

УДК 618.146-006.6-07

Л.А. ЯГУДИНА

Казанская государственная медицинская академия, 420012, Казань, ул. Бутлерова, д. 36

Применение лабораторных маркеров в прогнозировании рака шейки матки

Ягудина Лейла Асхатовна — кандидат медицинских наук, доцент кафедры клинической лабораторной диагностики, тел. (843) 236-09-09, e-mail: yagudinaleila@mail.ru

В статье представлен анализ данных литературы по использованию различных лабораторных маркеров в прогнозе рака шейки матки (РШМ). Ведущую роль в развитии РШМ играет вирус папилломы человека (ВПЧ). Особое внимание уделяется определению нуклеиновых кислот ВПЧ, генотипированию вирусов по степени их онкогенности, определению вирусных белков — предикторов развития злокачественного роста и выявлению поврежденных клеточных факторов в прогнозировании рака шейки матки. Дается сравнительная характеристика лабораторных методов диагностики данных маркеров. Обсуждаются достоинства и ограничения в использовании каждого из маркеров в прогнозировании РШМ.

Ключевые слова: вирус папилломы человека (ВПЧ), рак шейки матки (РШМ).

L.A. YAGUDINA

Kazan State Medical Academy, 36 Butlerov St., Kazan, Russian Federation 420012

Application of laboratory markers in forecasting cervical cancer

Yagudina L.A. — Cand. Med. Sc., Assistant Professor of the Department of Clinical Pathology, tel. (843) 236-09-09, e-mail: yagudinaleila@mail.ru

This article presents data analysis of the literature on the use of various laboratory markers in the prediction of cervical cancer (CC). Human papilloma virus (HPV) plays a key role in the development of cervical cancer. Special attention is paid to the identification of nucleic acids of HPV, viruses genotyping in accordance with the level of oncogenicity, identification of virus prediction proteins of development of malignant growth and identification of damaged cellular factors for predicting cervical cancer. Comparative analysis of laboratory methods of diagnosis this markers is given here. Worth and limitations in use of this markers in prognosis of cervical cancer are discussed.

Key words: human papilloma virus (HPV), cervical cancer.

Рак шейки матки — первый вирус-индуцированный солидный рак, обнаруженный у человека. Роль папилломавирусов человека в этиологии этого заболевания хорошо известна [1-3]. За открытие онкогенности ВПЧ Harald Zur Hausen получил Нобелевскую премию в области физиологии и медицины в 2008 году. Из 40 генотипов папилломавирусов, поражающих аногенитальную область, высокоонкогенными являются: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68. Наиболее распространенным генотипом, индуцирующим плоскоклеточный рак (59,3%) и аденокарциному (36,3%), является ВПЧ-16. Вторым по распространенности генотипом является ВПЧ-18, индуцирующий аденокарциному в 36,8% и плоскоклеточный рак в 13,2%. Как онкогенные, так и неонкогенные типы ВПЧ стимулируют пролиферацию клеток эпителия, но не идентичным способом. Поэтому предрасположенность гени-

тального поражения к злокачественной трансформации определяется в первую очередь типом вируса [4].

Отсутствие систем для культивирования вируса *in vitro* в течение долгого времени препятствовало исследованию данной проблемы. Лишь методы молекулярной диагностики дали веские доказательства, что ВПЧ играет главную роль в развитии специфических аногенитальных раков, включая рак шейки матки, влагалища, вульвы, полового члена, ануса [4, 5].

Механизмы онкогенности ВПЧ

Мутации генов ВПЧ (генов E2, E6, E7) могут быть важными факторами предрасположенности к злокачественной патологии клеток эпителия шейки матки. Три ранних гена (E1, E2, E4) контролируют функции, необходимые для репродукции вируса, причем E2 является регулятором транскрипции



вирусной ДНК. Гены E5, E6, E7 стимулируют пролиферацию и трансформацию клеток. Иницирующим фактором выступают мутации в различных участках гена E1, в результате чего ДНК папилломавируса внедряется в хромосомы клетки хозяина. После интеграции циркулярная ДНК открыта в области E1 и E2 генов, что заканчивается их разрушением, приводящим к неконтролируемой экспрессии генов E6 и E7 и, соответственно, к повышению синтеза белков E6 и E7. Гены, кодирующие ранние белки E6 и E7, являются онкогенами, а сами белки E6 и E7 — онкопротеинами. Гены E6 и E7 выявляются в опухолевых клетках, зараженных вирусом, в то время как другие фрагменты вирусного генома могут быть утеряны в процессе его длительной персистенции. Онкогены изменяют жизненный цикл клетки, связываясь с опухолевыми супрессорными белками p53 и белками ретинобластомы (pRb), участвующими в регуляции апоптоза. Кроме того, эти гены способствуют интеграции вируса в геном клетки-хозяина. При интеграции в геном онкоген E6 формирует инактивирующие комплексы с p53 (E6/p53), а E7 — с pRb (E7/pRb), после чего индуцируется процесс опухолевой трансформации. Также белок E6 подавляет выработку интерферона, предотвращает деградацию тирозинкиназ, активирует теломеразу, усиливая пролиферацию. В эписомальном состоянии вирус вызывает доброкачественные разрастания инфицированного эпителия, тогда как интеграция ВПЧ в геном клетки, которая более характерна для высокоонкогенных генотипов, сопровождается прогрессированием генитальных кондилом в злокачественную опухоль. Парадоксально, что продуктивная инфекция приводит к образованию остроконечных кондилом, которые имеют очень низкую вероятность прогрессирования в предрак или рак, а непродуктивные плоские кондиломы, которые обычно не видны невооруженным глазом, являются намного более опасным поражением [6-9].

Лабораторные методы выявления факторов прогноза рака шейки матки

Наиболее распространенным методом выявления цервикальной онкопатологии и косвенных признаков ВПЧ-инфекции является цитологический метод. С целью единого понимания предраковых процессов шейки матки в Национальном институте рака (США) была разработана и предложена классификация, получившая название Bethesda system [10]. Согласно этой классификации, изменения в шейке матки, связанные с дисплазией и преинвазивной карциномой, объединены под термином «плоскоклеточные интраэпителиальные поражения» низкой и высокой степени градации — SIL. SIL низкой степени градации включает в себя цервикальную интраэпителиальную неоплазию I степени (CIN I), а SIL высокой степени градации охватывает CIN II, CIN III и интраэпителиальный рак.

Наиболее специфическими клетками для ВПЧ являются койлоциты. Они образуются вследствие цитопатического действия ВПЧ и представляют собой клетки многослойного плоского эпителия неправильной формы, с четкими границами. Размеры койлоцитов различные, обычно они больше нормальных клеток. Ядра увеличены в разной степени, ядерная мембрана неровная, складчатая. Отмечается усиление окраски ядерного вещества, хроматин часто «смазан-

ный», что придает вид матового стекла. В части клеток наблюдается кариорексис. Все вышесказанное придает ядрам койлоцитов вид «изюма». Цитоплазма сохраняется только в периферических отделах клетки, образуя перинуклеарное гало (околоядерная зона просветления, сформированная за счет дегенеративных изменений и некроза разрушенных цитоплазматических органелл). Второй по специфичности клеткой считается дискератоцит. Это мелкие клетки многослойного плоского эпителия с пикнотическими ядрами различной формы и величины и интенсивной эозинофильной цитоплазмой, которые располагаются комплексами в поверхностных слоях эпителия [11].

К недостаткам цитологических исследований могут быть отнесены сложность исполнения, неэффективность трактовки результатов, сложность стандартизации и высокие требования к квалификации врача-цитолога. Специфичность метода высока и составляет 98%, однако остаются проблемой низкая воспроизводимость (от 11 до 80%) и низкая чувствительность (40-60%) метода. Значение цитологического скрининга в борьбе с раком шейки матки сохраняется, но массовые целевые осмотры не дают возможности выявить все случаи предраковых изменений [12-14].

Гистологический метод является «золотым стандартом» диагностики, однако высокая стоимость, невозможность частого проведения, не всегда точный прицельный забор материала ограничивают его использование. При этом не всегда четко дифференцируются признаки ВПЧ и CIN [15].

Определение нуклеиновых кислот ВПЧ

Главным преимуществом использования этих биомаркеров является высокая чувствительность определения ВПЧ, отрицательная прогностическая ценность, т.к. отсутствие высокоонкогенного генотипа ВПЧ указывает на крайне низкий риск развития необратимой интраэпителиальной неоплазии или рака. Риск рака остается очень низким до 5 лет после отрицательного теста на ВПЧ. Маркер также хорош для выявления предраковых состояний, которые часто упускаются при использовании цитологических методов.

Есть широкий спектр доступных методов лабораторного исследования для обнаружения ВПЧ, основанных на полимеразной цепной реакции (ПЦР). Их можно разделить на 2 группы: 1-я — тест для выявления широкого спектра онкогенных и неонкогенных вирусов; 2-я — тесты для выявления отдельных генотипов или пула генотипов высокого или низкого онкогенного риска [16, 17].

Для диагностики ВПЧ применяют чаще всего методы **детекции ДНК**. Среди амплификационных методов перспективна система двойной генной ловушки, которая обеспечивает: количественный анализ, компьютерную интерпретацию результатов, воспроизводимость и достоверность результатов, полный цикл исследования в течение одного рабочего дня, абсолютную специфичность. Однако использование этого метода для диагностики рака шейки матки приводит к значительной гипердиагностике, т.к. в 80% случаев инфицирование имеет кратковременный характер и заканчивается спонтанным выздоровлением и элиминацией. Обнаружение ДНК имеет большое значение для прогнозирования разви-

тия рака шейки матки. Если уже имеется картина дисплазии эпителия шейки матки, можно судить о степени канцерогенного риска. Пороговой концентрацией, характерной для дисплазии, является 100 000 копий/мл или 1 пг/мл. Принято считать, что при показателях уровня ДНК ВПЧ выше этой границы вероятность развития онкологического процесса велика.

Важность выявления ДНК ВПЧ и типирования вируса обусловлена тем, что у 15-20% женщин с наличием ДНК вируса в течение двух лет развивается сквамозная интраэпителиальная дисплазия эпителия, а без ДНК ВПЧ заболевание развивается лишь в 3% случаев.

Показания к проведению исследования:

1) для проведения первичного скрининга совместно с цитологическим исследованием для женщин старше 30 лет;

2) на втором этапе после цитологии для разрешения сомнительных ситуаций;

3) контроль проведенного хирургического лечения [18].

Детекция РНК ВПЧ-тест предназначен для обнаружения вирусных м-РНК, кодирующих белки Е6 и Е7, которые являются наиболее важными предикторами развития рака шейки матки. Избыточная экспрессия м-РНК была оценена как маркер перехода продуктивной инфекции в интегративную и в предрак и имеет более высокую прогностическую ценность по сравнению с определением ДНК ВПЧ. Чувствительность м-РНК Е6/Е7 теста составляет порядка 80%, специфичность — 80-90%, а также высокий показатель негативного прогноза (0,99/0,97 соответственно) [19].

Перспективными являются методы определения в цервикальном материале онкобелков Е6 и Е7 как маркеров, свидетельствующих о начавшемся процессе малигнизации эпителиальных клеток. Достоинством онкопротеина Е7 как прогностического маркера является и то, что этот белок в норме в тканях не определяется. Его происхождение полностью связано с жизненным циклом интегративной формы ВПЧ-инфекции. Онкобелок Е6 способствует транскрипции теломеразной обратной транскриптазы, которая стабилизирует и восстанавливает повторяющиеся последовательности ДНК в конце хромосом теломер. Усиление хромосомы 3q и притор хромосом 5p, содержащих ген транскрипции теломеразной обратной транскриптазы, были связаны с CIN II со специфичностью 97% [20, 21].

Используется также иммуногистохимический метод, основанный на выявлении P16INK4a — клеточного протеина, участвующего в регуляции клеточного цикла. В нормальных эпителиальных клетках шейки матки протеин P16ink4a экспрессируется в очень малом количестве и иммуногистохимическими методами не выявляется. Нарушение регуляции P16INK4a, вероятно, связано с угнетением функции белка-супрессора опухолевого роста pRb в результате формирования инактивирующих комплексов с онкопротеином Е7 (Е7/pRb). Поэтому P16INK4a может рассматриваться как не прямой маркер активной онкогенной экспрессии ВПЧ высокого онкогенного риска. Кроме того, избыточная экспрессия P16INK4a коррелирует с цервикальной интраэпителиальной неоплазией (CIN) II степени или прогнозирует развитие CIN II в течение трех лет среди ВПЧ-положительных женщин, особенно в возрасте 35-60 лет.

Новые данные свидетельствуют о том, что микро-РНК, малые некодирующие одноцепочечные РНК, которые регулируют экспрессию генов клеток, могут быть вовлечены в патогенез многих раковых заболеваний, в том числе и рака шейки матки. Снижение экспрессии микро-РНК-218, микро-РНК-375 играет важную роль в прогрессировании рака шейки матки. Эти маркеры могут явиться новыми кандидатами на роль скрининга и прогностической оценки у женщин с цервикальной неоплазией [22].

Метилирование вирусных и клеточных генов в прогрессировании неоплазии шейки матки. Метилирование ДНК является одним из эпигенетических механизмов, влияющих на транскрипцию генов, структуру хроматина, геномной стабильности. Аномальное метилирование генов-супрессоров опухолей встречается при различных видах рака, поэтому анализ метилирования ДНК в качестве биомаркеров в клинической онкологии представляется перспективным. Недавние исследования показали, что метилирование вирусной и клеточной ДНК является потенциальным биомаркером повышения точности цервикального скрининга у женщин с высокоонкогенными генотипами ВПЧ. Показано повышенное метилирование генов L1, L2, E2, E4 при CIN II. Однако коммерческие тесты на определение метилирования ДНК ВПЧ пока не разработаны [23].

Приведенные выше данные показывают, что организованный цитологический скрининг рака шейки матки с использованием тех или иных маркеров-предикторов является в настоящее время единственным проверенным способом, доказавшим свою эффективность в профилактике инвазивного РШМ. При длительном его применении показатели заболеваемости и смертности от РШМ постепенно снижаются, а затем поддерживаются на низком уровне. В нашей стране цитологический метод исследования при массовых профилактических гинекологических осмотрах начал использоваться с 1964 г. в Ленинградской области, а также в системе лечебно-профилактических учреждений Октябрьской железной дороги. Общегосударственный цитологический скрининг на РШМ начался после создания централизованных цитологических лабораторий (ЦЦЛ) на основании приказа Минздрава СССР № 1253 от 30.12.76 г. [24].

В России до сих пор нет программы организованного современного скрининга рака шейки матки. Приказами Министерства здравоохранения регламентированы лишь общие положения: ежегодные профилактические осмотры всех женщин старше 18 лет с проведением цитологического исследования мазков из шейки матки и шеечного канала. За последние 20 лет стратегия скрининга рака шейки матки не менялась. Отсутствие программы скрининга с разработкой всех организационных вопросов и контроля над ее выполнением является одной из основных причин недостаточной эффективности скрининга.

По зарубежному опыту наиболее выраженный эффект дает скрининг женщин старше 30 лет с интервалом не реже 1 раза в 5 лет с применением комплекса исследований, включающих цитологическое исследование мазка из шейки матки и ПЦР исследование на высокоонкогенные генотипы ВПЧ [25, 17, 19-21].



ЛИТЕРАТУРА

1. Ogilvie G.S., van Niekerk D.J. et al. A randomized controlled trial of Human Papillomavirus (HPV) testing for cervical cancer screening: trial design preliminary results // BMC Cancer. — 2010. — 2. — 111 p.
2. McCreddie M.R., Sharples K.J. et al. Natural history of cervical neoplasia and risk of invasive cancer in women with cervical intraepithelial neoplasia 3: a retrospective cohort study // Lancet Oncol. — 2008. — Vol. 2. — P. 425-34.
3. Назарова Е.Л., Йовдий А.В. Лечение больных латентной формой папилломавирусной инфекции // Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. — 2008. — Т. 7, № 5. — С. 47-51.
4. Киселев В.И., Киселев О.И. ВПЧ в развитии рака шейки матки. — М., 2006. — 80 с.
5. Peirson L., Fitzpatrick-Lewis D. et al. Screening for cervical cancer. Hamilton, ON: McMaster Evidence Review and Synthesis Centre, 2012.
6. Sasieni P., Castanon A. et al. Screening and adenocarcinoma of the cervix // Int.J.Cancer. — 2009. — Vol. 2. — P. 525-29.
7. Higgins J.P.T., Altman D.G. In: Cochrane Handbook for systematic Reviews of interventions // West Sussex, UK: Wiley, 2008. — P. 297-333.
8. Киселев В.И., Киселев О.И. Этиологическая роль вируса папилломы человека в развитии рака шейки матки: генетические и патогенетические механизмы. — Цитокины и воспаление. — 2003. — Т. 2, № 4. — С. 31-38.
9. Новик В.И. Эпидемиология рака шейки матки, факторы риска, скрининг // Практическая онкология. — 2002. — Т. 3, № 3. — С. 156-165.
10. Vesco K.K., Witlock E.P. et al. Screening for cervical cancer: a systematic evidence review for the US. Preventive services task force. Rockville, MD: Agency for healthcare research and quality (US). — 2011.
11. Andrae B., Kemetli L. et al Screening-preventable cervical cancer risks: evidence from a nationwide audit in Sweden // J.Natl. Cancer Inst. — 2008. — Vol. 2. — P. 622-29.
12. Леонов М.Г. Совершенствование цитологического метода диагностики рака шейки матки // Кубанский научно-медицинский вестник. — 2010. — № 6. — С. 75-78.
13. Decker K., Demers A. et al. Papanicolaou test utilization and frequency of screening opportunities among women diagnosed with cervical cancer. Open Med. — 2009. — 2. — e140-7.
14. Zappa M., Visioli C.B. et al. Lower protection of cytological screening for adenocarcinomas and shorter protection for younger women: the results of a case-control study in Florence // Br.J.Cancer. — 2004. — Vol. 2. — P. 1784-86.
15. Sasieni P., Castanon A. et al. Effectiveness of cervical screening with age: population based case-control study of prospectively recorded data // BMJ. — 2009. — Vol. 2. — b2968.
16. Rebolj M., van Ballegooijen M. et al. Incidence of cervical cancer after several negative smear results by age 50: prospective observational study // BMJ. — 2009. — Vol. 2. — b1354.
17. Sterne J.A.C., Egger M. et al. In: Cochrane handbook for systematic reviews of interventions. Higgins J.R.T., Green S., editor. West Sussex, UK, Wiley. — 2008. — P. 297-333.
18. Новик В.И. Скрининг рака шейки матки // Практическая онкология. — 2010. — Т. 11, № 2. — С. 66-73.
19. Sasieni P., Adams J. et al. Benefit of cervical screening at different ages: evidence from UK audit of screening histories // Br.J.Cancer. — 2003. — Vol. 2. — P. 288-93.
20. Puccala E., Coebergh J.W.W. et al. Mass screening programmes and trends in cervical cancer in Finland and the Netherlands // Int. J. Cancer. — 2008. — Vol. 2. — P. 1854-58.
21. Sankaranarayanan R., Nene B.M. et al. HPV screening for cervical cancer in rural India // N. Engl. J. Med. — 2009. — Vol. 2. — P. 1385-94.
22. Miller M.G., Sung H.Y. et al. Screening interval and risk of invasive squamous cell cervical cancer. Obstet. Gynecol. — 2003. — Vol. 2. — P. 29-37.
23. Guyatt G.H., Oxman A.D. et al. GRADE: an emerging consensus on rating quality of evidence and strength of recommendations // BMJ. — 2008. — Vol. 2. — P. 924-26.
24. Приказ Минздрава СССР №1253 от 30.12.76 г. «О мерах по улучшению цитологической диагностики злокачественных новообразований».
25. Kasinpila C., Promthet S. et al. Evaluation of the nationwide cervical screening programme in Thailand: a case-control study // J. Med. Screen. — 2011. — Vol. 2. — P. 147-53.

УВАЖАЕМЫЕ АВТОРЫ!

Перед тем как отправить статью в редакцию журнала «Практическая медицина», проверьте:

- Направляете ли Вы отсканированное рекомендательное письмо учреждения, заверенное ответственным лицом (проректор, зав. кафедрой, научный руководитель), отсканированный лицензионный договор.
- Резюме не менее 6–8 строк на русском и английском языках должно отражать, что сделано и полученные результаты, но не актуальность проблемы.
- Рисунки должны быть черно-белыми, цифры и текст на рисунках не менее 12-го кегля, в таблицах не должны дублироваться данные, приводимые в тексте статьи. Число таблиц не должно превышать пяти, таблицы должны содержать не более 5–6 столбцов.
- Цитирование литературных источников в статье и оформление списка литературы должно соответствовать требованиям редакции: список литературы составляется **в порядке цитирования источников**, но не по алфавиту.

Журнал «Практическая медицина» включен Президиумом ВАК в Перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени доктора и кандидата наук.