

Л.И. МАЛЬЦЕВА, Л.Н. ФАРРАХОВА, А.В. АХМЕТЗЯНОВА, Н.А. НИГМАТУЛЛИНА

УДК 618.146-002-036.1

Казанская государственная медицинская академия

Оценка ВПЧ-ассоциированного хронического цервицита, как фактора риска развития рака шейки матки

Мальцева Лариса Ивановна

доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой акушерства и гинекологии № 1

420012, г. Казань, ул. Муштары, д. 11, тел. (843) 236-46-41

Целью исследования являлась оценка риска раковой трансформации эпителия шейки матки у женщин с ВПЧ-ассоциированным цервицитом для определения путей совершенствования терапии. Изучалась зависимость соотношения метаболитов 2-гидроксиэстрогена и 16- α -гидроксиэстрогена (2-ОНЕ1/16 α -ОНЕ1) от уровня экспрессии онкобелка p16ink4 α и характера выявленной инфекции у 771 женщин с хроническим цервицитом. Выявлена корреляция между низкими показателями соотношения метаболитов эстрогена, позитивной реакцией p16ink4 α и наличием длительно персистирующей ВПЧ-инфекцией. Полученные факты показали, что выбор терапии ВПЧ-ассоциированного цервицита возможен с помощью оценки белка p16ink4 α и степени нарушения метаболитов эстрогена 2-ОНЕ1/16 α -ОНЕ1.

Ключевые слова: ВПЧ, хронический цервицит, жидкостная цитология, p16ink4 α , метаболиты эстрогена 2-ОНЕ1/16 α -ОНЕ1.

L.I. MALTSEVA, L.N. FARRAKHOVA, A.V. AKHMETZYANOVA, N.A. NIGMATULLINA

Kazan State Medical Academy

Evaluation of HPV-associated chronic cervicitis as a risk factor for cervical cancer

Aim of this study was to evaluate the risk of cancerous transformation of cervical epithelium in women with HPV-associated cervicitis to identify ways of improving therapy. The dependence of the ratio of metabolites 2-hydroxyestrone and 16- α -hydroxyestrone (2ONE1/16ONE1) the level of expression of oncoprotein p16ink4 α and nature of infection in 771 women with chronic cervicitis has been studied. The correlation between low levels of estrogen metabolites, a positive reaction of p16ink4 α and the presence of long-term persistent HPV infection were observed. The facts showed that the choice of therapy of HPV-associated cervicitis is possible through the assessment of protein p16ink4 and degree of violation of estrogen metabolites 2-ONE1/16 α -ONE1.

Keywords: HPV, chronic cervicitis, liquid cytology, p16ink4 α , estrogen metabolites 2-ONE1/16 α -ONE1.

Воспалительные заболевания органов малого таза занимают лидирующее положение в структуре гинекологических заболеваний и являются наиболее частой причиной нарушения репродуктивного здоровья женщин. Значительную долю среди них составляют воспалительные процессы шейки матки - эндо- и экзоцервициты. Рост распространенности цервицитов связан с увеличением числа случаев атипического течения инфекционного процесса, а также с мало- и бессимптомностью даже в острой стадии. Это нередко обуславливает несвоевременную терапию и переход заболевания в хронический рецидивирующий процесс, который трудно поддается медикаментозному лечению.

Хронический цервицит наряду с воспалительными осложнениями может обуславливать развитие бесплодия, невынашивания беременности, преждевременных родов, внутриутробного инфицирования плода, послеродовых

гнойно-септических осложнений, играет важную роль в формировании дисплазии и рака шейки матки. В последние годы обозначились тенденции роста заболеваемости раком шейки матки у женщин в возрастной группе до 29 лет [2].

В генезе хронических цервицитов важную роль играет неспецифическая условнопатогенная флора. Частота цервицитов, обусловленных бактериальным инфицированием, составляет 40-50%, кандидозом - 20-25%, у 15-20% наблюдается смешанная инфекция. Цервицит при хламидийной инфекции обнаруживается в 40-49% случаев, при трихомониазе - у 5-25% женщин, гонорее - у 2%. Около 86% женщин с хроническим цервицитом инфицированы папилломавирусной инфекцией [1, 3]. Риск рака шейки матки, связанный с высокоонкогенными типами ВПЧ и отсутствие эффективных этиотропных средств для лечения этой инфекции требуют поиска наиболее оптимального выбора



Таблица 1.

Микрофлора цервикального канала у женщин с хроническим экзо- и эндоцервицитом с наличием и отсутствием ВПЧ-инфекции

Характер микрофлоры цервикального канала	При наличии ВПЧ (n=547)	При отсутствии ВПЧ (n=224)
<i>Chlamydia trachomatis</i>	8,6%	4%
<i>Ureaplasma urealyticum</i> >10 ⁴ КОЕ/мл	14,3%	7,1%
<i>Mycoplasma hominis</i> >10 ⁴ КОЕ/мл	11,3%	5,8%
<i>Mycoplasma genitalium</i>	6,9%	6,7%
<i>Trichomonas vaginalis</i>	5,3%	2,2%
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	2,4%	1,8%
ЦМВ	2,5%	2,2%
ВПГ	9,7%	4,9%
<i>Candida</i> spp. >10 ⁴ КОЕ/мл	17,2%	16,5%
<i>Gardnerella vaginalis</i> >10 ⁴ КОЕ/мл	16,3%	15,6%
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	42,4%	39,7%
<i>Staphylococcus aureus</i>	14%	8,5%
<i>Streptococcus pyogenes</i>	2,2%	1,8%
<i>Enterococcus</i> spp.	5,1%	4,9%
<i>E. coli</i>	21%	18,3%
<i>Klebsiella pneumonia</i>	17,9%	20,5%
<i>Proteus</i> spp.	11,3%	6,2%

препарата или их комбинаций при проведении терапии. В этом ракурсе очень важно определение онкогенного потенциала вируса, так как именно это определяет необходимость консервативной или оперативной тактики лечения.

При взаимодействии вируса папилломы человека 16 и 18 серотипов с эпителиальной клеткой происходит слияние их геномов, что приводит к выработке вирусных белков E6 и E7. Существует киназа E2P, которая обеспечивает прохождение клетки из G1 в S фазу клеточного цикла. В норме она неактивна, находясь в связанном состоянии с белком супрессором ретинобластомы (Rb). Белок E7 вируса папилломы человека при своем взаимодействии с продуктом гена ретинобластомы приводит к разобщению комплекса E2F-Rb. Контроль разобщения комплекса E2F-Rb осуществляет белок p16ink4α, не допуская безудержной пролиферации клетки, что приводит к постоянному его синтезу [5, 6]. Известно, что белок p16ink4α появляется в процессе метилирования генов-супрессоров и отражает генетическую нестабильность, что предшествует раковой трансформации. Сверхэкспрессия p16ink4α и его накопление в цитоплазме позволяет выявить предраковые состояния и самые ранние формы рака шейки матки, которые установить другим способом зачастую невозможно [4].

В настоящее время общепризнано участие метаболитов эстрогенов в развитии неопластических процессов в тканях шейки матки и в повреждении ДНК. Установлено, что при персистенции ВПЧ-инфекции образование агрессивного метаболита эстрогена 16α-OHE1 происходит в 200 раз чаще, чем 2-OHE1. В результате образуются прочные ковалентные связи с эстрогеновыми рецепторами и, как следствие, усиливается клеточная пролиферация. Многочисленные экспериментально-клинические исследования доказали необходимость в поддержании баланса между этими метаболитами, при этом концентрация 2-OHE1 должна превышать концентрацию 16α-OHE1 как минимум в 2 раза. Отсюда соотношение 2-OHE1 к 16α-OHE1 является универсальным биомаркером и надежным диагностическим критерием для определения риска и прогноза развития эстрогензависимых опухолей.

Целью исследования явилась оценка риска раковой трансформации эпителия шейки матки у женщин с хроническим цервицитом путем определения белка p16ink4α, степени нарушения метаболитов 2-OHE1 и 16α-OHE1 и определения путей совершенствования лечения ВПЧ-ассоциированного цервицита.

Материалы и методы исследования

Было проведено обследование 771 женщины в возрасте 18-52 лет с признаками хронического экзо- и эндоцервицита: основную группу составили 547 пациенток с наличием ВПЧ-инфекции, группу сравнения – 224 с отсутствием ВПЧ. Всем больным было проведено комплексное обследование, включающее общеклинические методы: изучение анамнестических и эпидемиологических данных, общий и гинекологический осмотр и специальные методы: расширенная кольпоскопия, определение инфекций, передаваемых половым путем методом ПЦР - хламидий, микоплазм, уреаплазм, ВПГ, ЦМВ, высокоонкогенных типов ВПЧ (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59) и низкоонкогенных - (6, 11, 42, 44, 54), традиционная и жидкостная цитология мазков из экзо- и эндоцервикса, бактериоскопическое и бактериологическое исследования отделяемого из цервикального канала и заднего свода влагалища, морфологическое исследование прицельно взятого биоптата, иммуноцитохимическое исследование белка p16ink4α в мазках из экзо- и эндоцервикса на основе жидкостной цитологии и определение соотношения метаболитов 2-OHE1/16-αOHE1 в моче с использованием тест-системы ESTRAMET 2/16 ELISA (конкурентный метод твердофазного иммуноферментного анализа).

Результаты исследования

В результате исследования пациенток обеих групп оказалось, что у 61% из них выявлены инфекции, передаваемые половым путем: у каждой третьей отмечена ассоциация с условно-патогенной микрофлорой, а у каждой второй - сочетание от 2 до 4 инфекционных агентов.

По результатам ПЦР-диагностики инфицированность высокоонкогенными типами ВПЧ женщин основной группы без признаков дисплазии шейки матки составила 67,8%, низкоонкогенными – 49,6%. При наличии CIN частота выделения ВПЧ высокоонкогенных серотипов значительно превалирует над низкоонкогенными и составляет 84,2% и 27,4% соответственно, что подтверждает роль ВПЧ в формировании пролиферативной патологии шейки матки. Смешанная инфекция различными типами ВПЧ была зафиксирована в 46% случаев. У 22% женщин было зафиксировано 2 типа ВПЧ, у 15% - 3 типа, у 9% - 4 и более. Наиболее часто был обнаружен 16 тип - в 26,3% случаях, 58 тип – 10,6%, 18 тип – 8,4%, 31 – в 7,8%, 33 – 6,1%.

Анализ сопутствующей флоры цервикального канала показал, что чаще папилломавирусную инфекцию сопровождали хламидии уреаплазмы, микоплазмы, грибы рода Candida, гарднереллы, грамположительные кокки и грамотрицательные палочки на фоне отсутствия или резкого снижения содержания лактобактерий (табл. 1). Следует отметить, что у пациенток с наличием ВПЧ-инфекции инфицирование цервикального канала такими возбудителями как хламидии, микоплазмы, уреаплазмы, трихомонады, ВПГ значительно чаще, чем при отсутствии ВПЧ.

По итогам жидкостного цитологического исследования у 188 женщин с хроническим цервицитом выявлена дисплазия эпителия шейки матки (у 74 - CIN I, 64- CIN II, 50 – CIN III): из них 169 пациенток с наличием ВПЧ и 19 – с отсутствием. Сравнительный анализ данных традиционной и жидкостной цитологии выявил, что результаты чрезвычайно варьируют между собой (табл. 2). Для подтверждения диагнозов использовали гистологическую экспертизу. Ложноположительные заключения традиционных цервикальных мазков выявлены в 5% случаев, то есть была диагностирована дисплазия там, где ее нет на самом деле. По результатам жидкостного цитологического исследования наличие дисплазии шейки матки обнаружено в 100%, что подтверждает ценность этой методики.

Таблица 2.
Сопоставление результатов жидкостной и традиционной цитологии после морфологического исследования (n=771)

Исследуемый статус	Отсутствие дисплазии	CIN I	CIN II	CIN III
Жидкостная цитология	583	74	64	50
Традиционная цитология	554	87	76	54
Морфология	583	68	52	68 из них микроинв. рак у 3

Следует отметить, что у женщин с дисплазией, как правило, наблюдалась атипическая кольпоскопическая картина в виде ацетобелого эпителия, лейкоплакии, пунктации, мозаики и их сочетаний. У 583 больных с хроническим цервицитом без признаков дисплазии кольпоскопическая картина проявлялась в виде диффузной гиперемии и отека экзоцервикса, с выраженными и легко кровоточащими сосудами, у 318 из них - в сочетании с йоднегативными участками, нежной пунктацией и/или мозаикой. Таким образом, у большого числа пациенток с хроническим цервицитом кольпоскопическая картина характеризуется атипическими изменениями на шейке матки,

что нередко приводит к необоснованному использованию деструктивных методов лечения.

Иммуноцитохимическое определение белка p16ink4a показало положительные результаты у 65 (8,4%) женщин и только у больных с наличием CIN (у 12 - с CIN I, у 15 - CIN II, у 38 - CIN III) (табл. 3). Остальные 123 пациентки с дисплазией имели негативную реакцию на p16ink4a.

Таблица 3.
Результаты анализа экспрессии белка p16ink4a у больных с хроническим экзо- и эндоцервицитом (n=771)

	Без дисплазии n=583	CIN I n=74	CIN II n=64	CIN III n=50
Позитивные на p16ink4a n=65	0% (0)	16,2% (12)	23,4% (15)	76,9% (38)

Всем больным с позитивной реакцией на p16ink4a независимо от степени дисплазии была проведена электроэксцизия шейки матки с целью расширенной биопсии и лечения. Последующее гистологическое исследование биоптатов шейки матки 12 женщин с CIN I выявило у 6 из них CIN III (табл. 4). Морфологические результаты 15 пациенток с CIN II показали у 12 наличие CIN III. У всех женщин с CIN III подтвердился диагноз.

Таблица 4.
Сопоставление цитологических и морфологических результатов у p16-позитивных женщин (n=65)

Цитологические изменения			Морфологическое исследование биоптатов		
До лечения	CIN I	12	После электроэксцизии шейки матки	CIN III	6
	CIN II	15		CIN III	12
	CIN III	38		CIN III Микроинв. Ca	35 3

Наряду с гиперэкспрессией онкобелка p16ink4a, показательным фактом неблагоприятного влияния персистирующей ВПЧ-инфекции на экзо- и эндоцервикс оказался нарушенный обмен метаболитов эстрогена 2-OHE1 и 16α-OHE1. Анализ соотношения метаболитов эстрогена, проведенный у 120 женщин с персистирующей ВПЧ (высокоонкогенные типы у 104, низкоонкогенные – у 56), показал, что у 41,8% показатель соответствует уровню здоровых женщин - $2,35 \pm 0,10$. У 58,2% больной баланс метаболитов эстрогена оказался измененным, при этом уровень 16α-OHE1 превышал 2-OHE1 в 2 и более раз, что выражалось в снижении значений до 0,2. У женщин с персистирующей ВПЧ-инфекцией и при сочетании ВПЧ с хламидийной инфекцией соотношение составило $1,51 \pm 0,34$ (отличия от здоровых статистически значимы - $p < 0,05$), у пациенток с положительным результатом на p16ink4a - $0,56 \pm 0,23$, что достоверно отличалось от значений в других группах больных ($p < 0,01$ и $p < 0,05$ соответственно).

Обсуждение результатов

Проведенное обследование и клиническое наблюдение женщин обеих групп показали неоднозначные результаты.

Совершенно очевидно, что хронический цервицит на фоне ВПЧ-инфекции носит полимикробный характер, тогда как при отсутствии вируса обсемененность цервикального канала различной микробной и вирусной флорой значительно меньше. В связи с этим всем пациенткам с ВПЧ-ассоциированным хроническим цервицитом необходимо тщательное обследование для обнаружения сопутствующей инфекции с последующим проведением комплексного и поэтапного лечения.

Важными оказались результаты сравнительного анализа традиционной и жидкостной цитологии мазков с экзо- и эндоцервикса. С учетом того, что информативность цитологического метода определяется уровнем подготовки специалистов и качеством забора материала, очевидны преимущества жидкостного цитологического исследования над традиционным: последнее ассоциировалось с высоким уровнем как ложноположительных, так и ложноотрицательных результатов. В связи с этим жидкостной метод является более надежным лабораторным тестом, что позволяет рекомендовать его для обследования женщин с патологией шейки матки. Но настораживает, что даже при использовании этой усовершенствованной цитологической технологии у р16-позитивных женщин не были диагностированы 18 (27,7%) тяжелых интраэпителиальных поражений шейки матки (табл. 4), что определяет необходимость проведения иммуноцитохимического исследования экспрессии белка p16ink4a, являющегося биологическим маркером инициации канцерогенеза в эпителии. Белок p16ink4a является надежным тестом для ранней диагностики рака шейки матки, позволяющим достоверно оценивать потенциал дисплазии в отношении развития рака шейки матки и выбирать консервативную или оперативную тактику лечения. Появление белка определяет более радикальный подход к терапии. Даже легкая дисплазия в сочетании с p16-позитивной реакцией требует электроэксцизии шейки матки, и проведенные исследования подтвердили это: у 6 из 12 женщин с CIN I оказалась CIN III.

Известно, что длительное нарушение баланса метаболитов эстрогена 2-OHE1 и 16α-OHE1 у женщин с ВПЧ-ассоциированным хроническим цервицитом в сторону повышения синтеза «агрессивного» метаболита 16α-OHE1 увеличивает риск развития дисплазии и рака шейки матки. Метаболит 2-OHE1 обладает слабым эстрогеновым действием (примерно 48% активности эстрадиола - основного эстрогена) и не оказывает пролиферативного действия, а, напротив, нормализует процессы апоптоза. 16α-OHE1 - метаболит с пролиферативным потенциалом, обладает в 4 раза большей биологической активностью, чем свободные фракции эстрогенов, блокирует апоптоз и индуцирует пролиферацию клеток. Из этого следует, что в комплекс лечения больных с персистенцией ВПЧ и наличием хронического цервицита целесообразно включать препараты, нормализующие нарушенный обмен метаболитов эстрадиола (индол-3-карбинол). Исследование соотношения метаболитов эстрогена чрезвычайно важно проводить при иммуноцитохимически р16-негативном ответе, когда планируется консервативная терапия. Предварительные исследования показали, что использование препарата, содержащего индол-3-карбинол в комплексе с противовирусной терапией дает хорошие результаты, как в плане элиминации вируса, так и в регрессе атипических кольпоскопических изменений при CIN I – II.

Выводы

Таким образом, самыми распространенными типами ВПЧ, вызывающими развитие хронического цервицита, являются 16, 58, 18. ВПЧ-ассоциированный хронический цервицит часто сопровождается атипическими кольпоскопическими изменениями и для оценки истинного риска канцерогенеза следует использовать онкобелок p16ink4a. Позитивная реакция на p16ink4a требует радикального подхода в лечении с использованием электроэксцизии шейки матки, а при наличии показаний - конизации шейки матки.

Планирование консервативной терапии определяет необходимость исследования метаболитов эстрогена 2-OHE1/16α-OHE1 для составления протокола лечения с учетом выявленных нарушений.

С помощью оценки биологического маркера онкотрансформации белка p16ink4a и степени нарушения метаболитов эстрогена 2-OHE1/16α-OHE1 возможен дифференцированный и патогенетически обоснованный подход к терапии ВПЧ-ассоциированного хронического цервицита.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ваганова И.Г. Апоптоз и пролиферация эпителиоцитов эктоцервикса у больных папилломовирусным и хламидийным цервицитом // Вопросы онкологии. — 2000. — Т. 46, №5. — С. 578–582.
2. Киселев В.И., Ашрафян Л.А., Бударина С.О. и др. Этиологическая роль вируса папилломы человека в развитии рака шейки матки, генетические и патогенетические механизмы, возможности терапии и профилактики // Гинекология. — 2004. — Т. 6, № 4. — С. 174–180.
3. Заболевания шейки матки, влагалища и вульвы. Клинические лекции / Под ред. проф. В.Н. Прилепской. — М.: МЕДпресс, 1999. — 427 с.
4. Ivanova T.A., Golovina D.A., Zavalishina L.E. et al. Up-regulation of expression and lack of 5' CpG island hypermethylation of p16 INK4a in HPV-positive cervical carcinomas // BMC Cancer. — 2007. — P. 47.
5. Meyer J.L., Hanlon D.W., Andersen B.T. et al. Evaluation of p16INK4a expression in ThinPrep cervical specimens with the CINtec p16INK4a assay: correlation with biopsy follow-up results // Cancer. — 2007. — P. 83–92.
6. Rocco J.W., Sidransky D. p16 (MTS-1/CDKN2/INK4a) in cancer progression // Exp. Cell. Res. — 2001. — P. 42–55.