

ФГБУ РОССИЙСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР РЕНТГЕНРАДИОЛОГИИ
МИНЗДРАВСОЦРАЗВИТИЯ РОССИИ

04.2.01 2 52801 "

Хунова Лилия Заудиновна

Качественная оценка молекулярно-
биологических факторов раннего
канцерогенеза шейки матки.

14.01.12 – онкология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научные руководители:

Член-корр. РАМН, профессор
доктор медицинских наук, профессор

Л.А. Ашрафян
В.К. Боженко



Москва

2011

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННЫЕ ГИНЕКОЛОГИЧЕСКИЕ И ОНКОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОБЛЕМЫ В РАННЕЙ ДИАГНОСТИКЕ РАКА ШЕЙКИ МАТКИ (обзор литературы).....	9
1.1 Историческая справка.....	9
1.2 Роль ВПЧ в этиологии рака шейки матки.....	13
1.3 Строение ВПЧ и механизм канцерогенного действия ВПЧ.....	16
1.4 Поиск маркеров прогрессии цервикальных интраэпителиальных неоплазии.....	23
1.4.1 Использование экспрессии вирусных генов для оценки процесса малигнизации шейки матки.....	24
1.4.2 Изучение и поиск клеточных маркеров прогрессии.....	25
1.4.3 Механизмы злокачественной трансформации при инфицировании ВПЧ.....	29
1.4.4 Генетические маркеры в роли развития цервикальных интраэпителиальных неоплазий шейки матки.....	35
ГЛАВА 2. КЛИНИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БОЛЬНЫХ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	
2.1.Общая клиническая характеристика обследованных больных	41
2.2. Основные методы обследования	42
2.3. Методики ультразвукового исследования	42
2.4. ПЦР-диагностика ткани шейки матки	48
2.5 Определение уровня онкобелка E7.....	51
2.6. Другие методы исследования.....	51
2.7.Статистическая обработка данных.....	52

ГЛАВА 3. МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ РАННЕГО РАКА ШЕЙКИ МАТКИ.....	53
3.1 Папилломовирусная инфекция и онкобелок E7 у больных раком шейки матки	53
3.2 Онкобелок E7 при цервикальных интраэпителиальных неоплазиях и инвазивном раке шейки матки	57
3.3 Экспрессия теломеразы при цервикальных интраэпителиальных неоплазиях и инвазивном раке шейки матки.....	61
3.4 Гены пролиферации и апоптоза при цервикальных интраэпителиальных неоплазиях и инвазивном раке шейки матки.....	65
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	73
ВЫВОДЫ.....	83
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	84
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	85

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.

- **РШМ** - рак шейки матки
- **ПЦР** - полимеразная цепная реакция
- **ВПЧ (HPV)** - вирус папилломы человека
- **CIN** - цервикальная интраэпителиальная неоплазия
- **TERP** - теломераза
- **CCNB₁** - циклин В1
- **p53**- транскрипционный фактор, регулирующий клеточный цикл
- **E7** - онкобелок вируса папилломы человека
- **BCL2** – антиапоптопический белок
- **BAG** - белок (маркер) проапоптозной активности
- **BAX** - белок (маркер) проапоптозной активности
- **Ki-67** – клеточный маркер пролиферации

ВВЕДЕНИЕ.

Актуальность работы.

Рак шейки матки (РШМ) в настоящее время в России является третьим по частоте злокачественным процессом женских половых органов, встречается с частотой примерно в 12,2 на 100. тыс. населения.

Значительным достижением в борьбе за снижение заболеваемости раком шейки матки явилась разработка и внедрение в практическое здравоохранение методов цитологического скрининга, в тоже время активно развиваются разработки молекулярно-биологических методов диагностики и скрининга РШМ.

Одним из основных направлений вторичной профилактики рака шейки матки является своевременная диагностика и лечение предопухолевых состояний. Согласно международной классификации основной патологий, предшествующей раку шейки матки является дисплазия или цервикальная интраэпителиальная неоплазия. (CIN), которая подразделяется на 3 степени: легкая, средняя и тяжелая (или прединвазивная карцинома). Разница между этими тремя состояниями формируется на уровне патогистологического анализа и отражает, ту или иную степень изменения рядности плоского эпителия шейки матки. Методы лечения, используемые при цервикальных интраэпителиальных неоплазиях достаточно разнообразны и варьируют в диапазоне от использования консервативных методов до ампутации шейки матки, и даже до экстирпации матки. Согласно эпидемиологическим данным, лишь 15% цервикальных интраэпителиальных неоплазий III степени (CIN III) прогрессирует в инвазивную карциному. При более легких вариантах цервикальных интраэпителиальных неоплазий этот процент еще ниже.

Учитывая эти данные вполне закономерно становится проблема качественной оценки характера цервикальных интраэпителиальных неоплазий ее нацеленность на прогрессию в ивазивную карциному. Возможность проспективного прогнозирования за последние годы

появилась при исследовании ряда биологических маркеров канцерогенеза плоскоклеточного рака шейки матки.

В соответствии с современными представлениями, начальные этапы канцерогенеза РШМ, представляют собой каскад определенных молекулярно-генетических изменений. При этом изменяется функциональность таких основных клеточных процессов, как пролиферация клетки, апоптоз, межклеточное взаимодействие. Углубленный анализ этих изменений позволит расширить спектр методов уточняющей диагностики преодопухолевых и опухолевых процессов шейки матки.

Таким образом, основная цель работы - исследовать соотношение процессов пролиферации и апоптоза и сформировать спектр основных факторов, отражающих процессы начального канцерогенеза в клетках эпителия шейки матки.

Реализация этой цели сопряжена с решением следующих задач:

1. Изучить уровень экспрессии белка E7 при различных вариантах цервикальных интраэпителиальных неоплазий, инвазивном раке шейки матки и в группе контроля.
2. Изучить степень теломеразной активности при различных вариантах цервикальных интраэпителиальных неоплазий, инвазивном раке шейки матки и в группе контроля.
3. Изучить уровень экспрессии молекулярных маркеров пролиферации (Ki 67, CCNB1) и апоптоза (BCL2, BAX, BAG) при различных вариантах цервикальных интраэпителиальных неоплазий, инвазивном раке шейки матки и в группе контроля.
4. Определить молекулярно-биологические критерии раннего канцерогенеза при цервикальных интраэпителиальных неоплазиях.

Научная новизна:

Изучены варианты экспрессии онкобелка E7.

Определен уровень теломеразной активности при различных вариантах цервикальных интраэпителиальных неоплазий, инвазивном раке шейки матки.

Впервые проведен сравнительный анализ уровня экспрессии генов пролиферации (Ki 67, CCNB1) и генов апоптоза (BCL2, BAX, BAG) при различных вариантах цервикальных интраэпителиальных неоплазий, инвазивном раке шейки матки.

Впервые обнаружено отличие экспрессии основных молекулярных маркеров пролиферации и апоптоза в группах, содержащих и не содержащих вирус ВПЧ.

Определены молекулярные критерии начальных этапов канцерогенеза РШМ

Практическая значимость работы:

Обнаруженные в работе молекулярные маркеры раннего канцерогенеза могут быть положены в основу метода дифференциальной диагностики интраэпителиальных неоплазий. Полученные молекулярно-генетические данные могут войти в комплекс прогностических маркеров, отражающих возможные пути развития гиперпролиферативных заболеваний шейки матки, что позволит сформировать дифференцированный подход и лечение цервикальных интраэпителиальных неоплазий, широко используя консервативные методы терапии, и улучшить качество медицинской помощи при патологии шейки матки.

Положения, выносимые на защиту.

1. Большинство наблюдений цервикальных интраэпителиальных неоплазий III ст. (ca in situ) и инвазивный рак шейки матки, сопровождаются экспрессией онкобелка E7 в сочетании с ВПЧ высокого онкологического риска.
2. Высокий уровень теломеразной активности выявляется при CIN III и инвазивном раке шейки матки.

3. При цервикальных интраэпителиальных неоплазиях увеличивается экспрессия генов, контролирующую пролиферацию и уменьшение экспрессии генов, контролирующую апоптоз.

4. Лечение цервикальных интраэпителиальных неоплазий в группе пациенток раннего репродуктивного возраста должно сопровождаться и опираться на результаты молекулярно-биологических методов

Апробация работы.

Основные результаты работы представлены и доложены на Всероссийском научном форуме «Радиология 2005», (Москва, Центр международной торговли 31 мая-3 июня 2005 г.) Российский Форум «Мать и дитя», «Современные технологии в диагностике и лечении гинекологических заболеваний» (Москва, 4-9 июня 2007 г.). Международный конгресс молодых ученых «Актуальные вопросы лучевой диагностики и онкологии» (ФГУ РНЦ РР Москва 2007 г.), Международный конгресс молодых ученых «Актуальные вопросы лучевой диагностики и онкологии» (ФГУ РНЦ РР Москва 2008 г.). 13th Biennial Meeting of the International Gynecologic Cancer Society which will be held in Prague, Czech Republic. 2010.

Материалы диссертации доложены на VIII конгрессе «Человек и лекарство» 11-15 апреля 2011 г.

Апробация диссертации состоялась 18 июля 2011 года на научно-практической конференции ФГУ «РНЦ РР» Минздравсоцразвития России.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 8 научных работ, из них 3 статьи в журналах, рецензируемых ВАК.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 112 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, характеристики материала и методов исследования, 2 глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы, включающего 290 источника, из них 84 отечественных и 116 зарубежных. Работа иллюстрирована 14 таблицами, 17 рисунками.

ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННЫЕ ГИНЕКОЛОГИЧЕСКИЕ И ОНКОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОБЛЕМЫ В РАННЕЙ ДИАГНОСТИКЕ РАКА ШЕЙКИ МАТКИ (Обзор литературы.)

1.1 Историческая справка

Рак шейки матки (РШМ) - актуальная проблема для гинекологов и онкогинекологов всего мира. Ежегодно в мире выявляется около 500 тысяч случаев, более 270 тысяч женщин умирают от РШМ (Waggoner S.E., 2003). Три четверти всех случаев РШМ регистрируются в развивающихся странах.

Несмотря на большое внимание гинекологов к проблеме патологии шейки матки, повышенную онкологическую настороженность, разработанные алгоритмы диагностики и лечения больных с патологией шейки матки, рак шейки матки является одной из наиболее актуальных проблем отечественной гинекологии и онкогинекологии.

В 2006г. в России зарегистрировано более 13 тыс. заболевших РШМ. Заболеваемость РШМ составила 12,7 на 100 тысяч женщин, смертность от РШМ в 2006г составила 5,0 на 100 тыс. женщин.

Несмотря на то, что средний возраст заболевших РШМ в 2006 году составляет 53 года [1], всё чаще раком шейки матки болеют женщины репродуктивного возраста. В возрастной группе 15-39 лет в 2006 году рак шейки матки находился на втором месте, как по показателям заболеваемости, так и по показателям смертности [1,2].

Прирост заболеваемости у молодых женщин до 35 лет заметен во всем мире и составляет 40,7% [4]. Американские исследователи Р. М. Elliott, М. Н. Tattersall, и др. отмечают что молодые женщины до 35 лет составляли всего 9% среди всех заболевших РШМ в 50-60е года XX столетия, тогда как в 70-80е годы доля заболевших женщин этой возрастной группы составила 25%. Также имеет место значительное увеличение числа молодых женщин с диагностированными IB и IIA стадиями РШМ и наличием метастазов в тазовые лимфатические узлы. Во всем мире увеличивается частота относительно редкой опухоли – цервикальной аденокарциномы.

В России анализ показателей диагностики РШМ выявляет рост запущенности (III-IV стадия) и одногодичной летальности при снижении активной выявляемости I-II стадии опухолевого процесса. В 2002г. в России РШМ IV стадии выявлен у 12,2% больных, тогда как в 1992г. - в 9,7%, при этом доля выявленных больных с I-II стадиями заболевания снизилась с 61,7% в 1992г. до 58% в 2002г. Рак *in situ* диагностирован лишь у 12,8% пациенток с РШМ. Пятилетняя выживаемость больных РШМ III-IV стадии сохраняется на уровне 20% и 10% соответственно[12].

В мире наиболее высокая заболеваемость РШМ отмечается в развивающихся странах Африки, Центральной и Южной Америки, странах Индийского субконтинента, где ежегодно выявляется более 30 новых случаев цервикального рака на 100 тысяч женщин. В развивающихся странах РШМ составляет 20-30% всех злокачественных опухолей у женщин и занимает первое место среди причин женской смертности от онкологических заболеваний.

Заболеваемость РШМ в Европе и Северной Америке гораздо ниже, что обусловлено применением масштабного цервикального скрининга на протяжении уже 40 лет. Ежегодно регистрируются 12 новых случаев на 100 тысяч женщин.

Многочисленными клиническими и экспериментальными исследованиями доказано, что развитию РШМ предшествует появление патологических изменений, называемых предраковыми. Впервые к предраковым изменениям были отнесены дисплазия (легкая, умеренная и тяжелая) и рак *in situ* как чисто морфологические термины, учитывающие клеточную атипию и уровень дифференцировки. Позднее были приняты термины CIN I-III (*cervical intraepithelial neoplasia*), подчеркивающие последовательную неопластическую пролиферацию клеток, причем CIN III включает тяжелую дисплазию и рак *in situ*. По данным ВОЗ В США с 1990г. введено упрощенное обозначение LSIL/HSIL (*low/high squamous intraepithelial lesions*): LSIL соответствует CIN I, а HSIL – CIN II-III. Более

ранние патологические изменения шейки матки обозначают как плоскоклеточные атипии неопределенного значения (ASCUS, atypical squamous cells of undetermined significance [11]).

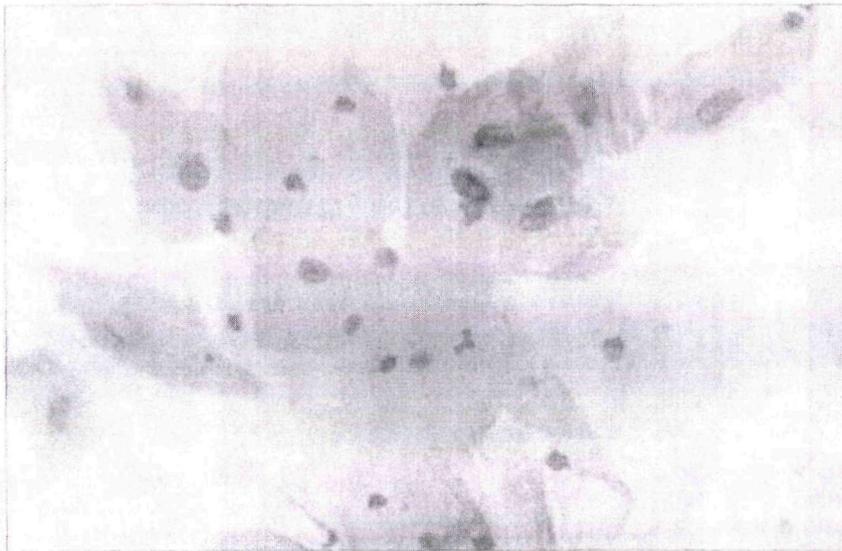


Рис. 1. Цитогарма соответствует CIN I

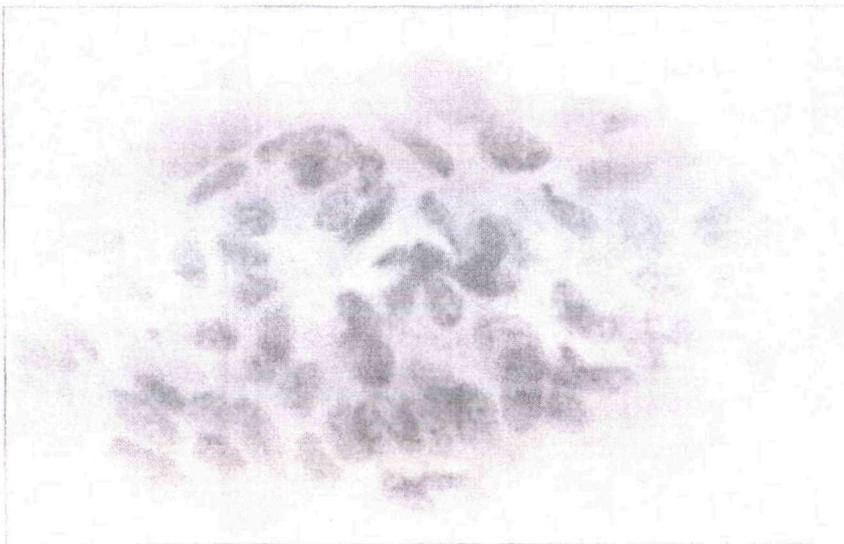


Рис. 2. Цитогарма соответствует CIN II

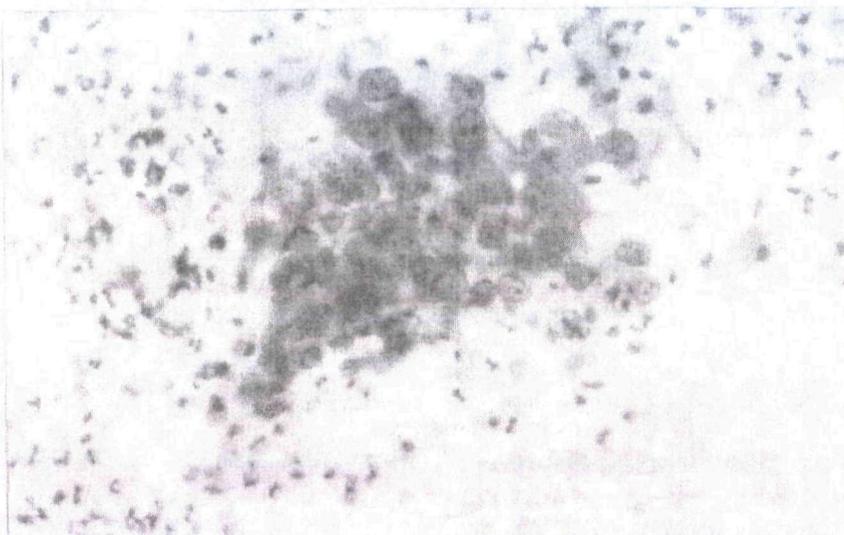


Рис.3 Цитограмма соответствует CIN III эндоцервикального эпителия

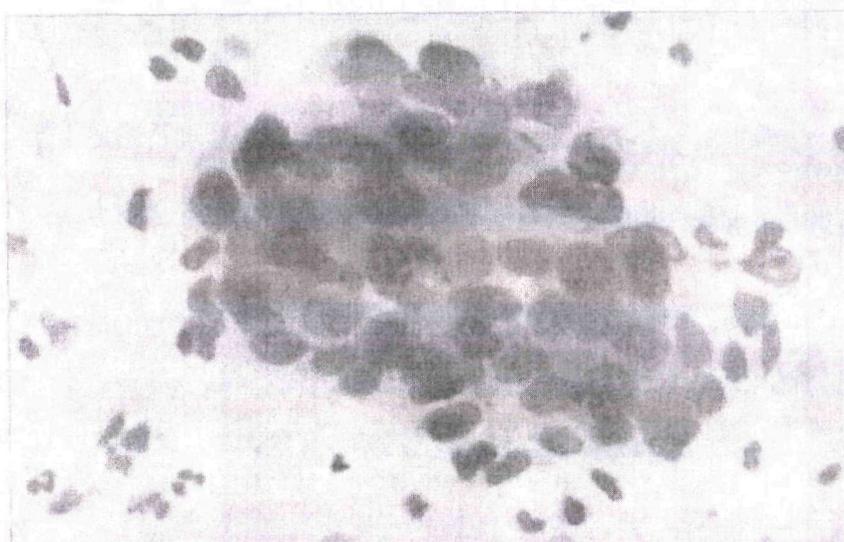


Рис.4. Цитограмма соответствует микроинвазивному раку

Выделение микроинвазивного рака в особую группу первой стадии связано с необходимостью выбора специальных методов лечения, отличных от таковых при инвазивном раке. Впервые понятие микрокарцинома шейки матки ввел Mestwerdt в 1947г., автор относил к этой стадии рак с глубиной инвазии опухоли до 5мм. В 1961г. FIGO включила в стадию IA раннюю стромальную инвазию опухоли без определения её глубины. В 1974г. американские ученые определили микроинвазивный рак как опухоль с глубиной инвазии до 3мм без наличия раковых эмболов в просвете сосудов.

В 1985г на заседании FIGO стадия рака шейки матки IA определена как преклиническая карцинома, диагностируемая при гистологическом исследовании с делением её на 2 группы: стадия IA1 с минимальной инвазией и стадия IA2 с глубиной инвазии в подлежащую строму не более 5мм и по протяженности не более 7мм. В 1994г комитет FIGO обозначил под понятием рак шейки матки IA1 раковую опухоль с глубиной инвазии не более 3 мм и по протяженности не более 7 мм.

1.2 Роль ВПЧ в этиологии РШМ

В 70-х годах XX столетия немецкий ученый Харальд цур Хаузен высказал предположение о роли вируса папилломы человека в развитии рака шейки матки (РШМ). В исследованиях, выполненных в 1983-1984гг, он доказал гипотезу вирусного происхождения РШМ, продемонстрировав присутствие в опухолевых клетках вирусной ДНК определённых типов папилломавирусов (HPV). В настоящее время ВПЧ причислен к онкогенным вирусам человека, вызывающим РШМ практически в 100% случаев.

Вирусы папиллом человека обнаруживают значительное многообразие: выявлено более 120 типов ВПЧ. В соответствии с онкогенным потенциалом различают вирусы папиллом высокого (ВПЧ 16 и 18) и низкого (ВПЧ 6 и 11) риска. В настоящее время в результате многочисленных исследований в различных популяциях к группе вирусов высокого риска РШМ относят также ВПЧ 45, 31, 33, 35, 51, 52, 58, 59 типов. ВПЧ низкого риска (6 и 11 типов) наиболее часто встречаются при неопухолевых поражениях шейки матки, кондиломах, CIN I. ВПЧ 16 и 18 типов обнаруживаются при CIN II-III в 50%, при инвазивном раке - в 90-95%. Не менее 20% инфицированных женщин имеют смешанную инфекцию - более одного типа ВПЧ. [31,42,56]

В 1996г информационный бюллетень ВОЗ констатировал основную этиологическую роль ВПЧ в развитии РШМ. Это положение основано на многочисленных эпидемиологических и молекулярно-биологических исследованиями. ДНК ВПЧ выявлена в 92,7% случаев инвазивного рака шейки матки, а более 99% CIN обусловлено инфицированием ВПЧ на фоне

наличия хронического цервицита (259 коз). По данным других зарубежных авторов при наблюдении за пациентками, инфицированными ВПЧ, при отсутствии адекватного лечения злокачественная трансформация эпителия шейки матки имела место в 50-70% случаев [7,14].

Исследование вирусов папиллом в опухолях шейки матки в 22 регионах мира показало присутствие известных типов ВПЧ в 95% случаев. При этом ВПЧ 16 и родственные типы (31, 33, 35, 52 и 58) встречаются в 67-69%, а ВПЧ 18 (39, 45, 59, 68) в 27% РШМ. На долю остальных (ВПЧ умеренного риска - 53, 55, 56, 62, 66 и др.) приходится около 6%. [42]

Исследования типов ВПЧ при РШМ у российских женщин показали, что наибольшее распространение имеет ВПЧ 16 типа: методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) ВПЧ 16 выявлен в 77%, а ВПЧ 18 - в 14% случаев плоскоклеточного РШМ. [73]

ВПЧ 16 присутствует, в основном, в плоскоклеточном раке, тогда как ВПЧ 18 чаще встречается в аденокарциномах и низкодифференцированных опухолях шейки матки. С ВПЧ 18 связывают быстрый темп опухолевой прогрессии и более неблагоприятный прогноз.

Пик инфекции ВПЧ приходится на возраст 18-25 лет и снижается после 30 лет, тогда как в этом возрасте существенно возрастает частота дисплазий и рака шейки матки, пик которого приходится на 45 лет. По разным данным ВПЧ обнаружен у 20-46% здоровых женщин в возрасте 20-25 лет и у 6% женщин старше 30 лет [13]. Эти цифры варьируют в зависимости от региона, и в некоторых группах молодых женщин частота инфекции ВПЧ достигает 40-60%. Обычно инфекция ВПЧ носит временный характер и при первичной инфекции самоизлечение может наступить через 7-16 месяцев, при этом реконвалесценция от ВПЧ-16 занимает наиболее продолжительное время. Антитела к ВПЧ перестают выявляться через 1-1,5 года у 70-80% инфицированных женщин. Период реконвалесценции затягивается при повторном заражении ВПЧ высокого риска, при инфекции несколькими типами папилломавирусов. В разных популяциях 3-10% женщин не могут

освободиться от инфекции и становятся персистентными носителями ВПЧ. Персистентная инфекция ВПЧ высокого риска с длительной активной экспрессией вирусных онкобелков является необходимым условием возникновения РШМ [11].

Предрак и рак шейки матки относятся к сексуально трансмиссивным заболеваниям. ВПЧ инфицирует эпителиальные клетки базального слоя плоского эпителия и отличается высоким тропизмом именно к этому типу клеток. Инфицирование эпидермиса происходит через микроповреждения при непосредственном контакте с вирусом [117], либо в месте стыка столбчатого эпителия эндоцервикса и многослойного плоского эпителия влагалитной части шейки матки [Lowy, Howley, 2001].

При репродуктивной стадии инфекции ВПЧ клетки базального слоя цервикального эпителия с персистирующим в цитоплазме вирусом (эписомальная форма) проходят последовательные этапы дифференцировки. В роговом слое, происходит активная сборка и выделение зрелых вирусных частиц. Вирусная инфекция на этой стадии высококонтагиозна. Репродуктивная стадия является обратимой и у многих инфицированных наступает ремиссия.

Стадия интегративной инфекции ВПЧ характеризуется встраиванием ДНК ВПЧ в геном инфицированных клеток и является первым шагом на пути к опухолевому перерождению.

Койлоциты представляют собой цитопатические изменения, вызванные продукцией вируса в эпителии шейки матки и являются наиболее удобным морфологическим маркером папилломавирусной инфекции. Койлоциты характеризуются гиперхромазией ядра и перинуклеарной цитоплазматической вакуолизацией - четкой зоной светлой цитоплазмы, в которой определяются собранные дочерние вирусные частицы.

Койлоцитоз наиболее часто встречается при CIN I-II, а также в нормальном цервикальном эпителии при наличии субклинической формы

ВПЧ инфекции. Менее заметен или практически отсутствует койлоцитоз при CIN III и инвазивном раке, что, по-видимому, связано с интеграцией вируса.

В различных исследованиях показано, что ВПЧ низкого онкологического риска существуют в эписомальной форме, а вирусы из группы высокого риска определяются в виде интегрированных форм в большинстве тяжелых дисплазий шейки матки.

1.3 Структура ВПЧ и механизм канцерогенного действия ВПЧ

Вирусы папиллом человека принадлежат к семейству Papoviridae. Кольцевая двуцепочечная ДНК ВПЧ кодирует синтез 8 вирусных белков: три ранних гена – онкогены E5, E6 и E7 обладают активностью, стимулирующей пролиферацию, а остальные - E1, E2, E4 контролируют функции, необходимые для репродукции, причем E2 обладает функциями регулятора транскрипции. Поздние гены L1 и L2 кодируют структурные белки вириона. На стадии активной продукции ВПЧ экспрессия генов E6 и E7 регулируется геном E2, подавляющим транскрипцию этих генов. В процессе интеграции в клеточный геном разрыв кольцевой молекулы вирусной ДНК наиболее часто происходит в области E1/E2. Исчезновение супрессорной функции белка E2 обуславливает суперэкспрессию вирусных онкогенов E6-E7, трансформирующее действие которых способствует прогрессии неоплазии.

Доказательством того, что именно гены E6 и E7 контролируют трансформированный фенотип клеток является следующее: 1) гены E6 и E7 обладают трансформирующим потенциалом *in vitro*; 2) трансформированные этими генами клетки способны индуцировать опухоли у бестимусных мышей; 3) ингибирование экспрессии генов E6/E7 вызывает в клетках реверсию трансформированного фенотипа [81].

Исследования биологической активности гена E6 ВПЧ высокого риска показало, что он, как в одиночестве, так и в сочетании с геном E7 способен к иммортализации плоскоклеточных эпителиальных клеток человека. Кроме того, белки E6 способны к иммортализации клеток эпителия шейки матки.

Взаимодействуя с продуктом гена p53, белок E6 вызывает деградацию белка p53, т.е. конкурирует с функциями супрессии опухолевого роста. E6 способен также увеличивать уровень мутагенеза и генетической нестабильности. Поскольку в подавляющем большинстве карцином шейки матки (в отличие от многих других опухолей человека), отсутствуют мутации в гене p53, предполагается, что экспрессия белка E6 ВПЧ высокого риска в итоге оказывает на p53 такое же воздействие, что и соматические мутации, т.е. приводит к потере p53 регулируемой транскрипции и ингибированию нормального клеточного ответа на повреждения ДНК. Кроме того, E6 обладает рядом других свойств, которые могут вносить вклад в процесс трансформации и не зависят от p53. К их числу относится уменьшение апоптоза, активация теломеразы, взаимодействие с различными белками, вовлеченными в процесс клеточного деления. В отличие от E6 ВПЧ высокого риска, E6 ВПЧ низкого риска не способны ни к иммортализации, ни к трансформации.

Ген E7 ВПЧ 16 и 18 типов способен индуцировать образование фокусов трансформации и рост в полужидком агаре различных клеточных линий фибробластов грызунов, вызывать иммортализацию первичных клеток грызунов. Для E7 ВПЧ низкого риска наблюдается меньшая эффективность трансформации: клетки не способны к росту в полужидком агаре, но являются туморогенными для бестимусных мышей. В системе кератиноцитов человека ген E7 вызывает иммортализацию, эффективность которой существенно возрастает при котрансфекции с геном E6 ВПЧ высокого риска. В некоторых случаях такая котрансфекция может приводить и к трансформации. Кроме того, ген E7 может вызывать иммортализацию эпителиальных клеток молочных желез, клеток поверхностного эпителия яичника. Гены E6 и E7 ВПЧ низкого риска не способны к иммортализации первичных кератиноцитов.

Основная функция гена E7 ВПЧ высокого риска сводится к индукции перехода покоящихся клеток из G₀ в S- фазу. Это осуществляется за счет

активации некоторых клеточных генов под влиянием E7 и в результате прямого взаимодействия E7 с белками, регулирующими прохождение клеточного цикла. Ген E7 ВПЧ 16 типа способен к взаимодействию с белком гена супрессора pRb 105. Ген E7 ВПЧ 16 типа способен участвовать как в процессах пролиферации, так и в апоптозе. Характерно, что апоптоз под действием E7 проявляется в клетках мышечной с удаленным геном p53. Таким образом, апоптоз под действием E7 может проявляться как по p53-зависимому, так и по p53-независимому пути.

Онкобелки E6 и E7 обладают онкогенным потенциалом *per se*, но этот потенциал существенно возрастает при совместной экспрессии. Это свидетельствует о том, что вирусные факторы могут функционально кооперироваться в процессе клеточной трансформации. По-видимому, E6 может участвовать в нарушении контроля регуляции размножения путем ингибирования апоптоза, направляемого E7 [81].

Инфекция ВПЧ высокого риска является необходимой, но не достаточной для процесса неоплазии. Действие вирусных генов инициирует процесс опухолевой прогрессии и является определяющим фактором для запуска последующих генетических процессов, приводящих к формированию моноклональной популяции опухоли.

Рассматривают два механизма развития предрака и рака шейки матки: клональная селекция все более и более недифференцированными фенотипами, либо независимое развитие морфологических типов предрака. Согласно первому происходит поэтапная прогрессия от легкой дисплазии до инвазивного рака, проходя все стадии дисплазии. Генетические исследования показали, что эти виды патологии развиваются путем клональной селекции из менее тяжелых форм предрака. При этом не обязательно, что более легкая степень переходит в более тяжелую. По наблюдению шведских ученых только 16% CIN I прогрессировали в CIN III или CIS за 39 месяцев, в то время как 62% регрессировали и 22% оставались без изменений [5]. Исследования, проведенные Ostor A.G., свидетельствуют о том, что вероятность регрессии

CIN I составляет 60%, персистенция – 30%, прогрессия до CIN III-10% и прогрессия до инвазивного рака –1% [83]. В отношении CIN II имеются соответствующие данные: 40, 40, 20, 5%. Вероятность регрессии CIN III – 33%, прогрессии в инвазивный рак – 12%. В другом наблюдении 30% CIN I прогрессировали в CIN III или CIS, 54% регрессировали, 16% оставались без изменений в течение 78 месяцев. Менее чем 30% женщин с CIN I, у которых не была взята биопсия и которые не лечились по этому поводу, в последствие имели CIN III [6]. По другим данным только около 15% CIN I-III прогрессируют в CIS и 36% CIS прогрессируют в инвазивный рак. Ухудшение гистологии отмечено в 22% CIN II. Менее 2% CIN всех стадий переходят в инвазивный рак (Monis et al., 1996). Шансы на регрессию CIN уменьшаются с возрастом и со степенью прогрессии от 60% (CIN I) до 33% (CIN III) [7].

Американские авторы считают, что LSIL (CINI) является самоограниченной инфекцией шейки матки вирусами папиллом высокого или низкого риска и высокую скорость прогрессии LSIL ставят под сомнение [8,9], несмотря на то, что при исследовании прицельных биопсий 79-86% LSIL (по данным разных методов) содержат ВПЧ высокого риска. Примерно 50% LSIL представляют собой не злокачественные поражения с продуктивной вирусной инфекцией и регрессируют спонтанно без терапии [83, Wright et al., 1994]. Прогрессия LSIL происходит крайне медленно, а наиболее общим и ранним проявлением инфекции онкогенными HPV считается HSIL (CINII-III), причем большинство HSIL возникает в течение 6 мес. и не позднее 24 мес. после инфекции ВПЧ высокого риска [9,10,11].

Эпидемиологические исследования показали, что время для превращения легкой дисплазии в тяжелую составляет 3,5-4,5 года, для появления инвазивного рака шейки матки - 15-20 лет. В 15-70% случаев, по данным разных авторов, прогрессия от CIS до инвазивного рака случается в течение 10 лет. (23,175). Период прогрессии плоскоклеточного преинвазивного рака шейки матки до 1 стадии РШМ составляет 4.2 года, а

аденокарциномы *in situ* до железистого рака эндоцервикса 1 стадии – 7.2 года. [41].

Показано, что в регрессии CIN действуют механизмы гуморального и клеточного иммунного ответов, а ослабление иммунологического надзора приводит к развитию дисплазий и их переходу в инвазивный рак. Пациенты с поврежденным клеточным иммунитетом имеют более высокий уровень ВПЧ инфекции, индуцирующей как доброкачественные, так и злокачественные опухоли (80 К). У больных СПИДом развитие CIN случается почти в четыре раза чаще [12]. Цитотоксическая реакция Т-лимфоцитов на Е6 и Е7 протеины более часто выявляется у ВПЧ положительных женщин без дисплазии, чем у имеющих дисплазию (287К). При изучении лимфопролиферативной реакции на ВПЧ-16 протеины Е6 и Е7 обнаружено, что положительный ответ чаще наблюдался у женщин с отсутствием ВПЧ инфекции и без дисплазии.

При анализе гуморального ответа на ВПЧ следует отметить, что наличие антител (IgG) к ВПЧ 16 указывает на увеличение риска возникновения РШМ, а высокий уровень антител еще более усугубляет этот риск. При измерении уровня антител IgG к L1 и L2 (VLP) обнаружено самое низкое их содержание у ВПЧ отрицательных больных, умеренное при типах ВПЧ низкого риска. Антитела IgG имели более 50% пациенток с ВПЧ высокого риска, а при персистирующей инфекции - более 80% больных.

Антитела IgG к Е6 и Е7 более часто обнаруживали у больных с излеченной инфекцией или у ВПЧ-отрицательных больных, чем у больных с хронической инфекцией. Это можно объяснить следующим механизмом. После успешного иммунного ответа Т-клеток на внедрение HPV инфицированные кератиноциты подвергаются лизису и освобождают Е7. Фрагменты Е7 перемещаются во внеклеточное пространство, где подвергаются воздействию В-лимфоцитов, в результате появляются специфические антитела IgG Е7. Поэтому IgG антитела наиболее часто выявляют у больных с излеченной инфекцией и редко – с хронической.

Таким образом, антитела IgG L1,L2 VLP идентифицируются с существующей инфекцией, а IgGE6, E7 - с излеченной. [131].

При исследовании факторов неспецифического иммунитета отмечено, что интерлейкин 4 и интерлейкин 10 являются ингибиторами клеточного иммунитета и могут стимулировать опухолевый рост, тогда как интерлейкин 2 и гамма интерферон оказывают иммуностимулирующее действие и участвуют в ограничении опухолевого роста. Интерфероны проявляют антивирусную, антипролиферативную и иммуномодулирующую функцию. Однако экспериментальные исследования на многочисленных клеточных линиях цервикального рака показали, что интерфероны не способны подавлять ВПЧ инфекцию универсально и клиническое их применение недостаточно эффективно. Устойчивость инфицированных ВПЧ клеток к интерферонам обусловлена свойствами онкобелка E7. С одной стороны протеин E7 нейтрализует противовирусную активность интерферона 2 за счет того, что способен избирательно блокировать большинство генов, индуцируемых интерфероном. С другой стороны белок E7 инактивирует фактор регуляции активности интерферона (IRF interferon regulatory factor). IRF активируется в клетках при воздействии на них интерферонов и «включает» транскрипцию генов, кодирующих синтез противовирусных белков. [12,43]

На основании данных Шведского онкологического регистра показано существование генетической предрасположенности к цервикальному раку: риск РШМ достоверно вдвое выше у сестер по сравнению со сводными сестрами или падчерицами [20]

По крайней мере часть иммунного ответа на ВПЧ 16 инфекцию обусловлена генетически и связана с генетическими особенностями иммунных реакций и степенью экспрессии цитокинов (274). Для элиминации вирус-инфицированных клеток важно распознавание HPV-антигенов продуктами генов основного комплекса гистосовместимости HLA I и II класса. Поскольку гены HLA I и II класса отличаются генетическим полиморфизмом,

предполагают, что генетически predeterminedная иммунологическая чувствительность к инфекции ВПЧ может быть вовлечена в этиологию и способность прогрессии CIN и РШМ. Многочисленные исследования, проведенные в различных популяциях, показали, что среди женщин с CIN и РШМ чаще встречаются женщины с определенными вариантами генов HLA I и II класса. Однако частота распространения того или иного варианта HLA I и II классов варьирует в различных популяциях. Тем не менее, наиболее часто встречается ассоциация между наличием аллелей HLA II класса DR B1* 1501 и DQ B*0602 и инфекцией ВПЧ16 [19]. Поскольку эти аллели чаще встречаются не только среди больных РШМ, но и у “здоровых” женщин с инфекцией ВПЧ16, они, по-видимому, обуславливают длительную персистенцию вируса в организме. Высокие титры ВПЧ16 у женщин, больных РШМ *in situ*, выявляются в течение ряда лет еще до появления цитологических изменений. Таким образом, на начальном этапе инфекции ВПЧ нарушения в иммунном ответе способствуют длительной персистенции вируса, что является фактором риска в возникновении РШМ.

К факторам риска рака шейки матки относят также раннее начало половой жизни, ранние первые роды, частую смену половых партнеров. Известны данные [13], согласно которым серопозитивность при инфекции HPV 16 типа зависит линейно от количества половых партнеров и возрастает на 4% после появления нового. Риск прогрессирования заболевания значительно выше у женщин, которым на момент выявления первых патологических изменений шейки матки было меньше 25 лет. Вероятность канцерогенеза увеличивается во время беременности. Имеются данные, что при длительном (более 5-9 лет) использовании оральных контрацептивов у носителей ВПЧ высокого риска отмечается статистически значимое возрастание риска возникновения РШМ [34,51,60]. Установлено, что использование барьерных методов контрацепции приводит к достоверному снижению заболеваемости РШМ. Имеются убедительные данные о повышенном риске развития CIN II-III и РШМ у курящих женщин. Никотин

и его продукты воздействуют на пораженный ВПЧ цервикальный эпителий на самых ранних стадиях канцерогенеза за счет повышения пролиферативной активности клеток [113]. При дефиците фолиевой кислоты в сочетании с ВПЧ риск CIN III повышается в 7 раз. Снижение уровня фолиевой кислоты сопровождается снижением содержания антиоксидантов в сыворотке больных с ВПЧ, что способствует неопластической трансформации. Предполагают, что прогрессии РШМ способствуют некоторые патогены, в частности ВПГ-2, *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, вирус Эпштейна-Барр, *Trichomonas vaginalis*, *Treponema pallidum*. Подразумевается синергичное действие различных инфекционных возбудителей, приводящее к проявлению трансформирующего потенциала HPV [14].

Выявление и искоренение факторов риска распространения ВПЧ и развития рака шейки матки является одной из мер профилактики РШМ.

На международной консенсус-конференции по раку шейки матки в 1999г признано, что при условии квалифицированного подхода к организации международных программ скрининга РШМ можно предотвратить или вылечить на ранних стадиях развития. Эта стратегия базируется на сложившихся более 30 лет назад представлениях, что CIN I, CIN II и CIN III/CIS являются морфологическими и биологическими стадиями прогрессии инвазивного рака шейки матки [Richart and Barron, 1969]. Адекватные лечебные мероприятия при CIN позволяют предотвратить развитие неопластической трансформации, ранняя диагностика РШМ увеличивает показатель 5 летней выживаемости при I стадии заболевания до 90%, при II - до 55%. При выявлении заболевания при III и IV стадиях пятилетняя выживаемость составляет соответственно 30% и менее 10%.

1.4 Поиск маркеров прогрессии цервикальных интраэпителиальных неоплазий.

Одним из направлений профилактики РШМ является активное выявление и лечение предраковых состояний шейки матки. Информация о

прогнозе течения CIN крайне важна для выбора оптимального метода лечения.

В настоящее время ведутся активные поиски диагностических методов и маркеров, способных выявить те случаи CIN, в которых процессы трансформации носят необратимый характер. Разработка маркеров необратимости прогрессии развивается в различных направлениях:

1.4.1. Использование экспрессии вирусных генов для оценки процесса малигнизации шейки матки.

Выявление папилломавирусной инфекции является первичным в подтверждении того, что неопределенные морфологические изменения вызваны именно тем или иным вирусом папиллом с определенным риском заболевания. Однако наличие вирусной инфекции не является достаточным для продолжения процесса и не коррелирует с прогрессией.

Тем не менее, проявление экспрессии вирусных онкогенов E6 и E7, которое происходит только при подавлении экспрессии гена E2, может быть использовано для характеристики процесса. Так, методами реал – тайм ПЦР проводят определение количества копий генов E2 и E7(E6). При сохранении эписомальной формы вируса, количество копий генов E2 и E7/E6 одинаково. Если количество копий гена E7(E6) превышает число копий гена E2 имеет место интеграция вирусной ДНК в геном клетки, которая происходит только при разрыве вирусной эписомы в области генов E1-E2 и освобождению промотора для генов E6 и E7. Показано, что частота интеграции провируса ВПЧ растет с увеличением степени тяжести дисплазии CIN I-CIN III. Например, по данным Cricca et al., 2007 [58], в CIN I эписомальная ДНК превалирует в 72%, смешанные формы (эписомальная и интегративная) выявлены в 28%, что предполагает, раннюю интеграцию вирусной ДНК в клеточный геном. Исключительно интегративные формы не выявлены. В то же время в CIN II-III смешанные формы превалируют (73.5%). В РШМ интегративные формы определяются в 81.8% в отсутствии эписомальной ДНК. Наблюдается линейная зависимость уменьшения соотношения E2/E6

от CIN I (0.90) к CIN II-III и РШМ (0.17). Авторы определили при этом абсолютное количество вирусной ДНК - 1.36 млн. копий вирусного генома на 300нг геномной ДНК хозяина. Эти исследования достаточно точны, но трудоемки для использования в клинической практике.

Другие авторы предлагают оценивать прогрессию дисплазий и рака путем определения экспрессии онкобелка E7 иммуногистохимическими методами. Австрийские исследователи использовали моноклональные антитела к E7, однако, оказалось, что количество онкобелка E7 в клетках даже рака недостаточно для выявления иммуногистохимически, что было бы чрезвычайно удобно.

Тем не менее, возможно определение E7 в иммуноферментном анализе экстракта клеток, полученного из цервикальных мазков, больных дисплазиями [76]. Повышенный синтез E7 указывает на интегративную фазу вирусной инфекции, при которой очень мала вероятность спонтанной регрессии.

Наконец, был предложен метод оценки степени прогрессии дисплазий по определению белка оболочки L1 в цервикальных мазках. Поскольку белок L1 синтезируется только при продуктивной вирусной инфекции, его можно выявить на начальных стадиях инфекционного процесса - в коилоцитах, ASCUS, в эпителии дисплазий ранних стадий, но не в CIN III и карциномах.

Однако, опыт показывает, что у одного и того же пациента на ранних этапах канцерогенеза может быть полный набор цитогенетических нарушений, начиная от условно нормального эпителия, эпителия с коилоцитами, фокусов CIN различной тяжести и до участков преинвазивного и инвазивного рака. Поэтому методы, описанные выше, не дают однозначных результатов анализа и прогноза.

1.4.2 Изучение и поиск клеточных маркеров прогрессии.

Развитие рака у небольшого процента инфицированных женщин, длительный латентный период и наличие четких стадий прогрессии заболевания, моноклональность опухолей и коканцерогенное действие

химических и физических канцерогенов, указывают на то, что инфекция ВПЧ высокого риска является необходимой, но не достаточной для развития рака шейки матки. Можно полагать, что роль вирусной инфекции сводится к запуску многостадийного процесса трансформации, который в значительной степени контролируется клеточными факторами. Проблема идентификации генов, вовлеченных в процесс трансформации и опухолевой прогрессии является одной из наиболее важных. Результаты многолетних исследований позволяют разделить обнаруженные гены на несколько групп. К ним относятся протоонкогены (клеточные онкогены), гены супрессоры опухолевого роста и гены стабилизации ДНК, к которым относятся гены теломеразного комплекса и системы репарации ДНК (Киселев В.И., 1998).

Функционирование вирусных онкобелков вызывает дестабилизацию хромосом, что может быть причиной инактивации генов-супрессоров опухолевого роста. Гены-супрессоры инактивируются при нарушениях структуры обоих аллелей гена, что обычно происходит при сочетании делеции одного аллеля и мутации другого (теория Knudson 1971). Поиск потенциальных генов-супрессоров заключается в обнаружении хромосомных локусов с высокой частотой генетических нарушений цитогенетическими и молекулярно-биологическими методами. В образцах рака шейки матки такие локусы обнаружены на хромосомах 3, 4, 5, 6, 11, 18 в большом проценте случаев [75; 76; 78 74]. Наиболее ранние нарушения отмечены на хромосомах 3p, 6p, 11 уже в дисплазиях, тогда как генетические изменения на 6q, 11q и 18 ассоциированы с прогрессией опухоли и образованием метастазов. К генам, нарушение которых приводит к канцерогенезу, можно отнести и гены, ответственные за иммунный ответ. Более чем в 50% опухолей имеются аллельные делеции в районе 6p21.3, в котором располагаются гены HLA [74, 77, 58]. Более того, еще 20% опухолей содержат мутации в этой области хромосомы 6, причем генетические нарушения на 6p21.3 в CIN и раке шейки матки коррелируют с нарушением экспрессии HLA-A/B антигенов I класса (Koorman et al., 2000). Нарушение экспрессии генов главного комплекса

гистосовместимости позволяет неопластическим клеткам ускользать от узнавания их цитотоксическими лимфоцитами и НК – клетками. В этой же области расположены гены HLA III класса, среди них гены лимфотоксинов и в частности TNF- α , который поврежден более, чем в 50% дисплазий и рака шейки матки.

Применение анализа потери гетерозиготности (определение делеции одного аллеля) является одним из наиболее распространенных молекулярно-биологических тестов выявления инактивированных или неизвестных генов супрессоров. В 2001-2005гг. появились работы по использованию анализа потери гетерозиготности (LOH) в помощь цитологическим исследованиям для молекулярного прогноза прогрессии дисплазии. Сравнение результатов анализа LOH определенных генетических маркеров в дисплазиях и РШМ ранних стадий, а также в сопутствующих дисплазиях может определить молекулярные маркеры прогрессии. Согласно Chang et al., 2001 [79] потеря одного-двух маркеров из панели четырех маркеров на 3p и одного на 6p (D6S291) может рассматриваться как прогностический признак. В работе Сидранского и др. [Rha et al., 2001] выбраны два из девяти маркеров на пяти хромосомах для анализа LOH, которые позволяют предсказать поведение CIN: D6S265 (локус 6p21.3 в области генов HLA класса I) и D11S488 на 11q. Другие авторы отвергают маркер D6S265 и предлагают маркеры на 3p и 11q, в частности маркер D3S1300, расположенный в интроне гена FHT, нарушения которого, однако, не относятся к ранним событиям РШМ [80]. Несмотря на то, что были предложены алгоритмы, позволяющие по результатам анализа LOH двух из четырех маркеров предсказать прогрессию 47% CIN со 100% специфичностью, этот метод является достаточно сложным и не нашел активного применения в клинике.

Последние достижения молекулярной биологии позволили создать трудоемкие и дорогостоящие методы анализа тысяч генов с использованием микрочипов и микроаррээв. Первый такой анализ рака шейки матки проведен с применением нуклеиновых кислот, полученных с помощью лазерной

микродиссекции из клеток нормального эпителия, стромы, дисплазий всех этапов прогрессии и рака с поправками на возраст и расу американских пациенток [115]. Полученные данные позволяют выделить три этапа в прогрессии рака шейки матки. Первый переход к CIN I связан с ответом цервикального эпителия на вирусную инфекцию и включает изменение экспрессии генов, отвечающих за пролиферацию и подавление иммунитета (иммуносупрессию). Второй переход к CIN II заключается в изменении экспрессии генов, связанных с ангиогенезом, и предполагает кооперативный обмен сигналами между стромой и опухолевыми клетками. Наконец, третий переход к CIN III и плоскоклеточному раку состоит в изменении экспрессии генов, связанных с инвазией клеток эпителиальной опухоли.

Всеобъемлющий анализ и глобальный результат таких исследований дает понимание и позволяет проникнуть вглубь процесса канцерогенеза. Наряду с этим, они открывают направления для практического применения полученных данных для дальнейшего улучшения диагностики и прогноза. Однако, молекулярные методы диагностики дороги и сложны в применении, требуют значительных временных затрат, поэтому пока не нашли своё место среди рутинных методов, используемых в клинической практике

Важно отметить, что техническая простота и быстрота исполнения являются определяющими для тестов подобного рода и поэтому сегодня абсолютное преимущество для определения степени прогрессии любого рака имеют иммуногистохимические методы.

Иммуногистохимия - метод окраски биологического материала в условиях сохранения морфологии клеток, позволяющий определить локализацию искомого антигена в различных тканях, типах клеток, клеточных структурах с помощью специфических антител и чувствительных систем детекции. Эта методика позволяет визуализировать наличие или отсутствие экспрессии искомого антигена, уточнить его локализацию, получить информацию об уровне экспрессии и сравнить уровень экспрессии

искомого антигена в нормальных и неопластических клетках на разных стадиях канцерогенеза.

1.4.3. Механизмы злокачественной трансформации при инфицировании ВПЧ.

Исследования в области молекулярной биологии и вирусологии в 70-х годах прошлого столетия, направленные на изучение патогенности вируса Рауса для млекопитающих, привели к открытию определенных последовательностей нуклеотидов онковирусов, которые получили название **онкогены** или **трансформирующие гены** (v-onc) [122,206,273,331]. Это событие внесло фундаментальный вклад, во-первых, в открытие и понимание молекулярных механизмов опухолевой трансформации, а значит и синтеза современной концепции биологии рака, и, во-вторых, в определение этиологии некоторых злокачественных опухолей человека.

Таблица 1.

Вирусные и клеточные белки.*

ДНК-содержащие Вирусы	Вирусные онкопротеины	Инактивируемые клеточные протеины
SV-40	T-антиген t-антиген	p53; pRB PP2A
ВПЧ	E6 E7	p53 pRB
Аденовирус	E1A E1B-55K	pRB p53
Аденовирус 9	E4ORF1	DLG, MAGI-1, MUPP1
Вирус Эпштейн-Барр	LMP1	TRAFs
Вирус гепатита В	HBx (?)	P53, DDB1
Полиомавирус	Большой T-антиген Средний T-антиген Малый t-антиген	pRB c-Src, PI3-K, PLC- γ , Shc PP2A

* J.S. Butel [149]

ДНК-содержащие вирусы, к числу которых относятся полиомавирусы, папилломавирусы, аденовирусы, в отличие от РНК-содержащих вирусов, реализуют канцерогенный эффект преимущественно посредством инактивации вирус-специфическими онкопротеинами функциональных свойств другой группы онкогенов - **генов-супрессоров** или **антионкогенов** (таб.1) [57,136,149,224,292,329].

Основным геном-супрессором, обладающим решающей ролью в запуске программы апоптоза, является **ген p53**, располагающийся в геноме человека на коротком плече хромосомы 17. Его продуктом является ядерный белок p53 с молекулярной массой 53 кД [252]. Обеспечивая постоянный контроль клеточного цикла, процессов регуляции нормальной пролиферации, синтеза и репарации структуры ДНК и программированной клеточной гибели, белок p53 поддерживает ее генетический гомеостаз [257,258,282,298,357,321].

В нормальной клетке при повреждении ДНК происходит активация гена p53, закономерно приводящая либо к гиперэкспрессии гена p21, который блокирует клеточный цикл в пресинтетическом периоде (фаза G1), либо к стимуляции гена bax и апоптозу. Таким образом, восстановление поврежденного участка ДНК и программированная клеточная смерть предотвращает появление мутированных клеток. Процесс злокачественной трансформации характеризуется утратой основных функций гена p53, которая может происходить как в результате спонтанной или индуцированной мутации, так и путем связывания с ним вирусного онкопротеина [29].

Вирус – опосредованный механизм деградации p53 достаточно четко представлен на модели рака шейки матки. Так в исследованиях *in vitro* доказано, что интеграция вирусной ДНК в клеточной геном хозяина ведет к суперэкспрессии гена E6 ВПЧ высокого онкологического риска, продукт которого – онкобелок E6, взаимодействуя с супрессорным белком p53 приводят к ингибированию последнего (рис. 5) [252,324.349].

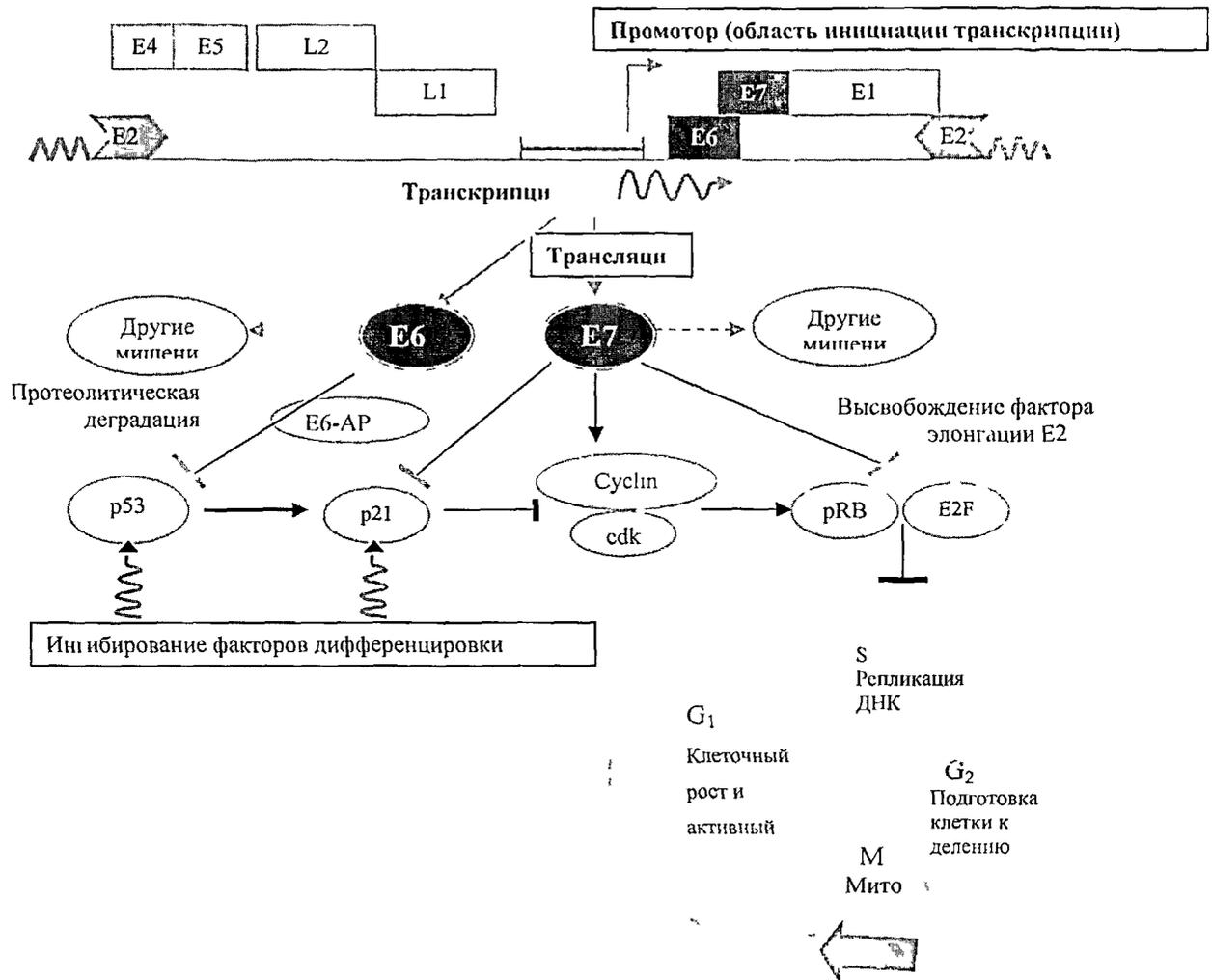


Рис. 5. Механизм опухолевой трансформации клеток, инфицированных ВПЧ «высокого риска» (Phelps W.C., 1999)[306].

Данные литературы, свидетельствующие о выключении функции ядерного протеина p53, вызванном связыванием со специфическими белками ВПЧ при ЗЭОЯ, носят эпизодический характер. Значительный научный и практический интерес приносят результаты исследования Q-J Wu и соавт. [362], согласно которым экспрессия онкобелка E6 ВПЧ 16 серотипа (E6 ВПЧ-16) при ЗЭОЯ составила 52% случаев. При этом в образцах тканей серозного РЯ E6 ВПЧ-16 был определен в 62.5% наблюдений, а при муцинозных цистаденокарциномах – 47.4%. Необходимо отметить, что экспрессия гена p53, зарегистрированная в 42% случаев, не коррелировала с детекцией E6 ВПЧ-16 в тканях эпителиальных опухолей яичников [362]. Результаты вышеизложенного исследования можно интерпретировать двояко. Во-

первых, предполагая общность механизмов трансформации клеточного роста среди ВПЧ-ассоциированных неоплазий различной локализации, некоторые авторы не исключают возможность взаимосвязи ПВИ высокого онкологического риска с мутацией гена p53 [213,214]. И, во-вторых, данных за категоричное исключение механизма утраты функциональных способностей p53 посредством связывания его со специфическими вирусными онкопротеинами недостаточно для формирования окончательных выводов по этой проблеме.

Более того, в человеческой популяции ген p53 полиморфен по 72-й аминокислоте, где кодирует пролиновый или аргининовый остаток. Известно, что риск развития ВПЧ-зависимых неопластических процессов шейки матки, ротовой полости и кожи ассоциируется с «аргининовой» формой гена p53, которая является более восприимчивой к деградации онкопротеином E6 ВПЧ 16 и 18 серотипов, нежели «пролиновая» форма [235,296,228].

Так же, онкобелок E7 поддерживает репликацию вируса в дифференцирующихся клетках, задерживая их терминальную дифференцировку, что блокирует экспрессию генов, контролирующих клеточное деление. Таким образом, онкопротеин E7 ВПЧ способен стимулировать неконтролируемый синтез ДНК.

И, наконец, онкопротеин E7 подавляет индукцию генов, отвечающих активацией экспрессии под влиянием эндогенного интерферона. Это свидетельствует о наличии своеобразного механизма «ускользания» ВПЧ от воздействия интерферона [234].

Вирусная инфекция инициирует опухолевый процесс, но является недостаточной для его прогрессии. HPV является основным фактором канцерогенеза на ранних стадиях, определяющим последующие генетические процессы с формированием моноклональной популяции опухолевых клеток.

Вовлеченность различных составляющих многоэтапного процесса прогресса рака (на примере рака шейки матки) представлена на рисунке.

Среди этих факторов наибольшее значение имеют эстрогены и различные мутагены, влияющие на активность персистирующей ДНК HPV с модификацией других клеточных генов и индукцией геномной нестабильности. В постменопаузе возникает тот эстрогенный комплекс, который облегчает реализацию канцерогенного эффекта вирусов папилломы.

Таким образом, вирусный канцерогенез можно условно разделить на несколько этапов:

1. Первичное инфицирование вирусом.
2. Персистенции генома вируса папиллом в эписомальной форме и возможность продукции вирусных частиц с последующей вторичной инфекцией.
3. Интеграция вирусной ДНК в клеточный геном без видимой специфичности сайта интеграции; на этапах 2, 3 начинают проявляться функции E6 и E7, нарушающих контроль деления клетки.
4. Индукция мутаций в клеточной ДНК, вызывающая нестабильность клеточного генома.
5. Селекция клона клеток с мутантной ДНК, содержащих интегрированную ДНК вирусов папилломы.
6. Активное размножение данного клона клеток и рост опухоли.

В рамках вирусного канцерогенеза наиболее значим 3 этап

В злокачественных опухолях вирусный геном персистирует в интегрированной форме, причем разрыв в вирусном геноме, который необходим для встраивания в клеточный, происходит в рамках E1-E2. Таким образом, в трансформированных клетках гены E6 и E7 остаются интактными. Еще раз упомянем, что интеграция ДНК ВПЧ в геном клеток сопровождается двумя молекулярными событиями:

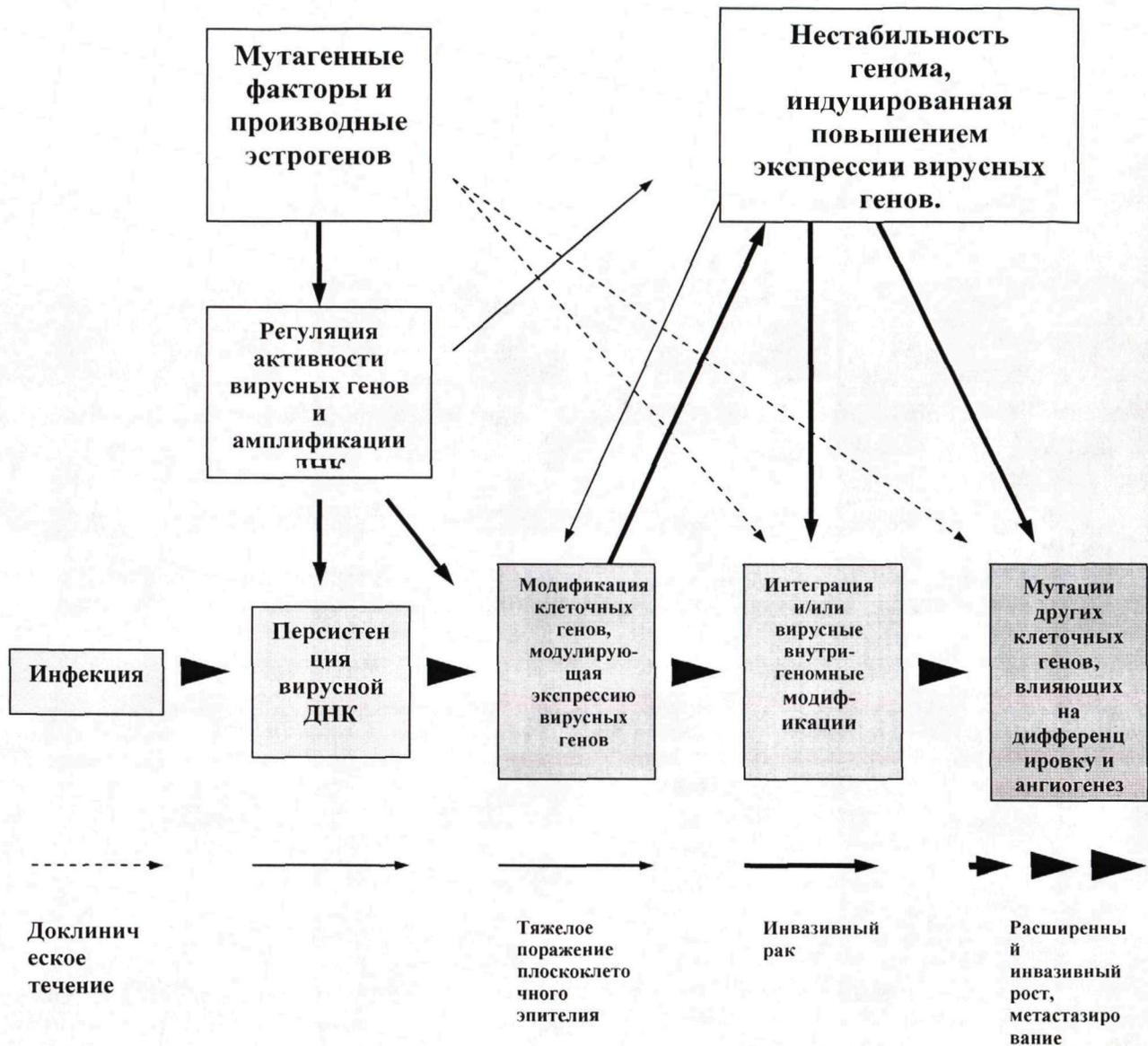


Рис. 6 . Прогрессия опухоли шейки матки (zur Hausen, 2002).

1. Встраивание вирусной ДНК в хромосому всегда сопровождается нарушением структуры гена E2, который является репрессором E7.
2. При интеграции ДНК-вируса синтез белка E2 прекращается вследствие нарушения структуры соответствующего гена и активируется синтез белка E7.

То есть, факт интеграции вирусной ДНК может быть зарегистрирован или изучением структуры гена E2 (эти методы в стадии разработок) или измерением уровня синтеза онкобелка E7. Из этого следует, что наличие

онкобелка E7 в пробах из опухоли может рассматриваться как однозначное свидетельство вирус-ассоциированного процесса. Неоспоримым достоинством E7 как маркера, является то, что в норме этот белок в тканях не синтезируется. Его происхождение полностью связано с жизненным циклом интегративной формы ВПЧ-инфекции [131,276,291,300,347,360].

Таким образом, измерение уровня онкобелка E7 позволяет уточнить характер вирусной инфекции, ее обратимость и потенциальную возможность злокачественной трансформации в случае интеграции ВПЧ в клеточный геном.

1.4.4 Генетические маркёры в роли развития цервикальных интраэпителиальных неоплазий шейки матки

Для оценки прогрессии предрака и рака шейки матки предлагают использовать различные маркеры. Среди них P16^{ink4a}, Ki-67 и другие.

- P16^{ink4a} — клеточный протеин, участвующий в регуляции клеточного цикла. В нормальных эпителиальных клетках шейки матки протеин P16^{ink4a} экспрессируется в очень малом количестве и иммуногистохимическими методами не выявляется. Нарушение регуляции P16^{ink4a}, вероятно, связано с угнетением функции белка — супрессора опухолевого роста pRb в результате формирования инактивирующих комплексов с онкопротеином E-7 (E-7/pRb). Поэтому P16^{ink4a} может рассматриваться как непрямой маркер активной онкогенной экспрессии ВПЧ высокого онкологического риска.

- Ki-67 является одним из наиболее часто исследуемых маркеров пролиферации, антитела к которому используются для оценки прогрессии различных типов неоплазий. Ki-67 — крупный негистоновый белок (359 кДа), который присутствует в ядрах клеток на всех стадиях жизненного цикла за исключением G0 и начальной стадии G1. После выхода клетки из митоза Ki-67 не выявляется, он также отсутствует во время репарации ДНК, поэтому является оптимальным маркером пролиферации. Предполагают, что Ki-67 — полифункциональный белок, взаимодействующий с большим количеством различных внутриклеточных белков, что регулируется его

фосфорилированием. Он участвует в ремоделировании хромосом, ядрышка, в организации микротрубочек митотического веретена, в прикреплении хромосом к внутренней поверхности оболочки ядра по завершении клеткой митоза. Несмотря на то, что детально его функции не известны, Ki-67 активно используют для оценки пролиферативной активности новообразований. С получением моноклональных антител к различным эпитопам молекулы, стало возможно использовать для анализа не только криостатные, но и парафиновые срезы. Существует несколько систем оценки Ki-67. Индекс пролиферативной активности Ki-67 рассчитывают по отношению числа опухолевых Ki-67-позитивных клеток к общему их числу (в %). Обнаружена связь между индексом Ki-67 и степенью гистологической дифференцировки опухоли и клиническим прогнозом при раке эндометрия, яичника, легкого, мочевого пузыря, опухолях нервной системы. Индекс Ki-67 является независимым показателем при прогнозировании рецидивов и длительности жизни у больных раком молочной и предстательной железы.

С 1996г. появились работы по исследованию Ki-67 в раке шейки матки [59, 65], а с 2001 - в дисплазиях шейки матки [61,62,63 64]. В норме экспрессия Ki-67 выявляется в клетках, расположенных базально или парабазально, при прогрессии дисплазии увеличивается количество клеток с Ki-67 положительными ядрами в различных слоях эпителия. Индекс Ki-67 нарастает с прогрессией дисплазий - 25%, 68% и 65.5% в LSIL, HSIL и РШМ, соответственно [59].

Для оценки пролиферативной активности в дисплазиях предложена специальная схема, учитывающая окраску ядер клеток одной, двух и трех третей толщины эпителия, что соответствует степени тяжести дисплазии. Рассчитывают стратификационный индекс –Si 90, количество клеток с окрашенными ядрами в центральном среднем слое эпителия. Менее 30% окрашенных ядер в среднем слое является показателем низкого риска, тогда как выше 30% - показатель высокого риска прогрессии CIN. При оценке прогноза женщин с CIN I и CINII при анализе Ki-67, авторы нашли, что ни у

одной из женщин из группы с низким риском (< 30% ядер окрашено на Ki-67) не отмечено прогрессирование, тогда как из группы с большим риском (>30% окрашенных ядер) у 30% из 50 женщин CIN I и CIN II прогрессировали в CIN III (8% CIN I и CIN II 20%) за три года [64]. Считают, что Ki-67 независимый маркер прогрессии рака шейки матки [116] и сегодня Ki-67 часто исследуется в сочетании с другими маркерами. Несмотря на широкое использование, неоднозначность полученных результатов придает актуальность разработке данной темы.

Исследование молекулярных механизмов пролиферативных (гиперпластических) и поиск путей их фармакологической коррекции— одна из самых динамично развивающихся областей современной молекулярной медицины. Понимание базисных основ индукции клеточного роста, особенно в условиях опухолевой трансформации клеток, является неотъемлемой частью научного понимания процессов пролиферативной активности. В настоящее время подробно изучены ключевые механизмы активации сигнальных путей, стимулирующих клетки к патологической пролиферации.

Опухолевая клетка имеет свой спектр белков, отличный от такового у нормальной клетки. Благодаря этому обстоятельству у опухолевой клетки имеется множество возможностей сохранить пролиферативный потенциал за счет взаимной подстройки сигнальных каскадов. Можно сказать, что опухоль характеризуется четко организованными нарушениями, направленными на поддержание активного клеточного деления. Особенность трансформированных клеток состоит в том, что большинство сигналов, поступающих извне, они воспринимают как стимул к пролиферации.

Существуют три основных канала, по которым в клетку поступают сигналы, побуждающие ее к активному делению. В активацию одного из пролиферативных путей вовлечены цитокины. Это могут быть как провоспалительные цитокины – интерлекин-1 или фактор некроза опухолей (IL-1, TNF- α), так и другие белки, относящиеся к разным подсемействам [60].

При этом финальным цитоплазматическим проводником является ядерный фактор транскрипции NF- κ B. Он проникает в ядро клетки включает работу генов, необходимых клетке для выживания. Это один из основных антиапоптотических факторов, вовлеченных в развитие воспаления, пролиферации и, в конечном счете, опухолевого роста.

Другой пролиферативный путь связан с ростовыми факторами, которые вовлекают в процессы клеточного деления онкогены и факторы, стимулирующие образование сосудов, необходимых для активного роста опухолей. К числу наиболее сильных стимуляторов клеточного деления относятся эпидермальный фактор роста и фибробластический фактор роста [184].

Третий возможный путь стимуляции клеточного деления реализуется через гормон-зависимые каналы. Для всех гиперпластических процессов очевидно сильнейшее влияние стероидных гормонов. Так, в женской репродуктивной системе наиболее значимыми являются эстрогены (E) – эстрон (E1), эстрадиол (E2), эстриол (E3). Эстрогенные рецепторы в клетках мишенях эстрогенов представлены двумя типами – альфа (ER α) и бета (ER β). По сравнению с ER α , рецептор ER β не обладает способностью генерировать ростовые стимулы, и в опухолевых клетках его не так много. Зато взаимодействие «ER α -E» обеспечивает клетке мощнейший стимул для выживания, обусловленный стимуляцией транскрипцией генов – NF- κ B, VEGF, EGF, CYP 1B1, протоонкогенов, других необходимых факторов выживания в условиях опухолевого метаболизма.

Эстрогенные рецепторы функционируют как активаторы транскрипции, проникая через ядерную мембрану и взаимодействуя с так называемыми ERE - элементами (estrogen-response elements) – участками ДНК, выполняющими функции промотора. Попав в ядро этот комплекс стимулирует экспрессию так называемых эстроген-зависимых генов (EGFR, CDK, KGF, VEGFR, IGF) и множество других белков.

BCL-2 - онкоген, участвующий в процессе возникновения злокачественного новообразования в связи с тем, что он подавляет апоптоз. Он принадлежит к большому семейству генов, продукты которых обладают антиапоптотическим (например, BCL-2, BCL-XL), так и проапоптотическим действием (Bax, Bad и др.) Кодированные этими генами полипептиды могут образовывать гомо—и гетеродимеры, сочетания членов которых определяют их влияние на апоптоз. Белок BCL-2 способен тормозить апоптоз, вызываемый p53 в ответ на генотоксические воздействия.

В последние годы существенное внимание исследователей различных областей, в первую очередь молекулярных биологов, привлекала теломерная теория. Генетики называют теломерами концевые участки хромосом, видимые в световом микроскопе. Молекулярные биологи имеют дело со значительно меньшим концевым районом хромосомы, перекрывающим тысячи нуклетидных пар и имеющую на конце многократно повторяющуюся монотонную последовательность (теломерный повтор). Эти участки синтезирует специальный фермент – теломераза (теломераза), имеющая постоянно ассоциированную с ней РНК-матрицу. Теломераза является рибонуклеиновым ферментом, который способен не только поддерживать размер теломерного повтора, но и синтезировать теломеры *de novo*. Основная функция теломеразы заключается в активации концевых сегментов хромосом, в большинстве клеток энзим полностью инактивирован, однако при онкологических заболеваниях он вновь начинает действовать вызывая неконтролируемое размножение клеток злокачественных опухолей. Наличие теломеразной активности может являться важным диагностическим признаком. (Егоров Е.Е. 2001г., Griffith J.D. 1999г.) Около 85% опухолей человека обладают теломеразной активностью, в связи с этим можно утверждать, что реактивация теломеразы участвует в онкогенезе. Увеличение надежности репрессии теломеразы должно резко уменьшать вероятность развития опухоли. Можно предполагать, что особенности регуляции теломеразы у человека связаны с тем, что репрессия теломеразы является

защитой от опухоли. Огромные усилия, потраченные на изучение теломеразной активности как раннего маркера опухолей, свидетельствуют, что теломеразная активность не может являться самостоятельным признаком для диагностики ранних стадий канцерогенеза, доказано, что с большей долей вероятности можно говорить о теломеразе как об универсальном диагностическом маркере и, что особенно важно, как о маркере ранних стадий злокачественного опухолевого процесса.

Многие аспекты раннего этапа канцерогенеза шейки матки достаточно хорошо изучены. Это одна из немногих локализаций, где четко обозначен этиологический фактор (вирус папилломы человека), достаточно хорошо изучен первый каскад молекулярно генетических процессов (белок E6, E7, теломеразная активность).

Все эти достижения позволяют наряду с цитологическим скринингом реализовать и молекулярно-биологические тесты, указывающие на канцерогенную направленность при различных вариантах дисплазии шейки матки. Этот аспект проблемы немало важен, так дает возможность уже сегодня дифференцировать лечебные мероприятия в рамках предрака шейки матки.

В заключении обзора литературных источников следует отметить, что «открытых» вопросов в проблеме этиопатогенеза гинекологического рака остается много. До настоящего времени нет прямых достаточных сведений, о роли онкобелка E7, теломеразы, генов пролиферации (Ki 67, CCNB1) и апоптоза (BCL2, BAX, BAG) в онкогенезе рака шейки матки.

Поэтому, несомненный интерес представляет изучение влияния молекулярно-биологических маркеров на процесс неопластических трансформации тканей для формирования новых подходов к профилактике и лечению, что и явилось целью данной работы.

ГЛАВА 2. КЛИНИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БОЛЬНЫХ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Характеристика клинического материала

Исследование основано на клинико-морфологическом и молекулярно-биологическом обследовании 16 пациенток с гистологически подтвержденным плоскоклеточным раком шейки матки, средний возраст лет $41,1 \pm 9,6$, 40 пациенток с гистологически подтвержденным диагнозом цервикальной интраэпителиальной неоплазии различной степени (CIN 1, CIN2, CIN 3 (плоскоклеточный рак *in situ*) средний возраст $37,5 \pm 10,5$ лет, находившихся на лечении в ФГУ РНЦРР в период с 2006-2010 год. Контрольную группу составили 20 женщин с морфологически неизменным эпителием шейки матки, средний возраст составил $38 \pm 12,4$.

Комплексное обследование женщин проводилось на основании специально разработанной схемы, включавшей следующие пункты:

1. Сбор и анализ жалоб.
2. Анамнестические данные.
3. Перенесенные заболевания.
4. Генеративная функция.
5. Перенесенные гинекологические заболевания.
6. Гинекологический осмотр (состояние слизистой влагалища, осмотр шейки матки, исследование тела матки (размеры, отклонение, подвижность, болезненность), состояние придатков матки, исследование мазка с шейки матки и цервикального канала на онкоцитологию).
7. Исследование мазков с шейки матки на онкоцитологию и ПЦР-диагностику.
8. Кольпоскопия.
9. Сонография органов малого таза.
10. Морфологическое исследование ткани шейки матки.

11. Иммуногистохимическое исследование эстрогеновых рецепторов в ткани шейки матки.
12. ПЦР-диагностика ткани шейки матки.
13. Определение уровня экспрессии генов (мРНК) эстрогеновых рецепторов (ESR) методом проведения полимеразной цепной реакции в «режиме реального времени» с предварительной реакцией обратной транскрипции (ОТ-ПЦР).

2.2 Основные методы обследования.

При гинекологическом осмотре у пациенток с цервикальными интраэпителиальными неоплазиями выявлялись визуальные изменения в виде гиперкератоза, атрофии, при окраски шейки матки раствором Люголя отмечались белесоватые участки, что служило «ориентиром» при проведении биопсии шейки матки.

2.3 Методики ультразвукового исследования

Ультразвуковое исследование проводилось на ультразвуковом сканере «Voluson – 530 МТ» фирмы Kretztechnik. Изучались возможности новых режимов сканирования, таких как трехмерная эхография, различные доплерографические методики и трехмерная ультразвуковая ангиография.

При проведении ультразвукового исследования нами был применен комплекс следующих методик:

1. Двухмерная эхография в В-режиме
2. Трехмерная эхография в В-режиме.
3. Цветовое доплеровское картирование.
4. Энергетическое картирование
5. Спектральная доплерография
6. Трехмерная ультразвуковая ангиография

Ультразвуковое исследование осуществлялось с помощью мультисекторных, широкополосных датчиков, с возможностью сбора объемной информации в автоматическом режиме. Для трансабдоминального исследования использовался датчик S – VAWA – 7, с частотой 3.5 – 5 МГц.

Для трансвагинального исследования использовался внутрисполостной датчик S – VDV – 8 В, с частотой – 8.5 МГц.

Ультразвуковые изображения архивировались на жестком диске рабочей станции ультразвукового сканера, магнитно-оптических дисках, флоппи дисках, видеопленке и термобумаге. Фиксирование объемной информации на жестком диске аппарата или магнитно-оптических дисках обеспечивало многократный ретроспективный анализ полученных данных.

а) Ультразвуковое исследование в двухмерном В-режиме.

На первом этапе комплексного ультразвукового исследования всем пациенткам проводилось трансабдоминальное сканирование. Процедура выполнялась в положении лежа на спине и при адекватно наполненном мочевом пузыре. Подготовка больных заключалась в приеме жидкости в количестве около 1 литра за 1 – 1.5 часа до исследования.

Затем, после опорожнения мочевого пузыря, выполнялось трансвагинальное сканирование. Для этого использовался специальный полостной датчик, на сканирующую поверхность которого наносился гель; сверху надевался презерватив. Исследование проводилось в положении лежа на спине. Датчик вводился во влагалище до упора в его передний свод. Вращая датчик, вокруг своей оси и изменяя плоскость наклона, получались продольные, поперечные и косые срезы органов малого таза.

При этом оценивались взаиморасположение органов малого таза; состояние мочевого пузыря; положение, общие размеры (длина, передне-задний, ширина), форма, контуры и внутренняя эхоструктура тела и шейки матки; переднее - задний размер, контуры и эхографическая структура срединных маточных структур (М-эхо). При исследовании яичников оценивались расположение, общие размеры, форма и особенности внутреннего строения.

При исследовании новообразований органов малого таза оценивались: происхождение, локализация, размеры, форма, контуры, границы, эхогенность и внутренне строение.

Для полноценной оценки степени распространенности опухолевого процесса производилась эхография регионарных лимфатических узлов.

б) Ультразвуковое исследование в трехмерном В-режиме.

Благодаря современным компьютерным технологиям, в основе методики трехмерной эхографии лежит возможность получать информацию об обследуемом органе в объемном виде с последующей, в различных своих вариантах, трехмерной реконструкцией данного объема.

Для получения объемного изображения исследуемого объекта первоначально, в двухмерном В-режиме, выбиралась «зона интереса», затем устанавливались угол В-изображения (от 20 до 130 градусов), угол поворота В-изображения вокруг оси датчика (от 8 до 90 градусов), глубина и скорость сканирования. Таким образом, объем сканирования представлял собой усеченную пирамиду. Время сбора объемной информации зависело от угла, глубины и скорости сканирования и находилось в диапазоне от 3 до 6 секунд. В процессе сбора информации на экране монитора формировалось изображение интересующей области одновременно в трех взаимно перпендикулярных плоскостях, прямые сечения которых представляли собой оси в системе координат – продольную, поперечную и горизонтальную, также изображение эталонной плоскости, указывающей положение объемного тела по отношению к плоскости экрана на момент исследования.

При изучении полученного массива данных использовались различные режимы трехмерной реконструкции. Режим ротации (вращение объекта вокруг своей оси) и режим трансляции (перемещение центра вращения вдоль прямых сечений). Режим поверхностной реконструкции изображения, позволяющий получать объемное (трехмерное) изображение внутренней поверхности исследуемого объекта.

Для более точного расчета объема эндометрия использовалась специальная трехмерная программа VOCAL. При использовании данной программы, после сбора объемной информации об изучаемом объекте, «зона интереса» (эндометрий) обводился в ручном режиме по контуру курсором, с

полным поворотом изображения вокруг своей оси (360 градусов), поворотным шагом в 6 градусов. В результате на экране появлялась волюметрическая модель полости матки с автоматически подсчитанным объемом.

в) Ультразвуковое исследование в режиме цветового доплеровского и энергетического картирования.

Для изучения состояния гемодинамики внутренних половых органов и внутриопухолевого кровотока использовалась методика ультразвуковой ангиографии. Визуализация сосудов проводилась с помощью цветового доплеровского и энергетического картирования, что позволяло быстро определить локализацию сосуда. Для этого, после выбора интересующей области в В-режиме, в нее помещали зону цветового картирования – «цветовое окно», представляющее собой усеченный сектор круга. Затем, для оптимизации качества цветового изображения, размеры «окна» устанавливали тем меньше, чем более мелкий сосуд необходимо было исследовать. Мощность настраивалась на максимальном уровне для лучшей визуализации мелких сосудов, а затем уменьшалась до исчезновения артефактов. Частота повторения импульсов настраивалась на минимальные значения кровотока. При ЦДК определялось направление движения тока крови в сосудах. Красный цвет отображал движение «к датчику» (положительный доплеровский сдвиг частот), а синий – «от датчика» (отрицательный сдвиг). Яркость цвета была пропорциональна скорости кровотока в сосуде. При этом более светлые тона свидетельствовали о более высокой скорости кровотока, а более темные – о низкой скорости кровотока.

Исследование в режиме энергетического картирования позволяло получать угол независимые изображения сосудистых структур, то есть визуализировались практически все сосуды независимо от доплеровского угла, направления и скорости кровотока. При использовании этого режима цветовая шкала была монохромной.

При сканировании в продольной плоскости маточная артерия визуализировалась в области перехода шейки матки в тело – перешейка матки. Выше этого уровня определялась восходящая ветвь маточной артерии (кровооснабжающая тело матки), а ниже нисходящая ветви маточной артерии (кровооснабжающая шейку матки). Для выявления более мелких сосудов «цветовое окно» устанавливалось на соответствующую область.

При изучении внутриопухолевого кровотока оценивалась степень васкуляризации, расположение, равномерность и плотность распределения сосудов.

г) Ультразвуковое исследование в режиме трехмерной ангиографии.

Режим трехмерной ангиографии (3D ангиография) использовался для получения пространственной картины внутриопухолевого сосудистого рисунка. 3D-ангиограмма создавалась с помощью трехмерной реконструкции множества полученных срезов в режиме цветового доплеровского или энергетического картирования.

Исследование начиналось с выбора интересующего участка в двухмерном В-режиме. Затем включался либо режим цветового доплеровского картирования, либо режим энергетического картирования и «цветовое окно» помещалось на интересующую область. Далее, в режиме объемного сканирования выбиралась скорость и дуга сканирования, и производилась локация объема в автоматическом режиме. Полученное объемное изображение обрабатывалось в режиме поверхностной реконструкции. После создания объемной картины внутриопухолевого сосудистого рисунка проводилась качественная оценка васкуляризации: оценивались равномерность распределения сосудов в структуре образования, их форма, диаметр и характер хода.

д) Спектральная доплерография.

Спектральная оценка кровотока в сосудах матки и яичников, а также в опухолевых сосудах осуществлялась с помощью импульсного доплеровского режима. Для этого в исследуемый сосуд помещалась метка контрольного

объема, и под визуальным контролем регулировался угол падения ультразвукового луча. Затем, в триплексном режиме сканирования, сочетающим в себе одновременно изображение в В-режиме, цветовом и импульсном доплеровском режимах, получались изображения доплеровского сдвига частот. После компьютерной обработки доплеровский сдвиг частот отображался в виде кривой скоростей кровотока. В интересующей области получали не менее трех кривых скоростей, из которых для расчета доплерометрических индексов использовали ту, которая имела наибольшую скорость и наиболее низкие значения индексов.

При анализе кривых скоростей кровотока определяли следующие показатели:

1. МСС (V_{max}) – максимальная систолическая скорость кровотока, отражающая наибольшую скорость в точке локации.
2. КДС (V_{min}) – максимальная конечная диастолическая скорость кровотока, отражающая наибольшую скорость в конце диастолы.
3. МВС – максимальная скорость внутриопухолевого венозного кровотока.
4. ИР (Resistive index, Pourcelot) - индекс периферического сопротивления – отношение разности максимальной систолической и максимальной конечной диастолической скоростей кровотока к максимальной систолической скорости.

$$ИР = (МСС - КДС) / МСС.$$

При исследовании внутриопухолевого кровотока определялись три, различных по своим доплерометрическим показателям, типа цветовых локусов: с наибольшим значением МСС и ИР; с минимальным значением ИР и с наибольшей скоростью венозного кровотока.

е) Определение информативности данных ультразвукового исследования.

Для оценки диагностической значимости методик ультразвукового исследования использовались показатели непараметрического метода определения диагностической точности, чувствительности, специфичности. Показатели определяли на основании сравнения ультразвукового заключения с результатами патоморфологического исследования биопсийного и

удаленного во время операции материала. Статистическая обработка полученных данных проводилась с помощью программы «Биостатистика».

2.4. ПЦР - диагностика ткани шейки матки.

Для обнаружения вирусов и бактерий в образцах опухолевой и нормальной тканей в настоящей работе применяли метод полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Метод ПЦР или специфической амплификации ДНК предложен в 1983 году американским исследователем Карри Муллисом, который в 1993 году был удостоен за это изобретение Нобелевской премии. Этот метод позволяет избирательно синтезировать *in vitro* относительно небольшие участки ДНК. Необходимым условием для проведения ПЦР является информация о нуклеотидной последовательности амплифицируемой области ДНК.

Выбор такого участка ДНК осуществляется путем гибридизации матричной ДНК с двумя искусственно синтезированными праймерами. Праймеры – это короткие, длиной 15-30 нуклеотидных пар оснований, олигонуклеотидные последовательности ДНК, комплиментарные 3' - концам амплифицируемого участка на смысловой и антисмысловой нитях ДНК. Благодаря праймерам ограничивается фрагмент ДНК, который будет скопирован несколько миллионов раз. В качестве матрицы для синтеза может быть использован любой тип ДНК, например, ДНК, выделенная из культуры клеток, бактериальных клонов и т.д. Для обеспечения синтеза ДНК необходимо присутствие термофильной ДНК-полимеразы – фермента, который был выделен из бактерий, живущих в горячих источниках, и потому устойчив к действию высоких температур.

Один цикл ПЦР включает несколько этапов с различными температурными режимами.

На первом этапе (денатурация) при температуре 95-98°C двунитевая ДНК переводится в однонитевую. На следующем этапе за счет понижения температур реакционной смеси до 30-50°C происходит присоединение праймеров к комплиментарной последовательности на ДНК-матрицы. При

температуре, оптимальной для работы ДНК-полимеразы, 60-70°C, протекает синтез ДНК путем достраивания цепей, образованных праймерами. При дальнейшем нагревании реакционной смеси до 80-90°C синтез ДНК прекращается, и двунитевый участок между матричной и вновь синтезированной молекулой ДНК денатурируется. За один цикл происходит двукратное увеличение числа синтезированных копий участка ДНК, выбранного для амплификации. За 25-30 циклов число таких копий ДНК достигает несколько миллионов. Таким образом, в результате из минимального количества ДНК (вплоть до 1 молекулы) можно получить материал, количество которого достаточно для идентификации с помощью электрофореза или альтернативных ему технологий (например, дот-блот-гибридизация с олигонуклеотидными зондами на амплифицированные фрагменты).

Основные этапы исследования

1. Подготовка материала – выделение ДНК из исследуемого материала.
2. Амплификация.
3. Детекция продуктов ПЦР.

Выделение ДНК.

Для выделения ДНК использовали стандартные наборы GenePak DNA PCR test. ДНК из замороженных образцов опухолевой и нормальной ткани эндометрия достаточного молекулярного веса и необходимой степени чистоты выделяли с помощью ускоренной пробоподготовки.

Непосредственно перед выделением ДНК замороженный биоптат ткани эндометрия аккуратно измельчали и растирали в ступке до гомогенной массы. Гомогенизат переносили в пробирку.

Для выделения ДНК с помощью ускоренной пробоподготовки к 100мкл анализируемой пробы, содержащей клинический материал в пробирке 1,5 мл (типа Эппендорф), добавляли 400 мкл лизирующего реагента (раствор

гуанидинтиоционата, предназначенный для лизиса клеток, солюбилизации клеточного дебриса и денатурации клеточных нуклеаз).

Пробирку с пробой перемешивали и инкубировали в течение 5 минут при 65°C. Затем в пробирку добавляли 20 мкл суспензии сорбента Nucleos и перемешивали в течение 5 минут на ротаторе. После центрифугирования пробы (10 секунд при 5000 об/мин) супернатант отбрасывали, а осадок сорбента трижды промывали солевым буфером, содержащим 70% этанол. Пробирку помещали в микротермостат и подсушивали пробы 5 минут при 65°C, оставляя пробирку открытой. В пробирку с осадком добавляли 100 мкл ЭкстраГена, суспендировали содержимое на вортексе до гомогенного состояния, после чего инкубировали в течение 5 минут при 65°C. Еще раз суспендировали содержимое пробирки на вортексе и затем центрифугировали в течение 1 минуты при 10000 об/мин. Супернатант использовали для постановки реакции амплификации.

Амплификация.

В пробирку типа Эппендорф объемом 0,5 мл, содержащую лиофилизированную сухую реакционную смесь, готовую для амплификации выделенной ДНК (Мастер Микс), добавляли 10 мкл ПЦР-растворителя, 10 мкл анализируемого образца и 20 мкл минерального масла. Амплификацию проводили в программируемом термостате «Amplify-4» (Россия) по следующей программе:

95°C – денатурация;

60°C – отжиг праймеров;

74°C – комплиментарное достраивание цепи ДНК.

Всего было проведено 43 цикла.

Для определения герпесвирусов (вирус Эпштейн-Барр, вирус простого герпеса 2 типа, цитомегеловирус) и бактериальной инфекции (*Chlamydia Trachomatis*, *Mycoplasma hominis* и *genitalium*, *Ureaplasma urealyticum*) были использованы консенсусные праймеры.

Детекция результатов.

С помощью источника тока с фиксированным напряжением 130В, полученные продукты амплификации разгоняли электрофорезом в 1,5% агарозном геле, содержащим бромистый этидий, в течение 20 минут при напряжении не более 15 в/см. Анализ результатов проводили с использованием трансиллюминатора «ТСР-20-М» (Франция) с длиной волны 312 нм. При наличии светящейся полосы желтого цвета строго на уровне положительного контроля отмечали положительную реакцию исследуемого образца на наличие соответствующего вируса или бактерии.

2.5 определение уровня онкобелка E7

Онкобелок E7 определялся методом двойного антительного сендвича на основе моноклональных антител 716-281 и 716-332 с ферментативной меткой для количественного определения онкобелка E7.

2.6. Другие методы исследования.

Гистологическое и иммуногистохимическое исследование биопсийного и операционного материалов проводилось в отделении патоморфологии ФГБУ «РНЦРР Росмедтехнологий».

Гистологическое исследование проводили по стандартной методике: операционный материал фиксировали в 10% растворе формалина, заливали в парафин, изготавливали срезы толщиной 5-7 мкм, которые окрашивали гематоксилином и эозином. Для детализации стромального компонента опухоли срезы окрашивали по Ван-Гизону. Для выявления слизи использовались окраски по Крейбергу, муцикармином, окраску на PAS. Для определения степени злокачественности опухоли использовали оценку структурной и клеточной атипии, а также митотический индекс.

Стандартизация анализа полученных результатов заключалась в протоколировании всех наблюдений по единой схеме. В протокол каждого наблюдения вносились паспортные данные пациентки, номер истории болезни, заключение на основании клинического обследования, а также рентгенологического, ультразвукового, молекулярно-генетического, цитологического и гистологического. В каждом наблюдении проводилось

сопоставление результатов, полученных при различных методах исследования.

2.7. Статистическая обработка данных

Данные обрабатывались при помощи пакета статистических программ «STATISTICA» for Windows '95, разработанного фирмой Statsoft (USA). При этом соблюдались общие рекомендации для медицинских исследований.

Определялись средние арифметические величины (M) и их ошибки (m). С целью определения значимости различий, сопоставляемых средних величин в некоторых случаях применяли критерий Стьюдента (t).

Для количественных данных использовались непараметрические критерии. Ранговый метод – критерий Крускала-Уолисса – использовался для нахождения различий между группами. Для множественного попарного сравнения между выборками различного объема использовался метод Данна. Для сравнения качественных признаков использовался метод χ^2 с поправкой Йейтеса и критерий Фишера.

Для определения связи между изучаемыми показателями, применялся корреляционный анализ с вычислением коэффициента ранговой корреляции Спирмена (R) или Пирсона (r) с последующим установлением его значимости по критерию t .

Различия в полученных показателях считались достоверными при $p < 0,05$ (95% уровень значимости).

ГЛАВА 3. МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ РАННЕГО РАКА ШЕЙКИ МАТКИ.

В обзоре литературы были представлены многочисленные данные, отражающие различные стороны патогенеза рака шейки матки. На фоне этих данных, а также, опираясь на ряд концептуальных положений в отношении канцерогенеза рака репродуктивных органов [13, 17, 18, 19, 29, 30, 107, 125, 172], мы и формировали наш научный поиск.

Интеграция вирусной ДНК в клеточной геном хозяина ведет к суперэкспрессии гена E6 ВПЧ высокого онкологического риска, продукт которого – онкобелок E6, взаимодействуя с супрессорным белком p53 приводит к ингибированию последнего, онкобелок E7 так же играет ключевую роль в репликации ВПЧ, кроме того, подавляет индукцию генов, отвечающих активацией экспрессии под влиянием эндогенного интерферона [54,55,56].

3.1. Папилломавирусная инфекция и онкобелок E7 у больных раком шейки матки.

Роль ВПЧ в возникновении рака шейки матки была впервые обозначена в научных исследованиях около 30 лет назад (zur Hausen H, 1976). Поиск дополнительных аргументов был продолжен, удалось получить обоснованные доказательства значимости вируса папилломы человека (ВПЧ) в канцерогенезе рака шейки матки [141]. В 1993 году – Schiffman et al. [330] продемонстрировали, что у подавляющего числа больных с интраэпителиальной неоплазией шейки матки имеется HPV. В 1995 году – Franco et al. [196] установили, что инфекция HPV предшествует последующей интраэпителиальной неоплазии шейки матки. В 2000 году – Bosch et al. [141] показали, что в 93% раковых опухолей шейки матки наблюдается положительная реакция на HPV.

Разумеется, само обнаружение ВПЧ при РШМ на данном этапе не является новостью. Нас интересовало в большей степени частота обнаружения вирусов в зависимости от стадии заболевания (местной

распространенности процесса) и детекции при этом онкобелка E7 [258]. То есть, хотелось бы уловить различия в группах ранний рак-поздний рак и установить значение обнаружения E7.

Рак шейки матки развивается последовательно, путем перехода из дисплазии (CIN) в преинвазивный рак (Ca in situ – CIS), затем в микроинвазивный, и, наконец, в инвазивный рак. Первые две формы подразумевают понятие раннего рака [23,63,134].

Были изучены группы больных с цервикальными интраэпителиальными неоплазиями шейки матки I-III ст., Ca in situ, раком шейки матки Ia (микроинвазивный рак) стадии, то есть в ситуации, когда процесс канцерогенеза полностью реализовался и далее проходил по различным молекулярным направлениям.

Таблица 2.

Частота определения ВПЧ (абс. число/%) в образцах опухолевой и нормальной ткани шейки матки с использованием метода ПЦР

Группа исследования	Количество больных	ВПЧ-положительные образцы	ВПЧ-негативные образцы
<u>CIN I</u>	17 100%	13 78,1%	4 21,9%
<u>CIN II</u>	11 100%	8 69,7%	3 30,3%
<u>CIN III (ca in situ)</u>	12 100%	10 91%	2 9%
<u>Инвазивный рак шейки матки</u>	16 100%	13 83,8%	3 16,2%
<u>Контрольная группа</u>	20 100%	9 49%	11 51%

$p < 0,05$

Известно около 100 видов ВПЧ. Мы определяли ВПЧ высокого и низкого риска. Этим объясняется факт достаточно широкого носительства этой инфекции в контрольной группе. Случаи выявления ВПЧ среднего и низкого риска отмечались только в группе CIS – 3 случая (выявили 33 серотип) и в контрольной группе, где с наибольшей частотой

обнаруживались вирусы 6 и 11 серотипов (6 наблюдений), а также по 1 случаю 33, 52, 83 серотипы. Мы уже упоминали о высокой распространенности ВПЧ в человеческой популяции. Это было отмечено многими исследователями. В большинстве случаев поражение носит транзиторный характер, и даже при дисплазиях различной степени тяжести в большинстве случаев регрессирует.

Таблица 3 .

Варианты развития при CIN 1-3. Мета-анализ.

	Регресс	Персистенция	Прогресс в CIN 3	Прогресс в инвазивный рак
CIN 1	57,0	32,0	11,0	1,0
CIN 2	43,0	35,0	22,0	5,0
CIN 3 (ca in situ)	32,0	<56,0	-	>12,0

Что касается микроинвазивного и инвазивного рака шейки матки, то в 100% вирусопозитивных наблюдений мы зарегистрировали наличие ВПЧ высокого риска (16 и 18 серотипы). В настоящее время идентифицировано более 100 типов ВПЧ, 80 из которых хорошо описаны. По клиническим проявлениям их делят на кожные типы (хотя роль ВПЧ в развитии патологий кожи остается до конца не изученной, а диагностическая ценность ВПЧ-тестирования не определена) и аногенитальные типы.

По степени злокачественности ВПЧ подразделяют на 3 группы

Таблица 4 .

Классификация типов HPV по риску онкогенности

Подтип HPV	Категория риска
16, 18, 45, 56	высокий
30, 31, 33, 35, 39, 51, 52, 58, 66	средний
6, 11, 40, 42, 43, 44, 53, 54, 55, 61, 70, 72, 81	низкий

Существующая градация типов ВПЧ на группы низкого, среднего и высокого онкологического риска на основании вероятности злокачественной трансформации эпителия носит условный характер и обусловлена локализацией процесса. Так, при преинвазивных и инвазивных формах рака шейки матки обнаруживаются ВПЧ-16,-18,-45,-56.

Таблица 5.

Частота выявления ВПЧ(абс./%) в ткани шейки матки.

Группа исследования	Количество больных	ВПЧ + Высокого риска	ВПЧ+ Низкого риска
<u>CIN I</u>	13	3	10
<u>CIN II</u>	8	2	6
<u>CIN III (ca in situ)</u>	10	4	6
<u>Инвазивный рак шейки матки</u>	13	13	-
<u>Контрольная группа</u>	9	2	-

Доказанным фактом является этиологическая связь папилломавирусной инфекции с возникновением злокачественных новообразований шейки матки. Само инфицирование вирусом, однако, не является достаточным условием для заболевания и не означает непременно его развитие. Данные, представленные в таблице демонстрируют неуклонное увеличение количества инфицированных пациенток в зависимости от степени дисплазии и при инвазивном раке шейки матки. Следует также отметить, что при микроинвазивном и инвазивном раке шейки матки в 100% вирусопозитивных наблюдений мы зарегистрировали наличие ВПЧ высокого риска (16 и 18 серотипы). В то же время ВПЧ-позитивные образцы получены и в контрольной группе.

3.2 Онкобелок E7 при цервикальных интраэпителиальных неоплазиях и инвазивном раке шейки матки.

В настоящее время изучается онкобелок E7, который обладает выраженным трансформирующим действием на клетки. В злокачественных опухолях вирусный геном персистирует в интегрированной форме, причем разрыв в вирусном геноме, который необходим для встраивания в клеточный, происходит в рамках E1-E2. Таким образом, в трансформированных клетках гены E6 и E7 остаются интактными. Еще раз упомянем, что интеграция ДНК ВПЧ в геном клеток сопровождается двумя молекулярными событиями:

1. Встраивание вирусной ДНК в хромосому всегда сопровождается нарушением структуры гена E2, который является репрессором E7.
2. При интеграции ДНК-вируса синтез белка E2 прекращается вследствие нарушения структуры соответствующего гена и активируется синтез белка E7.

То есть, факт интеграции вирусной ДНК может быть зарегистрирован или изучением структуры гена E2 (эти методы в стадии разработок) или измерением уровня синтеза онкобелка E7. Из этого следует, что наличие онкобелка E7 в пробах из опухоли может рассматриваться как однозначное свидетельство вирус-ассоциированного процесса. Неоспоримым достоинством E7 как маркера, является то, что в норме этот белок в тканях не синтезируется. Его происхождение полностью связано с жизненным циклом интегративной формы ВПЧ-инфекции [131,276,291,300,347,360].

Таким образом, измерение уровня онкобелка E7 позволяет уточнить характер вирусной инфекции, ее обратимость и потенциальную возможность злокачественной трансформации в случае интеграции ВПЧ в клеточный геном.

В нашем исследовании проведено определение онкобелка E7 в группах больных CIN I-II, CIN III и инвазивном раке шейки матки. Данные представлены на рисунках.

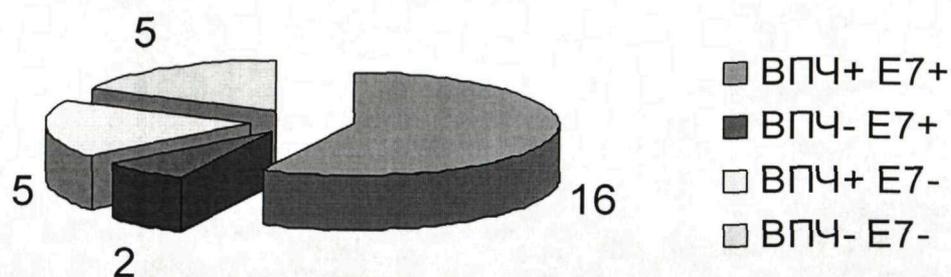


Рис. 7. Частота выявления ВПЧ и белка E7 у больных с цервикальными интраэпителиальными неоплазиями I-II ст. (n=28).

В группе больных CIN I-II у 16 пациенток из 28 (57 %) определялся как ВПЧ, так и онкобелок E7. У 5 пациенток (17,9%) в пробах ткани шейки матки отсутствовал ВПЧ и не определялся онкобелок E7. У таком же количестве исследований 5 (17%) при наличии ВПЧ, онкобелок не определялся.

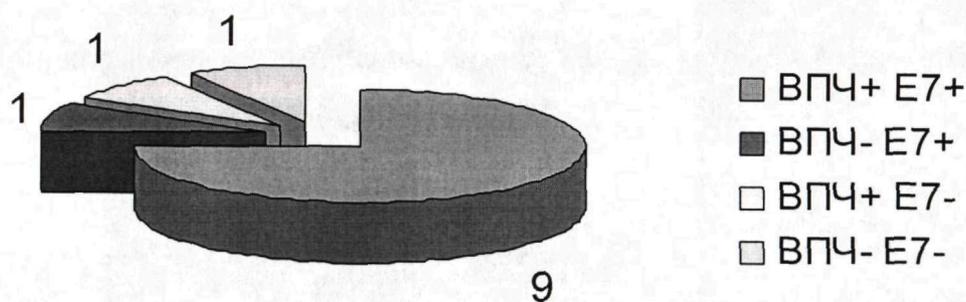


Рис. 8. Частота выявления ВПЧ и белка E7 у больных с преинвазивным раком (CIS) (n=12).

В группе больных CIN III –CIS одновременное обнаружение в пробах тканей ВПЧ и онкобелка E7 констатировано у 9 (75%) больных. Остальные варианты распределения ВПЧ и E7 определялись гораздо реже - в 1 пробе в каждой группе (8,3%). Наиболее неблагоприятной в прогностическом плане является подгруппа E7+ ВПЧ+. Можно с большой долей уверенности сказать, что процесс канцерогенеза в этом случае запущен и практически неотвратим.

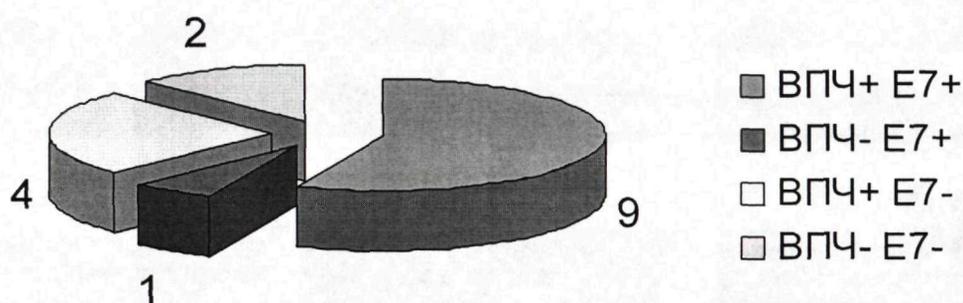


Рис. 9. Частота выявления ВПЧ и белка E7 у больных с инвазивным раком шейки матки (n=16).

В целом в группах позитивные результаты анализа на онкобелок E7 распределялись следующим образом – 64,3% в группе пациенток с CIN I-II, 83,3% в группе CIN III и 62,5% в группе больных инвазивным РШМ (таблица). В контрольной группе из 9 ВПЧ положительных образцов ни в одном случае не было выявлено наличие онкобелка E7.

В группе больных инвазивным раком шейки матки отмечено уменьшение числа наблюдений с позитивными анализами на ВПЧ и одновременным обнаружением онкобелка E7 (56,3%), свидетельствует о присоединении других механизмов злокачественной трансформации в ситуации обширного, прогрессирующего опухолевого процесса.

Таблица 6.

Частота определения окомаркера E7 при цервикальных интраэпителиальных неоплазиях и инвазивном раке шейки матки (абс.число/%)

Группа исследования	Количество больных	E7 позитивные образцы	E7 негативные образцы
<u>CIN I-II</u>	28 100%	18* 64,3%	10 35,7%
<u>CIN III (ca in situ)</u>	12 100%	10 83,3%	2 16,7%
<u>Инвазивный рак шейки матки</u>	16 100%	10 62,5%	6 37,5%
<u>Контрольная группа</u>	9 100%	-*	9 100%

*p<0,05

Таким, образом, установлено, что вариант ВПЧ+, E7+ чаще всего встречается в группе CIN III-CIS (75%), Данное сочетание реже обнаруживается в группе больных с CIN I-II и инвазивным раком. Полученные результаты свидетельствуют о значительной роли онкобелка E7, как маркера начальных этапов злокачественной неоплазии шейки матки. Несомненно, наибольший клинический интерес представляет выявление E7 при Cr in situ (CIN 3), а также CIN 1-2.

С нашей точки зрения, высокие концентрации онкобелка E7 при начальном раке шейки матки свидетельствуют о высоком уровне вирусиндуцированных популяций опухолевых клеток. Последующая прогрессия злокачественного процесса формирует условия для вируснезависимого канцерогенеза, в результате чего падает доля вирусиндуцированных популяций клеток, а это приводит к снижению уровня экспрессии белка E7.

3.3. Экспрессия теломеразы при цервикальных интраэпителиальных неоплазиях и инвазивном раке шейки матки.

В последние годы существенное внимание исследователей различных областей, в первую очередь молекулярных биологов, привлекала теломерная теория. Генетики называют теломерами концевые участки хромосом, видимые в световом микроскопе. Молекулярные биологи имеют дело со значительно меньшим концевым районом хромосомы, перекрывающим тысячи нуклетидных пар и имеющую на конце многократно повторяющуюся монотонную последовательность (теломерный повтор). Эти участки синтезирует специальный фермент – теломераза (теломераза), имеющая постоянно ассоциированную с ней РНК-матрицу. Теломераза является рибонуклеиновым ферментом, который способен не только поддерживать размер теломерного повтора, но и синтезировать теломеры *de novo*. Основная функция теломеразы заключается в активации концевых сегментов хромосом, в большинстве клеток фермент полностью инактивирован, однако при онкологических заболеваниях он вновь начинает действовать вызывая неконтролируемое размножение клеток злокачественных опухолей. Наличие теломеразной активности может являться важным диагностическим признаком. (Егоров Е.Е. 2001г., Griffith J.D. 1999г.) Около 85% опухолей человека обладают теломеразной активностью, в связи с этим можно утверждать, что реактивация теломеразы участвует в онкогенезе. Увеличение надежности репрессии теломеразы должно резко уменьшать вероятность развития опухоли. Можно предполагать, что особенности регуляции теломеразы у человека связаны с тем, что репрессия теломеразы является защитой от опухоли. Огромные усилия, потраченные на изучение теломеразной активности как раннего маркера опухолей, свидетельствуют, что теломеразная активность не может являться самостоятельным признаком для диагностики ранних стадий канцерогенеза, доказано, что с большей долей вероятности можно говорить о теломеразе как об универсальном

диагностическом маркере и, что особенно важно, как о маркере ранних стадий злокачественного опухолевого процесса.

Теломераза (TERT) является ферментом, который способен не только поддерживать размер теломерного повтора, но и синтезировать теломеры *de novo*. Его активация является необходимой для поддержания неограниченного деления клетки. Представляет интерес вопрос, на какой стадии канцерогенеза происходит включение этого механизма. В таблице 7 (рис. 10) показан относительный уровень экспрессии мРНК гена TERT в ткани шейки матки в зависимости от различной степени неоплазии.

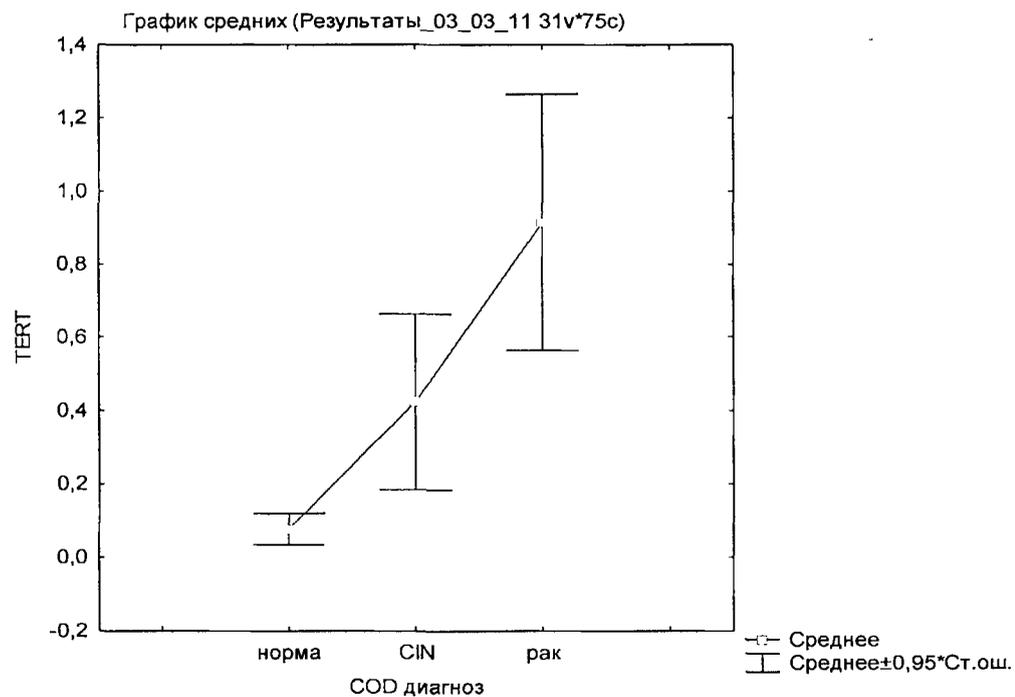


Рис.10 . Уровень экспрессии TERT при цервикальных интраэпителиальных неоплазиях и инвазивном раке шейки матки.

Таблица 7. Значения уровня экспрессия TERT при цервикальных интраэпителиальных неоплазиях и инвазивном раке шейки матки.

Группа исследования	Число больных	Уровень экспрессии (ст. откл.)	p
<u>CIN I-III</u>	40	0,42±1,16	
<u>Инвазивный рак шейки матки</u>	16	0,91±1,22	p3=0,109 p4=0,096
<u>Контрольная группа</u>	20	0,08±0,18	p ¹ =0,0558 p2=0,0146

p¹ - статистическая значимость различий по сравнению с группой CIN III, p2 - достоверность отличия в группах норма-рак, p3-достоверность отличия в группах CINII-рак, p4 - в группах CIN1-рак.

Обнаруживается существенное, статистически достоверное (на уровне менее $p < 0,1$) повышение уровня экспрессии теломеразы при CIN III и инвазивном РШМ по сравнению с контрольной группой. Интересно, что если CIN III объединить в одну группу с группой рака шейки матки, то достоверность отличия между объединенной группой и группой объединяющей CIN I+CINII повышается до 0,03 (при этом отличие между объединенной группой CIN III + рак и группой «норма» составляет 0,02). При этом достоверных отличий в уровне экспрессии мРНК гена TERT при CIN I-II не обнаружено.

На рисунке 5 приводятся значения средней активности теломеразы при различных стадиях интраэпителиальной неоплазии. Приведенные результаты четко показывают, что критическое увеличение активности теломеразы в клетках эпителия шейки матки происходит только при переходе неопластического процесса в стадию CIN III и ее высокая активность сохраняется при раке.

При анализе уровня экспрессии теломеразы в зависимости от нарастающей степени CIN выявил четкое и достоверное его повышение в образцах CIN III по сравнению с более легкими степенями цервикальной неоплазии. (таблица 8) (рис. 11)

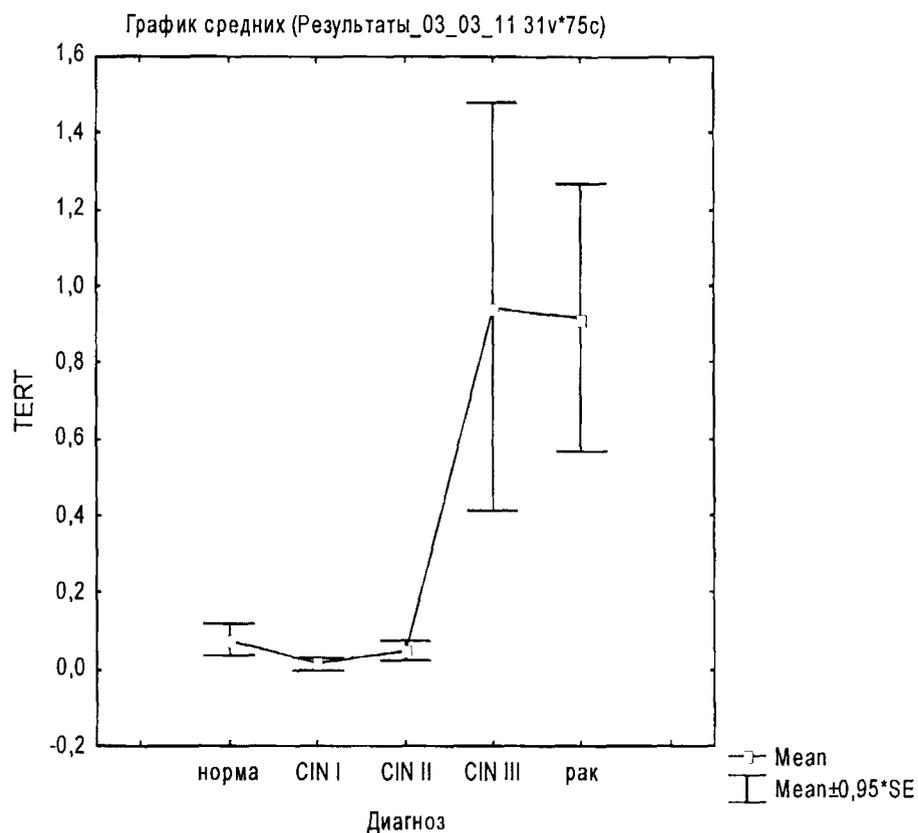


Рис.11. Средние значения и стандартная ошибка изменений относительного количества мРНК теломеразы в эпителии шейки матки.

Таблица 8. Уровень экспрессия TERT при цервикальных интраэпителиальных неоплазиях шейки матки I-III ст.

Группа исследования	Количество больных	Уровень экспрессии (ст. откл.)	p
<u>CIN I</u>	17	0,02 \pm 0,04	p=0,07
<u>CIN II</u>	11	0,05 \pm 0,07	p=0,5
<u>CIN III (ca in situ)</u>	12	0,95 \pm 1,68	p=0,5

Столь значительное увеличение уровня экспрессии теломеразы при цервикальных интраэпителиальных неоплазиях III степени позволяет четко обозначить собственно предраковые изменения и значительно улучшить и облегчить процесс диагностики данной патологии.

3.4. Гены пролиферации и апоптоза при цервикальных интраэпителиальных неоплазиях и раке шейки матки.

В современной литературе большое значение уделяется разработке объективных молекулярно-генетических критериев прогнозирования течения заболеваний шейки матки. [5]. Особый интерес вызывает анализ изменений генов пролиферации, апоптоза и дифференцировки в цервикальных интраэпителиальных неоплазиях (CIN) и раке шейки матки [6].

Ключевыми регуляторами апоптоза является семейство белков BCL-2. Выключение BCL-2 приводит к массивному p53 зависимому апоптозу. В настоящее время большое внимание уделяется оценке экспрессии мРНК BCL-2 в эпителии шейки матки как потенциального маркера значимых этапов в патогенезе цервикальных интраэпителиальных неоплазий [7]. Функционально связано с ними семейство BAG – (1-6) - группа мультифункциональных генов, взаимодействующих с шаперонами (Hsp70) и ингибирующих их. Одна из функций – связывание с BCL2, рецепторами стероидных гормонов, тем самым, подавляя апоптоз и активируя стероид опосредованную транскрипцию [8]. Универсальным маркером пролиферации считается белок, кодируемый геном Ki-67. Он относится к регуляторным белкам, отражая вступление клетки в митоз. В литературе отмечается, что цервикальные интраэпителиальные неоплазии характеризуются его повышенной экспрессией [9]. Прохождение клетками M-фазы клеточного цикла белок, кодируемый геном CCNB1(Циклин B1). Ряд исследователей обнаружили его гиперэкспрессию при раке шейки матки [10].

Сравнительный анализ м-РНК онкобелка BCL2 в материале неизменной шейки матки, цервикальной интраэпителиальной неоплазии и инвазивного плоскоклеточного рака шейки матки показал снижение его экспрессии в ряду неизмененный эпителий шейки матки - цервикальная интраэпителиальная неоплазия – плоскоклеточный рак. Так, его экспрессия была достоверно ниже при раке шейки матки в сравнении с неизмененным эпителием ($p=0,005$) (рис.12), (таблица 9)

Анализ количества мРНК генов, контролирующих апоптоз (гены BCL2, BAX, BAG) показал, что в отличии от генов Ki67 и циклина B1, активирующихся при процессах пролиферации, их активность снижается.

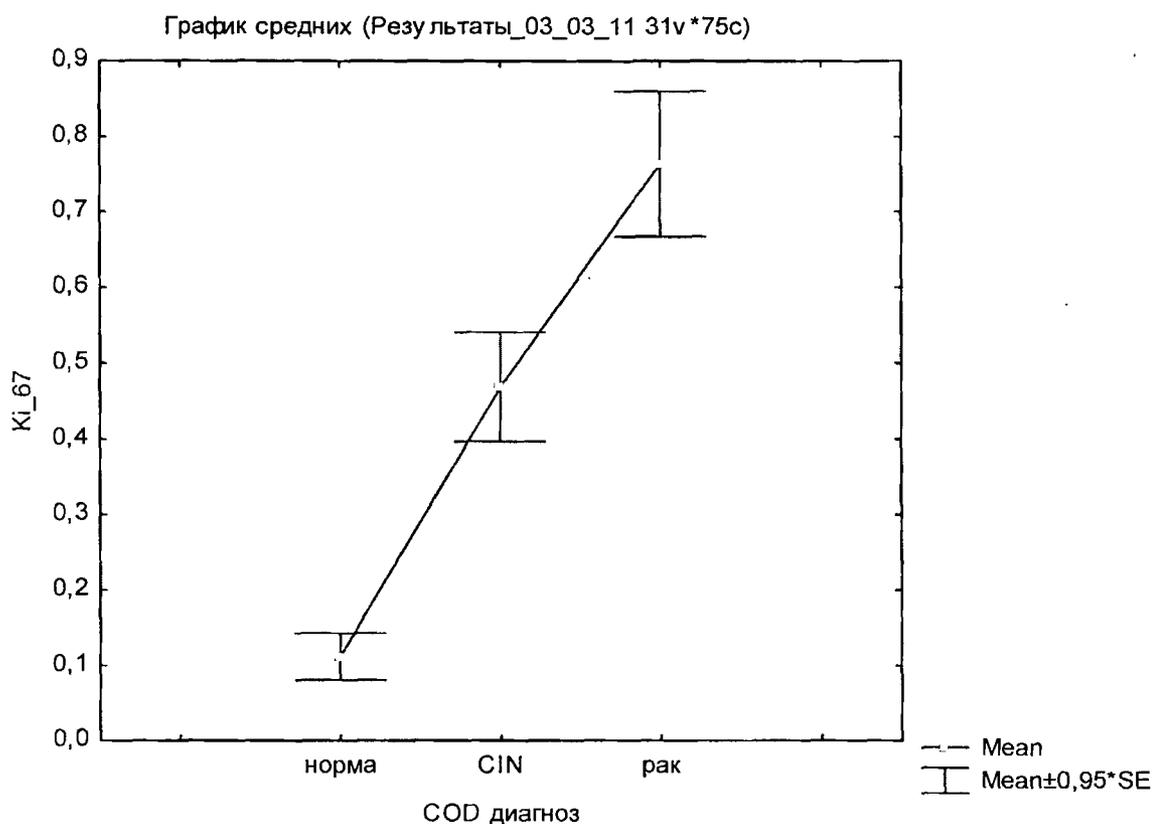


Рис.12 .Изменение количества мРНК гена Ki67 в ткани шейки матки.

Таблица 9.

Уровень экспрессии м-РНК Ki67 при при цервикальных интраэпителиальных неоплазиях и инвазивном раке шейки матки.

Группа исследования	Количество больных	Уровень экспрессии (ст. откл.)	p
<u>CIN I-III</u>	40	0,47±0,46	p=0,03
<u>Инвазивный рак шейки матки</u>	16	0,76±0,41	
<u>Контрольная группа</u>	20	0,11±0,14	p ¹ =0,002

p-статистическая значимость различий по сравнению с группой рак;
p¹ - статистическая значимость различий по сравнению с группой CIN.

Как видно из рис. 12-13 активность исследованных генов, контролирующих пролиферацию, возрастает в ряду «нормальная ткань эпителия шейки матки» - «группа CIN»-«рак». Отличия статистически достоверны.

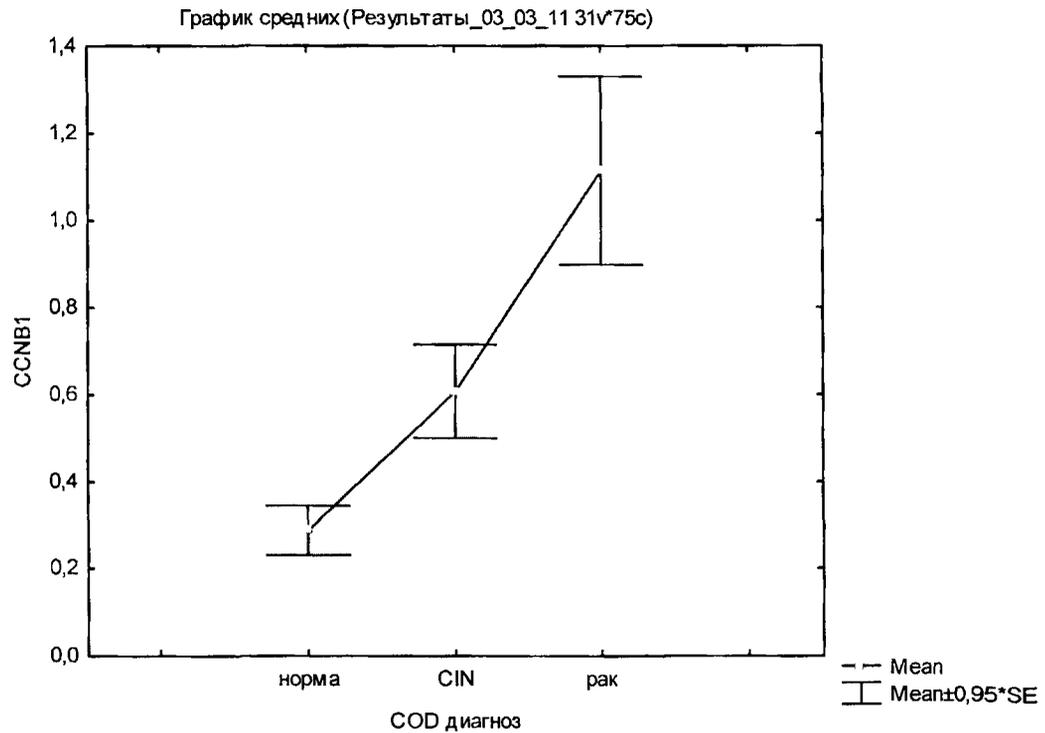


Рис.13 . Изменение относительного количества мРНК гена циклина В1 в ткани шейки матки.

Таблица 10.
Уровень экспрессии CCNB1 при цервикальных интраэпителиальных неоплазиях и инвазивном раке шейки матки.

Группа исследования	Количество больных	Уровень экспрессии (ст. откл.)	p
<u>CIN I-III</u>	40	0,61±0,69	p=0,03
<u>Инвазивный рак шейки матки</u>	16	1,11±0,91	
<u>Контрольная группа</u>	20	0,29±0,26	p ¹ =0,06

p-статистическая значимость различий по сравнению с группой рак;
p¹ - статистическая значимость различий по сравнению с группой CIN.

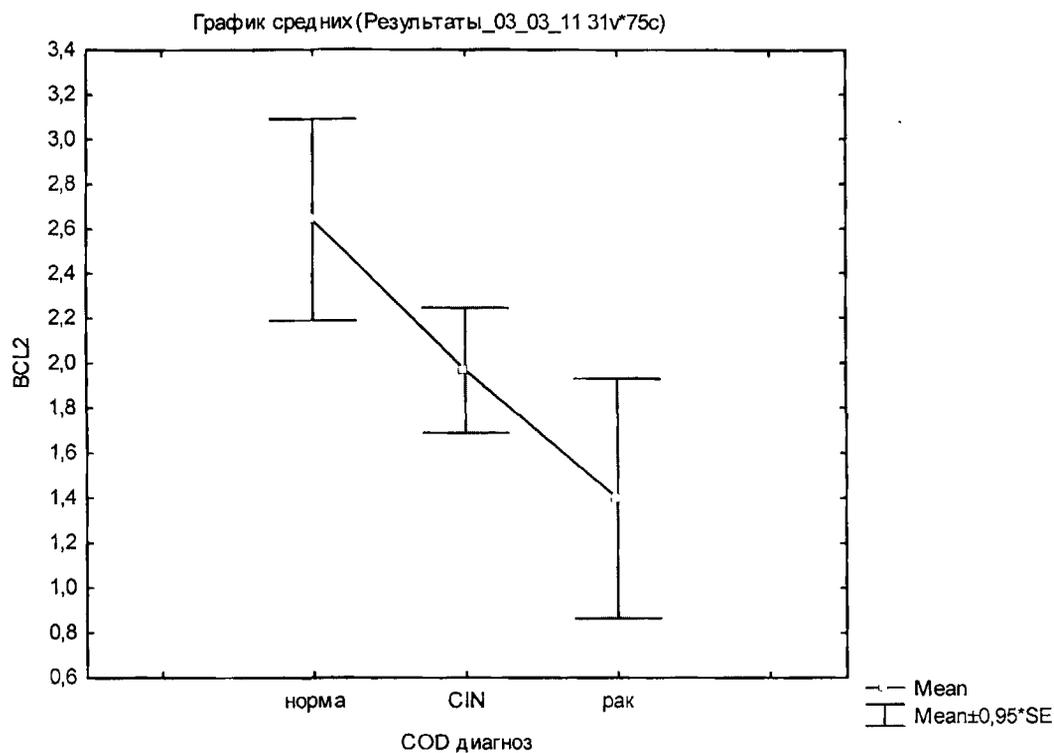


Рис.14 . Изменение относительного количества мРНК гена BCL2 в ткани шейки матки

Таблица 11.

Уровень экспрессии BCL2 при цервикальных интраэпителиальных неоплазиях и инвазивном раке шейки матки.

Группа исследования	Количество больных	Уровень экспрессии (ст. откл.)	p
<u>CIN I-III</u>	40	1,97±1,85	p=0,33
<u>Инвазивный рак шейки матки</u>	16	1,39±2,24	
<u>Контрольная группа</u>	20	2,64±2,01	p ¹ =0,22

p - статистическая значимость различий по сравнению с группой рак;
p¹ - статистическая значимость различий по сравнению с группой CIN.

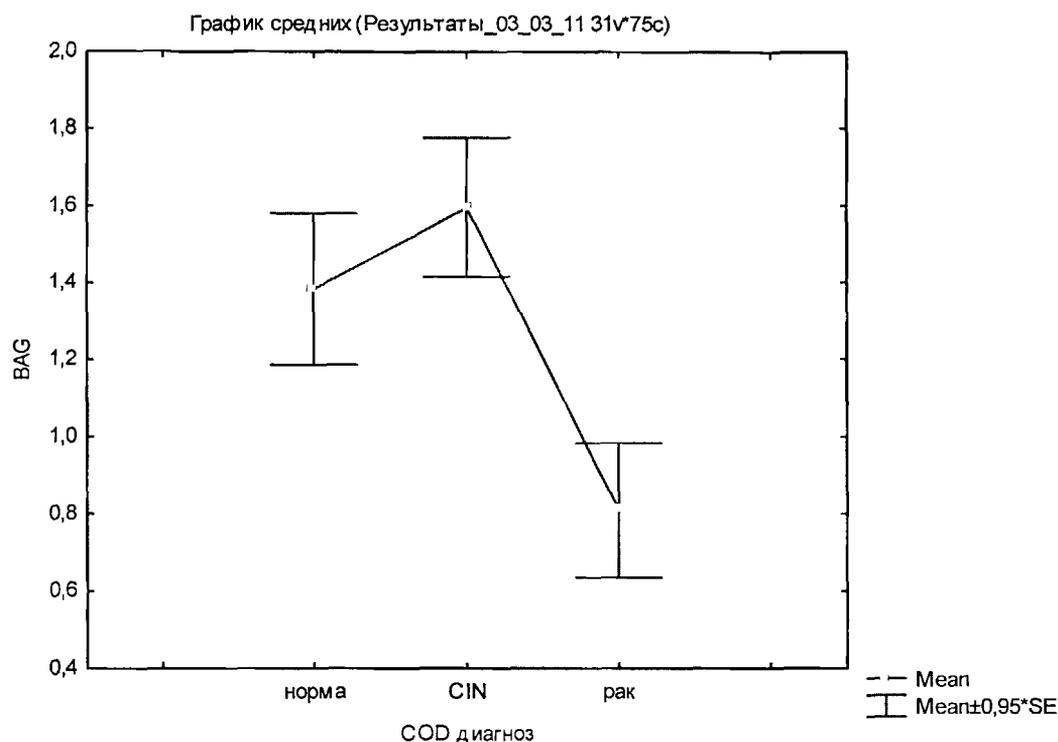


Рис.15 . Изменение относительного количества мРНК гена BAG в ткани шейки матки.

Таблица 12.

Уровень экспрессии BAG при цервикальных интраэпителиальных неоплазиях и инвазивном раке шейки матки.

Группа исследования	Количество больных	Уровень экспрессии (ст. откл.)	p
<u>CIN I-III</u>	40	1,59±0,85	p=0,01
<u>Инвазивный рак шейки матки</u>	16	0,81±0,58	
<u>Контрольная группа</u>	20	1,38±0,78	p ¹ =0,47

p-статистическая значимость различий по сравнению с группой рак; p¹ - статистическая значимость различий по сравнению с группой CIN.

При этом достоверное снижение наблюдается в группе больных раком шейки матки (Рис. 15,16,17). Таким образом, сравнение этих групп генов, контролирующих пролиферацию и апоптоз, обнаружило обратную направленность изменений при развитии злокачественной трансформации.

Интересно, что снижение уровня экспрессии наблюдается как для антиапоптотических генов (BCL2, BAG), так и для проапоптотического гена BAX. Анализ изменения уровня экспрессии генов пролиферации внутри группы CIN показал, что оно имеет аналогичный вид с изменением активности гена теломеразы (Рис.10), критическое увеличение происходит при переходе процесса неоплазии от CIN II к CIN III.

Как видно из данных, приведенных на рис.17, наибольшие изменения активности гена циклина В1 происходят при переходе процесса трансформации от CINII в CINIII. Высокая экспрессия гена Ki67 и гена циклина В1 сохраняется в группе рака шейки матки.

Интерес представляет возможность использования обнаруженных изменения для дифференцировки групп CIN II с группой CIN III и группы CIN III с группой рака шейки матки.

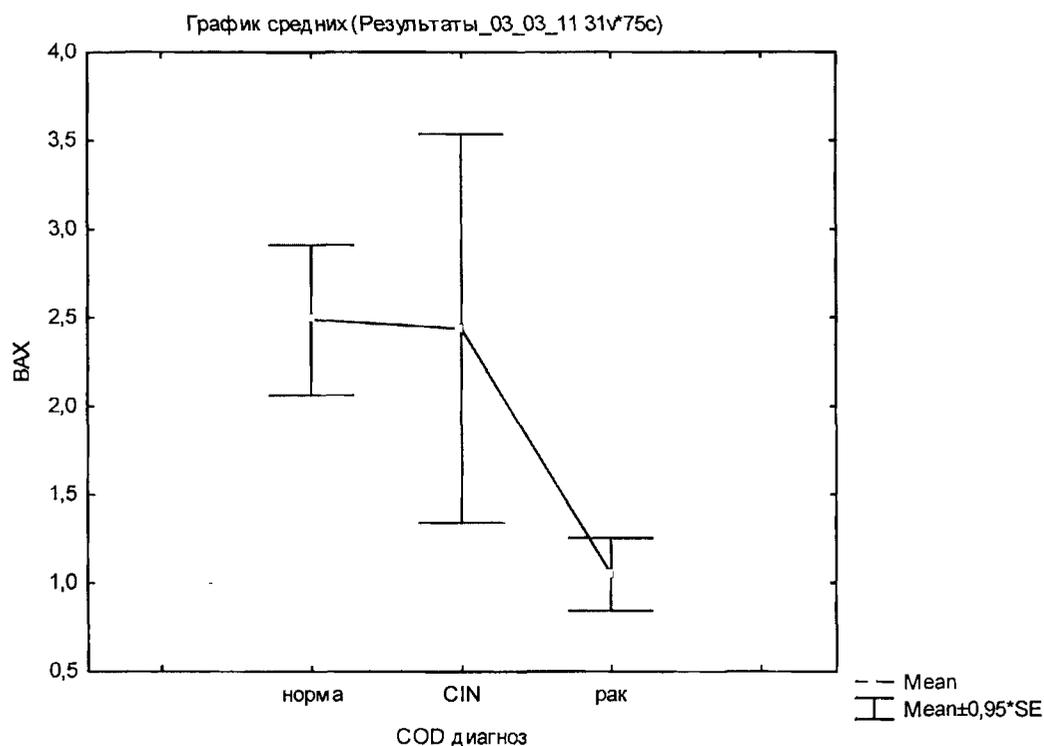


Рис.16 . Изменение относительного количества мРНК гена BAX в ткани шейки матки.

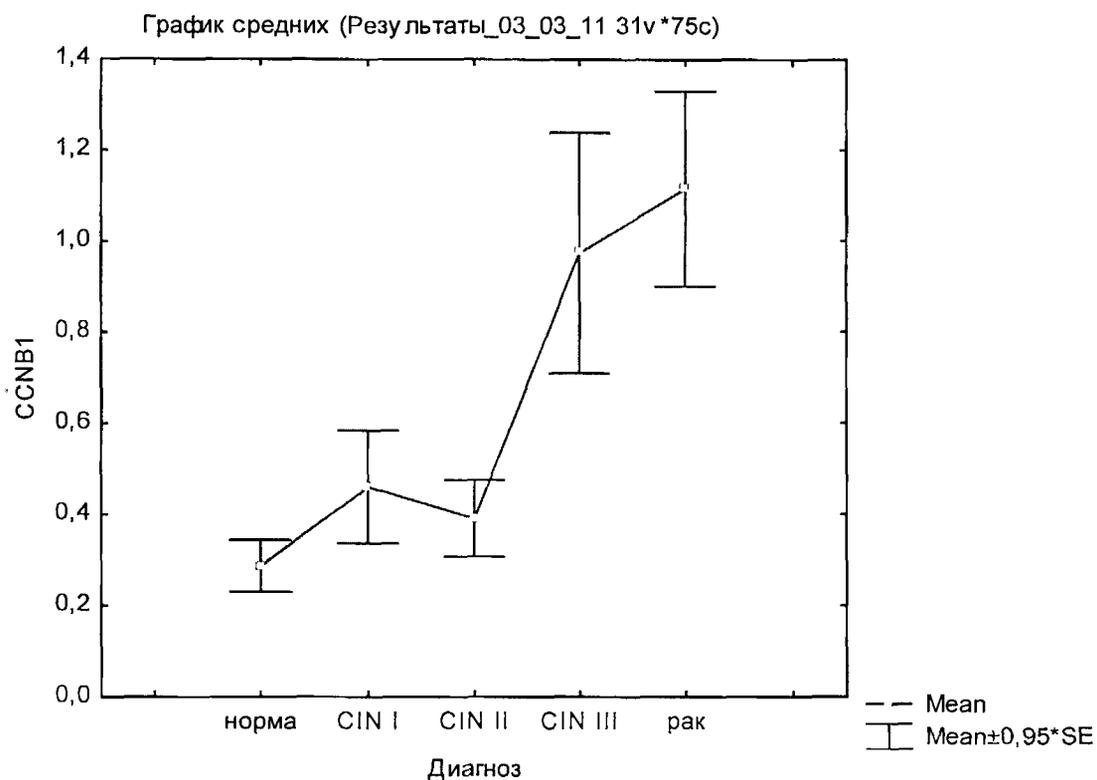


Рис.17 . Изменение относительно количества гена циклина В1 в ткани шейки матки.

С этой целью мы оценили достоверность отличия средних значений уровней экспрессии мРНК проанализированных генов. (Табл. 13-14).

Таблица 13.

Сравнение достоверности отличия средних значений уровней экспрессии в группах РШМ –СINIII.

Ген/группа	РШМ	СINIII	t-value	p	N	N
Ki ₆₇	0,763242	0,574298	1,31822	0,198927	16	12
CCNB ₁	1,114222	0,973774	0,39433	0,696551	16	12
BAG	0,809870	2,104724	-2,59340	0,022283	10	5
BCL ₂	1,396958	2,070176	-0,84022	0,408166	16	13
BAX	1,047137	1,546418	-1,18205	0,260080	10	4

Из значений, приведенных в табл.13 видно, что только для проапоптотического гена BAG наблюдается достоверные изменения для групп РШМ-СINIII.

Таблица 14.

Сравнение достоверности отличия средних значений уровней экспрессии в группах CIN II – CIN III.

Ген/группа	CIN II	CIN III	t-value	p	N	N
Ki ₆₇	0,276297	0,574298	-2,31417	0,031410	10	12
CCNB ₁	0,391481	0,973774	-1,83593	0,081281	10	12
BAG	1,392006	2,104724	-1,06277	0,318911	5	5
BCL ₂	2,402130	2,070176	0,35243	0,728025	10	13
BAX	0,945415	1,546418	-1,31735	0,235789	4	4

Сравнение достоверности отличий уровней экспрессии генов для групп CIN II и CIN III показывает, что уровни активности генов Ki₆₇ и CCNB₁ достоверно отличаются для этих групп.

Таким образом, анализ молекулярных процессов в клетках эпителия шейки матки показал, что на фоне вирусной инфекции и активации вирусного генома (экспрессия белка E7) происходят закономерные изменения процессов пролиферации апоптоза. При этом, критические изменения уровня пролиферации наблюдаются при переходе стадии интраэпителиальной неоплазии с CINII к CIN III. Именно на этой стадии происходит активация теломеразы, обеспечивающая неограниченность деления клеток.

Противоположную зависимость (снижение уровня экспрессии) обнаружена для генов, контролирующих апоптоз, однако определить стадию интраэпителиальной неоплазии, на которой происходят наиболее выраженные изменения уровня экспрессии генов, контролирующих апоптоз, выявить не удалось. Снижение их активности происходит постепенно – по мере увеличения степени неоплазии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Широкая распространенность, разнообразие патологических состояний и потенциальный риск злокачественной трансформации эпителия шейки матки определяют высокую значимость прогностических критериев развития цервикальной неоплазии. Мировые показатели заболеваемости предраковыми заболеваниями шейки матки составляют, по данным различных авторов, от 1,5% до 20,0% и опухолями от 7‰ до 15‰ .

В Российской Федерации на протяжении двух последних десятилетий рак шейки матки остается одной из часто встречающихся опухолей и составляет 5,2% в структуре злокачественных новообразований у женщин. Негативной тенденцией является значительный рост заболеваемости среди молодых женщин, представляющих не только репродуктивно значимую часть населения, но и активную социальную группу. Важно отметить, что в возрастной группе 20-40 лет рак шейки матки является основной причиной смерти среди всех больных злокачественными новообразованиями женской половой сферы, достигая 60% .

Общепризнано, что проблема цервикальных опухолей связана не только с устойчиво высокой заболеваемостью раком, но и с трудностями диагностики цервикальной интраэпителиальной неоплазии, представляющую один из этапов малигнизации цервикального эпителия. По мнению экспертов ВОЗ, рак шейки матки – полностью предотвратимое заболевание, если оно выявлено на стадии предрака.

Как известно, развитие цервикальной интраэпителиальной неоплазии и рака шейки матки связано с инфицированием онкогенными типами HPV. Длительная персистенция вирусов в цервикальном эпителии сопровождается их интеграцией в клеточный геном и появлением мутаций, причем неопластическая трансформация возникает с большей вероятностью при взаимодействии HPV с другими ИППП, достаточно распространенными в популяции.

По результатам многоцентровых эпидемиологических исследований, до 90% случаев инфицирования HPV заканчиваются спонтанным выздоровлением, и только в 10% наблюдений развивается персистирующая инфекция, которая и запускает механизм злокачественной трансформации эпителиальных клеток. Таким образом, инфицирование цервикального эпителия HPV представляет собой необходимое, но недостаточное условие для развития рака. Не исключено, что HPV является иницирующим фактором многостадийного процесса неопластической трансформации, однако, для финального превращения в рак важно его взаимодействие с другими онкогенами.

Таким образом, основная цель работы заключалась в изучении соотношения процессов пролиферации и апоптоза и сформировать спектр основных факторов, отражающих процессы начального канцерогенеза в клетках эпителия шейки матки. Для реализации этой цели были обозначены следующие задачи:

1. Изучить уровень экспрессии белка E7 при различных вариантах цервикальных интраэпителиальных неоплазий, инвазивном раке шейки матки и в группе контроля.

2. Изучить степень теломеразной активности при различных вариантах цервикальных интраэпителиальных неоплазий, инвазивном раке шейки матки и в группе контроля.

3. Изучить уровень экспрессии молекулярных маркеров пролиферации (Ki 67, CCNB1) и апоптоза (BCL2, BAX, BAG) при различных вариантах цервикальных интраэпителиальных неоплазий, инвазивном раке шейки матки и в группе контроля.

4. Определить молекулярно-биологические критерии раннего канцерогенеза при цервикальных интраэпителиальных неоплазиях.

В рамках поставленных задач было обследовано 16 пациенток с гистологически подтвержденным плоскоклеточным раком шейки матки, средний возраст лет $41,1 \pm 9,6$ лет, 40 пациенток с гистологически

подтвержденным диагнозом цервикальной интраэпителиальной неоплазии различной степени (CIN 1, CIN2, CIN 3 (плоскоклеточный рак in situ)) средний возраст $37,5 \pm 10,5$ лет, находившихся на лечении в ФГУ РНЦРР в период с 2006-2010 год. Контрольную группу составили 20 женщин с морфологически неизменным эпителием шейки матки, средний возраст составил $38 \pm 12,4$.

Мы провели исследование группы больных с преинвазивным РШМ, инвазивным раком шейки матки Ia стадии и более распространенными процессами Ib-IV стадий. Из 16 больных раком шейки матки ВПЧ-положительные результаты получены у 13 (78,1%). При этом, из 12 пациенток с CIS, ВПЧ-положительные образцы имелись у 10 (69,7%).

Были определены ВПЧ высокого и низкого риска. Этим объясняется факт достаточно широкого носительства этой инфекции в контрольной группе. Случаи выявления ВПЧ среднего и низкого риска отмечались только в группе CIS – 3 случая (выявили 33 серотип) и в контрольной группе, где с наибольшей частотой обнаруживались вирусы 6 и 11 серотипов (6 наблюдений), а также по 1 случаю 33, 52, 83 серотипы. Мы уже упоминали о высокой распространенности ВПЧ в человеческой популяции.

При инвазивном раке шейки матки 100% вирусологически положительных наблюдений мы зарегистрировали наличие ВПЧ высокого риска (16 и 18 серотипы).

Понимание того, что в случае инфицированности ВПЧ приводят к развитию CIN и не все случаи CIN далее прогрессируют в инвазивную карциному шейки матки ставит перед исследователями архиважную задачу: разработать тест, позволяющий с высокой вероятностью дифференцировать канцерогенную направленность HPV-инфицированного плоского эпителия шейки матки.

Мы считаем, что за этим стоит не только суть понимания биологии диспластических процессов эпителия шейки матки, но и важная экономическая составляющая, диктующая необходимость обработки совершенно новых показаний активной терапии всех вариантов CIN.

В инфекционном процессе, обусловленном ВПЧ можно разделить на две стадии: 1 стадия- репродуктивного размножения вируса; 2 стадия – интеграция ДНК вируса в геном эпителия клетки. Первая стадия является обратимой и чаще всего не сопряжена с развитием необратимых морфологических процессов. Стадия интегративной инфекции является первым шагом к опухолевому перерождению клетки и сопровождается двумя молекулярными событиями:

1. встраивание вирусной ДНК в хромосому, которое всегда сопровождается нарушением структуры гена E2, который является супрессором E7;

2. при интеграции ДНК-вируса синтез белка E2 прекращается и активируется синтез белка E7.

По нашему мнению, наличие онкобелка E7 может рассматриваться как однозначное свидетельство начавшегося процесса малигнизации эпителиальных клеток, содержащих интегрированную копию генома ВПЧ. Неоспоримым достоинством E7 как маркера является и то, что в норме этот белок в тканях не синтезируется. Его происхождение полностью связано с жизненным циклом интегрированной формой ВПЧ-инфекции.

Определяя самые начальные этапы канцерогенеза, белок E7, может рассматриваться в качестве истинного онкомаркера.

Были проведены исследования наличия онкобелка E7 в полученных образцах тканей. Экспрессия онкобелка при CIS составила 83,3%, при инвазивном раке 62,5%. Наиболее неблагоприятной в прогностическом плане следует признать группу с E7+ ВПЧ+. Можно с большой долей уверенности сказать, что процесс канцерогенеза в этом случае запущен и практически неотвратим.

В группе больных инвазивным раком шейки матки отмечено уменьшение числа наблюдений с позитивными анализами на ВПЧ и одновременным обнаружением онкобелка E7 (62,5%), свидетельствует о присоединении

других механизмов злокачественной трансформации в ситуации обширного, прогрессирующего опухолевого процесса.

Очевидно, что в группе дисплазий дифференцируются две биологические модели процесса. В одном случае, где экспрессия белка E7 отсутствует, можно думать, что диспластические изменения индуцированы неблагоприятным биоценозом влагалищной среды и как ответная реакция — формирование патологической пролиферации плоского эпителия. В этом варианте пролиферация является частью контролируемого регенераторного процесса и отражает состояние хронического воспаления. В другом случае, где отмечен синтез белка E7, уже запущен начальный этап канцерогенеза. С появлением этого белка, как уже было отмечено, включаются разнообразные механизмы, обеспечивающие неконтролируемую пролиферацию. Присутствие белка E7 даже без серьезных морфологических изменений эпителия шейки матки важный и тревожный признак развивающегося злокачественного процесса. По сути дела белок E7 отражает биохимический этап канцерогенеза. Этот факт весьма важен с позиций клинического осмысления сути происходящих процессов на шейке матки.

Мы глубоко убеждены в том, что в недалеком будущем тест на онкобелок E7 создаст предпосылки более диалектического (избирательного) подхода к пониманию сути происходящих изменений в эпителии шейки матки и сформирует совершенно новые тактические приемы ведения этой группы больных.

Следующий этап наших исследований исходил из предположения, что возможно существование корреляционных отношений между степенью CIN и концентрацией белка E7. Подобная закономерность позволила бы дополнить цитологический скрининг важным диагностическим тестом.

Измерение уровня онкобелка E7 в цервикальных пробах позволяет ответить на следующие вопросы:

- определить стадию развития вирусной инфекции. Повышенный синтез онкобелка E7 указывает на интегративную фазу инфекционного процесса, пр которой уже мало вероятна спонтанная ремиссия;

- высокий уровень E7 достоверно коррелирует с агрессивностью зарождающегося опухолевого процесса и может рассматриваться как неблагоприятный прогностический признак;

Ориентир на уровень онкобелка E7 уже сегодня позволяет сформировать дифференцированные подходы к тактике ведения пациенток с дисплазиями, что, с одной стороны, дает возможность резко сократить затраты, обусловленные необходимостью лечения большого количества дисплазий. С другой стороны, целенаправленно использовать более агрессивные, опережающие виды терапии в ситуациях сформировавшегося канцерогенеза.

Важным этапом наших исследований явилось изучение уровня экспрессии TERT при цервикальных интраэпителиальных неоплазиях и инвазивном раке шейки матки. Обнаруживается существенное, статистически достоверное повышение уровня экспрессии теломеразы при CIN и инвазивном РШМ по сравнению с контрольной группой. При этом, данный показатель в образцах инвазивного РШМ более чем в 2 раза превышал данные, полученные при CIN. Столь значительное увеличение уровня экспрессии теломеразы при цервикальных интраэпителиальных неоплазиях III степени позволяет четко обозначить собственно предраковые изменения и значительно улучшить и облегчить процесс диагностики данной патологии.

Развитие неопластических состояний связано с неспособностью клеток подвергаться апоптозу. Одним из механизмов нарушения гибели трансформированных клеток являются мутация гена p53, что препятствует функционированию белка-индуктора апоптоза p53, и нарушение экспрессии гена bcl-2, тормозящего апоптоз. При дефектном функционировании этих онкобелков происходит накопление клеток с множественными

генетическими изменениями, что может рассматриваться как фактор неблагоприятного прогноза.

Ключевыми регуляторами апоптоза является семейство белков BCL-2. Выключение BCL-2 приводит к массивному p53 зависимому апоптозу. В настоящее время большое внимание уделяется оценке экспрессии мРНК BCL-2 в эпителии шейки матки как потенциального маркера значимых этапов в патогенезе цервикальных интраэпителиальных неоплазий [7]. Функционально связано с ними семейство BAG – (1-6) - группа мультифункциональных генов, взаимодействующих с шаперонами (Hsp70) и ингибирующих их. Одна из функций – связывание с BCL2, рецепторами стероидных гормонов, тем самым, подавляя апоптоз и активируя стероид опосредованную транскрипцию [8]. Универсальным маркером пролиферации считается белок, кодируемый геном Ki-67. Он относится к регуляторным белкам, отражая вступление клетки в митоз. В литературе отмечается, что цервикальные интраэпителиальные неоплазии характеризуются его повышенной экспрессией [9]. Прохождение клетками M-фазы клеточного цикла белок, кодируемый геном CCNB1(Циклин B1). Ряд исследователей обнаружили его гиперэкспрессию при раке шейки матки [10].

Сравнительный анализ м-РНК онкобелка BCL2 в материале неизменной шейки матки, цервикальной интраэпителиальной неоплазии и инвазивного плоскоклеточного рака шейки матки показал снижение его экспрессии в ряду неизмененный эпителий шейки матки - цервикальная интраэпителиальная неоплазия – плоскоклеточный рак. Так, его экспрессия была достоверно ниже при раке шейки матки в сравнении с неизмененным эпителием ($p=0,005$)

В основе образования опухоли лежит избыточная пролиферация определенных клеток, поэтому нарушения регуляции клеточного цикла являются одним из основных механизмов возникновения и развития новообразований.

При исследовании пролиферативной активности – экспрессия м-РНК Ki67, установлено увеличение его значений в ряду неизмененный эпителий

шейки матки - цервикальная интраэпителиальная неоплазия – плоскоклеточный рак.

При этом достоверные отличия получены для групп: неизменный эпителий шейки матки - цервикальная интраэпителиальная неоплазия и цервикальная интраэпителиальная неоплазия – плоскоклеточный рак .

Достоверные отличия (достоверность между 0.1 и 0.05) выявлены для групп цервикальная интраэпителиальная неоплазия – плоскоклеточный рак.

При сравнительном анализе экспрессии м-РНК гена циклина В1(CCNB1) в материале неизменной шейки матки, цервикальной интраэпителиальной неоплазии и инвазивного плоскоклеточного рака шейки матки установлено возрастание его экспрессии в ряду неизменный эпителий шейки матки - цервикальная интраэпителиальная неоплазия – инвазивный плоскоклеточный рак. Достоверно увеличивалась его экспрессия в ряду неизменный эпителий шейки матки - инвазивный плоскоклеточный рак ($p=0,000333$).

Для экспрессии мРНК рецепторов эстрогена в эпителии шейки матки максимальные значения получены в случае цервикальных интраэпителиальных неоплазий. При этом его наименьшие значения характеризовали инвазивный плоскоклеточный рак ($p=0,005831$).

Сравнительный анализ экспрессии мРНК рецепторов прогестерона не выявил достоверных различий между исследуемыми группами.

Таким образом, в неизменном эпителии шейки матки по сравнению с тканью цервикальных интраэпителиальных неоплазий и рака шейки матки анализ соотношения пролиферации и апоптоза выявил наименьшую пролиферативную активность (уровень экспрессии м РНК Ki-67), что подтверждает и минимальная экспрессия Циклина В1. С другой стороны установлены максимальные значения апоптопической активности (уровень экспрессии м РНК BCL2).

В сравнении с неизменным эпителием достоверно выше пролиферативная активность (экспрессия м РНК Ki-67) характеризует группу цервикальных интраэпителиальных неоплазий., что подтверждает и увеличение значений

циклина В1. При оценке апоптотической активности внутри данной группы экспрессия онкобелка BAG также была достоверна выше в сравнении с группой инвазивного плоскоклеточного рака.

Максимальный уровень пролиферативной активности характеризовал группу плоскоклеточного рака шейки матки (уровень экспрессии м РНК Ki-67 и циклина В1).

При анализе маркеров апоптоза установлено, что минимальным был уровень экспрессии м РНК BCL2, что косвенно подтверждают минимальные значения экспрессии рецепторов эстрогена и онкобелка BAG.

Другим перспективным маркером канцерогенеза может стать уровень теломеразной активности при цервикальных интраэпителиальных неоплазиях. В норме клетки делятся ограниченное число раз, прежде чем они достигают биологической старости и подвергаются апоптозу. Репликативный потенциал клеток ограничивается нисходящимися на концах хромосом теломерами. Было установлено, что соматические клетки лишены теломеразной активности. Теломеры оказывают защитное действие, без которого происходят многочисленные повреждения хромосом, активация p53 и других белков, запускающих апоптоз клетки. Сравнительно недавно выяснилось, что активация теломеразы является самым универсальным признаком для эпителиальных опухолевых клеток, что может стать ранним диагностическим критерием канцерогенеза. В наших исследованиях оценена теломеразная активность при цервикальных интраэпителиальных неоплазиях, а также при инвазивном раке шейки матки. В заключении можно сказать, что ориентир на уровень теломеразной активности при CIN может стать дифференцирующим приемом для принятия адекватных терапевтических решений.

А также, полученные результаты позволяют сделать вывод о значительной роли онкобелка E7, как маркера начальных этапов злокачественной неоплазии шейки матки. Несомненно, наибольший клинический интерес представляет выявление E7 при *cr. in situ* (CIN III), а также CIN 1-2.

Эти данные – яркая иллюстрация к новым молекулярно-генетическим технологиям, расширяющим возможности ранней и уточняющей диагностики предрака и рака шейки матки.

ВЫВОДЫ

1. Экспрессия белка E7 при скрининговом обследовании женщин является важным диагностическим критерием неблагоприятного прогноза развития интраэпителиальных неоплазий шейки матки, требующим углубленной диагностики и мониторинга. Отсутствие экспрессии белка E7 даже при морфологическом диагнозе CIN может быть критерием широкого использования консервативных методов лечения и наблюдения.

2. Активность теломеразы значительно увеличивается при дисплазии шейки матки III степени и сохраняется высокой при инвазивном раке шейки матки.

3. Развитие цервикальных интраэпителиальных неоплазий сопровождается увеличением экспрессии генов (Ki 67 (при CIN 0,47 в группе контроля 0,29), CCNB1 (при CIN 0,61 в группе контроля 0,29)), контролирующих пролиферацию и снижением активности генов (BCL2 (при CIN 1,97, в группе контроля 2,64), BAX и BAG (при CIN 1,59, в группе контроля 1,38), контролирующих апоптоз.

4. Определение уровня экспрессия генов циклина В, теломеразы, Ki67 может быть дополнительным диагностическим критерием для дифференциации степени интраэпителиальных неоплазий шейки матки.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Уровень теломеразной активности при CIN дает возможность дифференцировать терапевтическую тактику. Высокий уровень активности теломеразы, циклина В1 и Ki67 являются фактором неблагоприятного прогноза при предраке шейки матки и формируют более активные лечебные мероприятия.

2. Определение ВПЧ при CIN I-III ст. более целесообразно осуществлять в комплексе с изучением уровня онкобелка E7, что позволит более целенаправленно проводить как противовирусную терапию, так и различные диагностические и лечебные воздействия. Во всех ситуациях при положительном анализе E7 необходимо применение опережающих видов терапии.

3. Комплекс стандартных мероприятий при скрининге рака шейки матки в лечебно-профилактических учреждениях необходимо дополнить анализами на онкобелок E7 и определением уровня активности Теломеразы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Адамян Л.В. Сохранение репродуктивной функции у онкологических больных / Л.В. Адамян, К.И. Жордания, С.Ф. Белобородов // Энциклопедия клинической онкологии: Руководство для практических врачей (М.И.Давыдов – ред). – М.: РЛС.-2005. – С.931-937.
2. Аكوпова Н.Б. Возможности рентгеновской денситометрии в диагностике инволюционно-атрофических и гиперпластических процессов у женщин в постменопаузальном периоде. Автореф. дис. ... канд.мед. наук.: 14.00.19, 14.00.01/ РНЦРР.- Москва, 2002.-22с.
3. Анисимов В.Н. Рак у пожилых / В.Н. Анисимов, В.М. Моисеенко, К.П. Хансон.- С-Пб.: ООО Изд-во Н.-Л, 2004.-336с.
4. Антонеева И.И. Экспрессия антигенов вирусов папилломы человека, простого герпеса и фенотип рецепторов эстрогенов и прогестерона в малигнизированных эпителиальных опухолях яичников, Автореф. ... дисс. канд. мед. наук:14.00.14./НИИ онкологии им. Н.Н.Петрова.- СПб., 2003.- 24 с.
5. Аполихина И.А. Папилломавирусная инфекция гениталий у женщин. Под ред. В.И. Кулакова. / И.А. Аполихина - М.: ГЭОТАР-МЕД, 2002.-112с.
6. Артымук Н.В. Ожирение и онкологические заболевания женских половых органов / Н.В. Артымук, Ю.А. Магарилл // Медицина в Кузбассе: Материалы научно-практич. межрегион. конф. Ленинск-Кузнецкий, 2004.-№ 11.-С.27-28.
7. Ашрафян Л.А. Опухоли репродуктивных органов (этиология и патогенез) / Л.А. Ашрафян, В.И. Киселев.-М.: Димитрейд График Групп, 2007.- 216с.
8. Ашрафян Л.А. Патогенетическая профилактика рака репродуктивных органов /Л.А. Ашрафян, В.И. Киселев, Е.Л. Муйжнек.- М.: Молодая гвардия, 2009.-171с.
9. Ашрафян Л.А. Четыре патогенетических варианта изменений в половых органах у женщин в менопаузе / Ашрафян Л.А., Харченко Н.В., Аكوпова Н.Б., Ивашина С. В. // Климактерий, 2001, № 3. - С. 7.

10. Балан В.Е. Нарушения мочеиспускания в климактерии и принципы их лечения / В.Е. Балан, Э.К. Гаджиева.- Русский медицинский журнал.- Т.8, №7.-М.:2000.- С. 284-286.
11. Бассалык А.С. Рецепторы стероидных гормонов в опухолях человека / А.С. Бассалык.- М.: Медицина, 1987. – 224с.
12. Башмакова М.А. Папилломавирусная инфекция / М.А. Башмакова, А.М. Савичева. - Н. Новгород: Издательство НГМА, 2002.-21с.
13. Беляева Л.Е. Гинекологическая эндокринология. Патофизиологические основы./ Л.Е. Беляева, В.И. Шебеко.-М.: Мед. лит., 2009.- 256с.
14. Беркетова Т. Ю. Заместительная гормональная терапия в пери- и постменопаузе : COMPLAINTность пациента / Т.Ю. Беркетова, М.А. Кулыгина, Г.А. Хорошева // Лечащий врач, 2002, N 5. – С. 32-35.
15. Берштейн Л.М. Внегонадная продукция эстрогенов / Л.М. Берштейн.- СПб.: Наука, 1998 – 172с.
16. Берштейн Л.М. Гормональный канцерогенез / Л.М. Берштейн. СПб.: Наука, 2000.- 199с.
17. Берштейн Л.М. Эстрогены, старение и возрастная патология / Л.М. Берштейн // Усп. геронт., 1998, Т. 2.- С. 90-97.
18. Бохман Я.В. Руководство по онкогинекологии / Я.В. Бохман.- СПб.: ООО «Издательство Фолиант», 2002. -542с.
19. Бутрова С.А. Метаболический синдром: патогенез, клиника, диагностика, подходы к лечению / С.А. Бутрова // Русский мед.журн, 2001, Т. 9, № 2.- С.56-60.
20. Вайтрауб Д.Б. Молекулярная эндокринология: фундаментальные исследования и их отражение в клинике: Перевод с англ. / Д.Б. Вайтрауб.-М.: Медицина, 2003.- 496 с.
21. Вишневская Е.Е. Ошибки в онкогинекологической практике / Е.Е. Вишневская, Я.В. Бохман.- Минск.: «Высшая школа», 1994.- 287с.

22. Вихляева Е.М. Постменопаузальная терапия / Е.М. Вихляева.- М.: «МЕДпресс-информ»,2008.- 447с.
23. Ганцев Ш.Х. Патология и морфологическая характеристика опухолевого роста / Ганцев Ш.Х., Хуснутдинов Ш.М.- М.: Медицинское информационное агентство, 2003.-208с.
24. Гинзбург М.М. Ожирение. Влияние на развитие метаболического синдрома. Профилактика и лечение / М.М. Гинзбург, Н.Н. Крюков.- М.: Медпрактика, 2002.- 128с.
25. Глушков А.Н. Общебиологические закономерности и механизмы канцерогенеза / А.Н. Глушков.- Медицина в Кузбассе, 2004, № 1.- С. 3-9.
26. Давыдов М.И. Злокачественные новообразования в России и странах СНГ в 2006 году / М.И. Давыдов, Е.М. Аксель // Вестник российского онкологического научного центра РАМН.-2008.-№2.-Т.19.-пр. 1.-154с.
27. Давыдов М.И. Лекции по онкогинекологии / М.И. Давыдов, В.В. Кузнецов.- М.: МЕДпресс-информ, 2009.- 432 с.
28. Дедов И.И. Ожирение: этиология, патогенез, клинические аспекты / И.И. Дедов, Г.А. Мельниченко.- Москва, 2004.- С. 216-232.
29. Демографический ежегодник России. Статистический сборник.-2007.- М.:Госкомстат.- 551с.
30. Дильман В.М. Большие биологические часы (введение в интегральную медицину) / В. М. Дильман. - 2-е изд., перераб. и доп. - М.: Знание, 1986. - 254 с.
31. Дильман В.М. Четыре модели медицины/ В.М. Дильман.- Л.: Медицина, 1987. – 288 с.
32. Дмитриев Г.А. Папилломавирусная инфекция./ Г.А. Дмитриев, О.А. Биткина.- М: Медицинская книга, 2006.- 80 с.
33. Доброхотова Ю.Э. Сексуальная функция у женщин репродуктивного периода после гистерэктомии / Ю.Э. Доброхотова //Климактерий и менопауза, 1999.-№4.-С. 10-12.

34. Здоровье женщин и менопауза. / Пер. с английского; Гл. редактор Н.К. Венгер.-М.:ГЭОТАГ-МЕД,2004.-528с.
35. Здравоохранение в России. 2008. Стат. сб. / Росстат. – М.: Пр.-изд. комб. ВИНТИ, 2009. - 365с.
36. Зильбер Л.А. Эволюция вирусно-генетической теории возникновения опухолей / Л.А. Зильбер.-М.:Наука, 1975.-286с.
37. Злокачественные новообразования в России в 2006 году (заболеваемость и смертность)./ Под ред. В.И.Чиссова, В.В.Старинского, Г.В.Петровой.-М.: МНИОИ им. П.А. Герцена, 2008.-248с.
38. Ивашина С.В. Значение двухфотонной периферической рентгеновской абсорбциометрии и уровня эстроген-рецепторов в тканях-мишенях в определении патогенетического варианта постменопаузы. Автореф. дис. ... канд. мед. наук. 14.00.19, 14.00.01./ РНЦРР. Москва, 2002.- 21с.
39. Исследование проблем менопаузы в 90-х годах. Доклад на-уч.гр. ВОЗ 866./ М.: Медицина, 1996.-155с.
40. Канцерогенез / Под ред. Д.Г. Заридзе.- М.: Медицина, 2004.-576с.
41. Карселадзе А.И. Некоторые проблемы клинической морфологии эпителиальных опухолей яичников / А.И. Карселадзе // Практическая онкология.-2000.-№4.-С.14-18.
42. Киселев В.И. Этиологическая роль вируса папилломы человека в развитии рака шейки матки генетические и патогенетические механизмы, возможности терапии и профилактики / В.И. Киселев, Л.А. Ашрафян, С.О. Бударина // Акушерство и гинекология, 2004.- Т.6.- № 4.-С. 174-179.
43. Киселев В.И. Этиологическая роль вируса папилломы человека в развитии рака шейки матки: генетические и патогенетические механизмы / В.И. Киселев, О.И. Киселев // Цитокины и воспаление, 2003.- Т. 2.- № 4.- С. 31-38.

44. Киселев В.И. Молекулярные механизмы регуляции гиперпластических процессов./ В.И. Киселев, А.А. Ляшенко.- М.: Изд-во «Димитрейд Грасрик Групп», 2005.- 346 с.
45. Киселев Ф.Л. Вирус-ассоциированные опухоли человека: Рак шейки матки и вирус папилломы / Ф.Л. Киселев // Биохимия, 2000.- № 1.- Т.65.- С. 79-91.
46. Клиническая эффективность заместительной гормонотерапии / В.Н. Серов, В.П. Сметник, В.Е. Балан, Я.З. Зайдиева, Г.А. Мельниченко // Пособие для врачей.-М.-2001.-37с.
47. Кулинский В.Н., Колесниченко Л.С. Молекулярные механизмы действия гормонов. Рецепторы. Нейромедиаторы. Системы со вторыми посредниками / В.Н. Кулинский, Л.С. Колесниченко // Биохимия, 2005.- №.1.- Т.70- С. 33-50.
48. Козлова В.И. Вирусные, хламидийные и микоплазменные заболевания гениталий / В.И. Козлова, А.Ф. Пухнер. –М.: Триада-Х, 2003.-440с.
49. Козаченко В.П. Клиническая онкогинекология: руководство для врачей / В.П. Козаченко.- М.: Медицина, 2005. - 376 с.
50. Копнин Б.П. Мишени действия онкогенов и опухолевых супрессоров: ключ к пониманию базовых механизмов канцерогенеза./ Б.П. Копнин // Биохимия, 2000.- Т.65.- С.5- 33.
51. Кубанов А.А. Современные методы диагностики вируса папилломы человека / А.А. Кубанов // Вестник Дерматологии и венерологии, 2005.-№1.- С. 26-35.
52. Левин Ю.М., Свиридкина Л.П. Эндэкологическая концепция лечения, предотвращения преждевременного старения и вымирания.// Альманах «Геронтология и гериатрия».-2001.-№1.-С. 29-32.
53. Макацария О.Д. Заместительная гормональная терапия: «за и против». Часть I. / О.Д. Макацария, В.О. Бицадзе // Атмосфера. Кардиология, 2003.- №1.- С. 29-33.

54. Максимов С.Я. Факторы риска возникновения злокачественных новообразований органов репродуктивной системы женщин / С.Я. Максимов // *Вопр. Онкологии*, 2003.- Т. 49.- С. 496-501.
55. Манухин И.Б. Заболевания наружных половых органов / И.Б. Манухин, Н.И. Кондриков, Т.П. Крапошина.-М.:МИА, 2002.-303с.
56. Манухин И.Б. Клинические лекции по гинекологической эндокринологии. Руководство для врачей / И.Б. Манухин, Л.Г. Тумилович, М.А. Геворкян .- Москва: Геотар-Мед, 2006.-320с.
57. Манухин И.Б. Здоровье женщины в климактерии / И.Б. Манухин, В.Г. Тактаров, С.В. Шмелева.-М.:Литтерра, 2010.-256с.
58. Мацко Д.Е. Современные методы в практической онкоморфологии / Д.Е. Мацко, К.Е. Шелихова // *Практическая онкология*, 2007.-№4.-Т.8.-С.182-187.
59. Минкина Г.Н. Предрак шейки матки / Г.Н. Минкина, И.Б. Манухин, Г.А. Франк. – Москва: Аэрограф-медиа, 2001.-112с.
60. Неизбежность реформы нормативно-правового регулирования здравоохранения. / А.Г. Аганбегян, Ю.В. Варшавский, В.В. Китаев, В. Д. Жуковский и др // *Экономическая политика*.-2007.- №1.- С.151-160.
61. Никитин Ю.П. Распространенность компонентов метаболического синдрома Х в неорганизованной городской популяции (эпидемиологическое исследование) / Ю.П. Никитин, Г.Р. Казека, Г.И. Симонова // *Кардиология*.- 2001.-№ 9.-С. 37-40.
62. Нечушкина В.М. Заместительная гормонотерапия после лечения злокачественных опухолей женских половых органов. / В.М. Нечушкина, К.Ю. Морхов В.В.Кузнецов // *Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН*, 2007.-Т.18.-№4.- С.13-18.
63. Оловников А.М. Редусомная гипотеза старения и контроля биологического времени в индивидуальном развитии / А.М. Оловников // *Биохимия*, 2003.-Т.68.-Вып. 1.- С. 7-41.

64. Петрова А.С. Роль и место цитологической диагностики в клинической практике/А.С.Петрова, К.А.Агамова, А.Г.Ермолаева// Клиническая лабораторная диагностика.- 1996.- № 4.- С.4-7.
65. Прилепская В.Н. Патогенетические основы ожирения и нарушения репродуктивной функции женщины / В.Н. Прилепская, Е.В. Цаллагова // Акушерство и гинекология, 2006.-№5.- С.51-55.
66. Руководство по эндокринной гинекологии / Под ред. Е.М. Вихляевой.- М.: 2002.-768с.
67. Серов В.Н. Климактерический период: нормальное состояние или патология? / В.Н. Серов.- Рос. Мед. Журнал, 2002.- Т.10.- №18.- С. 791–794.
68. Сметник В.П. Медицина климактерия. / В.П. Сметник.- М.-Литерра, 2006.-848с.
69. Сметник В.П. Современные представления о менопаузальном метаболическом синдроме/ В.П. Сметник, И.Г. Шестакова // Consilium medicum, 2003.- Т.5.-№ 9. -С. 543-546.
70. Стрижаков А.Н. Генитальные инфекции / А.Н. Стрижаков, А.И. Давыдов, О.Р. Баев. -М.: Издательский дом «Династия», 2003.- 140с.
71. Урманчеева Д.Ф. Вопросы эпидемиологии и диагностики рака яичников / Д.Ф. Урманчеева, И.Е. Мешкова // Практическая онкология., 2000.-№4.- С. 7-13.
72. Урманчеева А.Ф. Онкологические вопросы эстрогенной заместительной гормонотерапии (клиническая лекция) / А.Ф. Урманчеева, Л.М. Берштейн, М.М. Бурнина. – СПб.: ОРИОН ФАРМА, 2002. – 20 с.
73. Урогенитальные расстройства в климактерии. Руководство по климактерии / В.Е. Балан, В.П. Сметник, А.С. Анкирская, В.В. Муравьева, Г.Т. Сухих. – М.: Мед.информ.агентство. -2007.-С 194-264.
74. Хансон К.П. Молекулярная генетика рака яичников / К.П. Хансон, Е.Н. Имянитов // Практическая онкология, 2000. -№4.- С.3-6.
75. Хмельницкий О.К., Цитологическая и гистологическая диагностика заболеваний шейки матки / О.К. Хмельницкий.- СПб.: Сотис, 2000.- 333с.

76. Цейтлин О.Я. Минеральная плотность костной ткани, показатели ее метаболизма и кальций-фосфорного обмена у пожилых и старых людей.// Альманах «Геронтология и гериатрия», 2001.-вып.№1.-с49-52.
77. Чазова И.Е. Метаболический синдром. / И.Е.Чазова, В.Б.Мычка // Consilium medicum-2002.- Том 04.- N11-С.587-590.
78. Чижова Г. В. Медицинские аспекты физиологической и индуцированной постменопаузы / Г.В.Чижова, Т.Ф.Алтухова, Л.Ю.Канина, Т.И.Баранова, Л.Ф. Гнатюк // Дальневост. мед. журн, 2000, №3. – С.52-55.
79. Чиссов В.И. Состояние онкологической помощи в России в 2007г./ В.И.Чиссов, В.В.Старинский, Г.В.Петрова.- М.: ФГУ МНИОИ им.П.А.Герцена, 2008.-184с.
80. Чернова Т.О. Методы денситометрического исследования / Т.О.Чернова, В.Я.Игнатков //Вопросы акуш.гинеко. и перинат.,2003.-Т.2.-№1.- С.71-77.
81. Чулкова О.В. Диагностика и лечение фоновых и предраковых заболеваний вульвы / О.В.Чулкова, Е.Г. Новикова, В.В. Соколов, Е.А. Чулкова // Практическая онкология, 2006.-Т.7.-№4.- С. 197-204.
82. Шаталова Т.М. Рак яичников у женщин пожилого и старческого возраста/ Т.М.Шаталова, В.В.Кузнецов, А.Г.Блюменберг, В.А.Горбунова //Вестник РОНЦ им. Н.Н.Блохина РАМН, 2003.- №2.- С.69-71.
83. Шестаков М.В. Дисфункция эндотелия — причина или следствие метаболического синдрома? / М.В. Шестаков // Русский мед. журн., 2001, т. 9, № 2.
84. Шипицына Е.В. Папилломавирусная инфекция: факторы риска цервикальной неопластической прогрессии / Е.В. Шипицына, К.А. Бабкина, Е.А. Оржесковская // Журнал акушерства и женских болезней, 2004. - Т. LIII.- № 3.- С. 38–45.
85. Abu-Abid S. Obesity and cancer. / S. Abu-Abid, A. Szold, J.Klausner // J.Med., 2002.-Vol. 33 (1-4).- P. 73-86.

86. Andreyko J. Concordant suppression of serum immuno-reactive LH. / J. Andreyko, S. Monroe // *J. Clin. Endocrinol. Metab.*-1992, -Vol. 74. -P. 399.
87. Aoki M. Retroviral oncogenes and TOR./ M. Aoki, P.K. Vogt // *Current topics in microbiology and immunology*, 2004.- Vol.279.-P.321-338.
88. Armamento-Villareal R.C. The oxidative metabolism of estrogen modulates response to ERT/HRT in postmenopausal women. / R.C. Armamento-Villareal, N. Napoli, T. Klug, R. Civitelli // *J. Bone*, 2004. -Vol.35.-P. 682-688.
89. Aslan G. Sexual function in women with urinary incontinence / G. Aslan, H. Koseoglu, O. Sadic // *Int. J. Import. Res.*, 2005.-Vol.17.- P. 248-251.
90. Auburn K. Estrogen metabolism and laryngeal papillomatosis a pilot study on dietary prevention / K. Auburn, A. Abramson // *Anticancer research*, 1998. - Vol. 18. -P. 4574-4589.
91. Barnard P. The human papillomavirus Baud V. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives / V. Baud, M. Karin // *Trends Cell Biol.* - 2000. -Vol. 11. -P. 372-377.
92. E7 protein is able to inhibit the antiviral and anti-growth functions of interferon / P. Barnard P., E. Payne, N.A McMillan // *J. Virology*, 2000. -Vol. 277. -P. 411 -419.
93. Becagli L. Hormone receptors in dystrophic and neoplastic vulvar disease / L Becagli, F. Scrimin, D.De Salva // *Preliminary consideration. Clin. exp. Obstet. Gynecol.*, 1983. -Vol. 23, -P. 145-49.
94. Bedell M.A. The E6-E7 region of human papillomavirus type 18 is sufficient for transformation of NIH 3T3 and rat-1 cells / M.A Bedell, K.H Jones, L.A. Laimins // *J Virol.*, 1987. -Vol. 61. -P. 3635-3640.
95. Beral V Evidence from randomised trials on the long-term effects of hormone replacement therapy / V., Beral, E. Banks, G.Reeves // *Lancet*, 2002.- Vol.360.-P.942-944.
96. Berek J. Practical gynecologic oncology / J. Berek, N. Haker // *Cancer Treatment*. 4th ed. Philadelphia:Saunders., 2005. – 908p.

97. Bernard H.U. Transcriptional control and cell type specificity of HPV gene expression / Bernard H.U., D. Apt // Arch. Dermatol., 1994. -Vol. 130. -P. 210-215.
98. Bishop J.M. Cellular oncogenes and retroviruses / J.M. Bishop // Ann.Rev. Biochem.-1983. -Vol.52. -P.301-354.
99. Bishop J.M. Molecular themes in oncogenesis / J.M. Bishop // Cell., 1991. -Vol.64. -P. 235-248.
100. Bjorntorp P. Adipose tissue distribution and function / P. Bjorntorp // int.J. Obes., 1991. -Vol.15(2). -P. 67-81.
101. Bokhman J. Two pathogenetic types of endometrial carcinoma / J. Bokhman // Gynecol. Oncol., 1983. -Vol. 15. -P.10-17.
102. Bosch F.X. The viral etiology of cervical cancer./ F. X.Bosch, N.Munoz // Virus Res., 2002. -Vol.89(2). -P.183-190.
103. Bradlow H.I. Nutrient modulation of female hormone metabolism: Modifying breast cancer risk. In: Functional Medicine Approaches to Endocrine Disturbances of Aging / H.I. Bradlow // Vancouver, British Columbia: Institute of Functional Medicine Proceedings., 2001.-P. 51-53.
104. Bray G. Obesity: a time bomb to be defused / G. Bray //Lancet., 1998.-Vol.68(6).-P. 160-161.
105. Bruning P.F. Insulin resistance and breast cancer risk. / P.F. Bruning, J.M.G. Bonfrer, P.A.H. van Noord, W.J. Nooijen // IntJ.Cancer, 1992. Vol. -Vol.52. -P. 511-516.
106. Bukovsky A. Placental expression of estrogen receptor beta and its hormone binding variant—comparison with estrogen receptor alpha and a role for estrogen receptors in asymmetric division and differentiation of estrogen-dependent cells / A. Bukovsky, M.R. Caudle, M. Cekanova et al. // Reproductive Biology and Endocrinology, 2003. -Vol. 1. -P.36.
107. Burger H.G. A review of hormonal changes during the menopausal transition: focus on findings from the Melbourne Women's Midlife Health Project /

H.G. Burger, G.E. Hale, D.M. Robertson, L. Dennerstein // *Human Reproduction*, 2007. -Vol. 13.-N.6. -P.559-565.

108. Burger H.G. A prospective longitudinal study of serum testosterone, dehydroepiandrosterone sulfate, and sex-hormone-binding globuline levels through the menopause transition / H.G. Burger, Dudley E.C., J. Cui, I. Dennerstein // *J. Clin Endocrinol. Metab.*, 2000.-Vol.85.- P 2832-2838.
109. Butel J.S. Viral carcinogenesis: revelation of molecular mechanisms and etiology of human disease / J.S. Butel // *Cancerogenesis*, 2000.-Vol.21.-P. 405-426.
110. Calle E.E. Postmenopausal hormone use and breast cancer associations differ by hormone regimen and histologic subtype / E.E. Calle, H.S. Feigelson, J.S. Hildebrand, L.R. Teras et al. // *Cancer*, 2009. -Vol. 115(5), -P. 936–945.
111. Cameron I.R. Herpes simplex virus sequences involved in the initiation of oncogenic morphological transformation of rat cells are not required for maintenance of the transformed state / I.R. Cameron, M. Park, B.M. Dutia, A. Orr et al. // *J. Gen. Virol.*, 1985. -Vol.66. -P.517-527.
112. Campisi J. Between Scilla and Charibda: p53 links tumor suppression and aging / J. Campisi // *Mech.Ageing Dev.*, 2002.-Vol.123.-P.567-573.
113. Campos H. Differences in low density lipoprotein subfractions and apolipoproteins in premenopausal and postmenopausal women / H. Campos, J.R. McNamara, P.W. Wilson // *J.Clin. EndocrinolMetab.*, 1988. -Vol.67.-P.30.
114. Chen Z. Within-person variability of the ratios of urinary 2-hydroxyestrone to 16 α -hydroxyestrone in Caucasian women / Z. Chen, W. Zheng, L.M. Dunning, K.G. Anderson, R.S. Parrish, J.L. // *Steroids.*, 1999.-Vol. 64.-P. 856-859.
115. Chong H. Structure and expression of a membrane component of the inhibin receptor system / H. Chong, S.A. Pangas, D.J. Bernard, E.Wang, J. Gitch // *Endocrinology*, 2000.- Vol. 14.-No.7.- P. 2600–2607

116. Clark J.H. Nuclear binding and retention of the receptor estrogen complex: relation to the agonistic and antagonistic properties of estriol / J.H. Clark, Z. Paszko, E.J. Peck // *Endocrinology.*, 1977. -Vol. 100, -P. 91-96.
117. Clemons M. Estrogen and risk of breast cancer / M. Clemons, P. Goss // *N. Engl. J. Med.*, 2001. -Vol.344 (4). -P.276-285.
118. Colditz G.A. Hormone replacement therapy and the risk of breast cancer; results from epidemiologic studies / G.A. Colditz, K.M. Egan, M.J. Stampfer // *Am.J. ObstetGynaecol.*, 1993.-Vol.168. -P.473-1480.
119. Colditz G.A. The use of estrogen and progestins and risk of breast cancer in postmenopausal woman / G.A. Colditz, S.E. Hankinson, D.J. Hunter et al. // *N. English J. Med.*, 1995. -P.1589-1593.
120. Cole C.N. Polyomavirinae: the viruses and their replication / C.N. Cole // In Fields B.N. Knipe, D.M., Hovey, P.M. Chanock, R.M., Melnick J.L, Monath T.P, Roizman B, Straus S.E, Fields *Virology*. 3rd edn. Lippincott-Raven, Philadelphia, P.A., 1996. -Vol.2. -P. 1997-2025.
121. Coop J. Hormonal and nongormonal interventions for menopausal symptoms / J. Coop // *Maturitas*, 1996. -Vol. 23. -P.159-168.
122. Cordozo L. Estriol in the treatment of postmenopausal urgency / L. Cordozo, H. Rekers, A. Tapp // *A multycentral stady. Maturitas*, 1993. -Vol.18(1). -P.47-53.
123. Creasman W.T. Recent advances in endometrial cancer / W.T. Creasman, L.E. Gary // *J. of Surgical Oncology*, 2003.- vol. 6.- I.6.-P.339-342.
124. Crodstein F. Postmenopausal hormone therapy and mortality / F.Crodstein, M.J. Stampfer, C.A. Colditz // *N. Engl. J. Med.*, 1997. -Vol.336. -P. 1769-1775.
125. Cummings S.R. Lifetime risk of hip. Colins or vertebral fracture and coronary heart disease among white postmenopausal women / S.R. Cummings, D.M. Black, S.M. Rubin // *Arch. Intern. Med.*, 1989. -Vol.149.-P.2445-48.
126. Dadmarz R. CD4+T lymphocytes infiltrating human breast cancer recognise autologous tumor in an MHC-class-II restracted fashion / R. Dadmarz,

- M. Sgagias, S. Rosenberg // *Cancer Immunol. Immunother.*, 1995.-Vol.40(1),-P.1-9.
127. Davis D.L. Medical hypothesis: bifunctional genetic-hormonal pathways to breast cancer. / D.L. Davis, N.T. Telang, M.P. Osborne, H.L. Bradlow // *Environ. Health Perspect.*, 1997. -Vol.105. -P.571 -576.
128. Derogatis L.R. The female sexual distress Scale: initial validation of a standardized scale for assessment of sexually related personal distress in women / L.R. Derogatis, R. Rosen, S. Lieblum et al // *Sex. Marital Therapy.*, 2002.-V.28.-P.217-330.
129. De Laet C.E. Fractures in the elderly : epidemiology and demography / C.E. De Laet, H.A. Pols // *Baillities Best Pract. Res Clin. Endocrinol. Metab.*, 2000.-V.14.-No.2.-P.171-179.
130. Dennerstein L. A prospective population-based study of menopausal symptoms / L. Dennerstein, E.C. Dudley, J.L. Hopper et al. // *Obstet. Gynecol.*, 2000. -Vol.96. N.3.-P.351-358.
131. Dennerstein L. Modeling women's health during the menopausal transition: a longitudinal analysis / L. Dennerstein, P. Lehert, J.R. Guthrie, H.G. Burger // *Menopause*, 2007.-V.14.-P.1-10
132. DePinho R.A. The age and cancer / R.A. DePinho // *Nature*, 2000.-Vol.408.-P.248-254.
133. Dolle M.E.T. Mutational fingerprints of aging / M.E.T. Dolle, W.K. Snyder, D.B. Dunson, J. Vijg // *Nucleic Acids Res.*, 2002.-Vol.30.-P.545-549.
134. Dunne E.F. Prevalence of HPV infection among females in the United States./ E.F. Dunne, E.R. Unger, M. Sternberg, G. McQuillan et al // *JAMA.*, 2007.-Vol.297.-P.813-819.
135. Dupont E. The prognostic value of altered estrogen metabolism in breast cancer / E. Dupont, T. Klug, C. McCann, D. Vincent, A. Shons et al // Abstract 53rd Annual Cancer Symposium, Society of Surgical Oncology. March 16-19, New Orleans, LA, USA. *Ann. Surg. Oncol.*, 2000. -Vol.7(1). Suppl.

136. Dyson N. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product / N. Dyson, P.M. Howley, K. Munger, E. Harlow // *Science*. -1986. -Vol. 243. -P. 934-937.
137. Eifel P.J. Gynecologic cancer / P.J. Eifel, D.M. Gershenson, J.J. Kavanagh, E.G. Silva. - USA: Springer, 2006. – 289 p.
138. Eiken P. Continuous combined Hormone Replacement Therapy for osteoporosis 10 year data on Klibgest/ P. Eiken // *Eur. Menopause J.*, 1996. -Vol.3. -P.141-146.
139. Efeyan A. p53: guardian of the genome and policeman of the oncogenes / A. Efeyan, M. Serrano // *J.Cell cycle.*, 2007.-Vol.6.-No.10.- P. 1006-1010.
140. Engeland A. Height, body mass index, and ovarian cancer / A. Engeland, S. Tretli, T. Bjorge // *J. Natl. Cancer Inst.*, 2003. -Vol.95.- N.16.-P.1244-1248.
141. Enmark E. Human estrogen-receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern / E. Enmark, M. Peltö-Huikko et al. // *J.Clin.Endocrinol. Metab.*, 1997. -Vol.82.-P.4258-4265.
142. Enzi G. et al. Bone mineral density and body composition in underweight and normal elderly subjects, // *Osteopor.Int.*, 2000. -Vol. 11(12). -P. 1043-1050.
143. Epstein M. Historical background; Burkitt's Lymphoma and Epstein-Barr virus/ M. Epstein // *IARC Sci Publ.*, 1985. Vol. 60. -P 17-27.
144. Eriksen E.F. Evidence of estrogen receptor in normal human osteoblast-like cells / E.F. Eriksen, D.S. Colvard, N.J. Berg et al.// *Science.*, 1988. -P.241-84.
145. Faddy M. Accelerated disappearance of ovarian follicles in mid-life: implications for forecasting menopause / M. Faddy, R.Y. Gosden, A. Gougeon // *Hum.Re-prod.*, 1992. -Vol.7.-P.1342
146. Falk R.T. Urinary Estrogen Metabolites and Their Ratio among Asian American Women / R.T. Falk, T.R. Fears, X. Xu, R.N. Hoover et al. // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2005.-Vol.14.-P. 221-226.
147. Ferrell R.J. Monitoring reproductive aging in a 5-year prospective study: aggregate and individual changes in steroid hormones and menstrual cycle lengths

with age Menopause./ R. J. Ferrell, K. A. O'Connor, G. Rodríguez, T. Gorrindo et al // J. of The North American Menopause Society, 2005.- Vol. 12.- No. 5.-P. 567-577

148. Finch E.C. The regulation of physiological changes during mammalian aging, Q. Rev. Biol. / E.C. Finch, 1976.- Vol. 51.-N.1.- P. 49-83.
149. Fisher D.A. Endocrinology. Test Selection and Interpretation. Fourth Edition / D.A. Fisher// Gonadal Function.- USA: Quest Diagnostics Incorporated, 2007.- P.8-10.
150. Fishman J. Oxidative metabolism of estradiol / J. Fishman, H.I. Bradlow, T.F. Gallagher // J. Biol. Chem., 1960. -Vol.235. -P.3104-3107.
151. Fishman J. The role of estrogen in mammary carcinogenesis / J. Fishman, M.P. Osborne, N.T. Telang // Ann. NY Acad. Sci., 1995. -Vol.768. -P.91-100.
152. Ford E. Prevalence of the Metabolic syndrome among US Adults / E. Ford, W. Giles, W. Dietz // JAMA., 2002. -Vol.287. -P.356-359.
153. Ford C.H. Impact of Molecular Biology on Cancer Treatment: I Therapeutic Targets / C.H. Ford // Kuwait Medical Journal., 2003. -Vol.35(4). -P.253-262.
154. Fowke J.H. Urinary estrogen metabolites and breast cancer: differential pattern of risk found with pre- versus post-treatment collection / J.H. Fowke, D. Qi, H.L. Bradlow, X.O. Shu, Y.T. Gao, J.R. Cheng et.al.// J. Steroids, 2003.- Vol.68.- P. 65-72.
155. Franco E.L. Epidemiologic evidence and human papillomavirus infection as necessary cause of cervical cancer / E.L.Franco, T.E. Rohan, L.L.Villa. //J.Nat.Cancer Inst., 1999.-Vol.91.-P.506-511.
156. Frankenfeld C.L. Serum steroid hormones, sex hormone-binding globulin concentrations, and urinary hydroxylated estrogen metabolites in post-menopausal women in relation to daidzein-metabolizing phenotypes/ C.L. Frankenfeld, A. McTiernan, S.S. Tworoger, C. Atkinson, W.K. Thomas et al // J. Steroid Biochem. Mol Biol., 2004.-Vol. 88.-P.399-408

157. Frasor J. Profiling of estrogen up- and down-regulated gene expression in human breast cancers cells: insights into gene networks and pathways underlying estrogenic control of proliferation and cell phenotype / J. Frasor, J.M. Danes, B. Komm et al // *Endocrinology.*, 2003. -Vol.144. -P.4562-4574.
158. Fuller A. Uterine cancer / A. Fuller, M. Seiden, R. Young R.- London: Martin Dunitz., 2004.- 230p.
159. Genazzani A.R. Hormone replacement therapy and cancer / A.R. Genazzani // *The Current Status of Research and Practice/* Paryhenon Publishing Group., 2002. -P.281.
160. Gethmann U. Effect of 2-hydroxyoestrone on lutropin (LH) and follitropin (FSH) secretion in the ovariectomized primed rat / U. Gethmann U., R. Knuppen // *Hoppe-Seyler'sZ. Physiol. Chem.*, 1976. -Vol.357.-P.1011-1013.
161. Gillum R. Body fat distribution, obesity, overweight and stroke incidence in women and men: the NHANES I Epidemic Follow-up Study / R. Gillum, M. Mussolino, J. Madans // *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.*, 2001. -Vol.25.-P. 628-638.
162. Ginsburg E.S. Half-life of estradiol in postmenopausal women / E.S. Ginsburg, X. Gao, B.F. Shea, R.L. Barbieri // *Gynecol. Obstet. Invest.*, 1998. - Vol.45.-P.45-48.
163. Ghosh S. Missing pieces in the NF-B puzzle / S. Ghosh, M. Karin // *J. Cell*, 2002. -Vol.109. -P.81-96.
164. Gold E.B. Factors associated with age at natural menopause in a multiethnic sample of midlife women / E.B. Gold, J. Bromberger, S. Crawford et al // *Am.J.Epidemiol.*, 2001.-Vol.153.-P.865-874.
165. Gomperts B.D. Signal Transduction / B.D. Gomperts, Kramer I.M., Tatham PER // Elsevier Academic Press, USA, Orlando, Florida. -2003. -P. 257-392.
166. Gordon J. Steroids and lipid metabolism: The hypocholesteremic effect of estrogen metabolites / J. Gordon, W. Cantrall, H. Alberts et al. // *J. Steroids.*, 1964. -Vol.4. -P.267-291.

167. Gosden R. Follicular status at menopause / R. Gosden // *J. Hum. Reprod.*, 1987. -Vol.2.-P.617.
168. Gtannini S.L. Cytokine expression in squamous intraepilheial lesions of the uterine cervix: impications for the generation of local immunos uppression / S.L. Gtannini et al // *Clin. Exp. Immunol.*, 1998. -Vol.113.-P.183-189.
169. Gupta J. Association of human papillomavirus type 16 with neoplastic lesion of the vulva and other genital sites by in sity hybridization / J. Gupta, S. Piltti, F. Rilke, K. Shan // *Am.J. Pathol.*, 1987.-Vol.127.-P.206-215.
170. Gustafsson J.A., Warner M. Estrogen receptor in the breast: role \n+ estrogen responsiveness and development of breast cancer / J.A. Gustafsson, M. Warner // *J. Steroia Biochem. Mol. Biol.*, 2000. -Vol.74.-P.245-248.
171. Harlan W. Secular trends in body mass in the United States / W. Harlan, J. Landis, K. Regal // *Am.J.Epidemiol.*, 1988. -Vol.128.-P.1065.
172. Hachisuga T. Human papillomavirus and p53 overexpression in carcinomas of uterine cervix, low uterine segment and endometrium / T. Hachisuga, N. Matsuo, T. Iwasaka Et al // *Pathology.*, 1996.-Vol.28.-P.28-31.
173. Hasegava M. Expression of p21/WAF-1/ status of apoptpsis and p53 mutation in esophageal squamous cell carcinoma with HPV infection / M. Hasegava, I. Ohoka, K. Yamazaki Et al. // *J. Pathol.Int.*, 2002 -Vol.52.-P. 442-450.
174. Hauner H. Plasma concentration of TNFa and its soluble receptors in obese subjects / H. Hauner, M. Bender, F. Hube // *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.*, 1998. -Vol.22.-P.1239-43.
175. Hebert-Croteau N.A. A meta — analysis of hormone replacement therapy and colon cancer in women / N.A. Hebert-Croteau // *Cancer Epidemiol. Biomark.and Prevent.*, 1998.-Vol.7. -P.653-660.
176. Hee J. Perimenopausal patterns of gonadotropins, immunoreactive inhibin, estradiol and progesterone / J. Hee, J. MacNaughton, M. Banhag // *Maturitas.*, 1993. -Vol.18. -P. 9.
177. Henderson B.E. Hormonal cancerogenesis / B.E. Henderson, H.S. Feigelson // *Cancerogenesis*, 2000.-Vol.21.-P.427-433.

178. Hess G. Changes in mechanisms of hormone and neurotransmitter action during aging: current status of the role receptor and postreceptor alteration / G. Hess, G.S. Roth // *Mech. Ageing Dev.*, 1982. -Vol.20(3). -P.175-194.
179. Hildesheim A. Host and viral genetics and risk of cervical cancer/ A. Hildesheim, S.S. Wang // *Virus Res.*, 2002.-Vol.89.-P.229-240/
180. Ho G.H. Using 2/16 alpha-hydroxyestrone ratio: correlation with serum insulin-like growth factor binding protein-3 and a potential biomarker of breast cancer risk / G.H. Ho, X.W. Luo, C.Y. Ji, S.C. Foo, G.H. Ng // *Ann Acad. Med. Singapore.*, 1998.-Vol. 27. -P. 294-299.
181. Hoskins W. J. Principles and practice of gynecologic oncology /W.J. Hoskins, C.A. Perez, R.C. Young, R. Barracat et al // USA: Fourth edition Lippincot Williams & Wilkins, Philadelphia, 2005. -PP.3-33, 561-586.
182. Im A. Urinary estrogen metabolites in women at high risk for breast cancer / A. Im, V.G. Vogel, G. Ahrendt, S. Lloyd et al. // *Carcinogenesis.*, 2009. -Vol.30.-N.9. -P. 1532-1535.
183. Imreh S. Mechanisms of oncogene perturbation. In Peters G. Vousdeb K.H: *Oncogenes and tumor suppressors* / S. Imreh, L. Szekely, K.G. Wiman, G. Klein // UK: Oxford University Press, 1997. -P.3-32.
184. Isaacs S. Hormonal balance: understanding hormones, weigh, and your metabolism / S.Isaacs, T. Leopold // Bull Publishing Company., 2002. - P. 397.
185. International Agency for Research on Cancer. / IARC Biennial Report 2008-2009.- Leon:Cedex 08., 2009. -145p.
186. International Expert Consensus on Primary Therapy of Early Breast Cancer / Switz. St Gallen., 2009.- 23p.
187. Jee S.H. Polymorphysm p53 codon-72 and invasive cervical cancer: meta analysis / S.H. Jee, S.Y. Won, J.E. Yun et al. // *Int.J.Gynaecol.Obstet.*, 2004. - Vol.85.- N.3. -P.301-308.
188. Jonsson F. Obesity and hormon-dependent tumors / F. Jonsson, A. Wolck, N. Pedersen et al. // *Int J Cancer*, 2003. -Vol.106(4).-P.594-599.

189. Iversen T. Intraepithelial and invasive squamous cell neoplasia of the vulva / T. Iversen, S. Tretli // *Obstet. And Gyn.*, 1998. -Vol.91. -P. 969-972.
190. Kaaks R. Effects of weight control and physical activity in cancer prevention: role of endogenous hormone metabolism / R. Kaaks, A. Lukanova // *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2002.- Vol. 96.- P. 3268-3281.
191. Kaaks R. Obesity, endogenous hormones and endometrial cancer risk: synthetic review / R. Kaaks, A. Lukanova, M. Kurzer // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2002. -Vol.11(12).-P.1531-43.
192. Kabat G.C. Urinary estrogen metabolites and breast cancer: a case-control study./ G.C. Kabat, C.J.Chang, J.A. Sparano et al. // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 1997. -Vol.6. -P.505-509.
193. Kaelin W.J. Functions of retinoblastoma protein / W.J. Kaelin // *Bioessay*, 1999.-Vol.21.-P. 950-958.
194. Katiyar S. Polymorphism of the p53 codon 72 Arg/Pro and risk of HPV type 16/18-associated cervical and oral cancer in India. / S. Katiyar, B.K. Thelma, N.S. Murthy et al. // *Mol.Cell. Biochem.*, 2003.-Vol. 252(1-2).-P. 117-124.
195. Kaufman J.M. Pharmacokinetics of oestrogens and hormone replacement therapy / J.M. Kaufman // *Gur. Menopause J.*, 1997. -Vol. 4. -P. 14-22.
196. Khan S.A. Estrogen receptor expression in benign breast epithelium and breast cancer risk / S.A. Khan, M.A.M. Rogers, K.K. Khurana et al, // *J.Nat.Cancer Inst.*, 1998. -Vol. 90. -P.37-42.
197. Klein-Hitpass L. Specific binding of estrogen receptor to the estrogen response element / L. Klein-Hitpass, S.Y. Tsai, G.L. Greene, J.H.Clark et al // *Mol. Cell. Biol.*, 1989.-Vol.9.-No.1.-P.43-49.
198. Klein N.A. Decreased inhibin B secretion in associated with the monotrophic FSH rise in older ovulatory women: a study of serum and follicular fluid levels of dimeric inhibin A and B in spontaneous menstrual cycles. Kirschner M.A. In *Breast Cancer 3, Advances in Research and Treatment* / N.A. Klein, P.J. Illingworth, N.P. Groome // *J. Clin.Endocrinol. Metab.*, 1996.-Vol.81.-P.2742-2745.

199. Krtolica A. Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth ~~and~~ tumorigenesis: a link between cancer and aging / A. Krtolica, S. Parinello, ~~S.~~ Loskett et al // Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 2001.-Vol.98.-P.12072-12077.
200. Kuchta K.F. Pathophysiologic changes of obesity / K.F. Kuchta // ~~J.~~ Anesthesiology Clin. N. Am., 2005.- Vol.23.-P.421-429.
201. Kuller L.H. Estrogens and women's health: Interrelation of coronary ~~heart~~ disease, breast cancer, and osteoporosis / L.H. Kuller, K.A. Matthews, E. ~~N.~~ Meilhan // J Steroid Biochem. Mol. Biol., 2000.-Vol. 74.-P. 297-309.
202. Labrie F. Is dehydroepiandrosterone a hormone? / F. Labrie, V. Luu-~~The~~e, A. Belanger, S.X. Lin, J. Simard, G. Pelletier, C.J. Labrie // Endocrinol., 200~~5~~.- Vol. 187.- P: 169-196.
203. Lacey J. Obesity as a potential risk factor for adenocarcinoma ~~and~~ squamous cell carcinomas of the uterine cervix. / J. Lacey, C. Swanson et al. // Cancer, -2003. -Vol.15.- N.98.- N.4. -P.814-21.
204. Lai C. HPV in benign and malignant ovarian and endometrial tissues / ~~C.~~ Lai, S. Hsueh, C. Lin et al. // Int. Gyn. Pathol., 1992. -Vol.1. -P.210-215.
205. Lange C.A. Hypothesis: progesterone primes breast cancer cells for ~~cross~~-talk with proliferative or antiproliferative signals / C.A. Lange, J.K. Richer, K. ~~B.~~ Horwitz // Mol. Endocrinol., 1999. -Vol.13. -P. 829-836.
206. Lapinska-Szumczyk S. Obesity, hypertension and diabetes melitus ~~in~~ patients with endometrial cancer / S. Lapinska-Szumczyk, Emerich Janusz ~~//~~ Gynecol. Pol., 2003. -Vol.74.- N.4. -P.274-277.
207. Laughlin G.A. Hysterectomy, oophorectomy, and endogenous sex hormone levels in older women: the Rancho Bernardo Study / G.A. Laughlin, E. Barrett-Connor, D. Kritz-Silverstein, D. von Muhlen // J. Clin. Endocrinol. Metab., 200~~0~~.- Vol. 85.-N.2.-P. 645-51.
208. Lauritzen C., Studd J. Current management of the menopause / ~~C.~~ Lauritzen, J. Studd // Taylor & Frances., 2005. -P.448.
209. Leelawattana R. The oxidative metabolism of estradiol conditions ~~post~~-menopausal bone density and bone loss / R. Leelawattana, K. Ziambaras ~~//~~ J.

- Roodman-Weiss, C. Lyss et al // *J. Bone Miner. Res.*, 2000. -Vol.15.-P. 2513-2520.
210. Lehn H. Physical state and biological activity of human papillomavirus genomes in precancerous lesions of the female genital tract / H. Lehn, L.L. Villa, F. Marziona, M. Hilgarth, H.G. Hillemans, G. Sauer // *J Gen Virol.*, 1988. -Vol. 69. -P.187-196.
211. Lechner M.S. Inhibition of p53 tumor suppressor gene / M.S. Lechner, L.A. Laimins // *Nature.*, 1991.-Vol.351.-P.453-456.
212. Lin S.C. Regulation of the gp 80 and gp 130 subunits of the IL-6 receptors by sex steroids in the murine bone marrow / S.C. Lin, T. Yamate, Y. Taguchi et al. // *J. Clin. Invest.*, 1997. -Vol.100(8). -P. 1980-1990.
213. Lippman M.E. Autocrine and paracrine growth regulation of human breast cancer / M.E. Lippman, R.B. Dickson, S. Bates // *Breast Cancer Res. Treat.*, 1986. - Vol.7.- P.59-70.
214. Littman A.J. Association between late age at infectious mononucleosis, Epstein-Barr virus antibodies, and ovarian cancer risk / A.J. Littman, M.A. Rossing, M.M. Madeline et al // *Scand.J. Infect.Dis.*, 2003.-Vol.35.-P.728-735.
215. Liehr J.D. Hormone-associated cancer: mechanistic similarities between human breast cancer and estrogen-induced kidney carcinogenesis in hamsters / J.D. Liehr // *Environmental health perspectives*, 1997.- Vol.105.-Suppl.3.-P.565-569.
216. Liu H-P. Epstein-Barr virus latent membrane protein / H.-P. Liu, Y.-S.Chang // *J. Biomed.Sci.*, 2003. -Vol.10.-N.5. -P. 490-504.
217. Liu M. Epstein-Barr Virus latent membrane protein 1 represses p53-mediated DNA repair and transcriptional activity / M. Liu, Y. Chang, S. Chen // *Oncogen.*, 2005. -Vol. 24(16). -P. 2635-2646.
218. Longscope C. Endocrine Function of the Postmenopausal Ovary / C. Longscope // *J. of the Society for Gynecologic Investigation*, 2001.-Vol. 8.- No. 1. - P. S67-S68.
219. Lopez V. Epstein-Barr virus-associated cancer / V. Lopez, L. Young, P. Murray // *Aetiology and Treatment. Herpes.*, 2003. -Vol. 10,-N.3. -P. 78-82.

220. Lord R.S. Estrogen metabolism and the diet-cancer connection: rationale for assessing the ratio of urinary hydroxylated estrogen metabolites / R.S. Lord, B. Bongiovanni, J.A. Bralley // *Altern Med Rev.*, 2002. -Vol.7. -P.12-29.
221. Lőríc A.T. Human papillomavirus infection of cervix: relative risk associations of 15 common anogenital types / A.T. Lőríc, R. Reid, A.B. Jenson // *Obstet.Gynecol.*, 1992.-Vol 79.-P.328-337.
222. Lotinun S. Comparative effects of long-term continuous release of 16alpha-hydroxyestrone and 17beta-estradiol on bone, uterus, and serum cholesterol in ovariectomized adult rats / S. Lotinun, K.C. Westerlind, A.M. Kennedy, R.T. Turner // *J. Bone*,2003.-Vol. 33.-P. 124-31.
223. Lover R.R.. Effects of Tamoxifen on bone marrow density in postmenopausal women with breast cancer / R.R. Lover, R.B. Mazess, H.S. Barden et al. // *N. Engl. J.Med.*, 1992. -Vol.336. -P. 852-856.
224. Lurie G. Association of genetic polymorphisms with serum estrogens measured multiple times during a 2-year period in premenopausal women / G. Lurie, G. Maskarinec, R. Kaaks, F.Z. Stanczyk, L. Le Marchand // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2005.-Vol.14.-P. 1521-1527.
225. Lustig R. Obesity and Cancer / R. Lustig, H. Bradlow. In *Medical Care of the Cancer Patients*, ed. by Sai-Ching Jim Yeung, Carmen P. Escalante, Robert F. Gagel // BC Decker Inc., 2009. -Vol 25. P 216-225..
226. MacNaughton J. Age related changes in follicle stimulating hormone, luteinizing, hormone, estradiol and immunoreactive inhibin in women of reproductive age / J. MacNaughton, M. Banah, P. McCloud // *Clin. Endocrinol.*, 1992. -Vol.36. -P.339.
227. Mahmud N. Vulvar dystrophy: a clinical follow-up / N. Mahmud, T. Murakami, Y. Gyotoku et al. // *Asia Oceania J. Obstet. Gynaecol.*, 1992, -Vol 18(3). -P.231-238.
228. di Maio D. Viricrin transformation: the intersaction between viral transforming protein and cellular signal transduction pathway / D. di Maio, C. Lai, O. Klein // *Annu. Rev. Microbiol.*, 1998. -Vol. 52. -P. 397-421.

229. Manolitsas T. Synchronous ovarian and cervical squamous intraepithelial neoplasia: an analysis of HPV status / T. Manolitsas, S. Lanham, A. Hitchcock, R. Watson // *Gynec. Oncol.*, 1998. -Vol. 70. -P.428-431.
230. Marsh M.S. Hormone replacement Therapy and the Menopause / M.S. Marsh, J. Compston // Martin Dunitz Ltd., 2002. -P.43-59.
231. Mas S. Cancer, genes, and catechol estrogen metabolites/ S. Mas, N. Laso, M.J. Lafuente, A. Lafuente, R. Molina et al // *Int. Journal of Clinical Oncology.*, 2003. -Vol.8(1). -P'1341-9625.
232. Matlashewski G. Human papillomavirus type 16 DNA cooperation with activated ras transforming primary cells / G. Matlashewski, J. Schneider, L. Banes, N. Jones, A. Murray, L. Granford // *EMBO J.*, 1987. -Vol.6. -P.1741 -1746.
233. Matzuk M.M. Editorial: In Search of Binding—Identification of Inhibin Receptors / M.M. Matzuk // *Endocrinology*, 2000.- Vol.141.- No.7.-P.2281-2284.
234. Matthews C.E. Physical activity, body size, and estrogen metabolism in women / C.E. Matthews, J.H. Fowke, Q. Dai, L.H. Bradlow et al // *Cancer Causes Control.*, 2004.-Vol. 15.-P. 473-481.
235. McCance D.J. The biology of E7 protein of HPV 16. In *Papillomavirus research from natural history to vaccines and beyond* Ed. by M. Saveria Campo / D.J. McCance // Gr. Britain: Caister Academic Press, 2006.- P.133-144.
236. McDonnell D.P. Connections and Regulation of the Human Estrogen Receptor / D.P. McDonnell, J.D. Norris // *Science*, 2002.- Vol. 296.- No. 5573.- P. 1642 - 1644
237. Meng Q. Indole-3-carbinol is a negative regulator of estrogen receptor-alpha signaling in human tumor cells / Q. Meng, R. Yuan, I.D. Goldberg // *J. Nutr.*, 2000. -Vol.130. -P.2927-2931.
238. Michnovicz J.J. Increased estrogen 2-hydroxylation in obese women using oral indole-3-carbinol / J.J. Michnovicz // *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.*, 1998. -Vol.22. -P.227-229.
239. Miller R.A. Gerontology as oncology / R.A. Miller // *Cancer*, 1991.- Vol.68.-P.2496-2501.

240. Modugno F. Epidemiology Obesity, hormone therapy, estrogen metabolism and risk of postmenopausal breast cancer / F. Modugno, E.K. Kevin, B. Cochrane, L. Kuller, T.L. Klug et al // *Int.J.of Cancer.*, 2005.-Vol.18.is.105.-p.1292-1301.
241. Montenarh M. Biochemical properties of the growth suppressor/oncoprotein p53 / M. Montenarh // *Oncogene*, 1992.-Vol.7.-P. 1673-1680.
242. Moodley M. The role of steroid contraceptive hormones in the pathogenesis of invasive cervical cancer: a review / M. Moodley, J. Moodley, R. Chetty, C.S. Herrington // *Int. J. Gynecol Cancer*, 2003. -Vol.13.- N.2. -P.103-110.
243. Mori M. Recent progress in epidemiologic research of uterine cancer / M. Mori, S. Sagae // *Gan To Kagaku Ryoho*, 2001.-Vol. 28.- P.174-178.
244. Mosselman S. ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor / S. Mosselman, J. Polman, R. Dijkema // *FEBS Lett.*, 1996. -Vol.392(1). -P. 49-53.
245. Mueck A.O. Estrogen-dependent Neoplasia - What is the significance of estradiol metabolites / A.O. Mueck, H. Seeger, T.H. Lippert // *Zentralbl. Gynakol.*, 2003.-Vol. 125.-P. 458-66.
246. Muir L. C. Cancer lence in five continents / L.C. Muir, J. Waterhouse, T. Mack, J. Powell, S. Whelan S. et al // *France:International Agency for Can-b.*, 1987. -Vol. 5. -P. 88.
247. Munger K. The role of human papillomaviruses in human cancer / K. Munger // *Front. Biosci.*-2002.-Vol.7.-P.d641-d649.
248. Muti P. Estrogen metabolism and risk of breast cancer: a prospective study of the 2:16alpha-hydroxyestrone ratio in premenopausal and postmenopausal women / P. Muti, H.I. Bradlow, A. Micheli et al. // *J. Epidemiology.*, 2000. -Vol.11. -P.635-640.
249. Napoli N. Effect of CYP1A1 Gene Polymorphisms on Estrogen Metabolism and Bone Density/ N. Napoli, D.T. Villareal, S. Mumm, L. Halstead, S. Sheikh et al // *J. Bone Miner. Res.*, 2005.-Vol.20.-P. 232-239.
250. Nees M. Papillomavirus type16 oncogenes downregulate expression of interferon-responsive genes and upregulate proliferation-associated NF-kB-

- responsive genes in cervical keratinocytes/ M. Nees // J. Vrd., 2001. -P. 4283-4296.
251. Nevins J.R. Cell transformation by viruses. In Fields B.N., Knipe D.M., Hovey P.M. Chanock R.M., Melnick J.L., Monath T.P., Roizman B., Straus S.E. / J. R. Nevins, P.K. Vogt // Fields Virology. 3rd edn. Lippincott-Raven, Philadelphia, P.A., 1996.- Vol.2. -P. 301-343.
252. Newcomb P.A. Long-term hormone replacement therapy and risk of breast cancer in postmenopausal women/ P.A.Newcomb, M.P.Longnecker, B.E.Storer et al // Am. J. Epidem., 1995. -Vol.142. -P.788-795.
253. Nilsson S. Mechanisms of estrogen actions / S. Nilsson, S Macela, E. Treuter, M.Tujague, J. Tomsen // Physiol. Rev., 2001.-Vol.81.-No.4.-P.1535-1565.
254. O'Connor K.A. Menstrual cycle variability and the perimenopause. / K.A. O'Connor, D.J. Holman, J.W. Wood // Am. J. Hum.Biol., 2001.-Vol.13.- P.465-478.
255. de Oliveira W.R. Assosiation of p53 arginine polymorphism with skin cancer / W.R. de Oliveira, P.L. Rady, J. Grady et al. //Im.J. Dermatol., 2004. -Vol. 43.-N.7. -P.489-93.
256. Ostor A.G. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review./ A.G.Ostor// Int J Gynecol Pathol, 1993.-Vol. 12 (2).-P.186-192.
257. Oren M. P53: The ultimate tumor suppressor gene / M. Oren // FASEB J., 1992.-Vol. 6.-P.3169-3176.
258. Papanicolaou D. Interleukin-6: the endocrine cytokine / D. Papanicolaou // J.Clin. Endocrinol. Metab., 2000. -Vol.85. -P.1331-1333.
259. Park J.S. Inactivation of interferon regulatory factor-1 tumor suppressor protein by HPV E7 oncoprotein. Implication for the E7-mediated immune evasion macharism in cervical carcinogenesis / J.S. Park et at // J. Biol. Chem. -2000. -P. 6764-6769.
260. Parker E. International weight loss and incidence of obesity-related cancer / E. Parker, A. Folsom // the Iowa Women,s Health Study, Int.J.Obes.Relat.Metab.Disord., 2003. -Vol.Dec.27(12). -P.1447-1452.

261. Parkin D.M. The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002 / D.M. Parkin. // *Int J Cancer*, 2006.- Vol. 118.- No.12.- P. 3030-3044.
262. Persson I. The risk of endometrial and breast cancer after estrogen treatment. A review of epidemiological studies / I. Persson // *Acta Obstet. Gynecol. Scand. Suppl.*, 1985. -Vol.130. -P.59-66.
263. Peto J. Cancer epidemiology in the last century and the next decade / J. Peto // *Nature*, 2001.-Vol.411.-P.390-395.
264. Pfister H. Papillomaviruses: Particles, genom organization and proteins. In *Papillomavirus and human disease* / H. Pfister, P.G. Fuchs. Ed. K. Sujanen, L. Glissman, L.G. Koss // Ger.: Springer, Heidelberg., 1990.-P. 1-18.
265. Phelps W.C. Human papillomavirus: molecular targers and prospects` for antiviral therapy / W.C. Phelps, J.A. Barnes, D.C. Loba // *International Antiviral news*, 1999.-Vol.7.-P.4-7.
266. Pins M. Cervical squamous cell carcinoma in situ with intraepithelial extension to upper genital tract and invasion of tube and ovaries: report of case with human papilloma virus analysis / M. Pins, R. Young, C. Crum // *Int. J.Gynecol. Patol.*, 1997. -Vol.16. -P.272-278.
267. Pinzger G. Diagnosis and therapy of vulvar dystrophy. // G. Pinzger, K. Heim K. et al. // *Gynacol. Rundsch.*, 1991. -Vol.31. -Suppl.2. -P.225-229.
268. Pitot H.C. Fundamentals of oncology. Fourth edition revised and expanded / H.C. Pitot, D.D. Loeb // New-York: Marcer Dekker, Inc., 2002. – 998p.
269. Ponten J. Precancer of human cervix. Precancer: Biology, Importance and possible prevention / J. Ponten, Z. Guo // *Cancer Surveys*, 1998.-Vol.32.-P. 201-229.
270. Raab-Traub N. Epstein-Barr virus, lymphoproliferative diseases and nasopharyngeal carcinoma / N. Raab-Traub // UK.: Oxford University Press, Oxford, 1999. -P.180-206.

271. Rask E. Tissue-specific dysregulation of Cortisol metabolism in human obesity / E. Rask, T. Olson, S. Soderberg // *J Clin. Endocrinol. Metab.*, 2001. - Vol.86. -P.1418-1421.
272. Ravussin E. Pathophysiology of obesity / E. Ravussin, B.A. Swinburn // *Lancet.*, 1992. -P.340-404.
273. Rees M. *The Menopause: What you need to know.* / M. Rees, D.W. Purdie, S. Hope // UK.: British Society of Menopause., 2006. -P. 8-23.
274. Reid I.R. Determinants of total body and regional bone mineral density in normal postmenopausal women — a key role for fat mass / I.R. Reid, R. Ames, M.C. Evans, S. Sharpe et al. // *Journ. of din. endocrin. and metabolism*, 1992. - Vol.75. -P.45-51.
275. Reznik R:H. *Cancer of the ovary* / R.H. Reznik // UK.: Cambridge University Press, 2007. – 176 p.
276. Riza E. Urinary estrogen metabolites and mammographic parenchymal patterns in postmenopausal women / E. Riza, I. dos Santos Silva, B. De Stavola, H.L. Bradlow et al. // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2001. -Vol.10: -P. 627-634.
277. Roger P. Decreased Expression of Estrogen Receptor Protein in Proliferative Preinvasive Mammary / P. Roger, M.E. Sahla, S. Makela et al. // *Tumors Cancer Research.*, 2001. -Vol.61. -P.2537-2541.
278. Ross J.S. Breast cancer biomarkers and molecule medicine / J.S. Ross, G.P. Linette, J. Stec et al. // *Expert Rev. Mol. Diagn.*, 2003. -Vol.3.-N.5. -P. 573-585.
279. Rubin H. Selected cell and selective microenvironment in neoplastic development / H. Rubin // *Cancer Res.*, 2001.-Vol.61.-P.799-807. Salazar E.L. Relationship between estradiol 16 α -hydroxylation and human papillomavirus infection in cervical cell transformation / E.L. Salazar, E. Mercado, I. Sojo, M. Salcedo // *J. Gynecological Endocrinology*, 2001.-Vol.15.-Is.5.-P.335-340.
280. Saville M.K. Regulation of p53 by the ubiquitin-conjugating enzymes UbcH5B/C in vivo. / M.K. Saville, A. Sparks, D.P. Xirodimas, J. Wardrop et al // *J. Biol. Chem.*, 2004.-Vol. 279.-No.40.- P.42169-42181.

281. Scully R. Tumors of the Ovary, Maldeveloped Gonads, Fallopian Tube, and Broad Ligament: Atlas of Tumor Pathology (Afip Atlas of Tumor Pathology No. 23) / R. Scully, R. Young, P. Clement // American Registry of Pathology, 1 ed., 1999. – 527p .
282. Sherman B. The menopausal transition / B. Sherman, J. West, S. Korenman // J.Clin. Endocrin.Metab., 1976.- Vol.42.- P. 629.
283. Seavey S.E. The E7 oncoprotein of human papillomavirus type 16 stabilizes p53 through a mechanism independent of p19 (ARF) / S.E. Seavey, M. Holubar, L.J. Sausedo, M.E. Perry // J. Virol.-1999.-Vol.73.-P. 7590-7598.
284. Seidell J. The worldwide epidemic of obesity / J. Seidell // 8th International congress on obesity, London., 1999. -P.661-668.
285. Schneider H.P.J. Menopause. The State of the Art – in research and management / H.P.J. Schneider // The Panthenon publishing group, 2003. -540p.
286. Segars J.H. Estrogen action and cytoplasmic signalling cascades. Part 1, membrane associated signalling complexes / J.H. Segars, P.H. Driggers // TRENDS Endocrinol Metab.,2002.-Vol.13.-No.8.-P.349-354.
287. Settnes A. Hysterectomy in a Danish cohort. Prevalence, incidence and sociodemographic characteristics/ A. Settnes, T. Jorgensen // Acta Obstet.Gynec.Scand., 1996.-Vol.75.-P.274-280.
288. Shenk T. Adenoviridae: the viruses and their replication. Fields Virology. 3rd edn./ T. Shenk In B.N. Fields, D.M. Knipe, P.M. Hovey, R.M. Chanock et al. // USA: Philadelphia, P.A, 1996. -Vol.2. -P. 2111-3674.
289. Schiffman M.N. Epidemiology of cervical human papillomavirus infection M.N. Schiffman // Curr.Top.Microbiol.Immunol., 1994. -Vol186. -P.55-81.
290. Schneider A. Distribution pattern of human virus 16 genome in cervical neoplasia by molecular in situ hybridization of tissue sections / A. Schneider, T. Olterdorf, V. Schneider, L. Gissmann // Int J Cancer., 1987. -Vol.39.-P.717-21.