

# Белки противоопухолевого иммунного цикла и ВПЧ-статус у больных с предраком (HSIL) и раком шейки матки

Е.В. Каюкова<sup>✉</sup>, Т.Е. Белокриницкая, С.В. Романюк

ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Минздрава России, Чита, Россия

## Аннотация

**Обоснование.** Рак шейки матки (РШМ) является частой злокачественной опухолью среди женщин во всем мире. Противоопухолевый иммунный цикл (ПИЦ) – необходимый молекулярный механизм, препятствующий формированию и развитию опухоли. Известно, что при развитии РШМ возникают механизмы, нарушающие работу ПИЦ, способствующие опухолевой прогрессии. В последнее время в литературе появляются данные об изучении роли вируса папилломы человека (ВПЧ) в регуляции ПИЦ как механизма формирования резистентности опухоли к противоопухолевому иммунному ответу.

**Цель.** Изучить уровень белков ПИЦ (sCD25, 4-1BB, B7.2, TGF- $\beta$ 1, CTLA-4, PD-L1, PD-1, Tim-3, LAG-3, Galectin-9, sCD27, PD-L2) у больных с предраком (HSIL) и РШМ в зависимости от особенностей ВПЧ-статуса.

**Материалы и методы.** В проспективное исследование включены пациентки репродуктивного возраста с HSIL (n=53) и РШМ I–III стадий (n=93). Контрольная группа – женщины-добровольцы без наличия патологии шейки матки (n=30). Материал для исследования – цервикальный эпителий. Методы исследования: проточная цитометрия, диагностика с помощью метода полимеразной цепной реакции ВПЧ-статуса и вирусной нагрузки. Статистическая обработка осуществлялась с применением пакета программ IBM SPSS Statistics Version 25.0 методами непараметрической статистики.

**Результаты.** Полученные данные указывают на увеличение уровня экспрессии ингибиторов ПИЦ: PD-1, PD-L2 у больных РШМ с ВПЧ-инфекцией, sCD27 у больных РШМ с моноВПЧ-инфекцией. Статистически значимых различий по уровням белков ПИЦ в зависимости от величины вирусной нагрузки ВПЧ у больных с HSIL, у пациенток с РШМ не выявлено.

**Заключение.** Установлено влияние ВПЧ-инфекции и ее вида на регуляцию экспрессии некоторых белков ПИЦ, что является одним из механизмов опухолевой прогрессии.

**Ключевые слова:** HSIL, рак шейки матки, противоопухолевый иммунный цикл, вирус папилломы человека

**Для цитирования:** Каюкова Е.В., Белокриницкая Т.Е., Романюк С.В. Белки противоопухолевого иммунного цикла и ВПЧ-статус у больных с предраком (HSIL) и раком шейки матки. Гинекология. 2022;24(6):525–528. DOI: 10.26442/20795696.2022.6.201977

© ООО «КОНСИЛИУМ МЕДИКУМ», 2022 г.

ORIGINAL ARTICLE

## Antitumor immune cycle proteins and HPV status in patients with HSIL and cervical cancer

Elena V. Kayukova<sup>✉</sup>, Tatiana E. Belokrinitskaya, Svetlana V. Romanyuk

Chita State Medical Academy, Chita, Russia

## Abstract

**Background.** Cervical cancer (CC) is a common malignant tumor among women worldwide. The anti-tumor immune cycle (AIC) is a necessary molecular mechanism that prevents the occurrence and progression of a tumor. It is known that during the development of CC, several mechanisms disrupt the AIC and contribute to tumor progression. Recent data show the role of human papillomavirus (HPV) in the AIC regulation as a mechanism for the emergence of tumor resistance to the anti-tumor immune response.

**Aim.** To study the levels of AIC proteins (sCD25, 4-1BB, B7.2, TGF- $\beta$ 1, CTLA-4, PD-L1, PD-1, Tim-3, LAG-3, Galectin-9, sCD27, PD-L2) in patients with high-grade squamous intraepithelial lesion (HSIL) and CC, depending on the HPV status.

**Materials and methods.** A prospective study enrolled women of reproductive age with HSIL (n=53) and stage I–III CC (n=93). The control group included female volunteers without cervical abnormalities (n=30). The study material was the cervical epithelium. Study methods: flow cytometry, diagnostics using the polymerase chain reaction for HPV status and viral load. Statistical processing was performed using the IBM SPSS Statistics version 25.0 software package using non-parametric statistics methods.

**Results.** The obtained data indicate an expression increase of AIC inhibitors: PD-1 and PD-L2 in patients with HPV infection and sCD27 in patients with mono-HPV infection. There were no significant differences in the levels of AIC proteins, depending on the HPV viral load in patients with HSIL and CC.

**Conclusion.** The effect of HPV infection and its type on regulating the expression of specific AIC proteins has been established, which is one of the mechanisms of tumor progression.

**Keywords:** HSIL, cervical cancer, anti-tumor immune cycle, human papilloma virus

**For citation:** Kayukova EV, Belokrinitskaya TE, Romanyuk SV. Antitumor immune cycle proteins and HPV status in patients with HSIL and cervical cancer. Gynecology. 2022;24(6):525–528. DOI: 10.26442/20795696.2022.6.201977

## Информация об авторах / Information about the authors

<sup>✉</sup>Каюкова Елена Владимировна – канд. мед. наук, зав. каф. онкологии ФГБОУ ВО ЧГМА. E-mail: elena\_pochta22@mail.ru; ORCID: 0000-0002-4682-1811

Белокриницкая Татьяна Евгеньевна – д-р мед. наук, проф., зав. каф. акушерства и гинекологии педиатрического фак-та повышения квалификации и профессиональной переподготовки специалистов ФГБОУ ВО ЧГМА, засл. врач РФ. E-mail: tanbell24@mail.ru; ORCID: 0000-0002-5447-4223

Романюк Светлана Владимировна – канд. мед. наук, зав. лаб. молекулярной генетики Научно-исследовательского института молекулярной медицины ФГБОУ ВО ЧГМА. E-mail: romanyuks2013@mail.ru

<sup>✉</sup>Elena V. Kayukova – Cand. Sci. (Med.), Chita State Medical Academy. E-mail: elena\_pochta22@mail.ru; ORCID: 0000-0002-4682-1811

Tatiana E. Belokrinitskaya – D. Sci. (Med.), Prof., Chita State Medical Academy. E-mail: tanbell24@mail.ru; ORCID: 0000-0002-5447-4223

Svetlana V. Romanyuk – Cand. Sci. (Med.), Chita State Medical Academy. E-mail: romanyuks2013@mail.ru

Рак шейки матки (РШМ) является частой злокачественной опухолью среди женщин во всем мире [1]. В России в 2021 г. грубый показатель заболеваемости составил 19,5 на 100 тыс. женского населения [2]. РШМ представляет собой стадийный процесс, развивающийся путем малигнизации интраэпителиальных поражений высокой степени (HSIL). Одним из главных триггеров, потенцирующих развитие как HSIL, так и РШМ, является вирус папилломы человека (ВПЧ) канцерогенного риска, детектируемый в 70–100% случаев [3].

После революционного открытия Джеймсом Аллисоном и Тасуку Хондзе успешного использования иммунотерапии в онкологии появляется все больше публикаций, касающихся изучения противоопухолевого иммунного цикла (ПИЦ) и возможностей использования этих данных в клинической практике [4–6].

ПИЦ происходит в иммунологическом синапсе – месте контакта опухолевой клетки, клеток иммунной системы и клеток опухолевого микроокружения. Последовательность взаимодействий между указанными клетками и представляет собой ПИЦ. Этапы ПИЦ: высвобождение антигенов опухолевыми клетками, антиген-презентация, дифференцировка Т-лимфоцитов, миграция Т-лимфоцитов к опухолевой клетке, инфильтрация опухоли, распознавание и уничтожение опухолевых клеток [5].

В последнее время в литературе появляются данные об изучении роли ВПЧ в регуляции ПИЦ как механизма формирования резистентности опухоли к противоопухолевому иммунному ответу, прогрессированию злокачественного процесса. Однако при РШМ имеющиеся сведения ограничиваются изучением лишь отдельных белков ПИЦ и не касаются исследования уровня экспрессии ПИЦ в зависимости от ВПЧ-инфицирования [7].

**Цель исследования** – изучить уровень белков ПИЦ (sCD25, 4-1BB, B7.2, TGF- $\beta$ 1, CTLA-4, PD-L1, PD-1, Tim-3, LAG-3, Galectin-9, sCD27, PD-L2) у больных с HSIL и РШМ в зависимости от особенностей ВПЧ-статуса.

## Материалы и методы

В проспективное исследование включены пациентки с морфологически подтвержденными диагнозами HSIL (n=53, средний возраст – 32,2±5,6 года) и РШМ I–III стадий (n=101, средний возраст – 38,2±9,0 года), проходившими обследование и лечение на базе ГУЗ «Забайкальский краевой онкологический диспансер».

Критерии включения в исследование: морфологически подтвержденный диагноз HSIL или РШМ, выполненная процедура полного клинического обследования согласно действующим профильным клиническим рекомендациям [8, 9], репродуктивный возраст, подписанное согласие пациентки (форма утверждена локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО ЧГМА), отсутствие воспалительных заболеваний органов женской репродуктивной системы.

Контрольную группу составили женщины-добровольцы без наличия патологии шейки матки, что подтверждено цитологическим исследованием по Папаниколу (n=30, средний возраст – 40,0±3,2 года). Исследуемые группы сопоставимы по сопутствующей патологии.

Материал для исследования – цервикальный эпителий, методика забора которого соответствовала рутинной практике забора цитологического материала посредством щетки (cervex-brush) с зоны трансформации.

Методом проточной цитометрии CytoFLEX LX (Beckman Coulter, США) с использованием панели HU Immune Checkpoint Panel 1- S/P (10-plex) w/FP (Канада) изучали следующие белки ПИЦ: sCD25, 4-1BB, B7.2, TGF- $\beta$ 1, CTLA-4, PD-L1, PD-1, Tim-3, LAG-3, Galectin-9, sCD27, PD-L2.

ВПЧ-статус определяли путем тестирования с помощью метода полимеразной цепной реакции в режиме реально времени (амплификатор детектирующий «ДТпрайм», Россия) отделяемого цервикального канала для выявления качественного и количественного определения ВПЧ высокого онкогенного риска (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59).

Вирусная нагрузка (ВН) градировалась: низкая клинически малозначимая – ВН<3 lg копий/10<sup>5</sup> клеток; умеренная клинически значимая ВН 3–5 lg копий/10<sup>5</sup> клеток; высокая – ВН≥5 lg копий/10<sup>5</sup> клеток.

При проведении статистического анализа авторы руководствовались едиными требованиями для рукописей, подаваемых в биомедицинские журналы, и рекомендациями «Статистический анализ и методы в публикуемой литературе» (SAMPL) [10].

Статистическая обработка осуществлялась с применением пакета программ IBM SPSS Statistics Version 5.0 (International Business Machines Corporation, license No. Z125-3301-14, США) методами непараметрической статистики с расчетом критерия Краскела–Уоллиса с определением критерия значимости *p*. Подгрупповой анализ прово-

**Таблица 1. Локальный уровень белков ПИЦ у больных с HSIL и РШМ в зависимости от ВПЧ-статуса (Me [25; 75-й перцентили]), пг/мл**  
**Table 1. The local level of the anti-tumor immune cycle (AIC) proteins in patients with high-grade squamous intraepithelial lesion (HSIL) and cervical cancer (CC) depending on human papillomavirus (HPV) status (Me [25; 75th percentile]), pg/mL**

Группа	HSIL		РШМ		Статистическая значимость
	ВПЧ- (n=11)	ВПЧ+ (n=42)	ВПЧ- (n=19)	ВПЧ+ (n=74)	
Показатель, пг/мл					
4-1BB	25,8 [17,2; 34,7]	18,2 [51,5; 97,7]	24,6 [18,5; 30,8]	46,7 [40,2; 53,2]	U <sub>1</sub> =208,5 p <sub>1</sub> =0,017 U <sub>2</sub> =512,5 p <sub>2</sub> =0,037
PD-1	93,3 [65,4; 121,2]	33,6 [55,0; 100,0]	36,7 [24,2; 49,3]	67,3 [58,4; 76,1]	U <sub>1</sub> =321,5 p <sub>1</sub> =0,725 U <sub>2</sub> =504,0 p <sub>2</sub> =0,031
PD-L2	33,5 [28,9; 52,2]	65,4 [48,6; 82,1]	16,9 [15,4; 21,4]	40,3 [34,5; 46,1]	U <sub>1</sub> =313,0 p <sub>1</sub> =0,613 U <sub>2</sub> =369,0 p <sub>2</sub> =0,001

Примечание. Здесь и в табл. 2: указаны только статистически значимые величины; индекс 1 для U и p – значения для HSIL; индекс 2 для U и p – значения для РШМ.

**Таблица 2. Локальный уровень белков ПИЦ у больных с HSIL и РШМ в зависимости от варианта ВПЧ-инфекции (Me [25; 75-й перцентили]), пг/мл****Table 2. The local level of AIC proteins in patients with HSIL and CC depending on HPV infection type (Me [25; 75th percentile]), pg/mL**

Группа	HSIL		РШМ		Статистическая значимость
	моноВПЧ (n=20)	микстВПЧ (n=22)	моноВПЧ (n=78)	микстВПЧ (n=35)	
Показатель, пг/мл					
sCD27	27,4 [24,0; 30,8]	21,3 [17,9; 21,9]	38,3 [34,2; 42,4]	17,0 [14,6; 19,5]	U <sub>1</sub> =60,0 p <sub>1</sub> =0,257 U <sub>2</sub> =98,5 p <sub>2</sub> =0,019

дился путем попарного сравнения исследуемых показателей с применением U-критерия Манна–Уитни. Различия считались статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

### Результаты

ВПЧ выявлен у 80,2% у больных с HSIL и у 80% пациенток с РШМ. Преобладающим генотипом в обеих клинических группах стал серотип ВПЧ 16. Статистически значимых различий по частоте встречаемости отдельных генотипов ВПЧ среди исследуемых групп не выявлено.

В группе HSIL наиболее часто встречалась микстВПЧ-инфекция: 57,8% против 47,3% при РШМ ( $\chi^2=8,11$ ;  $p=0,017$ ).

У больных РШМ ВН оказалась выше в 1,5 раза ( $\chi^2=139,7$ ;  $p < 0,001$ ) и составила 5,97 [5,0; 6,0] lg копий/105 клеток.

Отличия по содержанию белков ПИЦ в зависимости от ВПЧ статуса выявлены только у больных РШМ. Повышение локальных величин 4-1BB, PD-1, PD-L2 на 89,8% ( $p=0,037$ ), 83,4% ( $p=0,031$ ), в 2,4 раза ( $p=0,001$ ) соответственно выявлено у больных РШМ с ВПЧ+ статусом (табл. 1).

У больных РШМ с микст-ВПЧ-инфекцией выявлено снижение локальной величины sCD27 на 55,6% ( $p=0,019$ ); табл. 2.

Статистически значимых различий по уровням белков ПИЦ в зависимости от величины ВН ВПЧ у больных с HSIL и у пациенток с РШМ не выявлено.

### Обсуждение

Нарушение регуляции ПИЦ является одной из причин опухолевой прогрессии [4–6]. Низкая иммуногенность опухоли, нарушение презентации антигена, нарушение межклеточного взаимодействия путем экспрессии ингибиторов ПИЦ, блокирование хемотаксиса лимфоцитов, атипичный метаболизм опухолевых и иммунных клеток являются только частью примеров механизмов блокирования ПИЦ, что потенцирует опухолевый рост [5].

Имеются сведения о том, что при HSIL и РШМ ВПЧ канцерогенного риска могут оказывать влияние на течение ПИЦ. В частности, в ВПЧ-позитивных образцах тканей РШМ уровень экспрессии ингибиторов ПИЦ – PD-L1 и PD-1 – положительно коррелирует с высоким уровнем белка P16INK4a, низким содержанием провоспалительных цитокинов [7].

В настоящем исследовании мы впервые изучили локальный уровень комплекса белков ПИЦ в зависимости от ВПЧ-статуса у больных с HSIL и РШМ.

Полученные данные указывают на увеличение уровня экспрессии ингибиторов ПИЦ; PD-1, PD-L2 у больных РШМ с ВПЧ-инфекцией, sCD27 у больных РШМ с моно-ВПЧ-инфекцией.

Взаимосвязи между величиной ВН ВПЧ и показателями локальных уровней белков ПИЦ у больных с HSIL и РШМ не выявлено. Прогностическое и диагностическое значение ВН ВПЧ в настоящее время окончательно не определено и активно обсуждается исследователями. Ряд авторов ука-

зывают на необходимость определения не количественной ВН, а степени интеграции ВПЧ [11].

### Заключение

Таким образом, актуальной задачей современности являются дальнейшие исследования по изучению влияния ВПЧ-инфекции на механизмы регуляции ПИЦ с целью улучшения понимания механизмов развития РШМ и совершенствования методов лечения, главным образом для больных генерализованным и рецидивирующим РШМ.

**Раскрытие интересов.** Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

**Disclosure of interest.** The authors declare that they have no competing interests.

**Вклад авторов.** Авторы декларируют соответствие своего авторства международным критериям ICMJE. Все авторы в равной степени участвовали в подготовке публикации: разработка концепции статьи, получение и анализ фактических данных, написание и редактирование текста статьи, проверка и утверждение текста статьи.

**Authors' contribution.** The authors declare the compliance of their authorship according to the international ICMJE criteria. All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published and agree to be accountable for all aspects of the work.

**Информированное согласие на публикацию.** Пациенты подписали форму добровольного информированного согласия на публикацию медицинской информации.

**Consent for publication.** Written consent was obtained from the patients for publication of relevant medical information and all of accompanying images within the manuscript.

**Соответствие принципам этики.** Протокол исследования был одобрен локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО ЧГМА (протокол №2 заседания от 26 сентября 2017 г.). Одобрение и процедуру проведения протокола получали по принципам Хельсинкской конвенции.

**Ethics approval.** The study was approved by the local ethics committee of Chita State Medical Academy (Minutes №2 of the meeting dated September 26, 2017). The approval and procedure for the protocol were obtained in accordance with the principles of the Helsinki Convention.

**Источник финансирования.** Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых МК-6143.2018.7 (соглашение №075-02-2018-547).

**Funding source.** The study was supported by a grant from the President of the Russian Federation for government support of young Russian scientists МК-6143.2018.7 (agreement №075-02-2018-547).

**Литература/References**

1. SEER Incidence Data, 1975–2019. National Cancer Institute. Surveillance, Epidemiology, and End Results. Available at: <https://seer.cancer.gov/data/> Accessed: 01.05.2022.
2. Каприн А.Д., Старинский В.В., Шахзадова А.О. Состояние онкологической помощи населению России в 2021 году. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2020 [Kaprin AD, Starinskii VV, Shahzadova AO. Sostoianie onkologicheskoi pomoschi naseleniiu v 2021 godu. 2020 (in Russian)].
3. Globocan Cancer today. Available at: <https://gco.iarc.fr/> Accessed: 01.08.2022.
4. Четверяков А.В., Цепелев В.Л. Роль мембранного белка t-лимфоцитов ctla-4 в регуляции иммунитета и иммунотерапии опухолей. *Забайкальский медицинский вестник*. 2020;4:206-14 [Chetveryakov AV, Tsepelev VL. Role of the t-lymphocyte membrane protein ctla-4 in regulating immunity and immunotherapy of tumor. *Zabaikal'skii medicinskii vestnik*. 2020;4:206-14 (in Russian)].
5. Малышев И.Ю., Буданова О.П., Бахтина Л.Ю. Рак предстательной железы и возможности иммунотерапии. *Патогенез*. 2019;17(2):4-15 [Malyshev IYu, Budanova OP, Bakhtina LYu. Prostate cancer and possibilities of immunotherapy. *Pathogenesis*. 2019;17(2):4-15 (in Russian)]. DOI:10.25557/2310-0435.2019.02.4-15
6. Ашрафян Л.А., Белокриницкая Т.Е., Каюкова Е.В., и др. Локальный уровень белков контрольных точек иммунного цикла у больных раком шейки матки. *Забайкальский медицинский вестник*. 2021;4:11-20 [Ashrafyan LA, Belokrinitskaya TE, Kayukova EV, et al. The local level checkpoint proteins of immune cycle in patients with cervical cancer. *Zabaikal'skii medicinskii vestnik*. 2021;4:11-20 (in Russian)].
7. Yang W, Lu YP, Yang YZ, et al. Expressions of programmed death (PD)-1 and PD-1 ligand (PD-L1) in cervical intraepithelial neoplasia and cervical squamous cell carcinomas are of prognostic value and associated with human papillomavirus status. *J Obstet Gynaecol Res*. 2017;43(10):1602-12. DOI:10.1111/jog.13411
8. Ашрафян Л.А., Новикова Е.Г., Тюляндина А.С., и др. Клинические рекомендации Министерства здравоохранения Российской Федерации «Рак шейки матки»: утверждены Министерством здравоохранения Российской Федерации в 2020 г. (пересмотр каждые 3 года). 2020. Режим доступа: [https://oncology-association.ru/wp-content/uploads/2020/09/rak\\_shejki\\_matki.pdf](https://oncology-association.ru/wp-content/uploads/2020/09/rak_shejki_matki.pdf). Ссылка активна на 01.11.2022 [Ashrafyan LA, Novikova EG, Tyulyandina AS, et al. Klinicheskie rekomendacii Ministerstva zdavoohraneniya Rossijskoj Federacii "Rak shejki matki": approved by the Ministry of Health of the Russian Federation in 2020 (reviewed every 3 years). 2020. Available at: [https://oncology-association.ru/wp-content/uploads/2020/09/rak\\_shejki\\_matki.pdf](https://oncology-association.ru/wp-content/uploads/2020/09/rak_shejki_matki.pdf). Accessed: 01.11.2022 (in Russian)].
9. Адамян Л.В., Аполихина И.А., Артымук Н.В., и др. Клинические рекомендации Министерства здравоохранения Российской Федерации «Цервикальная интраэпителиальная неоплазия, эрозия и эктропион шейки матки»: утверждены Министерством здравоохранения Российской Федерации в 2020 г. (пересмотр каждые 3 года). 2020. Режим доступа: [https://oncology-association.ru/wp-content/uploads/2020/09/rak\\_shejki\\_matki.pdf](https://oncology-association.ru/wp-content/uploads/2020/09/rak_shejki_matki.pdf). Ссылка активна на 02.10.2022 [Adamian LV, Apolihina IA, Artymuk NV, et al. Klinicheskie rekomendacii Ministerstva zdavoohraneniya Rossiiskoï Federacii "Cervikal'naia intraepitelial'naia neoplaziia, eroziia i ektropion sheiki matki": approved by the Ministry of Health of the Russian Federation in 2020 (reviewed every 3 years). 2020. Available at: [https://oncology-association.ru/wp-content/uploads/2020/09/rak\\_shejki\\_matki.pdf](https://oncology-association.ru/wp-content/uploads/2020/09/rak_shejki_matki.pdf). Accessed: 02.10.2022 (in Russian)].
10. International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals: writing and editing for biomedical publication. *Haematologica*. 2004;89(3):264.
11. Киселева В.И., Крикунова Л.И., Любина Л.В., и др. Количественная нагрузка вируса папилломы человека 1 типа и прогнозирование эффективности лечения рака шейки матки. *Радиация и риск*. 2011;20(2):58-63 [Kiseleva VI, Krikunova LI, Lyubina LV, et al. Quantitative loading of human papillomavirus type 1 and prediction of the effectiveness of cervical cancer treatment. *Radiaciia i risk*. 2011;20(2):58-63 (in Russian)].

Статья поступила в редакцию / The article received: 14.11.2022

Статья принята к печати / The article approved for publication: 16.12.2022