

# Совершенствование лечебно-диагностических подходов к ВПЧ-инфекции гениталий

Профессор С.И. Роговская, Е.С. Аколова, профессор Е.А. Коган

1 МГМУ имени И.М. Сеченова

РМАПО

Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова

Министерства здравоохранения и социального развития РФ, Москва

## Актуальность проблемы

Среди заболеваний, передающихся половым путем, особое место занимает папилломавирусная инфекция (ПВИ) гениталий, возбудителем которой является вирус папилломы человека (ВПЧ).

Вероятность трансформации поражений, индуцированных высокоонкогенными типами ВПЧ в CIN (цервикальную интраэпителиальную неоплазию) и рак шейки матки (РШМ), а также отсутствие в практике врача надежных прогностических маркеров обуславливают необходимость дальнейших исследований роли и качества диагностических тестов в скрининговых программах и клинической практике [zur Hausen, 2009]. Имеется ряд проблем с внедрением новых классификаций, что отражается на преемственности ведения пациенток с ПВИ, не определена оптимальная прогностическая эффективность молекулярных маркеров, среди которых перспективны COX 2 и p16<sup>INK4a</sup>, имеются противоречия в тактике ведения женщин с плоскоклеточными поражениями шейки матки низкой степени (LSIL).

Известно, что при наличии в тканях высокоонкогенных типов ВПЧ онкогены E6 и E7 вируса инактивируют в клетках эпителия противоопухолевые протеины p53 и pRb [Fujii T., Tsukazaki K., 2006]. Протеин p16<sup>INK4a</sup> – один из ингибиторов циклинзависимых киназ, предотвращающий фосфорилирование pRb [Serrano M., Hannon Gj., 2006], активно изучается в последние годы.

Выявлена взаимосвязь уровня маркера COX 2 с воспалительным процессом в шейке матки, что предположительно отражает степень инфицирования ВПЧ высокого риска (ВПЧ-ВР) [Greenberg M.D., 1999]. Предлагается использовать COX 2 в качестве биомаркера на ранней стадии развития неопластических процессов шейки матки и при выявлении его повышенного уровня своевременно проводить необходимую терапию [Powell M.A., 2003].

Сформировавшиеся в последние годы тенденции в лечении ПВИ недостаточно эффективны, поиски новых средств продолжаются. Терапия иммунопрепаратами в ряде случаев недостаточно высокоэффективна, что связывают с уровнем онкобелка E7, который нейтрализует их противовирусную и противоопухолевую активность за счет способности избирательно блокировать большинство генов, индуцируемых интерфероном [Nees M. et al., 2008]. В экспериментах показано, что специфическое соединение индол-3-карбинол (ИЗК) способно предупреждать или останавливать процессы канцерогенеза за счет индукции апоптоза. Поскольку экспериментально доказана способность ИЗК избирательно ин-

гибировать синтез вирусом протеина E7 в эпителиальных клетках [Rahman K.M. et al., 2008, Киселев В.И. и соавт., 2003], включение его в комплекс терапии может повысить ее эффективность.

Имеется ряд работ о положительных результатах комплексного применения в схемах лечения отечественного иммуномодулятора **Полиоксидония**, в основе механизма которого лежит прямое воздействие на фагоцитирующие клетки и естественные киллеры, а также стимуляция антителообразования, стимуляция выработки ФНО- $\alpha$ , противовоспалительных цитокинов, стимуляция синтеза эндогенных интерферонов- $\alpha$  и  $\gamma$  [Перламутров Ю.Н., 2010; Пинегин Б.В., 2008], что делает обоснованным исследование эффективности применения Полиоксидония в сочетании с ИЗК.

Все вышеизложенное свидетельствует об актуальности разработки более эффективных методов диагностики и комплексной терапии, направленных на ускорение процессов регенерации эпителия шейки матки и профилактики рака шейки матки.

**Цель исследования.** Совершенствование тактики ведения женщин с ВПЧ-ассоциированными поражениями гениталий низкой степени тяжести за счет оценки прогностической значимости маркеров пролиферации COX 2 и p16<sup>INK4a</sup>, а также изучения терапевтической эффективности иммуномодулятора Полиоксидоний® и фармакологического средства индол-3-карбинол.

## Материалы и методы

Согласно цели и задачам исследования было обследовано 563 женщины в возрасте от 18 до 67 лет, обратившихся в научно-поликлиническое отделение НЦАГ и П им. академика В.И. Кулакова с 2008 по 2010 г., у которых в анамнезе за последний год была выявлена патология шейки матки или методом ПЦР обнаружены различные типы ВПЧ. Всем пациенткам было проведено комплексное обследование, включающее кольпоскопический и цитологический методы исследования, а также определение степени вирусной нагрузки высокоонкогенными типами ВПЧ при помощи HCS II. По показаниям проводилась биопсия шейки матки с дальнейшим гистологическим исследованием и определение уровня экспрессии маркеров p16<sup>INK4a</sup> и COX 2.

Из обследованных женщин у 225 (40%) была выявлена высокая вирусная нагрузка высокоонкогенными типами ВПЧ, из них у 122 (65,6%) выявлены клинические признаки LSIL по данным цитологического либо гистологического исследования. Последние составили груп-

пу наблюдения для изучения эффективности различных методов диагностики и лечения, в том числе:

– группа 1 – 28 ВПЧ–ВР– позитивных женщин с LSIL, которым был проведен курс лечения иммуномодулятором Полиоксидоний® по 1 суппозиторию (12 мг) ежедневно интравагинально в течение 3 дней, а затем по 1 суппозиторию через день; курс лечения – 10 суппозиториев;

– группа 2 – 37 ВПЧ–ВР– позитивных женщин с LSIL, которым был проведен курс лечения фармакологическим средством индол–3–карбинол по 200 мг 2 раза в сутки в течение 2 месяцев;

– группа 3 – 32 ВПЧ–ВР– позитивные женщины с LSIL, которым был проведен комбинированный курс лечения обоими препаратами;

– группа 4 (контрольная) – 25 ВПЧ–ВР– позитивных женщин с LSIL, не получающих терапию в течение 12 месяцев.

Для распределения больных на группы проводили простую рандомизацию, основанную на прямом методе с применением таблицы случайных чисел, где они сгруппированы таким образом, что вероятность для каждого из однозначных чисел оказаться в любом месте таблицы была одинакова (равномерное распределение).

Помимо общепринятых клинических методов обследования, применялись специальные методы. Расширенную кольпоскопию проводили по общепринятой методике. Для **цитологического исследования** материал забирали из цервикального канала, переходной зоны и экзоцервикса с помощью одноразовой цервикальной щетки и шпателя. Оценку результатов цитологического исследования производили согласно классификационной системе Папаниколау в соотношении с классификацией Бетесда. **Гистологическое исследование** проводилось по общепринятой методике. **Иммуногистохимические реакции** проводились на депарафинированных срезах толщиной 4 мкм, расположенных на стеклах, покрытых APES–слоем. Результаты иммуногистохимической реакции для COX 2 и p16<sup>INK4a</sup> оценивались полуколичественным методом по количеству позитивно окрашенных клеток по следующей системе: ±– до 20% окрашенных клеток; +- от 20 до 40% окрашенных клеток; ++– от 40 до 60% , +++– более 60% окрашенных клеток. Выявление ДНК ВПЧ осуществлялось методом двойной «генной ловушки» – Digene Hybrid Capture System II (HCS II).

### Методы статистической обработки

Статистическая обработка полученных данных осуществлялась по общепринятым методикам с помощью пакетов прикладных программ SPSS V.15, Microsoft Excel 7.0. При описании полученных результатов определяли среднее арифметическое (M), ошибку среднего (m), среднее квадратичное отклонение (σ), частоты (%). Числовые показатели, имеющие нормальное распределение, изменяющиеся в динамике, оценивались с помощью критерия Стьюдента. По таблице Стьюдента в соответствии с числом наблюдений (N) и значением коэффициента t определяли вероятность ошибки (P). В случае отсутствия нормального распределения применялся непараметрический критерий Вилкоксона. Достоверность различий между группами оценивали непараметриче-

скими критериями Крускала–Уоллиса (для нескольких групп), затем осуществляли попарное сравнение с помощью критерия Манна–Уитни. Для определения различий между порядковыми показателями (%) использовали критерии Хи–квадрат и точный критерий Фишера для малых выборок. Различие между сравниваемыми величинами признавалось статистически значимым при  $p < 0,05$ .

### Результаты исследования

Проведенный анализ анамнестических данных обследованных пациенток показал, что возраст женщин в обследуемых группах колебался от 18 до 49 лет. Большинство женщин (67,2%) находились в возрастной группе до 30 лет, что подтверждает многочисленные данные международных и отечественных исследований о том, что у женщин молодого возраста ВПЧ–ассоциированная патология встречается чаще, однако и в зрелом возрасте является проблемой.

Гинекологические заболевания в анамнезе были выявлены у 96 женщин из 122, включенных в исследование, что составило 78,7%. Наиболее часто встречались патология шейки матки (71,3%) и воспалительные процессы органов малого таза (27,7%), по поводу которых пациентки ранее получали соответствующую терапию.

При оценке сексуальной активности пациенток исследуемых групп данные о количестве половых партнеров были получены у всех 122 женщин. Число половых партнеров варьировалось от 1 до 20. Среднее количество половых партнеров у ВПЧ–ВР позитивных женщин с LSIL составило 3 партнера. Полученные данные согласуются с известным мнением о роли факторов риска, что подтверждает целесообразность включать данных женщин в группу особого контроля по развитию предраковых поражений шейки матки.

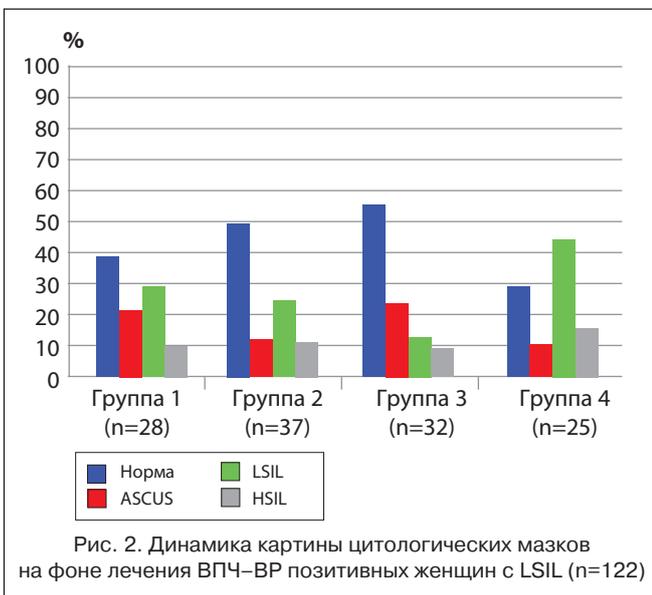
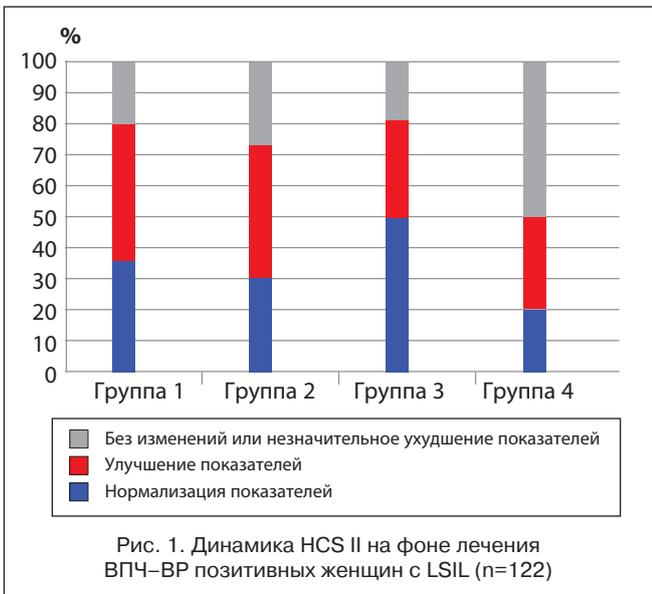
Наиболее часто встречающимися признаками являлись: йоднегативный участок (ЙНУ) в 73% случаях, ацетобелый эпителий (АБЭ) в пределах ЗТ – в 63% и вне ее – в 20%. Сосудистая атипия в виде мозаики и пунктации встречалась в 47% случаев. Остроконечные кондиломы шейки матки и влагиалища обнаружены у 11 (9,1%) пациенток. В дальнейшем всем участницам исследования с помощью цитологического и (или) гистологического метода был поставлен диагноз «плоская кондилома» либо «дисплазия легкой степени», что в соответствии с системой Бетесда относится к LSIL.

Цитологическое исследование проводилось всем ВПЧ–ВР позитивным пациенткам (n = 225). Наиболее часто в мазках на фоне поверхностных и промежуточных клеток плоского эпителия обнаруживали койлоциты – в 64% случаев. Койлоцитоз является частым, но не обязательным признаком ВПЧ–ассоциированной патологии. Другой тип клеток, который считают патогномичным для ПВИ – дискератоциты, был обнаружен у 125 (58,4%) пациенток. Дискариоз выявлен у 130 (60,7%) женщин из 225 ВПЧ–ВР позитивных.

По итогам цитологического исследования результат только 48 (22,4%) пациенток соответствовал норме, 36 (16,8%) пациенток были отнесены к ASCUS – состоянию, которое соответствует II классу мазка по системе

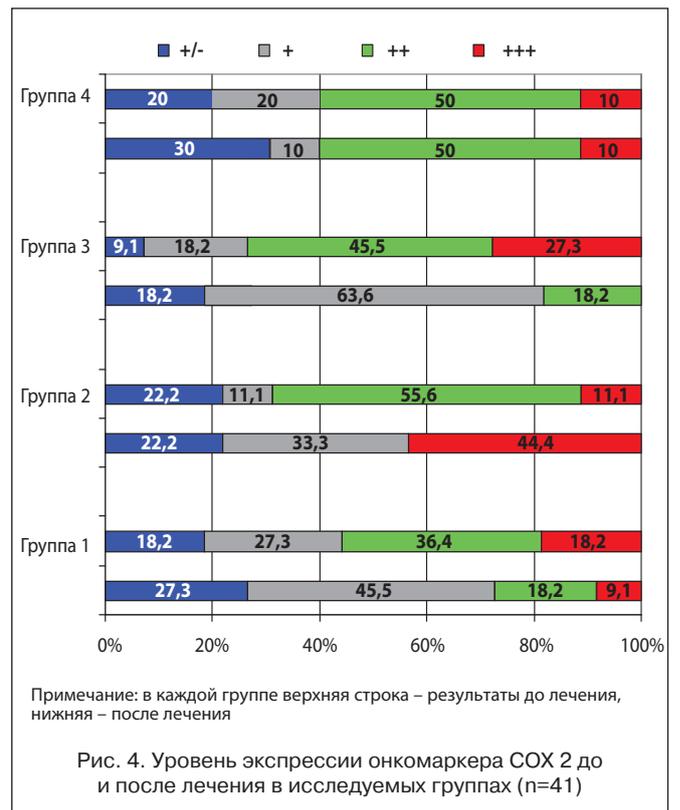
Папаниколау и отражает в большинстве случаев воспалительные и дистрофические изменения в эпителии шейки матки.

У 8 (3,7%) пациенток результаты цитологического исследования были отнесены к HSIL (III–IV класс цитологического мазка по системе Папаниколау). У 133 (59%) ВПЧ–ВП позитивных пациенток выявлен мазок типа LSIL, характеризующийся наличием клеток МПЭ с легким дискариозом. Из этих женщин в начале исследования 56 (26,2%) пациенткам в соответствии с показаниями (высокоатипическая ЗТ, грубые мозаика или пунктация по данным кольпоскопического исследования) производилась прицельная биопсия шейки матки, по результатам которой в 21 случае была выявлена субклиническая форма ПВИ – плоская кондилома; в 24 – дисплазия легкой степени (CIN I), из них у 9 женщин в сочетании с плоской кондиломой. Интраэпителиальные поражения высокой степени тяжести (HSIL), по данным гистологического исследования, в соответствии с классификацией Бетесда было обнаружено у 11 пациенток, из них у 6 пациенток обнаружено CIN II, у 5 – CIN III. Эти пациентки из дальнейшего исследования были исключены.



В дальнейшем проспективное исследование были включены 122 ВПЧ–ВП–позитивные женщины с LSIL, которые были рандомизированы на четыре группы в соответствии с получаемой терапией.

Анализ результатов ВПЧ–теста (HCS II) после проведенного лечения показал, что наиболее значимые изменения (нормализация показателя) наблюдались в группах 1 и 3, у 39,3 и 50% пациенток соответственно. В группе контроля снижение уровня вирусной нагрузки до нормы



было выявлено у 20% женщин, а во 2-й группе снижение уровня вирусной нагрузки до нормы происходило у 32,4% пациенток. Без динамики или тенденция к отрицательной динамике наблюдались у 17,8% – в группе 1, у 24,3% во 2-й, у 15,6% – в 3-й и у 48% пациенток контрольной группы (рис. 1). Таким образом, нормализация или значительное улучшение показателей ВПЧ–теста (HCS II), т.е. уровня вирусной нагрузки, отмечено в группах 1 и 3 – у 82,2 и 84,4% пациенток соответственно.

По результатам цитологического исследования случаи регрессии LSIL наблюдались во всех группах, однако наилучший клинический эффект отмечен в группе 3 – у 56,2% женщин, что статистически значимо выше по сравнению с контрольной группой (28%) ( $p < 0,05$ ). Отмечена тенденция к значимому клиническому эффекту в группе 2 по сравнению с группой контроля. Отрицательная динамика, т.е. прогрессирование в HSIL, отмечалась во всех группах, однако наибольшее значение данный показатель имел в группе контроля, составив 16% (рис. 2).

Анализ результатов кольпоскопического исследования, проведенный через 12 месяцев, показал, что наиболее значимые изменения наблюдались в группах 2 и 3: кольпоскопическая картина отвечает норме у 40,6 и 53,1% пациенток соответственно. В группе 1 результат исследования соответствует норме у 32,2% женщин, в группе контроля данный показатель составил 24%. Ухудшение кольпоскопической картины в виде увеличения или уплотнения ацетобелого участка, присоединения мозаики либо пунктации наблюдалось у 32% пациенток группы контроля, у 21,5% женщин в группах 1 и 2 и всего у 12,5% пациенток в группе комбинированного лечения.

ИЦХ и/или ИГХ исследование для определения уровня экспрессии p16<sup>INK4a</sup> и COX 2 было проведено 41-й ВПЧ–ВР позитивной пациентке с LSIL в начале исследования и через 12 месяцев наблюдения. Путем применения таблицы случайных чисел, что сделало группы сопоставимыми, все женщины также были рандомизированы на 4 группы – в соответствии с получаемым лечением.

Уровень экспрессии маркера p16<sup>INK4a</sup> в начале наблюдения был повышен в среднем у 36% пациенток обследуемых групп. После лечения уровень p16<sup>INK4a</sup> снизился в группе 1 в 1,7 раза и составил 27,3%, во 2-й – в 2 раза (22,2%), в 3-й – в 3,8 раза (9,1%). В контрольной группе отмечалась незначительная положительная динамика (рис. 3).

В начале наблюдения у обследованных женщин повышенный уровень экспрессии COX 2 был также отмечен во всех группах: у 5 женщин (54,6%) в группе 1, у 6 (66,7%) во 2-й, у 8 (72,8%) – в 3-й и 6 (60%) – в группе контроля. При этом через 12 месяцев в группе 1 отмечена положительная динамика у 4 женщин (36,4%), во 2-й – у 3 пациенток (33%), в группе 3 наблюдалось снижение уровня экспрессии COX 2 у 3 женщин (27,3%). В группе контроля отмечалась незначительная положительная динамика (рис. 4).

## Обсуждение

Рак шейки матки является одним из наиболее распространенных злокачественных заболеваний среди женщин. Этиологическая роль в развитии злокачественного

поражения шейки матки принадлежит ВПЧ, что связано с легкой передачей ПВИ при половом контакте и возможностью длительной персистенции вируса при отсутствии соответствующей симптоматики. Следовательно, проблема диагностики, лечения и прогноза папилломавирусной инфекции очень актуальна. Согласно международным стандартам ведения женщин с LSIL мы предприняли попытку проспективного наблюдения за пациентками с различными формами ПВИ без лечения и с применением различных консервативных методов терапии.

Продолжается поиск препаратов, которые могли бы повысить эффективность лечения ПВИ и снизить вероятность дальнейшей малигнизации. Применение имму-

Рекомендован Президиумом Российской Ассоциации Аллергологов и Клинических Иммунологов

# ПОЛИОКСИДОНИЙ®

АЗОКСИМЕРА БРОМИД

ИННОВАЦИОННЫЙ ПРЕПАРАТ КОМПЛЕКСНОГО ДЕЙСТВИЯ: ИММУНОМОДУЛЯТОР • ДЕТОКСИКАНТ • АНТИОКСИДАНТ

ЛОР	ГИНЕКОЛОГИЯ УРОЛОГИЯ	ПЕДИАТРИЯ
ИММУНОЛОГИЯ	ИММУНОМОДУЛЯТОР ДЕТОКСИКАНТ АНТИОКСИДАНТ	АЛЛЕРГОЛОГИЯ
ХИРУРГИЯ	ДЕРМАТОЛОГИЯ	ТЕРАПИЯ

### Применение Полиоксидония® способствует:

- более быстрой нормализации общих и местных клинических симптомов;
- купированию болевого синдрома;
- сокращению сроков лечения;
- ранним положительным изменениям при инструментальных методах исследований;
- нормализации СОЭ, лейкоцитоза, лейкоцитарной формулы, иммунологических показателей;
- увеличению длительности ремиссии.



Реклама

Полиоксидоний®  
Включен в перечень ЖНВЛС  
(Распоряжение правительства РФ от 29 марта 2007г. №376-р)  
\*Жизненно Необходимые и Важнейшие Лекарственные Средства

Группа Компаний  
**ПЕТРОВАКС**  
Препараты будущего – сегодня

номодулирующей патогенетической терапии у данной категории больных в нашей стране оправдано в связи с необходимостью своевременной профилактики начальных форм дисплазии шейки матки, ведущей причиной которых является активация папилломавирусной инфекции.

Отечественный препарат **Полиоксидоний®** – первый в мире химически чистый высокомолекулярный иммуномодулятор комплексного действия, повышающий пониженную и снижающий повышенную иммунологическую активность; воздействует на фагоциты и натуральные киллеры; стимулирует выработку ФНО- $\alpha$  и  $\alpha$ - и  $\gamma$ -ИФН, процессы фагоцитоза, увеличивает резистентность организма в отношении локальных и генерализованных форм инфекций; является детоксикантом, антиоксидантом [4].

Регулятор пролиферативных процессов – индол-3-карбинол – фармакологическое средство на основе растительного сырья, содержащегося в овощах семейства крестоцветных [3]. Совместное использование визуальных тестов, цитологии, молекулярных методов диагностики является достаточно эффективным для диагностики LSIL и позволяет в короткие сроки и более качественно провести профилактику рака шейки матки путем выявления начальных форм дисплазии без применения инвазивных методов. Мы оценивали данные HCS II, кольпоскопического и цитологического методов исследований и молекулярные маркеры в динамике и сравнивали их по двум направлениям: между группами и между начальными и конечными показаниями. На фоне лечения нормализация результатов HCS II отмечается у 39,3, 32,4, 50% женщин в 1, 2, 3 группах соответственно и только у 20% в контрольной группе. Снижение уровня вирусной нагрузки отмечается у 42,9; 43,3; 34,4 и у 32% женщин соответственно, что подтверждает целесообразность использования HCS II в качестве надежного диагностического теста.

При обследовании ВПЧ-ВР- позитивных женщин с LSIL рекомендуется комплексное применение всех неинвазивных методов диагностики и терапии, щадящих репродуктивную функцию женщины. При их сочетании повышается достоверность интерпретации результатов исследования, а использование комбинированной схемы лечения Полиоксидоний® + индол-3-карбинол повышает вероятность регрессии LSIL у 56,2% женщин по данным цитологического метода исследования.

Таким образом, в соответствии с целью исследования в результате проведенной работы был решен ряд задач по изучению диагностической ценности различных методов диагностики и лечения.

## Заключение

ВПЧ-ВР- позитивные женщины (по данным HCS II) репродуктивного возраста относятся к группе риска по наличию плоскоклеточных интраэпителиальных поражений шейки матки. Среди них (по результатам HCS II) преобладают пациентки с интраэпителиальными поражениями шейки матки низкой степени (LSIL) – в 59% случаев. Им показано комплексное обследование, включающее кольпоскопический, молекулярно-биологический, цитологический и (при наличии показаний) гистологический и иммунологический методы исследования. ВПЧ-тест сле-

дует считать скрининговым методом для выявления групп риска. Определение уровня экспрессии маркера p16<sup>INK4a</sup> является целесообразным, так как его повышенный уровень свидетельствует о неблагоприятном прогнозе течения ПВИ.

Учитывая сходные клинико-морфологические характеристики, плоскую кондилому и CIN I по совокупности кольпоскопических и цитологических признаков целесообразно объединить в LSIL соответственно классификации Бетесда. Полученные результаты позволяют считать маркер p16<sup>INK4a</sup> прогностическим, что может использоваться в качестве триажа. У 64% обследованных женщин в очагах LSIL отмечено повышение уровня экспрессии маркера COX 2, свидетельствующего о наличии воспалительного процесса, что подтверждается результатами цитологического исследования.

Регрессия LSIL, по данным цитологического метода исследования, до нормы имела максимальную частоту в группе комбинированного лечения. При этом в группе комбинированного лечения, по данным иммуноцитохимического и/или иммуногистохимического методов исследования выявлено значимое снижение экспрессии маркеров p16<sup>INK4a</sup> и COX 2 в патологических очагах ЗТ на ШМ в 27,3 и 81,8% случаев соответственно, что статистически значимо выше по сравнению с другими группами ( $p < 0,05$ ) и коррелируют с клиническими данными.

При сравнении уровней маркеров между пациентками всех групп после лечения существенных различий по всем показателям не выявлено ( $p > 0,05$ ). При сравнении с группой контроля отмечено статистически значимое снижение показателей p16<sup>INK4a</sup> в группе 1 ( $p = 0,02$ ) и в группе, получающей комбинированное лечение ( $p = 0,046$ ), а также тенденция к снижению в целом для COX 2 ( $p = 0,082$ ) во всех группах.

Таким образом, ВПЧ-ВР позитивным пациенткам с LSIL целесообразно рекомендовать временное наблюдение без деструктивного лечения с динамическим контролем каждые 6 месяцев, при этом иммуномодулятор Полиоксидоний® повышает вероятность регрессии поражения, особенно в сочетании с индол-3-карбинолом, которое позволяет добиться регрессии LSIL в 71,8% случаев ( $p < 0,05$ ) по результатам цитологического исследования. В группе принимавших только Полиоксидоний® у 82,2% произошла нормализация или значительное улучшение показателей ВПЧ-теста. Регрессия LSIL наблюдалась у 39,3% женщин, т.е. в 1,4 раза больше, нежели в группе контроля, кольпоскопическая картина соответствует норме у 32,3% пациенток. Снижение экспрессии маркера p16<sup>INK4a</sup> в группе пациенток, применявших только Полиоксидоний®, снизился практически в 2 раза (в контрольной группе отмечена незначительная динамика).

## Литература

1. Барышников А.Н., Новиков В.В. Программированная клеточная смерть (апоптоз). Клиническая онкогематология: руководство для врачей. М., 2007. С. 99–106.
2. Бауэр Г. Цветной атлас по кольпоскопии. М., 2007. С. 288.
3. Киселев В.И., Киселев О.И., Северин Е.С. Исследование специфической активности индол-3-карбинола в отношении клеток, инфицированных вирусом папилломы человека // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2003. Т. 4. С. 28–32.

Полный список литературы Вы можете найти на сайте <http://www.rmj.ru>