

УДК618.146-006.6+618.146-007.17]-07:578.827.1

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ОНКОПРОТЕИНА P16INK4A И ПЦР-АНАЛИЗА ВИРУСОВ ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА В ДИАГНОСТИКЕ ДИСПЛАЗИЙ И РАКА ШЕЙКИ МАТКИ

О.В. Михалева¹, Л.Д. Андосова², К.Н. Конторщикова²,
С.Ю. Куделькина¹, О.Л. Блатова¹, И.А. Кузнецова³,

¹Медицинский центр «Тонус», г. Н. Новгород, ²ГБОУ ВПО «Нижегородская государственная медицинская академия»,

³ГУЗ «Нижегородская областная клиническая больница им. Н.А. Семашко»

Михалева Ольга Владимировна – e-mail: tonus_nn@mail.ru

Цель и задачи исследования: оценить экспрессию белка p16ink4a в цитологических препаратах методом иммуноцитохимии у женщин репродуктивного возраста с фоновыми, предраковыми заболеваниями и раком шейки матки. Обследованы 153 женщины от 20 до 60 лет с фоновыми процессами и цитологически подтвержденными дисплазиями. Иммуноцитохимическое исследование мазков на белок p16ink4a выполнено при помощи наборов Cintec. 84 пациентки с фоновыми процессами, 36 женщин с поражениями низкой степени тяжести (LSIL), 1 пациентка с HSIL выявили негативную реакцию на p16ink4a в клетках. Позитивная реакция получена у 2 женщин (7,4%) 2-й группы; у 2 женщин 3-й группы (15,4%); у 16 (94,1%) с дисплазией III ст., рак in situ – 4-я группа. У больных с инвазивным раком p16ink4a в цервикальном эпителии экспрессируется в больших количествах – 12 пациенток (100%). Белок p16ink4a является надежным маркером истинных диспластических изменений и может быть использован как дополнительный метод обследования больных с дисплазиями и раком шейки матки.

Ключевые слова: онкопротеин p16ink4a, папилломавирусная инфекция, рак шейки матки.

Goals and objectives of research: to evaluate the expression of p16ink4a protein in cytological preparations by using immunocytochemistry method among women at childbearing age with background disease, precursor of cancer and cervical carcinoma. 153 women were examined at the age of 20 to 60 years old with background processes and cytologically affirmed dysplasia. The immunocytochemistry research of p16ink4a smears were made by using Cintec. 84 patients with background disease, 36 women with affections of a lesser heaviness degree (LSIL), one patient with HFIL revealed negative reaction on p16ink4a at cells. 2 women (7,4 percentages) of the second group, 2 women (15,4 percentages) of the third group, 16 women (94,1 percentages) with dysplasia III, cancer in situ – the forth group had the positive reaction. p16ink4a in cervical epithelium expressed in large quantities among patients with invasive cancer – 12 patients (100 percentages). The protein p 16 ink4a is a reliable marker of veritable dysontogenetic changes and it could be used as additional method of patients' examination with dysplasia and cervical carcinoma.

Key words: oncoprotein p16ink4a, papilloma virus infection, cervical carcinoma.

Рак шейки матки (РШМ) занимает второе место по распространенности среди онкологических заболеваний в мире и первое место среди причин женской смертности от рака в развивающихся странах [1, 2]. Важнейшим фактором канцерогенеза шейки матки является инфицирование женщин вирусом папилломы человека (ВПЧ) [3]. Более 20% женщин, в зависимости от возраста, инфицированы ВПЧ, но только у некоторых из них развиваются клинически подтвержденные диспластические изменения или рак шейки матки [4]. Механизм канцерогенеза начинается при

целом ряде условий. Ключевым событием является интеграция вируса в геном клетки, что сопровождается активацией синтеза онкобелков Е6, Е7. Киназа Е2F обеспечивает прохождение клетки из G1 в S фазу клеточного цикла. В норме она неактивна, находясь в связанном состоянии с белком супрессором Rb. Белок p16ink4a осуществляет контроль разобщения комплекса Е2F-Rb, не допуская безудержной пролиферации клетки. Белок Е7 вируса папилломы человека высокого онкогенного риска при своем взаимодействии с продуктом гена ретинобластомы приводит к разобщению комплекса

E2F-Rb, E2F остается постоянно в активном состоянии, стимулируя безудержную пролиферацию клетки, что приводит к постоянному его синтезу. Иммуноцитохимически это проявляется позитивной реакцией на p16ink4a в диспластически измененном эпителии шейки матки [5, 6].

Цель исследования: оценить экспрессию белка p16ink4a в цитологических препаратах методом иммуноцитохимии у женщин репродуктивного возраста с фоновыми, предраковыми заболеваниями и раком шейки матки.

Материал и методы

Обследованы 153 женщины от 20 до 60 лет с фоновыми процессами и цитологически подтвержденными дисплазиями: 1-я группа – 84 пациентки с фоновыми процессами шейки матки; 2-я группа – 27 пациенток с дисплазиями I степени; 3-я группа – 13 женщин с дисплазией II степени; 4-я группа – 17 пациенток с дисплазией III степени и начальными формами рака (сг in situ); 5-я группа – 12 женщин с инвазивным раком. Материалом для исследования служили образцы эпителия шейки матки, забранные с использованием одноразовых цервикальных цитощеток Cervix-brush и Cytobrush в транспортную среду «Cytoscreen System» («Seroa», Италия) для жидкостной цитологии и в транспортную среду «Ампли Сенс» для забора материала из урогенитального тракта женщины. Клеточная суспензия обрабатывалась на цитоцентрифуге с формированием двух мазков. Количество помещаемой клеточной суспензии, скорость и ускорение центрифугирования определяли в зависимости от густоты исследуемого материала. Под действием центробежной силы клетки осаждались на стекле на участке около 0,5 см в диаметре с формированием монослойного мазка. Жидкость в процессе центрифугирования поглощалась одноразовым фильтром. Первый из мазков окрашивали экспресс-красителем MGG, результаты окрашивания аналогичны получаемым в методе Май Грюнвальд-Гимза, второй подвергался иммуноцитохимическому исследованию на белок p16ink4a. Иммуноцитохимическое исследование мазков на белок p16ink4a выполнено при помощи наборов Cintec «Цитология» компании «Биолайн» эксклюзивного дистрибьютора компании «MTM laboratories AG» (Германия). Реакцию считали позитивной, если хотя бы одна диспластическая клетка оказывалась позитивной на p16. Оценивались ядерная реакция, ядерная реакция совместно с цитоплазматической. Результаты жидкостной цитологии сопоставлялись с результатами традиционной. Для выявления и определения генотипа ВПЧ использовали тест-систему «Ампли Сенс ВПЧ ВКР генотип-Fl», «Ампли Сенс ВПЧ ВКР скринитр-Fl». Наборы данных реагентов предназначены для выявления, дифференциации и количественного определения ДНК ВПЧ ВКР 16-, 18-, 31-, 33-, 35-, 39-, 45-, 51-, 52-, 56-, 58-, 59-го типов в клиническом материале методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией. Принцип метода основан на одновременной амплификации (мультикомплекс – ПЦР) в одной пробирке участков ДНК трех типов

ВПЧ и участка ДНК –глобинового гена, используемого в качестве эндогенного внутреннего контроля. ПЦР-анализ на наличие ДНК двенадцати типов ВПЧ проводится в четырех пробирках. Каждый тип регистрируется по своему каналу флуоресценции, что позволяет не только выявлять, но и определять генотип обнаруженного ВПЧ ВКР. Концентрацию ДНК ВПЧ в исследуемых пробах определяли с помощью стандартных кривых, построенных с использованием ВПЧ клонов данных типов. Вирусную нагрузку рассчитывали как количество копий ДНК ВПЧ, выраженное в lg на 10⁵ клеток. Полученный материал исследовали методом ПЦР-PB с использованием анализатора «iQ5» Cyclex («Bio-RAD», США), комплекта тест-систем ФГУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора. Полученные данные подвергнуты статистической обработке. Оценивались следующие статистические показатели: распределение эмпирических статистических совокупностей и параметров этого распределения, промежуточные итоги в виде абсолютных величин, относительные величины.

Результаты и их обсуждение

В целом, присутствие онкогенных типов ВПЧ обнаружено у 134 (87,6%) обследованных; среди первой группы – у 83,3% (70 женщин), с ЦИН I – у 81,5% (22) и у 100% больных в группах с ЦИН II, III и с раком шейки матки. ВПЧ 16-го типа был обнаружен у 88 пациенток (57,6%), следующим по распространенности был 56-й тип – 72 женщины (47%). Частота распространения остальных генотипов варьировала от 23 до 2%. В группе пациенток с фоновыми процессами с ЦИН I, II наиболее часто встречались ВПЧ 56-го типа – 26,5–28%; ВПЧ 16-го типа – 12,9–10,3%, соответственно. У больных с ЦИН III и с раком шейки матки ВПЧ 16-го типа существенно доминирует над остальными типами – 39,4–36,4%, соответственно, остальные типы (56-, 58-, 18- и 45-й) составили от 13 до 9% выявлений. В процессе исследования 84 пациентки с фоновыми процессами, 36 женщин с поражениями низкой степени тяжести (LSIL), 1 пациентка с тяжелыми интраэпителиальными поражениями (HSIL) выявили негативную реакцию на p16ink4a в клетках. Позитивная реакция получена у 2 женщин (7,4%) 2-й группы; у 2 женщин 3-й группы (15,4%); у 16 женщин (94,1%) с дисплазией III ст., рак in situ – 4-я группа. У женщин 2-й группы отмечены ВПЧ ВКР в высокой концентрации, с вирусной нагрузкой, обозначаемой как «порог прогрессии» – 5,31 и 8,65 lg на 100 тыс. клеток, с носительством 5 генотипов ВПЧ ВКР, т. е. это пациентки, которые требуют дальнейшего обследования и наблюдения. В группах 3 и 4 была выполнена конусовидная электроэксцизия шейки матки. В 3-й группе после гистологического исследования у женщины с дисплазией II–III ст. выявлен сг in situ шейки матки, генотипы ВПЧ ВКР 16, 51, 58; вирусная нагрузка 7,2 lg на 100 тыс. клеток, у второй пациентки диагноз Д III, генотипы ВПЧ ВКР 16, 51, 58; вирусная нагрузка 6,5. В 4-й группе после гистологического исследования у 6 больных с дисплазией III степени подтвержден сг in situ шейки матки, генотипы 16, 56, 52, 51; вирусная нагрузка более 5 lg

на 100 тыс. клеток. В группе больных с инвазивным раком p16ink4a в цервикальном эпителии экспрессируется в больших количествах – 12 пациенток (100%). ВПЧ ВКР 16-го типа встречается в группе в 91,7% случаев РШМ, вирусная нагрузка 3 Ig геномов ВПЧ на 100 тыс. клеток – порог клинической значимости – у 9 больных (75%), порог прогрессии – 5 Ig выявляют 25% женщин.

Выводы. Белок p16ink4a является надежным маркером истинных диспластических изменений в клетках эпителия цервикального канала и может быть использован как дополнительный метод обследования больных с дисплазиями и раком шейки матки. Определение вирусов папилломы человека высокого канцерогенного риска методом ПЦР в режиме реального времени с определением вирусной

нагрузки, внедрение молекулярных маркеров повышают эффективность диагностики предраковых состояний и улучшают прогнозирование развития рака шейки матки.



ЛИТЕРАТУРА

1. Прилепская В.Н. Патология шейки матки и генитальные инфекции. М.: МЕД пресс-информ, 2008. С. 384.
2. Сидорова И.С., Леваков С.А. Фоновые и предраковые процессы шейки матки. М.: Медицинское информационное агентство, 2006. С. 92.
3. Киселев В.И. Вирусы папилломы человека в развитии рака шейки матки. М.: Димитрейд График Групп, 2004. С. 182.
4. Роговская С.И. Папилломавирусная инфекция у женщин и патология шейки матки. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. С. 188.
5. Котов В.А., Раскин Г.А., Протасова А.Э. Применение жидкостной цитологии и иммуноцитохимического определения онкомаркера p16ink4a для скрининга, диагностики и выбора тактики лечения заболеваний шейки матки: учебное пособие. СПб. 2009. С. 24.
6. Молочков В.А., Киселев В.И., Рудых И.В. и др. Папилломавирусная инфекция. М.: Мириада Вива, 2008. С. 32.