

Е.В. Шипицына¹,
Е.А. Оржесковская¹,
К.А. Бабкина¹, А.М. Савичева¹,
Н.А. Микая², О.О. Орлова¹,
И.К. Юркова¹

¹НИИ акушерства и гинекологии
им. Д.О. Отта РАМН, Санкт-Петербург;

²НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова
РАМН, Санкт-Петербург

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИРУСНОЙ НАГРУЗКИ И СТАТУСА ДНК ВИРУСА ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА 16 ТИПА МЕТОДОМ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

■ Интеграция ДНК вируса папилломы человека в ДНК клетки-хозяина рассматривается как ключевое событие в злокачественной трансформации эпителиальных клеток при раке шейки матки (РШМ). В результате интеграции нарушается интактность вирусных генов E1 и E2 и, как следствие, регуляция экспрессии онкогенных белков ВПЧ E6 и E7. В данной работе показано, что вирус папилломы человека 16 типа является самым распространенным типом высокого онкогенного риска у женщин с патологией шейки матки, причем частота встречаемости ВПЧ 16 типа увеличивается со степенью неопластических изменений эпителия шейки. С использованием метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени были определены количество копий и статус вирусной ДНК ВПЧ 16 типа в клинических пробах, и установлена ассоциация степени дисплазии с вирусной нагрузкой и физическим статусом вируса.

■ **Ключевые слова:** вирус папилломы человека; цервикальная интраэпителиальная неоплазия; рак шейки матки; интеграция; физический статус ДНК

Введение

Одним из важнейших достижений в области изучения рака является установление этиологической роли некоторых типов вируса папилломы человека (ВПЧ) в развитии рака шейки матки (РШМ). За последние годы накоплено большое количество эпидемиологических и молекулярно-биологических данных, подтверждающих связь между опухолевым процессом и наличием вирусного генетического материала.

РШМ является очень редким следствием папилломавирусной инфекции (ПВИ), и даже в случаях тяжелой дисплазии может происходить спонтанная регрессия заболевания. В этой связи выработка критериев, с помощью которых можно распознать клинически значимую инфекцию, способную развиться в заболевание, представляется вопросом первостепенной важности. В качестве таких критериев в настоящее время рассматриваются:

- инфицирование онкогенными типами и молекулярными вариантами вируса;
- персистенцию папилломавирусной инфекции;
- высокую вирусную нагрузку;
- инфицирование несколькими онкогенными типами папилломавируса;
- интеграцию вирусной ДНК в клеточный геном.

В настоящее время охарактеризовано более 80 типов ВПЧ и показано, что около 40 типов могут вызывать заболевания аногенитального тракта. Типы ВПЧ, инфицирующие слизистые оболочки аногенитального тракта, разделяют на группы низкого и высокого онкогенного риска. Самым распространенным типом ВПЧ высокого онкогенного риска является 16 тип. Его обнаруживают более чем в 50% случаев РШМ [10].

Ключевым событием в злокачественной трансформации эпителиальных клеток считается интеграция ДНК вируса в ДНК клетки-хозяина. Процесс интеграции сопровождается разрушением открытых рамок считывания генов E1 и E2, продукты которых участвуют в регуляции экспрессии онкогенных белков ВПЧ E6 и E7 [6]. Как правило, на ранних стадиях опухолевого процесса вирусная ДНК выявляется в эписомной форме, тогда как на поздних стадиях — в интегрированной [7]. Недавно был предложен высокочувствительный метод определения физического статуса ВПЧ с применением ПЦР в реальном времени, с помощью которого было показано, что интеграция вируса может происходить на самых ранних стадиях заболевания, когда еще нет цитологических доказательств неопластических изменений [11, 12]. ПЦР в реальном времени позволяет с высокой точностью определить как вирусную нагрузку, так и статус вирусной ДНК — два параметра, которые наряду с типом ВПЧ рассматриваются в настоящее время в качестве критериев, позво-

ляющих прогнозировать течение ПВИ и ассоциированных с нею злокачественных изменений. Использование метода ПЦР в реальном времени для определения статуса вирусной ДНК основывается на следующих допущениях:

- при интегрированной форме ДНК ВПЧ ген E2 не обнаруживается;
- при эписомной форме вируса количество копий гена E2 равно количеству копий гена E6;
- если в клеточный геном интегрирована только часть вируса, число копий гена E2 меньше числа копий гена E6.

Несмотря на то что интеграция ДНК ВПЧ в клеточный геном рассматривается многими авторами как ключевой фактор риска неопластической прогрессии, остается еще много вопросов относительно биологической и клинической значимости явления интеграции, а также распространенности интегрированных форм вируса, особенно в преинвазивных повреждениях.

Целью данного исследования явилось определение вирусной нагрузки и статуса ДНК ВПЧ 16 типа с использованием ПЦР в реальном времени и оценка прогностических возможностей этих факторов. Для достижения поставленной цели планировалось протестировать клинические пробы, полученные от пациенток с патологией шейки матки, с применением типоспецифических праймеров и выявить пробы, содержащие ВПЧ 16 типа, затем определить вирусную нагрузку и статус вирусной ДНК и проанализировать полученные результаты в свете данных цитологических исследований.

Материалы и методы

Клинический материал. Клинический материал был получен от пациенток НИИ акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта РАМН и НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова РАМН. Соскобы эпителия цервикального канала собирали дакроновыми щеточками в пробирки «Эппендорф» объемом 1,5 мл, содержащие 300 мкл транспортной среды (ЦНИИ эпидемиологии, Москва). Одновременно с материалом для исследования на ВПЧ брали материал для цитологического исследования.

Цитологические исследования. Цитологические исследования соскобов эпителия цервикального канала проводились в лабораториях патоморфологии НИИ акушерства и гинекологии и НИИ онкологии. Для представления результатов цитологических исследований использовали следующие обозначения:

- ЦИН I (цервикальная интраэпителиальная неоплазия I степени или легкая дисплазия);

- ЦИН II (цервикальная интраэпителиальная неоплазия II степени или умеренная дисплазия);

- ЦИН III (цервикальная интраэпителиальная неоплазия III степени или карцинома *in situ*);

- цитологически нормальные мазки определяли как ЦН.

Выделение ДНК. Выделение ДНК из клинических проб проводили с использованием тест-системы «ДНК-сорб-А» (ЦНИИ Эпидемиологии, Москва) в соответствии с инструкцией производителя.

Полимеразная цепная реакция. Цервикальные образцы анализировали с помощью общих праймеров GP5+/GP6+, фланкирующих фрагмент гена L1 ВПЧ [14]. Реакцию проводили в реакционном объеме 50 мкл, содержащем 50 мМ KCl, 10 мМ Tris-HCl pH 8,3, каждого дезокси-нуклеозидтрифосфата 200 мкМ, 3,5 мМ MgCl₂, 1 единицу Taq-полимеразы, 50 пмол каждого из праймеров GP5+

+ (5'-TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC-3') и GP6+ (3'-CTTATACTAAATGTCAAATAAAAAG-5') и 10 мкл образца ДНК. Амплификацию осуществляли в программируемом термостате Терцик (ДНК-технология, Москва) при следующем температурном режиме: 94°C 4 мин; 94°C 1 мин, 40°C 2 мин, 72°C 1,5 мин (40 циклов); 72°C 4 мин. Анализ продуктов реакции проводили в 1,5% агарозном геле, который окрашивали бромистым этидием (0,5 мкг/мл); в ультрафиолетовом свете наблюдали амплифицированные специфические фрагменты длиной 150 п.о.

Типирование ВПЧ. Для выявления и дифференциации ДНК вирусов папилломы человека высокого канцерогенного риска (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 52, 56, 58, 59, 66) в соскобах эпителия цервикального канала использовали тест-системы «АмплиСенс ВПЧ высокого риска» (ЦНИИ эпидемиологии, Москва). Анализ проводили в полном соответствии с инструкцией производителя.

Получение стандарта для количественной ПЦР в реальном времени. ВПЧ 16 типа, клонированный в плазмиду pBR322, был любезно предоставлен доктором Е.М. de Villiers (Центр изучения рака, Университет Гейдельберга, Германия). Приготовление компетентных клеток *Escherichia coli* штамм JM107 и трансформацию их плазмидой pBR322, содержащей геном ВПЧ 16 типа, проводили в соответствии с методикой, описанной Н. Inoue [5]. Для выделения плазмидной ДНК использовали методику, предложенную Lee S.Y. и соавт. [8]. Концентрацию ДНК измеряли на спектрофотометре Smart Spec 3000 (Bio-Rad, USA).

Полимеразная цепная реакция в реальном времени. Полимеразную цепную реакцию в реальном времени выполняли в термоциклере с оптическим блоком iQ iCycler (Bio-Rad, USA) при следующем температурном режиме: 2 мин при 50°C, 10 мин при 95°C и 40 двухшаговых циклов 15 сек при 95°C и 1 мин при 60°C. Реакцию проводили в объеме 25 мкл, содержащем 10 mM Tris-HCl pH 8,3, каждого дезоксинуклеозидтрифосфата 200 мкМ, 50 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 1 единицу Taq-полимеразы, 15 пмол каждого праймера, 5 пмол зонда и 5 мкл ДНК. Праймеры и зонды для амплификации фрагментов ранних генов E2 и E6 [12] представлены в табл. 1.

Стандартные кривые были получены амплификацией серии последовательных разбавлений от 5×10⁷ до 5×10² стандарта. Для этих разбавлений была показана линейная зависимость логарифма копий стандарта от количества циклов. Все реакции проводили в двух пробирках. Результаты были пересчитаны на 50 нг клеточной ДНК.

Статистическая обработка данных. Оценку ассоциации стадии заболевания с частотой встречаемости ВПЧ 16 типа, а также с инфицированием несколькими типами ВПЧ проводили с использованием 2-теста. Для анализа ассоциации степени дисплазии с вирусной нагрузкой и статусом вирусной ДНК использовали критерий Крускала–Уоллиса (H-тест).

Результаты

Клинический материал (соскобы эпителия цервикального канала) был получен от 105-и пациенток с патологией шейки матки: эрозией, эктопией, лейкоплакией, диспластическими изме-

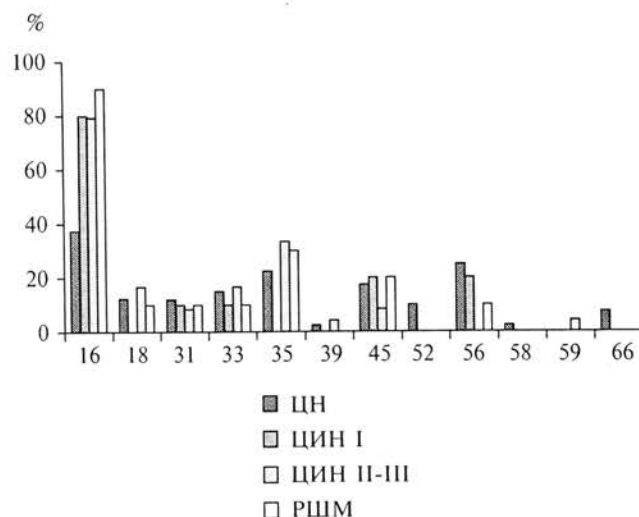


Рис. 1. Частота встречаемости типов ВПЧ высокого онкогенного риска в группах с различными данными цитологических исследований

нениями эпителия шейки матки и РШМ. В 88-ми пробах был обнаружен ВПЧ методом ПЦР с применением общих праймеров GP5+/GP6+ к фрагменту гена L1. ВПЧ высокого онкогенного риска (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 52, 56, 58, 59 и 66 типов) были выявлены в 84-х пробах. У 40 пациенток из 84-х эпителий шейки матки был без атипии, ЦИН I была определена в 10-ти случаях, ЦИН II и III — в 24-х случаях. Десяти пациенткам был поставлен диагноз плоскоклеточной карциномы. Результаты определения типов ВПЧ высокого онкогенного риска у этих пациенток представлены на рис. 1. Вирус папилломы 16 типа был обнаружен почти в 61% всех случаев, остальные типы распределились по частоте встречаемости следующим образом: 35 тип — 23,8%, 56 тип — 15,5%, 33 тип — 14,2%, 45 тип — 14,2%,

Таблица 1

Праймеры и зонды для ПЦР в реальном времени

Название	Последовательность (5'>3')
Праймер 1, 16E2F	AACGAAGTATCCTCTCCCTGAAATTATTAG
Праймер 2, 16E2R	CCAAGGCGACGGCTTTG
Зонд 16E2PRO	(FAM)-CACCCGCCGCGACCCATA-(TAMRA)
Праймер 1, 16E6F	GAGAACTGCAATGTTTCAGGACC
Праймер 2, 16E6R	TGTATAGTTGTTTGACGCTCTGTGC
Зонд 16E6PRO	(FAM)-CAGGAGCGACCCAGAAAGTTACCACAGTT-(TAMRA)

Таблица 2

Показатели инфицирования одним и несколькими типами ВПЧ в группах с различными цитологическими данными

Кол-во типов ВПЧ	Всего (n = 84)	ЦН (n = 40)	ЦИН I (n = 10)	ЦИН II-III (n = 24)	РШМ (n = 10)
Один тип ВПЧ	48 (57%)	23 (57,5%)	6 (60%)	14 (58,3%)	5 (50%)
Два и более типа ВПЧ	36 (43%)	17 (42,5%)	4 (40%)	10 (41,7%)	5 (50%)

18 тип — 11,9%, 31 тип — 10,7%, 52 тип — 4,8%, 66 тип — 3,6%, 39 тип — 2,4%, 58 и 59 типы — 1,2%. В 43% (36 из 84) было обнаружено два и более типа ВПЧ (табл. 2). Инфицирование несколькими типами ВПЧ не было ассоциировано со степенью дисплазии ($p = 0,998$).

Частота встречаемости 16 типа ВПЧ была ассоциирована со стадией заболевания ($p < 0,001$):

- при патологии шейки матки без атипии она составила 37,5% (15 случаев из 40);
- при дисплазии I степени — 80,0% (8 случаев из 10);
- при дисплазии II-III степени — 79,2% (19 случаев из 24);
- при плоскоклеточной карциноме — 90% (9 случаев из 10) (рис. 1).

ВПЧ 16 типа был обнаружен в 51-й пробе: 15-и проб были получены от пациенток без ати-

пии, 8-и от пациенток с ЦИН I, 19-и — от пациенток с ЦИН II-III, 9 — от пациенток с РШМ. В одной из проб, полученных от пациенток с РШМ, не удалось амплифицировать фрагмент гена Е6 — данная проба была исключена из анализа. Таким образом, физический статус ДНК ВПЧ 16 типа был определен в 50-и пробах.

Принципиальной особенностью ПЦР в реальном времени является возможность следить за накоплением продуктов амплификации непосредственно во время реакции. Оптический модуль осуществляет динамическое измерение флуоресценции, генерируемой пришитыми к зондам флуорофорами. Увеличение флуоресценции, отражающее динамику накопления продуктов амплификации, отображается на дисплее прибора в конце каждого цикла. ПЦР в реальном времени позволяет точно определить количество

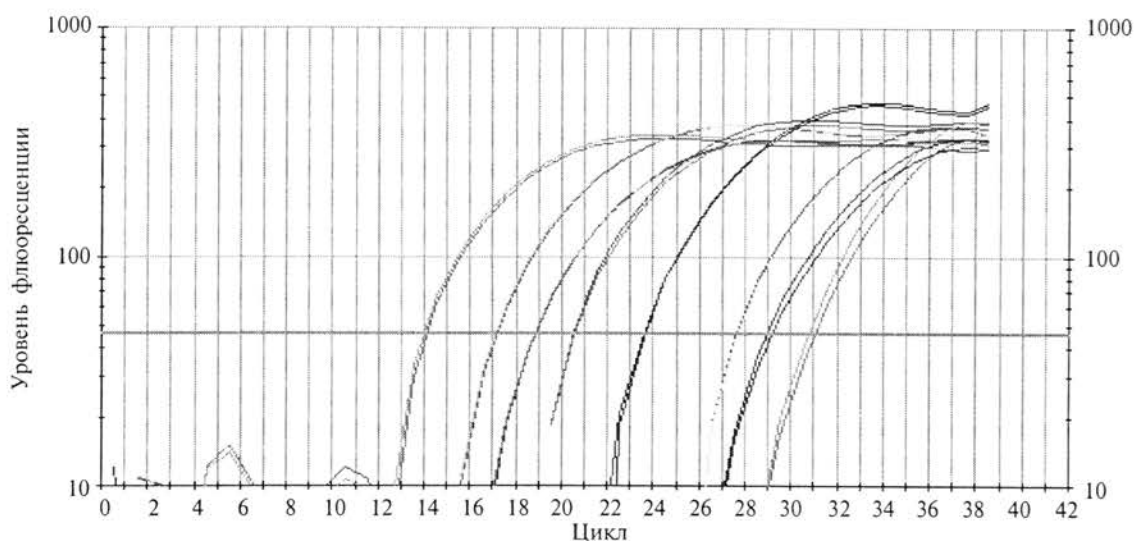


Рис. 2. График амплификации фрагмента гена Е2 ВПЧ 16 типа в серии 10-кратных разведений стандарта ($5 \times 10^7 - 5 \times 10^2$) и двух клинических пробах (314 и 345)

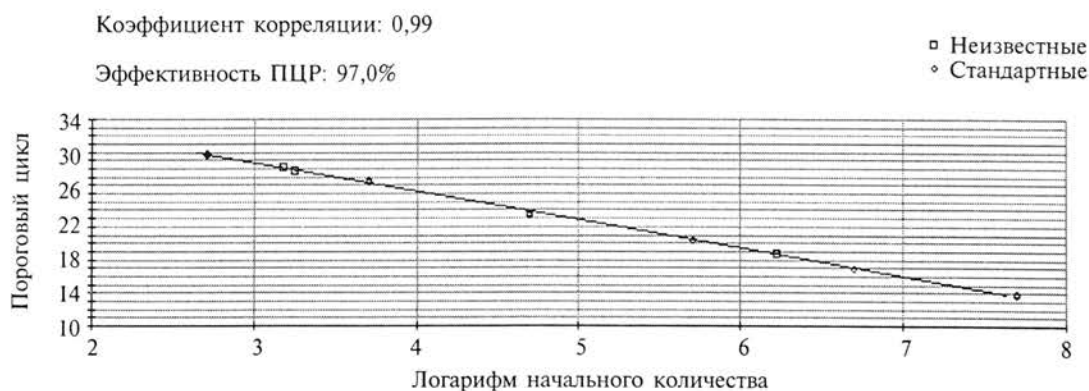


Рис. 3. Стандартная кривая, полученная в результате амплификации фрагмента гена Е2 ВПЧ 16 типа в серии 10-кратных разведений стандарта ($5 \times 10^7 - 5 \times 10^2$) и в двух клинических пробах (314 и 345)

Таблица 3

Количество копий ДНК ВПЧ 16 типа в клинических пробах*

Группы пациенток (по результатам цитологических исследований)	Диапазон значений	Среднее число копий ДНК
ЦН (n = 15)	$2 \times 10^1 - 3,9 \times 10^5$	4×10^4
ЦИН I (n = 8)	$4,4 \times 10^1 - 1,5 \times 10^6$	$2,8 \times 10^5$
ЦИН II-III (n = 19)	$1,3 \times 10^1 - 5,2 \times 10^7$	$4,4 \times 10^6$
РШМ (n = 8)	$6 \times 10^1 - 8,4 \times 10^6$	$2,3 \times 10^6$

* — на 50 нг тотальной ДНК

копий исследуемой ДНК в клинической пробе, так как исходное количество исследуемой матрицы оценивается по началу логарифмической фазы реакции, а не по количеству продуктов амплификации в конце реакции. На рис. 2 представлен график амплификации фрагмента гена E2 ВПЧ 16 типа в серии 10-кратных разведений стандарта ($5 \times 10^7 - 5 \times 10^2$) и двух пробах ДНК, выделенной из клинического материала. Концентрацию ДНК в исследуемых пробах определяли с помощью стандартной кривой (рис. 3). Вирусную нагрузку рассчитывали как количество копий гена E6 ВПЧ 16 типа на 50 нг тотальной ДНК. Среднее количество копий ДНК ВПЧ 16 типа возрастало с увеличением степени дисплазии. Если в случаях цитологической нормы оно составляло 4×10^4 копий вирусной ДНК на 50 нг клеточной ДНК, то у пациентов с ЦИН I — $2,8 \times 10^5$, а у пациенток с ЦИН II-III и РШМ — $4,4 \times 10^6$ и $2,3 \times 10^6$ соответственно (табл. 3). С использованием критерия Крускала-Уоллиса установлено, что различия в значениях вирусной нагрузки на

разных стадиях заболевания статистически значимы ($p < 0,001$).

Для оценки формы ДНК вируса использовали отношение числа копий гена E2 к числу копий гена E6 (E2/E6). Форму ДНК определяли как интегрированную, если ген E2 не обнаруживали (E2/E6 = 0), эписомную — если количество копий гена E2 равнялось количеству копий гена E6 (E2/E6 = 1). Если число копий гена E2 было меньше числа копий гена E6, форму ДНК определяли как смешанную (E2/E6 < 1) [12].

Результаты определения статуса ДНК ВПЧ 16 типа в клинических пробах представлены на рис. 4. У женщин без атипии эписомную форму ДНК вируса типа выявили в 3-х случаях из 15-ти, смешанную — в 12-ти. В случаях легкой дисплазии эписомная форма ДНК была обнаружена в 2-х пробах из 8-ми, смешанная — в 6-ти. В пробах, полученных от женщин без атипии и с ЦИН I, интегрированная форма вируса не встречалась. При умеренной и тяжелой дисплазии эписомная форма ВПЧ была обнаружена в одном случае из 19-ти, смешанная — в 17-ти, и в одной пробе была выявлена интегрированная форма ДНК. У женщин с РШМ эписомная форма вируса была выявлена в 3-х случаях из 10-ти, смешанная — в 4-х, интегрированная — в одном.

Мы получили несколько иную картину распространенности различных форм ДНК вируса 16 типа, когда включили в анализ случаи инфицирования только 16 типом (рис. 5). В 2-х из 6-ти случаев цитологической нормы была выявлена эписомная форма ДНК, в 4-х — смешанная. В одной из 4-х проб, полученных от женщин с легкой дисплазией, была обнаружена эписомная

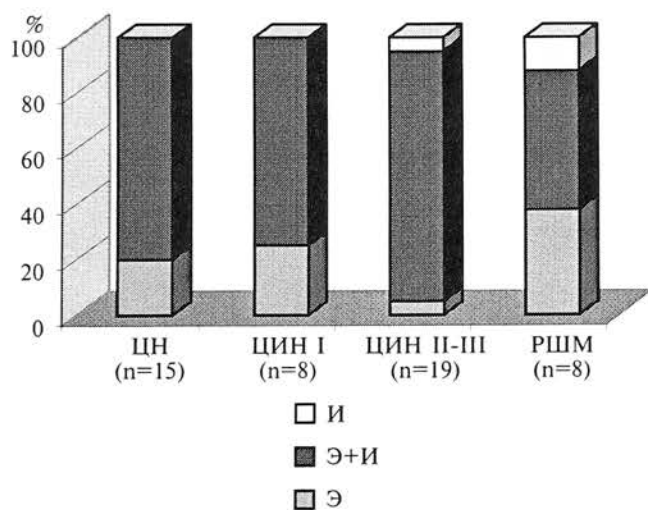


Рис. 4. Статус ДНК ВПЧ 16 типа во всех случаях инфицирования 16 типом:

И — интегрированная форма ДНК; Э + И — сочетание эписомной и интегрированной форм ДНК; Э — эписомная форма ДНК

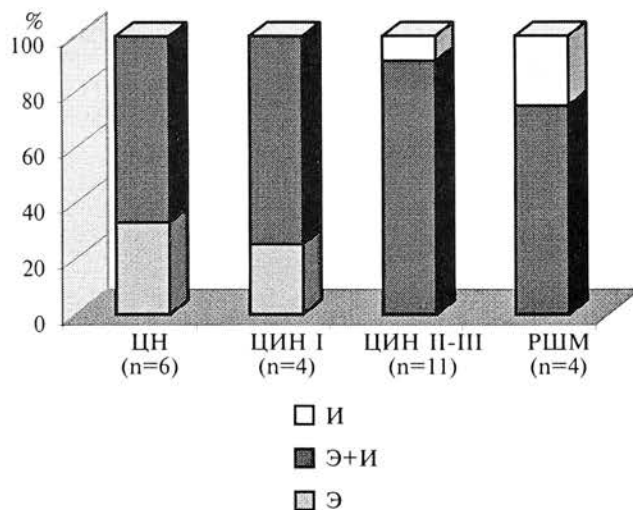


Рис. 5. Статус ДНК ВПЧ 16 типа в случаях инфицирования только 16 типом ВПЧ:

И — интегрированная форма ДНК; Э + И — сочетание эписомной и интегрированной форм ДНК; Э — эписомная форма ДНК

форма ДНК ВПЧ, в 3-х — смешанная. При высокой степени дисплазии и плоскоклеточной карциноме эпидермальная форма вируса не встречалась. У 10-ти из 11-ти женщин с высокой степенью дисплазии (II–III) ВПЧ 16 типа был выявлен в смешанной форме, у одной — в интегрированной. Одна из 4-х проб, полученных от женщин с РШМ, содержала интегрированную форму ДНК ВПЧ 16 типа, 3-х — смешанную. Применение критерия Крускала–Уоллиса для случаев инфицирования только 16 типом ВПЧ позволило выявить ассоциацию между степенью дисплазии и степенью интеграции, определяемой отношением количества копий гена E2 к количеству копий гена E6 ($p < 0,25$).

Обсуждение результатов

Характерной особенностью папилломавирусов является высокая гетерогенность, которая прослеживается между изолятами различных этнических групп, в пределах одной популяции и даже у одного и того же человека [3]. С использованием типоспецифических праймеров, предназначенных для детекции 12-ти самых распространенных типов ВПЧ высокого онкогенного риска, мы определили тип вируса в 88-ми пробах, полученных от женщин с патологией шейки матки. На первом месте по распространенности оказался 16 тип, встречающийся почти в 61% всех случаев, остальные типы значительно уступали ему по частоте встречаемости. Интересно отметить, что второе место по частоте встречаемости занял не 18, а 35 тип, который к тому же гораздо чаще обнаруживался в случаях инфицирования несколькими типами ВПЧ, чем в случаях моноинфекции. ВПЧ 39, 52, 58, 59 и 66 типов в случаях карциномы не встречались, что может быть объяснено, однако, небольшим размером выборки.

На сегодняшний день не существует единого мнения о значимости множественной ПВИ для неопластической прогрессии, и данные о связи множественной ПВИ и степени заболевания противоречивы. В нашем исследовании в 43% случаев пациентки были инфицированы двумя и более типами вируса, и инфицирование несколькими типами вируса не было связано со стадией заболевания. По мнению многих авторов, множественная ПВИ, возможно, лишь отражает обычную сексуальную трансмиссию одновременно нескольких типов ВПЧ. Если учесть, что исследования на выявление ВПЧ становятся важным элементом в скрининге цервикальных неоплазий и РШМ, необходимость дальнейшего изучения данного аспекта не вызывает сомнений.

В качестве одного из факторов риска неопластической прогрессии рассматривается высокая вирусная нагрузка, однако ее прогностическая ценность на сегодняшний день однозначно не определена. Swan D.C. и соавт. (1999), сравнивая возможности разных методов при определении вирусной нагрузки, отметили, что ни один из применяемых в настоящее время методов не позволяет оценить количество копий ДНК вируса с такой точностью, как метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени [15]. С помощью этого метода они исследовали связь между количеством копий ДНК ВПЧ 16, 18, 31 и 45 типов и степенью дисплазии и показали, что среднее число копий ДНК существенно варьировалось в зависимости от типа ВПЧ, причем самые высокие показатели вирусной нагрузки были зарегистрированы для ВПЧ 16 типа. Кроме того, среднее количество копий ДНК ВПЧ 16 типа резко возрастало с увеличением степени дисплазии. Интересно отметить, что для других типов вируса данная закономерность не прослеживалась. Исследуя связь между количеством копий ДНК ВПЧ 16 типа и степенью дисплазии, Peitsaro P. и соавт. (2002) также пришли к выводу, что прогрессия заболевания тесно связана с вирусной нагрузкой [12]. Авторы высказали предположение, что первоначально большое число копий генома ВПЧ увеличивает вероятность интеграции вирусной ДНК в геном хозяина и, как следствие, развития заболевания.

Уже в ранних работах по изучению статуса генома ВПЧ было показано, что интеграция ВПЧ в клеточный геном может происходить на ранних стадиях заболевания, и эпидермальная и интегрированная формы вируса могут выявляться одновременно [2, 9]. Согласно полученным нами данным, в 12-ти из 15-ти проб, полученных от женщин без атипии, и в 6-ти из 8-ми проб, полученных от женщин с легкой дисплазией, часть ВПЧ 16 типа находилась в эпидермальной форме, часть — в интегрированной. Только в двух пробах вирусная ДНК была полностью интегрирована в клеточный геном: одна проба была получена от пациентки с карциномой *in situ*, вторая — от пациентки с раком шейки матки. В обоих случаях в пробах был обнаружен вирус только 16 типа.

Существует мнение, что характер интеграции ВПЧ 16 типа отличается от характера интеграции ВПЧ других онкогенных типов. Так, для ВПЧ 18, 31, 33, 35, 52 и 58 типов показано, что в случаях дисплазий и РШМ вирусный геном почти всегда интегрирован в геном хозяина, тогда как геном ВПЧ 16 типа может существовать в эпидермальной форме даже при карциноме [4, 13]. В свете полученных нами данных большой интерес вы-

зывают результаты работы, авторы которой изучали связь между физическим статусом вируса папилломы 16 и 18 типов и клиническими параметрами в 89 случаях дисплазий высокой степени и карцином [1]. ДНК вируса 16 типа была выявлена как в интегрированной (35%), так и в episomal (38%) формах; в 28% случаев были обнаружены обе формы ДНК. В противоположность этому во всех случаях выявления вируса 18 типа вирусная ДНК присутствовала исключительно в интегрированной форме. Особенно интересным представляется наблюдение авторов, что ДНК вируса 16 типа чаще обнаруживалась в episomal форме в случаях, когда имела место инфекция обоими типами вируса, чем в случаях, когда присутствовала ДНК только 16 типа. Авторы предположили существование своего рода конкуренции за клеточные сайты интеграции. Полная интеграция ВПЧ 18 типа в клеточный геном, по мнению авторов, может свидетельствовать о возможных различиях в поведении разных типов вируса при онкогенной трансформации и особой «агрессивности» некоторых типов ВПЧ. Возможно также, что в случаях инфицирования несколькими типами вируса в геном хозяина встраивается тип вируса, изначально представленный в большем количестве. В нашем исследовании в 1-м из 19-ти случаев дисплазии высокой степени (ЦИН II-III) и в 3-х из 8-ми случаев плоскоклеточной карциномы ДНК вируса содержалась в episomal форме. Интересно отметить, что во всех этих случаях имела место коинфекция другими типами вируса и, более того, количество ВПЧ 16 типа в этих случаях было относительно невелико — от 6×10^1 до $6,7 \times 10^2$ копий ДНК на 50 нг тотальной ДНК.

Чтобы в полной мере оценить прогностическую значимость полученных нами результатов, мы планируем продолжение данной работы и анализ повторного материала от этих женщин. Не вызывает сомнений, что всестороннее изучение явления интеграции ДНК ВПЧ в клеточный геном будет способствовать как пониманию биологии неоплазий, так и выработке критериев, позволяющих прогнозировать течение заболевания.

Литература

1. Badaracco G., Venuti A., Sedati A., Marcante M.L. HPV16 and HPV18 in genital tumors: significantly different levels of viral integration and correlation to tumor invasiveness // *J. Med. Virol.* — 2002. — Vol. 67. — P. 574–582.
2. Cullen A.P., Reid R., Campion M., Lorincs A.T. Analysis of the physical state of different human papillomavirus DNAs in intraepithelial and invasive cervical neoplasms // *J. Virol.* — 1991. — Vol. 65. — P. 606–612.
3. Herrington C.S. Human papillomavirus and cervical neoplasia. Classification, virology, pathology, and epidemiology // *J. Clin. Pathol.* — 1994. — Vol. 47. — P. 1066–1072.
4. Hudelist G., Manavi M., Pischinger K.I. et al. Physical state and expression of HPV DNA in benign and dysplastic cervical tissue: different levels of viral integration are correlated with lesion grade // *Gynecol. Oncol.* — 2004. — Vol. 92. — P. 873–880.
5. Inoue H., Nojima H., Okayama H. High efficiency transformation of with *Escherichia coli* plasmids // *Gene* — 1990. — Vol. 96. — P. 23–28.
6. Jeon S., Lambert P.F. Integration of human papillomavirus type 16 DNA into the human genome leads to increased stability of E6 and E7 mRNAs: implications for cervical carcinogenesis // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1995. — Vol. 92. — P. 1654–1658.
7. Klaes R., Woerner S.M., Ridder R. et al. Detection of high-risk cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer by amplification of transcripts derived from integrated papillomavirus oncogenes // *Cancer Res.* — 1999. — Vol. 59. — P. 6132–6136.
8. Lee S.Y., Rasheed A. A simple procedure for maximum yield of high-quality plasmid DNA // *Biotechniques* — 1990. — Vol. 9. — P. 676–679.
9. Lehn H.L., Villa L.L., Marziona F. et al. Physical state and biological activity of human papillomavirus genomes in precancerous lesions of the female genital tract // *J. Gen. Virol.* — 1998. — Vol. 69. — P. 187–196.
10. 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. — Vol. 348. — P. 518–527.
11. Nagao S., Yoshinouchi M., Miyagi Y., Hongo A., Kodama J., Itoh S., Kudo T. Rapid and sensitive detection of physical status of human papillomavirus type 16 DNA by quantitative real-time PCR // *J. Clin. Microbiol.* — 2002. — Vol. 40. — P. 863–867.
12. Peitsaro P., Johansson B., Syrjänen S. Integrated human papillomavirus type 16 is frequently found in cervical cancer precursors as demonstrated by a novel quantitative real-time PCR technique // *J. Clin. Microbiol.* — 2002. — Vol. 40. — P. 886–891.
13. Pirami L., Giache V., Becciolini A. Analysis of HPV16, 18, 31, and 35 DNA in pre-invasive and invasive lesions of the uterine cervix // *J. Clin. Pathol.* — 1997. — Vol. 50. — P. 600–604.
14. Roda Husman A.M., Walboomers J.M.M., van den Brule A.J.C. et al. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improved human papillomavirus detection by PCR // *J. General Virol.* — 1995. — Vol. 76. — P. 1057–1062.
15. Swan D.C., Tucker R.A., Tortolero-Luna G. et al. Human papillomavirus (HPV) DNA copy number is dependent on grade of cervical disease and HPV type // *J. Clin. Microbiol.* — 1999. — Vol. 37. — P. 1030–1034.

DETERMINATION OF VIRAL LOAD AND STATE OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS TYPE 16 USING REAL-TIME PCR

Shipitsyna E.V., Orzhetskova E.A., Babkina K.A., Savicheva A.M., Mikaya N.A., Orlova O.O., Yurkova I.K.

■ **Summary:** Integration of HPV DNA into the host genome is considered to be a key event in malignant transformation. This process results in disruption of E1 and E2 HPV genes, which is followed by up-regulation of HPV E6 and E7 oncogenes expression. It has been shown in this study that HPV type 16 is the most prevalent high-risk type in women with pathology of the cervix, with the frequency of HPV type 16 detection increasing along with the degree of neoplasia. With the use of real-time polymerase chain reaction the number of HPV type 16 DNA copies and its state were determined in clinical specimens. It was shown that the degree of the disease is associated with viral load and HPV physical state.

■ **Key words:** human papillomavirus; cervical intraepithelial neoplasia; cervical cancer; integration; physical status of DNA