

В.А. Ершов<sup>1</sup>, Е.В. Ильинская<sup>2</sup>**КАПСИДНЫЙ БЕЛОК L1 ВПЧ 16 ГЕНОТИПА  
В ИЗМЕНЕННОМ ЦЕРВИКАЛЬНОМ ЭПИТЕЛИИ**<sup>1</sup>Городской клинический онкологический диспансер, Санкт-Петербург<sup>2</sup> Научно-исследовательский институт гриппа Минздрава России, Санкт-Петербург

**Исследованы 58 цервикальных биоптатов цитологическим, гистологическим, иммуноморфологическим, электронно-микроскопическим методами и методом ПЦР. Экспрессию капсидного белка L1 наблюдали только в дифференцированных клетках плоского и метаплазированного цервикального эпителия. При утяжелении цервикального повреждения отмечено снижение встречаемости экспрессии капсидного белка L1 с 75% случаев слабой формы дисплазии до 28,5% случаев плоскоклеточного рака. В случае тяжелой дисплазии шейки матки не все капсидные структуры ассоциированы с вирусной ДНК.**

**Ключевые слова:** капсидный белок L1, экспрессия, ВПЧ, дисплазия

Согласно современной вирусной концепции канцерогенеза в ходе клеточной дифференцировки возможна или репликация вируса папилломы человека высокого канцерогенного риска (ВПЧ ВКР) с последующим апоптозом инфицированной клетки или встраивание ДНК вируса в клеточные хромосомы с формированием цервикальной неоплазии, проходящей, как правило, без синтеза вирусов [2, 11].

Морфологическими критериями механизма репликации ВПЧ ВКР служат наличие в цервикальном эпителии капсидного белка L1 и выявление вирионов при электронной микроскопии. В ряде литературных источников отмечают, что связанные с ВПЧ ВКР слабые и умеренные диспластические поражения цервикального эпителия без выявляемого в морфологических препаратах капсидного белка L1 в четыре раза чаще прогрессируют в рак, чем L1 положительные случаи [3, 4, 6].

Целью исследования являлось изучение экспрессии капсидного белка L1 ВПЧ 16 генотипа у больных цервикальными неоплазиями.

**Материал и методика**

Проанализированы результаты цитологического, иммуноцитохимического, гистологического, иммуногистохи-

мического, электронно-микроскопического и молекулярно-генетического методов исследования эпителия шейки матки (ШМ) 58 ВПЧ-инфицированных женщин 22-72 лет, находившихся на лечении по поводу цервикальной неоплазии в Санкт-Петербургском Городском клиническом онкологическом диспансере с октября 2010 г. по апрель 2011 г. включительно.

Материал соскобов с влажной части ШМ и из цервикального канала (ЦК) для цитологического исследования распределяли в течение 10 мин. на предметные стекла с помощью центрифуги "Rotofix 32A" при скорости 6000 оборотов в мин, фиксировали в течение 5 мин. в 95% растворе этилового спирта и окрашивали по Папаниколау.

Для гистологического исследования использовали материал, полученный при электроэксцизии ШМ, который фиксировали в 10 % растворе формалина, обезживали в этиловых спиртах восходящей концентрации, заливали в парафин, готовили срезы толщиной 5-6 мкм, окрашивали гематоксилином и эозином.

В 46 случаях проводили иммуноцитохимические и в 12—иммуногистохимические исследования с использованием системы детекции "Ultra Vision LP Detection System HRP Polymer & Dab Plus Chromogen" (TL-015-HD) производства фирмы Thermo Scientific для Lab Vision Corporation и моноклональных антител (разведение 1:100) к протеину L1 ВПЧ 16 генотипа (CAMVIR-1, Mob 394) производства DBS. Полученные результаты оценивали полуколичественным способом среди клеток всех слоев многослойного плоского эпителия (МПЭ) и метаплазированных резервных клеток, в том числе, атипичных.

Для ультраструктурного исследования использовали материал больной тяжелой формой дисплазии, полученный при электроэксцизии ШМ. Кусочки ткани измельчали до 1 мм<sup>3</sup>, фиксировали в 2,5 % растворе глутаральдегида на 0,1М какодильном буфере и в 1 % растворе четырехоксида осмия на том же буфере, обезживали в серии этиловых спиртов восходящей концентрации и заключали в смесь эпона и аралдита. Ультратонкие срезы изготавливали на ультратоме LKB-100 (Швеция) и анализировали в электронном микроскопе JEM-1011 (Япония).

Выявление и генотипирование ДНК ВПЧ в соскобе ЦК проводили методом мультиплексной ПЦР в режиме реального времени на приборе Rotor Gene ("Corbett Research", Австралия) с использованием комплектов реагентов ФГУН ЦНИИЭ.

Заключения результатов цитологических исследований формулировали в соответствии с классификацией [1], гистологических исследований— в соответствии с редакцией гистологической классификации ВОЗ [9].

Достоверность различий между исследуемыми показателями оценивали на основании критерия Вилкоксона-Манна-Уитни с уровнем значимости  $p < 0,05$ .

## Результаты

На основании морфологического исследования операционного материала у 5 женщин 22-50 лет диагностирована псевдоэрозия ШМ, у 53 на её фоне выявлены неопластические изменения цервикального эпителия. Из них у 4 женщин 22-46 лет диагностирована слабая (CIN1, LSIL), у 11 больных 24-72 лет — умеренная (CIN2, HSIL), у 24 пациенток 21-50 лет — тяжелая форма дисплазии (CIN3, HSIL). У 7 женщин 30-61 года выявлен интраэпителиальный рак (CIN3, Carcinoma in situ, HSIL), у 7 пациенток 27-48 лет — плоскоклеточный рак шейки матки (SCC).

Наибольшее количество больных псевдоэрозией шейки матки — 2 (40 %) отмечено среди пациенток 30-39 лет, слабой формой дисплазии — 2 (50%) и плоскоклеточным раком — 4 (57,14%) — среди пациенток 40-49 лет, умеренной — 6 (54,55%) и тяжелой — 10 (41,67%) формами дисплазии среди женщин 20-29 лет. Наибольшее количество больных интраэпителиальным раком — по 3 (42,86%) в каждой группе выявлено среди пациенток 30-39 и 40-49 летнего возраста.

ВПЧ 16 генотипа обнаружен у 34 женщин, его сочетание с вирусами 31, 33, 35, 52, 58 генотипов (филогенетической группы — ФЛГ —  $\alpha 9$ ) и с вирусами 18, 45 генотипов (ФЛГ  $\alpha 7$ ) выявлено у 24 пациенток.

Изменения цервикального эпителия, ассоциированные с ВПЧ, положительную реакцию на антитела к протеину L1 определили в 31 из 58 случаев (таблица). Из них, экспрессию капсидного белка L1 наблюдали у 16 (47,06 $\pm$ 4,12%) пациенток, инфицированных ВПЧ 16 и у 15 (62,5 $\pm$ 3,4%) — инфицированных комбинацией ВПЧ 16 и вирусами ФЛГ  $\alpha 9$  и  $\alpha 7$ .

Внутриядерную экспрессию L1 [7] отмечали только в дифференцированных клетках, что свойственно циклу развития ВПЧ [2, 3, 12]. Во всех наблюдениях цервикальной неоплазии реакция на антитела к L1 в атипичных клетках была отрицательной.

В 19 исследованиях L1 обнаружен внутри ядер клеток поверхностного слоя (рис. 1 а) многослойного плоского эпителия (МПЭ) и в ядрах непосредственно прилежащих к ним клеток промежуточного слоя. Из них капсидный белок определили у 3 больных псевдоэрозией, у 4 — умеренной дисплазией, у 9 — тяжелой дисплазией и у 3 — интраэпителиальным раком.

В 4 случаях положительную реакцию на L1 ВПЧ 16 выявили в ядрах метаплазированного резервного эпителия (рис. 1, б). Из них в единичных исследованиях умеренной и тяжелой форм

дисплазии, карциноме in situ и плоскоклеточной карциноме она была единственным иммуноморфологическим признаком ВПЧ. В 2 исследованиях тяжелой формы дисплазии капсидный белок L1 наблюдали в ядрах метаплазированного эпителия и в ядрах поверхностных клеток МПЭ.

При иммуногистохимическом исследовании в 2 случаях псевдоэрозии, в 3 — легкой формы дисплазии и в случае плоскоклеточного рака скопления капсидного белка отмечали как внеклеточно в просвете дистального отдела цервикального канала (рис. 1, в), так и внутри расположенных там же сегментоядерных лейкоцитов.

При анализе иммуноморфологических результатов отметили снижение частоты встречаемости экспрессии L1 ВПЧ 16 при нарастании степени тяжести эпителиального поражения (таблица). Капсидный белок L1 выявлен во всех наблюдениях псевдоэрозии шейки матки. В случае низкой степени интраэпителиального повреждения плоского эпителия (LSIL) экспрессия L1 отмечена в 75 $\pm$ 1,73% наблюдений. У больных с высокой степенью интраэпителиального повреждения плоского эпителия (HSIL) — дисплазия 2, дисплазия 3, карцинома in situ — встречаемость L1 составила соответственно 45,45 $\pm$ 5,48%, 50 $\pm$ 3,46 % и 57,14 $\pm$ 3,46% случаев. Наименьшие относительные показатели наблюдений положительной реакции на антитела к белку L1 — 28,57 $\pm$ 3,16%, обнаружены у больных плоскоклеточным раком. Литературные данные встречаемости экспрессии капсидного белка L1 ВПЧ 16 у больных с разными степенями повреждения цервикального эпителия немногочисленны и противоречивы. Так, полученные нами результаты выявления белка L1 в случаях LSIL и HSIL или соответствуют частоте его обнаружения в других наблюдениях [3] или в 1,5-3 раза выше литературных данных [12]. Выявленная нами экспрессия капсидного белка L1 у больных плоскоклеточным раком почти в 5,5 раз превышала данные литературы [3] или противоречила наблюдениям других авторов об отсутствии экспрессии L1 в клетках рака шейки матки [12].

При электронно-микроскопическом исследовании случая тяжелой дисплазии наблюдали эпителиоциты как вытянутой, так и округлой формы, в которых форма ядер повторяла форму клетки. По характеру электронной плотности различали электронно-светлые (ЭСК) и электронно-темные клетки (ЭТК), некоторые из которых выглядели почти черными. В ЭСК ядра содержали мелкодисперсный хроматин с незначительным количеством гетерохроматина, расположенного по периферии ядра. В ЭТК почти

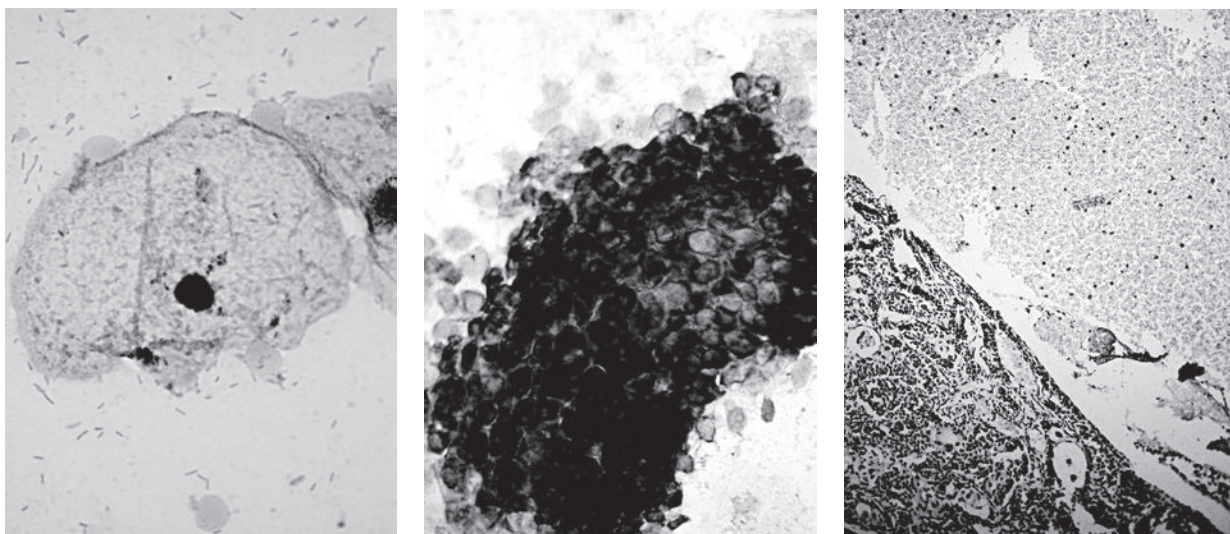


Рисунок 1. Капсидный белок L1 ВПЧ 16 генотипа в цервикальном эпителии. Иммунопероксидазное окрашивание.  
а — внутриядерная экспрессия L1 в поверхностной клетке МПЭ в цитологическом препарате псевдоэрозии шейки матки. x600;  
б — экспрессия L1 в метаплазированном эпителии в цитологическом препарате тяжелой формы дисплазии. x400;  
в — внеклеточные скопления L1 и их фагоцитоз лейкоцитами в просвете цервикального канала в гистологическом препарате плоскоклеточного рака шейки матки. x100

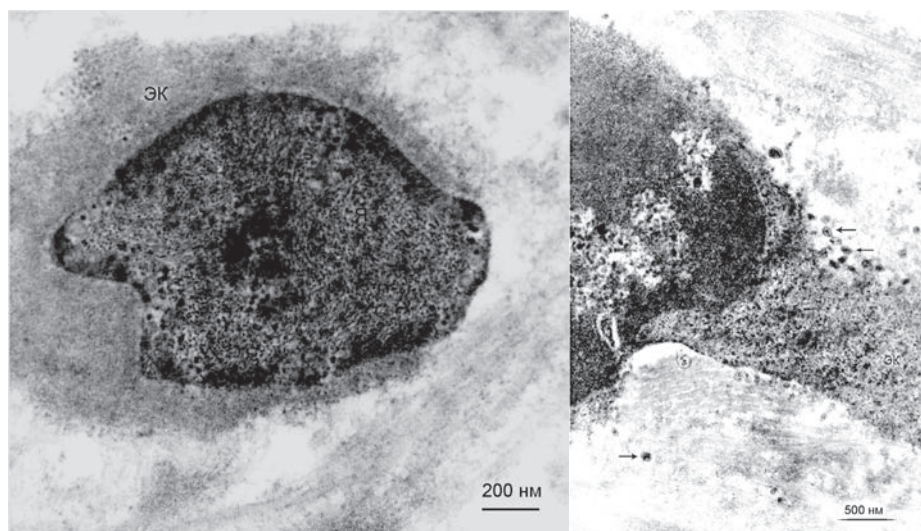


Рисунок 2. Электронограммы клеток цервикального эпителия.  
а — эпителиальная клетка с электронно-светлым ядром, содержащим тонкие нитчатые и мелкие гранулярные структуры;  
б — эпителиальная клетка и частицы ВПЧ (отмечены стрелками).  
(условные обозначения: ЭК — эпителиальная клетка, Я — ядро)

вся площадь ядра заполнена крупными глыбками гетерохроматина. Поверхность эпителиоцитов имела тонкие цитоплазматические выросты разной длины, контактирующие с отростками соседних клеток. Цитоплазма клеток содержала тонофиламенты и большое количество свободных рибосом, а также немногочисленные короткие цистерны гладкого и шероховатого эндоплазматического ретикулума. В местах отсутствия базальной мембраны обнаружены преимущественно округлой формы эпителиоциты, расположенные как бы “вне” эпителиального пласта. В их ядрах были различимы мелкие грану-

лярные и тонкие короткие нитчатые структуры (рис. 2 а), цитоплазма содержала единичные органоиды.

В ядрах и в околоядерной цитоплазме ЭТК, что подтверждает литературные данные [5, 8, 10], а также за пределами некоторых из этих клеток были обнаружены вирусоподобные частицы сферической формы размерами около 50 нм (рис. 2,б), что соответствует размерам частиц ВПЧ [5]. Во многих из этих частиц различима электронно-темная центральная часть, что считается признаком зрелого вириона [5]. Некоторые вирусоподобные частицы, располо-

**Капсидный белок L1 в измененном цервикальном эпителии ВПЧ-инфицированных женщин.**

| Морфология                | L1 | Количество инфицированных ВПЧ |          | Всего |    |
|---------------------------|----|-------------------------------|----------|-------|----|
|                           |    | 16                            | 16+α9+α7 |       |    |
| Псевдоэрозия              | +  | 2                             | 3        | 5     | 5  |
|                           | -  |                               |          | 0     |    |
| Дисплазия 1 (LSIL,CIN1)   | +  | 3                             |          | 3     | 4  |
|                           | -  | 1                             |          | 1     |    |
| Дисплазия 2 (HSIL,CIN2)   | +  | 2                             | 3        | 5     | 11 |
|                           | -  | 3                             | 3        | 6     |    |
| Дисплазия 3 (HSIL,CIN3)   | +  | 6                             | 6        | 12    | 24 |
|                           | -  | 7                             | 5        | 12    |    |
| Ca in situ (HSIL,CIN3)    | +  | 1                             | 3        | 4     | 7  |
|                           | -  | 3                             |          | 3     |    |
| Плоскоклеточный рак (SCC) | +  | 2                             |          | 2     | 7  |
|                           | -  | 4                             | 1        | 5     |    |
| Всего                     |    | 34                            | 24       | 58    |    |

женные как внутри-, так и внеклеточно, имели равномерную электронную плотность по всей площади, свидетельствующую об отсутствии ДНК вируса внутри капсида. Независимо от места локализации, вирусные частицы были расположены отдельно лежащими вирионами или образовывали аморфные скопления без формирования кристаллических фигур, что отмечено и другими исследователями [10, 13].

### Выводы

1. Экспрессия капсидного белка L1 ВПЧ 16 генотипа обнаружена только в дифференцированных клетках плоского и метаплазированного цервикального эпителия.

2. При утяжелении цервикального эпителияльного повреждения снижается встречаемость экспрессии капсидного белка L1 ВПЧ 16 генотипа с 75% случаев слабой формы дисплазии до 28,5% случаев плоскоклеточного рака.

3. В случае тяжелой дисплазии шейки матки не все капсидные структуры ассоциированы с вирусной ДНК.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Apgar B.S., Zoschnick L., Wright JR T.C. The 2001 Bethesda system terminology // Amer. Famil. Physic. — 2003. — Vol. 68. — P. 1992-1998.
2. Doorbar J. The papillomavirus life cycle // J. Clin. Virol. — 2005. — Vol. 32. — Suppl. 1. — S. 7-15.

3. Griesser H., Sander H., Hilfrich R. A. Correlation of immunochemical detection of HPV L1 capsid protein in Pap smears with regression of high risk positive mild/moderate dysplasia // AQCH. — 2004. — Vol. 26. — P. 241-245.
4. Griesser H., Sander H., Walczak C., Hilfrich R. A. HPV vaccine protein L1 predicts disease outcome of high-risk HPV+ early squamous dysplastic lesions // Amer. J. Clin. Pathol. — 2009. — Vol. 132. — P. 840-845.
5. Karageosov I., Dimova R., Makaveeva V. Electron microscopic detection of viruses in cervix papilloma // Zentralbl. Gynakol. — 1985. — Vol. 107. — P. 187-191.
6. Kösel S., Burggraf S., Engelhardt W., Olgemöller B. Correlation of HPV16 L1 capsid protein expression in cervical dysplasia with HPV16 DNA concentration, HPV16 E6\*1 mRNA and histologic outcome // Acta Cytol. — 2009. — Vol. 53. — P. 396-401.
7. McMurray H.R., Nguyen D., Westbrook T.F., Mcance D.J. Biology of human papillomavirus // Int. J. Pathol. — 2001. — Vol. 82. — P. 13-33.
8. Mulhaupt H.A., Rafferty P.A., Warhol M.J. Ultrastructural localization of human papilloma virus by nonradioactive in situ hybridization on tissue of human cervical intraepithelial neoplasia // Lab. Invest. — 1992. — Vol. 67. — P. 512-518.
9. Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs. WHO Classification of Tumours / Eds. F. A. Tavassoli, P. Devilee. — Lyon: IARC Press, 2003. — 432 p.
10. Sato S., Chiba H., Shikano K. et al. Ultrastructural observation of human papillomavirus particles in the uterine cervix intraepithelial neoplasia // Gan. No Rinsho. — 1988. — Vol. 34. — P. 993-1000.
11. Stemberger-Papić S., Vrdoljak-Mozetic D., Ostojić D. V. et al. Evaluation of the HPV L1 capsid protein in prognosis of mild and moderate dysplasia of the cervix uteri // Coll. Anthropol. — 2010. — Vol. 34. — P. 419-423.

12. Ungureanu C., Socolov D., Anton G. et al. Immunocytochemical expression of p16<sup>INK4a</sup> and HPV L1 capsid proteins as predictive markers of the cervical lesions progression risk // *Roman. J. Morphol. and Embryol.* — 2010. — Vol. 51. — P. 497-503.
13. Wang H-K., Duffy A.A., Broker T.R. et al. Robust production and passaging of infectious HPV in squamous epithelium of primary human keratinocytes // *Genes Develop.* — 2009. — Vol. 23. — P. 181-194.

*V. A. Ershov<sup>1</sup>, E. V. Ilyinskaya<sup>2</sup>*

**CAPSID PROTEIN L1 HPV OF 16 GENOTYPE  
IN A MODIFIED CERVICAL EPITHELIUM**

<sup>1</sup> City Clinical Oncology Dispensary

<sup>2</sup> Research Institute of Influenza St. Petersburg

The 58 cervical biopsies were studied by cytological, histological, immunomorphological methods, electron microscopy and PCR. Expression of L1 was observed only in the differentiated cells of squamous and metaplastic cervical epithelium. At increase of grade of cervical epithelial lesion decrease expression L1 from 75 % of cases of CIN1 up to 28,5 % of cases of SCC. Not all capsid structures connect with DNA HPV in case of CIN3.

Поступила в редакцию 01.10.2012