



Универзитет „Гоце Делчев“ – Штип

Факултет за медицински науки

Дипломиран лаборант – специјализација за хемиско-биохемиска лабораторија

Лепа Богдановска

**ВАЖНОСТА НА ПАП-ТЕСТОТ
КАКО ЦИТОЛОШКА СКРИНИНГ-МЕТОДА**

-специјалистички труд-

Штип, 2018

Лепа Богдановска

ВАЖНОСТА НА ПАП-ТЕСТОТ
КАКО ЦИТОЛОШКА СКРИНИНГ-МЕТОДА

Универзитет „Гоце Делчев” – Штип

Ментор: проф. д-р Невенка Величкова

Факултет за медицински науки

Комисија за оценка и одбрана:

Претседател: проф. д-р Ѓорѓи Шуманов

Член: проф. д-р Ленче Милошева

Член: проф. д-р Невенка Величкова

Благодарност:

Некогаш, едноставно, човек не може да разбере која е таа врска помеѓу некои лица којашто трае долго, долго време, а и ќе трае уште многу. Врска којашто со ништо не може да се замени, врска на искрено пријателство. Ти благодарам за Твојата безрезервна поддршка и сила којашто ми ја даваше во секој момент. Ти благодарам за Твоите несебични вложувања и професионализам во изработката на овој труд. Ова е за мојот ментор проф. д-р. Невенка Величкова.ТИ БЛАГОДАРАМ ЗА СÈ!

Голема благодарност и до моето семејство и моите родители, коишто секогаш беа директно поврзани со сите згоди и незгоди кои ме следеа во животот и секогаш со нив излегував како добитник.

Му благодарам на Бога што ми даваше сила и истрајност за сè.

Со почит до сите вас.

СОДРЖИНА

1. Воведен дел	6
1.1 Предмет на опсервација во цитологијата	6
1.2 Поделба на цитологијата	8
1.3 Постапки и методи во цитологијата.....	9
1.3.1 Боење по Хематоксилин и еозин - H & E (Hematoxylin и Eosin).....	9
1.3.2 Метахромазија	10
1.3.3 Ензимска дигестија	11
1.3.4 Ензимска хистохемија	11
1.3.5 Имуноцитохемија.....	12
1.3.6 Авторадиографија.....	13
1.4 PAP-тест.....	13
1.4.1 Принцип на PAP-тестот	14
1.4.2 Постапка на тестот.....	16
1.4.3 Изведување на PAP-тест.....	17
1.4.3.1. Bethesda- класификација.....	18
1.4.4 Улогата на медицинските лаборанти во рамките на цитодијагностиката...21	
2. Цели на трудот	22
3. Материјал и методи	23
3.1 Опис и можности на цитолошка лабораторија.....	23
4. Резултати и дискусија	28
5. Заклучоци	29
6. Литература	30

Абстракт

Воведен дел: Папаниколау-тестот или PAP-тестот како цитолошки дијагностички тест е од исклучителна важност во раното дијагностицирање на ракот на грлото на матката. Во развиените земји се користи како задолжителен скрининг-тест и значително влијае во намалување на инциденцијата и морталитетот од оваа болест или цервикален канцер. Како скрининг-тест се препорачува кај жени во репродуктивниот период, од причини што нема дијагностичко значење за постоење на грло на матка кај девојчиња помали од 25 години. **Цел на студијата** е да се изврши евалуација на преваленцијата на цервикален канцер или преканцерозни лезии кај жени од 21-40 год. на Клиниката за гинекологија и акушерство во Скопје. **Материјал и методи:** Со користење на PAP-тестот евалуирани се сите промени во грлото на матката, и со помош на медицински лаборанти и доктор потврдени се цитолошките промени со помош на микроскопирање и нивна визуелизација на цервикален размаз. Тоа вклучува ексфолијација на клетките од зоната на грлото на матката, со цел потврдување на преканцерогени или канцерогени промени. **Резултати:** Студијата покажува дека PAP-тестот како рутински дијагностички тест нуди одлична можност за потврдување на морфолошки промени во самите клетки, кои упатуваат на одредени преканцерогена цервикална интраепителна неоплазија и рак на матката. **Заклучок:** Отсуството на ваквиот скрининг или нередовното земање материјал за анализа со помош на PAP-тестот може да ги испушти или навреме да не ги воочи првичните цервикални лезии во самите клетки, што резултира со канцерогени промени или рак на матката.

Abstract

Introduction: The Papanicolaou cervical cytology test is capable of detecting cervical cancer at an early stage and is used widely in developed countries, where it has decreased both the incidence and mortality of cervical cancer. It is recommended for all women of reproductive age. Pap testing seems not to have a clear impact on the risk of cervical cancer at young age, especially considering women aged under 25. This study was undertaken to evaluate the prevalence of cervical precancerous and cancer pick up by single pap smear test. A prospective study of pap smear test of three years duration 2015-2017 in Obstetrics and Gynecology department in Macedonia. The patients are in the age group of active reproductive period (21-40 yr). **Material and Methods:** Pap test is a procedure that takes a few minutes and involves taking cells from the opening of the cervix in order to verify if they are normal. It involves exfoliating cells from the transformation zone of the cervix to enable examination of these cells microscopically for detection of cancerous or precancerous lesions. **Results:** This study shows that routine pap smear screening in patients attending gynecological OPD is the good method of detecting precancerous cervical intraepithelial neoplasia (CIN) lesion and early cervical cancer. **Conclusions:** Absence of screening in this age group may miss these high-grade cervical lesions that could progress to cervical cancer in the near future.

1. Воведен дел

1.1 Предмет на опсервација во цитологијата

Имајќи го предвид порастот и зголемената инциденција на малигните болести, од посебна важност е раното дијагностицирање, терапија и третман. Во прилог на тоа е и самата цитологија како наука. Цитологијата се темели на фактот што секој патофизиолошки процес во организмот, се карактеризира со свои карактеристични и видоизменети клетки. Од тие причини, анализирањето и проучувањето на сите клетки и нивниот сооднос е од посебна важност за утврдување на физиолошката или патофизиолошката состојба во организмот. Цитодијагностиката како метода се базира на анализа на самите клетки, големина, дијаметар, содржина на цитоплазмата, големина на јадрото, градба на клеточната мембрана, фиксација на самиот материјал, обојување и нивниот сооднос. Клиничката цитологија е медицинска гранка која се темели на микроскопска анализа на самите клетки како објект на опсервација. Тие можат да бидат земени од различни ткива и телесни течности и врз база на нивната морфологија и состојба се потврдува одредена дијагноза или физиолошка состојба во самиот организам.

Освен со проучување како на градбата на самата клетка, цитологијата се занимава и со принципите и методите кои се користат за опсервација на сите нормални или изменети процеси кои се случуваат на ниво на клетка. Употребата на овие принципи и методи овозможуваат правилно, точно и лесно одредување на сите промени. Со користењето на соодветни апарати и реагенси кои се висококвалитетни, може да се изврши правилно бојење и понатамошно микроскопирање на испитуваниот материјал за анализа. За таа цел неопходно е претходно правилно и ефикасно да биде изработен препаратот кој ќе се набљудува. Притоа, самиот препарат за микроскопирање се подготвува на соодветен начин, според одредени протоколи, кои се акредитирани и потврдени.

1.2. Поделба на цитологијата

Во зависност од начинот на кој се земени самите клетки за анализа, цитологијата може да биде ексфолијативна и аспирациона. При ексфолијативната цитологија, клетките се земаат од телесни течности, во кои се наоѓаат, или со стругање на површинскиот слој од слузницата. Најчесто се работи за десвамирани клетки присутни во различни секрети и екскрети. При аспирационата цитологија се користи аспират т.е. клетките за анализа се земаат со пункција со помош на тенка игла и врз база на негативниот притисок кој се создава во текот на постапката, клетките се всмукуваат од ткивото во кое се наоѓаат (Накиќ, 2006). За разлика од клетките кај ексфолијативната цитологија, клетките кај аспирационата цитологија се со сочувана морфологија и структура и во тој контекст промените полесно се визуелизираат и се потврдуваат.

Цитолошките техники се брзи, едноставни и евтини и тие се прифатливи од самите пациенти. Компликациите се најчесто занемарливи или многу мали, ретко се јавува мала болка или модринка на самото место од убодот. Постапката на земање на материјалот се изведува во стерилни услови и од тие причини можноста за инфекции е многу мала или не постои. Земањето на материјал за цитолошка анализа не бара претходен третман или посебна исхрана или внимание од страна на пациентот. Земањето материјал за цитолошка анализа може да биде од различни ткива и органи (најчесто коскена срцевина, коски, жлезди, гонади, црн дроб, лимфни јазли и др.) како и телесни течности (крв, урина, ликвор, ејакулат, спутум, лимфа). Земањето материјал од длабински туморозни формации или малформации во внатрешноста на некој орган може да биде и следена или контролирана со помош на ултразвук или други софистицирани методи. На тој начин постапката е висококонтролирана и можноста за грешки или несакани последици е многу мала.

- Цитолошката анализа во урина е од посебно значење и дијагностицирање на карциномот на мочните патишта;

- Цитолошката анализа на коскена срцевина се користи најчесто за следење и рано дијагностицирање на хематолошки и други заболувања, но и за дополнителни испитувања во рамките на микробиологијата, цитогенетиката, проточната цитометрија итн;

- Цитолошката анализа на спутум е од посебна важност за рано дијагностицирање на малигни клетки и други клеточни алтерации во респираторниот систем, но и во другите органски системи;

- Цитолошката анализа на спермиограмот е од посебна важност, со цел да се одреди бројот, подвижноста и виталноста на самите сперматозоиди. Секоја абнормалност или отстапување упатува на дополнителни клинички анализи;

Цитолошките анализи се надополнуваат со цитохемиски и имунохемиски методи, *image*-анализи како и други современи методи, со единствена цел поставување на рана дијагноза со што помалку инвазивни методи.

За женското репродуктивно здравје од посебно значење е цитолошката анализа или цитодијагностика на дојките и на грлото на матката.

- Експриматот или исцедокот од дојките најчесто се користи при рано дијагностицирање на малигни или атипични клетки во каналчињата на самите жлезди;

- скарификатот од дојки се добива со абразија или лупење на клетките од самите ареоли. Тој се користи во цитодијагностиката на малигни промени во самите жлезди;

- цитолошката пункција е едноставна, брза, безболна и евтина метода. Предностите на методата се во тоа што се намалува бројот на хируршки зафати, особено кај бенигните промени на дојката. Со примената на оваа метода (пункција) се дијагностицираат 92% од случаите на карцином на дојка. Сепак, клиничкиот преглед, мамографијата и цитолошката пункција се златниот стандард во дијагностицирањето на карциномот на дојка.

Во тој контекст, улогата на цитологијата е од огромна важност, кога станува збор за мали промени во самото ткиво. Со самата пункција, како постапка, се овозможува навремена терапија и третман, како и можност за преживување. Таа нуди можност за откривање на бенигни, премалигни и малигни промени.

1.3. Постапки и методи во цитологијата

Во изработката на цитолошкиот препарат потребни се неколку постапки на претходна изработка и третирање на самите клетки.

1) Фиксација

Овој третман може да се изведе со помош на хемиски или физички методи. Самата фиксација може да се изведе со помош на хемиски или физички методи. Кај хемиската фиксација ткивата се потопуваат во раствори наречени фиксативи. Бидејќи на самите фиксативи им е потребен подолг временски период за целосно да дифундираат во ткивата, вообичаено ткивата се сечат на мали фрагменти пред фиксацијата. Еден од најдобрите фиксативи кој се користи за рутинска светлосна микроскопија е пуферниот изотоничен раствор на 4% формалдехид. Самиот формалдехид реагира со amino-групите на ткивните протеини.

2) Вградување

Постапката обично се користи за подготвување на хистопатолошки препарати. Ткивата обично се вградени во цврст медиум со цел да се олесни формирањето на пресеците. За да се добијат тенки пресеци со помош на микротомовите, ткивата мораат да бидат инфилтрирани по фиксацијата со вградувачки супстанции кои му даваат ригидна конзистенција на самото ткиво. Вградените материјали вклучуваат парафин и пластична смола. Парафинот рутински се користи во светлосната микроскопија, додека пластичната смола се користи и за светлосна и за електронска микроскопија. Притоа, процесот на парафинско вградување вклучува два чекора: дехидратација и прочистување.

3) Обојување

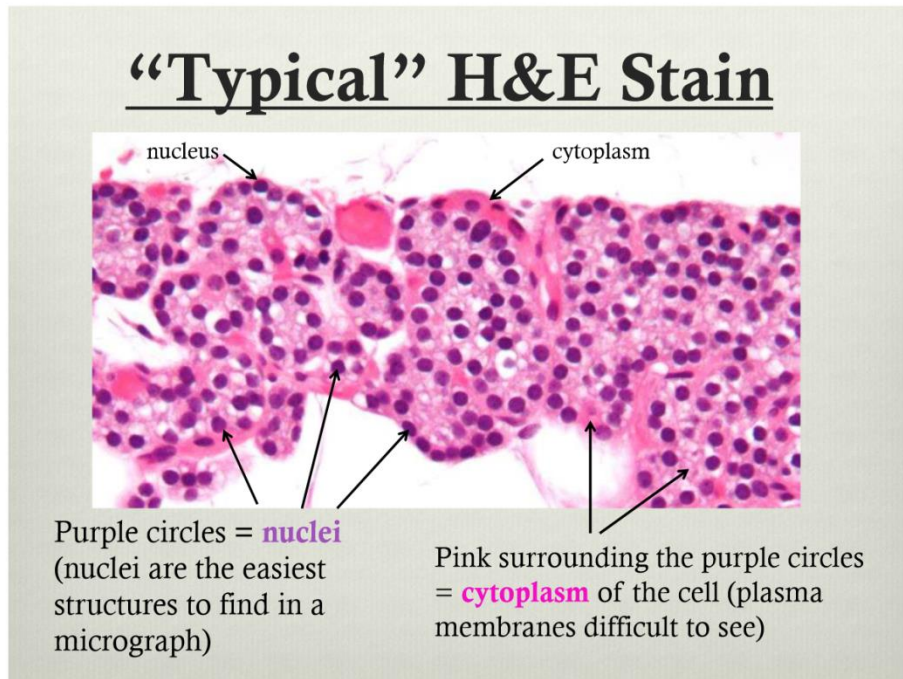
Обојувањето е исто така еден од најважните делови при подготовката на еден цитолошки препарат за негово понатамошно микроскопирање. Затоа повеќето пресеци треба да се обојат за да може поубаво да се проучат самите клетки.

Повеќето ткива се безбојни, но затоа се развиени методи за нивно обојување и самите обојувања овозможуваат компонентите во самото ткиво т.е. клетките да бидат видливи и да се направи разлика меѓу нив. Боите ги обојуваат ткивните компоненти помалку или повеќе селективно. Повеќето бои се однесуваат како кисели или базни соединенија и имаат тенденција да формираат солени врски со јонизирачките радикали од ткивата. Притоа ткивата кои се бојат со базни бои се нарекуваат базофилни, а оние кои се бојат со кисели бои, ацидофилни. Киселите бои го обојуваат негативно наелектризираниот дел од ткивото, додека базните бои го бојат позитивно наелектризираниот дел од ткивото. Од киселите бои начесто користени се: кисел фуксин, анилин плаво (**сино**), еозин, оранж. Од базните бои најкористени се: толуидин плаво, метиленско (**сино**) плаво, метиленско зелено и др. Хематоксилинот го обојува сино клеточното јадро и некои други клеточни структури како што се РНК од цитоплазмата, матриксотна хијалината 'рскавица. Еозинот пак ги обојува розово, цитоплазмата и колагенот (Роси Павлина, 2010).

За правилно и адекватно обојување на цитолошкиот препарат неопходно е да се следат соодветните чекори и правила за обојување на препаратот, бидејќи постојат многу видови боења на препаратите, како што се: Папаниколау (PAP)-боење, боење според Грам, *Ziehl-Neelsen*, Боење со гимза, хематоксилин и еозин. Основните видови боења на цитолошките препарати е со помош на кисели и базни бои.

1.3.1 Боење по хематоксилин и еозин - H&E (hematoxylin и eosin)

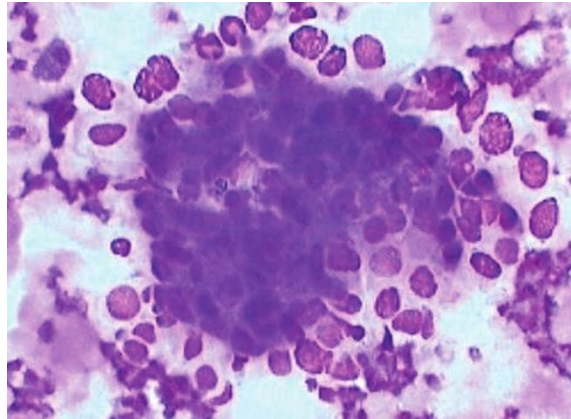
Најчесто користен систем за боење кој содржи две бои: хематоксилин и еозин (hematoxylin и eosin). Повеќето клетки се безбојни и транспарентни. Техниките што се користат може да бидат неспецифични и да го бојат поголемиот дел од клетките на ист начин, или специфични, да има селективно обојување на одредени хемиски групи или молекули во клетките или ткивата. Боењето се врши со употреба на боја, која дејствува на дел од компонентите на клетките со светла боја, заедно со контрастна боја, која ја остава останатиот дел од ќелијата (клетката) во поинаква боја. Еозинот е кисела боја и таа е негативно наполнета. Самата боја ја обојува основната (или ацидофилна) структура, црвена или розова. Ваквата обоеност се дефинира како еозинофилност. Хематоксилинот се користи во комбинација со јони од алуминиум (Al^{3+}). Се користи за боење на кисели (или базофилни) структури кои имаат виолетова сина. На тој начин практички се бои јадрото во пурпурно – виолетова боја. Ова значи дека јадрото и делови од цитоплазмата кои содржат РНК се бојат во една боја (виолетова), а остатокот од цитоплазмата се бои со различна боја (розова), (Слика бр. 1)



Слика бр.1

1.3.2 Метахромазија

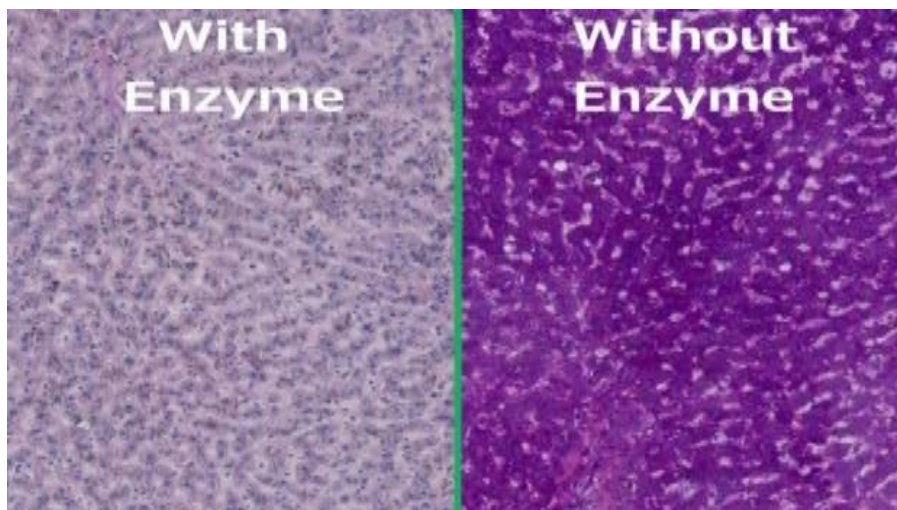
Определени базни бои реагираат со ткивните компоненти и ја менуваат нивната нормална боја од сина до црвена или виолетова. Ваквата промена се нарекува метахромазија (слика бр. 2). Главниот механизам за метахромазија е присуството на полианјони во самото ткиво. Кога овие ткива ќе се обојат со концентриран раствор на базна боја, како толуидин сино, молекулите на бојата се доволно блиску со цел да формираат димерни или полимерни агрегати. Апсорпциските својства на овие агрегати се разликуваат од оние на неагрегираните молекули од бојата. Клеточните и ткивните структури кои имаат висока концентрација на јонизиран сулфат и фосфатни групи, како што е главната материја на ’рскавицата и рапав едноплазматичен ретикулум на плазма-клетките, покажуваат метахромазија (Рос и Павлина, 2010).



слика бр.2

1.3.3 Ензимска дигестија

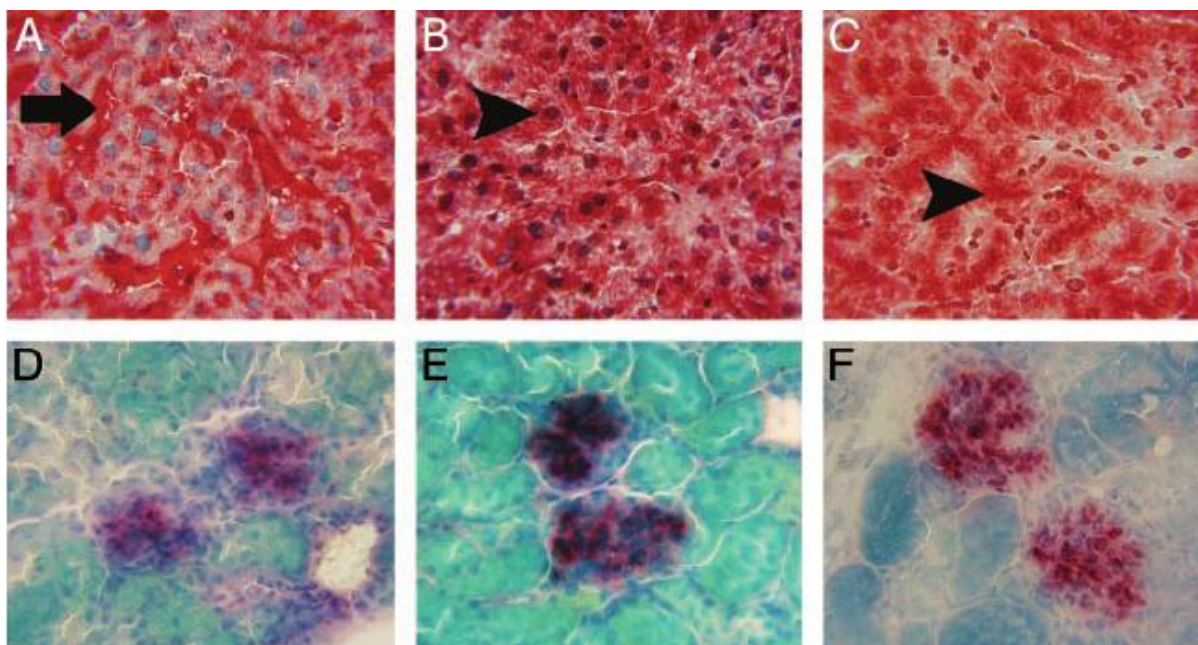
Ензимската дигестија (слика бр.3) може да се искористи како потврда на идентитетот на обоениот материјал.



слика бр.3

1.3.4 Ензимска хистохемија

Со цел да се локализираат ензими во пресеци од ткиво, мора да се посвети посебно внимание на фиксацијата со цел да се зачува ензимската активност. Обично, се претпочита методот на слаба алдехидна фиксација. Заробувачки реагенс, независно дали боја или тежок метал, се користи со цел да се зароби или да се врзе реакцискиот продукт на ензимот со преципитација на страната на реакцијата. Во типична реакција, со цел да се прикаже хидролитичкиот ензим, делот од ткивото се става во раствор којшто содржи супстрат и заробувачки агенс (слика бр. 4).



слика бр.4

1.3.5 Имуноцитохемија

Специфичноста на реакцијата помеѓу антигенот и антителото е главна основа на имуноцитохемијата. Два типа на антитела се користат во имуноцитохемијата поликлонални антитела кои се произведени од имунизирани животни и моноклонални антитела произведени од бесмртни клеточни линии што произведуваат антитела. И директните и индиректните цитохемиски методи се користат за локализирање на таргетен антиген во клетки и ткива (Рос и Павлина, 2010).

1.3.6 Авторадиографија

Авторадиографијата користи фотографска емулзија ставена врз ткивниот пресек за локализирање на радиоактивен материјал во ткивата. Пресеците од примероците коишто имаат споено радиоактивни материјали се ставаат на предметни стакла. Во темно, препаратот вообичаено се потопува во стопена фотогафска емулзија и на тој начин произведува тенок фотографски филм на површината на пресекот. По соодветна изложеност во кутија која не пропушта светлина, обично со денови или со недели, изложената емулзија на препаратот се развива со стандардна фотографска техника и трајно покриена со покривно стакленце. Пресеците може да се обојат пред или по изложувањето и развивањето. Сребрените зрнца во емулзијата над радиоактивно обележаните молекули се изложени и развиени со оваа процедура и се прикажуваат како темни зрнца коишто го препокриваат местото на радиоактивната емисија кога се испитуваат со светлосен микроскоп. Овие зрнца можат, едноставно, да се искористат со цел да ја покажат локацијата на материјата или да може да се избројат со цел да дадат полуквантитивни податоци за количеството на дадена материја на специфична локација. Авторадиографијата исто така, може да се изведе со користење тенки пластични делови за испитување со електронски микроскоп (Рос и Павлина, 2010).

1.4 PAP – тест (Пап-тест)

PAP-тестот е метода за рано откривање на карциномот на грлото на матката. Овој тест го добил своето име по американскиот лекар со грчко потекло, Papanicolaou (1883-1962) (слика бр.5). Со PAP-тестот се врши преглед на можните промени во клетките на грлото на матката. Грлото е долниот дел на матката (*uterus*), а по него продолжува вагината. PAP-тестот може да покаже дали постои: инфекција, абнормални клетки на грлото на матката или да се откријат најраните знаци на ракот на матката. Со PAP-тестот, исто така, може да се откријат и инфекциите и абнормалните клетки на грлото на матката, кои подоцна можат да алтерираат во канцерогени клетки. Лекувањето на инфекциите и на овие т.н. преканцерозни состојби на грлото на матката, можат да го спречат развојот на карцином кај голем број пациентки. По карциномот на дојка, карциномот на грлото на матката тој е најчест карцином во нашата држава, инциденцијата на цервикалниот карцином се движи 16/100 000 жители. Со имплементирањето и воведувањето на задолжителниот цитолошкиот скрининг кај жени постари од 21 год. и жени помлади од 21 год. кои се сексуално активни повеќе од 3 години, значително се намалува ризикот и намалување на инциденцијата од цервикален карцином. Жени кои се во менопауза исто така треба да подлежат на ваков скрининг. Тестот се користи за диференцијација на клетките во подготовката на размаската на разни гинеколошки примероци (PAP-брикети), материјали кои содржат ексфолијативни клетки и материјал од аспирација со фина игла (Dhurba, 2016).



слика бр.5

Georgios Nikolaou Papanicolaou (or George Papanicolaou)

(13 May 1883 – 19 February 1962)

Папаниколау опишал три главни цели за боење на цитолошкиот материјал:

- дефинирање на нуклеарни детали: Поради раширените молекуларни абнормалности на клетките на ракот и нивното дијагностичко значење, обојувањето на јадрото е од примарна важност;
- транспарентност на цитоплазмата: Ова е од особена важност поради различната дебелина и честото преклопување на клетките;
- диференцијација на клетките: Разликите во реакцијата на боење, како што се оние помеѓу ацидофилните и базофилните клетки, многу помагаат во идентификацијата на различни видови клетки.

1.4.1 Принцип на тестот

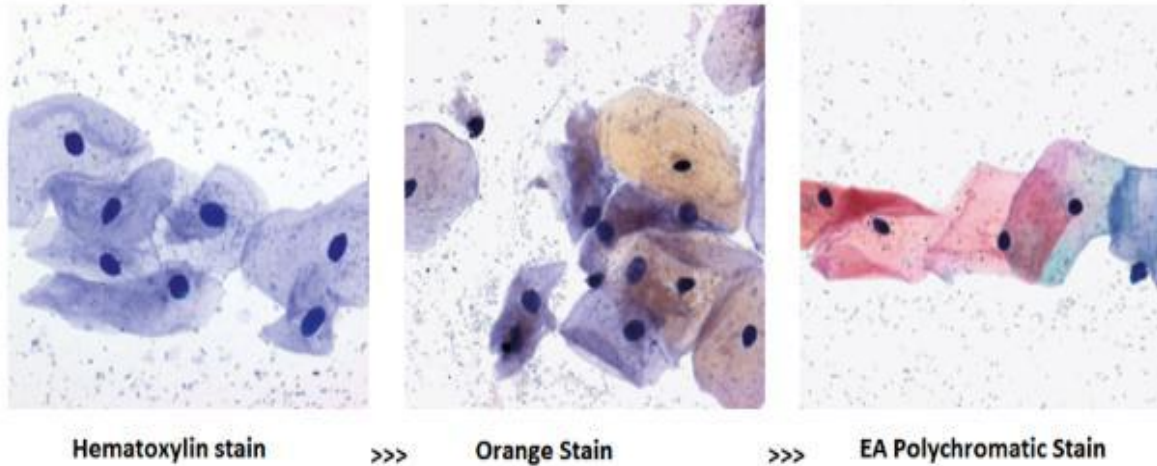
Боењето по Папаниколау вклучува кисели и основни бои. Полихромната боја на Папаниколау вклучува пет бои во три раствори (слика бр.6):

Hematoxylin: Природна боја hematoxylin ги зацврстува клеточните јадра сини. Има афинитет за хроматин, прицврстувајќи се на сулфатните групи на DNАмолекулата.

Портокалово зелено: Ова е првиот киселински контраст (цитоплазматска дамка) кој ги зацврстува зрелите и кератинизирани клетки. Целните структури се подеднакво обоени со портокалова боја и со различни интензитети.

Eosin azure: Ова е втор контраст, кој е полихромна мешавина на еозин Y, светло-зелена CF и бизмарк-кафеава. Еозин Y дава розова боја на цитоплазмата на зрелите сквамозни клетки, нуклеолите, цилиите и црвените

крвни клетки. Решенија за боење кои најчесто се користат во цитологијата се: EA 31 и EA 50, додека EA 65 светло-зелената СФ дава сина боја на цитоплазмата на метаболички активните клетки како парабазални сквамозни клетки, средни сквамозни клетки и колонозни клетки (Dhurba, 2016).



слика бр.6 Обојување на ткивата и клетките со Hematoxylin, Orange и EA Polychromatic)

Состав и подготовка на реагенси		
<p>Hematoxylin = 5g Етанол = 50ml Калиум алум = 100g Дестилирана вода (50 ° C) = 1000ml Меркуричен оксид=2-5g Глацијална оцетна киселина = 40ml</p>	<p>Orange G (10% воден) = 50ml Алкохол = 950ml Фосфотунгстинска киселина 0-15г</p>	<p>EA 50: 0,04 M светло зелена SF = 10ml 0.3M еозин Y = 20ml Фосфотунгстинска киселина = 2г Алкохол = 750ml Метанол = 250ml Глацијална оцетна киселина = 20ml</p>

1.4.2 Постапка на тестот

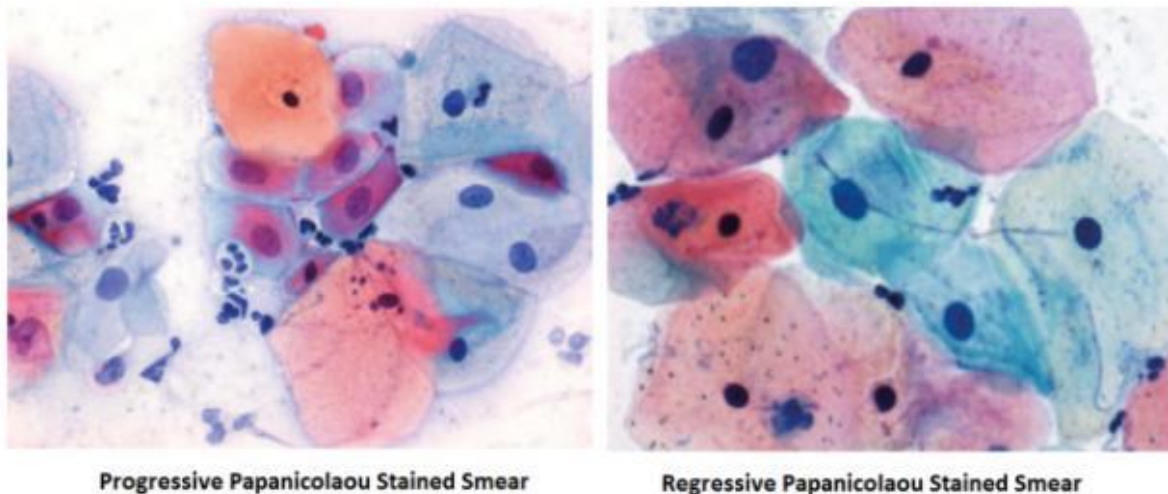
Двете прогресивни и регресивни техники за боење (слика бр.7) со нуклеарно оружје можат да се употребат во дамка на Папаниколау. Пред боење, потребно е влажна фиксација со цитолошки спреј фиксатор 96% етанол - минимум 30 мин.

- *Постапка за прогресивен метод на боење со Папаниколау*

Во прогресивниот метод, јадрото е обоено со хематоксилин до саканиот интензитет. Интензитетот на нуклеарното боење е контролиран со потопување на слајдот во сининг-агент. Најчесто употребуваниот сининг-агент е вода од чешма на Сот (со рН 8.02).

- *Постапка за регресивен метод на боење Папаниколау*

Кога се користи методот на регресивно боење, јадрото е намерно преголемо обоено со не-закиселен хематоксилин. Вишокот дамки се отстранува со разреден раствор на хлороводородна киселина. Процесот на деколоризација потоа се прекинува со потопување на слајдот во вода од чешма. Времето е од клучно значење во регресивниот метод, бидејќи депалењето може да доведе до хиперхроматско јадро и да стане хипохроматско (Dhurba, 2016)



слика бр.7

(Интерпретација од Прогресивен и Регресивен PAP)

Резултати од интерпретацијата на PAP-тестот (Слика бр.8):

Нуклеари: сина

Ацидофилни клетки: црвена

Базофилни клетки: сино-зелено

Еритроцити: портокалово-црвено

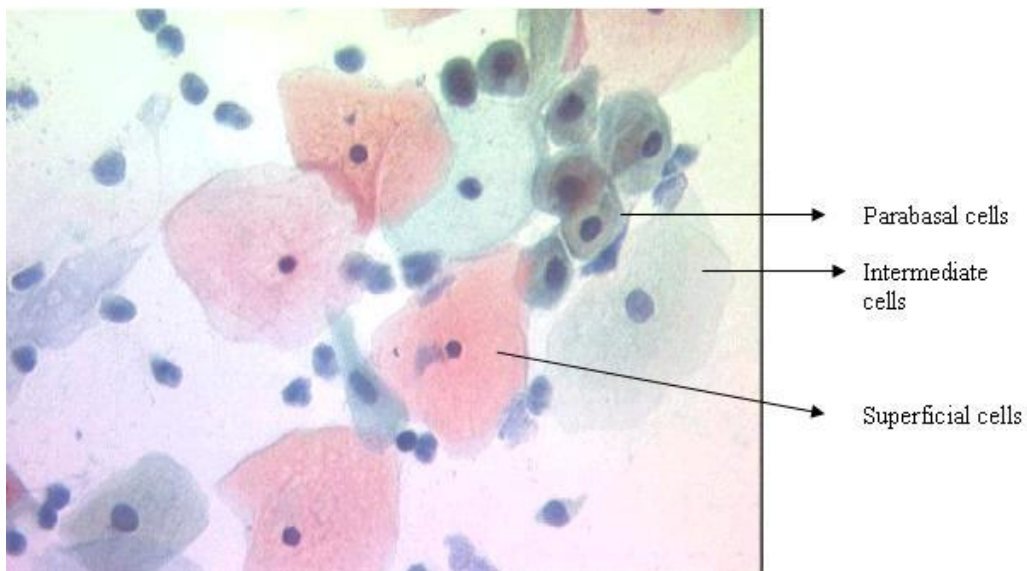
Кератин: портокалово-црвено

Површински клетки: розово

Средни и парабазални клетки: сина зелена

Еозинофил: портокалово-црвено

Кандида: црвена



слика бр.8

1.4.3 Изведување на PAP-тестот

Посетата на гинеколог треба да биде околку 10 до 20 дена по првиот ден од циклусот. Најмалку 2 дена пред посетата на гинекологот не треба да се користат вагинални креми, лекарства, тампони, пудри или дезодоранси, ниту, пак да се има сексуален однос. Прегледот е безболен, но за некои жени е непријатен момент. Гинекологот, со четкичка или со шпатула, ги собира одлупените клетки од грлото на матката и ги размачкува на предметно стакло за микроскопирање. Стаклото се става во фиксир и така подготвено се испраќа во цитопатолошката лабораторија.

1.4.3.1. Bethesda- класификација

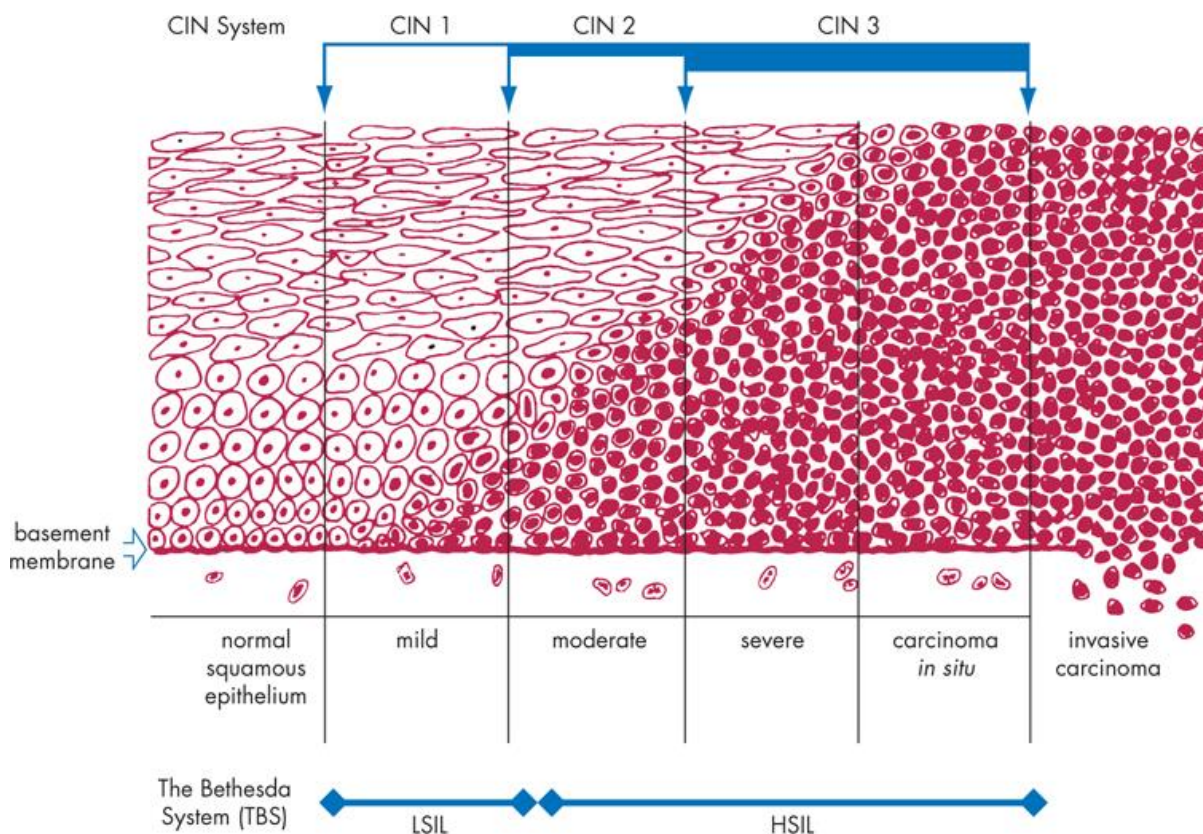
Поврзувањето на етиологијата и патогенезата на премалигните и малигните промени на грлото на матката, предизвикани од HPV-инфекција уловило хистолошка класификација на цитолошките промени кои се потврдени од страна на Американскиот институт за канцер во Bethesda 1988 (Solomon, 1989). Премалигните и малигните промени на грлото на матката се опфатени со терминот сквамозни интерепителни лезии (eng. squamous intraepithelial lesion - SIL) и тие се поделени во две групи (слика бр.9):

Comparison of cervical cytology classification systems			
Bethesda	CIN	Dysplasia	Papanicol.
NL	NL	NL	I
Infection , reactive,repair	Inflammatory atypia	Inflammatory atypia	II
ASC-US	Squamus+HPV atypia	Squamus+HPV atypia	IIR
LSIL	CIN I	Mild dysplasia	III
HSIL	CIN II CIN III CIN III	Moderate dyspl. Severe dyspl. Carcinoma insitu	III IV IV
SCC	SCC	SCC	V

слика бр. 9

- сквамозни интерепителни лезии од низок степен (eng. *low-grade squamous intraepithelial lesion* - LSIL) каде спаѓаат цервикалните интраепителни неоплазии (CIN1) и кондиломите (HPV индуцирани лезии) (слика бр.10)

- сквамозни интраепителни лезии од висок степен (eng. *high-grade squamous intraepithelial lesion* – HSIL), каде спаѓаат (CIN2 i CIN3) (слика бр.10)



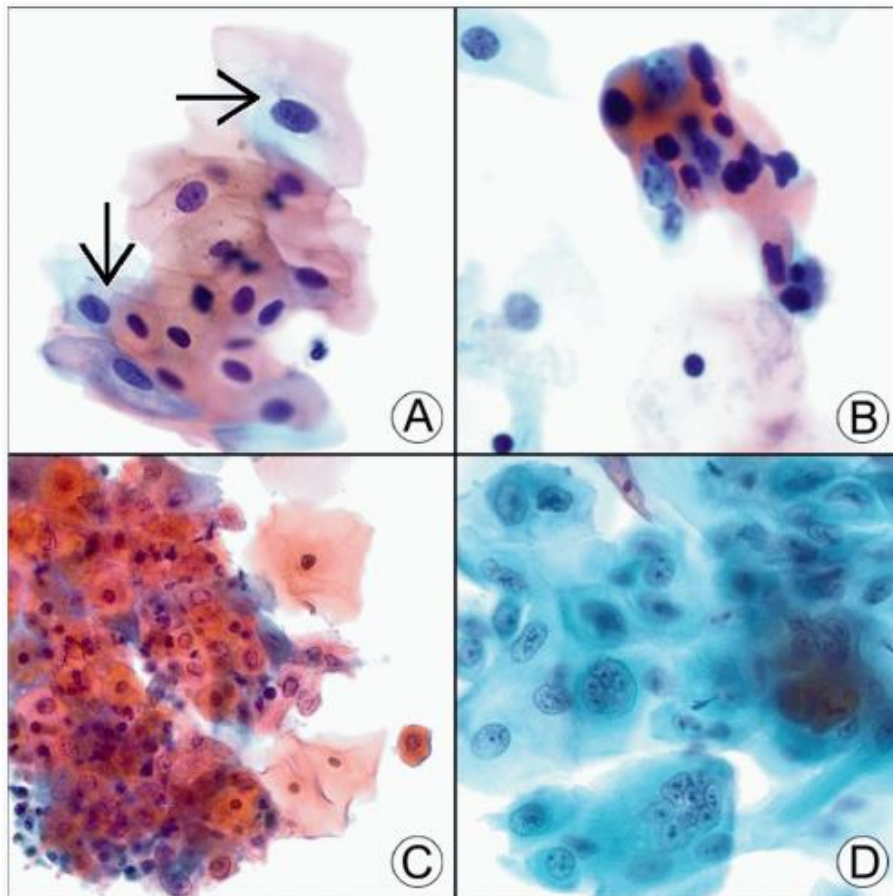
Source: John Murtagh, Jill Rosenblatt: *John Murtagh's General Practice, 6e*: www.murtagh.mhmedical.com
 Copyright © McGraw-Hill Education. All rights reserved.

слика бр. 10

Основните морфолошки критериуми врз основа на кои се дијагностицира степенот на лезија се: диференцијацијата т.е степенот на созревање и стратификација на епителот, јадрената атипичност и митотската активност на клетките (Popović-Lazić, 2006). Според *Bethesda*-класификацијата, епителните клетки кои се разликуваат од нормалните клетки, но, не покажуваат дискариоза, се вклучени во групата на атипични сквамозни клетки со неодредено значење (eng. *Atypical squamous cells of undetermined significance* - ASC-US) (слика бр. 11). Во 2001 год. во оваа цитолошка класификација е додадена и друга група на клетки кај кои не може да се исклучи HSIL (eng. *atypical squamous cells cannot exclude HSIL* - ASC-H) (Gingrich, (2004). Исто така во оваа класификација абнормалните жлездени клетки се поделени во неколку групи:

- атипични жлездести клетки со неодредено значење (*atypical glandular cells undermined significance* - AGUS);
- дисकारीоза на жлездести клетки до висок степен (*adenocarcinoma in situ* – AIS);
- малигни жлездести клетки (аденокарцинома) (Solomon et al., 2002).

Под терминот атипични клетки се подразбира секоја промена на клетките која е од неодредено значење, а не за промени кои се дефинираат како инфламаторни или неопластични.



слика бр. 11

(A) *ThinPrep Pap test shows superficial and intermediate cells, some with nuclear enlargement and changes that would qualify for a diagnosis of atypical squamous cells of undetermined significance (ASC-US) .*

(B) *3D cluster of parakeratotic cells with nuclear enlargement and shape abnormalities can be interpreted as ASC-US.*

(C) *ThinPrep Pap shows parakeratotic squamous cells with nuclear enlargement that could be interpreted as ASC-US.*

(D) *ThinPrep Pap shows repair, but the degree of nuclear enlargement, although prompting consideration, would not quite qualify for a diagnosis of ASC-US.*

Позитивен PAP-тест

Застрашувачки е податокот дека PAP-тестот покажува отстапувања од нормалниот наод. Ова не значи дека пациентката има рак на грлото на матката. Атипични клетки се оние кои отстапуваат од нормалните и може да се резултат на воспалителен процес, претходен сексуален однос, користење на средства за интимна нега и сл. Наодот на атипични клетки значи дека нешто се случува во слузницата на грлото на матката и дека е потребна подетална анализа која ќе ја расчисти дилемата. При позитивен PAP-тест се препорачуваат следните испитувања: колпоскопија, ендоцервикална киретажа и биопсија на грлото на матката. PAP-тестот не значи и 100% сигурност. Може да се случат и лажно позитивни и лажно негативни резултати. Лажно позитивен тест е ако PAP-тестот бил позитивен, а по направената биопсија или киретажа се покажало дека ткивото на слузницата на грлото на матката е сосема в ред или има некој воспалителен процес. Позагрижувачки е фактот на лажно негативниот PAP-тест. Тоа значи дека клетките се протолкувани како нормални, а вистинскиот процес не е евидентиран. Ова најчесто се случува поради неадекватно земање на материјалот. Тестовите може да се прават и почесто, на секои 3 до 6 месеци доколку пациентката има историја на претходно дијагностицирани изменети клетки во размаската (т.н. CIN1, CIN2, CIN3), ако има претходно дијагностицирана малигна болест на друг орган (дојка, јајник и сл.) и кај ХИВ-позитивни пациентки.

1.4.4 Улогата на медицинските лаборанти во рамките на цитодијагностиката

Гинеколошкиот скрининг на женската популација од 14- до 75-годишна возраст е од посебна важност за целата хумана популација во насока на подобрување на репродуктивното здравје. Тоа значи дека за секоја жена (вклучувајќи ги и младите девојки кои стапиле во сексуален однос) гинеколошки преглед е од посебна важност и значење. Улогата на медицинските лаборанти во рамките на цитодијагностиката е:

- да го примаат цитолошкиот материјал;
- да го означат и да го класифицираат;
- да го чуваат и да го обезбедат цитолошкиот материјал;
- да се снаоѓаат во архивата на цитолошки материјали и наоди;
- да направат фиксација и соодветно боене на цитолошкиот материјал;
- да ги користат основните цитохемиски и имунохемиски методи;
- да се служат со основните техники на микроскопирање;
- да ги знаат основните цитоморфолошки карактеристики на нормално и здраво ткиво;
- да ги препознаваат адекватните и неадекватните цитолошки примероци и артефакти;
- самостојно да се снаоѓаат во работата на секоја цитолошка лабораторија.

2. Цели на трудот

Првична цел на овој труд е да се објасни целата постапка и важност на PAP-тестот како скрининг-метода и да се изврши скрининг на досегашните резултати од примена на овој тест.

Како потцели на трудот е да се утврди:

- принципот за работа при ваквата цитолошка метода.
- улогата и местото на лаборантот при користење на оваа метода
- најчестите грешки при користење на оваа метода
- да се укаже на важноста од PAP-тестот
- предностите и недостатоците на оваа метода
- можностите од лажно позитивни или лажно негативни резултати

3. Материјал и методи

Во истражувањето се вклучени жени на различна возраст, од рурални и градски средини кај кои е направен PAP-тестот.

Цервикалните размази најнапред се фиксирани во 95% алкохол и се боени по Папаниколау. Тие потоа се анализирани на светлосен микроскоп и интерпретирани по *Bethesda*- класификацијата.

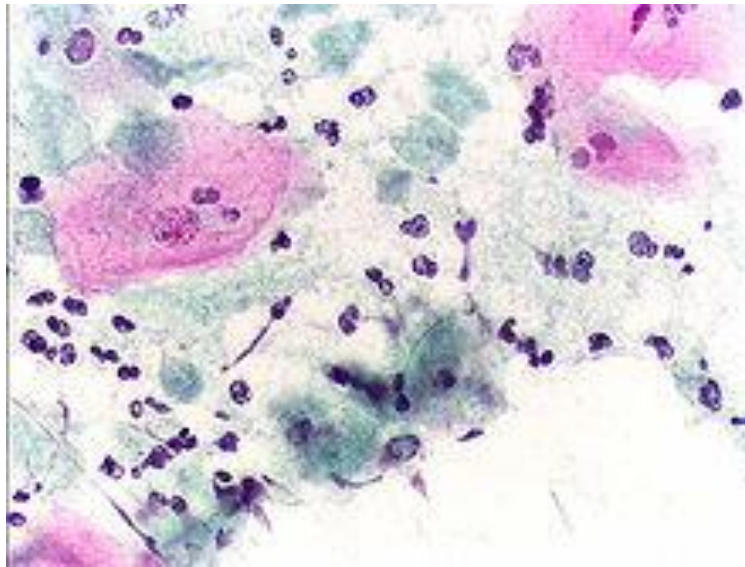
3.1 Цитолошка лабораторија

Цитолошката лабораторија е сместена во подрумскиот дел на Клиниката за гинекологија и акушерство при Универзитетски клинички центар “Мајка Тереза”. Постои приемен дел во кој се зема цитолошкиот материјал за анализа најмногу вагинални брисеви. Најголемиот дел од материјал за анализа се носат од Гинеколошката амбуланта на самата клиника. Примените материјали се подготвуваат за цитолошка анализа во самата лабораторија. Стакленцата ги вадиме на лигнин и ги оставаме да се исушат. Додека се сушат стакленцата, на секоја листа што ни е стигнато од пациентката од гинеколошката амбуланта ѝ ставаме соодветно цитолошко бројче, кое исто така го заведуваме во нашиот цитолошки дневник. Потоа стаклата ги редиме во специјални држачи (држачот за стакло собира 50 стакла) а потоа држачот го ставаме во апарат MERC – MIROSTAINER кој работи по специјална програма на боење на препаратите. Препаратите се бојат 45 мин. Во самиот апарат постојат специјални кади за боење во кои се полни со соодветен реагенс, боја, вода, алкохол. Откако ќе се обојат, препаратите ги вадиме од држачот и ги ставаме повторно на лигнин да се исушат. Потоа на секое стакленце ставаме по две капки *Neo Mount* (лепило) и одозгора ставаме по едно покривно стакло. Потоа препаратите ги редиме во специјални кивети едно зад друго, ги потопуваме во ксилол и ги оставаме да се исчистат.

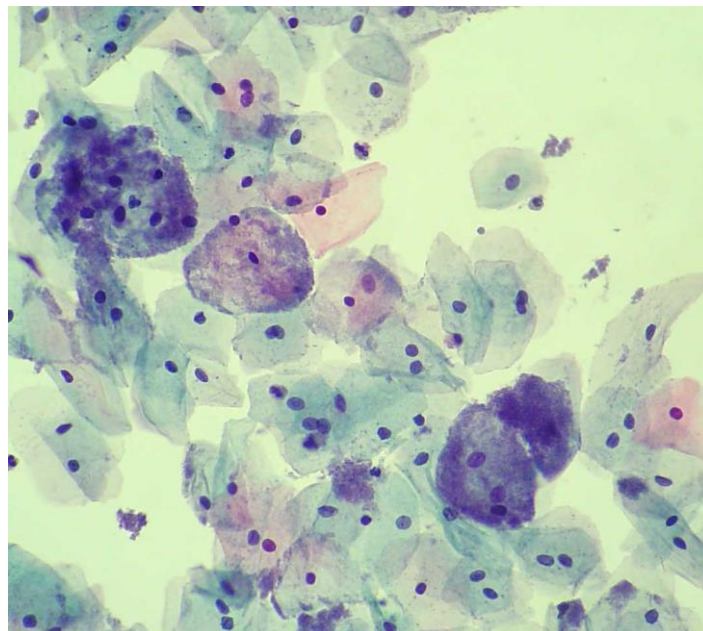
- Микроскопирање:

Најзначаен дел од целата постапка на микроскопирање е морфологијата на самите клетки, дали се со нормална форма, големина а најзначајно е нивното јадро (неговата градба каков е хроматинот, формата, големината). Оние вагинални брисеви кои ги оценуваме како негативни (клетките и јадрото не отстапуваат од својата форма и големина) ги одвојуваме како негативни и во долниот дел на листот го ставаме својот потпис и печат, а сето она што ни е сомнително (клетки и јадро кои отстапуваат од својата нормална големина) ги одвојуваме настрана и му ги даваме на нашиот доктор, кој понатаму повторно ги гледа под микроскоп и ја одредува конечната дијагноза на пациентката. Ова значи дека ги одделуваме сите брисеви за кои се сомневаме дека имаат промени во клетките и јадрото, а тоа значи дека ставаме точки со фломастер на местото

на самата промена на стакленцето за да може тоа место да го погледа докторот и да ја види промената.Најчести инфекции кои ги имаат пациентките се инфекции со *Trichomonos vaginalis* (Слика бр. 12) и *Gardnerella vaginalis* (слика бр.13) потоа инфекција со *Candida albicans* (Слика бр.14) или инфекции со кокоидни бактерии, кога се работи за инфекции во брисот се присутни многу Le.



слика бр.12



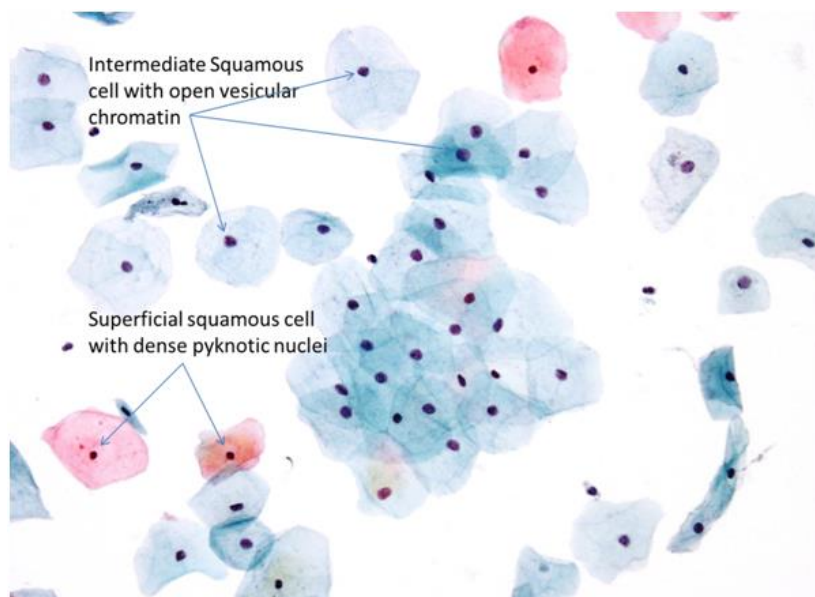
слика бр.13



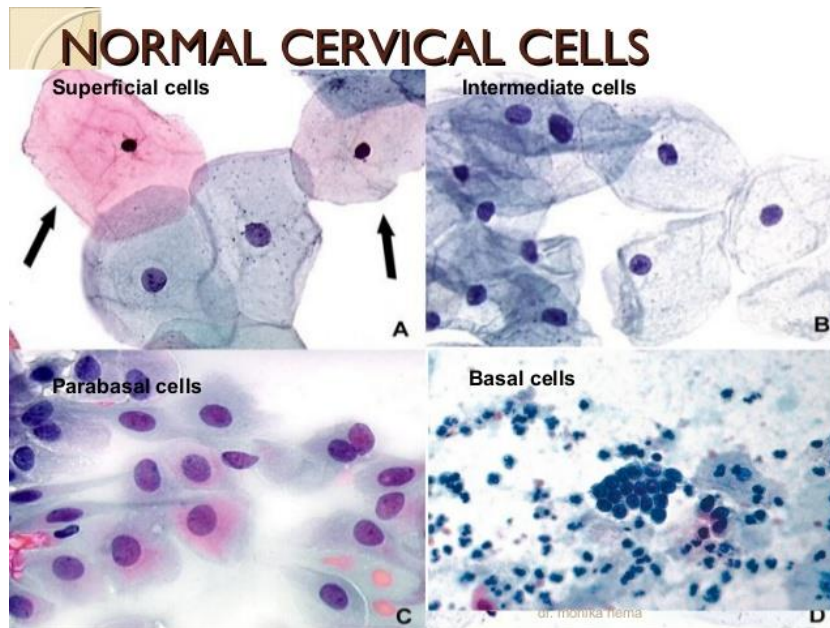
слика бр.14

- Цитолошка дијагностика за откривање на промени во цервикална лигавица

-Морфолошката дијагностика на промените во органите и ткивата се базира врз морфолошките промени во нивните составни делови – клетки и во нивниот нарушен или нормален распоред. Исто така има голема улога и самата лигавица, бидејќи од нејзината површина може да се добијат епителни клетки како што се суперфицијалните и интермедијалните клетки. Суперфицијалните клетки се полигонални големи клетки со плочесто сплескана форма и нивната цитоплазма се бои розово (Слика бр.15, 16 и 17)

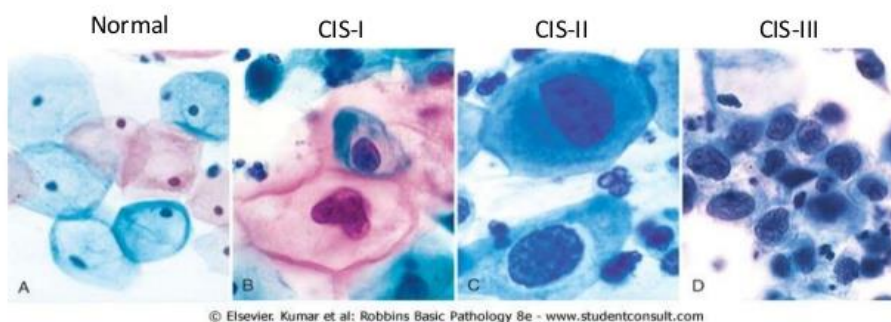


слика бр.15



слика бр.16

Cytology of CIN seen in Pap Smear



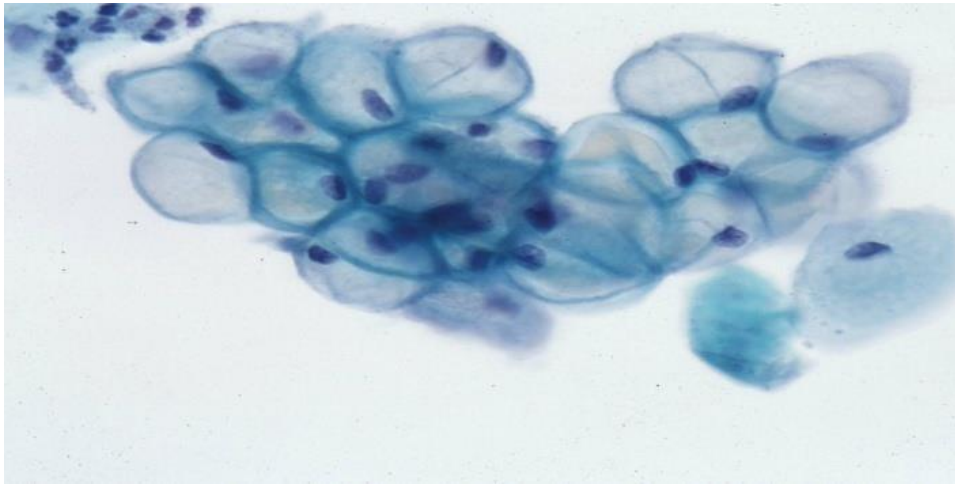
There is Progressive reduction of size of Cytoplasm, and increase in Nuclear Cytoplasm Ratio as the grade of lesion progresses, which reflects there is loss of cellular differentiation on the surface of cervical lesion

слика бр.17

(Суперфицијални и интермедијални клетки – патолошки променети кај CIN I)

Целуларните граници се доста дисфилтрирани, а рабовите на клетките можат да бидат свиткани. Во цитоплазмата на овие клетки може да се најдат кератински гранули. Јадрото на овие клетки е мало, компактно, без хроматински распони. Интердермалните клетки се клетки со исти карактеристики, освен што јадрото им е везикуларно со лесна, тенка нуклеарна мембрана и со фин хроматински распоред во партикули, така што јадрото има рамномерен изглед.

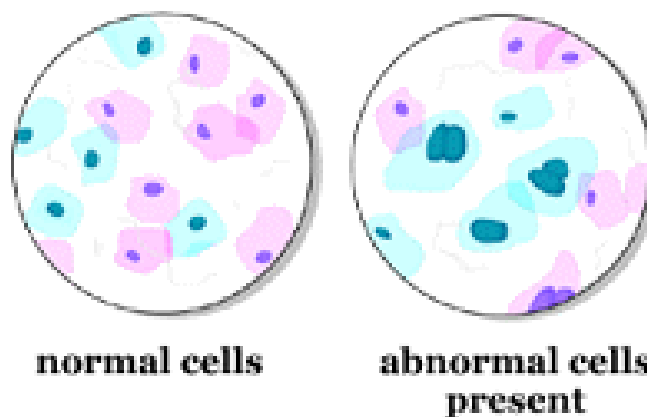
Парабазалните клетки се тркалезни (овални) имаат цитоплазма која се бои сино. Обликот на клетката е овален (тркалезен). Кај базалните клетки цитоплазмата е уште помала и таа се бои сино, а обликот им е исто овален (тркалезен) (слика 16 и 18) .



слика бр.18

(Базални и парабазални клетки – патолошко променети)

Во вагиналните размази имаме и клетки од цилиндричен епител кои можат да бидат поединечни и во групи. Нуклеарната мембрана е тенка, и со правилна контура. Цитоплазмата се бои розово. Кога се наоѓаат во групи, цилиндричните клетки имаат палисаден изглед, на „саќе“. Во цитолошкиот размаз се среќаваат и јаки суспектни клетки за инвазивен карцином. Јадрото на овие клетки е хиперхромативно, овални, тркалести или со издолжена форма која не е правилна поради неадекватното задебелување на нуклеарната мембрана. Хроматинската содржина во јадрото е неправилна хроматинот е насобран во големи грутчиња помеѓу кои има празни простори. Јадрото со зголемени нееднакви по големина и ја опфаќаат скоро целата цитоплазма. Ова се карактеризира со неправилна диференцијација (неправилни делови) издолжено јадро со издолжена цитоплазма (слика бр.19).



слика бр.19

4. Резултати и дискусија

Од пред неколку години во Р Македонија започна *Националната програма за рано откривање на ракот на грлото на матката*, кој вклучува гинеколошки преглед со вклучување на PAP-тест кај сите жени од 25-64 год. Врз база на цитолошките наоди во нашата лабораторија се потврдуваат сите цитолошки промени кај пациентки на различна возраст. Просечната возраст на пациентките е 47, 5 год. Најмладата пациентка била на возраст од 18 год. Изненадува фактот што канцерогени промени се дијагностицирани кај жени на возраст под 35 год. Цитолошките промени дефинирани како премалигни или малигни по месеци се дадени во Табела бр.1. Тие се преставени и на График бр. 1 и 2. Најчестиот цитолошки наод е ASCUS-US како и абнормални морфолошки промени во различни месеци.

Табела 1

	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
Negativ	520	1155	1150	1138	1213	1087	1208	1255	1660	2054	2255	1499
ASC-US	11	4	4	5	8	8	6	5	5	9	5	2
ASC-H	1	1	1	1	9	5	2	5	1	3	5	2
HPV	1	4	0	3	3	1	2	3	2	0	1	6
CIN 1	1	3	1	5	4	1	0	1	2	4	4	1
CIN 2	1	1	2	0	0	0	1	2	0	0	3	3
CIN 3	0	3	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
AGC	11	8	3	9	22	25	6	24	8	2	0	1
Abnormal	26	24	11	23	46	40	17	40	19	19	18	15

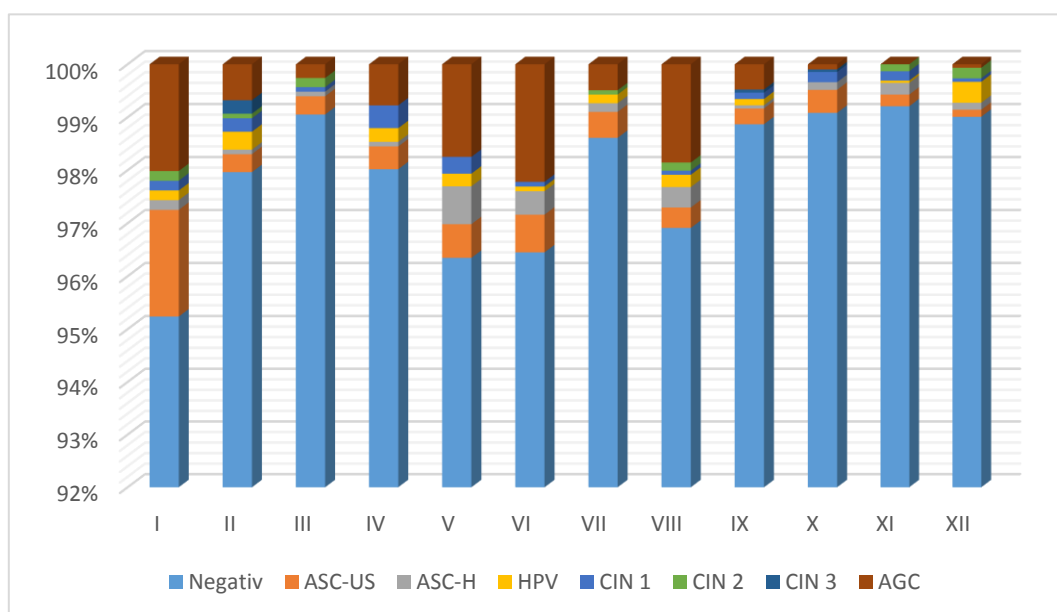


График бр.1

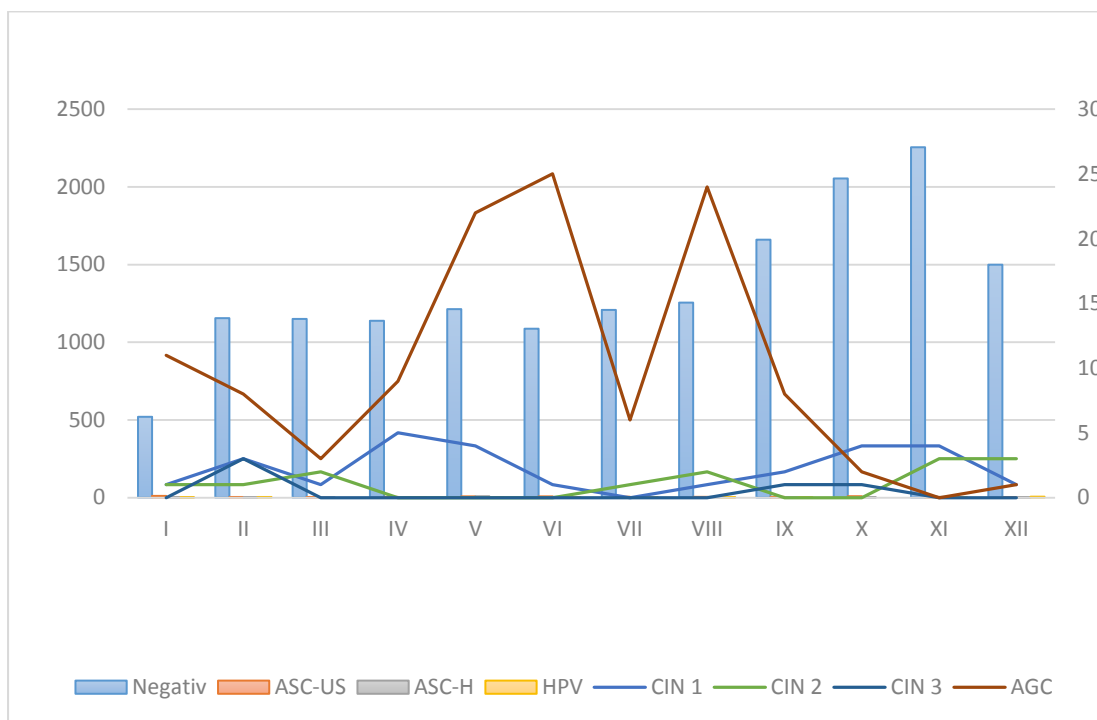


График бр.2

5. Заклучоци

Со резултатите и методите кои се користени во овој специјалистички труд, сакаме да укажеме на важноста на PAP-тестот во рамките на раната дијагностика и превенција на карцином на грлото на матката. Исто така, ја потврдивме улогата и важноста на лаборантот при изработување на цитолошките препарати, најчестите можни грешки при изведување на методата и евентуалните дисторзии и артефакти присутни на самиот цитолошки препарат.

Гинеколошкиот преглед со ПАП тест не само што овозможува откривање во рана фаза рак на грлото на матката, туку и откривање на преканцерозни лезии кои лесно можат да се отстранат. Иднината во превенцијата на цервикалниот карцином се состои во синергизам на вакцинацијата како примарна превенција заедно со скринингот (PAP-тест) како секундарна превенција. Воведувањето на цитолошкиот скрининг во последниве 40 години доведе до значително намалување на инциденцијата и морталитетот на инвазивниот рак на матката. Исто така со овој специјалистички труд сакаме да влијаеме на подигнување на свеста на жената за важноста од редовни прегледи и рано откривање на промените на грлото на матката и информирање за важноста од овој тест како цитолошка скрининг-метода.

6. Литература:

Bokun R., Bokun-Vukašinović Z., , Tatomirović Ž. Medicinska citologija, 2006, Narodna biblioteka Srbije, Beograd

Christophe Štemberger, Koraljka Rajković. Molek Klinička citologija Clinical cytology Irena Seili-Bekafigo* , medicina fluminensis 2016, Vol. 52, No. 3, p. 301-31

Dhurba, G. (2016): Papanicolaou Staining Principle Procedure Interpretation

Gray W, Kocjan G. Diagnostic Cytopathology, 3rd ed. London: Churchill Livingstone, 2010

Gingrich PM (2004). Management and follow-up of abnormal Papanicolaou tests. J Am Med Wom Associat 59: 54 – 60.

Hakić, M. Citologija - dijagnostičke i prognostičke mogućnosti malignim bolestima djece, Paediatr Croat 2006; 50 (Supl 1): 167-175.

Michael, H. Ross, Wojciech. P.(2006): A Text and Atlas, with correlated cell and molecular biology, Fifth edition, copyright, Lippincott Williams & Wilkins, published by arrangement with Lippincott Williams & Wilkins, USA.

Popović-Lazić J (2006a). Histološka slika cervikalnih intraepitelnih neoplazija. U: Stanimirović B (urednik) Dijagnostika i lečenje oboljenja cerviksa, vagine i vulve. Kolposkopski atlas. Elit-Medica, Beograd, 23-26.

Solomon D (1989). The 1988 Bethesda system for reporting cervical/vaginal cytologic diagnoses. Acta Cytol 33:567-574.

Solomon D, Davey D, Kurman R (2002). The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. JAMA 287:2114-2119.

National Cancer Institute workshop (1989). The 1988 Bethesda system for reporting cervical/vaginal cytologic diagnosis. JAMA 262: 931 – 934.