В ПОМОЩЬ ПРАКТИКУЮЩЕМУ ВРАЧУ

УДК 618.146:616-006

Л. И. МАЛЬЦЕВА, Г. А. РАСКИН, Л. Н. ФАРРАХОВА, А. В. АХМЕТЗЯНОВА, В. С. ПЕТРОВ, Р. Ш. ХАСАНОВ
Казанская государственная медицинская академия
Казанский государственный медицинский университет
Клинический онкологический диспансер МЗ РТ

Возможности ранней диагностики рака шейки матки

Мальцева Лариса Ивановна
доктор медицинских наук, профессор,
заведующий кафедрой акушерства и гинекологии №1 КГМА
420015, г. Казань, ул. Большая Красная, 51 тел.: 236-46-41

В статье обозначены проблемы в организации профилактики рака шейки матки и обсуждается диагностический алгоритм заболеваний шейки матки: стандартизованный забор клеточного материала с шейки матки; применение жидкостной цитологии; иммуноцитохимическое исследование онкомаркера p16ink4α. Предлагается алгоритм действий врача-гинеколога.

Ключевые слова: *рак шейки матки, диагностика, онкомаркер p16ink4α.*

L. I. MALTSEVA, G. A. RASKIN, L. N. FARRAKHOVA, A. V. AKHMETZYANOVA, V. S. PETROV, R. S. KHASANOV

Opportunities of early diagnostics of a cervical cancer

The article designates problems in the organization of preventive maintenance of cervical cancer and the diagnostic algorithm of diseases of cervix is discussed: the standardized fence of cellular material with cervix; application of liquid cytology; immunocytochemical research onkomarker p16ink4 α. The algorithm of actions of the doctor-gynecologist is offered.

Keywords: *cervical cancer, diagnostic algorithm, onkomarker p16ink4α.*

АКТУАЛЬНОСТЬ ПРОБЛЕМЫ

Рак шейки матки — злокачественная опухоль, этиологическим фактором которой являются вирусы папилломы человека (HPV) серотипов № 16, 18, 33, 35 и др. Согласно Всемирной базе данных по онкологической заболеваемости — GLOBOCAN (GLOBOCAN 2002 Database Jun. 2006), частота вновь выявляемых случаев рака шейки матки составляет в Российской Федерации 16,2 на 100 тыс. населения в год, в то же время смертность от данной опухоли — 10,1 на 100 тыс. населения в год. Организация цитологического скрининга позволила существенно снизить заболеваемость и смертность от рака шейки матки. Вместе с тем сохранился ряд вопросов.

Отсутствие стандартизованного забора материала: неадекватно взятый материал с шейки матки приводит к ложноотрицательным результатам.

Проблема ложноположительных цитологических заключений (когда мазок показывает дисплазию там, где ее нет на самом деле) не дискредитирует идею цитологического скрининга в целом, т.к. в большинстве случаев она разрешается ценой относительно малоинвазивных воздействий (биопсия шейки, повторная цитология после пробного лечения). Тем не менее, в каждом конкретном случае эта проблема создает ряд неудобств врачу и пациентке:

- необходимость выполнения биопсии (стоимость, инвазия, время);
- необходимость повторных визитов к врачу;
- негативное психологическое воздействие на пациентку, связанное с информацией о возможности развития у нее рака.

Даже если диагноз дисплазии верифицирован гистологически, вероятность перехода дисплазии в рак составляет ме-

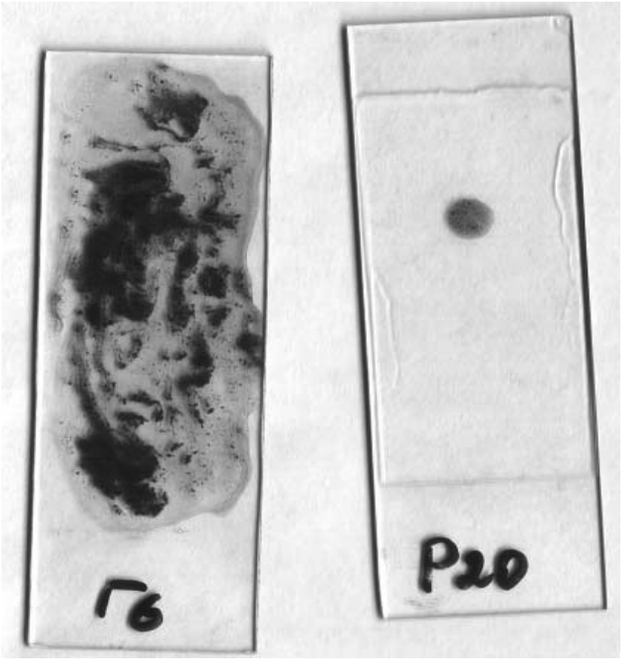

Рисунок 1. Мазки полученные Г6 – традиционным способом, Р20 – при помощи жидкостной цитологии

нее 50% (Хансон К.П., Имянитов Е.Н. Практическая онкология 2002). Вместе с тем, как на клиническом, так и на микроскопическом уровне в настоящее время отсутствуют достоверные прогностические критерии дальнейшего биологического поведения дисплазии (Nasser SM, Cibas ES, Crum C, et al. Cancer 2003).

Если консенсус в лечебной тактике по отношению к тяжелой дисплазии и Ca in situ уже достигнут, то при умеренной и легкой дисплазии многое зависит от мнения лечащего врача. Он должен сопоставить цитологическое заключение, клиническую и кольпоскопическую картину, возраст пациентки и т.п. и принять решение (в диапазоне от наблюдения без лечения до конусовидной эксцизии шейки матки). При этом, зачастую врач стоит перед нелегким выбором, т. к. агрессивная тактика не всегда оправдана (особенно у молодых пациенток), а необоснованно выбранная выжидательная тактика грозит развитием рака. Ситуация усугубляется тем, что в этом вопросе нет ни единства во мнении среди врачей, ни определенных общепринятых стандартов (Ашрафян Л. А., Харченко Н. В., Огрызкова В. Л., Антонова И. Б. Практическая онкология 2002).

Проблема ложноотрицательных цитологических заключений в налаженной системе цитологического скрининга нивелируется ежегодным повторением цитологического мазка. Однако при разовом цитологическом исследовании (когда пациентка до этого не была охвачена скринингом) в некоторых случаях требуются дополнительные гарантии отсутствия неопластического процесса.

Особо остро проблема ложноположительных и ложноотрицательных цитологических заключений стоит в отношении клеток железистого эпителия. В то время как аденокарцинома шейки может вообще не проявляться в цитологическом мазке, причинами выраженных изменений клеток железистого эпителия (даже с цитологической картиной аденокарциномы) могут являться реактивные процессы или эндометриоз (Krane J. F., Granter S. R. Cancer 2001).

Среди экспертов нет единого мнения по поводу тактики в отношении пациенток, которые инфицированы штаммами HPV высокого онкогенного риска, но нет дисплазии в цитологическом мазке. Мнение о том, что требуется лечить всех носителей и контактных лиц, сегодня уже дискредитировало себя, потому что большая часть носителей никогда не заболеет раком шейки матки.

Для разрешения данных проблем предлагается следующий диагностический алгоритм заболеваний шейки матки:

- стандартизованный забор клеточного материала с шейки матки;
- применение жидкостной цитологии;
- иммуноцитохимическое исследование онкомаркера p16ink4α.

Каждый из перечисленных пунктов обсуждается на последующих страницах статьи.

ЗАБОР МАТЕРИАЛА

При отсутствии видимой патологии с шейки матки обязательно берется соскоб для цитологического исследования.

Учитывая отсутствие видимой патологии, материал берется со всей поверхности шейки матки и из шеечного канала. В связи с тем, что рак чаще всего развивается в месте соединения плоского эпителия шейки матки с цилиндрическим эпителием цервикального канала, по периметру маточного зева (так называемая зона превращения), соскоб для забора материала при скрининге должен обязательно включать эту зону и эпителий шеечного канала.

Принципиальное значение при этом имеет использование специального инструмента, гарантирующего взятие материала со всех указанных зон и обеспечивающего информативность препарата. Использование приспособленных инструментов и средств недопустимо, так как это приводит к снижению эффективности скрининга, вплоть до нулевых результатов.

ЖИДКОСТНАЯ ЦИТОЛОГИЯ

Более пятидесяти лет назад доктор Папаниколау, чьим именем впоследствии был назван метод (Pap-тест), разработал метод цитологического исследования клеток цервикального канала по мазку на стекле. Pap-тест широко используется в скрининговых исследованиях для диагностики рака шейки матки, предраковых и фоновых состояний. В странах Северной Европы, где хорошо организованы скрининговые исследования, лечение предопухолевых состояний и ранних форм рака позволило уменьшить смертность от инвазивной цервикальной карциномы на 50-70%. По опубликованным данным, в Финляндии в 1992 г. заболеваемость была снижена до 2,8 случаев на 100000 женщин. В России в 1998 г. было выявлено 11 937 новых случаев заболевания, что составляло 15,3 на 100000 женщин, из которых 6,078 умерло (Syrjänen S., Shabalova I., Petrovichev N. et al. J Lower Genital Tract Disease 2002). В Англии по данным на 1987/88 гг. заболеваемость составляла 9 на 100000 женщин, смертность в 1997 г. — 3,7 на 100000. При этом около 4 млн женщин в год проходили цитологическое скрининговое исследование цервикальных мазков (Payne N, Chilcott J, McGoogan E. University of Sheffield 2000). В настоящее время выявление группы риска при цитологическом исследовании цервикальных мазков во время профилактических осмотров и дальнейшего наблюдения позволяют уловить процесс озлокачествления на самых ранних стадиях.

Необходимой предпосылкой для точной оценки морфологии клеток в мазке является правильно сделанный и хорошо окрашенный мазок. Эффективность цитологической диагностики в значительной мере определяется качеством приготовления препаратов. В настоящее время все большее распространение получает новая технология приготовления цитопрепаратов, так называемая жидкостная цитология. Важной технологической особенностью метода жидкостной цитологии (ЖЦ), улучшаю-

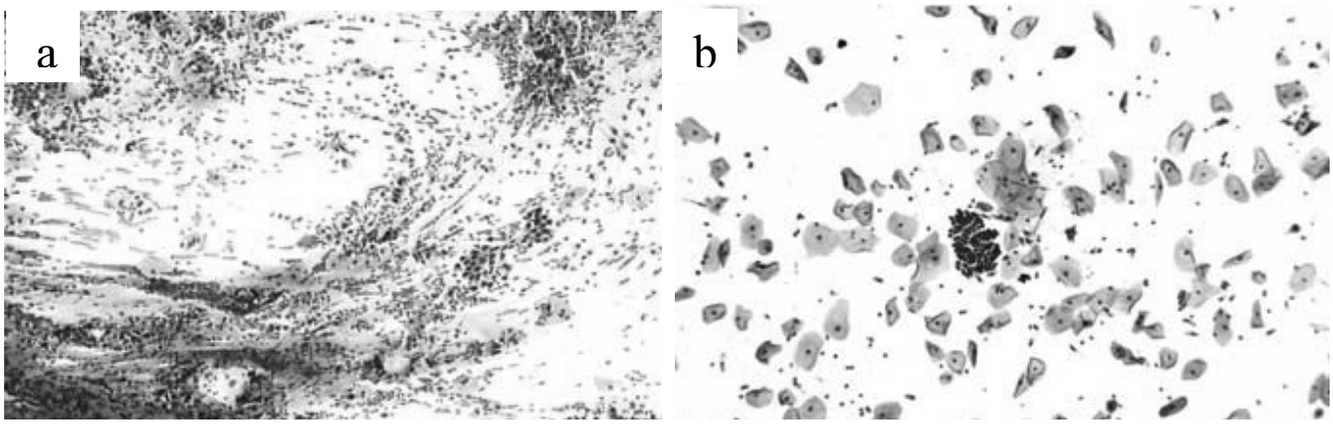

Рисунок 2
Мазки, полученные традиционным способом (a) и при помощи жидкостной цитологии (b)

щей качество исследования, является то, что исследуемый материал берется в специальный стабилизирующий раствор, который обеспечивает его сохранность без разрушения и потери клеток. При этом весь клеточный материал сохраняет без изменения свои морфологические и иммуноцитохимические свойства. Для метода ЖЦ известно несколько систем: Cytospin, AutoCytePrep (CytoRich), LABONORD Easy Prep, Thin Prep.

В последние пять лет в разных странах проводилось много исследований, в которых сравнивалась эффективность традиционной техники и ЖЦ, используя для подтверждения диагнозов гистологическую экспертизу как «золотой стандарт» и оценку цитопрепаратов согласно классификации TBS (The Bethesda System). В исследовании участвовали как поликлинические, так и стационарные отделения, обследовавшие тысячи пациентов (Grace A et al. Cytopathology 2002.). По обобщенным данным чувствительность традиционного метода колеблется в широком диапазоне значений: 34,5-89%; а для метода ЖЦ имеет более стабильные значения: 71,4-95%. Соответственно специфичность методов составляла: 36-76,9% и 58-76,2%. Авторы исследований резюмировали, что метод ЖЦ является более надежным лабораторным тестом, уменьшает количество ложноотрицательных результатов, уменьшает количество неудовлетворительных для анализа препаратов и время, необходимое цитологу для оценки препарата.

Исследование мазков по Папаниколау, полученных традиционным методом сбора материала, показывает, что не все, а только от 6,5 до 18% взятых клеток наносятся на мазок. Кроме того, многие из этих клеток в результате плохого нанесения трудно или невозможно анализировать. Не вызывает сомнения, что традиционный метод анализа цитологического мазка имеет высокую диагностическую эффективность. Тем не менее, существует мнение, что метод имеет от 6 до 55% ложноотрицательных результатов. По данным обзора Fahey, чувствительность традиционного метода составляет 55-65%, а специфичность — 65-70% (Fahey MT, Irwig L, Macaskill P. American Journal of Epidemiology 1995).

Причиной большинства (около 2/3) ложных результатов, снижающей качество работы лаборатории, является ошибка взятия или переноса материала для приготовления мазков. Материал для цитологического исследования получают с поверхности слизистой оболочки. Слизь, присутствующая во взятом материале, мешает перенести на мазок клетки, также материал невозможно равномерно перемешать. Материал может быть неравномерно распределен на стекле. Слишком толстый мазок является причиной получения неполноценного материала. При переносе материала на стекло традиционным способом клетки целого региона шейки матки могут не попасть в препарат. Подсушивание и потеря прилипших к инструменту клеток значительно уменьшает диагностическую информативность микропрепаратов (рис. 2). Метод ЖЦ позволяет исключить эти негативные факторы (Амелюшкина В.А. Лабораторная медицина 2002).

Однако рутинное окрашивание мазков дает нам информацию о состоянии шейки матки на настоящий момент, но оно не способно оценить онкогенный потенциал изменений в тех случаях, когда не выявляется рак. Таким образом, применение только цитологического метода недостаточно для скрининга рака шейки матки.

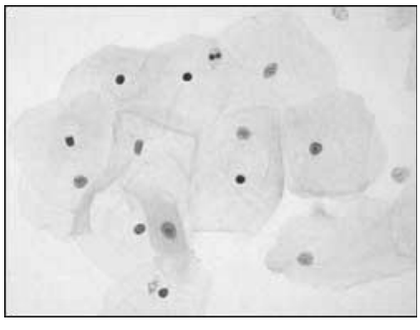

Рисунок 4. Негативная реакция на p16ink4α в нормальном плоском эпителии шейки матки

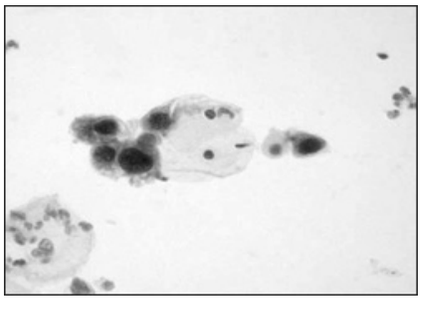

Рисунок 6. Позитивная реакция на p16ink4α (коричневое окрашивание ядер) в диспластически измененном эпителии шейки матки

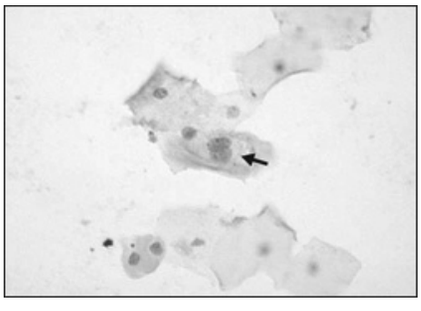

Рисунок 7. Негативная иммуноцитохимическая реакциея на p16ink4α в диспластических клетках (указано стрелкой).

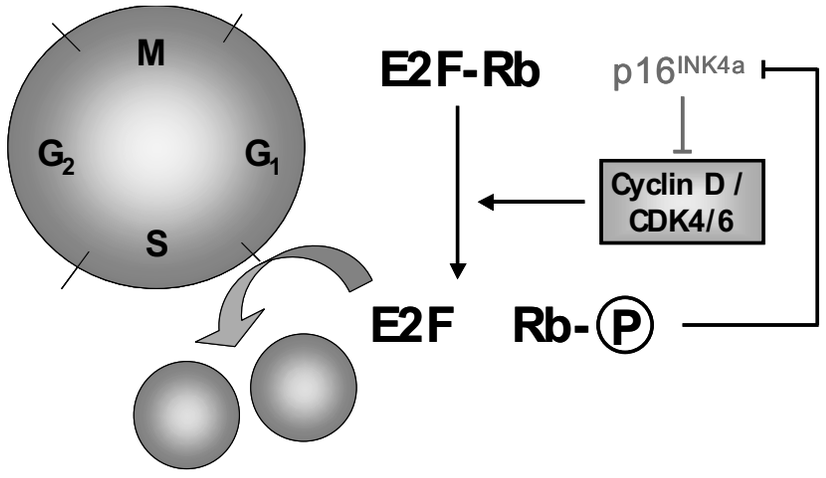

Рисунок 3. Нормальный клеточный цикл

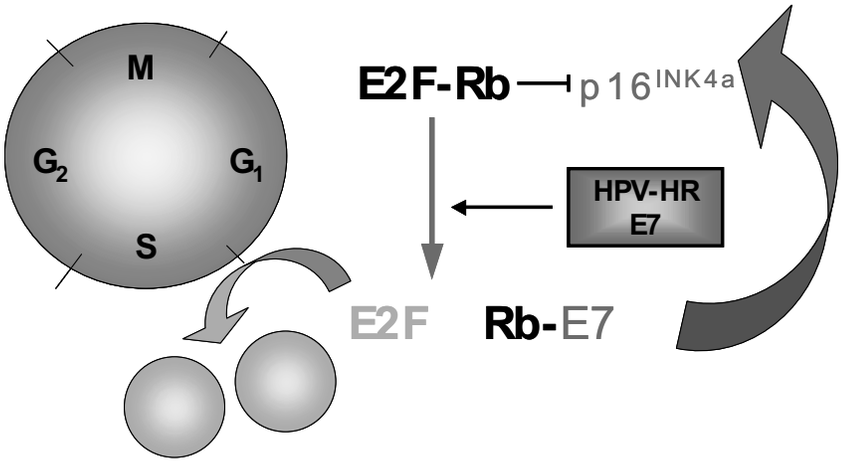

Рисунок 5. Онкогенное воздействие белка E7 на клеточный цикл, приводящее к синтезу p16 ink4α

Преимущество жидкостной цитологии состоит в том, что она из одного забора материала способна дать до 5-6 «серийных» (то есть одинаковых по клеточному составу) мазков. Это дает возможность применения дополнительных методов исследований. Длительное время таким дополнительным методом исследования применяли определения ДНК вируса папилломы человека высокого онкогенного риска. Однако в настоящее время известно, что скрининг ВПЧ-инфекции, осуществленный у женщин соответствующего возраста, может идентифицировать пациенток с низким риском развития рака шейки матки в случае негативного теста, но ПЦР ВПЧ бесполезна для обнаружения пациентов с высоким риском прогрессии. Для достижения данной цели нам необходим тест, позволяющий выявлять проявление онкогенного потенциала вируса. Таким образом, наше внимание должно быть перенесено от агента к хозяину (Miller AB. Lancet 2001).

ИММУННОЦИТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ОНКОМАРКЕРА P16INK4A.

Нормальный клеточный цикл состоит из G1-, S-, G2- и M-фаз. Эпителий шейки матки представляет собой динамическую ткань с постоянным клеточным обновлением. Киназа, которая обеспечивает прохождение клетки из G1 в S фазу клеточного цикла — это E2F. В норме она неактивна, находясь в связанном состоянии с белком супрессором Rb (продукт гена ретинобластомы) (рис. 3).

Белок p16(INK4α) осуществляет контроль разобщения комплекса E2F-Rb, не допуская безудержной пролиферации клетки. Однако синтез p16(INK4a) в норме по механизму обратной связи сдерживается.Таким образом, концентрация данного белка в нормальной клетке чрезвычайно мала, что проявляется негативной иммуноцитохимической реакцией (рис. 4).

Белок E7 вируса папилломы человека ВПЧ высокого онкогенного риска при своем взаимодействии с продуктом гена ретинобластомы приводит к разобщению комплекса E2F-Rb.

E2F остается постоянно в активном состоянии, стимулируя безудержную пролиферации клетки. P16(INK4a) пытается сдержать этот процесс, что приводит к бесконтрольному его синтезу (рис. 5). Однако p16 лишен своей мишени, что в условиях отсутствия обратной связи значительно повышает его концентрацию в клетке. Иммуноцитохимически это проявляется позитивной реакцией (рис. 6), что является биомаркером инициации канцерогенеза в эпителии шейки матки (Nieh S., Chen S.F., Chu T.Y. et al. Gynecol Oncol. 2003).

Было достоверно показано, что экспрессия p16 связана с низкой, умеренной и тяжелой дисплазией (с внутриэпителиальными плоскоклеточными поражениями шейки матки как высокого, так и низкого Grade, LSIL и HSIL соответственно классификации ВОЗ), причем экспрессия p16 не встречалась в плоском эпителии без признаков дисплазии (Bibbo M. et al. Acta Cytol 2002). В то же время, хотя отмечалась четкая корреляция обнаружения ДНК вируса папилломы человека с дисплазиями, имелось также большое количество ПЦР-позитивных на HPV случаев (с эписомальной локализацией HPV), в которых, при последующем гистологическом исследовании отсутствовал предрак и рак (Nieh S., Chen S.F., Chu T.Y. et al Gynecol Oncol. 2005). Данное явление подтверждалось негативной иммуноцитохимической реакцией на p16ink4α в диспластических клетках (рис. 7).

Таким образом, иммуноцитохимическое определение экспрессии p16 на мазках, приготовленных при помощи жидкостной цитологии, может позволить:

Достоверно оценивать потенциал дисплазии в отношении развития рака шейки матки и, соответственно, выбирать более консервативную или более агрессивную тактику лечения.

Уточнять заключения цитолога. Дополнительному исследованию на p16, с нашей точки зрения, подлежат все случаи атипической цитологии (кроме инвазивного рака шейки матки), неопределенные цитологические заключения (атипические клетки плоского эпителия неясного значения-ASCUS) и все изменения железистого эпителия (Murphy N. , Heffron B., King B. et al. Virchows Arch 2004).

Разрешать спорные вопросы при выявлении гинекологом высокоаномальной кольпоскопической картины, не сопровождающейся изменениями в цитологическом мазке.

Рисунок 8. Цервикальная щеточка

Во многих случаях обоснованно отказаться от биопсии.

У большинства пациенток пожилого возраста с цитологической картиной дисплазии на фоне атрофического цервицита обоснованно избрать выжидательную тактику, отказавшись не только от лечения, но и от биопсий, и увеличить интервалы между диспансерными осмотрами. У небольшого числа p16-позитивных пациенток этой возрастной группы, напротив, обоснованно избрать более активную тактику.

Определять индивидуальную тактику в отношении пациенток, инфицированных штаммами вируса папилломы человека высокого онкогенного потенциала, если у них нет цитологических и кольпоскопических изменений. У женщин с позитивной ПЦР на HPV выделить группу пациенток, у которых уже инициирован канцерогенез в эпителии шейке матки, и направить на них необходимое лечебное воздействие. Соответственно в более многочисленной группе p16 негативных женщин необходимо продолжить мониторинг.

Усовершенствовать мониторинг пациенток, прошедших органосохраняющее лечение по поводу «тяжелой дисплазии» или «рака in situ», добавив определение p16 к рутинному цитологическому исследованию. Это позволит у пациенток наибольшего риска повысить чувствительность цитологического исследования и тестировать персистирующую папилломавирусную инфекцию до появления морфологических изменений.

АЛГОРИТМ ДЕЙСТВИЙ ВРАЧА-ГИНЕКОЛОГА

Забор материала мы рекомендуем проводить при помощи одноразовой цервикальной щеточки (cervix-brush, рис. 8): она вводится во влагалище под контролем глаза. Конус щеточки осторожно направляется в цервикальный канал. После введения в него конуса, щеточка прижимается к поверхности шейки и производится 5 полных круговых вращений — три по часовой стрелке и два - против часовой стрелки. Перед проведением данных манипуляций необходимо тщательно очистить шейку матки от слизи. Щеточку с материалом необходимо опустить в контейнер с жидкой транспортной средой и тщательно ополоснуть ее там. Жидкая среда и клеточная среда должны храниться в холодильнике при температуре от +2 до +8°С. Клеточная суспензия стабильна в течение 10 дней.

Лабораторный этап занимает от 3 до 5 дней и включает в себя центрифугирование среды с получением монослойных мазков, рутинное окрашивание по Романовскому-Гимзе, иммуноцитохимическое исследование на p16ink4α.

Интерпретация результатов. Заключение включает в себя два подраздела: жидкостную цитологию и иммуноцитохимическое исследование на p16ink4α. Формулировка заключения жидкостной цитологии не отличается от традиционной, однако его интерпретация должна проводиться в зависимости от выявление онкомаркера p16ink4α. Особенно это относится к дисплазиям шейки матки.

Если выявляется позитивная реакция на онкомаркер p16ink4α, больной должно быть предпринято хирургическое лечение в размере конизации шейки матки. Мы рекомендуем проводить данное лечение в специализированных онкологических учреждения.

Если выявляется негативная реакция на онкомаркер p16ink4α, то проводится консервативное лечение на местах.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Ашрафян Л. А., Харченко Н. В., Огрызкова В. Л., Антонова И. Б. Принципы лечения пре- и микроинвазивного рака шейки матки. Практическая онкология, 2002.;т. 3: 173-178.

2. Хансон К. П., Имянитов Е. Н. Современные представления о канцерогенезе рака шейки матки. Практическая онкология, 2002; т. 3: 145-155.

3. Bibbo M., Klump W. J., DeCecco J., Kovatish A. J. Procedure for immunocytochemical detection of p16INK4α antigen in thin-layer, liquid-based specimens. Acta Cytol, 2002; V.46: 25-29.

4. 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; V. 6(12):3745–3753.

5. GLOBOCANDatabase Jun. 2006. http://www.dep.iarc.fr/globocan/globocan.htm; 3

6. 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; V.65(3): 1208–1218.

7. 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; V.92(2): 276-84.

8. Meyer J. L., Hanlon D. W., Andersen B. T. et al. Evaluation of p16INK4α expression in ThinPrep cervical specimens with the CINtec p16INK4αassay: correlation with biopsy follow-up results. Cancer, 2007; V. 111(2): 83-92.

9. 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; V. 445: 610–615.

10. 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; V.99: 272-276.

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; V. 27: 187–193.

12. 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; V.91(1): 201-8.

13. 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; V.99(3): 578-84.

14. Rocco J. W., Sidransky D. p16(MTS-1/CDKN2/INK4a) in cancer progression. Exp Cell Res, 2001; V.264: 42-55.

15. 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; V. 335(7609).: 28-38.

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; V.48: 580-5.

17. 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; V. 60: 6027-6032.