

УДК 578.76:[618.16-005.52+618.146-002.446

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ВИРУСОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ МАРКЕРОВ ПРОЛИФЕРАЦИИ У ПАЦИЕНТОК С ЛАТЕНТНЫМИ ФОРМАМИ ПАПИЛЛОМАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ И ЦЕРВИКАЛЬНЫМ ИНТРАЭПИТЕЛИАЛЬНЫМ ПОРАЖЕНИЕМ ЛЕГКОЙ СТЕПЕНИ

Боровиков И.О.¹, Холина Л.А.¹, Кравцова Е.И.¹, Авакимян В.А.¹, Никогда Ю.В.¹

¹ГБОУ ВПО «Кубанский государственный медицинский университет» Минздрава России, Краснодар, e-mail: bio2302@gmail.com

Проведенный анализ с определением типа вируса папилломы человека, вирусной нагрузки, онкобелка E7, маркеров пролиферации (p16ink4a и Ki-67) и соотношения метаболитов эстрогенов (2-ONE1/16-αONE1) у пациенток с латентными формами ПВИ и цервикальными интраэпителиальными неоплазиями легкой степени выявили значительные отличия между группами. Основными типами вируса папилломы человека при латентных формах ПВИ, как и при цервикальных неоплазиях, являлись типы 16 (53,7±2,2%), 18 (19,4±2,1%), 31 (11,5±1,7%) и 51 (15,1±1,9%). При этом в группе пациенток с CIN I высокая вирусная нагрузка встречалась в среднем в 2 раза чаще, чем при латентных формах ПВИ. С появлением клинических признаков папилломавирусной инфекции экспрессия онкобелка E7 возрастает в 5 раз, а гиперэкспрессия маркеров пролиферации p16ink4a и Ki-67 в 3 раза. А сочетание низкого коэффициента 2-ONE1/16α-ONE1 (менее 1,5) с положительным тестом на онкобелок E7 и коэкспрессией биомаркеров p16ink4D и Ki-67 является прогностически неблагоприятным фактором в плане утяжеления пролиферативных процессов в шейке матки.

Ключевые слова: шейка матки, латентная форма папилломавирусной инфекции, цервикальная интраэпителиальная неоплазия, вирусная нагрузка, маркеры пролиферации.

COMPARATIVE ANALYSIS OF VIROLOGICAL INVESTIGATION AND DEFINITION OF MARKERS OF CELL PROLIFERATION IN PATIENTS WITH LATENT FORMS OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS INFECTION AND CERVICAL INTRAEPITHELIAL LESIONS

Borovikov I.O.¹, Kholina L.A.¹, Kravtcova E.I.¹, Avakimyan V.A.¹, Nikogda J.V.¹

¹Kuban state medical university, Krasnodar, e-mail: bio2302@gmail.com

The analysis to the definition of the type of human papillomavirus, viral load's oncogenic protein E7, proliferation markers (p16ink4a and Ki-67) and the ratio of estrogen metabolites (2-ONE1/16-αONE1) in patients with latent forms of HPV and cervical intraepithelial neoplasia grade 1 revealed significant differences between the groups. The main types of human papilloma virus in latent forms of HPV, as with cervical intraepithelial neoplasia were 16 types (53.7%), 2.2 ± 18 (19.4 ± 2.1%), 31 (11.5 ± 1.7%) and 51 (15.1 ± 1.9%). In the group of patients with CIN I met a high viral load, on average 2 times more often than the latent forms of HPV. However, with the advent of clinical signs of HPV's oncogenic protein expression E7 infection increases 5 times, and overexpression of proliferation markers p16ink4a and Ki-67 in 3 times. But a combination of low 2-ONE1/16α-ONE1 (less than 1.5) with a positive test for oncoprotein E7 and coexpression biomarkers p16ink4D and Ki-67 is an adverse prognostic factor in terms of the weighting of proliferative processes in the cervix.

Keywords: cervix, the latent form of the human papilloma virus, cervical intraepithelial neoplasia, viral load, markers of cell proliferation.

Распространённость вируса папилломы человека (ВПЧ) чрезвычайно велика, у женщин тот или иной тип ВПЧ присутствует у 40-80% обследованных, однако клинически выраженные поражения бывают у 1-3%, субклиническое течение - у 13-34% [2]. В остальных случаях имеет место латентная инфекция. В настоящее время успехи молекулярной биологии дают нам

возможность как выявлять присутствие вируса папилломы человека в пораженных тканях, так и произвести их разделение на типы. Сейчас доказана связь рака шейки матки с определенными типами вируса папилломы человека. Ряд исследователей полагает, что 10-15% всех раков у человека связаны с папилломавирусами [1; 5; 12]. Цервикальные интраэпителиальные неоплазии (CIN) – наиболее частые заболевания, ассоциированные с папилломавирусной инфекцией (ПВИ), являются предраковыми поражениями шейки матки [2; 6]. Персистенция вируса с длительной активной экспрессией вирусных онкогенов инициирует многостадийный процесс, в результате которого клетки эпителия шейки матки претерпевают изменения, способствующие опухолевой прогрессии [1; 3]. При этом именно латентная форма ПВИ представляет наибольшую актуальность в начальном аспекте патогенеза, поскольку именно понимание механизма возникновения и прогрессирования процесса на данной стадии дает нам возможность в последующем разработать наиболее эффективную и «щадящую» терапию. При этом многие авторы приходят к выводу, что инфицирование эпителиальных клеток ВПЧ – необходимое, но недостаточное событие для возникновения цервикальных неоплазий [4; 5; 7]. В настоящее время в литературе обсуждаются различные иммунные и цитобиохимические, микробиологические нарушения в генезе предраковых заболеваний шейки матки [2; 8; 9]. Активно изучается состояние микробиоценоза цервико-вагинальной области и роль его нарушений в активации ВПЧ [4; 7]. Кроме того, велика роль экспрессии генов E6 и E7, кодирующих эти онкобелки эпителиальных клетках с интегрированной формой ВПЧ. Основным свойством этих белков является взаимодействие с продуктом гена Rb, с убиквитинизацией последнего и высвобождением из комплекса pRb-E2F транскрипционного фактора E2F, регулирующего клеточную пролиферацию [1; 8; 10]. Высокая активность фактора E2F приводит к апоптозу в клетках, экспрессирующих E7, и активизации синтеза ингибитора циклинзависимых киназ p16INK4A. В пролиферирующих HPV-инфицированных клетках существует механизм защиты от малигнизации путем подавления функций вирусных онкобелков за счет ингибиторов циклинзависимых киназ, в первую очередь p16INK4A. Однако, несмотря на высокий уровень p16INK4A, этот белок остается функционально неактивным, так как E7 также активирует циклины A и E, стимулирующие вход в S-фазу клеточного цикла. Это индуцирует анеуплоидию, вызывая амплификацию центриолей на ранних стадиях канцерогенеза [10]. Вышеперечисленные процессы, происходящие на локальном уровне, способствуют переходу бессимптомного ВПЧ-носительства в клиническую форму с последующей возможностью малигнизации.

Цель исследования: оценка прогностической ценности комплексного исследования с определением вирусной нагрузки и маркеров пролиферации у пациенток с латентными формами ПВИ и цервикальной интраэпителиальной неоплазией.

Материалы и методы

В ходе выполнения работы было обследовано 90 женщин с латентными формами ПВИ и 130 - с цервикальной интраэпителиальной неоплазией легкой степени (CIN I), находившихся на лечении в базовой акушерско-гинекологической клинике КубГМУ, женских консультациях № 1 и 4 г. Краснодара, Краевом перинатальном центре ГБУЗ ДККБ. Диагноз ПВИ устанавливался на основании клинико-микробиологического и цитологического обследования (жидкостная цитология – ThinPrep®). Диагностику инфицированности различными типами ВПЧ проводили с помощью ПЦР-тест-системы «АмплиСенс® FRT ВПЧ ВКР Генотип» (Россия) (набор реагентов для выявления и генотипирования ВПЧ высокого канцерогенного риска 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 и 59 типов). Определение маркера p16 ВПЧ ВКР проводили с помощью набора реагентов для иммуноцитохимического исследования «Cintec-Цитология» компании MTM laboratries AG (Германия). Соотношения метаболитов 2-OHE1/16- α OHE1 в моче определяли с использованием тест-системы ESTRAMET 2/16 ELISA (конкурентный метод твердофазного иммуноферментного анализа).

Статистическую обработку данных проводили в соответствии с методами, принятыми в вариационной статистике, с использованием свободного программного обеспечения – системы статистического анализа R (R Development Core Team, 2008, достоверным считали различие при $p < 0,05$). Для оценки корреляционных взаимосвязей отдельных изучаемых параметров использовали коэффициент Пирсона (r).

Результаты и обсуждение

Вирусологический анализ латентных форм ПВИ и больных ВПЧ-ассоциированной цервикальной интраэпителиальной неоплазией

Известно, и подтверждено в проведенном исследовании, что основными возбудителями ВПЧ-ассоциированной патологии шейки матки являются вирусы папилломы человека высокого онкогенного риска (в 100% случаев выявлены «чистые» высокоонкогенные типы вируса папилломы человека или их сочетание с низкоонкогенными). Основными типами вируса папилломы человека при латентных формах ПВИ, как и при цервикальных неоплазиях, являлись типы 16 ($53,7 \pm 2,2\%$), 18 ($19,4 \pm 2,1\%$), 31 ($11,5 \pm 1,7\%$) и 51 ($15,1 \pm 1,9\%$). Сочетания нескольких типов ВПЧ зарегистрировано в $41,2 \pm 1,4\%$ образцов. Различия между группами по эпидемиологическому преобладанию того или иного типа вируса папилломы человека были

недостовверны ($p>0,05$). Кроме качественного типирования вируса папилломы человека, изучали количественную вирусную нагрузку основных его высококанцерогенных типов. Оценка вирусной нагрузки 16, 18 31 и 51 типов ВПЧ (в случае их обнаружения). Отобрано в общей сложности 206 пациенток (84 с латентной формой ПВИ, 122 с CIN I). Высокой вирусная нагрузка считалась в концентрации ВПЧ >5 lg, средняя (3-5 lg) и низкая (<3 lg). Высокая вирусная нагрузка для ВПЧ 16 типа установлена в целом у $73,9\pm 26,3\%$ пациенток, причем при латентной форме ПВИ она была высокой лишь в 42,9% случаев, зато при CIN I в большинстве случаев нагрузка была высокой (84,3%) (рис. 1).

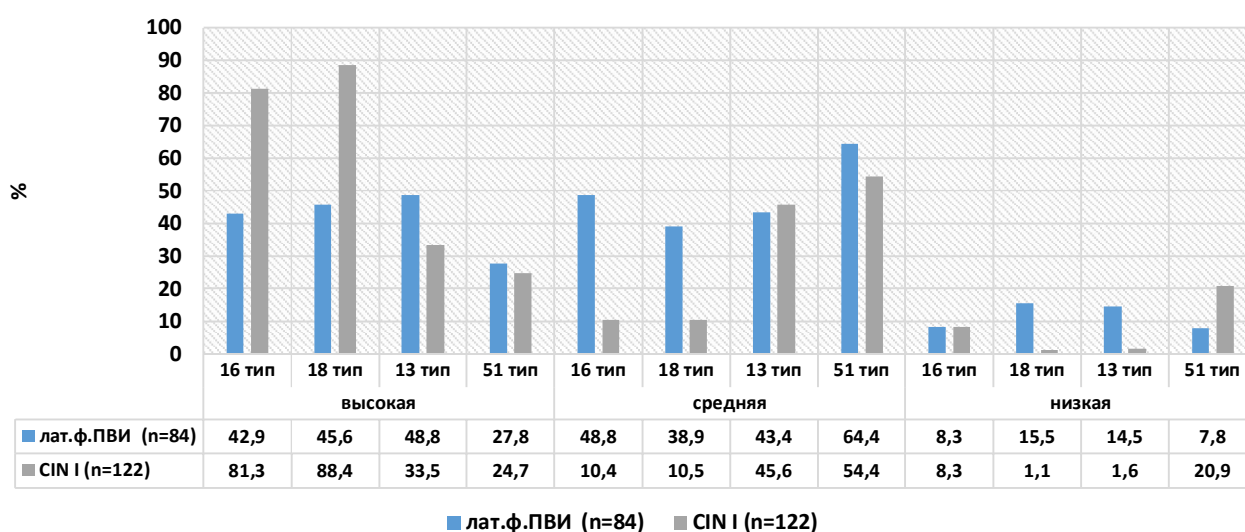


Рис. 1. Вирусная нагрузка ВПЧ 16, 18, 13 и 51 типов

Такая же ситуация для ВПЧ 18 типа: высокая вирусная нагрузка отмечена в целом в $75,8\pm 29,6\%$ образцов, но при этом она определялась лишь у 45,6% пациенток с латентным ВПЧ-носительством (38,9% имели среднюю вирусную нагрузку), а при CIN I высокая вирусная нагрузка была у 88,4% больных. Оценка вирусной нагрузки ВПЧ 13 и 51 типов показала несколько другие результаты: высокая нагрузка ВПЧ была у $32,9\pm 21,1\%$ пациенток с выявленным 13 типом ВПЧ (48,8% при латентной форме и 33,5-16,5% соответственно при CIN I), для 51 типа высокая нагрузка вирусами была в среднем в $23,8\pm 6,3\%$ исследованных образцов (латентная форма – 27,8%, CIN I – 24,7%). Это свидетельствует, что, несмотря на начавшееся распространение на территории Краснодарского края ВПЧ 13 и 51 типов, они в настоящее время не имеют высокой вирусной нагрузки, и чаще всего вызывают транзитное носительство. Таким образом, еще раз доказано преобладание вирусов папилломы человека высокого онкогенного риска (а именно 16 и 18 типов) в реализации неопластических процессов в шейке

матки. При этом чаще всего переход латентной формы ВПЧ в цервикальную неоплазию требует наличия большой концентрации вирусов, т.е. высокой вирусной нагрузки.

Определение онкобелка E7, экспрессии p16ink4D и Ki-67, соотношения метаболитов 2-гидроксиэстрогена и 16-α-гидроксиэстрогена (2-OHE1/16α-OHE1) у пациенток с латентными формами ПВИ и больных CIN I

В группах проводилась детекция вирусного мРНК онкопротеина E7 в цервикальных пробах методом ПЦР 16, 18 и 31 типа вируса папилломы человека, с использованием соответствующих комплектов реагентов НПО «ДНК-технология» и «Силекс» (Москва).

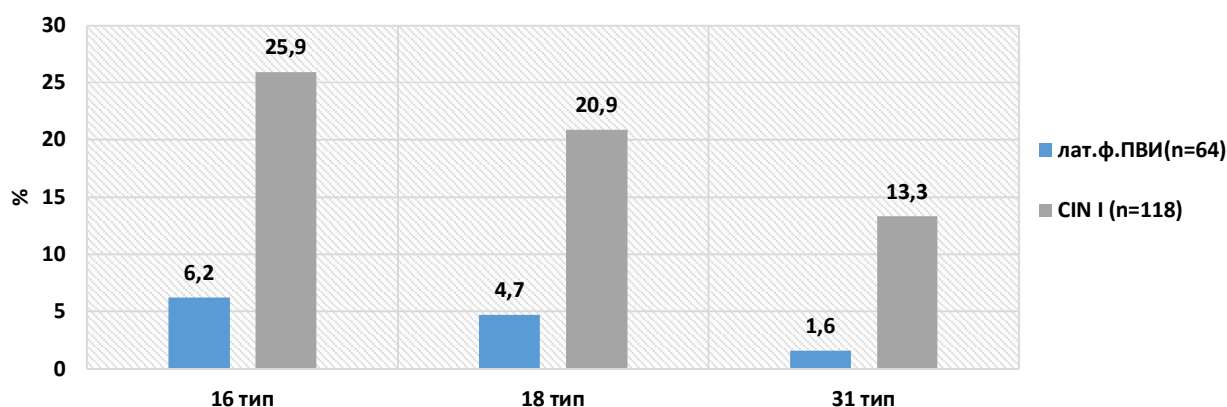


Рис. 2. Положительный ПЦР на мРНК онкобелка E7 16, 18 и 31 типов

Исследование в наших группах проведено у пациенток с идентифицированными в ходе исследования вирусами типов 16, 18 и 31 отдельно и в сочетании (64 женщины с латентной формой ВПЧ, 118 – с CIN I) (рис. 2). ПЦР-анализ обнаружения онкобелка E7 выявил, что при латентной форме ПВИ детекция мРНК ВПЧ 16, 18 и 31 типов была в среднем $4,1 \pm 2,7\%$ (наиболее часто (6,2%) определялся ВПЧ 16 типа) ($p=0,005$). В группах больных цервикальными неоплазиями детекция E7 при данных типах ВПЧ выявила на порядок больший процент: в среднем $20,2 \pm 4,7\%$ ($p=0,05$). То есть по мере активации индуцированного ВПЧ инфекционного процесса экспрессия онкобелка E7 увеличивается в 5 раз. При проведении кольпоскопии нами брались цитологические образцы, которые в дальнейшем подвергались иммуноцитохимическому исследованию на наличие экспрессии p16ink4α и Ki-67. При получении позитивной реакции оценивалась количественная составляющая экспрессии (диффузная и фокальная) в виде единичных клеток и гиперэкспрессии p16, Ki-67, а также производилась оценка коэкспрессии p16ink4α и Ki-67 (рис. 3). Всего позитивных p16ink4α пациенток исследуемых групп выявлено $22,4 \pm 12,7\%$ (11,7% латентных ВПЧ-носителей, 33,1% пациенток CIN I).

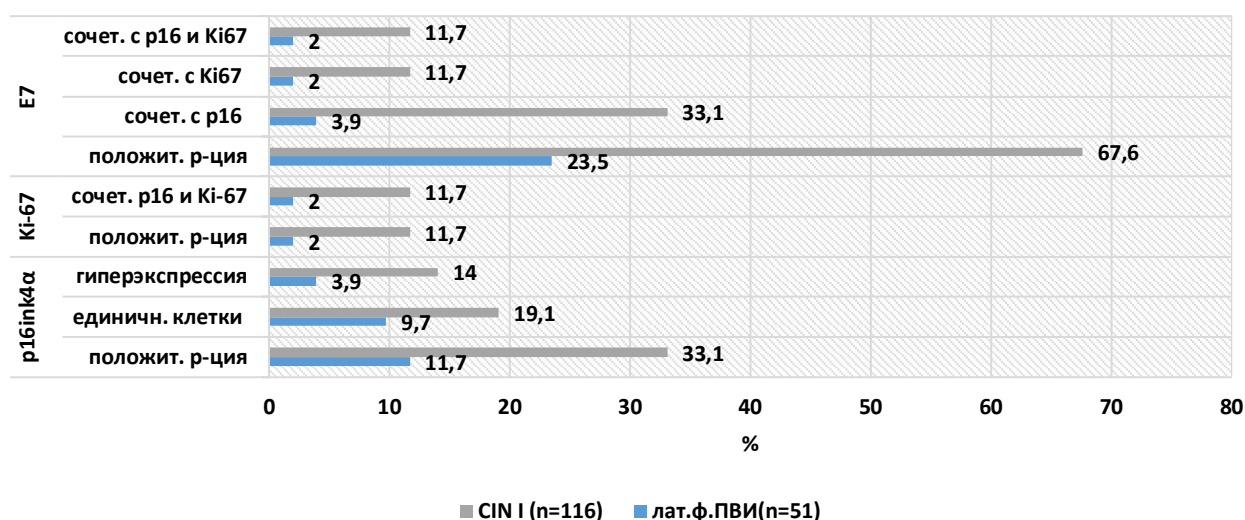


Рис. 3. Сравнительная характеристика частоты выявления p16ink4a, Ki67 и E7

У больных с CIN I единичные p16-позитивные клетки с цитоплазматической реакцией встречались в 19,1% образцов, в группе женщин с латентной формой ПВИ зарегистрирован единственный случай гиперэкспрессии p16 – 2,6% ($p=0,0001$). При детекции экспрессии Ki-67 выявлено заметное его преобладание в группе больных CIN I (60,7%), что в 5 раз больше, чем при латентных формах ПВИ ($p=0,001$; $p=0,005$). Коэкспрессия биомаркеров p16ink4D и Ki-67 преобладала в группе больных CIN I с таким же результатом ($p=0,001$ и $p=0,005$ соответственно). Корреляционный анализ по Спирмену установил прямую средней силы связь между CIN, p16 и Ki-67 ($rs=+0,41$; $p<0,001$). Оценка совместной экспрессии маркеров p16ink4D и Ki-67 у E7-позитивных женщин установила аналогичные статистически значимые изменения. Полученные нами данные позволяют сказать, что детекция онкомаркера p16 и маркера пролиферации Ki-67 при ПВИ зависит от пролиферативной активности клеток, пораженных вирусом. Это диктует необходимость более широкого использования определения маркеров E7, p16 и Ki-67 при первичном скрининге, что позволит усовершенствовать тактику ведения больных с различными формами ПВИ.

Наряду с экспрессией онкобелка E7, гиперэкспрессией онкобелка p16ink4a и обнаружением маркера пролиферации Ki-67, показательным фактом неблагоприятного влияния ВПЧ-инфекции на экзо- и эндоцервикс считается нарушенный обмен метаболитов эстрогена 2-ОНЕ1 и 16α-ОНЕ1. Проведенный анализ соотношения этих метаболитов эстрогена у пациенток с выявленными вирусами типов 16, 18 и 31 отдельно и в сочетании (206 женщин), показал, что только у 32,8% латентных ВПЧ-носителей и у 17,5±4,7% больных CIN данный показатель

соответствует уровню здоровых женщин (в среднем $2,33 \pm 0,11$ для вирусоносителей и $21,1 \pm 0,14$ для пациенток с CIN I). У $72,1 \pm 6,1\%$ больных цервикальными неоплазиями баланс метаболитов эстрогена оказался измененным, при этом уровень 16α -ОНЕ1 превышал 2-ОНЕ1 в 2 и более раз, что выражалось в снижении значений до 0,2. Наибольшее количество женщин с латентной ВПЧ-инфекцией (39,1%) имело соотношение $1,52 \pm 0,28$ (отличия от здоровых статистически значимы - $p < 0,05$). Корреляционный анализ по Спирмену установил прямую средней силы связь между степенью CIN и снижением коэффициента 2-ОНЕ1/ 16α -ОНЕ1 менее 1,5 ($r_s = +0,28$; $p < 0,001$). При значительном повышении 16α -ОНЕ1, когда у наших пациенток коэффициент 2-ОНЕ1/ 16α -ОНЕ1 был менее 1,5, мы выяснили сочетание данного коэффициента с положительным тестом на онкобелок E7 и коэкспрессией биомаркеров p16ink4D и Ki-67 (рис. 4). При этом выявлены заметные отличия в группе CIN I по сравнению с латентным ВПЧ-носительством. Коэкспрессия биомаркеров p16ink4D и Ki-67 в группе больных CIN I встречалась в 5,85 раза чаще, чем в группе пациенток с латентными формами ПВИ (11,7% – CIN I против 2,0%) ($p = 0,001$ и $p = 0,005$ соответственно). У E7+ пациенток выявлены схожие данные: у латентных вирусоносителей коэффициент 2-ОНЕ1/ 16α -ОНЕ1 менее 1,5 тестировался в 23,5%, в группе больных CIN I – 67,6% ($p = 0,05$).

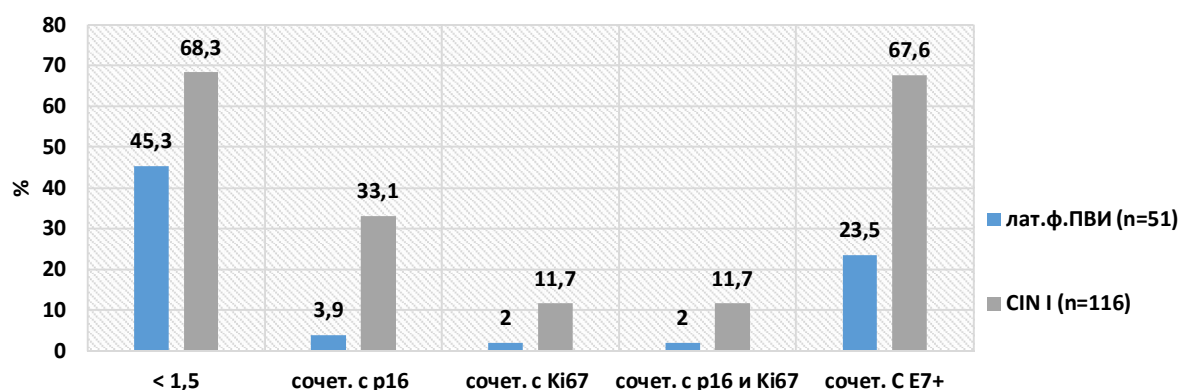


Рис. 4. Сравнительная характеристика частоты выявления низкого коэффициента 2-ОНЕ1/ 16α -ОНЕ1 (менее 1,5) в сочетании с p16ink4 α , Ki67 и E7

Таким образом, совместное определение онкобелка E7, экспрессии p16ink4D и Ki-67, соотношения метаболитов 2-гидроксиэстрогена и 16- α -гидроксиэстрогена (2-ОНЕ1/ 16α -ОНЕ1) у пациенток с папилломавирусной инфекцией позволит более точно как диагностировать форму ПВИ и степень цервикального интраэпителиального поражения, так и определить индивидуальный прогноз развития заболевания и, соответственно, дифференцировать лечебные мероприятия каждой отдельной пациентки.

Список литературы

1. Аполихина И.А. Папилломавирусная инфекция гениталий у женщин. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2008. – 32 с.
2. Башмакова М.А., Савичева А.М. Папилломавирусная инфекция. – М. : Медицинская книга; Н. Новгород : Изд-во НГМА, 2012. — 21 с.
3. Васильев М.М., Богатырёва И.И., Котова Л.К. Современные аспекты папилломавирусной инфекции урогенитального тракта. — М., 2014.
4. Папилломавирусная инфекция – клиника, диагностика, лечение : пособие для врачей / Молочков В.А., Киселев В.И., Рудых И.В., Щербо С.Н. — М., 2008. — 32 с.
5. Патология шейки матки и генитальные инфекции / под ред. проф. В.Н. Прилепской. – М.: МЕДпресс-информ, 2012. – 383 с.
6. Роговская С.И. Папилломавирусная инфекция у женщин и патология шейки матки (руководство практикующего врача). – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2015. – 144 с.
7. Bosch F., Manos M., Munoz N. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: A worldwide perspective // J. Natl. Cancer Inst. - 2009. - 87:796-802.
8. Brown D., Shew M., Qadadri B. A longitudinal study of genital human papillomavirus infection in a cohort of closely followed adolescent women // J Infect Dis. – 2015. - 191: 2: 182—192.
9. Gross G., Jablonska S., Pfister H. et al. Genital Papillomavirus Infections Modern Diagnosis and Treatment. — Springer-Verlag, 2013. - 449 p.
10. Kutsenko I.I., Kravtsova E.I. et al. Peculiarities of the development of chronic pelvic pain related components in peritoneal endometriosis. // Медицинский вестник Северного Кавказа. - 2016. Т. 11. - № 2. - С. 189-191.