

STRESZCZENIE

„Analiza zróżnicowania genetycznego wirusa HPV w populacji kobiet w województwie lubuskim”

Wirus brodawczaka ludzkiego (HPV) to jeden z najpowszechniej występujących patogenów przenoszonych drogą płciową. Dotychczas zidentyfikowano 222 typy wirusa HPV, z czego 22 charakteryzują się znacznym potencjałem onkogennym (typy HR-HPV/pHR-HPV – o wysokim/prawdopodobnie wysokim potencjale onkogennym). Zakażenia wirusem HPV mają najczęściej charakter przejściowy, jednak przetrwałe infekcje typami HR mogą doprowadzić do postępującego procesu transformacji nowotworowej. Udowodniono, że zakażenie HPV jest związane z rozwojem nowotworu szyjki macicy. W ostatnich latach coraz częściej odnotowuje się również przypadki HPV-dodatnich nowotworów okolic anogenitalnych oraz okolic jamy ustnej i gardła. Wraz z rozwojem coraz bardziej czułych metod detekcji wirusa, coraz częściej identyfikuje się przypadki koegzystencji kilku typów wirusa HPV w jednej tkance, jednak dotychczasowe dane na temat wpływu infekcji mnogich na ryzyko rozwoju procesu kancerogenezy nie są jednoznaczne.

Integracja genomu wirusa do genomu zainfekowanej komórki jest kluczowym zdarzeniem prowadzącym do rozwoju procesu transformacji nowotworowej. Efektem integracji jest nadekspresja wirusowych białek onkogennych E6/E7, co skutkuje pogłębiającą się niestabilnością genomową, proliferacją i immortalizacją komórek.

Rozpowszechnienie wirusa HPV wśród zdrowych kobiet na świecie wynosi ok. 12%, wzrastając niemal do 100% w przypadku nowotworu szyjki macicy. W Polsce, informacje na temat częstości występowania infekcji wirusem HPV są nieliczne i pochodzą z kilku województw (pomorskiego, wielkopolskiego, mazowieckiego, małopolskiego, łódzkiego). Brak danych odnośnie rozpowszechnienia infekcji wirusem HPV na terenie Ziemi Lubuskiej stanowił podstawę do podjęcia niniejszych badań. Celem badań było określenie zróżnicowania genetycznego wirusa HPV wśród kobiet z województwa lubuskiego.

Realizacja celu głównego obejmowała następujące etapy:

- identyfikację infekcji wirusem HPV w złuszczonych komórkach szyjki macicy,
- określenie genotypu wirusa HPV,
- identyfikację infekcji pojedynczych i mnogich,

- określenie stanu fizycznego genomu u najczęściej występujących typów HR-HPV,
- identyfikację polimorfizmów pojedynczych nukleotydów (SNP) sekwencji wirusowych białek onkogennych E6/E7 u najczęściej występujących typów HR-HPV,
- określenie powiązań między stanem fizycznym genomu wirusa a występowaniem infekcji pojedynczej lub mnogiej,
- określenie powiązań między występowaniem polimorfizmów SNP w regionach E6/E7 a stanem fizycznym wirusowego genomu.

Badania przeprowadzono przy współpracy z Poradnią Ginekologiczną oraz Kliniką Oddziałem Położniczo-Ginekologicznym Szpitala Uniwersyteckiego w Zielonej Górze w zakresie poboru prób i badania cytologicznego. Materiał do niniejszych badań stanowiły próby cytologii płynnej. Identyfikacji materiału genetycznego wirusa HPV dokonywano przy użyciu metody PCR. Próby pozytywne następnie genotypowano przy pomocy metody PCR-RFLP. W kolejnym etapie badań przeprowadzono analizę formy fizycznej genomu wirusowego (episom/mieszana/zintegrowana z genomem gospodarza) najczęściej identyfikowanych typów HR-HPV (HPV-16/HPV-31) metodą real-time PCR. Określono zmienność nukleotydową SNP w regionach E6 oraz E7 powyższych typów wirusa poprzez sekwencjonowanie metodą Sangera oraz ustalono przynależność filogenetyczną analizowanych wariantów HPV.

Przeanalizowano 458 prób. Obecność wirusa HPV stwierdzono w 20% prób, a infekcje kilkoma typami wirusa w nieco ponad 25% przypadków HPV-dodatnich (HPV+). Wykryto 24 typy wirusa należące do 9 gatunków. Dominowały typy HPV-16, -31 oraz -53. W przypadkach infekcji mnogich najczęściej identyfikowano koegzystencję typów HPV-16/HPV-31 oraz HPV-16/HPV-53. W badanym zbiorze prób powszechnie identyfikowano typy HR-HPV (65,6% prób HPV+).

Prawidłowy wynik cytologiczny był związany z ujemnym wynikiem HPV, natomiast występowanie infekcji mnogich korelowało z nieprawidłowym wynikiem cytologicznym. Zakażenia wirusem najczęściej identyfikowano u kobiet w wieku 30-39 lat.

Analiza stanu fizycznego genomu wykazała występowanie zarówno form episomalnych, mieszanych, jak i zintegrowanych z genomem komórkowym w przypadku typu HPV-16 oraz wyłącznie form episomalnych w przypadku typu HPV-31. W przypadkach koinfekcji typem HPV-16 obserwowano tendencję do częstszego występowania zjawiska integracji niż w infekcjach pojedynczych.

Większe zróżnicowanie sekwencji nukleotydowych wirusowych białek onkogennych (E6/E7), w szczególności E7, obserwowano w przypadku typu HPV-31

(E6: 9 SNPs, w tym 4 zmiany niesynonimiczne; E7: 6 SNPs, w tym 3 zmiany niesynonimiczne) niż HPV-16 (E6: 7 SNP, w tym 4 zmiany niesynonimiczne; E7: 1 niesynonimiczna SNP). W przypadku typu HPV-16 najczęściej identyfikowano zmianę T350G, skutkującą zmianą aminokwasową z lizyny na walinę w pozycji 90 (ponad 60% przypadków). Zaobserwowano tendencję do częstszego jednoczesnego współwystępowania zmiany T350G oraz zjawiska integracji genomu wirusa do genomu zainfekowanej komórki. Wszystkie badane warianty typu HPV-16 zaklasyfikowano do linii filogenetycznej A (wariant europejski), natomiast warianty typu HPV-31 przyporządkowano do linii B oraz C.

Badania przeprowadzone w ramach niniejszej pracy dostarczyły danych na temat rozpowszechnienia infekcji wirusem HPV oraz dominujących typów wirusa wśród kobiet w województwie lubuskim, przyczyniając się do wzbogacenia wiedzy odnośnie występowania zakażeń HPV w Polsce. Przeprowadzone badania dostarczają też wstępnych danych wskazujących na użyteczność analizy wybranych SNP jako potencjalnego biomarkera dla oceny ryzyka rozwoju procesu nowotworowego w przyszłości.

Uzyskane wyniki pozwoliły na sformułowanie następujących wniosków:

- 1) W badanej grupie kobiet rozpowszechnienie zakażeń wirusem HPV wyniosło 20%, obejmując różne typy wirusa, w tym znaczny odsetek typów o wysokim potencjale onkogennym, co wskazuje na istotny problem epidemiologiczny związany z zakażeniem wirusem HPV kobiet na terenie Ziemi Lubuskiej.
- 2) Wykazane zależności między nieprawidłową cytologią a obecnością infekcji typami onkogennymi HPV wskazuje na potencjalnie zwiększone ryzyko rozwoju zmian nowotworowych w obrębie szyjki macicy u badanych kobiet,
- 3) Częste występowanie zjawiska integracji genomu wirusa HPV-16 wraz z koegzystencją innych typów HR/pHR u kobiet poniżej 35 r.ż. wyraźnie sugeruje możliwość rozwoju procesu nowotworowego i wskazuje na potrzebę wdrażania i propagowania badań genetycznych wirusa w procesie monitorowania zdrowia.
- 4) Polimorfizm nukleotydowy T350G w obrębie sekwencji E6 HPV-16 może stanowić potencjalny biomarker progresji zmian nabłonkowych w obrębie szyjki macicy.
- 5) Wdrożenie powszechnych szczepień ochronnych szczepionką 9-walentną może przyczynić się do znacznej redukcji przypadków nieprawidłowych wyników cytologicznych będących konsekwencją zakażeń typami: HPV-6/-11/-16/-18/-31/-33/-45/-52/-58, które zidentyfikowanymi u 70% prób HPV+ w badanej populacji kobiet.

ABSTRACT

“Analysis of HPV genetic diversity in the female population in the Lubuskie Province”

Human papillomavirus (HPV) is one of the most common sexually transmitted pathogen. 222 HPV types have been identified so far, and 22 of them have significant oncogenic potential (HR/pHR – high/probably high risk types). HPV infections are most often transient, however, persistent infections with HR-HPV types can lead to progressive malignant transformation. It has been established that HPV infection is associated with the development of cervical cancer. In recent years, HPV-related anogenital and head and neck cancers have been increasingly detected. Coexistence of more than one type of HPV in the same tissue is increasingly identified along with the development of more and more sensitive methods of HPV detection, but data on the impact of multiple infections on the risk of developing carcinogenesis are contradictory so far.

Integration of the HPV genome to the genetic material of the infected cell is a key factor leading to malignant transformation. The integration phenomenon results in overexpression of E6/E7 viral oncogenic proteins, which causes an increase genomic instability, proliferation and immortalization of cells.

The prevalence of HPV among healthy women worldwide is about 12% rising to almost 100% in cases of cervical cancer. The information on the incidence of HPV in Poland is limited and comes from several provinces (Pomorskie, Wielkopolskie, Mazowieckie, Małopolskie and Łódzkie voivodeships). The basis for this study was the lack of data on the prevalence of HPV infection in the Lubuskie voivodeship. The aim of this study was to determine the genetic diversity of HPV among women from the Lubuskie Province.

The realization of the main goal included the following stages:

- identification of HPV infection in exfoliated cells of the cervix,
- determination of the HPV genotype,
- identification of single and multiple infections,
- determination of the viral genome physical state of the most common identified HR-HPV types,
- identification of the single nucleotide polymorphisms (SNPs) of the viral oncogenic protein sequences: E6 / E7 of the most frequently identified HR-HPV types,

- determination of the relationship between the physical state of the HPV genome and the occurrence of a single or multiple infection,
- determination of the relationships between the occurrence of SNPs in the E6/E7 regions and the physical state of the viral genome.

The research was carried out in the cooperation with the Gynecology Clinic and the Clinical Department of Obstetrics and Gynecology of the University Hospital in Zielona Góra in the field of cervical smear collection and cytological examination. The material for the research were liquid cytology samples. The HPV genetic material was identified by PCR. Positive samples were then genotyped using the PCR-RFLP method. Next, an analysis of the viral genome physical state (episome / mixed / integrated with the host genome) of the most frequently identified HR-HPV types (HPV-16 / HPV-31) was performed using real-time PCR. Then, by Sanger sequencing, the nucleotide variability of SNPs in the E6 and E7 regions of the above virus types was determined and the phylogenetic affiliation of the analyzed variants of a given HPV type was determined.

458 samples were analyzed. The HPV genome was found in 20% of them, and infection with several types of the virus was found in just over 25% of HPV+ cases. 24 viral types belonging to 9 species were detected. HPV-16, -31 and -53 dominated. The coexistence of HPV-16 / HPV-31 and HPV-16 / HPV-53 was most often identified in the cases of multiple infections. HR-HPV types were commonly identified in the samples set (65,6% of HPV+ tests).

Normal cytology was associated with negative HPV results, while multiple infections were associated with abnormal cytology. HPV infections were most often identified in women between 30-39 years.

Analysis of the physical state of the genome revealed the presence of both episomal, mixed and integrated forms in the cell genome for HPV-16, and only the episomal form for HPV-31. There was a tendency for the integration phenomenon to occur more frequently in HPV-16 co-infection than in single infections.

A greater diversity of the nucleotide sequences of viral oncogenic proteins (E6/E7), in particular E7, was observed for HPV-31 (E6: 9 SNPs, including 4 non-synonymous changes; E7: 6 SNPs, including 3 non-synonymous changes) than for HPV-16 (E6: 7 SNPs, including 4 non-synonymous changes; E7: 1 non-synonymous SNP). The most frequently identified SNP in the case of HPV-16 was T350G, which resulted in an amino acid change from lysine to valine at position 90 (over 60% of cases). There was a tendency for more frequent simultaneous coexistence of T350G and the phenomenon of integration of the

viral genome with the genetic material of the infected cell. All tested HPV-16 variants were classified as belonging to the phylogenetic line A (European variant), while the HPV-31 variants were assigned to lines B and C.

The conducted research provided data on the prevalence of HPV infection and the dominant HPV types among women in the Lubuskie voivodeship, contributing to the broadening of knowledge about the prevalence of HPV infections in Poland. The conducted research also provided preliminary data suggesting the usefulness of the analysis of selected SNPs as a potential biomarker of the development of the neoplastic process in the future.

The obtained results allowed for the formulation of the following conclusions:

- 1) In the studied group of women, the prevalence of HPV infections was 20%, covering various HPV types, including a high percentage of types with significant oncogenic potential, which indicates a significant epidemiological problem related to HPV in the Lubuskie province.
- 2) The relationship between abnormal cytology and the presence of infection with oncogenic HPV types indicates a significant risk of developing malignant transformation in the studied women.
- 3) The frequent occurrence of the HPV-16 genome integration with the coexistence of other HR/pHR types in women under 35 years of age clearly suggests the possibility of the neoplastic process development and points to the need to implement and promote genetic testing of viruses in the health monitoring process.
- 4) T350G nucleotide polymorphism within the HPV-16 E6 sequence may be a potential biomarker of the progression of epithelial lesions within the cervix.
- 5) The implementation of universal protective vaccinations with 9-valent vaccine may significantly reduce the detection of abnormal cytological results as a consequence of infections with the following HPV types: HPV-6/- 11/-16/-18/-31/-33/-45/-52/-58 identified in 70% of HPV+ samples in the study population.