

Вергейчик Г.И., Еремин В.Ф.

Гомельский государственный медицинский университет
РНПЦ эпидемиологии и микробиологии МЗ РБ

Молекулярно-генетические характеристики онкогенных вирусов папилломы человека, циркулирующих в Республике Беларусь

SUMMARY

This study presents the structure of different types of oncogenic human papilloma viruses in women with cervical cancer and defines the phylogenetic features of HPV-16 circulating on the territory of the Republic of Belarus. The East Asian and European subtypes of HPV-16, which can be included into one evolutionary branch, are prevalent for Belarus. We have also discovered a new Belarusian subtype, which is one of the HPV-16 progenitors, circulating on the European continent.

VIARHEICHYK H.I., ERIOMIN V.F. Molecular genetic characteristics of oncogenic human papilloma viruses circulating in the Republic of Belarus

По данным республиканского канцер-регистра, в Беларуси за 2008 г. зарегистрировано 897 случаев рака шейки матки (РШМ), 358 женщин умерли от этого заболевания [2]. Фактически это означает, что почти ежедневно в стране одна женщина умирает от цервикального рака.

Этиологическая роль вируса папилломы человека (ВПЧ) высокого канцерогенного риска в развитии РШМ не вызывает сомнений. Рост заболеваемости РШМ у женщин репродуктивного возраста отмечается в последние 15 лет на территории нашей страны, он обусловлен широким распространением ВПЧ-инфекции, ко-

торая передается контактным путем. Изучение молекулярной эпидемиологии ВПЧ-инфекции позволяет определить доминирующие генотипы ВПЧ высокого онкогенного риска, ответственные за развитие предрака и РШМ, генотипы, которые циркулируют среди здоровых носителей, а также миграцию вирусов на территории страны. Без широкого внедрения молекулярно-генетических методов в практическое здравоохранения профилактические мероприятия по предотвращению распространения генитальной ВПЧ-инфекции недостаточно эффективны.

Изоляты вируса папилломы традиционно называются типами. Для выявления

новых типов ВПЧ на протяжении последних 15 лет использовался ген L1 ORF так как он является наиболее сохраняемым геном в геноме ВПЧ. Новый тип ВПЧ признается таковым, если полный геном был клонирован и последовательность нуклеотидов L1 ORF отличается более чем на 10% от ближайших известных генотипов. Только в единственно широко изученном хозяине, человеке, почти 100 типов папилломавирусов были описаны на основе выделения полных геномов, еще большее число – на основе выявления субгеномных ампликонов. Многие из этих типов ВПЧ повсеместно и глобально распространены. Введение термина «виды» является биологически полезным, так как они являются естественными таксонами на основе тесных филогенетических отношений определенных типов, а также поскольку такие виды обычно классифицируют типы вирусов папилломы, которые имеют общие биологические и патологические свойства, без учета мелких различий, согласно требованию руководящих указаний Международной

классификации таксономии вирусов. Например, все типы ВПЧ, которые образуют вид вместе с ВПЧ-16, являются типами ВПЧ «высокого риска», которые обнаруживаются в образцах РШМ [5].

Субтипы типов ВПЧ определяются при отличии на геном уровне на 2–10% от любого типа ВПЧ. Этот термин изначально имел иной смысл, и он использовался, когда различные изоляты одного и того же типа частично отличались в структурах расщепления ферментов и их обозначали например: ВПЧ 2a, ВПЧ 2b, и ВПЧ 2c. Позднее стало ясно, что эти субтипы скорее попадают под категорию «варианты». Таким образом, на сегодняшний день различия от 2 до 10% в структуре гена L1 ВПЧ определяют субтип и менее 2% – вариант. Это определение было согласовано между всеми учеными, работающими над ВПЧ таксономией и диагностикой, на Международном симпозиуме по папилломавирусной инфекции, который проходил в Квебеке в 1995 г. [3, 5].

Вирус папилломы человека 16 типа в моноинфекции вызывает более 50% всех случаев РШМ, таким образом причины превалирования ВПЧ-16 типа представляют особый интерес [4]. Еще один практический аспект, который может быть ассоциирован с изучением структуры L1 гена ВПЧ-16, связан с тем, что иммунная система человека реагирует на белок, кодируемый этим геном. Поэтому вакцины первой генерации против ВПЧ-16 и 18 типов основаны на созданном генно-инженерным способом L1-капсиде. Однако насколько принципиальны различия в структуре L1 гена в случае циркуляции на территории страны различных субтипов папилломавирусов вакцинных генотипов для формирования стойкого индуцированного вакциной иммунитета на сегодняшний день остается не выясненным.

Цель исследования – определение доминирующих генотипов онкогенных папилломавирусов, вызывающих РШМ у женщин, проживающих в Республике Беларусь, и выявление филогенетических особенностей ВПЧ-16 типа.

Материалы и методы

В исследование были включены 492 образца эпителиальных соскобов шейки матки от женщин с преинвазивным и инвазивным РШМ. Для секвенса отобраны 35 образцов, содержащих ДНК ВПЧ-16 типа, от пациенток с различными проявлениями генитальной папилломавирусной инфекции, проживающих в Брестской, Гомельской, Бродненской, Витебской и Могилевской областях.

Биологические пробы получены от одной больной с диагнозом CIN1, 4 женщин с CIN2, 15 пациенток с CIN3+ca *in situ*, 12 больных с инвазивным РШМ и 3 пациенток с латентной формой ВПЧ-инфекции. Все диагнозы были верифицированы гистологически.

Материалом для исследований служили соскобы эпителия шейки матки. Забор материала производился с использованием одноразовой цитощетки или ложки Фолькмана в транспортную среду.

Для постановки реакции использовались коммерческие ПЦР-тест-системы «АмплиСенс» производства ЦНИИ эпидемиологии Министерства здравоохранения России. Для выявления вирусов высокого онкогенного риска применяли набор «АмплиСенс-50-F ВПЧ ВКР-генотип» (определяли ДНК ВПЧ 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 типов) с электрофоретической детекцией и в режиме реального времени. В наборах применялся метод одновременной амплификации (мультиплекс-ПЦР) участков ДНК E1-E2 генов ВПЧ и участка ДНК β-глобинового гена человека, используемого в качестве эндогенного внутреннего контрольного образца. ДНК-мишень, выбранная в качестве внутреннего контроля, является участком генома человека и должна всегда присутствовать в образце. Эндогенный внутренний контроль позволяет не только контролировать этапы ПЦР-анализа (выделение ДНК и проведение ПЦР), но и оценивать адекватность забора материала и его хранения. В случаях, если соскоб эпителия отобран неправильно (недостаточное количество эпителиальных клеток) сигнал амплификации β-глобинового гена будет заниженным.

Выделение ДНК ВПЧ проводили с использованием коммерческих наборов «ДНК сорб АМ», производства НИИ эпидемиологии (г. Москва).

Синтез праймеров. Пары праймеров к L1 гену ВПЧ-16, L1 L: ttgctctgtgccagatc; L1 R: aatggctgaccacgacctac, синтезировали на автоматическом синтезаторе «Expedite™ 8900 Nucleic Acid Synthesis System» («PerSeptive Biosystems», США).

ПЦР с синтезированными парами праймеров проводили по следующей прописи:

95 °C – 5 мин	} 40 циклов.
95 °C – 30 с	
54 °C – 45 с	
72 °C – 60 с	
72 °C – 7 мин	

Электрофорез в агарозном геле. Анализ продуктов амплификации проводили в 1%-ном агарозном геле на трис-боратном буфере, содержащем бромид этидия 1,5 мкл (10 мг/мл) на 150 мл буфера.

Секвенирование ВПЧ по гену L1 (300 п.н.) проводили на приборе модели 3100-Avant («Applied Biosystems»). Анализ результатов секвенирования проводили с помощью программ ClustalX (1.8) и BioEdit. Нуклеотидные последовательности амплифицированных фрагментов были выровнены, в них были найдены рамки считывания и получены соответствующие аминокислотные последовательности. Для филогенетического анализа полученные нуклеотидные последовательности были выровнены с нуклеотидными последовательностями референсных изолятов ВПЧ-16, взятых из Международной базы данных GenBank полных нуклеотидных последовательностей геномов различных штаммов ВПЧ-16 с помощью программы Clustal W. Для филогенетического анализа полученных фрагментов и построения деревьев использовали программу MEGA 4.1.

Результаты и обсуждение

Очевидно, что для длительной персистенции папилломавирусов в многослойном плоском эпителии шейки матки необходимы определенные условия в организме человека. Как правило, это особенности состояния эпителия и иммунной системы. Вирусы папилломы проникают в эпителий через микроповреждения и инфицируют клетки базального слоя. Вирус встраивается в жизненный цикл клетки и вместе с дифференцирующейся клеткой поднимается в поверхностный слой многослойного плоского эпителия, где и происходит репликация вирусных частиц. Таким образом, для реализации ВПЧ-инфекции благоприятным фоном являются доброкачественные патологические процессы на шейке матки, которые приводят к появлению микроповреждений, таких как острый или хронический цервицит, истинные эрозии, а также эктопия призматического эпителия различного генеза. В рамках исследования ВПЧ-инфекция была выявлена в 61,4% случаев женщин с доброкачественной патологией шейки матки. Наиболее высокая частота встречаемости латентной формы ВПЧ-инфекции у пациенток с доброкачественными патологическими процессами шейки матки отмечается в возрастных группах 20–24 года – 67,7%, 25–29 лет – 68,1%, 30–34 года – 67,3%, с тенденцией к сни-

Таблица Различные формы генитальной ВПЧ-инфекции в разных возрастных группах			
Возраст, лет	Инфицированность ВПЧ, %	CIN3 + <i>in situ</i> , %	Заболееваемость РШМ (Республиканский канцер-регистр, 2009), ‰
15–19	54,5	0	0,3
20–24	67,7	12,5	1,7
25–29	68,1	20,5	10,5
30–34	67,3	27,1	12,8
35–39	59,4	25,0	28,0
40–44	39,2	22,0	29,7
45–49	42,8	16,6	33,0
50–54	50,0	20,0	33,2

жению инфицированности среди женщин старше 35 лет. В то время как пик заболеваемости CIN3 в нашем исследовании отмечается в возрастной группе 30–34 года – 27,1%, высокие показатели сохраняются среди женщин 35–44 лет (см. таблицу). Пик заболеваемости РШМ согласно данным республиканского канцер-регистра выявлен в возрастных группах 45–49 лет – 33,0‰ и 50–54 года – 33,2‰ [2].

Среди 492 пациенток с преинвазивным и инвазивным цервикальным раком в 94,2% случаях выявлена ДНК онкогенных папилломавирусов, в 5,8% случаях ДНК исследуемых генотипов ВПЧ не выявлена, возможно, эти случаи дисплазии и рака обусловлены генотипами, не включенными в рабочую тест-систему.

В результате предыдущих исследований нами выявлены территориальные особенности распространенности онкогенных папилломавирусов у женщин, проживающих в Республике Беларусь. К ним необходимо отнести ассоциацию эпителиальных дисплазий и РШМ с ВПЧ-16, 31, 33, 35 и 18 типов, что встречается достоверно чаще ($p = 1,1 \times 10^{-9}$, $p = 0,002$, $p = 0,07$, $p = 0,02$, $p = 0,007$ соответственно), чем бессимптомное вирусоносительство этих генотипов у женщин с фоновыми состояниями и клинически здоровых женщин и указывает на высокий канцерогенный потенциал выше перечисленных генотипов [1].

Частота встречаемости ВПЧ-16, 18 типов, против которых направлены вакцины первой генерации, суммарно составляют 61,1% у пациенток, страдающих РШМ. Однако только более детальное изучение субтипов этих и других доминирующих генотипов позволит оценить потенциальную эффективность вакцин на территории Республики Беларусь и сформировать

группы, для которых могут быть эффективны вакцины первой генерации.

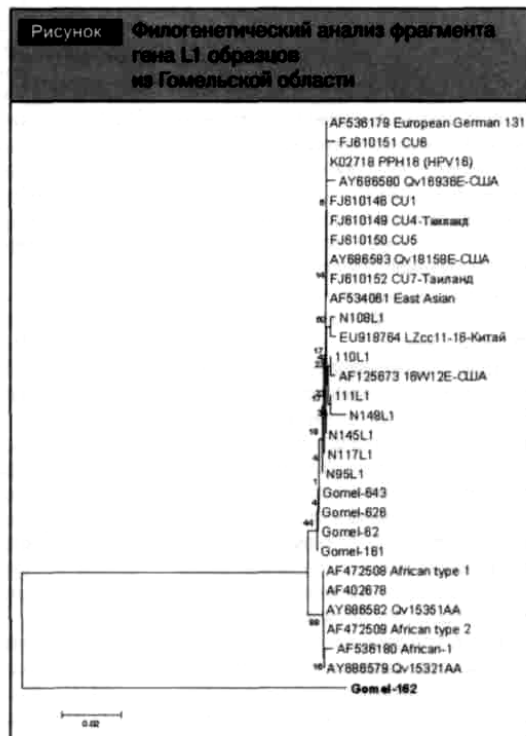
ВПЧ-16 типа является доминирующим генотипом, ответственным за развитие РШМ, и частота его встречаемости составляет 56,7% как в виде моноинфекции, так и в сочетании с другими вирусными генотипами среди пациенток с указанной патологией. Изучение L1 гена ВПЧ 16 типа обусловлено как наиболее высокой частотой встречаемости этого генотипа, так и его значением в формировании противовирусного иммунитета, так как вакцины первой генерации основаны на L1-вирусоподобных частицах ВПЧ 16 и 18 типов.

Как показали результаты проведенного исследования, на территории Беларуси циркулируют в основном европейский и восточно-азиатский тип ВПЧ-16 (европейские и восточно-азиатские субтипы ВПЧ-16 типа очень близки между собой и имеют общее происхождение). Средние *r*-дистанции между образцами из Бреста, Могилева и Витебска равнялись 0,000, что указывает на единый источник происхождения этих вирусов и длительную их циркуляцию в популяции инфицированных ВПЧ людей. Исключение составляли образцы № 7 (пациент-

ка в возрасте 51 год с диагнозом CIN3) и № 16 (пациентка 38 лет с диагнозом РШМ T₃N₀M₀G₃ III стадия) обе из Могилевской области, средние *r*-дистанции между ними и другими анализируемыми образцами составили 0,003, в связи с чем можно сделать вывод об отдельном источнике происхождения этих субтипов.

Средние *r*-дистанции между образцами из Брестской, Могилевской и Витебской областей и африканскими вариантами ВПЧ-16 составили 0,010–0,013, а с европейскими и азиатскими – 0,003, что указывает на более близкое родство белорусских, европейских и восточно-азиатских вирусов.

При анализе фрагментов ДНК ВПЧ-16, полученных от пациентов из Гомельской области (см. рисунок), было выявлено, что большинство образцов также относятся к европейским и азиатским вариантам ВПЧ-16, средние *r*-дистанции между образцами равнялись 0,000, а с африканскими – 0,013–0,017. Исключение составляли образцы № 108 (от пациентки 35 лет с диагнозом РШМ T_{1a}N₀M₀IA1st, проживающей в г. Мозыре Гомельской области) и № 148 (от пациентки 36 лет с диагнозом РШМ T₁N₀M₀G₂IB1st, проживающей в Речицком районе Гомельской области), *r*-дистанции между



этими образцами и остальными составили 0,004 и 0,007 соответственно, что указывает на отдельный источник происхождения данных субтипов. Таким образом, в Республике Беларусь циркулируют субтипы ВПЧ-16, имеющие эволюционно разных прародителей.

При анализе образцов, полученных в Гомельской области, нами впервые выявлен уникальный вариант ВПЧ-16, который не кластрировался ни с одним из «местных» образцов ВПЧ-16, ни с референсными вирусами, взятыми из Международной базы данных GenBank, р-дистанция между образцом № 162 и другими проанализированными пробами ДНК ВПЧ-16 составила 0,205. Таким образом, нами открыт новый субтип ВПЧ-16, который ранее нигде не был описан.

Вирус был изолирован от пациентки 30 лет с диагнозом CIN 3, обусловленной ВПЧ-16 типа, проживающей в отдаленной деревне Наровлянского района Гомельской области, которая никогда не покидала пределы республики. У женщины отмечается длительная персистенция (более двух лет) ВПЧ-16 типа после проведения электрохирургического иссечения CIN3 в неизменном многослойном плоском эпителии шейки матки, в клинически незначимой концентрации – 2,98 Ig геномных эквивалентов на 100 000 клеток. Использование системной иммунотерапии интерферонами α 2-b в течение 12 недель после оперативного лечения у данной пациентки не привело к элиминации ВПЧ из эпителия шейки матки.

Можно говорить об открытии «местного» ВПЧ, который эволюционно находится очень далеко от известных референсных вирусов и является одним из прародителей ВПЧ-16, циркулирующих на европейском континенте.

В Гродненской области все субтипы кластрировались вокруг европейских и азиатских референсных образцов. Средние р-дистанции между пробами составили 0,000–0,003, а с образцами из Африки р-дистанции варьировали от 0,010 до 0,013. Исключение составил образец № 8 от пациентки 42 лет с диагнозом CIN1, проживающей в г. Гродно, который на филогенетическом древе кластрировался

вместе с образцами с африканского континента. Средние р-дистанции образца № 8 с африканскими референсными последовательностями составили 0,000, а с европейскими и азиатскими варьировали от 0,010 до 0,013. Таким образом, в Гродненской области нами был выявлен первый ВПЧ-16 от местной жительницы с африканскими «корнями».

Знания об эпидемиологических и молекулярно-генетических особенностях онкогенных папилломавирусов, ответственных за канцерогенез в эпителии шейки матки, являются базовыми и в ближайшее время позволят определить новые направления в лечении и диспансерном наблюдении пациенток с учетом выявленных ВПЧ-генотипов, их канцерогенного потенциала, а также оценить целесообразность и потенциальную перспективу вакцинации на популяционном уровне вакцинами первой генерации.

Использование методов молекулярной эпидемиологии позволяет дать качественную характеристику эпидемиологическому процессу, определить направления и время заноса вируса в страну, контролировать циркуляцию вируса в популяции, наконец, определять новые субтипы вируса и давать рекомендации по применению вакцин.

В целом эпидемиологическая ситуация характеризуется преобладанием восточно-азиатских и европейских субтипов ВПЧ-16 на территории Беларуси. В то же время выявление субтипов ВПЧ-16, у которых р-дистанции между пробами составили 0,003–0,007, может свидетельствовать о нескольких прародителях ВПЧ, циркулирующих в нашей стране. Секвенированный уникальный субтип ВПЧ-16 на территории Гомельской области может являться одним из прародителей ВПЧ-16, циркулирующих на европейском континенте.

Проведенное исследование позволило сделать следующие выводы:

1. Наиболее высокая частота встречаемости латентной формы ВПЧ-инфекции у пациенток с доброкачественными патологическими процессами на шейке матки от 67,3 до 68,1% случаев отмечается в возрасте 20–34 года с тенденцией к снижению инфицированности среди жен-

щин старше 35 лет. Пик заболеваемости РШМ, согласно данным Республиканского канцер-регистра, выявлен в возрасте 45–54 года – 33,0–33,2%.

2. В 56,7% случаев у женщин, проживающих в Республике Беларусь, РШМ обусловлен ВПЧ-16 типа.

3. На территории Беларуси преобладают восточноазиатские и европейские субтипы ВПЧ-16, которые можно отнести к единой эволюционной ветви.

4. Нами открыт новый белорусский субтип, который является одним из прародителей ВПЧ-16, циркулирующих на европейском континенте. После секвенирования полного генома этого субтипа ВПЧ-16 он будет внесен в Международную базу данных GenBank.

5. Дальнейшие исследования, проводимые в заданном направлении, позволят охарактеризовать различия в клиническом течении патологии шейки матки, обусловленной «местными» и европейскими/восточноазиатскими субтипами ВПЧ-16, что даст возможность получить новые факторы прогноза течения заболевания и разработать эффективное лечение с учетом молекулярно-генетических особенностей вируса.

6. Для контроля циркуляции различных ВПЧ-генотипов на территории страны, а также контроля заноса вирусов из-за пределов республики необходимо постоянно проводить молекулярно-эпидемиологический мониторинг и совершенствовать систему противоэпидемических мероприятий.

ЛИТЕРАТУРА

1. Вергейчик Г.И., Стрибук Ж.А., Еремич В.Ф. и др. // Мед. новости. – 2010. – №11. – С. 69–75.
2. Злокачественные новообразования в Беларуси 1999–2008 / С.М. Поляков, Л.Ф. Левин, Н.Г. Шибко, О.Ф. Щербина; под ред. И.В. Малаховой, И.В. Залуцкой. – Минск, 2009. – 205 с.
3. De Villiers E.M., Fauquet C., Broker T.R. et al. // Virology. – 2004. – Vol. 324. – P. 17–27.
4. Stone K.M., Karem K.L., Sternberg M.R. et al. // The Journal of Infectious Diseases. – 2002. – Vol. 186, N 10. – P. 1396–1402.
5. Zur Hausen H. // Cancer Biology. – 1999. – Vol. 9. – P. 405–411.

Поступила 18.05.2011 г.