

## Нарушение клеточной дифференцировки при высокой степени интраэпителиального повреждения и раке шейки матки, ассоциированных с вирусами папилломы человека высокого канцерогенного риска

<sup>1</sup>Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова, Санкт-Петербург

<sup>2</sup>Городской клинический онкологический диспансер, Санкт-Петербург

**Резюме.** Жизненный цикл вируса папилломы человека связан с процессом дифференцировки многослойного плоского эпителия шейки матки. В качестве одного из критериев клеточной дифференцировки используют экспрессию цитokerатина 10. У 70 позитивных по вирусам папилломы человека пациенток цитологическим, гистологическим, иммуноморфологическим методами исследованы цервикальные биоптаты, методом количественной полимеразной цепной реакции – соскобы цервикального эпителия. В 16 случаях верифицирована умеренная, в 35 – тяжелая формы дисплазии, в 9 – интраэпителиальный рак, в 10 – инвазивный плоскоклеточный рак. Вирус папилломы человека 16 генотипа обнаружен в 37 случаях, его сочетания с папилломавирусами филогенетических групп  $\alpha 9$  и  $\alpha 7$  – в 16. Вирусы папилломы человека группы  $\alpha 9$  выявлены в 12, группы  $\alpha 7$  – в 5 случаях. У больных вирусами папилломы человека 16 генотипа при нарастании тяжести цервикального повреждения отмечается уменьшение числа клеток, сохраняющих способность к дальнейшему дифференцированию. В остальных случаях высокой степени интраэпителиального повреждения плоского эпителия независимо от генотипа вирусов филогенетических групп  $\alpha 9$ ,  $\alpha 7$  и их комбинаций положительная реакция на антитела к цитокератину 10 меняется разнонаправленно. В случаях высокой степени интраэпителиального повреждения и при инвазивном раке количество клеток с экспрессией цитокератина 10 у больных вирусами папилломы человека филогенетической группы  $\alpha 7$  превышало число соответствующих клеток у больных папилломавирусами филогенетической группы  $\alpha 9$ , и в первую очередь вирусами папилломы человека 16 генотипа. Это свидетельствует о способности вирусов группы  $\alpha 9$  в большей степени, чем вирусов группы  $\alpha 7$  замедлять процессы клеточной дифференцировки. У больных вирусами папилломы человека филогенетических групп  $\alpha 9$  и  $\alpha 7$  наименьшее число клеток с экспрессией СК10 отмечено при инвазивном плоскоклеточном раке.

**Ключевые слова:** вирус папилломы человека, клеточная дифференцировка, плоскоклеточный рак, экспрессия цитокератина, цервикальный биоптат, цервикальная неоплазия, полимеразная цепная реакция.

**Введение.** Репродукция вируса папилломы человека (ВПЧ) связана с процессом дифференцировки [8, 10] многослойного плоского эпителия (МПЭ) шейки матки. Уже на начальной стадии жизненного цикла папилломавируса его ген E2 осуществляет контроль над деятельностью остальных вирусных генов и используемых в процессе его репродукции генов пораженной клетки, участвуя в процессе ее пролиферации и дифференцировки, создавая наиболее благоприятные условия для формирования вирионов [11]. Прекращение регулирования роста клетки через модуляцию вирусным белком E5 рецепторов эпидермального фактора роста [6, 13], взаимодействие E5 с клеточным белком Вар31 [12], нарушение механизма противодействия сверхбыстрой пролиферации вследствие инактивации вирусными белками E6 и E7 апоптозных клеточных белков p53 [14] и pRB [3, 4] задерживают клетку в S-фазе клеточного цикла. Это позволяет продлить процесс репликации вирусной дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), который происходит параллельно с репликацией клеточной ДНК в этой фазе клеточного цикла, а после вступления

клетки в фазу митоза начать транскрипцию капсидных генов ВПЧ [10].

Все эти изменения замедляют или полностью угнетают дифференцировку клеток в параэпителиальном слое МПЭ [3], изменяют спектр продуцируемых ими белков, в том числе цитокератина 10 (СК10) – иммуноморфологического критерия процесса дифференцировки плоского эпителия [7]. Изменение клеточной дифференцировки в совокупности с нарушением механизма, сдерживающего пролиферацию, способствует развитию неопластического процесса вплоть до формирования цервикального рака [15], занимающего в структуре онкологической заболеваемости населения России 3 место [1].

**Цель исследования.** Изучить процессы дифференцировки атипичных и опухолевых клеток МПЭ шейки матки, пораженного вирусами папилломы человека высокого канцерогенного риска (ВПЧ ВКР), путем оценки в них экспрессии СК10.

**Материалы и методы.** Проанализированы результаты цитологического, иммуноцитохимического

го, гистологического, иммуногистохимического и молекулярно-генетического методов исследования эпителия шейки матки 70 ВПЧ-позитивных женщин, в возрасте 22–71 года, находившихся на лечении по поводу цервикальной неоплазии в Городском клиническом онкологическом диспансере (Санкт-Петербург) с октября 2010 г. по май 2011 г. включительно.

Цитологические препараты соскобов экзо- и эндоцервикса готовили методом жидкостной цитологии и окрашивали по методу Папаниколау. Для гистологического исследования использовали материал, полученный при электроэксцизии шейки матки, который фиксировали в 10% растворе формалина, обезвоживали в этиловых спиртах восходящей концентрации, заливали в парафиновые блоки, с помощью микротомы готовили срезы толщиной 5–6 мкм, окрашивали гематоксилином и эозином.

В 9 случаях проводили иммуноцитохимические, в 61 – иммуногистохимические исследования с использованием системы детекции «Ultra vision LP detection system HRP polymer & dab plus chromogen» (TL-015-HD) и моноклональных кроличьих антител к цитokerатину 10 (DE-K10, MS-611-PO, 611P91OF) производства фирмы «Thermo scientific» для «Lab vision corporation» (Соединенные Штаты Америки).

Полученные результаты иммуноморфологических исследований при высокой степени интраэпителиального повреждения [HSIL] оценивали среди клеток базального и парабазального слоев МПЭ и метapлазированных резервных клеток, при инфильтративном раке – среди опухолевых клеток.

Заключения результатов цитологических исследований формулировали в соответствии с классификацией «The Bethesda system for reporting cervical cytologic diagnoses» [2], гистологических исследований – в соответствии с последней редакцией гистологической классификации Всемирной организации здравоохранения [9].

Выявление и генотипирование ДНК ВПЧ в соскобе цервикального канала проводили методом мультиплексной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени на приборе «Rotor Gene» фирмы «Corbett Research» (Австралия) с использованием комплектов реагентов Центрального научно-исследовательского института эпидемиологии.

Достоверность различий полученных результатов оценивали на основании критерия Фишера с уровнем значимости  $p < 0,05$ .

**Результаты и их обсуждение.** У 16 (22,9%) женщин морфологически верифицирована умеренная (CIN2, HSIL), у 35 (50%) – тяжелая (CIN3, HSIL) формы дисплазии. В 9 (12,9%) случаях выявлен интраэпителиальный рак (Ca in situ, CIN3, HSIL), у 10 (14,2%) – инвазивный плоскоклеточный рак (SCC).

ВПЧ 16 генотипа обнаружен в 37 (52,9%) случаях, его сочетания с папилломавирусами филогенетической группы (ФГГ)  $\alpha 9$  – в 13 (18,6%) и с ФГГ  $\alpha 7$  – в 3

(4,3%) случаях. ВПЧ ФГГ  $\alpha 9$  выявлены у 12 (17,1%), ФГГ  $\alpha 7$  – у 5 (7,1%) пациенток (табл. 1).

Таблица 1  
Распределение ВПЧ-позитивных случаев с учетом морфологических изменений

Морфология	Количество женщин					Всего
	ВПЧ 16	ВПЧ 16+ $\alpha 9$	ВПЧ 16+ $\alpha 7$	ВПЧ $\alpha 9$	ВПЧ $\alpha 7$	
Умеренная дисплазия	6	2	2	4	2	16
Тяжелая дисплазия	18	8	1	7	1	35
Carcinoma in situ	6	2		1		9
Инвазивный рак	7	1			2	10
Всего	37	13	3	12	5	70

Наименьшее количество клеток с экспрессией СК10 у больных с ВПЧ ФГГ  $\alpha 9$  выявлено при Ca in situ, у женщин с другими генотипами ВПЧ – при инвазивном раке (табл. 2).

Таблица 2  
Удельный объем клеток с экспрессией СК10, %

Генотип ВПЧ	Умеренная дисплазия	Тяжелая дисплазия	Ca in situ	Инвазивный рак
16	17,4±0,8	17,6±0,8	8,1±0,6	6,4±0,5
16+ФГГ $\alpha 9$	7,9±0,5	17,6±0,8	22,4±0,8	0
16+ФГГ $\alpha 7$	5,2±0,4	30,9±0,9	–	–
ФГГ $\alpha 9$	28,7±0,9	22,9±0,8	4,9±0,4	–
ФГГ $\alpha 7$	0	39,8±1	–	12,1±0,7

У ВПЧ16-позитивных пациенток количество клеток с положительной реакцией на антитела к СК10 при умеренной и тяжелой формах дисплазии было сопоставимо между собой и в 2 раза превышало число клеток с экспрессией СК10 у больных с интраэпителиальной и в 2,5 раза – с инвазивной формами рака.

У женщин, инфицированных папилломавирусами ФГГ  $\alpha 9$  (без ВПЧ 16), отмечали постепенное снижение числа клеток с экспрессией СК10 от 28,7% при умеренной дисплазии до 4,9% при Ca in situ. У пациенток, инфицированных комбинациями ВПЧ16 с вирусами ФГГ  $\alpha 9$  и с ВПЧ ФГГ  $\alpha 7$ , а также ВПЧ ФГГ  $\alpha 7$ , при нарастании тяжести интраэпителиального повреждения отмечался рост числа клеток с СК10 с резким уменьшением численности или полным их отсутствием в случаях инвазивного рака (см. табл. 2).

При инвазивном раке количество опухолевых клеток с экспрессией СК10 у больных с ВПЧ ФГГ  $\alpha 7$  в 2 раза превышало число соответствующих клеток у больных с ВПЧ16. Полученные результаты свидетельствуют о том, что ВПЧ ФГГ  $\alpha 9$  и в первую очередь ВПЧ16, более тропны к плоскому эпителию, чем ВПЧ ФГГ  $\alpha 7$ , что согласуется с частотой выявления папилломавирусов данных групп у больных с плоскоклеточ-

ной и железистой формами цервикального рака [5]. Кроме того, отмечена разница в количестве клеток с положительной реакцией на антитела к СК10 при дисплазиях, ассоциированных с ВПЧ филогенетических групп  $\alpha 9$  и  $\alpha 7$ . Так, при тяжелой дисплазии количество клеток с экспрессией СК10 у больных с ВПЧ ФГГ  $\alpha 7$  в 1,7 раза превышало их число у пациенток с ВПЧ ФГГ  $\alpha 9$ . Количество клеток с антителами к СК10 у больных с комбинацией ВПЧ16 с ВПЧ ФГГ  $\alpha 7$  в 1,7 раза превышало их численность у пациенток с ВПЧ16 и у женщин с сочетанием ВПЧ16 с другими типами вирусов ФГГ  $\alpha 9$  (см. табл. 2). Полученные данные свидетельствуют о различии в тропности к плоскому и железистому эпителию у ВПЧ ФГГ  $\alpha 9$  и  $\alpha 7$  и в случаях HSIL.

**Заключение.** Установлено, что у больных с ВПЧ 16 генотипа при нарастании тяжести цервикального повреждения отмечается уменьшение числа клеток, сохраняющих способность к дальнейшему дифференцированию. Наименьшее число клеток с экспрессией СК10, отмеченное при инвазивном плоскоклеточном раке, ассоциированном с ВПЧ филогенетических групп  $\alpha 7$  и  $\alpha 9$ , свидетельствует о частичной или полной утрате опухолевыми клетками способности к собственной дифференцировке, что может быть использовано в качестве прогностического критерия опухолевого роста.

#### Литература

1. Состояние онкологической помощи населению России в 2010 году / под ред. В.И. Чиссова, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. – М.: МНИОИ, 2011. – 188 с.
2. Apgar, B.S. The 2001 Bethesda system terminology / B.S. Apgar, L. Zoschnick, T.C. Wright JR. // Amer. famil. physic. – 2003. – Vol. 68, № 15. – P. 1992–1998.
3. Collins, A.S. Interactions with pocket proteins contribute to the role of human papillomavirus type 16 E7 in the papillomavirus

- life cycle / A.S. Collins [et al.] // J. virol. – 2005. – Vol. 79, № 23. – P. 14769–14780.
4. Doorbar, J. The papillomavirus life cycle / J. Doorbar // J. clin. virol. – 2005. – Vol. 32 (Suppl. 1). – S. 7–15.
5. Doorbar, J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer / J. Doorbar // Clin. sci. – 2006. – Vol. 110. – P. 525–541.
6. Genter Williams, S.M. Requirement of epidermal growth factor receptor for hyperplasia induced by E5, a high-risk human papillomavirus oncogene / S.M. Genter Williams [et al.] // Cancer res. – 2005. – Vol. 65, № 15. – P. 6534–6542.
7. Ivanova, P. Knockdown of PKD1 in normal human epidermal keratinocytes increases mRNA expression of keratin 10 and involucrin: early markers of keratinocyte differentiation / P. Ivanova [et al.] // Arch. dermatol. res. – 2008. – Vol. 300, № 3. – P. 139–145.
8. Milligan, S.G. Analysis of novel human papillomavirus type 16 late mRNAs in differentiated W12 cervical epithelial cells / S.G. Milligan [et al.] // Virol. – 2007. – Vol. 360, № 1. – P. 172–181.
9. Pathology and genetics of tumours of the breast and female genital organs. WHO classification of tumours / eds F.A. Tavassoli, P. Devilee. – Lyon: IARC Press, 2003. – 432 p.
10. Pyeon, D. Establishment of human papillomavirus infection requires cell cycle progression / D. Pyeon [et al.] // Plos. pathog. – 2009. – Vol. 5, – № 2 – e1000318.
11. Ramírez-Salazar E. HPV16 E2 could act as down-regulator in cellular genes implicated in apoptosis, proliferation and cell differentiation / E. Ramírez-Salazar [et al.] // Virol. j. – 2011. – Vol. 8. – P. 247.
12. Regan, J.A. Bap31 is a novel target of the human papillomavirus E5 protein / J.A. Regan, L.A. Laimins // J. virol. – 2008. – Vol. 82, № 20. – P. 10042–10051.
13. Rosenberger, S. Alternative splicing of human papillomavirus type-16 E6/E6\* early mRNA is coupled to EGF signaling via Erk1/2 activation / S. Rosenberger [et al.] // Proc. natl. acad. sci. USA. – 2010. – Vol. 107, № 15. – P. 7006–7011.
14. Wang, X. Oncogenic HPV infection interrupts the expression of tumor-suppressive miR-34a through viral oncoprotein E6 / X. Wang [et al.] // RNA. – 2009. – Vol. 15, № 4. – P. 637–647.
15. zur Hausen, H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application / H. zur Hausen // Nat. rev. cancer. – 2002. – Vol. 2, № 5 – P. 342–350.

V.S. Chirsky, V.A. Ershov

### Infringement of cellular differentiation at high-grade squamous intraepithelial lesion and cervix uteri cancer, associated with high-risk human papilloma viruses

**Abstract.** The life cycle of human papilloma virus is connected with process of differentiation stratified squamous epithelia of cervix uteri. Expression cytokeratin 10 is used as one of criteria of cellular differentiation. 70 patients with human papilloma virus were studied by cytological, histological, immunomorphological methods (biopsies) and by polymerase chain reaction (cervical samples). In 16 cases is revealed moderated, in 35 – severe forms of dysplasia, in 9 – carcinoma in situ, in 10 – squamous cell cancer. Human papilloma viruses of 16 genotypes is found out in 37 cases, its combinations with human papilloma viruses of phylogenetical groups  $\alpha 9$  and  $\alpha 7$  – in 16 cases. Human papilloma viruses of group  $\alpha 9$  are revealed in 12, of group  $\alpha 7$  – in 5 cases. At patients with human papilloma viruses of 16 genotypes at increase of grade squamous epithelial lesion are decreased number of the cells keeping ability to the further differentiation. In other cases of grade squamous intraepithelial lesion irrespective of genotype of viruses of phylogenetical groups  $\alpha 9$ ,  $\alpha 7$  and their combinations positive reaction to antibodies to cytokeratin 10 varies differently. In cases of high-grade squamous intraepithelial lesion and at squamous cell cancer the quantity of cells with expression of cytokeratin 10 at patients with human papilloma virus of phylogenetical group  $\alpha 7$  exceeded quantity of corresponding cells at patients with human papilloma virus of phylogenetical group  $\alpha 9$ . It testifies the ability of viruses of group  $\alpha 9$  in greater degree, than viruses of group  $\alpha 7$  slow down processes of cellular differentiation. Least of cells with expression of cytokeratin 10 are at squamous cell cancer, associated with human papilloma virus's phylogenetical groups  $\alpha 9$  and  $\alpha 7$ .

**Key words:** human papilloma virus, cellular differentiation, squamous cell carcinoma, expression of cytokeratin, cervical biopsy, cervical neoplasia, polymerase chain reaction.

Контактный телефон: 8 (812) 329-71-87; e-mail: v\_chirsky@mail.ru