

Биология папилломавирусной инфекции и канцерогенеза эпителиальных клеток кожи и слизистых

А.Г. Румянцев

ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева»
Минздрава России; Россия, 117997, Москва, ул. Саморы Машела, 1

Контактные данные: Александр Григорьевич Румянцев info@fnkc.ru

В лекции представлены современные данные по биологии папилломавирусной инфекции и влиянию ее на канцерогенез. Дано определение папилломавируса и его краткие характеристики, типы и история открытия и изучения. Представлены клинические симптомы и диагностические исследования, позволяющие обнаружить вирус. Показаны данные, которые могут свидетельствовать о роли вируса в канцерогенезе, а также пути профилактики инфекции как метода протекции.

Ключевые слова: папилломавирус, инфекция, вирус, симптомы, риск, канцерогенез, история изучения

DOI: 10.17650/2311-1267-2016-3-2-33-37

Biology of human papillomavirus infection and carcinogenesis of epithelial cells of the skin and mucous membranes

A.G. Rumyantsev

Federal Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology named after Dmitriy Rogachev, Ministry of Health of Russia;
1 Samory Mashela St., Moscow, 117997, Russia

The lecture presents current data on the biology of HPV infection and its influence on carcinogenesis. The definition of HPV and its brief characteristics, types and history of finding and study. We present the clinical symptoms and diagnostic studies to detect the virus. Showing information that may indicate the role of viruses in carcinogenesis, as well as ways to prevent infection as a method of protection.

Key words: papillomavirus, infection, virus, symptoms, risk, carcinogenesis, history of research

Термином «инфекция», как правило, обозначают инфекционное заболевание, заразное начало или процесс проникновения микроорганизма в макроорганизм. Поскольку вирусы являются облигатными внутриклеточными паразитами, то в основе их взаимодействия с организмом лежит инфекция конкретной клетки-мишени. Это ключевой вопрос патогенеза любой вирусной инфекции конкретной клетки, так как внеклеточный вирус биологически инертен. Второй ключевой вопрос, какова биология ДНК или РНК вируса, уровень их базовой специфичности и, соответственно, всеядности по отношению к разным биологическим объектам и разнообразию клеточных популяций.

Папилломавирусы относятся к семейству *Papovaviridae*, геном которого представляет собой кольцевую молекулу двунитчатой ДНК с молекулярной массой 3–5 мегадальтон, мишенью которых являются эпителиальные клетки всех видов млекопитающих и птиц. Они видоспецифичны, описано более 120 типов папилломавирусов, причем по понятным причинам 100 из них — у человека.

Таксономически вирусы папиллом выделяют в семейство *Papillomaviridae*, которое подразделяется на роды (они обозначаются греческими буквами — a, b, c, d и др.), виды (обозначаются арабскими цифрами и буквой рода, например, a7, b7 и др.), типы (обозначаются арабскими цифрами, например, 6, 11, 16, 18 и др.). Принято выделять «кожные», тропные к ороговевающему эпителию типы (в основном роды b и d) и «слизистые», т. е. тропные к слизистым оболочкам (род a) типы вируса. Среди последних, в зависимости от их способности или неспособности оказывать трансформирующее воздействие на клетки эпителия, выделяют подгруппы низкого (в основном виды a1, a8, a10) и высокого канцерогенного риска (виды a5, a7, a9). Эпидемиологическими исследованиями последних лет показано, что к группе высокого риска принадлежат типы 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59. Типы 6 и 11, возможно, также являются канцерогенными.

Типы вируса папилломы человека (ВПЧ) как высокого, так и низкого риска способны, воздействуя на клетки эпителия, вызывать развитие классических

проявлений папилломавирусной инфекции (ПВИ) — остроконечных кондилом гениталий, а также дисплазий/неоплазий слизистой влагалища, шейки матки, прямой кишки разной степени (для обозначения которых используются аббревиатуры LSIL или CIN — от англ. low grade squamous cell intraepithelial lesion и cervical intraepithelial neoplasia соответственно). Типы высокого онкогенного риска отличает способность оказывать трансформирующее воздействие на эпителиоциты, приводя к развитию предраковых изменений (дисплазий умеренной и высокой степени тяжести, LSIL или CIN 2, 3) и собственно рака. Развитие дисплазий необязательно сопровождается появлением остроконечных кондилом.

Патогенез инфекционной природы папиллом кожи был сформулирован более 120 лет назад. Экспериментальную попытку проверить эту гипотезу предприняли англичане J. M¹ Fedyeau и F. Hobday в 1896 г., которые с помощью бесклеточных фильтратов, полученных из бородавок собак, провели успешное заражение других. У зараженных особей развились папилломы. В 1907 г. итальянский исследователь G. Ciuffo путем самозаражения продемонстрировал инфекционность бесклеточного фильтрата, полученного из бородавок человека. В течение века клиническая характеристика ПВИ, ее диагностика и лечение стали широко известными для врачей и пациентов.

Инкубационный период ПВИ колеблется от 1 до 12 мес (в среднем — 3 мес). Клинические проявления ПВИ гениталий могут быть различными: остроконечные кондиломы, папилломы с экзофитным ростом, плоские папилломы. Кондиломы представляют собой бородавчатые возвышения, которые могут быть единичными, но чаще множественными, слившимися в группы и напоминающими цветную капусту или петушинные гребни. Их поверхность покрыта многослойным плоским эпителием, нередко с ороговением. Особенно быстрый рост остроконечных кондилом наблюдается при беременности, у подростков и у ВИЧ-инфицированных индивидов (развитие гигантской опухоли Бушке—Левенштейна). Вполне естественно, что широкое распространение ПВИ у взрослых не могло не отразиться на увеличении показателей заболеваемости ПВИ среди детей. Данные современных методов исследования показали, что папилломавирусные поражения у детей связаны с теми же типами ВПЧ, что и у взрослых, но в силу физиологических особенностей и незрелости защитных механизмов дети и подростки более уязвимы, чем взрослые.

Так, при прохождении через инфицированные родовые пути роженицы возможно заражение ПВИ ребенка с развитием ювенильного рецидивирующего респираторного папилломатоза. Клиническая картина респираторного папилломатоза складывается из нарушения голоса и дыхания. Наиболее часто при пораже-

нии гортани в области комиссуры и передних отделов голосовых складок развивается охриплость голоса, вплоть до полной его потери. По мере сужения просвета гортани папилломами развивается стеноз, вплоть до смертельного исхода от асфиксии. Патологический процесс в детском возрасте носит активный характер, для него характерны распространенность и частота рецидивирования, в связи с чем дети подвергаются многократным хирургическим вмешательствам с целью удаления папиллом. Многократная повторная эксцизия ларингеальных опухолей приводит к развитию рубцовых осложнений, необходимости трахеостомии, потере способности говорить, усугублению хронической респираторной гипоксемии. При прогрессировании и распространении опухоли в дистальные дыхательные пути заболевание часто заканчивается фатальным исходом.

Клиническая диагностика остроконечных кондилом и папиллом обычно не вызывает затруднений, если это не ранняя стадия заболевания, когда образования малых размеров, или не «атипичная» форма ВПЧ. Основным методом диагностики является цитологический. Обнаружение койлоцитов, трансэпителиальной лимфоцитарной инфильтрации и базальноклеточной гиперплазии в биоптате считается подтверждением ПВИ гениталий. Широко используется определение ДНК 12 типов ВПЧ высокого онкогенного риска методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени (типы ВПЧ 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59) в соскобе цервикального канала, уретры или в моче. Внедряется в практику метод амплификации нуклеиновых кислот. Серологическим методом диагностики определяется наличие антител против вирусоспецифичных протеинов E2, E6 и E7, наличие которых является маркером текущей инфекции. Для этого используется ELISA — тест с высокоочищенными рекомбинантными протеинами E6 и E7. Снижение концентрации этих антител является показателем успешно проводимой терапии ПВИ и цервикальных неоплазий.

Установлено, что регрессия ВПЧ-обусловленных повреждений напрямую зависит от состояния Т-клеточного иммунитета и что нейтрализующие антитела блокируют распространение вирусной инфекции. И хотя часто ВПЧ-обусловленные образования самостоятельно поддаются регрессии, у многих, особенно у лиц с иммунодефицитами, ПВИ приобретают персистирующий характер и способны к реинфекции. Резистентность ВПЧ к лечению связана с особенностью строения вируса, позволяющей длительно персистировать в организме. Сложный цикл внутриядерной репликации, возможность существования инфекции в эписомальной и интегрированной формах, трудности изучения патогенеза вируса на биологических моделях обуславливают отсутствие патогенетической терапии ПВИ на сегодняшний день.

Представление о ВПЧ как причине рака формировалось, прежде всего, в ходе исследований, посвященных изучению рака шейки матки (РШМ), — второго по частоте после рака молочной железы онкологического заболевания у женщин. Предположение о том, что РШМ представляет собой заболевание, передаваемое половым путем, высказал еще в 1842 г. итальянский врач А. D. Rigoni-Stern. Но только в последние 40 лет лауреат Нобелевской премии Н. Hausen и его сотрудники получили экспериментальные данные о связи РШМ и ВПЧ. Ими обнаружен генетический материал ВПЧ в подавляющем большинстве биопсий из образцов РШМ, проклонированы и охарактеризованы ВПЧ 2 наиболее распространенных типов — 16-го и 18-го. Была показана интеграция вирусного генома в хромосомы клетки-хозяина, а также избирательная транскрипция вирусных онкогенов *E6* и *E7*. Помимо плоскоклеточного РШМ, при котором практически в 100 % опухолей обнаруживается генетический материал ВПЧ высокого риска, на сегодня твердо установлено участие этих вирусов в индукции некоторых других форм рака: вульвы, влагалища, прямой кишки, полового члена, ротовой полости, ротоглотки (в частности, миндалин и основания языка). Помимо форм рака, перечисленных выше, этиологически, вероятно, связаны с ВПЧ высокого риска и отдельные случаи рака гортани и слизистой оболочки глаза. Ведется проверка возможного участия этих вирусов в индукции ряда других форм рака (пищевода, легких, толстой кишки, яичников, молочной железы, предстательной железы, мочевого пузыря, носовых синусов).

Наиболее подробно события, происходящие после заражения эпителиальных клеток ВПЧ высокого риска, изучены для плоскоклеточного эпителия шейки матки. После заражения эпителиальных клеток базального слоя вирус может персистировать в так называемой латентной стадии: темп репликации вирусного генома соответствует темпу репликации ДНК клетки хозяина. Вирусный генетический материал присутствует в этих клетках в виде эписомы, т. е. он не интегрирован в хромосомы клетки-хозяина. Зрелые частицы вируса образуются только в клетках, достигших стадии терминальной дифференцировки, и в момент слущивания/гибели клетки выделяются на поверхность эпителиального слоя. При контакте этого эпителия с эпителием другого, незараженного человека может произойти заражение последнего. Таким образом, на этой стадии вирус практически не вызывает гибели клеток хозяина (так называемого цитопатического эффекта) — клетки, достигшие стадии терминальной дифференцировки, в любом случае обречены погибнуть: по мере созревания они слущиваются с поверхности. Так, принося минимум вреда хозяину, вирус имеет возможность эволюционировать вместе с ним.

Более 80 % инфицированных женщин освобождаются от ВПЧ в течение 9–15 мес от момента заражения без проведения каких бы то ни было лечебных процедур. Однако иногда репликация и транскрипция вирусного генома выходят из-под контроля клетки-хозяина, находящейся в составе базального или парабазального слоев эпителия. Это ведет к экспрессии вирусных онкогенов в таких клетках. Резко возрастает генетическая нестабильность клеток. Образуются дисплазии (последовательно: слабые, умеренные и тяжелые — CIN 1, CIN 2, CIN 3 соответственно). Могут возникнуть очаги трансформации. Инфекция приводит к развитию предрака у малой части инфицированных женщин (менее 0,5 %).

Дисплазии также могут самопроизвольно регрессировать, причем этому процессу подвержены более 90 % всех дисплазий, лишь очень небольшая их часть после длительного латентного периода превращается в злокачественные опухоли. Латентный период между заражением ВПЧ высокого риска и образованием злокачественной опухоли может составлять от 5 до 30 и более лет (в среднем — около 20 лет).

Для поддержания трансформированного фенотипа клетки эпителия шейки матки необходима постоянная экспрессия вирусных онкогенов *E6* и *E7* ВПЧ высокого риска. Кодированные ими белки *E6* и *E7* обладают способностью связываться со многими белками клетки-хозяина и нарушать их нормальное функционирование. Возможные механизмы онкогенеза ВПЧ приведены ниже.

1. Онкобелок *E6* ВПЧ способен взаимодействовать с супрессором опухолевого роста *p53*, что ведет к быстрой протеосомной деградации последнего. Без этого в клетке нарушается механизм апоптоза. Кроме того, онкобелок *E6* ВПЧ активирует транскрипцию гена, кодирующего каталитическую субъединицу теломеразы, *hTERT*. Тем самым клетка получает возможность достраивать теломерные районы хромосом и благодаря этому избегает репликативного старения. Клетка становится «бессмертной» (происходит так называемая иммортализация клетки).

2. Онкобелок *E7* ВПЧ взаимодействует с супрессором опухолевого роста, известным как белок ретинобластомы (БРБ). БРБ регулирует активность транскрипционных факторов семейства *E2F*. Связывание *E7* с БРБ необходимо вирусу для обеспечения возможности реплицировать собственный геном в клетке, достигшей стадии терминальной дифференцировки. *E7*, связываясь с БРБ, вызывает протеосомную деградацию белка. В результате этого клетки беспрепятственно преодолевают рестриктивную точку *G1/S*-клеточного цикла, деления.

Таким образом, оба онкобелка (*E6* и *E7*) резко повышают нестабильность генома клетки-хозяина. Это достигается несколькими способами. Во-первых,

в p53-дефектной клетке нарушаются процессы репарации генома и резко возрастает частота генных мутаций. Кроме того, благодаря способности онкобелка E7 нарушать удвоение центриолей в клеточной популяции, появляются многополюсные митозы. Их результатом являются анеуплоидные клетки.

Эффективность ранней диагностики РШМ резко возросла с внедрением цитологического исследования клеток вагинального мазка, известного как тест Папаниколау (Pap-тест), однако вероятность как ложнопозитивных, так и ложнонегативных диагнозов остается высокой. Не привели к созданию надежного теста для прогноза возникновения РШМ попытки выявления ДНК ВПЧ высокого риска в ПЦР: рак *in situ* и инвазивный РШМ развиваются лишь у небольшой части женщин, у которых выявлены ДНК ВПЧ – позитивные слабые дисплазии эпителия шейки матки (CIN 1). Таким образом, вопреки надежде на высокую чувствительность ПЦР, специфичность диагностики оказалась низкой.

Развитие рака у небольшого процента инфицированных женщин, длительный латентный период и отсутствие четких стадий прогрессии заболевания свидетельствуют о том, что инфекция ВПЧ высокого риска является необходимой, но не достаточной для развития РШМ. Очевидно, что роль вирусной инфекции сводится к запуску многостадийного процесса трансформации, который в значительной степени контролируется клеточными факторами. Эти факторы до конца не изучены. На сегодня среди них принято выделять 3 группы. Это, во-первых, факторы, связанные с модификацией клеточных генов, влияющих на презентацию вирусных антигенов. Вторая группа факторов связана с сигнальными каскадами, усиливающими подавление транскрипции вирусных онкогенов и функционирование вирусных онкобелков. Факторы, включаемые в 3-ю группу, непосредственно влияют на персистенцию вирусной ДНК, усиление транскрипции вирусных онкогенов путем модификации вирусных промоторов либо вызывают амплификацию вирусной ДНК.

Попытки усовершенствовать раннюю диагностику РШМ в настоящее время сосредоточены на поиске генов зараженной ВПЧ высокого риска клетки-хозяина, экспрессия которых в дисплазиях и карциномах необратимо меняется под действием онкобелков вируса. Выявлены десятки таких генов – потенциальных кандидатов на роль маркеров для диагностики РШМ.

Наиболее полно изучен ген *INK4a* (синонимы: *CDKN2A*, *MTS1*, *INK4a/ARF*), кодирующий белок p16^{INK4a}, являющийся ингибитором циклин-D-зависимых киназ CDK4/6. Белок p16^{INK4a} препятствует фосфорилированию БРБ, кодируемого геном чувствительности к ретинобластоме. В гипофосфорилированной форме супрессор опухолевого роста БРБ удержи-

вает клетку в стадии G1 митотического цикла, препятствуя началу репликативного синтеза.

При дисплазиях и карциномах шейки матки доля p16^{INK4a}-позитивных образцов увеличивается в следующем ряду: CIN 1 > CIN 2 > CIN 3 > инвазивный рак. Сравнивая прогностическую ценность разных клеточных индикаторов цервикального канцерогенеза, таких как p16^{INK4a}, p14ARF, p53, PCNA, Ki-67, циклин E, CDC6 и MCM5, исследователи отметили особую надежность именно p16^{INK4a} в качестве маркера для ранней диагностики РШМ. В настоящее время иммуногистохимический тест на p16^{INK4a} является общепризнанным ранним диагностическим маркером ВПЧ-индуцированного канцерогенеза.

Заключение

ВПЧ так называемых типов высокого риска являются биологическими канцерогенами. Они вызывают РШМ и некоторые другие формы рака эпителия кожи и слизистых. От момента заражения до момента выявления злокачественной опухоли у пациента проходят многие годы, а в ряде случаев – десятилетия.

Для того чтобы из нормальной клетки возникла раковая, необходима экспрессия 2 генов вирусного генома – *E6* и *E7*. Эти гены называют вирусными онкогенами. Белковые продукты этих генов, онкобелки E6 и E7, нарушают функционирование нескольких важнейших клеточных белков, контролирующих размножение клеток, процессы репарации, апоптоза и ряд других. В эпителиальных клетках, в которых экспрессируются онкогены *E6* и *E7*, резко нарастает генетическая нестабильность: учащаются генные мутации, структурные aberrации хромосом, а также нарушения числа хромосом. Это сильно увеличивает генетическую неоднородность клеточной популяции и ускоряет прогрессию новообразования.

В целом в процессе онкогенеза, индуцированного ВПЧ высокого риска, нарушается экспрессия многих генов клетки-хозяина. Тем не менее главные этапы этого процесса единообразны. Так, онкобелок E6 вируса связывается с белком-супрессором опухолевого роста p53 клетки-хозяина, а онкобелок E7 вируса – с клеточным белком-супрессором опухолевого роста БРБ. В результате этих взаимодействий p53 и БРБ быстро деградируют. Одновременная утрата сразу 2 важнейших белков, охраняющих клетку от злокачественного перерождения, ведет к нарушению генетического контроля клеточного цикла, репарации хромосом, апоптоза, функционирования центриолей, а также ряда других процессов.

В нормальной клетке БРБ подавляет транскрипцию клеточного гена *INK4a*. Утрата этого белка клеткой, в которой присутствует вирусный онкобелок E7, ведет к многократной активации транскрипции *INK4a*. В такой клетке резко увеличивается содержание белка

p16^{INK4a}, кодируемого *INK4a*. Обнаружение клеток, содержащих p16^{INK4a}, при иммунохимическом окрашивании материалов, получаемых из влагалища и цервикального канала женщин, у которых выявлены дисплазии шейки матки p16^{INK4a}-специфичными антителами, является надежным индикатором того, что эти

клетки вовлечены в процесс злокачественного перерождения. Феномен гиперэкспрессии белка p16^{INK4a} лег в основу иммунохимического теста, который широко применяется в ранней диагностике РШМ. Этот тест может быть использован и для дифференциальной диагностики дисплазий, папиллом и рака других локализаций.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. A review of human carcinogens. Part B. Biological agents. Lyon, 2011. Vol. 100. 502 p.

Международная летняя школа по первичным иммунодефицитам 19–20 июня 2016 г. (ФНКЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева, Москва)

19–20 июня 2016 г. на базе ФНКЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева состоится Международная летняя школа по первичным иммунодефицитам (ПИД).

Профессура: выдающиеся специалисты в области диагностики и лечения ПИД из России, Европы и США.
Язык Школы: английский.

Предварительная программа Школы:

- лекции приглашенных профессоров по ключевым вопросам диагностики и терапии ПИД;
- презентации клинических случаев слушателями Школы с последующим обсуждением с профессорами и коллегами.

К участию в Школе приглашаются врачи и врачи-ординаторы, начинающие карьеру в области клинической иммунологии (независимо от возраста).

Заявки присылать по электронной почте pidrussia@gmail.com.