

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр онкологии
имени Н.Н. Петрова»

Министерства здравоохранения Российской Федерации
(ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России)

Отдел учебно-методической работы

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Северо-Западный государственный
медицинский университет имени И.И. Мечникова»

Министерства здравоохранения Российской Федерации
(ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова Минздрава России)

Кафедра онкологии

**Новик В. И., Михетько А. А.,
Артемьева А. С., Рогачев М. В.**

Метод уточняющей цитологической диагностики цервикальной интраэпителиальной неоплазии шейки матки с помощью анализа микроизображений

Учебное пособие

Санкт-Петербург
2021

УДК:618.146-006.32-07(07)

ББК:57.15я7

Новик В. И., Михетько А. А., Артемьева А. С., Рогачев М. В. Метод уточняющей цитологической диагностики цервикальной интраэпителиальной неоплазии шейки матки с помощью анализа микроизображений: учебное пособие для обучающихся в системе высшего и дополнительного профессионального образования. – СПб.: ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, 2021. – 36 с.

ISBN 978-5-6045023-2-7

Рецензент: доктор медицинских наук, профессор А. Ф. Урманчеева, врач-онколог хирургического онкогинекологического отделения, ведущий научный сотрудник научного отделения онкогинекологии федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Петрова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

В учебном пособии представлен упрощенный медицинский метод уточнения цитологического диагноза цервикальной интраэпителиальной неоплазии (ЦИН) шейки матки с использованием цитологических препаратов, окрашенных гематоксилином и эозином, и применением компьютерной денситоморфометрии ядер атипических клеток (анализ микроизображений). Данный метод может быть использован для уточняющего цитологического диагноза различных степеней ЦИН шейки матки в трудных случаях, в том числе при расхождении цитологических и гистологических данных, а также для подтверждения цитологического диагноза ЦИН 3 степени при отрицательных данных гистологического исследования.

Учебное пособие предназначено для врачей-онкологов, врачей-гинекологов, врачей клинической лабораторной диагностики, цитологов, для врачей, работающих с онкологическими больными, а также для обучающихся в системе высшего образования (аспирантура, ординатура, специалитет) и дополнительного профессионального образования (повышение квалификации и профессиональная переподготовка).

Утверждено
в качестве учебного пособия
Ученым советом ФГБУ «НМИЦ онкологии
им. Н.Н. Петрова» Минздрава России
протокол № 2 от 16 февраля 2021 г.

ISBN 978-5-6045023-2-7

©Новик В. И. Коллектив авторов, 2021

СОДЕРЖАНИЕ

| | |
|---|----|
| Список сокращений | 5 |
| Введение | 6 |
| Глава 1. Показания и противопоказания к использованию метода уточняющей цитологической диагностики цервикальной интраэпителиальной неоплазии шейки матки с помощью анализа микроизображений | 8 |
| 1.1. Показания к использованию метода | 8 |
| 1.2. Противопоказания к использованию метода | 8 |
| Глава 2. Материально-техническое обеспечение метода уточняющей цитологической диагностики цервикальной интраэпителиальной неоплазии шейки матки с помощью анализа микроизображений | 9 |
| Глава 3. Характеристика метода уточняющей цитологической диагностики цервикальной интраэпителиальной неоплазии шейки матки с помощью анализа микроизображений | 10 |
| 3.1. Обработка и окраска цитологических препаратов | 10 |
| 3.2. Получение изображений и проведение измерений | 11 |
| Глава 4. Денситоморфометрические критерии для разделения различных стадий ЦИН | 14 |
| Глава 5. Возможные ошибки при использовании метода уточняющей цитологической диагностики цервикальной интраэпителиальной неоплазии шейки матки с помощью анализа микроизображений | 22 |

| | |
|--|----|
| Глава 6. Эффективность использования метода уточняющей цитологической диагностики цервикальной интраэпителиальной неоплазии шейки матки с помощью анализа микроизображений | 23 |
| Контрольные вопросы | 25 |
| Тестовые задания | 28 |
| Список литературы | 36 |

Список сокращений

| | |
|--------|---|
| ВД | – выраженная дисплазия |
| ГЭ | – гематоксилин-эозин |
| ДНК | – дезоксирибонуклеиновая кислота |
| ИОП | – интегральная оптическая плотность |
| КИС | – карцинома in situ |
| МПЭ | – многослойный плоский эпителий |
| РШМ | – рак шейки матки |
| СД | – слабая дисплазия |
| УД | – умеренная дисплазия |
| ЦИН | – цервикальная интраэпителиальная неоплазия |
| ASC-H | – atypical squamous cells undetermined significance cannot exclude HSIL (атипические плоские клетки неясного значения, не позволяющие исключить HSIL) |
| ASC-US | – atypical squamous cells of undetermined significance (атипические плоские клетки неясного значения) |
| HSIL | – High-Grade squamous intraepithelial lesion (высокой степени плоскоклеточное интраэпителиальное поражение) |
| LSIL | – Low-Grade squamous intraepithelial lesion (низкой степени плоскоклеточное интраэпителиальное поражение) |

Введение

Развитию инвазивного плоскоклеточного рака шейки матки в большинстве случаев предшествует цервикальная интраэпителиальная неоплазия (ЦИН), которая разделяется на 3 степени:

ЦИН1 – слабая дисплазия многослойного плоского эпителия (МПЭ),

ЦИН2 – умеренная дисплазия МПЭ,

ЦИН3 – выраженная дисплазия МПЭ и карцинома *in situ*.

По существу, эта морфологическая классификация соответствует стадиям развития злокачественного процесса.

Гистологические и цитологические критерии диагностики ЦИН различаются.

При гистологическом исследовании основным критерием определения степени ЦИН является степень вовлеченности пласта МПЭ в патологический процесс. При ЦИН1 атипические клетки занимают нижнюю 1/3 часть пласта, при ЦИН2 – до 2/3 части пласта, при ЦИН3 – почти весь пласт.

При цитологическом исследовании критерием ЦИН является наличие в мазках клеток с признаками атипии, т.е. клеток с крупными и гиперхромными ядрами. При ЦИН1 таких клеток мало, и они в небольшой степени отличаются от нормальных клеток соответствующего слоя МПЭ, при ЦИН2 их больше и степень атипии выражена в большей степени, при ЦИН3 таких клеток может быть много и их трудно бывает отличить от клеток рака.

Такие нечеткие критерии в ряде случаев создают трудности в дифференциальной морфологической диагностике различной степени ЦИН и являются причиной расхождения диагнозов между разными специалистами, а также между цитологическим и гистологическим диагнозом.

При углубленном обследовании выявленных больных окончательный морфологический диагноз устанавливается при гистологи-

ческом исследовании биопсийного и операционного материала. Это исследование считается «золотым стандартом».

Однако, как цитологический, так и гистологический материалы могут оказаться неинформативными, и не всегда цитологический диагноз ЦИН3, не подтвержденный при гистологическом исследовании, является гипердиагностикой.

На нашем материале (лаборатории цитологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России) при проведении денситоморфометрических исследований с определением ploидности ДНК ядер атипических клеток было показано, что в 56 (12%) из 468 наблюдений не подтверждение цитологического диагноза карциномы *in situ* шейки матки при гистологическом исследовании было связано не с ложноположительными цитологическими заключениями, а с установлением гистологического диагноза по неинформативному материалу [1].

Для объективизации критериев цитологической диагностики предлагаем в таких случаях применять метод уточняющей цитологической диагностики цервикальной интраэпителиальной неоплазии шейки матки в виде компьютерной денситоморфометрии с использованием анализа микроизображений.

Глава 1.

Показания и противопоказания к использованию метода уточняющей цитологической диагностики цервикальной интраэпителиальной неоплазии шейки матки с помощью анализа микроизображений

1.1. Показания к использованию метода

Показания к использованию метода уточняющей цитологической диагностики цервикальной интраэпителиальной неоплазии шейки матки с помощью анализа микроизображений следующие:

1. Уточняющая цитологическая диагностика различных стадий ЦИН, в том числе в случаях расхождения цитологических и гистологических данных.
2. Верификация цитологического диагноза ЦИН3 при отрицательных данных гистологического исследования.

1.2. Противопоказания к использованию метода

Противопоказания к использованию метода уточняющей цитологической диагностики цервикальной интраэпителиальной неоплазии шейки матки с помощью анализа микроизображений отсутствуют.

Глава 2.

Материально-техническое обеспечение метода уточняющей цитологической диагностики цервикальной интраэпителиальной неоплазии шейки матки с помощью анализа микроизображений

Медицинский метод уточняющей цитологической диагностики цервикальной интраэпителиальной неоплазии шейки матки с помощью анализа микроизображений может быть успешно применен в цитологических и гистологических лабораториях, оснащенных соответствующим оборудованием и набором стандартных реактивов.

Используется комплекс аппаратно-программной визуализации морфологических препаратов, анализа и регистрации оптических и морфометрических показателей «Видео-Тест» с программой «Видео-Тест Морфология» (Россия, ООО «Видео-Тест», Санкт-Петербург ОКПО 52154675; регистрационное удостоверение № ФСР 2012/13356 от 28.04.2012).

Аппаратный комплекс включает стандартный микроскоп со стабилизированным освещением и бинокулярной насадкой с видеовыходом, компьютер (не менее Pentium IV с процессором 1 МГц и выше), цифровую видеокамеру с высоким разрешением.

Программное обеспечение: программа «Видео-Тест Морфология» 5.2 (Россия, ООО «АргусСофт», Санкт-Петербург).

Глава 3.
Характеристика метода
уточняющей цитологической диагностики
цервикальной интраэпителиальной неоплазии
шейки матки с помощью анализа микроизображений

Метод уточняющей цитологической диагностики цервикальной интраэпителиальной неоплазии шейки матки с помощью анализа микроизображений включает в себя прохождение следующих этапов:

- обработки и окраски цитологических препаратов,
- получения изображений и проведения измерений.

3.1. Обработка и окраска цитологических препаратов

Для проведения денситоморфометрических измерений используются обычные традиционные цитологические препараты, приготовленные в виде мазков на предметных стеклах материала, полученного с помощью шпателя и цитологических щеток (Cytobrush) из шейки матки и цервикального канала, и окрашенные гематоксилином Майера и эозином (ГЭ). Для получения однородной окраски окрашивание препаратов необходимо проводить в цитостейнере.

В классических работах по денситоморфометрии измерения проводились на препаратах, окрашенных или переокрашенных по Фельгену, т.к. в специальных работах было показано, что интенсивность окраски ядер при этом методе прямо пропорциональна количеству ДНК. Однако такие препараты оказались мало пригодными для обычного микроскопического исследования. С другой стороны, гематоксилин является ядерным красителем, поэтому степень окраски ядер и увеличение их площади (интегральная оптическая плотность), конечно, коррелируют с содержанием ядерной ДНК.

Некоторые авторы [2] показали, что при проведении плоидометрических измерений на препаратах, окрашенных ГЭ и по Фельгену,

результаты совпадают. В дополнительных выборочных сравнительных исследованиях, в которых измерения производились как на мазках, окрашенных гематоксилином и эозином, так и после перекраски их по Фельгену, мы пришли к такому же заключению [3].

В качестве референтной клеточной популяции используются нормальные не пролиферирующие клетки многослойного плоского эпителия. Для определения диплоидного стандарта производят измерения непикиотичных ядер клеток поверхностного слоя многослойного плоского эпителия (со средним диаметром 6-8 микрометров), имеющихся в исследуемых препаратах (внутренний диплоидный стандарт) или в других препаратах, окрашенных при таких же условиях в цитостейнере. Цитологические препараты, подлежащие исследованию, должны быть заключены в канадский бальзам или другие среды и покрыты покровным стеклом.

3.2. Получение изображений и проведение измерений

Настраивают освещение микроскопа по Келлеру. Цветные микроизображения должны быть четкими (в фокусе) и достаточно контрастными. В процессе получения и сохранения изображений установленные параметры освещения и других опций не должны изменяться. Для записи микроизображений используются объективы, как правило, 40×. Сначала записывают микроизображения нормальных клеток для определения диплоидного стандарта (в пределах 30-40 ядер), затем изображения атипических клеток при исследовании всего препарата или двух препаратов (из шейки матки и цервикального канала). Изображения сохраняются в формате jpeg (можно использовать также форматы bmp и tiff).

Следующим этапом является трансформация цветных 24-битных изображений в черно-белые 8-битные изображения, которая осуществляется с помощью специального модуля программы ВидеоТест Морфология 5.2. Их можно сохранить в отдельной папке.

Перед проведением измерений необходимо произвести калибровку системы для измерения морфометрических параметров в микрометрах. Для этого используется записанное изображение объектива микрометра при выбранном увеличении и соответствующие команды программы измерения. Следующим этапом является определение стандарта плоидности с помощью специализированной методики «Плоидность. Стандарт». Для определения диплоидного стандарта измеряют черно-белые изображения ядер нормальных клеток.

После старта методики появляется сообщение о ее назначении. Далее задают необходимые установки методики – способ получения изображения и контроль достаточности данных. На открываемых изображениях указывают участки фона (околоядерные зоны).

Следующие этапы – выделение масок объектов по порогу яркости, редактирование объектов (разделение контактирующих ядер, добавление контуров и пр.) с помощью инструментов редактирования. Далее указывают ядра стандарта, которые будут учтены в расчете стандарта плоидности. Параметры этих измерений отражаются на панели «Ручной классификатор». Цикл набора клеток стандарта можно повторить при обработке дополнительных изображений. В результате автоматически будет создан классификатор для методики «Плоидность. Измерения».

При старте методики «Плоидность. Измерения» важным этапом является выбор параметров для автоматических измерений. Программа измерений предоставляет широкий выбор морфометрических и светооптических параметров, сведения о которых можно найти в сопровождающей справочной системе.

Наиболее значимыми и часто используемыми параметрами являются: площадь ядер, периметр, максимальный и минимальный диаметры (или длина и ширина), фактор формы круга, средняя яркость, отклонения яркости, средняя оптическая плотность, интегральная оптическая плотность и др. Интегральная оптическая плотность определяется как сумма локальных плотностей всех точек

(пикселей) ядра, измеряемых на 256 уровнях градации серого цвета от черного (0) до белого (255). Так как при окраске по Фельгену (или гематоксилином) интенсивность окраски ядер прямо пропорциональна содержанию ядерной ДНК, а на черно-белых полутоновых изображениях интенсивность окраски ядер соответствует их интегральной оптической плотности (ИОП), то этот показатель определяет содержание ДНК в относительных единицах. При выборе параметров автоматических измерений можно также задать нижний порог величины или площади измеряемых объектов.

Дальнейшие этапы работы методики аналогичны описанным выше: настройка методики, указание участков фона, выделение масок объектов по порогу яркости, редактирование объектов.

При ручном выделении масок правильность выделения контролируется в интерактивном режиме по изображению на мониторе. Участки неточного выделения масок ядер могут быть скорректированы вручную. Измерению подвергаются лишь изолированно расположенные ядра или соприкасающиеся ядра, между масками которых можно провести разделяющие границы («разрезать»). Маски накладывающихся друг на друга ядер и других посторонних элементов должны быть удалены.

В программе «Видео-Тест Морфология» имеется функция отброса от рамки изображения всех соприкасающихся с ней масок объектов. Для набора статистики цикл измерения объектов повторяется при обработке дополнительных изображений. Обычно в каждом случае измеряют от 100 до 200 ядер наиболее атипичических клеток.

После завершения измерений в окне программы отражаются результаты статистической обработки: диаграмма распределения измеренных параметров по заданным классам, данные статистики и таблица статистики. Эти данные могут быть сохранены в отдельном файле, распечатаны в виде стандартного бланка или отправлены в прилагаемую базу данных.

Глава 4.

Денситоморфометрические критерии для разделения различных стадий ЦИН

Для выработки денситоморфометрических критериев различных стадий ЦИН нами произведены ретроспективные цитогистологические сопоставления на материале, полученном от 52 пациенток.

После пересмотра цитологических и гистологических препаратов и оценки денситоморфометрических показателей выделены 4 группы наблюдений: слабая дисплазия (ЦИН1, СД) – 9 наблюдений, умеренная дисплазия (ЦИН2, УД) – 12 наблюдений, выраженная дисплазия (ЦИН3, ВД) – 16 и карцинома *in situ* (ЦИН3, КИС) – 15.

Результаты измерений представлены в таблице 1.

При сравнении полученных показателей с помощью программы Statgraphics Plus 5.1. установлено, что средняя ИОП атипических ядер при ЦИН1 ($3,6 \pm 0,3с$) достоверно ниже, чем при ЦИН2 ($4,1 \pm 0,2с$; $P < 0,05$), а при ЦИН2 значительно ниже, чем при ЦИН3 ($P < 0,00001$), тогда как в пределах ЦИН3 показатели ИОП при ВД и КИС (соответственно $5,7 \pm 0,2с$ и $5,9 \pm 0,6с$) существенно не различаются ($P > 0,1$). Такая же закономерность отмечена и при сравнении средних показателей пропорции клеток с плоидностью 5с и более.

Не выявлено достоверных различий средних показателей площади атипических ядер между ЦИН1 ($115 \pm 17,4 \text{ мкм}^2$), ЦИН2 ($118,4 \pm 6,8 \text{ мкм}^2$) и КИС ($126,4 \pm 16,4 \text{ мкм}^2$; $P > 0,1$).

При ВД средняя площадь атипических ядер ($151,7 \pm 11,4 \text{ мкм}^2$) была значительно выше, чем при ЦИН1 и ЦИН2 ($P < 0,00005$) и КИС ($P < 0,05$).

Наименьшая площадь атипических ядер ($84,6 \pm 6,9 \text{ мкм}^2$) отмечена в 3 наблюдениях низкодифференцированной (мелкоклеточной) КИС; показатели этих наблюдения в таблице выделены подчеркиванием.

Таблица 1

Результаты денситоморфометрических измерений
в различных группах ЦИН

| Критерии оценки | Группы | | | |
|--|---|---|---|---|
| | ЦИН-1 (слабая дисплазия) n=9 | ЦИН-2 (умеренная дисплазия) n=12 | ЦИН-3 (выраженная дисплазия) n=16 | ЦИН-3 (карцинома in situ) n=15 |
| Интегральная оптическая плотность (С) | 3,9; 3,9; 4,2; 4,2; 3,6; 3,1; 3,2; 3,4; 3,4 | 4,4; 4,4; 4,5; 3,9; 3,9; 4,1; 4,4; 3,6; 4,1; 3,6; 4,4; 4,1 | 5,4; 5,5; 5,6; 5,2; 5,7; 5,8; 5,7; 5,6; 5,5; 5,3; 6,8; 6,0; 5,1; 6,5; 5,5; 5,6 | 6,4; 6,5; <u>6,0</u> ; 6,0; 4,8; 4,6; 6,6; <u>4,6</u> ; 5,6; 8,8; 5,4; 4,9; <u>6,2</u> ; 6,0; 5,5 |
| ИОП (С) М ± м | 3,6 ± 0,3 | 4,1 ± 0,2 | 5,7 ± 0,2 | 5,9 ± 0,6 |
| Доля клеток с плоидностью ≥ 5 С (%) | 26,6; 21,7; 33,8; 30,2; 21,4; 10,0; 15,9; 15,7; 18,0; | 36,6; 31,8; 33,0; 27,9; 33,9; 32,8; 24,6; 27,6; 20,0; 27,7; 32,2; 28,6 | 60,0; 71,9; 61,3; 52,3; 73,6; 45,9; 67,2; 63,9; 55,3; 63,4; 84,7; 81,0; 51,8; 67,2; 68,9; 77,6 | 77,8; 72,9; <u>42,1</u> ; 75,0; 50,0; 50,0; 94,4; <u>47,1</u> ; 76,9; 100,0; 65,4; 54,1; <u>85,8</u> ; 65,3; 58,1 |
| Доля клеток с плоидностью ≥ 5 С (%) М ± м | 21,5 ± 5,8 | 29,7 ± 2,9 | 65,4 ± 5,8 | 67,7 ± 9,8 |
| Средняя площадь ядер (мкм ²) | 99,6; 137,8; 87,4; 104,4; 106,4; 158,3; 123,4; 126,2; 97,1 | 126,7; 113,4; 110,5; 134,0; 103,8; 126,7; 113,7; 107,3; 107,9; 120,7; 119,7; 136,2 | 171,7; 134,5; 142,4; 136,0; 145,2; 152,4; 170,0; 122,7; 150,5; 192,5; 161,0; 154,7; 145,8; 191,6; 136,0; 119,6 | 168,6; 153,3; <u>87,7</u> ; 135,4; 116,1; 103,2; 121,4; <u>83,2</u> ; 110,9; 175,6; 129,7; 130,3; <u>82,8</u> ; 151,3; 146,7 |
| Средняя площадь ядер (мкм ²) М ± м | 115,6 ± 17,4 | 118,4 ± 6,8 | 151,7 ± 11,4 | 126,4 ± 16,4 |

Примечания:

Подчеркиванием выделены показатели мелкоклеточной КИС.

ЦИН – цервикальная интраэпителиальная неоплазия.

ИОП – интегральная оптическая плотность.

Однако средние показатели ИОП ($5,6 \pm 2,2$ с) и пропорции ядер с плоидностью 5с и более ($58,3 \pm 59,4\%$) в этих наблюдениях были

значительно более высокими, чем при ЦИН1 и ЦИН2 ($P < 0,005$), и достоверно не отличались от таковых при ВД и КИС ($P > 0,1$).

Наиболее высокая степень достоверности различия всех измеренных данных отмечена при объединении показателей ЦИН1 и ЦИН2 и сравнении их с соответствующими показателями ЦИН3 (ВД + КИС).

Так, ИОП атипических ядер при ЦИН1-2 ($3,9 \pm 0,2с$) была значительно ниже, чем при ЦИН3 ($5,8 \pm 0,3с$; $P=0,0$), пропорция атипических клеток с плоидностью 5с и более при ЦИН1-2 ($26,2 \pm 3,3\%$) – значительно ниже, чем при ЦИН3 ($66,5 \pm 5,3\%$; $P=0,0$), площадь атипических ядер при ЦИН 1-2 ($117,2 \pm 7,5 \text{ мкм}^2$) – значительно ниже, чем при ЦИН3 ($139,4 \pm 10,4 \text{ мкм}^2$; $P=0,002$).

Наглядно результаты измерений ИОП и количества ядер с плоидностью 5с и более представлены в диаграмме (рис.1).

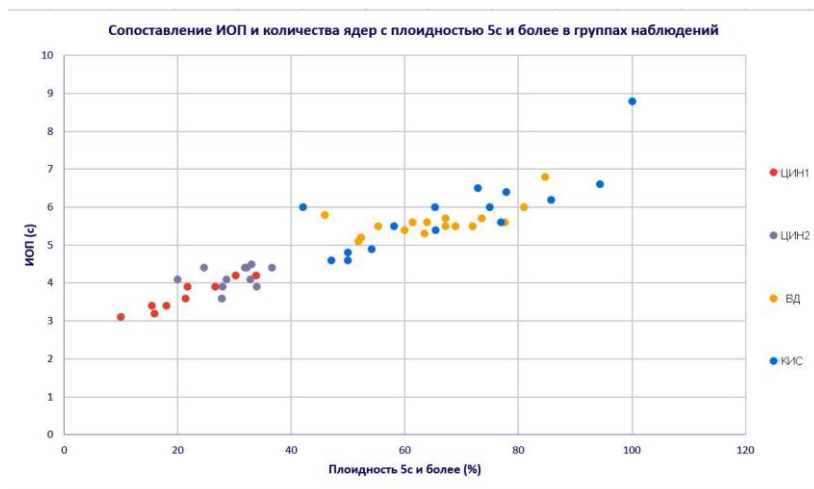


Рис. 1. Диаграмма распределения средних показателей интегральной оптической плотности и количества ядер с плоидностью 5с и более.

Для разграничения ЦИН1-2 от ЦИН3 (ВД и КИС) можно использовать следующие пороговые значения: ИОП атипических ядер = 4,5с и пропорция атипических ядер с плоидностью 5с и более = 40%. Если

при измерении атипических ядер полученные данные меньше этих показателей, предполагается наличие ЦИН1-2, если больше – ЦИН3.

Средняя площадь атипических ядер на нашем материале оказалась недостаточно надежным дифференциально-диагностическим признаком из-за значительного перекрытия полученных показателей в различных группах ЦИН.

Применение анализа микроизображений позволило в 18 (34,6%) из 52 наблюдений уточнить морфологический диагноз, в том числе при расхождении гистологических и цитологических данных. Так, в 3 наблюдениях цитологический диагноз ЦИН1 после проведения денситоморфометрии был изменен на ЦИН2, еще в 3 – на ЦИН3. У 2 женщин при цитологическом исследовании диагностирована ЦИН2, при гистологическом исследовании установлено наличие ЦИН3, и этот диагноз был подтвержден данными анализа микроизображений. В одном наблюдении при похожей ситуации данные денситоморфометрии подтвердили цитологический диагноз ЦИН2 (рис. 2).

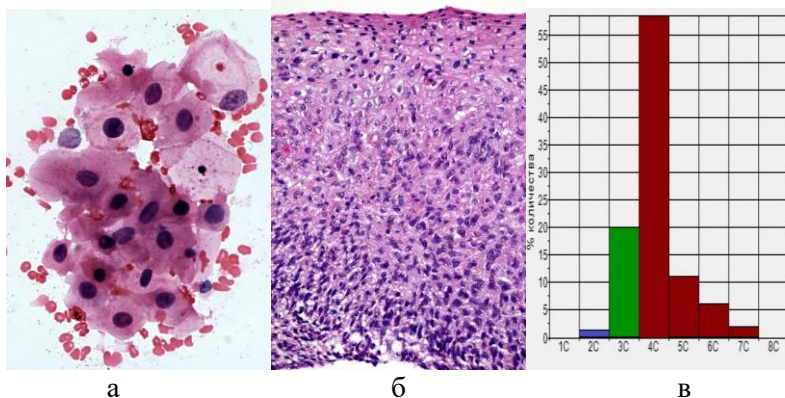


Рис. 2. Данные обследования больной Д., 40 лет: а – клетки с признаками ЦИН2 в мазке из шейки матки; б – пласт клеток многослойного плоского эпителия с дисплазией, расцененной как ЦИН3; в – гистограмма распределения ИОП. Средняя ИОП – 4,1с; доля ядер с плоидностью 5с и более – 20%; средняя площадь ядер – 107,9 мкм². Данные соответствуют ЦИН2. Окраска гематоксилином и эозином (ГЭ), ув. обь. а – 40×, б – 20×.

В одном случае установлен цитологический диагноз ЦИН2, при гистологическом исследовании конуса диагностирована ЦИН1, по результатам денситометрического анализа установлена ЦИН3 и этот диагноз был подтвержден при пересмотре препаратов (рис. 3).

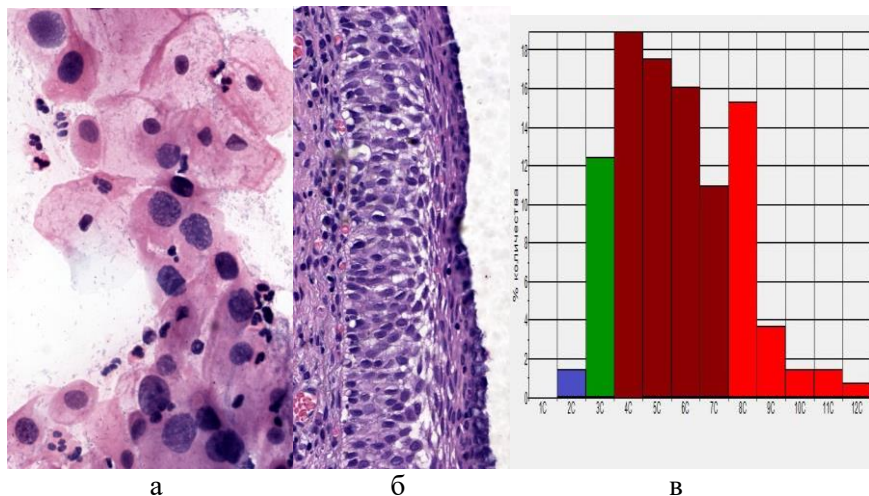


Рис. 3. Данные обследования больной М., 33 лет: а – клетки с атипией, ошибочно расцененной как ЦИН2; б – пласт клеток с атипией, ошибочно расцененной как ЦИН1; в – гистограмма распределения ИОП. Средняя ИОП – 5,7с; доля клеток с плоидностью 5с и более – 67,2%; средняя площадь ядер – 170,0 мкм². Данные соответствуют ЦИН3. Окраска ГЭ, ув. объ. а – 40×, б – 20×.

В 7 наблюдениях цитологически предполагалось наличие у пациентов ЦИН3, при гистологическом исследовании материала конусовидной эксцизии установлен диагноз ЦИН2, результаты денситоморфометрии указывали на наличие ЦИН3 (рис. 4, 5).

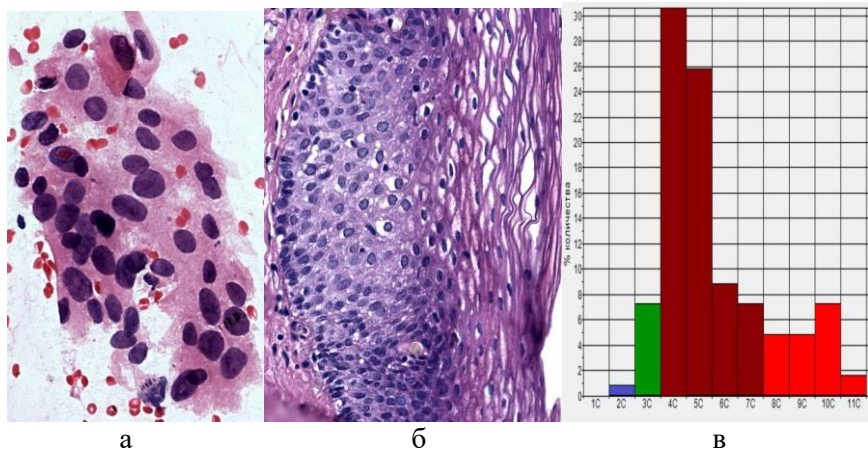
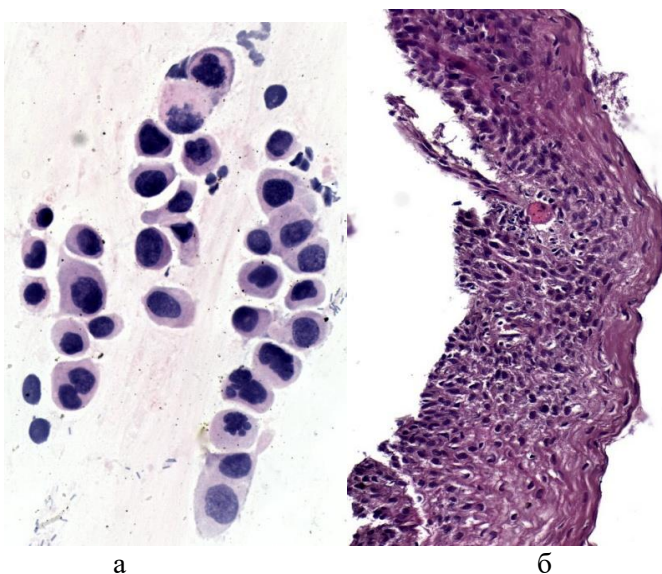
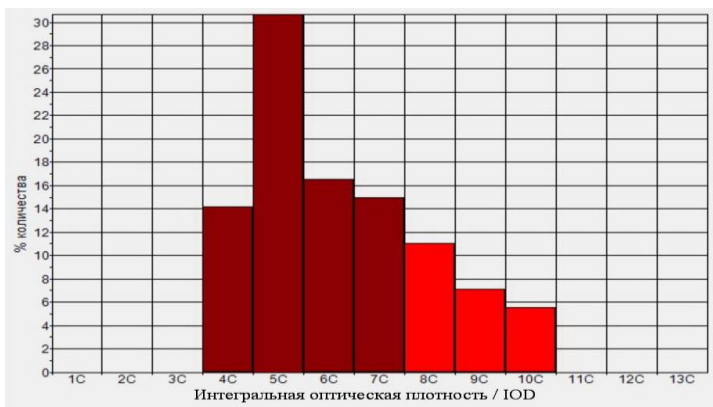


Рис. 4. Данные обследования больной З., 48 лет: а – пласт клеток с признаками ЦИН3 в мазке из шейки матки; б – пласт многослойного плоского эпителия с умеренной дисплазией (ЦИН2); в – гистограмма распределения ИОП. Средняя ИОП – 5,6с; пропорция ядер с плоидностью 5с и более – 61,3%; средняя площадь ядер – 142,4 мкм². Данные соответствуют ЦИН3. Окраска ГЭ, ув. обь. а – 40×, б – 20×.

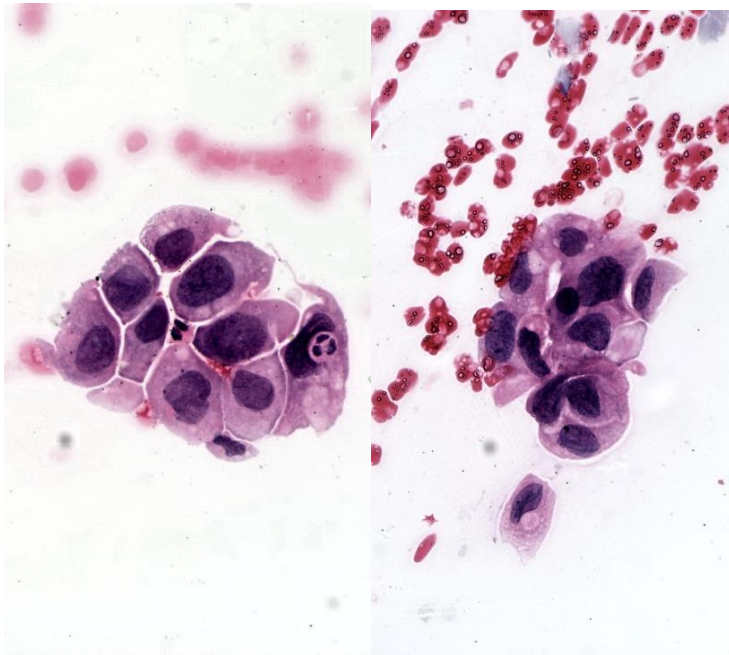




В

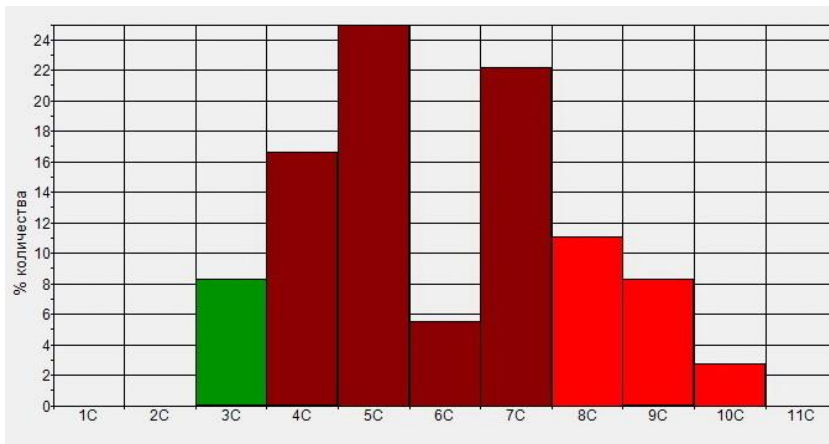
Рис. 5. Данные обследования больной Х., 45 лет: а – скопления атипических клеток, расцененных как элементы низкодифференцированной карциномы *in situ*; б – пласт клеток с признаками ЦИН2; в – гистограмма распределения ИОП. Средняя ИОП – 6,2 с, пропорция ядер с плоидностью 5с и более – 85,8%, средняя площадь ядер – 82,8 мкм². Данные соответствуют ЦИН3. Окраска ГЭ, ув. объ. а – 40×, б – 20×.

У одной пациентки 29 лет с клиническим диагнозом лимфома Ходжкина при цитологическом исследовании мазков из шейки матки обнаружены пласты клеток с выраженной атипией, расцененные как элементы карциномы *in situ* (ЦИН3). При гистологическом исследовании материала конусовидной эксцизии обнаружены лишь участки эпителия с признаками плоскоклеточной метаплазии. Результаты анализа микроизображений цитологических препаратов соответствовали наличию злокачественного процесса (рис. 6).



а

б



в

Рис. 6. Данные обследования больной Д., 29 лет: а – пласты атипических клеток, расцененные как элементы КИС; б – гистограмма распределения ИОП. Средняя ИОП – 6,0; пропорция клеток с плоидностью 5с и более – 75%; средняя площадь атипических ядер – 235,4 мкм². Данные соответствуют ЦИНЗ. Окраска ГЭ, ув. объ. 40×.

Глава 5.
Возможные ошибки при использовании
метода уточняющей цитологической диагностики
цервикальной интраэпителиальной неоплазии шейки матки
с помощью анализа микроизображений

При использовании метода уточняющей цитологической диагностики цервикальной интраэпителиальной неоплазии шейки матки с помощью анализа микроизображений могут наблюдаться неадекватные результаты денситоморфометрического исследования из-за неправильного отбора объектов для измерения.

Денситоморфометрические исследования должны производиться обученным персоналом.

Для измерения необходимо отбирать наиболее атипичные ядра, имеющиеся в мазках.

Глава 6.

Эффективность использования метода уточняющей цитологической диагностики цервикальной интраэпителиальной неоплазии шейки матки с помощью анализа микроизображений

Разработанный нами метод денситоморфометрии при использовании цитологических препаратов, окрашенных гематоксилином и эозином вместо переокраски их по Фельгену, позволил упростить и сократить процедуру подготовки препаратов и получения микроизображений для исследования.

Это дало возможность сохранить цитологические препараты в архиве для возможного повторного пересмотра и создания учебных коллекций, а записанные и сохраненные цветные микроизображения также использовать для учебных целей.

Уточнены наиболее информативные критерии для дифференциальной цитологической диагностики различных стадий ЦИН. Пороговыми значениями для разделения ЦИН1-2 от ЦИН3 оказались следующие показатели: ИОП атипических ядер равна 4,5с и пропорция атипических ядер с плоидностью 5с и более – 40%.

Использование этого дополнительного метода исследования может быть полезным для уточняющей цитологической диагностики HSIL, разделения ЦИН2 от ЦИН3 особенно у молодых женщин, желающих сохранить фертильность. Если у них подтверждается наличие ЦИН2, то предпочтительным выбором является более щадящее консервативное лечение (антибактериальная, противовирусная терапия, иммуномодуляторы, возможно, лазерная деструкция ацетобелых пятен и т.д.) с последующим цитологическим контролем, т.к. при проведении конизации шейки матки в некоторых случаях могут отмечаться осложнения течения беременности (выкидыши, преждевременные роды и др.).

При подтверждении ЦИН3 показано более радикальное лечение

(конизация шейки матки).

При расхождении данных цитологического и гистологического исследований для уточнения степени ЦИН и для верификации цитологического диагноза ЦИН3 при отрицательных гистологических данных также показано использование разработанной методики денситоморфометрии. На нашем материале использование анализа микроизображений позволило уточнить степень ЦИН более, чем у 30% обследованных пациентов.

Контрольные вопросы

1. Скрининг. Определение. Требования к скрининговым тестам.
2. Методологические основы цитологического скрининга рака шейки матки.
3. История проведения цитологического скрининга рака шейки матки.
4. Организованный и неорганизованный цитологический скрининг рака шейки матки.
5. Факторы эффективности скрининга рака шейки матки: процент охвата скринингом женского населения, периодичность проведения скрининга, организационные вопросы.
6. Альтернативные методы скрининга рака шейки матки.
7. Способы получения материала для цитологического исследования шейки матки.
8. Условия получения полноценного материала.
9. Оценка качества цитологического мазка.
10. Контроль качества цитологического исследования.
11. Возможные причины получения неполноценного материала из шейки матки.
12. Инструменты для взятия материала из шейки матки.
13. Традиционные и современные методы приготовления цитологических препаратов.
14. Методы фиксации цитологического материала.
15. Методы окраски цитологического материала.
16. Цитологические критерии злокачественности клеток.
17. Цитологические классификации поражений шейки матки.
18. Классификация Bethesda изменений эпителия шейки матки.
19. Цитологические особенности клеток эпителия шейки матки.
20. Цитология шейки матки в норме.
21. Цитологическая характеристика клеток поверхностного слоя многослойного плоского эпителия шейки матки.
22. Цитологическая характеристика клеток промежуточного слоя многослойного плоского эпителия шейки матки.
23. Цитологическая характеристика клеток парабазального слоя многослойного плоского эпителия шейки матки.

24. Цитологическая характеристика клеток базального слоя многослойного плоского эпителия шейки матки
25. Цитологическая характеристика эпителия шейки матки в репродуктивном периоде.
26. Цитологическая характеристика эпителия шейки матки при беременности
27. Цитологическая характеристика эпителия шейки матки в послеродовом периоде.
28. Цитологическая характеристика эпителия шейки матки в менопаузе.
29. Нормальная микрофлора влагалища и шейки матки.
30. Цитологическая картина бактериального вагиноза.
31. Цитологическая характеристика «ключевых клеток» при бактериальном вагинозе.
32. Цитологическая картина трихомонадного кольпита.
33. Цитологическая картина грибковых поражений шейки матки.
34. Цитологическая картина хламидийной инфекции шейки матки.
35. Цитологическая картина герпесвирусной инфекции шейки матки.
36. Цитологическая картина цитомегаловирусной инфекции эпителия шейки матки.
37. Цитологическая картина актиномикоза шейки матки.
38. Цитологическая характеристика плоскоклеточной метаплазии эпителия шейки матки.
39. Этапы развития плоскоклеточной метаплазии.
40. Цитологическая характеристика лейкоплакии шейки матки.
41. Цитологическая картина паракератоза эпителия шейки матки.
42. Цитологическая картина дискератоза эпителия шейки матки.
43. Цитологическая характеристика репаративных процессов в шейке матки.
44. Цитологическая характеристика дегенеративных процессов в эпителии шейки матки.
45. Цитологическая характеристика реактивных изменений эпителия шейки матки.

46. Цитологическая диагностика резервноклеточной гиперплазии эпителия шейки матки.
47. Цитологическая картина фолликулярного цервицита.
48. Внутриэпителиальная неоплазия (дисплазия) эпителия шейки матки. Определение. Степени выраженности внутриэпителиальных изменений.
49. Биологические особенности цервикальной интраэпителиальной неоплазии.
50. Цитологические признаки слабо выраженных интраэпителиальных изменений (LSIL).
51. Цитологические признаки папилломавирусной инфекции.
52. Койлоцитарная атипия эпителия шейки матки.
53. Атипия неясного значения (ASC-US и ASC-H).
54. Цитологическая характеристика выраженных интраэпителиальных изменений эпителия шейки матки (HSIL).
55. Внутриэпителиальная неоплазия железистого эпителия.
56. Цитологическая картина плоскоклеточной карциномы *in situ* шейки матки.
57. Цитологическая картина аденокарциномы *in situ* шейки матки
58. Классификация злокачественных опухолей шейки матки.
59. Цитологическая картина микроинвазивного рака шейки матки.
60. Цитологическая диагностика плоскоклеточного ороговевающего рака шейки матки.
61. Цитологическая картина плоскоклеточного неороговевающего рака шейки матки.
62. Цитологическая картина плоскоклеточного рака из мелких клеток.
63. Цитологическая диагностика аденокарциномы шейки матки.
64. Цитологическая диагностика светлоклеточного рака шейки матки.
65. Цитологическая диагностика неэпителиальных злокачественных опухолей шейки матки.
66. Цитологическая диагностика метастатических опухолей шейки матки.

Тестовые задания

Инструкция: выберите один или несколько правильных ответов.

1. Первичная профилактика рака шейки матки включает

| Поле для выбора ответа | Варианты ответов | Поле для отметки правильного ответа (+) |
|------------------------|-----------------------------------|---|
| а | вакцинация против HPV-инфекции | + |
| б | цитологический скрининг | |
| в | кольпоскопия | |
| г | борьба с курением | + |
| д | пропаганда здорового образа жизни | + |

2. Вторичная профилактика рака шейки матки включает

| Поле для выбора ответа | Варианты ответов | Поле для отметки правильного ответа (+) |
|------------------------|--|---|
| а | вакцинация против HPV-инфекции | |
| б | цитологический скрининг | + |
| в | своевременное выявление рецидивов рака шейки матки | |
| г | борьба с курением | |
| д | пропаганда здорового образа жизни | |

3. Основные требования к скрининговым тестам

| Поле для выбора ответа | Варианты ответов | Поле для отметки правильного ответа (+) |
|------------------------|----------------------------|---|
| а | безопасность для пациента | + |
| б | экономическая дешевизна | + |
| в | простота выполнения | + |
| г | воспроизводимость | + |
| д | диагностическая надежность | + |

4. Критериями эффективности скрининга РШМ являются

| Поле для выбора ответа | Варианты ответов | Поле для отметки правильного ответа (+) |
|------------------------|--|---|
| а | снижение заболеваемости | + |
| б | увеличение заболеваемости | |
| в | снижение смертности | + |
| г | увеличение смертности | |
| д | снижение доли запущенных стадий РШМ в структуре заболеваемости | + |

5. Эффективность цитологического скрининга РШМ зависит от

| Поле для выбора ответа | Варианты ответов | Поле для отметки правильного ответа (+) |
|------------------------|--|---|
| а | широты охвата скринингом населения | + |
| б | периодичности проведения скрининга | + |
| в | квалификации лаборантов и врачей-цитологов, выполняющих исследования | + |
| г | способа забора материала для исследования | + |
| д | адекватного обследования и лечения лиц с выявленной патологией | + |

6. Наиболее информативный скрининг-тест для ранней диагностики рака шейки матки

| Поле для выбора ответа | Варианты ответов | Поле для отметки правильного ответа (+) |
|------------------------|---|---|
| а | простая кольпоскопия | |
| б | бимануальное ректовагинальное исследование | |
| в | цитологическое исследование мазков с поверхности шейки матки и канала шейки матки | + |
| г | вакуум-кюретаж канала шейки матки | |
| д | цитологическое исследование эндометриального аспирата | |

7. Методы окраски цитологических препаратов, пригодные для проведения скрининга

| Поле для выбора ответа | Варианты ответов | Поле для отметки правильного ответа (+) |
|------------------------|--|---|
| а | гематоксилин и эозин | + |
| б | азур-эозин | + |
| в | окраска по Папаниколау | + |
| г | альциановый синий | + |
| д | акридин оранжевый (люминесцентная микроскопия) | + |

8. Эпителий экзоцервикса

| Поле для выбора ответа | Варианты ответов | Поле для отметки правильного ответа (+) |
|------------------------|--------------------------------------|---|
| а | многослойный плоский ороговевающий | |
| б | многослойный плоский неороговевающий | + |
| в | цилиндрический | |
| г | переходный | |
| д | кубический | |

9. Методы окраски цитологических препаратов, пригодные для проведения денситоморфометрии

| Поле для выбора ответа | Варианты ответов | Поле для отметки правильного ответа (+) |
|------------------------|------------------------|---|
| а | гематоксилин и эозин | + |
| б | азур-эозин | |
| в | окраска по Папаниколау | |
| г | альциановый синий | |
| д | окраска по Фельгену | + |

10. Эпителий эндоцервикса

| Поле для выбора ответа | Варианты ответов | Поле для отметки правильного ответа (+) |
|------------------------|--------------------------------------|---|
| а | многослойный плоский ороговевающий | |
| б | многослойный плоский неороговевающий | |
| в | цилиндрический | + |
| г | переходный | |
| д | кубический | |

11. Характерными для бактериального вагиноза выявляются

| Поле для выбора ответа | Варианты ответов | Поле для отметки правильного ответа (+) |
|------------------------|---|---|
| а | многоядерные клетки плоского эпителия | |
| б | «ключевые клетки» | + |
| в | клетки плоского эпителия с гиперхромными ядрами | |
| г | обилие нейтрофилов | |
| д | клетки призматического эпителия | |

12. Для диагностики поражения грибом рода *Candida* характерно выявление

| Поле для выбора ответа | Варианты ответов | Поле для отметки правильного ответа (+) |
|------------------------|----------------------------------|---|
| а | нейтрофилов | |
| б | лактобацилл | |
| в | бластоспор гриба | |
| г | почкующихся форм и псевдомицелия | + |
| д | базофилов | |

13. Для фолликулярного цервицита характерно обнаружение

| Поле для выбора ответа | Варианты ответов | Поле для отметки правильного ответа (+) |
|------------------------|--|---|
| а | нейтрофилов | |
| б | макрофагов | |
| в | лимфоидных клеток различной степени зрелости | + |
| г | базофилов | |
| д | эозинофилов | |

14. Для лейкоплакии характерно присутствие в мазках

| Поле для выбора ответа | Варианты ответов | Поле для отметки правильного ответа (+) |
|------------------------|--|---|
| а | большого числа клеток со светлой цитоплазмой | |
| б | ороговевающих безъядерных клеток | + |
| в | метаплазированных клеток | |
| г | резервных клеток | |
| д | базофилов | |

15. Для атрофического типа мазка характерно присутствие клеток

| Поле для выбора ответа | Варианты ответов | Поле для отметки правильного ответа (+) |
|------------------------|---|---|
| а | поверхностного слоя с пикнотическими ядрами | |
| б | поверхностного слоя с крупным ядром | |
| в | межуточного слоя | |
| г | парабазального слоя | + |
| д | всех слоев одновременно | |

16. Признаки эстрогенной стимуляции влагиалищного эпителия

| Поле для выбора ответа | Варианты ответов | Поле для отметки правильного ответа (+) |
|------------------------|--|---|
| а | преобладание клеток поверхностного слоя эпителия | + |
| б | раздельное расположение клеток | + |
| в | пикноз ядер | + |
| г | расправление края полигональных клеток | + |
| д | полиморфизм ядер | |

17. Для поражения вирусом простого герпеса характерно наличие в мазках

| Поле для выбора ответа | Варианты ответов | Поле для отметки правильного ответа (+) |
|------------------------|---|---|
| а | многочисленных лейкоцитов | |
| б | метаплазированного эпителия | |
| в | многоядерных клеток с тесным расположением ядер | + |
| г | койлоцитов и дискератиноцитов | |
| д | макрофагов | |

18. Для выявления поражения вирусом папилломы человека характерно обнаружение

| Поле для выбора ответа | Варианты ответов | Поле для отметки правильного ответа (+) |
|------------------------|-------------------------------|---|
| а | многоядерных клеток | |
| б | «ключевых клеток» | |
| в | метаплазированных клеток | |
| г | койлоцитов и дискератиноцитов | + |
| д | эозинофильных лейкоцитов | |

19. Для дисплазии эпителия характерно

| Поле для выбора ответа | Варианты ответов | Поле для отметки правильного ответа (+) |
|------------------------|---|---|
| а | нарушения пролиферации и дифференцировки клеток | + |
| б | распространение процесса за базальную мембрану | |
| в | клеточная и ядерная атипия | + |
| г | нарушение гистоархитектоники ткани | + |
| д | атрофические изменения эпителия | |

20. Слабо выраженная дисплазия характеризуется

| Поле для выбора ответа | Варианты ответов | Поле для отметки правильного ответа (+) |
|------------------------|---|---|
| а | глубиной поражения 1/3 эпителиального пласта | + |
| б | поражением от 1/3 до 2/3 эпителиального пласта | |
| в | поражением всей толщи эпителиального пласта | |
| г | отсутствием деления многослойного плоского эпителия на слои | |
| д | прорастанием базальной мембраны | |

21. Умеренно выраженная дисплазия характеризуется

| Поле для выбора ответа | Варианты ответов | Поле для отметки правильного ответа (+) |
|------------------------|---|---|
| а | глубиной поражения 1/3 эпителиального пласта | |
| б | поражением от 1/3 до 2/3 эпителиального пласта | + |
| в | поражением всей толщи эпителиального пласта | |
| г | отсутствием деления многослойного плоского эпителия на слои | |
| д | проращением базальной мембраны | |

22. Выявленная дисплазия характеризуется:

| Поле для выбора ответа | Варианты ответов | Поле для отметки правильного ответа (+) |
|------------------------|---|---|
| а | глубиной поражения 1/3 эпителиального пласта | |
| б | поражением от 1/3 до 2/3 эпителиального пласта | |
| в | поражением всей толщи эпителиального пласта | + |
| г | отсутствием деления многослойного плоского эпителия на слои | + |
| д | проращением базальной мембраны | |

23. Для карциномы *in situ* шейки матки характерен фон мазка

| Поле для выбора ответа | Варианты ответов | Поле для отметки правильного ответа (+) |
|------------------------|--------------------------------------|---|
| а | воспалительный | |
| б | слизистый | |
| в | грязный, содержащий клеточный детрит | |
| г | чистый | + |
| д | гистиоциты, фибробласты, фиброциты | |

24. Цитологический диагноз карциномы *in situ* шейки матки устанавливают по следующим признакам

| Поле для выбора ответа | Варианты ответов | Поле для отметки правильного ответа (+) |
|------------------------|---|---|
| а | чистый фон мазка | + |
| б | расположение атипичных клеток в один слой | + |
| в | однообразие форм опухолевых клеток | + |
| г | отсутствие уродливых клеток | + |
| д | присутствие уродливых клеток | |

25. Характерными признаками злокачественных клеток являются

| Поле для выбора ответа | Варианты ответов | Поле для отметки правильного ответа (+) |
|------------------------|---|---|
| а | увеличение размеров ядер | + |
| б | увеличение ядерно-цитоплазматического соотношения | + |
| в | полиморфизм клеток | + |
| г | анизохромия | + |
| д | гиперхромия ядер | + |

26. Комплексы раковых клеток отличают следующие признаки

| Поле для выбора ответа | Варианты ответов | Поле для отметки правильного ответа (+) |
|------------------------|------------------------------------|---|
| а | многослойность клеточных структур | + |
| б | ослабление межклеточных связей | + |
| в | беспорядочное нагромождение клеток | + |
| г | клеточный полиморфизм | + |
| д | ядерный полиморфизм | + |

27. Формы рака не встречающиеся в шейке матки

| Поле для выбора ответа | Варианты ответов | Поле для отметки правильного ответа (+) |
|------------------------|-------------------------------------|---|
| а | плоскоклеточный ороговевающий рак | |
| б | плоскоклеточный неороговевающий рак | |
| в | аденокарцинома | |
| г | переходноклеточный рак | + |
| д | светлоклеточный рак | |

28. Для плоскоклеточного ороговевающего рака характерно:

| Поле для выбора ответа | Варианты ответов | Поле для отметки правильного ответа (+) |
|------------------------|----------------------------------|---|
| а | мономорфный клеточный состав | |
| б | выраженный клеточный полиморфизм | + |
| в | мелкая вакуолизация в цитоплазме | |
| г | плотная блестящая цитоплазма | + |
| д | гиперхромия ядер | + |

29. Для плоскоклеточного неороговевающего рака характерно

| Поле для выбора ответа | Варианты ответов | Поле для отметки правильного ответа (+) |
|------------------------|----------------------------------|---|
| а | мономорфный клеточный состав | + |
| б | выраженный клеточный полиморфизм | |
| в | мелкая вакуолизация в цитоплазме | |
| г | плотная блестящая цитоплазма | |
| д | гиперхромия ядер | + |

30. Для аденокарциномы шейки матки характерно:

| Поле для выбора ответа | Варианты ответов | Поле для отметки правильного ответа (+) |
|------------------------|---|---|
| а | изолированное расположение клеток | |
| б | формирование комплексов, железистоподобных структур, розеток, сосочковых структур | + |
| в | заметные ядрышки | + |
| г | тонкодисперсный хроматин | + |
| д | грубый глыбчатый хроматин | |

Список литературы

1. Новик В. И. и соавт. Метод верификация цитологического диагноза карциномы *in situ* шейки матки при расхождении его с гистологическими данными (Медицинская технология) / Санкт-Петербург, 2012. – 18 с.

2. Автандилов Г. Г., Купрюшина Н. В. Гистоплоидометрическая диагностика новообразований желудка по биоптатам: руководство. Новые гистоцитологические технологии. Книга 4. – Москва: РМА-ПО, 2008. – 126 с.

3. Новик В. И. Использование анализа микроизображений как метода уточняющей цитологической диагностики цервикальной интраэпителиальной неоплазии шейки матки // Новости клинической цитологии России. – 2019. – Т. 23, № 2. – С. 12-16.

ISBN 978-5-6045023-2-7



Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр онкологии
имени Н.Н. Петрова»
Министерства здравоохранения Российской Федерации
(ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России)
Отдел учебно-методической работы