

## ПЕРСИСТЕНЦИЯ ВИРУСА ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА В ШЕЙКЕ МАТКИ И АЛЛЕЛЬНЫЙ ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ ТОЛЛ-ПОДОБНЫХ РЕЦЕПТОРОВ, ИНТЕРФЕРОНА ЛЯМБДА

**Т. С. Киселева<sup>1</sup>, О. П. Гумилевская<sup>2</sup>, У. Б. Матохина<sup>3</sup>, К. П. Вахания<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Михайловская центральная районная больница,

<sup>2</sup>Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, центр клинической лабораторной диагностики,

<sup>3</sup>Волгоградский государственный медицинский университет,

кафедра клинической лабораторной диагностики с курсом клинической лабораторной диагностики ФУВ

Предполагается, что наследование определенной комбинации аллелей генов толл-подобных рецепторов и цитокинов приводит к эффективному иммунитету против вируса папилломы человека, некоторые сочетания связаны с недостаточным иммунитетом и приводят к персистенции вируса в организме. Обследованы женщины на наличие ДНК ВПЧ 16 и 18 типов методом ПЦР. В зависимости от персистенции вируса, женщин разделили на две группы и провели сравнительное исследование на основе данных по цитологической диагностике цервикальных мазков с целью ранней диагностики диспластических изменений и молекулярно-генетического анализа полиморфизмов генов Toll-like рецепторов (TLR 9 (T-1237C и A2848G), TLR 3 Phe-412 Leu) и цитокина IL28 rs8099917 T > G.

*Ключевые слова:* вирус папилломы человека, полиморфизм, Toll-рецептор, Пап-тест.

DOI 10.19163/1994-9480-2017-3(63)-56-59

## PERSISTENCE OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS IN THE UTERINE CERVIX AND ALLELIC GENE POLYMORPHISM OF TOLL-LIKE RECEPTORS AND INTERFERON LAMBDA

**T. S. Kiseleva<sup>1</sup>, O. P. Gumilevskaya<sup>2</sup>, U. B. Matohina<sup>3</sup>, K. P. Vakhaniya<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Mikhailivsky Central District Hospital,

<sup>2</sup>Military Medical Academy named after S. M. Kirov,

<sup>3</sup>Volgograd State Medical University,

Department of clinical laboratory diagnostics of faculty of advanced physicians

The inheritance of a specific combination of alleles of the genes of toll-like receptors and cytokines is believed to lead to effective immunity against the human papillomavirus; some combinations are associated with insufficient immunity and lead to persistence of the virus in the body. The women were examined for the presence of DNA HPV 16 and 18 types by PCR. Depending on the persistence of the virus, the women were divided into two groups and a comparative study was conducted based on the findings of cytological diagnosis of cervical smears for the purpose of early diagnosis of dysplastic changes and molecular genetic analysis of polymorphisms of Toll-like receptor genes (TLR 9 (T-1237C and A2848G), TLR 3 Phe-412 Leu) and cytokine IL28 rs8099917 T > G.

*Key words:* human papillomavirus, polymorphism, Toll-like receptor, Pap smear.

Современные подходы к проблеме повышения качества лечения все больше и больше связаны с развитием принципов персонализированной медицины. Это подходы к лечению патологического процесса у конкретного человека с учетом уникальных особенностей его генома. Концептуальную основу предиктивной медицины составляют представления о генетическом полиморфизме. За генетическую предрасположенность чаще всего отвечают однонуклеотидные замены (SNP) [7].

В настоящее время общепризнано, что восприимчивость к инфекционным заболеваниям генетически детерминирована и, по-видимому, большое значение имеют гены иммунного ответа и воспаления. С ответом на инфекцию и манифестацией заболевания может быть ассоциирован функциональный полиморфизм генов, кодирующих рецепторы врожденного иммунитета, кото-

рые играют ключевую роль в предрасположенности и тяжести инфекционного процесса [11].

Среди заболеваний, передающихся половым путем, особое значение имеет папилломавирусная инфекция (ПВИ), обладающая онкогенным потенциалом. Учитывая тропность вируса папилломы человека (ВПЧ) к многослойному плоскому эпителию, большое значение принадлежит системе местной защиты органов репродуктивного тракта. Ткани шейки матки обладают автономной иммунной системой, функционирующей за счет гуморальных и клеточных факторов [3].

На ранней стадии инфекции взаимосвязанными процессами микробного распознавания, клиренса, воспаления и клеточной смерти управляет система врожденного иммунитета, которая представлена нейтрофилами, моноцитами/макрофагами и дендритными клетками, распознающими патоген-ассоциированные

молекулярные паттерны благодаря специализированным паттерн-распознающим рецепторам (ППР). Одним из наиболее важных представителей семейства ППР являются Toll-подобные рецепторы (TLR) [2]. TLR являются предметом активного изучения, как в норме, так и при различных патологиях [1]. В последние годы ведутся работы по поиску ассоциаций аллельных полиморфизмов в генах TLR с патологическими состояниями на уровне слизистых оболочек, в том числе при заболеваниях урогенитального тракта [4].

Общепринятым методом диагностики патологии шейки матки является цитологическое исследование мазков с шейки матки и цервикального канала, с целью оценки клеточного состава и обнаружения атипичных клеток. Цитологическое исследование в настоящее время является одним из экономически выгодных методов. Кроме этого, учитывая, что РШМ является ВПЧ-ассоциированным заболеванием, значительное место в диагностике ПВИ занимают молекулярно-биологические методы [5]. У каждого метода имеется определенная специфичность и чувствительность, что может ограничивать их использование. Предпринимаются попытки комбинировать методы, что повышает диагностическую эффективность, однако увеличивает стоимость обследования. Внедрение новых технологий открывает новые возможности для профилактики РШМ, что является основой для снижения частоты этого заболевания в целом и открывает новые перспективы в сохранении здоровья женщины.

## ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Оценка генетически детерминированных иммунологических аспектов патогенеза папилломавирусной инфекции на основе комплексной оценки генетических и цитологических параметров, и выявлении предикторов эффективного противoinфекционного иммунитета.

## Задачи

1. Оценить состояние цитологических мазков с шейки матки у исследуемых женщин с целью оценки клеточного состава и выявления наличия атипичных клеток.

2. Оценить распределение вариантов полиморфных локусов (A2848G), (T-1237C) TLR 9, (Phe412 Leu) TLR 3 и (rs8099917 T > G) IL28B в исследуемых группах женщин.

## МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

В ходе работы было проведено обследование 194 женщин в возрасте 18–49 лет, из анамнеза которых известно наличие ВПЧ высокого онкогенного типа (ВОТ). Материалом для лабораторного исследования являлись соскоб со слизистой оболочки шейки матки и периферическая кровь пациенток, взятая утром натощак, в пробирки с антикоагулянтом 3 % ЭДТА. Все обследуемые наблюдались на протяжении не менее трех лет. Определение ДНК ВПЧ 16 и 18 типов проводили методом ПЦР по конечной точке (наборы реагентов «Амп-

лиСенс ВПЧ 16/18-FL», производства ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, ООО «ИнтерЛабСервис», Москва) в сочетании с цитологическим исследованием мазков из шейки матки (окраска по Паппенгейму). Оценка результатов цитологического исследования производилась согласно классификации Бетесда. В зависимости от присутствия вируса женщины были разделены на две группы: 98 пациенток с персистирующей папилломавирусной инфекцией (первая группа ВПЧ+) и 96 женщин без ВПЧ (вторая группа ВПЧ-).

Для исследования точечных нуклеотидных полиморфизмов (SNP) генов TLR и IL-28B использовались образцы ДНК, выделенной из лейкоцитов крови. Идентификация полиморфных аллелей генов осуществлялась методом аллельспецифической полимеразной цепной реакции с последующей электрофоретической детекцией в агарозном геле. На всех стадиях проведения молекулярно-генетических исследований использовались реактивы и методики, разработанные ООО НПФ «Литех» (г. Москва).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенный анализ анамнестических данных обследованных пациенток показал, что возраст женщин в обследуемых группах колебался от 18 до 49 лет. Большинство женщин (55,3 %) находилось в возрастной группе 18 до 30 лет, что подтверждает многочисленные данные международных и отечественных исследований о том, что у женщин молодого возраста ВПЧ-ассоциированная патология встречается чаще, однако и в зрелом возрасте является проблемой. По результатам цитологического исследования плоскоклеточные интраэпителиальные поражения были выявлены у 21 пациентки (21 %) с персистирующей ПВИ, что значительно больше, чем в группе женщин без ВПЧ (9 женщин – 9 %). Дистрофические изменения, отражающие воспалительный процесс, встречались чаще в группе женщин с персистенцией ВПЧ – у 95 пациенток (98 %) по сравнению с группой женщин без ВПЧ – у 87 женщин (91 %),  $p = 0,03$ . Только у 2 (2 %) пациенток из группы ВПЧ+ мазки соответствовали норме, что значительно меньше по сравнению с 9 (9 %) женщинами из группы ВПЧ-. Таким образом, у пациенток с персистентной формой ПВИ цитологические мазки чаще носили патологический характер, что свидетельствует о сопряженности хронической инфекции ВПЧ с другими негативными процессами в слизистой оболочке шейки матки.

В литературе имеются многочисленные и в то же время противоречивые данные о роли TLR 9 в развитии рака шейки матки при ВПЧ. В ряде исследований установлено, что у пациенток с персистирующей ПВИ не выявлялись клетки, продуцирующие TLR 9 [6, 9, 13], другие исследования показали активную экспрессию TLR 9 раковыми клетками [8]. Существует достаточно работ, посвященных оценке роли полиморфных вариантов гена TLR 9, в развитии риска цервикальных

неоплазий при ВПЧ [14, 15]. Таким образом, можно предположить, что конкретные *snr* TLR 9 могут влиять и на клиренс вируса.

Результаты исследования распределения SNP мутаций A2848G TLR 9 среди пациенток исследованных групп позволили установить, что у женщин с персистенцией ВПЧ частота встречаемости гомозиготы AA была 22 %, что значимо больше, чем в группе женщин без ВПЧ (11 %). В то же время гетерозиготный фенотип AG у пациенток с персистирующей папилломавирусной инфекцией встречался реже, чем у женщин без ВПЧ (37 % и 56 % соответственно). В то же время другой исследуемый полиморфизм TLR 9, T-1237C не был связан с персистенцией ВПЧ. Так, при сравнении пациенток с персистирующей папилломавирусной инфекцией и женщин без ВПЧ не было выявлено значимых различий в распределении вариантов этого полиморфизма.

TLR3 является одним из основных медиаторов противовирусного иммунного ответа, поскольку распознает вирусную РНК в цитоплазме зараженных клеток. Однако данные относительно роли TLR 3 и персистенцией ПВИ и ее исходом не однозначны. Так, одни исследователи обнаружили связь между клиренсом ВПЧ и уровнем экспрессии TLR 3 [9], другие установили, что повышенный уровень TLR 3 может быть маркером уже диспластических изменениях эпителия [10]. Установлено, что SNP-полиморфизм Phe-412 Leu TLR3 сопряжен с изменением структуры белка и концентрации или активности продукта гена.

В нашем исследовании анализ частоты встречаемости аллельных вариантов полиморфного локуса Phe412 Leu гена TLR 3 позволил установить значимо меньшую частоту встречаемости гомозиготного генотипа Phe/Phe у пациенток с персистенцией ВПЧ по сравнению с группой женщин без ВПЧ (4 % против 13 %). В то же время гомозиготный фенотип Leu/Leu у пациенток с персистирующей папилломавирусной инфекцией встречался чаще, чем у женщин без ВПЧ (55 % и 42 % соответственно).

В настоящее время точно установлено, что изменения в кластере генов цитокинов (IL28A, IL28B и IL29 – так называемые INF-λ) являются важным фактором, определяющим особенности противовирусной защиты организма. INF-λ индуцирует противовирусные, антипролиферативные, противоопухолевые и иммунные эффекты. Наибольшее значение имеет полиморфизм в регионе, примыкающем к гену интерлейкина 28B (IL28B) [12]. Установлено, что он ассоциирован с генетической резистентностью к вирусным инфекциям и эффективностью лечения хронического гепатита С комбинированной противовирусной терапией и помогает прогнозировать вероятность самопроизвольной элиминации вируса. В нашем исследовании, при сравнении пациенток с персистирующей папилломавирусной инфекцией и женщин без ВПЧ не было выявлено значимых различий в распределении вариантов полиморфизма rs8099917 T>G гена IL28B. Это может свидетельство-

вать о незначительной роли INF-λ в местном иммунитете против ВПЧ.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные нами данные позволяют сделать следующие выводы:

1. Женщины с высокоонкогенными типами ВПЧ 16 и 18 типов являются группой риска по развитию цервикальных интраэпителиальных поражений. У пациенток с персистой формой ПВИ цитологические мазки чаще носили патологический характер.

2. Toll-рецепторы принимают активное участие в элиминации ВПЧ из организма, наличие определенных полиморфных локусов гена TLR9 (A2848G) и TLR3 (Phe-412 Leu) предрасполагает к хронизации процесса.

3. Изученный полиморфный вариант rs8099917 T > G гена INF-λ не связан с персистенцией вируса папилломы человека.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Бережная Н.М. Toll-like рецепторы и онкогенез // Онкология. – 2013. – № 2 (15). – С. 76–87.
2. Гумилевский Б.Ю., Гумилевская О.П. Аллельный полиморфизм генов цитокинов при хроническом отторжении ренального трансплантата // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2010. – № 3. – С. 62–65.
3. Лебедева О.П., Пахомов С.П., Калуцкий П.В., Карпов П.А., Чурносов М.И. Роль Толл-подобных рецепторов врожденного иммунитета в развитии акушерской и гинекологической патологии // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2012. – № 1. – С. 19–26.
4. Лемякина Е.В., Гумилевский Б.Ю. Особенности *snr* полиморфизма генов Toll рецепторов при хроническом неспецифическом цервиците // Врач-аспирант. – 2013. – № 6.3 (61). – С. 427–431.
5. Полонская Н.Ю., Юрасова И.В. Цитологическое исследование цервикальных мазков – Пап-тест. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2016.
6. Прошин С.Н., Глушаков Р., Шабанов П., Сайковская Л. А., Семёнова И.В. Значение экспрессии TLR рецепторов для выбора фармакологической коррекции патологии шейки матки и эндометрия // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2011. – № 1 (6). – С. 91–97.
7. Ризванова Ф.Ф., Лукуза О.И., Файзуллина Р.А., Гайфуллина Р.Ф., Ризванов А.А. Генетическая диагностика: полиморфизм генов цитокинов // Практическая медицина. – 2010. – № 45 (6). – С. 41–43.
8. Chen X., Wang S., Liu L., Chen Z., Qiang F. A genetic variant in the promoter region of Toll-like receptor 9 and cervical cancer susceptibility // DNA Cell Biol. – 2012. – Vol. 31, № 5. – P. 766–771.
9. Daud I.I., Scott M.E., Ma Y. Association between toll-like receptor expression and human papillomavirus type 16 persistence // International Journal of Cancer. – 2011. – Vol. 128. – P. 879–886.
10. DeCarlo C., Rosa B., Jackson R., Niccoli S., Escott N. Toll-Like Receptor Transcriptome in the HPV-Positive Cervical Cancer Microenvironment // Clinical and Developmental Immunology. – 2012. – Vol. 2012. – P. 1–9.
11. Douville R., Lissitsyn Y., Hirschfeld A., et al. TLR4 Asp299Gly and Thr399Ile Polymorphisms: No Impact on Human Immune Responsiveness to LPS or Respiratory Syncytial Virus // PLoS ONE. – 2010. – Vol. 5. № 8. – P. 1–10.
12. Ge D., Fellay J., Thompson A., Simon J., Shianna K. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance // Nature. – 2009. – Vol. 461. – P. 399–401.
13. Hasan U. Human papillomavirus (HPV) deregulation of Toll-like receptor 9 // Oncol Immunology. – 2014. – Vol. 3. – P. e27257-1-e27257-3.

14. Lai Z., Ni-Zhang, Pan X., Song L. Toll-like receptor 9 (TLR9) gene polymorphisms associated with increased susceptibility of human papillomavirus-16 infection in patients with cervical cancer // Journal of International Medical Research. – 2013. – Vol. 41, № 4. – P. 1027–1036.

15. Oliveira L., Louvanto K., Ramanakumar A., Franco E., Villa L. Polymorphism in the promoter region of the Toll-like receptor 9 gene and cervical human papillomavirus infection // Journal of General Virology. – 2013. – Vol. 94. – P. 1858–1864.

## REFERENCES

1. Berezhnaja N.M. Toll-like receptory i onkogenez [Toll-like receptors and oncogenesis] *Onkologija*. 2013, no2 (15), S. 76-87 (In Russ.)

2. Gumilevskij B.Ju., Gumilevskaja O.P. Allel'nyj polimorfizm genov citokinov pri hronicheskom ottozhenii renal'nogo transplantata [Allelic polymorphism of cytokine genes in chronic rejection of a renal transplant] *Vestnik Volgogradskogo Gosudarstvennogo Medicinskogo Universiteta*. 2010, no3, S. 62-65 (In Russ.)

3. Lebedeva O.P., Pahomov S.P., Kaluckij P.V., Karpov P.A., Churnosov M.I. Rol' Toll-podobnyh receptorov vrozhdennogo immuniteta v razvitii akusherskoj i ginekologicheskoy patologii [Toll-like receptors of innate immunity in the development of obstetric and gynecological pathology] *Immunopatologija, allergologija, infektologija*. 2012, no1, S. 19-26 (In Russ.)

4. Lemjakina E.V., Gumilevskij B.Ju. Osobennosti snp polimorfizma genov Toll receptorov pri hronicheskom nespecificeskom cervicite [Features of snp polymorphism of Toll receptor genes in chronic nonspecific cervicitis] *Vrach-aspirant*. 2013, no6.3 (61), S. 427-431 (In Russ.)

5. Polonskaja N.Ju., Jurasova I.V. Citologicheskoe issledovanie cervikal'nyh mazkov Pap-test. M.: GJeOTAR-Media, 2016.

6. Proshin S.N., Glushakov R., Shabanov P., Sajkovskaja L. A., Semjonova I.V. Znachenie jekspressii TLR receptorov dlja vybora farmakologicheskoy korekcii patologii shejki matki i jendometrija [Value of TLR receptor expression for the selection of

pharmacological correction of cervical and endometrial pathology] *Kletochnaja transplantologija i tkanevaja inzhenerija*. 2011, no 1(6), S. 91-97 (In Russ.)

7. Rizvanova F.F., Pikuza O.I., Fajzullina R.A., Gajfullina R.F., Rizvanov A.A. Geneticheskaja diagnostika: polimorfizm genov citokinov [Genetic diagnostics: polymorphism of cytokine genes Practical medicine] *Prakticheskaja medicina*. 2010, no45 (6), S. 41-43 (In Russ.)

8. Chen X., Wang S., Liu L., Chen Z., Qiang F. A genetic variant in the promoter region of Toll-like receptor 9 and cervical cancer susceptibility DNA Cell Biol. 2012. Vol. 31, no5. P. 766-771.

9. Daud I.I., Scott M.E., Ma Y. Association between toll-like receptor expression and human papillomavirus type 16 persistence International. Journal of Cancer. 2011. Vol. 128. P. 879-886.

10. DeCarlo C., Rosa B., Jackson R., Niccoli S., Escott N. Toll-Like Receptor Transcriptome in the HPV-Positive Cervical Cancer Microenvironment Clinical and Developmental Immunology. 2012. Vol. 2012. P. 1-9.

11. Douville R., Lissitsyn Y., Hirschfeld A., et al. TLR4 Asp299Gly and Thr399Ile Polymorphisms: No Impact on Human Immune Responsiveness to LPS or Respiratory Syncytial Virus PLoS ONE. 2010. Vol. 5. no8. P. 1-10.

12. Ge D., Fellay J., Thompson A., Simon J., Shianna K. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. Nature. 2009. Vol. 461. P. 399-401.

13. Hasan U. Human papillomavirus (HPV) deregulation of Toll-like receptor 9. *Oncolmmunology*. 2014. Vol. 3. P. e27257-1-e27257-3.

14. Lai Z., Ni-Zhang, Pan X., Song L. Toll-like receptor 9 (TLR9) gene polymorphisms associated with increased susceptibility of human papillomavirus-16 infection in patients with cervical cancer Journal of International Medical Research. 2013. Vol. 41, no4. P. 1027-1036.

15. Oliveira L., Louvanto K., Ramanakumar A., Franco E., Villa L. Polymorphism in the promoter region of the Toll-like receptor 9 gene and cervical human papillomavirus infection. Journal of General Virology. 2013. Vol. 94. P. 1858-1864.

## Контактная информация

**Киселева Татьяна Сергеевна** – врач клинической лабораторной диагностики, Михайловская центральная районная больница, Волгоградская область, e-mail: sveklashka@rambler.ru