

© Коллектив авторов, 2011
УДК 616-006-02

В. И. Киселев¹
докт. биол. наук

П. Г. Свешников²
докт. биол. наук

П. М. Барановский²
канд. биол. наук

Е. В. Липова¹
докт. мед. наук

И. И. Глазко¹
канд. мед. наук

Л. А. Ашрафян³
докт. мед. наук

¹Российская медицинская академия последипломного образования, Москва

²НИИ фармацеи ГОУ ВПО «I Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова», Москва

³Российский научный центр рентгенодиагностики Росмедтехнологий, Москва

Онкобелок E7 вируса папилломы человека – новый маркер ранних стадий канцерогенеза

Успешная терапия рака шейки матки, обусловленного вирусом папилломы человека (ВПЧ), во многом зависит от ранней диагностики. Многочисленные исследования показывают, что началом инфекционного процесса следует считать внедрение вируса в эпителиальную ткань и синтез специфического онкобелка E7. Впервые в мировой практике в России разработана диагностическая тест-система иммуноферментного анализа (ИФА), позволяющая определять онкобелки E7 вируса папилломы человека 16-го и 18-го типов с чувствительностью порядка 1 нг/мл по каждому из белков. Использование этой тест-системы в клинической практике показывает ее высокий диагностический потенциал, особенно в сочетании с ПЦР-анализом. Интерпретация результатов может быть следующей: при получении результата ПЦР+ и ИФА – можно с большой долей вероятности говорить о бессимптомном носительстве и возможной спонтанной ремиссии ВПЧ. Результат ПЦР+ и ИФА+ свидетельствует об интеграции ВПЧ в эпителиальные клетки и начале процесса малигнизации, а следовательно, о необходимости проведения специфической терапии. Кроме того, клиницисты получили инструмент для контроля за элиминацией вируса в процессе специфического лечения, который можно осуществлять с помощью разработанной ИФА тест-системы, широкое применение которой в клинической практике позволит в дальнейшем определить ее место в ранней диагностике рака шейки матки.

Ключевые слова: диагностика, вирус папилломы человека, онкобелок E7

По данным ВОЗ, в мире ежегодно регистрируется около 500 тыс. заболеваний раком шейки матки (РШМ), каждое второе заканчивается смертью пациентки в течение первого года жизни после постановки диагноза. В России ежегодно диагностируется более 11 тыс. больных инвазивным РШМ [1]. У значительной части пациенток опухоль данной локализации диагностируется только на поздних стадиях заболевания, когда терапия уже малоэффективна. Об этом свидетельствуют следующие данные: выживаемость больных с I и II стадиями заболевания составляет от 65 до 95 % и проходит тем успешнее, чем раньше диагностировано

заболевание и начато лечение. Большой удельный рост данного злокачественного новообразования диктует необходимость поиска новых высокоэффективных методов его ранней диагностики.

Важная роль в возникновении предраковых состояний принадлежит инфекционным агентам, среди которых первое место занимает вирус папилломы человека (ВПЧ). Большинство случаев инфицирования ВПЧ заканчивается спонтанным выздоровлением, однако в некоторых случаях развивается персистирующая инфекция, которая способна запускать процессы клеточной трансформации. Более 50 % сексуально активного населения в мире в течение жизни инфицируется ВПЧ, что является «первичным» событием в патогенезе РШМ [2]. Так, по сведениям ученых Калифорнийского уни-

Павел Менделеевич Барановский
e-mail: pbaranovsky@yandex.ru

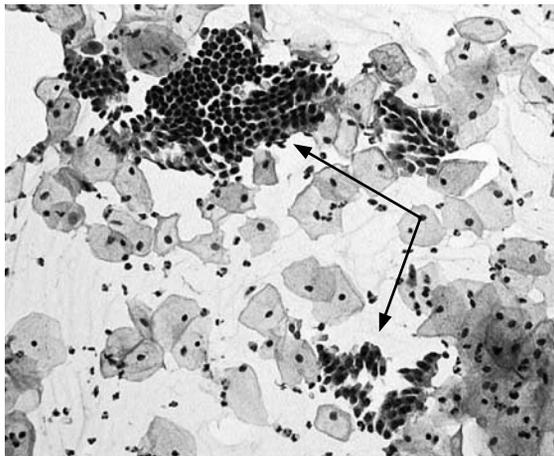


Рис. 1. Окрашенный мазок по Г. Н. Папаниколау. Видны морфологически аномальные клетки

верситета, среди женщин, у которых три раза и более было установлено наличие ВПЧ, риск тяжелых онкогенных поражений эпителия возрастал в 14 раз [3]. В настоящее время известно, что около 95 % заболеваний РШМ вызывается онкогенными типами ВПЧ, преимущественно 16-го и 18-го типов, которые передаются половым путем, достигая максимума инфицирования у женщин к 30-летнему возрасту [4]. ВПЧ обладает высокой гетерогенностью, и на сегодняшний день известно более 100 типов вируса, 38 из которых имеет вагинальную локализацию. Часть из них чрезвычайно редко может являться причиной РШМ и их относят к ВПЧ низкого онкологического риска, однако известен ряд типов ВПЧ, относящийся к вирусам высокого онкогенного риска. ДНК ВПЧ 16-го и 18-го типов обнаруживают в 70–90 % биопсий у больных РШМ, в этой связи Международное агентство по исследованию рака (IARC) официально объявило ВПЧ 16-го и 18-го типов канцерогенными факторами, именно поэтому вирусы этих типов представляют наибольший интерес для разработки диагностических систем [5].

Наиболее распространенным методом диагностики ВПЧ является цитологический тест, предложенный Г. Н. Папаниколау [6] (рис. 1). Однако обнаруживаемые морфологические нарушения могут иметь разную этиологию. Метод плохо поддается стандартизации и его использование позволяет выявлять в среднем не более 30 % (20–87 %) заболеваний РШМ [7].

В 2001 г. Klaes предложил использовать в качестве маркера дисплазий и неоплазий ингибитор циклинзависимой киназы *P16 (INK4a)* [8].

Экспрессия гена *INK4a* усиливается в присутствии белка *E7* ВПЧ, что может служить индикатором процесса встраивания вирусной ДНК в геном клетки, однако ген *INK4a* может регулироваться и другими факторами, не связанными с папилломавирусной инфекцией [9]. В этой ситуации нужны более совершенные методы диагностики, и их поиск не прекращается по сегодняшний день.

У большинства носителей ВПЧ никаких видоизменений в цервикальном канале не происходит, а для развития неоплазий необходимо встраивание вирусной ДНК ВПЧ в геном эпителиальной клетки. Встраивание ДНК ВПЧ в геном эпителиальной клетки сопровождается синтезом ранних онкобелков ВПЧ — *E6* и *E7* [10]. Продолжительная продукция этих белков часто сопутствует переходу дисплазии в инвазивный цервикальный рак, что делает белки *E6* и *E7* наиболее привлекательными маркерами для определения риска развития РШМ (рис. 2). Соответственно, при выявлении белка *E7* в клеточном материале, полученном из шейки матки, можно уверенно говорить о начале, или «инициации», процессов клеточной трансформации [11, 12]. В настоящее время можно считать доказанным тот факт, что онкобелок *E7* ВПЧ 16-го типа является важным фактором канцерогенеза [13].

До недавнего времени разработка простых и эффективных иммунологических методов определения белка *E7* ВПЧ осложнялась отсутствием антител, обладающих необходимыми для этих целей свойствами. С этой задачей успешно справились сотрудники НИИ молекулярной медицины ММА им. И. М. Сеченова [14]. На основе полученных моноклональных антител впервые в мире была разработана и внедрена в клиническую практику иммуноферментная ИФА тест-система для количественного определения белка *E7* ВПЧ 16-го и 18-го типов (Регистрационное удостоверение № ФСР 2010/07581), а авторы награждены дипломом в номинации «100 лучших изобретений России».

С помощью разработанной ИФА тест-системы для количественного определения белка *E7* ВПЧ 16-го и 18-го типов были проведены исследования по наличию онкобелка *E7* в цервикальных пробах у различных групп пациенток. Всего были обследованы 556 пациенток, из которых 85 были практически здоровые женщины, 126 — с цервикальной интраэпителиальной неоплазией (CIN) I–II стадии, 114 пациен-

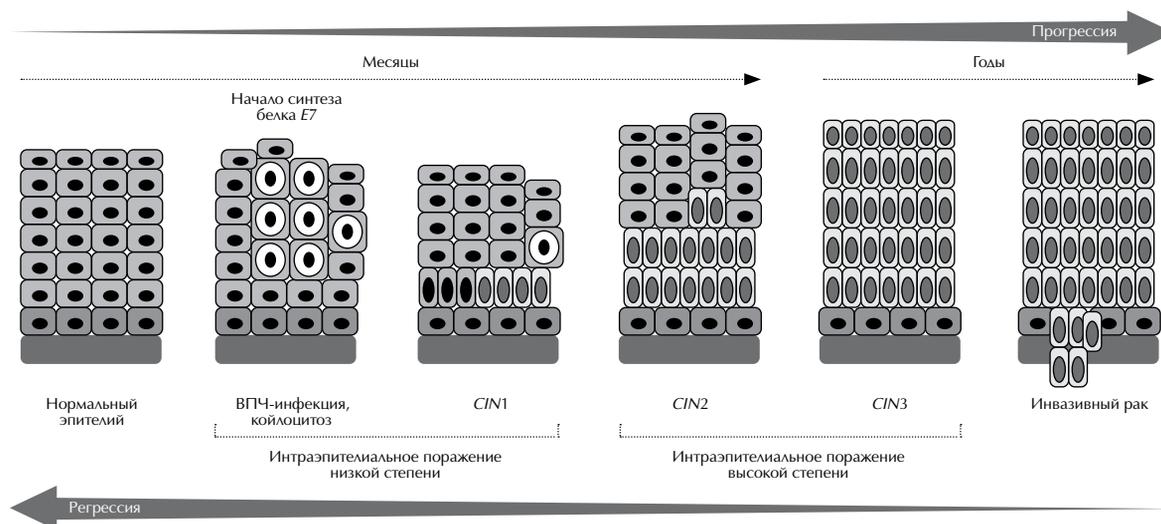


Рис. 2. Онкогенез рака шейки матки при ВПЧ

ток — с CIN II–III стадии, 162 женщины — с РШМ, 20 — с раком другой локализации и 49 женщин с другими гинекологическими заболеваниями.

Онкобелок E7 ВПЧ 16-го и 18-го типов в нашем исследовании обнаружен у 69,7% больных РШМ. Это говорит о том, что основная масса случаев РШМ является ВПЧ-обусловленной, причем основные канцерогенные свойства у этих больных реализуют ВПЧ 16-го и 18-го типов. В этой группе активно идет синтез всех вирусных белков, обладающих канцерогенной активностью, в том числе и онкобелка E7, который количественно регистрируется в цервикальном материале.

У больных с гинекологическими заболеваниями, исключаящими неоплазии и РШМ, были, в основном, хронический цервицит, лейкоплакия шейки матки, лейкокрауроз вульвы, эрозия шейки матки, эктопия шейки матки, кондиломатоз вульвы и наружных половых органов.

Женщин контрольной группы обследовали во время диспансеризации. По возрасту и анамнезу они незначительно отличались от исследованных групп больных. Всего в группу вошли 85 женщин, у которых не было обнаружено патологических изменений в мазках по Г. Н. Папаниколау и были отрицательные показатели исследования на ВПЧ высокого онкогенного риска методом ПЦР. Из 85 исследований в 5 случаях (6,5%) онкобелок E7 в цервикальных пробах обнаруживался при ИФА. Эти пациентки были повторно обследованы на наличие

ВПЧ с типированием вирусов, — в трех пробах вирус был обнаружен.

Для сопоставления данных выявления ВПЧ методом ПЦР и определения белка E7 методом ИФА было отобрано 105 пациенток с полным обследованием, включающим клинический диагноз, цитологический тест и ПЦР. Результаты представлены в таблице.

Как видно из данных таблицы, в каждой группе доля полных совпадений результатов ИФА с ПЦР составляет приблизительно 73,5%. В группах больных с дисплазиями инвазия ВПЧ по данным ПЦР составляет 80%, по результатам ИФА — 77,6%, в группе больных с РШМ — 72,4 и 69%, соответственно.

Во всех группах наблюдалась ситуация, когда выявлялся онкобелок E7 при ИФА, при этом ВПЧ высокого онкогенного риска не обнаруживался при ПЦР. При исследовании цервикальных проб на E7 ВПЧ 16-го и 18-го типов эта группа составила при РШМ 13,8%, при дисплазиях — 13,1% от общего количества обследованных. Эта ситуация нам до конца не ясна, но учитывая, что онкобелок E7 высоко специфичен для ВПЧ (так как является продуктом его «жизнедеятельности»), можно предположить, что образцы из данной группы тоже являются ВПЧ-положительными. Отрицательные реакции на ВПЧ можно объяснить тем, что часто приходится анализировать минимальное количество инфицированной ткани. При поиске ВПЧ в замороженном биопсийном материале количество положительных результатов возросло на 20% [10].

Сопоставление данных методов ПЦР и ИФА в различных группах больных

Группа	ПЦР+ и ИФА+		ПЦР- и ИФА+		ПЦР+ и ИФА-		ПЦР- и ИФА-	
	абс. число	%						
Рак шейки матки, n=29	16	55,2	4	13,8	5	17,2	4	13,8
Дисплазия I-II стадии, n=37	24	65	7	19	5	13	1	3
Дисплазия II-III стадии, n=39	25	64,1	3	7,7	6	15,4	5	12,8
Суммарно дисплазии, n=76	49	64,5	10	13,1	11	14,5	6	7,9
Контрольная группа (здоровые), n=85	3	3,5	2	2,4	—	—	80	94,1

Выявилась и противоположная ситуация, в которой в цервикальных пробах определялся ВПЧ высокого онкогенного риска, а онкобелки E7 16-го и 18-го типов не были выявлены при ИФА-исследовании. При РШМ таких результатов было 17,2 %, при дисплазии — 15,4 %. Объяснить это можно тем, что ведущую роль в канцерогенезе в данных случаях играла ВПЧ-инфекция других типов, а не 16-го и 18-го. Как указывалось выше, обнаружение ВПЧ 16-го и 18-го типов при цервикальных неоплазиях составляет 72 %, и 13 % приходится на ВПЧ высокого риска других типов [15]. Эти данные подтверждают, что хотя ВПЧ 16-го и 18-го типов и доминируют среди пациенток с цервикальной патологией, инфицированность ими не является абсолютной, и в процессе канцерогенеза могут доминировать вирусы других типов. Соответственно, онкобелки E7 этих вирусов мы не можем определить этой ИФА тест-системой ввиду ее типоспецифичности.

Проведенные клинические исследования показали, что при определении риска разви-

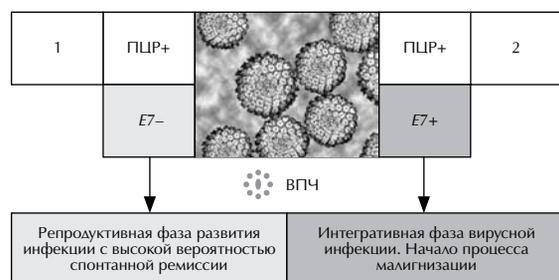


Рис. 3. Диагностическая информативность лабораторных методов анализа на ВПЧ

тия РШМ, обусловленного ВПЧ, наиболее информативным следует считать сочетанное применение методов ПЦР и ИФА. При этом интерпретация результатов может быть следующей: при получении результата ПЦР+ и ИФА- можно с большой долей вероятности говорить о бессимптомном носительстве или возможной спонтанной ремиссии ВПЧ. Результат ПЦР+ и ИФА+ свидетельствует об интеграции ВПЧ в геном эпителиальных клеток и начале процесса малигнизации, а следовательно, необходимости проведения терапии (рис. 3).

Кроме того, для клиницистов чрезвычайно важен контроль за элиминацией вируса в процессе специфического лечения, который можно осуществлять с помощью разработанной ИФА тест-системы.

Впервые в мировой практике в России разработана и внедрена в клиническую практику диагностическая ИФА тест-система, позволяющая определять онкобелки E7 ВПЧ 16-го и 18-го типов с чувствительностью порядка 1 нг/мл по каждому из белков. Клинические исследования показали высокую эффективность применения этой диагностической тест-системы для определения риска развития РШМ, особенно в сочетании с ПЦР-методом. Вместе с тем, очевидно, что не все результаты клинических исследований поддаются однозначному трактованию. В то же время, очевидно, что практическое здравоохранение получило новый инструмент для выявления ранних стадий РШМ, что чрезвычайно важно для проведения эффективной профилактики и терапии этого опасного заболевания. Простота и дешевизна проведения анализа делают его весьма перспективным для проведения скрининговых исследований в этом направлении.

Литература

1. Новик В. И. Эпидемиология рака шейки матки, факторы риска, скрининг // Практич. онкология. 2000. Т. 3. № 3. С. 156–165.
2. Gross G., Joblonska S. Genital papillomavirus infections. 1989. P. 13.
3. Selvey L. A., Dunn L. A., Murray B. et al. An ELISA capture assay for the E7 transforming proteins of HPV16 and HPV18 // J. Virol. Methods. 1992. Vol. 37. № 2. P. 119–127.
4. Киселев В. И. Вирусы папилломы человека в развитии рака шейки матки. М., 2004.
5. Ciuffo G. Innestopositivo con filtrato di verruca volgare // Giorn. Ital. Mai. Venereol. 1907. Vol. 48. P. 12–17.
6. Papanicolaou G. N. A new procedure for staining vaginal smears // Science. 1942. Vol. 95. № 2469. P. 438–439.
7. Von Knebel Doeberitz M. New molecular tools for efficient screening of cervical cancer // Dis. Markers. 2001. Vol. 17. № 3. P. 123–128.
8. Jungbauer A. et al. Comparison of protein A, protein G and copolymerized hydroxyapatite for the purification of human monoclonal antibodies // J. Chromatogr. 1989. Vol. 476. P. 257–268.
9. Fujikawa K., Furuse M., Uwabe K. et al. Nuclear localization and transforming activity of human papillomavirus type 16 E7-beta-galactosidase fusion protein: characterization of the nuclear localization sequence // Virology. 1994. Vol. 204. № 2. P. 789–793.
10. Münger K., Basile J. R., Duensing S. et al. Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein // Oncogene. 2001. Vol. 20. № 54. P. 7888–7898.
11. Burger R., Monk B. J., Kuroski T. et al. Human papillomavirus type 18: association with poor prognosis in early stage cervical cancer // J. nat. Cancer Inst. 1996 (Oct. 2). Vol. 88. № 19. P. 1361–1368.
12. Vaeteewoontacharn K., Chamutpong S., Ponglikitmongkol M., Angeletti P. Differential localization of HPV16 E6 splice products with E6-associated protein // Virology. 2005. Vol. 2. P. 50.
13. Jabbar S. F., Abrams L., Glick A., Lambert P. F. Persistence of High-Grade Cervical Dysplasia and Cervical Cancer Requires the Continuous Expression of the Human Papillomavirus Type 16 E7 Oncogene // Cancer Res. 2009. Vol. 69. № 10. P. 4407–4414.
14. Киселев В. И., Свешников П. Г., Барановский П. М., Ашрафян Л. А. Молекулярные мишени для ранней диагностики рака шейки матки // В кн: Введение в молекулярную диагностику. М., 2010. Т. 1. С. 263–283.
15. Larsen N. S. Invasive cervical cancer rising in young white females // J. nat. Cancer Inst. 1994. Vol. 86. № 1. P. 6–7.

V. I. Kiselev¹, P. G. Sveshnikov², P. M. Baranovskiy², Ye. V. Lipova¹, I. I. Glazko¹, L. A. Aschrafyan³

¹Russian Medical Academy of Postgraduate Education, Moscow

²Research Institute of Pharmacy, I. M. Sechenov First State Medical University, Moscow

³Russian Scientific Center of Radiology and Medical Technologies, Moscow

Human papilloma virus E7 oncoprotein — a new marker of early cervical cancer

Successful treatment of cervical cancer caused by human papilloma virus, depends largely on early diagnostics. Numerous studies show that the beginning of infection should be considered the virus invasion in epithelial tissues and the synthesis of a specific oncoprotein E7. A diagnostic ELISA test system that can detect E7 oncoprotein of human papillomavirus types 16 and 18 with a sensitivity of 1 ng/ml for each of the proteins is developed in Russia. This test system in clinical practice demonstrate high diagnostic potential, especially in combination with PCR analysis. Interpretation of results may be as follows: when the result of PCR is positive but ELISA is negative we can very likely talk about asymptomatic virus carriage and the possible spontaneous remission of HPV infection. PCR+ ELISA+ indicates the integration of HPV in epithelial cells and the malignization beginning, and hence the need for specific therapy. In addition, clinicians have a tool for monitoring the virus elimination during the specific treatment. Wide application of the developed ELISA test in clinical practice will improve the early diagnosis of cervical cancer.

Key words: diagnosis of cervical cancer, human papilloma virus, E7 oncoprotein