

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 616.22-006.04-022:578.827.1]-078:575.08

Дворянинова О.Ю.<sup>1</sup>, Никитина Е.Г.<sup>1,2</sup>, Бычков В.А.<sup>1</sup>, Литвяков Н.В.<sup>1,2</sup>

## ГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПАПИЛЛОМАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ В ОПУХОЛЕВОЙ И ПРИЛЕЖАЮЩЕЙ ТКАНИ БОЛЬНЫХ ПЛОСКОКЛЕТОЧНЫМ РАКОМ ГОРТАНИ

<sup>1</sup> ФГБНУ «Томский НИИ онкологии», 634050, г. Томск;<sup>2</sup> ФГАОУ ВПО «Национальный исследовательский Томский государственный университет», 634050, г. Томск

В статье рассмотрены методы определения вируса папилломы человека (ВПЧ) в опухолевой и прилежащей (морфологически неизменной) ткани больных плоскоклеточным раком гортани (ПРГ) в аспекте вирусного патогенеза. Проведена сравнительная оценка принципов и техники детекции ВПЧ. Рассмотрены преимущества и недостатки методов его определения. Обосновано применение подходов к определению ДНК и онкопротеинов E6—E7 ВПЧ. Приведены результаты собственных исследований по качественному и количественному выявлению ВПЧ в опухолевой и прилежащей ткани больных ПРГ, выполненных на коммерческих тест-системах АмплиСенс ВПЧ ВКР скрин-титр-FL и АмплиСенс ВПЧ ВКР генотип-FL. На основе полученных данных разработан алгоритм определения ВПЧ в образцах опухолевой ткани больных ПРГ. На обсуждение вынесен вопрос о необходимости типирования ВПЧ-позитивных образцов ткани с низкой концентрацией ДНК ВПЧ.

**Ключевые слова:** плоскоклеточный рак гортани; опухолевая и прилежащая ткань; вирус папилломы человека; коммерческие тест-системы АмплиСенс ВПЧ ВКР скрин-титр-FL и АмплиСенс ВПЧ ВКР генотип-FL; молекулярно-генетические методы определения ВПЧ.

**Для цитирования:** Дворянинова О.Ю., Никитина Е.Г., Бычков В.А., Литвяков Н.В. Генетические аспекты определения папилломавирусной инфекции в опухолевой и прилежащей ткани больных плоскоклеточным раком гортани. *Вопросы вирусологии*. 2016; 61(6):275-279.

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2016-61-6-275-279>Dvoryaninova O.Yu.<sup>1</sup>, Nikitina E.G.<sup>1,2</sup>, Bychkov V.A.<sup>1</sup>, Litviakov N.V.<sup>1,2</sup>

## GENETIC ASPECTS OF HPV INFECTION DETECTION IN TUMOR AND ADJACENT TISSUES OF PATIENTS WITH LARYNGEAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA

<sup>1</sup> Tomsk Cancer Research Institute, Tomsk, 634050, Russian Federation;<sup>2</sup> National Research Tomsk State University, Tomsk, 634050, Russian Federation

The article describes methods for the human papillomavirus (HPV) detection in tumor and adjacent (morphologically intact) tissues of patients with laryngeal squamous cell carcinoma (LSSC) in terms of viral pathogenesis. Comparative evaluation of the principles and techniques for HPV detection was performed. Advantages and disadvantages of the HPV detection methods are described. Approaches for DNA and HPV oncoproteins E6-E7 identification are substantiated. The results of our research into the qualitative and quantitative detection of HPV in the tumor and adjacent tissues of patients with LSSC are described. The research was conducted using commercial test systems AmpliSens HPV HR screen-titre-FL and AmpliSens HPV HR genotype-FL. Based on these results we developed the algorithm of HPV detection in samples of tumor tissue of patients with LSSC. The need for typing HPV-positive tissue samples with low concentration of HPV DNA was discussed.

**Key words:** laryngeal squamous cell carcinoma; tumor and adjacent tissue; human papillomavirus; commercial test system AmpliSens HPV HR screen-titre-FL and AmpliSens HPV HR genotype-FL; molecular-genetic methods for HPV detection.

**For citation:** Dvoryaninova O.Yu., Nikitina E.G., Bychkov V.A., Litviakov N.V. Genetic aspects of HPV infection detection in tumor and adjacent tissues of patients with laryngeal squamous cell carcinoma. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2016; 61(6): 275-279. (In Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2016-61-6-275-279>

**For correspondence:** Vyacheslav A. Bychkov, Candidate of Medical Sciences, Senior research scientist, Laboratory of oncovirology, Tomsk Cancer Research Institute, Tomsk, 634050, Russian Federation. E-mail: [va.bych@gmail.com](mailto:va.bych@gmail.com)

**Acknowledgments.** The study had no sponsorship.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

Received 06 April 2016

Accepted 24 May 2016

### Введение

Для построения корректного дизайна исследования по определению вируса папилломы человека (ВПЧ) в образцах опухолевой и прилежащей ткани необходимо иметь четкое

представление о целях проводимой работы: планируем ли решить задачи исключительно научного/фундаментального или клинического аспекта. Последнее подразумевает не только констатацию факта наличия — отсутствия ДНК ВПЧ у па-

**Для корреспонденции:** Бычков Вячеслав Алексеевич, канд. мед. наук, ст. науч. сотр. лаб. онковирусологии, ФГБНУ «Томский НИИ онкологии», 634050, г. Томск. E-mail: [va.bych@gmail.com](mailto:va.bych@gmail.com)

циента, но и определение типа вируса, оценку вирусной нагрузки, проведение дифференциальной диагностики между литической/латентной инфекцией, эписомальной/интегрированной формой вирусного генома, что в свою очередь требует применения соответствующих методов исследования. На сегодняшний момент вышеперечисленным требованиям удовлетворяют методы амплификации вирусных нуклеотидных последовательностей (RT-PCR, nested ПЦР, NASBA, ПЦР-RFLP, bDNA (branched DNA)), оценки уровня экспрессии вирусного генома (ТМА — transcription-mediated amplification, АРОТ — amplification of papillomavirus oncogene transcript), а также отечественные и зарубежные коммерческие тест-системы, основанные на данных техниках.

В странах Европы и США разработаны и запатентованы коммерческие наборы для определения ДНК ВПЧ в соскобах цервикального канала (ЦК) пациенток с патологией шейки матки (ШМ). «Золотым стандартом» признана тест-система Hybrid capture («Digene»), направленная на выявление специфических фрагментов ДНК ВПЧ в соскобах. Однако в России данный тест не получил широкого распространения вследствие высокой стоимости. Аналогами данной техники в России являются тест-системы, предложенные отечественными фирмами «АмплиСенс», «Вектор-Бест», «Литех» и «ДНК-технология», которые позволяют определить присутствие вируса, а также провести количественное определение ДНК ВПЧ в соскобах ЦК [1, 2]. На образцах ткани, полученных из ЦК, было показано, что вирусная нагрузка менее 1000 геномов ВПЧ (3 lg ВПЧ на 100 000 клеток) является клинически малозначимой в отношении риска развития рака шейки матки (РШМ), тогда как 100 000 геномов (более 5 lg ВПЧ на 100 000 клеток) свидетельствует о высоком риске развития дисплазии и РШМ [1].

Между тем экстраполяция данных результатов в отношении образцов опухолевой и прилегающей ткани, полученных от больных плоскоклеточным раком области головы и шеи (ПР ОГШ), в частности гортани, некорректна вследствие отсутствия в доступных литературных источниках информации о связи между типом ВПЧ, уровнем вирусной нагрузки и риском развития злокачественной патологии гортани.

В связи с этим целью настоящего исследования явилась разработка алгоритма определения ВПЧ в опухолевой и прилегающей ткани больных ПРГ с помощью наборов АмплиСенс ВПЧ ВКР скрин-титр-FL и АмплиСенс ВПЧ ВКР генотип-FL для адекватной/корректной оценки присутствия вируса в исследуемой ткани в соответствии со специфической локализацией опухоли.

### Материал и методы

В исследование включены образцы опухолевой ( $n = 100$ ) и прилегающей ( $n = 100$ ) ткани, полученные от больных ПРГ III и IV стадии, проходивших лечение на базе отделения опухолей головы и шеи Томского НИИ онкологии в период 2010—2015 гг. В 46% случаев верифицирован ороговевающий (кератинизированный) рак. Экстракция ДНК проведена хлороформно-фенольным методом. Изучение частоты встречаемости, типирование и определение вирусной нагрузки ВПЧ проведено с наборами реагентов АмплиСенс ВПЧ ВКР скрин-титр-FL и АмплиСенс ВПЧ ВКР генотип-FL с применением сопроводительных программ Amplisens FRT HR HPV Screen RG4x и Amplisens FRT HR HPV Genotype RG4x (амплификатор Rotor-Gene 6000 фирмы «Corbett Research» (Австралия)).

### Результаты

Набор АмплиСенс ВПЧ ВКР скрин-титр-FL предусматривает одновременную амплификацию и детекцию в режиме реального времени участков ДНК E1—E2-генов ВПЧ и участка  $\beta$ -глобинового гена (внутренний контроль).

Для количественного определения ВПЧ параллельно с постановкой ПЦР с ДНК образца ткани ставится реакция амплификации с ДНК-калибраторами — образцами с известной концентрацией ДНК ВПЧ, выстраивается калибровочная кривая, по которой определяется концентрация ДНК вируса в образцах. Концентрация ДНК вируса в свою очередь нормируется по концентрации геномной ДНК [1].

Набор АмплиСенс ВПЧ ВКР генотип-FL применяется для одновременной амплификации участка гена E6 ВПЧ и участка  $\beta$ -глобинового гена. Данный набор обладает большей специфичностью по сравнению с АмплиСенс ВПЧ ВКР скрин-титр-FL, что обусловлено использованием разных типов праймеров: в наборе АмплиСенс скрин — вырожденных праймеров, тогда как в АмплиСенс генотип — типоспецифичных. Каждый тип ВПЧ регистрируется на специфическом канале флюоресценции, что позволяет определить генотип ВПЧ.

Несмотря на отработанные условия протоколов наборов АмплиСенс, сотрудники лаборатории онковирусологии Томского НИИ онкологии столкнулись с проблемой потери данных, или гиподиагностикой, что, вероятно, обусловлено спецификой анализируемых образцов ткани — низкой концентрацией ДНК ВПЧ. Это обстоятельство продиктовало необходимость разработки алгоритма оценки и интерпретации данных, полученных при изучении образцов опухолевой и прилегающей ткани, полученных от больных ПРГ.

На первом этапе исследования определена чувствительность набора АмплиСенс ВПЧ ВКР скрин-титр FL с использованием в качестве ДНК-матрицы плазмидной ДНК ВПЧ с известным количеством копий (от 10 до 5000). Каждая реакция ставится пятикратно (табл. 1). Результат стабильно (100%) воспроизводился при наличии 50 и более копий плазмидной ДНК вируса на реакцию по всем каналам флюоресценции. При количестве 10 копий на реакцию эффективность детекции варьировала в зависимости от канала флюоресценции. Наибольшее число позитивных результатов получено по каналу Green (внутренний контроль) — 80%, минимальное (40%) — по каналу Orange.

Вследствие методических особенностей провести проверку для определения уровня чувствительности набора АмплиСенс ВПЧ ВКР генотип-FL не представилось возможным.

Для верификации результатов и типирования ВПЧ была проведена реакция амплификации с набором АмплиСенс ВПЧ ВКР генотип-FL. Образцы ткани, определенные набором АмплиСенс ВПЧ ВКР скрин-титр-FL как вирусопозитивные, но в которых тип вируса не был определен с помощью набора АмплиСенс ВПЧ ВКР генотип-FL, считали вируснегативными. Результат был подтвержден лишь в 49% (25/51) ВПЧ-позитивных случаев (табл. 2).

На втором этапе исследования были проанализированы образцы опухолевой и прилегающей ткани, полученные от больных ПРГ, при помощи набора АмплиСенс ВПЧ ВКР скрин-титр-FL.

С учетом специфики локализации и уровня чувствительности метода была выбрана тактика постановки реакции в триплете. Проанализировано 200 образцов ткани (100/100 — опухолевая/прилегающая ткань). Вирусопозитивными по набору АмплиСенс ВПЧ ВКР скрин-титр-FL считали реакции с детекцией сигнала как минимум в одной из трех пробирок триплета (см. табл. 2). Во всех случаях детекции сигнала в одной из трех пробирок триплета было отмечено незначительное содержание вирусных частиц: около 380 копий (от 1 до 12 500 — рассчитано эмпирически) ДНК вируса на  $10^6$  клеток. ДНК ВПЧ была обнаружена в 25,5% случаев (51/200 с набором АмплиСенс ВПЧ ВКР скрин-титр-FL) и подтверждена в 17,5% случаев (35/200 с набором АмплиСенс ВПЧ ВКР генотип-FL). В опухолевой ткани ДНК ВПЧ была обнаружена в 21% (21/100) случаев с набором АмплиСенс ВПЧ ВКР скрин-титр-FL и подтверждена в 15 образцах. В прилегающей

Таблица 1

**Уровень чувствительности (в %) метода ПЦР в режиме реального времени**

Число копий на реакцию	GLOBAL FAM/Green	ВПЧ 16 JOE/Yellow	ВПЧ 18 ROX/Orange	ВПЧ 51 Cy5/Red
5000	5/5* (100)	5/5 (100)	5/5 (100)	5/5 (100)
500	5/5 (100)	5/5 (100)	5/5 (100)	5/5 (100)
50	5/5 (100)	5/5 (100)	5/5 (100)	5/5 (100)
10	4/5 (80)	3/5 (60)	2/5 (40)	3/5 (60)

Примечание. \* — соотношение числа положительных реакций внутри одной постановки ПЦР и общего числа реакций по каждому каналу детекции флюоресценции.

ткани ДНК ВПЧ выявлена в 30% (30/100) случаев с набором АмплиСенс ВПЧ ВКР скрин-титр-FL и подтверждена в 20 случаях. Следовательно, ВПЧ-положительный результат был верифицирован в 69% (35/51) случаев (см. табл. 2).

Таким образом, при работе с коммерческими наборами фирмы «АмплиСенс» относительно образцов ткани, полученных от больных ПРГ, количество ложноотрицательных результатов составило 31%, что диктует необходимость постановки реакции в триплете. При увеличении количества постановок с одним и тем же образцом вероятность обнаружения ДНК ВПЧ 1 из 12 типов в случае его низкой концентрации возрастает.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что вирусопозитивными следует считать образцы, в которых был определен тип ВПЧ вне зависимости от результатов постановки реакции с набором АмплиСенс скрин. В то же время вопрос о необходимости количественного определения ДНК вируса в ВПЧ-положительных образцах ткани, полученной от больных ПРГ, остается дискуссионным.

**Обсуждение**

Для идентификации и верификации ВПЧ-положительных случаев ПРГ в лаборатории онковирусологии Томского НИИ онкологии разработан алгоритм определения вируса папилломы в опухолевой и прилегающей ткани коммерческими тест-системами АмплиСенс ВПЧ ВКР скрин-титр-FL и АмплиСенс ВПЧ ВКР генотип-FL. Показана необходимость постановки реакции в триплете для увеличения шанса обнаружения вируса в исследуемой ткани. Кроме того, вирусопозитивными следует считать только образцы с валидным (верифицированным) типом ВПЧ, вне зависимости от результатов постановки реакции с набором АмплиСенс скрин.

Таблица 2

**Результаты ПЦР-анализа с применением наборов АмплиСенс ВПЧ ВКР скрин-титр-FL и АмплиСенс ВПЧ ВКР генотип-FL на образцах ткани больных ПРГ**

Число ВПЧ-положительных образцов/число постановок реакции	Опухолевая ткань	Прилегающая ткань	Всего
0/3	0	0	149
1/3	9/3* (33)	17/7 (41)	26/10 (38)
2/3	3/3 (100)	4/4 (100)	7/7 (100)
3/3	9/9 (100)	9/9 (100)	18/18 (100)

Примечание. \* — реакций, проведенных с помощью ПЦР набора АмплиСенс ВПЧ ВКР скрин-титр-FL, и числа ВПЧ-положительных случаев, подтвержденных набором АмплиСенс ВПЧ ВКР генотип-FL; в скобках — частота (в %) верифицированных ВПЧ-положительных случаев.

Полученные результаты, касающиеся применения отечественных тест-систем АмплиСенс ВПЧ ВКР скрин-титр-FL и АмплиСенс ВПЧ ВКР генотип-FL для изучения ассоциации ВПЧ с инициацией опухолевого процесса гортани, к сожалению, невозможно сравнить с другими подобными по причине отсутствия как информации о проведении данного вида исследований в России, так и непосредственно исследовательских работ в этом направлении.

Следует отметить, что, несмотря на внушительное количество проведенных экспериментальных исследований, посвященных ВПЧ-положительному ПРГ, на данный момент не существует алгоритма для определения клинически значимой вирусной нагрузки при данной патологии, в связи с чем проведение молекулярно-генетического теста по определению вирусной нагрузки у данной категории больных нецелесообразно. Поэтому вектор исследований прежде всего должен быть ориентирован на оценку частоты встречаемости типов ВПЧ, эндемичных для Томского региона или области, где проводится исследование. Вторым этапом исследования станет определение клинически значимой вирусной нагрузки для типов ВПЧ, которые с максимальной частотой будут обнаружены при ПРГ.

В рамках предложенной статьи коллектив лаборатории онковирусологии предлагает рассмотреть методы определения ВПЧ в ткани больных ПР ОГШ в контексте вирусного канцерогенеза для ориентации и помощи коллегам, которые планируют заниматься изучением ВПЧ-ассоциированной формы рака области головы и шеи.

ПЦР является широко распространенным методом определения генетической информации о ВПЧ. Теоретически для обнаружения в биологическом материале ДНК ВПЧ достаточно 30 циклов, в результате которых интересующий фрагмент вирусной ДНК будет амплифицирован до миллиарда копий. Данное преимущество позволяет выполнять диагностические манипуляции с малым количеством биологического материала (соскобы, капля крови, культура клеток, слюна, моча, образцы ткани, полученные при проведении тонкоигольной биопсии) или деградированной ДНК (архивные гистологические срезы, заключенные в парафин).

Кроме определения нуклеотидных последовательностей ВПЧ, техника ПЦР позволяет определить интеграцию вирусной ДНК в клеточный геном. Данное событие может быть детектировано по делеции генов E1—E2 либо отсутствию экспрессии E5-гена, которая является следствием делеции генов E1—E2, ведущей к пространственному разделению p97 промоторного региона и открытой рамки считывания E5-гена [3, 4]. Однако вышеперечисленные факторы не являются показательными, или маркерными, в отношении интеграции генома. Так, В.А. Van Tine и соавт. [4] в прилегающей к опухолевой морфологически неизменной ткани больных ПР ОГШ, содержащей геном ВПЧ в интегрированной и эписомальной форме, отметили низкий уровень экспрессии E5-гена. Более того, в опухолевой ткани обнаружены множественные сайты интеграции ДНК ВПЧ, тогда как в прилегающей это было ограничено лишь несколькими хромосомными локусами.

Однако даже после интеграции вирусного генома может наблюдаться частичная/полная супрессия экспрессии генов ВПЧ, или феномен «молчащей интеграции», вследствие процесса метилирования промоторных доменов вирусных генов [4, 5].

Не менее важным является и понимание того, что при встраивании ВПЧ в клеточный геном возможно образование как полноразмерных, так и сплайсированных вариантов мРНК генов E6—E7, среди которых только первые обладают онкогенной потенциальностью.

В контексте выбора метода детекции функционально активной формы ВПЧ необходимо учитывать и вероятность посттранскрипционных модификаций мРНК E6/E7 в виде сплайсинга и процесса полиаденилирования. При этом аль-

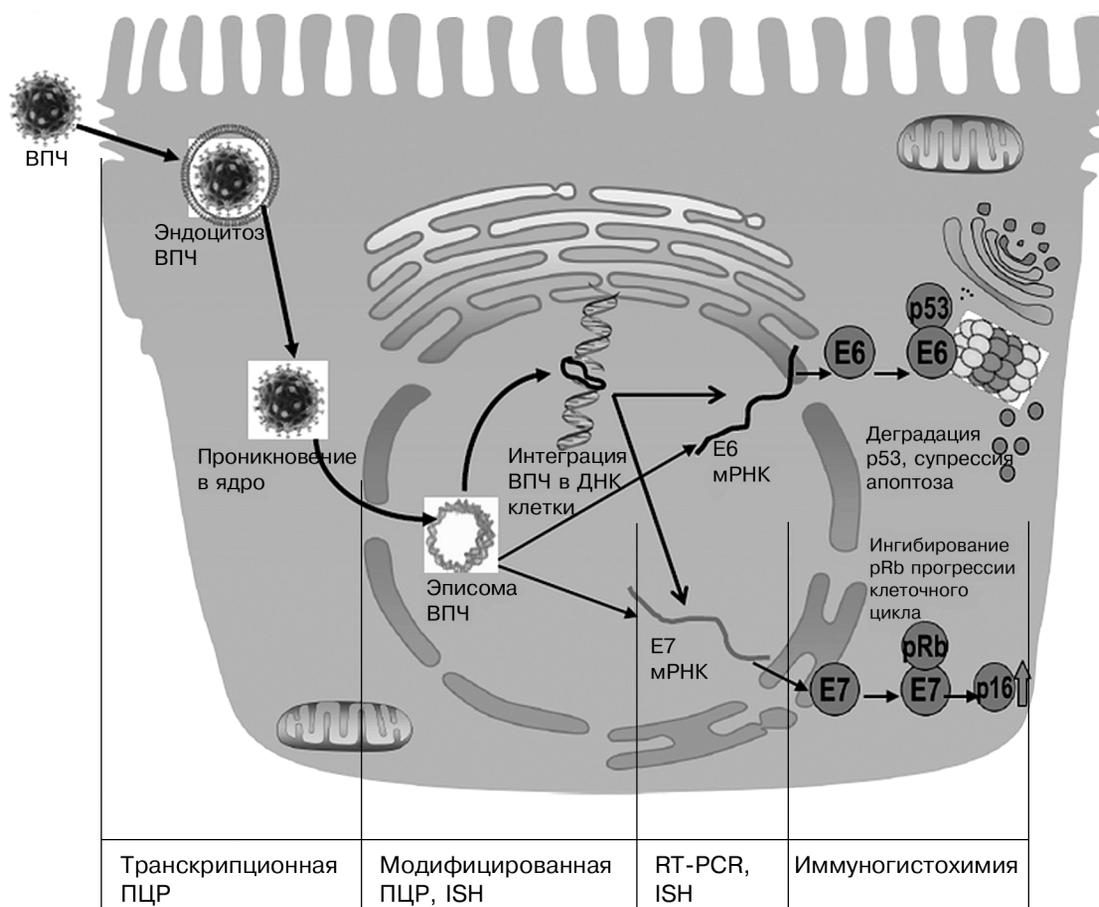


Схема инфицирования эпителиальной клетки вирусом папилломы человека и методы детекции ВПЧ.

После интервенции вириона в клетку вирус может существовать в эписомальной и интегрированной форме. Экспрессия вирусных онкопротеинов E6/E7, которая происходит с обеих форм ВПЧ-генома, инициирует деградацию белка-онкосупрессора p53 и ингибирование белка ретинобластомы pRb соответственно. Методы детекции ДНК ВПЧ, продуктов экспрессии вирусных и клеточных генов изображены в соответствии со стадией биологической активности вируса.

тернативный сплайсинг мРНК онкопротеинов приводит к трансляции преимущественно мРНК E7, тогда как трансляция мРНК E6 возможна только в его отсутствие [6]. Кроме того, при выборе в качестве маркера вирусной инфекции определение E6/E7-онкопротеинов следует акцентировать внимание на ядерной, а не на цитоплазматической локализации данных белков, поскольку именно ядерная локализация является специфичной для транскрипционно активной формы генома ВПЧ. Следует подчеркнуть, что уровень экспрессии E6/E7-генов может не зависеть ни от количества сайтов интеграции, ни от вирусной нагрузки [7].

Вместе с тем, ставя перед собой цель определения интегрированной формы ДНК ВПЧ по присутствию в клетке E6/E7-онкопротеинов, необходимо помнить, что образование мРНК данных генов может происходить как со встроенной, так и с эписомальной ДНК.

Поскольку при встраивании ДНК ВПЧ в геном клетки возможна потеря и другого гена — E6, наиболее информативным, по данным некоторых авторов, будет определение соотношения тандема генов E2/E6 [8—11]. Однако согласно данным Н.С. Mellin и соавт. [12], ген E2 ВПЧ может отсутствовать в эписомальной молекуле ДНК, что может стать причиной ложноположительных результатов.

Необходимо учитывать, что интеграция ДНК ВПЧ, возможно, не является ключевым событием на пути злокачественной трансформации слизистой оболочки респиратор-

ного тракта, как в случае РШМ. Так, при ПР ОГШ интеграция ДНК ВПЧ происходит в поздней стадии канцерогенеза, тогда как именно эписомальная форма ДНК вируса может обладать транскрипционной активностью и инициировать клеточную трансформацию, но с учетом пролонгированной персистенции в организме [3, 5, 13—16]. В связи с вышесказанным и рекомендациями некоторых зарубежных коллег для определения функционально активного генома ВПЧ приоритет должен быть отдан эписомальной форме ДНК [3, 13, 14, 17, 18].

Поскольку для инициации экспрессии генов ВПЧ одного лишь присутствия в клетке вирусной ДНК недостаточно, индикатором транскрипционно активной формы ВПЧ является уровень экспрессии мРНК E6/E7-генов, оценить который можно с помощью таких методов, как ТМА, RT-PCR, APOT, PCR-RFLP, nested PCR, основанных на амплификации транскриптов вирусных генов (см. рисунок).

Так, NASBA (nucleic acid sequence based amplification) — метод, основанный на амплификации РНК и получивший широкое распространение в научной среде, позволяет как идентифицировать ВПЧ в ткани, так и оценить уровень экспрессии онкопротеинов E6/E7.

Провести определение мРНК E6/E7 ВПЧ 16, ВПЧ 18, ВПЧ 31, ВПЧ 33, ВПЧ 35 и ВПЧ 45 позволяют также коммерческие наборы (PreTest HPVProofer/Norchip, NucliSENS EasyQ HPV/bioMerieux) [19].

Для получения амплифицированных транскриптов генов E6/E7 стоит рассмотреть метод ТМА [7, 20].

АРТИМА HPV-тест позволяет определить мРНК E6/E7 14 (16/18/31/33/35/39/45/51/52/56/58/59/66/68) типов ВПЧ. Данная тест-система основана на ТМА-технике с использованием магнитных микрочастиц для выделения транскриптов генов, находящихся в образце ткани, с последующим созданием ДНК-копии с мРНК (при помощи обратной транскриптазы) и копии РНК-ампликона с ДНК-матрицы (при помощи T7-РНК-полимеразы) [21].

Менее распространен в научной среде вследствие его трудоемкости метод АРОТ, который позволяет провести дифференциальную диагностику между транскриптами, экспрессируемыми с интегрированной и эписомальной форм [7, 20, 22].

### Заключение

Таким образом, при выборе стратегии и дизайна исследования следует учитывать специфичность технических и аналитических характеристик каждого из методов детекции ВПЧ. Несмотря на широкое распространение RT-PCR как стандартного метода определения продуктов транскрипции E6/E7-генов ВПЧ, основным лимитирующим условием RT-PCR (как, впрочем, и всех методов, основанных на определении РНК) является низкая стабильность РНК. Кроме того, отмечена прямая корреляция между чувствительностью метода — временем забора/фиксации образца ткани — и условиями хранения [23]. Поэтому большинство специалистов в области изучения ВПЧ-позитивного ПРГ рекомендуют в комплексе с RT-PCR-методом проводить иммуногистохимическое исследование или ISH-анализ уровня экспрессии клеточного протеина p16 как маркера стабильной экспрессии мРНК E6/E7-генов ВПЧ.

В Томском НИИ онкологии при диагностике высокоонкогенных ВПЧ в опухолевой и прилежащей ткани больных раком гортани с помощью коммерческих наборов АмплиСенс ВПЧ ВКР сотрудники обнаружили факт гиподиагностики, что, вероятно, обусловлено спецификой анализируемых образцов ткани — низкой концентрацией ДНК ВПЧ в исследуемой ткани. В связи с этим был разработан алгоритм оценки и интерпретации данных, основанный на постановке реакции ПЦР в триplete, поскольку при увеличении количества постановок с одним и тем же образцом вероятность обнаружения ДНК ВПЧ 1 из 12 типов в случае его низкой концентрации возрастает.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### ЛИТЕРАТУРА (п.п. 2—25 см. REFERENCES)

1. Кувяда Д.А., Шипулина О.Ю. Количественный подход в диагностике папилломавирусной инфекции. *Практическая онкология*. 2006; 7(3): 135—41.

### REFERENCES

1. Kuevda D.A., Shipulina O.Yu. The quantitative approach in diagnostic of HPV-infection. *Prakticheskaya onkologiya*. 2006; 7(3): 135—41. (in Russian)
2. Meijer C.J., Snijers P.J., Castle P.E. Clinical utility of HPV genotyping. *Gynecol. Oncol.* 2006; 103 (1): 12—7.
3. Hafner N., Driesch C., Gajda M., Jansen L., Kirchmayr R., Runnebaum I.B. et al. Integration of the HPV16 genome does not invariably result in high levels of viral oncogene transcripts. *Oncogene*. 2008; 27: 1610—7.
4. Van Tine B.A., Kappes J.C., Banerjee N.S., Knops J., Lai L., Syeenbergen R.D. et al. Clonal selection for transcriptionally active onco-

- genes during progression to cancer. *J. Virol.* 2004; 78(20): 11172—86.
5. Briolat J., Dalstein V., Saunier M., Joseph K., Caudroy S., Pre J.L. HPV prevalence, viral load and physical state of HPV-16 in cervical smears of patients with different grades of CIN. *Int. J. Cancer*. 2007; 121: 2198—204.
6. Zheng Z.M., Baker C.C. Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. *Front. Biosci.* 2006; 11: 2286—302.
7. Olthof N.C., Huebbers C.U., Kolligs J., Henfling M., Ramaekers F.C., Cornet I. et al. Viral load, gene expression and mapping of viral integration sites in HPV16-associated HNSCC cell lines. *Int. J. Cancer*. 2015; 136(5): 207—18.
8. Jung A.C., Briolat J., Millon R., de Reyniès A., Rickman D., Thomas E. et al. Biological and clinical relevance of transcriptionally active human papillomavirus (HPV) infection in oropharynx squamous cell carcinoma. *Int. J. Cancer*. 2010; 126(8): 1882—94.
9. De Marco L., Gillio-Tos A., Bonello L., Ghisetti V., Ronco G., Merletti F. Detection of human papillomavirus type 16 integration in pre-neoplastic cervical lesions and confirmation by DIPS-PCR and sequencing. *J. Clin. Virol.* 2007; 38(1): 7—13.
10. Peitsaro P., Johanson B., Syrjanen S. Integrated human papillomavirus type 16 is frequently found in cervical cancer precursors as demonstrated by a novel quantitative real-time PCR technique. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 40(3): 886—91.
11. Klaes R., Woerner S.M., Ridder R., Wentzensen N., Duerst M., Schneider A. et al. Detection of high-risk cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer by amplification of transcripts derived from integrated papillomavirus oncogenes. *Cancer Res.* 1999; 59(24): 6132—6.
12. Mellin H., Dahlgren L., Munck-Wikland E., Lindholm J., Rabbani H., Kalantari M. et al. Human/papillomavirus type 16 is episomal and a high viral load may be correlated to better prognosis in tonsillar cancer. *Int. J. Cancer*. 2002; 102(2): 152—8.
13. Wiest T., Schwarz E., Enders C., Flechtenmacher C., Bosch F.X. Involvement of intact HPV16 E6/E7 gene expression in head and neck cancers with unaltered p53 status and perturbed pRb cell cycle control. *Oncogene*. 2002; 21: 1510—7.
14. Bechtold V., Beard P., Raj K. Human papillomavirus type 16 E2 protein has no effect on transcription from episomal viral DNA. *J. Virol.* 2003; 77: 2021—8.
15. Ragin C.C., Reshmi S.C., Gullin S.M. Mapping and analysis of HPV16 integration sites in a head and neck cancer cell line. *Int. J. Cancer*. 2004; 110: 701—9.
16. Zaravinos A., Mammias I.N., Sourvinos G., Spandidos D.A. Molecular detection methods of human papillomavirus (HPV). *Int. J. Biol. Markers*. 2009; 24(4): 215—22.
17. Sehr P., Muller M., Höpfl R., Widschwendter A., Pawlita M. HPV antibody detection by ELISA with capsid protein L1 fused to glutathione S-transferase. *J. Virol. Methods*. 2002; 106(1): 61—70.
18. Wentzensen N., Vinokurova S., von Knebel Doeberitz M. Systematic review of genomic integration sites of human papillomavirus genomes in epithelial dysplasia and invasive cancer of the female lower genital tract. *Cancer Res.* 2004; 64(11): 3878—84.
19. Molden T., Kraus I., Karlsen F., Skomedal H., Nygård J.F., Hagmar B. Comparison of Human Papillomavirus messenger RNA an DNA detection: a cross-sectional study of 4,136 women >30 years of age with a 2 year follow-up of high-grade squamous intraepithelial lesion. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2005; 14(2): 367—72.
20. Chaiwongkot A., Pientong C., Ekalaksananan T., Vinokurova S., Kongyingyoes B., Chumworathayi B. et al. Detection of the human papillomavirus 58 physical state using the amplification of papillomavirus oncogene transcripts assay. *J. Virol. Methods*. 2013; 189(2): 290—8.
21. Hill C.S. Molecular diagnostic testing for infectious diseases using TMA technology. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2001; 1(4): 445—55.
22. Bogusiak K., Kobos J. The role of human papillomavirus infection in the head and neck region and methods for its detection. *Pol. J. Pathol.* 2014; 65(1): 1—14.
23. Iftner T., Villa L.L. Human papillomavirus technologies. *J. Natl. Cancer Inst. Monogr.* 2003; (31): 80—8.

Поступила 06.04.16

Принята в печать 24.05.16