

к.б.н. Улитин И.Б., Бовыкина Г.А., Улитина Е.П.

**НЕОБХОДИМОСТЬ ПРОВЕДЕНИЯ ТЕСТИРОВАНИЯ ВИРУСА
ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА У ПАЦИЕНТОК С
МОРФОЛОГИЧЕСКИМИ ПРИЗНАКАМИ ВПЧ ПРИ
ЦИТОЛОГИЧЕСКОМ СКРИНИНГЕ**

ГБОУ ВПО НижГМА Минздрава России

603005, г. Нижний Новгород, пл. Минина и Пожарского. д.10/1

ГБУЗ НО НОКБ им. Н.А.Семашко,

Нижний Новгород, ул.Родионова 190, 603126

Введение

Актуальность вопросов современной и своевременной диагностики, полного лечения и профилактики рака шейки матки обусловлены статистикой данного вида заболевания. Доказана прямая корреляция вируса папилломы человека с раком шейки матки. Ассоциация с ВПЧ подтверждена в 99,7% случаев РШМ, что приводит к разработке новых современных подходов к диагностике, лечению и мониторингу этого заболевания. Существенная роль в диагностике морфологических проявлений ВПЧ принадлежит методу жидкостной цитологии, в частности, на основе методики BD PrepStain, как метода повышения чувствительности и специфичности скрининга рака шейки матки.

1. ВПЧ инфекция - эволюция проблемы.

Одно из основных мест среди злокачественных опухолей репродуктивной системы занимает рак шейки матки (РШМ). Он занимает второе место (после рака молочной железы) по распространенности, и составляет 14% от всех злокачественных опухолей у женщин. На территории Российской Федерации отмечается высокий уровень запущенных стадий этого заболевания – более чем 40% всех выявленных случаев, ежегодно в России от рака шейки матки умирает более 6 000 женщин. В возрастной группе 16-40 лет рак шейки матки является

второй по значимости причиной смертности больных злокачественными новообразованиями.

Согласно статистике ВОЗ, сегодня раком шейки матки страдают около миллиона женщин по всему миру, и ученые надеются на то, что новые методы профилактики болезни помогут снизить количество заболевших женщин.

На сегодняшний день установлено, что этиологическим агентом рака шейки матки является вирус папилломы человека (ВПЧ). Показано, что ДНК ВПЧ выявляется более чем в 99.5% всех биоптатов рака шейки матки

2. Открытие вирусной природы рака шейки матки.

Вопреки существовавшим в 1970-х представлениям о природе раковых заболеваний, Гарольд цур Хаузен (*Harald zur Hausen*) постулировал, что развитие рака шейки матки (по крайней мере, в некоторых случаях) связано с папилломавирусом человека (ВПЧ). Он предположил, что если опухолевые клетки содержат онкогенный вирус, то их геном должен включать и вирусную ДНК. Следовательно, активность вирусных генов, иницирующих злокачественный рост, может быть обнаружена при помощи специальных ДНК-тестов, ориентированных на вирусный генетический материал. Цур Хаузен более десяти лет продвигал свою идею и занимался поиском различных типов ВПЧ-инфекции, что затруднялось, в частности, тем обстоятельством, что вирусная ДНК лишь частично внедрялась в хромосомы хозяина (человека). В 1983 году ему удалось обнаружить ДНК папилломавируса в биопсии рака шейки матки, и это событие можно считать открытием онкогенного вируса ВПЧ-16. Годом позже он клонировал ДНК ВПЧ-16 и ВПЧ-18 в пациентах, больных раком шейки матки. Эти типы вируса обнаруживаются примерно в 70% случаях рака шейки матки.

Ущерб, наносимый папилломавирусом здоровью людей во всём мире, весьма значителен. Более 5% всех зарегистрированных случаев рака вызывается именно вирусами этой группы. Вирусы папилломы — одна из наиболее часто встречающихся инфекций, передающихся половым путём.

Из более чем 100 известных разновидностей ВПЧ, около сорока инфицируют мочеполовую систему, и 15 из них создают повышенный риск заболевания раком шейки матки (но ВПЧ связывают и с другими разновидностями онкогенных процессов).

Исследования Гарольда цур Хаузена в области ВПЧ-инфекции легли в основу понимания механизмов канцерогенеза, индуцированного вирусом папилломы.

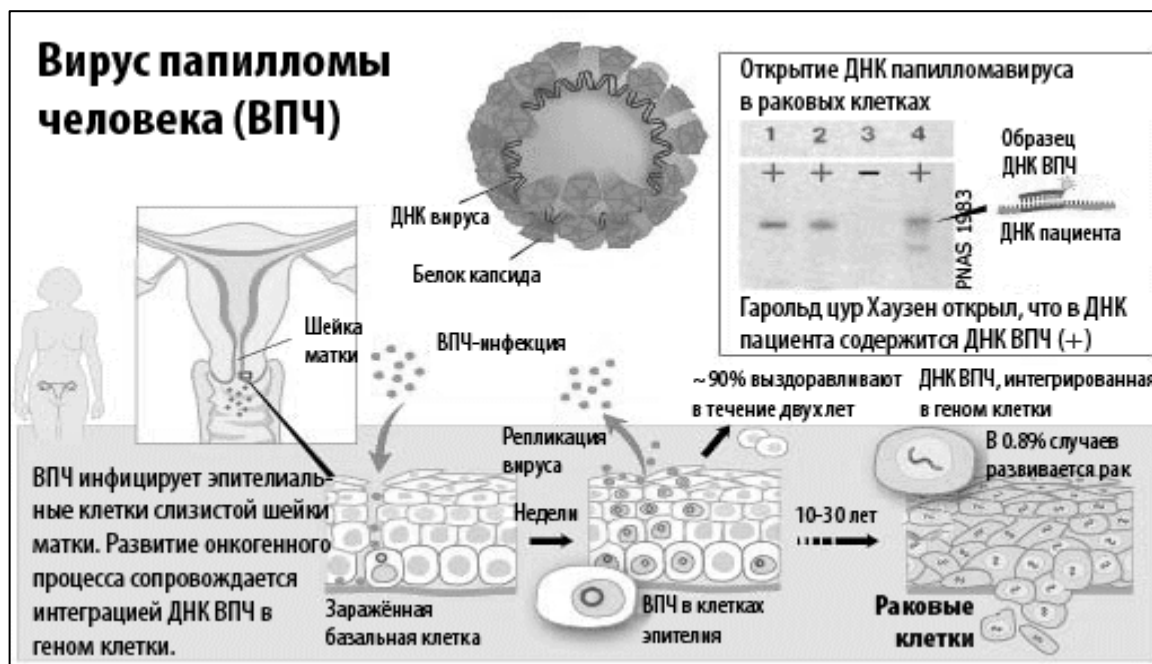


Рис.1 Схема развития вируса папилломы человека (ВПЧ)

Ежегодно выявляемость и заболеваемость ПВИ во всем мире увеличивается.

По данным ВОЗ ежегодно в мире диагностируется около 2,5 – 3 миллионов случаев ПВИ. Более 660 млн. людей на планете инфицированы ВПЧ. Известно около 200 типов ВПЧ. Современная медицина описывает более 70 разновидностей ВПЧ. Среди всех случаев РШМ 70-80% составляет плоскоклеточный рак, а 10-25% - аденокарцинома.

Вирус папилломы человека (ВПЧ) относится к подгруппе А семейства Papoviridae, поражающей человека, крупный рогатый скот и птиц. Мелкий ДНК-содержащий вирус, особенностью которого является пролиферативное влияние на эпителиоциты кожи, слизистых оболочек гениталий и других органов (гортань, бронхи, ротовая полость, глаза). Вирус не имеет внешней

оболочки. Геном вируса представлен двуспиральной, кольцевидно скрученной ДНК.

В процессе репликационного цикла он экспрессирует от 8 до 10 белковых продуктов. Ранние белки контролируют репликацию, транскрипцию и клеточную трансформацию, в частности, за онкогенные свойства вируса ответственны онкобелки E-6 и E-7.

Поздние гены кодируют структурные белки вириона. Гены E-6 и E-7 всегда выявляются в опухолевых клетках, зараженных ВПЧ, в то время как другие фрагменты вирусного генома могут быть утеряны в процессе его длительной персистенции в организме.

ВПЧ инфицирует пролиферирующие эпителиальные клетки базального слоя эпителия и отличается высоким тропизмом именно к этому типу клеток.

Инфицирование многослойного плоского эпителия происходит через микроповреждения (механические, бактериальные и др.), когда глубина их достигает базального слоя, где и обнаруживается эписомальный вирусный геном. При этом репликация ДНК ВПЧ происходит только в клетках базального слоя, эти клетки являются постоянным источником инфицирования эпителиальных клеток, а в клетках других слоев вирусные частицы лишь персистируют.

В зараженных клетках вирусный геном может существовать в двух формах: эписомальной (вне хромосом) и интегрированной в клеточный геном.

Репликация ДНК вируса и синтез, связанных с ней капсидных белков, изменяют клеточный цикл и приводят к клеточной атипии, что занимает от 1 года до 3 лет.

Пока вирус находится в эписомальном состоянии, наблюдаются доброкачественные процессы. После инфицирования ВПЧ в эпителиальных клетках нарушается нормальный процесс дифференцировки, особенно в клетках шиповатого слоя, в котором наблюдается клональная экспансия инфицированных ВПЧ-клеток базального слоя, прошедших только первичную стадию дифференцировки. Эта клональная экспансия связана с их

трансформацией и последующей малигнизацией. В стадии развитой инфекции наблюдается синтез вирусной ДНК в клетках шиповатого слоя при переходе в зернистый слой. Причем экспрессия поздних генов L1 и L2 на этом этапе отсутствует. Она наступает только на конечной стадии дифференцировки, где и наблюдается активная сборка зрелых вирусных частиц, их выделение из клеток эти участки инфекционно опасны в отношении контактного заражения.

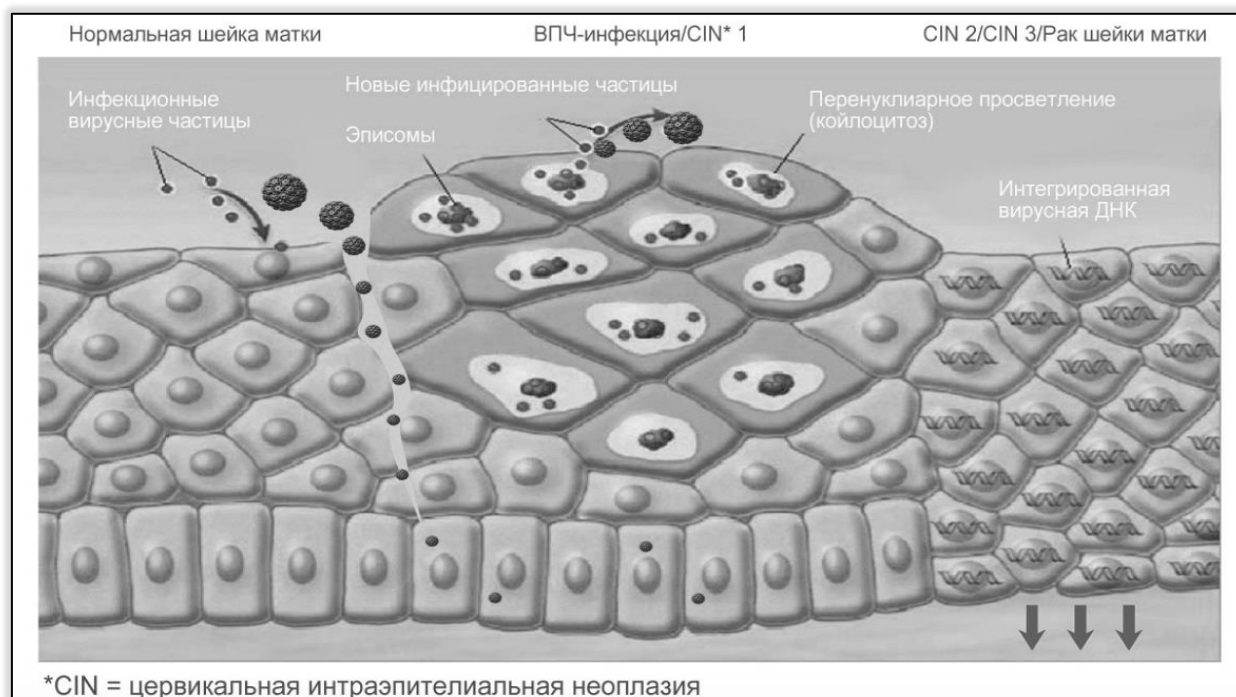


Рис.2 Goodman A, Wilbur DC. *N Engl J Med.* 2003;349:1555–1564. Copyright © 2003

Однако многие авторы приходят к выводу, что инфицирование эпителиальных клеток ВПЧ – необходимое, но недостаточное событие для ракового перерождения. Для формирования необратимой неоплазии необходимы:

- активная экспрессия генов E-6 и E-7 вируса
- индукция метаболических механизмов конверсии эстрадиола в 16,2-гидроксистерон(16,2-ОН)
- индукция множественных повреждений хромосомной ДНК в инфицированной клетке, которая завершает процесс перерождения.

Крайне неблагоприятна сочетанная персистенция ВПЧ с вирусом простого герпеса–2, цитомегаловирусом, вирусом Эпштейна-Барра, вирусом иммунодефицита человека, хламидиями и микоплазмами.

Развитие рака шейки матки не является молниеносным процессом и занимает 10-15 лет.

Вирусы "высокого риска" ассоциируются с высоким относительным риском возникновения рака шейки матки. В эту группу входят следующие типы: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 82. Наиболее часто при умеренных (средних) и тяжелых дисплазиях шейки матки, а также при раке шейки матки, встречаются типы ВПЧ 16 и 18. ВПЧ 18 находят при раковых изменениях цилиндрического эпителия внутреннего канала шейки матки. В 70% случаев рака шейки матки находят ДНК этих двух типов вируса (55% - ВПЧ 16 и 15% - ВПЧ 18). Другие онкогенные типы находят в 5-18% случаев рака шейки матки.

Вирусы "низкого риска" - это группа вирусов, которые редко ассоциируются с предраковыми и раковыми состояниями шейки матки: типы 6, 11, 40, 42, 43, 44, 53, 54, 61, 72, 73, 81. ВПЧ типы 6 и 11 наиболее часто ассоциируются с генитальными бородавками (*condyloma accuminata*) – 90% случаев.

ВОЗ разработала руководящие принципы в отношении того, как предотвращать рак шейки матки и бороться с ним, в том числе с помощью вакцинации и скрининга. Организация работает со странами и партнерами над разработкой и осуществлением комплексных программ. Международная организация по исследованиям в области рака (IARC) определила, что ВПЧ – вакциноуправляемая инфекция, а предотвращение заражения и персистенции ВПЧ однозначно можно считать профилактикой РШМ.

В настоящее время в мире и в России зарегистрировано две вакцины против ВПЧ – бивалентная вакцина Церварикс R (регистрационный номер ЛСР-006423/08 от 11.08.2008 г., последние изменения от 15.02.2013 г., производства Глаксо СмитКляйн Байолоджикалз с.а., Бельгия) и квадριвалентная вакцина Гардасил R (регистрационный номер ЛС-002293 от 24.08.2011 г., производства Мерк Шарп и Доум Б.В., Нидерланды).

Профилактическая вакцинация против РШМ рекомендована ведущими профессиональными ассоциациями/организациями мира:

- Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ),
- Европейским центром контроля заболеваний (ECDC),
- Международной федерацией гинекологии и акушерства (FIGO),
- Американским онкологическим обществом (ACS),
- Обществом онкогинекологов (SGO),
- Европейским обществом специалистов в области онкогинекологии (ESGO),
- Национальным объединенным заключением SOGC–GOC–SCC,
- Американской коллегией акушеров-гинекологов (ACOG) и др.

Вакцины против ВПЧ:

- неинфекционны;
- не способны вызывать инфицирование ВПЧ;
- не содержат тиомерсал, который входит в состав некоторых других вакцин в качестве консерванта;
- успешно стимулируют продукцию нейтрализующих антител.

Принципы вакцинации базируются на двух главных характеристиках адаптивного иммунитета: специфичности и клеточной памяти. Иммунитет против ВПЧ является типоспецифическим, или приобретенным в процессе контакта с инфекционным агентом. Введение вакцины приводит к стимуляции выработки антител. Все антитела сходны по структуре, но имеют отличия в специфичности связывания антигена.

Антитела синтезируются В-лимфоцитами, которые имеют определенную ограниченную продолжительность жизни, поэтому стимуляция клеточной памяти при вакцинации – чрезвычайно важный компонент. Благодаря клеточной памяти при будущем контакте с возбудителем-антигеном запускается процесс новой выработки нейтрализующих антител, что важно для создания долговременного иммунитета. Контакт с антигеном приводит к созданию комплекса антиген–антитело, который легко распознается

цитотоксическими клетками организма, пораженная клетка разрушается, лизируется и выводится из организма вместе с генным материалом ВПЧ. Дополнительно к антигену в вакцину вводятся специальные вещества-адьюванты, которые содержатся практически во всех вакцинах и способствуют усилению иммунного ответа.

В настоящее время известно, что профилактическая вакцина зарегистрирована более чем в 117 странах мира. Национальные программы ВПЧ-вакцинации рекомендованы в 44 странах, причем в 39 странах за счет государственного финансирования.

Обе вакцины в установленном порядке зарегистрированы Министерством здравоохранения РФ, одобрены и рекомендованы для программ массовой вакцинации ВОЗ, накоплен достаточный опыт их применения. В России вакцинация против РШМ в 2007 г. была одобрена Правительством страны.

Именно уникальные возможности цитологического скрининга РШМ сохраняют здоровье и жизнь женщин.

Систему скрининга могут эффективно дополнить меры индивидуальной профилактики с использованием более частого обследования в группах повышенного риска с привлечением молекулярно-биологических методов определения ДНК ВПЧ.

Развитие молекулярной биологии и установление роли ВПЧ в развитии рака шейки матки привели к тому, что ДНК-диагностика ВПЧ-инфекции рассматривается в настоящее время как основа скрининга и профилактики этого тяжелого заболевания, и во многих странах накоплен положительный опыт применения различных методов определения ДНК ВПЧ в скрининговых исследованиях.

Большинство случаев выявления ВПЧ и характерные изменения при цитологическом исследовании нередко разрешаются самостоятельно в течении 1 года (преходящая или латентная инфекция), не оставляя повреждений или наличия ВПЧ.

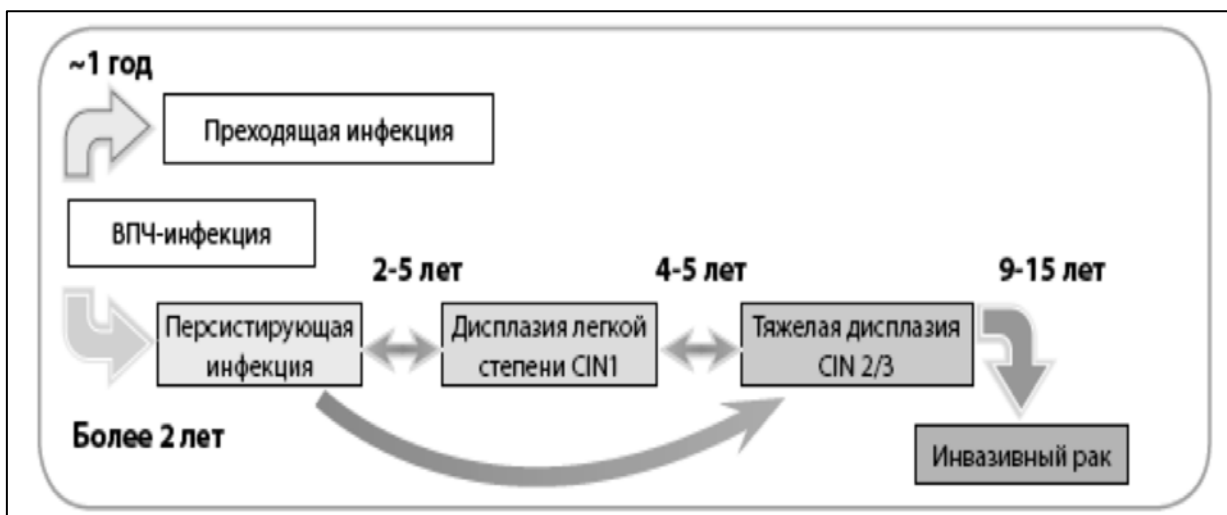


Рис. 3 Pagliusi SR et al. Efficacy and other milestones for human papillomavirus. 2004

При наличии ВПЧ в организме более 2 лет, развивается персистирующая инфекция, которая приводит к развитию цервикальной интраэпителиальной неоплазии (ЦИН).

К предраковым заболеваниям шейки матки относят дисплазии эпителия (ЦИН), предшествующие инвазивному раку шейки матки. Цервикальные интраэпителиальные неоплазии характеризуются нарушением дифференцировки клеток эпителия в результате пролиферации камбиальных элементов с развитием их атипии, утратой полярности и нарушением гистоструктуры.

По данным ВОЗ «дисплазия – это изменение, при котором часть толщи эпителия замещена клетками с различной степенью атипии, утратой стратификации и полярности без изменения стромы».

Распространенность в мире ЦИН I степени по данным ВОЗ составляет 30 млн. случаев, а ЦИН II-III степени – 10 млн. Наиболее часто диагностируют ЦИН II степени, частота перехода ЦИН в карциному in situ (CIS) варьирует от 40 до 64%.

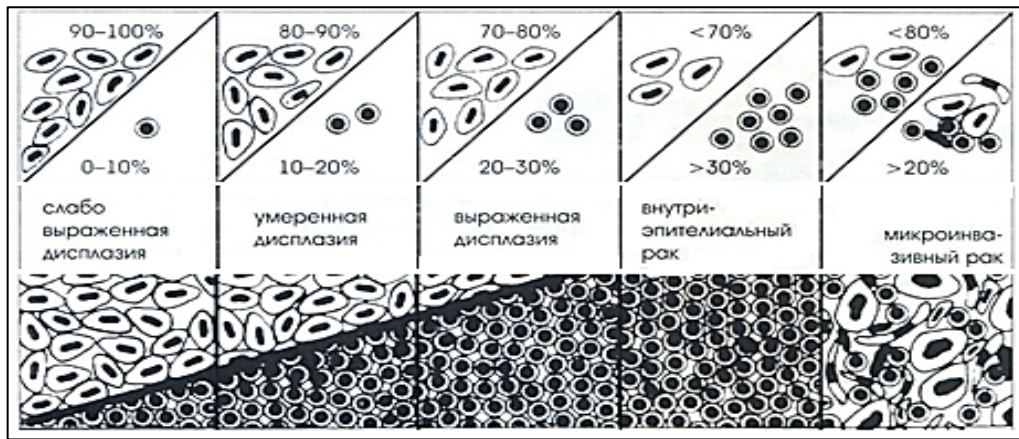


Рис. 4. Процентное соотношение диагностируемых патологий шейки матки

Диспластические изменения и преинвазивная карцинома шейки матки, обозначенные в зарубежной литературе как цервикальная интраэпителиальная неоплазия (ЦИН), объединены под названием плоскоклеточные интраэпителиальные поражения (squamous intraepithelial neoplasia SIL). Клеточные изменения: низкой степени – LSIL; высокой степени – HSIL.

Низкая степень плоскоклеточных интраэпителиальных поражений (LSIL) является проявлением продуктивной вирусной инфекции и включает в себя койлоцитоз, т.е. морфологические проявления ВПЧ в мазках с шейки матки (клетки-койлоциты) и ЦИН I, высокая степень (HSIL) – истинный предрак, включает ЦИН II, ЦИН III и carcinoma in situ (CIS).

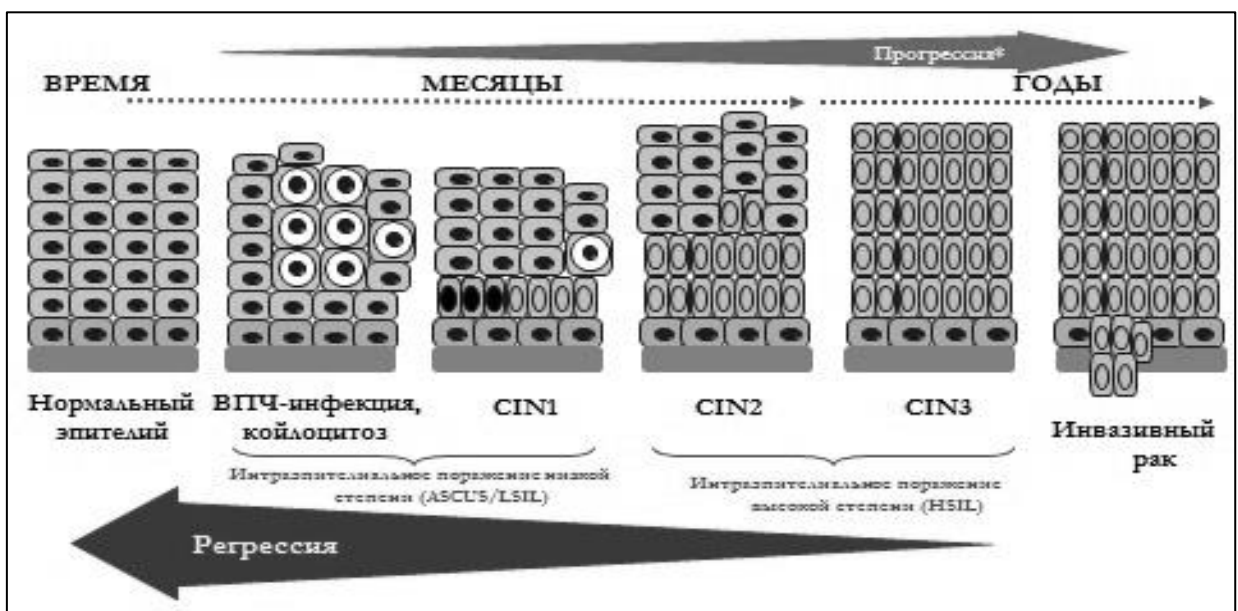


Рис. 5. Прогрессия (f(t)) цервикальных интраэпителиальных поражений шейки матки

В настоящее время одним из основных и общепризнанных методов диагностики заболеваний шейки матки является цитологический метод исследования. Его основной целью является выявление морфологических особенностей клеток, их взаиморасположение в тканевых комплексах, характеризующих конкретный процесс.

Различают скрининговое (при массовых профилактических обследованиях) и прицельное (во время проведения кольпоскопии) цитологическое исследование мазков.

Цитологический метод дает возможность оценить структуру и клеточный уровень повреждения тканей, попавших в мазок.

Достоинствами цитологического метода являются: простота, безболезненность и безопасность получения материала, возможность исследования патологического очага в динамике, возможность диагностики злокачественного процесса в самой начальной стадии, оценка состояния клеток в различном жизненном состоянии, экономичность

Повышение точности жидкостной цитологической диагностики методом BD Sure Path достигается за счет преодоления всех погрешностей, связанных с приготовлением мазка, и проведения микроскопии одного пласта клеток. По литературным данным частота ложнонегативных результатов при использовании жидкостной цитологии составляет 7%, в то время как при использовании традиционной методики – 25%.

Жидкостная цитология признана медиками наиболее информативным методом, рекомендованным ВОЗ в качестве «золотого стандарта» для исследования мазков из шейки матки.

В последнее время в России она приобретает все большее распространение в связи с диагностикой рака шейки матки. Этот метод настолько хорошо зарекомендовал себя в скрининге дисплазии и злокачественных трансформаций в общемировой практике, что согласно приказу Министерства Здравоохранения РФ № 572н от 01.11.12 был включен в перечень обязательного оборудования

для оснащения клинико-диагностических лабораторий центров охраны здоровья семьи, родильных домов и женских консультаций.

До настоящего времени активно обсуждается целесообразность включения типирования вирусов папилломы человека (ВПЧ) в скрининговые программы. Дискуссии в отношении методов скрининга населения для диагностики РШМ включают 3 основные направления: Пап – тест (большой опыт и много исследований), Пап – тест вместе с ВПЧ тестом (утверждено FDA для женщин старше 30 лет в США, но не принято в других странах, во Франции) и ВПЧ тест вместе с кольпоскопией (отдельные исследования в некоторых странах).

Большинство исследователей считают рациональным проведение тестов на ДНК ВПЧ у пациенток с изменениями плоского эпителия низкой степени или неклассифицируемыми атипичными клетками, выявленными при цитологическом исследовании.

Рекомендации ВОЗ по применению ВПЧ-теста:

- как первичного скринингового метода в дополнение к цитологии для женщин старше 30 лет
- для разрешения сомнительных результатов цитологического исследования (ASCUS, ASC-H)
- для мониторинга после лечения ЦИН II-III

ВПЧ - тест, безусловно, должен быть интегрирован в массовый цитологический скрининг!

1. Мониторинг ВПЧ-инфицированных женщин позволит выделить группы с прогнозом развития ЦИН

2. Совместное ВПЧ-тестирование и цитологическое исследование повышает чувствительность диагностики РШМ до 93,6% (Anttila A., Kotaniemi-Talonen L., Leinonen M., et al., 2010)

3. Комбинация жидкостной цитологии с ВПЧ-тестом повышает чувствительность с 53,3% до 96,7% (Castle P.E., Stoler M.H., Wright T.C., et al., 2011)

3. Результаты исследований

Как видно из литературных данных, развитие дисплазий при носительстве ВПЧ развивается в течение длительного времени. Поэтому необходим алгоритм ведения пациенток с выявленными морфологическими признаками ВПЧ при скрининговом обследовании ПАП-теста, когда лечение и вакцинация будут эффективны в предотвращении развития РШМ.

С этой целью среди пациенток, общее число которых составило 2639 чел. за 2015 год, прошедших скрининговое обследование с применением ПАП-теста жидкостной цитологии методом BD PrepStain (на монослойных препаратах с автоматизированной окраской по Папаниколау), нами были выделены группы с морфологическими признаками ВПЧ и морфологическими признаками дисплазий, ассоциированных с ВПЧ.

При анализе цитологических заключений получены следующие результаты, представленные на гистограмме.

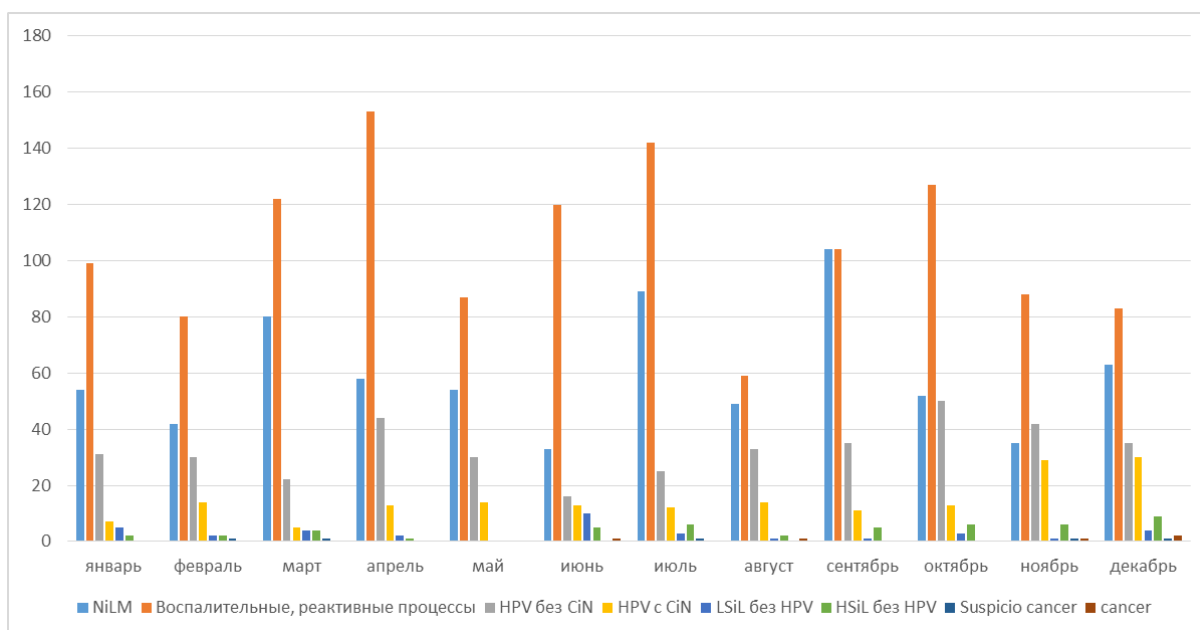


Рис.7. Распределение обследованных пациенток по группам патологий.

Нами обнаружено среди 1832 больных женщин с воспалительными заболеваниями гениталий (в т.ч. ВПЧ ассоциированные) 393чел. – имелся HPV вирус без перехода в интраэпителиальную неоплазию; у 175 женщин – наблюдались морфологические признаки дисплазии, ассоциированные с ВПЧ инфекцией из которых с ВПЧ и LSIL – 145 чел. и ВПЧ и HSiL – 30 чел..

У 85 пациенток носительство ВПЧ было установлено до проведения ПАП-теста.

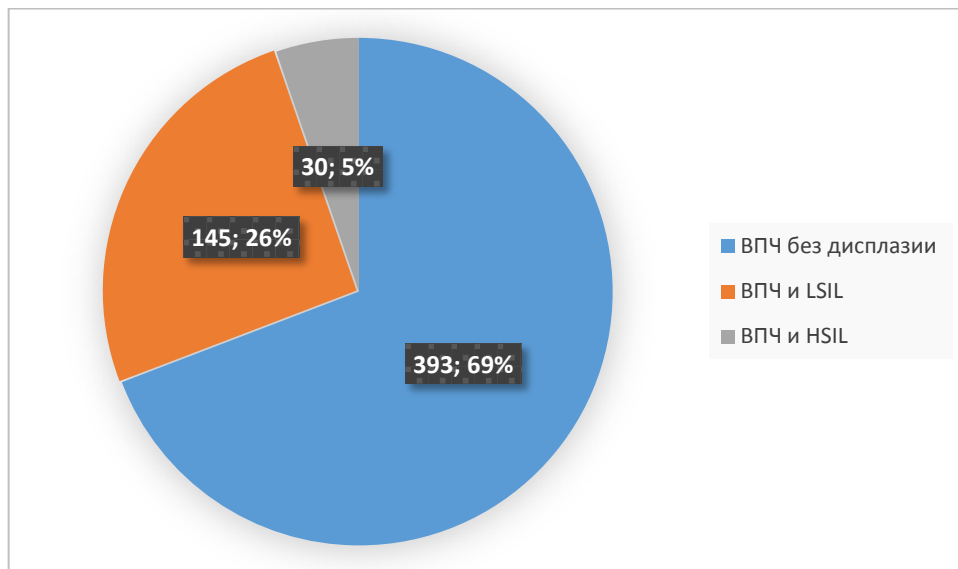


Рис. 8. Соотношение критериев персистенции вируса (без дисплазии, LSIL, HSIL)

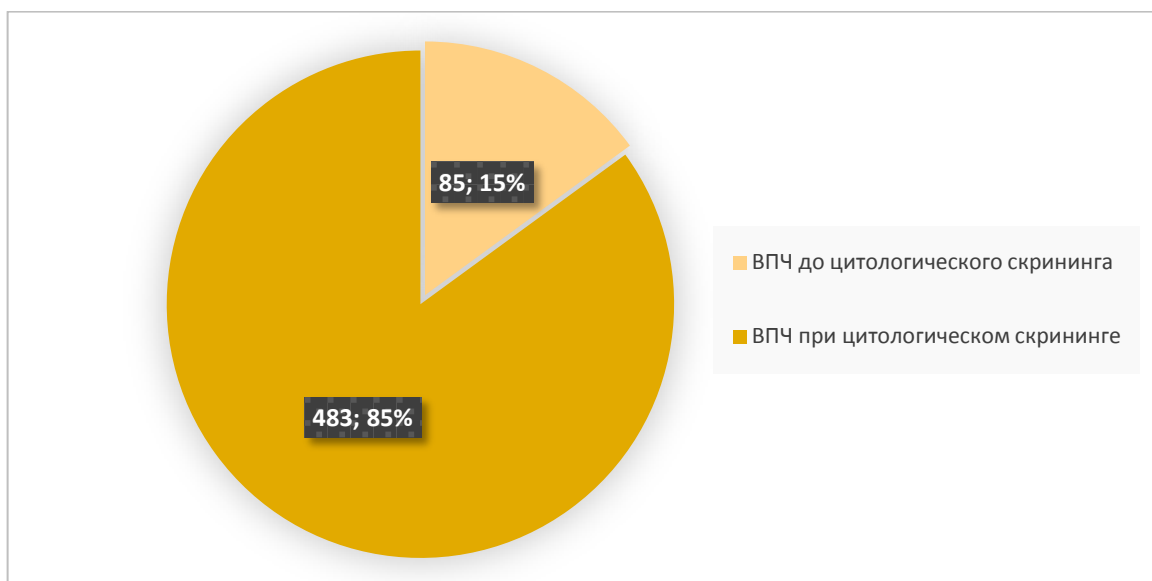


Рис. 9. Статистика выявляемости ВПЧ на разных этапах диагностики

Кроме вышеуказанных групп нами были выявлены пациентки с высокой степенью онкогенных признаков (Cr) – 10 чел. (из них 5 – Suspicio cancer и 5 – cancer).

Из всех обследованных пациентов у 713 чел. была отмечена нормальная цитологическая картина (NiLM).

Выводы.

Согласно последним данным около 70% рабочего времени современный российский гинеколог тратит на преодоление таких инфекционных проблем как малосимптомный невоспалительный бактериальный вагиноз, кандидозный вульвовагинит, трихомоноз, урогенитальный герпес и др. ИПП в том числе и на диагностику такой невероятно актуальной вирусной инфекции как папилломовирусная.

Данная проблема временных затрат ведения женщин с заболеваниями шейки матки, ассоциированными с ВПЧ, связана с несвоевременной диагностикой и отсутствием четко прописанных схем обследования и лечения.

На основе описанных выше полученных данных предлагаем схему алгоритма обследования женщин с применением цитологического метода жидкостной цитологии (ПАП-теста) и определения ВПЧ, что позволит на наш взгляд достичь еще более существенных показателей в снижении уровня заболеваемости раком шейки матки.

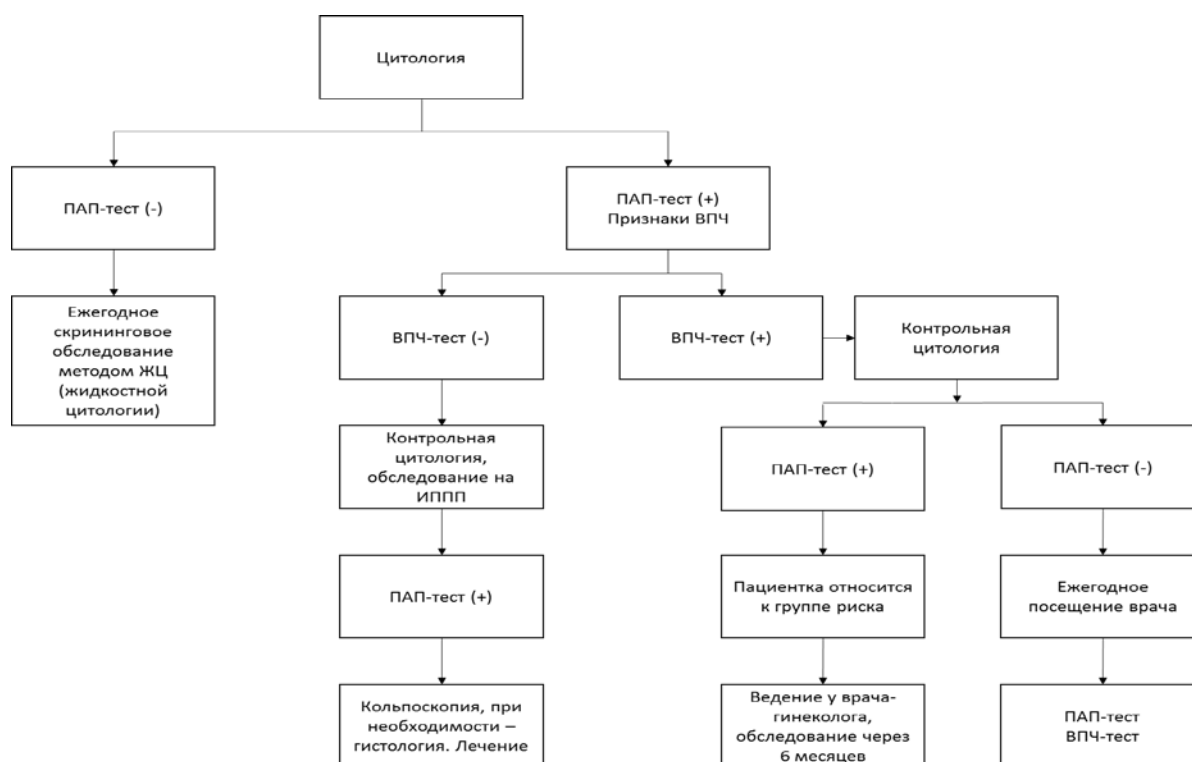


Рис. 10. Алгоритм обследования с применением цитологического метода жидкостной цитологии (ПАП-теста) и определения ВПЧ

Литература:

1. Коломиец Л.А., Уразова Л.Н., Севастьянова Н.В., Чуруксаева О.Н. Клинико-морфологические аспекты цервикальной папилломавирусной инфекции // Вопр. онкол. -2002. - Т.48, 1.- С. 43-46.
2. Новик В.И. Эпидемиология рака шейки матки, факторы риска, скрининг. – С-Петербург: НИИ онкологии им. проф. Н.Н. Петрова Минздрава РФ. 2011.
3. Урманчеева А.Ф., Мерабишвили В.М., и др. Эпидемиология и диагностика рака шейки матки // Акуш. и гин. - 2001. - Т. XLX. - Вып. 1. - С. 80-86.
4. Воробьев С.Л., Иванова Т.М., Костючек И.Н. и др. Цитологический скрининг рака шейки матки (тезисы выступлений) // Материалы X съезда Ассоциации клинических цитологов России. – 2013. – 24 с.
5. Cervical cancer screening on a national level // Cancer prevention and early detection facts and figures. - 2002. -ACS. - P.25. 6. Ferlay J., Bray F., Pisani P., Parkin D.M. GLOBOCAN 2000: Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide, Version 1.0 /IARC Cancer Base No.5. - Lyon: IARCPress, 2001. (<http://www-dep.iarc.fr/globocan.htm>).
6. Parkin D.M., Pisani P., Ferlay J. Global Cancer Statistics // Ca Cancer J. Clin. - 1999. - Vol. 49, No. 1. - P. 33-64.
7. Дмитриев Г.А., Биткина О.А. Папилломавирусная инфекция. М.: Медицинская книга, 2006. 76с
8. Ершов В.А., Нарвская О.В. Фоновые процессы и неоплазия эпителия шейки матки. СПб.: Человек, 2007. 79 с.
9. И.П.Шабалова, К.Т.Касоян Цитологическая диагностика заболеваний шейки и тела матки. М. 2010.
10. Цервикальные интраэпителиальные неоплазии. Учебное пособие ГБУЗ ФУВ МОНИКИ под редакцией проф. Агафонова Б.В. , 2015 г.

СОДЕРЖАНИЕ

Введение

1. ВПЧ инфекция - эволюция проблемы
2. Открытие вирусной природы рака шейки матки
3. Результаты исследований

Выводы