



3. Пат. 2161519 Российская Федерация, МПК⁸ А 61 N 5/067. Способ лечения полипов среднего уха / Самбулов В. И., Зенгер В. Г., Наседкин А. Н., Селин В. Н.; заявитель и патентообладатель Москва, ГУ МОНИКИ им. М. Ф. Владимирского; заявл. 01.12.99; опубл. 10.01.01, Бюл. №1 (Пч.). – 252 с.
4. Пат. 21777351 Российская Федерация, МПК⁸ А 61 N 5/067. Способ лечения мукозитов среднего уха / Самбулов В. И., Чканников А. Н., Зенгер В. Г., Наседкин А. Н., Исаев В. М.; заявитель и патентообладатель Москва, ГУ МОНИКИ им. М. Ф. Владимирского; заявл. 07.12.00; опубл. 27.12.01, Бюл. №36 (Пч.). – 123 с.
5. Пат. 2182818 Российская Федерация, МПК⁸ А 61 F 11/00. Способ хирургического лечения дисфункций слуховой трубы / Исаев В. М., Наседкин В. Н., Зенгер В. Г., Ашулов З. М., Самбулов В. И., Фетисов И. С.; заявитель и патентообладатель Москва, ГУ МОНИКИ им. М. Ф. Владимирского; заявл. 05.04.01; опубл. 27.05.02, Бюл. №15 (Пч.). – 207 с.

УДК: 616. 22–006. 52–053. 2(470. 5)

ТИПИРОВАНИЕ ДНК ПАПИЛЛОМАВИРУСА ЧЕЛОВЕКА У ДЕТЕЙ УРАЛЬСКОГО РЕГИОНА С ДИАГНОЗОМ ЮВЕНИЛЬНЫЙ РЕЦИДИВИРУЮЩИЙ РЕСПИРАТОРНЫЙ ПАПИЛЛОМАТОЗ

В. О. САМОЙЛИЧЕНКО, Х. Т. АБДУЛКЕРИМОВ

*ГОУ ВПО Уральская государственная медицинская академия, г. Екатеринбург
(Зав. каф. оториноларингологии – проф. Х. Т. Абдулкеримов)*

Рецидивирующий респираторный папилломатоз является наиболее часто встречающейся доброкачественной опухолью гортани. Папилломы могут поражать любой участок эпителия дыхательных путей – от полости носа до легочной паренхимы, но наиболее частая локализация папиллом – слизистая оболочка гортани [6].

Папилломатоз гортани представляет собой одну из сложных проблем оториноларингологии. В связи с увеличением заболеваемости детей папилломатозом гортани, тяжестью патологии (рост папиллом в самом узком участке дыхательных путей приводит к выраженному стенозу гортани, вплоть до асфиксии), возможной малигнизацией папиллом, высокой стоимостью лечения, длительностью заболевания и его клинической непредсказуемостью, а также с малым количеством информации по данному вопросу возникает необходимость изучения и типирования папилломавируса человека.

Папилломавирус человека принадлежит к подгруппе А семейства *Papovaviridae*. Имеет диаметр 40–55 нм. Его оболочка – капсид составлен из 72 модулей (капсомеров). Геном вируса представлен замкнутой в кольцо ДНК. Характерной особенностью ПВЧ является способность вызывать пролиферацию эпителия кожи и/или слизистых оболочек.

Вирусная этиология папилломатоза гортани предполагалась давно, но лишь в последние десятилетия появились научные работы о строении и свойствах папилломавирусов. Успехи молекулярной биологии дали возможность судить не только о присутствии вируса в ткани папиллом, но даже произвести разделение ПВЧ на типы и проследить связь типа вируса с заболеваниями той или иной локализации [5].

Вирус не размножается в культуре клеток, поэтому сведения о биологии вирусов получены с помощью молекулярно-генетических технологий и эпидемиологических исследований. Показано существование 100 типов, отличающихся по строению ДНК, 75 из них молекулярно клонированы и полностью секвенированы. Типирование ПВЧ основано не на антигенных различиях, а на ДНК-гомологии. В настоящее время выделены разновидности низкого – ПВЧ 6 и 11, среднего – ПВЧ 31, 33, 35 и высокого онкогенного риска – ПВЧ 16 и 18 [3].

Основную роль в этиологии папилломатоза гортани у детей играют ПВЧ типов 6, 11, 30, которые известны также как возбудители генитального папилломатоза [1]. Это подтверждает передачу папилломавирусной инфекции новорожденным от матерей посредством инфицированных околоплодных вод или при прохождении через родовые пути.



В диагностике ПВЧ с целью типирования вируса применяется метод полимеразной цепной реакции. В настоящее время используется современная модификация ПЦР с детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени (Real-time PCR), принципиальная особенность которой заключается в наличии линейной зависимости кинетики накопления флуоресцентного сигнала от концентрации специфической ДНК [4].

Цель исследования – генотипирование ДНК ПВЧ у детей Уральского региона с диагнозом ювенильный рецидивирующий респираторный папилломатоз, сравнение полученных результатов с данными литературы.

Материалы и методы исследования

В настоящее исследование включены 29 детей в возрасте от 3 месяцев до 15 лет с диагнозом папилломатоз гортани, находившиеся на лечении в ЛОР-отделении ДГКБ №9 г. Екатеринбурга. Материалом для молекулярно-биологического исследования служила папилломатозная ткань из просвета гортани, удаленная при прямой ларингоскопии выкусывателями. Манипуляции проводили в стерильных условиях под общим обезболиванием. Исследуемый материал помещали в отдельные пробирки, содержащие стерильный физиологический раствор. Для максимального сохранения клеточного и вирусного ДНК пробирки замораживали сразу после взятия материала и хранили до проведения ПЦР-анализа при -70°C .

После предварительной обработки биоптатов раствором протеиназы К (5 мг/мл) проводили выделение ДНК с помощью коммерческого набора «ДНК – сорб Б». Постановку ПЦР осуществляли с использованием наборов «АмплиСенс» того же производителя для индикации ПВЧ 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35 и 45 серотипов согласно «Инструкции по применению».

Продукты амплификации подвергали электрофорезу в 2% агарозном геле с бромистым этидием с последующим учетом результатов на ультрафиолетовом трансиллюминаторе. Положительным результатом считали наличие в треке отчетливой светящейся полосы ДНК на уровне, совпадающем с образцом контрольной ДНК соответствующего серотипа ПВЧ.

Принцип метода ПЦР (Polymerase chain reaction (PCR)) был разработан Кэри Мюллисом в 1983 г. [1, 4]. В основе метода ПЦР лежит природный процесс – комплементарное достраивание ДНК матрицы, осуществляемое с помощью фермента ДНК-полимеразы. Эта реакция носит название репликации ДНК.

Естественная репликация ДНК включает в себя несколько стадий:

- денатурация ДНК (расплетение двойной спирали, расхождение нитей ДНК);
- образование коротких двухцепочечных участков ДНК (затравок, необходимых для инициации синтеза ДНК);
- синтез новой цепи ДНК (комплементарное достраивание обеих нитей).

Данный процесс можно использовать для получения копий коротких участков ДНК, специфичных для конкретных микроорганизмов, т. е. осуществлять целенаправленный поиск таких специфических участков, что и является целью генодиагностики для выявления возбудителей инфекционных заболеваний.

Открытие термостабильной ДНК-полимеразы (Taq-полимеразы) из термофильных бактерий *Thermis aquaticus*, оптимум работы которой находится в области $70-72^{\circ}\text{C}$, позволило сделать процесс репликации ДНК циклическим и использовать его для работы *in vitro*. Создание программируемых термостатов (амплификаторов), которые по заданной программе осуществляют циклическую смену температур, создало предпосылки для широкого внедрения метода ПЦР в практику лабораторной клинической диагностики. При многократном повторении циклов синтеза происходит экспоненциальное увеличение числа копий специфического фрагмента ДНК, что позволяет из небольшого количества анализируемого материала, который может содержать единичные клетки микроорганизмов получить достаточное количество ДНК копий для идентификации их методом электрофореза.

Комплементарное достраивание цепи начинается не в любой точке последовательности ДНК, а только в определенных стартовых блоках – коротких двунитевых участках. При присоединении таких блоков к специфическим участкам ДНК можно направить процесс синтеза новой цепи только в этом участке, а не по всей длине ДНК-цепи. Для создания стартовых бло-



ков в заданных участках ДНК используют две олигонуклеотидные затравки (20 нуклеотидных пар), называемые праймерами. Праймеры комплементарны последовательностям ДНК на левой и правой границах специфического фрагмента и ориентированы таким образом, что достраивание новой цепи ДНК протекает только между ними [1, 3].

Таким образом, ПЦР представляет собой многократное увеличение числа копий (амплификация) специфического участка ДНК, катализируемое ферментом ДНК-полимеразой.

Математическую обработку результатов выполняли на персональном компьютере с использованием программного обеспечения Microsoft Excel 2003.

Результаты исследования и их обсуждение

Проанализировав истории болезней детей, находившихся на лечении в ЛОР-отделении ДГКБ №9 г. Екатеринбурга, с диагнозом папилломатоз гортани в период с 1990 по 2008 годы, мы можем отметить рост заболеваемости (от 2 больных в 1991 г. до 37 в 2008 г.). Причем частота госпитализации и хирургического удаления папиллом в 2005–2008 г. г. варьировалась от 1 до 7 раз в год: 1 раз в год 46%, 1 раз в 6 месяцев 36%, 1 раз в 3 месяца 9% и 7 раз в год также 9%. По возрасту больные распределились следующим образом: 46% – до 3 лет, 45% – 3–6 лет и 9% составляют дети старше 10 лет. Дебют заболевания составил 47% в возрасте 3–6 лет, 42% – дети младше 3 лет и 11% – дети старшей возрастной группы. Анализ социально-бытовых условий (полнота семьи, условия проживания, качество питания) показал, что в 55% случаев они оценены как неблагоприятные. Сроки госпитализации составили в 36% случаев 10 дней, в 64% – до 21 дня.

Типирование ДНК ПВЧ проводилось у 28 детей, находившихся на хирургическом лечении с июня 2007 года по ноябрь 2008 года. В 26 образцах была обнаружена ДНК ПВЧ и 6, и 11 типов, и в 3 случаях – выявление отдельно 6 или 11 типов, что согласуется с данными литературы [2] и говорит о доброкачественности заболевания (так как ПВЧ 6 и 11 типов относят к вирусам низкого онкогенного риска). В 1 случае выявлено наличие в ткани папилломы ДНК трех типов ПВЧ: 6, 11 и 16. По данным литературы [1], ПВЧ 16 типа является вирусом высокого онкогенного риска и служит возбудителем рака шейки матки. В данном случае, выявление 16 типа ПВЧ показывает возможность озлокачествления процесса, что подтверждается частотой рецидивирования (7 раз в год), клинической картиной (затруднение дыхания вплоть до асфиксии, затруднение в глотании, отказ от еды, осиплость или отсутствие голоса), а также проведением прямой ларингоскопии (когда было диагностировано прорастание папилломы в пищевод). Также в 1 случае, помимо 6, 11 типов, обнаружены 33 и 35 (вирусы среднего онкогенного риска), что настораживает в плане дальнейшего клинического течения заболевания.

Все это дает повод думать о неблагоприятном прогнозе исхода заболевания и необходимости дальнейшего детального изучения и решения данной проблемы.

Выводы:

1. *Отмеченная тенденция роста заболеваемости ювенильным респираторным папилломатозом (от 2 до 37 лиц) и частоты рецидивирования доказывает необходимость детального изучения данного вопроса.*
2. *ДНК папилломавируса человека 6 и 11 типов выявлены в 100% случаев, причем у 90% детей отмечается микстинфицирование (2 и более типов). Выявление типов среднего и высокого риска онкогенности заставляет заподозрить более тяжелое клиническое течение данного заболевания.*
3. *Типирование папилломавируса человека в эпителиальной ткани может дать дополнительную информацию для выяснения прогноза заболевания и в последующем тактики лечения.*

ЛИТЕРАТУРА

1. Башмакова М. А. Папилломавирусная инфекция (пособие для врачей) / М. А. Башмакова, А. М. Савичева. – М.: 2003
2. Вознесенская И. А. Папилломы ВПД / И. А. Вознесенская. – М: Медицина 1974; 165 с.
3. Махов А. М. Успехи современной биологии / Махов А. М., Коган А. И., Клименко С. М. 1989; 102 (2): 259–279.
4. Покровский В. И. Молекулярная диагностика 2007 / В. И. Покровский. – М.: 2007; том 3, 124 с.
5. Чирешкин Д. Г. Хроническая обструкция гортанной части глотки, гортани и трахеи у детей. Этиология, клиника и методы устранения / Д. Г. Чирешкин. – М.: Радпид–Принт, 1994; 144 с.
6. Genital Papillomavirus Infections Modern Diagnosis and Treatment. / G. Gross, S. Jablonska, H. Pfister et al. // Spigener-Verlag 1990. – P. 449.