

УДК 577'3.146-002.446:577.121

**ИЗМЕНЕНИЕ ЦИТОБИОХИМИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ
ПРИ ВПЧ-АССОЦИИРОВАННОМ ПОРАЖЕНИИ ШЕЙКИ МАТКИ****Боровиков И.О., Холина Л.А., Тхатль С.К., Авакимян В.А.***ГБОУ ВПО «Кубанский государственный медицинский университет» Минздрава России,
Краснодар, e-mail: bio2302@gmail.com*

Проведенные биохимические исследования шейки матки при низкой степени цервикального интраэпителиального поражения (LSIL) выявило угнетение макрофагального звена локального иммунитета, способствующего Th-1 девиации с интенсификацией образования реактивных форм азота и кислорода, что вызывает пероксидативные процессы липидов и интенсивное образование свободнорадикальных форм кислорода, которые становятся причиной изменений молекулярных, субклеточных и клеточных структур. Имеющиеся цитобиохимические изменения при низкой степени цервикального интраэпителиального поражения становятся факторами, нарушающими структуры клеточных мембран, а изменение метаболических процессов играет значительную роль в патогенезе и переходе процесса в более тяжелые формы. Изменения показателей оксидативного статуса цервикальной зоны у больных ВПЧ-ассоциированной низкой степенью цервикального интраэпителиального поражения показывают необходимость дифференцированного подхода при коррекции метаболических нарушений, что определяет целесообразность в дополнение к традиционной терапии использование местных препаратов с антиоксидантной направленностью.

Ключевые слова: шейка матки, низкая степени цервикального интраэпителиального поражения, цитобиохимия макрофагов, оксидативная система

**CHANGING CITOBIOCHEMICAL PROCESSES
IN THE CERVIX HPV-ASSOCIATED LESIONS****Borovikov I.O., Kholina L.A., Thatl S.K., Avakiman V.A.***Kuban state medical university, Krasnodar, e-mail: bio2302@gmail.com*

Conducted biochemical studies of Lowgrade Squamous Intraepithelial Lesions (LSIL) revealed the oppression of macrophagal link local immunity, conducive to the Th-1 deviation with the intensification of the education of reactive nitrogen and oxygen that causes the peroksidatyve processes of lipids and intensive education of free radical oxygen species which cause changes of molecular, subcellular and cellular structures. Available cytobiochemical changes when a low grade cervical lesion intraepithelial become factors violate the structure of cell membranes and metabolism plays a significant role in the pathogenesis and the transition process in more severe forms. Changes in oxidative status of cervical zone in patients with Lowgrade Squamous Intraepithelial Lesions defeats show the need for a differentiated approach to the correction of metabolic disturbances.

Keywords: cervix, Lowgrade Squamous Intraepithelial Lesions, mild citobiochemistry macrophages, oxidants system

В последние годы большое внимание уделяется проблеме цервикальной интраэпителиальной неоплазии различной степени поражения, вызванного вирусом папилломы человека (ВПЧ). Папилломавирусная инфекция (ПВИ) – одна из самых распространенных инфекций в мире, инфицированность вирусом папилломы человека, по данным различных авторов, составляет от 38 до 82% [1, 2, 5]. Имеются данные, что почти 8% здорового населения выделяют с мочой вирус папилломы человека 16 типа, а среди женщин, пациенток гинекологических клиник, этот показатель достигает 49% [1]. Цервикальные интраэпителиальные неоплазии (CIN) – наиболее частые заболевания, ассоциированные с ПВИ, являются предраковыми поражениями шейки матки [3, 6]. Персистенция вируса с длительной активной экспрессией вирусных онкогенов инициирует многостадийный процесс, в результате которого клетки эпителия шейки матки претерпевают изменения, способствующие опухолевой прогрессии [1, 3,

10]. За последние десятилетия отмечены существенные достижения в проблеме изучения патогенеза заболеваний шейки матки [1, 5]. При этом именно ранние стадии поражения шейки матки, а именно низкая степень цервикального интраэпителиального поражения (LSIL), представляет наибольшую актуальность в начальном аспекте патогенеза, поскольку именно понимание механизма возникновения и прогрессирования процесса на данной стадии дает нам возможность в последующем разработать наиболее эффективную и «щадящую» терапию без применения деструктивных методов. При этом многие авторы приходят к выводу, что инфицирование эпителиальных клеток ВПЧ – необходимое, но недостаточное событие для возникновения цервикальных неоплазий [1, 2, 3, 6]. В настоящее время в литературе обсуждаются различные иммунные и оксидативные нарушения в генезе предраковых заболеваний шейки матки [2, 7, 9]. В некоторых работах по онкоцитобиохимии доказана способность ме-

таболитов перекисного окисления липидов вызывать повреждение ДНК клетки, что послужило открытию оригинальной концепции генотоксического типа оксидативного канцерогенеза [4, 9, 10]. В эпителиальных клетках с интегрированной формой ВПЧ отмечается повышенная экспрессия генов E6 и E7, кодирующих эти онкобелки. Было установлено, что там, где наблюдается активная экспрессия белков ВПЧ, отмечен высокий уровень NO. Репродукция ВПЧ индуцирует образование агрессивного метаболита LOO в инфицированных клетках, который является самостоятельным повреждающим фактором и создает дополнительные условия для прогрессирования процесса. В патогенезе каждого паранеопластического процесса значительную роль играют молекулярные и субклеточные механизмы: нарушение транспорта электронов, усиление образования генераторов свободных форм кислорода и пероксидрадикалов, понижение антиоксидантной активности крови. Пероксидазы с функциональной точки зрения являются ферментами, катализирующими в присутствии перекиси водорода окисление различных субстратов [4, 6, 9]. МПО и перекись водорода значительно усиливают бактерицидную активность ряда фенолов посредством перевода их в соответствующие хиноны [6, 8]. Кроме того, МПО в присутствии перекиси водорода и окисляемого кофактора действует против различных микроорганизмов, вирусов, микоплазм, патогенных грибов и участвует в обезвреживании их токсинов [4, 7]. Миелопероксидазная система является основной бактерицидной системой макрофагов, дифференцирующихся из моноцитов при эмиграции последних из крови в очаг воспаления. По количеству пероксидазоположительных макрофагов и по содержанию в них активного фермента можно судить о потенциальной защитной активности слизистой, в том числе и при воспалении урогенитальной системы, вызванной инвазией папилломавирусов [10]. Многие авторы отмечают тесную корреляционную зависимость между активностью лизосомальной кислой фосфатазы и функциональной активностью макрофагов, в особенности их бактерицидной функцией. Руководствуясь этим фактором, а также тем, что, с одной стороны, сенсibilизированные лимфоциты в присутствии антигена могут выделять лимфокины, активирующие макрофаги, в результате чего изменяется их ферментативная активность [4, 7, 9], с другой – сами папилломавирусы и сопутствующая им микрофлора могут оказывать прямые иммунодепрессивные либо активирующие

эффекты, изменяя функциональную активность фагоцитов, мы исследовали в соскобах из уретры активность кислой фосфатазы макрофагов. Таким образом, изучение иммуноцитобиохимических дисфункций позволит определить патогенетические особенности LSIL и совершенствовать методы лечения данной патологии.

Целью настоящего исследования явилась оценка состояния цитобиохимического статуса шейки матки у больных с низкой степенью цервикального интраэпителиального поражения (LSIL).

Материалы и методы исследования

В ходе выполнения работы было обследовано 70 человек с низкой степенью цервикального интраэпителиального поражения (LSIL), находившихся на лечении в базовой акушерско-гинекологической клинике КубГМУ, женских консультациях № 4 и № 5 г. Краснодара, ГБУЗ ККБ № 2, Краевом перинатальном центре ГБУЗ ДККБ и 30 условно здоровых женщин (биохимический контроль). Проведено клиническое, кольпоскопическое, цитогистологическое и микробиологическое исследование. С целью исключения потенциального влияния сопутствующих урогенитальных инфекций на исследуемые параметры в группы исследования были включены пациентки с отсутствием или пролеченными не менее, чем за месяц до исследования, урогенитальными инфекциями. Диагноз ПВИ устанавливался на основании клинико-микробиологического и цитологического обследования (жидкостная цитология – технология ThinPrep®, Pap-smear test). Диагностику инфицированности различными типами ВПЧ проводили с помощью ВПЧ Digene-теста (система «HPV Digene-test®»). Исследование цитохимических показателей клеток мононуклеарно-фагоцитарной системы слизистой цервикального канала включало определение активности миелопероксидазы, кислой фосфатазы и неспецифической эстеразы в макрофагах соскобов матки. МПО исследовали ультрацитохимическим методом по Gracham and Karnovsky, КФ методом одновременного азосочетания по Burstone в модификации Zeva H.C использованием в качестве субстрата нафтол-AS-BI-фосфата при pH 5,0 и в качестве диазосоставляющей прочного гранатового GBC. Мазки фиксировали в парах формалина, докрашивали гематоксилином по Mowry R., НЭ по Burgess A. с использованием в качестве диазосоставляющей прочного синего ВВ с докраской ядерным красным. Активность исследованных ферментов, регистрировали по проценту клеток с выявленной активностью фермента, а также визуальным полуколичественным методом с использованием принципа Kaplow [12]. Состояние окислительных процессов в слизистой шейки матки на фоне LSIL включало определение NO, реактивных форм кислорода (супероксидрадикалы, O₂⁻) и липидов (пероксидрадикалы, LOO⁻). В основе метода электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) лежит феномен поглощения микроволнового излучения сверхвысоких частот частицами, обладающими некомпенсированным магнитным моментом. Образцы цервикального смыва помещали в полиэтиленовые трубочки диаметром 0,5 см и длиной 1-1,5 см и замораживали при температуре жидкого

азота (-196°C). ЭПР – спектры регистрировались на радиоспектрометре РЭ-1307 (Россия), снабженном компьютерной программой накопления сигналов. Для определения содержания свободного оксида азота в образцах цервикального смыва использовали спинметку-диэтилдитиокарбамат натрия (DETC) (SIGMA) в дозе 1,75 мг на мл жидкости. С целью определения содержания супероксидрадикалов применялась спин-ловушка 5,5-диметил-1-пиролин-N-оксид (DETC) (SIGMA) дозой 5 мМ DMPO на 1 мл жидкости. С целью определения содержания пероксидрадикалов использовали спин-ловушку α -фенил-tert-бутилнитрон (PBN) (SIGMA) дозой 50 мг PBN на 1 мл жидкости.

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили в соответствии с методами, принятыми в вариационной статистике, с использованием свободного программного обеспечения – системы статистического анализа R (R Development Core Team, 2008, достоверным считали различие при $p < 0,05$). Для оценки корреляционных взаимосвязей отдельных изучаемых параметров использовали коэффициент Пирсона (r).

Результаты исследования и их обсуждение

В ходе проведенного исследования выявляемая активность миелопероксидазы, отражающей один из компонентов кисло-

родзависимой бактерицидной системы макрофагов цервикальной зоны у больных LSIL, была более чем на треть ($73,8 \pm 9,6$ против $208,1 \pm 19,3$; $p < 0,05$) ниже таковой у здоровых лиц контрольной группы (рис. 1).

Активность кислой фосфатазы у ВПЧ-инфицированных пациенток практически не отличалась от соответствующего параметра контроля ($124,1 \pm 12,3$ против $138,9 \pm 17,5$; $p < 0,05$), тогда как выявляемая активность неспецифической эстеразы, коррелирующая с субактивационными характеристиками макрофагов у женщин, страдающих LSIL, находилась на достоверно ($p < 0,05$) более низком уровне ($42,3 \pm 6,3$ против $84,7 \pm 7,5$; $p < 0,05$).

Также в ходе проведенных исследований выявлено, что при низкой степени цервикального интраэпителиального поражения интенсивность ЭПР сигнала спинмеченных пероксидрадикалов (LOO-) увеличивается на $60,8 \pm 4,1\%$ ($p < 0,05$), также регистрируются сигналы супероксидрадикалов (O2-), которые в контрольной группе не регистрируются, увеличение интенсивности сигнала ЭПР спинмеченого оксида азота (NO) возрастает на $50,1\%$ по сравнению с контролем (рис. 2).

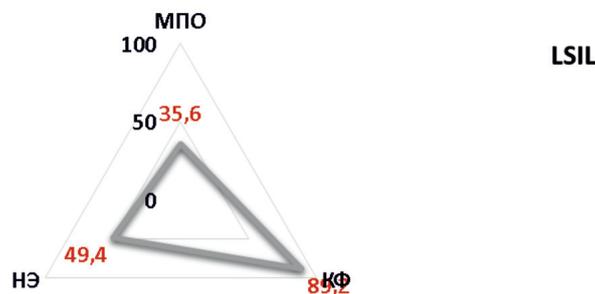


Рис. 1. Активность ферментов (СПП) макрофагов цервикальной зоны больных LSIL (% от контроля)

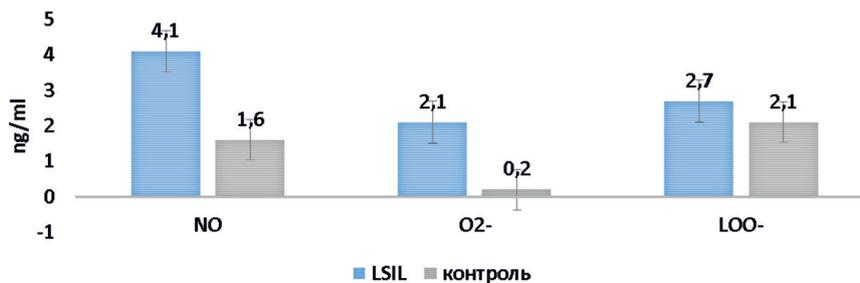


Рис. 2. Содержание свободного оксида азота (NO), реактивных форм кислорода (O2-) и липидов (LOO-) в слизистой шейки матки

Таким образом, исходя из анализа результатов исследований, можно заключить, что в случае ВПЧ-ассоциированного поражения шейки матки легкой степени имеет место угнетение макрофагального звена локального иммунитета, способствующего Th-1 девиации с интенсификацией образования реактивных форм азота и кислорода, которые становятся причиной изменений молекулярных, субклеточных и клеточных структур. Кроме того, в эпителиоцитах усиливается образование реактивных форм кислорода и азота (O₂- и NO), что вызывает пероксидативные процессы липидов (LOO-) и интенсивное образование свободнорадикальных форм кислорода. Имеющиеся иммунологические и цитобиохимические изменения при низкой степени цервикального интраэпителиального поражения становятся факторами, нарушающими структуры клеточных мембран, а изменение метаболических процессов играет значительную роль в патогенезе и переходе процесса в более тяжелые формы. Изменения показателей оксидативного статуса цервикальной зоны у больных низкой степенью цервикального интраэпителиального поражения показывают необходимость дифференцированного подхода при коррекции метаболических нарушений, что определяет целесообразность в дополнение к традиционной терапии, ис-

пользование местных препаратов с антиоксидантной направленностью.

Список литературы

1. Аполихина И.А. Папилломавирусная инфекция гениталий у женщин. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. – 32 с.
2. Бебнева Т.Н., Прилепская В.Н. Папилломавирусная инфекция и патология шейки матки // Гинекология. – 2009. – Т. 3. – № 3. – С. 77–81.
3. Патология шейки матки и генитальные инфекции / Под ред. проф. В.Н. Прилепской. – М.: МЕДпресс-информ, 2008. – 383 с.
4. Роговская С.И. Папилломавирусная инфекция у женщин и патология шейки матки: (руководство практикующего врача). – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2005. – 144 с.
5. Топуриа М., Маисурадзе Н.З., Саникидзе Т.В., Мусеридзе Н.Г. Окислительные процессы в слизистой ткани влагалища и шейки матки при папилломавирусной инфекции // Georgian Medical News. – 2005. – № 3. – С. 30–33.
6. Brown D., Shew M., Qadadri B. A longitudinal study of genital human papillomavirus infection in a cohort of closely followed adolescent women. *J Infect Dis* 2005; 191: 2: 182–192.
7. Stern P.L., van der Burg S.H., Hampson I.N., Broker T.R., Fiander A., Lacey C.J., Kitchener H.C., Einstein M.H. Therapy of human papillomavirus-related disease. HPV and disease prevention. *J Vaccine* 2012; 30: Suppl: 5: 71.
8. Axline S. Functional biochemistry of macrophages. – *Seminars Hemat.* – 1970. – V.7. – P. 1239–1260.
9. Bosch F., Manos M., Munoz N. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: A worldwide perspective. *J. Natl. Cfncr Inst* 87:796-802, 2009.
10. Kaplow L. Clinical significance of leucocyte alkaline phosphatase determinations. *Rev. Roum. Med. Int.* – 1973. – V. 10. – № 5. – P. 365–372.