

Е.В. Бахидзе^{1,2}, И.В. Берлев^{1,2}, П.А. Архангельская², А.В. Малек¹

Возможности оценки прогноза развития преинвазивных неоплазий шейки матки с помощью новейших молекулярно-биологических методов

¹ ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России,

² Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург

Вторичной профилактикой РШМ является выявление и лечение преинвазивных форм заболевания, к которым относятся дисплазии или цервикальные интраэпителиальные неоплазии (CIN). Традиционным методом выявления CIN является цитологический, однако чувствительность и специфичность этого метода ограничена. Обсуждается эффективность применения теста на выявление ВПЧ, а также новых молекулярно-биологических методов для оценки прогноза развития дисплазии и выбора адекватной лечебной тактики. В статье рассмотрены возможности использования новых молекулярно-биологических методов для оценки прогноза развития CIN и рака шейки матки (РШМ).

Ключевые слова: рак шейки матки, вирус папилломы человека, цервикальные интраэпителиальные неоплазии, прогноз

Рак шейки матки (РШМ), второе по распространенности злокачественное новообразование женской репродуктивной системы, после рака молочной железы у женщин во всем мире [14]. Несмотря на впечатляющий прогресс в разработке стратегий предотвращения развития РШМ при помощи современных программ цитологического скрининга, направленного на выявление и лечение преинвазивных форм заболевания, РШМ остается значительной проблемой для всего мира и не только для развивающихся стран, где эти программы отсутствуют. По мнению исследователей, проблема связана с недостаточной эффективностью в ряде случаев самого традиционного цитологического метода, чувствительность и специфичность которого ограничена [28,33]. С целью повышения эффективности программ скрининга РШМ в последние годы предлагается интегрировать методы исследования на онкогенные типы вируса папилломы человека (ВПЧ) в программы скрининга, что уже применяется в ряде стран Западной Европы [12, 31].

Благодаря фундаментальным и эпидемиологическим исследованиям последних десятилетий патогенетическая роль инфицирования онкогенными типами ВПЧ эпителия шейки матки

в патогенезе РШМ и его предшествующих поражений - CIN не вызывает сомнений [8,34,38]. При этом инфицирование ВПЧ широко распространено среди сексуально активных женщин и чаще не вызывает ни умеренных, ни переходных цитологических изменений и лишь примерно у 0,01% инфицированных ВПЧ женщин развивается РШМ через 10-15 лет от момента инфицирования [8]. В связи с этим исключительно важным представляется разработка методов оценки прогноза развития CIN на фоне папилломавирусной инфекции.

Прогрессию цервикальных неоплазий связывают с участием дополнительных внутренних или внешних факторов (кофакторов) ВПЧ ассоциированного канцерогенеза [19].

Выявление факторов риска развития CIN и рака шейки матки было целью многих исследований [1,10,19,23,39]. Считается, что прогрессия от папилломавирусной инфекции к цервикальным неоплазиям зависит как от свойств самого вируса, так и от особенностей организма инфицированной женщины [1-3,5,8,9]. Показано, что персистирующая инфекция ВПЧ на фоне нарушений иммунной системы – необходимое условие для развития неоплазий шейки матки тяжелой степени [23,39]. Кроме того, эпидемиологические исследования показывают существование многочисленных факторов риска развития CIN и рака шейки матки, таких как молодой возраст первого полового акта, множество половых партнеров, курение сигарет, раса, паритет, использование противозачаточных таблеток и низкий социально-экономический статус [1,9,10,20]. Среди кофакторов прогрессии ВПЧ инфекции до цервикальных неоплазий отмечают заболевания передающиеся половым путем, такие как хламидиоз, вирус простого герпеса, и вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) [10,19].

В настоящее время все больше внимания уделяется молекулярно-биологическим особенностям самого ВПЧ [2,3,5,32,42]. Среди них выделяют такие как генотип вируса, вирусная нагрузка и физический статус вируса [2,5].

Установлено, что ВПЧ 16 и 18 типов ответственны за развитие примерно 70% всех случаев РШМ в мире [23]. При этом цервикальные неоплазии

плазии могут развиваться как на фоне инфицирования одним типом ВПЧ, так и множеством типов вируса. Ряд авторов рассматривают наличие множественной ПВИ, как фактор риска в развитии неоплазии тяжелой степени [32,35,37]. Имеются и противоположные данные, свидетельствующие о том, что множественная папилломавирусная инфекция наиболее часто соответствует дисплазии слабой степени, и ее множественность уменьшается по мере увеличения тяжести цервикальной неоплазии [2,3,27].

Другой важный фактор ВПЧ инфекции – вирусная нагрузка или иными словами – количество копий ДНК вируса, роль которой также неоднозначно трактуется в настоящее время. Существует представление о том, что высокая вирусная нагрузка увеличивает вероятность интеграции вирусной ДНК в геном хозяина и, как следствие, развитие заболевания [15,24,29]. Тем не менее, есть данные о снижении вирусной нагрузки по мере увеличения тяжести цервикальной интраэпителиальной неоплазии от слабой до тяжелой степени в 3 раза и от тяжелой неоплазии до инвазивного рака в 2 раза [43], а также по мере прогрессирования РШМ [3]. Следовательно, обнаружение снижения вирусной нагрузки при использовании метода исследования ПЦР в реальном времени у пациентки, наблюдаемой по поводу инфицированной ВПЧ может свидетельствовать о прогрессии цервикальной неоплазии.

В зараженной клетке вирус может существовать в различных состояниях: эписомальная форма (вне хромосом клетки) – считается доброкачественной, интегрированная (встроена в геном клетки-хозяина). Интеграция ДНК ВПЧ в геном клетки эпителия шейки матки приводит к потере клеткой способности к апоптозу [42]. Ведущая роль в канцерогенезе принадлежит вирусным генам E1, E2, E6 и E7 региона E. Иницирующим фактором выступают мутации в различных участках гена E1. В результате его повреждения происходит интеграция генома ВПЧ в хромосомы клетки хозяина. Процесс встраивания генома ВПЧ сопровождается также инактивацией еще одного вирусного гена – E2. В результате потери функциональной активности гена E2, увеличивается экспрессия генов E6 и E7. Онкогены E6 и E7 оказывают влияние на гены-супрессоры опухолевого роста – p53 и pRb, что приводит к дерегуляции клеточной прогрессии и прекращению элиминации клеток с начальными опухолевыми изменениями. Об активной экспрессии вирусного онкогена E7 свидетельствует выраженная гиперэкспрессия ингибитора циклинзависимой киназы p16INK4a – биомаркера, который регулярно наблюдается в предраковых и злокачественных поражениях, вызванных ВПЧ [21,34,38,42]. Ряд исследований

показал, что определение p16INK4a способствует более полноценному определению биологической сущности патологического процесса в эпителии шейки матки, что способствует более качественной диагностике поражения за счет снижения частоты ложноположительных и ложноотрицательных результатов в традиционных цитологических методах диагностики CIN, и, следовательно, адекватному выбору объема лечебных мероприятий [4,22,36].

В настоящее время новым направлением среди молекулярно-биологических методов исследования является идентификация и характеристика микроРНК [44]. Прогрессия неопластических изменений эпителий шейки матки под влиянием ВПЧ затрагивает клеточные процессы, приводящие к образованию E6 и E7 онкопротеинов. Высказывается предположение, что инфекция ВПЧ и состояние генов E6/E7 важны, но не достаточны для развития РШМ и, следовательно, другие генетические и эпигенетические факторы могут быть вовлечены в этот сложный процесс. Данные последних исследований свидетельствуют о важной роли клеточных микроРНК и других не кодирующих РНК наряду с вирусными белками E6/E7 [41]. Определенные сдвиги профиля микроРНК сопровождают процесс неопластической трансформации различных клеток, отражая, и, отчасти, определяя биологические и клинические особенности опухолевого роста. Уровень экспрессии определенных микроРНК может специфично отражать такие биологические особенности клеток, как активность пролиферации, направление и степень дифференцировки, секреторную активность, метаболический статус [6,7,13,26,30].

Многочисленные исследования показали, что микроРНК вовлечены в инициацию и прогрессию различных локализаций рака, в том числе и РШМ, и могут быть потенциальными биомаркерами для диагностики и прогноза опухолей [11,16,26].

В ходе ряда исследований были отобраны ключевые микроРНК, которые могут быть использованы в качестве потенциальных биомаркеров при диагностике или таргетных мишеней при лечении рака шейки матки [39,41].

В одном из исследований была произведена оценка уровня экспрессии микроРНК: mir-21, mir-27a, mir-34a, mir-155, mir-196a, mir-203 у ВПЧ-позитивных женщин, а также в материале, полученном из эпителия шейки матки женщин с неоплазиями различной степени и плоскоклеточным раком. Уровень экспрессии mir-27a был значительно выше в цервикальной интраэпителиальной неоплазии тяжелой степени (CIN)2-3 по сравнению со слабой неоплазией CIN1 (p=0,023) и в образцах плоскоклеточного рака по сравне-

нию с CIN2-3 ($p=0,033$). Кроме того, отмечалось снижение уровня экспрессии miR-34a при CIN2-3, по сравнению с образцами при CIN1 ($p=0,041$) и в образцах плоскоклеточного рака по сравнению с уровнем образцов CIN2-3 ($p=0,021$). Были обнаружены значимые различия у испытуемых с несколькими типами ВПЧ в miR-27a ($p=0,015$) и miR-203 ($p=0,025$) в CIN2-3 по сравнению с CIN1 и miR-21 ($p=0,002$), и miR-27a ($p=0,001$) и miR-34a ($p=0,001$) в образцах плоскоклеточного рака по сравнению с уровнем образцов CIN2-3. Экспрессия miR-27a повышалась при CIN2-3 по сравнению с CIN1 ($p=0,027$) и miR-34a понижалась при CIN2-3 по сравнению с образцами при CIN1 ($p=0,036$) и в образцах плоскоклеточного рака по сравнению с уровнем образцов CIN2-3 ($p=0,021$) [17].

В ходе аналогичного исследования по оценке уровня экспрессии miR-34, было обнаружено, что снижение экспрессии miR-34a возникает не только при раке шейки матки, но и в предраковых поражениях даже раньше, чем возникают морфологические изменения [25].

Уровень экспрессии miR-424/miR-375/miR-34a/miR-218 в цервикальной интраэпителиальной неоплазии тяжелой степени (CIN 2-3) был статистически значимо ниже, чем при CIN 1 и нормальной цитологической картине. По сравнению с классическим мазком по Папаниколау, при обнаружении снижения экспрессии miR-424 и miR-375 достигается более высокая чувствительность (76,0% и 74,9% против 63,8%, $P < ,05$) и более высокая отрицательная прогностическая ценность (NPV) от (85,7% и 85,4% против 79,3%, $P < ,05$) [40].

При проведении дифференциальной диагностики между преинвазивными и инвазивными стадиями РШМ в сложных случаях ряд исследователей предлагают определять значение miR-127, чья экспрессия повышается при инвазивных стадиях и достигает максимальных значений при метастазировании в лимфатические узлы [41,44].

В настоящее время идентифицировано более 100 miRНК [41], дальнейшее изучение которых сможет стать полезным для уточнения степени неопластического поражения эпителия шейки матки и прогноза заболевания.

ЛИТЕРАТУРА

- Бахидзе Е.В. Фертильность, беременность и гинекологический рак. – СПб.: Издательство «ДИЛЯ». – 2004. – 288 с.
- Бахидзе Е.В., Аршавская И.Л. Роль вируса папилломы человека в диагностике, мониторинге и прогнозе рака шейки матки // Сиб. онкол. журнал. – 2012. – Т. 51. – №3. – С. 34-40.
- Евстигнеева Л.А., Бахидзе Е.В., Семиглазов В.В. Роль генотипа вируса папилломы человека, множественности вируса, вирусной нагрузки и иммунного статуса в патогенезе рака шейки матки. Обзор литературы // Ученые записки. – Т. 15. – № 2. – 2008. – С. 10-14.
- Кондриков Н.И., Шамаракова М.В., Горбачева Ю.В. Значение иммуногистохимического определения биомаркеров плоскоклеточных интраэпителиальных поражений шейки матки // Научно практический журнал акушерство и гинекология. – 2010. – № 6. – С. 44-48.
- Шипицина Е.В., Оржесковская Е.А., Бабкина К.А. и др. Определение вирусной нагрузки и статуса ДНК вируса папилломы человека 16 типа методом ПЦР в реальном времени // Журнал акушерства и женских болезней. – 2004. – Т. LIII. – Вып. 4. – С. 26-32.
- Aydoğdu E, Katchy A, Tsouko E. et al. MicroRNA-regulated gene networks during mammary cell differentiation are associated with breast cancer. *Carcinogenesis* – 2012. – Vol. 33. – P. 1502-1511.
- Balch C, Naegeli K, Nam S et al. A unique histone deacetylase inhibitor alters microRNA expression and signal transduction in chemoresistant ovarian cancer cells. *Cancer Biol Ther* – 2012. – Vol. 13. – P. 681-693.
- Bosch FX, de Sanjose S Chapter 1: Human papillomavirus and cervical cancer – burden and assessment of causality // *J Natl Cancer Inst Monogr*. – 2003. – Vol. 3 – P. 13.
- Bosch FX, de Sanjose S. The epidemiology of human papillomavirus infection and cervical cancer // *Dis Markers* 2007. – Vol. 23. – P. 213–227.
- Castellsague X, Bosch FX, Munoz N Environmental co-factors in HPV carcinogenesis // *Virus Res*. -2002. Vol. 89. – P. 191–199.
- Cho WC: MicroRNAs: potential biomarkers for cancer diagnosis, prognosis and targets for therapy // *Int J Biochem Cell Biol*. – 2010. – Vol. 42. – P. 1273-1281.
- Dillner J., Rebolj M., Birembaut P. et al. Long term predictive values of cytology and human papillomavirus testing in cervical cancer screening: joint European cohort study // *BMJ*. – 2008 Oct. – Vol. 13. – P. 337:a1754.
- Farazi TA, Hoell JI, Morozov P and Tuschl T: MicroRNAs in human cancer // *Adv Exp Med Biol*. – 2013. – Vol. 774. – P. 1-20.
- FIGO IFOGaO (2009) Global Guidance For Cervical Cancer Prevention and Control.
- Fontaine J, Hankins C, Money D et al. Human papillomavirus type 16 (HPV-16) viral load and persistence of HPV-16 infection in women infected or at risk for HIV // *J Clin Virol*. – 2008. – Vol. 43. – P. 307-312.
- Garzon R, Fabbri M, Cimmino A. et al. MicroRNA expression and function in cancer // *Trends Mol Med*. – 2006. – Vol. 12. – P. 580-587.
- Gocze K, Gombos K, Kovacs K. et al. MicroRNA expressions in HPV-induced cervical dysplasia and cancer // *Anticancer Res*. – 2015 Jan. – Vol. 35 (1). – P. 523-530.
- Hawes SE, Kiviat NB Are genital infections and inflammation cofactors in the pathogenesis of invasive cervical cancer? // *J Natl Cancer Inst*. – 2002. – Vol. 94. – P. 1592–1593.
- Huh WK Human papillomavirus infection: a concise review of natural history // *Obstet Gynecol*. – 2009. – Vol. 114. – P. 139–143.
- Juneja A, Sehgal A, Mitra AB, Pandey A A survey on risk factors associated with cervical cancer // *Indian J Cancer*. – 2003. – Vol. 40. – P. 15–22.

21. Kalantari M, Blennow E, Hagmar B, Johansson B. Physical state of HPV16 and chromosomal mapping of the integrated form in cervical carcinomas // *Diagn Mol Pathol*. - 2001. - Vol. 10. - P. 46-54.
22. Klaes R., Benner A., Friedrich T. et al. p16INK4a immunohistochemistry improves interobserver agreement in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia // *Am. J. Surg. Pathol.* — 2002. — Vol. 26. — P. 1389—1399.
23. Koshiol J, Lindsay L, Pimenta JM. et al. (2008) Persistent human papillomavirus infection and cervical neoplasia: a systematic review and meta-analysis // *Am J Epidemiol*. - 2008. - Vol. 168. - P. 123-137.
24. Lorincz AT, Castle PE, Sherman ME. et al. Viral load of human papillomavirus and risk of CIN3 or cervical cancer // *Lancet*. - 2002. - Vol. 360. - P. 228-229.
25. Li B, Hu Y, Ye F. et al. Reduced miR-34a expression in normal cervical tissues and cervical lesions with high-risk human papillomavirus infection // *Int J Gynecol Cancer*. - 2010 May. - Vol. 20 (4). - P. 597-604.
26. Lu J, Getz G, Miska EA. et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers // *Nature*. - 2005. - Vol. 435. - P. 834-838.
27. Mazarico E, Gómez-Roig MD, Miñano J. et al. Relationship of human papilloma virus multiple genotype infection with patient's age and type of cervical lesion // *Eur J Gynaecol Oncol*. - 2014. - Vol. 35 (4). - P. 378-381.
28. Monsonego J., Cox J.T., Behrens C. et al. Prevalence of high-risk human papilloma virus genotypes and associated risk of cervical precancerous lesions in a large U.S. screening population: data from the ATHENA trial // *Gynecol. Oncol*. - 2015. - Vol. 137. - N. 1. -P. 47-54.
29. Peitsaro P., Johansson B., Syrjänen 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.
30. Pritchard CC, Kroh E, Wood B. et al. Blood cell origin of circulating microRNAs: a cautionary note for cancer biomarker studies // *Cancer Prev Res (Phila)*. -2012. - Vol. 5. - P. 492-497.
31. Rijkaart D.C., Berkhof J., Rozendaal L. et al. Human papillomavirus testing for the detection of high-grade cervical intraepithelial neoplasia and cancer: final results of the POBASCAM randomised controlled trial // *Lancet Oncol*. - 2012 Jan. - Vol. 13 (1). - P. 78-88.
32. 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.
33. Sasieni P.D., Cuzick J., Lynch-Farmery E. et al. Estimating the efficacy of screening by auditing smear histories of women with and without cervical cancer // *Bridsh Journal of Cancer*. - 1996. - Vol. 73. - P. 1001-1005.
34. Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J. et al. Human papillomavirus and cervical cancer // *Lancet*. - 2007. - Vol. 370. - P. 890-907.
35. Seraceni S, De Seta F, Colli C et al. High prevalence of hpv multiple genotypes in women with persistent chlamydia trachomatis infection // *Infect Agent Cancer*. - 2014 Sep. - Vol. 8. - P. 9-30.
36. Snijders P.J., Steenbergen R.D.M., Heideman D.A. et al. HPV-mediated cervical carcinogenesis: concepts and clinical implications // *J. Pathol*. — 2006. — Vol. 208. — P. 152—164.
37. Spinillo A1, Gardella B, Roccio M et al. Multiple human papillomavirus infection with or without type 16 and risk of cervical intraepithelial neoplasia among women with cervical cytological abnormalities // *Cancer Causes Control*. - 2014 Dec. - Vol. 25 (12). - P. 1669-1676.
38. Stanley MA. Human papillomavirus and cervical carcinogenesis // *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. - 2001. - Vol. 15. - P. 663-676.
39. Stanley MA Immune responses to human papilloma viruses // *Indian J Med Res*. - 2009. - Vol. 130. - P. 266-276.
40. Tian Q, Li Y, Wang F, Li et al. MicroRNA detection in cervical exfoliated cells as a triage for human papillomavirus-positive women// *J Natl Cancer Inst*. - 2014 Sep. - Vol. 106 (9).
41. Abraham Pedroza-Torres, Eduardo López-Urrutia, Verónica García-Castillo et al. MicroRNAs in Cervical Cancer: Evidences for a miRNA Profile Deregulated by HPV and Its Impact on Radio-Resistance // *Molecules*. - 2014. - Vol. 19 (5). - P. 6263-6281.
42. Tungteakkhum S.S., Duerksen- Hughes P.J. Cellular binding partners of the human papillomavirus E6 protein // *Arch.Virol*. - 2008. - Vol.153. - N3. - P.397-408.
43. Yoshida T, Sano T, Kanuma T et al.Quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of the type distribution, viral load, and physical status of human papillomavirus in liquid-based cytology samples from cervical lesions // *Int J Gynecol Cancer*. - 2008 Jan -Feb. - Vol. 18 (1). - P. 121-127.
44. Zhu XL, Wen SY, Ai ZH et al. Screening for characteristic microRNAs between pre-invasive and invasive stages of cervical cancer// *Mol Med Rep*. - 2015 Jul. - Vol. 12 (1). - P. 55-62.

Поступила в редакцию 17.08.2015 г.

*E.V.Bakhidze^{1,2}, I.V.Berlev^{1,2}, P.A.Arkhangel'skaya²,
A.V. Malek¹*

Possibilities of estimating the prognosis for development of preinvasive cervical neoplasia by the latest molecular biology methods

¹N.N.Petrov Research Institute of Oncology
²I.I.Mechnikov North-West State Medical University
St. Petersburg

Secondary prevention of cervical cancer is the identification and treatment for preinvasive forms of the disease, which include cervical intraepithelial neoplasia (CIN). The traditional method of identification of CIN is cytological however the sensitivity and specificity of this method is limited. The efficacy of a test for human papillomavirus as well as new molecular-biological methods for assessing the prognosis of development of dysplasia and choice of appropriate treatment tactics are still in the process of discussion. The article contains information about different possibilities of using molecular-biological methods for assessing the prognosis of development of CIN and cervical cancer.

Key words: cervical cancer, human papillomavirus, cervical intraepithelial neoplasia, prognosis