

УДК: 618.146-006:578.827.1]-07

ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЦЕННОСТЬ ИММУНОЦИТОХИМИЧЕСКОГО МЕТОДА ПРИ ВПЧ-АССОЦИИРОВАННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ШЕЙКИ МАТКИ

© А. Р. Хачатурян¹, Е. К. Орехова², Г. Х. Толибова³, Т. Г. Траль³¹ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова»;²Клиника ЕМС, Санкт-Петербург;³ФГБНУ «НИИ АГиР им. Д. О. Отта», Санкт-Петербург

■ Папилломавирусная инфекция (ПВИ) в настоящее время считается наиболее распространенной из инфекций, передаваемых половым путем. Однако только в 8–20 % случаев инфицирование вирусом папилломы человека высокого онкогенного риска имеет шансы на трансформацию в неопластический процесс. Обнаружение продуктивной формы ПВИ является основой ранней диагностики предраковых заболеваний шейки матки. С целью уточнения степени выраженности неоплазии и выбора достаточного по объему метода лечения исследована диагностическая значимость иммуноцитохимического метода оценки наличия и степени экспрессии клеточных биомаркеров вирус-индуцированной пролиферации — протеинов p16^{inkα}, Ki-67, чувствительность и положительная прогностическая значимость ко-экспрессии которых превышала диагностическую значимость цитологического метода.

■ **Ключевые слова:** вирус папилломы человека; цервикальная интраэпителиальная неоплазия; белки p16^{inkα}, Ki-67; скрининг рака шейки матки.

DIAGNOSTIC VALUE OF P16^{INKα}/KI-67 DUAL-STAINED CYTOLOGY IN HPV-ASSOCIATED CERVICAL DISEASES

© A. R. Khachaturyan¹, E. K. Orekhova², G. Kh. Tolibova³, T. G. Tral³¹I. P. Pavlov State Medical University of Saint Petersburg, Russia;²EMC clinic, Saint Petersburg, Russia;³D. O. Ott Research Institute for Obstetrics and Gynecology, Saint Petersburg, Russia

■ Human papillomavirus (HPV) infection is currently considered the most common of sexually transmitted infections. However, only 8–20 % of cases of infection with human papillomavirus oncogenic risk has the potential to transform to a neoplastic process. Detection of productive forms of HPV infection is the basis of early diagnosis of precancerous lesions. In order to clarify the severity of neoplasia and choose a sufficient way of treatment we investigated the diagnostic value of p16^{inkα}/Ki-67 Dual-stained cytology method for assessing the presence and degree of expression of p16^{inkα} protein and Ki-67, biomarkers of virus-induced proliferation, the sensitivity and positive predictive value of co-expression degree of which can increase the diagnostic value of cervical cytology.

■ **Key words:** Human Papilloma virus; cervical intraepithelial neoplasia; p16^{inkα}, Ki-67; cervical cancer screening methods.

В настоящее время общеизвестен тот факт, что для развития рака шейки матки необходимо присутствие вируса папилломы человека (ВПЧ) высокого онкогенного риска. В то же время каждый второй житель земного шара с началом половой жизни имеет шанс инфицирования ВПЧ [2, 10]. При этом вероятность развития ВПЧ-ассоциированного поражения шейки матки тяжелой степени равна 1 : 250. По данным отечественных авторов, ВПЧ обнаружен у 30,3 % здорового населения Европейского региона нашей страны [1]. Наиболее подвержена инфицированию ВПЧ возрастная группа 18–30 лет. Частота передачи вируса достигает 80 % при однократном половом контакте, до 60 % молодых людей приобретают ВПЧ в течение двух лет после начала половой жизни [4]. Однако ведущим фактором канцерогенеза является не инфицирование ВПЧ, а развитие персистирующей и интегрированной

формы папилломавирусной инфекции (ПВИ). Известно, что в 70 % случаев ПВИ заканчивается спонтанным выздоровлением в течение 1 года, а в 90 % случаев — в течение 2 лет, но длительная персистенция типов ВПЧ высокого онкогенного риска (более 2 лет) является наиболее опасным фактором прогрессии в предрак и рак шейки матки [8, 12].

В современных условиях развития науки известны и доступны три пути профилактики рака шейки матки, каждый из которых имеет равные права на реализацию, но требует соблюдения определенных условий. Во-первых, это отказ (воздержание) от половой жизни или соблюдение условий моногамии обоими половыми партнерами. Данный путь может реализоваться лишь в небольших регионах, а значит он не имеет большого значения в профилактике цервикального рака в современном мире. Во-вторых, это при-

менение профилактических вакцин до первого полового контакта (эффективность метода возрастает при применении среди представителей как женского, так и мужского пола, и считается перспективой для современных молодых женщин). В-третьих, проведение обязательного цервикального скрининга с применением цитологического метода и/или определения ДНК ВПЧ высокого онкогенного риска. В странах с обязательными скрининговыми программами заболеваемость и смертность от рака шейки матки снизилась на 70%, однако цитологический метод, являющийся основой цервикального скрининга в большинстве стран, демонстрирует низкую чувствительность [3]. Высокая частота ложноотрицательных результатов оценки цервикальных мазков, а также доказанная вероятность регресса минимальных степеней диспластических поражений цервикального эпителия и необходимость идентификации тех вирус-индуцированных цервикальных дисплазий, которые с высокой долей вероятности будут прогрессировать в инвазивный рак, привели к необходимости поиска и внедрения новых методов верификации не столько присутствия ДНК ВПЧ в цервикальном эпителии, сколько обнаружения персистирующей и прогрессирующей формы папилломавирусной инфекции (ПВИ) [5, 11]. Такими методами оказались иммуноцитохимические методы определения наличия и степени экспрессии вирусных (ДНК, м-РНК) и клеточных (p16^{ink4}, Ki-67 и др.) биомаркеров вирус-индуцированной пролиферации [13].

Целью исследования явилась сравнительная оценка прогностической ценности цитологического и иммуноцитохимического методов исследования при диагностике ВПЧ-ассоциированных заболеваний шейки матки.

Материалы и методы

Обследовано 100 пациенток в возрасте 20–49 лет, обратившихся в амбулаторное звено с жалобами, не связанными с патологией шейки матки, например нарушения менструального цикла, бесплодие, планирование беременности, плановый профилактический осмотр. Методы обследования включали: онкоцитологическое исследование в режиме цервикального скрининга методом автоматизированной жидкостной цитологии NOVAPREP-25 (NOVACYT), ВПЧ-тестирование методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с типированием вируса, иммуноцитохимическое исследование цитологических препаратов с оценкой ко-экспрессии онкопротеинов p16^{ink4} и Ki-67 по стандартной методике с использованием набора Cintec plus; кольпоскопию и прицельную биопсию (по показаниям) с гистологическим

исследованием полученного материала. Степень экспрессии онкопротеинов оценивалась как положительная, слабоположительная и отрицательная в зависимости от наличия и степени интенсивности окраски препарата. Для количественного анализа ко-экспрессии использовали систему компьютерного анализа изображений «Морфология 5.2» (ВидеоТест, Россия).

Интерпретации результатов цитологического исследования мазков-соскобов с поверхности шейки матки и из цервикального канала проводилась согласно классификационной системе Бетесда (2001 г.).

Для оценки диагностической ценности неинвазивных и малоинвазивных методов обнаружения плоскоклеточных поражений эпителия шейки матки у пациенток с подозрением на ПВИ нами применялись следующие статистические параметры: положительная прогностическая значимость, чувствительность и специфичность метода.

Результаты

Средний возраст обследованных больных составил $30,8 \pm 6,56$ лет. В обследованной группе частота выявления ВПЧ высокого онкогенного риска составила 50%. Определение типа ВПЧ выполнено 37 пациенткам, при этом 17 (45,9%) пациенток были инфицированы несколькими типами ВПЧ высокого онкогенного риска одновременно. Распределение типов ВПЧ в обследованной группе было следующим: преобладающим по частоте был 16 тип — 19 (51,3%), на втором месте по частоте выявления был 31 тип — 10 (27%), на третьем месте оказались 56 тип — 6 (16,2%) и 18 тип — 5 (13,5%). При ДНК-типировании вируса папилломы человека также были обнаружены 52 и 33 типы ВПЧ — 4 (10,8%); 51 и 58 типы — 3 (8,1%); 45 тип — 2 (5,4%); 35, 39 и 66 типы — 1 (2,7%). По результатам онкоцитологического исследования в 60% случаев интраэпителиальные изменения (категория NIL по системе Бетесда), в 18% случаев были обнаружены цитологические признаки ПВИ (дискариоз, койлоцитоз и т. д.), в 9% случаев обнаружены атипичные клетки неясного значения (ASCUS), в 9% случаев — плоскоклеточные интраэпителиальные поражения низкой степени (LSIL), в 3% случаев — атипичные клетки, не позволяющие исключить HSIL (ASC-H), в 1% случаев — плоскоклеточные интраэпителиальные поражения высокой степени (HSIL). Мы сопоставили данные цитологического скрининга с результатами гистологического исследования. Положительная прогностическая ценность цитологического метода для определения вирусного поражения в целом составила 88,8%, чувствитель-

ность метода — 44,4%, специфичность — 72,7%. Для оценки результатов кольпоскопического исследования мы применяли международную классификацию кольпоскопических терминов, принятую в 2011 году в Рио-де-Жанейро (IFCPC), согласно которой у 15% обследованных нами пациенток была обнаружена нормальная кольпоскопическая картина. Аномальная кольпоскопическая картина 1 степени была выявлена в 66%, 2 степени — в 19% случаев.

При иммуноцитохимическом исследовании клеточного материала, полученного из эндо- и экзоцервикса, положительная экспрессия протеина p16^{ink4} выявлялась в 74% случаев, при этом в 19% экспрессия расценивалась как слабоположительная, а в остальных 55% случаев экспрессия протеина p16^{ink4} была положительной. Экспрессия маркера клеточной пролиферации, протеина Ki-67, выявлялась в 39%, при этом в 14% случаев экспрессия расценивалась как слабоположительная, а в 25% случаев выявлена положительная экспрессия протеина Ki-67. Прицельная биопсия была выполнена в 65 случаях. Согласно результатам гистологического исследования биоптатов шейки матки в большинстве случаев (49,23%) были диагностированы неспецифические гистологические признаки ПВИ (воспалительная атипия, дискератоз, койлоцитоз, паракератоз), в 16,92% случаев в биоптатах определялась цервикальная эктопия с элементами метаплазии. В 33,9% случаев при морфологическом исследовании биоптатов шейки матки обнаруживалась дисплазия различной степени тяжести: дисплазия легкой степени (CIN I) была обнаружена в 15,4% случаев, дисплазия средней степени (CIN II) — в 10,76%, тяжелая дисплазия (CIN III) — в 6,15%, карцинома in situ (CIS) — в 1,54%. Необходимо отметить, что в нашем исследовании при цитологической и морфологической оценке степени выраженности ВПЧ-ассоциированного поражения цервикального эпителия расхождений в результатах исследований не было выявлено.

На основе полученных данных была произведена оценка положительной прогностической ценности иммуноцитохимического исследования

с оценкой экспрессии протеинов p16^{ink4} и Ki-67 для диагностики морфологически верифицированного ВПЧ-ассоциированного поражения цервикального эпителия. По результатам расчетов положительная прогностическая значимость оценки экспрессии протеина p16^{ink4} составила 84%, чувствительность — 77%, а специфичность — 27%. Положительная прогностическая значимость оценки экспрессии протеина Ki-67 составила 87,5%, чувствительность — 42%, а специфичность — 80%. При этом положительная прогностическая ценность для определения дисплазии составила 100% по обоим иммуноцитохимическим показателям экспрессии, а положительная прогностическая значимость и чувствительность ИЦХ-метода для определения наличия неспецифических признаков ВПЧ-ассоциированного поражения цервикального эпителия составили 77 и 87,5% по протеину p16^{ink4}, соответственно. У 34 пациенток, которым была выполнена прицельная биопсия шейки матки, при ИЦХ-исследовании выявлялась ко-экспрессия протеинов p16^{ink4} и Ki-67, при этом положительная прогностическая значимость иммуноцитохимического метода была выше и составила 86%, а чувствительность метода — 71%, специфичность — 50%. Необходимо отдельно отметить, что чувствительность ИЦХ-метода исследования при выявлении ко-экспрессии протеинов p16^{ink4} и Ki-67 для выявления дисплазии составила 60%, для выявления цитологических признаков поражения клетки ДНК ВПЧ высокого онкогенного риска чувствительность ко-экспрессии достигала 77%.

Выводы

Цитологический метод исследования является одним из наиболее доступных и распространенных методов цервикального скрининга. В то же время высокая специфичность, но низкая чувствительность данного теста определяют необходимость поиска новых, более специфических методов диагностики ВПЧ-ассоциированного поражения шейки матки. Включение в цервикальный скрининг методов идентификации ВПЧ высокого онкогенного риска (метод ПЦР в реаль-

Таблица 1

Положительная прогностическая значимость, чувствительность и специфичность цитологических методов исследования

| Статический показатель, % | Метод исследования | Цитологический метод | Иммуноцитохимический метод (экспрессия протеинов) | | |
|---------------------------|--------------------|----------------------|---|-------|---|
| | | | p16 ^{ink4} | Ki-67 | Ко-экспрессия p16 ^{ink4} и Ki-67 |
| | ППЗ | 88,8 | 84 | 87,5 | 86 |
| | Чувствительность | 44,4 | 77 | 42 | 71 |
| | Специфичность | 72,7 | 27 | 80 | 50 |

ном времени, основанном на реакции амплификации ДНК вируса, Digene-тест с применением ДНК-гибридизации) позволяет оптимизировать организацию цервикального скрининга и выявить группы пациенток, нуждающихся в дополнительном обследовании с применением инвазивных методик [6, 7, 9]. В то же время положительный результат ВПЧ-теста позволяет лишь определить группу риска, но не диагностировать предрак или рак шейки матки. Внедрение в клиническую практику иммуноцитохимического метода оценки ко-экспрессии белков клеточной пролиферации p16^{ink4a} и Ki67 и применение его в сочетании с цитологическим методом позволит не только повысить чувствительность и специфичность неинвазивных способов диагностики вирус-ассоциированного поражения цервикального эпителия, но и создать четкие алгоритмы ведения пациенток группы высокого риска, избежать хирургического лечения в случаях поражений, имеющих высокую вероятность спонтанного регресса, что особенно важно у молодых женщин репродуктивного возраста.

Статья представлена М. А. Тарасовой,
ФГБНУ «НИИ АГиР им. Д. О. Отта»,
Санкт-Петербург

Литература

1. Александрова Ю. Н., Лыщев А. А., Сафронникова Н. Р. Папилломавирусная инфекция у здоровых женщин Санкт-Петербурга. Вопросы онкологии. 2000; 2: 175–9.
2. Андосова Л. Д., Качалина О. В., Куделькина С. Ю., Гонова Е. С. Генодиагностика папилломавирусной инфекции у женщин с различной патологией репродуктивной сферы. Медицинский альманах. 2012; 2 (12): 71–3.
3. Андосова Л. Д., Контрощикова К. Н., Качалина О. В. Методы ранней диагностики и новые скрининговые технологии при заболеваниях шейки матки. Медицинский альманах. 2011; 6 (19): 98–102.
4. Роговская С. И., Михеева И. В., Шипулина О. Ю., Минкина Г. Н., Подзолкова Н. М., Радзинский В. Е., Шипулин Г. А. Распространенность папилломавирусной инфекции в России. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2012; 1: 25–34.
5. Савичева А. М., Шипицина Е. В. Вакцинация и скрининг: интеграция стратегий профилактики рака шейки матки. Журнал акушерства и женских болезней. 2009; 5: 90–1.
6. Шипицина Е. В., Оржесковская Е. А., Бабкина К. А., Савичева А. М., Микая Н. А., Орлова О. О., Юркова И. К. Определение вирусной нагрузки и статуса ДНК вируса папилломы человека 16 типа методом ПЦР в реальном времени. Журнал акушерства и женских болезней. 2004; 4: 26–32.
7. Abbott Molecular RealTime High Risk HPV Optimising Cervical Cancer Screening. Available at: <http://www.abbottmolecular.com/products/infectious-diseases/realtime-pcr/hepatitis-high-risk-hpv-assay.html>.
8. Bosh F. X. Human papillomavirus: science and technologies for the elimination of cervical cancer. Expert Opin Pharmacother. 2011; 12 (14): 2189–204.
9. Digene Corporation Hybrid Capture® 2 High-Risk HPV DNA Test™, An In Vitro Nucleic Acid Hybridization Assay with Signal Amplification using Microplate Chemiluminescence for the Qualitative Detection of Human Papillomavirus (HPV) Types 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 and 68 in Cervical Specimens. 2004; 10.
10. Franceschi S., Herrero R., Clifford G. M., et al. Variations in the age — specific curves of human papillomavirus prevalence in women worldwide. Int J Cancer. 2006; 119: 2677–84.
11. Ogunmodede F., MD; Steven H. Yale et al. Human Papillomavirus Infections in Primary Care. Clinical Medicine Research. 2007; 5 (4): 210–7.
12. Sedlacek T. V., Lindhein S. et al. Mechanism for HPV transmission at birth. Am. J. Obstet. Gynecol. 1989; 161: 55–9.
13. World Health Organization, International Agency of Research on Cancer. Handbooks of Cancer Prevention. Cervix Cancer Screening. Geneva: IARC Press, 2005.

References

1. Aleksandrova Yu. N., Lyshchev A. A., Safronnikova N. R. Papillomavirusnaya infektsiya u zdorovykh zhenshchin Sankt-Peterburga. [Human papilloma virus infection in healthy women in Saint Petersburg]. Voprosy onkologii. 2000; 2: 175–9. (in Russian).
2. Andosova L. D., Kachalina O. V., Kudel'kina S. Yu., Gonova E. S. Genodiagnostika papillomavirusnoy infektsii u zhenshchin s razlichnoy patologiyey reproductivnoy sfery. [Gene diagnostics of human papilloma virus infection in women with different pathologies of the reproductive sphere]. Meditsinskiy al'manakh. 2012; 2 (12): 71–3. (in Russian).
3. Andosova L. D., Kontorshchikova K. N., Kachalina O. V. Metody ranney diagnostiki i novye skringovoye tekhnologii pri zabolevaniyakh sheyki matki. [Methods of early diagnosis and new screening technology for cervical disease]. Meditsinskiy al'manakh. 2011; 6 (19): 98–102. (in Russian).
4. Rogovskaya S. I., Mikheeva I. V., Shipulina O. Yu., Minkina G. N., Podzolkova N. M., Radzinskiy V. E., Shipulin G. A. Rasprostranennost' papillomavirusnoy infektsii v Rossii [Distribution of human papilloma virus infection in Russia]. Epidemiologiya i vaktinoprofilaktika. 2012; 1: 25–34. (in Russian).
5. Savicheva A. M., Shipitsina E. V. Vaktinatsiya i skringing: integratsiya strategiy profilaktiki raka sheyki matki. [Vaccination and screening: the integration of strategies for prevention of cervical cancer]. Zhurnal akusherstva i zhenskikh bolezney. 2009; 5: 90–1. (in Russian).
6. Shipitsyna E. V., Orzheskovskaya E. A., Babkina K. A., Savicheva A. M., Mikaya N. A., Orlova O. O., Yurkova I. K. Opre-delenie virusnoy nagruzki i statusa DNK virusa papillomy cheloveka 16 tipa metodom PTsR v real'nom vremeni. [Determination of viral load and state of human papillomavirus

- type 16 using real-time PCR]. Zhurnal akusherstva i zhenskikh bolezney. 2004; 4: 26–32. (in Russian).
7. Abbott Molecular RealTime High Risk HPV Optimising Cervical Cancer Screening. Available at: <http://www.abbottmolecular.com/products/infectious-diseases/realtime-pcr/hepatitis-high-risk-hpv-assay.html>.
 8. Bosh F. X. Human papillomavirus: science and technologies for the elimination of cervical cancer. Expert Opin Pharmacother. 2011; 12 (14): 2189–204.
 9. Digene Corporation Hybrid Capture® 2 High-Risk HPV DNA Test™, An In Vitro Nucleic Acid Hybridization Assay with Signal Amplification using Microplate Chemiluminescence for the Qualitative Detection of Human Papillomavirus (HPV) Types 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 and 68 in Cervical Specimens. 2004; 10.
 10. Franceschi S., Herrero R., Clifford G. M. et al. Variations in the age — specific curves of human papillomavirus prevalence in women worldwide. Int J Cancer. 2006; 119: 2677–84.
 11. Ogunmodede F., MD; Steven H. Yale et al. Human Papillomavirus Infections in Primary Care. Clinical Medicine Research. 2007; 5 (4): 210–7.
 12. Sedlacek T. V., Lindhein S. et al. Mechanism for HPV transmission at birth. Am. J. Obstet Gynecol. 1989; 161: 55–9.
 13. World Health Organization, International Agency of Research on Cancer. Handbooks of Cancer Prevention. Cervix Cancer Screening. Geneva: IARC Press, 2005.

■ Адреса авторов для переписки

Хачатурян Арминэ Робертовна — к. м. н., доцент кафедры акушерства и гинекологии. ГБОУ «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова». 197022, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, д. 6/8.

E-mail: armine2709@rambler.ru.

Орехова Екатерина Константиновна — врач акушер-гинеколог. Клиника ЕМС. Россия, Санкт-Петербург, ул. Победы, д. 17 А.

E-mail: orekhovakatherine@gmail.com.

Толибова Гулрухсор Хайбуллоевна — к. м. н., старший научный сотрудник, лаборатория клеточной биологии, отдел патоморфологии. ФГБНУ «НИИ АГиР им. Д. О. Отта». 199034, Россия, Санкт-Петербург, Менделеевская линия, д. 3. **E-mail:** gulyatolibova@mail.ru.

Траль Татьяна Георгиевна — врач-патологоанатом. ФГБНУ «НИИ АГиР им. Д. О. Отта». 199034, Россия, Санкт-Петербург, Менделеевская линия, д. 3. **E-mail:** TTG2008@bk.ru.

Khachatryan Armine Robertovna — associate professor of the chair of Obstetrics and Gynecology. I. P. Pavlov State Medical University of St. Petersburg. 197022, St. Petersburg, L. Tolstogo St., 6/8, Russia.

E-mail: armine2709@rambler.ru.

Orekhova Ekaterina Konstantinovna — obstetrician-gynecologist. EMC clinic. St. Petersburg, Pobedy St., 17 A, Russia.

E-mail: orekhovakatherine@gmail.com.

Tolibova Gulruksor — PhD. MD. Senior Scientist. Laboratory of Cell Biology, Department of Pathomorphology. D. O. Ott Research Institute of Obstetrics and Gynecology, RAMS. 199034, St. Petersburg, Mendeleyevskaya Line, 3, Russia. **E-mail:** gulyatolibova@mail.ru.

Tral Tatyana Georgiyevna — MD. Pathologist. Department of Pathomorphology. D. O. Ott Research Institute of Obstetrics and Gynecology, RAMS. 199034, St. Petersburg, Mendeleyevskaya Line, 3, Russia. **E-mail:** TTG2008@bk.ru.