

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
ХЕРСОНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**

**Факультет біології, географії і екології  
Кафедра біології людини та імунології**

**ОСОБЛИВОСТІ ВИЯВЛЕННЯ ІНФІКОВАНОСТІ  
НАСЕЛЕННЯ РІЗНИМИ ТИПАМИ ПАПІЛОМАВІРУСІВ  
МЕТОДАМИ ЛАБОРАТОРНОЇ ДІАГНОСТИКИ**

Кваліфікаційна робота (проект)  
на здобуття ступеня вищої освіти “магістр”

Виконала: студентка 2 курсу 211-М групи  
Спеціальності 091 Біологія  
Освітньо-професійної програми Біологія  
Година Оксана Вікторівна  
Керівник: к.б.н., доцент Бесчасний С.П.  
Рецензент: д.б.н., професор Ходосовцев О.Є.

## ЗМІСТ

<b>ВСТУП</b> .....	3
<b>РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ</b> .....	6
1.1. Вірус папіломи людини, загальна характеристика.....	6
1.1.1. Клініко – патогенитичні властивості інфекції. ....	12
1.1.2. Епідеміологія та тригерні фактори, які визначають клінічний перебіг папіломавірусної інфекції.....	17
1.1.3. Морфологічні зміни слизової шийки матки у жінок, інфікованих вірусом папіломи людини. ....	25
1.2. Методи діагностики вірусу папіломи людини. Метод полімеразно-ланцюгової реакції. ....	33
1.2.1. Історія відкриття методу. ....	34
1.2.2. Етапи та види полімеразно-ланцюгової реакції.....	36
1.2.3. Використання ПЛР в практиці.....	40
1.3. Умови проведення полімеразно - ланцюгової реакції у лабораторній практиці.....	43
1.3.1. Підготовка проб (виділення ДНК і РНК із біологічного матеріалу).....	46
1.3.2. Модифікація методу ПЛР або проведення зворотної транскрипції на матриці РНК.....	48
<b>РОЗДІЛ 2. ОРГАНІЗАЦІЯ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ</b> .....	52
2.1. Характеристика досліджуваних, взяття та транспортування матеріалу .....	52
2.2. Етапи та процес методу полімеразно ланцюгової реакції.....	52
2.2.1. Проведення аналізу.....	54
2.2.2. Підготовка та проведення полімеразно - ланцюгової реакції....	56
2.2.3. Реєстрація результатів ампліфікації.....	58
<b>РОЗДІЛ 3. АНАЛІЗ ТА ОБГОВОРЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ</b> .....	60
3.1. Загальні показники захворювання на рак шийки матки по Україні та Херсонській області.....	60
3.2. Тенденція захворюваності по Херсону та Херсонській області .....	60
3.2.1. Особливість типів високого онкогенного ризику .....	62
3.2.2. Особливості типів низького онкогенного ризику.....	64
<b>ВИСНОВКИ</b> .....	66
<b>СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ</b> .....	67

## ВСТУП

**Актуальність теми.** В останні роки відзначають підвищення частоти виявлення папіломавірусної інфекції.

На сьогодні відомо не менше 70 типів вірусів папіломи людини (ВПЛ), що визначає клінічний поліморфізм папіломавірусних уражень шкіри та слизових оболонок.

За даним міжнародного агентства по вивчиню рака, рак шийки матки (РШМ) – одне із найбільш розповсюджених онкологічних захворювань, займає друге місце по частоті поширення серед жінок во всьому світі, поступаючись тільки раку молочної залози. Кожен рік діагностується біля 500 тисяч випадків захворювання та 250 тисяч пацієнтів помирають. На сьогодні доказано, що папіломавіруси впливають на розвиток РШМ та інших злоякісних новоутворень уrogenітального тракту [42].

Одним із перших та основних методів діагностики передракових уражень став цитологічний аналіз мазка. Однак він став суб'єктивним методом та залежить від кваліфікації лікаря. Внаслідок чого програми цитологічного скринінгу не мали суттєво зменшити частоту розвитку РШМ. Міжнародне агентство по вивчиню рака рекомендує включати до програми популяційного скринінгу молекулярні тести для виявлення вірусу папіломи людини.

В наказі МОЗ України від 31 грудня 2004 року № 676 “Про затвердження клінічних протоколів з акушерської та гінекологічної допомоги”, вірусологічні методи дослідження при фонових та передракових захворюваннях шийки матки рекомендовані як додаткові за наявності показників, а молекулярно - біологічні методи не оговорюються взагалі. Тим не менш, для профілактики розповсюдження ВПЛ, попередження розповсюдження предраку та рака, зниження захворювання та смертності від РШМ необхідно підвищувати якість

діагностики папіломавірусної інфекції, використовувати всі доступні сучасні методи лабораторних досліджень.

**Мета дослідження** – дослідити особливості інфікованості населення Херсону та Херсонської області різними типами папіломавірусу.

**Завдання:**

1. Провести літературний огляд класифікацій, механізму дії та патологічних процесів, викликаних папіломавірусами. Визначити етапи та шляхи лабораторної діагностики вірусів;

2. Дослідити та виявити різні види папіломавірусу у жінок Херсону та Херсонської області;

3. З'ясувати залежність та варіативність видів папіломавірусу у жінок Херсону та Херсонської області.

**Об'єкт дослідження** – поширення різних типів папіломавірусу людини серед жіночого населення.

**Предмет дослідження** – варіативність виявлених типів папіломавірусу у жінок Херсону та Херсонської області за онкогенністю.

**Методи дослідження** – для досягнення мети та вирішення поставлених задач використовували наступні методи: аналіз та синтез наукової та науково-методичної літератури з тематики дослідження; полімеразно – ланцюгова реакція; ампліфікація; статистичні методи.

**Наукова новизна одержаних результатів.** Встановлена статистична оцінка поширеності різних типів папіломавірусу серед жінок Херсону та Херсонської області.

**Практична значущість дослідження.** Отримані дані необхідні для уточнення статистичної оцінки інфікованості жінок Херсону і області, а також загальна онкологічна ситуація в місті та області. Отримані данні можуть бути використані при викладанні курсів «Клітинні основи кровотворення», «Імунологія», «Фізіологія людини і тварини», що викладаються в Херсонському державному університеті.

**Апробація результатів дослідження.** Робота була представлена в науково-методичній збірці “Метода”.

**Структура роботи.** Робота складається з трьох розділів, вступу, висновків та списку використаних джерел. У роботі присутні 10 рисунків і 5 таблиці.

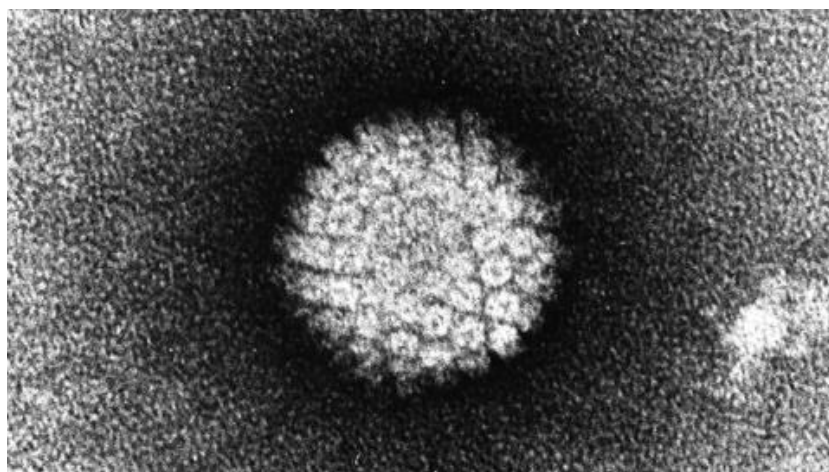
## РОЗДІЛ 1.

### ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ

#### 1.1. Вірус папіломи людини, загальна характеристика

Віруси папіломи людини – широко розповсюджена та дуже варіабельна група вірусів, володіючих онкогеним потенціалом. ВПЛ – передається при тісному контакті з інфікованим та ураженим епітелієм. Клітинами – мішенями для ВПЛ є епіталіальні клітини шкіри та слизових оболонок. Віруси мають продуктивний або трансформуючий вплив на епітелій. При продуктивному впливі виникають доброякісні новоутворення – папіломи та канділоми шкіри та слизових оболонок. Результатом трансформуючого впливу є дисплазії тяжкого ступеня, прогресуючий розвиток яких приводить до виникнення раку [1].

Вірус папіломи – ДНК вірус (рис. 1.1). Впродовж циклу життя вірус вражає єдиний тип господаря. Загальним типом господаря вірусів папіломи є хребетні тварини (шимпанзе, макаки – резус, корови, олені, собаки, коні, вівці, слони, лосі, миші, черепахи, попуги) та людина [8].



**Рис. 1.1. Електронна мікрофотографія вірусу папіломи людини**

По класифікації вірусів, прийнятої на 7 Міжнародному Конгресі по таксономії, папіломавірус утворює сімейство – *Papillomaviridae* (International Congress of Taxonomy, 2001) [8].

Сімейство Papillomaviridae включає наступні роди: *Alphapapillomavirus*, *Betapapillomavirus*, *Gammapapillomavirus*, *Deltapapillomavirus*, *Epsilonpapillomavirus*, *Zetapapillomavirus*, *Etapapillomavirus*, *Thetapapillomavirus*, *Iotapapillomavirus*, *Kappapapillomavirus*, *Lambdapapillomavirus*, *Mupapillomavirus*, *Nupapillomavirus*, *Xipapillomavirus*, *Omikropapillomavirus*, *Pipapillomavirus*.

*Alphapapillomavirus* (HPV-2, HPV-3, HPV-6, HPV-7, HPV-10, HPV-13, HPV-16, HPV-18, HPV-26, HPV-28, HPV-32, HPV-33, HPV-34, HPV-40, HPV-42, HPV-45, HPV-52, HPV-53, HPV-54, HPV-55, HPV-57, HPV-61, HPV-66, HPV-67, HPV-68, HPV-69, HPV-71, HPV-77, HPV-81, HPV-84, HPV-cand85, HPV-cand86, HPV-cand89, HPV-cand90, HPV-cand91, HPV-cand94, PCPV=1, RhPV=1). Представники цього роду найчастіше вражають слизові роту, носу, очей та аногенітальної області. Для деяких типів (ВПЛ 2, 10) найбільш характерні шкірні ураження.

*Betapapillomavirus* (HPV-4, HPV-5, HPV-9, HPV-12, HPV-14D, HPV-17, HPV-20, HPV-23, HPV-25, HPV-38, HPV-47, HPV-48, HPV-49, HPV-50, HPV-60, HPV-65, HPV-75, HPV-88, HPV-cand92, HPV-cand96, BPV-1, BPV-2, DPV, OvPV-1, OvPV-2). Представники цього роду найчастіше вражають дерму. Для інфекції характерно латентний перебіг та активація при розвитку імунодефіциту. ВПЛ 9 та 49 типів пов'язані з веруциформною епідермодисплазією:

- *Epsilonpapillomavirus* (BPV (*Bovine papillomavirus*)-5)). Інфекція проявляється як шкірні папіломи у рогатої худоби.

- *Zetapapillomavirus* (EcPV (*Equus caballus papillomavirus*)-1, EcPV)). Інфекція проявляється як шкірні ураження у коней.

- *Etapapillomavirus* (FcPV (*Fringilla coelebs papillomavirus*)), ChPV (*Chaffinch papillomavirus*). Інфекція проявляється як шкірні ураження у птахів.

- *Thetapapillomavirus* (PePV (*Psittacus erithacus timneh papillomavirus*)). Інфекція проявляється як шкірні ураження у птахів.

- *Iotapapillomavirus* ( MNPV (*Mastomys natalensis papillomavirus*)), ROPV (*Rabbit oral papillomavirus*). Інфекція проявляється як шкірне ураження у гризунів.

- *Kappapapillomavirus* (CRPV (*Cottontail rabbit papillomavirus*)), ROPV(*Rabbit oral papillomavirus*). Інфекція проявляється як ураження шкіри та слизових у кролів.

- *Lambdapapillomavirus* ( COPV (*Canine oral papillomavirus*)), FDPV (*Felis domesticus papillomavirus*). Інфекція проявляється як ураження шкіри та слизових у котів та собак.

- *Murapapillomavirus* (HPV=1,HPV-63). Інфекція проявляється як шкірні ураження у людини.

- *Nurapapillomavirus* (HPV-41). Інфекція проявляється як злоякісне ураження шкіри та м'яких тканин у людини.

- *Xipapillomavirus* (BPV (*Bovine papillomavirus*))-3, BPV-4, BPV-6). Інфекція проявляється як істинні папіломи шкіри та слизових оболонок великої рогатої худоби.

- *Omikronpapillomavirus* (PsPV (*Phocoena spinipinnis papillomavirus*)). Інфекція проявляється як статеві бородавки у тварин сімейства китових.

- *Pipapillomavirus* (HaOPV (*Hamster oral papillomavirus*)). Інфекція проявляється як ураження слизових у хом'яків [5].

Вірус папіломи людини (ВПЛ) є поширеним і зазвичай тимчасова інфекція, яка недавно отримала увагу засобів масової інформації у зв'язку з розробками в області профілактики вакцин і змінами рекомендацій по скринінгу (Forcier et al., 2010). ВПЛ є етіологічним агентом загальні дерматологічні та венеричні захворювання. ВПЛ-інфекція є найбільш поширеним захворюванням, що передаються статевим шляхом, хоча вона зазвичай виліковується імунна система. У всьому світі ризик зараження по меншій мірі один раз в житті серед чоловіків і жінок 50% (Handler et al., 2015a). Хоча історично відомо як причина загальних і аногенітальних



бородавок, є з 1980 року були проведені великі дослідження з вивчення ролі ВПЛ у розвитку раку шийки матки та інших пухлин (Palefsky, 2016 року; Reid et al., 1980). Найпоширеніші типи у всьому світі ВПЛ 16 і 18, які є основними типами пов'язані з канцерогенезом. Обидва ВПЛ 16 і ВПЛ 18 є можна запобігти за допомогою вакцинації (Палефській, 2016). [9].

Геномові віруси папіломи (PV) містять 8 т.п.н. двухланцюгової кільцевої ДНК з 8 генами, кодуєчими білок (L1 і L2, які кодуєють капсидні білки та E1, E2, E4, E5, E6 та E7, які кодуєють білки, беручи участь у реплікаціях, транскрипціях та трансформаціях) та недіючу регуляторну область довгого контролю (LCR) (Bernard et al., 2006). ВПЛ атакують кератиноцити шкіри та слизові оболонки (De Villiers, 2013 рік; Vinzón et al., 2015). Вірус папіломи людини (ВПЛ) заражають тільки людей. Слизова оболонка  $\alpha$

Типи ВПЛ широко вивчені та дотепер вони найкраще характеризуються. Майже всі дослідження на ВПЛ отримують з аналізу роду  $\alpha$ , і, отже, більшість повідомленої інформації може бути віднесена лише до слизових ВПЛ, що належать до роду  $\alpha$ . ВПЛ є вірус з дволанцюговою циркулярною ДНК із сімейства папіломавірусів. Усі ВПЛ мають ікосаедричні капсиди. Вони включають гени, які експресують необхідні неструктурні білки для реплікації ДНК, транскрипції або вірусного складання та звільнення. Гени, транскрибовані пізно (L-гени), включають L1 і L2, що кодуєють вірусні капсидні білки, що називаються L1 і L2 відповідно. Виготовлено капсид вірусу папіломи з 2 структурних білків: основний основний білок (L1) та незначний основний білок (L2). Кожна капсида містить 72 пентамерних капсомерів, кожен з яких складається з 5 білків L1 та L2.

Вірусна збірка відбувається в ядрі клітини; L1 білок самозбирається у вірусоподібні частинки, тоді як L2 має менш відому

роль, але може бути залучений до виробництва віріону (Handler et al., 2015a; Palefsky et al., 1995) [69, 10].

У випадку інтеграції ДНК ВПЛ вірусні частки не виробляються, і це має назву непродуктивної ВПЛ – інфекції. Парадоксально, що продуктивна інфекція призводить до утворення гострокінцевих канділом, котрі мають дуже низьку ймовірність розвитку в предрак або рак, а непродуктивні плоскі канділоми, які зазвичай невидимі неозброєним оком, є набагато небезпечним ураженням [4, 44].

У випадку інтеграції вірусної ДНК в клітинний геном господаря відбувається продукція двох онкопротеїнів: Е6 та Е7, при взаємодії з ендогенними клітинними регуляторними протеїнами (p53 та pRb) відбувається дерегуляція циклу клітинної пргресії, що є критичною сходинкою цервікального плоскоклітинного канцерогенезу [11, 12].

Вираження білків Е6 і Е7 пов'язані з інтеграцією вірусних ДНК у геном господаря, зляксісне перетворення та в кінцевому рахунку прогресування раку (Forcier et al., 2010). Є 3 основні вірусні онкопротеїни (Е5, Е6 та Е7) сприяють ініціювання та прогресування раку шляхом зміни регуляції клітинного циклу та утримання теломерів, викликаючи пошкодження ДНК і геномна нестабільність, і блокування супресора пухлини шляхи та апоптоз.

ВПЛ проявляє тропізм у напрямку до епітеліальний базальний шар, в якому розміщується епітеліальний стебло дорослого клітини, відповідальні за поповнення епітелію с клітини дочки. Онкопротеїди Е6 / Е7 є первинними перетворюючи вірусні білки, і вони грають важливе значення роль в ухиленні імунітету шляхом націлення на експресію цитокінів щоб змінити проліферацію клітин та реакції інтерферону. Білки Е7 модулюють транскрипцію в геномі через їх взаємодії з гістоновими деацетилазами, які активуються транскрипція при видаленні з промоторів. Важливо, що експресія вірусних білків ВПЛ та вірусна інтеграція сприяє хромосомним аномаліям і клітинної іморталізації

(Moody et al., 2010; Pullos et al., 2015). Більше, ніж Ідентифіковано та класифіковано 200 різних типів ВПЛ на 5 родів,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\mu$ ,  $\nu$ . ВПЛ  $\alpha$  слизової високого ризику є найбільш вивченими і будуть зосереджені на наступному дискусії.

Типи ВПЛ з перевіреним онкогенним огляд захворювань та раку, пов'язаних з ВПЛ 81 тенденція, добре встановлена роль при раку шийки матки та значний відсоток інших аногенітальних шляхів та перорально карциноми належать до роду  $\alpha$  (McLaughlin-Drubin, 2015). При інтеграції в геном плоскоклітинного епітелію господаря типи ВПЛ з високим ризиком (16 і 18) будуть експресують ген Е6, який погіршить супресор пухлини білок р53. Е7, також виражений рано, є онкопротейном, що пов'язує протеїн супресорного ретинобластоми (рRB) і дозволяє синтезувати ДНК ВПЛ. Білок Е1 збільшує реплікацію вірусного генома, Е2 знижує експресію Е6 та Е7. Втрата функції репресії Е2 призводить до дерегуляції вірусних онкогенів Е6 та Е7 (Handler et al., 2015, 2004; Smith et al., 2014).

Серед типів низького ризику не онкогенний ВПЛ асоціюється з аногенітальними бородавками (AGWs), (Dunne et al., 2013), деякі види шкірних бородавок (Vinzón et al., 2015) та рецидивуючий респіраторний папіломатоз, в той час як онкогенні типи підвищеного ризику пов'язані з шийними, статевими членами, анальними, рак піхви, вульви та ротоглотки (Dunne et al., 2013). Група ВПЛ низького ступеня ризику 6 та 11 типу спричиняє 90% зовнішні аногенітальні бородавки (AGWs, condylomata), а також низькосортні зміни в цервікальних клітинах (Forsier et al., 2010; Schiffman et al., 2009). Інші типи ВПЛ з низьким рівнем ризику включають ВПЛ 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 та CP6108. Пов'язані високоризикові ВПЛ, зокрема ВПЛ 16 і 18 з повноцінною дисплазією шийки матки та аналом та інвазивною карцинома. Інші онкогенні типи ВПЛ включають ВПЛ 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82 (Schiffman et al., 2009; Muñoz et al., 2003) [6].

Ця клональна експансія пов'язана з їх трансформацією та подальшою іморталізацією. Трансформація та іморталізація клітин епідермісу контролюється генами ВПЛ, кодується ранніми білками Е6 та Е7. При цьому морфологічно спостерігається деформація внутрішніх шарів епідермісу та загальне потовщення шкіри. При цьому експресія пізніх генів L1 та L2 в даному етапі відсутня. Вона настає тільки на кінцевій стадії диференціровки в ороговілому шарі, де спостерігається активна збірка зрілих вірусних часток, їх виділення з клітин та почковання на поверхні шкіри. Ці ділянки шкіри інфекційно небезпечні в співвідношенні до контактного зараження [7].

Послідовне розмноження вірусу папіломи людини в окремих шарах епідермісу з остаточним почкованням в мертвих клітинах ороговілого шару являє собою окремий випадок тісного зв'язку життєвого циклу вірусу з фізіологічним процесом диференціровки та зміни епітеліальних клітинних елементів епідерміса та слизових оболонок відповідної локалізації [11].

Для виникнення незворотної інтраепітеліальної неоплазії необхідно:

- висока експресія вірусних генів Е6 та Е7;
- запуск метаболічних механізмів конверсії естрадіола в 16,2 – гідроксистерон (16,2 ОН);
- індукція множинних ушкоджень ДНК хромосом в інфікованій клітині, котра завершує процес переродження.

**1.1.1. Клініко – патогенетичні властивості інфекції.** Клініко - патогенетичні властивості інфекції обумовлені різними типами папіломавірусу людини.

Основним шляхом зараження ВПЛ є статевий шлях передачі інфекції. При цьому треба враховувати, що резервуаром ВПЛ є уретра, сперма, предміхурова залоза. Передача під час пологів через природні

родові шляхи виникає шляхом аспірації вагінального вмісту, що може привести до виникнення респіраторного (лорингеального) папіломатоза та шкірних уражень у новонароджених. При цьому інфекція впродовж багатьох років може розвиватися в букальних клітинах рота дитини та являтися причиною рецидивуючого респіраторного папіломатозу гортані. Описані випадки легеневого папіломатоза у дітей, народжених шляхом методу кесаревого розтину, що дає підставу про те, що є можливість трансплацентарної передачі інфекції [2, 3].

Інфікування людини може відбуватися як одним, так і декількома типами вірусу папіломи людини [19]. В деяких випадках (до 30%) впродовж 6-12 місяців відбувається мимовільна елімінація вірусу та лікування. В інших випадках спостерігається рецидивуючий перебіг, при якому можливий розвиток інтраепітеліальної неоплазії та ракового процесу (характерно для типів ВПЛ, володіючи високою трансформуючою активністю стосовно до епітеліальних клітин) [42].

Як встановлено, генітальна ВПЛ-інфекція має високу контагіозність та набувається під час перших статевих контактів. Зараження при одноразовому статевому акті відбувається приблизно в 60% випадках. Так, по даним ВООЗ, в світі щорічно фіксується приблизно 600 тисяч випадків рака шийки матки. Незважаючи на проведену терапію, у 45-45% хворих спостерігається несприятливий результат [16].

Володіючи високою специфічністю, різні типи ВПЛ викликають різні ураження шкіри та слизових. Нижче приведені типи ВПЛ, зустрічаються при різних захворюваннях (Табл. 1.1).

Таблиця 1.1.

**Типи вірусу папіломи людини, виявлені при різних ураженнях шкіри та слизових оболонок**

Клінічні прояви	Типи ВПЛ
<b>Шкірні ураження</b>	
Підшовні бородавки	1, 2, 4
Звичайні бородавки	1, 2, 3, 4, 7, 10, 26, 27, 29, 41, 48, 57, 60, 63, 65, 75, 78
Плоскі бородавки	3, 10, 28, 49
Бородавки Бютчера	7
Бородавча епідермодисплазія	5, 8, 9, 10, 12, 14, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 36, 39, 40, 47
Верруциформна епідермодисплазія	3, 5, 8, 9, 12, 14, 15, 17, 19в, 25, 36в, 38, 46, 47
Левандовського–Лютца	49,50
Небородавчаті шкірні ураження	37, 38
Фокальна гіперплазія епітелію	13, 32
Хвороба Боуена	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68
Карцинома	5, 8, 14, 17, 20, 47
<b>Ураження слизових геніталій</b>	
<i>Condylomata accuminata</i>	6, 11, 30, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 54, 55, 58, 59, 61, 64,
Гігантська конділома Бушке–Левенштейн	6, 11
Неконділоматозне ураження	43, 51, 52, 55, 56, 57, 58, 59, 64, 67, 69, 70
Карцинома	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 54, 56, 66, 68
<b>Ураження слизових оболонок не геніталій</b>	
Папілома гортані	6, 11, 30
Карцинома мигдалин	16, 33
Карцинома шеї, язика	2, 6, 11, 16, 18, 30

В практиці за своєю трансформуючою активністю до клітин всі відомі ВПЛ діляться на 3 основні групи [17]:

**Папіломавіруси низького онкогенного ризику** ( ВПЛ 1, 2, 3, 5, 6, 11, 13, 30, 32, 34, 40, 41, 42, 43, 44, 51, 53, 61, 72,73)

**Папіломавіруси середнього онкогенного ризику** (ВПЛ 30, 35, 45, 52, 53, 56, 58)

**Папіломавіруси високого онкогенного ризику** (ВПЛ 16, 18, 31, 33, 39, 50, 58, 59, 64, 68, 70). Перелік типів ВПЛ високого онкогенного ризику розширюється за рахунок уточнення будови ДНК та появи нових типів проміжного ризику. Папіломовірусна інфекція, обумовлена вірусами низького онкогенного ризику, найбільш часто проявляє себе продуктивною формою інфекції [41].

**Вульгарні бородавки** (*Common warts*) обумовлені папіломавірусом 2 типу. Шлях передачі інфекції – контактно- побутовий. Вульгарні бородавки являють собою епідермальнoderмальні папули сіро-бурого кольору з сосочковими розростаннями з зроговіннями та поверхнею. Вульгарні бородавки локалізуються на тильній поверхні кистей і пальців рук [18].

**Плоскі бородавки** (*Plane warts*) обумовлені папіломавірусом 3 та 5 типів. Бородавки це вузлики до 3-5 мм в діаметрі з плоскою поверхнею. Локалізуються на обличчі та тильній поверхні рук. Інфекція виникає переважно в підлітковому віці (юнацькі бородавки).

**Подошвені бородавки** (*Plantare warts*) обумовлені папіломавірусом 1 типу. Являють собою потовщення рогового шару епітелію розміром 5-8 мм, іноді неправильної форми, при натисканні болючі. Розвиваються в місцях тиску взуття.

**Гострокінцеві кондиломи** (*Condylomata acuminata*) обумовлені папіломавірусом 6,11 типу. Основний шлях передачі статевий. Згідно Міжнародної класифікації хвороб (МКХ), гострі кондиломи віднесені до інфекцій, котрі передаються статевим шляхом. Гострокінцеві кондиломи визначаються як утворення м'якої консистенції, мають дольчасту будову, за формою нагадують "цвітну капусту". Зазвичай розташовані на вузькій основі (ніжки). Локалізуються у чоловіків та жінок на статевих органах. Описано декілька різновидів гострокінцевих кондилом.

Так звані кератотичні бородавки являють собою себорейний

кератоз, нагадуючи за своєю будовою “цвітну капусту”. Також локалізуються на статевих органах [59].

Папульозні бородаки куполоподібно підняті над поверхнею шкіри та досягають в діаметрі 1-4 мм, мають гладку поверхню червоно-бурого кольору.

Кондилома Бушке-Левенштейна являє собою гігантську кондилому. Ця патологія найбільш часто розвивається на фоні зниження клітинного імунітету. В гінекологічній практиці зустрічається при вагітності [36].

**Папіломи шийки матки** (поєднуються з генітальними кондиломами). Клінічно виділяють наступні:

Екзофітні папіломи структурно аналогічні аногенітальним кондиломам. При гістологічному дослідженні виявляють койлоцитоз, іноді цервікальні інтраепітеліальні неоплазії I, II ступеня [14].

Ендофітні папіломи (плоскі кондиломи) локалізуються в товщі епітелія, діагностуються при кольпоскопічному дослідженні. Ендофітні папіломи схильні до злоякісного перебігу. Злоякісна трансформація розвивається у 4-10 % жінок впродовж 3-5 років [20].

Для папіломавірусної інфекції, обумовленої ВПЛ високого онкогенного ризику, характерний розвиток бовеноїдного папульоза та плоскоклітинних інтраепітеліальних неоплазій шийки матки [39].

**Бовеноїдний папульоз** (*Bowenoid papulosis*) може бути обумовлений ВПЛ 16, 18, 31, 35, 39, 42, 48, 51, 54 типу. Клінічно проявляється куполообразними та плоскими папулами. Іноді визначаються плями з гладкою чи оксамитовою поверхнею. В осередку ураження слизової елементи набувають сірувато-білого кольору з коричневато або помаранчево-червоним відтінком. Бовеноїдний папульоз описаний у осіб, які мають багато статевих партнерів, що може свідчити о статевому шляху передачі інфекції. Хвороба зазвичай протікає доброякісно, тенденції до інвазивного росту відзначається рідко [38].



**Легка неоплазія шийки матки LSIL** (*Low grade Squamous Intraepithelial Lesions*), цервікальна інтраепітеліальна неоплазія I (CIN I) та ВПЛ – індуковані морфологічні зміни (койлоцитоз), помірною неоплазією шийки матки HSIL (*High grade Squamous Intraepithelial Lesions*), CIN-II, виражена неоплазія чи інтраепітеліальний рак (*in situ*) CIN- III, рак шийки матки (плоскоклітинна карцинома, *Cervical cancer*) – форми перебігу інфекційного процесу, який діагностується при кольпоскопічному чи гістологічному дослідженні [40].

**1.1.2. Епідеміологія та тригерні фактори, які визначають клінічний перебіг папіломавірусної інфекції.** Багаточисельні епідеміологічні дослідження дозволили визначити розповсюдженість ВПЛ – інфекції в різних країнах світу (35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57) (табл. 1.2.).

Згідно з літературними даними, у жінок Європи та Америки превалює папіломавірус 16 типу [22], тоді як в Індонезії більш ніж у 50% інфікованих жінок виявляється папіломавірус 18 типу [23].

Більш висока поширеність РШМ, пов'язана з ВПЛ 45 типу в Африці, ВПЛ 52 та 58 типу – в Китаї та Японії [24].

На даний час різноманітні клінічні прояви ВПЛ, здатні або рецидивувати, або спонтанно зазнавати зворотного розвитку, пов'язують з різними тригерними факторами, які можуть визначити перебіг і прогноз захворювання.

Таблиця 1.2.

**Поширеність ВПЛ високого онкогенного ризику**

<b>Країна (регіон)</b>	<b>Кількість обстежених, людей</b>	<b>Кількість, інфікованих %</b>
Франція	3091	36,60
Китай(Гонконг)	2080	37,90
Японія	1928	38,80
США	3863	39,20
Росія (Московський регіон)	8533	42,60
Білорусь	687	38,57

Тригерними факторами ВПЛ- інфекції є:

1. Сексуальна поведінка.

Як встановлено, папіломавірусна інфекція тісно пов'язана з сексуальною поведінкою. Серед критеріїв ризикованої сексуальної поведінки прийнято виділяти наступні: ранній початок статевого життя (до 17 років), кількість статевих партнерів впродовж останнього року (більше 3), значна кількість статевих партнерів впродовж сексуального життя (більше 6). Серед жінок, інфікованих ВПЛ, з ризикованою сексуальною поведінкою відзначається статистично значимо частіше ( $p < 0,001$ ), ніж серед жінок контрольної групи, де ВПЛ – інфекція не була виявлена. Зв'язок між ризиком зараження ВПЛ, виникненням РШМ та сексуальною поведінкою добре узгоджується з епідеміологічними даними, отриманих в незалежних дослідках з використанням різних методів аналізу [33].

Виявлено також, що на ризик появи цервікального раку надає вплив сексуальної поведінки партнера. Підвищений ризик розвитку раку шийки матки був відзначений у жінок, статеві партнери які мали статеві зв'язки з жінкою, померлою від раку шийки матки; партнери яких мали безліч полових зв'язків; партнери яких мали генітальні ураження, викликаних ВПЛ, чи карциному статевого члена.

При аналізі сексуальної поведінки пацієток, у яких була виявлена ВПЛ – інфекція (група спостереження), та пацієток без ВПЛ – інфекції (група контролю) одержані дані (табл. 1.3) [30].

Таблиця 1.3.

**Ризикована сексуальна поведінка**

<b>Фактор ризику</b>	<b>ГН (n- 341). Абс. числ. (%±m)</b>	<b>ГК (n – 346) Абс. числ. (%±m)</b>	<b>Всього (n – 687) Абс. числ. (%±m)</b>
Сексуальний дебют до 17 років	73 (21,4±2,2)	61 (17,6±2,1)	134 (19,5±1,5)
3 та більше партнерів впродовж року	54 (15,8 ± 1,9)	47 (13,6 ± 1,8)	101 (14,8 ± 1,4)
Більше 6 статевих партнерів	47 (13,8±1,9)	39 (11,3±1,7)	86 (12,5±1,3)
Ранній сексуальний дебют + 3 та більше партнерів за рік	21 (6,2±1,3)	18 (5,2±1,2)	39 (5,7±0,9)
Ранній початок статевого життя + 6 та більше статевих партнерів	29 (8,5±1,5)	17 (4,9±1,2)	46 (6,7±0,9)
3 та більше партнерів за рік +6 та більше полових партнерів	17 (4,9±1,9)	15 (4,3±1,1)	32 (4,7±0,8)
Ранній початок статевого життя +3 та більше партнерів за рік +6 та більше статевих партнерів	19 (5,6±1,2)	20 (5,8±1,3)	39 (5,7±0,9)
Всього	260 (76,3 ± 2,3)*	217 (62,7 ± 2,6)	477 (69,4 ± 1,8)

\*Статистично значимо по відношенню до контрольної групи  $p < 0,001$

На даний час обговорюється також роль чоловічого обрізання

(циркумцизии) як фактора, який знижує ризик зараження ВПЛ та розвитку рака шийки матки у статевих партнерок. Заслуговує уваги дослідження X. Castellsague, F.X. Bosch об'єднали дані дослідження 1913 подружніх пар в п'яти країнах Західної Європи. Інфікування ВПЛ було виявлено у 19,6 % чоловіків, які не проводили обрізання, та у 5,5 % чоловіків, які пройшли цю процедуру [58].

Статеві партнерки чоловіків, які пройшли процедуру обрізання мали низький ризик зараження ВПЛ та розвитку шийки матки, чим у жінок, статеві партнери яких не проходили цю процедуру. Найнижчий ризик зараження ВПЛ та розвитку рака шийки матки також спостерігалися у моногамних жінок в тому випадку, якщо їх статевим партнерам, які мали багато позашлюбних статевих зв'язків (більш як 6 статевих партнерів), було проведено обрізання. Цей факт пояснюють тим, що білки смегми, можливо, мають канцерогенні властивості. Однак, на думку С.С. Ragin, Е.Р. Taioli білки – канцерогени (гістон, протамін) містяться в смегмі, а в спермі, тому, що ними було виявлено, що протамін сперми в культурі тканини здатен викликати атипію шийки матки [32].

## 2. Зміни імунного статусу.

Імунна система в захисті від ВПЛ простежується при спостереженні за пацієнтами з імунологічною недостатністю. Встановлено, що розповсюдженість ВПЛ – інфекції та цервікальних інтраепітеліальних неоплазій у жінок, інфікованих ВІЛ, у 2 - 4 рази вище в порівнянні з ВІЛ – негативними. Інфікованість ВПЛ та захворюваність СІН у жінок на фоні імуносупресивної терапії при операціях по трансплантації зростає до 10-14 разів [34].

З урахуванням тропності ВПЛ до багатошарового плоского епітелію велике значення має система місцевого захисту репродуктивної системи. Шкіра та слизові оболонки є механічним та функціональним бар'єром. В системі місцевого захисту виділяють гуморальні фактори (інтерферони, інтерлейкіни, лізоцим, імуноглобуліни) та клітинні

фактори (макрофаги, Т-та В- лімфоцити). В захисті від папіломавірусної інфекції важливу роль відіграють моноклеарні клітини та клітини Лангерганса. Їх ефективність обумовлена антигенпрезентуючою функцією. За літературними даними при цервікальних інтраепітеліальних неоплазіях та раку шийки матки місцеві порушення антигенпрезентуючою здібністю епітелію цервікального каналу супроводжується змінами активності клітинної ланки імунної системи. Характерна активація Т – лімфоцитів. Встановлено, що цитотоксична дія Т- лімфоцитів спрямована на руйнування кліток CIN III, презентуючи білки E6 та E7 папіломавірусу 16 типу [35].

Також активно вивчається механізм міграції в осередок ВПЛ – інфекції макрофагів та інших ефекторних клітин. Імуноглобуліни мають суперечливі дані в захисті організму від ВПЛ. В клінічній практиці найбільш часто використовується загальна кількість імуноглобулінів, однак найбільшим показником є виявлення антитіл, специфічних до ВПЛ, є дані о значному збільшенні порівняно з нормою вмісту IgA та IgG до білків ВПЛ типу 16 у пацієнток з CIN [37].

Таким чином, ВПЛ – інфекція впливає на багато компонентів імунітету на системному та локальному рівні.

Основну роль в регуляції імунної відповіді грають цитокіни, які є великою групою факторів міжмолекулярної взаємодії. В цю групу входять інтерферони, інтерлейкіни, ростові фактори. Синтезувати цитокіни здатні різні клітини. Найбільшу роль в протівірусному захисту грають клітини, які знаходяться в прямому контакті з вірусом.

Цитокіни діляться на групи згідно з назвою клітин їх основних продуцентів (лімфокіни, монокіни, цитокіни типу Th1 та Th2), а також згідно з головними принципами чи об'єктами їх дії (хемокіни, про – та протизапальні цитокіни). Лімфоцити типу Th1 виробляють протизапальні цитокіни, інтерлейкіни (ІЛ-1, ІЛ-2), ІФН, фактор нікрозу пухлини (ФНП)-фактор протівірусний, протипухлинний, антибактеріального захисту.

Лімфоцити типу Th2 виділяють ІЛ-4, -5, -6, -9, -10, -13, при чому ІЛ-10 володіє яскраво вираженими протизапальними та імуносупресорними властивостями.

За численними дослідженнями встановлено, що система ІФН забезпечує неспецифічний протівірусний захист організму. ІФН являє собою гетерогенний клас білків, які продукуються на дію різних агентів (індукторів) та здатних пригнічувати репродукцію широкого кола мікроорганізмів. ІФН має такі функції: захист організму від проникнення чужорідної генетичної інформації, підтримання гомеостазу. ІФН є ефективними імуномодуляторами та можуть впливати на імунну систему яка стимулює, так і інгібує в залежності від дози та тривалості впливу на організм.

Різноманіття функцій ІФН свідчить про те, що вони є елементами складного ланцюга цитокінів, гормонів, простагландинів та регуляторів апоптозу, дія яких взаємно регулюється та частково дублюється [13].

### 3. Використання оральних контрацептивів.

Обговорюється роль гормонального статусу як можливого тригерного фактору, який може впливати на ризик інфікування ВПЛ – інфекцією. Було доведено, що при використанні контрацептивів збільшується ризик виникнення раку шийки матки при прояві ВПЛ – інфекції. Так за даними IARC, використання комбінованих оральних контрацептивів менш ніж 5 років не асоціюється зі збільшенням частоти розвитку раку шийки матки, відносний ризик цієї хвороби при прийманні оральних контрацептивів від 5 до 9 років складає 2,72%, понад 10 років – 4, 48%. В результаті досліджень, проведених в латиноамериканських країнах було виявлено, що використання оральних контрацептивів приводить до збільшення ризику виникнення аденокарциноми, а не плоскоклітинних кондилом [43,45,46].

### 4. Авітамінози.

Дослідниками доведено збільшення ризику ураження ВПЛ при

нестачі вітаміну А, В-каротіна, вітаміну С та фолієвої кислоти. В літературі є дані о захисної ролі каротиноїдів при канцерогенезі [47].

#### 5. Інфекції, що передаються статевим шляхом.

Епідеміологічні дані вказують на те, що наявність хоч би однієї, а можливо й декількох інфекцій які передаються статевим шляхом прискорює розвиток цервікальної дисплазії та являється фактором ризику розвитку рака шийки матки. Ще до виявлення ВПЛ – інфекції обговорювалася роль герпетичної інфекції, оскільки в ряді досліджень було показано, що до 80% жінок, хворих на рак шийки матки, мали ознаки попередньої інфекції ВПГ-2. Однак герпетична інфекція статевих органів не була асоційована з випадками цервікального раку в 100%. Показано, що у жінок з герпесвірусною інфекцією статевих органів спостерігалось збільшення ризику подальшого розвитку рака шийки матки приблизно у 2-4 рази [49].

В розвитку рака шийки матки є взаємодія ВПЛ з іншими вірусами герпесу. Показано, що цитомегаловірус людини також здатен посилювати трансформацію кліток, інфікованих ВПЛ *in vitro*, та може брати участь в розвитку цервікальних неоплазій [51].

Передбачається, що при ВІЛ - інфекції може розвиватися дисплазія, яка прогресує швидше, ніж зазвичай. Згідно з цією гіпотезою ВІЛ- індукована імуносупресія може пришвидшити прогресію попередніх уражень в тяжкому стані ВІЛ та ВПЛ можуть взаємодіяти безпосередньо [54].

Наявність клітинних атипій у пацієток з перерахованими інфекціями досягає 28%. У хворих з підозрою на онкогінекологічну патологію шийки матки бактеріальний вагіноз виявляється частіше (50,3%) ніж у практично здорових жінок(41,2%). У жінок хворих на плоскоклітинний інтраепітеліальне ураження шийки матки відмічається збільшення частоти виділення та надлишковий ріст условнопатогенної мікрофлори. Ентеробактерії висівалися у 2,5 раза, ентерококи та

стафілококи – у 2 рази частіше ніж у здорових жінок. Також можуть бути виявлені анаеробні бактерії – клостридії, грампозитивні анаеробні коки (пептострептококи).

Актиноміцети – бактерії, не характерні для нормальної мікрофлори, виділяються у 2 рази частіше у хворих з вираженим плоскоклітинним інтраепітеліальним ураженням шийки матки. Крім того для всіх хворих, особливо з низьким їх ступенем, характерна висока частота виділення *Gardnerella vaginalis* (58% у хворих, при нормі 3%). Також відмічається значна контамінація піхви та шийки матки дріжджоподібними грибами роду *Candida* (40% у хворих, при нормі 3%). Таким чином, при різних дослідженнях виявлено що у хворих з цервікально - інтраепітеліальним ураженням свідчить о наявності дисбактеріозу піхви, який проявляється в значному зниженні виділення нормальних представників вагінального мікробіоценозу – лактобактерії та біфідобактерії – на фоні надлишкового росту умовно - патогенної флори.

Часте поєднання бактеріального бактеріозу та генітального кандидозу у хворих з кандиломатозом шийки матки свідчить о наявності єдиних механізмів в генезі цих захворювань (порушення вагінального мікробіоценозу та місцевих факторів захисту), що дозволяє характеризувати їх як клінічні прояви імунологічної недостатності при ВПЛ шийки матки [60].

#### 6. Куріння.

Серед факторів, які сприяють інфікуванню ВПЛ та прогресуванню інфекційного процесу, деякі автори виділяють куріння. Похідні нікотину та інші похідні диму (3-4 –бензпірен, антрацен) були виявлені в цервікальному слизу курців. Під дією цих речовин в шийки матки зменшується кількість клітин Лангерганса, які є важливою часткою Т-лімфоцитарної ланки клітинно-опосередкованого імунітету, який протистоїть впровадженню онкогенних факторів, зокрема ВПЛ.



Допускається канцерогенна роль табачного диму нікотину та котоніну, які мають здатність перетворюватися в канцерогенні агенти нітрозаміни в присутності специфічної бактеріальної інфекції.

### 7. Урбанізація.

В літературі є данні, які розглядають урбанізацію як тригерний фактор перебігу ВПЛ -інфекції. Згідно з даними ряда авторів, ризик розвитку CIN та раку шийки матки певно вище у жінок, які живуть в великих городах, ніж у жінок які проживають в сільській місцевості [63].

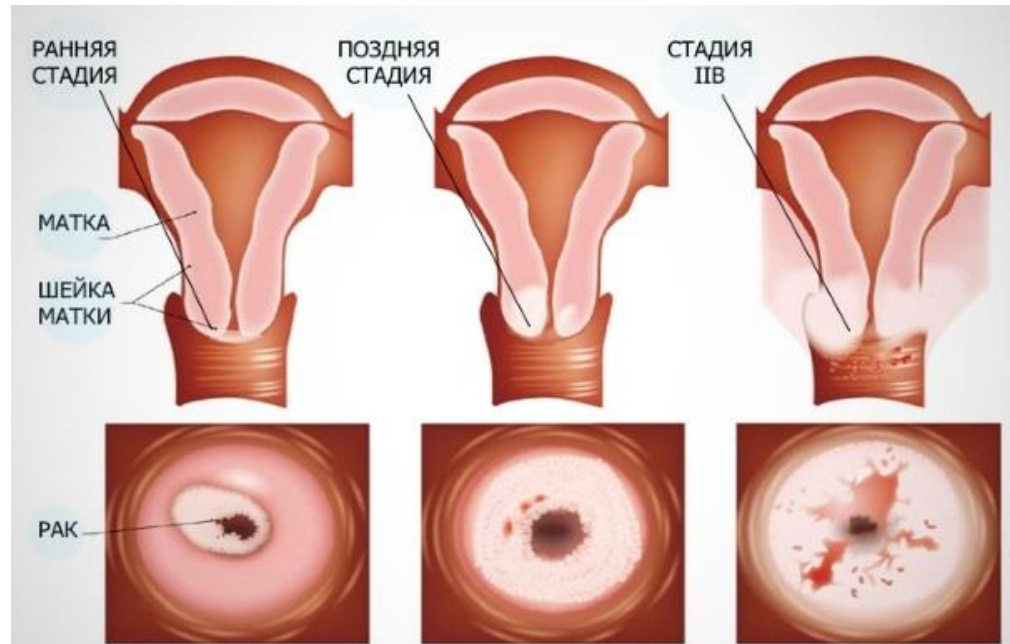
**1.1.3. Морфологічні зміни слизової шийки матки у жінок, інфікованих вірусом папіломи людини.** При потраплянні в організм вірус папіломи людини інфікує камбіальний шар епітелію. Мішенню для онкогенних вірусів, є зона трансформації шийки матки, де і розвивається пред ракові зміни шийки матки. В нормі в області зовнішнього зеву шийки матки багат шаровий плоский епітелій вагінальної частини шийки матки переходять в залозистий епітелій цервікального каналу. На даній ділянці чутливі до ВПЛ- інфекції клітини базального шару епітелію розташовані найбільш близько до поверхні та створюють сприятливі умови для інфікування ВПЛ. В зараженій клітині вірус може існувати в різних станах: епісомальна форма (поза хромосом клітин) вважається доброякісною, інтегрована (вбудована в геном клітини) розцінюється як злоякісна форма персистирования вірусу [64].

Генітальні типи ВПЛ можуть інфікувати будь- яку частину урогенітального тракту, включаючи шийку матки, піхву, вульву та періанальну область. Ураження можуть регресувати, персистувати та прогресувати.

### ВПЛ 16 типу

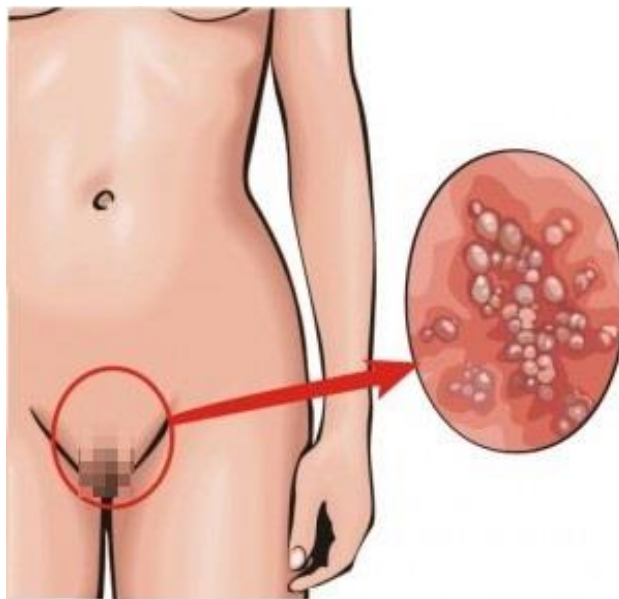
16-ий тип вірусу найонкогенніший. Потрапляючи в організм через слизову, ВПЛ довгий час залишається латентним. Через деякий період на цьому місці виникає новоутворення: плоскої папіломи або кондиломи. Зміни на шийці матки призводять до високого ризику розвитку атипичних

клітин, які призводять до онкології (рис.1.2.).



**Рис. 1.2. Зміни на шийці матки**

Папіломи можуть проявити себе на абсолютно різних ділянках тіла (рис. 1.3.)



**Рис. 1.3. Місце розповсюдження ВПЛ**

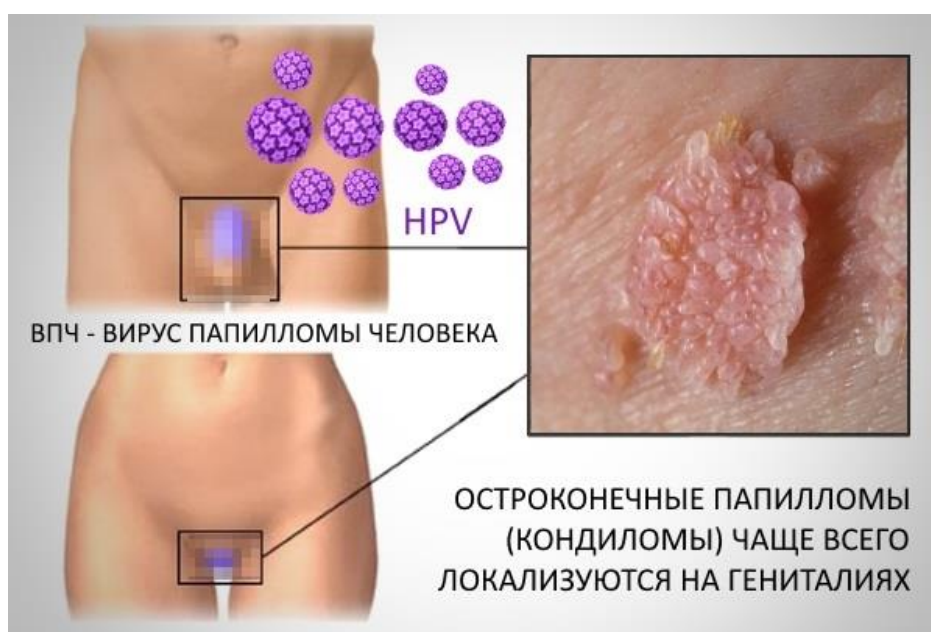
- на слизовій оболонці геніталій.
- в слизовій порожнині рота та носа.
- на ділянках з потоншеною дермою.
- на шиї, обличчі або пахвових ділянках.

Колір найчастіше тілесний, відтінок може бути трохи світліше або темніше.

Папіломи, які локалізуються на слизовій поверхні геніталій, мають гостру форму.

ВПЛ 18 типу

18-ий тип — це новоутворення на шкірі або на слизових тканинах, найчастіше на геніталіях (рис. 1.4.) Їх можна розділити на 3 види за формою:



**Рис. 1.4. Місце локалізації на зовнішній вигляд гостокінцевої  
кондиломи**

Хоча термін немеланомний рак шкіри (NMSC) включає шкірні лімфоми, придаткові пухлини, Капоші саркоми, клітини Меркель та інші рідкісні первинні шкірних новоутворень, його в основному використовують для визначення базальної клітини карциноми (ОЦК) та плоскоклітинні карциноми (СКЦ) (Abbas et al., 2016). BCC та SCC - два найпоширеніші підтипи NMSC (Callens et al., 2016). ВПЛ має були причетні до кількох НМСК (Cobos et al., 2014). В ВПЛ були виявлені в НМСК, хоча зазвичай з дуже низькі вірусні навантаження. Різні дослідження повідомляють про ВПЛ ДНК у 30-50% НМСК у

імунокомпетентних пацієнтів, тоді як при ураженнях хворих на імуносупресію цей показник сягає до 90%, як правило, також в інших невірусних інфекціях (Vinzón et al., 2015; Gisondi та ін., 2015). Borgogna та ін. (2014) першими продемонстрували активну  $\beta$ -папіломавірусну інфекцію при ураженнях шкіри від отримувачів трансплантації нирки. Ці віруси також можуть бути виявлені в премагнійних ураженнях, таких як актинічний кератоз, де вірус транскрипційно активний, а також у нормальній шкірі, вітілігоїдні ділянки, що піддаються лікуванню та вищипуються волосся брів, де в кількох дослідженнях було виявлено зв'язок між наявністю вірусної ДНК та підвищеним ризиком NMSC (Vinzón et al., 2015; Neale et al., 2013; Borgogna та ін., 2012; Dell'Oste et al., 2009; Cazzaniga et al., 2009).

Примітно, що, здається, існує зворотна кореляція між вірусною навантаженням та злоякісністю ураження, що підтримує механізм канцерогенезу, що знаходиться в положенні, який знаходиться в на відміну від прямого канцерогенного ефекту від генітальних ВПЛ (Vinzón et al., 2015; Quint et al., 2015; Howley et al., 2015).

Іншими словами, оскільки у деяких пухлин або немає ВПЛ, або тільки кожну 10-1000 клітин може бути виявлено вірусно-позитивну, вірусних онкопротеїнів не потрібно підтримувати проліферативний та пухлиногенний фенотип. Окрім звіти зосереджені на кореляції між  $\beta$  PV ДНК та захворювання, численні сероепідеміологічні дослідження також внесли дані, що дозволяють запропонувати зв'язок між  $\beta$  PV інфекція та НМСК або її попередники. Генітальний з високим ризиком Відомо, що типи ВПЛ погіршують p53, тим самим блокуючи низхідні шляхи, такі як апоптоз (Vinzón et al., 2015 рік; Moody et al., 2010).

Хоча білок  $\beta$  HPV E6 не може виконувати цю пряму функцію, це було показано нещодавно що білки E6 деяких  $\beta$  типів можуть інгібувати опосередковане NIPK2 фосфорилування p53 при сериновому залишку у відповідь на ультрафіолетове (УФ) пошкодження (Vinzón et al., 2015;

Muschik et al., 2011). Це перешкоджає стабілізації p53 у відповідь на дестабілізуючі події геному (Vinzón et al., 2015; Wallace et al., 2014) та блокує трансактивацію генів-мішеней p53 (тобто MDM2, p21 та проапоптотичних генів) (Vinzón et al., 2015; White et al., 2014). Крім того,  $\beta$  HPV Е6 націлений на проапоптотичний білок Bak для деградації (Vinzón et al., 2015; Jackson et al., 2000; Underbrink et al., 2008). Ці ефекти, як правило, поєднуються з механізмами, які затримують відновлення ДНК (наприклад, діяльність ATR (Vinzón et al., 2015; Wallace et al., 2012) або порушення системи теломер / теломераза (Vinzón et al співавт., 2015; Gabet et al., 2008) може пояснити внесок  $\beta$  HPV в канцерогенез шкіри, сприяючи накопиченню УФ-пошкоджених клітин. Онкогенний потенціал  $\beta$  ВПЛ також показано в трансгенних моделях *in vivo* які розвивають SCC у відповідь на експресію гена  $\beta$  HPV, або спонтанно, або після УФ-опромінення (Vinzón et al., 2015 рік; Schaper et al., 2005; Viarisio et al., 2011). Далі робота надала підтримку онкогенного потенціалу Е6 Hufbauer та ін. (2015). Вони продемонстрували, що клітини, що експресують Е6, не відчують і не створюють ефективної реакції для відновлення уражених ультрафіолетовими ураженнями ДНК та показав фізіологічну приналежність інгібування опосередкованого Е6 відновлення пошкодження ДНК для ініціації пухлини.

Це перші механістичні дані *in vivo* про пухлиногенність ВПЛ 8 і продемонструють, що пошкодження ДНК пошкоджує шляхи вірусного білка Е6 є критичним фактором Канцерогенез шкіри, спричинений ВПЛ (Hufbauer et al., 2015). Золотий сигнальний шлях є ключовим фактором у диференціації кератиноцитів та зупинці циклу росту повідомлялося про функцію пригнічення пухлини на шкірі. Дві групи показали, що ВПЛ типу 8 Е6 підриває активацію NOTCH під час диференціації кератиноцитів шляхом інгібування транскрипційного активатора RBPJ / MAML1 комплекси НЕТЧ-цільової ДНК. Пригнічення NOTCH погіршує диференціацію епітелію, що потенційно сприяє реплікація  $\beta$ -ВПЛ та

вірусний онкогенез (Tan et al., 2012; Meyers et al., 2013). Vieira та ін. (2014) поглибив зв'язок між білком Е6 та канцерогенезом. Вони вивчали вроджену імунну ДНК цитозиндезаміназу АРОВЕС3В (А3В), яка є істотним джерелом геномних уразильні ураження та мутагенез при багатьох ракових захворюваннях людини, включаючи рак шийки матки та голови та шиї. [50].

Спектр клінічних проявів генітальної ВПЛ – інфекції варіює від клінічних та субклінічних признаков до рака шийки матки. В більшості випадків ВПЛ – інфекція не маніфестує, залишаючись безсимптомною [65].

В клінічній практиці ВПЛ - інфекції підрозділяють на форми перебігу хвороби:

Клінічна форма – це коли є ураження, які можна побачити неозброєним оком, або є наявність відповідних симптомів (конділоматоз, плоскі кондиломи, вульгарні бородавки; симптоматичні внутрішньоепітеліальні неоплазії (ВН) на ранніх стадіях, койлоцитоз, дискератоз при відсутності дисплазії (плоскі кондиломи)).

Субклінічна форма – це коли є ураження які притикають безсимптомно та їх не можна побачити неозброєним оком; виявляються тільки при кольпоскопії або цитологічному чи гістологічному обстеженні (асимптоматичні ВН на ранніх стадіях, койлоцитоз, дискератоз при відсутності дисплазії (плоскі кондиломи)).

Латентна форма – при якій відсутні морфологічні чи гістологічні відхилення та виявленні ДНК ВПЛ методом молекулярної гібридизації.

Перебіг ВПЛ- інфекції достатньо варіабільний: вона може спонтанно регресувати, персистувати та рецидивувати (прогресувати з розвитком CIN), що характеризується різною візуально та кольпоскопічною картиною, а також різними морфологічними ознаками [66].

Згідно з літературними даними, найбільш специфічними

клітинами для ВПЛ-інфекції є койлоцити. Ці клітини утворюються внаслідок цитопатичної дії ВПЛ та являють собою клітини багат шарового плоского епітелію проміжного типу зі збільшеними ядрами, нерівній складчастою мембраною та гіперхроматозом. Цитоплазма існує тільки в периферійних відділах клітини, утворюючи перинуклеарне гало (околоядерна зона просвітлення, сформована шляхом дегенеративних змін та некрозу зруйнованих цитоплазматичних органел).

Другою по специфічності клітиною при ВПЛ-інфекції є дискератоцит. Клітини малого розміру багат шарового плоского епітелію с пікнотичними ядрами різної форми та розміру з інтенсивною еозинофільною цитоплазмою, які розташовуються комплексами в поверхневих шарах епітелію [27].

Структура ВПЛ – асоційованої патології, в 16,9% випадків представлена плоскими та гострокінцевими кондиломами, у 28,2% - різними змінами метапластичного чи плоского епітелію шийки матки при наявності поодиноких кліток з койлоцитозом, в 16,9% - цервікальними інтраепітеліальними неоплазіями в поєднанні з плоскою кондиломою, у 27,4% - цервікальними інтраепітеліальними неоплазіями різного ступеню тяжкості без койлоцитів, в 10,4% спостережень – раком шийки матки [65].

Проявлення клінічної форми папіломавірусної інфекції виступають генітальні бородавки (гострокінцеві, плоскі та ендофітні кондиломи). Генітальні бородавки зазвичай асоціюються з вірусом папіломи людини низького онкогенного ризику, найбільш часто (80%) – з ВПЛ-6. Це візуальна форма ВПЛ –інфекції, яка має ряд специфічних симптомів та можна побачити неозброєним оком [67].

Екзофітні кондиломи підняті над поверхнею шкіри та слизових оболонок. При кольпоскопічному дослідженні характеристика екзофітних кондилом різна. По зовнішньому вигляду виділяють три основні форми: гострокінцеві, папілярну, папуловідну. Типічні гострокінцеві кондиломи представляють собою папілярні вирости епітелію з васкуляризованою

сполучно-тканинною строю, можливо наявність ніжки чи широкої основи у вигляді поодинокого вузла чи множинних епітеліальних виростів, які нагадують цвітну капусту. Папілярні кондиломи нагадують бородавку-пухлину. Кольпоскопічна картина характеризується наявністю окремих сосочків, які утворюють розетку, на фоні гладкої поверхні кондиломи. В кожному сосочку поліферіруючого плоского епітелію визначається розширена судинна петля почковидної форми. Ці судини рівномірно розташовані на поверхні кондиломи та утворюють малюнок який повторюється. Поверхня кондилом має білий наліт, в наслідок чого судинна сітка не дуже виражена; при пальпації - плотноеластичної консистенції.

Екзофітна кондилома при гістологічному дослідженні являє собою пухлиноподібне утворення деревовидної форми, поверхня якого покрита багат шаровим плоским епітелієм з вираженим папіломатозом, акантозом, паракератозом.

Субклінічна форма ВПЛ – інфекції проявляє себе в вигляді різних морфологічних змін плоского епітелію без зовнішніх розростань та може бути виявлена при кольпоскопічному та мікроскопічному дослідженні тканини [68].

При гістологічному дослідженні плоска кондилома являє собою ділянку вагінальної частини шийки матки, покритих багат шаровим плоским чи метапластичним епітелієм, з паракератозом, дискератозом з зануренням декількох ділянок в подепітеліальну сполучну тканину (акантоз). У свою чергу сполучнотканинні сосочки з центрально розташованими капілярами пронизують товщу епітелію, періодично доходючи до поверхні епітеліального пласта. При цьому в проміжному шарі епітелію зустрічаються скупчення одноядерних та двоядерних кліток з койлоцитозом.

До латентної форми ВПЛ - інфекції відносять безсимптомне, тобто без яких або клінічних проявів ВПЛ – носійство, яке виявляється за



допомогою молекулярно – біологічних методів.

На даний час не викликає сумніву наявність прямого зв'язку між виявленням високо онкогенних типів ВПЛ в тканинах шийки матки та більш високому ступеню тяжкості CIN. Таким чином, виявлення ДНК ВПЛ при CIN та раку шийки матки, виявлення койлоцитів, специфічних для цитопатичної дії ВПЛ, дозволяє віднести цей патологічний стан до ВПЛ – асоційованим хворобам.

## **1.2. Методи діагностики вірусу папіломи людини. Метод полімеразно- ланцюгової реакції**

Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) - метод, широко застосовуваний в молекулярній біології для виготовлення декількох копій певного сегмента ДНК. За допомогою ПЛР копії послідовностей ДНК піддаються експоненціальній ампліфікації, щоб генерувати тисячі до мільйонів більше копій саме цього сегмента ДНК. ПЛР зараз є поширеною і часто незамінною методикою, яка використовується в медичній лабораторії та клінічних лабораторних дослідженнях для широкого спектру застосувань, включаючи біомедичні дослідження та кримінальну криміналістику. Переважна більшість методів ПЛР покладаються на термічний велосипед. Термічне кругообіг піддає реагентам неодноразові цикли нагрівання та охолодження, щоб дозволити різні реакції, що залежать від температури - зокрема, плавлення ДНК та реплікація ДНК, що обумовлена ферментами. ПЛР використовує два основні реагенти - праймери (це короткі одониткові фрагменти ДНК, відомі як олігонуклеотиди, які є комплементарною послідовністю до цільової області ДНК) та ДНК-полімерази. На першому етапі ПЛР дві нитки подвійної спіралі ДНК фізично розділяються при високій температурі в процесі, який називається плавленням ДНК. На другому етапі температура знижується і праймери зв'язуються з

комплементарними послідовностями ДНК. Дві нитки ДНК потім стають шаблонами для ДНК-полімерази для ферментативного збирання нової ланцюга ДНК із вільних нуклеотидів, будівельних блоків ДНК. У міру прогресування ПЛР генерована ДНК сама використовується як шаблон для реплікації, приводячи в рух ланцюгову реакцію, в якій вихідний шаблон ДНК експоненціально ампліфікується [62].

**1.2.1. Історія відкриття методу.** 25 квітня 1953 р. Джеймс Д. Уотсон та Френсіс Крік опублікували "радикально іншу структуру" ДНК [3], тим самим заснувавши область молекулярної генетики. Їх структурна модель містила дві нитки комплементарної ДНК-парної ДНК, що бігали в протилежні сторони, як подвійна спіраль. Вони закінчили свою доповідь, сказавши, що "Ми не уникнули нашого повідомлення про те, що конкретне сполучення, яке ми постулювали, негайно говорить про можливий механізм копіювання генетичного матеріалу". За це розуміння їм було присуджено Нобелівську премію в 1962 році.

Починаючи з середини 50-х років, Артур Корнберг почав вивчати механізм реплікації ДНК. [4] До 1957 року він виявив першу ДНК-полімеразу. Фермент був обмежений, створюючи ДНК лише в одному напрямку та вимагаючи існуючого праймера для ініціювання копіювання нитки шаблону. Загалом, процес реплікації ДНК напрочуд складний, вимагаючи, щоб окремі білки відкривали спіраль ДНК, тривали її відкритою, створювали праймери, синтезували нову ДНК, видаляли праймери та з'єднували шматочки всі разом. Корнберг був удостоєний Нобелівської премії в 1959 році.

На початку 60-х років Х. Гобінд Хорана домогся значних успіхів у з'ясуванні генетичного коду. Згодом він ініціював великий проект із повного синтезу функціонального людського гена. Щоб досягти цього, Хорана запровадив багато методик, необхідних для виготовлення та використання синтетичних олігонуклеотидів ДНК. Олігонуклеотиди,

специфічні для послідовності, використовувались як в якості будівельних блоків для гена, так і як праймери та шаблони для ДНК-полімерази. У 1968 році Хорану було присвоєно Нобелівську премію за роботу над Генетичним кодексом.

У 1969 році Томас Д. Брок повідомив про виділення нового виду бактерій з гарячої джерела в Національному парку Йеллоустоун. *Thermus aquaticus* (Taq) став стандартним джерелом ферментів, здатних витримувати більш високі температури, ніж ті, що виникають у *E. Coli*.

У 1970 р. Кленов повідомив про модифіковану версію ДНК-полімерази I від *E. coli*. Лікування протеазою знімало активну нуклеазу цього ферменту. Таким чином, загальна активність одержуваного фрагмента Кленова орієнтована на синтез ДНК, а не на її деградацію.

У 1971 р. Дослідники проекту Хорана, стурбовані виходами ДНК, почали розглядати "синтез ремонту" - штучну систему праймерів та шаблонів, що дозволяє ДНК-полімеразі копіювати сегменти гена, який вони синтезують. Хоча подібний до ПЛР у використанні повторних застосувань ДНК-полімерази, процес, який вони зазвичай описують, використовує лише єдиний комплекс праймер-шаблону, і тому не призведе до експоненціальної ампліфікації, що спостерігається в ПЛР.

Приблизно в 1971 р. Келл Клеппе, дослідник лабораторії Хорани, передбачав процес, дуже схожий на ПЛР. Наприкінці статті про попередню техніку він описав, як система з двома праймерами може призвести до реплікації певного сегмента ДНК:

"можна сподіватися отримати дві структури, кожна з яких містить повну довжину нитки шаблону, відповідним чином комплексується з праймером. ДНК-полімераза буде додана, щоб завершити процес відновлення реплікації. У результаті повинні вийти дві молекули вихідного дуплексу. Весь цикл міг би повторювати, туди додавати щоразу свіжу дозу ферменту".

Результатів там не показано, а згадка про неопубліковані

експерименти в іншій роботі [9] може (або не може) стосуватись системи реплікації з двома праймерами. (Ці ранні попередники ПЛР були ретельно вивчені в патентному позові, і вони обговорюються в главах Муллліса в «Полімеразній ланцюговій реакції» (1994))

Також у 1971 р. Корпорація Cetus була заснована в Берклі, штат Каліфорнія, Рональдом Кейп, Пітером Фарлі та Дональдом Глейзером. Спочатку компанія проводила обстеження на мікроорганізми, здатні виробляти компоненти, що використовуються у виробництві харчових продуктів, хімікатів, вакцин чи фармацевтичних препаратів. Після переїзду до сусіднього Емерівіля вони розпочали проекти, що стосуються нової галузі біотехнології, насамперед клонування та експресії генів людини, а також розробки діагностичних тестів на генетичні мутації.

У 1976 р. Від *T. aquaticus* була виділена ДНК-полімераза. Було встановлено, що він зберігає свою активність при температурі вище 75 °С.

У 1977 р. Фредерік Сангер повідомив про спосіб визначення послідовності ДНК. [13] Методика використовувала олігонуклеотидний праймер, ДНК-полімеразу та модифіковані нуклеотидні попередники, які блокують подальше продовження праймера послідовно залежним чином. За це нововведення він був удостоєний Нобелівської премії в 1980 році.

До 1980 р. Всі компоненти, необхідні для ампліфікації ПЛР, були відомі науковій спільноті. Використання ДНК-полімерази для розширення олігонуклеотидних праймерів було звичайною процедурою в секвенуванні ДНК та отриманні кДНК для клонування та експресії. Використання ДНК-полімерази для трансляції нік було найпоширенішим методом для маркування ДНК-зондів для Саузерн-блот.

**1.2.2. Етапи та види полімеразно-ланцюгової реакції.** Як і в інших хімічних реакціях, на швидкість реакції та ефективність ПЛР

впливають лімітуючі фактори. Таким чином, весь процес ПЛР можна далі розділити на три етапи на основі прогресу реакції:

**Експоненціальна ампліфікація:** На кожному циклі кількість продукту збільшується вдвічі (при 100% ефективності реакції). Через 30 циклів одиничну копію ДНК можна збільшити до 1 000 000 000 (один мільярд) примірників. У певному сенсі реплікацією дискретного ланцюга ДНК маніпулюють у трубці в контрольованих умовах. [15] Реакція дуже чутлива: мають бути присутніми лише хвилинні кількості ДНК.

**Вирівнювання на стадії:** Реакція сповільнюється, коли ДНК-полімераза втрачає активність, а споживання реагентів, таких як dNTP та праймери, призводить до того, що вони стають більш обмеженими.

**Плато:** більше продукту не накопичується через виснаження реагентів і ферментів. [71].

Зазвичай ПЛР складається з серії 20–40 повторних змін температури, званих тепловими циклами, при цьому кожен цикл зазвичай складається з двох або трьох дискретних температурних ступенів (див. Малюнок нижче). Циклічному обробці часто передує один етап температури при дуже високій температурі ( $> 90^{\circ}\text{C}$  ( $194^{\circ}\text{F}$ )), після чого слід одне утримування в кінці для продовження остаточного продукту або короткого зберігання. Використовувані температури та тривалість часу їх застосування у кожному циклі залежать від різних параметрів, включаючи фермент, що використовується для синтезу ДНК, концентрацію двовалентних іонів та дНТП в реакції та температуру плавлення ( $T_m$ ) праймерів. Окремі етапи, характерні для більшості методів ПЛР, наступні:

**Ініціалізація:** Цей крок необхідний лише для ДНК-полімераз, які потребують активації тепла методом ПЛР гарячого старту. Він складається з нагрівання реакційної камери до температури  $94\text{--}96^{\circ}\text{C}$  ( $201\text{--}205^{\circ}\text{F}$ ) або  $98^{\circ}\text{C}$  ( $208^{\circ}\text{F}$ ), якщо використовуються надзвичайно термостабільні полімерази, які потім тримають протягом 1–10 хвилин.

Денатурація: Цей етап є першим регулярним циклічним заходом і складається з нагрівання реакційної камери до 94–98 ° C (201–208 ° F) протягом 20–30 секунд. Це викликає плавлення ДНК або денатурацію дволанцюгового шаблону ДНК, розриваючи водневі зв'язки між комплементарними основами, отримуючи дві одноланцюгові молекули ДНК.

Відпал: На наступному етапі температуру реакції знижують до 50–65 ° C (122–149 ° F) протягом 20–40 секунд, що дозволяє відпалювати праймери до кожного з одноланцюжкових шаблонів ДНК. У реакційну суміш, як правило, включаються два різних праймерів: по одному для кожного з двох ланцюжкових компонентів, що містять цільову область. Самі праймери є одноланцюговими послідовностями, але значно коротші довжини цільової області, доповнюючи лише дуже короткі послідовності на 3 'кінці кожної ланцюга.

Важливо визначити належну температуру для етапу відпалу, оскільки ефективність та специфічність сильно впливають на температуру відпалу. Ця температура повинна бути достатньо низькою, щоб допускати гібридизацію праймера до нитки, але досить високою, щоб гібридизація була специфічною, тобто праймер повинен зв'язуватися лише з ідеально доповнювальною частиною пасма і ніде більше. Якщо температура занадто низька, ґрунтовка може зв'язатися недосконало. Якщо вона занадто висока, ґрунтовка може взагалі не зв'язуватися. Типова температура відпалу приблизно на 3–5 ° C нижче  $T_m$  використовуваних праймерів. Стабільні водневі зв'язки між комплементарними основами утворюються лише тоді, коли послідовність праймера дуже тісно відповідає послідовності шаблону. Під час цього етапу полімераза зв'язується з гібридом праймер-шаблону і починає утворення ДНК.

Подовження / подовження: Температура на цьому етапі залежить від використовуваної ДНК-полімерази; оптимальна температура

активності для термостабільної ДНК-полімерази полімерази Таq (*Thermus aquaticus*) становить приблизно 75–80 ° С (167–176 ° F), хоча температура становить 72 ° С (162 ° F) зазвичай використовується з цим ферментом. На цьому етапі ДНК-полімераза синтезує нову ланцюг ДНК, комплементарну до ланцюга шаблону ДНК, додаючи вільні dNTP з реакційної суміші, які є комплементарними шаблону в напрямку 5'-до-3', конденсуючи 5'-фосфатну групу dNTP з 3'-гідроксигрупою в кінці нитки, що зароджується (подовжується), ДНК. Точний час, необхідний для подовження, залежить як від використовуваної ДНК-полімерази, так і від довжини цільової області ДНК для її посилення. Як правило, при їх оптимальній температурі більшість ДНК-полімераз полімеризують тисячу основ на хвилину. При оптимальних умовах (тобто, якщо немає обмежень через обмеження субстратів або реагентів), на кожному етапі розширення / подовження кількість послідовностей ДНК-мішені подвоюється. З кожним наступним циклом вихідні нитки шаблону плюс усі новостворені нитки стають нитками шаблону для наступного кола подовження, що веде до експоненціальної (геометричної) ампліфікації конкретної цільової області ДНК.

Процеси денатурації, відпалу та подовження складають єдиний цикл. Для ампліфікації ДНК-цілі до мільйонів копій потрібно кілька циклів. Формула, яка використовується для обчислення кількості копій ДНК, утворених після заданої кількості циклів, дорівнює  $2^n$ , де  $n$  - кількість циклів. Таким чином, набір реакцій на 30 циклів призводить до отримання 230, або 1073741824, копій вихідної дволанцюгової цільової області ДНК.

Остаточне подовження: Цей єдиний етап є не обов'язковим, але виконується при температурі 70–74 ° С (158–165 ° F) (температурний діапазон, необхідний для оптимальної активності більшості полімераз, що використовуються в ПЛР) протягом 5–15 хвилин після останній цикл ПЛР, щоб гарантувати, що будь-яка залишилася одноланцюгова ДНК

повністю витягнута.

Кінцеве утримання: Заключний крок охолоджує реакційну камеру до 4–15 ° C (39–59 ° F) протягом невизначеного часу і може бути використаний для короткочасного зберігання продуктів ПЛР [65].

Щоб перевірити, чи вдало ПЛР генерувала передбачувану ДНК-цільову область (також її іноді називають амплімером або ампліконом), електрофорез агарозного гелю може бути використаний для розділення розмірів продуктів ПЛР. Розмір (и) продуктів ПЛР визначається порівнянням із ДНК-драбинкою, маркером молекулярної маси, який містить фрагменти ДНК відомого розміру, що проходять на гелі поряд з продуктами ПЛР.

### **1.2.3. Використання ПЛР в практиці.** Медичні та діагностичні програми

Потенційні батьки можуть бути перевірені на те, що вони є генетичними носіями, або ж їхні діти можуть бути перевірені на те, чи справді вони уражені хворобою. Зразки ДНК для внутрішньоутробного тестування можуть бути отримані шляхом амніоцентезу, забору ворсин хоріона або навіть шляхом аналізу рідкісних клітин плода, що циркулюють у крові матері. ПЛР-аналіз також має важливе значення для генетичної діагностики передплантаційним шляхом, коли окремі клітини ембріона, що розвивається, тестуються на мутації.

ПЛР також може бути використана як частина чутливого тесту на типізацію тканин, життєво важливого для трансплантації органів. Станом на 2008 рік, є навіть пропозиція замінити традиційні тести на основі антитіл для групи крові на тести на основі ПЛР.

У багатьох формах раку пов'язані зміни з онкогенами. Використовуючи тести на основі ПЛР для вивчення цих мутацій, схеми терапії іноді можуть бути індивідуально налаштовані для пацієнта. ПЛР дозволяє на ранній діагностиці злоякісних захворювань, таких як



лейкемія та лімфоми, які в даний час є найбільш розвиненими в дослідженнях раку і вже використовуються в звичайному режимі. ПЛР-аналізи можуть бути проведені безпосередньо на зразках геномної ДНК для виявлення специфічних для транслокації злоякісних клітин при чутливості, що принаймні на 10 000 разів вище, ніж у інших методів. ПЛР дуже корисна в галузі медицини, оскільки дозволяє виділити і посилити пухлинні супресори. Наприклад, кількісна ПЛР може бути використана для кількісної оцінки та аналізу поодиноких клітин, а також для розпізнавання ДНК, мРНК та підтвердження і комбінацій білка.

#### Застосування інфекційних захворювань

ПЛР дозволяє швидко та високоспецифічно діагностувати інфекційні захворювання, в тому числі, спричинені бактеріями чи вірусами. [27] ПЛР також дозволяє ідентифікувати некультивуруемое або повільно зростаючі мікроорганізми, такі як мікобактерії, анаеробні бактерії або віруси з аналізів тканинної культури та тваринних моделей. Основою для застосування ПЛР-діагностики в мікробіології є виявлення інфекційних агентів та дискримінація непатогенних від патогенних штамів завдяки специфічним генам.

Характеристика та виявлення інфекційних організмів були зроблені революцією за допомогою ПЛР такими способами:

Вірус імунодефіциту людини (або ВІЛ) є важкою ціллю для пошуку та викорінення. Найбільш ранні тести на інфекцію спиралися на наявність антитіл до вірусу, що циркулює в крові. Однак антитіла з'являються до багатьох тижнів після зараження, материнські антитіла маскують інфекцію новонародженого, а терапевтичні засоби для боротьби з інфекцією не впливають на антитіла. Були розроблені тести на ПЛР, які дозволяють виявити лише один вірусний геном серед ДНК понад 50 000 клітин-господарів. Інфекції можна виявити раніше, здану кров можна перевірити безпосередньо на вірус, новонароджених можна негайно перевірити на інфекцію, а ефекти противірусних методів

лікування можна кількісно оцінити.

Деякі хвороботворні організми, наприклад, туберкульоз, важко відбирають у пацієнтів і повільно вирощуються в лабораторії. Тести на основі ПЛР дозволили виявити невелику кількість організмів хвороби (як живих, так і мертвих) у зручних зразках. Детальний генетичний аналіз також може бути використаний для виявлення резистентності до антибіотиків, що дозволяє негайну та ефективну терапію. Ефекти терапії також можна негайно оцінити.

Поширення організму хвороби через популяції домашніх чи диких тварин можна контролювати за допомогою ПЛР-тестування. У багатьох випадках появу нових вірулентних підтипів можна виявити та контролювати. Підтипи організму, які відповідали за більш ранні епідемії, також можна визначити за допомогою ПЛР-аналізу.

Вірусну ДНК можна виявити за допомогою ПЛР. Використовувані праймери повинні бути специфічними для цільових послідовностей у ДНК вірусу, а ПЛР можна використовувати для діагностичних аналізів або секвенування ДНК вірусного геному. Висока чутливість ПЛР дозволяє виявити вірус незабаром після зараження та ще до початку захворювання. Таке раннє виявлення може дати лікарям значний час у лікуванні. Кількість вірусу ("вірусне навантаження") у пацієнта також можна кількісно визначити методами кількісного визначення ДНК на основі ПЛР.

Такі захворювання, як коклюш (або коклюш) викликають бактерії коклюш. Ця бактерія відзначається серйозною гострою респіраторною інфекцією, яка вражає різних тварин і людей і призвела до загибелі багатьох маленьких дітей. Коклюшний токсин - це білковий екзотоксин, який зв'язується з рецепторами клітин двома димерами і реагує з різними типами клітин, такими як Т-лімфоцити, який відіграє роль у клітинному імунітеті. ПЛР є важливим інструментом тестування, який може виявити послідовності, що знаходяться в гені коклюшного токсину. Це тому, що

ПЛР має високу чутливість до токсину і продемонстрував швидкий час повороту. ПЛР є дуже ефективною для діагностики коклюшу порівняно з культурою. [31]

### **1.3. Умови проведення полімеразно - ланцюгової реакції у лабораторній практиці**

Велика кількість цільових організмів при обробці проб може призвести до попереднього ампліфікації перехресного забруднення зразків. Джерела забруднень між зразками різноманітні і всі вони можуть сприяти забрудненню готового продукту ПЛР. Ці джерела можуть включати реагенти, одноразові поставки, пробування зразків, неправильні процедури поводження тощо.

Перехресне забруднення між нуклеїновими кислотами є головною проблемою у всіх лабораторіях ПЛР. Нуклеїнові кислоти організмів або плазмідні клони, отримані від раніше проаналізованих організмів і які можуть бути присутні у великій кількості в лабораторних умовах, можуть стати джерелом зараження. Забруднення також можуть бути введені через споріднені дії в сусідніх лабораторіях. Ці джерела забруднення є проблематичними, оскільки можуть призвести до попереднього посилення перехресного забруднення.

#### **Забруднення, що переносяться продуктом ПЛР**

Найважливіше джерело забруднення - це багаторазове посилення тієї ж цільової послідовності, що призводить до накопичення продуктів ампліфікації в лабораторному середовищі. Навіть хвилинні перевезення можуть призвести до хибнопозитивних результатів. Типова ПЛР теоретично генерує до 108 копій цільової послідовності [11]. Якщо вони не контролюються, продукти ампліфікації забруднюють лабораторні реагенти, обладнання та вентиляційні системи. Проведення раніше

накопиченої ампліфікованої ДНК вважається основним джерелом забруднення.

#### Методи контролю забруднення

Забруднення між зразками та попереднім генеруванням ПЛР-ампліконів є важливим потенційним джерелом невірних результатів ПЛР [12]. Перші дві форми забруднення, описані вище, можна легко уникнути, використовуючи ретельну техніку та належну практику контролю якості. Як правило, більшість аналізів на основі ПЛР складаються з трьох етапів: обробка зразків ДНК, ампліфікація ПЛР та виявлення продукту ампліфікації (включаючи ПЛР у режимі реального часу). Саме на останній стадії забруднення при перенесенні часто відбувається за допомогою методів, що включають гелевий електрофорез, тверду фазу, гібридизацію розчину та капілярний електрофорез. Методи запобігання забрудненню продуктами ампліфікації були розроблені протягом останніх десяти років. В основному існують механічне, хімічне, УФ-випромінювання, ферментативні методи та формати виявлення ПЛР із закритою трубкою, які можуть допомогти запобігти забрудненню продуктом ампліфікації. У наступному розділі буде присвячено новітні практики та методи, які використовуються в нашій лабораторії для усунення забруднення при перенесенні.

#### Механічний метод

Наша лабораторія була розроблена та функціонувала таким чином, щоб запобігти забрудненню реакцій продуктами ПЛР з попередніх аналізів та перехресного забруднення між зразками. Він включає поділ ділянок лабораторії, де готують зразки та реагенти, від областей, де проводиться ампліфікація та аналізуються продукти ампліфікації. Цей однонаправлений робочий процес може зменшити можливість виникнення забруднення. Типову лабораторію ПЛР слід розділити щонайменше на три-чотири різні області: (1) підготовка зразків, (2)

підготовка суміші для ПЛР, (3) виявлення продукту ПЛР та (4) зона, що не має РНКаз, якщо метод ПЛР включає РНК зразок.

#### Хімічний метод

Загальна практика очищення важлива для контролю забруднення при перенесенні ПЛР. Всі поверхні в області ПЛР повинні бути регулярно знезаражені, щоб запобігти перехресному забрудненню. Робочий стіл для ПЛР потрібно очистити 10–15% розчином гіпохлориту натрію (відбілювачем) з подальшим видаленням хлорки 70% -ним етанолом.

#### Метод УФ-опромінення

УФ-опромінення - це простий метод інактивації продукту ампліфікації, який бере участь у забрудненні перенесення. Метод заснований на здатності УФ-світла індукувати утворення димеру тимідину в ДНК, що робить забруднюючу нуклеїнову кислоту неактивним як шаблон для подальшого ампліфікації. Доброю практикою є піддавати всі запаси ПЛР ультрафіолетовим світлом протягом 5–20 хв, оскільки нуклеїнова кислота буде пошкоджена шляхом поглинання енергії ультрафіолетового світла на довжині хвилі 254 нм [19]. УФ-опромінення є невід'ємною особливістю нашої ПЛР-лабораторії, а Spectrolinker XL-1500 (Spectronics Corporation, Westbury, NY) використовується для усунення забруднень, які можуть виникнути під час тестів на ПЛР. Всі наші інструменти для ПЛР зберігаються у УФ-світловій коробці (C.B.S Scientific, Co. Del Mar, Ca). Підготовка і суміш зразка PCR master також проводиться в цьому УФ-світлі. [71].

**1.3.1. Підготовка проб (виділення ДНК і РНК із біологічного матеріалу).** ПЛР дозволяє виділити фрагменти ДНК з геномної ДНК шляхом селективного ампліфікації конкретної ділянки ДНК. Це використання ПЛР збільшує безліч способів, таких як генерування зондів гібридизації для південної або північної гібридизації та клонування ДНК, які потребують більшої кількості ДНК, що представляє конкретну область ДНК. ПЛР забезпечує ці методи великою кількістю чистої ДНК,

що дозволяє аналізувати зразки ДНК навіть із дуже невеликої кількості вихідного матеріалу.

Інші застосування ПЛР включають секвенування ДНК для визначення невідомих ампліфікованих ПЛР послідовностей, в яких один з ампліфікаційних праймерів може бути використаний при секвенуванні Сангера, виділення послідовності ДНК для прискорення рекомбінантних технологій ДНК, що включає введення послідовності ДНК у плазмиду, фаг або космиду (залежно від розміру) або генетичний матеріал іншого організму. Колонії бактерій (наприклад, кишкова паличка) можуть бути швидко скриніровані за допомогою ПЛР для правильних конструкцій векторних ДНК. [20] ПЛР може також використовуватися для генетичного відбитків пальців; криміналістична методика, що використовується для ідентифікації людини або організму шляхом порівняння експериментальних ДНК за допомогою різних методів на основі ПЛР.

Деякі методи «відбитків пальців» ПЛР мають високу дискримінаційну силу і можуть бути використані для виявлення генетичних зв'язків між людьми, наприклад батьком-дитиною або між побратимами, і використовуються при тестуванні на батьківство (рис. 4). Ця методика може також використовуватися для визначення еволюційних зв'язків між організмами, коли використовуються певні молекулярні годинники (тобто, 16S рРНК та гени *recA* мікроорганізмів). Оскільки ПЛР ампліфікує ділянки ДНК, на які вона націлена, ПЛР можна використовувати для аналізу надзвичайно малих кількості вибірки. Це часто є критичним для криміналістичного аналізу, коли в якості доказів доступна лише слідова кількість ДНК. ПЛР також може бути використана при аналізі стародавньої ДНК, якій є десятки тисяч років. Ці методи на основі ПЛР були успішно використані на тваринах, таких як мамонт сорок тисяч років, а також на ДНК людини, в додатках, починаючи від

аналізу єгипетських мумій до ідентифікації російського царя та тіла Англійський король Річард III. [22]

Кількісні методи ПЛР або ПЛР у реальному часі (qPCR, [23] не плутати з RT-PCR) дозволяють оцінити кількість заданої послідовності, присутньої у зразку - метод, який часто застосовується для кількісного визначення рівнів експресії генів. Кількісна ПЛР - це встановлений інструмент кількісного визначення ДНК, який вимірює накопичення продукту ДНК після кожного раунду ампліфікації ПЛР.

qPCR дозволяє здійснювати кількісне визначення та виявлення конкретної послідовності ДНК в режимі реального часу, оскільки він вимірює концентрацію, поки відбувається процес синтезу. Існує два методи одночасного виявлення та кількісного визначення. Перший спосіб полягає у використанні флуоресцентних барвників, які неспецифічно зберігаються між подвійними нитками. Другий метод включає зонди, які кодують для певних послідовностей і мають флуоресцентну мітку. Виявлення ДНК за допомогою цих методів можна побачити лише після того, як відбудеться гібридизація зондів з її комплементарною ДНК. Цікавим поєднанням методів є ПЛР у режимі реального часу та зворотна транскрипція. Ця складна методика, яка називається RT-qPCR, дозволяє оцінити невелику кількість РНК. За допомогою цієї комбінованої методики мРНК перетворюється на кДНК, яка додатково кількісно визначається за допомогою qPCR. Ця методика знижує можливість помилки в кінцевій точці ПЛР, [24] збільшуючи шанси на виявлення генів, пов'язаних з генетичними захворюваннями, такими як рак. [4] Лабораторії використовують RT-qPCR з метою чутливого вимірювання регуляції генів. [71].

**1.3.2. Модифікація методу ПЛР або проведення зворотної транскрипції на матриці РНК.** Полімеразна зворотна транскрипційна полімеразна ланцюгова реакція (RT-PCR) - це лабораторна техніка, що поєднує зворотну транскрипцію РНК у ДНК (у цьому контексті

називається комплементарною ДНК або кДНК) та ампліфікацію конкретних цілей ДНК за допомогою ланцюгової реакції полімерази (ПЛР). Він використовується в першу чергу для вимірювання кількості конкретної РНК. Це досягається шляхом моніторингу реакції ампліфікації за допомогою флуоресценції, методикою, яка називається ПЛР у реальному часі або кількісною ПЛР (qPCR). Комбіновані RT-PCR та qPCR регулярно використовуються для аналізу експресії генів та кількісної оцінки вірусної РНК у дослідженнях та клінічних умовах.

Тісна зв'язок між RT-PCR і qPCR призвела до метонімічного використання терміна qPCR для позначення RT-PCR. Таке використання може бути заплутаним [2], оскільки RT-PCR може використовуватися без qPCR, наприклад, для забезпечення молекулярного клонування, секвенування або простого виявлення РНК. І навпаки, qPCR може використовуватися без RT-PCR, наприклад, для кількісного визначення кількості копій конкретного фрагмента ДНК.

З моменту введення Північної плями в 1977 році вона широко використовувалася для кількісного визначення РНК, незважаючи на свої недоліки: (а) трудомістка техніка, (б) вимагає великої кількості РНК для виявлення, і (с) кількісно неточна в низькій великій кількості вмісту РНК. Однак виявлення зворотної транскриптази під час дослідження вірусної реплікації генетичного матеріалу призвело до розвитку РТ-ПЛР, яка з тих пір витіснила північну пляму як метод вибору для виявлення та кількісного визначення РНК. [11]

RT-PCR піднявся, щоб стати еталонною технологією виявлення та / або порівняння рівнів РНК з кількох причин: (а) він не потребує після обробки ПЛР, (б) широкий діапазон (> 10<sup>7</sup> разів) рясності РНК може бути виміряна, і вона забезпечує розуміння як якісних, так і кількісних даних. [5] Завдяки своїй простоті, специфічності та чутливості, RT-PCR застосовується в широкому діапазоні застосувань: від експериментів, таких як просте, як кількісне визначення клітин дріжджів у вині, до



складніших застосувань як діагностичних інструментів для виявлення інфекційних агентів, таких як вірус пташиного грипу.

У RT-PCR шаблон РНК спочатку перетворюється в комплементарну ДНК (кДНК) за допомогою зворотної транскриптази. КДНК потім використовується як шаблон для експоненціальної ампліфікації за допомогою ПЛР. На даний момент QT-NASBA є найбільш чутливим методом виявлення РНК, доступним. Використання RT-PCR для виявлення транскрипту РНК революціонувало дослідження експресії генів такими важливими способами:

Теоретично стало можливим виявити стенограми практично будь-якого гена. Увімкнено ампліфікацію зразків та усунуло потребу в рясному вихідному матеріалі, необхідному при використанні аналізу "Норт-блот".

Забезпечується толерантність до деградації РНК до тих пір, поки РНК, що охоплює праймер, є неушкодженою.

Кількісне визначення мРНК за допомогою RT-PCR може бути досягнуто як одноетапною, або двоступеневою реакцією. Різниця між двома підходами полягає в кількості трубок, які використовуються при виконанні процедури. Двоетапна реакція вимагає, щоб реакцію зворотної транскриптази та ампліфікацію ПЛР проводили в окремих пробірках. Недоліком двоетапного підходу є сприйнятливність до забруднення через більш часту обробку зразків. З іншого боку, вся реакція від синтезу кДНК до ампліфікації ПЛР відбувається в одній пробірці при одноетапному підході. Вважається, що одноетапний підхід зводить до мінімуму експериментальну варіацію, що містить усі ферментативні реакції в одному середовищі. Це виключає етапи піпетування продукту кДНК, який є трудомістким і схильним до забруднення, до реакції ПЛР. Подальше використання стійких до інгібіторів полімераз, підсилювачів полімерази з оптимізованим одноетапним станом RT-PCR, підтримує зворотну транскрипцію РНК з неочищених або неочищених зразків, таких як цільна кров та сироватка. Однак вихідні шаблони РНК схильні до

деградації при одномоментному підході, і використання цього підходу не рекомендується, коли потрібно повторне тестування з одного зразка. Крім того, повідомляється, що одноетапний підхід є менш точним порівняно з двоступеневим підходом. Також є кращим методом аналізу при використанні ДНК-зв'язуючих барвників, таких як SYBR Green, оскільки усунення праймерів-димерів може бути досягнуто простою зміною температури плавлення. Тим не менш, одноетапний підхід є відносно зручним рішенням для швидкого виявлення цільової РНК безпосередньо при біосенсифікації.

#### RT-PCR кінцевої точки проти RT-PCR в реальному часі

Кількісне визначення продуктів RT-PCR можна значною мірою розділити на дві категорії: кінцеві і в режимі реального часу. [14] Використання RT-PCR кінцевої точки є кращим для вимірювання змін експресії генів у невеликій кількості зразків, але RT-PCR в реальному часі став золотим стандартним методом перевірки результатів, отриманих за допомогою аналізу масивів або змін експресії генів у глобальному масштабі масштаб.

#### Кінцева точка RT-PCR

Підходи вимірювання кінцевої точки RT-PCR вимагають виявлення рівнів експресії генів за допомогою флуоресцентних барвників, таких як бромід етидію, P32 маркування продуктів ПЛР за допомогою фосфоримера, або шляхом сцинтиляційного підрахунку. Кінцева точка RT-PCR зазвичай досягається за допомогою трьох різних методів: відносного, конкурентного та порівняльного.

Відносна RT-PCR: Відносна кількісна оцінка RT-PCR передбачає спільну ампліфікацію внутрішнього контролю одночасно з цікавим геном. Внутрішній контроль використовується для нормалізації зразків. Після нормалізації можна здійснити пряме порівняння відносної кількості стенограми у кількох зразках мРНК. Однією обережністю слід зазначити,

що внутрішній контроль повинен бути обраний таким чином, щоб він не впливав на експериментальну обробку. Оскільки кількісне визначення результатів аналізується шляхом порівняння лінійного діапазону цілі та контрольної ампліфікації, важливо враховувати початкову концентрацію молекул-мішеней та швидкість їх ампліфікації перед початком аналізу. Результати аналізу виражаються як відношення сигналу гена до сигналу внутрішнього контролю, значення якого потім можуть бути використані для порівняння між зразками при оцінці відносної експресії цільової РНК.

**Конкурентна RT-PCR:** Конкурентна методика RT-PCR використовується для абсолютного кількісного визначення. Він передбачає використання синтетичної "конкурентної" РНК, яку можна відрізнити від цільової РНК за невеликою різницею в розмірах або послідовності. Важливо, щоб конструкція синтетичної РНК була ідентичною за послідовністю, але трохи коротшою, ніж цільова РНК для отримання точних результатів.

Після розробки та синтезу відомої кількості конкурентної РНК додають до експериментальних зразків і спільно ампліфікують з мішенню за допомогою RT-PCR. Потім виробляється крива концентрації РНК-конкурента, і вона використовується для порівняння RT-PCR-сигналів, вироблених з ендогенних стенограм, для визначення кількості мішені, присутнього у зразку. Після завершення реакції результати порівнюють із зовнішньою стандартною кривою для визначення цільової концентрації РНК. Порівняно з відносними та конкурентними методами кількісного визначення порівняльний RT-PCR вважається більш зручним методом використання, оскільки він не вимагає від слідчого проведення експериментального експерименту; у відносній RT-PCR діапазон експоненціальної ампліфікації мРНК повинен бути визначений заздалегідь, а в конкурентній RT-PCR необхідно синтезувати синтетичну конкурентну РНК. [71].

## **РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.**

### **2.1. Характеристика досліджуваних, взяття та транспортування матеріалу**

Базою дослідження була лабораторія ТОВ «Лабдіагностика» медичного центру «Дніпромед» міста Херсона. Для дослідження використовували зіскрібок епітеліальних клітин з цервікального каналу, з шийки матки та уретри. Досліджувались зразки взяті у жінок з міста Херсона та Херсонській області, віком від 20 до 45 років, які проходили обстеження або лікування. Дослідження проводилось методом ПЛР.

Транспортування та зберігання досліджуваного матеріалу. Час від взяття матеріала до початку дослідження не має перевищувати 24 години.

Транспортувати та зберігати зразки до початку дослідження необхідно при температурі від 2 С ДО 8 С. У випадку неспроможності доставки матеріалу в лабораторію протягом доби допускається одноразове заморожування матеріалу.

### **2.2. Етапи та процес методу полімеразно ланцюгової реакції**

Для дослідження використовувалась тест-система «HPV квант-21, ДНК - Технологія». Принцип методу заснований на використанні процесу ампліфікації ДНК, який полягає в повторюванні циклів температурної денатурації ДНК, відпалу праймерів з комплементарними послідовностями та подальшої добудови полінуклеотидних ланцюгів з цих праймерів Tag – полімеразою.

Для підвищення чутливості та специфічності реакції передбачено застосування “гарячого” старту який забезпечується методикою приготування реакційної суміші, що складається з двох шарів, які розділені прошарком з парафіну. Змішування шарів та перетворення їх в реакційну суміш відбувається тільки після плавлення парафіну, що

виключає неспецифічний відпал праймерів на ДНК – мішень при початковому прогріванні пробірки [21].

В ампліфікаційну суміш введені ДНК – зонди, кожен з яких несе флуоресцентну мітку та «гасник флуоресценції». При утворенні специфічного продукту ДНК – зонд руйнується дія гасника на флуоресцентну мітку завершується, що призводить до зростання рівня флуоресценції, кількість зруйнованих зондів (рівень флуоресценції) збільшується пропорційно кількості утворившихся специфічних ампліконів що вимірюються на кожному циклі ампліфікації.

Дослідження з використанням набору ВПЛ квант складається з наступних етапів: виділення ДНК (підготування проб) та ПЛР – ампліфікація ДНК ВПЛ в режимі реального часу.

Набір реагентів включає: суміш для ампліфікації, специфічні для вірусу папіломи людини (ВПЛ 6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 44, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82), та суміш для ампліфікації геномної ДНК людини, призначену для контролю взяття клінічного матеріалу (КВМ). КВМ використовується для виключення помилок преналітичного етапу. У випадку недостатньої кількості забраного матеріалу необхідного для аналізу, треба взяти матеріал повторно.

В наборі реагентів ВПЛ квант в пробірки з сумішю для ампліфікації додано внутрішній контрольний зразок (ВК), призначений для контролю проходження полімеразної ланцюгової реакції [26].

До складу ДНК – зондів, які використовуються для детекції продуктів ампліфікації фрагментів геномів виявляємих типів вірусу папіломи, включені флуоресцентні метки Fam, Rox та Cy5. До складу ДНК – зондів, які використовуються для детекції продуктів ампліфікації внутрішнього контрольного зразка, до якого входить флуоресцентний барвник Nex, для контролю взяття матеріалу – Fam [53].

Використання декількох флуоресцентних барвників дозволяє скоротити кількість пробірок, оскільки є можливість одночасно реєструвати різні реакції ампліфікації, які проходять в одній пробірці.

До комплектації ВПЛ квант – 15 та ВПЛ квант 21 в одну з пробірок доданий олігонуклеотид з флуоресцентною міткою Rox – “Маркер”. Він використовується прибором як маркер визначення положення стрипованих пробірок (стріпів) в плащі. Після проходження ампліфікації програма порівнює положення пробірок який задав оператор з реальним положенням маркеру, та як що виявляє розбіжність, то попереджає оператора про це. Оператору необхідно розташувати дані з кожної окремої пробірки вручну, або повторити дослідження даного зразка, вірно розташувати пробірки в термообробці.

Кількісне визначення ДНК ВПЛ представлено двома типами аналізу: абсолютним та відносним. При абсолютному типі аналізу після проходження ампліфікації, по показникам індикаторного циклу (порговий цикл) програмно розраховується кількість копій вірусу в зразку. При відносному типі аналізу використовується підхід нормалізації кількості ДНК вірусу на кількість геномної ДНК (КВМ) в даному зразку ( тобто на кількість кліток в зразку), в результаті чого враховується розкид при взятті клінічного матеріалу.

Клінічна значима концентрація складає більш  $10^3$  копій ДНК ВПЛ на  $10^5$  кліток людини (при коректному взятті матеріалу), що характеризує високий рівень інфекції та може призвести до розвитку неоплазії шийки матки. Тому при відносному типі аналізу ПЛР використовується програмне обмеження отриманих значень концентрації вірусу, якщо вони не потрапляють в клінічно значущий діапазон.

**2.2.1. Проведення аналізу.** Виділення ДНК з біологічного матеріалу. Одночасно з виділенням ДНК з біологічного матеріалу необхідно провести пробопідготовку негативного контрольного зразку

(К-). Для цього в окрему пробірку об'ємом 1,5 мл внести 100 мкл транспортної середи для біопроб.

1. Додати в кожную пробірку по 300 мкл лізуючого розчину, не торкаючись краю пробірки.

2. Щільно закрити кришки пробірок, струсити на вортексу впродовж 3-5 секунд.

3. Далі ставимо пробірки в термостат при температурі 65° С впродовж 15 хвилин, осадити конденсат, центрифугувати при 13000 обертів – 30 секунд (рис. 2.1.).



**Рис. 2.1. Спеціалізований термостат для ПЛР**

4. Додати 400 мкл реагенту для преципітації та струсити пробірки на вортексу впродовж 3-5 секунд.

5. Центрифугувати пробірки при 13000 обертів за хвилину - 15 хвилин.

6. Не торкаючись до осаду треба повністю видалити рідину (окремим наконечником для кожної пробірки).

7. Додати до осаду 500 мкл розчину для промивки №1, закрити кришки пробірок та 3-5 разів перевертати.

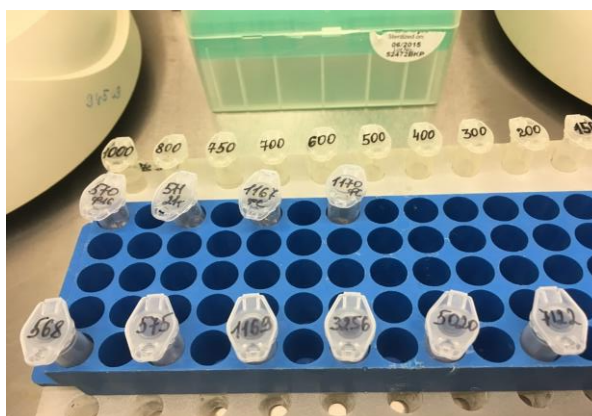
8. Центрифугувати пробірки при 13000 об. хв. – 5 хвилин.

9. Не торкаючись до осаду треба видалити рідину (окремим наконечником).

10. Додати до осаду 300 мл промивного розчину №2, закрити кришки пробірок та 3-5 разів перевернути.
11. Центрифугувати пробірки при 13000 обертів – 5 хвилин.
12. Не торкаючись осаду видалити рідину, окремим наконечником.
13. Відкрити кришки пробірок та висушити осад при температурі 65 С впродовж 5 хвилин.
14. Додати до осаду 300 мкл буферу для розчинення. Осадити краплі з кришок пробірок на вортексу 1-3 секунди.
15. Прогріти пробірки при 65<sup>0</sup> С впродовж 10 хвилин. Струсити пробірки на вортексу впродовж 3-5 секунд.
16. Осадити краплі центрифугуванням пробірок при 13000 обертів – 30 секунд.

Препарат ДНК готовий до проведення ПЛР.

Препарат можна зберігати при температурі від мінус 18<sup>0</sup> С до мінус 22<sup>0</sup> С не більше одного місяця та при температурі мінус 70<sup>0</sup> С не більше одного року (рис. 2.2.).



**Рис. 2.2. Готовий препарат ДНК упробірках типу Eppendorf**

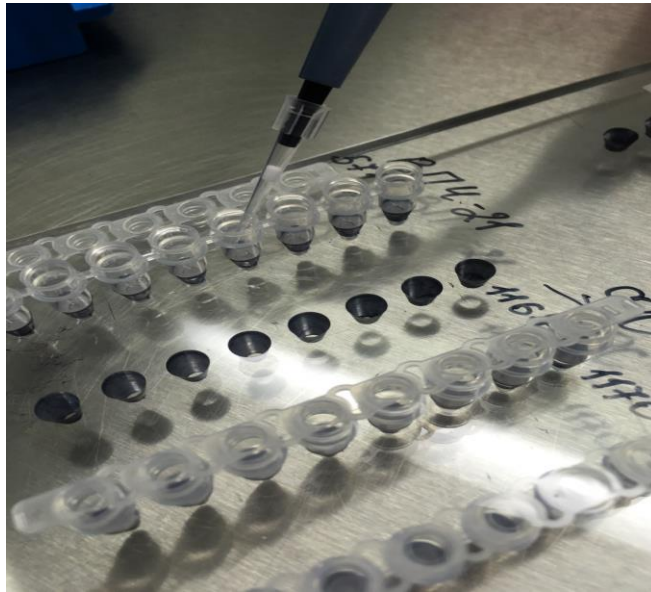
**2.2.2. Підготовка та проведення полімеразно - ланцюгової реакції.** Промаркувати стрипи з запечатаною парафіном сумішшю для ампліфікації для кожного окремого зразку, та контрольного зразку (К-) та



позитивного контрольного зразку (K+). Для квант 21 стрип розрахован на дослідження одного зразку.

1. Струсити пробірки з розчином Таq – полімерази МАХ впродовж 3-5 секунд та центрифугувати 1-3 секунди на вортексу.

2. Додати в кожную пробірку, не пошкоджуючи шар парафіну, по 10 мкл розчину Таq – полімерази МАХ (рис. 2.3.).



**Рис. 2.3. Внесення до стрип Таq – полімерази**

3. Додати в кожную пробірку по одії краплі (20 мкл) мінеральної олії. Закрити кришки стрипів.

4. Для попередження контамінації слід перед тим як вносити ДНК відкривати кришки тільки тих стрипів, в які будуть вноситись даний зразок та закрити їх перед внесенням наступного. Препарати ДНК слід вносити наконечниками з фільтром.

Вносити не пошкоджую шар парафіну по 5,0 мкл виділеного з зразків препарату ДНК до відповідних стріпованих пробірок для досліджуваних зразків. В пробірки “К-“ та “К+” ДНК не вноситься.

5. Внести, не пошкоджуючи шар парафіну, по 5,0 мкл негативного контролю в відповідні стріповані пробірки, та позитивний контроль в пробірки K+.

6. Встановити всі стрипи в детектуючий ампліфікатор. Рекомендується розташовувати пробірки по центру термоблоку (рис. 2.4.).



**Рис. 2.4. Внесення планшету до ампліфікатора**

7. Запустити програмне забезпечення RealTime PCR в режимі “Робота з прибором”. При першому проведенні ПЛР загрузити файл “HPV qvant.ini”. Далі при наступних постановках треба додати протокол - тест, та вказати кількість та ідентифікатори зразків, відзначити розташування стрипів на матриці термоблоку відповідно до їх установки та провести ПЛР.

**2.2.3. Реєстрація результатів ампліфікації.** Реєстрація сигналу флуоресценції проводиться прибором в автоматичному режимі під час ампліфікації.

Детекція та облік результатів здійснюється детектуючим ампліфікатором автоматично. Після закінчення програми ампліфікації на екрані з’являється інформаційне повідомлення та буде пропонувано перейти до аналізу результатів. На графіку відображається залежність флуоресценції від номеру циклу для кожної пробірки в термоблоці.

Облік та інтерпретація результатів реакції здійснюється автоматично за допомогою програмного забезпечення.

Після проходження ампліфікації програма порівнює задане оператором розташування пробірок з реальним положенням маркером та якщо є розбіжність, то попереджує оператора про це.

В результатах аналізу необхідно враховувати значення контролю взяття матеріалу (КВМ). Значення КВМ менш чотирьох слід інтерпретувати як недостатня кількість матеріалу. У такому разі слід провести повторне взяття матеріалу.

За наявності в досліджуваному зразку ДНК вірусу папіломи людини, буде вказано абсолютна кількість даного типу вірусу в зразку

## РОЗДІЛ 3

### АНАЛІЗ ТА ОБГОВОРЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ

#### **3.1. Загальні показники захворювання на рак шийки матки по Україні та Херсонській області**

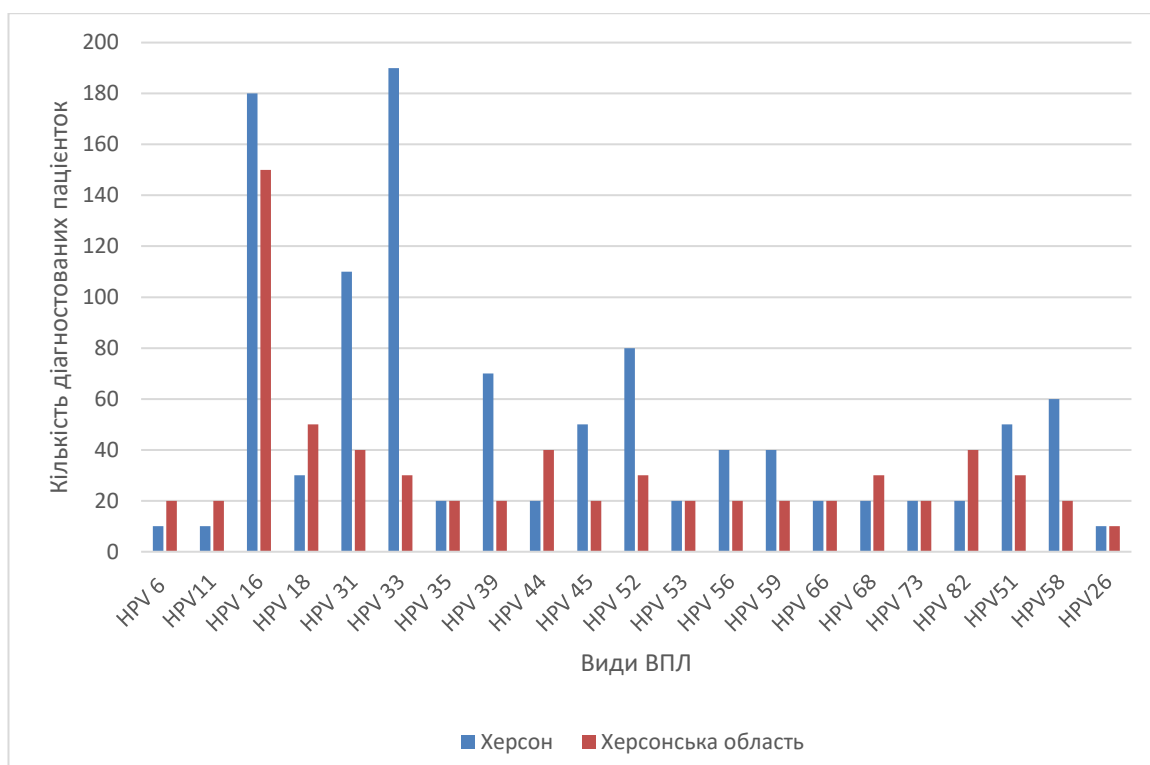
Як відомо 90 % захворюваності на рак шийки матки викликає саме папіломавірусна інфекція. За даними канцер – реєстру Національного інституту раку, на 2017-2018 роки, захворюваність на рак шийки матки в Україні на 100 тисяч населення складає 21,7 випадків, а в 2018 році – 19,6 випадків. В Херсонській області на 2017 рік складає 21,1 випадок та 19,8 випадків за 2018 рік [70]. Найбільш поширене захворювання серед жінок працездатного віку складає 60,8% та репродуктивного віку 47,0%. Згідно з даними канцер реєстру Херсон та Херсонська область займає одне з перших місць по онкологічним захворюванням. Загалом Україна серед країн Європи займає 11-те місце з показником 19,2.

Зміна показника захворюваності 2018 року показана в порівнянні з 2017 роком; від’ємне значення свідчить про його зменшення. Однак захворюваність в 2018 році в Херсонській області є більшою ніж по Україні, яке може свідчити про несприятливу обстановку в нашому регіоні, що збільшує ріст онкозахворювань.

#### **3.2. Тенденція захворюваності по Херсону та Херсонській області**

Дослідження проводилось впродовж 6 місяців 2019 року серед жінок віком від 20-45 років які проходили обстеження або лікування. Вони були поділені на дві групи:

- 1) жінки які проживають у місті Херсоні;
- 2) жінки які проживають в Херсонській області (рис. 3.1).



**Рис. 3.1. Загальна тенденція захворювань по Херсону та області**

Згідно з проведених досліджень ми виявили, що кількість жінок, які звернулися у лікарні в місті Херсон на діагностику або терапію ВПЛ, значно перевищує кількість жінок з Херсонської області.

Досліджувані види ВПЛ, були диферинційовані на 3 групи, за рівнем онкогенності: низька, середня, висока (табл. 3.1).

*Таблиця 3.1.*

**Рівень інфікованості пацієток вірусом папіломи людини за онкогенністю**

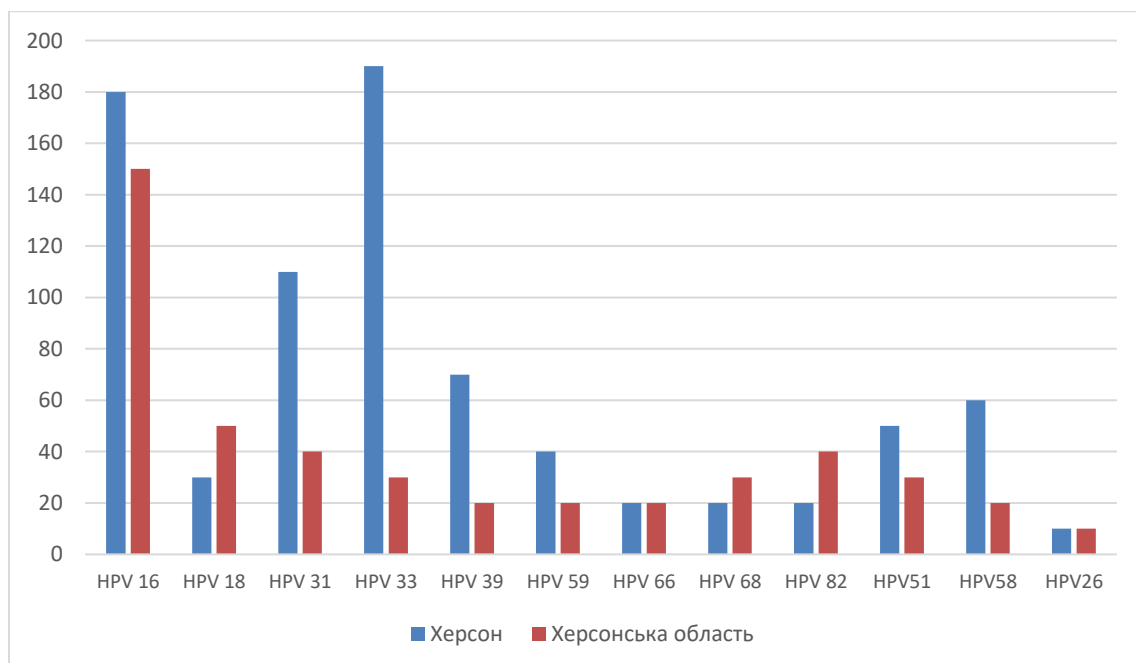
Онкогенність	Херсон, пацієток	Херсонська обл., пацієток	Частина від загального Херсон, %	Частина від загального Херсон обл, %
Низька	60	100	6%	15%
Середня	210	110	20%	16%
Висока	800	460	75%	69%

Згідно з дослідженням і отриманими даними, кількість діагностованих ВПЛ високої онкогенності, значно перевищує рівень (75% Херсон і 69% область) ВПЛ середньої онкогенності (20% Херсон і 16% область) і низького рівня (6% Херсон і 15% область). Також, згідно даних, найбільшою різницею між пацієнтками Херсону і області, становить рівень ВПЛ низької онкогенності – 9%, та різниця в 40 діагностованих випадків.

Середнє значення кількості пацієток в Херсоні: низького рівня онкогенності ВПЛ – 15, середня 42, висока 66,6; в Херсонській області низька група – 25, середня – 22, висока – 38,3.

Рівень загальної та кореляції Пірсона між онкогенними групами Херсона та області, становить: низька –  $r=0.578$ , середня –  $r=0.853$ , висока –  $r=0.588$ , де 1 це пряма залежність, а -1, залежності немає.

**3.2.1. Особливість типів високого онкогенного ризику.** До високого онкогенного ризику відносять: 16, 18, 26, 31, 33, 39, 58, 59, 66, 68, 82 типи вірусу (рис. 3.3.).



**Рис.3.2. Графік діагностованих ВПЛ високого онкогенного рівня**

Серед цих типів вірусу найбільш канцерогеними властивостями володіють наступні типи: 16, 18, 31, 33, 35. Для папіломавірусної інфекції високого онкогенного ризику характерний розвиток бовеноїдного папульоза та плоскоклітинних неоплазій. Бовеноїдний папульоз (Bowenoid papulosis) може бути обумовлений ВПЛ 16, 18, 31, 35, 39, 42, 48, 51, 54 типу. Найбільш часто він клінічно проявляється куполообразними та плоскими папулами.

16-ий тип вірусу найбільш небезпечний в плані розвитку раку шийки матки. Потрапляючи в організм по слизовій оболонці, вірус може довгий час себе не проявляти.

18-ий тип — це прояв новоутворень на шкірі або на слизових оболонках, найчастіше на статевих органах і веде, як і 16 тип до РШМ і становить 95% від всіх діагностованих ВПЛ які введуть до раку шийки матки (табл. 3.2) [15].

*Таблиця 3.2.*

**Показик інфікованості жінок Херсону та Херсонської області вірусом папіломи людини 16 і 18 типу**

РШМ	Херсон, %	Херсонська обл., %
ВПЛ 16	17%	22%
ВПЛ 18	3%	7%

31-ий тип — це доброякісна пухлина, але вона здатна перерости в онкологічне захворювання.

51-ий тип папіломавірусу — найпідступніший його різновид, оскільки він важко піддається діагностиці. Немає явних симптомів, які вказували б на зараження цим вірусом.

56-ий тип вірусу часто розвивається, ніяк себе не проявляючи. У більшості випадків він виявляється при плановому обстеженні у гінеколога.

**3.2.2. Особливості типів низького онкогенного ризику.** До вірусів низького онкогенного ризику відносять наступні типи: 6, 11, 44, 53, 56, 66, 73, 82, 26. Ці типи вірусу не призводять до онкології, та являють собою продуктивну форму інфекції. До них відносяться бородавки, гострокінцеві кандиломи, папіломи шийки матки. Згідно до розрахунків ми бачимо що по області найбільш частіше хворіють на такі типи папіломавірусної інфекції як: 6 тип, 11 тип, 44 тип, 82 тип.

В місті більш розповсюджен 56 тип папіломавірусної інфекції. Інші типи інфекції однаково розповсюджені як в місті так і в області.

Вульгарні бородавки (*Common warts*) обумовлені папіломавірусом 2 типу. Шлях передачі інфекції – контактно- побутовий. Найбільш часто вульгарні бородавки локалізуються на тильній поверхні кистей і пальців рук [18].

Плоскі бородавки (*Plane warts*) обумовлені папіломавірусом 3 та 5 типів. Найбільш часто локалізуються на обличчі та тильній поверхні кистей рук. Інфекція виникає переважно в підлітковому віці (юнацькі бородавки).

Подошвені бородавки (*Plantare warts*) обумовлені папіломавірусом 1 типу. Являють собою потовщення рогового шару епітелію розміром 5-8 мм, іноді неправильної форми, при натисканні болючі. Розвиваються в місцях тиску взуття.

Гострокінцеві кандиломи (*Condylomata acuminata*) обумовлені папіломавірусом 6,11 типу. Основний шлях передачі статевий. Згідно Міжнародной класифікації хвороб (МКХ), гострі кандиломи віднесені до інфекцій, котрі передаються статевим шляхом. Гострокінцеві кандиломи визначаються як утворення м'якої консистенції, мають дольчасту будову, за формою нагадують “цвітну капусту”. Зазвичай розташовані на вузькій основі (ніжки). Локалізуються у чоловіків та жінок на статевих органах [56].



Визначено діагностичні показники вірусу папіломи людини в Херсоні та Херсонській області. Статистично встановлено, що в регіоні значну більшість випадків ВПЧ, займають пацієнтки з вірусом високої онкогенності 75% в Херсоні та 69% в Херсонській області. Різниця між пацієнтками Херсону та області майже відсутня, відсоток інфікованості ВПЛ середньої онкогенності (Херсон – 20%, область – 16%, від загальної кількості діагностованих ВПЛ) та високої онкогенності (Херсон – 75%, область - 69%). Різниця між ВПЛ низького рівня онкогенності складає 9% (Херсон – 6%, область – 15%).

## ВИСНОВКИ

1. Віруси папіломи людини – широко розповсюджена та дуже варіабельна група вірусів, які володіють онкогеним потенціалом. Клініко - патогенитичні властивості інфекції обумовлені різними типами папіломавірусу людини. Клітинами – мішенями для ВПЛ є епіталіальні клітини шкіри та слизових оболонок.

При продуктивному впливі на епітелій виникають доброякісні новоутворення – папіломи та канділоми шкіри та слизових оболонок. Результатом трансформуючого впливу є дисплазії тяжкого ступеня, прогресуючий розвиток яких приводить до виникнення раку.

2. Визначено діагностичні показники ВПЛ в Херсоні та Херсонській області. Статистично встановлено, що в регіоні значну більшість випадків ВПЧ, займають пацієнтки з вірусом високої онкогенності 75% в Херсоні та 69% в області.

Також отримані дані свідчать про те, що пацієнтки з Херсона, значно частіше приходять на діагностику та терапію ВПЛ, так інфіковані мешканки Херсона звернулись 1070 разів, а жінки області 670 разів, за один і той же період, що може свідчити, про нижчу медичну інформованість в області.

3. Встановлено, що між пацієнтками Херсону та області майже відсутня різниця між відсотком інфікованості ВПЛ середньої онкогенності (Херсон – 20%, область – 16%, від загальної кількості діагностованих ВПЛ) та високої онкогенності (Херсон – 75%, область - 69%). Але разом з цим, різниця між ВПЛ низького рівня онкогенності складає 9% (Херсон – 6%, область – 15%).

Рівень інфікованості ВПЛ 16 і 18 типу, які найчастіше викликають рак шийки матки, також має територіальну різницю. Так ВПЛ 16 типу у пацієнток Херсону діагностовано у 17% випадків, а в області - 22%, кількість ВПЛ 18 в Херсоні - 3%, в Херсонській області 7% від зальної кількості діагностованих ВПЛ.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Agrawal N. Temporal acceleration of the human papillomavirus life cycle by adeno-associated virus (AAV) type 2 super-infection in natural host tissue / Agrawal N., Mane M., Chiriva-Internati M. // *Virology*.- 2002.- Jun. 5; 297 (2):p. 203–10.
2. Altekruze S.F. Comparison of human papillomavirus genotypes, sexual. and reproductive risk factors of cervical adenocarcinoma and squamous cell carcinoma: Northeastern United States / Altekruze S.F., Lacey J.V Jr., Brinton L.A. // *Am. J. Obstet. Gynecol.*- 2003.- Mar.;188 (3):p. 657–63.
3. Becker T.M. Cigarette smoking and other risk factors for cervical in southwestern Hispanic and non-Hispanic white women / Becker T.M., Wheeler C.M., McGough N.S. // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*- 1994.- Mar.; 3 (2):p. 113–9
4. Boon M.E. Urbanization and the incidence of abnormalities of squamous and glandular epithelium of the cervix / Boon M.E., van Ravenswaay Claasen H.H., van Westering R.P., Kok L.P. // *Cancer*.- 2003.- Feb.- 25; 99 (1):p. 4–8.
5. Brabin L. Interaction of the female hormonal environment, susceptibility to viral infections, and disease progression / Brabin L. // *AIDS Patient Care STDS*.- 2002.- May; 16(5): p.211-21.
6. Castellsague X. Male circumcision, penile human papillomavirus infection, and cervical cancer in female partners / Castellsague X., Bosch F.X., Munoz N. // *N. Engl. J. Med.*- 2002.- 11; 346 (15):p. 1105–12.
7. Chan P.K. Determinants of cervical human papillomavirus infection: differences between high- and low-oncogenic risk types / Chan P.K., Chang A.R., Cheung J.L. // *J. Infect. Dis.*- 2002.- Jan. 1; 185 (1):p. 28–35.
8. Chow V.T. Cancer and viruses / Chow V.T. // *Ann Acad Med Singapore*.- 1993.- Mar.; 22 (2):p. 163–9.
9. Cripe T. Human papillomavirus and cervical cancer / Cripe T. Alderboru A., Anderson R., Pakkinen S., Bergman T., Haugen T., Petterson V.

// *The New Biologist*. – 1995.- № 199.- P. 450–463.

10. Dillner J. Epidemiology of human papillomavirus infection / Dillner J., Meijer C.J., von Krogh G., Horenblas S. // *Scand. J. Urol. Nephrol. Suppl.*- 2000.- (205): P 194–200.

11. DiPaolo J.A. HSV 2 induced tumorigenicity in HPV-16 immortalized human genital keratinocytes / DiPaolo J.A., Woodworth C.D., Popescu N.C. et al. // *Virology*.- 1990.- Vol. 177. P. 777–779.

12. De Villiers E.M. Classification of papillomaviruses / de Villiers E.M., Fauquet C., Broker T.R., Bernard H.U., Hausen H. // *Virology*. - 2004. - 324(1): P. 17–27.

13. Franceschi S. Prevalence and determinants of human papillomavirus genital infection in women / Franceschi S., Castellsague X., Dal Maso L. // *Br. J. Cancer*.- 2002.- Mar. 4; 86 (5):P. 705–11.

14. Franco E. Cervical cancer: epidemiology, prevention and role of human papillomavirus infection / Franco E., Duarte-Franco E., Ferenczy A. // *GMA* / 2001; №164.- p. 1017–1025;

15. Goodkin K. Psychoneuroimmunological aspects of disease progression among women with human papillomavirus-associated cervical dysplasia and human immunodeficiency virus type 1 co-infection / Goodkin K., Antoni M.H., Helder L. // *Int. J. Psychiatry Med.*- 1993; 23 (2):p.119–48.

16. Hildesheim A. Host and viral genetics and risk of cervical cancer: a review / Hildesheim A., Wang S.S. // *Virus. Res.*- 2002.- Nov.; 89 (2):p. 229–240.

17. Human papilloma virus and genital warts//National Institute of Allergy and Infectious Diseases. [Electronic resource] July, 2004. Mode of access: [http:// www.niaid.nih.gov/factsheets/stdhpv.htm](http://www.niaid.nih.gov/factsheets/stdhpv.htm).

18. Kjaer S.K. Case-control study of risk factors for cervical squamous-cell neoplasia in Denmark. III. Role of oral contraceptive use / Kjaer S.K., Engholm G., Dahl C. // *Cancer. Causes. Control.*-1993.-Nov.; 4(6):p. 513–9.

19. Klingelutz A.J. Restoration of telomeres in human papillomavirus-

immortalized human anogenital epithelial cells / Klingelutz A.J., Barber S.A., Smith P.P. // *Mol. Cell. Biol.*- 1994.- Feb.; 14(2):p. 961–9.

20. Lehtinen M. Human T helper cell epitopes overlap B cell and putative cytotoxic T cell epitopes in the E2 protein of human papillomavirus type 16 / Lehtinen M., Hibma M.H., Stellato G. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.*- 1995. Apr.- 17; 209 (2):p. 541–6.

21. Lenner P. Serum antibody responses against human papillomavirus in relation to tumor characteristics, response to treatment, and survival in carcinoma of the uterine cervix / Lenner P., Dillner J., Wiklund F. // *Cancer. Immunol. Immunother.*- 1995.- Mar.; 40 (3):p.201–5.

22. Lipsey L.R. Anogenital neoplasia in patients with HIV infection / Lipsey L.R., Northfelt D.W.// *Curr. Opin. Oncol.*- 2003.- Sep.; 5 (5):p. 861–6.

23. Macnab J.C.M. Herpes simplex virus and human cytomegalovirus: their role in morphological transformation and genital cancers / Macnab J.C.M.// *J. Gen. Virol.*- 1987.- Vol. 68. P. 2525–2550.

24. Madeleine M.M. Human papilloma virus and long- term oral contraceptive use increase the risk of adenocarcinoma in situ of the cervix / Madeleine M.M., Daling J.R., Schwartz S.M. // *Cancer. Epidemiol. Biomarkers Prev.*- 2001.- Mar.; 10 (3):p. 171–7.

25. Moreno V. International Agency for Research on Cancer. Multicentric Cervical Cancer Study Group. Effect of oral contraceptives on risk of cervical cancer in women with human papillomavirus infection: the IARC multicentric case-control study/ Moreno V., Bosch F., Munoz N. et al.// *Lancet.*- 2002.- Mar.; 30; 359 (9312):p. 1085–92-55

26. Muller M. Antibodies to the E4, E6, and E7 proteins of human papillomavirus (HPV) type 16 in patients with HPV-associated diseases and in the normal population / Muller M., Viscidi R.P., Ulken V. // *J. Invest. Dermatol.*- 1995.- Jan.; 104 (1):p. 138–41.

27. Ragin C.C. Survival of squamous cell carcinoma of the head and neck in relation to human papillomavirus infection: Review and meta-analysis

/ Ragin C.C., Taioli E // *Int. J. Cancer.* -2007.- Jun. 1; p.703–7.

28. Sasagawa T. High-risk and multiple human papilloma-virus infections associated with cervical abnormalities in Japanese women / Sasagawa T., Basha W., Yamazaki H.// *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*- 2001.- Jan.; 10 (1):p. 45–52.

29. Schlecht N.F. Repeatability of sexual history in longitudinal studies on HPV infection and cervical neoplasia: determinants of reporting error at follow-up interviews / Schlecht N.F., Franco E.L., Rohan T.E. // *J. Epidemiol. Biostat.*- 2001; 6 (5):393–407.54

30. Serra H. Cervixuterilesi on sand human papilloma virus infection (HPV): detection and characterization of DNA/HPV using PCR (polymerase chain reaction) / Serra H., Pista A., Figueiredo P. // *Acta Med. Port.*- 2000.- Jul–Aug.; 13 (4):P. 181–92.

31. Sherman M.E. Effects of age and human papilloma viral load on colposcopy triage: data from the randomized Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance / Sherman M.E., Schiffman M., Cox J.T. // *J. Natl. Cancer. Inst.*-2002.- Jan.- 16; 94 (2):p. 102–7.

32. Sikstrom B. Smoking, alcohol, sexual behavior and drug use in women with cervical human papillomavirus infection / Sikstrom B., Hellberg D., Nilsson S. // *Arch. Gynecol. Obstet.*- 1995.; 256 (3):p. 131–7

33. Stanley M.A. Human papillomavirus and cervical carcinogenesis / Stanley M.A.// *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.*- 2001.- Oct; 15 (5):P.663–76.

34. Steller M.A. Human papillomavirus immunology and vaccine prospects / Steller M.A., Schiller J.T. // *J. Natl. Cancer. Inst. Monogr.*- 1996.; (21):p.145–8.

35. Veress G. Human papillomavirus DNA and antiHPV secretory IgA antibodies in cytologically normal cervical specimens / Veress G., Konya J., Csiky-Meszaros T. // *J. Med. Virol.*- 1994.- Jun.; 43 (2):p.201–7.

36. Vernon S.D. Human papillomavirus infection and associated disease

in persons infected with human immunodeficiency virus / Vernon S.D., Holmes K.K., Reeves W.C. // Clin. Infect. Dis.- 1995.- Aug.; 21 Suppl 1:S. 121–4.

37. Fauquet C.M. Version 4 is based on Virus Taxonomy, Classification and Nomenclature of Viruses, 8th ICTV Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. / Fauquet C.M., Mayo M.A., Maniloff J., Desselberger U., and Ball, LA. // EDS. – 2005.

38. Wick M.J. Diagnosis of human papillomavirus infections. / Wick M.J. // Clin. Lab. Med.- 2000.- Jun.; 20(2):271–87, VI.

39. Woodman C.B. Natural history of cervical human papillomavirus infection in young women: a longitudinal cohort study / Woodman C.B., Collins S., Winter H., Bailey A., Ellis J., Prior P., Yates M. Rollason T.P., Young L.S. // Lancet.- 2001 Jun.- 9; 357 (9271):1831–6.

40. Башмакова М. А. Вирусы папилломы человека и их роль в образовании опухолей / Башмакова М. А., Савичева А. М. // М.: Мед.; Н. Новгород, 1999.- 16 с.

41. Башмакова М.А. Папилломавирусная инфекция: Пособие для врачей./ Башмакова М.А., Савичева А.М. // М.: Медицина, 2003.- С.8–10.

42. Борьба с основными болезнями в Европе – актуальные проблемы и пути их решения // Факты и цифры Европейского регионального бюро ВОЗ Копенгаген [Электронный ресурс]. - 2006. Режим доступа: <http://www.euro.who.int/mediacentre>.

43. В. Крог Европейский курс по заболеваниям, ассоциированным с ВПЧ: Рекомендации для врачей общей практики по диагностике и лечению аногенитальных бородавок / Ван Крог, Лейси Д., Гросс Г. и др.// ЗППП. - 2001.

44. Дранник Г.Н. Клиническая иммунология и аллергология / Дранник Г.Н. // М.: Мед.информ. агентство.- 2003.- С.113–127.

45. Железнов Б.И. Опухоли женского полового тракта/ Железнов Б.И.// Патологоанатомическая диагностика опухолей человека. М.: Медицина, 1993.- С. 198–263.

46. Здоров'я України Медична газета №13-14 (194-195) липень 2008 р.
47. Киселев В.И. Вирусы папилломы человека в развитии рака шейки матки. М.: Димитреид График Групп 2004. С. 17–22.
48. Киселев В.И. Вирусы папилломы человека в развитии рака шейки матки./ Киселев В.И., Киселев О.И.// М.: Медицина. - 2003.- 42 с.
49. М.Н. Кочи Клиническая патология беременности и новорожденного / М.Н. Кочи, Г.Л. Гилберта, Дж.Б. Брауна (пер. англ.). // М.: Медицина, 1996. 314 с.
50. Кожные и венерические болезни: Руководство для врачей/ Под ред. Ю.К. Скрипкина. М., 1995.- С. 309.
51. Козаченко В.П. Диагностика и лечение эпителиальных дисплазий и преинвазивной карциномы шейки матки // Заболевания шейки матки, влагалища и вульвы: Клинические лекции / Под ред. проф. В.Н. Прилепской. М.: МЕДпресс, 2-е изд. - 2000. - С. 139–152.
52. Кубанов А.А. Результаты генотипирования вируса папилломы человека при скрининговом исследовании в Московском регионе // Вестн, дерматологии и венерологии [Электронный ресурс]. 2005.
53. Кузнецова Ю.Н. Латентная папилломавирусная инфекция урогенитального тракта женщин, обусловленная ВПЧ 16-го и 18.типу. / Кузнецова Ю.Н. // Здоров'я України Медична газета №09 (166) травень 2007.- С. 13-14
54. Кулаков В.И. Современные подходы к диагностике папилломавирусной инфекции гениталий женщин и их значение для скрининга рака шейки матки / Кулаков В.И. и др. // Гинекология.- 2000.- No 1 (2). С. 4–8.
55. Левицкая С.К. Некоторые аспекты внутриутробного инфицирования новорожденного / Левицкая С.К., Елиневская Г.Ф. // Акушерство и Гинекология. 1991. No 11 5 с.
56. Международная классификация болезней: Краткий вариант, основанный на Междунар.статистической классификации болезней и



проблем, связанных со здоровьем, 10-го пересмотра, принятой 43-й Всемирной Ассамблеей Здравоохранения / В.К. Овчаров [и др.]; Отдел медицинской демографии и Международной классификации болезней НИИ социальной гигиены, экономики и управления здравоохранением им. Н.А. Семашко РАМН. Москва, 1996.- 23с.

57. Методология скрининга предопухолевых заболеваний и опухолей шейки матки, тела матки и яичников: Инструкция по применению, утв. М-вом здравоохранения Респ. Беларусь 3.02.2005. / И.В. Залуцкий [и др.]. Минск: Дикта. - 2005. - 3 с.

58. Минкина Г.Н. Предрак шейки матки. / Минкина Г.Н., Манухин И.Б., Франк Г.А.// М.:Аэрограф-Медиа, 2001. С. 40–45.

59. Новиков А.И. Инфекции, передаваемые половым путем, и экзоцервикс./ Новиков А.И., Кононов А.В., Ваганова И.Г. // М.: Медицина, 2002. С. 34–59.

60. Новиков А.И. Инфекции, передаваемые половым путем, и экзоцервикс./ Новиков А.И., Кононов А.В., Ваганова И.Г. // М.: Медицина, 2002.- С. 80–82.

61. Рак в Україні, 2017–2018р (Захворюваність, смертність, показники діяльності онкологічної служби // Бюлетень національного канцер - реєстру України №20. Київ – 2019. С.48-49.

62. Роговская С.И. Папилломавирусная инфекция у женщин и патология шейки матки. Москва: Изд. группа «ГЭОТАР – Медиа», 2005. - С. 15–17.

63. Роговская С.И. Папилломавирусная инфекция у женщин и патология шейки матки. М.: ГЭОТАР – Медиа 2005.- С. 48–67.

64. Семена И.И. Папилломавирусная инфекция: Клинико-иммунологические особенности женщин и методы комбинированной терапии: Автор реф.дисс. канд. мед. наук. С.-Пб.- 2005.

65. Семенов Д.М. Клинико-патогенетические аспекты папилломавирусной инфекции в акушерско-гинекологической практике:

Сб. научн. Тр. ВГМУ. Витебск, 2004.

66. Семенов Д.М. Клиническая картина и эпидемиология папилломавирусной инфекции у женщин репродуктивного возраста в Республике Беларусь / Семенов Д.М. // Охрана материнства и детства.- 2006.- №1 (7). С. 98–104.

67. Семенов Д.М. Триггерные факторы, определяющие клиническое течение папилломавирусной инфекции у женщин с патологией шейки матки / Семенов Д.М. // Охрана материнства и детства.- 2006.- №2 (8). С. 98–106.

68. Семенов Д.М. Микст-инфекция в акушерстве и гинекологии / Семенов Д.М., Дмитраченко Т.И., Занько С.Н. // Тез. докл. науч. сессии ВГМУ. Витебск, 2005.

69. Солодовников В.М. Генитальный герпес // Заболевания, передаваемые половым путем. Горький, 1989. С. 227–232.

70. Тейлор-Робинсон Д. Бактериальный вагиноз. Осложнения вне беременности / ЗППП. 1998. №3. С. 6–7.

71. Федоренко В. О. Великий практикум з генетики, генетичної інженерії та Методи аналітичної біотехнології мікроорганізмів / В. О. Федоренко, Б. О. Осташ, М. В. Гончар, Ю. В. Ребець. — Л. : Видавничий центр ЛНУ імені Івана Франка, 2007. — 277 с.