

Мониторинг результатов лечения цервикальных интраэпителиальных неоплазий и раннего рака шейки матки с использованием молекулярно-генетических методов исследования

SUMMARY

The article presents the results of the treatment for cervical intraepithelial neoplasms, pre-invasive and invasive cervical cancer by means of electrocoagulation method. The basic reasons of cervical disease relapses after the surgical operation have been revealed. The substantiation of the use of molecular genetic diagnostic methods in postmedical monitoring of precancer and early cervical cancer has been given.

VIARHEICHYK H.I. Monitoring of the results after the treatment for cervical intraepithelial neoplasms and early cervical cancer with the use of molecular genetic research methods

Проблема рака шейки матки актуальна для Республики Беларусь, наблюдается неуклонный рост заболеваемости цервикальным раком и смещение структуры заболеваемости в сторону женщин молодого возраста [1]. Рост заболеваемости раком шейки матки обусловлен широким распространением вирусов папилломы человека (HPV) высокого канцерогенного риска. Этиологическая роль канцерогенных папилломавирусов в развитии рака шейки матки не вызывает сомнений [5].

Несмотря на возможности первичной профилактики рака шейки матки – вакцинации, наиболее важным методом профилактики является ранняя диагностика предраковой стадии папилломавирусной инфекции – цервикальной интраэпителиальной неоплазии (CIN) и её эффективное лечение.

При лечении HPV-ассоциированной патологии шейки матки преследуется цель удаления или разрушения патологического очага. Цервикальные интраэпителиальные неоплазии, рак *in situ* и микроин-

вазивная карцинома шейки матки лечатся методом диатермоэлектроэксцизии (ДЭЭ) с обязательным гистологическим контролем краев резекции. Рецидивы CIN после органосохраняющих операций составляют от 15 до 35%, что в ряде случаев связано с полифокальным поражением шейки матки, неполным иссечением патологического очага, положительным краем резекции при иссечении патологических очагов, а также с персистенцией папилломавирусов в эпителии шейки матки после удаления очагов дисплазии или микроинвазивного рака шейки матки [4]. Наличие дисплазии или очагов опухоли в краях резекции является плохим прогностическим признаком для прогрессии заболевания или его рецидива в период наблюдения до 3 лет. В 13,2–79% случаев при наличии позитивных краёв резекции в эктоцервиксе или эндоцервиксе в течение 18 месяцев наблюдения развивается рецидив заболевания [2,

3]. Однако заболевание рецидивирует и в случае негативного края резекции, что может быть следствием персистенции папилломавирусов в неизменённом эпителии шейки матки после удаления очаговых патологических процессов, обусловленных HPV. Поэтому на сегодняшний день актуально не только радикальное удаление патологических очагов из шейки матки, но и выявление продолжающейся персистенции папилломавирусов, приводящей к рецидиву заболевания.

Очень важно своевременно перестроить подходы в лечении больных с проявлениями HPV-инфекции и планировать его с учётом диагностированного вирусносительства.

Цель исследования – повысить эффективность мониторинга результатов лечения цервикальных интраэпителиальных неоплазий.

Материалы и методы

За период с 2007 по 2010 год под наблюдением находились 148 пациенток с предраковой патологией, преинвазивным или микроинвазивным раком шейки матки, которые были пролечены с использованием метода электроэксцизии шейки матки. Средний возраст пациенток составил 30,6 года (от 20 до 56 лет). Была выполнена расширенная кольпоскопия, цитологическое, гистологическое исследование, диагноз верифицирован морфологически во всех случаях до проведённой операции. Во всех удалённых препаратах шейки матки были оценены гистологические края резекции шейки матки как критерий радикальности операции, также проводился контроль ДНК HPV высокого онкогенного риска до операции и дважды после операции (через 2 и 6 месяцев) в неизменённом эпителии шейки матки.

Идентификацию HPV проводили методом ПЦР. Для постановки реакции использовали тест-системы «АмплиСенс» производства ЦНИИ эпидемиологии Минздрава России. Для выявления вирусов высокого онкогенного риска применяли набор «АмплиСенс-50-F HPV ВКР-генотип» (определяли ДНК HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 52, 56, 58, 59, 66 типов) с электрофоретической детекцией. В наборах применялся метод одновременной амплификации (мультиплекс-ПЦР) участков ДНК E1-E2 генов HPV и участка ДНК β-глобинового гена, используемого в качестве эндогенного внутреннего контрольного образца. ДНК-мишень, выбранная в качестве внутреннего контроля, является участком генома человека и должна всегда присутствовать в образце. Эндогенный внутренний контроль поз-

воляет не только контролировать этапы ПЦР-анализа (выделение ДНК и проведение ПЦР), но и оценивать адекватность забора материала и его хранения. Если соскоб эпителия отобран неправильно (недостаточное количество эпителиальных клеток), сигнал амплификации β-глобинового гена будет заниженным.

Также нами была использована количественная оценка вирусной нагрузки онкогенных папилломавирусов в многослойном плоском эпителии шейки матки с использованием ПЦР в режиме реального времени. Применяли тест-системы «АмплиСенс ВПЧ ВКР Скрин-Титр FRT», в которых используется принцип амплификации с выщеплением 5'-концевой метки специфического зонда (TaqMan Assay) и принцип группспецифических олигонуклеотидов, способных амплифицировать фрагменты ДНК нескольких представителей филогенетической группы. Количественное определение основано на использовании стандартных образцов с известной концентрацией ДНК HPV и ДНК человека. Результат рассчитывается в логарифмах геномных эквивалентов вируса (ГЭ), нормализованных на 100 тысяч (10⁵) геномов человека. Нормализация на количество геномов позволяет нивелировать эффект вариаций забора клинического материала. Порог релевантного количества вируса принимался равным 10³ ГЭ на 10⁵ геномов человека, что примерно соответствует порогу в 1 пг/мл ДНК ВПЧ, описанному Snijders и Lorincz как порог релевантного количества вируса.

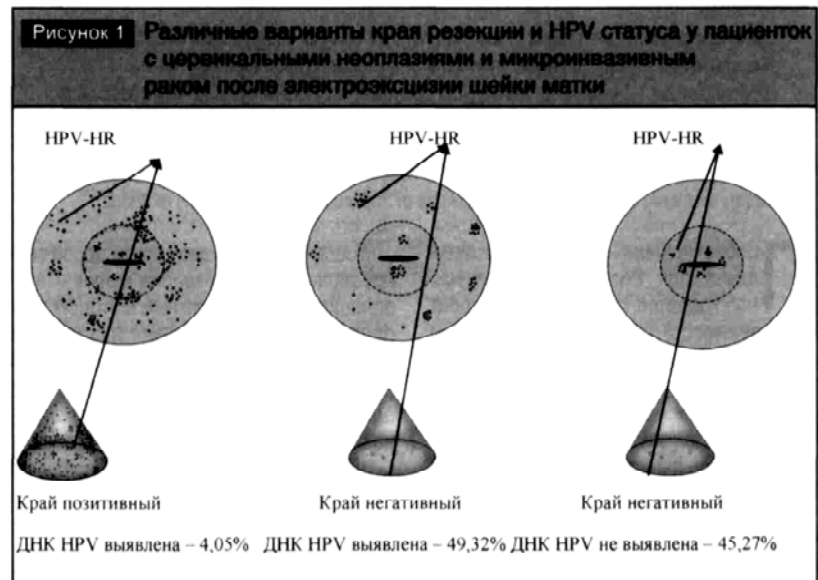
Оценка результатов исследования проведена с помощью программы Statistica 7.0.

Результаты и обсуждение

В результате проведённого исследования у 6 из 148 пациенток (4,05±0,8% случаев) был определён позитивный край резекции после электроэксцизии шейки матки и выявлена ДНК HPV через 2 и 6 месяцев после хирургического вмешательства, у 50% пациенток из этой группы рецидив заболевания выявлен в течение первого года после операции. У 67 (45,27±0,6%) женщин край резекции удалённого конуса был отрицательный и не выявлена ДНК HPV после электроэксцизии, ни в одном случае из этой группы за период наблюдения рецидива заболевания не было, однако в 3 случаях выявлена реинфекция более чем через год после операции. У 73 (49,32±0,58%) пациенток определён негативный край резекции, но в неизменённом эпителии шейки матки после операции выявлена ДНК HPV, из них у 14 женщин (19,17±1,05%) в период от 1 до 3 лет развился рецидив заболевания.

Клинические диагнозы пациенток, перенесших электроэксцизию шейки матки: CIN1 – 14; CIN2 – 21; CIN3 (+in situ) – 99; рак шейки матки (IA1 стадия) – 14.

Таким образом, даже радикальное иссечение патологического очага из шейки матки не является гарантией успешного лечения предрака и рака шейки матки в случае персистенции онкогенных типов папилломавирусов в эпителии шейки матки. Какие причины приводят к длительной персистенции папилломавирусов после удаления очагов дисплазии и преинвазивного и микроинвазивного рака шейки матки? Полагаем, что одной из причин является очаговое или диф-



3). Однако заболевание рецидивирует и в случае негативного края резекции, что может быть следствием персистенции папилломавирусов в неизменённом эпителии шейки матки после удаления очаговых патологических процессов, обусловленных HPV. Поэтому на сегодняшний день актуально не только радикальное удаление патологических очагов из шейки матки, но и выявление продолжающейся персистенции папилломавирусов, приводящей к рецидиву заболевания.

Очень важно своевременно перестроить подходы в лечении больных с проявлениями HPV-инфекции и планировать его с учётом диагностированного вирусносительства.

Цель исследования – повысить эффективность мониторинга результатов лечения цервикальных интраэпителиальных неоплазий.

Материалы и методы

За период с 2007 по 2010 год под наблюдением находились 148 пациенток с предраковой патологией, преинвазивным или микроинвазивным раком шейки матки, которые были пролечены с использованием метода электроэксцизии шейки матки. Средний возраст пациенток составил 30,6 года (от 20 до 56 лет). Была выполнена расширенная кольпоскопия, цитологическое, гистологическое исследование, диагноз верифицирован морфологически во всех случаях до проведённой операции. Во всех удалённых препаратах шейки матки были оценены гистологические края резекции шейки матки как критерий радикальности операции, также проводился контроль ДНК HPV высокого онкогенного риска до операции и дважды после операции (через 2 и 6 месяцев) в неизменённом эпителии шейки матки.

Идентификацию HPV проводили методом ПЦР. Для постановки реакции использовали тест-системы «АмплиСенс» производства ЦНИИ эпидемиологии Минздрава России. Для выявления вирусов высокого онкогенного риска применяли набор «АмплиСенс-50-F HPV ВКР-генотип» (определяли ДНК HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 52, 56, 58, 59, 66 типов) с электрофоретической детекцией. В наборах применялся метод одновременной амплификации (мультиплекс-ПЦР) участков ДНК E1-E2 генов HPV и участка ДНК β-глобинового гена, используемого в качестве эндогенного внутреннего контрольного образца. ДНК-мишень, выбранная в качестве внутреннего контроля, является участком генома человека и должна всегда присутствовать в образце. Эндогенный внутренний контроль поз-

воляет не только контролировать этапы ПЦР-анализа (выделение ДНК и проведение ПЦР), но и оценивать адекватность забора материала и его хранения. Если соскоб эпителия отобран неправильно (недостаточное количество эпителиальных клеток), сигнал амплификации β-глобинового гена будет заниженным.

Также нами была использована количественная оценка вирусной нагрузки онкогенных папилломавирусов в многослойном плоском эпителии шейки матки с использованием ПЦР в режиме реального времени. Применяли тест-системы «АмплиСенс ВПЧ ВКР Скрин-Титр FRT», в которых используется принцип амплификации с выщеплением 5'-концевой метки специфического зонда (TaqMan Assay) и принцип группоспецифических олигонуклеотидов, способных амплифицировать фрагменты ДНК нескольких представителей филогенетической группы. Количественное определение основано на использовании стандартных образцов с известной концентрацией ДНК HPV и ДНК человека. Результат рассчитывается в логарифмах геномных эквивалентов вируса (ГЭ), нормализованных на 100 тысяч (10⁵) геномов человека. Нормализация на количество геномов позволяет нивелировать эффект вариаций забора клинического материала. Порог релевантного количества вируса принимался равным 10³ ГЭ на 10⁵ геномов человека, что примерно соответствует порогу в 1 пг/мл ДНК ВПЧ, описанному Snijders и Lorincz как порог релевантного количества вируса.

Оценка результатов исследования проведена с помощью программы Statistica 7.0.

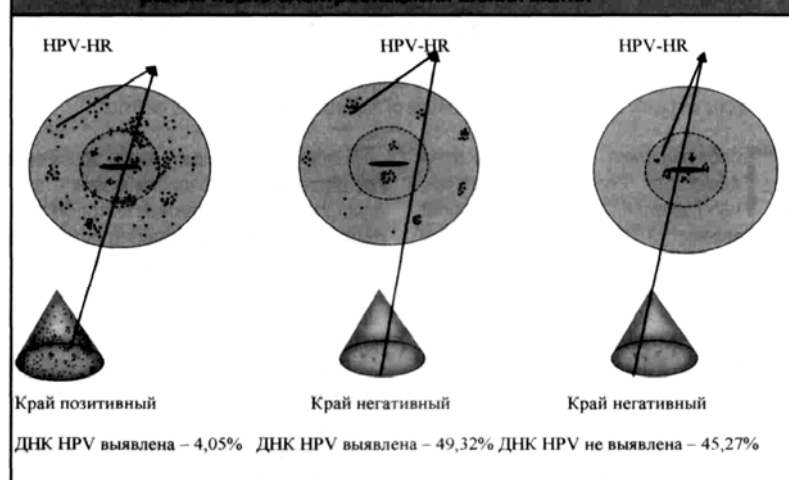
Результаты и обсуждение

В результате проведённого исследования у 6 из 148 пациенток (4,05±0,8% случаев) был определён позитивный край резекции после электроконизации шейки матки и выявлена ДНК HPV через 2 и 6 месяцев после хирургического вмешательства, у 50% пациенток из этой группы рецидив заболевания выявлен в течение первого года после операции. У 67 (45,27±0,6%) женщин край резекции удалённого конуса был отрицательный и не выявлена ДНК HPV после электроэксцизии, ни в одном случае из этой группы за период наблюдения рецидива заболевания не было, однако в 3 случаях выявлена реинфекция более чем через год после операции. У 73 (49,32±0,58%) пациенток определён негативный край резекции, но в неизменённом эпителии шейки матки после операции выявлена ДНК HPV, из них у 14 женщин (19,17±1,05%) в период от 1 до 3 лет развился рецидив заболевания.

Клинические диагнозы пациенток, перенесших электроэксцизию шейки матки: CIN1 – 14; CIN2 – 21; CIN3 (+in situ) – 99; рак шейки матки (IA1 стадия) – 14.

Таким образом, даже радикальное иссечение патологического очага из шейки матки не является гарантией успешного лечения предрака и рака шейки матки в случае персистенции онкогенных типов папилломавирусов в эпителии шейки матки. Какие причины приводят к длительной персистенции папилломавирусов после удаления очагов дисплазии и преинвазивного и микроинвазивного рака шейки матки? Полагаем, что одной из причин является очаговое или диф-

Рисунок 1 Реализованные варианты края резекции и HPV статуса у пациенток с цервикальными неоплазиями и микроинвазивным раком после электроэксцизии шейки матки



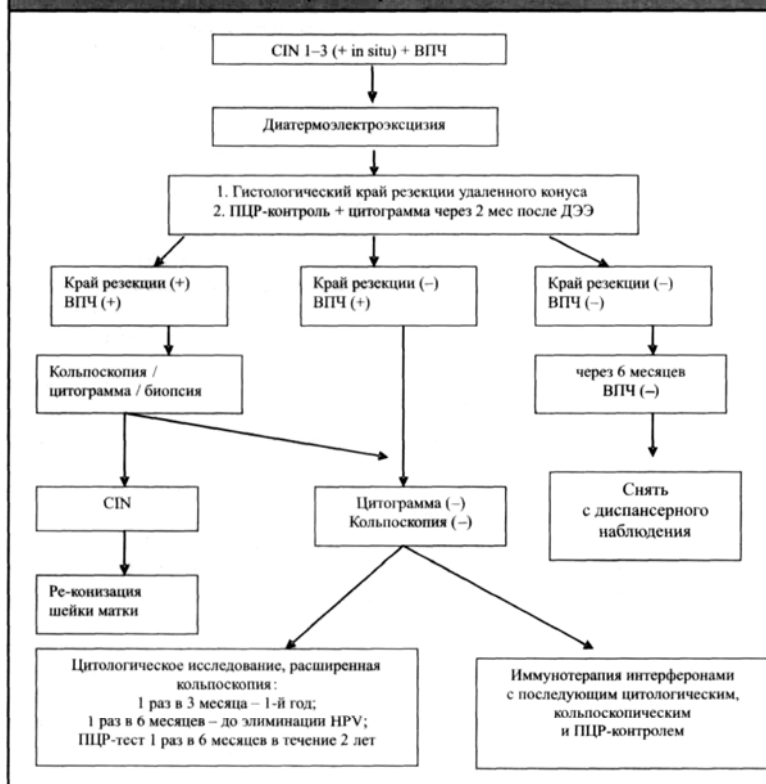
фузное поражение эпителия вирусами. В тех случаях, когда у пациентки отмечается очаговое поражение многослойного плоского эпителия (МПЭ), учитывая то, что HPV-инфекция – это исключительно внутриэпителиальная инфекция, очаг вирусного поражения может быть ограничен только зоной цервикальной интраэпителиальной неоплазии или рака, в неизменённом эпителии вирусы отсутствуют. В этом случае удаление очагов неоплазии или рака приводит к полному устранению HPV-инфекции из эпителия шейки матки. Именно в этих случаях радикальное иссечение (в пределах здоровых тканей) – залог полного выздоровления женщины. Однако при диффузном распространении вирусов при иссечении патологического очага вирус остаётся в эпителии, и создаются условия для рецидива заболевания (рис. 1).

Второй причиной, которую мы рассматриваем как возможную для продолжающейся персистенции HPV, является уровень вирусной нагрузки. В группе пациенток с персистирующей HPV-инфекцией после электроконизации шейки матки средний уровень нагрузки до проведённой операции составил $6,68 \pm 0,59$ Ig геномных эквивалентов на 100 000 клеток. У пациенток с полной элиминацией HPV-инфекции после ДЭЭ уровень вирусной нагрузки до операции был $5,12 \pm 1,57$ Ig геномных эквивалентов на 100 000 клеток. Различия в значениях вирусной нагрузки между группами с персистенцией и элиминацией HPV после ДЭЭ оказались достоверными ($p < 0,02$).

Также интерес представляет резкое снижение уровня вирусной нагрузки HPV в эпителии шейки матки после проведения электроэксцизии патологических очагов с $6,68 \pm 0,59$ до $3,92 \pm 1,28$ Ig геномных эквивалентов на 100 000 клеток, что также подтверждает максимальную концентрацию вирусов в очаге трансформации. Таким образом, после удаления патологического участка концентрация вирусов остаётся в пределах от 3 до 5 Ig геномных эквивалентов на 100 000 клеток. Необходимо отметить, что вирусная нагрузка в доклинической концентрации (менее 3 Ig геномных эквивалентов на 100 000 клеток) в случае постхирургического мониторинга заставляет брать под контроль пациенток, перенесших CIN, так как имеется риск прогрессии заболевания в отличие от случаев впервые выявленного бессимптомного вирусносительства.

При оценке роли вирусного генотипа в персистенции HPV-инфекции в многослойном плоском эпителии шейки матки

Рисунок 2 Алгоритм мониторинга элиминации ВПЧ после хирургического лечения CIN 1–3 (+in situ)



после проведённой операции было выявлено, что HPV-16 типа продолжал персистировать в $65,45 \pm 0,79\%$ случаев, в то время как в $34,54 \pm 1,09\%$ произошла его элиминация в течение 6 месяцев после лечения ($p < 0,05$). Также получены достоверные различия для HPV 33 типа: в $63,15 \pm 1,39\%$ случаев отмечалась длительная персистенция против $36,84 \pm 1,82\%$ случаев полной элиминации HPV после хирургического лечения. Для других вирусных генотипов не получено достоверных данных об их роли в длительности персистенции в эпителии шейки матки. Возможно, эти результаты связаны с более редкой частотой встречаемости этих генотипов HPV.

Дальнейшая тактика ведения пациенток с положительным краем резекции и пациенток с персистирующей HPV-инфекцией зависела от ряда факторов. Решение о проведении реконизации было обусловлено не только гистологическим заключением о позитивном крае резекции, но и верификацией очагов дисплазии морфологическими методами при дальнейшем мониторинге пациенток. В 50% случаев в нашем исследовании при наблюдении более 2 лет рецидивы

заболевания выявлены не были, несмотря на позитивный край резекции, что можно объяснить широкой зоной глубокой коагуляции вокруг края резекции, которая позволяет повредить микроскопические остаточные участки CIN. В случае остаточных очагов патологического процесса в глубине цервикального канала при завершённой репродуктивной функции пациентам выполнялась гистерэктомия с целью снизить риск прогрессии CIN в инвазивный рак.

Тактика ведения женщин с персистирующей HPV-инфекцией после радикального иссечения очагов CIN может быть основана на двух позициях:

1. Наблюдение с использованием расширенной кольпоскопии и цитологического исследования раз в три месяца в течение первого года наблюдения, раз в шесть месяцев при дальнейшем мониторинге. В течение первых двух лет диспансеризации 1 раз в 6 месяцев целесообразно использовать ПЦР-тест для оценки элиминации HPV, так как самопроизвольная элиминация возможна при низкой вирусной нагрузке и происходит, как правило, в течение 6–12 месяцев после ДЭЭ;

2. Использование иммунотерапии интерферонами- α с целью элиминации HPV с последующим двукратным ПЦР-контролем в течение 6 месяцев после окончания лечения.

Электрокоагуляция шейки матки – эффективный метод лечения цервикальных интраэпителиальных неоплазий и микроинвазивного рака шейки матки, но почти в половине случаев он не позволяет добиться элиминации вирусной инфекции. У женщин с персистирующей HPV-инфекцией после хирургического лечения остаётся высокий риск развития рецидива заболевания. Использование молекулярно-генетических методов диагностики позволило разработать алгоритм постлечебного мониторинга за пациентками с CIN 1-3 (рис. 2). Используя метод количественной ПЦР в режиме реального времени можно оценить риск персистенции папилломавирусов до операции, определив уровень вирусной нагрузки. Полученные результаты указывают на целесообразность усовершенствования подходов к постхирургическому наблюдению за пациентами с CIN и доказывают важность молекулярно-генетических методов диагностики в дополнение к клиническим методам.

Радикально прооперированных пациенток, у которых произошла полная элиминация HPV после эксцизии шейки

матки, при получении двух отрицательных HPV-тестов в течение 6 месяцев после операции можно считать излеченными, снять с диспансерного учета и наблюдать как здоровых женщин. Это позволит экономить средства, которые затрачиваются на контрольные осмотры и цитологические исследования каждые 3 месяца в течение 1-го года и каждые полгода в течение 2-го года наблюдения. Выявление HPV-инфекции в эпителии шейки матки после радикального иссечения патологического очага приводит к необходимости пролонгировать сроки наблюдения с целью своевременной диагностики рецидива заболевания и предупреждения развития цервикального рака.

Выводы

1. У 73 (49,32±0,58%) из 148 обследованных при радикальном иссечении патологического очага шейки матки вирус папилломы человека продолжал персистировать, что может привести к развитию рецидива заболевания.

2. В 19,17±1,05% случаев у радикально прооперированных пациенток с персистирующей HPV-инфекцией в период от 1 до 3 лет развился рецидив заболевания.

3. Персистенция HPV-инфекции после ДЭЭ достоверно выше в группе пациенток с уровнем вирусной нагрузки до операции выше 6 lg геномных эквивалентов на 100 000 клеток ($p<0,02$).

4. Получены достоверные разли-

чия в частоте персистенции HPV-16 и HPV-33 типов после электроэксцизии патологического очага шейки матки по сравнению с элиминацией этих же генотипов – 65,45±0,79% против 34,54±1,09% и 63,15±1,39% против 36,84±1,82% случаев соответственно ($p<0,05$). Для других генотипов HPV не получено достоверных различий в частоте персистенции и элиминации.

5. ПЦР тестирование позволяет объективно определить группу риска по прогрессии заболевания и возникновению рецидива CIN среди женщин, которым проведено радикальное хирургическое лечение, и своевременно начать терапию, направленную на элиминацию вируса папилломы человека для предотвращения неблагоприятных исходов лечения предрака и раннего рака шейки матки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Злокачественные новообразования в Беларуси 1999–2008 / С.М. Поляков, Л.Ф. Левин, Н.Г. Шебеко, О.Ф. Щербина; под ред. И.В. Малаховой, И.В. Залуцкого. – Минск: РНГЦ МТ, 2009. – 205 с.
2. Houfflin Debarge V., Collinet P., Vinatier D., Ego A. // *Gynecol. Oncol.* – 2003. – Vol. 90, I. 3. – P. 587–592.
3. Narducci F., Occelli B., Boman F., Vinatier D. et al. // *Gynecol. Oncol.* – 2000. – Vol. 76, I. 3. – P. 311–314.
4. Nam K., Chung S., Rim J. et al. // *J. Gynecol. Oncol.* – 2009. – Vol. 20, I. 2. – P. 91–95.
5. Wieland U., Pfister H. Papillomaviruses in human pathology: Epidemiology, pathogenesis and oncogenetic role. In: Gross, Barasso Eds. *Human Papilloma Virus. – Clinical atlas.* – Ullstein Mosby, 1997. – P. 1–18.

Поступила 08.06.2011 г.