

**Инна Геннадьевна Видяева¹, Людмила Николаевна Уразова¹,
Любовь Филипповна Писарева¹, Салангы Кадыроловна Ховалык²,
Ольга Юрьевна Шипулина³, Дмитрий Александрович Кувейда³**

ЧАСТОТА ВЫЯВЛЕНИЯ ВИРУСА ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА ВЫСОКОГО ОНКОГЕННОГО РИСКА У ЖЕНЩИН РЕПРОДУКТИВНОГО ВОЗРАСТА РЕСПУБЛИКИ ТЫВА

¹ГУ НИИ онкологии ТНЦ СО РАМН

634009, Томск, пер. Кооперативный, 5

²Республиканский онкологический диспансер республики Тыва

667003, Кызыл. Ул. Оюна Курседа, 162;

³ФГУН «Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора», Москва

111123, Москва, ул. Новогиреевская, д.3а

В исследование были включены 90 пациенток Республиканского онкологического диспансера Республики Тыва, которые являются коренными жительницами этого региона (средний возраст $45 \pm 1,4$ лет). Общая инфицированность вирусом папилломы человека (ВПЧ) составляет $74,4 \pm 4,6$ %. В группе здоровых женщин ДНК ВПЧ выявлена в 47 % случаев, в группах с фоновыми патологиями шейки матки и у больных раком шейки матки (РШМ) I-IV стадии - в 82 и 91 % случаев соответственно. Показано, что среди ВПЧ(+) женщин преобладает преимущественно ВПЧ 16-го типа (81 %) и ВПЧ 18-го типа (7,5 %). Другие типы вируса папилломы (ВПЧ 35, 45, 52, 56) встречаются лишь в единичных случаях (1,5 %). При исследовании вирусной нагрузки среди ВПЧ(+) лиц повышенная и значимая вирусные нагрузки (51 и 39 % соответственно) наблюдаются в группе больных РШМ. В сумме 90,3 % больных РШМ имеют высокие концентрации ВПЧ. В группе здоровых женщин и с фоновыми патологиями ВПЧ присутствует в основном в малозначимых концентрациях.

Ключевые слова: рак шейки матки, вирус папилломы человека, эпидемиология

В настоящее время вирусная природа ряда злокачественных новообразований человека не вызывает сомнений. Роль вируса папилломы человека в возникновении рака шейки матки (РШМ) общепризнанна, что отражено в пресс-релизе Всемирной организации здравоохранения 2006 г. [1]. Стандартизированный показатель заболеваемости и смертности от РШМ в мире составляет 16,2 и 9,0 на 100 тыс. населения соответственно [2]. Однако средний показатель не отражает значительную вариабельность эпидемиологических данных по разным регионам, которая может быть объяснена географическими и этническими различиями в распространенности высокоонкогенных серотипов ВПЧ, непосредственно связанных с развитием РШМ. Во всем мире можно выделить 15

наиболее часто отмечаемых высокоонкогенных типов ВПЧ: 16, 18, 45, 31, 33, 52, 58, 35, 59, 56, 39, 51, 73, 68 и 66 [3]. В России по частоте встречаемости лидирует ВПЧ 16-го типа, однако эти данные касаются европейской и центральной части России [4]. Неизвестна степень распространенности ВПЧ в регионах Сибири и Дальнего Востока, хотя именно эти сведения крайне важны для организации целевых мероприятий по ранней диагностике папилломавирусная инфекция (ПВИ), профилактике ее персистенции, формированию групп риска, и, следовательно, для реализации потенциальной возможности снижения риска развития очаговых диспластических и злокачественных трансформаций эпителия урогенитального тракта [4]. В настоящее время во всем мире основным подходом

Видяева И. Г. к.м.н., н. с. лаборатории онковирусологии, virology@oncology.tomsk.ru

Уразова Л. Н. д.б.н., зав. лабораторией онковирусологии, url@oncology.tomsk.ru

Писарева Л. Ф. проф., д.м.н., зав. лабораторией эпидемиологии, PisarevaLF@oncology.tomsk.ru

Ховалык С. К. - врач радиолог, fedemarina@yandex.ru

Шипулина О. Ю. рук. лаборатории молекулярных методов, Olga.Shipulina@pcr.ru

Кувейда Д. А. н. с. лаборатории молекулярных методов, Dmitri.Kuevda@pcr.ru

для предотвращения РШМ является тактика раннего скрининга, которая включает не только цитологическое и кольпоскопическое обследование, но и тест на ДНК ВПЧ, что позволяет повысить чувствительность и специфичность ранней диагностики рака шейки матки до 99-100 % [5, 6]. Современные тесты на ДНК ВПЧ позволяют определять не только типы, но и концентрацию наиболее распространенных при РШМ вирусов папилломы, что необходимо как для прогнозирования возможности развития злокачественной трансформации, так и для мониторинга инфекции. В последние годы большое внимание уделяется возможности определения концентраций ВПЧ, так как в некоторых исследованиях была показана взаимосвязь между увеличением вирусной нагрузки и риском развития дисплазий и рака шейки матки [7, 8].

Помимо методов раннего скрининга для предупреждения развития РШМ разрабатываются методы вакцинации против ВПЧ. В настоящее время создана и успешно апробируется вакцина «Гардасил», американской компании «Мерк» (Merck & Co., Inc.) против 16, 18, 6, 11-го типов вируса папилломы человека [6, 9]. Учитывая то, что распространенность различных типов ВПЧ может иметь географический характер, необходимо точно знать какие типы вирусов присутствуют в том или ином регионе, поскольку данная вакцина не обеспечивает защиту от других типов ВПЧ, для которых доказана ассоциация с РШМ (45, 31, 33, 52, 58, 35, 59, 56, 39, 51, 73, 68 и 66). Кроме того, вакцина «Гардасил» не обеспечивает защиту для той категории людей, которые уже инфицированы ВПЧ, поэтому на данном этапе программа раннего скрининга РШМ является необходимой и оправданной.

Целью настоящей работы является изучение частоты встречаемости ВПЧ высокого канцерогенного риска и определение вирусной нагрузки у больных с патологиями шейки матки различного генеза, а также у здоровых женщин, проживающих на территории Республики Тыва.

Материалы и методы

Исследования соответствовали этическим стандартам биоэтического комитета ГУ НИИ онкологии ТНЦ СО РАМН, разработанным в соответствии с Хельсинской декларацией Всемирной ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками от 2000 г. и Правилами клинической практики в Российской Федерации, утвержденными Приказом Минздрава РФ № 266 от 19.06.2003 г. В исследование были включены пациентки онкологического диспансера Республики Тыва, которые являются коренными жительницами этого региона. Обследовано

90 женщин (средний возраст $45 \pm 2,5$ лет), которые были разделены на три группы: 1) здоровые ($n=34$; средний возраст $43,7 \pm 1,6$); 2) женщины с фоновыми патологиями шейки матки воспалительного генеза ($n=11$; средний возраст $41,6 \pm 4,2$); 3) больные РШМ I-IV стадии ($n=45$; средний возраст $49,8 \pm 1,7$). В группу здоровых вошли женщины, не имеющие визуальных изменений эпителия шейки матки. В группу с фоновыми патологиями шейки матки (ФПШМ) включены пациентки с такими заболеваниями как эктопии, эндоцервициты, кисты, полипы цервикального канала и шейки матки, гиперплазии и деформации шейки матки и др. У женщин с ФПШМ и РШМ I-IV стадии диагноз верифицирован гистологически. Материалом для выделения ДНК и последующей амплификации послужили соскобы эпителия цервикального канала и шейки матки, взятые одноразовыми цитощетками. Забор материала у пациенток проведен до начала первого этапа комбинированного курса лечения (лучевая терапия). Выделение ДНК проводили с использованием коммерческих наборов «ДНК-сорб-В» и «ДНК-сорб-С» (ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва). В качестве метода выявления и количественного определения ДНК ВПЧ использовалась ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени (тест-системы «Амплисенс FRT ВПЧ ВКР скрининг» и «Амплисенс FRT ВПЧ ВКР генотип» (ФГУН «Центральный НИИ эпидемиологии», Москва). В применяемых тест-системах используется принцип группоспецифических олигонуклеотидов, способных амплифицировать фрагменты ДНК нескольких представителей филогенетической группы ВПЧ (табл. 1). Результат рассчитывается в геномных эквивалентах вируса на 10^5 клеток. Порог релевантного количества вируса принимается равным 3 lg ВПЧ на 10^5 клеток. Исследование проводили на четырехканальном амплификаторе «RotorGeen 3000/6000» фирмы «Corbett Research» (Австралия).

Таблица 1

Распределение генотипов ВПЧ относительно филогенетических групп

| Филогенетические группы генитальных ВПЧ | Генотип ВПЧ |
|---|----------------|
| α 9 | 16, 31, 33, 35 |
| α 7 | 18, 45, 39, 59 |
| α 5/6 | 52, 56, 58, 66 |

Анализ данных полученных методом детекции, осуществлялся автоматически, для чего использовалось специальное программное обеспечение в формате Microsoft Excel при обработке и интерпретации результатов для приборов «Rotor Geen 3000». Статистическую обработку данных проводили с использованием точного критерия Фишера, который используется для анализа качественных признаков, при малых объемах выборок ($V < 50$).

Результаты и обсуждение

При исследовании общей инфицированности ВПЧ среди коренного женского населения Республики Тыва показано, что из 90 обследованных женщин ДНК вируса папилломы выявлена у 67 человек, что составляет $74,4 \pm 4,6$ %. В группе здоровых женщин ДНК ВПЧ выявлена почти у половины женщин (47 %). В группе с фоновыми патологиями количество ВПЧ(+) лиц больше и составляет почти 82 %. В группе больных раком шейки матки количество ВПЧ-позитивных лиц составляет 91 % (табл. 2).

При исследовании распределения генотипов вирусов папилломы среди ВПЧ-позитивных женщин показано, что в большинстве случаев (81 %) у коренного женского населения Тывы преобладает ВПЧ 16-го типа, превышая аналогичные показатели по другим регионам России [4, 10, 11]. В 7,5 % случаев выявляется ВПЧ 18-го типа (рис). Другие типы вируса папилломы (ВПЧ 35, 45, 52, 56) отмечены лишь в единичных (1,5 %) случаях.

В табл. 3 представлены результаты исследования вирусной нагрузки среди ВПЧ-позитивных лиц. Повышенная (>5 lg) и значимая (>3 lg) вирусные нагрузки

наблюдаются у 51 и 39 % больных раком шейки матки соответственно. В 9,6 % случаев РШМ вирусная нагрузка малозначима (≤ 2 lg). В группах ВПЧ(+) здоровых женщин и с фоновыми заболеваниями шейки матки только в 12,5 и 11 % случаев соответственно отмечена значимая вирусная нагрузка, в основном наблюдается лишь малозначимое количество вируса.

В табл. 4 показано распределение вирусной нагрузки среди вирус-позитивных больных раком шейки матки. Показано, что частота выявления пациенток с повышенной и значимой вирусной нагрузкой наблюдается у 82,2 % больных РШМ, статистически значимо превышая аналогичный показатель для больных с малозначимой вирусной нагрузкой ($p=0,0004$).

Таблица 2

Общая инфицированность ВПЧ пациенток Республиканского онкодиспансера Республики Тыва

| Группа пациенток | Общее кол-во пациенток | Кол-во ВПЧ(+) |
|--|------------------------|-----------------------------------|
| Здоровые | 34 | 16 (47 ± 8,5 %) $p_1=0,012$ |
| Женщины с фоновыми патологиями шейки матки | 11 | 9 (81,8 ± 11 %) $p_2=0,8$ |
| Больные РШМ I-IV стадии | 45 | 41 (91 ± 4,2 %) $p_3=0,3$ |

Примечание. уровень достоверности различий между группами: p_1 - здоровых и больных РШМ I-IV стадии; p_2 - женщин с ФПШМ и больных РШМ I-IV стадии; p_3 - здоровых и больных ФПШМ.

Таблица 3

Распределение вирусной нагрузки у ВПЧ(+) лиц

| Группа пациенток | Кол-во ВПЧ(+) проб | Средний логарифм вирусной нагрузки (lg ДНК ВПЧ/10 ⁵ клеток) | | |
|------------------|--------------------|--|------------------|--------------------------|
| | | Повышенная >5 lg | Значимая >3 lg | Малозначимая ≥ 2 lg |
| Здоровые | 16 | 0 | 0 | 14 (87,5 %) |
| ФПШМ | 9 | 0** | 1 (11%)** | 8 (89 %) ** |
| РШМ I-IV стадии | 41 | 21 (51,3 %)* | 16 (39 %) | 4 (9,6 %)* |

Примечание. Различия достоверны: * - с группой здоровых женщин; ** - с группой больных РШМ ($p < 0,05$).

Таблица 4

Распределение вирусной нагрузки среди больных РШМ (I-IV ст.)

| Кол-во больных РШМ I-IV стадии, % | Средний логарифм вирусной нагрузки | | | |
|-----------------------------------|------------------------------------|-------------------|-----------------------|----------|
| | Повышенная > 5 lg | Значимая > 3 lg | Малозначимая < 2 lg | ВПЧ (-) |
| 82,2% $p=0,0004$ | 21 (46,7%) | 16 (35,6%) | - | - |
| 17,8% | - | - | 4 (8,9%) | 4 (8,9%) |

Примечание. p – уровень значимости различий между пациентками с высокой и низкой вирусной нагрузкой.

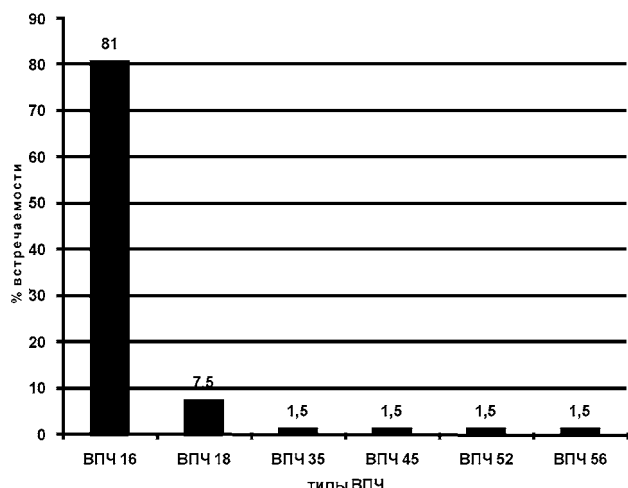


Рисунок. Частота встречаемости генотипов ВПЧ высокого канцерогенного риска

В рамках данного исследования выявление малозначимого количества вируса также является важным, так как это позволяет в процессе мониторинга оценить качество проводимого лечения и прогноз заболевания.

Согласно литературным данным микст-инфекция несколькими типами ВПЧ характерна для населения европейской и центральной части России, включая Томскую область, где ее частота встречаемости составляет 54 % [4, 10, 11]. Полученные нами результаты показывают, что среди жительниц Тывы микст-инфекция ВПЧ практически не встречается: лишь в двух случаях выявлено инфицирование ВПЧ 16+18 и ВПЧ 16+18+45, однако обследованные оказались русской национальности. Кроме того, общая инфицированность ВПЧ в группе обследованных здоровых женщин Тывы (47 %), достоверно превышает аналогичный показатель по сравнению со здоровым женским населением Томской области (26 %). В группе тывинок с фоновыми патологиями шейки матки количество ВПЧ(+) также больше, чем в Томской области: приблизительно 82 % против 35 %. Различие частоты инфицирования больных раком шейки матки незначительно: 91 % в Тыве и 86 % в Томске.

Заключение

Получены предварительные данные по частоте выявления спектра вирусов папилломы человека высокого онкогенного риска среди ограниченного контингента женщин - коренных жительниц республики Тыва, что явилось первым этапом эпидемиологических исследований, планируемых в регионе. Частота инфицированности обследованного контингента ВПЧ высокого онкогенного риска, в частности, ВПЧ 16 типа, превышает аналогичные показатели в других регионах России. Вероятно, определенную роль играют этнические особенности генетики, физиоло-

гии, иммунной реактивности организма коренного населения республики. Высокие показатели инфицированности обследованных лиц вирусом папилломы человека, который является этиологическим фактором развития РШМ, объясняют лидирующие позиции данной патологии в структуре женской онкологической заболеваемости Республики Тыва. Анализ региональных эпидемиологических особенностей распространенности ВПЧ среди женского населения республики может послужить основой для организации целевых мероприятий по ранней диагностике и профилактике РШМ, и, следовательно, для реализации потенциальной возможности снижения риска развития диспластических и злокачественных трансформаций эпителия шейки матки. Более полная информация о циркуляции определенных генотипов ВПЧ в женской популяции данного региона может быть использована в дальнейшем для выбора адекватной схемы вакцинации женского населения.

Литература

1. World Health Organization (WHO). Comprehensive cervical cancer control. A guide to essential practice. Geneva: WHO, 2006.
2. Молчанов Д. Вирус папилломы человека и рак шейки матки: уникальная взаимосвязь и вызов современной медицине // Здоровье Украины. 2007. 1:3.
Molchanov D. Human papilloma virus and cervical carcinoma: unique correlation and challenge to modern medicine. // Ukraine health. 2007. 1:3.
3. Munoz N., Bosch F.X., de Sanjose S. et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer // N. Engl. J. Med. 2003. 348:518-552.
4. Евстигнеева Н.П. Папилломавирусная инфекция уrogenитального тракта женщин: эпидемиология, факторы персистенции, оптимизация ранней диагностики и профилактики онкогенеза: Автореф. дис ... д-ра мед. наук. М., 2007. 42 с.
Evstigneeva N.P. Papilloma viral infection of women urogenital tract: epidemiology, persistence factors, early diagnostics optimization and oncogenesis prophylaxis: Abstract of thesis of Doctor of Med. Sci. Moscow, 2007. 42 p.
5. Куведва Д.А., Шипулина О.Ю. ВПЧ-тестирование: алгоритмы диагностики и требования к молекулярным тестам для выявления вирусов папилломы человека // Сб. тр. 6-й Всерос. науч.-практ. конф. «Генодиагностика инфекционных болезней». 2007. 3:108-119.
Kuevda D.A., Shipulina O.Yu. HPV testing: diagnostics algorithms and requirements to molecular tests for human papilloma virus revelation // Proceedings of the 6th All-Russ. sci. practic. conf. «Gene diagnostics of infection diseases». 2007. 3:108-119.
6. Прилепская В.Н. Профилактика рака шейки матки: методы ранней диагностики и новые скрининговые технологии // Гинекология. 2007. 9(1):12-14.
Prilepskaya V.N. Cervical cancer prophylaxis: Methods of

early diagnostics and new screening technologies // *Gynecology*. 2007. 9(1):12-14.

7. Josefsson A.M., Magnusson P.K., Ylitalo N. et al. A higher level of human papillomavirus 16 DNA was associated with increased risk for cervical carcinoma in situ // *J. Lancet*. 2000. 355:2189—2193.

8. Куведова Д.А., Ермакова Н.В., Шипулина О.Ю., Минкина Г.Н. и др. Высокая вирусная нагрузка и интеграция ВПЧ в геном человека как молекулярные маркеры диспластических изменений шейки матки // Сб. тр. 6-ой Всерос. науч.-практ. конф. «Генодиагностика инфекционных болезней». 2007. 3:83-85.

Kuevda D.A., Ermakova N.V., Shipulina O.Yu., Minkina G.N. etc. High viral load and HPV integration into human genome as molecular markers of cervix of the uterus dysplastic changes // *Proceedings of the 6th All-Russ. sci. practic. conf. "Gene diagnostics of infection diseases"*. 2007. 3:83-85.

9. Роговская С.И. Вакцины против вируса папилломы человека: новые возможности профилактики цервикального рака (В помощь практикующему врачу) // *Гинекология*. 2007. 9(1):15-20.

Rogovskaya S.I. Vaccines against human papilloma virus: new possibilities of cervical cancer prophylaxis (In help to practice doctor) // *Gynecology*. 2007. 9(1):15-20.

10. Золотоверхая Е.А., Шипулина Е.В., Юшманова Е.С., Савичева А.М. // Маркеры папилломавирусной инфекции в скрининге рака шейки матки // Сб. тр. 6-ой Всерос. науч.-практ. конф. «Генодиагностика инфекционных болезней». 2007. 3:91-93.

Zolotoverkhaya E.A., Shipitsyna E.V., Yushmanova E.S., Savicheva A.M. Papilloma viral infection markers in cervical cancer screening // *Proceedings of the 6th All-Russ. sci. practic. conf. "Gene diagnostics of infection diseases"*. 2007. 3:91-93.

11. Видяева И.Г., Уразова Л.Н., Агаркова Л.А. и др. Технология Real-Time PCR в детекции серотипов ВПЧ высокого онкогенного риска при патологиях шейки матки // Сб. тр. 6-ой Всерос. науч.-практ. конф. «Генодиагностика инфекционных болезней». 2007. 3:83-85.

Vidyaeva I.G., Urazova L.N., Agarkova L.A. etc. Technology of Real-Time PCR in detection of serotypes of HPV high oncogenous risks under cervical cancer pathologies // *Proceedings of the 6th All-Russ. sci. practic. conf. "Gene diagnostics of infection diseases"*. 2007. 3:83-85.

INCIDENCE OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS WITH INCREASED CANCER RISK AMONG REPRODUCTIVE-AGED WOMEN OF THE TYVA REPUBLIC

Inna Gennadiyevna Vidyaeva¹, Lyudmila Nikolaevna Urazova¹, Lyubov Filippovna Pisareva¹, Salangy Kadyrolovna Khovalyk², Olga Yurjevna Shipulina³, Dmitry Alexandrovich Kuevda³

¹SI RI for oncology TSC of SB RAMS

5, Kooperativnyi lane, 634009, Tomsk, Russia

²Republic oncology dispensary, Tyva

Republic Cancer Center; 162 Yun Kursedy str., 667003- Kyzyl

³Central Research Institute for epidemiology of Russian Agency for Health and Consumer Rights

3a Novogireevskaya str. 111123, Moscow

The study comprised 90 indigenous patients of the Republic of Tyva (median age 45 ± 1.4 years). The overall human papillomavirus (HPV) incidence rate was $74.4 \pm 4.6\%$. For healthy women, HPV DNA was detected in 47% of cases, for women with chronic cervical diseases and cancer (I-IV stages) in 82% and 91%, respectively. It was shown that HPV 16 (81%) and HPV 18 (7.5%) were the most common among HPV-positive women. Other HPV types (HPV 35, 45, 52 and 56) occurred in single cases (1.5%). When studying virus concentration among HPV-positive women, the increased and significant virus concentrations (51% and 39%, respectively) were observed in patients with cervical cancer amounting to 90.3% of patients with high HPV concentration. Low HPV concentrations were found in healthy women and in patients with chronic cervical diseases.

Key words: cervical cancer, human papillomavirus, HPV, epidemiology.

Vidyaeva I. G., M.D, Ph.D, research scientist, Oncovirology Laboratory, virology@oncology.tomsk.ru

Urazova L. N. Doctor of Biological Sciences, Head of Oncovirology Laboratory, url@oncology.tomsk.ru

Pisareva L. F., Prof., Doctor of Medical Sciences, Head of Epidemiology Laboratory,

PisarevaLF@oncology.tomsk.ru

Khovalyk S. K., physician-radiologist, fedemarina@yandex.ru

Shipulina O. Yu., Head of Laboratory of Molecular Methods, Olga.Shipulina@pcr.ru

Kuevda D. A. research scientist, Laboratory of Molecular methods, Dmitri.Kuevda@pcr.ru