

ОНКОЛОГИЯ

УДК 61

А. Э. Протасова¹, Г. А. Раскин^{2,3}, Р. В. Орлова^{1,2,3}, В. А. Котов², С. В. Петров⁴,
И. В. Рыков²

**ОЦЕНКА ОНКОГЕННОГО РИСКА РАЗВИТИЯ РАКА ШЕЙКИ МАТКИ
МЕТОДАМИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВПЧ И ЭКСПРЕССИИ БЕЛКА ПРОЛИФЕРАЦИИ
(p16ink4α)**

¹ ГОУ ДПО «Санкт-Петербургская медицинская академия последипломного образования»;

² ФГУЗ «Клиническая больница №122», ФМБА России, г. Санкт-Петербург;

³ СПбГУЗ «Городской клинический онкологический диспансер»;

⁴ ГОУ ВПО «Казанский государственный медицинский университет»

Рак шейки матки относится к основным онкогинекологическим опухолям. Инвазивный рак шейки матки делит II–III места в структуре онкогинекологической заболеваемости и составляет от 25 до 30% (в США и Санкт-Петербурге — 25%, в России — 30%). Ежегодно в мире инвазивным раком шейки матки (РШМ) заболевают более 500 000 [1–3], а 274 000 женщин умирают от данного заболевания, кроме того, 78% заболевших приходится на развивающиеся страны. В странах Европейского союза средний показатель ежегодной заболеваемости раком шейки матки составляет 13,2 случаев на 100 тыс. женщин, а смертности — 5,9 случаев на 100 тыс. женщин в год [4]. В России число заболевших РШМ достигает 12 700 [5], а заболеваемость составляет 17,2 на 100 000 женского населения. Средний возраст больных раком шейки матки — 47–54 года (в США — 47 лет, в Санкт-Петербурге — 54,4 года) [1, 2, 5]. В последнее десятилетие рак шейки матки заметно «помолодел». До 70% женщин заболевают в репродуктивном периоде [4, 5]. К сожалению, независимо от того, что рак шейки матки относится к визуальной локализации, а метод цитологического скрининга удовлетворяет всем требованиям ВОЗ, в нашей стране сохраняется высокий уровень заболеваемости, большое число больных, диагноз которым установлен в запущенной стадии опухолевого процесса и не снижающиеся показатели смертности. С 1990 г. до 2009 г. стандартизованный показатель заболеваемости увеличился с 13,1 до 14,8 на 100 000 населения, независимо от возможностей раннего выявления как фоновых, так и начальных форм заболевания шейки матки [5, 6]. Наиболее эффективным методом снижения смертности от инвазивного рака шейки матки является проведение популяционного цитологического скрининга в возрасте от 25 до 65 лет — сначала 2 года подряд, а при отрицательных результатах далее каждые 3 года с максимальным охватом женского населения. Общеизвестны и недостатки рутинного цитологического исследования:

- отсутствие стандартизованного забора материала, что до 40–80% снижает эффективность скрининга;
- ложноположительные и ложноотрицательные результаты исследования;
- отсутствие достоверных прогностических критериев дальнейшего биологического поведения дисплазии. Легкие дисплазии, выявленные на Пап-мазках, в 91% случаев самопроизвольно регрессируют в течение 36 месяцев и только в 3% переходят в тяжелую дисплазию [7, 8];
- отсутствие стандартного подхода к лечению пациенток с умеренной и легкой дисплазией, что нередко приводит к неоправданной агрессивной и необоснованно выжидательной тактикам лечения [8, 9];
- отсутствие единого мнения по поводу тактики в отношении пациенток, которые инфицированы штаммами вируса папилломы человека (ВПЧ) высокого онкогенного риска при отсутствии признаков дисплазии в цитологическом препарате. Мнение о том, что необходимо лечить всех носителей и контактных лиц, сегодня уже дискредитировало себя, потому что большая часть носителей никогда не заболит раком шейки матки.

Таблица 1. Динамика стандартизованных показателей смертности больных инвазивным раком шейки матки в Санкт-Петербурге (1990–2009 гг.)

Локализация	1990	1995	2000	2005	2009
Шейка матки	4,1	4,1	4,5	5,5	5,4

Проведение стандартной программы цитологического скрининга в нашей стране, к сожалению, не приводит к снижению смертности больных от инвазивного рака шейки матки [5]. В Санкт-Петербурге также с 1990 по 2009 гг. не отмечено динамики снижения стандартизованных показателей смертности больных раком шейки матки (табл. 1).

В европейских странах, где налажен цитологический скрининг рака шейки матки, встречаемость инвазивных форм рака шейки матки уменьшилась на 90%, а смертность женщин от опухолей данной нозологии снизилась на 60%.

В настоящее время необходимо акцентировать внимание не только на выявлении инвазивного рака шейки матки, даже его начальных стадий (в том числе *Ca in situ*), но в основном на выявление диспластических изменений эпителия шейки матки с риском малигнизации до 30–50% и своевременное их лечение. Такой подход является надежным методом профилактики инвазивных форм злокачественных опухолей шейки матки.

К наиболее частым факторам риска развития рака шейки матки относятся:

- вирусные инфекции, при которых ведущим является вирус папилломы человека (Human Papillomaviruses HPV);
- раннее начало половой жизни;
- частая смена половых партнеров не только самой женщиной, но и ее партнерами-мужчинами;
- несоблюдение половой гигиены;
- венерические заболевания;
- иммунодефицит;
- курение;
- контакт с токсичными веществами.

Основным этиологическим фактором развития рака шейки матки является вирус папилломы человека (ВПЧ) серотипов 16, 18, 33, 35 и др. При взаимодействии вируса с эпителиальной клеткой происходит слияние их геномов и выработка вирусных белков Е6 и Е7 [10–12]. Е6 взаимодействует с белком р53, инактивируя его, и тормозит апоптоз эпителиальной клетки. Белок Е7 онкогенных серотипов вируса папилломы человека при своем взаимодействии с продуктом гена ретинобластомы приводит к активации пролиферации и к увеличению экспрессии белка р16(ink4α), являющегося биомаркером инициации канцерогенеза в эпителии шейки матки [10, 12–14].

Цель исследования — сравнение эффективности идентификации ВПЧ высокого онкогенного риска методом полимеразно-цепной реакции (ПЦР) и иммуноцитохимического исследования белка р16ink4α, являющегося биологическим маркером инициации канцерогенеза в эпителии, на мазках, выполненных методом жидкостной цитологии [14–16].

Материалы и методы. Вирус папилломы человека (ВПЧ) высокого онкогенного типа определен методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) у 339 пациенток. ПЦР — метод молекулярной биологии, позволяющий добиться значительного увеличения малых концентраций определённых фрагментов нуклеиновой кислоты (ДНК) в биологическом материале (пробе). Метод основан на многократном избирательном копировании определённого участка ДНК при помощи ферментов в искусственных условиях (in vitro). При этом происходит копирование только того участка, который удовлетворяет заданным условиям, и только в том случае, если он присутствует в исследуемом образце. Длина копируемых ДНК-участков составляет не более 3000 пар оснований (3 kbp), что значительно меньше длины хромосомной ДНК эукариотической клетки. ПЦР проводили в амплификаторе, обеспечивающем периодическое охлаждение и нагревание пробирок, обычно с точностью не менее 0,1 °С.

Выполнение иммуноцитохимического исследования р16ink4α выполнено в 597 случаях. Материал получали с шейки матки при помощи эндоцервикальной щетки (cervix-brush) и цито-браш, помещали в контейнер с адаптированной транспортной средой Thermo Shandon и хранили при температуре +4–+8 °С не более 10 дней. В дальнейшем клеточная суспензия обрабатывалась на цитоцентрифуге Cytospin® 4 с формированием двух мазков. Первым этапом проводили окрашивание по Папаниколау, вторым этапом — иммуноцитохимическое исследование на белок р16ink4α. Для иммуноцитохимического исследования использовался CINtec Cytology Kit (MTM laboratories, Германия). Мазок высушивался на воздухе и фиксировался в 95%-ном этиловом спирте в течение 10 мин. Далее проводилась демаскировка антигенов в водяной бане при температуре 95 °С в течение 10 мин в растворе Epitope Retrieval Solution. После остывания в течение 20 мин при комнатной температуре, стекла с мазками промывались в трис-буфере. Применялись первые антитела фирмы MTM Laboratories, клон Е6Н4 с инкубацией во влажной бане в течение 30 мин. Для детекции использовалась полимерная система визуализации с диаминобензидином в качестве хромогена. Промывка осуществлялась при помощи трис-буфера с твином. Реакция считалась положительной, если хотя бы одна диспластическая клетка оказывалась позитивной на р16ink4α. Оценивались ядерная реакция и ядерная реакция совместно с цитоплазматической (рис. 1). Статистический анализ проводили на персональном компьютере с использованием пакета программ Statistica 6.0. Непараметрические данные анализировались с использованием теста χ^2 . Различия считались статистически достоверными при $p < 0,05$.

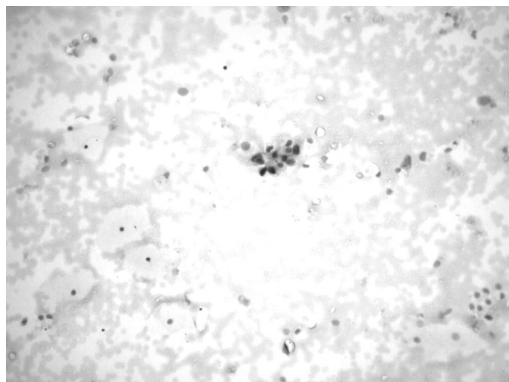


Рис. 1. Дисплазия шейки матки тяжелая (CIN III). Позитивная иммуноцитохимическая реакция на p16ink4α в диспластических клетках (смешанный тип реакции: ядро и цитоплазма, коричневое окрашивание диаминобензидином), нормальные эпителиальные клетки негативны (синее контрастирование гематоксилином). Увеличение 1 × 100.

Результаты исследования. По результатам жидкостной цитологии из 597 исследуемых случаев 363 — не имели дисплазии, в эту группу вошли цитogramмы с неизмененным эпителием, с признаками воспаления, кандидоза, атрофического кольпита и др. 114 случаев были с легкой дисплазией (CIN I), 66 пациентов — с умеренной дисплазией (CIN II), 30 — с тяжелой дисплазией (CIN III, рис. 1), 24 — с подозрением на рак *in situ* — плоскоклеточный рак.

Цитологическая картина оценивалась согласно классификации Бетесда 2001 г., которая основана на термине SIL (Squamous Intraepithelial Lesion) — плоскоклеточное интраэпителиальное поражение. Клиническое значение имеют три вида препаратов:

- 1) нормальные мазки, без цитологических изменений;
- 2) «непонятные» мазки, не имеющие определенного значения, иначе говоря — не позволяющие исследователю точно ответить на вопрос о характере поражения, но в то же время не являющиеся нормой (ASC-US, Atypical squamous cells of undetermined significance);
- 3) дисплазии низкой (LSIL) и высокой (HSIL) степени поражения (табл. 2) [17].

Экспрессия p16ink4α связана с низкой, умеренной и тяжелой дисплазией (с плоскоклеточными интраэпителиальными поражениями шейки матки как высокого (HSIL), так и низкого (LSIL) риска). Причем экспрессия p16ink4α не встречалась в клетках плоского эпителия без признаков дисплазии [14, 15, 18–20]. В то же время, хотя отмечалась четкая корреляция обнаружения ДНК вируса папилломы человека с дисплазиями, имелось также большое количество позитивных на ВПЧ случаев (с эписомальной локализацией ВПЧ), в которых, при последующем гистологическом исследовании, отсутствовали признаки предрака и рака шейки матки [19, 20–23].

Иммуноцитохимическое исследование p16ink4α выполнялось в 597 случаях (100%). Данные ПЦР исследования ВПЧ высокого онкогенного риска были доступны в 339 случаях (табл. 3).

Как видно из табл. 3, вирус папилломы человека выявлялся в 73% (в 159 случаях из 219 исследованных) случаев без дисплазии. В 78% случаев (в 42 случаях из 54 исследований) с легкой дисплазией (CIN I), у 89% пациентов (в 24 из 27) с умеренной дисплазией (CIN II), в 100% случаев тяжелой дисплазии (15 из 15) и рака *in situ* — плоскоклеточный рак (24 из 24). Таким образом, процент инфицированных ВПЧ в группах без дисплазии и CIN I отличался статистически недостоверно ($p = 0,8631$). Не было статистической значимости в уровне инфицированности ВПЧ между группами CIN I и CIN II ($p = 0,4835$), CIN II и CIN III ($p = 0,4392$). При анализе экспрессии p16ink4α установлено, что данный онкомаркер не выявлялся в случаях без дисплазии (все пациенты исследовались на наличие p16ink4α), у 16% больных с CIN I, у 64% пациентов

Таблица 2. Терминологическая система Бетесда, 2001 (Terminology Bethesda System)

Клеточные изменения (рус.)	Клеточные изменения (англ.)	Аббревиатура
Атипичные железистые клетки	Atypical glandular cells	AGC
Атипичные железистые клетки, похожие на неопластичные	Atypical glandular cells, favor neoplastic	AGC, favor neoplastic
Атипичные клетки плоского эпителия	Atypical squamous cells	ASC
Атипичные клетки плоского эпителия неясного значения	Atypical squamous cells undertermined significance	ASC-US
Атипичные клетки плоского эпителия, не позволяющие исключить HSIL	Atypical squamous cells cannot exclude HSIL	ASC-H
Цервикальная интраэпителиальная неоплазия 1, 2 или 3 степени	Cervical intraepithelial neoplasia grade 1, 2 or 3	<u>CIN</u> 1, 2, 3
Карцинома in situ	Carcinoma in situ	CIS
Высокая степень плоскоклеточного интраэпителиального поражения	High grade squamous intraepithelial lesion	HSIL
Низкая степень плоскоклеточного интраэпителиального поражения	Low grade squamous intraepithelial lesion	LSIL
Не определенные иначе	Not otherwise specified	NOS
Плоскоклеточное интраэпителиальное поражение	Squamous intraepithelial lesion	SIL

с CIN II, в 90% случаев CIN III и в 100% рака in situ — плоскоклеточного рака (табл. 3). Таким образом, процент p16ink4a — позитивных наблюдений в группах без дисплазии и CIN I отличался статистически достоверно ($p < 0,0001$), также количество позитивных на p16ink4a случаев отличалось статистически достоверно в группах CIN I и CIN II ($p < 0,001$), CIN II и CIN III ($p < 0,001$). В то же время процент p16ink4a — позитивных наблюдений в группах CIN III и рака (in situ и плоскоклеточного инвазивного) отличался статистически недостоверно ($p = 0,3574$).

Обсуждение. В рандомизированном мультицентровом исследовании было показано, что мазки, полученные традиционным способом, в 10 раз чаще оказываются неинформативными в сравнении с мазками, полученными методом жидкостной цитологии (10% и 1% соответственно) [24]. В 2002 г. жидкостная цитология была рекомендована для использования в скрининге рака шейки матки Американским противораковым обществом (ACS). Жидкостная цитология была также рекомендована для использования Американским обществом кольпоскопии и цервикальной патологии (2006 Consensus Guidelines for the Management of Women with Cervical Cytological Abnormalities) и одобрена для применения FDA.

В нашем исследовании оказалось, что результаты жидкостной и традиционной цитологии чрезвычайно варьируют между собой. Кроме очевидного преимущества самой технологии жидкостной цитологии над традиционной, данное различие связано еще и с тем, что в своем исследовании мы применяли стандартизованный забор материала двумя щеточками цервикс-браш и цито-браш, в то время как процедура

Таблица 3. Сопоставление цитологических изменений с ВПЧ-статусом (ПЦР, n = 339) и p16ink4a (иммуноцитохимическое исследование, n = 597)

Изучаемый статус	Цитологические изменения				
	Без дисплазии	CIN I	CIN II	CIN III	Рак in situ — плоско-клеточный рак
Позитивные на ВПЧ — высокого онкориска	73% (n = 219)	78% (n = 54)	89% (n = 27)	100% (n = 15)	100% (n = 24)
Позитивные на p16ink4a	0% (n = 363)	16% (n = 114)	64% (n = 66)	90% (n = 30)	100% (n = 24)

Примечание: в скобках указано общее количество исследованных случаев в данной группе.

забора материала для традиционной цитологии произвольная. Считается, что использование приспособленных инструментов и средств для забора материала недопустимо, так как это приводит к снижению эффективности скрининга, вплоть до нулевых результатов.

Как видно из результатов исследования, процент инфицированных ВПЧ возрастал статистически недостоверно в зависимости от увеличения степени дисплазии. Так, количество инфицированных пациенток с легкой дисплазией превышает число случаев ВПЧ — позитивных без дисплазии всего на 5% ($p = 0,8631$, табл. 1). При сопоставлении последующих групп (CIN I с CIN II и CIN II с CIN III) эта разница оказывается чуть выше (11%), но является статистически недостоверной ($p = 0,4835$ и $p = 0,4392$ соответственно). Если анализировать уровень экспрессии p16ink4a в исследуемых группах: без дисплазии с CIN I, CIN I с CIN II, CIN II с CIN III, то процент отличия составляет 16%, 48%, 26% соответственно. Таким образом, наиболее яркое различие в уровне p16ink4a обнаружено между группами CIN I и CIN II ($p < 0,001$), разделяя LSIL и HSIL, что наиболее важно для онкогинекологии.

Необходимо особо отметить, что в трех случаях CIN I с позитивной реакцией на p16ink4a при последующем гистологическом исследовании был выявлен рак in situ, а в двух случаях CIN II с позитивной реакцией на p16ink4a обнаружен инвазивный рак.

Таким образом, мы считаем, что для повышения эффективности цитологического скрининга и раннего выявления патологии шейки матки можно предложить следующий алгоритм диагностики заболеваний шейки матки:

1. Стандартизованный забор клеточного материала с шейки матки.
2. Применение методики жидкостной цитологии.
3. Иммуноцитохимическое исследование белка p16ink4a.

Последовательное использование жидкостной цитологии в сочетании с иммуноцитохимическим исследованием p16ink4a необходимо внедрять в клиническую практику, так как они являются более эффективными в скрининге рака шейки матки в сравнении с традиционной цитологией и ПЦР-анализом ВПЧ высокого онкогенного риска.

Литература:

1. Ferlay J., Bray F., Pisani P., Parkin D. M. GLOBOCAN 2002: Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide // IARC Cancer Base. N5. version 2.0. Lyon: IARC Press, 2004 (available at <http://www-dep.iarc.fr/>)

2. *Curado M. P., Edwards B., Shin, H. R., Ferlay J., Heanue M., Boyle P., Storm H.* Cancer incidence in Five Continents // IARC. Scientific Publication. Lyon. 2007. Vol. IX, N 160. 897 p.
3. *Parkin D. M., Bray F., Ferlay J. et al.* Global Cancer Statistics // *Ca Cancer Clin.* 2005. Vol. 55. P. 74–108.
4. *Pavlidis N., Hansen H., and Stahel R.* ESMO Clinical Practice Guidelines: development, implementation and dissemination *Ann Oncol* (2010) 21(suppl 5): v7-v8 doi:10.
5. *Чиссов В. И., Старинский В. В., Петрова Г. В.* Злокачественные новообразования в России в 2009 году (заболеваемость и смертность). Москва, 2011. 260 с.
6. *Старинский доклад «Онкология России в свете национальной противораковой программы»* 28.07.2009, см. сайт Oncology.ru
7. *Nasser S. M., Cibas E. S., Crum C. et al.* The significance of the Papanicolaou smear diagnosis of low-grade squamous intraepithelial lesion cannot exclude high-grade squamous intraepithelial lesion // *Cancer.* 2003. Vol. 99. P. 272–276; 16.
8. *Anttila A., von Karsa L., Aasmaa A. et al.* Cervical cancer screening policies and coverage in Europe // *Eur J Cancer.* 2009. Vol. 15. P. 2649–2658.
9. *Аишафян Л. А., Харченко Н. В., Огрызкова В. Л., Антонова И. Б.* Принципы лечения пре- и микроинвазивного рака шейки матки // *Практическая онкология.* 2002. Т. 3. С. 173–178; 17.
10. *Murphy N., Heffron B., King B. et al.* p16INK4A positivity in benign, premalignant and malignant cervical glandular lesions: a potential diagnostic problem // *Virchows Arch.* 2004. Vol. 445. P. 610–615; 12.
11. *Negri G., Egarter-Vigl E., Kasal A. et al.* p16INK4A is a useful marker for the diagnosis of adenocarcinoma of the cervix uteri and its precursors // *Am J Surg Pathol.* 2003. Vol. 27. P. 187–193; 13.
12. *Хансон К. П., Имянитов Е. Н.* Современные представления о канцерогенезе рака шейки матки // *Практическая онкология.* 2002. Т. 3. С. 145–155; 18.
13. *Jenison S. A., Yu X. P., Valentine J. M., Galloway D. A.* Characterization of human antibody-reactive epitopes encoded by human papillomavirus types 16 and 18 // *J Virol.* 1991. Vol. 65 (3). P. 1208–1218; 1.
14. *Cripe T. P., Haugen T. H., Turk J. P. et al.* Transcriptional regulation of the human papillomavirus-16 E6-E7 promoter by a keratinocyte-dependent enhancer, and by viral E2 trans-activator and repressor gene products: implications for cervical carcinogenesis // *EMBO J.* 1987. Vol. 6 (12). P. 3745–3753; 2.
15. *Bibbo M., Klump W. J., DeCecco J., Kovatish A. J.* Procedure for immunocytochemical detection of p16INK4A antigen in thin-layer, liquid-based specimens // *Acta Cytol.* 2002. Vol. 46. P. 25–29; 15.
16. *Sano T., Oyama T., Kashiwabara K., Fukuda T., Nakajima T.* Immunohistochemical overexpression of p16 protein associated with intact retinoblastoma protein expression in cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasia // *Pathol Int.* 1998. Vol. 48. P. 580–5; 8.
17. *Solomon D. et al.* The 2001 Bethesda System: Terminology for Reporting Results of Cervical Cytology // *Journal of the American Medical Association,* April 24, 2002. Vol. 287, N 16. P. 2114–2119.
18. *Ylitalo N., Josefsson A., Melbye M. et al.* A Prospective Study Showing Long-Term Infection with Human Papillomavirus 16 before the Development of Cervical Carcinoma in situ // *Cancer Research.* 2000. Vol. 60. P. 6027–6032; 14.
19. *Nieh S., Chen S. F., Chu T. Y. et al.* Expression of p16 INK4A in Papanicolaou smears containing atypical squamous cells of undetermined significance from the uterine cervix // *Gynecol Oncol.* 2003. Vol. 91 (1). P. 201–8; 5.
20. *Nieh S., Chen S. F., Chu T. Y. et al.* Is p16(INK4A) expression more useful than human papillomavirus test to determine the outcome of atypical squamous cells of undetermined significance-categorized Pap smear? A comparative analysis using abnormal cervical smears with follow-up biopsies // *Gynecol Oncol.* 2005. Vol. 99 (3). P. 578–84; 6.
21. *Klaes R., Froedrich T., Spitkovsky D. et al.* Overexpression of p16(INK4A) as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri // *Int J Cancer.* 2001. Vol. 92 (2). P. 276–84; 4.

22. Meyer J. L., Hanlon D. W., Andersen B. T. et al. Evaluation of p16INK4 α expression in ThinPrep cervical specimens with the CINtec p16INK4 α assay: correlation with biopsy follow-up results // *Cancer*. 2007. Vol. 111 (2). P. 83–92; 20.

23. Rocco J. W., Sidransky D. p16(MTS-1/CDKN2/INK4a) in cancer progression // *Exp Cell Res*. 2001. Vol. 264. P. 42–55; 7.

24. Ronco G., Cuzick J., Pierotti P. et al. Accuracy of liquid based versus conventional cytology: overall results of new technologies for cervical cancer screening: randomised controlled trial // *BMJ*. 2007. Vol. 335 (7609). P. 28–38; 19.

Статья поступила в редакцию 1 июня 2011 г.