

НОВІ МЕТОДИ ТА ТЕХНОЛОГІЇ

УДК 618.15-006.6

DOI 10.54229/2226-2008-2022-1-2-16

О. В. Бондар, А. І. Рибін, В. В. Музика

ДОСВІД ПЕРВИННОГО ВПЛ-ТЕСТУВАННЯ У СКРИНІНГУ РАКУ ШИЙКИ МАТКИ

Одеський національний медичний університет, Одеса, Україна

УДК 618.15-006.6

О. В. Бондар, А. І. Рибін, В. В. Музика

ДОСВІД ПЕРВИННОГО ВПЛ-ТЕСТУВАННЯ В СКРИНІНГУ РАКУ ШИЙКИ МАТКИ

Одеський національний медичний університет, Одеса, Україна

Метою роботи є оцінка ефективності ВПЛ-тестування як первинного скринінгу раку шийки на базі Університетської клініки ОНМедУ. Підбито підсумки проекту з ВПЛ-тестування за технологією Hybrid Capture (digene HC2 HPV DNA Test) 294 жінок в Одесі. Частота ВПЛ-інфекції високого ризику в досліджуваному регіоні становила 10,5%, середнє вірусне навантаження – 319,97 RLU/COV ratio в загальному зразку, що відповідає високим вірусним навантаженням (більше 3×10^7 геномних еквівалентів). У 10,7% ВПЛ-позитивних жінок була виявлена патологія шийки матки, рак шийки матки на ранніх стадіях було виявлено у 28% жінок (2 раку in situ і 1 рак IA).

Ключові слова: рак шийки матки, вірус папіломи людини, ВПЛ-тестування, вірусне навантаження, дисплазія шийки матки.

UDC 618.15-006.6

O. V. Bondar, A. I. Rybin, V. V. Muzyka

EXPERIENCE OF PRIMARY HPV TESTING IN CERVICAL CANCER SCREENING

Odesa National Medical University, Odesa, Ukraine

The main cause of cervical cancer in almost 100% of cases is the human papillomavirus (HPV), which is also involved in the development of other cancers of the lower genital tract. The malignant transformation of the cervical epithelium is a continuous process that takes decades to develop, and early detection of HPV can prevent the long-term development of cervical cancer and the unfavourable course of the disease. The aim of the study is an evaluation of the effectiveness of HPV testing as primary screening project of the cervical cancer on the base of University clinic of Odessa National Medical University.

Materials and methods. The results of a project on HPV-testing by the Hybrid Capture technology (digene HC2 HPV DNA Test) of 294 women in the Odessa were summarized. **Results.** The frequency of high-risk HPV infection in the studied region was 10.5%, the average viral load was 319.97 RLU / COV ratio in the total sample, which corresponds to a high viral load (more than 3×10^7 genomic equivalents). In 10.7% of HPV-positive women, cervical pathology was revealed, cervical cancer in the early stages was detected in 28% women (2 cancer in situ and 1 cancer IA). **Conclusions.** Thus, the introduction of new screening and prevention technologies using simple and standardised methods shows effective results aimed at reducing female morbidity and mortality. The successful experience of the study makes it possible to recommend the introduction of HPV testing at the compulsory stage of medical examination of the population as a more effective screening in terms of clinical and economic aspects.

Key words: cervical cancer, human papillomavirus, HPV-testing, viral load, cervical dysplasia.

Вступ. Рак шийки матки посідає четверте місце за частотою серед злоякісних пухлин репродуктивної системи і належить до групи онкологічних захворювань з установленною етіологією [1]. Основною причиною захворювання здебільшого є вірус папіломи людини (ВПЛ), який також бере участь у розвитку інших видів раку нижніх статевих шляхів, із яких рак шийки матки є найбільш поширеним [2]. Злоякісна трансформація епітелію шийки матки – це безперервний процес, який розвивається десятиліттями, а своєчасне виявлення ВПЛ може запобігти довгостроковому розвитку раку шийки матки і несприятливому перебігу захворювання.

Одним зі способів зниження смертності від злоякісних новоутворень є масовий скринінг – виявлення безсимптомного онкологічного захворювання за допо-

могою регулярних профілактичних оглядів. Першим сучасним напрямом реалізації скринінгових програм є впровадження нових технологій і методів дослідження. Після встановлення ролі вірусу папіломи людини ВПЛ у канцерогенезі шийки матки багато країн почали включати тестування високоонкогенних штамів ВПЛ у програмах скринінгу раку шийки матки [3]. Низка перспективних досліджень показала, що негативний тест на ВПЛ передбачає відсутність раку шийки матки на наступні п'ять років. Спостереження останніх років показали, що використання лише тесту на ВПЛ як методу скринінгу у жінок старше 25 років має однакову ефективність порівняно з гібридним скринінгом, за якого у віці 25–29 років проводиться тільки цитологічне обстеження, а в групі 30 років додатково проводиться тест на ВПЛ [4].

З огляду на високу поширеність раку шийки матки, тестування на ВПЛ є ефективним методом ранньої

© О. В. Бондар, А. І. Рибін, В. В. Музика, 2023

діагностики передракових процесів та раку шийки матки, відповідно до «Українського національного консенсусу з обстеження та лікування жінок після проходження первинного цервікального скринінгу» (2018) було реалізовано на базі Одеського національного медичного університету.

Метою роботи є оцінка ефективності ВПЛ-тестування як первинного скринінгу раку шийки на базі Університетської клініки ОНМедУ.

Матеріали та методи. Для реалізації дослідження були розроблені інформаційні, організаційні, діагностичні, профілактичні заходи, спрямовані на раннє виявлення безсимптомних передракових і ракових захворювань шийки матки у жінок, які звернулися в рамках щорічних профілактичних оглядів. На першому етапі скринінгу було проведено ВПЛ-тест мазка шийки матки та пап-тест. На другому етапі, за умови позитивного результату ВПЛ-тесту, проведено кольпоскопію, біопсію (за виявлення підозрілої кольпоскопічної картини) та гістологічний аналіз біопсії з початковим результатом тесту на ВПЛ.

Усього було обстежено 294 жінки у віці 19–52 років, відбір матеріалу для дослідження здійснювався під час профілактичних оглядів в Університетській клініці ОНМедУ. Матеріал був узятий із шийки матки за допомогою ендоцервікальних штоків у спеціальне середовище (віалас). У всіх жінок проводили тестування на ВПЛ за допомогою методу гібридного захоплення ДНК-тест Digene HC2 HPV. Дослідження проводилися у лабораторіях CSD та «Арт-Медіуз» (м. Одеса). У роботі використовується набір реагентів Digene HC2 High-Risk HPV DNA Test виробництва QIAGEN GmbH (Німеччина) для виявлення *in vitro* 13 типів вірусів високого ризику (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68) з визначенням загального вірусного навантаження. Інтенсивність світіння вимірювалася на люмінометрі і виражалася у відносних одиницях світла (RLU). На присутність ДНК-ВПЛ у зразках указали результати аналізу (виражені в RLU), еквівалентні величині порогового контролю (Cutoff Value =COV) або перевищують її. Величини RLU нижче COV свідчили про відсутність специфічних ДНК ВПЛ або про таку кількість ДНК ВПЛ, що не перевищує поріг чутливості методу. Рівень COV відповідає концентрації ВПЛ = 1 пг/мл або 10^5 копій/мл або 5000 копій/тесту. За співвідношення $RLU/COV \geq 1,0$ зразки вважалися позитивними, за значення співвідношення $RLU/COV < 1,0$, зразки вважалися негативними. Статистична обробка отриманих даних із застосуванням непараметричних методів (коефіцієнта рангової кореляції Спірмена r_s), критерію Вілкоксона (однорідності досліджуваних ознак).

Результати дослідження та їх обговорення. У рамках дослідження було 294 жінки, основний віковий діапазон становив 30–39 років (40,8%), інші вікові категорії – 59,2%. У загальній вибірці частота ВПЛ-позитивних жінок становила 10,5%, тоді як найвища захворюваність інфікування була виявлена серед жінок молодше 30 років – 24,9%.

Технологія аналізу digene HC2 HPV DNA Test, яку ми використовували, дала змогу не лише виявити ВПЛ-позитивних жінок, а й оцінити клінічно значущий

рівень вірусного навантаження, що був розрахований шляхом оцінки кількості вірусних частинок у певному обсязі біологічної рідини інфікованого організму.

За правильного і стандартизованого збору клінічного матеріалу клінічно значущим вважається вірусне навантаження до 10^3 ГЕ (геномні еквіваленти), на 100 тис клітин людини є клінічно малозначущим, оскільки практично не зустрічається при захворюваннях на рак шийки матки і важкій дисплазії. Вірусним навантаженням до 10^5 ГЕ вважається середнє навантаження, вище цих значень – високе вірусне навантаження.

У методиці, що ми використовували, рівень вірусного навантаження 1 (значення співвідношення RLU/COV) відповідає 10^5 копій ДНК ВПЛ в 1 мл, $10 \cdot 10^6$, $100 \cdot 10^7$, $1000 \cdot 10^8$ копій геномів ВПЛ.

Середній рівень вірусного навантаження становив 319,97 у жінок до 30 років, що відповідає високому вірусному навантаженню (більше 3×10^7), найвище значення – 361,1 було виявлено в групі жінок старше 39 років, а найнижче значення – 287,9 – у віковій групі 30–39 років.

Ми розділили вірусне навантаження на чотири категорії і провели порівняльний аналіз між різними віковими категоріями жінок і величиною співвідношення RLU/COV. Виявилось, що понад 10^8 копій ДНК онкогенних типів вірусу папіломи людини найчастіше зустрічаються у жінок старше 39 років (у 19%), тоді як у молодих жінок не перевищує 10,1%, найбільші відмінності були виявлені між групами 30–39 років і більше 39 років ($\chi^2=3,583$, $p=0,058$), але відмінності не досягли статистичної значущості. Статистично значущі відмінності були виявлені під час порівняння груп жінок старше 39 років і менше 30 років із вірусним рівнем навантаження від 100 до 1000 RLU/COV ($10^6 - 10^7$ копій ВПЛ) ($\chi^2=4,842$, $p = 0,028$). З огляду на відсутність однозначних статистично значимих закономірностей рівня вірусного навантаження з віком ВПЛ-позитивних жінок, оцінили розподіл вірусного навантаження ВПЛ у групі жінок залежно від віку за середніми значеннями і медіаною.

Виявилось, що середні значення у всіх групах приблизно рівні і знаходяться всередині діапазону можливих варіантів. При цьому медіани в кожній групі невисокі, а 2–3 інтервали квартиля (25–75% результатів) також охоплюють відносно невеликі значення. Із цього можна зробити висновок, що існує виражена асиметрія в розподілі значень у досліджуваних групах, а наявність «викидів» – надзвичайно високі значення у окремих людей.

Із 31 ВПЛ-позитивної жінки 28 (90,3%) пройшли кольпоскопію та біопсію. Було порівняно підозрілі цитологічні результати відповідно до класифікації BETHESDA: ASC-US і ASC-H – 14,2%, LSIL і HSIL – 21,4%, епітеліальна атипія і карцинома – 7,1%, а також аномальні варіанти кольпоскопічної картини 14,2%, біопсія проводилася у 100% із цих випадків.

У результаті біопсії та гістологічних досліджень 28 ВПЛ-позитивних жінок мали різні патології шийки матки: рак шийки матки у 10,7% (2 рак *in situ* і 1 рак ІА за системою TNM) і дисплазія шийки матки різного ступеня прояву у 28% жінок.

Серед жінок із раком шийки матки зазвичай був високий рівень вірусного навантаження – у середньому 548,77 RLU/COV, але діапазон значень був досить великим – від 4.14 до 1637.88. Результати ПАП-тесту цій групі жінок тільки в одному випадку показали ймовірність плосколітинного зрговілого раку, в одній – атипії невідомого походження, в інших випадках – дисплазії різного ступеню або нормальна цитологічна картина. Кольпоскопія також здебільшого не виявляла рак шийки матки, і лише гістологічний аналіз біопсійного матеріалу дав змогу встановити діагноз захворювання.

Так, дослідження з тестування на ВПЛ у жінок Одеського регіону показало ефективність цієї технології скринінгу для ранньої діагностики раку шийки матки і вперше виявило частоту інфікування ВПЛ у досліджуваному регіоні.

У більшості розвинених країн світу за останні три десятиліття показники захворюваності і смертності жінок від раку шийки матки мають тенденцію до зниження завдяки систематичній роботі навчальних програм і своєчасному лікуванню [5]. Багаточисельні дослідження, що підтверджують етіологічну роль ВПЛ у розвитку злоякісної трансформації шийки матки, дали змогу таким країнам, як США, Австралія, Нідерланди, Італія та ін., включити ідентифікацію ДНК ВПЛ високоонкогенних типів у програми скринінгу як основну діагностику раку шийки матки.

Поширеність ВПЛ у різних популяціях визначається як медичними, так і немедичними чинниками: географічним розташуванням, соціально-економічним рівнем регіону, віком хворих, методами контрацепції і т. п. Нині загальна ефективність цитологічного пап-тесту все частіше ставиться під сумнів. Літературні дані, а також результати декількох мета-аналізів показують, що пап-тест не виявляє в середньому 50% клінічно значущих передракових і ракових захворювань. Окрім того, залишається проблемою суб'єктивна інтерпретація мазків Папаніколау, адже залежить від кваліфікації цитолога і рівня навантаження на фахівця. Таким чином, через обмеження цитологічного тестування на перший план виходять молекулярні скринінгові тестування ВПЛ. Дослідження показують, що скринінгові тести на ДНК ВПЛ поодиночі або з супутнім цитологічним тестуванням показують кращі результати для виявлення передракових змін.

Сьогодні РШМ є однією з найпоширеніших форм раку у жінок у всьому світі. Незважаючи на те що ВПЛ належить до основного чинника, що призводить до раку шийки матки, більшість інфекцій є тимчасовими і можуть бути спонтанно усунені імунною системою організму. Це підтверджується тим, що 60% інфекцій ВПЛ регресують спонтанно протягом одного року і 90% регресують протягом двох років [6; 9].

За персистуючої інфекції ВПЛ необхідні десятиліття для прогресування РШМ. Тривале тимчасове вікно, протягом якого розвивається захворювання, надає прекрасну можливість для клінічного втручання. У цьому аспекті розвиток онкологічного процесу йде шляхом формування багатofакторного захворювання, де крім самої етіологічної причини (наявність вірусної інфекції), для розвитку захворювання необхідні додат-

кові чинники, якими можуть виступати інші несприятливі чинники середовища (куріння, алкоголь), а також специфічний генетичний профіль та епігенетичні порушення. Таким чином, на перший план виходять пошуки спадкових генетичних і епігенетичних чинників ризику, оскільки вони дадуть змогу краще зрозуміти взаємодії між організмом і вірусом, а також загальне етіологічне розуміння канцерогенеза шийки матки. Доказами впливу генетичних чинників, що сприяють канцерогенезу шийки матки, можуть бути стани, які характеризуються ВПЛ-інфікованістю і високим ризиком розвитку РШМ: гіпогаммаглобулінемія, різні імунodefіцитні стани, синдром мієлотаксису, а також синдромом спадкового неполіпозного колоректального раку (синдром Лінча).

Перші дослідження схильності до РШМ були зосереджені на генах сімейства HLA (Human leukocyte antigens) – людські лейкоцитарні антигени, або система тканинної сумісності людини – група антигенів гітосумісності людини (МНС). У декількох роботах було показано збільшення відносного ризику РШМ для генотипів МНС DQB1*0303 і DQB1*0604 і зниження відносного ризику для DQB1*0201 і гетерозигот DQB1*0301/*0501 у афроамериканських жінок [7]. У подальшому в різних популяціях світу для багатьох варіантів генів МНС була виявлена кореляція з РШМ [8]. Нині з'являються дослідження, що вказують на потенційно важливу роль генетичних варіантів, які беруть участь у регуляції клітинного циклу, апоптозу, проліферації і диференціювання клітин, репарації ДНК. Проте ми досі мало знаємо про те, як генетична схильність пов'язана з прогресом РШМ. Тому необхідно розширення функціональних досліджень для розуміння можливих механізмів генетичної схильності до РШМ. Соматичні мутації, що виникають у геномі в ході ВПЛ-індукованого розвитку раку, також є важливим аспектом вивчення канцерогенезу шийки матки. Аналіз мутацій ДНК відіграє важливу роль у виявленні різниці між раковими і нераковими тканинами, а також у визначенні діагностичних та терапевтичних підходів.

Окрім генетичних чинників, останнім часом пильна увага приділяється епігенетичним механізмам розвитку онкологічних захворювань. Поширеним епігенетичним механізмом ВПЛ-індукованого канцерогенезу є метилювання ДНК. Епігеномний профіль ВПЛ як екзогенний патоген може мати велике клінічне значення. За допомогою методу піросеквенування було виявлено, що РШМ пов'язаний із метилюванням областей L1, L2 і E2/E4 в геномі HPV16. Інше дослідження показало значно підвищений рівень метилювання ДНК у ділянці E2, L1 і L2 у цервікальній інтраепітеліальній неоплазії 3 міри (CIN3+), ніж при транзиторній інфекції для типів ВПЛ 18, ВПЛ 31 і ВПЛ 45 [9].

Відомо, що E6 і E7 ділянки ДНК ВПЛ високого ризику безпосередньо пов'язані з функціями ДНК-метилтрансферази, які є ключовими ферментами, відповідальними за метилювання ДНК. Це свідчить про те, що онкогени ВПЛ пов'язані з метилюванням генів людини. Під час прогресування злоякісного новоутворення локальна гіперметилювання острівців CpG у промоторних областях генів – супресорів пухлин може призвести до зниження їх експресії. У дослі-

дженні було показано, що рівень метилювання позитивно корелював із тяжкістю як CIN, так і РШМ. Ця обставина дала змогу створити нові специфічні молекулярні методи діагностики раку шийки матки на основі визначення профілю метилювання зразків пацієнтів із раком шийки матки [10]. Таким чином, змінена модель метилювання ДНК для ВПЛ високого ризику і низки генів людини можуть слугувати потенційними біомаркерами для розвитку злоякісної пухлини і можуть бути використані для скринінгу та діагностики раку шийки матки у майбутніх дослідженнях.

Висновки.

1. Проведення ВПЛ-тесту мазка шийки матки у жінок віком 19–52 років дало змогу виявити у 10,5%

пацієнтів вірус папіломи людини, причому найвище вірусне навантаження спостерігалось у жінок старше 39 років, найнижче – у віковій групі 30–39 років.

2. Під час подальшого дослідження ВПЛ-позитивних пацієнтів у 7,1% діагностовано епітеліальну атипію і карциному, аномальні варіанти кольпоскопічної картини – у 14,2%.

3. Проведення профілактичного ВПЛ-тестування є ефективним методом ранньої діагностики передракових процесів та раку шийки матки. Успішний досвід дослідження дає змогу рекомендувати впровадження ВПЛ-тестування на обов'язковому етапі медичного огляду населення як більш ефективний скринінг із погляду клініко-економічного аспекту.

ЛІТЕРАТУРА

1. Arbyn M., Weiderpass E., Bruni L. et al. Estimates of incidence and mortality of cervical cancer in 2018: a worldwide analysis. *Lancet Glob Health*. 2020 Feb;8(2):e191–e203.
2. Плоскоклеточные интраэпителиальные поражения шейки матки: возможности ранней диагностики и тактики ведения пациенток / Г.Р. Байрамова и др. *Доктор.Ру*. 2019. № 11(166). С. 61–67. DOI:10.31550/1727-2378-2019-166-11-61-67
3. Профилактика рака шейки матки. Руководство для врачей / под ред. Г.Т. Сухих, В.Н. Прилепской. Москва : МЕД-прессинформ, 2012. 192 с.
4. Белокриницкая Т.Е., Туранова О.В., Фролова Н.И. Сравнительная оценка прогностической ценности самостоятельного и врачебного забора материала для ВПЧ-теста. *Гинекология*. 2018. № 2. С. 51–54.
5. Современный подход к первичному цервикальному скринингу (обзор литературы) / О.В. Туранова и др. *Acta Biomedica Scientifica*. 2018. № 3(3). С. 47–53.
6. Результаты тестирования на вирус папилломы человека при самостоятельном и врачебном заборе материала / Т.Е. Белокриницкая и др. *Consilium Medicum. Акушерство и гинекология*. 2017. № 19(1). С. 56–62.
7. Gregoire L., Lawrence W.D., Kukuruga D. et al. Association between HLA-DQB1 alleles and risk for cervical cancer in African-American women. *Int. J. Cancer*. 1994;57:504–507.
8. Odunsi K., Terry G., Ho L. et al. Association between HLA DQB1 * 03 and cervical intra-epithelial neoplasia. *Mol. Med*. 1995;1:161–171.
9. Wentzensen N., Sun C., Ghosh A. et al. Methylation of HPV18, HPV31, and HPV45 Genomes and Cervical Intraepithelial Neoplasia Grade 3. *JNCI*. 2012;104:1738–1749.
10. Lando M., Fjeldbo C.S., Wilting S.M. et al. Interplay between promoter methylation and chromosomal loss in gene silencing at 3p11-p14 in cervical cancer. *Epigenetics*. 2015;10:970–980.

REFERENCES

1. Arbyn M., Weiderpass E., Bruni L. et al. Estimates of incidence and mortality of cervical cancer in 2018: a worldwide analysis. *Lancet Glob Health*. 2020 Feb; 8(2): e191–e203.
2. Bairamova GR, Baranov II, Ezhova LS. et al. Squamous Intraepithelial Cervix Lesions: Possible Early Diagnostics and Management. *Doctor.Ru*. 2019, 11(166):61–67. DOI:10.31550/1727-2378-2019-166-11-61-67 (in Russian).
3. Prevention of cervical cancer: a guide for doctors. Sukhikh GT, Prilepskaya VN. ed. 3rd ed. M.: MEDpress-inform, 2012: 190 (in Russian).
4. Belokrinitskaya TE, Turanova OV, Frolova NI. Purpose of the study. Evaluate the prognostic value of an independent and medical fence of the vaginal discharge for the HPV test. *Gynecology*. 2018; 20(2):51–54. doi: 10.26442/2079-5696_2018.2.51-54 (in Russian).
5. Turanova OV, Belokrinitskaya TE, Frolova NI. et al. Modern approach to primary cervical cancer screening (literature review). *Acta Biomedica Scientifica*. 2018; 3(3): 47–53. doi:10.29413/ABS.2018-3.3.7 (in Russian).
6. Belokrinitskaya TE, Frolova NI, Turanova OV. et al. Results of human papillomavirus testing on self-collected versus clinician-collected samples. *Gynecology*. 2017; 19(1): 56–62 (in Russian).
7. Gregoire L., Lawrence W.D., Kukuruga D. et al. Association between HLA-DQB1 alleles and risk for cervical cancer in African-American women. *Int. J. Cancer*. 1994; 57: 504–507 (in Russian).
8. Odunsi K, Terry G, Ho L. et al. Association between HLA DQB1 * 03 and cervical intra-epithelial neoplasia. *Mol. Med*. 1995; 1: 161–171 (in Russian).
9. Wentzensen N, Sun C, Ghosh A. et al. Methylation of HPV18, HPV31, and HPV45 Genomes and Cervical Intraepithelial Neoplasia Grade 3. *JNCI*. 2012;104:1738–1749 (in Russian).
10. Lando M, Fjeldbo CS., Wilting SM. et al. Interplay between promoter methylation and chromosomal loss in gene silencing at 3p11-p14 in cervical cancer. *Epigenetics*. 2015; 10: 970–980 (in Russian).

Надійшла до редакції 11.11.2022 р.

Прийнята до друку 26.11.2022 р.

Електронна адреса для листування ovbondar0708@gmail.com