



Е.В. Шипицына, К.А. Бабкина,
Е.А. Оржесковская,
А.М. Савичева

НИИ акушерства и гинекологии
им. Д.О. Отта РАМН,
Санкт-Петербург

ПАПИЛЛОМАВИРУСНАЯ ИНФЕКЦИЯ: ФАКТОРЫ РИСКА ЦЕРВИКАЛЬНОЙ НЕОПЛАСТИЧЕСКОЙ ПРОГРЕССИИ

■ Вирус папилломы человека (ВПЧ) играет важнейшую роль в этиологии рака шейки матки (РШМ). Так как РШМ является очень редким следствием папилломавирусной инфекции, и даже в случаях тяжелой дисплазии может происходить спонтанная регрессия заболевания, поиск факторов, позволяющих прогнозировать неопластическую прогрессию, представляется чрезвычайно актуальным. В обзоре представлены результаты работ, посвященных изучению факторов риска развития РШМ. С точки зрения прогностической значимости проанализированы некоторые вирусные факторы, такие как инфицирование онкогенными типами и вариантами ВПЧ, вирусная нагрузка, интеграция вирусной ДНК в геном человека, и факторы хозяина — полиморфизм гена p53, кодирующего один из ключевых белков апоптоза, потеря гетерозиготности, гиперметилирование регуляторных последовательностей генов-супрессоров опухолевого роста.

■ **Ключевые слова:** вирус папилломы человека, рак шейки матки, неопластическая прогрессия, факторы риска

В течение последних двух десятилетий данные эпидемиологических и молекулярно-биологических исследований позволили получить убедительные доказательства этиологической роли некоторых типов вируса папилломы человека (ВПЧ) в развитии рака шейки матки (РШМ). Причинная связь ВПЧ с РШМ была оценена с использованием всех применяемых в настоящее время критериев [8] и принята научным сообществом; на сегодняшний день не существует убедительных альтернативных гипотез относительно этиологии РШМ.

Раку шейки матки предшествуют цервикальные интраэпителиальные неоплазии (ЦИН), которые по степени тяжести разделяют на ЦИН I (легкая дисплазия), ЦИН II (умеренная дисплазия) и ЦИН III (тяжелая дисплазия и карцинома *in situ*). Анализ данных, полученных разными исследовательскими группами в течение 40 лет, показал, что в большинстве случаев при наличии ЦИН I и II происходит их спонтанная регрессия [29]. Так, для ЦИН I показатели регрессии, персистенции и прогрессии до карциномы *in situ* составили 57, 32 и 11%, соответственно. Для ЦИН II эти же показатели выглядели следующим образом: в 43% случаев происходила спонтанная регрессия, в 35% случаев имела место персистенция вируса, а в 22% случаев заболевание прогрессировало до карциномы *in situ*. По этическим причинам невозможно оценить данные показатели для ЦИН III при сколько-нибудь длительном сроке наблюдения. Немногочисленные ретроспективные данные свидетельствуют о том, что спонтанная регрессия при ЦИН III встречается гораздо реже, чем при ЦИН I и ЦИН II [40].

Признание факта, что папилломавирусная инфекция (ПВИ) — необходимое условие развития РШМ, имеет огромное практическое значение. В первую очередь речь идет о пересмотре концепции групп риска: к группе высокой степени риска развития РШМ сейчас принято относить женщин с персистирующей ПВИ. Следствием этого является разработка новых стратегий скрининга и профилактики. Изменения вносятся и в определение факторов риска развития РШМ. Если раньше к ним относились такие факторы, как низкий социально-экономический статус, большое количество половых партнеров, курение, начало половой жизни в раннем возрасте, текущие или перенесенные в прошлом инфекции генитального тракта, то сейчас большинство из этих факторов рассматриваются только как факторы риска инфицирования ВПЧ. Принимая во внимание, что в подавляющем большинстве случаев происходит спонтанная элиминация вируса, а на основании морфологических критериев практически невозможно дифференцировать повреждения, которые исчезнут самопроизволь-

но, от повреждений, которые в конечном итоге будут прогрессировать до РШМ, поиск надежных прогностических факторов (или совокупности факторов) представляется чрезвычайно актуальным. Очевидно, что внимание должно быть сосредоточено на факторах, имеющих прямое или опосредованное отношение к персистенции вируса и реализации его онкогенного потенциала. В настоящее время в качестве таких факторов рассматриваются: инфекция, вызванная онкогенными типами и вариантами ВПЧ, а также несколькими типами вируса одновременно, высокая вирусная нагрузка, интеграция вирусной ДНК в геном хозяина, полиморфизм гена, кодирующего клеточный фактор апоптоза p53, и некоторые другие.

Онкогенный потенциал папилломавирусов существенно варьируется. По способности инициировать диспластические изменения и РШМ папилломавирусы условно разделены на типы «высокого» (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68) и «низкого» (6, 11, 40, 42, 43, 44) риска опухолевой трансформации инфицированного эпителия. Самым распространенным типом ВПЧ высокого онкогенного риска является 16 тип: его обнаруживают более чем в 50% случаев РШМ [27]. Неудивительно, что большая часть работ посвящена изучению ВПЧ 16 типа, и именно этот тип вируса служит моделью для изучения вирусного канцерогенеза.

Молекулярные основы типоспецифических различий в трансформирующей активности ВПЧ изучены пока недостаточно. Считается, что за онкогенность ВПЧ «высокого риска» отвечают ранние белки ВПЧ Е6 и Е7, которые в процессах immortalization и трансформации клеток действуют согласованно. Продукты генов Е6 и Е7 ВПЧ многофункциональны, что обусловлено их способностью взаимодействовать с несколькими клеточными белками. Белок Е6 участвует в инактивации клеточного фактора супрессии опухолей p53, в результате чего нарушается механизм контроля клеточного роста и процесс дифференцировки клеток. Белок Е7, взаимодействуя с другим супрессором клеточного роста — белком pRb, способен стимулировать неконтролируемый синтез ДНК. Таким образом, белки Е6 и Е7 онкогенных типов ВПЧ выводят из строя два ключевых белка, регулирующих клеточный цикл [2]. Показано, что у неонкогенных типов ВПЧ белки Е6 и Е7 не способны вызывать функциональную инактивацию p53 и pRb. Учитывая, что гены Е6 и Е7 консервативны в геноме всех ВПЧ независимо от уровня их онкогенности, можно предположить, что эти белки должны выполнять какие-то другие функции, не имеющие прямого

отношения к канцерогенезу. Однако эти функции изучены еще недостаточно.

Существуют эпидемиологические доказательства того, что молекулярные варианты ВПЧ также могут проявлять различную степень ассоциации с риском развития РШМ. Анализ нуклеотидных последовательностей сотен изолятов ВПЧ, выделенных из клинического материала и опухолевых клеточных линий, выявил значительное внутритиповое разнообразие для ВПЧ 16 типа [45, 47], 18 типа [28], 6 и 11 типов [17]. Путем сравнения нуклеотидных последовательностей различных папилломавирусов было реконструировано их распределение в человеческой популяции [7]. Данные, полученные из 25 регионов мира, говорят о том, что ВПЧ 16 типа разделится в эволюции на 5 основных ветвей: две представлены в основном в Африке, две — в Азии, и одна — в Европе и Индии [19, 28]. Эти исследования показывают, что колонизация Нового Света европейцами и африканцами отражена в распределении вариантов ВПЧ 16 типа на американском континенте. Xi L.F. и соавт. (1997), изучая полиморфизм генов LCR (*long control region* — контрольная область вируса) и Е6 ВПЧ 16 типа, выявили ассоциацию между инфекцией так называемыми неевропейскими вариантами вируса и риском развития РШМ [46]. К такому же выводу пришли Villa L.L. и соавт. (2000) при анализе полиморфизма генов LCR, Е6 и L1 ВПЧ 16 и 18 типов [43]. В основе этой ассоциации могут лежать различия как в регуляции транскрипции вирусных генов, так и в биологической активности белков, кодируемых разными вариантами вируса, например, повышенной трансформирующей способностью белков Е6 и Е7. Так, Londesborough P. и соавт. (1996), изучая полиморфизм гена Е6 ВПЧ 16 типа, описали вариант, имеющий нуклеотидную замену в позиции 350, и выявили корреляцию между инфицированием этим вариантом вируса и персистенцией ПВИ и риском развития РШМ [24]. В другом исследовании было показано, что вариант ВПЧ 16 типа с нуклеотидной заменой в гене Е7 в позиции 647 чаще других вариантов обнаруживался при цервикальных карциномах [37]. Авторы предположили, что аминокислотная замена, обусловленная данной нуклеотидной заменой, может влиять на связывание продукта гена Е7 с клеточным фактором супрессии опухолей pRb.

Анализ нуклеотидных последовательностей изолятов ВПЧ и изучение частоты встречаемости конкретных вариантов ВПЧ могут служить важным инструментом исследования трансмиссии вируса и персистенции ПВИ [15]. Так, Xi L.F. и соавт. (1995) выявили 16 различных вариантов

ВПЧ 16 типа, один из которых обладал способностью к длительной персистенции, тогда как инфекция, вызванная другими вариантами вируса, чаще всего была кратковременной [45]. Кроме того, было показано, что у женщин с несколькими вариантами ВПЧ один вариант обычно превалировал, а поликлональность вариантов вируса чаще встречалась в случаях РШМ. Эта же группа исследователей позднее показала, что внутритиповые варианты ВПЧ могут служить индикаторами прогрессии ПВИ до клинически значимых повреждений [46]. Villa L.L. и соавт. (2000) изучали связь между молекулярными вариантами ВПЧ 16 и 18 типов с персистенцией вируса, а также клиническими проявлениями ПВИ. Они обнаружили несколько вариантов этих типов вируса в цервикальных образцах, полученных от женщин с бессимптомной ПВИ в Бразилии — регионе с высоким риском развития РШМ [43]. Во всех случаях при наличии персистирующей ПВИ в образцах, полученных от одной женщины в разное время, выявляли один и тот же вариант вируса. Однако в отличие от других авторов Villa L.L. и соавт. не обнаружили множественные варианты вируса в одном образце, хотя и анализировали нуклеотидную последовательность как минимум 5 клонов каждого изолята вируса. В более поздней работе эта группа исследователей показала, что поликлональность вариантов ВПЧ 16 типа имела место лишь в 10% случаев РШМ [21]. Таким образом, представляется логичным ожидать, что изучение молекулярных основ, определяющих различия в онкогенной активности молекулярных вариантов вируса, может иметь решающее значение для понимания роли вируса в генезе РШМ [48].

В качестве одного из критериев, с помощью которых можно распознать клинически значимую инфекцию, способную развиться в заболевание, рассматривается вирусная нагрузка, хотя ее прогностическая ценность на сегодняшний день однозначно не определена. Так, Dalstein V. и соавт. (2003) с помощью метода Hybrid Capture II показали, что показатель спонтанной элиминации вируса был выше в случаях ПВИ с более низкой вирусной нагрузкой [12]. Далее прогрессия заболевания имела место только в случаях персистенции ПВИ, а риск прогрессии был выше в случаях, когда большое количество вирусной ДНК было зарегистрировано в начале наблюдения. Авторы работы заключили, что высокая вирусная нагрузка может использоваться в качестве прогностического маркера, хотя низкая нагрузка не исключает прогрессию заболевания. Ассоциация вирусной нагрузки со стадией заболевания была установлена в работе D.M. Hernandez—Her-

andez D.M. и соавт. [18]. В противоположность этому Szoke K. и соавт. (2003), изучая факторы риска неопластической прогрессии также с использованием Hybrid Capture II, показали, что высокая вирусная нагрузка не предсказывала онкогенной прогрессии [41].

Swan D.C. и соавт. (1999), сравнивая возможности разных методов при определении вирусной нагрузки, отметили, что ни один из применяемых в настоящее время методов не позволяет оценить количество копий ДНК вируса с такой точностью, как метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени [39]. С помощью этого метода они исследовали связь между вирусной нагрузкой и степенью дисплазии и показали, что среднее число копий ДНК существенно варьировалось в зависимости от типа ВПЧ, причем самые высокие показатели вирусной нагрузки были зарегистрированы для ВПЧ 16 типа. Так, у пациентов с ЦИН II-III, инфицированных ВПЧ 16 типа, среднее число копий ДНК вируса в 4–6 тысяч раз превышало среднее число копий ДНК ВПЧ 18, 31 и 45 типов, обнаруженных у пациентов с той же степенью заболевания. Кроме того, среднее количество копий ДНК ВПЧ 16 типа резко возрастало с увеличением степени дисплазии: если в случаях цитологической нормы оно составляло $2,2 \times 10^7$ копий вирусной ДНК на 1 мкг клеточной ДНК, то у пациентов с ЦИН I — $4,1 \times 10^7$, а у пациентов с ЦИН II-III — $1,3 \times 10^9$. Интересно отметить, что для других типов вируса данная закономерность не прослеживалась. Данные Swan D.C. и соавт. согласовались с результатами более ранних работ [11, 25], в которых было показано, что в случае инфекции, вызванной ВПЧ 16 типа, число копий ДНК возрастает с увеличением степени дисплазии. Исследуя связь между количеством копий ДНК ВПЧ 16 типа и степенью дисплазии, Peitsaro P. и соавт. (2002) также пришли к выводу, что прогрессия заболевания тесно связана с вирусной нагрузкой [30]. Авторы высказали предположение, что первоначально большое число копий генома ВПЧ увеличивает вероятность интеграции вирусной ДНК в геном хозяина и, как следствие, развития заболевания.

Несмотря на то что вирусная нагрузка как фактор риска неопластической прогрессии активно изучается, использование ее в качестве самостоятельного прогностического индикатора в настоящее время не представляется возможным: во-первых, зависимость степени дисплазии от вирусной нагрузки в достаточной мере описана только для ВПЧ 16 типа, а во-вторых, по причине отсутствия стандартизованного методического подхода к определению количества вирусной ДНК нельзя установить «пороговое

значение» вирусной нагрузки, выше которого она может считаться «высокой».

На сегодняшний день не существует также единого мнения о значимости множественной ПВИ (инфекции, вызванной одновременно несколькими типами ВПЧ) для неопластической прогрессии. Так, в работе Swan D.C. и соавт. (1999) было показано, что количество проб, содержащих ДНК ВПЧ нескольких онкогенных типов, увеличивалось в процентном отношении с возрастанием степени дисплазии [39]. В противоположность этому, согласно данным Perovic M.C. и соавт. (2003), множественная ПВИ чаще встречалась в случаях дисплазии легкой степени [31]. Корреляция степени дисплазии и инфекции, вызванной несколькими типами ВПЧ, была показана в работе Fife K.H. и соавт. [14]. Lee S.A. и соавт. (2003), изучая частоту встречаемости множественной ПВИ с помощью олигонуклеотидных чипов, также пришли к выводу, что инфицирование несколькими типами ВПЧ было ассоциировано с повышенным риском развития РШМ [23]. Rolon P.A. и соавт. (2000), напротив, не выявили статистически значимых различий в риске развития РШМ среди женщин, инфицированных одним типом ВПЧ, и женщин, инфицированных несколькими типами вируса [34]. В работе Rousseau M.C. с соавт. (2003) было показано, что персистенция ПВИ не зависела от того, одним или несколькими типами ВПЧ была инфицирована женщина на «базовой линии», то есть в самом начале наблюдения [35].

Исследуя разнообразие типов ВПЧ в обычной скрининговой популяции и ассоциацию множественной инфекции с цервикальной неоплазией, Cuschieri K.S. и соавт. (2004) выявили высокую частоту встречаемости множественной ПВИ вне зависимости от степени дисплазии [10]. Анализ полученных данных показал, что инфицирование несколькими онкогенными типами ВПЧ не является лучшим прогностическим индикатором развития дисплазии высокой степени по сравнению с инфицированием одним онкогенным типом вируса. Кроме того, случаи инфицирования несколькими типами ВПЧ чаще встречались среди женщин молодого возраста. По мнению авторов, это свидетельствует о том, что трансмиссия множественной ПВИ ассоциирована с более высокой сексуальной активностью. На основании полученных результатов авторы пришли к заключению, согласующемуся с мнением авторов более раннего исследования [9], что различные типы ВПЧ не кооперируются в неопластической трансформации. Ранее Thomas K.K. и соавт. (2000), изучая множественную ПВИ, не обнаружили такого сочетания типов ВПЧ, которое при

передаче имело бы преимущество перед другим сочетанием типов ВПЧ [42]. Кроме того, они показали, что риск инфицирования новым типом вируса не был меньше, если женщина ранее была инфицирована ВПЧ. Таким образом, множественная ПВИ, возможно, лишь отражает обычную сексуальную трансмиссию одновременно нескольких типов ВПЧ. Если учесть, что исследования на выявление ВПЧ становятся важным элементом в скрининге цервикальных неоплазий и РШМ, необходимость дальнейшего изучения данного аспекта не вызывает сомнений.

ДНК ВПЧ может находиться в опухолевых клетках в двух формах — эписомной и интегрированной. Биологическое значение интеграции вирусной ДНК в геном хозяина до сих пор остается неясным. Интеграция ДНК ВПЧ в клеточный геном не является необходимым этапом в жизненном цикле вируса: в результате этого события вирус теряет часть своего генома, и продукция инфекционного потомства прекращается. Однако интеграция, возможно, является важным событием в цервикальном канцерогенезе, так как она очень часто ассоциирована с неопластической прогрессией. В результате интеграции повышается стабильность транскриптов генов E6 и E7 ВПЧ и нарушается интактность гена E2, регулирующего их транскрипцию [20]. Данные о формах персистенции вирусного генома на разных стадиях опухолевой прогрессии противоречивы. Как правило, на ранних стадиях опухолевого процесса вирусная ДНК выявляется в эписомной форме, тогда как на поздних стадиях — в интегрированной [22]. Однако описаны случаи, когда в опухолевых клетках выявляли ДНК ВПЧ либо в эписомной, либо в комбинации эписомной и интегрированной форм [36, 44]. Киселев Ф.Л. и соавт. (2001) показали, что в тотальной популяции клеток из плоскоклеточных карцином экспрессируемые нуклеотидные последовательности ДНК ВПЧ 16 типа могут существовать как в интегрированной, так и в эписомной форме, причем эписомная форма может выявляться на поздних стадиях заболевания, а интегрированная — на ранних [3]. Gallo G. и соавт. (2003) изучали статус ДНК ВПЧ 16 типа в случаях дисплазии легкой степени с целью установить, насколько рано начинается процесс интеграции вирусной ДНК: они показали, что в половине всех случаев встречалась интегрированная форма ДНК [16].

Четкое представление о том, какие именно участки генома теряются, а какие — сохраняются в процессе интеграции, может иметь решающее значение для понимания механизма малигнизации, индуцированной ВПЧ. Общее заключение целого ряда работ по изучению интеграции ДНК

ВПЧ 16 типа с использованием как клеточных линий, так и клинического опухолевого материала состоит в том, что в интегрированной форме вируса всегда присутствуют LCR, E6 и E7. Что касается гена E2, то в некоторых работах показано, что при интеграции теряется весь ген, в других — лишь его часть. Существует мнение, что характер интеграции ВПЧ 16 типа отличается от характера интеграции ВПЧ других онкогенных типов. Так, для ВПЧ 18, 31 и 35 типов показано, что в случаях дисплазий и РШМ вирусный геном всегда интегрирован в геном хозяина, тогда как геном ВПЧ 16 типа может существовать в эпизодной форме даже при карциноме [32]. Badaracco G. и соавт. (2002) изучали связь между физическим статусом ВПЧ 16 и 18 типов и клиническими параметрами в 86 случаях цервикальных карцином и дисплазий [5]. В 40 случаях был обнаружен ВПЧ 16 типа (46,6%), в 7 — 18 типа (8,1%), и в 39 случаях были обнаружены оба типа ВПЧ (45,3%). ДНК ВПЧ 16 типа была выявлена как в интегрированной (35,4%), так и в эпизодной (36,7%) формах; в 27,8% случаев были обнаружены обе формы ДНК. В противоположность этому во всех 46 случаях выявления ВПЧ 18 типа ДНК вируса присутствовала исключительно в интегрированной форме. Интеграция ВПЧ 16 типа была ассоциирована со стадией заболевания. Интересным представляется наблюдение авторов, что ДНК ВПЧ 16 типа чаще обнаруживалась в эпизодной форме в случаях, когда имела место инфекция обоими типами ВПЧ, чем в случаях, когда присутствовала ДНК только 16 типа. Авторы предположили существование своего рода конкуренции за клеточные сайты интеграции. Полная интеграция ВПЧ 18 типа, даже в случаях неоплазий средней степени, наводит на мысль о возможных различиях в поведении разных типов вируса при онкогенной трансформации и может отражать особую «агрессивность» этого типа ВПЧ. Авторы работы заключили, что определение типа вируса в сочетании с оценкой его физического статуса могут обеспечить лучшую диагностическую и прогностическую оценку заболевания.

Недавно был предложен высокочувствительный метод определения физического статуса ВПЧ с применением ПЦР в реальном времени, основывающийся на следующих допущениях: 1) при интегрированной форме ДНК ВПЧ ген E2 не обнаруживается; 2) при эпизодной форме вируса количество копий гена E2 равно количеству копий гена E6; 3) если в клеточный геном интегрирована только часть вируса, число копий гена E2 меньше числа копий гена E6. В ра-

боте Peitsaro P. и соавт. (2002) с помощью данного метода был определен физический статус ДНК ВПЧ в биопсийном материале от 24 женщин, наблюдавшихся в течение 10 лет [30]. Только одна проба, взятая от пациентки с ЦИН II, содержала эпизодную форму ДНК, и в данном случае имела место спонтанная регрессия. Пробы от другой пациентки содержали только интегрированную форму ДНК, и в данном случае ЦИН I прогрессировала до ЦИН III в течение двух лет. Во всех остальных случаях было показано, что часть ДНК ВПЧ существовала в эпизодной форме, часть — в интегрированной.

Несмотря на то что остается еще много вопросов относительно распространенности интегрированных форм вируса, особенно в преинвазивных повреждениях, а также клинической значимости явления интеграции, интеграция ДНК ВПЧ рассматривается как ключевой фактор риска неопластической прогрессии. По мнению многих авторов, всестороннее изучение этого сложного феномена не только углубит понимание биологии неоплазий, но также обеспечит важным инструментом, позволяющим прогнозировать течение заболевания.

ВПЧ взаимодействует с клеткой хозяина на разных уровнях, затрагивая различные системы защиты клетки от независимой пролиферации. Бесконтрольная пролиферация инфицированных клеток приводит к накоплению генетических повреждений и, в конечном счете, к малигнизации. Как пример подобного влияния можно привести инактивацию вирусным белком E6 клеточного белка p53, одного из ключевых факторов апоптоза. Апоптоз — это активно протекающая физиологическая гибель клетки. Апоптоз является чрезвычайно важным биологическим феноменом. Он представляет собой защитно-адаптивный механизм по устранению ненужных и потенциально опасных клеток, существующий в строгом балансе с процессами пролиферации и дифференцировки. При наличии повреждений клеточной ДНК белок p53 активирует запуск механизма апоптоза. Интеграция ВПЧ высокого риска в геном человека повышает экспрессию вирусного онкогена E6, который индуцирует протеолитическую деградацию белка p53, что служит своеобразным механизмом ухода вируса от действия апоптоза. Исследование нуклеотидной последовательности гена, кодирующего p53, показало, что он имеет полиморфизм в 72 кодоне. В человеческой популяции описано два аллеля гена p53, один из которых кодирует аргинин в положении 72, другой — пролин. Storey A. и соавт. (1998) обнаружили, что белок, имеющий аргинин в положении 72, был более чув-

ствительным к Е6-опосредованной деградации, чем белок, имеющий в этом положении пролин [38]. Аллельный анализ показал, что среди пациенток с РШМ гомозиготы по аргинину встречались гораздо чаще, чем в популяции здоровых женщин. Таким образом, мутантный белок p53, по мнению авторов, может служить биологическим маркером прогноза неопластической прогрессии.

Одним из подходов к прогнозированию ВПЧ-ассоциированных повреждений является определение апоптотической готовности клеток [1]. Наиболее изученный критерий среди лабораторно-диагностических показателей апоптотической активности — процентное содержание CD95⁺-лимфоцитов в крови. Известна положительная корреляция этого показателя с возрастом у здорового человека. Доля CD95⁺-лимфоцитов в крови здоровых людей с возрастом монотонно повышается, а у больных остается практически неизменной. Это означает, что у больных с ВПЧ, особенно старшей возрастной группы (54–67 лет), готовность клеток к апоптозу более низкая, чем у здоровых. Иными словами, эффективность последнего (после системы интерферона и иммунной системы) «эшелона» выбраковки дефектных, инфицированных клеток у больных существенно снижена. Эти клетки более продолжительное время остаются в организме больных, составляя основу рецидива заболевания, хронического его течения и развития РШМ.

Хорошо известна роль эстрогенов в развитии неопластических процессов в так называемых эстрогенчувствительных тканях, к числу которых относится и эпителий шейки матки. Превращение метаболитов эстрогена осуществляет специальная монооксигеназная система печени, которая представлена ферментами цитохрома P450, катализирующими образование гидрокси-производных эстрогена 2-гидроксиэстрогена (2-ОНЕ1) и 16 α -гидроксиэстрогена (16 α -ОНЕ1). Эти производные обладают противоположными биологическими эффектами: 2-ОНЕ1 не влияет на пролиферацию клеток, в то время как 16 α -ОНЕ1, наоборот, стимулирует рост клеток и является антагонистом эстрогена. Установлено, что в инфицированных ВПЧ клетках уровень образования 16 α -ОНЕ1 повышается в несколько раз [4]. Изучение функций 2-ОНЕ1 и 16 α -ОНЕ1 позволило выявить однозначную связь между уровнем 16 α -ОНЕ1 и риском развития опухолей в эстрогензависимых тканях. В то же время было показано, что при повышении уровня 2-ОНЕ1 наблюдалась тенденция к гибели опухолевых клеток и профилактики их дальнейшего образования. Многочисленные эксперименты *in vivo*

доказали необходимость в поддержании такого баланса между этими метаболитами, при котором концентрация 2-ОНЕ1 должна превышать концентрацию 16 α -ОНЕ1 как минимум в два раза. Отношение 2-ОНЕ1 к 16 α -ОНЕ1 рассматривается как надежный диагностический критерий при определении риска и прогноза развития эстрогензависимых опухолей. В настоящее время применяется простой и удобный метод измерения метаболитов эстрогенов в моче, основанный на иммуноферментном анализе. Простота и высокая чувствительность метода позволяют четко выявить соотношение 2-ОНЕ1/16 α -ОНЕ1 в концентрации обоих гидроксистероидов менее чем два нанограмма в миллилитре; соотношение 2-ОНЕ1/16 α -ОНЕ1 ниже двух относит пациента к группе риска развития эстрогензависимых опухолей [6].

Одним из существенных факторов канцерогенеза является изменение статуса метилирования (модификации ДНК путем добавления метильной группы к цитозину) отдельных генов или всего генома в целом, которое драматическим образом сказывается на судьбе клеток. Растущий список генов, aberrантное метилирование которых отмечено при различных типах злокачественных новообразований, включает в себя гены, ответственные за реализацию фундаментальных процессов клеточной физиологии, таких как клеточный цикл, апоптоз, дифференцировка, репарация ДНК, передача внутриклеточных и межклеточных сигналов, регуляция факторов транскрипции. Гиперметилирование регуляторных последовательностей генов-супрессоров опухолевого роста приводит к их инактивации. В работе Dong S.M. и соавт. (2001) было показано, что увеличение уровня метилирования ряда генов, кодирующих факторы роста и развития клеток, коррелировало с цервикальной опухолевой прогрессией [13]. Таким образом, гиперметилирование также может служить маркером раковых изменений.

Интеграция вируса инициирует процессы, в результате которых в клетках эпителия шейки матки возникают генетические и эпигенетические (не затрагивающие геном) нарушения, способствующие опухолевой прогрессии. Наиболее вероятным следствием этих событий может быть инактивация генов-супрессоров опухолевого роста. Один из подходов к идентификации участков хромосом, содержащих потенциальные гены-супрессоры, состоит в анализе потери гетерозиготности (LOH — *loss of heterozygosity*) в опухолевой ДНК с использованием микросателлитных маркеров. Пристальное изучение аллельных делеций в различных локусах хромосо-

мы 6 человека показало, что определенные делеции могут указывать на неблагоприятный прогноз течения заболевания. Так, делеции в одном из участков хромосомы 6 ассоциированы с возникновением таких аутоиммунных заболеваний, как анкилозирующий спондилез и ревматоидный артрит. По-видимому, эти делеции при раке шейки матки неслучайны и могут быть связаны с нарушением иммунитета. Кроме того, в опухолевых клетках делетированы гены семейства фактора некроза опухолей (TNF). Комплексное изучение антигенов HLA класса I обнаружало изменение структуры генов и их экспрессии в 90% опухолей шейки матки, причем в 50% случаев это происходит в результате LOH и еще в 20% — за счет мутаций генов HLA класса I, либо β -микроглобулина. По-видимому, нарушения в локусе HLA играют решающую роль в способности опухолевых клеток преодолевать иммунный ответ как на ранних стадиях вирусной инфекции, так и в ходе опухолевой прогрессии [26].

Частота LOH растет с прогрессией опухоли и достигает 67% в опухолях второй стадии, то есть в большей степени частота LOH коррелирует с увеличением размеров опухоли. Эти данные позволяют предполагать существование нескольких локусов на коротком и длинном плечах хромосомы 6, специфически ассоциированных с прогрессией рака шейки матки. Появление аллельных делеций в определенных локусах при дисплазии может указывать на ее дальнейшую прогрессию и плохой прогноз. Изучение LOH при раке шейки матки приобретает также практическую значимость в связи с сообщениями о попытках молекулярной диагностики дисплазий и рака шейки матки с помощью микросателлитного анализа ДНК из цитологических мазков [33].

Таким образом, изучение генов человека, продукты которых взаимодействуют с белками ВПЧ, даст возможность составлять индивидуальный генетический портрет пациента, что позволит прогнозировать течение ПВИ и ассоциированных с ней злокачественных изменений. Но это вопросы будущего и персонализированной медицины. Текущие исследования хозяйских факторов клеточного и гуморального иммунитета являются важным шагом по направлению к идентификации и оценке ключевых иммунных путей, специфических для цервикального патогенеза. Пониманию механизмов канцерогенеза, индуцированного ВПЧ, должны способствовать также полная характеристика генома вируса и изучение функций вирусных генов различных типов и молекулярных вариантов ВПЧ. Несмотря на то, что биологическое и клиническое значение та-

ких факторов, как интеграция вируса и вирусная нагрузка, инфицирование онкогенными типами и молекулярными вариантами ВПЧ в настоящее время активно изучаются и обсуждаются, имеющиеся данные не позволяют однозначно оценить их прогностическую значимость из-за ряда методологических ограничений. Тщательно спланированные молекулярные и эпидемиологические исследования помогут оценить роль этих факторов в цервикальной неопластической прогрессии и выработать критерии высокой диагностической и прогностической ценности.

Литература

1. Барышников А.Ю., Шишкин Ю.В. Иммунологические проблемы апоптоза. — М., 2002. — 318 с.
2. Казин В.Л. Введение в молекулярную вирусологию. — СПб.: Изд-во СПбГТУ, 2002. — 302 с.
3. Киселев Ф.Л., Киселева Н.П., Кобзева В.К. и др. Статус ДНК вируса папиллом человека в опухолях шейки матки // Мол. Биол. Клетки — 2001. — Т. 35. — С. 470–476.
4. Auborn K.J., Woodworth C., DiPaolo J.A., Bradlow H.L. The interaction between HPV infection and estrogen metabolism in cervical carcinogenesis // Int. J. Cancer. — 1991. — Vol. 49. — P. 867–869.
5. Badaracco G., Venuti A., Sedati A., Marcante M.L. HPV16 and HPV18 in genital tumors: significantly different levels of viral integration and correlation to tumor invasiveness // J. Med. Virol. — 2002. — Vol. 67. — P. 574–582.
6. Bell M. C., Crowley-Nowick P., Bradlow H. L. et al. Placebo-controlled trial of indol-3-carbinol in the treatment of CIN (cervix cancer) // Gynecol. Oncol. — 2000. — Vol. 78. — P. 123–129.
7. Bernard H. U., Chan S.-Y., Delius H. Evolution of papillomaviruses // Cur. Top. Microbiol. Immunol. — 1994. — Vol. 186. — P. 33–53.
8. Bosch F. X., Lorincz A., Munoz N. et al. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer // J. Clin. Pathol. — 2002. — Vol. 55. — P. 244–265.
9. Chaouki N., Bosch F. X., Munoz N. et al. The viral origin of cervical cancer in Rabat, Morocco // Int. J. Cancer. — 1998. — Vol. 75. — P. 546–554.
10. Cuschieri K.S., Cubie H.A., Whitley M. W. et al. Multiple high risk HPV infections are common in cervical neoplasia and young women in a cervical screening population // J. Clin. Pathol. — 2004. — Vol. 57. — P. 68–72.
11. Cuzick J., Terry G., Ho L. et al. Type-specific human papillomavirus DNA in abnormal smears as a predictor of high-grade cervical intraepithelial neoplasia // Br. J. Cancer. — 1994. — Vol. 69. — P. 167–171.
12. Dalstein V., Riethmuller D., Pretet J.L. et al. Persistence and load of high-risk HPV are predictors for development of high-grade cervical lesions: a longitudinal French cohort study // Int. J. Cancer. — 2003. — Vol. 106. — P. 396–403.
13. Dong S. M., Kim H. S., Rha S. H., Sidransky D. Promoter hypermethylation of multiple genes in carcinoma of the uterine cervix // Clin. Cancer Reseach. — 2001. — Vol. 7. — P. 1982–1986.
14. Fife K. H., Cramer H. M., Schroeder J. M., Brown D. R. Detection of multiple human papillomavirus types in the lower genital tract correlates with cervical dysplasia // J. Med. Virol. — 2001. — Vol. 64. — P. 550–559.
15. Franco E., Villa L. L., Rahal P., Ruiz A. Molecular variant analysis as an epidemiological tool to study persistence of cervical human papillomavirus infection // J. Nation. Cancer Inst. — 1994. — Vol. 86. — P. 1558–1559.
16. Gallo G., Bibbo M., Bagella L. et al. Study of viral integration of HPV-16 in young patients with LSIL // J. Clin. Pathol. — 2003. — Vol. 56. — P. 532–536.

17. *Heinzel P.A., Chan S.-Y., Ho L. et al.* Variation of human papillomavirus type 6 (HPV-6) and HPV-11 genome samples throughout the world // *J. Clin. Microbiol.* — 1995. — Vol. 33. — P. 1746-1754.
18. *Hernandez-Hernandez D.M., Ornelas-Bernal L., Guido-Jimenez M. et al.* Association between high-risk human papillomavirus DNA load and precursor lesions of cervical cancer in Mexican women // *Gynecol. Oncol.* — 2003. — Vol. 90. — P. 310-317.
19. *Ho L., Chan S.-Y., Burk R. D. et al.* The genetic drift of human papillomavirus type 16 is a means of reconstructing prehistoric viral spread and the movement of ancient human populations // *J. Virol.* — 1993. — Vol. 67. — P. 6413-6423.
20. *Jeon S., Lambert P.* Integration of human papillomavirus type 16 DNA into the human genome leads to increased stability of E6 and E7 mRNAs: Implications for cervical carcinogenesis // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1995. — Vol. 92. — P. 1654-1659.
21. *Junés K. S., Síchero L., Mello W. et al.* Intratypic variability of HPV-16 and -18 in tumour biopsies from a high risk area for cervical cancer // 18th International Papillomavirus Conference. — 2000, 23-28 July. — Barcelona, Spain.
22. *Klaes R., Woerner S.M., Ridder R. et al.* Detection of high-risk cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer by amplification of transcripts derived from integrated papillomavirus oncogenes // *Cancer Research-1999.* — Vol. 59. — P. 6132-6136.
23. *Lee S.A., Kang D., Seo S.S. et al.* Multiple HPV infection in cervical cancer screened by HPV-DNA Chip // *Cancer Lett.* — 2003. — Vol. 198. — P. 187-192.
24. *Londesborough P., Ho L., Terry G. et al.* Human papillomavirus genotype as a predictor of persistence and development of high-grade lesions in women with minor cervical abnormalities // *Int. J. Cancer.* — 1996. — Vol. 69. — P. 364-368.
25. *Mansell M.E., Ho L., Terry G. et al.* Semi-quantitative human papillomavirus DNA detection in the management of women with minor cytological abnormality // *Br. J. Obstet. Gynaecol.* — 1994. — Vol. 101. — P. 807-809.
26. *Mazurenko N., Attaleb M., Gritsko T. et al.* High resolution mapping of chromosome 6 deletions in cervical cancer // *Oncol. Reports.* — 1999. — Vol. 6. — P. 859-863.
27. *Munoz N., Bosch F.X., Sanjose S. et al.* Epidemiological classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer // *New Eng. J. Med.* — 2003. — Vol. 348. — P. 518-527.
28. *Ong C.K., Chan S.-Y., Campo M.S. et al.* Evolution of human papillomavirus type 18: an ancient phylogenetic root in Africa and intratype diversity reflect co-evolution with human ethnic groups // *J. Virol.* — 1993. — Vol. 67. — P. 6424-6431.
29. *Ostor A.G.* Natural history of cervical intraepithelial neoplasia — a critical review // *Int. J. Gynecol. Pathol.* — 1993. — Vol. 12. — P. 186-192.
30. *Peitsaro P., Johansson B., Syrjanen S.* Integrated human papillomavirus type 16 is frequently found in cervical cancer precursors as demonstrated by a novel quantitative real-time PCR technique // *J. Clin. Microbiol.* — 2002. — Vol. 40. — P. 886-891.
31. *Perovic M.V., Berisavac M.J., Kuljic-Kapulica N., Jovanovic T.* High-risk human papillomavirus (HPV) types in patients with squamous intraepithelial lesions (SIL) // *Eur. J. Gynaecol. Oncol.* — 2003. — Vol. 24. — P. 178-180.
32. *Pirami L., Giache V., Becciolini A.* Analysis of HPV16, 18, 31, and 35 DNA in pre-invasive and invasive lesions of the uterine cervix // *J. Clin. Pathol.* — 1997. — Vol. 50. — P. 600-604.
33. *Rha S.H., Dong S.M., Jen J. et al.* Molecular detection of cervical intraepithelial neoplasia and cervical carcinoma by microsatellite analysis of Papanicolaou smears // *Int. J. Cancer.* — 2001. — Vol. 93. — P. 424.
34. *Rolon P.A., Smith J.S., Munoz N. et al.* Human papillomavirus infection and invasive cervical cancer in Paraguay // *Int. J. Cancer.* — 2000. — Vol. 85. — P. 486-491.
35. *Rousseau M.C., Abrahamowicz M., Villa L.L. et al.* Predictors of cervical coinfection with multiple human papillomavirus types // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* — 2003. — Vol. 12. — P. 1029-1037.
36. *Samoylova E.V., Shaikhaiev G.O., Petrov S.V. et al.* HPV infection in cervical-cancer cases in Russia // *Int. J. Cancer.* — 1995. — Vol. 61. — P. 337-341.
37. *Song Y.S., Kee S.H., Kim J.W. et al.* Major sequence variants in E7 gene of human papillomavirus type 16 from cervical cancerous and non-cancerous lesions of Korean women // *Gynaecol. Oncol.* — 1997. — Vol. 66. — P. 275-281.
38. *Storey A., Thomas M., Kalita A. et al.* Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer // *Nature-1998.* — Vol. 393. — P. 229-234.
39. *Swan D.C., Tucker R.A., Tortolero-Luna G. et al.* Human papillomavirus (HPV) DNA copy number is dependent on grade of cervical disease and HPV type // *J. Clin. Microbiol.* — 1999. — Vol. 37. — P. 1030-1034.
40. *Syrjanen K.J.* Biological behavior of cervical intraepithelial neoplasia // *New developments in cervical cancer screening and prevention.* — Oxford: Blackwell Science, 1997. — P. 93-108.
41. *Szoke K., Sapy T., Krasznai Z. et al.* Moderate variation of the oncogenic potential among high-risk human papillomavirus types in gynecologic patients with cervical abnormalities // *J. Med. Virol.* — 2003. — Vol. 71. — P. 585-592.
42. *Thomas K.K., Hughes J.P., Kuypers J.M. et al.* Concurrent and sequential acquisition of different genital human papillomavirus types // *J. Infect. Dis.* — 2000. — Vol. 182. — P. 1097-1102.
43. *Villa L.L., Síchero L., Rahal P. et al.* Molecular variants of human papillomavirus types 16 and 18 preferentially associated with cervical neoplasia // *J. Gen. Virol.* — 2000. — Vol. 81. — P. 2959-2968.
44. *Vernon S.D., Unger E.R., Miller D.L. et al.* Association of human papillomavirus type 16 integration in the E2 gene with poor disease-free survival from cervical cancer // *Int. J. Cancer.* — 1997. — Vol. 74. — P. 50-56.
45. *Xi L.F., Demers W., Koutsky L.A. et al.* Analysis of human papillomavirus type 16 variants indicates establishment of persistent infection // *J. Infect. Dis.* — 1995. — Vol. 172. — P. 747-755.
46. *Xi L.F., Koutsky L.A., Galloway D.A. et al.* Genomic variation of human papillomavirus type 16 and risk for high-grade cervical intraepithelial neoplasia // *J. Natl. Cancer Inst.* — 1997. — Vol. 89. — P. 796-802.
47. *Yamada T., Wheeler C.M., Halpern A.L. et al.* Human papillomavirus type 16 lineages in the United States populations characterized by nucleotide sequence analysis of the E6, E2 and L1 coding segments // *J. Virol.* — 1995. — Vol. 69. — P. 7743-7753.
48. *Zehbe J., Tommasino M.* The biological significance of human papillomavirus type 16 variants for the development of cervical neoplasia // *Papillomavirus Report.* — 1999. — Vol. 10. — P. 105-116.

PAPILLOMAVIRAL INFECTION: RISK FACTORS OF CERVICAL NEOPLASTIC PROGRESSION

Shipitsyna E.V., Babkina K.A., Orzheskovskaya E.A., Savitcheva A.M.

■ **Summary:** Human papillomavirus (HPV) plays the important role in the etiology of the cervical cancer. Considering that the cancer is very rare consequence of HPV-infection and even the high-grade lesions may spontaneously regress, search for the factors capable of predicting disease progression is of great significance. In the present review results of researches into risk factors of developing cervical cancer are summarized. Some virus-associated factors, such as infection with oncogenic types and variants of human papillomavirus, viral load, integration of viral DNA into cell genome, as well as host factors - polymorphism of p53 gene encoding a key apoptotic protein, loss of heterozygosity, tumor suppressor genes hypermethylation - are analyzed in terms of their prognostic value.

■ **Key words:** human papillomavirus, cervical cancer, neoplastic progression, risk factors.