



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **65152** (13) **U**
(51) МПК (2011.01)
A61B 10/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ЦИТОГЕНЕТИЧНОЇ ДІАГНОСТИКИ ПЕРЕДРАКУ І РАКУ ШИЙКИ МАТКИ

1

2

(21) u201106256

(22) 19.05.2011

(24) 25.11.2011

(46) 25.11.2011, Бюл.№ 22, 2011 р.

(72) БОЛГОВА ЛІДІЯ СЕВАСТІАНІВНА, ТУГАНОВА
ТАМАРА МИКОЛАЇВНА, АЛЕКСЄЄНКО ОКСАНА
ІВАНІВНА

(73) НАЦІОНАЛЬНИЙ ІНСТИТУТ РАКУ

(57) Спосіб цитогенетичної діагностики передраку і раку шийки матки, що включає сріблення цитологічних препаратів з виявленням зон ядерцеутворюючих регіонів хромосом, який **відрізняється** тим, що початкові ознаки малігнізації визначають за основними морфофункціональними типами ядерця в залежності від їх ступеня активності.

Корисна модель належить до медицини, зокрема до морфології, і стосується онтогенетичної діагностики передраку і раку шийки матки (РШМ).

Відомий спосіб цитологічної діагностики передраку і РШМ, за допомогою якого нанесений на предметні скельця матеріал із шийки матки (ШМ) висушують на повітрі і фарбують за методом Паппенгейма, а після фіксації в суміші Нікіфорова - за методом Папаніколау [1]. При цьому ефективність цитологічної діагностики РШМ значно вища, ніж дисплазій (відповідно, 80 % і 52 %), що пов'язано з менш чіткими цитоморфологічними ознаками та суб'єктивною оцінкою диспластичних змін різного ступеня вираженості уражених епітеліальних клітин [2]. Наведені дані підтверджують необхідність покращання діагностики дисплазій і ранніх форм РШМ.

Одним з методів, який дозволяє на світлооптичному рівні оцінити рівень проліферативних процесів в популяціях змінених клітин і визначити ознаки початкової малігнізації, є вивчення ядерцеутворюючих регіонів (ЯУР) хромосом [3].

Прототипом запропонованої корисної моделі є спосіб цитогенетичного дослідження цитологічних препаратів мазків із ШМ, фіксованих і пофарбованих розчином срібла (Silver-stained nucleolar organizer regions in normal and dysplastic cervical lesions: correlation with DNA ploidy and S-phase fraction by flow cytometry /M.Singh, S. Prasad, N. Karla [et al.] //Oncology.-2006. - Vol.71, № 5-6. - P.411-416), який дозволяє виявити показники кількості аргентофільних гранул, розташованих в зонах ЯУР хромосом в змінених клітинах плоского епітелію ШМ при інтраепітеліальному ураженні низького і високого ступеня (відповідно, 4,33-5,86 і 5,91-7,42). При цьому високе число аргентофіль-

них гранул має прогностичне значення для ранньої цитологічної діагностики РШМ.

Перевагою прототипу є дослідження функціонального стану клітин і визначення початкових ознак малігнізації за пропорційним збільшенням кількості гранул срібла, розташованих в зонах ЯУР хромосом в змінених клітинах плоского епітелію ШМ, в залежності від ступеня інтраепітеліального ураження.

Недоліком прототипу є те, що аргентофільні гранули визначаються в місцях ЯУР хромосом з різною функціональною активністю і їх кількість не є точним показником рівня проліферативних процесів досліджених клітин.

В основу корисної моделі поставлена задача вдосконалити спосіб цитогенетичної діагностики передраку і раку шийки матки шляхом визначення ознак початкової малігнізації клітин плоского епітелію за основними морфофункціональними типами ядерця з їх різним ступенем активності, що дозволить підвищити ефективність цитологічної діагностики дисплазій і ранніх форм раку шийки матки.

Поставлена задача вирішується таким чином.

Вирішення поставленої задачі вдосконалення способу цитогенетичної діагностики передраку і РШМ включає три етапи.

На першому етапі проводять цитологічну діагностику матеріалу із ШМ, пофарбованого за методами Паппенгейма і Папаніколау. Для наступного етапу відбирають препарат, пофарбований за методом Паппенгейма з нечіткими цитоморфологічними ознаками дисплазії або її ступеня вираженості в клітинах зміненого плоского епітелію ШМ з позначенням цих місць склорізним маркером.

На другому етапі цитологічні препарати фіксують і фарбують розчином срібла за методом

(13) **U**(11) **65152**(19) **UA**

Howell W.M., Black D.A. з попереднім їх знебарвленням у 96 % етиловому спирті.

На третьому етапі проводять визначення основних морфофункціональних типів ядерець в змінених клітинах плоского епітелію ШМ за класифікацією П. В. Челідзе і О. В. Зацепіної [5].

Отримані показники основних морфофункціональних типів ядерець в клітинах плоского епітелію ШМ з ознаками слабкої, помірної, тяжкої дисплазії, підозрілих на рак і чіткими ознаками раку (табл.).

Таблиця

Морфофункціональні типи ядерець в клітинах передраку і раку шийки матки (M±m)*

№ п/п	Морфофункціональні типи ядерець	Слабка дисплазія (n=16)	Помірна дисплазія (n=18)	Тяжка дисплазія (n=15)	Підозріння на рак (n=15)	Плоско-клітинний рак (n=22)
1	Компактні ядереця	0,01±0,01	0,02±0,01	0,06±0,01	0,08±0,01	0,23±0,03
		0,20±0,01	0,50±0,01	1,18±0,04	1,28±0,06	3,20±0,01
2	Нуклеолонемні ядереця	1,47±0,07	1,56±0,05	1,55±0,02	1,80±0,02	1,70±0,04
		36,00±0,12	35,80±0,09	28,41±0,38	28,82±0,31	22,40±0,04
2.1	Власне нуклеолонемні**	75,40±0,50	67,00±0,52	43,23±0,31	33,89±0,19	11,10±0,20
2.2	Перехідні нуклеолонемно-компактні**	24,60±0,50	33,00±0,60	56,77±0,24	66,11±0,26	88,90±0,30
3	Кільцеподібні	1,00±0,06	1,00±0,07	1,47±0,01	1,38±0,02	1,70±0,03
		24,40±0,13	21,80±0,02	26,81±0,24	23,53±0,27	22,40±0,12
4	Мікроядереця	1,62±0,06	1,78±0,05	2,39±0,03	2,58±0,02	3,93±0,10
		39,40±0,14	41,60±0,13	43,60±0,37	46,37±0,30	52,00±0,13
5	Всього ядерець на 1 ядро	4,10±0,06	4,36±0,08	5,47±0,04	5,84±0,03	7,60±0,07

Примітки: * - в чисельнику абсолютні значення, в знаменнику %, ** - %.

При визначенні ознак початкової малігнізації клітин плоского епітелію ШМ виявлено пропорційне збільшення загальної кількості ядерець та числа компактних і перехідних нуклеолонемно-компактних їх типів в залежності від ступеня інтра-епітеліального ураження, що дає можливість з урахуванням цитоморфологічних ознак покращити цитологічну діагностику дисплазій і ранніх форм РШМ.

Вивчення загального вмісту основних морфофункціональних типів ядерець в клітинах плоского епітелію ШМ з ознаками атипії показало пропорційне збільшення їх відповідно ступеня цитоморфологічних неопластичних проявів при слабкій дисплазії - 4,10±0,06, помірній - 4,36±0,08, тяжкій - 5,47±0,04, підозрі на рак - 5,84±0,03 і раку - 7,60±0,07.

Визначений кількісний показник найбільш активних компактних типів ядерець, які є маркерами злоякісності, свідчить про пропорційне його збільшення в залежності від ступеня неоплазії клітин плоского епітелію ШМ, відповідно, при слабкій дисплазії - 0,20±0,01 %, помірній - 0,50±0,01 %, тяжкій - 1,18±0,04 %, підозрі на рак - 1,28±0,06 % і раку - 3,20±0,01 %.

Установлено, що кількість активних ядерець перехідного типу (нуклеолонемно-компактного) в клітинах плоского епітелію ШМ з ознаками дисплазії і атипії послідовно зростає згідно з підвищенням функціональної активності ЯУР і корелює з відповідними цитоморфологічними ознаками малігнізації: при слабкій дисплазії - 24,60±0,50 %, помірній -

33,00±0,60 %, тяжкій - 56,77±0,24 %, підозрі на рак - 66,11±0,26 % і раку - 88,90±0,30 %.

Визначена ефективність цитологічної діагностики передраку і РШМ за відомим і заявленим способом, яка склала, відповідно, при слабкій і помірній дисплазії - 50,00 і 66,67 % та тяжкій дисплазії і ранніх форм РШМ - 73,33 і 80,00 %.

Таким чином, при порівнянні результатів цитологічної діагностики дисплазій ШМ при використанні загальноприйнятого способу за матеріалом, пофарбованим за методами Паппенгейма і Папаніколау і заявленого способу визначається перевага заявленого способу, який дозволяє виявити ознаки початкової малігнізації клітин плоского епітелію ШМ та сприяє підвищенню ефективності цитологічної діагностики слабкої і помірної дисплазії на 16,67 % та тяжкої дисплазії і ранніх форм РШМ на 6,67 %.

Переконалим доказом ефективності застосування запропонованого способу є два приклади цитологічного дослідження матеріалу із ШМ за відомим і заявленим способом:

1. Хвора С-а О.Б., 1957 р. н., знаходилась в Національному інституті раку на обстеженні з клінічним діагнозом: дисплазія епітелію ШМ. При цитологічному дослідженні матеріалу з ШМ видано заключення № 4329/06 про наявність тяжкої дисплазії плоского епітелію ШМ. Для підтвердження діагнозу у хворої отримана біопсія з ураженої ділянки ШМ і проведено гістологічне дослідження. Гістологічний висновок № 20372-85/06: В матеріалі з ШМ на фоні вираженого хронічного цервіциту

відмічаються ділянки вираженої лейкоплакії і поширені ділянки тяжкої дисплазії багатшарового плоского епітелію, окремі ділянки внутрішньоепітеліальної карциноми з поодинокими розривами базальної мембрани.

Для цитогенетичного дослідження був відібраний препарат, пофарбований за методом Паппенгейма з цитоморфологічними ознаками тяжкої дисплазії в клітинах плоского епітелію ШМ з позначенням цих місць склорізним маркером. Потім цитологічний препарат був знебарвлений у 96 % етиловому спирті, зафіксований і пофарбований розчином нітрату срібла за методом Howell W.M., Black D.A. При мікроскопіюванні проводилось визначення основних морфофункціональних типів ядерців в 100 ядрах диспластично змінених клітинах плоского епітелію ШМ. При цьому загальний вміст ядерців склав $5,84 \pm 0,04$, кількість компактних - $0,09 \pm 0,01$ (1,45 %), нуклеолонемних - $1,50 \pm 0,01$ (26,59 %), з них власне нуклеолонемних - 28,67 % і перехідних нуклеолонемно-компактних - 71,33 %. Кількість неактивних кільцеподібних ядерців склала $1,09 \pm 0,01$ (18,44 %) і мікроядерців - $3,16 \pm 0,04$ (53,52 %). Отримані показники основних морфофункціональних типів ядерців в змінених клітинах плоского епітелію ШМ підтверджували наявність тяжкої дисплазії. В той же час високе число компактних і перехідних нуклеолонемно-компактних форм ядерців (вище середніх значень для групи тяжкої дисплазії) свідчило про поглиблення ступеня інтраепітеліального ураження і настання ознак початкової малігнізації.

2. Хвора М-ва М. І., 1980 р.н., знаходилась в Національному інституті раку на обстеженні з клінічним діагнозом: дисплазія епітелію ШМ. При цитологічному дослідженні матеріалу з ШМ видано заключення № 3762/05 про наявність слабкої дисплазії плоского епітелію ШМ. Для підтвердження діагнозу у хворої отримана біопсія з ураженої ділянки ШМ і проведено гістологічне дослідження. Гістологічний висновок № 7004/05: Епідермізуючий залозисто-фіброзний поліп цервікального каналу з метаплазією і нерізно вираженою дисплазією покривного епітелію.

Для цитогенетичного дослідження був відібраний препарат, пофарбований за методом Паппенгейма з цитоморфологічними ознаками слабкої дисплазії в клітинах плоского епітелію ШМ з позначенням цих місць склорізним маркером. Потім цитологічний препарат був знебарвлений у 96 %

етиловому спирті, зафіксований і пофарбований розчином нітрату срібла за методом Howell W.M., Black D.A. При мікроскопіюванні проводилось визначення основних морфофункціональних типів ядерців в 100 ядрах диспластично змінених клітинах плоского епітелію ШМ. При цьому загальний вміст ядерців склав $3,22 \pm 0,05$, кількість нуклеолонемних склала $1,28 \pm 0,02$ (39,80 %), з них власне нуклеолонемних - 50,00 % і перехідних нуклеолонемно-компактних - 50,00 %. Компактні типи ядерців були відсутні. Кількість неактивних кільцеподібних ядерців склала $0,18 \pm 0,12$ (5,60 %) і мікроядерців - $1,76 \pm 0,09$ (54,60 %). Враховуючи низький загальний вміст ядерців та відсутність компактних їх типів, отримані показники основних морфофункціональних типів ядерців в уражених клітинах плоского епітелію ШМ відповідали слабкій дисплазії. В той же час велике число перехідних нуклеолонемно-компактних форм (вище середніх показників для групи слабкої дисплазії) свідчило про поглиблення ступеня інтраепітеліального ураження і мало прогностичне значення для настання ознак початкової малігнізації без проведення спеціального лікування.

Джерела інформації:

1. Цитологический скрининг рака шейки матки: пособие для врачей /Л. С. Болгова, Т. Н. Туганова, Л. И. Воробьева [и др.]. - К., 2007.-148 с.

2. Авраменко Н. В. Контроль качества цитологических исследований. Сравнительная характеристика эффективности цитологической диагностики предрака и рака шейки матки в условиях скрининга /Н. В. Авраменко, О. Г. Михайлова, М. А. Каушман //Цитологический скрининг рака шейки матки: материалы наук.-практ. конф. - опубл.: Репродуктивное здоровье женщины.-2007. - № 3 (32), прилож., ч. 2. - С. 4-5.

3. Howell W.M. Controlled silver staining of nucleolar regions with protective colloidal developer: a one step method/W.M. Howell, D. A.Black // Experientia.-1980. - Vol.36, № 2. - P.1014.

4. Silver-stained nucleolar organizer regions in normal and dysplastic cervical lesions:correlation with DNA ploidy and S-phase fraction by flow cytometry /M.Singh, S. Prasad, N. Karla [et al.] //Oncology.-2006. - Vol.71, № 5-6. - P.411-416 (прототип).

5. Челидзе П. В. Морфофункціональна класифікація ядрышек /П. В. Челидзе, О. В. Зацепина // Успехи современной биологии.-1988. - Т. 105, № 2. - С. 252-268.