

УДК578.233.42

Е.В. МАШКИНА, К.А. КОВАЛЕНКО, К.Н. САРАЕВ, О.В. ЛЫСЕНКО, Т.П. ШКУРАТ**ГЕНОДИА ГНОСТИКА ПАПИЛЛОМАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ У ЖИТЕЛЕЙ
РОСТОВСКОЙ ОБЛАСТИ****Реферат**

Проанализирована частота выявления типов вируса папилломы человека высокого канцерогенного риска среди жителей Ростовской области. Частота ВПЧ-положительных проб составила 40 %. Частота обнаружения папилломавируса наибольшая среди молодых лиц до 20 лет. 28 % ВПЧ-положительных лиц (вне зависимости от возраста) имеют повышенную концентрацию вируса, что связано с высоким риском развития злокачественного процесса. 26,4 % лиц в популяции Ростовской области являются носителями более чем одного типа вируса папилломы человека высокого канцерогенного риска. Самым частым сочетанием является одновременное носительство типов вируса из А7 и А9 филогенетических групп.

Вирус папилломы человека относится к семейству паповавирусов (Papovaviridae), группе Papillomavirus (HPV). Вирус папилломы человека (ВПЧ) является чисто эпителиотропным вирусом. В настоящее время выделено более 130 различных генотипов вируса, среди которых почти 30 были обнаружены в кондиломатозных, предраковых и раковых поражениях вульвы, влагалища и шейки матки [5]. По данным Международного агентства по изучению рака ВОЗ, рак шейки матки (РШМ) -одно из наиболее распространенных онкологических заболеваний, занимающее второе место по частоте встречаемости среди женщин во всем мире, уступая только раку молочной железы. Доказана безусловная роль папилломавирусов в развитии РШМ и других злокачественных новообразований урогенитального тракта [4].

Одним из первых и основных методов диагностики предраковых поражений шейки матки стал цитологический анализ мазка эпителиальных клеток. Однако международное агентство по изучению рака ВОЗ рекомендует включать в программы популяционного скрининга молекулярные тесты для выявления вируса папилломы человека.

Целью данной работы было изучение частоты регистрации вируса папилломы человека среди жителей Ростовской области в зависимости от возраста, а также генотипирование папилломавирусов высокого канцерогенного риска.

Материал и методы

Материалом для исследования послужили образцы ДНК, полученные из эпителиальных клеток урогенитального тракта женщин и мужчин. Всего было исследовано 5655 образцов ДНК лиц, проходивших скрининговое обследование в клинико-диагностической лаборатории «Наука» на базе НИИ биологии ЮФУ в период с 2007 по март 2009 г.

Для выделения ДНК из соскоба эпителиальных клеток использовали набор реагентов «ДНК-сорб-АМ» (производства АмплиСенс, Россия).

С целью выявления ВПЧ 11 онкогенно опасных типов (16,18,31,33,35,39,45,52,58,59 и 67 типы) применяли тест-систему «АмплиСенс ВПЧ ВКР скрин». Метод основан на одновременной амплификации (мультиплекс-ПЦР) участков ДНК ВПЧ и участка р-глобинового гена, используемого в качестве эндогенного внутреннего контроля.

Количественный анализ онкогенно опасных типов ВПЧ осуществляли с помощью тест-системы «АмплиСенс ВПЧ ВКР скрин-титр-FL». Количественное определение ДНК ВПЧ основано на существовании линейной зависимости между циклом начала увеличения флуоресценции образца и исходной концентрацией ДНК-мишени.

Для выявления и определения генотипа ВПЧ использовали тест-систему «АмплиСенс ВПЧ ВКР генотип FRT», которая позволяет дифференцировать ДНК вируса папилломы человека высокого канцерогенного риска (16,18,31,33,35,39,45,51, 52,56,58 и 59 типы).

При статистическом анализе полученных данных для оценки достоверности различий использовали Т-критерий Стьюдента.

Результаты и их обсуждение

Эпидемиологически выделяют «кожные», тройные к ороговевающему эпителию типы (в основном роды β и γ) и слизистые или аногенитальные (тройные к слизистым оболочкам) типы вируса (род α). С поражением урогенитального тракта исследователи ассоциируют 35 типов ВПЧ. По мере изучения ВПЧ выяснилось, что риск злокачественного перерождения связан с несколькими типами вируса (16,18,31,33,35,39,45,51,52, 54, 56, 58, 59, 66, 68), которые обозначены как типы высокого онкогенного риска [10].

В настоящее время известно, что папиллома-вирусная инфекция передается преимущественно половым (с инфицированием сексуальных партнеров в 60 %) [12] и контактно-бытовым путем, а также при проведении медицинских исследований, при прохождении плода через инфицированные родовые пути (с этим путем передачи связывают ювенильный папилломатоз гортани и рецидивирующий респираторный папилломатоз с кистозом легких у детей) [13]. Попадая в организм, папилло-мавирусная инфекция (ПВИ) не всегда приводит к развитию заболевания. Это происходит лишь при наличии предрасполагающих факторов, к которым относятся высокая сексуальная активность (раннее начало половой жизни, большое количество партнеров, частые половые контакты); наличие партнеров, имевших в анамнезе аногенитальные бородавки или инфицированных вирусами папилломы человека; другие заболевания, передаваемые половым путем; молодой возраст; курение; алкоголь; беременность; эндометриоз; авитаминоз и др. При этом развитие вирусной инфекции может происходить на фоне нормально функционирующей иммунной системы [14].

По данным литературы, инфицированность населения России и мира вирусом папилломы человека в целом составляет от 40 до 80 % [12]. Однако инфицированность аногенитальными типами ВПЧ составляет 10-20 %, в Москве - 16 %, в Нижнем Новгороде - 33,4% [2, 11].

За период с января 2007 по март 2009 г. было проведено обследование 5655 образцов ДНК жителей Ростова-на-Дону и Ростовской области на наличие вируса папилломы человека. Частота ВПЧ-положительных проб среди жителей Ростовской области составила 40,0 %. В нашем исследовании мы анализировали тропные к слизистым оболочкам урогенитального тракта типы вируса. Следовательно, частота обнаружения ВПЧ рода α в Ростовской области в 2 раза выше, чем в Москве и ряде других городов России.

Частота ВПЧ-положительных образцов в зависимости от возраста представлена в табл. 1. В Ростовской области максимальная заболеваемость, обусловленная ВПЧ, наблюдается у лиц до 20 лет. В этой возрастной группе более половины лиц являются носителями вируса папилломы человека. Наши данные соответствуют данным литературы, согласно которым пик выявления ВПЧ приходится на возрастные группы до 29 лет [3, 11], у которых отмечается наибольшая сексуальная активность и смена половых партнеров. Среди населения США 44,8 % инфицированных папилломавирусом - это лица в возрасте от 20 до 24 лет [14].

Таблица 1

Частота обнаружения вируса папилломы человека в зависимости от возраста

Частота регистрации положительных проб, %	До 20 лет	20-30 лет	31-40 лет	Старше 40 лет
	55,3±2,95	44,7±0,84***	29,9±1,31***	27,4±1,75***

Примечание. *** - достоверные отличия по сравнению с первой возрастной группой при $P < 0,001$.

Папилломавирусная инфекция поражает как женщин, так и мужчин, однако из-за гормональных различий вероятность развития опухолей у мужчин гораздо ниже, чем у женщин. Тем не менее мужчины в течение длительного времени могут быть носителями ВПЧ и передать вирус женщинам. В нашей выборке 99 % приходится на женщин, мужчины гораздо реже проходят обследование на инфекции, передаваемые половым путем, поэтому мы не смогли провести анализ инфицированности вирусом папилломы человека в зависимости от пола.

Многочисленные исследования указывают на возможность спонтанной регрессии папилломавирусной инфекции, т.е. на самопроизвольное выздоровление. В 85 % случаев через год после инфицирования ВПЧ исчезает из организма благодаря функционированию иммунной системы [17].

Как видно из данных табл. 1, в популяции Ростовской области в более старших возрастных группах доля ВПЧ-положительных лиц неуклонно уменьшается. Но, с другой стороны, около трети обследованных лиц старше 30 лет являются носителями вируса папилломы человека. По современным данным, факторами риска развития цервикальной неоплазии и РШМ являются длительность персистенции вируса, генотип ВПЧ, возраст женщины, уровень эстрогенов и состояние иммунной системы. Женщины, у которых длительно персистирует ВПЧ в шейке матки, по сравнению с теми, у которых нет этого вируса, имеют высокий риск (примерно 65-кратный) развития РШМ.

Самыми опасными типами ВПЧ являются 16 и 18 типы. Одновременное инфицирование данными типами ВПЧ обуславливает 70 % случаев цервикального рака [12]. Частота выявления 16 и 18 типов вируса в популяции Ростовской области представлена в табл. 2. Как видно из данных таблицы, частота выявления вируса папилломы человека 16 и 18 типов среди лиц младше 20 лет составляет около 15 %, однако с возрастом также снижается. Среди лиц старше 30 лет частота выявления самых опасных типов ВПЧ достоверно ниже по сравнению с более молодыми возрастными группами.

Однако в старших группах в силу возрастных изменений иммунитета и гормональных функций организма, которые благоприятствуют многим факторам канцерогенеза, возможны проявления папилломавирусной инфекции и клеточная трансформация ракового характера особенно при носительстве типов вируса высокого канцерогенного риска. От заражения ВПЧ до развития предрака и рака шейки матки в среднем проходит 20 лет [6]. Более высокий риск (130-кратный) отмечается у женщин старше 30 лет, инфицированных типами ВПЧ высокого онкогенного риска, включая в первую очередь типы 16 и 18 [12].

Таблица 2

Частота обнаружения вируса папилломы человека 16 и/или 18 типов в зависимости от возраста

Частота регистрации положительных проб, %	До 20 лет	20-30 лет	31-40 лет	Старше 40 лет
	14,8±2,01	12,5±0,52	7,9±0,73**	5,4±0,77***

Примечание. ** -достоверные отличия по сравнению с первой возрастной группой при $P < 0,01\%$; *** -достоверные отличия по сравнению с первой возрастной группой при $P < 0,001$.

Согласно недавним исследованиям, папилломавирусная инфекция обладает дозозависимым эффектом - при высокой концентрации ДНК ВПЧ в материале риск развития неоплазии и опухоли более высокий [1]. В связи с этим важное значение для прогноза течения ВПЧ-инфекции имеет определение вирусной нагрузки. Выявление вируса в количестве ниже определенного порогового уровня имеет низкое клиническое значение, так как говорит о высокой вероятности спонтанного излечения и практически полном отсутствии риска прогрессии. Напротив, для послеоперационного мониторинга выявление вируса даже с низкой нагрузкой может быть ранним маркером рецидива,

поэтому введение порога в этом случае не оправдано. Пороговый уровень клинически значимого количества вируса составляет 103 геномных эквивалента ВПЧ, приходящихся на 105 клеток [6, 8]. При первичном количественном анализе вируса папилломы человека выделяют три варианта ответа (табл. 3).

Результаты определения вирусной нагрузки среди ВПЧ-положительных проб жителей Ростовской области представлены в табл. 4. Около трети ВПЧ-положительных лиц имеют незначительную вирусную нагрузку, что указывает на благоприятное развитие событий - высока вероятность спонтанного исчезновения вируса папилломы человека. Более 40 % обследованных лиц имеют вирус папилломы человека в «средней» концентрации, при которой возможна дисплазия клеток.

В 28 % случаев наблюдается повышенная концентрация вируса, что связано с высоким риском развития злокачественного процесса. Данный показатель практически в два раза превосходит данные по Москве (11 %) [11].

Таблица 3

**Интерпретация количественного результата определения
вируса папилломы человека [6, 8]**

Результат (lg ВПЧ на 100 тыс. клеток)	Трактовка
Менее 3	Клинически малозначима. В 80 % случаев инфекция проходит самостоятельно
3-5	Клинически значимая, нельзя исключить дисплазию
Более 5	Ассоциирована с большей вероятностью наличия или прогрессии злокачественных новообразований

Таблица 4

**Количественный уровень вируса папилломы человека среди обследованных лиц из
Ростовской области**

Показатель	Содержание ВПЧ (lg ВПЧ на 100 тыс. клеток)		
	Менее 3 lg	От 3 до 5 lg	Более 5 lg
Относительная частота регистрации, %	28,8	42,8	28,4
Средний уровень lg (ВПЧ на 100 тыс. клеток)	2,09	4,07	6,14

Среди лиц с высоким уровнем вируса папилломы человека (более 5 lg ВПЧ на 100 тыс. клеток) более 70 % являются молодыми людьми в возрасте до 30 лет (табл. 5). Данная группа лиц требует пристального внимания врачей, поскольку уровень ВПЧ высокого канцерогенного риска указывает на высокую вероятность злокачественной трансформации клеток.

Таблица 5

**Распределение лиц с высокой вирусной нагрузкой вируса папилломы человека в
зависимости от возраста**

Возраст	До 20 лет	20-30 лет	31-40 лет	Старше 40 лет
Относительная частота регистрации, %	18,6±5,06	57,6±6,43***	11,9±4,21	11,9±4,21

Примечание. *** - достоверные отличия по сравнению с другими возрастными группами при P<0,001

Однако риск злокачественных новообразований, вероятно, выше у 23 % лиц старше 30 лет. Поскольку скорее всего в данном случае вирус длительное время персистирует в организме, более того, высокая вирусная нагрузка указывает на активное размножение вируса.

По последним литературным данным, более полная информация о прогнозе течения заболевания может быть получена при одновременном количественном определении ВПЧ высокого канцерогенного риска и определении уровня экспрессии онкогенов ВПЧ E6/E7 [10].

При интеграции в геном клетки вирус папилломы человека способен утрачивать практически все гены (в том числе и те, которые являются мишенью для ПЦР), за исключением онкогенов E6 и E7. Известно, что при переходе инфекционного состояния из стадии легкой дисплазии в стадию тяжелой

дисплазии происходит деструкция гена супрессора E2, который сдерживает экспрессию онкогенов E6/E7. Как только происходит разрыв E2, начинается активная наработка E6/E7, главным последствием чего является функциональная инактивация белков-регуляторов p53 и pRb [15,16].

Дополнительные возможности определения прогноза течения заболевания может дать проведение генотипирования ВПЧ. Традиционное для России выявление всего двух высокоонкогенных типов ВПЧ (16 и 18) не обладает достаточно высокой диагностической чувствительностью, поскольку позволяет выявлять не более 72 % случаев рака шейки матки [9]. Более актуальным и информативным является одновременный анализ широкого спектра типов ВПЧ высокого канцерогенного риска.

Выявление нескольких генотипов вируса ассоциировано с менее благоприятным прогнозом течения заболевания и более высоким риском персистенции. Проведение генотипирования позволяет отличить реинфицирование от персистентной инфекции. О реинфицировании говорит изменение спектра генотипов, о персистентной инфекции - сохранение генотипа вируса через год после первого тестирования, повторное инфицирование тем же генотипом вируса после самостоятельного излечения практически невозможно.

На следующем этапе работы была проанализирована частота встречаемости 12 различных типов ВПЧ высокого канцерогенного риска. Генотипирование ВПЧ было выполнено для 201 человека. Частота распределения типов папилломавируса представлена на рис. 1. Чаще всего встречаются 16,51 и 31 типы ВПЧ. В популяции Ростовской области реже всего регистрируют 18, 58 и 59 типы вируса папилломы человека. Наши данные соответствуют данным литературы о доминировании 16,33,31 генотипов ВПЧ [2]. 16 тип вируса папилломы человека чаще всего встречается и в других популяциях России. Так, при генотипическом анализе популяции Сибири выявлено, что первое место по частоте встречаемости занимает ВПЧ 16 типа (36%) [9].

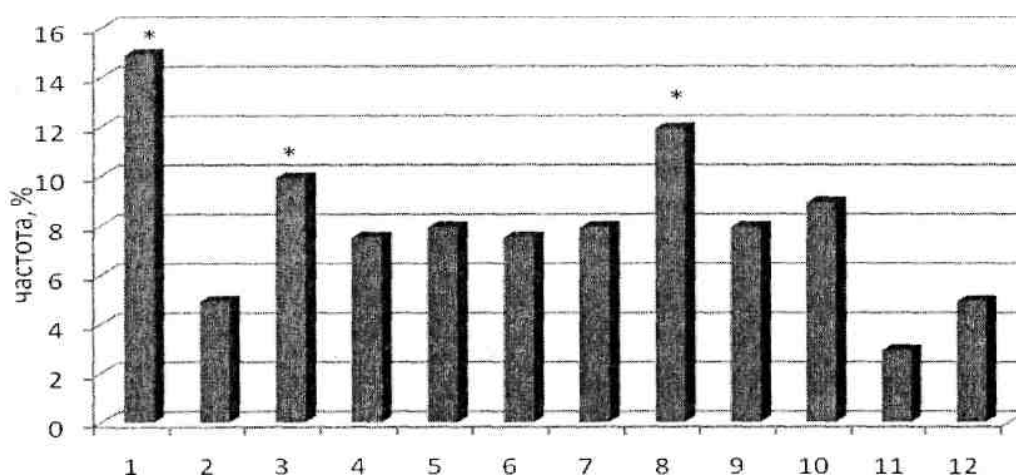


Рис. 1. Относительная частота регистрации типов вируса папилломы человека высокого канцерогенного риска

(1 - 16 тип, 2- 18 тип, 3-31 тип, 4-33 тип, 5-35 тип, 6-39 тип, 7-45 тип, 8-51 тип, 9-52 тип, 10-56 тип, 11-58 тип, 12-59 тип).

Примечание. * - достоверное отличие по сравнению с другими типами ВПЧ при $P < 0,05$

Поведение различных генотипов ВПЧ в организме женщины неодинаково: 16 тип является максимально агрессивным и при инфицировании этим типом вероятность персистенции выше, тогда как для 51 типа наблюдается высокая вероятность элиминации в течение года [7].

26,4 % лиц в популяции Ростовской области являются носителями более чем одного типа вируса папилломы человека высокого канцерогенного риска, что увеличивает риск дисплазии. Мы разделили 12 анализируемых типов ВПЧ на 3 филогенетические группы - А7 (18, 39,45 и 59 типы), А9 (16, 31,33,35,52 и 58 типы) и А5,6 (51 и 56 типы ВПЧ). В 3,8 % случаев у человека выявляются несколько типов ВПЧ филогенетической группы А7 (рис. 2) -чаще всего сочетание 18 и 39 типов вируса. Одновременное присутствие в клетках человека вируса А7 и А5,6 филогенетических групп обнаружено в 11,3 % случаев. 13,2 % лиц являются носителями типов вируса из А9 филогенетической группы - чаще всего одновременно обнаруживают 31,33 и 35 типы ВПЧ.

Однако в 30 % случаев одновременно выявляют типы вируса из А7 и А9 филогенетических

групп. Это сочетание 16 и 18 типов, 16, 33 и 39 типов и другие. 26,4 % лиц являются носителями А9 и А5, 6 типов ВПЧ (рис. 2). И в 15 % случаев у одного человека выявляются типы ВПЧ из всех трех филогенетических групп.

Среди лиц, инфицированных несколькими типами вируса папилломы человека почти 68 % приходится на молодых людей в возрасте от 20 до 30 лет (рис. 3). Данная возрастная группа характеризуется высокой сексуальной активностью, возможно частой сменой половых партнеров, что способствует заражению ВПЧ. Доля лиц со смешанным инфицированием ВПЧ в возрасте от 30 до 40 лет составляет всего 11 %. Около 6 % приходится на возрастную группу старше 40 лет.

Однако лица старше 30 лет и инфицированные несколькими типами вируса папилломы человека высокого онкогенного риска имеют высокую вероятность развития злокачественных новообразований и требуют пристального внимания со стороны врачей.

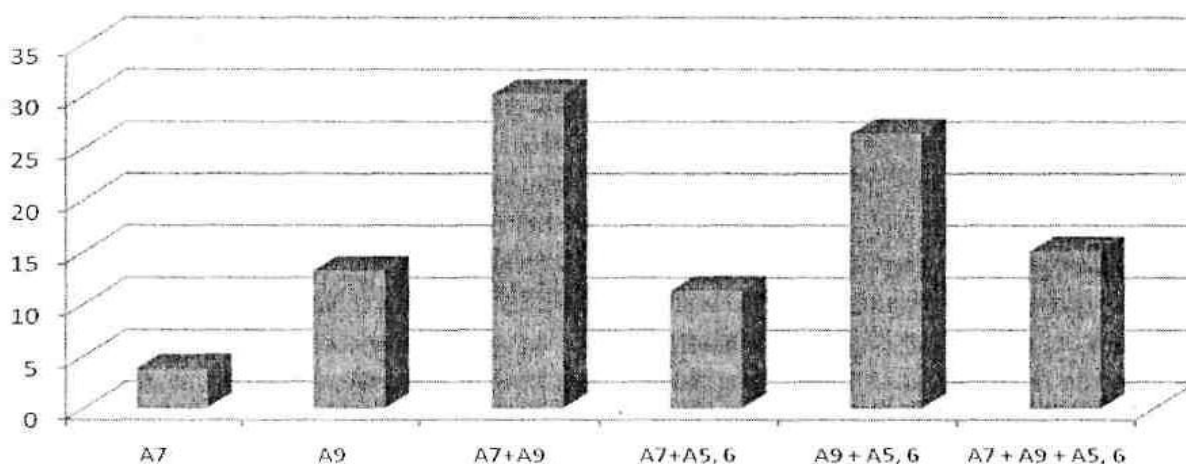


Рис. 2. Распределение типов вируса папилломы человека по филогенетическим группам при сочетании инфицирования

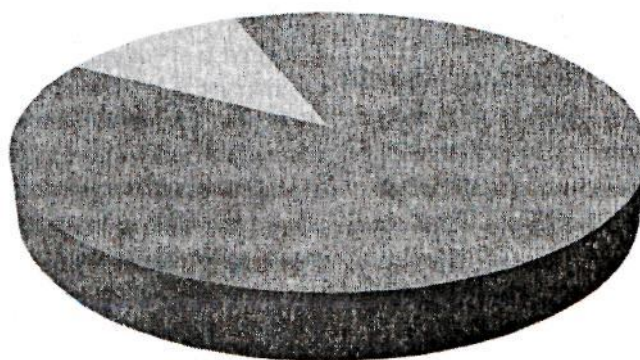


Рис. 3. Относительная частота, % распределения лиц со смешанным инфицированием вирусом папилломы человека в зависимости от возраста

Abstract

The frequency of human papilloma virus of high cancer risk among inhabitants of the Rostov region is analysed in work. Frequency of HPV-positive tests among inhabitants of the Rostov region was 40 %. Frequency of HPV detection was the greatest among young faces till 20 years. The high concentration of a virus was determined for 28 % of HPV-positive persons (without dependence from age). It is connected with high, risk of development of malignant process. 26,4 % of persons in Rostov population have more than one type of a HPV of high cancerogen risk. The most frequent combination are types of a virus from A7 and A9 phylogenetic groups.

Литература

1. *Башмакова М.А., Савичева А.М.* Папиллома-вирусная инфекция. Н.Новгород; М., 2002. 20 с.
2. Выявление ВПЧ высокого канцерогенного риска у женщин репродуктивного возраста / В. Мазепа [и др.] // Молекулярная диагностика, 2007. Т. 3. С. 133-134.
3. Генодиагностика папилломавирусной инфекции при патологии шейки матки у женщин Приморского края / С. Ващенко [и др.] // Молекулярная диагностика, 2007. Т. 3. С. 77-81.
4. *Цвойрин В.В., Аксель М.Е., Трапезников Н.Н.* Статистика злокачественных новообразований в России и некоторых странах СНГ в 1990-1994 гг. М., 1995.
5. *Цубинский В.В.* Урогенитальная папилломавирусная инфекция // Российский журн. кожных и венерических болезней 2000. № 5. С. 50-55.
6. *Кувда Д., Шипулина О.* ВПЧ-тестирование: алгоритмы диагностики и требования к молекулярным тестам для выявления вирусов папилломы человека // Молекулярная диагностика. 2007. Т. 3. С. 108-119.
7. *Насонова В., Кувда Д., Новоселова А.* Течение ВПЧ-инфекции у женщин с признаками цервикальной патологии // Там же. 2007. С. 141-145.
8. *Насонова В., Кувда Д., Шипулина О.* Разработка тест-системы для скринингового выявления 11 генотипов ВПЧ высокого канцерогенного риска в формате клинически значимого количества, основанной на ПЦР с детекцией флуоресцентного сигнала по конечной точке // Там же. С. 135-140.
9. *Никитина Е.Г., Видяева И.Г., Асадчикова О.Н.* Выявление вирусов папилломы человека высокого канцерогенного риска методом ПЦР при различных патологиях шейки матки // Сибирский онкол. журн. 2008. № 1. С. 97-99.
10. Повышенная экспрессия онкогенов ВПЧ как маркер существования или развития тяжелой цервикальной патологии и рака шейки матки / О. Трофимова [и др.] // Молекулярная диагностика. 2007. Т. 3. С. 151-154.
11. Результаты апробации ВПЧ-тестирования в программе цервикального скрининга в Москве / Д. Кувда [и др.] // Там же. С. 127-129.
12. *Monk B., Tewari K.* The spectrum and clinical sequelae of human papillomavirus infection // Gynecol. Oncol., 2007. Vol. 107. S. 6-13.
13. *Sinal S., Wood C.* Human papillomavirus infections of the genital and respiratory tracts in young children // Semin Pediatr Infect Dis., 2005. Vol. 16. P. 306-316.
14. *Steben M., Duarte-Franco E.* Human papillomavirus infection: epidemiology and pathophysiology // Gynecol Oncol. 2007. Vol. 107. S. 2-5.
15. *Thierry E.* E2F-Rb complexes assemble and inhibit cdc25 A transcription in cervical carcinoma cells following repression of human papillomavirus oncogene expression // Mol. Cell. Biol. 2000. Vol. 20. P. 1059-1067.
16. *Thierry F.* Transcriptional regulation of the papillomavirus oncogenes by cellular and viral transcription factors in cervical carcinoma // Virology. 2009. Vol. 384. P. 375-379.
17. *Widdice L., Moscicki A.* Updated guidelines for Papanicolaou tests, colposcopy, and human papillomavirus testing in adolescents // J. Adolesc. Health. 2008. Vol. 43. P. 41-51.

Научно-исследовательский институт биологии
Южный федеральный университет,
Клинико-диагностическая лаборатория «Наука»

Статья поступила в редакцию 06.08.09