

УДК 618.146-006.6:616.988

К ВОПРОСУ О РОЛИ ВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ В РАЗВИТИИ ДИСПЛАСТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ НА ШЕЙКЕ МАТКИ

Н.В. Вознесенская¹, Р.А. Насыров², Л.И. Трубникова¹,
Н.А. Савинова¹, В.В. Кометова³

¹Ульяновский государственный университет,

²Санкт-Петербургская государственная педиатрическая медицинская академия,

³Ульяновский областной клинический диспансер

При иммуногистохимическом исследовании биоптатов шейки матки у женщин с цервикальными интраэпителиальными неоплазиями II–III стадии и раком шейки матки выявлена экспрессия вируса папилломы человека и вируса Эпштейна-Барр. Вирусы были обнаружены как в эпителии, так и в подлежащей строме. Частота выявления обоих вирусов коррелировала со степенью тяжести поражения шейки матки при неоплазиях. Ассоциация вирусов имела место у 37 % больных с цервикальной интраэпителиальной неоплазией и у 33 % больных с раком шейки матки.

Ключевые слова: иммуногистохимия, цервикальная интраэпителиальная неоплазия, рак шейки матки, вирус папилломы человека, вирус Эпштейна-Барр, цитомегаловирус, вирус герпеса.

Введение. Обнаружено этиологическое значение в развитии рака шейки матки (РШМ) высокоонкогенных типов вируса папилломы человека (ВПЧ). Вместе с тем в последнее время дискутируется гипотеза о роли других факторов – комутагенов – в инициации опухолевого роста. Показано, что комутагены самостоятельно не вызывают мутаций, но усиливают мутагенный эффект ВПЧ [8]. К мутагенам следует отнести возбудителей генитальных инфекций, вирусы семейства *Herpes Viridae*: вирусы простого герпеса 1–2 типа (ВПГ1–2), цитомегаловирус (ЦМВ), вирус Эпштейна-Барр (ВЭБ), которые часто рецидивируют, не вызывают стойкого иммунитета и характеризуются прогрессированием иммуносупрессии. По данным С.В. Ключаревой и соавт. [5], обследовавших женское население Санкт-Петербурга, нередко является сочетание онкогенных ВПЧ с гонореей, сифилисом, трихомонозом, ВПГ1 и ВПГ2, ЦМВ, ВЭБ, хламидиями, уреаплазмами, микоплазмами.

Развитие онкопроцесса на шейке матки обычно происходит на фоне иммуносупрессии, при которой ВПЧ-инфекция отличается более тяжелым течением, резистентностью к терапии и высокой частотой рецидивов.

В связи с этим становится очевидной роль сопутствующей вирусной инфекции в потенцировании ВПЧ-инфекции. Распространенность вирусной инфекции достаточно высока. Так, Всемирная организация здравоохранения в 1999 г. объявила о пандемии герпетической инфекции в мире. Около 90 % населения земного шара инфицировано герпесвирусами, 2–12 % страдает рецидивирующими герпесвирусными заболеваниями [9]. Более того, негативные факторы жизни и внешней среды приводят к изменению вирулентности вирусов, возникновению новых клинических форм болезней [2; 9].

Роль ВПГ2 в онкогенезе активно обсуждалась в 70–80-е гг. XX в. Предполагалось, что ВПГ2, выступая в ассоциации с бактериями и простейшими в качестве кофактора канцерогенеза, инициирует развитие цервикальной интраэпителиальной неоплазии (CIN) шейки матки [7]. Показано, что у женщин с герпетическим кольпитом и цервицитом *Carcinoma in situ* шейки матки обнаруживалась в 7–21,1 % случаев, тем самым подтверждалось существование связи развития РШМ с латентным герпесом II типа [7].

В исследованиях J.R. Daling, M.M. Madeleine, B. McKnight et al. [12] обнаружено

достоверное повышение риска развития РШМ, связанного с ВПГ2 среди женщин без ВПЧ, что показывает возможную роль ВПГ2 в генезе 5–10 % случаев РШМ, однако, по мнению Я.В. Бохмана [10], инфицированность ВПГ2 способствует развитию CIN шейки матки, препятствует ее регрессии, но не приводит к прогрессии дисплазии в пре- и инвазивный рак шейки матки.

Цитомегаловирус является еще одним представителем семейства *Herpes viridae*. Показаны *in vitro* его способность усиливать неопластическую трансформацию клеток, инфицированных ВПЧ, и возможность участия в развитии цервикальных дисплазий [6]. В настоящее время ЦМВ-инфекция отнесена к группе инфекций, являющихся индикаторами иммунологической недостаточности.

Вирус Эпштейна-Барр является убиквитарным человеческим патогеном, поражающим эпителиальные клетки слизистых оболочек (дыхательных путей, пищеварительного тракта, половых органов), а также клетки иммунной системы, в том числе В-лимфоциты и Т-лимфоциты, в которых происходит репликация вируса. Роль ВЭБ как фактора развития цервикальной патологии должна рассматриваться прежде всего в аспекте вирусного коканцерогенеза [10]. Не исключено, что инфицирование лимфоцитов вирусом ВЭБ ведет к нарушениям локального противоопухолевого иммунного ответа и на фоне папилломавирусной инфекции облегчает ВПЧ-индуцированный процесс малигнизации цервикального эпителия [11]. Кроме того, не подвергается сомнению тот факт, что ВЭБ, как и ВПЧ, имеет несколько видоспецифичных и тканеспецифичных штаммов. Но точный механизм проникновения ВЭБ в клетки нелимфоидной ткани неизвестен, и нет данных о том, имеют ли эти клетки рецепторы к ВЭБ.

Таким образом, актуальной проблемой остается изучение влияния ассоциаций вирусов на функциональное состояние и особенности пролиферации многослойного плоского эпителия шейки матки при CIN и начальных стадиях РШМ. Учитывая, что современным и новым направлением исследований является превентивная медицина, решение указанных вопросов имеет большое клиниче-

ское значение для определения факторов риска развития предрака и РШМ, а также для разработки принципов индивидуальной профилактики этих форм патологии при наличии генитальных инфекций.

Цель исследования. Определить возможное участие сочетанной вирусной инфекции в развитии цервикальной интраэпителиальной неоплазии и рака шейки матки.

Материалы и методы. В результате скрининга больных на специализированном приеме по патологии шейки матки углубленному обследованию подвергнуты 46 пациенток. У 24 из них был диагностирован рак шейки матки (I группа), у других 22 женщин – цервикальная интраэпителиальная неоплазия. С умеренной дисплазией (CIN II) было 10 пациенток и с тяжелой (CIN-III) – 12. Среди последних трех женщин изменения в эпителии соответствовали *carcinoma in situ* (II группа).

В процессе наблюдения всем женщинам было проведено общеклиническое и гинекологическое обследование. Скрининговое обследование для уточнения патологии шейки матки включало цитологическое исследование мазков, кольпоскопию, гистологическое исследование биоптатов экзоцервикса и соскобов эндоцервикса, оценку инфекционного статуса женщины (мазки на степень чистоты, ПЦР-исследование на ИППП (хламидии, микоплазмы, вирус простого герпеса 1–2 типа, ЦМВ, ВЭБ)); бактериологическое исследование секрета шейки матки. Проводилась детекция 12 типов ВПЧ (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 52, 56, 58, 59, 66 типы) посредством полимеразной цепной реакции с использованием тест-систем «АмплиСенс ВПЧ ВКР генотип-ЕPh» (ИнтерЛабСервис, Москва), предназначенных для выявления и дифференциации ДНК ВПЧ высокого канцерогенного риска. Для определения роли сочетанной вирусной инфекции в развитии предраковых заболеваний и РШМ в биоптатах шейки матки изучалась экспрессия антигенов вирусов ВПЧ, ВПГ, ЦМВ и ВЭБ иммуногистохимическими методами (ИГХ). Иммуногистохимическое исследование материала на парафиновых срезах проводилось по схеме, рекомендованной фирмой-производителем. В хо-

де проведения окрашивания выполнялись отрицательные контрольные исследования. В качестве первичных антител при проведении иммуногистохимической окраски использовались первичные поликлональные антитела к вирусу папилломы человека, вирусу простого герпеса 1 и 2 типа (Dako), моноклональные антитела к вирусу Эпштейна-Барр, цитомегаловирусу (производство Novocastro). При положительной окраске продукт реакции (искомый антиген) имел вид мелких гранул коричневого цвета. Анализ изображения и фотодокументацию выполняли с использованием программного обеспечения фирмы Zeiss.

В процессе статистической обработки данных применялись методы описательной статистики, корреляционного и графического анализа данных на базе пакетов прикладных

программ Microsoft Excel и Statistica for Windows, Release 6 фирмы Statsoft Inc., США (2002). Достоверность различий определялась при доверительной вероятности 95 % и выше.

Результаты и обсуждение. Материалом для ИГХ служили биоптаты шейки матки 46 женщин. В первой группе женщин с верифицированным раком шейки матки возраст колебался от 28 до 72 лет (средний возраст – $44,6 \pm 9,4$ года). Во второй группе средний возраст был почти на 10 лет меньше ($35,4 \pm 9,3$ года), однако колебания были также значительными – от 18 до 55 лет, что указывало на достаточно раннее инфицирование женщин онкогенными типами ВПЧ. На рис. 1 представлено распределение всех наблюдаемых нами больных по возрасту.

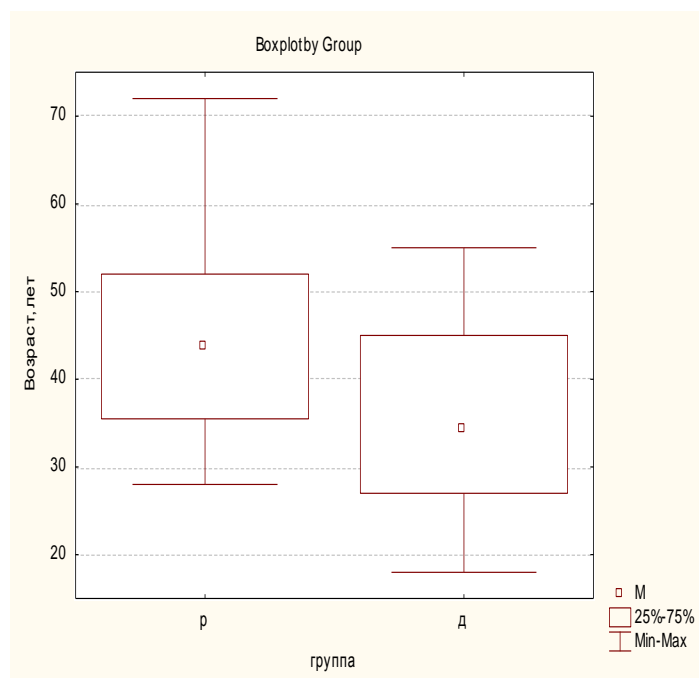


Рис. 1. Распределение обследованных женщин по возрасту.

Обозначения групп: p – PIM, д – CIN

Полученные различия в возрастном аспекте между двумя группами согласуются с литературными данными, свидетельствующими о том, что с момента возникновения структурных изменений в шейке матки до развития инвазивного рака проходит 5–10 лет.

Как указывалось, 42 женщины, вошедшие в данное исследование, были инфицированы ВПЧ, однако высокоонкогенные типы

выявлены не у всех женщин. Так, инфицированность женщин с CIN высокоонкогенными штаммами ВПЧ, по данным ПЦР-исследования, составила 92,3 %, причем в 69,1 % выявлялся один тип вируса, в 22,7 % – два типа, в 1,8 % – три типа, в 4,6 % – четыре типа вирусов. Характерно, что при CIN наиболее часто определялись 18 (66,7 %) и 16 (33,4 %) типы ВПЧ, другие типы наблюдались у

16,7 % пациенток. При РШМ высокоонкогенные типы ВПЧ обнаружены у всех женщин, однако структура типов была иной: 16 тип определялся в 66,7 % случаев, 18 тип – в 44,4 %, ассоциации с другими типами ВПЧ – до 11,1 %. Как видно, при CIN и особенно при РШМ женщины инфицированы несколькими онкогенными типами ВПЧ. Проведенные исследования с определением генотипов 12 штаммов свидетельствуют о более широком распространении ВПЧ, чем в данных ранее проводимых исследований других авторов, установивших наличие при CIN ВПЧ 16-го типа в 55–64,9 % случаев [4; 16].

Усугубляющими факторами развития CIN и РШМ являются ассоциации не только различных типов ВПЧ, но и сочетание с другой микробной флорой. Показано, что микроценоз влагалища нарушен у 77 % обследованных женщин. Отмечены ассоциации ВПЧ с уреаплазмозом (20,4 %), бактериальным вагинозом (18,6 %), микоплазмозом (8,1 %), неспецифическим вагинитом (7,6 %), хламидиозом (3,2 %), кандидозом (3,8 %), герпесом (0,2 %), цитомегаловирусом (0,2 %) (рис. 2).

Полученные данные позволяют говорить об изменениях в последние годы структуры возбудителей, ассоциированных с ВПЧ (рис. 2). До 2000 г. авторы указывали на роль *Chlamydia trachomatis* как кофактора в раз-

витии карциномы шейки матки и высокую частоту ассоциации этого возбудителя с ВПЧ [14; 16; 17]. Результаты данного исследования указывают, что почти треть женщин имеют ассоциации ВПЧ с уреаплазмозом и микоплазмозом, тогда как хламидии определены только в 3,2 % случаев. В последнее время появились сообщения о возможном участии микоплазм в онкогенезе [1]. В 2008 г. в американском журнале *Oncogene* опубликованы результаты экспериментального исследования влияния микоплазм на клеточные сигнальные системы. Авторы показали, что микоплазменная инфекция, подавляя функцию онкобелка p53 и активируя ядерный фактор NFκB, приводит к изменениям в клетке, в последующем предрасполагающим к мутациям, генетической нестабильности, хроническому воспалению, пролиферации, блокированию апоптоза и злокачественному перерождению клеток.

Наряду со специфической инфекцией при бактериологическом исследовании выявлен разнообразный спектр неспецифической флоры: *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *St. aureus*, *St. saprophyticus*, *St. haemolyticus*, *Streptococcus viridians* и др., что подтверждает известные литературные данные о высокой частоте сопутствующей бактериальной инфекции при ВПЧ-инфекции.

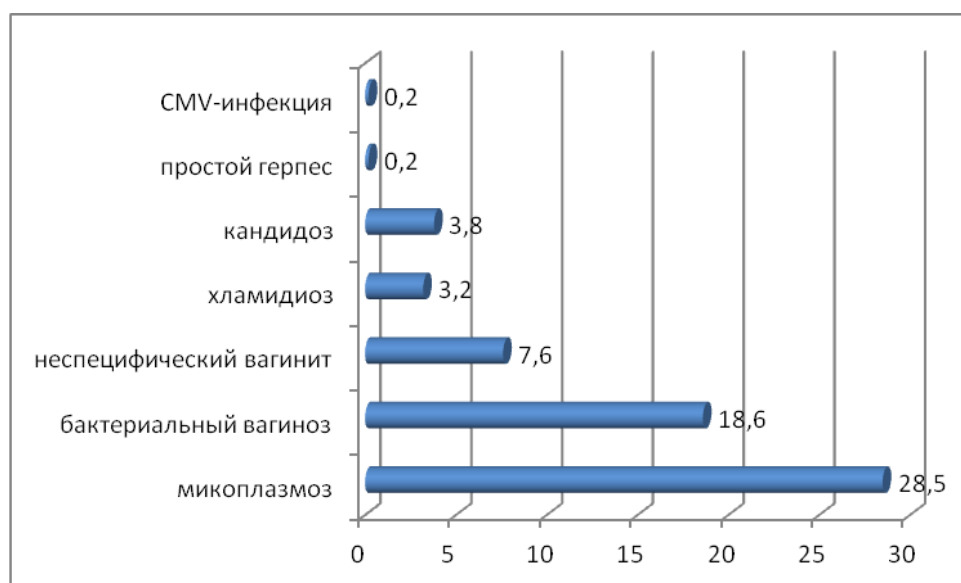


Рис. 2. Ассоциация ВПЧ с влагалищной микрофлорой

ВПГ и ЦМВ в мазках с шейки матки методом ПЦР были выявлены только в 0,2 % случаев. Вирус Эпштейна-Барр этим методом обнаружен не был, вероятно, потому, что концентрация его в мазках с шейки матки была ниже порогового диагностического уровня. При углублении исследований и проведении иммуноцитохимического анализа мазков с шейки матки у ВПЧ-инфицированных женщин экспрессия ВПЧ была выявлена у 31,3 %, а ВЭБ – в 12,5 % случаев. Надо полагать, что достоверное определение вирусов затруднено в связи с тем, что в образцы попадает минимальное количество инфицированного материала.

Иные результаты получены при иммуногистохимическом определении экспрессии ВПЧ и герпес-вирусов в строме и эпителии биоптатов шейки матки. Так же, как и при иммуноцитохимическом исследовании, антиген ЦМВ в структурах шейки матки не обнаружен.

Вирус простого герпеса выявлен только в многослойном эпителии с относительной частотой 0,14 и 0,18 при CIN и РШМ соответственно. В строме ВПГ экспрессии ВПГ при CIN и РШМ нет.

Частота экспрессии ВПЧ и ВЭБ в эпителии оказалась в 2–3 раза выше, чем ВПГ. Как представлено в табл. 1, существенных различий в частоте не обнаружено. Заслуживает особого внимания, что при CIN ВПЧ и ВЭБ выявляются с одинаковой частотой, причем концентрация ВПЧ в строме при РШМ была в 1,5 раза, при CIN – более чем в 2 раза выше, чем в эпителии. Выявлена прямая умеренная корреляция между тяжестью поражения шейки матки при CIN и частотой экспрессии ВПЧ и ВЭБ в строме и эпителии (R 0,48, $p=0,02$). При тяжелых дисплазиях отмечена выраженная прямая корреляция (R 0,74, $p<0,00001$). При РШМ экспрессия ВЭБ возрастает и в строме, и в эпителии по сравнению с CIN ($OR>1,1$), тогда как экспрессия ВПЧ снижается, причем это снижение более выражено в строме. Подобное снижение экспрессии ВПЧ при возникновении рака заслуживает внимания и проведения дальнейших исследований для объяснения механизма подобной динамики или феномена. Проведенные в 2011 г. исследования С.Б. Городецкой и соавт. [3] также показали снижение концентрации онкобелка E7 ВПЧ 16 и 18 типов у женщин с РШМ в цервикальном материале.

Таблица 1

Частота экспрессии герпес-вирусов у больных РШМ и CIN

Герпес-вирусы	Группы	Эпителий		Строма	
		ОЧ	ДИ (95 %)	ОЧ	ДИ (95 %)
ВПЧ	Рак	0,38	(0,11–0,64)	0,56	(0,15–0,96)
	CIN II–III	0,36	(0,07–0,64)	0,79	(0,54–1,00)
ВЭБ	Рак	0,44	(0,16–0,71)	0,60	(0,23–0,97)
	CIN II–III	0,38	(0,11–0,64)	0,40	(0,12–0,68)
ВПГ	Рак	0,14	(0,02–0,49)	0	
	CIN II–III	0,18	(0,01–0,46)	0	
ЦМВ	Рак	0		0	
	CIN II–III	0		0	

Примечание. ОЧ – относительная частота, ДИ – доверительный интервал.

Интересным является тот факт, что ассоциации ВПЧ и ВЭБ встречаются в строме в 33 % при РШМ и в 37,5 % – при CIN. В эпителии процент сочетания несколько ниже и составляет 25 и 18,5 % соответственно. Таким образом, у каждой третьей больной па-

тологический процесс в шейке матки развивался на фоне сочетанной вирусной инфекции. В ходе исследования установлено, что интенсивность экспрессии ВПЧ в строме была самой высокой при диспластических изменениях на шейке матки, но при усугубле-

нии процесса и развитии РШМ повышалась интенсивность экспрессии вируса в пораженном эпителии (табл. 2). ВЭБ определялся с высокой интенсивностью в строме в обеих

группах пациенток, при РШМ число случаев выраженной экспрессии вируса в эпителии было почти в два раза ниже, чем в строме.

Таблица 2

Степень выраженности экспрессии вирусов при CIN I–II и РШМ

Вирус	Выраженность экспрессии вирусов					
	РШМ			CIN II-III		
	0	1	2	0	1	2
ВПЧэ	0,69	00	0,31	0,64	0,36	00
ВЭБэ	0,56	0,25	0,19	0,63	0,37	00
ВПЧс	0,44	0,33	0,23	0,21	0,29	0,50
ВЭБс	0,44	0,23	0,33	0,56	0,13	0,31
ВПГэ	0,86	0,14	00	0,82	0,18	00
ЦМВ	0	0	0	0	0	0

Примечание. 0 – экспрессия отсутствует; 1 – умеренная экспрессия; 2 – выраженная экспрессия.

Заклучение. Таким образом, в результате проведенного исследования экспрессия ВЭБ в биоптатах шейки матки была выявлена в 44 % случаев при CIN II–III и в 56 % – при РШМ. Вирус определялся как в эпителии, так и в подлежащей строме. Экспрессия вируса в этих тканях позволяет говорить о наличии в них рецепторов, с которыми вирус может взаимодействовать. Однако значимое различие между относительными частотами экспрессии вирусов при различных стадиях дисплазии и рака отсутствует. Ассоциация ВПЧ и ВЭБ встречалась достаточно часто: в 37 % случаев при CIN и в 33 % – при РШМ, что позволяет сделать вывод о том, что вирус Эпштейна-Барр является кофактором развития неоплазий и рака шейки матки. Увеличение частоты экспрессии ВЭБ в пораженных тканях повышает риск усугубления морфологических изменений в шейке матки. По-видимому, изменения иммунного статуса, обусловленные наличием ВЭБ, облегчают ВПЧ-индуцированный процесс малигнизации цервикального эпителия. То, что иммунодефицит является обязательным компонентом развития вирусной инфекции, которая влияет на тяжесть и исход заболевания, подчеркивают некоторые авторы [18]. Ассоциации этих возбудителей изменяют функциональ-

ное состояние и особенности пролиферации многослойного плоского эпителия шейки матки при CIN, способствуя прогрессированию процесса в начальные стадии РШМ. Определение экспрессии ВПГ позволяет говорить о его меньшей роли в патологической пролиферации многослойного плоского эпителия шейки матки, нежели ВЭБ. Данное исследование как первая попытка изучения комплекса вирусных патогенов в поврежденных тканях шейки матки подтвердило предположение о том, что инфицирование ВПЧ реализуется в развитие CIN и РШМ только при предшествующем и сопутствующем микст-воздействию вирусов, вызывающих иммунодефицитные состояния у женщины.

1. *Винаров, А.З.* Микоплазменная инфекция: персистенция и возможная роль в канцерогенезе предстательной железы / А.З. Винаров // Урология сегодня. – 2010. – №4. – С. 24–28.

2. Герпесвирусные инфекции / Н.П. Глинских и др. – Екатеринбург, 2001. – 64 с.

3. Значение исследования уровня экспрессии онкобелка E7 вируса папилломы человека 16 и 18 типов в цервикальном материале в диагностике неопластических образований шейки матки / С.Б. Городецкая и др. // Молекулярная биология. – 2010. – №5. – С. 14–19.

4. Особенности экспрессии P16ink4a и уровня метаболитов эстрадиола при ВПЧ-ассо-

цированных плоскоклеточных поражениях шейки матки / Т.В. Клинышкова и др. – *Вопр. гинекологии, акушерства и перинатологии*. – 2011. – Т. 10, №2. – С. 45–49.

5. Современные методы диагностики и лечения папиллом человека в целях профилактики их озлокачествления / С.В. Ключарева и др. // *Российский журн. кожных и венерических болезней*. – 2007. – №4. – С. 66–70.

6. *Козлова, В.И.* Вирусные, хламидийные и микоплазменные заболевания гениталий / В.И. Козлова, А.Ф. Пухнер. – СПб., 2000. – 574 с.

7. Роль герпетической инфекции при эпителиальных дисплазиях шейки матки и опыт лечения противогерпетическими препаратами / Т.А. Посева и др. // *Вопр. вирусологии*. – 1991. – №1. – С. 78.

8. *Русакевич, П.С.* Системный патогенетический подход к диагностике и лечению предраковых заболеваний шейки матки / П.С. Русакевич, К.И. Шмак // *Материалы III съезда онкологов и радиологов СНГ*. – Мн., 2004. – С. 215.

9. *Шахгильдян, В.И.* Клиническая характеристика, диагностика и лечение цитомегаловирусной инфекции у больных с ВИЧ-инфекцией / В.И. Шахгильдян // *Мед. кафедра*. – М., 2003. – №1. – С. 29–36.

10. Detection of human papillomavirus types 6 and 11 in pubis and perianal hair from patients with genital warts / I.L. Boxman. et al. // *J. Clin. Microbiol.* – 1999. – Jul. – №37 (7). – P. 2270–2273.

11. *Cruchley, A.T.* Epstein-Barr virus: biology and disease / A.T. Cruchley, D.M. Williams, G. Nie-

dobitek // *Oral Dis.* – 1997. – №3 (Suppl. 1). – P. 153–156.

12. The relationship of human papillomavirus – related cervical tumors to cigarette smoking, oral contraceptive use, and prior herpes simplex virus type 2 infection / J.R. Daling et al. // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* – 1996. – Vol. 5, №7. – P. 541–548.

13. The ins and outs of EBV infection / C. Glenda et al. // *Trends in Microbiology*. – 2000. – №8. – P. 185–189.

14. Association of Chlamydia trachomatis and human papilloma virus as predisposing factors in cervical intraepithelial neoplasia / J.L. Gonzalez Sanchez et al. // *Ginecol. Obstet. Mex.* – 1995. – Vol. 63. – P. 422–426.

15. Chlamydia trachomatis infection as a risk factor for invasive cervical cancer / E. Jellum et al. // *Int. J. Cancer.* – 2000. – Vol. 85, №1. – P. 35–39.

16. *Lopez-Revilla, R.* Prevalence of high-risk human papillomavirus types in Mexican women with cervical intraepithelial neoplasia and invasive carcinoma / R. Lopez-Revilla, L. Martinez-Contreras, M. Sanchez-Garza // *Infect Agent Cancer.* – 2008. – Vol. 28 (3). – P. 3.

17. The role of Chlamydia trachomatis infection in cervical cancer development / J. Markowska et al. // *Eur. J. Gynaecol. Oncol.* – 1999. – Vol. 20, №2. – P. 144–146.

18. HPV and intraepithelial neoplasia recurrent lesions of the lower genital tract: assessment of the immune system / P. Stentella et al. // *J. Gen. Virol.* – 1996. – Vol. 77. – P. 593–602.

TO THE QUESTION OF THE ROLE OF THE VIRUS INFECTION OF DEVELOPMENT OF UTERINE CERVIX DYSPLASIA

N.V. Vosnesenskaya¹, R.A. Nasirov², L.I. Trubnikova¹, N.A. Savinova¹, V.V. Kometova³

¹Ulyanovsk State University,

²St.-Petersburg Pediatric Medical Academy,

³Ulyanovsk Regional Clinical Dispensary

Immunohistochemical detection of biopsy cervix utery at the women with cervical intraepithelial neoplasia II-III stages and cancer of cervix utery is revealed expression of the human papilloma virus and Epstein-Barr virus. The viruses were found out both in epithelial, and in subject strom. The frequency of revealing of both viruses correlated with a degree of weight cervix utery at the neoplasia. The association of viruses took place at 37 % of the patients with cervical intraepithelial neoplasia and at 33 % with a cancer of cervix utery.

Keywords: immunohistochemical detection, cervical intraepithelial neoplasia, cancer of cervix utery, a human papilloma virus, Epstein-Barr virus.