

АПОПТОЗ ПРИ ВПЧ- АССОЦИИРОВАННЫХ ПАТОЛОГИЯХ ШЕЙКИ МАТКИ: ИЗМЕНЕНИЕ МАРКЕРОВ

АПОПТОСИС IN HPV-ASSOCIATED CERVICAL PATHOLOGIES: CHANGE OF MARKERS

**O. Vinogradova
O. Artemova**

Summary. The current stage of development of medicine demonstrates the presence of pathological processes at the molecular level. In particular, the phenomenon of apoptosis, programmed cell death, is being actively studied. In order to determine the role of apoptosis in the etiology and pathogenesis of HPV-associated cervical pathologies, such as leukoplakia and grade 1 dysplasia, the state of cervix in women of childbearing age was investigated. The study showed that in HPV-positive patients with grade 1 dysplasia, an apoptosis-resistant phenotype develops.

Keywords: grade 1 dysplasia, grade 2 dysplasia, cervical leukoplakia, caspase 3, caspase 9, apoptosis-resistant phenotype, cell death, cervical cancer.

Виноградова Ольга Павловна

Д.м.н., профессор, Филиал ГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» МЗ РФ

Артемова Ольга Игоревна

*Ассистент, ФГБОУ ВО «Пензенский государственный университет» Медицинский институт
artyomovaolg@gmail.com*

Аннотация. Современный этап развития медицины характеризуется изучением механизмов возникновения патологических процессов на молекулярном уровне. В частности, активно исследуется феномен апоптоза — запрограммированной клеточной гибели. С целью определения роли процесса апоптоза в этиологии и патогенезе ВПЧ-ассоциированных патологий шейки матки, таких как лейкоплакия и дисплазия 1 степени, исследовано состояние цервикса у женщин фертильного возраста. Исследование показало, что у ВПЧ-положительных пациенток с дисплазией 1 степени происходит становление апоптоз-резистентного фенотипа.

Ключевые слова: дисплазия эктоцервикса, лейкоплакия шейки матки, каспаза 1, каспаза 3, апоптоз-резистентный фенотип.

Современная медицина базируется на изучение механизмов возникновения патологических процессов на молекулярном уровне [1, 2, 3]. Для этого активно изучается феномен запрограммированной гибели клетки — апоптоз. Этот процесс представляет собой особую, генетически запрограммированную форму гибели клетки [4, 5, 6, 7] и является необходимым условием нормального существования организма. Назначение апоптоза состоит в поддержании постоянства численности клеток, обеспечении правильного соотношения клеток различных типов и удалении генетически дефектных клеток [8, 9, 10]. Сбои в апоптотической программе могут приводить к прогрессии злокачественных изменений. Клетки с нарушенным апоптозом перестают реагировать на сигналы иммунной системы, продолжая свою пролиферацию [11, 12, 13].

Цель работы

Определить нарушение апоптотической программы по средствам оценки уровня каспазы 3 и каспазы 9.

Материалы и методы исследования

Проведено комплексное обследование 175 женщинам с ВПЧ-ассоциированной патологией шейки матки: 1 группа- 60 пациенток с лейкоплакией шейки матки, сред-

ний возраст которых составил $20,6 \pm 3,45$ лет; 2 группа- 55 пациенток с дисплазией 1 степени, (средний возраст $26,3 \pm 4,75$ лет); 3 группа – 55 пациенток с дисплазией 2 степени, (средний возраст $32,4 \pm 3,5$ лет). В связи с отсутствием показателей нормы исследуемых показателей была обследована группа контроля, представлена 40 относительно здоровыми пациентками, средний возраст которых составил $32,4 \pm 2,65$ лет.

Клинико-лабораторное обследование включало проведение кольпоскопии, цитологического и гистологического исследований, ВПЧ-типирование в режиме «реального времени», определение уровня каспазы 3 и каспазы 9 методом ИФА.

В исследовании приняли участие ВПЧ — положительные пациентки фертильного возраста с гистологически подтвержденными диагнозами: лейкоплакия шейки матки, дисплазия 1 степени или дисплазия 2 степени. К моменту начала исследования пациентки были пролечены от инфекций, передаваемых половым путем. Так же, пациентки не получали терапию препаратами, с возможным влиянием на исследуемые показатели за последние 7 месяцев до начала исследования.

Критериями исключения из исследования были: возрастной интервал до 18 и старше 45 лет, пациентки

Таблица 1. Результаты цитологического исследования.

Цитологическое заключение	Абсолютные величины	Относительные величины, %
Норма	78	57,77
Лейкоплакия	14	10,37
LSIL	32	23,70
HSIL	11	8,14

Таблица 2. Интерпретация результатов кольпоскопического исследования:

Предполагаемый диагноз	Абсолютные числа	Относительные числа, %
Лейкоплакия	34	25,1
CIN I	58	42,96
CIN II–III	43	31,85

Таблица 3. Интерпретация кольпоскопических результатов по баллам кольпоскопических признаков:

Патология	Абсолютные числа	Относительные числа, %
ВПЧ — носительство или CIN I	22	16,29
CIN1–2	55	40,74
CIN2–3	58	42,96

с положительным тестом на беременность, с тяжелой соматической патологией, принимавшие лекарственные препараты, влияющие на исследуемые показатели и не имеющие возможности следовать условиям протокола.

После анализа цитологического заключения, результатов расширенной кольпоскопии и определения наличия ВПЧ производили прицельную мультифокусную биопсию шейки матки (МБШМ).

Материал забирался из наиболее подозрительных участков шейки матки по результатам расширенной кольпоскопии. Исследовались биоптаты пораженных участков шейки матки, взятые методом радиоволновой хирургии с использованием аппарата «Фотек», что позволило минимально воздействовать физической энергией на субстрат для получения качественных результатов.

С целью изучения патофизиологических процессов, происходящих в структуре эпителия шейки матки под действием вируса папилломы человека, проводилось определение уровня каспазы 3 и каспазы 9. Учитывая отсутствие параметров нормы для данных показателей были исследованы женщины группы контроля, обратившиеся для профилактического осмотра, не имеющие атипических изменений на шейке матки, с цитологическим заключением « норма» и ВПЧ отрицательные.

Содержание каспазы 3 и каспазы 9 определяли по средствам ИФА — диагностики. Для этого полученный материал из цервикального канала с помощью урогенитального одноразового стерильного зонда (тип D «Цитощетка») помещали в фосфатно-солевой буферный раствор и доставляли в лабораторию для дальнейшей обработки. Для определения уровня каспазы 3 и каспазы 9 использовался набор реагентов компании Cloud.Clone corp., предназначенный для количественного определения CASP3 и CASP9 сэндвич-методом ИФА в гомогенатах тканей, клеточных лизатах, супернатантах клеточных культур и других биологических жидкостях человека. Все реагенты хранились в соответствии с маркировкой на флаконах.

Оценку статистических показателей проводили с использованием методов оценки и с применением программы «STATISTICA» 6.0. Также в ходе обработки полученных данных использовалась описательная статистика. При проведении оценки статистических показателей применялся метод Фишера — метод углового преобразования. Разница между сравниваемыми данными считалась достоверной при $P > 0,05$.

Результаты и их обсуждения

Первым этапом обследования пациенток было цитологическое исследование мазков –отпечатков с шейки

Таблица 4. Распределение вирусной нагрузки при наиболее часто встречающихся типах вируса.

Тип вируса	16 тип	18 тип	31 тип	33 тип	51 тип
Вирусная нагрузка	> 5 lg	> 5 lg	> 5 lg	> 5 lg	> 5 lg
Лейкоплакия,%	83	68	56	53,4	82
CIN I,%	76	87	32	35,6	67
CIN II,%	75,1	92	35	24,5	78

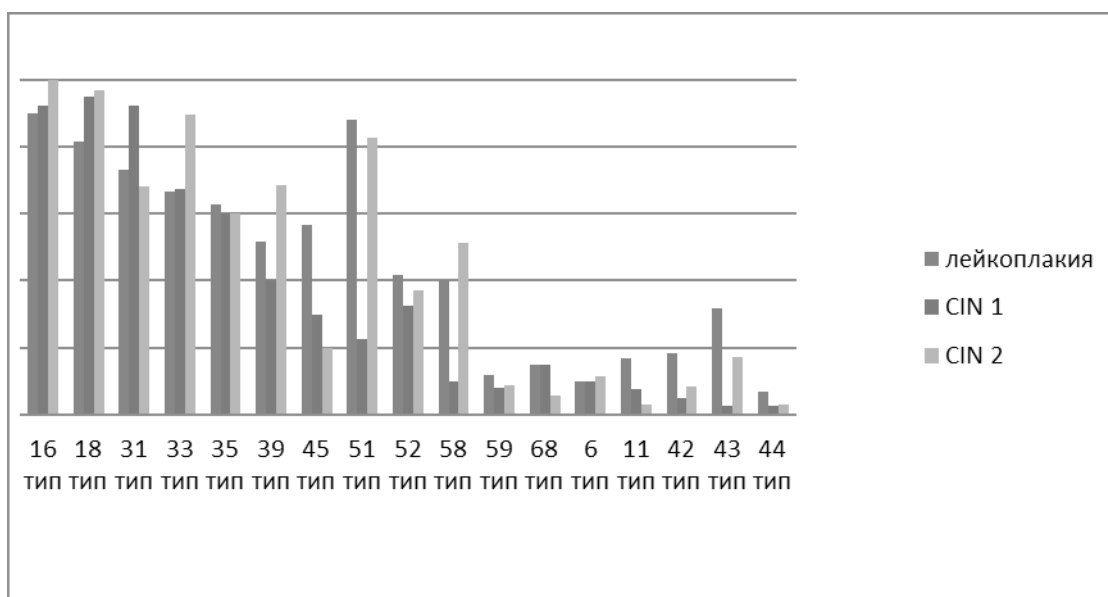


Рис. 1. Частота встречаемости ВПЧ высокого и низкого канцерогенного риска в исследуемых группах,%

матки, с целью определения атипических клеток в цервикальном канале и в зоне трансформации. (таблица 1).

Подавляющее большинство женщин в трех группах имели нормальные цитологические мазки. Очевидно, что специфичность и чувствительность цитологического метода исследования показали невысокие результаты, так как данные этого исследования имели значительные расхождения с последующими гистологическими заключениями.

В ходе работы одним из рутинных клинических методов, который позволил определить размер и степень поражения эпителия шейки матки, явилась расширенная кольпоскопия. У всех пациенток из трех групп исследования кольпоскопические изменения соответствовали аномальной КПС. Причем в группе как с лейкоплакией шейки матки, так и с дисплазией 1 и 2 степени были определены изменения, характерные для CIN II–III (таблица 2).

При анализе данных кольпоскопического исследования с градацией по баллам кольпоскопических призна-

ков (клинико-кольпоскопический индекс и индекс Рейда (КИР)) были получены следующие результаты (таблица 3).

Таким образом, кольпоскопия, относясь к субъективным методам исследования, обладая чувствительностью 80% и специфичностью 60% [15, 16, 17] не всегда позволяет оценить степень поражения эпителия, но помогает определить участки для проведения прицельной мультифокусной биопсии.

Всем пациенткам было предусмотрено проведение ВПЧ типирования методом ПЦР. В ходе исследования установлено, что у всех пациенток в группах определялось сочетание нескольких высокоонкогенных типов ВПЧ, иногда в сочетании с низкоонкогенными (рисунок 1).

Кроме этого была проведена оценка вирусной нагрузки 16,18, 31,33 и 51 типов ВПЧ при их обнаружении (таблица 4).

Анализируя полученные результаты можно сделать вывод, что в развитии патологических процессов на шейке матки с возможным дальнейшим развитием онколо-

Таблица 5. Результаты гистологического исследования:

Патология	Абсолютные числа	Относительные числа, %
Лейкоплакия	60	44,4
Дисплазия 1	40	29,63
Дисплазия 2	35	25,92

Таблица 6. Значения каспазы 3 и каспазы 9 в группах исследования:

Группа исследование	Caspase 3	Caspase 9
Группа контроля	0,179 ± 0,03*	0,213 ± 0,04*
Лейкоплакия шейки матки	0,894 ± 0,04*	0,891 ± 0,03*
CIN I	2,452 ± 0,05*	2,54 ± 0,04*
CIN II	2,971 ± 0,04*	2,96 ± 0,05*

Примечание: Оценка статистической достоверности изменений активности каспазы 3 и каспазы 9 проводилась в соответствии с критериями Уилкоксона-Манна-Уитни. Символом * маркированы группы, в которых активность каспазы достоверно отличается от группы иммунологического «контроля» (различия полагаются достоверными с $p < 0,05$).

гической патологии цервикальной зоны принимают участие высокоонкогенные типы ВПЧ (16,18,31,33,51). При этом очевидно, что прогрессирование данного процесса требует сочетание нескольких типов и преобладание высокой вирусной нагрузки. Полученный анализ данных о наиболее распространенных типах ВПЧ по Пензенской области соотносится с данными исследований по другим регионам РФ [16, 17].

Следующим этапом работы было проведение мультифокусной биопсии шейки матки (МБШМ). Учитывая высокую чувствительность и специфичность гистологического метода диагностики, распределение в исследовании по группам согласно изучаемой патологии осуществлялось на основании полученных результатов (таблица 5).

Таким образом, сравнительный анализ кольпоскопических, цитологических и гистологических результатов позволяет сделать вывод, что у ВПЧ-положительных пациенток с лейкоплакией шейки матки, дисплазией 1 степени и дисплазией 2 степени наибольшую информацию о состоянии эпителия шейки матки дает гистологический метод. Но данный метод является инвазивным вмешательством травмирующему шейку матки, порой требующему анестезии и завершающемуся длительным периодом заживления тканей.

Следующим этапом работы была оценка выраженности нарушений процесса апоптоза при изменениях цервикальной зоны под действием вируса папилломы человека посредством оценки уровня каспазы 3 и каспазы 9. При определении уровня исследуемых каспазы 3 и каспазы 9 были получены значения, которые коррелируют с прогрессией ПВИ в эпителиальных клетках цервикальной зоны.

Ввиду отсутствия нормальных значений для каспазы 3 и каспазы 9, за показатели нормы были приняты результаты в группе контроля, которая представлена относительно здоровыми женщинами фертильного возраста (таблица 6).

В группах исследования активность каспазы 3 и каспазы 9 была выше относительно уровня контроля и увеличивалась по мере прогрессии патологии шейки матки на фоне вируса. Это объясняется тем, что первоначально в клетках каспазы присутствуют в форме неактивных мономерных предшественников, для активации которых требуются расщепление проэнзима [11, 12, 13] и последующая димеризация [8, 13, 17]. Осуществление этих реакций возможно при последовательной активации каспаз друг другом. Пусковым моментом к таким преобразованиям является повреждение ДНК при проникновении ВПЧ, которая в свою очередь запускает каспазный каскад [14, 16]. Сигнальный путь апоптоза может реализоваться по внешнему и по внутреннему путям. Одним из главных этапов внутреннего, митохондриального, пути является каспаза 9.

Как видно из таблицы 6, по мере прогрессии патологии шейки матки на фоне ПВИ имеет место рост данной каспазы, что говорит об активации внутреннего пути апоптоза. Тем не менее вне зависимости от направления каскада реакций его финальной эффекторной каспазой является каспаза — 3. Значение данной каспазы в группах исследования было выше относительно группы контроля и повышалось по мере прогрессирования ВПЧ — ассоциированной доброкачественной патологии шейки матки. Механизмы, при которых происходит формирование ВПЧ-ассоциированных патологий шейки матки,

таких как лейкоплакия, дисплазия 1 степени или дисплазия 2 степени, могут быть рассмотрены как экспрессия уровня эффекторной каспазы 3 и каспазы 9. Результаты

определения апоптотических каспаз характеризовались увеличением величин по мере прогрессирования ВПЧ — ассоциированной патологии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Всесторонняя борьба против рака шейки матки: Руководство по клинической практике. — Женева: ВОЗ, 2014. — 278 с.
2. Ciavattini, A. Follow up in women with biopsy diagnosis of cervical low-grade squamous intraepithelial lesion (LSIL): how long should it be? / A. Ciavattini, N. Clemente, D. Tsiroglou, F. Sopracordevole, M. Serri, G. Delli Carpini et al. // Arch. Gynecol. Obstet. — 2017. — Т. 295, No. 4. — P. 997–1003.
3. Вирусно-бактериальная природа дисплазии и рака шейки матки/ М. С. Афанасьев, В. А. Алешкин, С. Афанасьев и др.// Вестник Российской академии медицинских наук.-2014-№ 6.-35–40.
4. Tranberg, M. Study protocol of the CHOICE trial: a three-armed, randomized, controlled trial of home-based HPV self-sampling for non-participants in an organized cervical cancer screening program / M. Tranberg, B. H. Bech, J. Blaakær, J. S. Jensen, H. Svanholm, B. Andersen // BMC Cancer. — 2016. — Т. 16. — N1. — P. 835.
5. Белоцерковцева Л.Д. и др. Сравнительный анализ различных методов лечения цервикальной интраэпителиальной неоплазии, ассоциированной с ВПЧ-инфекцией//Акушерство и гинекология.-2015.-№ 5. — С. 55–60.
6. Бажуттова Г.А., Тамаразова Л. И. Возможности цитологического метода исследования при профилактическом осмотре материала шейки матки// Клин. лаб.д-ка.-2014- № 10–38–40.
7. Teimoori B, Yazdi A, Rezaei M, Mohammadpour-Gharehbagh A, Jahantigh D, Salimi S. J Cell Biochem. 2018 Aug;119(8):6756–6764. doi: 10.1002/jcb.26869. Epub 2018 May 8.
8. Massad, L.S. 2012 ASCCP Consensus Guidelines Conference. 2012 Updated consensus guidelines for the management of abnormal cervical cancer screening tests and cancer precursors / L. S. Massad, M. H. Einstein, W. K. Huh, H. A. Katki, W. K. Kinney, M. Schiffman // J. Lower Genit. Tract Dis. — 2013. — V. 17 (5, Suppl. 1). — P. 1-
9. Автандилов Г.Г., Глухова Ю. К., Шабалова И. П. Пloidометрическая диагностика предраковых процессов и рака шейки матки по цитологическим препаратам//Клиническая лабораторная диагностика.-2014-№ 11.-45–47
10. Teng M.W., Galon J., Fridman W. H., Smyth M. J. From mice to humans: developments in cancer immunoeediting // J Clin Invest. — 2015. — Vol. 125, No. 9. — P. 3338–3346
11. Кадагидзе З.Г, Черткова А. И. Иммунная система и рак// Практическая онкология.-2016.-Т.17,-№ 2.-с.62–73.
12. Zehbe, I. Community-randomised controlled trial embedded in the Anishinaabek Cervical Cancer Screening Study: human papillomavirus selfsampling versus Papanicolaou cytology / I. Zehbe, R. Jackson, B. Wood, B. Weaver, N. Escott, A. Severini // BMJ Open. — 2016. — Т. 6. — N10. — P. 117–154.
13. Wong, E.L.Y. Evaluation of the impact of human papillomavirus DNA selfsampling on the Uptake of Cervical Cancer Screening / E.L.Y. Wong, K. S. Chan Paul, J.S.Y. Chor, A.W.L. Cheung, F. Huang, S.Y.S. Wong // Cancer Nurs. — 2016. — Т. 39. — N1. — P. 1–11.
14. Taniguchi M., Harada M., Dashtsoodol N., Kojo S. Discovery of NKT cells and development of NKT cell-targeted anti-tumor immunotherapy // Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci. — 2015. — Vol. 91, No. 7. — P. — 292–304.
15. А. С. Дятлова, А. В. Дудков, Н. С. Линькова, В. Х. Хавинсон, Молекулярные маркеры каспаза-зависимого и митохондриального апоптоза: роль в развитии патологии и в процессах клеточного старения. Успехи современной биологии, 2018, том 138, № 2, с. 126–137)
16. Eleftheriadis T., Pissas G., Antoniadi G. et al. Malate dehydrogenase-2 inhibitor LW6 promotes metabolic adaptations and reduces proliferation and apoptosis in activated human T-cells // Exp. Ther. Med. 2015. No 10 (5). P. 1959–1966;
17. Jorgensen I, Miao EA (May 2015). "Pyroptotic cell death defends against intracellular pathogens". Immunological Reviews. 265 (1): 130–42. DOI:10.1111/imr.12287. PMC4400865. PMID25879289.

© Виноградова Ольга Павловна, Артемова Ольга Игоревна (artyomovaolg@gmail.com).

Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»