جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة ديالى كلية العلوم
قسم علوم الحياة

تقييم مناعي وجزيئي لفيروس الورم الحليمي البشري بين النساء العراقيات المصابات بأمراض عنق الرحم

رسالة مقدمة لمجلس كلية العلوم جامعة ديالى كجزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة

من قبل الطالبة
ضحى صلاح محمد

بكالوريوس علوم الحياة \كلية العلوم\جامعة ديالى
٢٠١٨

بأشراف

ا.م.د ابتهال حميد محسن

ا.م.د عفراء محجوب النداوي

٢٠٢٣م

١٤٤٥ هـ

Republic of Iraq
Ministry of Higher Education and
Scientific Research
University of Diyala
College of Science
Department of Biology

Immunological and Molecular Evaluation Of Human Papillomavirus Among Iraqi Women With Cervical Diseases

A Thesis
Submitted to the Council of the College of Science,
University of Diyala, in Partial Fulfillment of the
Requirements for the Degree of Master of Biology

By
Duha Salah Mohammed
B.Sc. Biology /College of Science / Diyala University,
2018

Supervised by

Assistant Professor
Ph. D. Ibtihal Hameed Mohsin

Assistant Professor
Ph. D. Afraa Mahjoob AL-Naddawi

2023 A.D **1445 A.H**

1.1 Introduction

Cervical cancer is the growth of abnormal cells in the lining of the cervix. The most common cervical cancer is squamous cell carcinoma, accounting for 70% of cases. Adenocarcinoma is less common (about 25% of cases) and more difficult to diagnose because it starts higher in the cervix. (Cohen *et al*.,2019).

Cervical cancer is the fourth most common cancer among women globally, with an estimated 604 000 new cases and 342 000 deaths in 2020. About 90% of the new cases and deaths worldwide in 2020 occurred in low- and middle-income countries (Bhatla *et al*.,2021). cervical cancer ranks fourth in the world in relation to the tumors affecting women, with a 13.3% incidence and a mortality rate of 7.3 every 100,000 women (Bautista *et al*.,2022).

The relationship between cervical cancer and sexual behavior was suspected for more than 100 years and was established by epidemiologic studies in the 1960s. In the early 1980s, cervical cancer cells were shown to contain HPV DNA. Epidemiologic studies demonstrating a consistent association between HPV and cervical cancer were published in the 1990s; more recently, HPV has been identified as a cause of certain other mucosal cancers. A quadrivalent vaccine to prevent infection with four types of HPV was licensed for use in the United States in 2006, a bivalent vaccine was licensed in 2009, and a 9-valent vaccine was licensed in 2014 (Signorelli *et al*.,2017).

Some Human Papilloma virus (HPV) genotypes are present all over the world. Indeed, several studies have shown that the most common types are High risk (HR)-HPVs, with genotypes 16, 18, 59, 45, 31, 33, 52, 58, 35, 39, 51, 56, and 53 mainly found in descending order of prevalence. Among the Low risk (LW)-HPVs, the most common are

HPV 6 and 11 types, which are responsible for almost all genital warts (GWs) However, their prevalence differs by region moreover (Kombe *et al*.,2021). HPV infection alone is not adequate for the advancement to cervical cancer and other risk conditions such as smoking, prolonged oral contraception consumption, co-infections, and multi-parity, immune-related diseases appear to lead the infection on the route of carcinogenesis. Cervical cancer continues to be a major health problem in developing countries (Coleman *et al*., 2013).

Human papilloma virus is the most common sexually transmitted infection worldwide. It is also the causative agent for 1/3 of all the viral induced tumors and responsible for (5%) of human cancers (Mahmoud & Rifat, 2021). HPV infections spread through vaginal or anal sexual contact, or through skin to skin contact (Mahmoud & Nofal, 2022). Sexually active individuals who have multiple partners, weakened immune systems, or damaged skin, are more susceptible to HPV (Harley *et al*., 2020). Structurally, HPV16 and HPV18 are small non-enveloped viruses with icosahedral capsid enclosing a circular double-stranded DNA. The total length of viral DNA is about 8000 base pairs (8 kb), encompassing eight open reading frames transcribed as polycistronic messages from a single DNA strand (Gorginzadeh & Motavaf, 2021).

Cancers of the throat, mouth, cervix, anus, penis, and vagina are linked to HPV infections (Schmitz, 2020). HPV is thought to be responsible for more than 90% of anal and cervical cancers, about 70% of vaginal and vulvar cancers, 60% of penile cancers, and 60% to 70% of oropharyngeal cancer" (Saxena *et al*., 2022).

The molecular biology of this small DNA molecule is complex. (Patel *et al*., 2019). According to the Centers for Disease Control and Prevention (CDC), HPV infections are common in the United States.

Infection by most papillomavirus types, depending on the type, is either asymptomatic (e.g. most Beta-PVs) or causes small benign tumors, known as papillomas or warts (e.g. human papillomavirus 1, HPV6 or HPV11), Papillomas caused by some types. However, human papillomaviruses 16 and 18, carry a risk of becoming cancerous (Muñoz, *et al*.,2006).

1.2 Aim of study

1- Immunological detection to presence of anti-HPV IgM in serum in women with Enzyme-Linked Immunosorbent Assay technique (ELISA).

2-Measuring the concentration of some cytokines and their immune relationship to the presence of the HPV.

3-Molecular Detection of HPV and their genotype by polymerase chain reaction (PCR).

4- Sequences the E7, E6 gene and made their phylogenic tree.

الخلاصة

اجريت هذه الدراسة من الفترة (تشرين الاول ٢٠٢٢الى كانون الثاني ٢٠٢٣) في مستشفى بغداد التعليمي \بغداد \العراق بموافقة اللجنة العلمية للصحة اشارة الى الكتاب ذي العدد ٣٠٠٥ في ٩\١٠\٢٠٢٢.

تهدف الدراسة الحالية إلى الكشف المناعي عن انتشار فيروس الورم الحليمي البشري بين النساء اللواتي يعانين من سرطان عنق الرحم، وتحديد العلاقة بين الفيروس وسرطان عنق الرحم، ومن ثم دراسة التأثير المناعي لوجود الفيروس على مستوى تركيز الحركيات الخلوية نوع ١٠،عامل النخر الورمي و تحديد النمط الوراثي الحالي في العراق من خلال جمع ٨٩ عينة مع ٤٠ عينة سليمة للمقارنة وتحتوي على عينات من عنق الرحم ودم الوريد من المرضى بعد تشخيصهم في عيادة الكشف المبكر في مستشفى بغداد التعليمي بواسطة أخصائية نسائية.

تضمن التشخيص المناعي استخدام تقنية مقايسة الممتز المناعي المرتبط بالانزيم (ELISA) لاكتشاف الاجسام المضادة لفيروس الورم الحليمي البشري من النوع M وكانت نسبتها ١٩ (٢١.٣%)، وكذلك مستوى الحركيات الخلوية -١٠ بمتوسط ٢.٢٢٣ للمرضى و ٢.٠٣٥ للأشخاص الأصحاء مع وجود فارق كبير ($P < 0.001$)، ومستويات عامل النخر الورمي ألفا TNF كانت أعلى في المرضى من الأشخاص الأصحاء وبلغت متوسط ٢.٦٥٠ للمرضى و ٢.٣٨٤ للأشخاص الأصحاء مع وجود فارق كبير ($P < 0.001$).

التشخيص الجزيئي تضمن استخدام تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) لاكتشاف فيروس الورم الحليمي البشري الإيجابي (١٩) وتحديد النمط الوراثي HPV16 (57.89) و النمط الوراثي HPV6 (10.52) ولكنه كان سلبياً بالنسبة للنمط الوراثي (HPV-11، 18، 45). فيروس الورم الحليمي البشري من النوع ١٦ وفيروس الورم الحليمي البشري من النوع ٦ شائعان بين النساء العراقيات اللواتي يعانين من سرطان عنق الرحم. تم تكوين التسلسل الوراثي لتحديد النمط الوراثي لفيروس الورم الحليمي البشري بالنسبة لجين E6، وأشارت النتائج إلى وجود اختلاف في الحمض النووي في عينتين تم فحصهما S1 و S2 (في الموقع ١٢٤A>C) بالنسبة لجين E6 في فيروس الورم الحليمي البشري النوع ٦، وبالنسبة لجين E6 في فيروس الورم الحليمي البشري النوع ١٦، أشارت نتائجنا إلى وجود اختلاف في الحمض النووي في العينات التي تم فحصها S2 و S3 و S4 و S5 و S10 (في الموقع ٢٢٥G>T). وأظهر ترجمة هذه الاختلافات إلى بقايا الأحماض الأمينية أن هذه الاستبدالات في الحمض النووي لها تأثير صامت على طول البروتين المشفر بالشفرة (p.74I= و p.117 L=). واستنتجنا من الأشجار الوراثية المولدة أن هناك مسافات وراثية واسعة تم العثور عليها بين فرع عيناتنا وبين أنواع أخرى من نفس الكائن الفيروسي، حيث تم التعرف على مسافات وراثية متميزة بين النوع ٦ والنوع ١٦ وبين السلاسل الخارجة المدرجة.

أظهرت شجرة النشوء الوراثية الخاصة بعزلات النوع ١٦ وجود مسافات وراثية متنوعة بين سلاسل النوع ٦ والنوع ١١ والنوع ٩ والنوع ٤٣ والنوع ٧ والنوع ٤٤ والنوع ٧٤ على التوالي. وفيما يتعلق بشجرة النشوء الوراثية لعزلات النوع ٦، أظهرت وجود مسافات في التطور الوراثي المتغيرة بين تسلسلات النوع ١٦ والنوع ٢٦ والنوع ٣٤ والنوع ٧٠ على التوالي. لذلك، استنادًا إلى هذا، رسمنا شجرة تطور في هذه الأنماط الجينية.

استنتجت الدراسة الحالية بأن مستويات الحركيات الخلوية و عامل النخر الورمي ومستوى الجسم المضاد لفيروس الورم الحليمي البشري (HPV) كانت لديها حساسية وخصوصية عالية في تشخيص المرضى مقارنة بالأفراد الأصحاء باستخدام تقنية ELISA، وكانت المستويات أعلى في المرضى مقارنة بالأفراد الأصحاء مع وجود فرق ملحوظ. النمطان الأكثر شيوعًا في الدراسة الحالية كانا HPV-16 و HPV-6، مما يشير إلى أن النساء لدينا عرضة للإصابة بسرطان عنق الرحم.