

ВОСПАЛИТЕЛЬНЫЕ БЕЛКИ В КАЧЕСТВЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ ПРИ ДИАГНОСТИКЕ ОНКОПАТОЛОГИИ ШЕЙКИ МАТКИ

DOI: 10.17691/stm2021.13.4.07

УДК 618.146-006-073:577.112

Поступила 22.03.2021 г.



Е.В. Каюкова, к.м.н., доцент, зав. кафедрой онкологии¹;

Л.Ф. Шолохов, д.м.н., профессор, зав. лабораторией физиологии и патологии эндокринной системы²;

А.М. Зиганшин, к.м.н., доцент кафедры акушерства и гинекологии³;

В.А. Мудров, к.м.н., доцент кафедры акушерства и гинекологии¹

¹Читинская государственная медицинская академия, ул. Горького, 39а, Чита, 672000;

²Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека, ул. Тимирязева, 16, Иркутск, 664003;

³Башкирский государственный медицинский университет, ул. Ленина, 3, Уфа, 450008

Несовершенство цитологической диагностики рака шейки матки обуславливает поиск альтернативных методов выявления этой патологии.

Цель исследования — оценка эффективности использования воспалительных белков в качестве молекулярных маркеров при диагностике онкопатологии шейки матки.

Материалы и методы. Проведено проспективное контролируемое исследование, в котором участвовали три группы женщин: 1-я группа (n=13) — с предопухоловой патологией (цервикальной интраэпителиальной неоплазией III степени); 2-я группа (n=49) — больные с раком шейки матки; 3-я, контрольная, группа (n=13) — гинекологически здоровые женщины (средний возраст — 30,0±4,4 года).

Исследовали цервикальный эпителий, забранный по стандартной методике с помощью цитощетки с зоны стыка эпителиев шейки матки. Методом проточной цитометрии в цервикальном эпителии определяли уровни воспалительных белков: SAA, ICAM-1, VCAM-1 и sCD27.

Результаты. Установлено, что молекулярными критериями наличия предопухоловой патологии и рака шейки матки может служить повышение значений SAA в 3,10 [1,31; 3,28] раза (U=41,0; p=0,02), ICAM-1 — в 2,62 [2,79; 3,50] раза (U=137,0; p=0,001), VCAM-1 — в 5,20 [3,84; 12,37] раза (U=138,5; p=0,001) и sCD27 — в 4,32 [2,07; 5,02] раза (U=109,0; p<0,001) в цервикальном эпителии по сравнению с данными контрольной группы. Разработан коэффициент COP (cervical opcoroblem), который позволяет рассчитать вероятность наличия онкологической патологии шейки матки с точностью до 90%. Для упрощения его расчета создано приложение для Android в среде разработки Delphi.

Заключение. Созданная технология позволяет в кратчайшие сроки установить диагноз и оптимизировать лечебно-диагностический процесс путем ускорения сроков обследования и улучшения его точности.

Ключевые слова: рак шейки матки; диагностика рака шейки матки; SAA; ICAM-1; VCAM-1; sCD27.

Как цитировать: Kayukova E.V., Sholokhov L.F., Ziganshin A.M., Mudrov V.A. Inflammatory proteins as molecular markers in the diagnosis of cervical oncopathology. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2021; 13(4): 64–69, <https://doi.org/10.17691/stm2021.13.4.07>

English

Inflammatory Proteins as Molecular Markers in the Diagnosis of Cervical Oncopathology

E.V. Kayukova, MD, PhD, Associate Professor, Head of the Department of Oncology¹;

L.F. Sholokhov, MD, DSc, Professor, Head of the Laboratory of Physiology and Pathology of the Endocrine System²;

A.M. Ziganshin, MD, PhD, Associate Professor, Department of Obstetrics and Gynecology³;

V.A. Mudrov, MD, PhD, Associate Professor, Department of Obstetrics and Gynecology¹

¹Chita State Medical Academy, 39A Gorkogo St., Chita, 672000, Russia;

Для контактов: Зиганшин Айдар Миндиярович, e-mail: Zigaidar@yandex.ru

²Scientific Center for Family Health and Human Reproduction Problems, 16 Timiryazev St., Irkutsk, 664003, Russia;

³Bashkir State Medical University, 3 Lenina St., Ufa, Republic of Bashkortostan, 450008, Russia

Imperfection of cytological diagnostics of cervical cancer has prompted the search for alternative methods of pathology detection.

The aim of the study was to evaluate the effectiveness of inflammatory proteins as molecular markers in the diagnosis of cervical oncopathology.

Materials and Methods. A prospective controlled trial was conducted with three groups of women: group 1 (n=13) — with precancerous pathology (cervical intraepithelial neoplasia of grade III); group 2 (n=49) — patients with cervical cancer; group 3, control (n=13) — gynecologically healthy women (mean age — 30.0±4.4 years).

The material for the study was cervical epithelium, which was taken according to the standard technique using a cytobrush from the junction zone of cervical. The levels of inflammatory proteins (SAA, ICAM-1, VCAM-1, and sCD27) in the cervical epithelium were determined by flow cytometry.

Results. Molecular criteria for the presence of precancerous pathology and cervical cancer have been found to be a 3.10 [1.31; 3.28] fold increase in SAA values (U=41.0, p=0.02), 2.62 [2.79 3.50] fold (U=137.0, p=0.001) in ICAM-1, 5.20 [3.84; 12.37] fold (U=138.5, p=0.001) in VCAM-1, and 4.32 [2.07; 5.02] fold (U=109.0, p<0.001) in sCD27 in cervical epithelium compared with the control group data. The COP (cervical oncoprobem) coefficient was developed to calculate the probability of cervical oncological pathology presence with the accuracy of 90%. An application for Android was created in Delphi development environment to simplify its calculation.

Conclusion. The created technology makes it possible to establish the diagnosis in the shortest possible time and to optimize the treatment and diagnostic process by accelerating the examination period and improving its accuracy.

Key words: cervical cancer; cervical cancer diagnosis; SAA; ICAM-1; VCAM-1; sCD27.

Введение

Рак шейки матки (РШМ) является одной из самых частых опухолей у женщин во всем мире. В России в 2018 г. на долю этой патологии приходилось 5,2% в структуре онкологической заболеваемости, что соответствует третьему месту после рака молочной железы и рака кожи. Заболеваемость РШМ в нашей стране за последние 10 лет выросла на 23,3%, при этом смертность увеличилась на 2,84%. В 2019 г. показатель активной выявляемости составил 41,1% с учетом опухолей визуальной локализации; у 33,4% больных заболевание было диагностировано в запущенных формах [1, 2].

В настоящее время в нашей стране скрининг РШМ проводится с 21 года: в возрастной группе женщин 21–29 лет — с применением цитологического исследования с периодичностью 1 раз в 3 года, в возрасте 30–65 лет — дополнительно с использованием ВПЧ-тестирования 1 раз в 5 лет.

Однако в последние годы появляется все больше критических публикаций об эффективности цитологического исследования в качестве метода цервикального скрининга и диагностики РШМ.

В первую очередь это касается организации проведения цервикального скрининга, что связано с низким охватом населения скрининговой программой. Во-вторых, имеет место несовершенство самого метода: большое количество цитологических классификаций; низкая чувствительность (30–87%), что требует проведения реисследований или уточняющей диагностики; ошибки в технике забора материала и интерпретации его результатов. В-третьих, наблюдается гипердиагностика РШМ на основании ВПЧ-тестирования, что свя-

зано с возможностью спонтанной элиминации вируса у большинства инфицированных [3, 4].

Техническое усовершенствование Pap-теста, такое как жидкостная цитология, не привело к значимому улучшению качественных показателей результативности цервикального скрининга [4].

В некоторых странах применяются методики компьютерно-ассоциированного скрининга, который включает аппаратную подготовку цитологического материала. В настоящее время известны системы ThinPrep (Hologic, Inc., США) и SurePath (BD, США), которые применяются в диагностике цервикальных интраэпителиальных неоплазий, в том числе высокой степени. Однако в описании результатов исследований по их использованию не указывается влияние данных технологий на показатель смертности от РШМ в качестве главного индикатора эффективности скрининговых программ [5].

Все вышесказанное обуславливает актуальность поиска альтернативных методик цервикального скрининга и диагностики патологии шейки матки.

Известно, что в патогенезе предопухолевых поражений и РШМ основную роль играют механизмы хронического вирусиндуцированного воспаления, в которых принимают активное участие некоторые воспалительные белки:

SAA — белок острой фазы воспаления, участвующий как в хроническом воспалении, так и в канцерогенезе путем индукции каскада метастазирования (потенцирование опухолевой адгезии и миграции, стимуляция ангиогенеза, активация ряда сигнальных митотических путей ERK1/2, p38 и JNK) [6];

ICAM-1 и VCAM-1 — молекулы межклеточной и клеточной адгезии, регулирующие контакты между

опухолевыми клетками, клетками иммунной системы и эндотелием сосудов, являются непосредственными участниками опухолевой прогрессии [7];

sCD27 — растворимая форма трансмембранного белка CD27. При его взаимодействии с лигандом CD70 запускается противоопухолевый иммунный ответ [8].

Целью данного исследования послужила оценка эффективности использования названных белков в качестве молекулярных маркеров при диагностике онкологической патологии шейки матки.

Материалы и методы

Проведено проспективное контролируемое исследование, в которое были включены три группы женщин: с предопухолевой патологией (цервикальной интраэпителиальной неоплазией III степени) — 1-я группа (n=13), возраст пациенток — 32,0 [28,3; 36,5] года; с РШМ — 2-я группа (n=49), возраст пациенток — 39,0 [35,6; 42,3] года; контрольная — 3-я группа (n=13) из гинекологически здоровых женщин (возраст пациенток — 30,0 [25,5; 35,7] года).

Рандомизацию в группы осуществляли на основании морфологически (для групп сравнения) и цитологически (для контрольной группы) подтвержденного статуса цервикального эпителия.

Все обследуемые были информированы о проводимой работе и дали свое письменное согласие на участие в ней. Исследование выполнено с соблюдением принципов Хельсинкской декларации (2013) и одобрено локальным Этическим комитетом Читинской государственной медицинской академии.

Материалом для исследования послужил цервикальный эпителий, который был забран по стандартной методике с помощью цитощетки с зоны стыка эпителиев шейки матки.

Методом проточной цитометрии с использованием панелей Human Vascular Inflammation Panel 1-S/P (12-plex) with Filter Plate (Канада) и HU Immune Checkpoint Panel 1-S/P (10-plex) w/FP (Канада) в цервикальном эпителии определяли уровни воспалительных белков: сывороточного амилоида А (serum amyloid A,

SAA); молекулы межклеточной адгезии 1 (intercellular adhesion molecule 1, ICAM-1); сосудистой молекулы клеточной адгезии (vascular cell adhesion molecule 1, VCAM-1); растворимой формы рецептора sCD27.

Статистический анализ результатов исследования выполняли согласно принципам Международного комитета редакторов медицинских журналов (ICMJE) и рекомендациям «Статистический анализ и методы в публикуемой литературе» (SAMPL) [9, 10]. Анализ нормальности распределения признаков с учетом численности исследуемых групп, равной менее 50 женщин, проводили путем оценки критерия Шапиро–Уилка. Учитывая ненормальное распределение признаков в вариационном ряду, статистический анализ выполняли с помощью методов непараметрической статистики: три исследуемые группы сравнивали путем оценки Н-критерия Краскела–Уоллиса с последующим попарным сравнением статистически значимых показателей с помощью U-критерия Манна–Уитни. Учитывая поправку Бонферрони, статистически значимыми считали различия при p<0,017 [26]. Результаты исследования представлены в виде медианы, первого и третьего квартилей — Me [Q1; Q3].

Для оценки вероятности наличия онкопатологии шейки матки использовали метод бинарной логистической регрессии. Диагностическую ценность разработанной модели определяли путем построения ROC-кривой с последующим расчетом площади под ней. Статистическую обработку результатов исследования осуществляли с помощью пакета программ IBM SPSS Statistics v. 25.0 (США).

Результаты и обсуждение

В исследовании были получены следующие данные (табл. 1).

Уровень SAA в 1-й группе был в 3,10 [1,31; 3,28] раза (U=41,0; p=0,02) выше, чем контрольный показатель, однако статистически значимо не отличался от соответствующего показателя во 2-й исследуемой группе (U=256,0; p=0,78). Такие результаты указывают на то, что уровень SAA является неспецифическим

Т а б л и ц а 1
Уровень белков цервикального эпителия в исследуемых группах (Me [Q1; Q3])

Белки цервикального эпителия	Группы			Статистическая значимость
	Контроль (n=13)	1-я (n=13)	2-я (n=49)	
SAA, нг/мл	1,0 [1,05; 1,71]	3,10 [2,24; 3,44]	2,18 [2,77; 3,50]	H=10,4 p=0,006
ICAM-1, нг/мл	1,07 [1,09; 1,77]	2,29 [2,04; 3,50]	2,80 [3,04; 3,81]	H=11,6 p=0,003
VCAM-1, нг/мл	0,15 [0,19; 0,38]	0,51 [0,94; 4,05]	0,78 [1,46; 2,35]	H=11,5 p=0,003
sCD27, пг/мл	8,13 [8,13; 14,17]	23,65 [29,62; 41,32]	35,09 [29,36; 40,83]	H=14,5 p=0,01

маркером диагностики злокачественной трансформации шейки матки, это объясняется участием данного белка как в механизмах хронического воспаления, так и в канцерогенезе.

Значение ICAM-1 было максимальным во 2-й группе, что выше соответствующей величины в группе контроля в 2,62 [2,79; 3,50] раза ($U=137,0$; $p=0,001$), но не отличалось от значений в 1-й группе ($U=224,5$; $p=0,37$).

Уровень VCAM-1 во 2-й группе был выше, чем в контрольной, в 5,20 [3,84; 12,37] раза ($U=138,5$; $p=0,001$), при этом статистически значимых различий со значениями в 1-й группе не выявлено ($U=248,5$; $p=0,67$).

Полученные нами данные указывают на активное участие молекул ICAM-1 и VCAM-1 в цервикальном канцерогенезе.

Количество sCD27 было максимальным во 2-й группе и превышало его значение в группе контроля в 4,32 [2,07; 5,02] раза ($U=109,0$; $p<0,001$), но не отличалось от данных 1-й группы ($U=241,0$; $p=0,57$). Выявленное повышение количества sCD27 в цервикальном эпителии у больных с предопухолевыми заболеваниями и РШМ указывает на активацию клеточного иммунитета, однако этого, как можно предположить, недостаточно, чтобы избежать прогрессирования РШМ.

На основании бинарной логистической регрессии было составлено уравнение вероятности наличия онкологической патологии шейки матки (COP, cervical oncoprobem):

$$COP = \frac{1}{1 + e^{1,2 - 0,2 \cdot SAA - 0,02 \cdot ICAM-1 - 0,5 \cdot VCAM-1 - 0,1 \cdot sCD27}}$$

где 1,2 — константа (регрессионный коэффициент b_0); 0,2; 0,02; 0,5 и 0,1 — нестандартизованные коэффициенты b ; e — основание натурального логарифма ($e \sim 2,72$). Значение коэффициента COP, равное 0,7 и более, свидетельствовало о наличии онкопатологии шейки матки. Значение, равное 0,5 и менее, соответствует здоровому состоянию цервикального эпителия.

На основании анализа уравнения логистической регрессии определена значимость показателей в структуре диагностической модели (табл. 2).

Чувствительность разработанной диагностической модели составляет 0,95, специфичность — 0,73. Площадь под ROC-кривой — 0,89 (95% CI 0,80–0,98); $p<0,001$. Стандартная ошибка — 0,04 (рис. 1).

С учетом сложности необходимых расчетов и для упрощения использования предлагаемой технологии в повседневной клинической практике создано приложение для Android в среде разработки Delphi (Delphi 10.3.3 Rio, Embarcadero, США), которое позволяет подтвердить факт наличия онкологической патологии шейки матки у конкрет-

ной пациентки за кратчайший промежуток времени (рис. 2).

Несмотря на до конца не признанную функциональную связь между уровнем исследуемых маркеров и

Таблица 2

Значимость показателей логистической регрессии в структуре диагностической модели

Белок	B	Средне-квадратичная ошибка	«Лес»	Степень свободы	Статистическая значимость	Exp(B)
SAA	0,2	0,3	0,4	1	0,05	1,2
ICAM-1	0,02	0,4	0,04	1	0,009	1,2
VCAM-1	0,5	0,7	0,5	1	0,05	1,7
sCD27	0,1	0,5	4,4	1	0,004	1,1
Константа	-1,2	0,7	2,7	1	0,01	0,3

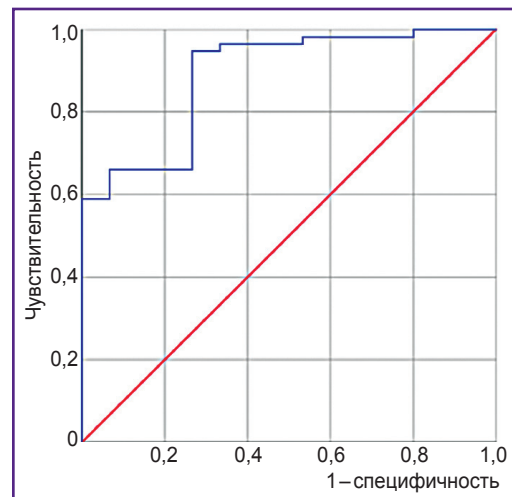


Рис. 1. Площадь под ROC-кривой для разработанной модели



Рис. 2. Вид рабочего окна разработанного приложения

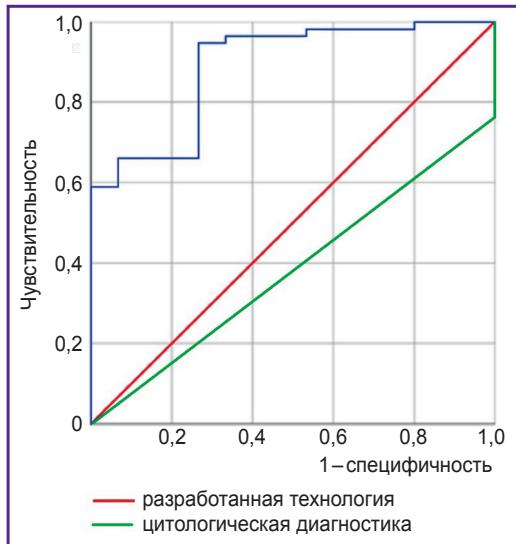


Рис. 3. Площадь под ROC-кривой для разработанной модели и для цитологической диагностики

фактом наличия онкологической патологии шейки матки, полученная модель позволяет прогнозировать около 90% истинно-положительных случаев. Вероятно, данная цифра обусловлена персистенцией воспалительного ответа в зоне злокачественной трансформации в цервикальном эпителии на момент забора материала. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о высокой информативности разработанной технологии в сравнении с результатами традиционного цитологического исследования (рис. 3).

Следует обратить внимание на тот факт, что площадь под ROC-кривой для цитологического исследования составляет 0,38 (95% CI 0,24–0,53; $p=0,2$), что не позволяет считать данный метод статистически значимым.

На рис. 4 представлен алгоритм диагностических мероприятий для определения наличия РШМ.

Заключение

Молекулярными критериями наличия предопухоловой патологии и рака шейки матки может служить повышение значений SAA в 3,10 [1,31; 3,28] раза ($U=41,0$; $p=0,02$), ICAM-1 — в 2,62 [2,79; 3,50] раза ($U=137,0$; $p=0,001$), VCAM-1 — в 5,20 [3,84; 12,37] раза ($U=138,5$; $p=0,001$) и sCD27 — в 4,32 [2,07; 5,02] раза ($U=109,0$; $p<0,001$) в цервикальном эпителии по сравнению с данными контрольной группы.

Разработанный коэффициент COP позволяет рассчитать вероятность наличия онкологической патологии шейки матки с точностью до 90%, что превышает таковую при цитологической диагностике более чем в 2,2 раза.

Использование разработанного алгоритма диагно-

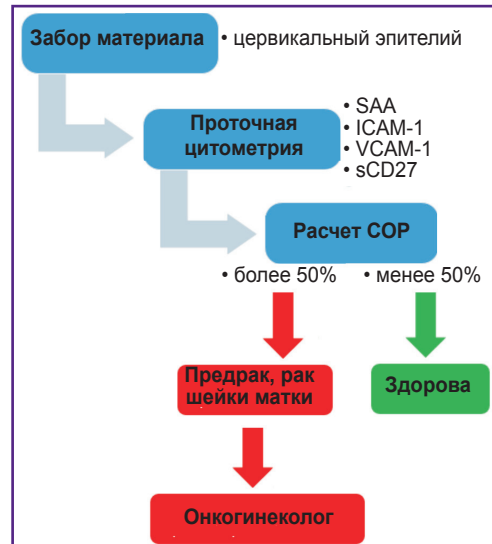


Рис. 4. Алгоритм-схема обследования пациентки на рак шейки матки

стики позволит не только своевременно выявить онкопатологию шейки матки, но и оптимизировать лечебно-диагностический процесс.

Источники финансирования. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых МК-6143.2018.7 (соглашение №075-02-2018-547).

Конфликт интересов отсутствует.

Литература/References

- Каприн А.Д., Старинский В.В., Шахзадова А.О. *Состояние онкологической помощи населению России в 2019 году*. М: МНИОИ им. П.А. Герцена; 2020; с. 239.
Kaprin A.D., Starinskiy V.V., Shakhzadova A.O. *Sostoyanie onkologicheskoy pomoshchi naseleniyu Rossii v 2019 godu* [The state of cancer care for the population of Russia in 2019]. Moscow: MNI OI im. P.A. Gertsena; 2020; p. 239.
- Белокриницкая Т.Е., Филиппов О.С., Фролова Н.И. Распространенность рака шейки матки в Дальневосточном федеральном округе и пути решения проблемы ранней выявляемости заболевания. *Акушерство и гинекология* 2020; S1: 63–68, <https://doi.org/10.18565/aig.2020.1suppl.63-68>.
Belokrinitskaya T.E., Filippov O.S., Frolova N.I. Prevalence of cervical cancer in the Far Eastern Federal District and ways to improve early detection of the disease. *Akusherstvo i ginekologiya* 2020; S1: 63–68, <https://doi.org/10.18565/aig.2020.1suppl.63-68>.
- Ашрафян Л.А., Оводенко Д.Л. Основные трудности скрининга рака шейки матки. *Акушерство и гинекология: новости, мнения, обучение* 2018; 1: 14–17, <https://doi.org/10.24411/2303-9698-2018-00001>.
Ashrafyan L.A., Ovodenko D.L. Cervical cancer screening key problems. *Akusherstvo i ginekologiya: novosti, mneniya*,

obucenie 2018; 1: 14–17, <https://doi.org/10.24411/2303-9698-2018-00001>.

4. Должиков А.А., Жернакова Н.И., Дмитриев В.Н., Жернаков Е.В., Мухина Т.С., Кокорина О.С., Кривчикова А.П. Папиллома-вирусная инфекция и рак шейки матки: некоторые проблемы скрининга, ранней диагностики и прогноза. *Человек и его здоровье* 2012; 3: 108–118.

Dolzhiikov A.A., Zhernakova N.I., Dmitriev V.N., Zhernakov E.V., Mukhina T.S., Kokorina O.S., Krivchikova A.P. Papilloma-virus infection and cervical cancer: some problems of screening, early diagnostics and prognosis. *Celovek i ego zdorov'e* 2012; 3: 108–118.

5. Минкина Г.Н. Цитологический скрининг рака шейки матки: от традиционного ПАП-теста к компьютерным технологиям. *Акушерство, гинекология и репродукция* 2017; 11(1): 56–63, <https://doi.org/10.17749/2313-7347.2017.11.1.056-063>.

Minkina G.N. Cytological screening of the cervical cancer: from the traditional PAP-test to computer technologies. *Akuserstvo, ginekologiya i reprodukcija* 2017; 11(1): 56–63, <https://doi.org/10.17749/2313-7347.2017.11.1.056-063>.

6. Zhang Y., Zhang J., Sheng H., Li H., Wang R. Acute

phase reactant serum amyloid A in inflammation and other diseases. *Adv Clin Chem* 2019; 90: 25–80, <https://doi.org/10.1016/bs.acc.2019.01.002>.

7. Каюкова Е.В., Белокрыницкая Т.Е., Шолохов Л.Ф., Терешков П.П. Оценка локального уровня воспалительных белков в цервикальной слизи в процессе развития рака шейки матки. *Забайкальский медицинский вестник* 2020; 2: 42–48.

Kayukova E.V., Belokrinitskaya T.E., Sholokhov L.F., Tereshkov P.P. Study the local level of inflammatory proteins in cervical cancerogenesis. *Zabajka'skij medicinskij vestnik* 2020; 2: 42–48.

8. Starzer A.M., Berghoff A.S. New emerging targets in cancer immunotherapy: CD27 (TNFRSF7). *ESMO Open* 2020; 4(Suppl 3): e000629, <https://doi.org/10.1136/esmoopen-2019-000629>.

9. International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals: writing and editing for biomedical publication. *J Pharmacol Pharmacother* 2010; 1(1): 42–58.

10. Lang T.A., Altman D.G. Statistical analyses and methods in the published literature: the SAMPL guidelines. *EON* 2016; 9(7): 10, <https://doi.org/10.18243/eon/2016.9.7.4>.