

# ЦЕРВИКАЛЬНАЯ НЕОПЛАЗИЯ И ВИРУСНАЯ НАГРУЗКА ВПЧ 16 ГЕНОТИПА

В.С. Чирский<sup>1</sup>, В.А. Ершов<sup>2</sup>, А.А. Вязовая<sup>3</sup>, О.В. Нарвская<sup>3</sup>, Л.В. Лялина<sup>3</sup>

<sup>1</sup>ФВГБОУ ВПО Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup>СПб ГБУЗ Городской клинический онкологический диспансер, Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup>ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия

**Резюме.** Исследованы 83 цервикальных биоптата эпителиальных неоплазий цитологическим, гистологическим, иммуноморфологическим методами и методом ПЦР. При цервикальной эктопии вирусная нагрузка колебалась от 2,49 до 6,65 lg копий ДНК ВПЧ/10<sup>5</sup>. При умеренной и тяжелой формах дисплазии количество вируса превышало 4 lg копий ДНК ВПЧ/10<sup>5</sup> клеток, при слабой форме дисплазии, интраэпителиальной и инвазивной формах плоскоклеточного рака — 5 lg копий ДНК ВПЧ/10<sup>5</sup> клеток. При прогрессировании цервикальной неоплазии частота выявления клинически значимых показателей вирусной нагрузки коррелировала с увеличением средних значений периметра ядер клеток, ассоциированных с ВПЧ. При эктопии и низкой степени интраэпителиального повреждения плоского эпителия экспрессия капсидного белка L1 свидетельствовала о продуктивном характере вирусного поражения. При высокой степени интраэпителиального повреждения плоского эпителия и инвазивном раке при отсутствии экспрессии L1 ВПЧ высокие показатели вирусной нагрузки свидетельствовали о нарушении жизненного цикла папилломавируса.

**Ключевые слова:** вирус папилломы человека, вирусная нагрузка, шейка матки, дисплазия, рак, ядерный периметр.

## Введение

Персистенция вирусов папилломы человека высокого канцерогенного риска (ВПЧ ВКР) является этиологическим фактором рака шейки матки, который занимает в мире второе [10], а в России — третье место в структуре онкологической заболеваемости женского населения [4].

Канцерогенез включает в себя ряд последовательных этапов развития цервикальной интраэпителиальной неоплазии (CIN). В большинстве случаев своевременная диагностика и адекватное лечение позволяют устранить угрозу формирования злокачественной опухоли на стадии предрака. С этой целью во многих странах мира используют программу цитологического скрининга.

В настоящее время в повседневную практику активно внедряют цервикальный молекулярно-генетический скрининг [5], позволяющий выявить ВПЧ ВКР и прогнозировать спонтанную элиминацию вируса или развитие интраэпителиальной неоплазии при латентной и субклинической формах инфекции. В качестве одного из диагностических критериев используют количественную характеристику содержания вируса в цервикальной пробе. Однако данные о характере связи показателя вирусной нагрузки с тяжестью цервикальной неоплазии противоречивы [1, 2, 3, 5, 11].

Целью нашего исследования явилось определение прогностического значения вирусной нагрузки ВПЧ 16 генотипа при цервикальных неоплазиях.

## Авторы:

**Чирский В.С.**, д.м.н., профессор, зав. кафедрой патологической анатомии ФВГБОУ ВПО Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия;

**Ершов В.А.**, к.м.н., врач-патологоанатом патологоанатомического отделения СПб ГБУЗ Городской клинический онкологический диспансер, Санкт-Петербург, Россия;

**Вязовая А.А.**, к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

**Нарвская О.В.**, д.м.н., профессор, зав. лабораторией молекулярной микробиологии ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

**Лялина Л.В.**, д.м.н., зав. лабораторией эпидемиологии ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия.

## Адрес для переписки:

Ершов Владимир Анатольевич  
198255, Россия, Санкт-Петербург, пр. Ветеранов, 56.  
Тел.: (812) 752-93-52 (служебн.). Факс: (812) 376-06-25.  
E-mail: goronkod@zdrav.spb.ru

поступила в редакцию 17.04.2014  
отправлена на доработку 18.04.2014  
принята к печати 30.04.2014

© Чирский В.С. и соавт., 2014

## Материалы и методы

Проведен анализ результатов цитологического, иммуноцитохимического, гистологического, иммуногистохимического и молекулярно-генетического методов исследования эпителия шейки матки 83 ВПЧ-позитивных женщин в возрасте 22–61 лет, проходивших лечение по поводу цервикальной интраэпителиальной неоплазии в Санкт-Петербургском ГБУЗ Городской клинической онкологической диспансер с октября 2010 по май 2011 гг.

Цитологические препараты соскобов эктоцервикса и эндоцервикса готовили методом жидкостной цитологии и окрашивали по методу Папаниколау.

Материал электроэксцизии шейки матки для гистологического исследования готовили по стандартной методике и окрашивали гематоксилином и эозином.

В 60 случаях проводили иммуноцитохимические, в остальных 23 — иммуногистохимические исследования с использованием системы детекции «Ultra Vision LP Detection System HRP Polymer & Dab Plus Chromogen» (TL-015-HD), Thermo Scientific (США) и моноклональных антител (разведение 1:100) к капсидному протеину L1 ВПЧ 16 генотипа (СAMVIR-1, Mob 394), DBS (США). Полученные результаты оценивали в цитологических или гистологических препаратах полуколичественным способом среди всех атипичных клеток, характерных для интраэпителиальной неоплазии, в смежных с ними клетках многослойного плоского эпителия, в метаплазированных резервных клетках, а также во всех опухолевых клетках морфологического препарата и клетках паратуморальной зоны.

С помощью видеокамеры «Progres С3» в режиме «Measure»  $\times 100$  в цитологических препаратах измеряли периметр ядра всех присутствующих в них клеток, рассчитывали среднее значение периметра ядер (ПЯ) клеток плоского эпителия типичного строения, а также атипичных и опухолевых клеток, ассоциируемых с ВПЧ [7].

Заключения результатов цитологических исследований формулировали в соответствии с классификацией «The Bethesda System for reporting cervical cytologic diagnoses» [6], гистологических исследований — в соответствии с гистологической классификацией ВОЗ [10].

Выявление, количественное определение (lg копий ДНК ВПЧ ВКР/ $10^5$  клеток) и генотипирование ВПЧ ВКР в цервикальном соскобе проводили методом мультиплексной ПЦР в режиме реального времени на приборе Rotor Gene («Corbett Research», Австралия) с использованием комплектов реагентов ФГУН ЦНИИЭ (Москва) согласно инструкции производителя.

Достоверность различий полученных результатов оценивали на основании критерия Фишера.

## Результаты и обсуждение

В результате морфологического исследования операционного материала у 12 женщин 32–50 лет верифицирована эктопия шейки матки, у 71 на ее фоне выявлены изменения многослойного плоского эпителия. Из них у 5 женщин (22–46 лет) диагностирована слабая (CIN I, LSIL), у 16 больных (25–54 лет) — умеренная (CIN II, HSIL), у 27 пациенток (22–60 лет) — тяжелая форма дисплазии (CIN III, HSIL). У 14 женщин (29–61 лет) верифицирован интраэпителиальный (CIN III, Carcinoma *in situ*, HSIL) и у 9 пациенток (27–48 лет) — инвазивный плоскоклеточный рак шейки матки (SCC).

В 66 (79,52%) из 83 ВПЧ-позитивных образцов материала обнаружено присутствие ВПЧ 16-го генотипа. В остальных случаях выявлена ассоциация ВПЧ 16 с папилломавирусами других генотипов.

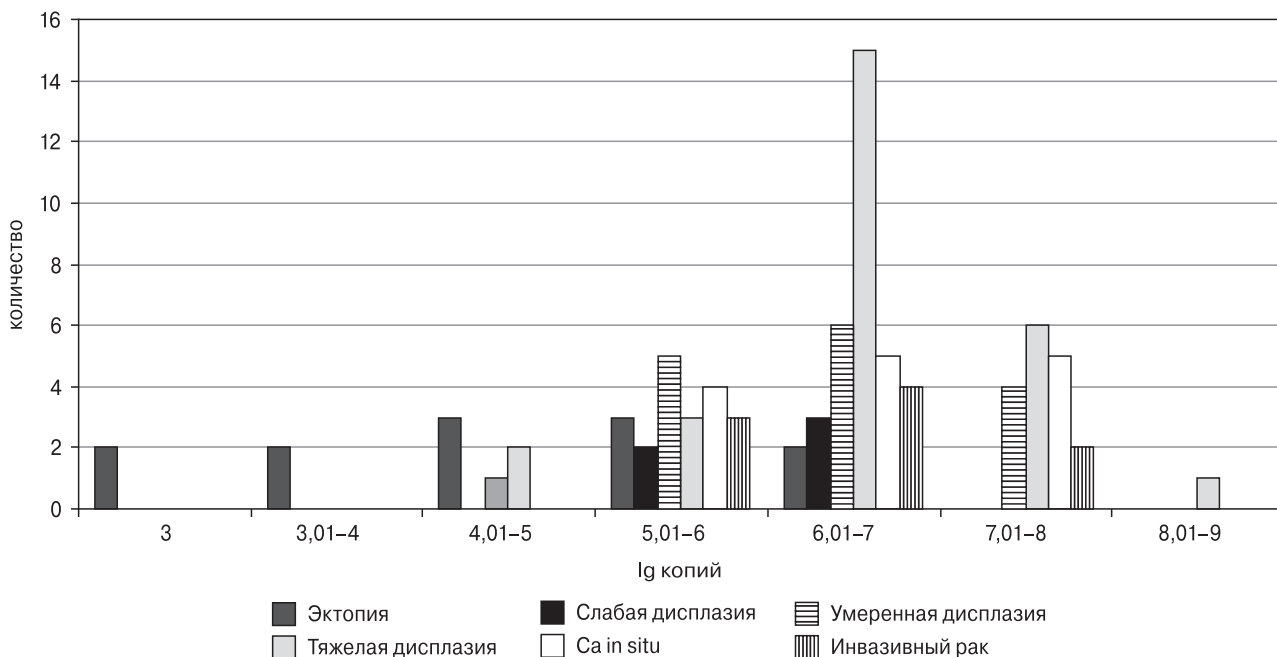
При цервикальной эктопии определены как клинически мало значимые уровни инфицирования — 2,49, так и высокие показатели количества ВПЧ — 6,65 lg копий ДНК ВПЧ/ $10^5$  (рис. 1). Для умеренной и тяжелой форм дисплазии были характерны показатели «вирусной нагрузки» свыше 4,0 lg копий ДНК ВПЧ/ $10^5$  клеток. Во всех случаях слабой формы дисплазии, интраэпителиальной и инвазивной форм плоскоклеточного рака количество вируса превышало 5,0 lg копий ДНК ВПЧ/ $10^5$  клеток (рис. 1).

В биоптатах большинства цервикальных неоплазий выявлено от 6,01 до 7,0 lg копий ДНК ВПЧ/ $10^5$  клеток.

Иммуноромфологический критерий репродукции ВПЧ — капсидный белок L1 [9] — при эктопии обнаружен в клетках поверхностного слоя плоского эпителия, средние значения ПЯ которых составили  $24,78 \pm 2,99 \mu$  (рис. 2).

В препаратах CIN I кроме поверхностных клеток типичного строения протеин L1 наблюдали в крупных ядрах клеток с окооядерной зоной просветления — койлоцитах, так и без нее — «некойлоцитах», периметры ядер которых составили, соответственно,  $29,12 \pm 1,97 \mu$  и  $86,93 \pm 2,11 \mu$  ( $p < 0,01$ ). Увеличение ядер клеток, ассоциированных с ВПЧ (рис. 2), среднее значение ПЯ которых составило  $46,98 \pm 2,87 \mu$  ( $p < 0,01$ ), обусловленное увеличением количества ДНК [7] и, в первую очередь — вирусной ДНК [8], объясняло различия в вирусной нагрузке при эктопии и CIN I (рис. 1).

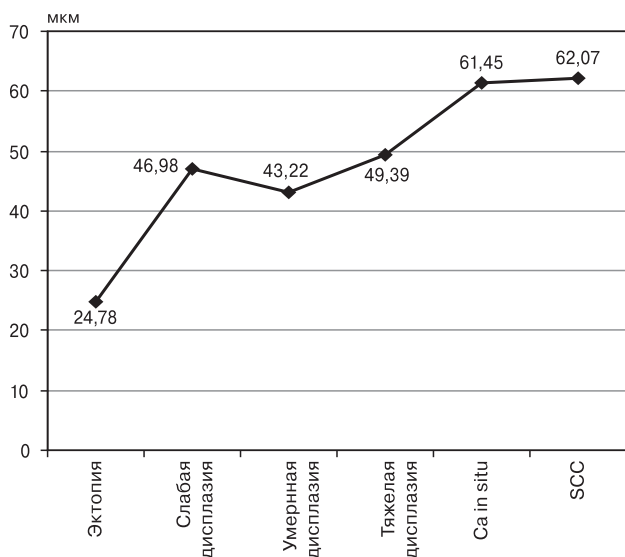
При умеренной дисплазии (HSIL, CIN II) протеин L1 был обнаружен в клетках поверхностного слоя плоского эпителия (ПЯ =  $23,06 \pm 3,04 \mu$ ), прилежащего к неопластическому участку. Ядерные изменения атипичных клеток, а также койлоцитов и «некойлоцитов» в пограничном эпителии, средние значения ПЯ которых составили, соответственно,  $38,12 \pm 2,56$ ,  $57,01 \pm 2,11$  и  $54,67 \pm 2,88 \mu$  ( $p < 0,01$ ), служили кос-



**Рисунок 1. Частота выявления показателей вирусной нагрузки ВПЧ 16 генотипа при разных формах поражения цервикального эпителия**

венным свидетельством накопления в них ДНК. Среднее значение ПЯ клеток при CIN II, ассоциированных с ВПЧ, составило  $43,22 \pm 1,99 \mu$  ( $p < 0,01$ ) и не превышало соответствующие показатели при CIN I (рис. 2).

При тяжелой дисплазии (HSIL, CIN III) капсидный белок L1 обнаружен в атипичных клетках (ПЯ =  $41,87 \pm 2,56 \mu$ ) в одном случае. В остальных исследованиях CIN III и SCC



**Рисунок 2. Средние значения периметра ядер ассоциированных с ВПЧ клеток в препаратах цервикальной неоплазии**

экспрессию L1 наблюдали в граничащих с участком поражения эпителия койлоцитах и поверхностных клетках, средние значения ПЯ которых составили, соответственно,  $54,78 \pm 2,23$  и  $22,68 \pm 1,94 \mu$ . Периметр ядер атипичных клеток при тяжелой дисплазии был сопоставим с соответствующим показателем при CIN II, составив  $43,99 \pm 2,33 \mu$ , но уступал периметру ядер при Ca *in situ* и SCC, которые составили, соответственно,  $68,11 \pm 3,12$  и  $69,35 \pm 1,88 \mu$  ( $p < 0,01$ ), крупные размеры которых, характерные для цервикальных неоплазий [7], связаны с нерегулируемой репликацией вирусной ДНК при гиперэкспрессии E7 [8, 12]. Средние значения ПЯ клеток, ассоциируемых с ВПЧ (рис. 2), составили при тяжелой дисплазии  $49,39 \pm 1,97 \mu$ , при интраэпителиальном раке —  $61,45 \pm 3,48 \mu$ , при инвазивном раке —  $62,07 \pm 3,66 \mu$  ( $p < 0,01$ ).

Таким образом, при утяжелении поражения цервикального эпителия частота выявления клинически значимых показателей вирусной нагрузки коррелировала с увеличением средних значений периметра ядер клеток, ассоциированных с ВПЧ. При эктопии и LSIL положительная экспрессия капсидного белка L1 свидетельствовала о продуктивном характере вирусного поражения. При HSIL и инвазивном раке отсутствие экспрессии L1 и высокие показатели вирусной нагрузки характеризовали изменение жизненного цикла папилломавируса.

## Список литературы

1. Вязовая А.А., Ершов В.А., Банюк Н.В., Нарвская О.В. Выявление различных генотипов вируса папилломы человека высокого канцерогенного риска у женщин Санкт-Петербурга // Папилломавирусная инфекция и злокачественные новообразования. Интегрированная система надзора и профилактики: материалы междунар. симп.; 4–5 июня 2009 г. — СПб.: НИИЭМ им. Пастера, 2009. — С. 26–27.
2. Вязовая А.А., Кувейда Д.А., Трофимова О.Б., Шипулина О.Ю., Ершов В.А., Лялина Л.В., Нарвская О.В. Выявление вирусов папилломы человека высокого канцерогенного риска и оценка физического статуса вирусной ДНК методом ПЦР при поражении цервикального эпителия // Клиническая лабораторная диагностика. — 2013. — № 8 — С. 24–26.
3. 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 // Ученые записки Санкт-Петербургского государственного университета им. акад. И.П. Павлова. — 2008. — Т. 15, № 2. — С. 10–14.
4. Состояние онкологической помощи населению России в 2010 г. / Под ред. В.И. Чиссова, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. — М.: ФГУ МНИОИ им. П.А. Герцена Минздравсоцразвития России, 2011. — 188 с.
5. Трушина О.И., Новикова Е.Г., Шипулина О.Ю., Романюк Т.Н. Вирусная нагрузка ДНК ВПЧ как прогностический фактор злокачественной прогрессии ПВИ // Молекулярная диагностика-2014: сб. тр. VIII Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием / Под ред. В. И. Покровского. — М., 2014. — Т. 1. — С. 207.

Ссылки 6–12 см. в References (с. 196). See References for numbers 6–12 at p. 196.

Infekciâ i immunitet (Infection and Immunity)  
2014, vol. 4, no. 2, pp. 192–196

SHORT COMMUNICATIONS

### CERVICAL NEOPLASIA AND VIRUS LOAD OF HPV 16 GENOTYPE

Chirsky V.S.<sup>a</sup>, Ershov V.A.<sup>b</sup>, Vyazovaya A.A.<sup>c</sup>, Narvskaya O.V.<sup>c</sup>, Lyalina L.V.<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Military Medical Academy of S.M. Kirov, St. Petersburg, Russian Federation

<sup>b</sup>Municipal Clinical Oncology Dispensary, St. Petersburg, Russian Federation

<sup>c</sup>St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

**Abstract.** The 83 biopsies from HPV16-positive cervical epithelial neoplasias were studied by cytological, histological, immunomorphological methods and PCR. At cervical ectopia virus loading changed from 2.49 up to 6.65 lg copies of DNA HPV/10<sup>5</sup>. At CIN II and CIN III the quantity of a virus exceeded 4 lg copies of DNA HPV/10<sup>5</sup> of cells, at the CIN I, Ca *in situ* and SCC — 5 lg copies of DNA HPV/10<sup>5</sup> of cells. At progressing of neoplasia frequency of revealing of clinically significant parameters of virus loading correlated with increase in average values of nuclear perimeter of cells, associated with HPV. At ectopia and LSIL expression of capsid protein L1 testified about virus production. At HSIL and SCC at absence expression L1 HPV high parameters of virus load testified to infringement of life cycle papillomaviruses.

**Key words:** HPV, viral load, cervix uteri, CIN, cancer, perimeter of nucleus.

#### Authors:

**Chirsky V.S.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Department of Pathologic Anatomy, Military Medical Academy of S.M. Kirov, St. Petersburg, Russian Federation;

**Ershov V.A.** ✉, PhD (Medicine), Pathologist of Pathological Department of Municipal Clinical Oncology Dispensary; 198255, Russian Federation, St. Petersburg, Veteranov pr., 56.

Phone: (812) 752-93-52 (office). Fax: (812) 376-06-25.

E-mail: goronkod@zdrav.spb.ru

**Vyazovaya A.A.**, PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Molecular Microbiology, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

**Narvskaya O.V.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Laboratory of Molecular Microbiology, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

**Lyalina L.V.**, PhD, MD (Medicine), Head of Laboratory of Epidemiology, St. Petersburg Pasteur Institute St. Petersburg, Russian Federation.

#### References

1. Vyazovaya A.A., Ershov V.A., Banyuk N.V., Narvskaya O.V. Vyyavlenie razlichnykh genotipov virusa papillomy cheloveka vysokogo kantserogennogo riska u zhenshchin Sankt-Peterburga [Detection of high risk human papillomavirus types in women in St. Petersburg] Papillomavirusnaya infektsiya i zlokachestvennye novoobrazovaniya. Integrirovannaya sistema nadzora i profilaktiki: materialy mezhdunarodnogo simpoziuma; 4-5 iyunya 2009 g. [Human papillomavirus infection and cancer. Integrated surveillance system and prevention: book of abstracts]. St. Petersburg, 2009, pp. 26–27.

2. Vyazovaya A.A., Kuevda D.A., Trofimova O.B., Shipulina O.Yu., Ershov V.A., Lyalina L.V., Narvskaya O.V. Vyyavlenie virusov papillomy cheloveka vysokogo kantserogennoogo riska i otsenka fizicheskogo statusa virusnoy DNK metodom PTSR pri porazhenii tservikal'nogo epiteliya [Detection of high risk human papillomaviruses and estimation of the physical status DNA HPV by PCR in cervical epithelium lesions]. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika — Clinical Laboratory Diagnostics*, 2013, no. 8, pp. 24–26.
3. Evstigneeva L.A., Bakhidze E.V., Semiglazov V.V. Rol' genotipa virusa papillomy cheloveka, mnozhestvennosti virusa, virusnoy nagruzki i immunnogo statusa v patogeneze raka sheyki matki [The role of human papillomavirus genotype, viral load and the immune status in pathogenesis of cervical cancer]. *Uchenye zapiski Sankt-Peterburgskogo gosudarstvennogo universiteta im. akad. I.P. Pavlova — Scientists of note of the St. Petersburg state university*, 2008, vol. 15, no. 2, pp. 10–14.
4. Ostoyanie onkologicheskoy pomoshchi naseleniyu Rossii v 2010 godu (pod red. V.I. Chissova, V.V. Starinskogo, G.V. Petrovoy) [Condition of the oncological aid to the population of Russia in 2010 (Eds. V.I. Chissov, V.V. Starinskiy, G.V. Petrova)]. *Moscow*, 2011. 188 p.
5. Trushina O.I., Novikova E.G., Shipulina O.Yu., Romanyuk T.N. Virusnaya nagruzka DNK VPCH kak prognosticheskiy faktor zlokachestvennoy progressii PVI [Viral load DNA HPV as prognostic factor of cancer progression in HPI] *Molekulyarnaya diagnostika-2014: sbornik trudov VIII Vserossiyskoy nauchno-prakticheskoy konferentsii s mezhdunarodnym uchastiem (pod red. V.I. Pokrovskogo) [Molecular diagnostics-2014: proceedings of the VIIIth All-Russia conference (ed. V.I. Pokrovsky)]*. *Moscow*, 2014, vol. 1, p. 207.
6. Apgar B.S., Zoschnick L., Wright T.C.Jr. The 2001 Bethesda system terminology. *Am. Fam. Physic.*, 2003, vol. 68, no. 15, pp. 1992–1998.
7. Artacho-Pérula E., Roldán-Villalobos R., Salas-Molina J., Vaamonde-Lemos R. Histomorphometry of normal and abnormal cervical samples. *Anal. Quant. Cytol. Histol.*, 1993, vol. 15, no. 4, pp. 290–297.
8. Doorbar J. The papillomavirus life cycle. *J. Clin. Virol.*, 2005, vol. 32 (suppl. 1), pp. 7–15.
9. 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 mid/moderate dysplasia. *AQCH*, 2004, vol. 26, no. 5, pp. 241–245.
10. 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.*
11. Yoshida T., Sano T., Kanuma T., Owada N., Sakurai S., Fukuda T., Nakajima T. 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, vol. 18, no. 2, pp. 121–127.
12. Zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat. Rev. Cancer.*, 2002, vol. 2, no. 5, pp. 342–350.

Received 17.04.2014

Revision received 18.04.2014

Accepted 30.04.2014