



## МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ В ДИАГНОСТИКЕ ЦЕРВИКАЛЬНОЙ ИНТРАЭПИТЕЛИАЛЬНОЙ НЕОПЛАЗИИ

Ю.Н. Пономарева<sup>1</sup>, И.Б. Манухин<sup>2</sup>, Л.А. Ашрафян<sup>3</sup><sup>1</sup>Московская областная больница №5; <sup>2</sup>кафедра акушерства и гинекологии МГМСУ; <sup>3</sup>ФГУ РНЦРР, Москва

## MOLECULAR BIOLOGICAL FACTORS IN THE DIAGNOSIS OF CERVICAL INTRAEPITHELIAL NEOPLASIAS

Yu.N. Ponomareva<sup>1</sup>, I.B. Manukhin<sup>2</sup>, L.A. Ashrafyan<sup>3</sup><sup>1</sup>Moscow Regional Hospital Five; <sup>2</sup>Department of Obstetrics and Gynecology, Moscow State University of Medicine and Dentistry; <sup>3</sup>Russian X-ray Radiology Research Center, Russian Agency for Medical Technologies, Moscow

*The authors have made a complex analysis of the molecular biological factors associated with cervical intraepithelial neoplasia. They have revealed that infection by oncogenic human papillomavirus types is associated with suppressed apoptosis and enhanced cellular proliferative activity, which can be effectively used in the diagnosis and prediction of cervical neoplasias to optimize management tactics and to improve the results of treatment.*

**Key words:** cervix uteri, cervical neoplasia, apoptosis, proliferation

Широкая распространенность, разнообразие патологических состояний и потенциальный риск злокачественной трансформации эпителия шейки матки (ШМ), определяют высокую значимость прогностических критериев возникновения и развития цервикальной интраэпителиальной неоплазии (ЦИН). Частота возникновения предраковых заболеваний ШМ составляет, по данным различных авторов, от 10,7 до 38,8%, опухолей от 3,7 до 22,5% [1–3].

На протяжении двух десятилетий рак ШМ (РШМ) остается одним из наиболее распространенных новообразований и составляет около 5% в структуре злокачественных опухолей у женщин [2]. Тенденцией настоящего времени является значительный рост заболеваемости среди молодых женщин, представляющих не только репродуктивно значимую часть населения, но и активную в социальном отношении группу [3, 4]. При этом в возрастной группе от 20 до 40 лет РШМ является основной причиной смерти среди всех больных злокачественными новообразованиями женской половой сферы [2].

Общепризнано, что проблема цервикальных опухолей связана не только с устойчиво высокой заболеваемостью раком, но и с трудностями диагностики эпителиальных дисплазий, представляющих собой один из этапов малигнизации цервикального эпителия. По мнению экспертов ВОЗ, РШМ, выявленный на стадии предрака, — полностью предотвратимое заболевание [5]. В связи с этим изучение механизмов цервикального онкогенеза с позиций взаимосвязи различных молекулярно-биологических маркеров при ЦИН и во время их прогрессии в рак представляет огромный клинический интерес.

**Материалы и методы**

Для изучения диагностической и прогностической значимости папилломавирусной инфекции (вирус папилломы человека — ВПЧ), регуляторов апоптоза и пролиферации клеток при ЦИН

проведено комплексное клиничко-морфологическое исследование 214 пациенток с морфологически подтвержденным диагнозом предрака ШМ. Возраст обследованных варьировал от 23 до 42 лет и составил в среднем  $35,3 \pm 8,1$  года.

Диагностика заболеваний шейки матки включала в себя клинические, кольпоскопические, цитогистологические и иммуногистохимические (ИГХ) методы исследования. Стадирование и систематизацию предраковых процессов ШМ проводили в соответствии с общепринятой Международной статистической классификацией болезней (1992), гистологической классификацией опухолей женского полового тракта ВОЗ (1995). В обследованной группе женщин у 62 ( $29 \pm 3,1\%$ ) пациенток выявлена ЦИН I, у 60 ( $28 \pm 3,1$ ) — II и у 92 ( $49 \pm 3,4$ ) — III степени.

При оценке цервикального биотопа определяли наличие ассоциированных с патологией ШМ сексуально-трансмиссивных инфекций: ВПЧ типов 6/11, 16/18, 31/33, 35/45, *Chlamydia trachomatis*, вируса простого герпеса (ВПГ)-430 1-го и 2-го типа, цитомегаловируса (ЦМВ)-500. Диагностика проводилась методом анализа полимеразной цепной реакции (ПЦР) по общепринятой методике с применением тест-систем АмплиСенс-100-R (Москва) [6]. Материалом для ПЦР-исследования служили соскобы эпителия цервикального канала и поражений ШМ, взятые одноразовыми зондами до проведения комплексного обследования и лечения заболеваний ШМ. Контрольную группу при определении типа ВПЧ составили 50 здоровых женщин без патологических изменений в ШМ, отобранных методом случайного выбора из общей популяции.

Определение мутантного гена-супрессора p53 (p53mut), антиапоптозного гена bcl-2, антигена ядер пролиферирующих клеток (Proliferating Cell Nuclear Antigen — PCNA) проведено ИГХ-методом с использованием моноклональных антител к p53mut

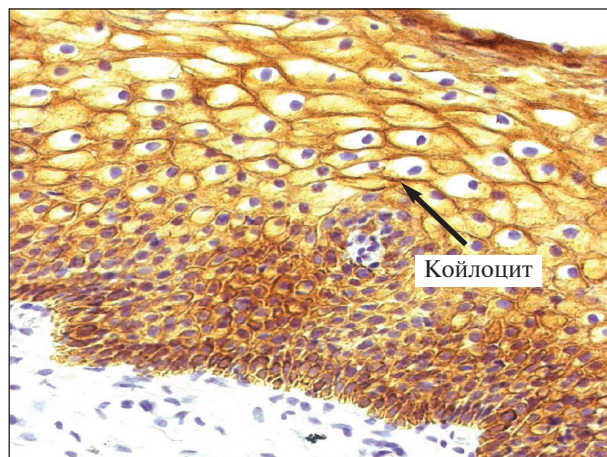
(клон D07, разведение 1:100, «Dako», Дания), bcl-2 (клон 124, рабочее разведение 1:20, «Dako», Дания) и PCNA (клон PC-10, предварительное разведение, «Dako», Дания). Для иммунного окрашивания использован стрептавидин-биотин-пероксидазный метод («Dako», Дания) [7]. Подсчет иммунопозитивных клеток проводился в 20 произвольно выбранных полях зрения при кратности увеличения  $\times 400$ . Индексы мечения p53mut и PCNA рассчитывали как отношение числа позитивно окрашенных ядер к общему числу ядер. При оценке bcl-2 определялось соотношение числа клеток с окрашенной цитоплазмой и общего количества клеток [8]. ИГХ-исследование проведено с применением биопратов ШМ, полученных до начала лечения пациенток. Контрольную группу составили 10 образцов морфологически неизмененных тканей ШМ.

Данные представлены в виде  $M \pm m$ , где  $M$  — среднее арифметическое,  $m$  — ошибка среднего. Для оценки статистически значимых различий полученных данных использовали критерий Стьюдента ( $t$ ), критический уровень значимости принимался меньшим или равным 0,05. В табл. 1–4 приведены коэффициенты только статистически значимых различий.

### Результаты и обсуждение

В ходе исследования обнаружено, что в подавляющем большинстве случаев ЦИН ассоциированы с ВПЧ-инфицированием. В многочисленных данных литературы продемонстрирована высокая клиническая значимость диагностики ВПЧ [1, 3, 5, 9, 10]. Это определяется необходимостью формирования групп онкологического риска с выявлением тех пациенток, которым показано проведение активной комплексной профилактики и доклинической диагностики РШМ.

Характерными для ВПЧ клетками считаются койлоциты, образующиеся в тканях в результате цитопатического эффекта вирусов и представляющие собой клетки плоского эпителия промежуточного типа неправильной формы с увеличенными в разной степени ядрами, неровной складчатой мембраной, гиперхроматозом и выраженной перинуклеарной зоной просветления [9, 10]. В группе обследованных у  $53,2 \pm 3,4\%$  больных неоплазиями отмечена койлоцитарная атипия цервикального эпителия (см. рисунок).



Образец цервикального эпителия с койлоцитарной атипией клеток при инфицировании ВПЧ. Окрашивание гематоксилин-эозином,  $\times 400$

В настоящее время основным методом идентификации папилломавирусной инфекции является молекулярно-биологическое выявление ДНК ВПЧ различных типов. Известно, что около 12 типов ВПЧ — потенциально онкогенные [1, 9].

При определении типа ВПЧ (см. табл. 1) обнаружено, что частота выявления ДНК-последовательности ВПЧ у женщин с неизмененным цервикальным эпителием соотносилась с аналогичными показателями при ЦИН. Достаточно высокий уровень инфицированности среди здоровых женщин ( $12 \pm 4,6\%$ )

Таблица 1. Распределение типов ВПЧ у обследованных женщин

| Тип ВПЧ   | Число пациенток, % инфицированных |                             |                                                         |                                            |
|-----------|-----------------------------------|-----------------------------|---------------------------------------------------------|--------------------------------------------|
|           | Контроль<br>(n=50)                | ЦИН I степени<br>(n=62)     | ЦИН II степени<br>(n=60)                                | ЦИН III степени<br>(n=92)                  |
| 6         | $6 \pm 3,4$                       | $9,7 \pm 3,8$               | $6,7 \pm 3,2$                                           | —                                          |
| 11        | $4 \pm 2,8$                       | $6,5 \pm 3,1$               | $3,3 \pm 2,3$                                           | $1,1 \pm 1,1$                              |
| 16        | $2 \pm 2$                         | $9,7 \pm 3,8$               | $13,3 \pm 4,4$<br>$p=0,031$<br>$p_2=0,003$              | $34,8 \pm 5$<br>$p<0,001$<br>$p_1=0,009$   |
| 18        | —                                 | $3,2 \pm 2,2$               | $6,7 \pm 3,2$<br>$p_2=0,038$                            | $18,4 \pm 4$<br>$p_1=0,004$                |
| 31        | —                                 | —                           | —                                                       | $4,4 \pm 2,1$                              |
| 33        | —                                 | —                           | $3,3 \pm 2,3$                                           | $3,3 \pm 1,9$                              |
| 35        | —                                 | —                           | —                                                       | $5,4 \pm 2,4$                              |
| 45        | —                                 | —                           | $6,7 \pm 3,2$                                           | $4,4 \pm 2,1$                              |
| Смешанный | —                                 | —                           | $10,0 \pm 3,9$                                          | $6,5 \pm 2,6$                              |
| Итого ... | $12,0 \pm 4,6$                    | $29,1 \pm 5,8$<br>$p=0,028$ | $50 \pm 6,5$<br>$p<0,001$<br>$p_1=0,018$<br>$p_2<0,001$ | $78,3 \pm 4,3$<br>$p<0,001$<br>$p_1<0,001$ |

Примечание.  $p$  — статистическая значимость различий по сравнению с группой контроля;  $p_1$  — с ЦИН I;  $p_2$  — с ЦИН III степени.

Таблица 2. Экспрессия p53mut при ЦИН

| Экспрессия p53mut           | Число пациенток, % |           |                                      |
|-----------------------------|--------------------|-----------|--------------------------------------|
|                             | I (n=62)           | II (n=60) | III (n=92)                           |
| Число положительных случаев | 6,5±3,1            | 16,7±4,8  | 40,2±5,1<br>$p<0,001$<br>$p_1=0,002$ |
| Уровень экспрессии          | 4,8±1,2            | 2,3±1,2   | 13,1±2,9<br>$p=0,048$<br>$p_1=0,013$ |

Примечание.  $p$  — статистическая значимость различий с ЦИН I степени;  $p_1$  — с ЦИН II степени.

обусловлен преимущественно папилломавирусами популяционного риска — 6-го и 11-го типов и лишь в 2±2% наблюдений отмечен ВПЧ 16-го типа.

ВПЧ 6-го и 11-го типов также идентифицировались при ЦИН I—II степени и редко встречались при III степени заболевания. Из онкогенных типов ВПЧ при ЦИН преобладающим был 16-й тип вируса, он достоверно чаще встречался при тяжелой степени поражения ШМ. Отмечена прямая корреляционная зависимость между выявляемым в цервикальном эпителии 16, 18, 31, 33, 35, 45-го типов ВПЧ, которые принято рассматривать как канцерогенные, и степенью тяжести предраковых изменений ШМ. Так, коэффициент корреляции  $r$  между инфицированием ВПЧ и тяжестью поражения эпителиального пласта при ЦИН I степени составил 0,762 ( $p=0,001$ ), при ЦИН II — 0,862 ( $p=0,047$ ) и при ЦИН III степени — 0,835 ( $p=0,037$ ).

Многочисленные данные литературы свидетельствуют о том, что наиболее выраженное цитопатическое действие на цервикальный эпителий с формированием стойких неспецифических патологических изменений с хронизацией процесса и усилением дисбаланса между пролиферацией и апоптозом клеток оказывают ассоциированные сексуально-трансмиссивные инфекции [1, 3, 9, 11].

При изучении особенностей распределения смешанных сексуально-трансмиссивных инфек-

ций в зависимости от степени тяжести ЦИН установлено, что частота выявления хламидийно-папилломавирусной инфекции составила 16,8±2,6%. Именно с этим вариантом инфицирования, за исключением моноинфекции ВПЧ, связано развитие эпителиальных дисплазий ШМ с тенденцией увеличения числа инфицированных пациенток при ЦИН II—III степени. Значительно реже по сравнению с хламидийной инфекцией встречалось сочетание ВПЧ с ЦМВ и ВПГ — 5,1±1,5 и 6,1±1,6% ( $p=0,004$  и  $p=0,034$ ) соответственно.

Постоянство клеточного состава эпителия ШМ поддерживают строго скоординированные между собой процессы: пролиферация, дифференцировка и апоптоз клеток [11, 12], одними из основных регуляторов которых считаются онкогены p53 и bcl-2.

При исследовании p53mut и bcl-2 выявлены следующие особенности их экспрессии при ЦИН. Онкоген p53mut определялся в 21,3±4,2% случаев ЦИН (см. табл. 2), в здоровых тканях ШМ этого онкогена не обнаружено. Число p53mut-позитивных случаев и средние значения экспрессии p53mut при ЦИН I и II степени не различались в отличие от ЦИН III степени, при которой экспрессия p53mut встречалась более чем в 40% наблюдений и превышала 13% окрашенных ядер.

Только в 2,3±1% случаев одновременно с p53mut определялся bcl-2. В большинстве наблюдений обнаружены bcl-2-позитивные поражения при отсутствии экспрессии p53mut, либо bcl-2-негативные образцы экспрессировали p53mut. Рядом исследователей показано, что регуляция экспрессии bcl-2 по принципу обратной связи ассоциирована с геном p53 и вполне вероятно, что в регуляции экспрессии bcl-2 может участвовать не только нормальный p53, но и его мутированный тип, при этом определенный уровень продукции p53 способен нивелировать гиперэкспрессию bcl-2 [13].

В цервикальном эпителии здоровых женщин bcl-2 определялся преимущественно в базальной части эпителиального пласта, а уровень его экспрессии не превышал 4% клеток. При ЦИН I—II степени частота и уровень экспрессии bcl-2 не отличались от показателей группы контроля. Отличительной чертой ЦИН III степени явилось уменьшение случаев определения bcl-2 с появлением образцов с гиперэкспрессией этого онкогена (см. табл. 3).

Представленные данные показывают, что появление p53mut и aberrантная экспрессия bcl-2 имеют критическое значение в процессе развития неопластических изменений цервикального

Таблица 3. Экспрессия bcl-2 в неизменном цервикальном эпителии и при ЦИН

| Экспрессия bcl-2            | Число пациенток, % |                         |                        |                        |
|-----------------------------|--------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|
|                             | контроль (n=10)    | ЦИН I степени (n=62)    | ЦИН II степени (n=60)  | ЦИН III степени (n=92) |
| Число положительных случаев | 90±9,5             | 87,1±4,3<br>$p_1<0,001$ | 80±5,6<br>$p_1<0,001$  | 51,1±5,2<br>$p=0,018$  |
| Уровень экспрессии          | 2,1±0,3            | 4,5±0,6<br>$p_1=0,006$  | 6,3±1,4<br>$p_1=0,048$ | 12,4±2<br>$p=0,044$    |
| Число отрицательных случаев | 10±9,5             | 12,9±4,3<br>$p_1<0,001$ | 20±5,6<br>$p_1<0,001$  | 48,9±5,2<br>$p=0,018$  |

Примечание. Здесь и в табл. 4:  $p$  — статистическая значимость различий по сравнению с группой контроля;  $p_1$  — с ЦИН III степени.

эпителия в результате нарушения гибели инфицированных клеток, что закономерно приводит к их нерегулируемой пролиферации. Так, при ЦИН число PCNA-позитивных клеток возрастало более чем в 5 раз по сравнению с показателями контрольной группы, при этом пролиферирующие клетки занимали большую часть толщины эпителиального пласта, составляя в среднем от 10 до 30% (см. табл. 4). Показатели экспрессии PCNA при ЦИН I и II степени не отличались. Цервикальные неоплазии тяжелой степени характеризовались значительным увеличением пролиферативной активности клеток по сравнению с таковой в группе контроля и соответствующими показателями при ЦИН I—II степени.

Таким образом, проведенное исследование свидетельствует о достаточно высокой распространенности ВПЧ у здоровых женщин, которые формируют группу потенциального риска осуществления злокачественной трансформации цервикального эпителия. Определение ВПЧ как диагностического критерия неопластических процессов ШМ в ряде случаев не позволяет прогнозировать развитие цервикального рака, так как в большинстве наблюдений инфицирование имеет кратковременный характер и заканчивается спонтанным выздоровлением и элиминацией вируса. Однако прогностическая значимость ВПЧ-тестирования значительно возрастает, в случае если на фоне ВПЧ-инфицирования уже имеется картина ЦИН, что может свидетельствовать о наличии канцерогенного риска. Длительная персистенция вирусов сопровождается их интеграцией в клеточный геном и появлением мутаций, причем неопластическая трансформация возникает с большей вероятностью при взаимодействии папилломавирусов с другими сексуально-трансмиссивными инфекциями — хламидиями, ВПГ и ЦМВ [9, 10].

Известно, что изменения в генетическом аппарате инфицированных клеток могут быть обусловлены нарушением программы клеточной гибели. Одним из механизмов нарушения апоптоза являются мутации в генах, контролирующих гибель клеток.

**Таблица 4.** *Уровень экспрессии PCNA в неизменном цервикальном эпителии и при ЦИН*

| Группа               | Число пациенток, %              |
|----------------------|---------------------------------|
| Контроль (n=10)      | 3,5±1,5                         |
| Степень ЦИН I (n=62) | 15,5±3,3<br>p=0,053<br>p'=0,045 |
| II (n=60)            | 15,5±3<br>p=0,03<br>p'=0,048    |
| III (n=92)           | 28,6±4,3<br>p=0,023             |

p — статистическая значимость различий с контролем; p' — статистическая значимость различий с CIN III.

В ряду этих процессов находятся потеря функций гена-супрессора опухолевого роста p53 в результате его превращения в мутантный тип и гиперэкспрессия протоонкогена bcl-2. В результате проведенных исследований показано увеличение продукции p53mut по мере нарастания неопластических изменений ШМ и уменьшение частоты определения bcl-2 с высоким уровнем экспрессии этого онкогена в bcl-2-положительных случаях. Генетические нарушения посредством изменения темпов гибели клеток влияют на пролиферативную активность, динамически возрастающую при ЦИН, и создают условия для неконтролируемого роста клеток.

Совокупность указанных молекулярно-биологических особенностей течения ЦИН имеет определяющее значение в развитии предрака ШМ и его клиническом течении. Выявление сексуально-трансмиссивных инфекций с типированием вирусов папиллом, определение уровня p53mut, bcl-2, пролиферативной активности могут эффективно использоваться в комплексной диагностике ЦИН, благодаря формированию дифференцированного подхода к тактике ведения, выбору метода терапии и прогнозированию заболевания.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Бохман Я.В. Руководство по онкогинекологии. Л.: Медицина, 1989.
2. Злокачественные новообразования в России и странах СНГ в 2002 г. Под ред. М.И. Давыдова, Е.М. Аксель. М.: РОНЦ им. Н.Н. Блохина, РАМН, 2004.
3. Кулаков В.И., Тохиян А.А. Проблемы злокачественных новообразований репродуктивной системы в практике гинеколога. Журн акуш жен бол-езн 2002; LI(вып 1):9—12.
4. Новикова Е.Г. Диагностика предраковых заболеваний и начальных форм рака шейки матки. Заболевания шейки матки, влагалища и вульвы (Клинические лекции). Под ред. В.Н. Прилепской. М.: МЕДпресс, 2000. с. 153—60.
5. Кондриков Н.И., Прилепская В.Н. IX Всемирный конгресс по патологии шейки матки и кольпоскопии. Акуш гинекол 1996;(6):51—2.
6. Бауэр Х.М., Грир К.Е., Мано М.М. Применение ПЦР для диагностики папилломавирусных инфекций гениталий. В кн.: Молекулярная клиническая диагностика. Методы. Пер. с англ. Под ред. С. Херрингтон, Дж. Макги. М.: Мир, 1999.
7. Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека. Под ред. С.В. Петрова, Н.Т. Райхлина. Казань, 2004.
8. Эллиниди В.Н., Аникеева Н.В., Максимова Н.А. Практическая иммуноцитохимия. СПб.: ВЦЭРМ МЧС России, 2002.
9. Минкина Г.Н., Манухин И.Б., Франк Г.А. Предрак шейки матки. М.: Аэрограф-медиа, 2001.
10. Schlecht N.F., Kulaga S., Ferreira S. et al. Persistent human papillomavirus infection as a predictor of cervical intraepithelial neoplasia. JAMA 2001;286(24):3106—14.
11. Hale A.J., Smith C.A., Sutherland L.C. et al. Apoptosis: molecular regulation of cell death. Eur J Biochem 1996;236(1):26.
12. Лушников Е.Ф., Абросимов А.Ю. Гибель клетки (апоптоз). М.: Медицина, 2001.
13. Liang J.Y., Jiang J.X., An X.H. et al. Bcl-2 protooncogene expression in cervical carcinoma cell lines containing inactive p53. J Cell Biochem 1995;57(3):509—21.