

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Гладчук Василь Ігорович

УДК: 618.146:618.1-022.7:578.827.1]-073(043.3)

ОПТИМІЗАЦІЯ ДІАГНОСТИКИ ПАТОЛОГІЇ ШИЙКИ МАТКИ,
АСОЦІЙОВАНОЇ З ПАПІЛОМАВІРУСНОЮ ІНФЕКЦІЄЮ

14.01.01 – акушерство і гінекологія

Магістерська робота на здобуття ступеню магістра

Науковий керівник

доцент кафедри акушерства та
гінекології №1

к.м.н. Марічерета В.Г.

Одеса – 2013

ЗМІСТ

СПИСОК СКОРОЧЕНЬ.....	4
ВСТУП.....	5
РОЗДІЛ 1. Сучасні аспекти розвитку диспластичних процесів шийки матки.....	10
1.1 Епідеміологія цервікальних інтраепітеліальних неоплазій.....	10
1.2 Роль ВПЛ та експресії пухлинних супресорів у розвитку раку шийки матки.....	11
1.2.1 Особливості біологічної дії папіломавірусів, пов'язані із канцерогенезом.....	12
1.2.2 Фактори ризику неопластичної прогресії.....	14
1.3 Роль STAT-3 в канцерогенезі раку шийки матки.....	16
1.4 Етіопатогенетичний зв'язок між запаленням і онкогенезом.....	17
1.4.1 Запалення і пухлинний ріст.....	22
1.4.2 Запалення і метастазування.....	25
1.5. Сучасні підходи до діагностики ранішніх форм диспластичних процесів шийки матки	26
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	28
2.1 Загальна характеристика досліджуваних жінок.....	28
2.2 Клініко-лабораторні дослідження.....	32
2.2.1 Методика проведення кольпоскопії.....	32
2.2.2 Методика проведення цитологічного дослідження.....	35

2.3.1 Лабораторні методи діагностики.....	36
2.3.1.1 Визначення ВПЛ та інфекцій статевих органів за допомогою полімеразної ланцюгової реакції.....	36
2.3.1.2 Бактеріоскопічне дослідження.....	40
2.4. Методика біопсії, конусоподібної ексцизії (електроконізація \ ножова конізація) шийки матки.....	41
2.5. Методика вестернблоттінгу (Western Blotting).....	44
2.6 Статистичні методи.....	45
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ КОМПЛЕКСНОГО ОБСТЕЖЕННЯ ДОСЛІДЖУВАЛЬНИХ ГРУП.....	47
3.1 Клінічна характеристика обстежених хворих.....	47
3.2 Результати дослідження експресії пухлинного супресора Stat3 у зразках здорових тканин жінок контрольної групи, без патології шийки матки з валідізацією відносно екстракту клітин Hela.....	51
3.3 Результати дослідження експресії пухлинного супресора Stat3 у хворих із доброякісними та передраковими процесами шийки матки у залежності від статусу ВПЛ-інфікування.....	55
3.4 Результати дослідження експресії пухлинного супресора Stat3 у хворих із доброякісними, передраковими та злоякісними процесами шийки матки у залежності від статусу ВПЛ-інфікування.....	56
РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ ТА ОБГОВОРЕННЯ ОДЕРЖАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ...60	
ВИСНОВКИ.....	68
ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ.....	69
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	70

СПИСОК СКОРОЧЕНЬ

ВГС – вірусний гепатит С

ВПЛ - вірус папіломи людини

ГПВІ - генітальна папілома вірусна інфекція

ДК – дендритні клітини

ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота

ІЛ - інтерлейкіни

ІПСШ – інфекції, що передаються статевим шляхом

ПВІ - папіломавірусна інфекція

ПВЛ – папіломавірусна інфекція людини

РШМ - рак шийки матки

CD – кластери диференціювання

CIN – цервікальна інтраепітеліальна неоплазія

Ig – імуноглобуліни

NK – натуральні кілери

STAT-3 – сигнальний трансдуктор і активатор транскрипції 3

Th – Т-лімфоцити (хелпери)

TNF – фактор некрозу пухлини

ВСТУП

Останні десятиріччя в Україні спостерігається несприятлива епідеміологічна ситуація щодо захворювань, які передаються статевим шляхом (ЗПСШ). Провідне місце в структурі захворюваності на ЗПСШ займає генітальна папіломавірусна інфекція (ГПВІ). Це обумовлено високою контагіозністю вірусів папіломи людини (ВПЛ) і тенденцією до росту цього захворювання. На сьогоднішній день отримані переконливі докази того, що ВПЛ є однією з основних причин злоякісних трансформацій шийки матки (Шевчук О.В., 2003).

За даними ВООЗ щорічно у світі віруси папіломи людини викликають до 500 000 нових випадків раку шийки матки (РШМ) і щорічно близько 240 000 жінок помирають. В Україні щорічно реєструється понад 10 тис. випадків захворювань ГПВІ. Але, згідно з наявними даними, неможливо вірогідно оцінити стан проблеми в цілому й здійснити навіть наближене прогнозування епідеміологічної картини поширення ВПЛ серед населення України, тому що вивчення поширеності ГПВІ й носійство вірусу ВПЛ в Україні практично не піддавалися об'єктивним оцінкам. За даними Національного канцер-реєстру (2008), щороку в Україні від РШМ помирають близько 2 230 жінок, з них близько 500 – працездатного віку. За статистичними даними, РШМ нині посідає друге місце за частотою серед онкологічних причин смертності після раку молочної залози (Чайка В.К. та ін., 2010)

Факт інфікування ВПЛ є обов'язковим, але недостатнім для канцерогенезу. Як відомо, злоякісному процесу передують доброякісні та передракові стани шийки матки, тому останнім часом пильна увага дослідників притягнута до вивчення факторів ризику неопластичної

прогресії. Ці фактори можуть бути імунними, зумовлюючи стан місцевого імунітету, генетичними, тобто опосередкованими мутаціями в деяких генах, що беруть участь у клітинній регуляції, гормональними і вірусними, що означають зв'язок між ступенем дисплазії епітелію шийки матки з вірусним навантаженням і статусом ДНК ВПЛ. Слід зазначити, що чіткі морфологічні критерії, що дозволяють припустити наслідки доброякісних та передракових процесів епітелію шийки матки на тлі інфікованості ВПЛ, відсутні. Незважаючи на те, що при важкій дисплазії, у порівнянні з легкою та середнього ступеня тяжкості, відзначається більш несприятливий результат щодо можливості розвитку преінвазивної карциноми і ранніх форм раку, останні в окремих хворих можуть розвиватися за умов легкого та середнього ступеня тяжкості дисплазії.

Особливу роль в реалізації протипухлинного захисту на етапі канцерогенезу відіграє стан місцевого імунітету. Цитокіни, виконуючи функції медіаторів, регулюють ступінь імунної відповіді при захворюваннях пухлинної природи. Визначення концентрації цитокінів в крові дає інформацію про функціональну активність різних типів імунокомпетентних клітин, тяжкість запального процесу, його перехід на системний рівень і про прогноз захворювання. Патологічні стани, а саме, запалення та інфекційне ушкодження ВПЛ, стимулюють імунну клітинну відповідь шляхом вивільнення медіаторів, які забезпечують виживання пухлинних клітин і швидке збільшення осередків пухлин паракринним шляхом.

Крім того, епігенетичні мутації онкогенів та хромосомні аберації пухлино-супресорних генів стимулюють продукцію пухлинних медіаторів в межах мікрооточення пухлин, що сприяє розвитку неопластичних процесів аутокринним шляхом.

Ці два шляхи концентруються в осередках пухлини і призводять до активації латентного сигнального трансдуктора і активатора транскрипції 3 (Stat3), який є посередником транскрипційної відповіді, що сприяє виживанню та швидкому росту клітин і ангиогенезу. Надлишок цитокінів,

які активізують Stat3 в межах мікросередовища пухлини, таких як, інтерлейкіни (ІЛ) ІЛ6, ІЛ10 і ІЛ17/23, створює основу сигнальної мережі, яка одночасно просуває ріст неопластичного епітелію, ініціює запалення і пригнічує анти-пухлинну імунну відповідь організму. Відповідно, аномальна і постійна активація Stat3 часто спостерігається в злоякісних пухлинах епітеліального походження і асоціюється із негативним результатом (Shukla S., et al, 2010).

Тому актуальною проблемою гінекології є оптимізація діагностики доброякісних і передракових процесів шийки матки, асоційованих із ВПЛ, за допомогою визначення нових патогенетичних маркерів неопластичної трансформації клітин епітелію.

Зв'язок роботи з науковими планами, програмами, темами. Магістерська робота є фрагментом планової науково-дослідницької теми кафедри акушерства та гінекології №1 Одеського національного медичного університету "Оптимізація діагностичних та лікувальних заходів при захворюваннях репродуктивної системи жінки з урахуванням патогенетичних молекулярно-генетичних механізмів" (№ держреєстрації – 0107U011173).

Робота виконувалася на кафедрі акушерства та гінекології №1 Одеського національного медичного університету (завідувач кафедрою – академік АМН України, д.мед.н., професор В.М. Запорожан). Магістрант є виконавцем фрагмента вказаної теми.

Мета і завдання дослідження. Метою даного дослідження є підвищення ефективності діагностики та покращення результатів лікування хворих із доброякісними та передраковими процесами шийки матки на тлі ВПЛ шляхом вивчення впливу рівня експресії Stat3 на розвиток непластичної прогресії.

Для досягнення мети були поставлені такі завдання:

1. Вивчити рівень експресії Stat3 у хворих з неспецифічними запальними процесами шийки матки.
2. Вивчити рівень експресії Stat3 у хворих з дисплазією шийки матки легкого ступеню з ураженням ВПЛ.
3. Вивчити рівень експресії Stat3 у хворих з дисплазією шийки матки легкого ступеню без ураження ВПЛ.
4. Вивчити діагностичну цінність визначення рівня експресії Stat3 у хворих із доброякісними та передраковими процесами шийки матки на тлі ГПВІ.
5. Вивчити прогностичну цінність визначення рівня Stat3 у хворих із доброякісними та передраковими процесами шийки матки на тлі ГПВІ.

Об'єкт дослідження – доброякісні та передракові процеси шийки матки у жінок, асоційовані з ГПВІ.

Предмет дослідження - рівень експресії пухлинного супресора Stat3 у жінок із доброякісними та передраковими процесами шийки матки на тлі ГПВІ.

Методи дослідження – загальноклінічні (вивчення загального і спеціального анамнезу, загальний огляд, гінекологічне дослідження, проведення тестів функціональної діагностики), інструментальні (кольпоскопія, ультразвукове дослідження), лабораторні (бактеріоскопічне, бактеріологічне, вірусологічне, цитологічне, кольпоцитологічне, морфологічне дослідження, імуногістохімічне дослідження).

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше вивчено експресію пухлинного супресора Stat3 у жінок із запальними, доброякісними та передраковими процесами шийки матки з інфікуванням ВПЛ. Вперше визначено діагностичну та прогностичну цінність рівня експресії пухлинного супресора Stat3, як маркеру неопластичної трансформації епітелію шийки матки. Вивчення та проведення порівняльної

оцінки традиційних методів скринінгової діагностики патології шийки матки, та додаткового визначення рівня експресії пухлинного супресора Stat3.

Практичне значення одержаних результатів. Встановлена залежність між активністю STAT3 і неопластичною прогресією епітеліальних клітин шийки матки зумовлює доцільність рекомендувати жінкам із хронічними запальними процесами шийки матки визначення активності STAT3, особливо за умов персистенції ВПІ, з метою прогнозування злоякісної трансформації клітин епітелію шийки матки. Результати дослідження дозволяють рекомендувати за наявності підвищення активності STAT3 у жінок із CIN проводити морфологічне дослідження тканин шийки матки. При наявності хронічних запальних захворювань шийки матки проводити лікування, яке є патогенетично обґрунтованою профілактикою передракових уражень шийки матки, особливо у жінок із персистенцією ВПІ.

Результати досліджень впроваджені в роботу жіночих консультацій №№ 8, 9, пологових будинків №№ 1, 2, 5, 7 (м. Одеса) та навчальний процес кафедр акушерства та гінекології № 1, акушерства та гінекології № 2 Одеського національного медичного університету.

Особистий внесок здобувача. Автором самостійно проведено аналіз результатів клінічного обстеження 110 жінок. Автор брав безпосередню участь у проведенні загальноклінічних обстежень, веденні та лікуванні пацієнток, хірургічних втручаннях, взятті біологічного матеріалу для цитологічних, морфологічних та інших досліджень. Формулювання мети і завдання роботи, визначення об'єктів, матеріалів й методів дослідження, висновків та практичних рекомендацій, написання всіх розділів магістерської роботи, статистична обробка отриманих результатів дослідження, формулювання висновків, практичних рекомендацій виконані автором самостійно.

РОЗДІЛ 1

СУЧАСНІ АСПЕКТИ РОЗВИТКУ ДИСПЛАСТИЧНИХ ПРОЦЕСІВ ШИЙКИ МАТКИ

1.1 Епідеміологія цервікальних інтраепітеліальних неоплазій

Надзвичайно важливою проблемою сучасного акушерства та гінекології залишається патологія шийки матки. У структурі гінекологічної захворюваності серед патологічних змін епітелію шийки матки доброякісні та фонові процеси складають до 85%, передпухлинні (насамперед, дисплазії) – до 20% [1].

За даними Національного канцер-реєстру (2011), щороку в Україні від раку шийки матки (РШМ) помирають близько 2 242 жінок, з них близько 500 – працездатного віку. За статистичними даними, РШМ нині посідає друге місце за частотою серед онкологічних причин смертності після раку молочної залози. [2,3].

Багаторічними комплексними клінічними і морфологічними дослідженнями встановлено, що на незмінену епітелію РШМ виникає рідко. Як правило, йому передують ряд змін, серед яких основними є диспластичні процеси багатошарового плоского епітелію. Диспластичні процеси епітелію слизової оболонки шийки матки характеризуються порушенням нормального диференціювання і нормальної стратифікації через гіперплазію базальних і парабазальних клітин, порушенням подальшої диференціації гіперплазованих базальних і парабазальних клітин, зростанням ядерно-цитоплазматичного співвідношення, поліморфізмом ядер, появою мітозів у середніх прошарках епітелію, та анеуплоїдією. Враховуючи спільність морфологічних змін, які виникають в епітелію шийки

матки при дисплазії і початкових формах РШМ, було запропоновано відносити їх до цервікальної інтраепітеліальної неоплазії (CIN) (в англійській транскрипції CIN – Cervical Intraepithelial Neoplasia), з виділенням CIN різного ступеню вираженості - легкого, помірного, тяжкого [4,5].

1.2 Роль ВПЛ та експресії пухлинних супресорів у розвитку раку шийки матки

Про етіопатогенетичний зв'язок генітальної папіломавірусної інфекції (ГПВІ) та РШМ відомо давно [6]. В даний час відомо вже більше 100 типів папіломавірусів, виявлених у людини, причому 34 типа вражають сечостатеві органи і відповідно передаються при статевих контактах. Папіломавіруси належать до роду Papillomavirus, що відноситься до сімейства Papillomaviridae. Вірус папіломи людини (ВПЛ) – досить дрібний, його двохниткова кільцева ДНК укладена в білкову оболонку – капсид. У геномі вірусу (розміром 8000 пар нуклеотидів) шість генів, що забезпечують на ранніх етапах його життєвого циклу взаємодії з клітиною-господарем і реплікацію вірусної ДНК, і ще два гени, що кодують білки капсиду. Проникаючи в клітину, вірус використовує клітинні системи для отримання власних білків. У першу чергу синтезуються білки, необхідні для підтримки і реплікації вірусної ДНК. Ці гени позначаються літерою E (від англ. early – ранній). Після напрацювання ДНК включаються "пізні" (late) гени L1 і L2, які запускають синтез білків вірусного капсиду. Ранні гени працюють в базальних клітинах епітелію. У диференційованих кератиноцитах активні пізні гени і здійснюється збірка інфекційних вірусних частинок. Але найчастіше останній етап відсутній, і вірус залишається в клітині у вигляді вільної або вбудованої в клітинний геном ДНК.

Особливу роль у іморталізації і трансформації клітини грають вірусні гени E6 і E7. Білки, які кодуються ними втручаються в роботу

клітинного геному, порушуючи регуляцію клітинного циклу. Найбільш важлива інактивація клітинних генів p53 і pRb, які в нормі перешкоджають раковому переродженню клітини і названі тому онкосупресорами (що пригнічують пухлину). Робота генів-онкосупресорів забезпечує нормальне чергування фаз росту і поділу клітини. Порушення їх функцій відзначається в багатьох пухлинах різного типу, не тільки викликаних вірусом. Впливає вірус і на роботу інших генів клітини, контролюючих її нормальний поділ. Один з механізмів впливу – вибіркова модифікація (метилування) тих ділянок клітинної ДНК, які регулюють роботу генів. У неонкогенних типів папіломавірусів гени E6 і E7 також здатні інактивувати онкосупресори p53 і pRb, але менш ефективно. Ще один вірусний ген, який бере участь у трансформації клітини, – ген E5 – у частини вірусів групи низького ризику неактивний або взагалі відсутня.

1.2.1 Особливості біологічної дії папіломавірусів, пов'язані із канцерогенезом. Для вірусу папіломи людини характерні відносно повільні цикли розвитку й реплікація усередині ядра, а нуклеїнова кислота ВПЛ має інфекційні й трансформативні властивості. Латентний вірус у формі плазмиди перебуває в базальному шарі клітинок, але реплікація відбувається в епітеліальних клітинах шкіри або слизової оболонки. Повна реплікація ВПЛ відбувається тільки у високоспеціалізованих клітинах багат шарового плоского епітелію. У теперішній час ідентифіковано близько 120 генотипів папіломавірусів, 40 з яких асоційовані з аногенітальним трактом людини [7,8].

На основі зв'язку між ВПЛ і розвитком передпухлинних і пухлинних захворювань аногенітальної ділянки умовно виділено типи вірусу: низького (6, 11, 40, 42, 43, 44, 61), середнього (30, 33, 35, 39, 51, 52, 56, 58) і високого (16, 18, 31, 36, 45) онкологічного ризику, або генотипи високого ризику (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68) і генотипи низького ризику (6, 11, 42, 43, 44). До групи високоонкогенного ризику включено й і типи ВПЛ, які

трапляються при РШМ, але в багатьох випадках виявляються у хворих із CIN. Генотипи низького ризику (6,11) є причиною гострих кондилом, а по даним деяких дослідників, рідко виявляються при CIN і карциномах. При цьому неонкогенні серотипи ВПЛ нерідко сполучаються з онкогенними. Це обґрунтовує включення жінок із зовнішніми генітальними бородавками в групу підвищеного ризику по онкологічних захворюваннях шийки матки [6-8].

Папіломавіруси є антропонозними збудниками – тобто передача їх можлива тільки від людини до людини. Інкубаційний період триває від 3-х місяців до декількох років. Існує ймовірність збереження вірусів в відлущуваних клітинах шкіри певний час – тому для деяких захворювань, що викликаються вірусом вірогідний контакт-побутовий шлях зараження за умови мікропошкодження шкіри. Втім основним шляхом зараження ВПЛ є статевий шлях зараження, включаючи оральногенітальні контакти і анальний секс.

Потрапивши в організм ВПЛ інфікує базальний шар епітелію, причому найбільш уразливою ділянкою є зона переходу багат шарового плоского епітелію в циліндричний. В зараженій клітині вірус існує у двох формах – епісомальній, тобто поза хромосом клітини – яка вважається доброякісною формою і інтросомальній – інтегрованою, а саме, вбудовуючись в геном клітини, яку визначають як злоякісну форму паразитування вірусу. При інтегрованій формі відбувається так звана індукція мутацій, що призводить до селекції клону клітин з мутантною ДНК, яка містить ДНК вірусу. Під впливом поки нез'ясованих факторів відбувається розмноження клону мутантних клітин, що клінічно проявляється ростом пухлини. Для ВПЛ найбільш характерний прихований або латентний перебіг. При цьому вірус існує в епісомальній формі, не викликаючи патологічних змін у клітинах, клінічних проявів немає. При цьому людина може одночасно заражатися декількома типами папіломавірусів. Під впливом різних факторів відбувається активація вірусу, його посилене розмноження і хвороба переходить в стадію клінічних

проявів. У більшості випадків (до 90%) на протязі до 24 місяців, частіше в період від 6 до 12 місяців, відбувається самовиліковування, а саме, вірус перестає визначатися доступними в даний час методами діагностики, в інших випадках відзначається тривалий хронічний рецидивуючий перебіг з можливою малігнізацією процесу в залежності від типу вірусу. Клінічні форми ПВІ проявляються у вигляді [6-8]: 1) папілом, бородавок, кондилом, коли вірус існує в епісомальній формі, однак відбувається посилене розмноження клітин базального шару, що призводить до появи розростань, які клінічно визначаються як бородавки або папіломи; 2) неоплазія (дисплазія), коли вірус існує в інтегрованій формі – при цьому відбуваються зміни в структурі клітин, які отримали назву койлоцитоз; 3) карцинома – вірус існує в інтегрованій формі, є значна кількість змінених "атипових" клітин, що свідчать про злоякісність процесу (інвазивний рак).

1.2.2 Фактори ризику неопластичної прогресії. Інфікування епітеліальних клітин ВПЛ – обов'язкова, але недостатня подія для канцерогенезу. Як маркери прогресування передпухлинного стану тканин шийки матки в неопластичний розглядали порушення апоптозу, збільшення мітотичної активності в клітинах епітелію шийки матки, абсолютну або відносну гіперпролактинемію. Гормональний дисбаланс – один з факторів, що модифікують РШМ, а пролактин є чинником, що стимулює клітинну полімерацію, абсолютна або відносна гіперпролактинемія розглядається як коканцерогенний фактор розвитку пухлин органів жіночої репродуктивної системи [8].

Активна репродукція ВПЛ індукує утворення агресивного метаболіту 16-сс-гідроксистерону в інфікованих клітинах, що розглядається як фактор ризику розвитку інтраепітеліальної неоплазії.

ВПЛ, інтегруючись у хромосоми інфікованої клітини, приводить до порушення її метаболізму. У нормі епітеліальні клітини не здатні забезпечувати це перетворення. Формується порочне коло гормонозалежної

експресії онкогенів ВПЛ і підвищеного синтезу метаболіту. Синтез білка E7 також має естрадіол залежний характер. У присутності гормону спостерігається багаторазове посилення синтезу онкобілка.

У якості кофакторів, що підсилюють неопластичну роль ВПЛ, дослідники розглядають ранній початок статевого життя, ранні перші пологи, часту зміну статевих партнерів, паління, гормональні порушення, ендометріоз, ВІЛ-інфекцію, ІПСШ, тривалий прийом оральних контрацептивів. Встановлено, що 41% жінок із ПВІ почали статеве життя до 19 років. Ряд авторів відзначають, що частота інфікування ВПЛ прямо пропорційна числу статевих партнерів: при наявності одного партнера ВПЛ виявляється в 17-21% жінок, 5 і більше – в 69-83%. У результаті запальних захворювань шийки матки знижується місцева резистентність, що приводить до персистенції ВПЛ, яка викликає грубі зміни в покривному багат шаровому плоскому й залозистому епітелії, створює сприятливі умови для порушення мікробіоценозу піхви й приєднання вторинної інфекції. Значну актуальність здобувають дослідження, спрямовані на пошук особливо значимих маркерів інфекції й розробку адекватних діагностичних методів [2-6].

При розвитку папіломавірусної інфекції (ПВІ) порушення в імунній системі супроводжуються зміною показників інтерференового статусу, фенотипових і функціональних показників лімфоцитів крові, що залежить від серотипу вірусу. Імунітет до ВПЛ є типоспецифічним і не запобігає наступному інфікуванню іншими широко розповсюдженими серотипами ВПЛ. У хворих із ПВІ визначається зниження вмісту в крові лімфоцитів, пригнічення здатності лейкоцитів продукувати лейкоцитарний та імунний інтерферони, зміни в гуморальних факторах місцевого захисту. Різка зниження місцевого імунітету у хворих ПВІ супроводжується зниженням в цервікальному слизу рівня IgA і IgG при підвищеній концентрації IgM. Результати досліджень переконують у тім, що ВПЛ не володіє цитопатичними властивостями: не реплікується й не інфікує антиген-презентуючі клітки й не руйнує кератиноцити. Існування хронічної інфекції

свідчить про те, що протягом тривалого часу немає ефективної імунної відповіді, тому що відсутня фаза розмноження ВПЛ під час життєвого циклу, що дозволяє вірусу обійти імунну систему. При вивченні фенотипу лімфоцитів крові при ПВЛ виявлені зміни (зниження змісту Т-килерів і збільшення Т-хелперів), що відрізняються від інших вірусних інфекцій: герпесвірусної, ВІЛ, гострої інфекції, викликані вірусом Епштейна-Барр. За даними літератури, значимим фактором, але мало вивченим дотеперішнього часу, є мікстинфікування різними серотипами ВПЛ. [7,8]

1.3 Роль STAT-3 в канцерогенезі раку шийки матки

Особливу роль в реалізації протипухлинного захисту на етапі канцерогенезу відіграє стан місцевого імунітету. Цитокіни, виконуючи функції медіаторів, регулюють ступінь імунної відповіді при захворюваннях пухлинної природи. Визначення концентрації цитокінів в крові дає інформацію про функціональну активність різних типів імунокомпетентних клітин, тяжкість запального процесу, його перехід на системний рівень і про прогноз захворювання. Патологічні стани, а саме, запалення та інфекційне ушкодження ВПЛ, стимулюють імунну клітинну відповідь шляхом вивільнення медіаторів, які забезпечують виживання пухлинних клітин і швидке збільшення осередків пухлин паракринним шляхом. Крім того, епігенетичні мутації онкогенів та хромосомні аберації пухлино-супресорних генів стимулюють продукцію пухлинних медіаторів в межах мікрооточення пухлин, що сприяє розвитку неопластичних процесів аутокринним шляхом.

Ці два шляхи концентруються в осередках пухлини і призводять до активації латентного сигнального трансдуктора і активатора транскрипції 3 (STAT3), який є посередником транскрипційної відповіді, що сприяє виживанню та швидкому росту клітин і ангиогенезу. Надлишок цитокінів, які активізують STAT3 в межах мікросередовища пухлини, таких як, інтерлейкіни ІЛ 6, ІЛ 10 і ІЛ 17/23, створює основу сигнальної мережі, яка одночасно просуває ріст неопластичного епітелію, ініціює запалення і пригнічує анти-пухлинну імунну відповідь організму. Відповідно,

аномальна і постійна активація STAT-3 часто спостерігається в злоякісних пухлинах епітеліального походження і асоціюється із негативним результатом. Сигнальний трансдуктор і активатор транскрипції-3 є одним з шести членів сімейства транскрипційних факторів. STAT3 було відкрито майже 15 років тому, як білок «гострої фази» запалення. Цей фактор був пов'язаний із запаленням, клітинною трансформацією, проліферацією, інвазією, регенерацією тканин, і метастазуванням ракових утворень. Різні види канцерогенів, радіації, вірусів, факторів росту, онкогенів і запальних цитокінів, як з'ясовувалося, активізували STAT 3. STAT3 є активним у багатьох пухлинних клітинах. Активовані білки системи STAT3 потрапляють в ядро і впливають на певні ділянки ДНК. Зв'язуючись з регуляторними ділянками ДНК, білки системи STAT3 можуть впливати на гени стимулюючи або пригнічуючи їх експресію [9,10].

Дослідники вважають, що надактивність білків системи STAT3 змушує клітини продовжувати рости і ділитися і попереджує апоптоз. Через свою ключову роль в канцерогенезі, в даний час досліджуються інгібітори активації цього фактора для профілактики і лікування раку. Це призвело до ідентифікації малих пептидів, олігонуклеотидів, і малих молекул, як потенційних інгібіторів STAT3 [11].

1.4 Етіопатогенетичний зв'язок між запаленням і онкогенезом

Епідеміологічні та експериментальні дані свідчать про тісний зв'язок між запаленням і канцерогенезом. Більшість, якщо не всі, пухлини інфільтровані імунними і запальними клітинами. Це може представляти постійну протипухлинну відповідь або бути ознакою діяльності імунної системи пухлини на свою користь. Перша можливість вирішується в рамках концепції "пухлиного імуновживання", запропонованої Олдом, Шрайбером і співавт. [1]. Імунна система може грати протионкогенну роль в деяких випадках, особливо хімічно та вірусно індукованого раку шляхом усунення передракових, а також повністю трансформованих клітин. Цей

процес багато в чому залежить від змінених імуногенних епітопів, експресованих раковими клітинами, а також стресу, некрозу та інших імуностимулюючих сигналів, які допомагають імунній системі розпізнавати пухлинні антигени. З ефektorного боку імунна відповідь покладається на CD8 + цитотоксичні Т-клітини (CTL) і натуральні кілери (NK), а також дендритні клітини (ДК) і CD4 + Th1-клітини [1]. Однак, ракові клітини мають велику здатність змінюватися, розвиватися і швидко рости. Отже, рак може легко перехитрити імунну систему за рахунок зростання низькоімуногенних або резистентних клонів безпосередньо або шляхом підриву протипухлинної імунної відповіді, і використовувати його для просування пухлини, процес, що часто згадується як «пухлина втеча» [2]. Також пухлини можуть не проявлятися протягом тривалого часу, що відображають як «рівновагу» між ростом пухлини, тобто імунозалежні або незалежні пухлини та імунним руйнуванням [3]. Таким чином, у той час, як імунна система господаря може займатися на початку виявленням пухлин і руйнуванням, стає все більш очевидним, що клітини імунної системи і запальні процеси, які або передують або є наслідком розвитку раку, грають ключову проонкогенну роль [4,5]. Різні клітини імунної системи, у тому числі Т-і В-лімфоцити, макрофаги, дендритні клітини, нейтрофіли, NK-клітини та інші типи клітин, які часто зустрічаються, концентруються в пухлини по відношенню до навколишнього тканини [6-9]. Таким чином, очевидно, що ці клітини більше активно відбирають у відповідь на отримані з пухлини сигнали в результаті відбору та еволюції пухлини. Проте, можливо, що також ці клітини можуть бути спочатку спрямовані в пухлину як частина протипухлинної відповіді, але як тільки з'являються в микрооточенні пухлини вони спрямовані на проонкогенну відповідь. Наприклад, мієлоїдні клітини, макрофаги виробляють ІЛ-12 і інші анти-онкогенні продукти у микрооточенні пухлини мієлоїдного диференціювання в отриманих супресорних клітин або "M2" макрофагів виробляють різні імуносупресивні і проангіогенні молекули [10-12]. Крім того, різні пухлини сприяння Т-клітинам, в тому числі Th2, Th17 і Treg

клітини, можуть бути рекрутовні або диференційовані на місці протягом розвитку пухлини, в той час як клітини, важливі для протипухлинної відповіді, такі як Th1-клітини або CD8+ можуть бути недостатньо або функціонально неспроможні [13-16]. Важливо відзначити, що не існує однозначної кореляції між наявністю Т-клітинної інфільтрації і пухлинного прогнозу спорадичного раку, наприклад товстої кишки, оскільки він представляє кращий прогноз [17,18], в той час як при РШМ і раку молочної залози з великим CD4 + CD8 + співвідношення корелює з поганим прогнозом [19].

Загальний внесок запальних процесів до розвитку пухлини визначає по-перше, багато медіаторів запалення, наприклад, цитокіни, також важливі фактори росту і виживання, які стимулюють проліферацію і виживання передзлості клітин [21]. Часто запальні медіатори активують онкогенні фактори транскрипції, такі як NF-Кб і STAT3 [22-24], в той час, такі як Ras і Мус онкогени можуть ініціювати запальні реакції [25,26].

Пухлиноасоційовані запалення можуть пригнічувати протипухлинну імунну відповідь і пухлиноспецифічну імунну відповідь, яка замість анти-онкогенної стає проонкогенною. Запалення може стимулювати ангиогенез пухлини. Запалення може стимулювати інвазивні властивості і метастазування пухлини [27].

Існує декілька типів запалення, які розрізняються за причинами, механізмами, результатами та інтенсивністю [28], і всі вони потенційно можуть сприяти розвитку і прогресії раку. Існує також декілька теорій згідно яких запалення індукує пухлинний ріст. По-перше, повторювані травми та інфекції можуть призвести до хронічної запальної реакції, наприклад, персистенція інфекції *Helicobacter Pylori* або вірусу гепатиту С (ВГС) викликає гастрит, виразку і гепатит, в кінцевому підсумку призводить до раку шлунку або печінки, відповідно [21]. Зараження *Bacteroides Sp* полегшує спонтанний розвиток пухлини при раку кишківника [29].

Хронічне запалення також може бути викликане впливом навколишнього середовища або харчовими та метаболічними факторами. Матеріал частинок та інших компонентів тютюнового диму запускає травмування тканин і хронічне запалення легенів, тим самим збільшуючи ризик розвитку раку легенів [30]. Ожиріння є фактором ризику для розвитку раку печінки і пов'язане з ожирінням запалення може служити критичною рушійною силою для просування раку печінки [31-34].

Кілька типів аутоімунних захворювань також можуть сприяти розвитку пухлин, наприклад, запальні захворювання кишківника збільшують ризик раку, асоційованого з (САС), а целиакія є чинником ризику для лімфоми [35-37]. Однак, не всі хронічні запальні захворювання збільшують ризик раку в рівній мірі. Виразковий коліт є набагато більший ризиком, ніж для хвороба Крона, ревматоїдний артрит не збільшує ризик розвитку раку взагалі. Швидше за все, хронічне запалення має діяти синергічно з дією канцерогенів і пошкодженням і репарацією тканин.

Навіть рак, який розвивається без попереднього хронічного запалення демонструють асоційовані з пухлиною запалення і містять запальні інфільтрати [26]. Активація онкогенів (RAS і Muc) або клітинного старіння, індуковане ушкодження ДНК, може підвищити транскрипцію прозапальних генів, що кодують цитокіни та хемокіни [25, 38-40]. Останні, але не менш важливі, типи запальної реакції, пов'язані з терапією раку, індукованого запаленням. Так як більшість ракових клітин стійкі до апоптозу, їх загибелі, індукованої хіміо- або променевої терапії некрозу білків, що вивільняються і є сильними індукторами запалення [41]. Схожа запальна реакція може бути викликана гіпоксією і нестачою поживних речовин, що призводить до некротичної загибелі клітин в основі великих пухлин. Два результати, які не виключають один одного, можуть бути викликані цим типом запалення. По-перше, активація імунної системи продуктами некротичних клітин може підвищити ефективність презентації антигенів пухлини, в результаті чого протипухлинний імунітет, який допомагає господарю викоринити залишки

пухлини [42,43]. По-друге, запальні медіатори, що вивільняються з вмираючих ракових клітин можуть призвести до активації макрофагів, що проникають до пухлини і продукують цитокіни. Останні зрештою активують онкогенні фактори транскрипції в залишках ракових клітин, стимулюють їх виживання і проліферацію [23,44].

Баланс між терапія-індукованим викоріненням пухлини, та її рєзростанням дуже тонкий і, ймовірно, залежить від ступеня загибелі клітин протягом терапії, типу раку, який лікують і запального мікросередовища, пов'язаного з пухлиною.

Епідеміологічні, фармакологічні та генетичні докази, надані для ствердження, що можуть підвищити ризик раку і запалення може сприяти прогресії пухлини [26]. Тим не менш, це ще належить визначити, чи може хронічне запалення привести до пухлини, які ініціюють, або генетичні зміни можуть діяти тільки в поєднанні з впливом канцерогенів.

У разі РШМ, було висловлено припущення, що хронічне запалення шийки матки та кишківника може призвести до альтерацій ДНК [45,46]. Тим не менш, хронічне запалення і втрата захисного слизу може також збільшити проникність кишечника для токсинів навколишнього середовища та мутагенів, які індукують мутації в стовбурових клітинах і призводить до раку [47]. Крім того, запалення може стимулювати проліферацію клітин, які вкривають онкогенні мутації, індуковані канцерогенами, викликати мутації а не діяти безпосередньо. Тим не менш, запалення може привести до утворення реактивних форм кисню та азоту імунними клітинами, а також імунної опосередкованої стимуляції в попередньо злякисних клітинах, індукцію "мутагенних" ферментів, таких як активація індукованої цитидиндезамінази [48, 49] та інактивації шляхів пошкодження ДНК такі, як mismatch repair response (MMR) [10,45] або p53 [50,51]. Запалення може також призвести до епігенетичних модифікацій, включаючи метилування ДНК і гістонів що в кінцевому підсумку призвести до глушників супресорів пухлин локусів [52-55]. Таким чином, це ще належить повністю встановити

чи може запалення поодинці призвести до ініціювання пухлини (рис. 1), але існуючі наукові дані говорять за те, що запалення є суттєвим фактором розвитку пухлини.

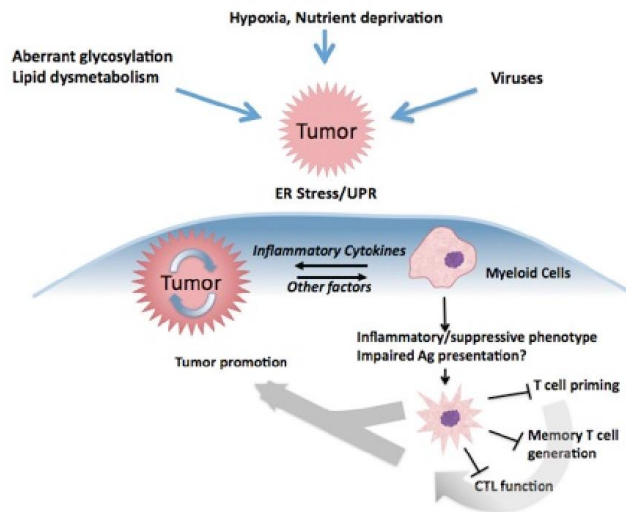


Рис.1. Yale J Biol Med. 2006 December; 79(3-4): 123–130. Published online 2007 October. PMID: PMC1994795. Cancer Issue. Why Cancer and Inflammation?

Запалення є важливим на різних стадіях онкогенезу. Так, цей процес може сприяти виникненню ракових клітин, викликаючи пошкодження ДНК через проміжні стадії і через активацію епігенетичних механізмів, що призводить до пригнічення супресорів пухлин.

1.4.1 Запалення і пухлинний ріст. Зростання пухлини являє собою загальну суму злякисної проліферації клітин в порівнянні із клітинної смерті злякисної пухлини. Обидва процеси знаходяться під сильним вплив запалення і запальних цитокінів, продукованих пухлиною імунних клітин: таких, як і ІЛ-6, TNF- α , що можуть служити як мітогени і фактори виживання для передракових і повністю ракових клітин (рис. 2). Також запалення сприяє індукції ангіогенезу, який має вирішальне значення для надання необхідних для зростаючої пухлини поживних речовин і кисню [56,57].

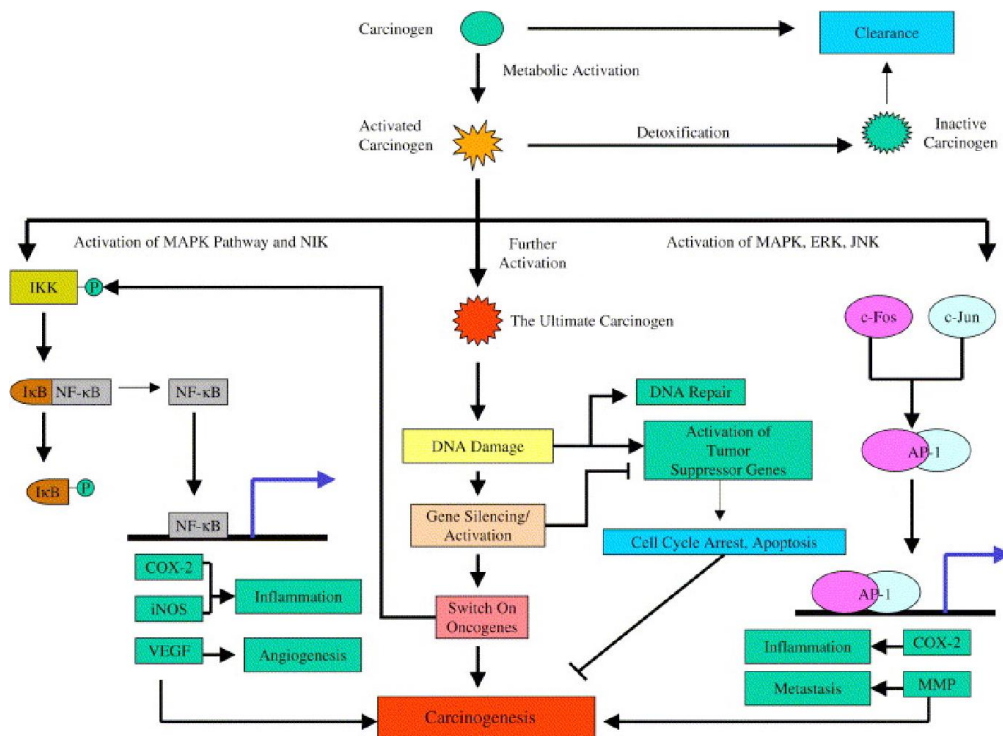


Fig. 2. Carcinogenesis is a complex multistep process. The role of phytochemicals in inhibition of cancer and inflammation: New directions and perspectives (Critical Review Ala Y. Issaa, Suresh R. Volatea, Michael J. Wargovichb. Journal of Food Composition and Analysis Volume 19.- Issue 5.- August 2006.- P. 405–419).

Велика частина зростання стимулювання перехресних перешкод між імунними та злоякісними клітинами опосередковано цитокінами, які активують онкогенні фактори транскрипції NF-Кб і STAT3 [22]. Активізація одного або NF-Кб або STAT3 знаходиться більш ніж в 50 % всіх випадків раку [23,44,58] і є передумовою для експресії різних генів-мішеней важливих для онкогенезу, в тому числі антиапоптотичних генів (С-IAP, Bcl-XL, Bcl-2, С-FLIP), проліферативних генів (цикліни, з-Мус), стрес-реакторних генів (SOD2, феритину ланцюг, hsp70), хемокінів і проангіогенних молекул (VEGF, BFGF, CXCL12) [22.59-61]. З іншого боку, в імунних клітинах, NF-кВ і STAT3 відіграють важливу роль для виробництва прозапальних цитокінів, які опосередковані NF-кВ і активацією STAT3 в ракових клітинах, включаючи ІЛ-1, TNF, ІЛ-6 ІЛ-і 23.

В моделях, асоційованих із запаленням РШМ, товстої кишки і раком печінки, видалення ІКК β , протеїнази необхідних для NF- κ B активації в міелоїдних клітинах, зменшує продукцію різних прозапальних цитокінів, включаючи ІЛ-1, ІЛ-6, TNF і ІЛ-12/ІЛ-23, і призводить до зменшення пухлини і кратності розмірів [62,63]. Пухлинна дія, що стимулює означені цитокіни, в основному опосередковані NF- κ B (наприклад, TNF і ІЛ-1) або STAT3 (наприклад, ІЛ-6, ІЛ-11) активацією в попередньо злоякісних клітинах шийки матки, ентероцитах і гепатоцитах [64-70]. Інші відповідні STAT3 активатори в пухлинних клітинах можуть включати в себе членів ІЛ-6 родини, наприклад, OSM, LIF, CNTF і ІЛ-27, ІЛ-10 сімейства цитокінів (ІЛ-22, 19-ІЛ та ін), а також зростання факторів, таких як EGF [71-74]. NF- κ B в обох імунних клітини і ракових клітинах можуть також бути активовані сигнали з Toll-подібний або NOD-подібних рецепторів, або запальних цитокінів, таких як ІЛ-1 або TNF. Було запропоновано також, що ІЛ-17 може керувати NF- κ B активацією [75] і може побічно викликає активацію STAT3 шляхом стимулювання продукції ІЛ-6 [15]. Саме STAT3 було запропоновано для продовження NF- κ B активації та ядерного утримання [68], таким чином є основою для перехресних перешкод між цими важливими шляхами онкогенно обумовлених запальних сигналів. Важливо, однак, NF-STAT3 КБ і не є класичними онкогенами, так як вони не підпадають під пряму мутаційну активацію.

Важлива роль NF- κ B в ув'язці запалення і канцерогенезу була вперше продемонстрована на мишачій моделі [62]. Абляції ІКК β в епітеліальних клітинах кишечника відмінила розвиток аденоми товстої кишки. Проонкогенна ролі NF- κ B, швидше за все, опосередкована індукцією антиапоптотичних білків, особливо Bcl-XL [62,64,65]. Активація NF- κ B в епітеліальних клітинах не впливає на клітинну проліферацію. На відміну від цього, STAT3 в епітеліальних клітинах впливає як на клітинну проліферацію і виживання клітин [64,65]. Відповідно, абляція STAT3 в епітеліальних клітинах призводить до значного зниження як пухлинні, так і індукції пухлинного росту, а також зниження експресії Bcl-XL, та рівню

інших захисних білків і регуляторів клітинного циклу [64,65,74]. Як згадувалося вище, NF-κB-активація в мієлоїдних клітинах також підвищує ріст пухлини, але ефект основному спрямований на підвищення проліферації епітеліальних клітин, а не виживання [62]. Цей ефект NF-κB опосередковано через продукцію TNF [76], ІЛ- 6 [64,77] та інших цитокінів.

1.4.2 Запалення і метастазування. Імунні клітини, присутні у всіх пухлинах, беруть участь у різних формах прямих і непрямих взаємодій з метастатичними клітинами і мікрометастазами [20, 27]. Дійсно, запальні мікросередовища дозволяють впливати на кілька ключових етапів метастатичного процесу [78]. Процес епітеліально-мезенхімальної трансформації, яка має вирішальне значення для метастазування, може бути викликаний декількома з цитокінів, включаючи TGF-α, ІЛ-1, TNF-α і ІЛ-6 [79-81] і може бути наслідком з активації NF-κB і STAT3 [23] за допомогою індукції регуляторів епітеліально-мезенхімальної трансформації [80,82]. Також запальні сигнали регулюють виробництво і активність різних протеаз, які руйнують позаклітинний матрикс і сприяють інвазії і екстравазації ракових клітин [23,83]. Безпосередньо хемокіни можуть стимулювати міграцію злоякісних клітин до кровоносних судин [23,84,85], тоді: такі як цитокіни TNF можуть збільшити проникність судин [86]. Крім того, цитокіни є важливими для виживання, рекрутування, метастатичної колонізації тими ж механізмами, які впливають на ріст і виживання первинних пухлин [87-89].

Зв'язок між запальною імунною реакцією і онкогенезом був широко досліджений протягом останнього десятиліття, і деякі з механізмів, що лежать у його підґрунті, з'ясовані. У результаті, уявлення про роль імунної системи в канцерогенезі змістилися від суворої протионкогенної функції до більш збалансованої точки зору відповідно з якою імунна система, маючи певний негативний вплив на ріст пухлини на ранніх стадіях онкогенного процесу, має загальну стимулюючу дію на пухлину. Хронічне запалення,

викликане інфекцією, аутоімунними захворюваннями і впливом подразників, а також асоційоване з пухлиною запалення, сприяють просуванню пухлини, прогресії і метастазуванню. Якщо у пов'язаних із запаленням пухлинах, запалення можна розглядати як збудник, що впливає на пухлина, що почала розвиватися, пухлини, що викликані запаленням, діють, як пізній промотор для підвищення прогресування пухлини і метастазів. Багато ефектів запалення щодо пухлинної стимуляції залежить від виробництва хемокінів і цитокінів і активації факторів транскрипції онкогенних NF-κB і STAT3. Втручання у виробництво, секрецію і зв'язування з рецепторами хемокінів і цитокінів, які були підтвержені щодо проонкогенних властивостей, представляють собою нові терапевтичні підходи, які повинна бути оцінені з точки зору ефективності як в якості монотерапії та в якості ад'ювантів для хіміо-і променевої терапії. Маючи на увазі взаємне співвідношення між анти-пухлинною (імунного) і про-пухлинною (рак розвитку запалення) ланками імунної системи, також має важливе значення для оцінки ефективності терапевтичних агентів, які заважають активації про-онкогенного шляху в комбінації з агентами або лікування, які посилюють протипухлинний імунітет.

1.5 Сучасні підходи до діагностики ранішніх форм диспластичних процесів шийки матки

Велике значення у своєчасному розпізнаванні передпухлинних і пухлинних процесів надається цитологічній діагностиці патологічних процесів шийки матки. В нашій країні широке упровадження цитологічного скринінгу РШМ почалось тільки в 1978-1979 роках. Цитологічні дослідження використовуються при проведенні скринінгу на РШМ для диференційної діагностики пухлинних і непухлинних захворювань, для оцінки гормонального статусу, радикальності і абластичності операцій, а також для оцінки прогнозу захворювання. Цитологічний метод має лише одну негативну рису - неможливість встановити глибину інфільтративного

росту карцином у зв'язку з відсутністю у дослідженому матеріалі тканинного субстрату [12].

Незважаючи на суттєвий прогрес у вирішенні проблеми лікування пацієнок з доброякісними, фоновими та передраковими захворюваннями шийки матки, її не можна вважати вирішеною, оскільки жоден з запропонованих методів, включаючи радикальні, не має 100 % ефективності, яка б повністю виключала виникнення рецидивів та подальше прогресування захворювання. Певною мірою це пов'язано зі складним патогенезом РШМ та передуючих йому процесів.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Загальна характеристика хворих

Обстежено 110 жінок віком від 25 до 45 років (середній вік $36,4 \pm 1,3$ років). Всі пацієнтки проходили загальноприйняте клінічне, гінекологічне, інструментальне та лабораторне обстеження на базі МКЛ № 9 ім. проф. О.І. Мінакова, згідно чинних клінічних протоколів. Стан шийки матки оцінювали за допомогою цитологічного, кольпоскопічного досліджень, з подальшим патогістологічним дослідженням біопсійного матеріалу, який був взятий з піхвової частини шийки матки після проведення кольпоскопічного дослідження та виконання гістеректомій з 2010 по 2013 рік. Наявність генітальної папіломавірусної інфекції, визначення типу вірусу, рівень активності вірусу за кількістю копій проводилось методом полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі (ПЛР) Real time.

Було зібрано 110 свіжих біоптатів шийки матки, серед яких 20 - з гістологічно верифікованим РШМ (36,4%), 70 передракових (CIN I – 10 (14,3%), CIN II – 32 (45,7%), CIN III – 28 (40,0%)) та 20 нормальних контрольних зразків. Частина кожного зі зразків, була поміщена в охолоджений 1×фосфатний буфер сольового розчину (PBS), які відправлені для молекулярно-біологічних робіт, а друга половина для патогістологічного дослідження в розчині формаліну. Патогістологічний діагноз встановлений згідно класифікації Всесвітньої організації Охорони Здоров'я.

Всі пацієнтки, відібрані для участі у дослідженні, комплексно обстежені відповідно до рекомендацій ВООЗ (1993 р.) та діючих клінічних протоколів, регламентованих наказами МОЗ України від 15.12.2003 №582 і від 31.12.2004 №676).

Групу порівняння склали 20 здорових жінок, обстежених у порядку диспансерного спостереження на клінічних базах кафедри акушерства та гінекології №1 Одеського національного медичного університету.

Усі жінки, включені в дослідження, дали інформовану згоду.

Критерії включення в дослідження:

- Гістологічно верифікований діагноз ураження шийки матки;
- Вік старше 18 років;
- Загальний задовільний стан;
- Відсутність протипухлинного ефекту лікування на фоні лікування, що раніше проводилось, або наявність ознак прогресії після їх проведення;
- Можливість візуальної або інструментальної оцінки динаміки змін;
- Згода на участь у дослідженні.

Критерії виключення з дослідження:

- а) Ураження центральної нервової системи;
- б) Активний аутоімунний процес;
- в) Вік старше 60 років;
- г) Хворі з однією з перерахованих інфекцій: HIV, HBV, HCV;
- д) Наявність інфекційних або важких захворювань серцево-судинної, нервової, дихальної або ендокринної систем; вагітність або лактація;
- е) Порушення функції печінки і/або нирок (білірубін $> 1,5 \times N$, креатинін $> 1,5 \times N$), показники крові: лейкоцити $< 2,5 \times 10^9$ /л, Нь < 90 г/л, лімфоцити $< 1,0 \times 10^9$ /л, тромбоцити $< 75 \times 10^9$ /л.

Вибір чисельності груп обумовлено особливостями епідеміології захворювань шийки матки і тимчасовими рамками проведення дисертаційного дослідження, обсяг вибірки достатній для виявлення факторів ризику. Вкопювання медичної документації здійснювалася за шифрами МКБ (зазначено шифром).

Був проведений детальний аналіз характеристик менструальної, сексуальної функцій (вік менархе, характеристики ОМЦ - тривалість, регулярність, болючість; початок статевого життя, кількість статевих партнерів, контрацептивний анамнез); вивчений репродуктивний анамнез

(кількість пологів, вік перших пологів, шляхи розродження, штучне переривання вагітності, маса тіла дитини при народженні), гінекологічний анамнез (проведено докладний аналіз гінекологічної патології, методів її лікування, проведених раніше; акцентовано увагу на наявності доброякісної і передпухлинної патології шийки матки в анамнезі, структурі діагностичного та лікувального алгоритму при їх виявленні, враховані (по можливості) часові проміжки проведення диспансерного спостереження, цитологічного скринінгу та звернення до гінеколога первинно і після проведеного лікування, якщо таке мало місце).

Етапи роботи були проведені на клінічних та лабораторних базах Одеського державного медичного університету (ректор, академік АМН України, д.мед.н., професор Запорожан В.М.), НДІ молекулярно-генетичної та клітинної медицини ОДМУ (зав. лабораторією, к.мед.н., ст. н.с. Бубнов В.В.), Обласний одеський онкологічний диспансер (головний лікар Добровольський В.В.).

Перед проведенням лікування всі пацієнтки були комплексно обстежені, обсяг діагностичних процедур, згідно з рекомендаціями Всесвітньої організації охорони здоров'я (1993р.) та діючих клінічних протоколів, регламентованих наказами МОЗ України від 15.12.2003 № 582 і від 31.12.2004 № 676), був наступним:

1. Збір анамнезу - скарги, спадкові професійні особливості, вік менархе, особливості статевого життя - початок статевого життя, кількість статевих партнерів, методи контрацепції, репродуктивний анамнез - кількість пологів, абортів, шляхи розродження, масу тіла з якої народжувалися діти; наявність в анамнезі доброкачественної і передпухлинної патології шийки матки, який був обсяг обстежень при виявленні останніх і методи їх лікування (якщо лікування проводилося), інтервали диспансерного спостереження.

2. Онкоцитоморфологічне дослідження мазків шийки матки (з екзо-і ендocerвікса);

3. Кольпоскопія (проста, розширена, з використанням кольорових фільтрів, зокрема, зеленого, для кращого розгляду форми судин).
4. Прицільна біопсія шийки матки \ конус-біопсія (за показаннями).
5. Обстеження на генітальні інфекції (трихомоніаз, хламідіоз, уреоплазмоз, мікоплазмоз, вірус простого герпесу 2 та ін.)
6. Обстеження ВПЛ з визначенням онкогенного потенціалу вірусу.
7. УЗД органів малого тазу.
8. Консультування суміжними спеціалістами за показаннями.
9. Мамографія (за рекомендаціями мамолога).
10. Пацієнтки, яким за показаннями проводилося в якості діагностики або лікування операція (конусоподібна ексцизія шийки матки) - були обстежені згідно з нормативами з надання акушерсько-гінекологічної допомоги, необхідним при проведенні малих гінекологічних операцій: загальноклінічні обстеження (ОАК, ОАМ, коагулограма, печінкові проби), ЕКГ, консультація терапевта, анестезіолога (наказ № 620 від 29.12.2003 р. []).

Гінекологічне обстеження складалося з огляду зовнішніх статевих органів, піхви, огляду шийки матки в дзеркалах. При бімануального дослідженні оцінювали розмір, щільність, рухливість, форму, положення матки, стан яєчників, наявність об'ємної патології в малому тазу, форму, щільність шийки матки, стан параметріїв.

Всім пацієнткам проводилося кольпоскопічне дослідження (проста і розширена кольпоскопія) [5]. Кольпоскопія проводилася в 1 фазу менструального циклу (МЦ), на 7-8 день, у випадках підозри на ендометріоз шийки матки кольпоскопію проводили повторно за 2-3 дні до очікуваної менструації. Перед проведенням процедури пацієнтку попереджали які умови слід дотриматися: за 2-3 дні до процедури не використовувати вагінально медикаменти, що не спринцеватися, утриматися від статевого життя. При проведенні кольпоскопічного дослідження пацієнткам проводився забір матеріалу для цитологічного дослідження або первинно, або при необхідності повторний аналіз з метою уточнення діагнозу.

Забір матеріалу для цитологічного дослідження [7] проводився або перед проведенням кольпоскопії, або ж в інший день, у другу фазу МЦ. Матеріал розподіляли тонким шаром, як мінімум на 2 скла, при необхідності виробляли паркан з максимально зміненої ділянки шийки матки на окреме скло (індивідуально).

Ультразвукове дослідження органів малого тазу [9] проводили з використанням абдомінального та вагінального датчиків. При УЗ - дослідженні оцінювали форму, розмір, щільність матки, яєчників, шийки матки. Стан слизової оболонки матки і цервікального каналу.

2.2 Клиніко-лабораторні дослідження

2.2.1 Методика проведення кольпоскопії. Кольпоскопія - метод дослідження епітелію шийки матки і піхви за допомогою спеціального приладу - кольпоскопа, що забезпечує збільшення в 8-40 і більше разів [17].

Кольпоскопія дозволила оцінити стан епітелію, судин, кольору, рельєфу шийки матки, слизової піхви; виявити вогнище (і) ураження та їх поширеність, площа; віддиференціювати доброякісні зміни від підозрілих щодо малігнізації і при необхідності здійснити прицільне взяття мазків і біопсії, що істотно підвищує інформативність цитоморфологічного дослідження.

Оцінку кольпоскопічних змін давали згідно з двома класифікаційними системам: Міжнародній класифікації кольпоскопічних термінів, прийнятої на VI Всесвітньому конгресі з кольпоскопії в Римі (1990) [22] (Міжнародна класифікація IFCPC (1990)) та класифікації Ганіною К.П., Коханевич Є.В., Мельник О.М. (1984) [38]. Кольпоскопію проводили всім пацієнткам за допомогою кольпоскопа МК 200 (Україна, м. Черкаси), а також за допомогою кольпоскопа «Leisegang I Light» (Німеччина), у всіх клінічних випадках була виконана відеокольпоскопія з роздрукуванням ув'язнення з зображенням шийки матки, стандартно роздруковували 2 фото: проба з 3%

оцтовою кислотою і проба Шиллера. При необхідності роздруковували більше зображень для можливості максимальної візуалізації зміненого епітелію шийки матки, надання повної кольпоскопічне картини, а також для проведення порівняльного аналізу до і після лікування. Роздрукування висновків із зображеннями шийки матки проводилося за допомогою лазерного принтера виробник «EPSON» (Тайвань) на спеціальному фотопапері.

Кольпоскопію проводили наступним чином [17]. 1. Проста кольпоскопія. Хвору укладали на гінекологічне крісло, шийку матки оголювали за допомогою дзеркал. Проста кольпоскопія вагінальної частини шийки матки проводилася без видалення слизу з її поверхні. Шийку матки оглядали послідовно, квадрант за квадрантом, за напрямком годинникової стрілки. Враховували колір і рельєф слизової оболонки, межу плоского і циліндричного епітелію, розташування і форму кровоносних судин, характер і кількість виділень. Після обережного видалення слизу огляд повторювали. Просту кольпоскопію виконували без застосування барвників і виконання діагностичних тестів.

2. Розширена кольпоскопія. При розширеній кольпоскопії слизову оболонку шийки матки вивчали після обробки розчином 3% оцтової кислоти і розчином Люголя (проба Шиллера), також використовували зелений фільтр для кращої візуалізації судин шийки матки.

Побіління і набухання зміненого епітелію чітко дозволяло побачити його межі. Слід зазначити, що процес побіління епітелію займає близько 1-2 хвилин, а через 2 хвилини кольпоскопічні картина поверталася до вихідної, тому важливим було розгляд кольпоскопічних афектів в перші хвилини проведення проби. Дану пробу ми розглядали, як основну і важливу, оскільки саме при проведенні цієї проби можна побачити наскільки грубі зміни епітелію шийки матки мають місце бути в кожному випадку. При пробі з 3% оцтовою кислотою чітко можна віддиференціювати метаплазорованном епітелій від патологічно зміненого залежно від ступеня інтенсивності побіління, наявності мозаїчних, точкових елементів, їх

однорідності (мономорфні, поліморфні). Крім того, при проведенні вищевказаної проби можна візуалізувати ряд змін, характерних для вірусного ураження. Судинна реакція при проведенні проби з 3% оцтовою кислотою також має своє пояснення: незмінені судини (судини правильної форми, зі збереженим дихотомічним поділом), зникали на кілька секунд при проведенні проби, атипові ж судини - не реагували на цю пробу. Пояснюється цей факт наявністю м'язового шару в нормальних незмінених судинах, атипові судини не мають м'язової прошарку, у зв'язку з чим, не реагують на вищеописану пробу. При наявності запального процесу, на тлі загальної гіперемії екзоцервікса, відзначається більш тривала судинна реакція при проведенні проби з 3% оцтовою кислотою, побіління шийки матки тримається дещо довше, на відміну від ситуацій, коли запалення відсутнє.

Проба Шиллера. Після обробки шийки матки оцтовою кислотою застосовували пробу з розчином Люголя. У проміжному шарі МПЕ накопичується глікоген, який вступає в реакцію з розчином Люголя, після чого здорові незмінені клітини, багаті глікогеном фарбуються в темно-коричневий колір - екзоцервікс при цьому набуває рівномірний темно-коричневий колір. Ділянки зміненого епітелію набувають світло - жовтий або світло - коричневий колір (що характерно для вірусного ураження), або ж візуалізувати чітко йод-негативні («німі») ділянки. Останні характерні для грубих уражень епітелію шийки матки. Також спостерігалось слабе фарбування циліндричного, метапластичного, атрофічного епітеліїв; ділянки локального запалення мали плямисту нерівномірне забарвлення (симптом «шкура гепарда»), контури при цьому були нечіткі. Проба Шиллера обов'язково проводилася перед біопсією шийки матки, конусоподібної ексцизією з метою чіткої візуалізації кордонів поразки. Для детального вивчення архітектоніки судинного малюнка, форми судин ми використовували зелені фільтри.

2.2.2 Методика проведення цитологічного дослідження.

Цитологічний метод дослідження мазків шийки матки розглядається як основний скринінговий метод, що передує кольпоскопії і біопсії шийки матки [5].

Матеріал для цитологічного дослідження забирався під час гінекологічного огляду. Перед отриманням матеріалу шийку матки оглядали в дзеркалах. Інструменти, які використовуються для забору цитологічного матеріалу, були стерильними і сухими. Уточнювали, щоб у пацієнтів протягом доби попередніх діагностичної процедури не було введення в піхву медикаментів, статевого акту, спринцювань. У разі значних виділень з піхви, шийку матки обережно просушували марлевим тампоном.

Забір матеріалу проводили легким зішкрібком зі всієї поверхні шийки матки за допомогою дерев'яних, пластмасових або металевих шпатель (типу шпателя Ейра); з цервікального каналу - спеціальною щіточкою, завдяки будові якої отримували матеріал з усієї поверхні слизової оболонки цервікального каналу. Отриманий матеріал розподіляли тонким пластом на знежирене предметне скельце. При відсутності видимих змін шийки матки матеріал брали з усієї поверхні шийки матки і з цервікального каналу на окремі скельця. Препарат на скельці маркірувався літерами Ш (із шийки матки), і Ц (з цервікального каналу). При патологічних змінах шийки матки матеріал брався з трьох (або більше - визначали індивідуально) місць: поверхня шийки матки, цервікальний канал, місце ураження (з дільниці, підозрілого на рак).

Цитологічне дослідження шийки матки проводилося з фарбуванням препаратів за методом Папаніколау, Паппенгейм і Романовського-Гимзе (відділення патоморфології Обласного онкологічного диспансеру, м. Одеса).

Трактування морфологічних діагнозів здійснювали за допомогою зведеної класифікаційної системи Richart (1968 р.) і цитологічної класифікації за Папаніколау. Для виставлення остаточного діагнозу використовували термінологію CIN (CIN 1, CIN 2, CIN 3) з метою

позначення передпухлинних змін епітелію шийки матки і визначення їх ступеня тяжкості.

Richart в 1968 році запропонував і ввів термін «цервікальна інтраепітеліальна неоплазія» (CIN, CIN), що є синонімом термінів «дисплазія і преінвазивна карцинома». Легка дисплазія відповідає CIN I, помірна дисплазія - CIN II, поняття CIN III об'єднує важку дисплазію і cancer in situ. Обумовлено це тим, що цитологічних та гістологічних диференціювати важку дисплазію і преінвазивного рак один від одного представляє певні труднощі, а терапевтична тактика в обох ситуаціях ідентична, у зв'язку з цим вони були об'єднані в CIN III. Дана термінологія прийнята Всесвітньою організацією охорони здоров'я (ВООЗ, 1993).

Найбільш специфічним цитологічним критерієм ВПЛ ми вважали наявність койлоцитів, а також цитологічні позначення "зміни, характерні для ВПЛ", «койлоцитарная атипия», «койлоцитоз». Койлоцити утворюються в тканинах в результаті цитопатичного ефекту ВПЛ і являють собою клітини проміжного типу з збільшеними в різному ступені ядрами, нерівній складчастої мембраною і гіперхроматоз. Цитоплазма зберігається лише в периферичних відділах клітини з характерною обширної околядерной зоною просвітління за рахунок дегенеративних змін і некрозу зруйнованих цитоплазматичних органел і складається з однієї або декількох порожнин.

2.3.1 Лабораторні методи діагностики.

2.3.1.1 Визначення ВПЛ та інфекцій статевих органів за допомогою полімеразної ланцюгової реакції.

ВПЛ у фіксованих препаратах визначали за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). ПЛР була проведена за стандартною методикою у два етапи. Спочатку проводилася ПЛР на групову специфічність ВПЛ альфа-групи високого онкогенного ризику такі як: 6, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 або 68. При позитивній реакції визначали тип вірусу.

Для імуногістохімічної реакції на ВПЛ використано мишачі моноклональні антитіла (Biomol, Німеччина). У якості імуногена використана ДНК ВПЛ 1 типу із спектром реактивності поширеним на ВПЛ 6, 11, 16, 18, 31, 33, 42, 51, 52, 56 і 58 типів.

Інфекції генітального тракту, в тому числі і ВПЛ з визначенням онкогенного потенціалу визначали методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з використанням «Набору для виділення ДНК з біопроб» (Росія, м. Москва, Науково-производственная фірма «Літех»). Комплект «ДНК-ЕКСПРЕС» складається з 100 пробірок типу Еппендорфф об'ємом 1,5 мл з замикалася кришкою, що містять по 200 мкл реагенту.

В основі методу лежить виявлення специфічного фрагмента ДНК мікроорганізму шляхом накопичення (ампліфікації) копій даного фрагмента (ДНК-мішені) у процесі синтезу нових ланцюгів ДНК [37].

Полімеразна ланцюгова реакція являє собою багаторазово повторювані цикли синтезу ДНК-мішені у присутності термостабільної ДНК-полімерази, дезоксинуклеозидов-трифосфатов (дНТФ), відповідного сольового буфера і олігонуклеотидних затравок - праймерів, що визначають межі ампліфіціруемого ділянки ДНК-мішені. Кожен цикл складається з трьох стадій з різними температурними режимами. На першій стадії при 94оС відбувається поділ ланцюгів ДНК, потім при 57-62оС - приєднання (отжиг) праймерів до гомологічним послідовностям на ДНК-мішені, і при температурі 72оС протікає синтез нових ланцюгів ДНК шляхом подовження праймера в напрямі 5-3 '.

У кожному циклі відбувається подвоєння числа копій ампліфіціруемого ділянки, що дозволяє за 35 циклів напрацювати фрагмент ДНК, обмежений парою обраних праймерів, в кількості, достатній для його детекції за допомогою електрофорезу.

ПЛР-аналіз складався з 3 лабораторних етапи:

1. Обробці клінічних проб (виділення ДНК).
2. Постановка реакції ПЛР (ампліфікація).

3. Детекція продуктів ампліфікації (у даній методиці електрофоретичної поділ продуктів в агарозному гелі).

Взяття біоматеріалу проводилося в умовах поліклініки, в оглядовому гінекологічному кабінеті. За 10 днів до взяття матеріалу на дослідження пацієнткам забороняли прийом будь-яких антибактеріальних препаратів, а також інших медикаментів, дія яких могло б позначитися на результаті обстеження. Матеріал для дослідження набирали перед менструацією або через 1-2 дні після її закінчення, забезпечуючи тим самим фізіологічну провокацію інфекцій. Також використовували харчову провокацію (за добу до аналізу пацієнткам рекомендували вживання гострої, солоної їжі) і медикаментозну провокацію (внутрішньом'язове введення 1,0 мл гоновакцини за 24 години до забору матеріалу для дослідження). Пацієнток попереджали, що напередодні обстеження на ЗПСШ, вони не повинні проводити туалет зовнішніх статевих органів, спринцювання, утриматися від статевих контактів та використання місцевих сперміцидних та інших медикаментозних засобів за 3-5 днів до забору біоматеріалу для ПЛР-аналізу. Взяття біоматеріалу для контролю ефективності лікування проводилося через 3-4 тижні після закінчення терапії.

Кількість матеріалу, що забирається для дослідження при взятті мазків і зіскрібків, можна було назвати достатнім, порівнявши з розміром «сірникової головки». В якості інструменту для взяття зіскрібків і мазків для ПЛР-аналізу використовували за рекомендаціями виробника набору одноразовий урогентіальний зонд (щіточку), який збирає необхідну кількість епітелію, не травмуючи слизову, майже не вбирає зразок і добре віддає зібраний матеріал в рідку транспортну середу. Зберігали попередньо оброблені проби в реагенті «ДНК-ЕКСПРЕС» при температурі -18 ...-20оС - не більше 2-х тижнів.

Перший лабораторний етап - виділення ДНК з біопроб. Пробірку з реактивом "ДНК-ЕКСПРЕС", що містить аналізований матеріал, ретельно перемішували на мікроцентрифузі-струшувачі (вортексі) протягом 10 секунд. Пробірку з перемішаним вмістом поміщали в твердотільний

термостат попередньо прогрітий до 98°C і прогрівали при 98°C протягом 10 -15 хвилин. Перед приміщенням пробірок в термостат обов'язково перевіряли, щоб у всіх пробірках був заклацнути замочок на кришках. Після прогріву пробірки переносили в високошвидкісну Мікроцентрифуга і центрифугували при 12000-16000g (8 - 12000 об / хв) при кімнатній температурі протягом 20-30 сек. Отриманий в результаті центрифугування супернатант використовували як досліджуваного зразка ДНК для постановки ампліфікації.

Наступний лабораторний етап - ампліфікація виконували в такій послідовності. Пробірки для проведення ампліфікації місткістю 0,5 мл (або 0,2 мл) пронумеровувати відповідно до кількості аналізованих проб на наявність ДНК обраного збудника. Готували і промаркіровували пробірки для позитивного (маркування «К +») і негативного (маркування «К-») контрольних зразків. У комплектах для ПЛР для типування мікроорганізмів в одній реакції (ГЕРПОЛ 1 +2, Полімік-Б, ВПАПОЛ 16/18, ВПАПОЛ 6/11) реакція ставилася з двома позитивними контрольними зразками.

Аналіз результатів. У негативному контрольному зразку (К-) для наборів з внутрішнім контролем виявлялася одна смуга оранжево-червоного кольору, відповідна внутрішньому контролю (ВК). Поява другої смуги на рівні позитивного контролю свідчило про контамінації (забрудненні) компонентів набору. Для наборів без внутрішнього контролю смуги були відсутні. Поява смуги на рівні позитивного контролю свідчить про контамінації (забрудненні) компонентів набору.

У позитивному контрольному зразку (К +) для наборів з внутрішнім контролем виявлялися дві смуги: 1) смуга оранжево-червоного кольору, відповідала позитивному контролю (ПК), 2) смуга оранжево-червоного кольору, відповідала внутрішньому контролю (ВК).

Для наборів без внутрішнього контролю виявлялася одна смуга, відповідна ПК.

Аналіз проб. Відсутність смуги оранжево-червоного кольору строго на рівні позитивного контролю (ПК) свідчило про відсутність ДНК

шуканого збудника в аналізованій пробі; наявність смуги, відповідної по електрофоретичній рухливості позитивному контролю - свідчило про присутність ДНК шуканого збудника в аналізованій пробі. У всіх негативних зразках виявлялася смуга оранжево-червоного кольору, відповідна внутрішньому контролю (ВК).

2.3.1.2 Бактеріоскопічне дослідження. Мікроскопічна оцінка мазків з піхви проводилася після висушування останніх на повітрі, фіксації і фарбування.

Приготування мазків

Досліджуваний матеріал розподіляють тонким шаром по поверхні предметного добре знежиреного скла. Біоматеріал, нанесений на предметне скло ближче до вузького краю, накривають іншим предметним склом. Скла злегка придавлюють один до одного. Після цього вільні кінці стекол захоплюють I і II пальцями обох рук і розводять у протилежні сторони так, щоб при русі обидва скла щільно прилягали один до одного. Таким чином, виходять мазки з рівномірно і тонко розподіленим матеріалом.

Висушування і фіксування мазків

Приготований на предметному склі мазок висушують на повітрі і після повного висихання фіксують. При фіксуванні мазок закріплюється на поверхні предметного скла, і тому при подальшій забарвленні препарату мікробні клітини не змиваються. Крім того, убиті мікробні клітини фарбуються краще, ніж живі.

Розрізняють фізичний спосіб фіксації, в основу якого покладено вплив високої температури на мікробну клітину, і хімічні способи, що передбачають застосування хімічних засобів, що викликають коагуляцію білків цитоплазми. Фарбування мазків проводили за Грамом.

2.4. Методика біопсії, конусоподібної ексцизії (електроконізація \ ножова конізація) шийки матки.

Біопсію шийки матки виконували під контролем кольпоскопії, при необхідності проводили пробу Шиллера. З цією метою шийку матки

виводили в дзеркалах, фіксували кульовими щипцями і підтягували до області входу в піхву. У всіх випадках була виконана ножова біопсія за допомогою скальпеля. Скальпелем відсікали клиновидний ділянку з підлеглою стромою з максимально зміненої області шийки матки, в деяких випадках біопсійний матеріал набирали з різних зон шийки матки, підозрілих на малигнізацію. При необхідності на область дефекту після біопсії накладали 1 - 2 кетгутових шва. При проведенні тільки біопсії шийки матки, останню виконували в умовах поліклініки, в кабінеті патології шийки матки, перед процедурою шийку матки обробляли лідокаїном 2% з метою знеболення. Якщо біопсію шийки матки виконували з одночасним фракційним діагностичним вишкрібанням слизової порожнини матки і цервікального каналу під \ без гістероскопічного контролю або разом з ендцервікальною кюретажем, ці оперативні втручання проводили в умовах стаціонару з використанням анестезіологічної допомоги. Основне завдання біопсії - постановка діагнозу, що може бути вирішальним у визначенні подальшої терапевтичної тактики, саме тому правильно і грамотно виконана біопсія є запорукою успішного лікування пацієток.

При виконанні фракційного діагностичного вишкрібання слизової порожнини матки і цервікального каналу, конусоподібної ексцизію шийки матки пацієнтку укладали на гінекологічне крісло в положенні для малих гінекологічних операцій. Дезінфікуючим розчином (% розчин Йодобака) обробляли область малих і статевих губ, лобок, верхню третину внутрішньої поверхні стегон, промежину. Шийку матки оголювали в дзеркалах, обробляли дезінфікуючим розчином (% розчин Йодобака). На передню губу шийки матки тангенціально накладали кульові щипці. Проводили зондування матки, відзначаючи при цьому максимальне проникнення зонда по вимірювальній шкалі. Наступним етапом було розширення цервікального каналу розширювачами Гегара до № 11. Таке розширення цервікального каналу забезпечує достатній і вільний відтік рідини з порожнини пр необхідності проведення гістероскопії. Крім того, введена в порожнину матки рідина в меншій кількості потрапляє в черевну

порожнину, що знижує ризик інфекційних ускладнень. Після розширення цервікального каналу в порожнину матки вводили гістероскоп з підключенням світловода та променевої системи. Просування гістероскопу здійснювали лише після заповнення останнього рідким середовищем і під контролем зору, обережними і акуратними рухами. Для кращого огляду створювали тиск 100-120 мм рт.ст., але не більше 200 мм рт. ст. Огляд починали з загального огляду порожнини матки. Звертали увагу на величину, форму порожнини матки, рельєф стінок, стан слизової оболонки, її фарбування, товщину складчастості, ступінь вираженості і рівномірність судинного малюнка, доступність і стан гирл маткових труб. Далі гістероскоп просували до дна матки і, за допомогою кругових рухів по його осі, проводили огляд всієї порожнини матки. Після огляду порожнини матки гістероскоп повільно переміщали до зовні, як би «задкуючи назад» і «виходячи» з порожнини матки у напрямку до цервікальному каналу. Проводили ретельно цервікоскопію: звертали увагу на довжину, ширину цервікального каналу, стан слизової оболонки, судинний малюнок, рельєфність, наявність деформації останнього. Після діагностичної гістероскопії проводили фракційне діагностичне вишкрібання слизової порожнини матки і цервікального каналу кюреткой № 2. Ми проводили в кожному випадку ножову біопсію за допомогою скальпеля. Шийку матки фіксували кульовими щипцями і підтягували до області входу в піхву. Проводили пробу Шиллера. Скальпелем відсікали клиновидний ділянку шийки матки в межах здорових тканин з підлеглою строю. У разі кровотечі накладали 1-2 кетгутових шва на область дефекту шийки матки. У деяких клінічних випадках біопсію проводили з двох ділянок шийки матки. Отриманий матеріал фіксували в 10%-му розчині нейтрального формаліну і відправляли на гістологічне дослідження.

Для проведення гістероскопії використовували спеціальні набори обладнання та інструментів виробництва «OLYMPUS» (Японія), «KARL STORZ», «MARTIN» (Німеччина). Операції проводилися з використанням

анестезіологічного забезпечення (ТВВА - тотальна внутрішньовенна анестезія).

Конусоподібну ексцизії шийки матки проводили кількома методиками, це залежало від мети, яка ставилася перед даною маніпуляцією, від стану форми шийки матки: лікувальна або діагностична. Конізацію шийки матки виконували після ФДВ. Пацієнтку укладали на гінекологічне крісло в положенні для малих гінекологічних операцій. Дезінфікуючим розчином (% розчин Йодобака) обробляли область малих і статевих губ, лобок, верхню третину внутрішньої поверхні стегон, промежину. Шийку матки оголювали в дзеркалах, обробляли дезінфікуючим розчином (% розчин Йодобака). Далі на передню губу шийки матки накладали тангенціально кульові щипці. За допомогою електрода Роговенко (розмір, кут підбирався індивідуально, залежно від клінічної ситуації) проводили конусоподібну ексцизії шийки матки. Електрод прикладали щільно до шийки матки і його активною частиною розсікали передню губу на 12 ч.у.ц. і одномоментно (одним рухом руки) проводили ротацію на 3600, при цьому тканини шийки матки циркулярно розсікали. У разі необхідності гудзиковим електродом забезпечували додатковий гемостаз. Куксу шийки матки обробляли розчином перманганату калію, проводили тампонаду піхви. Отриманий матеріал фіксували в 10%-му розчині нейтрального формаліну, відправляли на гістологічне дослідження.

Ножова конізація шийки матки. Пацієнтку укладали на гінекологічне крісло в положенні для малих гінекологічних операцій. Дезінфікуючим розчином (% розчин Йодобака) обробляли область малих і статевих губ, лобок, верхню третину внутрішньої поверхні стегон, промежину. Шийку матки виводили в дзеркалах, на «3» і «9» годин умовного циферблата захоплювали на однозубого затискачі, далі в цих місцях накладали лігатури з метою перев'язування низхідних гілок маткової артерії та попередження кровотечі. Кінці лігатур залишали довгими, щоб шийку матки можна було відтягнути допереду. Проводили пробу Шиллера. У цервікальний канал

вставляли розширювач Гегара (№ 4 або № 5), починаючи з задньої губи виробляли розріз на глибину 5мм і формували конус таким чином, щоб верхівка конуса захоплювала цервікальний канал. Після відсікання тканини шийки матки, на що залишилася культі шийки матки проводили додатково гемостаз за допомогою пуговчатого електрода. Перед проведенням ножовий конусоподібної ексцизію шийки матки обов'язково виконували фракційне діагностичне вишкрібання слизової порожнини матки і цервікального каналу. Отриманий матеріал фіксували в 10%-му розчині нейтрального формаліну, відправляли на гістологічне дослідження.

2.5. Методика вестернблоттінгу (Western Blotting)

Наявність експресії STAT-3 визначали за допомогою методу Western Blotting за наступною методикою: зразки тканини лізували у лизуючому буфері, що містить 1 % NP40 і 0,1 % SDS. Концентрацію білка визначали з використаного альбуміну і набору для аналізу Bradford reagent (R1271, Fermentas) відповідно до протоколу виробника. Рівні кількості лізата (близько 30 мкг - за сумарною концентрації білків у пробі) були розділені за молекулярною вагою в 12% ПААГе з 0,1% SDS, потім переносили на нітроцелюлозну мембрану та проводили імуноблот-аналіз зі специфічними антитілами проти Stat3 (SantaCruz, США) і Bcl-XL и β-актину (Sigma-Aldrich, Сент-Луїс, Міссурі, США). Специфічні білки візулізували з використаних набору реагентів PolyVue HRP/DAB Detection system (PV 100D, Diagnostic Biosystems, USA). Специфічні смуги аналізували за допомогою програми Quantity ONE і системи відеодокументації VersaDOC 4000MP (BIO-RAD). Молекулярну вагу специфічних білків вираховували за допомогою програми Quantity ONE за стандартними пофарбованим білком PageRuler Prestained Protein ladder Plus (SM 1811, Fermentas) які наносили на гель і переносили на мембрану.

Статистичний аналіз здійснювали за допомогою пакету програм Statistics 10. Значення $p < 0,05$ вважали статистично достовірним.

2.6. Статистичні методи.

Статистична обробка проводилася методами аналізу таблиць спряженості, дисперсійного та кореляційного аналізу [17]. Перевірці гіпотез про положення та розсіяння передувало проведення перевірки нормальності розподілу кількісних ознак з використанням критерію Колмогорова-Смірнова та перевірки рівності генеральних дисперсій за допомогою критерію Фішера. Після підтвердження факту нормальності розподілу ознак та рівності дисперсій для порівняння груп та перевірки гіпотези про рівність центрів розподілу у вибірках, що представляли кількісні дані, одержані для різних референтних груп (контролю та досліду), використовували непарний критерій Ст'юдента. Нульова гіпотеза ($H_0: \bar{X}_1 = \bar{X}_2$ проти $H_1: \bar{X}_1 \neq \bar{X}_2$) приймалася якщо за абсолютною величиною критеріальне значення було більше максимуму t-розподілу, взятого з v ступенями свободи, тобто при $|t| > t_{v, \alpha/2}$. Альтернативна гіпотеза ($H_0: \bar{X}_1 \leq \bar{X}_2$ проти $H_1: \bar{X}_1 > \bar{X}_2$) приймалася якщо за абсолютною величиною критеріальне значення було більше максимуму t-розподілу, взятого з v ступенями свободи при $|t| > t_{v, \alpha}$.

У випадку непідтвердження припущення про нормальність розподілу кількісних ознак, а також при порівнянні референтних груп за порядковими та дискретними ознаками використовувався непараметричний критерій Вілкоксона-Мана-Уїтні.

Кореляційний аналіз проводився для величин, розподілених за законом нормального розподілу за методом Пірсона. Для величин, що мали інший характер розподілу, для якісних та дискретних величин за методом рангової кореляції Спірмена [35].

На всіх етапах проведення статистичного аналізу для підготовки первинних таблиць спряженості та групування ознак використовувалися стандартні функції програмного пакету MS Excell 7.0. Визначення

критеріальних значень та основні обчислення проводилися за допомогою статистичних пакетів програми Statistica 7.0.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ КОМПЛЕКСНОГО ОБСТЕЖЕННЯ ДОСЛІДЖУВАЛЬНИХ
ГРУП

3.1 Клінічна характеристика обстежених хворих

Комплексно обстежені відповідно до вимог чинних клінічних протоколів, регламентованих наказами МОЗ України (№ 582 від 15.12.2003, № 676 від 31.12.2004, № 417 від 15.07.2011) 90 пацієнок із передраковими та злоякісними новоутвореннями жіночих статевих органів. Пацієнтки з РШМ (n=20) відносилися до стадій захворювання (T1N1M0), крім того було обстежено 50 жінок з дисплазією шийки матки (група CIN).

Клініко-патогістологічна характеристика та наявність ВПЛ представлені в таблиці № 1

Таблиця 1

Клініко-патогістологічна характеристика зразків тканини шийки
матки

Тип тканини	Характеристика	Кількість	ВПЛ 16, 18 тип, (%)	Середній вік
Нормальні зразки	ВСЬОГО	20	11 (55,0)	
	Нормальні зразки без запалення	4	2 (50,0)	35,1±4,2
	Нормальні зразки з ознаками	16	9 (56,2)	28,0±1,8

	запалення			
Дисплазії	ВСЬОГО	70	47 (67,1%)	29,1±2,2
	1	10	7 (70%)	
	2	32	24 (75%)	
	3	28	16 (57,1%)	
Плоскоклітинна карцинома		20	20 (100,0%)	40,3±2,5

Як показано на рисунку (рис. 1), імуноблот-аналіз клітинних білків показав наявність конститутивної експресії STAT3 у всіх зразках РШМ, причому ступінь експресності була різною.

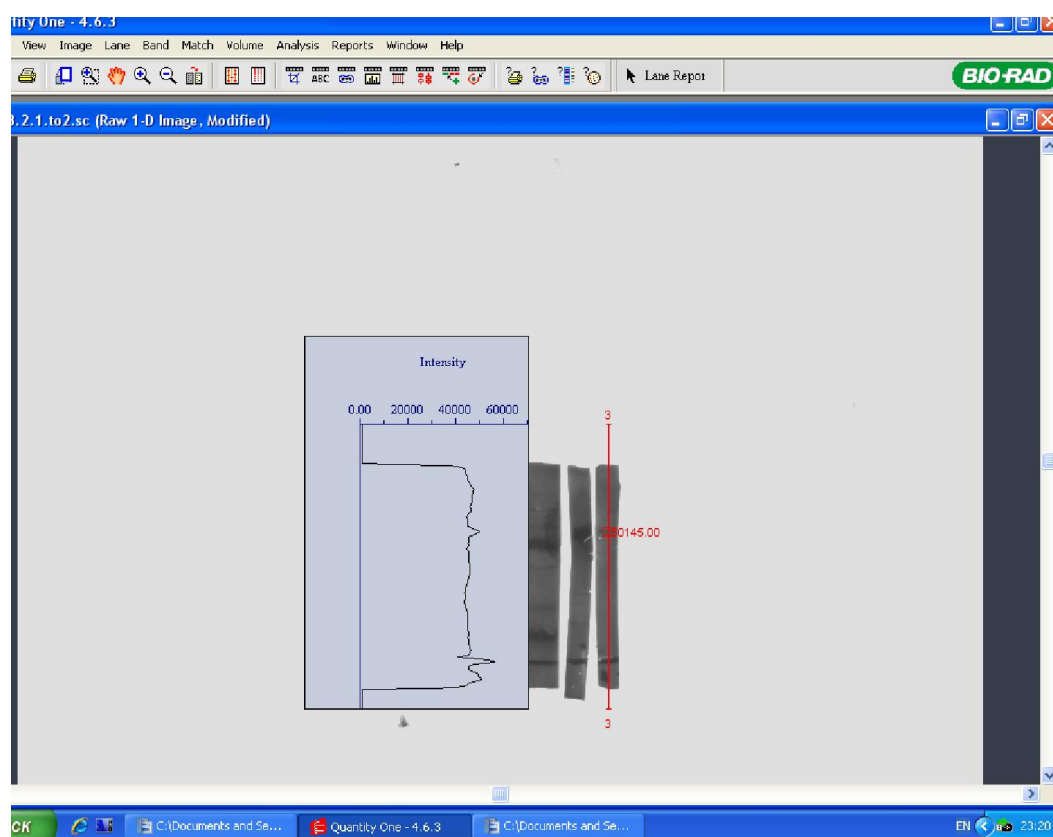


Рис. 3 Висока експресія STAT3 у пацієнтки Н., 47 років, з РШМ

При розвитку папіломавірусної інфекції (ПВІ) порушення в імунній системі супроводжуються зміною показників інтерферонового статусу, фенотипових і функціональних показників лімфоцитів крові, що залежить від серотипу вірусу. Імунітет до вірусу папіломи людини (ВПЛ) є типоспецифічним і не запобігає наступному інфікуванню іншими широко розповсюдженими серотипами ВПЛ. У хворих із ПВІ визначається зниження вмісту в крові лімфоцитів, пригнічення здатності лейкоцитів продукувати лейкоцитарний та імунний інтерферони, зміни в гуморальних факторах місцевого захисту. Різке зниження місцевого імунітету у хворих ПВІ виражається в зниженні в цервікальному слизу рівня IgA і IgG при підвищеній концентрації IgM. Результати досліджень переконують у тім, що ВПЛ не володіє цитопатичними властивостями: не реплікується й не інфікує антиген-презентуючі клітки й не руйнує кератиноцити. Існування хронічної інфекції свідчить про те, що протягом тривалого часу немає ефективної імунної відповіді, тому що відсутня фаза розмноження ВПЛ під час життєвого циклу, що дозволяє вірусу обійти імунну систему. При вивченні фенотипу лімфоцитів крові при ПВІ виявлені зміни (зниження вмісту Т-килерів і збільшення Т-хелперів), що відрізняються від інших вірусних інфекцій: герпесвірусної, ВІЛ, гострої інфекції, викликані вірусом Епштейна-Барр. За даними літератури, значимим фактором, але мало вивченим дотеперішнього часу, є мікстинфікування різними серотипами ВПЛ.

Фактори ризику неопластичної прогресії можуть бути імунними (стан місцевого імунітету), генетичними (мутації в деяких генах, що беруть участь у клітинній регуляції), гормональними і вірусними (зв'язок між ступенем дисплазії епітелію шийки матки з вірусним навантаженням і статусом ДНК ВПЛ). Дотепер немає чіткої визначеності відносно факторів, що обумовлюють різні темпи персистування ПВІ, не виявлені достовірні прогностичні ознаки, що визначають можливість персистенції вірусу [7,8].

Особливу роль в реалізації протипухлинного захисту на етапі канцерогенезу відіграє стан місцевого імунітету. Цитокіни, виконуючи функції медіаторів, регулюють ступінь імунної відповіді при захворюваннях пухлинної природи. Визначення концентрації цитокінів в крові дає інформацію про функціональну активність різних типів імунокомпетентних клітин, тяжкість запального процесу, його перехід на системний рівень і про прогноз захворювання. Патологічні стани, а саме, запалення та інфекційне ушкодження ВПЛ, стимулюють імунну клітинну відповідь шляхом вивільнення медіаторів, які забезпечують виживання пухлинних клітин і швидке збільшення осередків пухлин паракринним шляхом. Крім того, епігенетичні мутації онкогенів та хромосомні аберації пухлино-супресорних генів стимулюють продукцію пухлинних медіаторів в межах мікрооточення пухлин, що сприяє розвитку неопластичних процесів аутокринним шляхом. Ці два шляхи концентруються в осередках пухлини і призводять до активації латентного сигнального трансдуктора і активатора транскрипції 3 (STAT-3), який є посередником транскрипційної відповіді, що сприяє виживанню та швидкому росту клітин і ангиогенезу. Надлишок цитокінів, які активізують STAT-3 в межах мікросередовища пухлини, таких як, інтерлейкіни (ІЛ) ІЛ 6, ІЛ 10 і ІЛ 17/23, створює основу сигнальної мережі, яка одночасно просуває ріст неопластичного епітелію, ініціює запалення і пригнічує анти-пухлинну імунну відповідь організму. Відповідно, аномальна і постійна активація STAT-3 часто спостерігається в злоякісних пухлинах епітеліального походження і асоціюється із негативним результатом. Сигнальний трансдуктор і активатор транскрипції-3 є одним з шести членів сімейства транскрипційних факторів. STAT-3 було відкрито майже 15 років тому, як білок «гострої фази» запалення. Цей фактор був пов'язаний із запаленням, клітинною трансформацією, проліферацією, інвазією, регенерацією тканин, і метастазуванням ракових утворень. Різні види канцерогенів, радіації, вірусів, факторів росту, онкогенів і запальних цитокінів, як з'ясувалося, активізували STAT-3. STAT-3 є активним у багатьох пухлинних клітинах, але не в нормальних клітинах. Коли білки

системи STAT-3 активовані, вони потрапляють в ядро і впливають на певні ділянки ДНК. Зв'язуючись з регуляторними ділянками ДНК, білки системи STAT-3 можуть впливати на гени включаючи або вимикаючи їх [9,10].

Дослідники вважають, що надактивність білків системи STAT-3 змушує клітини продовжувати рости і ділитися, і попереджує самознищення клітини (апоптозу). Через свою ключову роль в онкогенезі, в даний час досліджуються інгібітори активації цього фактора для профілактики і лікування раку. Це призвело до ідентифікації малих пептидів, олігонуклеотидів, і малих молекул, як потенційних інгібіторів STAT-3 [11].

Велике значення у своєчасному розпізнаванні передпухлинних і пухлинних процесів надається цитологічній діагностиці патологічних процесів шийки матки. В нашій країні широке упровадження цитологічного скринінгу РШМ почалось тільки в 1978-1979 роках. Цитологічні дослідження використовуються при проведенні скринінгу на РШМ для диференційної діагностики пухлинних і непухлинних захворювань, для оцінки гормонального статусу, радикальності і абластичності операцій, а також для оцінки прогнозу захворювання. Цитологічний метод має лише одну негативну рису - неможливість встановити глибину інфільтративного росту карцином у зв'язку з відсутністю у дослідженому матеріалі тканинного субстрату [12].

3.2 Результати дослідження експресії пухлинного супресора Stat3 у зразках здорових тканин жінок контрольної групи, без патології шийки матки з валідізацією відносно екстракту клітин Hela

Незважаючи на суттєвий прогрес у вирішенні проблеми лікування пацієток з доброякісними, фоновими та передраковими захворюваннями шийки матки, її не можна вважати вирішеною, оскільки жоден з запропонованих методів, включаючи радикальні, не має 100% ефективності,

яка б повністю виключала виникнення рецидивів та подальше прогресування захворювання. Певною мірою це пов'язано з складним зі складним патогенезом раку шийки матки та передуючих йому процесів.

Першим етапом дослідження було визначення експресії STAT-3 у жінок контрольної групи, без патології шийки матки. Обстежено 20 жінок віком від 35 до 40 років (середній вік $36 \pm 1,2$). Всі пацієнтки проходили загальноприйняте клінічне, гінекологічне, інструментальне та лабораторне обстеження. Стан шийки матки оцінювали за допомогою цитологічного, кольпоскопічного досліджень, з подальшим патогістологічним дослідженням біопсійного матеріалу, який був взятий з піхвової частини шийки матки після проведення кольпоскопічного дослідження та виконання гістеректомії. Зберігання матеріалу здійснювалось згідно з вимогами – температура зберігання -20°C . Наявність генітальної папіломавірусної інфекції та визначення типу вірусу проводилось методом Real time полімеразної ланцюгової реакції (РТ-ПЛР). Наявність експресії STAT-3 визначали за допомогою методу Western Blotting згідно з протоколом фірм Amersham Biotech. Для детекції STAT-3 на мембрані використовували прямі антитіла фірми GeneScript і набори для візуалізації ESL Plex Western Blotting. (GE Healthcare). Аналіз зображення проводили на системі Versa DOC MP4000 з допомогою програми Quantity One1D software (BIO-RAD).

При дослідженні зразків тканин піхвової частини шийки матки методом Western Blotting у всіх 20 жінок контрольної групи експресія STAT-3 була відсутня. Позитивним контролем проведення Western Blotting аналізу був екстракт клітин Hela, в якій експресію STAT-3 було виявлено.

Клітинна лінія Hela є найстарішою стандартною культурою пухлинної тканини, вона була одержана 8 лютого 1951 року у Генрієтти Лакс (Henrietta Lacks), яка невдовзі, 4 лютого 1951 року, померла від раку шийки матки. Дана клітинна лінія демонструє добрі властивості зберігати сталі антигенні властивості й характеризується високою активністю теломери під час мітозу, що запобігає скороченню теломерів хромосом та обумовлює

«безсмертя» клітин пухлини, які таким чином уникають ліміту Гейфліка. Позитивна експресія протоонкогену STAT-3 у клітинах цієї лінії є важливим доказом валідності проведених досліджень.

В результаті проведеного дослідження встановлено, що відсутність запальних змін в клітинах ендocerвіксу корелює з активністю експресії STAT-3, який є посередником транскрипційної відповіді, що сприяє виживанню та швидкому росту клітин і ангиогенезу. Це підтверджено наявністю експресії STAT-3 в позитивному контролі екстракту клітин Hela.



Рисунок 1. Експресія STAT-3 в зразках тканин.

1 - Експресія STAT-3 в позитивному контролі

2 - Відсутність експресії STAT-3 у жінок контрольної групи

Слід зазначити, що імуноблотинг надає у певній мірі «усереднені» дані про експресію фактору, тому що біологічні зразки можуть містити клітини суміжних тканин, в тому числі стромальні та запально змінені клітини, що зрештою впливає на експресію STAT3 або pSTAT3. Таким чином, одержаний негативний результат є дуже СІНним, тому що він свідчить по-перше про коректність відбору пацієнток для участі у

дослідженні, а по друге про дотримання технологічних стандартів використаного діагностичного методу.

На сьогодні відомий феномен мікрогетерогенності у експресії та розподілі STAT3 у клітинах при передракових фонових процесах та раку *in situ*, таким чином удосконалення існуючих протоколів імуногістохімічних досліджень стає невідкладним завданням для сучасної медичної науки й практики. Зокрема, підвищення діагностичної точності аналізу STAT3 та його фосфорильованих форм (pSTAT3(Y705) та pSTAT3(S727)) у зразках біологічної тканини може дозволити покращити ранню діагностику неопластичної патології шийки матки.

На нашу думку, відсутність експресії як фосфорильованих (Y705 або S727) так й нефосфорильованих форм STAT3 у тестованій тканині є CINним маркером діагнозу й прогнозу, який спростовує припущення про наявність активного пухлинного процесу. Втім, зважаючи на те, що в окремих випадках передракові ураження (low grade precancer lesions (LSIL) відповідно до даних літератури можуть мати негативну експресію STAT3 та/або pSTAT3, необхідний подальше вдосконалення діагностичного алгоритму й пошук додаткових маркерів непластичної прогресії. З іншого боку, більша частина передракових захворювань шийки матки, так звані high grade precancer lesions (HSIL) відрізняються позитивною експресією STAT3 та pSTAT3.

Подальший розвиток обраного наукового напрямку вимагає поглиблення дослідження репрезентації експресії STAT цитоплазмі та ядрах клітин епітелію шийки матки та цервікального каналу. Значний інтерес являє також асоціація папіломавірусної інфекції, в тому числі викликаною високо онкогенними штамми, з експресією STAT3/pSTAT3 при захворюваннях шийки матки.

Отже, при дослідженні зразків тканин піхвової частини шийки матки методом Western Blotting у всіх 20 жінок експресія STAT-3 була відсутня.

Проведення контрольних аналізів з культурою клітин Hela підтверджує валідність отриманих результатів.

3.3. Результати дослідження експресії пухлинного супресора Stat3 у хворих із доброякісними та передраковими процесами шийки матки у залежності від статусу ВПЛ-інфікування.

Як показано в таблиці 2, слідові кількості STAT3 були експресовані в нормальних тканинах шийки матки у той час як початкова, а також висока ступінь передракових уражень (CIN II, CIN III) відрізнялася помірним або високим рівнем STAT3 відповідно. Більшість початкових передракових уражень (CIN I) мали слабку або відсутню експресію STAT3, хоча в деяких CIN I STAT3 показала фокально позитивні результати в базальному шарі. Навпаки, більш виражені типи передракових уражень (CIN II, CIN III) мали змінний рівень експресії STAT3. Незмінені тканини шийки матки виявили низький рівень експресії STAT3, за винятком декількох випадків, які супроводжувалися запальними процесами шийки матки. У передракових ураженнях шийки матки, ми спостерігали іммунопозитивність STAT3 в межах від 33 до 40 % за допомогою імуноблотингу.

Таблиця 2

Рівень експресії STAT3 у біоптатах шийки матки у досліджуваних групах

Білок	Контрольна група (n=20)				Група CIN (n=70)			
	відсут ня (-)	слаба (+)	помірн а (++)	вираж ена (+++)	відсут ня (-)	слаба (+)	помірн а (++)	вираж ена (+++)
Рівень експресії STAT3								
кількість	13	5	1	1	9	46	11	4

Для аналізу впливу інфекції ВПЛ на експресію STAT3 і активність на різних стадіях уражень шийки матки, результати даних імуноблотингу STAT3 у біоптатах передракових захворювань були проаналізовані відносно статусу ВПЛ- інфікування у відповідних зразках.

У ВПЛ позитивних зразках виявлено більш високий рівень експресії STAT3 порівняно з таким у ВПЛ–негативних ураженнях шийки матки. У більшості ВПЛ позитивних нормальних тканин шийки матки не виявлено експресії STAT3, за винятком тих, що мали ознаки запалення.

Загалом, у цьому дослідженні нами продемонстровано зміну експресії STAT3 у цервікальних клітинах на тлі передракових захворювань шийки матки. Результати імуноблотінга показали, що активність STAT3 зростає залежно від тяжкості уражень. Було виявлено також позитивний зв'язок зміненої експресії STAT3 із ураженням ВПЛ-18. Кореляція експресії STAT3 з ВПЛ-18 позитивним статусом в передракових захворюваннях шийки матки свідчить про участь ВПЛ-інфекції у розвитку передракової трансформації епітелію шийки матки. В більш ранніх дослідженнях експресія STAT3 не корелювала зі статусом ВПЛ-інфекції, як принциповий агент, який асоційовано із розвитком передракових уражень шийки матки.

3.4 Результати дослідження експресії пухлинного супресора Stat3 у хворих із доброякісними, передраковими та злоякісними процесами шийки матки у залежності від статусу ВПЛ-інфікування

Наші спостереження, що свідчать про потенційну роль STAT3 в цервікальному канцерогенезі, відповідають аналогічним результатам, що демонструють присутність STAT3 в пухлинних клітинах шийки матки, хоча і з перемінним рівнем експресії в межах від 24 % до 56 % [7-9]. Ці дослідження були проведені з використанням імуногістохімічного аналізу STAT3 на ретроспективно взятих зразках. Близька у 40 % випадків наявність STAT3 в клітинах була виявлена в зразках передракових уражень шийки матки, які переважно відносилися до категорії CINII і

CINIII [10]. Наші результати показують вищий рівень експресії STAT3 в CINII і CINIII зразках у порівнянні з CINI типом передракових уражень. Підвищення експресії і активація STAT3, знайдені в нашому дослідженні, можуть бути пов'язані з поліпшенням якості зразків, оскільки вони були оброблені негайно після біопсії. STAT3 є лабільним білком, тобто цілком імовірно, що в результаті тривалого зберігання STAT3 може зазнавати деградації чи дефосфорилування, які можуть бути частково відповідальні за низький рівень експресії STAT3 в інших дослідженнях [11-13]. Крім того, дослідження, про які повідомлялося раніше, використовували тільки імуногістохімічне визначення фосфорильованого STAT3 і не розглядали загальну експресію STAT3 одночасно, як це можливо за допомогою імуноблотінгу.

Усі ВПЛ-позитивні зразки тканин характеризувалися найвищою експресією STAT3. Крім того, ми дослідили експресію STAT3 в зразках передракових захворювань шийки матки і РШМ в порівнянні з контрольною групою (табл. 3).

Таблиця 3

Рівень експресії STAT3 у біоптатах шийки матки у досліджуваних групах

Білок	Контрольна група (n=20)				Група CIN (n=70)				РШМ (n=20)			
	відс утн я (-)	сла ба (+)	пом ірн а (++))	вир аже на (++ +)	відс утн я (-)	сла ба (+)	пом ірн а (++)	вир аже на (++ +)	відс утн я (-)	сла ба (+)	пом ірн а (++)	вир аже на (++ +)
Рівень експресії STAT3												
кількість	13	5	1	1	9	46	11	4	1	3	5	11

Як показано на рис. 1, слідові кількості STAT3 були експресовані в нормальних тканинах шийки матки у той час як початкова, а також висока ступінь передракових уражень (CIN II, CIN III) відрізняється помірним або високим рівнем STAT3 відповідно. STAT3 послідовно гіперекспресується в пухлинних тканинах (табл. 3). Рівень експресії STAT3 зростав в залежності від тяжкості ураження шийки матки від передракових до пухлинних уражень шийки матки. Більшість початкових передракових уражень (CIN I) мали слабку або відсутню експресію STAT3, хоча в деяких CIN I, STAT3 показала фокально позитивні результати в базальному і супрабазальному шарах (рис. 2, 3).

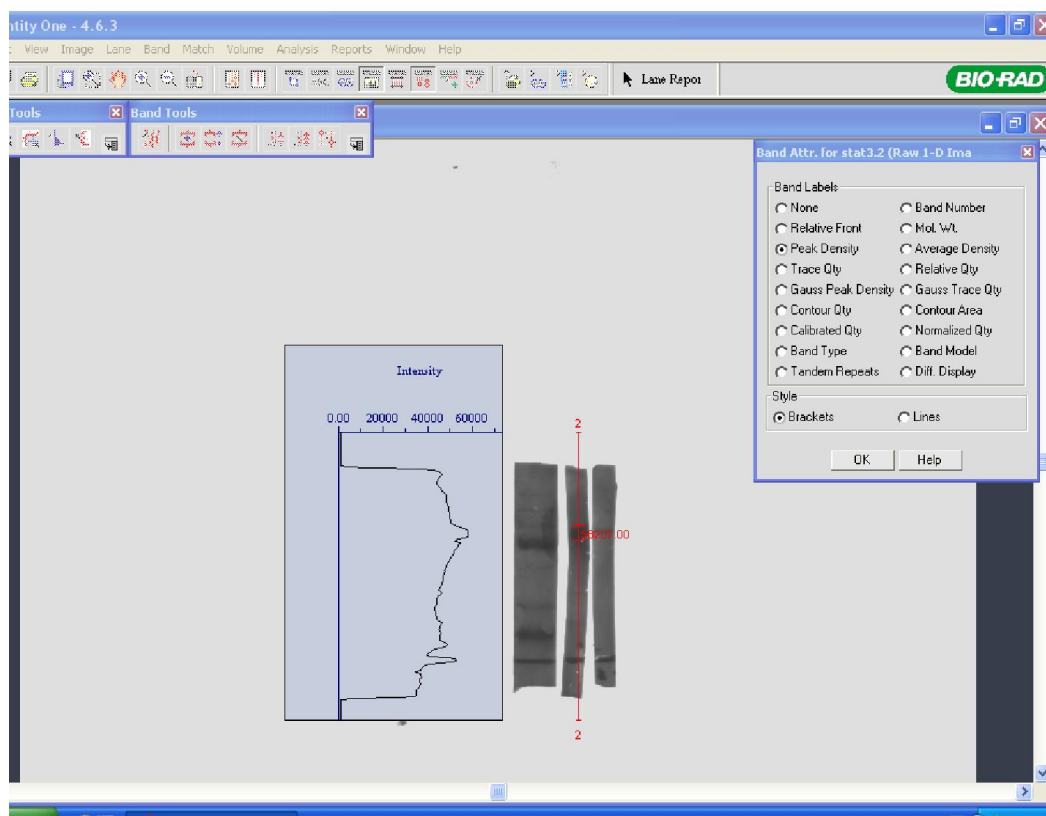


Рис. 2. Приклад калібрування показників активності STAT3.

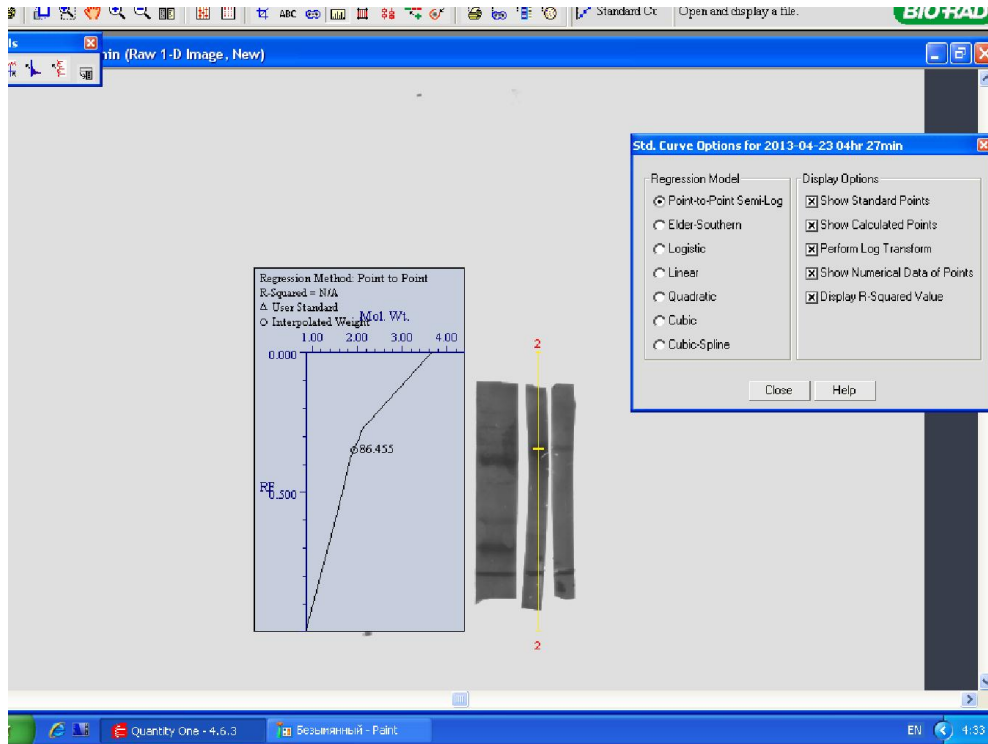


Рис. 3 Результати імуноблотингу у пацієнтки з РШМ

Навпаки, більш виражені типи передракових уражень (CIN II, CIN III) мали змінний рівень експресії STAT3. З 20 біопсій РШМ STAT3, 18 мали позитивний результат для STAT3, з них 16 (88,9%) були з помірною або високою експресією STAT3 (рис. 3).

З іншого боку, незмінені тканини шийки матки виявили низький рівень експресії STAT3, за винятком декількох випадків, які супроводжувалися запальними процесами шийки матки. Для порівняння, передракові ураження (CIN I, CIN II) показали помірний рівень експресії STAT3, в той час, як тканини біоптатів РШМ продемонстрували високий рівень експресії STAT3.

РОЗДІЛ 4

АНАЛІЗ ТА ОБГОВОРЕННЯ ОДЕРЖАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ

Для аналізу впливу інфекції ВПЛ на експресію STAT3 і активність на різних стадіях цервікального канцерогенезу, результати даних імуноблотингу STAT3 у біоптатах передракових захворювань і РМШ були проаналізовані відносно статусу ВПЛ-інфекції у відповідних зразках.

У ВПЛ позитивних зразках передракових і тканин злоякісних пухлин виявлено більш високий рівень експресії STAT3 порівняно з таким в ВПЛ-негативних, передракових і неопластичних ураженнях. У більшості ВПЛ позитивних передракових і нормальних тканинах не виявлено експресії STAT3, в той час як лише невелика кількість ВПЛ-18 позитивних передракових форм (n=35,7%) і РШМ (n=20%) не мали взагалі або мали низький статус експресії STAT3.

Диференціальна експресія і активація STAT3 виявлена в різних гістопатологічних типах ВПЛ-18 позитивних РШМ.

З метою визначення співвідношення експресії, ступеню прогресування пухлин та ВПЛ статусом ми розглянули експресію STAT3 в ВПЛ-18 позитивних випадках раку шийки матки з різним гістопатологічними класами. Усі без виключення біоптати РШМ із підтвердженим гістологічним діагнозом та ВПЛ-позитивним статусом були проаналізовані щодо експресії STAT3. Як показано на рис. 1-3, порівняльний імуноблотінг показав низьку експресію STAT3 у високодиференційованих випадках карциноми у порівнянні з помірно- і низькодиференційованими, що характеризувалися високим рівнем експресії STAT3. Разом ці результати показують, що конститутивна активація STAT3 часто відбувається за умов високого ступеня злоякісності раку шийки матки і позитивно корелює з гістопатологічно ранніми стадіями.

Загалом, у цьому дослідженні нами продемонстровано зміну експресії STAT3 у цервікальних клітинах РШМ і передракових захворюваннях шийки матки. Результати імуноблотінга показали, що аберрантна активність STAT3 зростає залежно від тяжкості захворювання від передракових до злоякісних уражень шийки матки, імовірно приймаючи участь у процесі канцерогенезу. Було виявлено також позитивний зв'язок зміненої експресії STAT3 із ураженням ВПЛ-18.

Крім того, експресія STAT3 добре корелювала з ВПЛ-18 позитивним статусом в передракових захворюваннях шийки матки і злоякісних ураженнях, що свідчить про можливу участь ВПЛ-інфекції у розвитку злоякісної трансформації епітелію шийки матки. Корелюючи з різними гістопатологічними типами у ВПЛ-18 позитивних біоптатах, випадки з більш розвиненими гістопатологічними типами мали значно вищу експресію активності STAT3.

У передракових ураженнях шийки матки, ми спостерігали іммунопозитивність STAT3 в межах від 33 до 40% за допомогою імуноблотингу.

Наші спостереження, що свідчать про потенційну роль STAT3 в цервікальному канцерогенезі, відповідають аналогічним результатам, що демонструють присутність pSTAT3 в пухлинних клітинах шийки матки, хоча і з перемінним рівнем експресії в межах від 24 % до 56 % [13-16]. Ці дослідження були проведені з використанням імуногістохімічного аналізу pSTAT3 на ретроспективно взятих зразках. Близька у 40% випадків наявність STAT3 в клітинах була виявлена в зразках передракових уражень шийки матки [17], які переважно відносилися до категорії I і II.

Наші результати показують вищий рівень експресії STAT3 в CINII і CINIII зразках у порівнянні з типом передракових уражень, але різниця не була статистично значущою. На відміну від помірних іммунопозитивних передракових уражень, більше 70 % досліджених біопсій РШМ продемонстрували помірно високі рівні експресії STAT3 за допомогою імуноблотингу. В нещодавньому повідомленні показано, що, з урахуванням

10 % клітин, що експресують ядерну pSTAT3, спостерігається максимум 57% STAT3 в тканинах шийки раку [18].

Підвищення експресії і активація STAT3, знайдені в нашому дослідженні, можуть бути пов'язані не тільки стосовно різних гістологічних підтипів, а також з поліпшенням якості зразків, оскільки вони були оброблені негайно після біопсії. STAT3 є лабільним білком, тобто цілком імовірно, що в результаті тривалого зберігання STAT3 міг зазнати деградації чи дефосфорилування, які можуть бути частково відповідальні за низький рівень експресії pSTAT3 в інших дослідженнях. Крім того, дослідження, про які повідомлялося раніше, використовували тільки для імуногістохімічне визначення pSTAT3 і не розглядали загальну експресію STAT3 одночасно. Важливо відзначити, що рівень фосфорильованого STAT3 значною мірою залежить від часу обробки після резекції тканини. Тривала затримка у фіксації або заморожування зразків тканин також можуть підвищувати рівень фосфорилування STAT3 у зв'язку з активністю тирозин фосфатази [19]. Крім того, в більш ранніх дослідженнях експресія STAT3 не корелювала зі статусом ВПЛ-інфекції, як принциповий агент, який асоційовано із розвитком РШМ.

Збільшення активації STAT3 в даному дослідженні може бути також пов'язане з популяційними відмінностями в спектрі розповсюдженості інфекції ВПЛ. Відомо, що ВПЛ-18 є одним з найбільш поширених ВПЛ-типів при РШМ і в цьому дослідженні ми також спостерігали високу частоту ВПЛ-18 у 100 % випадків РШМ і у 68 % в передракових тканинах. Це набагато більш висока поширеність ВПЛ-18, ніж в Європейських країнах, де вона коливається у межах 48-52% [20, 21].

Зовнішній вигляд активованого STAT3 на початку передракових захворювань і особливо у сполученні з ВПЛ-18 інфекцією та її локалізацією в базальних і супрабазальних клітинах, які представляють проліферуючу частку епітелію, і є водночас місцем продуктивної ВПЛ-інфекції, чітко відображає можливу участь STAT3 у створенні стійкої вірусної інфекції у інфікованих ВПЛ зразках.

Цікаво, що недавнє дослідження виявлення злоякісних стовбурових клітин, подібних до первинного раку шийки матки, також продемонстрували високий рівень експресії STAT3 у всій популяції утворених стовбурових клітин [22]. Втім, конститутивну експресію STAT3 і його активацію спостерігали також у деяких нормальних тканинах при запальних цитологічних станах. Ймовірно, що запалення, викликане первинною інфекцією, що передається статевим шляхом, таке як хламідіоз, може посилювати активацію STAT3, і надалі підтримувати ВПЛ-інфекцію. Інфекції, що передаються статевим шляхом такі, як гонорея, хламідіоз, і вірус простого герпесу 2 також діють у ролі кофакторів розвитку раку шийки матки [23-25] і часто пов'язані з інтенсифікацією хронічної запальної відповіді і розвитком мікроуражень в епітелії шийки матки [24], що є причиною сприяє клітин базального шару епітелію до інфекційних віріонів ВПЛ з подальшим проникненням та реплікацією вірусу.

Проведене дослідження показало значну кореляцію між позитивністю ВПЛ-18 і гіперекспресією STAT3 в передракових ураженнях шийки матки і РШМ. Цікаво, що деякі зі зразків тканин ВПЛ-18 позитивних передракових і злоякісних захворювань, особливо з низькодиференційованими гістотипами, показали більш низький рівень експресії STAT3. Хоча відсоток ВПЛ-18 позитивних зразків серед різних гістопатологічних класів (низько-, помірно-, високодиференційованих) незначно відрізнявся (86%, 80%, 80% відповідно), це не корелювало з аналогічною експресією STAT3. Гістопатологічно більш диференційовані біоптати з ВПЛ-18 позитивним статусом виявили більш високі рівні STAT3 порівняно з ВПЛ-18 позитивними низькодиференційованими випадками. Це відображає той факт, що наявність вірусної ДНК в клітинах-господаря не індукує активність STAT3, але вимагає експресії вірусних генів або онкогенів, щоб взаємодіяти з передачею сигналів клітиною-господарем, яка управляє активацією сигнального каскаду STAT3, і за відсутності цих факторів може призводити до зниження активності STAT3.

Крім того, фізичний стан вірусної ДНК (інтегрований в порівнянні з епісомним) і число копій вірусу, які впливають на величину експресії вірусного онкогена [26], можуть бути важливим чинником, відповідальним за зміну клітинної відповіді щодо рівнів активності STAT3. Однак ці механізми ще належить вивчити.

Визначено, що конститутивна активність STAT3 пов'язана з більш високою гістологічною оцінкою і інвазивністю раку в декількох епітеліальних злоякісних пухлинах [27, 28]. Хоча причини аберантної діяльності STAT3 у розвитку передракових захворювань шийки матки і РШМ ще не досліджені, його зв'язок з інфікуванням ВПЛ-18 в цервікальному канцерогенезі видно з даних, представлених в цьому дослідженні.

Відношення між збільшенням експресії STAT3 і числом копій ВПЛ-18 або його експресію онкогенів нині не відомо, хоча кілька авторів вказують на можливу взаємодію між цими двома регуляторами цервікального канцерогенезу. З іншого боку існують повідомлення, що p53 і STAT3 є антагоністами експресії один для одного, оскільки p53 запобігає впливу STAT3 на трансформації клітин [29], а STAT3 пригнічує експресію і функцію p53 шляхом зв'язування з промотором p53, в результаті чого знижується «де ново» експресія p53 [30]. Ці спостереження показують, що аберантна експресія STAT3 в пухлинній трансформації може бути потенційним результатом E6/E7-медіаторної дестабілізації p53/pRB медіаторів, регулюючих клітинний цикл, який контролює негативну експресію STAT3.

Дійсно, спостереження вказують на підвищену експресію STAT3 в РШМ [31], яка була також підтверджена в цьому дослідженні. Поточні дані показують, що ці гіперекспресовані STAT3, що виступають, як функціональні білки, одночасно активуються за допомогою фосфорилування, і можуть відігравати важливу роль у стимулюванні ВПЛ-18 опосередкованого цервікального канцерогенезу. Ми спостерігали

стабільну активацію STAT3 у випадках РШМ, яка збільшилася в залежності від тяжкості захворювання.

Крім того, молекулярна щільність STAT3 при CINIII та РШМ суттєво відрізнялася від рівня транскрипції при дисплазії епітелію шийки матки легкого та середнього ступеня (рис. 1, 2). Слід зазначити, що молекулярна щільність визначається ступенем фосфорилування та є відображенням експресії показника. Загалом, діяльність STAT3 регулюється двома незалежними типами фосфорилування, в Tyr705 і на Ser727, які необхідні для його повної функціональної активності [32]. Tyr705 фосфорилування в першу чергу контролюється STAT3 підвищенням активності кінази Src і EGFR або його негативних регуляторів – фосфатази PTEN, SOCS, в той час як Ser727 фосфорилування регулюється MAP/JNK шляху [33], який зазвичай активується у відповідь на стрес і хронічне запалення.

Тим не менше, немає ніяких повідомлень, які прямо або побічно демонструють взаємодію онкогенів ВПЛ з цими позитивними чи негативними регуляторами активності STAT3.

Так як хронічне запалення є попередником більшості злоякісних новоутворень [34], ймовірно, підвищення експресії різних запальних цитокінів через інфекції ВПЛ, не може бути проігноровано у цервікальному канцерогенезі. Запальні цитокіни ІЛ-6 є потужним індуктором STAT3 діяльності за допомогою зв'язування з gp130 пов'язаних рецепторів Jak/тирозинкіназ, отримали особливу увагу в патогенезі РШМ. Доброякісні ВПЛ-трансформовані кератиноцити і клітини карциноми шийки матки утворюють велику кількість ІЛ-6 [35]. Тим не менш, дослідження показують, що ІЛ-6 не можуть функціонувати аутокринним чином, оскільки клітини шийки матки, як правило, втрачають ІЛ-6-рецептор [35]. Тому конститутивна активація STAT3 може бути ІЛ-6-незалежною подією, що сприяє розвитку альтернативного сигнального шляху. Дослідження показують високу експресію рецептора епідермального фактора росту (EGFR) в тривимірних органотипових культурах людських клітин карциноми шийки матки і блокування функції EGFR прямим і зворотнім

інгібітором, PD153035, зниження синтезу ДНК та інгібування інвазії в залежності від ступеню [36]. EGFR, ініціює багатоступінчастий канцерогенез шкіри в мишачої моделі за допомогою активації STAT3 [37] і ErbB2, EGFR-сімейство рецепторів зазвичай посилюється в плоскоклітинному раку шийки матки [38].

Підвищена активація STAT3, що спостерігається в ВПЛ-інфікованих клітинах, може бути пов'язана з активацією EGFR [38]. Крім того, епігенетичні чергування експресії негативних регуляторів як PTEN, SOCS3, PIAS можуть бути іншою можливою причиною аберрантної активації STAT3. У країнах з низьким ризиком HPV6/11-асоційованих папілом гортані, наявність помірного або низького рівня pSTAT3 (Tyr705) була виявлена в неаногенітальних папіломах які були пов'язані з підвищеною експресією негативного регулятора, PTEN [39]. Цікаво, що метилювання PTEN і втрати експресії PTEN є ранніми подіями в розвитку раку шийки матки [40]. Заслуговує уваги наявність достатньо чіткої асоціації між станом експресії білку p53, яка в свою чергу залежить від інтенсивності реплікації ВПЛ та стану місцевого імунітету, та активацією STAT3. Як видно з рис. 4, важливу роль у аберрантній активації відіграють також механізми регуляції активності специфічних гіпоксія-індуцибельних факторів та білків, що регулюють активність апоптозу.

Загалом дане дослідження демонструє аберрантну у експресію і конститутивну активацію STAT3, що поступово накопичується в процесі цервікального канцерогенезу і являє значну кореляцію з високим ризиком інфікування ВПЛ-18 в захворюваннях шийки матки з активною експресією STAT3.

Проте взаємодія ВПЛ-18 або його онкогенів із STAT3 сигнальними шляхами і ВПЛ-18-механізм опосередкованої активації STAT3 досі не з'ясовані в розвитку злоякісних новоутворень шийки матки. Розуміння механізмів патогенезу захворювання з особливою увагою на взаємодію генів ВПЛ-онкогенів із STAT3 сигнальним шляхом може допомогти в

розробці нових підходів для терапевтичних втручань проти ВПЛ-інфекції і раку шийки матки.

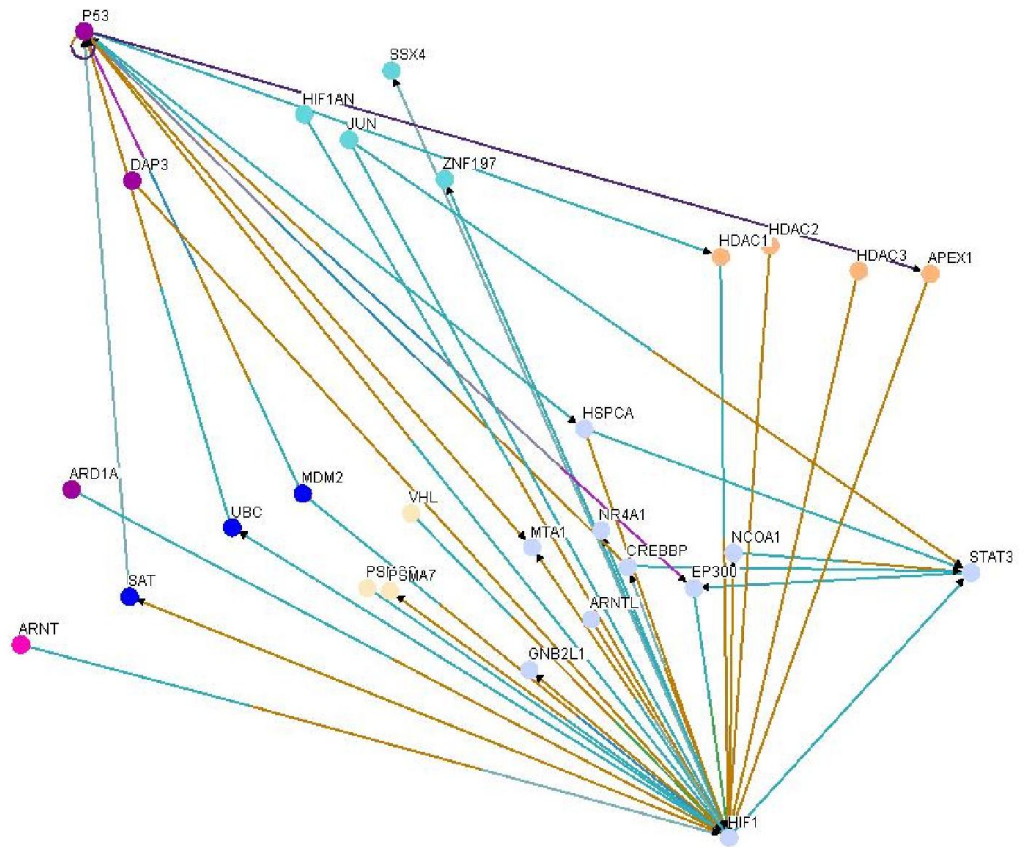


Рис. 4 Функціональні зв'язки аберантної активації STAT3

ВИСНОВКИ

1. В зразках тканин шийки матки жінок контрольної групи експресію STAT3 не визначено. Наявність запальних процесів шийки матки поза присутності передракових уражень асоціюється із підвищенням експресії STAT3.
2. Активність STAT3 прогресивно зростає залежно від ступеню передракових уражень шийки матки.
3. Встановлено позитивний зв'язок зміненої експресії STAT3 біоптатів шийки матки із ураженням ВПЛ-18.
4. Рівень активності STAT3 є прогностичним маркером неопластичної трансформації клітин шийки матки.
5. Визначення рівню активності STAT3 є додатковим критерієм посилення проонкогенної активності клітин шийки матки.

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. Визначення активності STAT3 рекомендовано жінкам із хронічними запальними процесами шийки матки, особливо за умов персистенції ВПІ, з метою прогнозування злоякісної трансформації клітин епітелію шийки матки
2. За наявності підвищення активності STAT3 у жінок із CIN проводити морфологічне дослідження тканин шийки матки
3. При наявності хронічних запальних захворювань шийки матки проводити лікування, яке є патогенетично обґрунтованою профілактикою передракових уражень шийки матки, особливо у жінок із персистенцією ВПІ.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Воробьева Л.И., Винницкая Д.Б., Доценко Ю.С., Евтушенко Г.В. Опухоли женских половых органов. В: Справочник по онкологии. Киев: Здоров'я, 2000: 499—553.
2. Національний канцер-реєстр України БЮЛЕТЕНЬ НАЦІОНАЛЬНОГО КАНЦЕР-РЕЕСТРУ УКРАЇНИ Видання № 12 КИЇВ – 2011 [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://www.ucr.gs.com.ua/dovida9/PDF/57-58-shm.pdf>
3. Zaporozhan V., Peresunko A., Oliynyk E. The role of clinico-genetic monitoring of risk groups for early diagnostics of female reproductive system tumors. EJC Supplements Controversies in Tumor Prevention and Genetics , 2004, Vol №2, No.1. p-45
4. Полонская Н.Ю., Юрасова И.В., Сокольская Т.Ю. Преимущества и эффективность стандартизации цитологических исследований в гинекологии // Клин. лаб. диагностика.- 2004.- № 11.- С. 47-50.
5. Туганова Т.Н., Болгова Л.С., Смолянка И.И. и др. Внеядрышковые аргентофильные гранулы в дифференциальной цитологической диагностике фиброаденом и рака молочной железы // Злоякісні новоутворення. - Зб. наук. робіт, вип. 9.- Київ, 2004.- С. 74-75.
6. Walboomers JMM, et al. Human Papillomavirus is a Necessary Cause of Invasive Cervical Cancer Worldwide. J Pathol 1999; 189: 12–9.
7. Human papillomavirus types by age in cervical cancer precursors: predominance of human papillomavirus 16 in young women / [Porras C.,

- Rodriguez A.C., Hildesheim A. et al.] // Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. – 2009. – Vol. 18, № 3. – P. 863-365.
8. . Роговская С.И. Папилломавирусная инфекция у женщин и патология шейки матки / С.И. Роговская. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2004. – 141 с.
9. Shirish Shukla, Gauri Shishodia, Sutapa Mahata, Suresh Hedau, Arvind Pandey, Suresh Bhambhani, Swaraj Batra, Seemi F Basir, Bhudev C Das, and Alok C Bharti Aberrant expression and constitutive activation of STAT3 in cervical carcinogenesis: implications in high-risk human papillomavirus infection [Электронный ресурс] Режим доступа: <http://www.molecular-cancer.com/content/9/1/282>
10. Запорожан В.М., Пішак В.П., Пересунько О.П. Генетика пухлин жіночих репродуктивних органів Одеса, ОДМУ, 2004. – 232 с.
11. Bharat B. Aggarwal, Ajaikumar B. Kunnumakkara, Kuzhuvelli B. Narikumar, Shan R. Gupta, Sheeja T. Tharakan, Cemile Koca, Sanjit Dey, Bokyoung Sung Signal Transducer and Activator of Transcription-3, Inflammation, and Cancer [Электронный ресурс] Режим доступа: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1749-6632.2009.04911.x/full>
12. Новик В.И., Урманчеева А.Ф. Принципы организации цитологического скрининга рака шейки матки // Матер. III съезда онкологов и радиологов СНГ. Часть 1. - Минск: ОДО "Тонпик", 2004. - С.241.
13. Chen C. L., Hsieh F.C., Lieblein J.C., et al.: Stat3 activation in human endometrial and cervical cancers. Br. J. Cancer 2007.- Vol.96.-P.591-599.
14. Takemoto S., Ushijima K., Kawano K., et al.: Expression of activated signal transducer and activator of transcription-3 predicts poor prognosis in cervical squamous-cell carcinoma. Br. J. Cancer 2009.- Vol.101. – P.967-972.
15. Yang S.F., Yuan S.S., Yeh Y.T., et al.: Positive association between STAT3 and Ki-67 in cervical intraepithelial neoplasia. Kaohsiung J. Med. Sci.- 2006.- Vol. 22.- P.539-546.

16. Yang S.F., Yuan S.S., Yeh Y.T., et al.: The role of p-STAT3 (ser727) revealed by its association with Ki-67 in cervical intraepithelial neoplasia. *Gynecol. Oncol.*- 2005.- Vol.98.-P.446-452.
17. Prusty B.K., Das B.C.: Constitutive activation of transcription factor AP-1 in cervical cancer and suppression of human papillomavirus (HPV) transcription and AP-1 activity in HeLa cells by curcumin. *Int. J. Cancer* 2005.- Vol. 113.- P.951-960.
18. Takemoto S., Ushijima K., Kawano K., et al.: Expression of activated signal transducer and activator of transcription-3 predicts poor prognosis in cervical squamous-cell carcinoma. *Br. J. Cancer* 2009.-Vol. 101. – P. 967-972.
19. Garcia R., Bowman T.L., Niu G., et al.: Constitutive activation of Stat3 by the Src and JAK tyrosine kinases participates in growth regulation of human breast carcinoma cells. *Oncogene* 2001.- Vol. 20.- P.2499-2513.
20. Clifford G.M., Gallus S., Herrero R., et al.: Worldwide distribution of human papillomavirus types in cytologically normal women in the International Agency for Research on Cancer HPV prevalence surveys: a pooled analysis.
21. Bao Y.P., Li N., Smith J.S., Qiao Y.L.: Human papillomavirus type distribution in women from Asia: a meta-analysis. *Int J. Gynecol. Cancer* 2008.-Vol. 18.- P. 71-79.
22. Feng D., Peng C., Li C., et al.: Identification and characterization of cancer stem-like cells from primary carcinoma of the cervix uteri. *Oncol. Rep.* 2009.- Vol. 22.-P.1129-1134.
23. Smith J.S., Munoz N., Herrero R., et al.: Evidence for Chlamydia trachomatis as a human papillomavirus cofactor in the etiology of invasive cervical cancer in Brazil and the Philippines. *J. Infect. Dis.* 2002.-Vol. 185.- P. 324-331.
24. Johansen C., Mellekjær L., Frisch M., Kjaer S.K. et al.: Risk for anogenital cancer and other cancer among women hospitalized with gonorrhoea. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.*- 2001.-Vol. 80.-P.757-761.

25. Smith J.S., Herrero R., Bosetti C., et al.: Herpes simplex virus-2 as a human papillomavirus cofactor in the etiology of invasive cervical cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 2002.- Vol.94.- P.1604-1613.
26. Jeon S., Allen-Hoffmann B.L., Lambert P.F.: Integration of human papillomavirus type 16 into the human genome correlates with a selective growth advantage of cells. *J. Virol.*- 1995.-Vol. 69.-P.2989-2997.
27. Kim D.J., Chan K.S., Sano S., Digiovanni J.: Signal transducer and activator of transcription 3 (Stat3) in epithelial carcinogenesis. *Mol. Carcinog.* – 2007.- Vol. 46.-P.725-731.
28. Aggarwal B.B., Sethi G., Ahn K.S., et al.: Targeting signal-transducer-and-activator-of-transcription-3 for prevention and therapy of cancer: modern target but ancient solution. *Ann N Y Acad. Sci.* – 2006.-Vol. 1091.-P.151-169.
29. Lin J., Jin X., Rothman K., Lin H.J. et al.: Modulation of signal transducer and activator of transcription 3 activities by p53 tumor suppressor in breast cancer cells. *Cancer Res.*- 2002.-Vol. 62.-P.376-380.
30. Niu G., Wright K.L., Ma Y. et al.: Role of Stat3 in regulating p53 expression and function. *Mol. Cell. Biol.*- 2005.-Vol. 25.-P.7432-7440.
31. Sobti R.C., Singh N., Hussain S. et al.: Overexpression of STAT3 in HPV-mediated cervical cancer in a north Indian population. *Mol. Cell. Biochem.*- 2009.-Vol 174.-P.187-192.
32. Wen Z., Zhong Z., Darnell J.E. Jr.: Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation. *Cell.*- 1995.-Vol. 82.-P.241-250.
33. Decker T., Kovarik P.: Serine phosphorylation of STATs. *Oncogene.*- 2000.- Vol.19.- P.2628-2637.
34. Lu H., Ouyang W., Huang C.: Inflammation, a key event in cancer development. *Mol. Cancer. Res.* – 2006.-Vol. 4.-P.221-233.
35. Hess S., Smola H., Sandaradura De Silva U. et al.: Loss of IL-6 receptor expression in cervical carcinoma cells inhibits autocrine IL-6 stimulation: abrogation of constitutive monocyte chemoattractant protein-1 production. *J. Immunol.*- 2000.- Vol. 165.- P.1939-1948.

36. Woodworth C.D., Michael E., Marker D.: Inhibition of the epidermal growth factor receptor increases expression of genes that stimulate inflammation, apoptosis, and cell attachment. *Mol. Cancer. Ther.*- 2005.-Vol. 4. - P. 650-658.
37. Chan K.S., Carbajal S., Kiguchi K.: Epidermal growth factor receptor-mediated activation of Stat3 during multistage skin carcinogenesis. *Cancer. Res.*- 2004.-Vol. 64.-P.2382-2389.
38. Wu R., Sun S., Steinberg B.M.: Requirement of STAT3 activation for differentiation of mucosal stratified squamous epithelium. *Mol. Med.*- 2003.-Vol. 9.-P.77-84.
39. Sun S., Steinberg B.M.: PTEN is a negative regulator of STAT3 activation in human papillomavirus-infected cells. *J. Gen. Virol.*- 2002.-Vol. 83.-P.1651-1658.
40. Cheung T.H., Lo K.W., Yim S.F., et al.: Epigenetic and genetic alternation of PTEN in cervical neoplasm. *Gynecol. Oncol.* – 2004. –Vol. 93. –P.621-627.
41. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The three Es of cancer immunoeediting. *Annu Rev Immunol.* 2004;22:329–360.
42. Koebel CM, Vermi W, Swann JB, Zerafa N, Rodig SJ, Old LJ, Smyth MJ, Schreiber RD Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature.* 2007;450:903–907. (** This paper provides unequivocal evidence for the existence of the equilibrium between tumor and immune system in vivo)
43. Bui JD, Schreiber RD. Cancer immunosurveillance, immunoeediting and inflammation: independent or interdependent processes? *Curr Opin Immunol.* 2007;19:203–208.
44. Naugler WE, Karin M. NF-kappaB and cancer-identifying targets and mechanisms. *Curr Opin Genet Dev.* 2008;18:19–26. [PMC free article]
45. de Visser KE, Eichten A, Coussens LM. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nat Rev Cancer.* 2006;6:24–37.
46. Johansson M, Tan T, de Visser KE, Coussens LM. Immune cells as anti-cancer therapeutic targets and tools. *J Cell Biochem.* 2007;101:918–926.

47. de Visser KE, Korets LV, Coussens LM De novo carcinogenesis promoted by chronic inflammation is B lymphocyte dependent. *Cancer Cell*. 2005;7:411–423.
48. Soucek L, Lawlor ER, Soto D, Shchors K, Swigart LB, Evan GI. Mast cells are required for angiogenesis and macroscopic expansion of Myc-induced pancreatic islet tumors. *Nat Med*. 2007;13:1211–1218.
49. Colotta F, Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis*. 2009;30:1073–1081.
50. Sica A, Allavena P, Mantovani A. Cancer related inflammation: the macrophage connection. *Cancer Lett*. 2008;267:204–215.
51. Gabriljovich DI, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2009;9:162–174. [PMC free article]
52. Roberts SJ, Ng BY, Fidler RB, Lewis J, Glusac EJ, Hayday AC, Tigelaar RE, Girardi M. Characterizing tumor-promoting T cells in chemically induced cutaneous carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:6770–6775. [PMC free article]
53. DeNardo DG, Barreto JB, Andreu P, Vasquez L, Tawfik D, Kolhatkar N, Coussens LM CD4(+) T cells regulate pulmonary metastasis of mammary carcinomas by enhancing protumor properties of macrophages. *Cancer Cell*. 2009;16:91–102. (* establishes the pro-metastatic role of CD4+ T cells in breast cancer and shows that CD4+ T cells educate tumor-associated macrophages)
54. Wang L, Yi T, Kortylewski M, Pardoll DM, Zeng D, Yu H. IL-17 can promote tumor growth through an IL-6-Stat3 signaling pathway. *J Exp Med*. 2009;206:1457–1464. [PMC free article]
55. Langowski JL, Kastelein RA, Oft M. Swords into plowshares: IL-23 repurposes tumor immune surveillance. *Trends Immunol*. 2007;28:207–212.
56. Pages F, Berger A, Camus M, Sanchez-Cabo F, Costes A, Molidor R, Mlecnik B, Kirilovsky A, Nilsson M, Damotte D, et al. Effector memory T cells,

- early metastasis, and survival in colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2005;353:2654–2666.
57. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pages C, Tosolini M, Camus M, Berger A, Wind P, et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science.* 2006;313:1960–1964. (* References 17 and 18. T cell infiltration in sporadic colon cancer tumors can be used for the prediction of the outcome of disease and seem to have anti-tumorigenic role)
58. Kohrt HE, Nouri N, Nowels K, Johnson D, Holmes S, Lee PP. Profile of immune cells in axillary lymph nodes predicts disease-free survival in breast cancer. *PLoS Med.* 2005;2:e284. [PMC free article]
59. Grivennikov S, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation and cancer: the good, the bad and the ugly. *Cell.* 2010 in press. (* This review describes in details types for tumor-promoting inflammation, discusses the role of inflammation at different stages of tumorigenesis and outlines common specific mechanisms for tumorigenesis driven by inflammation)
60. Greten FR, Karin M. NF- κ B: Linking Inflammation and Immunity to Cancer Development and Progression. *Nature Reviews Immunology.* 2005;5:749–759.
61. Grivennikov S, Karin M. Dangerous liaisons: STAT3 and NF- κ B collaboration and crosstalk in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2010 in press.
62. Yu H, Kortylewski M, Pardoll D. Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol.* 2007;7:41–51.
63. Karin M. Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature.* 2006;441:431–436.
64. Ancelet B, Lim KH, Counter CM. Oncogenic Ras-induced secretion of IL6 is required for tumorigenesis. *Genes Dev.* 2007;21:1714–1719. [PMC free article]
65. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature.* 2008;454:436–444. (* Recent review, which summarizes our current

- knowledge about cancer related inflammation represented by anti-tumor immunity and cancer-promoting inflammation)
66. DeNardo DG, Johansson M, Coussens LM. Immune cells as mediators of solid tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 2008;27:11–18.
 67. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature.* 2008;454:428–435. (** Recent review which describes the causes, types and outcomes of inflammatory reactions)
 68. Wu S, Rhee KJ, Albesiano E, Rabizadeh S, Wu X, Yen HR, Huso DL, Brancati FL, Wick E, McAllister F, et al. A human colonic commensal promotes colon tumorigenesis via activation of T helper type 17 T cell responses. *Nat Med.* 2009 (** This paper describes a role of specific strain of commensal bacteria, which can trigger intestinal injury, colitis and promote tumor growth in a classical sporadic colon cancer model. It also establishes the role of Th17 T cells and STAT3 in tumor promotion)
 69. Punturieri A, Szabo E, Croxton TL, Shapiro SD, Dubinett SM. Lung cancer and chronic obstructive pulmonary disease: needs and opportunities for integrated research. *J Natl Cancer Inst.* 2009;101:554–559. [PMC free article]
 70. Yamasaki K, Hayashi Y, Okamoto S, Osanai M, Lee GH. Insulin-independent promotion of chemically induced hepatocellular tumor development in genetically diabetic mice. *Cancer Sci.* 2009
 71. Hiji-Baskin AE, Markiewski MM, Buchner DA, Shao H, DeSantis D, Hsiao G, Subramaniam S, Berger NA, Croniger C, Lambris JD, et al. Diet-induced hepatocellular carcinoma in genetically predisposed mice. *Hum Mol Genet.* 2009;18:2975–2988. [PMC free article]
 72. Park EJ, Lee JH, Yu GY, Ali SR, Holzer R, Osterreicher C, Takahashi H, Karin M. Dietary and genetic obesity promote liver carcinogenesis by enhancing IJ-6 expression. *Cell.* 2010 submitted.
 73. Tuncman G, Hirosumi J, Solinas G, Chang L, Karin M, Hotamisligli GS. Functional in vivo interactions between JNK1 and JNK2 isoforms in obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103:10741–10746.

74. Waldner MJ, Neurath MF. Colitis-associated cancer: the role of T cells in tumor development. *Semin Immunopathol.* 2009;31:249–256.
75. Kraus S, Arber N. Inflammation and colorectal cancer. *Curr Opin Pharmacol.* 2009
76. Gao Y, Kristinsson SY, Goldin LR, Bjorkholm M, Caporaso NE, Landgren O. Increased risk for non-Hodgkin lymphoma in individuals with celiac disease and a potential familial association. *Gastroenterology.* 2009;136:91–98.
77. Sparmann A, Bar-Sagi D. Ras-induced interleukin-8 expression plays a critical role in tumor growth and angiogenesis. *Cancer Cell.* 2004;6:447–458.
78. Rodier F, Coppe JP, Patil CK, Hoeijmakers WA, Munoz DP, Raza SR, Freund A, Campeau E, Davalos AR, Campisi J. Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nat Cell Biol.* 2009;11:973–979. [PMC free article]
79. Orjalo AV, Bhaumik D, Gengler BK, Scott GK, Campisi J. Cell surface-bound IJ1-1alpha is an upstream regulator of the senescence-associated IJ1-6/IJ1-8 cytokine network. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106:17031–17036. [PMC free article]
80. Tesniere A, Panaretakis T, Kepp O, Apetoh L, Ghiringhelli F, Zitvogel L, Kroemer G. Molecular characteristics of immunogenic cancer cell death. *Cell Death Differ.* 2008;15:3–12.
81. Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, Obeid M, Ortiz C, Criollo A, Mignot G, Maiuri MC, Ullrich E, Saulnier P, et al. Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat Med.* 2007;13:1050–1059.
82. Ghiringhelli F, Apetoh L, Tesniere A, Aymeric L, Ma Y, Ortiz C, Vermaelen K, Panaretakis T, Mignot G, Ullrich E, et al. Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IJ1-1beta-dependent adaptive immunity against tumors. *Nat Med.* 2009 (* This paper shows that chemotherapeutic intervention leads to the activation of inflammasome and production of IJ1-1b, which drives anti-tumor immune responses)

83. Karin M. NF- κ B and cancer: mechanisms and targets. *Mol Carcinog.* 2006;45:355–361.
84. Hofseth LJ, Khan MA, Ambrose M, Nikolayeva O, Xu-Welliver M, Kartalou M, Hussain SP, Roth RB, Zhou X, Mechanic LE, et al. The adaptive imbalance in base excision-repair enzymes generates microsatellite instability in chronic inflammation. *J Clin Invest.* 2003;112:1887–1894. [PMC free article]
85. Meira LB, Bugni JM, Green SL, Lee CW, Pang B, Borenshtein D, Rickman BH, Rogers AB, Moroski-Erkul CA, McFaline JL, et al. DNA damage induced by chronic inflammation contributes to colon carcinogenesis in mice. *J Clin Invest.* 2008;118:2516–2525. (** This paper establishes the role of chronic inflammation in tumor initiation. In a model of chronic chemically-induced colitis authors found that chronic inflammation directly induces DNA damage and mutations and causes colitis associated cancer without administration of environmental mutagen)
86. Sakaguchi T, Brand S, Reinecker HC. Mucosal barrier and immune mediators. *Curr Opin Gastroenterol.* 2001;17:573–577.
87. Takai A, Toyoshima T, Uemura M, Kitawaki Y, Marusawa H, Hiai H, Yamada S, Okazaki IM, Honjo T, Chiba T, et al. A novel mouse model of hepatocarcinogenesis triggered by AID causing deleterious p53 mutations. *Oncogene.* 2009;28:469–478.
88. Matsumoto Y, Marusawa H, Kinoshita K, Endo Y, Kou T, Morisawa T, Azuma T, Okazaki IM, Honjo T, Chiba T. Helicobacter pylori infection triggers aberrant expression of activation-induced cytidine deaminase in gastric epithelium. *Nat Med.* 2007;13:470–476.
89. Niu G, Wright KL, Ma Y, Wright GM, Huang M, Irby R, Briggs J, Karras J, Cress WD, Pardoll D, et al. Role of Stat3 in regulating p53 expression and function. *Mol Cell Biol.* 2005;25:7432–7440. [PMC free article]
90. Tergaonkar V, Pando M, Vafa O, Wahl G, Verma I. p53 stabilization is decreased upon NF κ B activation: a role for NF κ B in acquisition of resistance to chemotherapy. *Cancer Cell.* 2002;1:493–503.

91. Cooper CS, Foster CS. Concepts of epigenetics in prostate cancer development. *Br J Cancer*. 2009;100:240–245. [PMC free article]
92. Hahn MA, Hahn T, Lee DH, Esworthy RS, Kim BW, Riggs AD, Chu FF, Pfeifer GP. Methylation of polycomb target genes in intestinal cancer is mediated by inflammation. *Cancer Res*. 2008;68:10280–10289. [PMC free article]
93. Edwards RA, Witherspoon M, Wang K, Afrasiabi K, Pham T, Birnbaumer L, Lipkin SM. Epigenetic Repression of DNA Mismatch Repair by Inflammation and Hypoxia in Inflammatory Bowel Disease-Associated Colorectal Cancer. *Cancer Res*. 2009
94. Jin B, Yao B, Li JL, Fields CR, Delmas AL, Liu C, Robertson KD DNMT1 and DNMT3B modulate distinct polycomb-mediated histone modifications in colon cancer. *Cancer Res*. 2009;69:7412–7421. (* References 52–55 cover important advances in how inflammation can stimulate epigenetic silencing of genes relevant to tumorigenesis and enhance tumor initiation and tumor promotion)
95. Murdoch C, Muthana M, Coffelt SB, Lewis CE. The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer*. 2008;8:618–631.
- 96.57. Zumsteg A, Christofori G. Corrupt policemen: inflammatory cells promote tumor angiogenesis. *Curr Opin Oncol*. 2009;21:60–70.
97. Levy DE, Darnell JE., Jr. Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002;3:651–662.
98. Karin M. The I κ B kinase - a bridge between inflammation and cancer. *Cell Res*. 2008;18:334–342.
99. Kujawski M, Kortylewski M, Lee H, Herrmann A, Kay H, Yu H. Stat3 mediates myeloid cell-dependent tumor angiogenesis in mice. *J Clin Invest*. 2008;118:3367–3377. [PMC free article]
100. Niu G, Briggs J, Deng J, Ma Y, Lee H, Kortylewski M, Kujawski M, Kay H, Cress WD, Jove R, et al. Signal transducer and activator of transcription 3 is required for hypoxia-inducible factor-1 α RNA expression in both tumor

- cells and tumor-associated myeloid cells. *Mol Cancer Res.* 2008;6:1099–1105. [PMC free article]
101. Pisani P, Bray F, Parkin DM: Estimates of the world-wide prevalence of cancer for 25 sites in the adult population. *Int J Cancer* 2002, 97:72-81.
 102. Hausen H: Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2002, 2:342-50.
 103. Parkin DM, Bray F: Chapter 2: The burden of HPV-related cancers. *Vaccine* 2006, 24(Suppl 3):S3/11-25.
 104. Das BC, Sharma JK, Gopalkrishna V, et al.: A high frequency of human papillomavirus DNA sequences in cervical carcinomas of Indian women as revealed by Southern blot hybridization and polymerase chain reaction. *J Med Virol* 1992, 36:239-45.
 105. Prusty BK, Das BC: Constitutive activation of transcription factor AP-1 in cervical cancer and suppression of human papillomavirus (HPV) transcription and AP-1 activity in HeLa cells by curcumin. *Int J Cancer* 2005, 113:951-60.
 106. Sankaranarayanan R: Overview of cervical cancer in the developing world. FIGO 6th Annual Report on the Results of Treatment in Gynecological Cancer. *Int J Gynaecol Obstet* 2006, 95(Suppl 1):S205-10.
 107. Bharti AC, Shukla S, Mahata S, Hedau S, Das BC: Anti-human papillomavirus therapeutics: facts & future. *Indian J Med Res* 2009, 130:296-310.
 108. O'Conner M, Chan SY, Bernard HU: Transcription factor binding sites in the long control regions of genital HPVs. In *Human Papillomaviruses, 1995, Compendium*. Edited by GM Bernard HU, Delius H, et al. Los Alamos: Los Alamos National Library; 1995:p21-40.
 109. Thierry F: Transcriptional regulation of the papillomavirus oncogenes by cellular and viral transcription factors in cervical carcinoma. *Virology* 2009, 384:375-9.
 110. Prusty BK, Husain SA, Das BC: Constitutive activation of nuclear factor- κ B: preferential homodimerization of p50 subunits in cervical carcinoma. *Front Biosci* 2005, 10:1510-9.

111. Levy DE, Darnell JE Jr: Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002, 3:651-62.
112. Kim DJ, Chan KS, Sano S, Digiovanni J: Signal transducer and activator of transcription 3 (Stat3) in epithelial carcinogenesis. *Mol Carcinog* 2007, 46:725-31.
113. Germain D, Frank DA: Targeting the cytoplasmic and nuclear functions of signal transducers and activators of transcription 3 for cancer therapy. *Clin Cancer Res* 2007, 13:5665-9.
114. Wen Z, Zhong Z, Darnell JE Jr: Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation. *Cell* 1995, 82:241-50.
115. Yuan ZL, Guan YJ, Chatterjee D, Chin YE: Stat3 dimerization regulated by reversible acetylation of a single lysine residue. *Science* 2005, 307:269-73.
116. Aggarwal BB, Kunnumakkara AB, Harikumar KB, et al.: Signal transducer and activator of transcription-3, inflammation, and cancer: how intimate is the relationship? *Ann N Y Acad Sci* 2009, 1171:59-76.
117. Wang R, Cherukuri P, Luo J: Activation of Stat3 sequence-specific DNA binding and transcription by p300/CREB-binding protein-mediated acetylation. *J Biol Chem* 2005, 280:11528-34.
118. Aggarwal BB, Sethi G, Ahn KS, et al.: Targeting signal-transducer-and-activator-of-transcription-3 for prevention and therapy of cancer: modern target but ancient solution. *Ann N Y Acad Sci* 2006, 1091:151-69.
119. Chen CL, Hsieh FC, Lieblein JC, et al.: Stat3 activation in human endometrial and cervical cancers. *Br J Cancer* 2007, 96:591-9.
120. Takemoto S, Ushijima K, Kawano K, et al.: Expression of activated signal transducer and activator of transcription-3 predicts poor prognosis in cervical squamous-cell carcinoma. *Br J Cancer* 2009, 101:967-72. |
121. Yang SF, Yuan SS, Yeh YT, et al.: Positive association between STAT3 and Ki-67 in cervical intraepithelial neoplasia. *Kaohsiung J Med Sci* 2006, 22:539-46.

122. Yang SF, Yuan SS, Yeh YT, et al.: The role of p-STAT3 (ser727) revealed by its association with Ki-67 in cervical intraepithelial neoplasia. *Gynecol Oncol* 2005, 98:446-52.
123. Arany I, Grattendick KG, Tyring SK: Interleukin-10 induces transcription of the early promoter of human papillomavirus type 16 (HPV16) through the 5'-segment of the upstream regulatory region (URR). *Antiviral Res* 2002, 55:331-9.
124. Mishra A, Bharti AC, Varghese P, Saluja D, Das BC: Differential expression and activation of NF-kappaB family proteins during oral carcinogenesis: Role of high risk human papillomavirus infection. *Int J Cancer* 2006.
125. Bharti AC, Donato N, Aggarwal BB: Curcumin (diferuloylmethane) inhibits constitutive and IL-6-inducible STAT3 phosphorylation in human multiple myeloma cells. *J Immunol* 2003, 171:3863-71.
126. Bharti AC, Donato N, Singh S, Aggarwal BB: Curcumin (diferuloylmethane) down-regulates the constitutive activation of nuclear factor-kappa B and IkappaBalpha kinase in human multiple myeloma cells, leading to suppression of proliferation and induction of apoptosis. *Blood* 2003, 101:1053-62.
127. Yu CL, Meyer DJ, Campbell GS, et al.: Enhanced DNA-binding activity of a Stat3-related protein in cells transformed by the Src oncoprotein. *Science* 1995, 269:81-3.
128. Solomon D, Davey D, Kurman R, et al.: The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA* 2002, 287:2114-9.
129. Mishra A, Bharti AC, Saluja D, Das BC: Transactivation and expression patterns of Jun and Fos/AP-1 super-family proteins in human oral cancer. *Int J Cancer* 2010, 126:819-29.
130. Gao L, Zhang L, Hu J, et al.: Down-regulation of signal transducer and activator of transcription 3 expression using vector-based small interfering

- RNAs suppresses growth of human prostate tumor in vivo. *Clin Cancer Res* 2005, 11:6333-41.
131. Garcia R, Bowman TL, Niu G, et al.: Constitutive activation of Stat3 by the Src and JAK tyrosine kinases participates in growth regulation of human breast carcinoma cells. *Oncogene* 2001, 20:2499-513.
 132. Clifford GM, Gallus S, Herrero R, et al.: Worldwide distribution of human papillomavirus types in cytologically normal women in the International Agency for Research on Cancer HPV prevalence surveys: a pooled analysis. *Lancet* 2005, 366:991-8.
 133. Bao YP, Li N, Smith JS, Qiao YL: Human papillomavirus type distribution in women from Asia: a meta-analysis. *Int J Gynecol Cancer* 2008, 18:71-9.
 134. Feng D, Peng C, Li C, et al.: Identification and characterization of cancer stem-like cells from primary carcinoma of the cervix uteri. *Oncol Rep* 2009, 22:1129-34.
 135. Smith JS, Munoz N, Herrero R, et al.: Evidence for *Chlamydia trachomatis* as a human papillomavirus cofactor in the etiology of invasive cervical cancer in Brazil and the Philippines. *J Infect Dis* 2002, 185:324-31.
 136. Johansen C, Mellemkjaer L, Frisch M, Kjaer SK, Gridley G, Olsen JH: Risk for anogenital cancer and other cancer among women hospitalized with gonorrhoea. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2001, 80:757-61.
 137. Smith JS, Herrero R, Bosetti C, et al.: Herpes simplex virus-2 as a human papillomavirus cofactor in the etiology of invasive cervical cancer. *J Natl Cancer Inst* 2002, 94:1604-13.
 139. Kiviat NB, Paavonen JA, Wolner-Hanssen P, et al.: Histopathology of endocervical infection caused by *Chlamydia trachomatis*, herpes simplex virus, *Trichomonas vaginalis*, and *Neisseria gonorrhoeae*. *Hum Pathol* 1990, 21:831-7.
 140. Jeon S, Allen-Hoffmann BL, Lambert PF: Integration of human papillomavirus type 16 into the human genome correlates with a selective growth advantage of cells. *J Virol* 1995, 69:2989-97.

141. Jeon S, Lambert PF: Integration of human papillomavirus type 16 DNA into the human genome leads to increased stability of E6 and E7 mRNAs: implications for cervical carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995, 92:1654-8. |
142. de Boer MA, Jordanova ES, Kenter GG, et al.: High human papillomavirus oncogene mRNA expression and not viral DNA load is associated with poor prognosis in cervical cancer patients. *Clin Cancer Res* 2007, 13:132-8.
143. Fiander AN, Hart KW, Hibbitts SJ, et al.: Variation in human papillomavirus type-16 viral load within different histological grades of cervical neoplasia. *J Med Virol* 2007, 79:1366-9.
144. Munger K, Phelps WC, Bubb V, Howley PM, Schlegel R: The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *J Virol* 1989, 63:4417-21.
145. Vultur A, Arulanandam R, Turkson J, Niu G, Jove R, Raptis L: Stat3 is required for full neoplastic transformation by the Simian Virus 40 large tumor antigen. *Mol Biol Cell* 2005, 16:3832-46. |
146. Lin J, Jin X, Rothman K, Lin HJ, Tang H, Burke W: Modulation of signal transducer and activator of transcription 3 activities by p53 tumor suppressor in breast cancer cells. *Cancer Res* 2002, 62:376-80.
147. Niu G, Wright KL, Ma Y, et al.: Role of Stat3 in regulating p53 expression and function. *Mol Cell Biol* 2005, 25:7432-40. |
148. Sobti RC, Singh N, Hussain S, Suri V, Bharti AC, Das BC: Overexpression of STAT3 in HPV-mediated cervical cancer in a north Indian population. *Mol Cell Biochem* 2009, 330:193-9.
149. Decker T, Kovarik P: Serine phosphorylation of STATs. *Oncogene* 2000, 19:2628-37.
150. Lu H, Ouyang W, Huang C: Inflammation, a key event in cancer development. *Mol Cancer Res* 2006, 4:221-33.

151. Hess S, Smola H, Sandaradura De Silva U, et al.: Loss of IL-6 receptor expression in cervical carcinoma cells inhibits autocrine IL-6 stimulation: abrogation of constitutive monocyte chemoattractant protein-1 production. *J Immunol* 2000, 165:1939-48.
152. Woodworth CD, Michael E, Marker D, Allen S, Smith L, Nees M: Inhibition of the epidermal growth factor receptor increases expression of genes that stimulate inflammation, apoptosis, and cell attachment. *Mol Cancer Ther* 2005, 4:650-8.
153. Chan KS, Carbajal S, Kiguchi K, Clifford J, Sano S, DiGiovanni J: Epidermal growth factor receptor-mediated activation of Stat3 during multistage skin carcinogenesis. *Cancer Res* 2004, 64:2382-9.
154. Mitra AB, Murty VV, Pratap M, Sodhani P, Chaganti RS: ERBB2 (HER2/neu) oncogene is frequently amplified in squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Cancer Res* 1994, 54:637-9.
155. Lakshmi S, Nair MB, Jayaprakash PG, Rajalekshmy TN, Nair MK, Pillai MR: c-erbB-2 oncoprotein and epidermal growth factor receptor in cervical lesions. *Pathobiology* 1997, 65:163-8.
156. Wu R, Sun S, Steinberg BM: Requirement of STAT3 activation for differentiation of mucosal stratified squamous epithelium. *Mol Med* 2003, 9:77-84.
157. Sun S, Steinberg BM: PTEN is a negative regulator of STAT3 activation in human papillomavirus-infected cells. *J Gen Virol* 2002, 83:1651-8.