

УДК 616.6-006.6

**ЛИГАНДЫ АПОПТОЗА ПРИ ПАПИЛОМАВИРУС-АССОЦИИРОВАННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ШЕЙКИ МАТКИ****<sup>1</sup>Хараева З.Ф., <sup>1</sup>Сизжаева О.А., <sup>2</sup>С.Де Лука, <sup>2</sup>Коркина Л.Г.**<sup>1</sup>ФГБОУ ВПО «Кабардино-Балкарский государственный университет  
им. Х.М. Бербекова», Нальчик, e-mail: [Irafe@yandex.ru](mailto:Irafe@yandex.ru);<sup>2</sup>Институт дерматологии (IDI IRRS), Рим

Были исследованы концентрации основных лигандов апоптоза у пациенток с ВПЧ разного онкогенного риска, а также у пациенток с предраковыми и раковыми заболеваниями шейки матки (на фоне ВПЧ). Для определения ДНК вирусов группы ВПЧ 16, 18, 31, 33, 35, 45 использовался метод полимеразной цепной реакции (ПЦР). Оценку содержания сывороточного растворимого Fas-рецептора (sFas), TRAIL (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand) и фактора некроза опухоли-альфа (ФНО- $\alpha$ ) проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА). Дополнительно были исследованы коцентрации sFas, TRAIL и ФНО- $\alpha$  в отделяемом цервикального канала пациенток. Наиболее значимыми показателями уменьшения активности апоптических процессов среди маркеров, исследованных в данной работе, являются концентрации основных лигандов апоптоза sFas и TRAIL.

**Ключевые слова:** папилломавирусная инфекция, заболевания шейки матки, апоптоз, цитокины**LIGANDS OF APOPTOSIS OF PAPILLOMAVIRUS ASSOCIATED DISEASES OF NECK OF UTERUS****<sup>1</sup>Kharaeva Z.F., <sup>1</sup>Sizhazsheva O.A., <sup>2</sup>C.De Luca, <sup>2</sup>Korkina L.G.**<sup>1</sup>Kabardino-Balkarien State University n.a. K.M. Berbekov, Nalchik, e-mail: [irafe@yandex.ru](mailto:irafe@yandex.ru);<sup>2</sup>Institute of dermatopathology (IDI IRRS), Rome

Have been investigated the concentration of the main apoptosis ligands of patients with HPV different oncogenic risk and of patients with precancer and cancer of the neck of the uterus (in the background HPV). For the determination of DNA viruses group HPV 16, 18, 31, 33, 35, 45 we used the method of polymerase chain reaction (PCR). Assess the content of serum soluble Fas-receptor (sFas), TRAIL (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand) and tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) was conducted by the method of solid-phase enzyme immunoassay (ELISA). Additionally, the concentration of sFas, TRAIL and TNF- $\alpha$  in cervical chanel of the patients were investigated. The most significant factors decreasing the activity of apoptotic processes among the markers studied in this work are the concentration of the main ligands of apoptosis and sFas TRAIL.

**Keywords:** papillomavirus infection, disease of neck of uterus, apoptosis, cytokines

Вирус папилломы человека (ВПЧ) относится к роду папилломавирусов (Papillomavirus) и принадлежит к подгруппе А семейства Papovaviridae, обладает способностью инфицировать и трансформировать эпителиальные клетки [2, 3]. Идентифицировано более ста видов ВПЧ, из которых 35 инфицируют урогенитальный тракт человека, вызывая поражение покровного эпителия кожи и слизистых оболочек половых органов. Эпидемиологические и вирусологические исследования подтверждают, что по крайней мере 95% всех плоскоклеточных раков шейки матки содержат ДНК ВПЧ. Частота обнаружения ДНК HPV возрастает по мере усугубления степени дисплазии и перехода диспластических изменений эпителия в опухоль [6].

Диссеминация вируса чаще происходит на фоне изменения иммунной системы. В иммунологическом ответе организма на папилломавирусную инфекцию ведущими являются Th1 клеточный ответ (активация цитотоксических лимфоцитов) и интерфероновый статус [1]. Иммунные эффектор-ные клетки продуцируют разнообразные

цитокины, задействованные в различных механизмах противовирусной и противоопухолевой защиты макроорганизма [5]. Апоптоз при интергративных вирусных инфекциях, таких как ВПЧ, является одним из защитных механизмов [8]. Способность к длительному персистенции возможна в связи с наличием у ВПЧ многочисленных механизмов, воздействующих на формирование противовирусной иммунной защиты и способствующих уклонению вируса от иммунологического надзора.

**Цель исследования:** исследовать концентрации основных лигандов апоптоза у пациенток с ВПЧ разного онкогенного риска, а также у пациенток с предраковыми и раковыми заболеваниями шейки матки (на фоне ВПЧ).

**Материалы и методы исследования**

Под наблюдением находилось четыре группы пациенток. Первая группа состояла из женщин с папилломавирусной инфекцией высокого онкогенного риска (ВПЧ) (48 женщин возрасте от 21 до 45 лет). У всех пациенток ВПЧ-инфекция подтверждалась ПЦР-анализом. Цитологические изменения при кольпоскопии у женщин с ВПЧ высокого онкоген-

ного риска (койлоцитарная атипия, наличие в мазках двухъядерных и многоядерных клеток, амфилия цитоплазмы и пр.) были обнаружены у 24 пациенток (50%). Вторую группу составили пациентки с ВПЧ низкого онкогенного риска (47 женщин), цитологические изменения при кольпоскопии не зарегистрированы. В группу контроля вошли 20 здоровых доноров, не имеющих антител к ВПЧ и не содержащих ДНК ВПГ, ЦМВ и других инфекций, передающихся половым путем. В третью группу входили женщины с предраковыми состояниями шейки матки с выявленной ВПЧ инфекцией (75 женщин в возрасте от 24 до 45 лет, из них 25 – с явлениями эктопии, 19 – с лейкоплакией и 31 – с явлениями дисплазии 1, 2 степени). Кроме того, обследовано 14 больных с явлениями дисплазии III степени и 10 с Ca in situ ШМ (на фоне выявленной ВПЧ инфекции). Морфологически имелись значительные изменения клеток в виде нарушений взаимоотношений клеточного расположения, гигантские гиперхромные ядра, появление патологических митозов. В исследование не включались больные, подвергнутые ранее любому виду противовирусной терапии, и пациентки, имеющие серьезные сопутствующие заболевания.

**Расширенная кольпоскопия** проводилась с помощью кольпоскопа «Leisegang» (Германия) при увеличении в 15 раз с целью выявления и конкретизации изменений эпителиального покрова шейки матки, для документирования кольпоскопических картин использовалась видеоприставка. Цитологическое исследование мазков с экзо- и эндоцервикса проводилось по Папаниколау (Pap-smear-test).

Для определения ДНК вирусов группы ВПЧ 16, 18, 31, 33, 35, 45 использовался метод полимеразной цепной реакции (ПЦР). Оценку содержания сывороточного растворимого Fas-рецептора (sFas), TRAIL (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand) и фактора некроза опухоли-альфа (ФНО-α) проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА). Дополнительно sFas, TRAIL и ФНО-α в отделяемом цервикального канала пациенток.

При математической обработке результатов исследований были использованы следующие методы: расчет средних значений и доверительный интервал, рассчитанные по данным *n* измерений. Доверительный интервал оценивали с использованием критерия Стьюдента для  $p < 0,05$ . Статистическую обработку и расчет корреляционного коэффициента проводили с использованием программы Microsoft Excel.

### Результаты исследования и их обсуждение

Обращают на себя внимание данные, полученные при исследовании сыворотки крови пациентов ВПЧ с разной степенью онкогенного риска. Так, при ВПЧ-16,18 типа sFas1 снижен на 22% по сравнению с донорской группой ( $p < 0,01$ ). Однако минимальные концентрации sFas1 обнаружено в группе пациенток с предраковыми и раковыми заболеваниями шейки матки (уровень sFas1 снижен более чем на 42 и 56% по сравнению с группой доноров соответственно). Сниженное количество sFas приводит к уменьшению возможности клетки запустить апоптоз.

TRAIL (Apo2L) (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand), это лиганд DR3 и DR5 [7]. Так же как и CD95L, Apo2L запускает быстрый апоптоз во многих злокачественных линиях клеток [4]. Сывороточные концентрации TRAIL в изученных группах пациентов оказались близки к нормальным значениям лишь в группе больных с ВПЧ низкого онкогенного риска. Обращает на себя внимание выявленная тенденция к снижению TRAIL в сыворотке крови в случаях с более тяжелым течением патологического процесса (табл. 1). Резко сниженные показатели у пациентов с ВПЧ высокого онкогенного риска приводят к заключению о том, что отсутствие TRAIL-рецепторного апоптоза может быть одной из причин онкогенеза, о чем дополнительно свидетельствуют более чем в 6–7 раз сниженные показатели TRAIL у пациентов с предраковыми заболеваниями шейки матки и раком шейки матки (табл. 1).

**Таблица 1**  
Показатели содержания TRAIL в сыворотке крови у больных папилломавирусными инфекциями, (пг/мл)

Группа пациентов		TRAIL, (пг/мл)
ВПЧ	высокого онкогенного риска	90,0 ± 16,0 <sup>1</sup>
	низкого онкогенного риска	180,0 ± 14,0
С предраковыми заболеваниями шейки матки		52,0 ± 1,5 <sup>1</sup>
С раком шейки матки		30,5 ± 1,5 <sup>1</sup>
Доноры		199,0 ± 5,3

**Примечание.** <sup>1</sup> – достоверность различий по отношению к показателям доноров,  $p < 0,05$ .

Другими регуляторами процессов апоптоза являются цитокины. Известно, что фактор некроза опухолей (ФНО) продуцируется активированными макрофагами и Т-лимфоцитами в ответ на антигенную стимуляцию. При ВПЧ высокого и низкого онкогенного риска обнаружено, что концентрации ФНОα выше нормальных на 90 и 94%. Достоверно повышены сывороточные концентрации и в сыворотке крови пациентов с предраковыми заболеваниями ( $p < 0,05$ ), в группе женщин с раковыми заболеваниями шейки матки уровни ФНОα ниже нормальных значений ( $p < 0,05$ ).

Так как проявлениями папилломавирусной инфекции являлись высыпания в генитальной области и образование кондилом (папиллом), диспластические заболевания

шейки матки, представляло интерес изучить локальные показатели активности апоптоза у исследованных групп больных.

Обнаружено, что уровень ФНО  $\alpha$  не изменен, что свидетельствует, во-первых, об отсутствии воспаления, и, во-вторых, содействует одной из причин снижения активности апоптоза, так как в рецепторзависимом пути запуска апоптоза задействована

группа ФНО рецепторов. sFas в цервикальном отделяемом женщин с ВПЧ разной степени онкогенного риска достоверно снижен (табл. 2). Данные по sFas-лиганду имели обратную корреляцию со степенью тяжести патологического процесса, инициированного ВПЧ – количество sFas достоверно меньше в группах пациентов с более тяжелым течением инфекционного процесса (табл. 2).

Таблица 2

Показатели апоптоза в отделяемом цервикального канала в группе пациенток с папилломавирусной инфекцией, (пг/мл)

Показатели апоптоза	Показатели контрольной группы	Группа пациентов	Показатель
ФНО $\alpha$	13,0 $\pm$ 2,0	ВПЧ высокого онкогенного риска	15,0 $\pm$ 2,0
		ВПЧ низкого онкогенного риска	13,0 $\pm$ 2,0
		С предраковыми заболеваниями шейки матки	15,0 $\pm$ 2,0
		С раком шейки матки	14,0 $\pm$ 2,0
sFas	1000,5 $\pm$ 150,5	ВПЧ высокого онкогенного риска	750,5 $\pm$ 110,0
		ВПЧ низкого онкогенного риска	750,5 $\pm$ 130,5
		С предраковыми заболеваниями шейки матки	720,5 $\pm$ 100,0
		С раком шейки матки	694,5 $\pm$ 140,0
TRAIL	145,0 $\pm$ 25,0	ВПЧ высокого онкогенного риска	55,0 $\pm$ 5,5 <sup>1</sup>
		ВПЧ низкого онкогенного риска	145,0 $\pm$ 25,0 <sup>1</sup>
		С предраковыми заболеваниями шейки матки	44,0 $\pm$ 5,5 <sup>1</sup>
		С раком шейки матки	41,0 $\pm$ 5,5 <sup>1</sup>

Полученные данные коррелируют с показателями sFas в сыворотке крови. TRAIL является рецепторным лигандом, участвующим в механизмах апоптоза. Так как папилломавирусы являются интегративными вирусами с высоким онкогенным риском, особенно интересным было исследовать концентрацию TRAIL местно. Было обнаружено, что количество TRAIL уменьшается при тяжелом течении инфекционного процесса. Достоверное снижение количества TRAIL может служить одним из факторов риска развития канцерогенеза. Уровень ФНО $\alpha$  не изменен, что, во-первых, свидетельствует об отсутствии воспаления [1], и, во-вторых, может служить одной из причин снижения активности апоптоза, так как в рецепторзависимом пути запуска апоптоза задействована группа ФНО-рецепторов (табл. 2).

Полученные результаты позволяют предположить, что снижение интенсивности апоптоза приводит нарушению элиминации атипичных изменений в клетках шеечного эпителия в процессе их неопластических изменений. Наиболее значимы-

ми показателями уменьшения активности апоптотических процессов среди маркеров, исследованных в данной работе, являются концентрации основных лигандов апоптоза sFas и TRAIL.

*Работа выполнена в рамках федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2013 годы», государственный контракт № 11.519.11.2019 от 21 октября 2011 г.).*

#### Список литературы

1. Лялина Л.В. Эпидемиологические закономерности злокачественных новообразований, ассоциированных с хроническими вирусными инфекциями, и развитие системы эпидемиологического надзора: дис. ... д-ра мед. наук. – СПб., 2005. – 42 с.
2. Прилепская В.Н., Кондриков Н.И. Значение вируса папилломы человека в развитии диспластических процессов шейки матки // Гинекология для практических врачей. – 2000. – Т. 2. № 3. – С. 80–82.
3. Роговская С.И., Бебнева Т.Н. Папилломавирусная инфекция гениталий. Клиника и лечение // Заболевания шейки матки, влагалища и вульвы / под ред. В.Н. Прилепской. – М.: МЕДпресс, 2000. – С. 240–246.

4. Сафронникова Н.Р. Мерабишвили В.М. Профилактика вирусозависимых онкологических заболеваний // Диагностика и лечение папилломавирусной инфекции: пособие для врачей. – СПб., 2007. – 34 с.

5. Особенности апоптоза при папилломавирусной инфекции разного онкогенного риска / З.Ф. Хараева, А.А. Шевченко, Е.Ф. Кузьмицкая, С. De Luca, Л.Г. Коркина // Доклады АМАН. – 2012. – № 2. – С. 25–30.

6. Эпидемиологические особенности распространения папилломавирусной инфекции у женщин / З.Ф. Хараева, А.А. Шевченко, О.А. Сижаева, М.М. Текуева, Н.И. Самойлик // Известия КБНЦ. – 2012. – № 3(47). – С. 45–49.

7. The casual relation between papillomavirus and cervical cancer / F.X. Bosch, A. Lorinez, N. Munos, C.J.L.M. Meiyer, V. ShacnK. // Journal of clinical pathology. – 2002. – Vol. 55, № 4. – P. 244–265.

8. Hardwick J.M. Virus-induced apoptosis // Adv. Pharmacol. – 1997. – vol. 41. – P. 295–336.

4. Safronnikova N.R. Merabishvili V.M. Profilaktika viruszavisimyh onkologicheskikh zabolevanij. Diagnostika i lechenie papillomavirusnoj infekcii: posobie dlja vrachej. SPb., 2007. 34 p.

5. Haraeva Z.F., Shevchenko A.A., Kuz'mickaja E.F., C.De Luca, Korkina L.G. Osobennosti apoptoza pri papillomavirusnoj infekcii raznogo onkogenno go riska. Doklady AMAN. 2012. no. 2. pp. 25–30.

6. Haraeva Z.F., Shevchenko A.A., Sihazheva O.A., Teкуeva M.M., Samojlik N.I. Jepidemiologicheskie osobennosti rasprostraneni ja papillomavirusnoj infekcii u zhenshhin. Izvesti ja KBNC. 2012. no. 3(47). pp. 45–49.

7. Bosch F.X., Lorinez A., Munos N., Meiyer C.J.L.M., ShacnK. V. The casual relation between papillomavirus and cervical cancer. Journal of clinical pathology. 2002. Vol. 55, no. 4. pp. 244–265.

8. Hardwick J.M. Virus-induced apoptosis. Adv. Pharmacol. 1997. Vol. 41. pp. 295–336.

**References**

1. Ljalina L.V. Jepidemiologicheskie zakonomernosti zlokachestvennyh novoobrazovanij, associirovannyh s hronicheskimi virusnymi infekcijami, i razvitie sistemy jepidemiologicheskogo nadzora: dis. dokt. med. nauk. SPb., 2005. 42 p.

2. Prilepskaja V. N., Kondrikov N. I. Znachenie virusa papillomy cheloveka v razvitii displasticheskikh processov shejki matki. Ginekologija dlja prakticheskikh vrachej. 2000. T. 2. no. 3. pp. 80–82.

3. Rogovskaja S.I., Bebneva T.N. Papillomavirusnaja infekcija genitalij. Klinika i lechenie. Zabolevanija shejki matki, vlagalishha i vul'vy. Pod red. V.N. Prilepskoj. M.: MEDpress, 2000. pp. 240–246.

**Рецензенты:**

Узденова З.Х., д.м.н., профессор, заведующая курсом акушерства и гинекологии кафедры детских болезней, ФГБОУ ВПО «Кабардино-Балкарский государственный университет им. Х.М. Бербекова», г. Нальчик;

Иванова М.Р., д.м.н., профессор, заведующая кафедрой инфекционных болезней, ФГБОУ ВПО «Кабардино-Балкарский государственный университет им. Х.М. Бербекова», г. Нальчик.

Работа поступила в редакцию 19.02.2013.