

Степичик Г.И.¹, Ерёмин В.Ф.²

¹Гомельский государственный медицинский университет, Гомель, Беларусь

²Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь

Эпидемиологические, молекулярные и филогенетические особенности генитальной папилломавирусной инфекции в Республике Беларусь

Введение

Вирус папилломы человека (HPV) признан основным этиологическим фактором рака шейки матки (РШМ) у женщин. Цервикальный рак является актуальной проблемой в современной онкологии и занимает второе место среди злокачественных новообразований женских половых органов. Изучение молекулярной эпидемиологии HPV-инфекции позволяет определить доминирующие генотипы HPV высокого онкогенного риска (HPV-HR), ответственные за развитие плоскоклеточного рака и рака шейки матки, генотипы, которые циркулируют среди здоровых носителей, а также миграцию вирусов на территории страны. Поэтому без широкого внедрения молекулярно-генетических методов в практическое здравоохранение профилактические мероприятия по предотвращению распространения генитальной HPV-инфекции недостаточно эффективны.

Цель исследования

Определить молекулярные и эпидемиологические особенности генитальной HPV-инфекции у женщин, проживающих в Республике Беларусь.

Материалы и методы

В исследование включены 1035 образцов эпителиальных соскобов шейки матки от пациенток с различной патологией шейки матки, среди них 299 образцов от пациенток с преинвазивным и инвазивным раком шейки матки. Для секвенса отобраны 35 образцов, содержащих ДНК HPV-16 типа.

Пары праймеров к L1 гену HPV-16, L1 L: ttgcctcctgtcccagatc; L1 R: aatggctgaccacgacctac синтезировали на автоматическом синтезаторе «Expedite™ 8900 Nucleic Acid Synthesis System», PerSeptive Biosystems, США. Секвенирование HPV 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. Для филогенетического анализа полученных фрагментов и построения деревьев использовали программу MEGA 4.1.

Результаты

Очевидно, что для длительной персистенции HPV 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. Таким образом, для реализации HPV-инфекции благоприятным фоном являются доброкачественные патологические процессы на шейке матки, которые приводят к появлению таких микроповреждений, как цервицит, истинные эрозии, эктопия призматического эпителия различного генеза. Наиболее высокая частота встречаемости латентной формы HPV-инфекции у пациенток с доброкачественными патологическими процессами шейки матки отмечается в возрастных группах 20–24 года – 65,55%, 25–29 лет – 65,94%, 30–34 года – 62,29%, с тенденцией к снижению инфицированности среди женщин старше 35 лет. В то время как пик заболеваемости CIN3 в нашем исследовании отмечается в возрастной группе 30–34 года – 29,19%, высокие показатели сохраняются среди женщин 35–44 лет – 28,91% (табл. 1). Пик заболеваемости раком шейки матки, согласно данным Белорусского республиканского канцер-регистра, выявлен в возрастных группах 40–44 лет – 33,3% и в 50–54 года – 33,0%.

Таблица 1

Различные формы генитальной HPV-инфекции в разных возрастных группах

Возраст	Инфицированность HPV, при доброкачественной патологии шейки матки, %	CIN3 + in situ, %	Заболеваемость раком шейки матки (Белорусский республиканский канцер-регистр, 2011), %
15–19 лет	47,05 ± 1,76	0	0
20–24 года	65,55 ± 0,43	12,73 ± 0,52	1,9
25–29 лет	65,94 ± 0,49	19,06 ± 0,56	8,1
30–34 года	62,29 ± 0,78	29,19 ± 0,71	15,1
35–39 лет	56,09 ± 1,03	28,91 ± 0,92	26,5
40–44 года	40,62 ± 1,36	22,41 ± 1,15	33,3
45–49 лет	43,75 ± 1,87	27,27 ± 1,48	27,9
50–54 года	50,0 ± 2,88	38,88 ± 1,84	33,0

Среди 492 пациенток с преинвазивным и инвазивным цервикальным раком в 94,2% случаях выявлена ДНК онкогенных папилломавирусов, в 5,8% случаях ДНК исследуемых генотипов HPV 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 рака шейки матки с HPV-16, 31, 33, 35 и 18 типов, что встречается достоверно чаще ($P = 1,24 \times 10^{-12}$, $P = 0,007$, $P = 0,004$, $P = 0,004$, $P = 0,02$ соответственно), чем бессимптомное вирусоносительство этих генотипов у женщин с фоновыми состояниями и клинически здоровых женщин и указывает на высокий канцерогенный потенциал выше перечисленных генотипов.

Частота встречаемости HPV-16, 18 типов, против которых направлены вакцины первой генерации, суммарно составляют 58,42% у пациенток, страдающих раком шейки матки. 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.

HPV-16 типа является доминирующим генотипом, ответственным за развитие рака шейки матки, 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 HPV 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 HPV 16 и 18 типов.

Как показали результаты проведенного исследования, на территории Беларуси циркулирует в основном европейский и восточно-азиатский тип HPV-16 (европейские и восточно-азиатские субтипы HPV-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 HPV людей. При анализе фрагментов ДНК HPV-16, полученных из Гомельской области, было выявлено, что большинство образцов также относится к европейским и азиатским вариантам HPV-16, средние r -дистанции между образцами равнялись 0,000, а с африканскими – 0,013–0,017.

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

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

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

Обсуждение

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 HPV-генотипов, их канцерогенного потенциала, а также оценить целесообразность и потенциальную перспективу вакцинации на популяционном уровне вакцинами первой генерации.

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

Выводы

1. Наиболее высокая частота встречаемости латентной формы HPV-инфекции у пациенток с доброкачественными патологическими процессами на шейке матки от 65,55% до 65,94% случаев отмечается в возрасте 20–34 года с тенденцией к снижению инфицированности сре-

ди женщин старше 35 лет. Пик заболеваемости раком шейки матки, согласно данным Белорусского республиканского канцер-регистра, выявлен в возрасте 45–54 лет – 33,0–33,2%.

2. В 56,7% случаев у женщин, проживающих в Республике Беларусь, рак шейки матки обусловлен HPV-16 типа.
3. На территории Беларуси преобладают восточно-азиатские и европейские субтипы HPV-16, которые можно отнести к единой эволюционной ветви.
4. Нами открыт новый белорусский субтип, который является одним из прародителей HPV-16, циркулирующих на европейском континенте. После секвенирования полного генома этого субтипа HPV-16 он будет внесен в Международную базу данных – GenBank.

Resume

Viarheichyk H.I.¹, Eremin V.F.²

¹ Gomel State Medical University, Gomel, Belarus

² The Republican Research and Practical Center for Epidemiology and Microbiology, Minsk, Belarus

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 Byelorussian subtype, which is one of the HPV-16 progenitors, circulating on the European continent.

Key words: HPV-infection, molecular epidemiology.
