

## О роли вирусов папилломы человека типов 16 и 18 и иммунных нарушений при раке шейки матки

Л.А. Камалян, М.Г. Гаспарян, А.Г. Хангельдян, З.Р. Тер-Погосян, Е.О. Мнджоян,  
Э.Р. Бахшиян, Л.Г. Хачатрян

Онкологический научный центр МЗ РА,  
Центр медицинской генетики НАН РА  
Ереван 375052, ул. Фанарджяна, 76

**Ключевые слова:** папилломавирусы, иммуносупрессия, рак шейки матки

Рак шейки матки (РШМ) по распространенности занимает второе место среди онкологических заболеваний в мире. Ежегодно регистрируется около 400000 новых случаев РШМ и 200000 летальных исходов от этого заболевания [13]. Благодаря широкому внедрению скрининговых программ стало возможным своевременно выявлять доброкачественные поражения и предопухолевые состояния шейки матки с проведением адекватного лечения [1, 6, 8]. По данным ВОЗ (1996), этиологическими агентами РШМ являются вирусы папилломы человека (ВПЧ) определенных типов. К наиболее онкогенным и широко распространенным во всем мире типам ВПЧ относятся типы 16 и 18, которые обнаруживаются у 70–80% женщин с цервикальным раком [5, 7, 15]. Общеизвестна высокая тропность ВПЧ к эпителию шейки матки и стадийность вызываемой ими инфекции от интраэпителиальных поражений (CIN I, II, III) к раку *in situ* и инвазивному РШМ [3, 8, 11].

После первичного инфицирования вирусный геном может персистировать в клетках эпителия шейки матки как в эписомальной, так и в интегрированной в геном клетки форме. Латенция может продолжаться длительный период (5–10 лет и более), в течение которого активация вирусного генома может привести к развитию опухолевой прогрессии. Причины активации вирусного генома недостаточно изучены, и некоторые кофакторы, способствующие развитию РШМ, интенсивно исследуются. К ним, возможно, относится состояние иммунной системы организма, особенно ее клеточного звена [8, 9].

В настоящее время наиболее эффективными методами определения зараженности ВПЧ при продуктивной инфекции, персистенции вируса и интеграции ДНК вируса в геном клетки являются – прямая гибридизация генома вируса *in situ* и полимеразная цепная

реакция (ПЦР). Последняя признана наиболее часто используемым методом для определения распространенных и ассоциированных с РШМ типов ВПЧ 16 и 18, позволяющим выявлять наличие в пробе даже малого числа копий вирусного генома (10 – 100). Этот метод высоко чувствителен и специфичен [2].

Следует отметить, что в Армении до сих пор полностью отсутствуют публикации об ассоциации наиболее онкогенных типов ВПЧ 16 и 18 с РШМ, а также не определена их роль в развитии опухолевого процесса. Поэтому целью исследования является выявление в раковых клетках шейки матки последовательностей ДНК наиболее онкогенных типов ВПЧ как в эписомальной, так и в интегрированной в геном форме, а также изучение состояния клеточных факторов неспецифической резистентности у больных РШМ.

### Материал и методы

Обследовано 50 больных в стадии  $T_2N_xM_0$  –  $T_3N_xM_0$  с гистологически подтвержденным РШМ в возрасте от 35 до 72 лет до начала лучевой терапии. Гистологически у всех больных выявлен инвазивный РШМ (плоскоклеточный неороговевающий или ороговевающий рак – 47 больных или аденокарцинома – 3). Определение ДНК-последовательностей ВПЧ типов 16 и 18 проведено в Центре медицинской генетики НАН Армении. Экстракция ДНК проводилась стандартным способом из биопсийного материала больных РШМ по методу Maniatis [12]. Наличие ВПЧ в пробах экстрагированной ДНК определяли путем ее амплификации с использованием соответствующих праймеров методом ПЦР, который проводили в термоцикле фирмы “Applied Biosystems” (Франция). Реакционная смесь для амплификации ДНК состояла из



исследуемой ДНК, d NTP, буфера и термофильной ДНК-полимеразы (Gibco, США). Последовательность вирусного генома определяли методом электрофореза в 2% геле агарозы. Одновременно с выявлением ДНК последовательности ВПЧ 16 и 18 в соскобах шейки матки у больных в периферической крови исследовали количественные показатели Т-клеточного иммунитета – CD3+, CD4+, CD8+, Т-клетки и уровень естественных клеток-киллеров – CD56+ с помощью моноклональных антител на иммуномагнитных биях (Dynabeads M-450, Dynal, Norway). О функциональной активности Т-клеток судили по продукции интерферона-гамма (ИФН-γ) мононуклеарами крови больных под влиянием ФГА *in vitro*. Уровень ИФН-γ определяли методом биологического титрования на клеточной культуре Нер-2 в отношении вируса энцефаломиокардита мышей. В качестве контроля указанные иммунологические показатели были исследованы у 30 здоровых женщин.

## Результаты и обсуждение

Согласно полученным данным, у больных РШМ наиболее часто обнаруживался ВПЧ тип 16 – у 18 из 50 обследованных (35%); тип 18 выявлен у 14 больных (28%); оба типа ВПЧ определялись у 3 больных (5%). В целом в 68% случаев выделены типы 16–18 и у 32% (15 больных) РШМ не ассоциировался с ВПЧ-инфекцией. Следует учесть, что нами определялись наиболее распространенные у людей типы ВПЧ и нельзя исключить возможность наличия у больных РШМ и других онкогенных типов ВПЧ – 31, 33, 35, 45, 51 и др.

Одной из задач проведенного исследования являлось сравнительное изучение степени иммуносупрессии у больных с наличием ВПЧ (I гр.) и с отсутствием вирусов (II гр.). Показатели неспецифического клеточного иммунитета у больных I и II групп, а также у практически здоровых женщин (III группа) представлены в таблице.

Таблица

Иммунологические показатели у больных РШМ и здоровых лиц

| Группа                        | Т-лимфоциты     |                |            | Индекс<br>CD4+/<br>CD8+ | CD56+,<br>%     | ИФН-γ<br>средне-<br>геом. титр,<br>ед/мл |
|-------------------------------|-----------------|----------------|------------|-------------------------|-----------------|------------------------------------------|
|                               | CD3+            | CD4+           | CD8+       |                         |                 |                                          |
| Больные РШМ<br>ВПЧ+<br>I гр.  | ** *<br>570±2,5 | ** *<br>327±14 | 255±16,6   | 1,29                    | ** *<br>7,5±1,5 | ** *<br>75±5,6                           |
| Больные РШМ<br>ВПЧ-<br>II гр. | *<br>690±37,5   | *<br>420±23,2  | 270±105    | 1,55                    | *<br>11±3,1     | *<br>105±6,8                             |
| Здоровые<br>III гр.           | 918±81,3        | 594,5±46       | 323,4±29,0 | 1,83±0,41               | 14,1±2,3        | 145±11,2                                 |

Примечание. \*\* достоверная разница между показателями I и II групп, \* достоверно по сравнению с контролем

Согласно данным таблицы, у больных РШМ I и II групп наблюдалось достоверное снижение уровня CD3+, CD4+ и CD56+ клеток, а также резкое угнетение синтеза ИФН-γ мононуклеарами крови *in vitro* по сравнению с контролем (III гр.). Выявленная иммуносупрессия Т-клеточного звена и CD56+ клеток – важных факторов клеточной защиты и нарушение синтеза ИФН-γ CD4+ клетками имеет место как у ВПЧ-положительных, так и у ВПЧ-отрицательных больных

РШМ, однако по всем изученным показателям выраженность иммуносупрессии у больных РШМ с ВПЧ-инфекцией (I гр.) была достоверно более тяжелой по сравнению с больными без ВПЧ (II гр.), что свидетельствует об отягчающей роли вируса в развитии вторичного иммунодефицита у больных раком.

При вирусассоциированном РШМ имеет место более резкое угнетение синтеза важного лимфокина – ИФН-γ, свидетельствующее о нарушении функцио-



нальной активности CD4+ клеток, – ключевых клеток в противовирусной и противоопухолевой защите организма. Ведь именно количественное и функциональное нарушение этих клеток при ВИЧ-инфекции приводит к активации многочисленных оппортунистических инфекций и возникновению злокачественных опухолей, в том числе и РШМ [9,10].

Представляет интерес тот факт, что при ассоциации РШМ с ВПЧ иммуносупрессия была более выражена, чем при отсутствии ВПЧ (почти по всем показателям выявлена достоверная разница между I и II группами), что подтверждает данные литературы о том, что состояние иммунной системы является важ-

ным фактором в развитии инвазивного рака шейки матки [4,14].

Итак, показано, что у 68% больных инвазивным РШМ в клетках эпителия шейки матки выявляются ДНК последовательности ВПЧ 16 и 18, что свидетельствует о ведущей роли этих вирусов в развитии РШМ и их иммунодепрессивном влиянии на факторы неспецифической клеточной защиты. Следовательно, профилактика РШМ должна проводиться при персистенции вирусов на фоне доброкачественных поражений шейки матки, и наряду с общепринятыми методами лечения целесообразно применение анти-вирусных и иммунокорректирующих препаратов.

Поступила 08.07.02

## Մարդու տիպ 16 և 18 պապիլոմավիրուսների և իմունային խանգարումների դերը արգանդի վզիկի քաղցկեղի դեպքում

Լ.Ա. Քամալյան, Մ.Մ. Գասպարյան, Ա.Գ. Խանգելդյան,  
Զ.Ռ. Տեր-Պողոսյան, Ե.Օ. Մեջոյան, Է.Ռ. Բախշինյան, Լ.Գ. Խաչատրյան

Հետազոտված է հայ կանանց մոտ արգանդի վզիկի քաղցկեղի /ԱՎԶ/ և տիպ 16 և 18 պապիլոմավիրուսների /ՊՎ/ առցիպիտային աստիճանը:

Կատարվել է ոչ սպեցիֆիկ բջջային իմունիտետի որոշ ցուցանիշների համեմատական ուսումնասիրություն վիրուս առցիպիտային և առանց վիրուսի ԱՎԶ դեպքում:

Ցույց է տրված, որ 68 % ԱՎԶ հիվանդների մոտ հայտնաբերվում են ՊՎ 16 և 18 ԴՆԹ-ի հաջորդականությունները, ինչը հաստատում է այս վիրուսների

զնկոգենների առաջնորդ դերը ԱՎԶ-ի զարգացման մեջ:

Բոլոր հիվանդների մոտ նկատվել է իմունա-սուպրեսիա, որն ավելի արտահայտված էր վիրուսակիր հիվանդների մոտ:

Այսպիսով, հայտնաբերվել է պապիլոմավիրուսների բարձր հաճախականություն ԱՎԶ-ի դեպքում և այդ վիրուսների լրացուցիչ իմունադեպրեսիվ ազդեցությունը ուռուցքային հիվանդության ժամանակ:

## On the role of papillomaviruses type 16 and 18 and immune disturbances in cervical cancer patients

L.A. Kamalyan, M.H. Gasparyan, A.G. Khangelian, Z.R. Ter-Pogossyan,  
E.O. Mnjoyan, E.R. Bakhshinyan, L.G. Khachatryan

The relation between HPV 16 and 18 and cervical cancer (CC) in Armenian women has been studied. The comparison of nonspecific cellular immunity factors in virus - associated and nonviral cervical carcinoma in 50 patients has been performed. It is demonstrated that HPV 16 and 18 DNA is detected in 68% patients with invasive CC, that justifies the main role of HPV oncogenesis in cervical cancer progression. Immune suppres-

sion in patients with virus associated CC is more expressed in comparison with patients without HPV.

Thus, the high frequency of HPV 16 and 18 detection testifies to their additional immunosuppressive influence on carcinogenesis.



## Литература

1. Бебнева Т.Н., Прилепская В.Н. Гинекология, 2001, 1, 3, с.1.
2. Валбомерс Я., Мелкерт П., Ван дер Брюль А. и др. В кн.: Молекулярная клиническая диагностика. Методы. М., 1999, с. 474.
3. Киселев В.И., Дмитриев Г.А., Кубанова А.А. Вестн. дермат. и венерол., 2000, 6, с. 20.
4. Кубанова А.А., Стефанович Я.А. Вестн. дермат. и венерол., 2000, 6, с. 36.
5. Bauer H.M., Ting Y., Greez C.E. et al. J.Am. Med. Assoc., 1991, 256, p. 472.
6. Cuzic J. Ann. of oncol., 2001, 12, 11, p.1511.
7. Hildesheim A., Schiffman M., Bromley C. J. of Nat.Cancer Inst., 2001, 93, 4, p.315.
8. IARC monographs. Human papillomaviruses. 1995, Lyon. France.
9. IARC monographs. Human immunodeficiency virus, 1996, Lyon, France.
10. Jonstone F.D., Mc Googan E., Smart G.E. et al. Br. J. Obstet. Gynaecol., 1995, 101, p. 986.
11. Krone M., Kiviat N.V., Koutsky L.A. The epidemiology of cervical neoplasia. In: Jordan J., Richard R., Luesley D. Intraepithelial neoplasia of the female lower genital tract. Edinburg, 1995.
12. Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. Ed. Fritsch E.F., Maniatis T., 2-nd edition, 1989.
13. Parkin D.M., Pisani P., Ferlay Int.J.Cancer, 1999, 80, p. 827.
14. Southern S.A., Herrington C.S. Sex. Transm. Infect. 1998, 78, 2, p.101.
15. Xi L., Demers G.W., Koutsky L.A. et al. J. Infect. Dis., 1995, p. 467.