

# Определение экспрессии онкогенов E6/E7 вируса папилломы человека у беременных пациенток с генитальной папилломавирусной инфекцией

Кравченко С.С.<sup>1</sup>, Северин И.Н.<sup>2</sup>, Вергейчик Г.И.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Гомельский государственный медицинский университет, Беларусь

<sup>2</sup>Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий, Минск, Беларусь

Kravchenko S.S.<sup>1</sup>, Severin I.N.<sup>2</sup>, Vergeichik G.I.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Gomel State Medical University, Gomel, Belarus

<sup>2</sup>Republican Scientific and Practical Center for Transfusiology and Medical Biotechnologies, Minsk, Belarus

## Detection E6/E7 oncogene expression of human papillomavirus in pregnant women with genital HPV infection

**Резюме.** В исследование включены беременные пациентки (n = 51) с различными формами папилломавирусной инфекции (ВПЧ-инфекции) и наличием экспрессии онкогенов E6/E7 19 генотипов ВПЧ. У 11,8% женщин с папилломатозом наружных половых органов и дисплазией шейки матки легкой степени методом ПЦР-генотипирования (по участку генов E1/E2) вирус не выявлен, однако экспрессия онкогенов E6/E7 ВПЧ была определена. При ПЦР-генотипировании чаще выявлялись ВПЧ 16 (37,2%), 31 (18,6%) и 58 (18,6%), экспрессия E6/E7 генотипов 59 (51%), 45 (41,2%) и 35 (27,5%). Экспрессия E6/E7 генотипов 16 и 18 статистически значимо чаще выявлялась при вирусной нагрузке более 5 lg г.э. на 100 000 клеток (p=0,04). Определение экспрессии онкогенов E6/E7 может стать эффективным вспомогательным методом оценки течения ВПЧ-инфекции при использовании по показаниям.

**Ключевые слова:** ВПЧ, дисплазия шейки матки, экспрессия онкогенов E6/E7, беременность.

Медицинские новости. – 2015. – №9. – С. 63–66.

**Summary.** The study included pregnant women (n = 51) with various forms of human papillomavirus infection (HPV infection) and the presence of E6/E7 oncogene expression of 19 genotypes. Revealed that 11.8% of women with genital papillomatosis and cervical dysplasia by PCR genotyping (on site E1/E2) virus was not identified, but the expression of E6/E7 oncogenes of HPV was determined. Using PCR genotyping more prevalent was HPV 16 (37.2%), 31 (18.6%) and 58 (18.6%). More common was determined expression of the E6/E7 59 (51%), 45 (41.2%) and 35 (27.5%) genotypes. E6/E7 expression of HPV 16 and 18 was statistically significantly more frequently detect if viral load was more than 5 lg g.e. per 100 000 cells (p=0.04). Detection of expression E6/E7 oncogenes can be an effective additional method for assessing current HPV infection when it use according to indications.

**Keywords:** HPV, cervical dysplasia, the expression of E6/E7 oncogenes, pregnancy.

Meditsinskie novosti. – 2015. – №9. – P. 63–66.

Распространенность вируса папилломы человека (ВПЧ) и, соответственно, ВПЧ-ассоциированных заболеваний различной локализации постоянно растет, несмотря на работу скрининговых программ, усовершенствование методов диагностики и терапии данной инфекции, внедрение профилактической вакцинации.

Согласно данным европейского отделения Международного общества по изучению инфекции в акушерстве и гинекологии (I-IDSOG-Europe), ВПЧ подразделяются на группы высокого (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 46, 51–53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82-й типы) и низкого (6, 11, 40, 42–44, 54, 61, 70, 72, 81-й типы) онкологического риска. Все генитальные серотипы ВПЧ отнесены к подгруппе А, которая, согласно филогенетической классификации, подразделена на основе различий последовательностей генов E6, E7, L1 на 7 филогенетических групп генитальных ВПЧ: А5, А6, А7, А8, А9, А10, А11 (45 генотипов). Группа А9 включает 16, 31, 33, 35, 52, 58, 67-й типы; А7 – 18, 39, 45, 59, 68, 70-й типы и с 85-го типа и далее; А5 – 26, 51, 69, 82-й типы; А6 – 30, 53, 56, 66-й типы; А11 – 34, 73-й типы. Такое деление важно для динамического на-

блюдения за течением вирусной инфекции и более точного прогнозирования ее развития, так как разные типы ВПЧ обладают разным онкогенным потенциалом и способностью к персистенции. Кроме того, существует условное разделение генотипов по преобладанию в определенных регионах: выделяют европейские (16, 18, 31, 33, 45-й и др.) и азиатские (52, 58, 59, 65-й и др.) типы [3, 6, 7, 9].

Данные относительно распространенности типов ВПЧ по регионам и их связи с развитием предраковых заболеваний шейки матки разноречивые. Так, по сведениям авторов [1], ВПЧ выявляется у 30,3% здорового населения Европейского региона Российской Федерации. В Европе наиболее распространенными типами являются ВПЧ 16 (61,6%), 18 (7%), 33 (5%), 45 (3,6%), 31 (3,3%). По данным исследований, проведенных в Республике Беларусь, частота выявления ВПЧ у здоровых женщин варьировала от 8,1 до 61,5%, в зависимости от возрастных рамок и других факторов. У здоровых обследованных пациенток преобладали ВПЧ 16 (22,4%), 56 (16,5%), 51 (15,3%), 31 (14,1%), 52 (12,4%), 45 (11,8%), а у пациенток с дисплазией и

раком шейки матки – 16 (55%), 31 (14,1%), 33 (12,4%), 56 (8,8%), 35 (7,8%). Эпидемиологическая особенность Беларуси по сравнению с другими Европейскими странами состоит в относительно более широкой распространенности 56 генотипа и низкой частоте 18 генотипа [2, 4]. Среди жительниц Китая и Южной Бразилии с предраковыми заболеваниями шейки матки и раком шейки матки выявлено широкое распространение ВПЧ 52 и 58-го типов (23,8 и 13,8% соответственно), имеющих высокий онкогенный потенциал. Таким образом, ВПЧ 52 и 58-го типов также ассоциированы с раком шейки матки [3, 8].

В процессе развития предраковых состояний происходят генетические и эпигенетические изменения, такие как интеграция вирусного генома в геном клеток хозяина, из-за этого регуляция экспрессии вирусных генов E6 и E7 нарушается. Поскольку эти гены принимают непосредственное участие в процессе развития злокачественных изменений в клетках, возможно использование выявления E6 и E7 в качестве более точных маркеров, чем вирусная ДНК. Однако,

учитывая низкий уровень E6/E7 в клетке, вместо прямого определения используют выявление мРНК. Данная методика может позволить различать бессимптомно протекающие инфекции и инфекции, представляющие опасность для здоровья [5].

Исследований, посвященных использованию метода определения экспрессии онкобелков E6/E7 для широкого спектра генотипов ВПЧ и его диагностической значимости у беременных, до сих пор не проводилось.

**Цель исследования** – оценить клиническую значимость определения экспрессии онкогенов E6/E7 16, 18, 31, 59, 45, 33, 6, 11, 58, 52, 56, 35, 42, 43, 44, 68, 39, 51, 66 генотипов ВПЧ у беременных пациенток.

**Материалы и методы**

В исследование включены беременные женщины (n = 51) с различными формами папилломавирусной инфекции, у которых при последующем обследовании была выявлена экспрессия онкогенов E6/E7 19 вышеперечисленных генотипов ВПЧ.

Материалом для исследования послужили соскобы из шейки матки беременных, взятые одноразовыми ложечками Фолькмана, которые помещали в две пробирки: в транспортную среду («Амплисенс», Россия) и в среду RNA Later («QIAGEN», Германия).

Для определения генотипов ВПЧ и их вирусной нагрузки использовали метод ПЦР с электрофоретической детекцией и в режиме реального времени (ПЦР-генотипирование). Использовали тест-систему «АмплиСенс ВПЧ ВКР генотип-FL» и «АмплиСенс ВПЧ 6,11-Ерн» для выявления ДНК ВПЧ 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 52, 56, 58, 59, 66, 6, 11 генотипов, тест-система «АмплиСенс ВПЧ ВКР титр-скрин-FL» для определения вирусной нагрузки ВПЧ (АмплиСенс, РФ). Метод основан на одновременной амплификации (мультиплекс-ПЦР) участков ДНК E1/E2 генов трех основных групп ВПЧ и участка ДНК глубоного гена, используемого в качестве эндогенного внутреннего контроля.

Для определения экспрессии E6/E7 из образцов, помещенных в среду RNA Later, выделяли РНК с использованием набора «Рибозоль-В-100» по протоколу производителя («АмплиСенс», РФ). Образцы РНК хранили при температуре -80°C. Выделенные образцы РНК использовали для получения соответствующей кДНК с использованием набора «Реверта L 100» («АмплиСенс», РФ), кДНК хранили при температуре -20°C. Для детекции кДНК гена E6/E7 вируса папилломы человека генотипов ВПЧ 16, 18, 31, 59, 45, 33, 6, 11, 58, 52, 56, 35, 42, 43, 44, 68, 39, 51, 66 использовали двустадийную ПЦР. На первом этапе амплифицировали общую

использованием прямого праймера GP-E6-3F и двух обратных праймеров GP-E6-5B и GP-E6-6B. Продукты первого этапа ПЦР использовали в так называемой «гнездовой» ПЦР с использованием типоспецифических праймеров. При этом праймеры были объединены для использования в мультиплексной ПЦР. Реакционная смесь ПЦР состояла из 2-кратного ПЦР-буфера (разведенного до 1-кратной концентрации), смеси дезоксинуклеозидтрифосфатов (конечная концентрация 0,8 мМ), праймеров (в концентрации 0,1–0,2 мкМ каждого праймера), полимеразы TaqMan S (все реагенты производства «Праймтех», Беларусь). На первом этапе ПЦР в реакционную смесь добавляли 2 мкл кДНК после обратной транскрипции, в «гнездовой» ПЦР использовали 0,5 мкл соответствующего образца после первого этапа амплификации. Амплификация проводилась на приборе Master Cycler epGradient S (Eppendorf, Германия). Учет результатов проводили с помощью гель-электрофореза в 2,5-процентном агарозном геле в 0,5-кратном буфере TBE. Для определения размеров полученных ампликонов использовали маркер длин фрагментов ДНК O'GeneRuler Low Range DNA Ladder (Fermentas NsSM1203, Латвия) и маркер длин фрагментов Low Molecular Weight DNA Ladder (New England Biolabs NsN3233S). Снимки гелей получали с помощью гель-документирующей системы Kodak Molecular Image Station 2000R.

Для статистической обработки количественных данных применялись методы вариационной статистики Фишера – Стьюдента с определением доли (P %) изучаемого признака и стандартной ошибки доли (S<sub>p</sub>, %). При межгрупповом и внутригрупповом сравнении по долям использованы критерии Фишера и  $\chi^2$ . Для описания центральной тенденции рассчитаны медиана (Me) и интерквар-

тильный размах (25; 75). Для установления различий в группах признаков вычисляли критерий Манна – Уитни (Z). Статистическая обработка данных производилась при помощи программы «Statistica 7.0».

**Результаты и обсуждение**

В общей структуре клинических проявлений у обследованных пациенток папилломатоз наружных половых органов встречался в 41,2% случаев, причем у трех пациенток (5,8%) в сочетании с дисплазиями шейки матки легкой и средней степени, в одном случае (2%) – с интраэпителиальной неоплазией вульвы легкой степени. Дисплазии шейки матки верифицировались в 39,2% случаев: легкой степени – 7,8%, средней – 27,5%, тяжелой – 3,9%. В одном случае (2%) у пациентки гистологически была верифицирована лейкоплакия шейки матки на фоне инфекции ВПЧ 16. В 19,6% случаев определялись доброкачественные процессы шейки на фоне ВПЧ-инфекции.

У 88,2% обследованных беременных верифицированы высоко- и низкоонкогенные генотипы папилломавирусов, наличие которых, согласно методике, определялось по участкам E1/E2. У 11,8% женщин с ВПЧ-ассоциированными поражениями гениталий (папилломатоз наружных половых органов и дисплазии легкой степени) вирус выявлен не был, однако онкобелки E6/E7 ВПЧ (их экспрессия) были определены. Полученные результаты могут стать предпосылкой для того, чтобы при полноценной диагностике папилломавирусной инфекции, особенно в группах риска, признать необходимость использовать также и метод определения экспрессии E6/E7, что позволит не только выявлять вирус в продуктивной фазе, но и определять его наличие вообще.

Частота выявления различных генотипов ВПЧ у пациенток в зависимости от использования методики их выявления представлена на рисунке.





Методом ПЦР-генотипирования наиболее часто определяются генотипы 16 (в 37,2% случаев), 31 (в 18,6% случаев) и 58 (в 18,6% случаев). Превалирование этих генотипов соответствует данным авторов, изучавших распространенность вируса в изучаемом регионе [4]. Экспрессия онкогенов E6/E7 чаще выявлялась при наличии типов 59 – 51% случаев, 45 – 41,2% случаев и 35 – 27,5% случаев.

Относительная частота выявления генотипов 16, 33, 51, 52, 56, 58 была выше, нежели наличие их экспрессии. ВПЧ 35, 45, 59, напротив, чаще определялись методом экспрессии онкогенов E6/E7. Детекция одновременно экспрессии онкогенов E6/E7 генотипов высоко- и низкоонкогенного риска определялась в 31,4% случаев, причем в 62,5% случаев у пациенток с генитальным папилломатозом.

Частота экспрессии E6/E7 только генотипа 16 составила 21,6%, а 16 и 18 – 31,4%. Показатель не столь велик, поэтому при использовании метода определения экспрессии перечисленных онкобелков целесообразно выявлять его и у других генотипов, которые также могут стать причиной развития предраковой патологии шейки матки.

При определении генотипов ВПЧ методом ПЦР используя тест-системы с детекцией участков E1/E2, в 46,5% случаев определялся один генотип, а при определении экспрессии онкобелков E6/E7 у этих же пациенток один генотип встречался только в 19,6% случаев. Процентное соотношение встречаемости двух генотипов в обеих группах было сопоставимо (37,2 и 33,3% соответственно). Частота детекции трех и более генотипов в исследуемых группах была различной: в первой группе – 47,1%, во второй – 16,3%. То есть при определении экспрессии онкобелков E6/E7 статистически значимо чаще определялись два и более генотипов нежели методом определения ВПЧ по участкам генов E1/E2 ( $\chi^2=12,1$ ,  $p=0,02$ ).

Интересно, что один генотип вируса был выявлен обоими методами только в 4 (7,8%) случаях, причем признаков озлокачествления (наличие дисплазии) у данных пациенток не обнаружено: у двух из них (3,9%) был верифицирован папилломатоз наружных половых органов, у двух других (3,9%) – латентная форма папилломавирусной инфекции. Данный факт может наводить на мысль, что в патогенезе развития дисплазии шейки матки важную роль играет не только наличие высокоонкогенного генотипа ВПЧ, но также сочетание нескольких генотипов, пагубное действие которых для клеток эпителия усиливается при наличии определенной комбинации типов вируса.

Для дальнейшего анализа все женщины в зависимости от клинической формы папил-

ломавирусной инфекции были разделены на две группы: со слабовыраженными проявлениями (латентная форма ВПЧ-инфекции, папилломатоз половых органов, дисплазия шейки матки легкой степени,  $n=34$ ) и с выраженными проявлениями (дисплазии шейки матки средней и тяжелой степеней,  $n=17$ ).

Частота встречаемости высоко- и низкоонкогенных генотипов, определяемых по участку ДНК E1/E2 и по экспрессии онкобелков E6/E7, в зависимости от наличия различных проявлений ВПЧ-инфекции представлена в таблице.

Так, при ПЦР-генотипировании в обеих группах чаще определялся генотип 16 (31,2 и 43,8% случаев соответственно). Но, в отличие от группы 2, где также преобладали ВПЧ 31, 33, 52, 58, в группе 1 на втором месте по частоте встречаемости стояли низкоонкогенные генотипы 6 и 11 (21,4%). При использовании метода детекции экспрессии онкобелков E6/E7 в обеих группах преобладали типы 59 и 45. Однако в группе пациенток с выявленной дисплазией II–III степеней в несколько раз чаще определялись генотипы с высоким онкогенным потенциалом (16, 18, 31, 33, 39, 58), а у пациенток с более легкими проявлениями (группа 1) напротив, – низкоонкогенные 6, 11, 42, 43 типы.

Один генотип вируса папилломы в генитальном тракте методом ПЦР-генотипирования определялся в 50% случаев у пациенток группы 1 и у 43,8% пациенток группы 2. Экспрессия онкогенов E6/E7 одного генотипа встречалась только у одной пациентки (5,9%) группы 2 и у 26,5% женщин группы 1, однако статистически значимых различий выявлено не было ( $p=0,27$ ).

Медиана и интерквартильный размах вирусной нагрузки среди всех обследованных пациенток составил 5,29 (4,45; 6,11) lg г.э. на 100 000 клеток. Уровни вирусной нагрузки пациенток, у которых была верифицирована дисплазия средней и тяжелой степеней, сопоставимы с показателями пациенток с более легкими проявлениями ВПЧ-инфекции (соответственно 5,59 (4,67; 6,11) и 5,21 (4,04; 6,11) lg г.э. на 100 000 клеток ( $p=0,54$ )). Также было выявлено, что при высокой вирусной нагрузке (более 5 lg г.э. на 100 000 клеток) статистически значимо чаще выявлялась экспрессия генотипов 16 и 18 (58,8%) нежели при количестве вируса менее 5 lg г.э. на 100 000 клеток (6,25%,  $\chi^2=4,22$ ,  $p=0,04$ ). Полученные данные показывают, что экспрессия онкобелков E6/E7 и дальнейшее

Генотип	Группа 1		Группа 2	
	ПЦР-генотипирование (n=28)	Экспрессия онкобелков E6/E7 (n=34)	ПЦР-генотипирование (n=16)	Экспрессия онкобелков E6/E7 (n=17)
16	31,2±1,56%	14,7±1,58%	43,8±1,89%	35,3±1,95%
18	7,1±1,82%	5,9±1,66%	6,25±2,42%	17,6±2,2%
31	14,3±1,75%	11,8±1,61%	25±2,17%	29,4±2,04%
33	10,7±1,79%	5,9±1,66%	25±2,17%	17,6±2,2%
35	7,1±1,82%	26,5±1,47%	6,25±2,42%	29,4±2,04%
39	3,6±1,86%	5,9±1,66%	12,5±2,34%	17,6±2,2%
45	7,1±1,82%	38,2±1,35%	12,5±2,34%	47,1±1,76%
51	10,7±1,79%	8,8±1,64%	12,5±2,34%	0
52	0	0	25±2,17%	5,9±2,35%
56	10,7±1,79%	5,9±1,66%	0	0
58	10,7±1,79%	5,9±1,66%	25±2,17%	11,8±2,28%
59	10,7±1,79%	44,1±1,28%	12,5±2,34%	64,7±1,44%
66	3,6±1,86%	5,9±1,66%	0	0
6,11	21,4±1,68%	14,7±1,58%	6,25±2,42%	0
42	Не определялся	14,7±1,58%	Не определялся	5,9±2,35%
43	Не определялся	11,8±1,61%	Не определялся	5,9±2,35%
44	Не определялся	2,9±1,69%	Не определялся	5,9±2,35%
68	Не определялся	2,9±1,69%	Не определялся	0

онкогенное действие ВПЧ происходят в подавляющем большинстве случаев при высокой вирусной нагрузке, что в свою очередь подтверждает диагностическую значимость определения вышеназванного показателя для оценки течения папилломавирусной инфекции.

В 11,8% случаев у женщин группы 1 и в 11,8% случаев у женщин группы 2 ВПЧ 16 и 18 выявлялись только методом генотипирования с определением участков E1/E2, а экспрессия онкогенов E6/E7 данных генотипов не определялась. У двух пациенток (3,9%) с верифицированными дисплазиями средней степени определялась экспрессия E6/E7 генотипов 16 и 18, хотя другим методом вирус этих типов не был выявлен, то есть можно предположить, что он присутствовал только в интегрированной форме. Детекция генотипов 16 и 18 обеими методиками наблюдалась в 32,6% случаев: причем в 2 раза чаще в группе пациенток с дисплазией шейки матки средней и тяжелой степеней, чем в группе с более легкими проявлениями ВПЧ-ассоциированной патологии (соответственно 41,2 и 20,6%).

#### **Заключение**

Учитывая, что экспрессия онкогенов E6/E7 только генотипа 16 составила

21,6%, а генотипов 16 и 18 – 31,4%, более половины женщин имели признаки интегративной формы других как высоко-, так и низкоонкогенных генотипов, которые также могут являться причиной развития ВПЧ-ассоциированной патологии. Этот факт подтверждает целесообразность определения данного показателя широкого спектра генотипов, однако для выявления значимости каждого генотипа в процессе как злокачественной трансформации, так и развития папиллом, необходимо дальнейшее изучение вопроса. Детекция более чем одного генотипа ВПЧ в подавляющем большинстве случаев может дать подтверждение предположению о том, что для развития патологического процесса необходимо одновременное присутствие сразу нескольких онкогенных генотипов.

Согласно результатам проведенного исследования, определение экспрессии онкогенов E6/E7 может стать эффективным вспомогательным методом оценки течения генитальной папилломавирусной инфекции. Он может быть использован при наличии клинических и субклинических проявлений ВПЧ-инфекции и отрицательном результате ПЦР-генотипирования для определения интегративной формы виру-

са. Также возможно его использование при доброкачественных поражениях шейки матки, генитальных папилломатозах и дисплазиях легкой степени (особенно при выявлении нескольких генотипов ВПЧ и высокой вирусной нагрузке) для определения риска прогрессии заболевания. Данная методика будет особенно актуальна у беременных пациенток, у которых перечень методов диагностики и лечения ограничен.

#### **ЛИТЕРАТУРА**

1. Александрова Ю.Н., Лыцев А.А., Сафронникова Н.Р. // *Вопр. онкологии.* – 2000. – Т.6, №2. – С.175–179.
2. Беляковский В.Н., Аль-Яхири О.В., Аль-Яхири А.К. // *Прикл. информ. аспекты медицины.* – 2009. – №12. – С.133–141.
3. Бестаева Н.В., Назарова Н.М., Прилепская В.Н. и др. // *Гинекология.* – 2013. – №3. – С.4–7.
4. Вергейчик Г.И., Стрибук Ж.А., Еремин В.Ф. и др. // *Мед. новости.* – 2010. – №11. – С.69–75.
5. Прилепская В.Н., Коган Е.А., Трофимов Д.Ю. // *Акушерство и гинекология.* – 2013. – №9. – С.90–96.
6. Рекомендации по диагностике и лечению папилломавирусных инфекций женского генитального тракта. Официальная публикация Европейского Общества по инфекционным заболеваниям в акушерстве и гинекологии // *Eur. J. Inr. Immunol. Dis. Obstet. Gyn.* – 2001. – Vol.4, iss.5, suppl.21.
7. Bernard H.U., Calleja-Macias I.E., Dunn S.T. // *Int. J. Cancer.* – 2006. – Vol.118, iss.5. – P.1071–1076.
8. Paesi S., Pretto E.S., Barea Fet al. // *J. Med. Virol.* – 2009. – Vol. 81. – P.1270–1275.
9. Villa L.L., Costa R.L., Petta C.A. et al. // *Lancet Oncol.* – 2005. – Vol.6. – P.271–278.

Поступила 01.10.2014 г.