

**Uniwersytet Jagielloński
Collegium Medicum
Wydział Lekarski**

Bartłomiej Galarowicz

**Wartość kliniczna oceny ekspresji transkryptorów mRNA onkroteiny E6 i E7 jako
markerów śródnabłonkowej neoplazji szyjki macicy.**

Praca doktorska

Promotor: Prof. dr hab.med. Antoni Basta

Pracę wykonano w Klinice Ginekologii i Onkologii

Kierownik jednostki: Prof. dr hab.med. Antoni Basta

Kraków 2015

Streszczenie

Aktualnie rak szyjki macicy w Polsce pod względem częstości występowania zajmuje szóste miejsce wśród nowotworów złośliwych u kobiet po raku piersi, płuc, jelita z odbytnicą, endometrium i jajnika.

Zmiany przednowotworowe i nowotworowe rozwijają się głównie w obrębie strefy transformacji-TZ (TZ-Transformation Zone) tarczy części pochwowej szyjki macicy. Jest to proces stosunkowo łatwo dostępny do obserwacji kolposkopowo-cytologicznej co umożliwia prowadzenie badań profilaktycznych mających na celu wykrycie zmian przedrakowych tj śródnabłonkowej neoplazji szyjki macicy (Cervical intraepithelial neoplasia-CIN), oraz wczesnych postaci raka szyjki macicy tj postaci przedklinicznych, a więc zmian nie widocznych gołym okiem(1,3,4).

Blisko 40 letnie badania wykazały, że głównym czynnikiem ryzyka inicjującym proces karcinogenezy w obrębie szyjki macicy jest przewlekła infekcja wirusem ludzkiego brodawczaka o wysokim potencjale onkogennym Human Papilloma Virus- HR HPV komórki warstwy bazalnej nabłonka wielowarstwowego płaskiego szyjki macicy(4,11,13-19). W infekcji o charakterze przewlekłym dochodzi do integracji wirusowego DNA z DNA komórki gospodarza, której skutkiem jest utrata zdolności do kontroli działania wirusowych onkoprotein E6, E7 i zwiększona ich produkcja. Efektem nadekspresji wirusowych onkoprotein E6 i E7 jest niestabilność genomu, utrata zdolności do regulacji cyklu komórkowego, kumulacja mutacji onkogennych, a w konsekwencji rozwój raka (2,4,13).

Pośrednie potwierdzenie integracji wirusowego DNA z DNA gospodarza za pomocą detekcji mRNA wirusa HPV można uznać za niekorzystny czynnik prognostyczny dla pacjentki świadczący o dokonaniu się kolejnego kroku w transformacji nowotworowej, a testy potwierdzające ekspresję onkoprotein E6 i E7 najczęstszych typów wirusa HPV:16,18,31,33,45 można uznać za wysoce przydatne w ocenie ryzyka rozwoju zmian o charakterze CIN2+ u pacjentek z nieprawidłowymi wynikami cytologii.

Zmiany o charakterze CIN w dużej części dotyczą kobiet w okresie pełnej aktywności rozrodczej. Stąd postępowanie terapeutyczne powinno uwzględniać zasadę aby w jak najmniejszym stopniu zaburzać proces prokreacji. Zmiany o charakterze CIN3 w znakomitej większości przypadków bezpośrednio po ich zdiagnozowaniu są poddawane terapii, a jedynie zakres i rodzaj zabiegu operacyjnego zależy od lokalizacji zmiany, jej wielkości, chęci dalszej prokreacji, oraz możliwości dalszej współpracy z pacjentką tj. jej gotowości do

systematycznej kontroli po leczeniu. Natomiast pewnym problemem klinicznym są zmiany CIN1, a zwłaszcza CIN 2 . Obserwowany odsetek samoistnej regresji nakazuje prowadzić obserwację kliniczną badaniem kolposkopowo-cytologicznym zwłaszcza u kobiet w okresie prokreacyjnym. Jednak należy tu uwzględnić stopień pewności, że pacjentka będzie się regularnie zgłaszała na badania kontrolne. Jednakże zarówno w tych przypadkach jak i w przypadkach w których decydujemy się na oszczędzające chirurgiczne leczenie tych zmian dane na temat ich biologii tj które z nich ulegną remisji , a które progresji są niezmiernie cenne . Stąd identyfikacja ewentualnych markerów regresji bądź ich progresji do zmian inwazyjnych mogłaby się okazać niezwykle przydatna.

Celem niniejszej pracy było uzyskanie danych umożliwiających udzielenie odpowiedzi na pytania:

- 1.Czy i w jakim stopniu obecny jest materiał genetyczny wirusa HPV o wysokim potencjale onkogennym u kobiet z nieprawidłowymi rozmazami cytologicznymi tj DNA HPV o wysokim potencjale onkogennym oceniany techniką Hybrid Capture 2 , oraz transkrypty mRNA onkogenów E6/E7 HR HPV jako markera przetrwałej infekcji HPV o wysokim potencjale onkogennym techniką PCR (Polymerase Chain Reaction).
- 2.Jaki będzie wynik porównania przydatności klinicznej oznaczenia obecności DNA HR HPV i transkryptów mRNA E6/E7 HR HPV w zależności od stopnia zawansowania śródnabłonkowej neoplazji i raka szyjki macicy.
- 3.Jaką wartość kliniczną może mieć pozytywny wynik badania na obecność transkryptów onkogenów E6/E7 HR HPV w ocenie zachowania się śródnabłonkowej neoplazji szyjki macicy.

Materiał badawczy stanowiła grupa osiemdziesięciu pięciu kobiet z nieprawidłowym wynikiem badania cytologicznego skierowanych w 2010 roku do etapu pogłębionej diagnostyki w ramach badań profilaktycznych raka szyjki macicy realizowanego w Poradni Patologii Szyjki Macicy i Oddziale Klinicznym Kliniki Ginekologii i Onkologii Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie. U wszystkich pacjentek wykonano rozmaz cytologiczny oraz badanie kolposkopowe. Pobrano wymaz z szyjki macicy celem oznaczenia obecności: DNA HPV techniką HC2 , a także transkryptów mRNA onkogenów E6/E7 HR HPV techniką PCR. We wszystkich przypadkach pobrano pod kontrolą kolposkopu materiał do badania histopatologicznego wykonując biopsje kleszczykami biopsyjnymi Ependorfa, pętlą elektryczną (LEEP-Loop Electrosurgical Excisional Procedure), a w razie konieczności wykonano abrazję kanału szyjki macicy.

Na podstawie wyników badań molekularnych materiał badawczy podzielono na dwie grupy. Grupę A stanowiło 28 pacjentek z pozytywnym wynikiem badania na obecność transkryptów mRNA E6/E7 HR HPV, niezależnie od wyniku testu na obecność DNA HPV. Grupę B stanowiło 57 pacjentek z negatywnym wynikiem badania na obecność transkryptów mRNA E6/E7 HR HPV i pozytywnym wynikiem badania na obecność DNA HPV o wysokim potencjale onkogennym.

Po uzyskaniu wyniku badania histopatologicznego kwalifikowano pacjentki w zależności od stopnia zaawansowania procesu karcinogenezy do odpowiednich procedur terapeutycznych, lub obserwacji klinicznej.

W przypadkach w których badanie cytologiczne wykazało ASCUS, a obraz kolposkopowy był nie podejrzany oraz w części przypadków CIN1 prowadzono obserwację cytologiczno kolposkopową. W pozostałych przypadkach CIN1 wykonano waporyzację zajętego przez śródnabłonkową neoplazję małego stopnia obszaru szyjki macicy laserem CO₂. W grupie w której prowadzono obserwację w przypadkach podejrzenia kolposkopowego o progresję wykonywano ponowną weryfikację histopatologiczną pobierając celowany wycinek pod kontrola kolposkopu. U pacjentek u których wynik badania histopatologicznego wykazał CIN2 wykonywano konizację pętlą elektryczną o wysokiej częstotliwości, konizację chirurgiczną (sposobem Madeja), lub waporyzację laserem CO₂. W przypadkach CIN3 wykonywano konizację chirurgiczną szyjki macicy zimnym nożem (sposobem Madeja). W 2 przypadkach raka wykonano rozszerzone wycięcie macicy Piver II z przydatkami i limfadenektomię miednicy mniejszej.

W kolejnym etapie przeanalizowano związek obecności DNA HR HPV i transkryptów mRNA onkogenów E6/E7 HR HPV w zależności od stanu zaawansowania klinicznego procesu karcinogenezy.

Wszystkim pacjentkom grupy A i B niezależnie od przeprowadzonych procedur tj. obserwacji bez leczenia, lub poddanych terapii chirurgicznej zaproponowano kontrolę cytologiczno kolposkopową celem oceny zachowania procesu karcinogenezy. Uwzględniając także wyniki badań molekularnych obserwacje te prowadzono przez okres 20 miesięcy. W badaniach kontrolnych wzięło udział łącznie 66(77,6%) pacjentek z czego 28(100%) z grupy A i 38(66,7%) z grupy B.

W 72 przypadkach operowanych kobiet w których pozyskano materiał do badania histopatologicznego oceniono zgodność wyników kolposkopii i cytologii z wynikami badań histopatologicznych określając czułość, swoistość, PPV oraz NPV tych badań w detekcji

zmian CIN2+. Do analizy związku między badanymi zmiennymi użyto testu korelacji gamma. Posługując się cytologią, kolposkopią i badaniem histopatologicznym określono i porównano wartość kliniczną oznaczenia DNA HRHPV techniką HC2, oraz oznaczenia obecności mRNA onkogenów E6 i E7 HRHPV techniką PCR określając ich czułość, swoistość, PPV oraz NPV w detekcji zmian CIN2+. Dzięki przeprowadzonej 20 miesięcznej obserwacji cytologiczno kolposkopowej oceniono zachowanie się zmian CIN w zależności od przynależności do grupy A czy B.

Porównanie wyników cytologii z wynikami badania histopatologicznego pozwoliło określić czułość cytologii na poziomie 72,2%; swoistość 91,8%; PPV 86,7%; NPV 81,8%.

W grupie A zgodność badania cytologicznego z wynikiem badania histopatologicznego uzyskano w 18(64,3%) przypadkach. Przeprowadzona analiza korelacji wyników badań cytologicznych z wynikami badań histopatologicznych wykazała współczynnik korelacji gamma 0,798 ($p < 0.001$). Tak więc wykazano dodatnią korelację wyniku badania cytologicznego z ostatecznym wynikiem rozpoznania histopatologicznego.

W grupie B zgodność wyników badania cytologicznego z wynikami badania histopatologicznego uzyskano w 40(90,9%) przypadkach natomiast w 4(9,1%) przypadkach wyniki badania cytologicznego były niezgodne z wynikami badania histopatologicznego. Przeprowadzona analiza korelacji wyników badań cytologicznych z wynikami badań histopatologicznych wykazała współczynnik korelacji gamma 0,961 ($p < 0.001$). Tak więc wykazano silnie dodatnią korelację wyniku badania cytologicznego z ostatecznym wynikiem rozpoznania histopatologicznego.

Zestawiając wyniki badania kolposkopowego z wynikami badania histopatologicznego materiału operacyjnego w 72 przypadkach operowanych kobiet oceniono czułość, swoistość, PPV i NPV tej metody dla detekcji zmian CIN2+. Czułość wynosiła 80,6%; swoistość 95,9%, PPV 93,5%, NPV 87%. W grupie A zgodność kolposkopii z wynikiem badania histopatologicznego dotyczyła 71,42% przypadków. Natomiast w 28,57% przypadkach wynik badania histopatologicznego był niezgodny z oceną kolposkopową. Przeprowadzona analiza korelacji wyników badania kolposkopowego z wynikami badania histopatologicznego w grupie A wykazała współczynnik korelacji gamma 0,747 ($p < 0.001$). Tak więc wykazano dodatnią korelację wyniku badania kolposkopowego z ostatecznym wynikiem rozpoznania histopatologicznego. W grupie B zgodność wyników badania kolposkopowego z wynikami badania histopatologicznego dotyczyła 93,2% przypadków. Przeprowadzona analiza korelacji wyników badania kolposkopowego w tej grupie z wynikami badania

histopatologicznego wykazała współczynnik korelacji gamma 0,994 ($p < 0.001$), a więc silnie dodatnią istotną statystycznie korelację wyników powyższych badań.

Porównano wyniki badań cytologicznych w grupie A i B stwierdzono, że w grupie A u pacjentek z dodatnim wynikiem oznaczenia obecności mRNA E6,E7 odsetek rozmazów cytologicznych sklasyfikowanych jako HGSIL 50% ,był wyższy , w porównaniu do grupy B z ujemnym wynikiem oznaczenia obecności mRNA E6,E7 w której odsetek ten wynosił 24,6%. A obserwowane różnice w wynikach cytologii były istotne statystycznie $p = 0.003$.

Porównano także wyniki badań kolposkopowych w grupie A i B i stwierdzono, że w grupie A u pacjentek z dodatnim wynikiem oznaczenia obecności mRNA E6,E7 odsetek obrazów kolposkopowych sugerujących zmiany dużego stopnia i raka 53,6% był wyższy , w porównaniu do grupy B z ujemnym wynikiem oznaczenia obecności mRNA E6,E7 w której odsetek ten wynosił 28,1%. Wykazane różnice w obrazach kolposkopowych były istotne statystycznie $p = 0.022$.

Dzięki porównaniu wyników badań histopatologicznych w grupie A i B stwierdzono, że w grupie A u pacjentek z dodatnim wynikiem oznaczenia obecności mRNA E6,E7 odsetek zmian histopatologicznych CIN2 i CIN3 71,42% był wyższy , w porównaniu do grupy B z ujemnym wynikiem oznaczenia obecności mRNA E6,E7 w której odsetek ten wynosił 24,55%. Obserwowane różnice w wynikach badań histopatologicznych były istotne statystycznie $p < 0.001$.

Przeanalizowano związek obecności DNA HR HPV i transkryptów mRNA onkogenów E6/E7 HR HPV w zależności od stanu zaawansowania klinicznego procesu karcinogenezy. W grupie A –pacjentek z dodatnim wynikiem mRNA HR HPV i dodatnim wynikiem DNA HR HPV znalazło się 100% zdiagnozowanych w naszym badaniu raków, 78,6% CIN3, 45% CIN2 i 13,6% CIN1 , a w grupie B-pacjentek z ujemnym wynikiem mRNA i dodatnim DNA dominowało rozpoznanie CIN1 86,3% z wszystkich CIN1, następnie CIN2 55%, CIN3 21,4%, a różnice te były istotne statystycznie $p < 0.001$.

Oceniono wartości zastosowanych metod diagnostycznych cytologii , kolposkopii, oznaczenia mRNA HR HPV i DNA HR HPV(w przypadku DNA HRHPV określenie swoistości i NPV nie było możliwe ze względu na dodatni wynik oznaczenia w wszystkich 85 przypadkach) pod kątem ich czułości, swoistości, PPV i NPV względem detekcji zmian śródnabłonkowych dużego stopnia . Wyniki osobno dla każdej z tych czterech metod: cytologii, kolposkopii, mRNA HR HPV, DNA HR HPV przedstawiają się następująco

czułość:72,2%, 80,6%,61%,100%, swoistość: 91,8%,95,9%, 87,8% , PPV:86,7%,93,5%, 78%,42,3%, NPV:81,8%,87%,75,4%.

Na podstawie uzyskanych wyników badań wykazaliśmy, że :

1. Odsetek ekspresji mRNA E6/E7 HRHPV w zmianach CIN jest istotnie wysoki i wzrasta wraz ze stopniem zawansowania CIN. Potwierdza to wysoką wartość oznaczenia mRNA E6/E7 HRHPV w detekcji szczególnie istotnych klinicznie przypadkach CIN dużego stopnia.
2. Oznaczenie mRNA E6/E7 HRHPV ma wysoką wartość w weryfikacji nieprawidłowych wyników cytologicznych szczególnie w obszernej grupie rozpoznań cytologicznych ASCUS i LGSIL.
3. Oznaczenie mRNA E6/E7 HRHPV z powodzeniem mogłoby zastąpić cytologię w skriningu śródnabłonkowej neoplazji i raka , przy zachowaniu zbliżonej czułości , swoistości, pozytywnej wartości predykcyjnej(PPV) i negatywnej wartości predykcyjnej(NPV) takiego badania przesiewowego.
4. Dodatni wynik oznaczenia mRNA E6/E7 HRHPV uzyskany przed procedurami terapeutycznymi CIN jest czynnikiem istotnie zwiększającym ryzyko nawrotu.
5. Oznaczenie mRNA E6/E7 HRHPV podczas planowania leczenia CIN jest skutecznym narzędziem odróżniającym CIN z tendencją do progresji od zmian CIN bez takiej tendencji. Umożliwia to indywidualizację leczenia i uniknięcie w części przypadków niepotrzebnego leczenia chirurgicznego, co ma szczególne znaczenie w grupie młodych kobiet z planami prokreacyjnymi.