

В.С. Чирский¹, В.А. Ершов¹,
А.А. Вязовая², О.В. Нарвская²

Степень повреждения цервикального эпителия и статус дезоксирибонуклеиновой кислоты вируса папилломы человека 16 генотипа

¹Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова, Санкт-Петербург

²Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург

Резюме. У 87 пациенток инфицированных вирусом папилломы человека 16 генотипа, гистологическим методом исследованы цервикальные биоптаты, методом количественной полимеразной цепной реакции – соскобы цервикального эпителия. Физический статус дезоксирибонуклеиновой кислоты вируса папилломы человека 16 генотипа оценивали по соотношению количества копий вирусных генов E2 и E7. В результате полимеразной цепной реакции определяли эписомную, смешанную и интегрированную формы вирусной дезоксирибонуклеиновой кислоты. Различали низкую (от 1 до 33%), умеренную (от 34 до 66%), выраженную (от 67 до 99%), полную (100%) степени интеграции вируса папилломы человека 16 генотипа. В 10 случаях верифицирована эктопия шейки матки, в 5 – слабая, в 17 – умеренная, в 30 – тяжелая формы дисплазии, в 15 – интраэпителиальный рак, в 10 – плоскоклеточный рак шейки матки. Эписомная форма дезоксирибонуклеиновой кислоты вируса папилломы человека 16 генотипа выявлена в 20 случаях. Низкая степень интеграции вирусной дезоксирибонуклеиновой кислоты обнаружена у 43, умеренная – у 16, выраженная – у 3, полная – у 5 пациенток. В 80% случаев развитие интраэпителиальной и инвазивной форм плоскоклеточного рака, по-видимому, было обусловлено интеграцией вирусной дезоксирибонуклеиновой кислоты в дезоксирибонуклеиновую кислоту клеток. При нарастании тяжести цервикального эпителиального повреждения в 3 раза снижалась встречаемость эписомной, в 1,6 раза – низкой и в 2,5 раза – умеренной степеней интеграции вирусной дезоксирибонуклеиновой кислоты. Количество случаев с выраженной и полной интеграцией дезоксирибонуклеиновой кислоты вируса папилломы человека 16 генотипа возрастало при утяжелении эпителиального повреждения и достигало своих максимальных значений – по 10% при инвазивном плоскоклеточном раке.

Ключевые слова: шейка матки, цервикальный биоптат, полимеразная цепная реакция, патология, дисплазия, эктопия, канцерогенез, интеграция, дезоксирибонуклеиновая кислота, вирус папилломы человека, плоскоклеточный рак.

Введение. Вирус папилломы человека высокого канцерогенного риска (ВПЧ ВКР) – основной этиологический фактор развития цервикальной неоплазии.

Дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) ВПЧ содержит информацию, необходимую для собственной транскрипции и репродукции в эпителиальных клетках [20]. Принято считать, что онкогенное действие папилломавируса связано со встраиванием его ДНК в ДНК клетки в ходе ее пролиферации [1, 2, 5]. Этот процесс сопровождается потерей функциональной активности вирусного гена E2, контролирующего экспрессию генов E6 и E7. Наблюдаемое при этом повышение синтеза вирусных белков E6 и E7, инактивирующих клеточные белки p53 и pRB [9], может привести к неконтролируемой клеточной пролиферации, что в свою очередь повышает риск развития цервикальной интраэпителиальной неоплазии вплоть до формирования рака шейки матки, занимающего 3 место в структуре онкологической заболеваемости населения России [4].

Вирусный ген E2 регулирует экспрессию вирусных и клеточных генов, контролируемых, в частности, белки семейства SR, которые участвуют в модификации матричной рибонуклеиновой кислоты [13, 14] и могут проявлять онкогенность в повреждениях цервикального эпителия. Свою роль в цервикальном канцерогене-

незе также играют взаимодействие вирусного белка E5 с факторами роста [18] и нарушающий регуляцию митозов вирусный белок E7 [15]. Все эти факторы дестабилизируют геном клетки, которая может потерять чувствительность к сдерживающим пролиферацию сигналам и получить неограниченный репликативный потенциал на фоне замедления процессов программируемой клеточной гибели, то есть приобрести критерии злокачественной опухоли [11].

Вместе с тем, опубликованы данные о существовании ДНК ВПЧ ВКР и в первую очередь – ДНК папилломавируса 16 генотипа, в клетках цервикального рака в эписомной (не интегрированной) форме [6–8, 17]. Эти наблюдения позволяют предположить, что злокачественная цервикальная прогрессия может быть обусловлена не только изменениями клеточной ДНК вследствие встраивания в нее ДНК ВПЧ [2].

Определение физического состояния и количественную оценку степени интеграции вирусной ДНК в ДНК клетки проводят с учетом соотношения числа копий генов вирусных белков E2 и E7 ВПЧ 16 генотипа [1, 5, 12], выявляемого в 54,4% случаев плоскоклеточного цервикального рака [10].

Цель исследования. Выявление связи между тяжестью цервикальной интраэпителиальной неопла-

зии и физическим статусом вирусной ДНК в клетках цервикального эпителия.

Материалы и методы. Проведен анализ результатов гистологического и молекулярно-генетического методов исследования эпителия шейки матки 87 ВПЧ-позитивных женщин в возрасте от 22 до 61 года, находившихся на лечении по поводу цервикальной интраэпителиальной неоплазии в Санкт-Петербургском городском клиническом онкологическом диспансере с октября 2010 г. по май 2011 г. включительно.

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. Заключение результатов гистологических исследований формулировали в соответствии с последней редакцией гистологической классификации Всемирной организации здравоохранения [16].

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

Физический статус ДНК ВПЧ 16-го генотипа оценивали по соотношению количества копий вирусных генов E2/E7 с учетом стандартного отклонения и коэффициента вариации [1, 5]. Расчет степени интеграции ДНК ВПЧ 16 генотипа осуществляли по формуле:

$$(1 - E2/E7) \times 100\%$$

где E2 – число копий гена E2; E7 – число копий гена E7.

По результатам молекулярно-генетического исследования выделяли эписомную, смешанную и интегрированную формы вирусной ДНК. Степени интеграции ДНК ВПЧ 16 определяли как отсутствие

(0%), низкую (от 1 до 33%), умеренную (от 34 до 66%), выраженную (от 67 до 99%), полную (100%).

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

Результаты и их обсуждение. Морфологическое исследование операционного материала позволило верифицировать у 10 (11,5%) женщин 32–50 лет эктопию шейки матки, у 77 на ее фоне выявлены изменения многослойного плоского эпителия. Из них у 5 (5,7%) женщин 22–46 лет диагностирована слабая (CIN1), у 17 (19,5%) больных 25–54 лет – умеренная (CIN2), у 30 (34,5%) пациенток 22–60 лет – тяжелая форма дисплазии (CIN3). У 15 (17,3%) женщин 29–61 года верифицирован интраэпителиальный рак (CIN3, Carcinoma in situ), у 10 (11,5%) пациенток 27–48 лет – плоскоклеточный рак шейки матки (SCC).

В соскобах цервикального эпителия эписомная (не интегрированная) форма ДНК ВПЧ 16 генотипа выявлена в 20 (23%) случаях. Низкая степень интеграции вирусной ДНК обнаружена у 43 (49,5%), умеренная – у 16 (18,4%), выраженная – у 3 (3,4%) женщин. Полная интеграция отмечена в 5 (5,7%) случаях.

В ходе анализа полученных данных отмечено снижение частоты встречаемости эписомной формы ДНК ВПЧ с 60% при эктопии до 20% при интраэпителиальной и инвазивной формах рака (табл.).

Наличие эписомной формы ДНК ВПЧ 16 в клетках цервикального эпителия при Ca in situ и SCC отражено в ряде публикаций [6–8, 17], авторы которых объясняли этот факт различным характером интеграции ДНК ВПЧ 16 и ВПЧ ВКР других генотипов без уточнения ее механизма. В исследованиях Л.А. Евстигнеевой с соавт. [2] показано, что интеграция ДНК ВПЧ 16 не является обязательной для злокачественной прогрессии. По нашему мнению, отсутствие интеграции ДНК ВПЧ 16 в каждом пятом случае интраэпителиальной и инвазивной форм рака (см. табл.), позволяет предположить, что злокачественная трансформация эпителия, по-видимому, может быть связана с нарушениями клеточной ДНК, возникающими во время митоза независимо от репликации вирусной ДНК в клетке.

Наибольшее число случаев – 80% низкой степени интеграции ДНК ВПЧ 16 генотипа выявлено у пациенток с CIN1. При утяжелении повреждения цервикального эпителия отмечено снижение встречаемости низкой степени интеграции вирусной ДНК до 1,6 раза при SCC. У больных с CIN2, CIN3 и SCC наблюдали умеренную, выраженную и полную степени интеграции ДНК ВПЧ 16 генотипа, что согласуется с результатами наших предыдущих исследований [3].

Наибольшее количество случаев с умеренной степенью интеграции вирусной ДНК – 23,5 и 26,7% выявлено, соответственно, у больных с CIN1 и CIN2. В ходе прогрессирования повреждения эпителия к инвазивному раку этот показатель уменьшился в 2,5 раза [3]. Количество случаев с выраженной и полной интеграцией ДНК ВПЧ 16 нарастало при утяжелении

Таблица
Степень интеграции ДНК ВПЧ 16 генотипа в ДНК клетки с учетом морфологических изменений

Морфология	% случаев интеграции ДНК ВПЧ				
	0	1–33	34–66	67–99	100
Эктопия шейки матки, n=10	60	40	–	–	–
Слабая дисплазия, n=5	20	80	–	–	–
Умеренная дисплазия, n=17	23,5	41,2	23,5	5,9	5,9
Тяжелая дисплазия, n=30	13,3	46,7	26,7	3,3	10
Ca in situ, n=15	20	60	20	–	–
Плоскоклеточный рак, n=10	20	50	10	10	10

процесса и достигало своих максимальных значений – по 10% при инвазивном плоскоклеточном раке.

Заключение. Полагаем, что у ВПЧ16-положительных пациенток до 80% случаев интраэпителиальной и инвазивной форм плоскоклеточного рака шейки матки были обусловлены интеграцией вирусной ДНК в ДНК клеток цервикального эпителия. Количество случаев с эпизодической формой ДНК, с низкой и умеренной степенью интеграции ДНК ВПЧ 16 генотипа снижалось при нарастании степени тяжести повреждения цервикального эпителия. Количество случаев с выраженной и полной интеграцией, наоборот, возрастало с утяжелением эпителиального повреждения.

Литература

1. Вязовая, А.А. Интеграция ДНК вируса папилломы человека 16 генотипа в геном клеток цервикального эпителия при фоновых процессах и неоплазии шейки матки / А.А. Вязовая [и др.] // Материалы II симпозиума с международным участием «Папилломавирусная инфекция и рак. Интегрированная система надзора и профилактики». – СПб.: Издат. НИИЭМ им. Пастера, 2011. – С. 12–14.
2. Евстигнеева, Л.А. Роль генотипа вируса папилломы человека, множественности вируса, вирусной нагрузки и иммунного статуса в патогенезе рака шейки матки / Л.А. Евстигнеева, Е.В. Бахидзе, В.В. Семиглазов // Учёные записки СПбГУ им. акад. И.П. Павлова. – 2008. – Т. 15, № 2. – С. 10–14.
3. Ершов, В.А. Репродукция вируса папилломы человека 16 генотипа и интеграция вирусной ДНК в измененном цервикальном эпителии / В.А. Ершов [и др.] // Онкология. Журн. им. П. А. Герцена. – 2013. – № 1. – С. 21–26.
4. Состояние онкологической помощи населению России в 2010 году / под ред. В.И. Чиссова, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. – М.: МНИОИ им. П. А. Герцена, 2011. – 188 с.
5. Andersson, S. Type distribution, viral load and integration status of high-risk human papillomaviruses in pre-stages of cervical cancer (CIN) / S. Andersson [et al.] // Br. j. cancer. – 2005. – Vol. 92. – P. 2195–2200.
6. Badaracco, G. HPV 16 and HPV 18 in genital tumors: significantly different levels in viral integration and correlation to tumor invasiveness / G. Badaracco // J. med. virol. – 2002. – Vol. 67. – P. 574–582.
7. Briolat, J. HPV prevalence, viral load and physical state of HPV-16 in cervical smears of patients with different grades of CIN / J. Briolat [et al.] // Int. j. cancer. – 2007. – Vol. 121, № 10. – P. 2198–2204.
8. Cricca, M. Viral DEOXYRIBONUCLEIC ACID load, physical status and E2/E6 ratio as markers to grade HPV16 positive women for high-grade cervical lesions / M. Cricca [et al.] // Gynecol. oncol. – 2007. – Vol. 106, № 3. – P. 549–557.
9. Doorbar, J. The papillomavirus life cycle / J. Doorbar // J. clin. virol. – 2005. – Vol. 32 (Suppl. 1). – S. 7–15.
10. Doorbar, J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer / J. Doorbar // Clin. science. – 2006. – Vol. 110. – P. 525–541.
11. Hanahan, D. The hallmarks of cancer / D. Hanahan, R. Weinberg // Cell. – 2000. – Vol. 100. – P. 57–70.
12. Jiang, M. Sequence variation of Human Papillomavirus type 16 and measurement of viral integration by quantitative PCR / M. Jiang [et al.] // J. clin. microbiol. – 2009. – Vol. 47, № 3. – P. 521–526.
13. Mole, S. RNA splicing factors regulated by HPV16 during cervical tumour progression / S. Mole [et al.] // J. pathol. – 2009. – Vol. 219, № 3. – P. 383–391.
14. Mole, S. Human papillomavirus type 16 E2 protein transcriptionally activates the promoter of a key cellular splicing factor, SF2/ASF / S. Mole, S. G. Milligan, S. V. Graham // J. virol. – 2009. – Vol. 83, № 1. – P. 357–367.
15. Nguyen, C. L. Human papillomavirus E7 protein deregulates mitosis via an association with nuclear mitotic apparatus protein 1 / C.L. Nguyen, K. Münger // J. virol. – 2009. – Vol. 83, № 4. – P. 1700–1707.
16. 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.
17. Pirami, L. Analysis of HPV 16, 18, 31 and 35 DEOXYRIBONUCLEIC ACID in preinvasive and invasive lesions of the uterine cervix / L. Pirami, V. Giache, A. Becciolini // J. clin. pathol. – 1997. – Vol. 50. – P. 600–604.
18. 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.
19. Thierry, F. Transcriptional regulation of the papillomavirus oncogenes by cellular and viral transcription factors in cervical carcinoma / F. Thierry // Virology. – 2009. – Vol. 384, № 2. – P. 375–379.

V.S. Chirsky, V.A. Ershov, A.A. Vyazovaya, O.V. Narvskaya

Grade of cervical intraepithelial lesion and physical status of human papilloma virus deoxyribonucleic acid genotype 16

Abstract. The 87 samples of human papillomavirus 16-positive patients were studied by histological method (biopsies) and by quantitative polymerase chain reaction (cervical samples). The physical status of deoxyribonucleic acid human papillomavirus of the 16th genotype defined on a parity of quantity of spears of virus genes E2 and E7. As a result polymerase chain reaction defined episomal, the mixed and integrated forms of deoxyribonucleic acid human papillomavirus. Low (from 1 up to 33%), moderated (from 34 up to 66%), expressed (from 67 up to 99%), full (100%) degrees of integration human papillomavirus 16 genotypes distinguished. In 10 cases verified ectopia of cervix uteri, in 5 cases – mild, in 17 – moderated, in 30 – the severe forms dysplasia, in 15 – carcinoma in situ, in 10 – squamous cell cancer. The episomal form of deoxyribonucleic acid human papillomavirus 16 genotype is revealed in 20 cases. The low degree of integration of deoxyribonucleic acid human papillomavirus is found out at 43, moderated degree – at 16, expressed degree – at 3, full degree – in 5 patients. In 80% cases of intraepithelial and invasive squamous cell cancer the epithelial lesions apparently could be associated with the integration of viral deoxyribonucleic acid into cellular deoxyribonucleic acid. The occurrence of episomal, low-grade and moderate-grade integration of deoxyribonucleic acid human papillomavirus 16 genotype decreased in 3, in 1,6, in 2,5 times respectively with the growth of grade of cervical squamous epithelial lesion. The occurrence of high-grade and full integration of viral deoxyribonucleic acid correlated with the increase of the grade of cervical squamous epithelial lesion and reached the maximal parameters at invasive squamous cell cancer.

Key words: cervix, cervical biopsy, polymerase chain reaction, pathology, dysplasia, ectopic, carcinogenesis, integration, deoxyribonucleic acid, human papillomavirus, squamous cell carcinoma.

Контактный телефон: т. 929-75-80; e-mail: v_chirsky@mail.ru