

Профессор С.И. Роговская, Е.С. Аكوпова, 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

Совершенствование лечебно-диагностических подходов к ВПЧ-инфекции гениталий*

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 GN (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^{INK4a}, 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^{INK4a} — один из ингибиторов циклинзависимых киназ, предотвращающий фосфорилирование pRb [Serrano M., Hannon G., 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 продолжают. 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 ингибировать 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-α, противовоспалительных цитокинов, стимуляция синтеза эндогенных интерферонов-α и γ [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^{INK4a}, 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^{INK4a} 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 группу 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 суппозиториями;
- 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.

* По материалам журнала «РМЖ», № 20, 2011

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. Оценка 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 p16INK4a 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 (a), 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 непараметрическими критериями Крускала Уоллиса (для нескольких групп), затем осуществляли попарное сравнение с помощью критерия Манна-Уитни. Для определения различий между порядковыми показателями (%) использовали критерии Хивадрат и точный критерий Фишера для малых выборок. Различия между сравниваемыми величинами признавались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Рисунок 1. Динамика HCS II на фоне лечения ВПЧ-ВР позитивных женщин с LSIL (n=122)



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: йод-негативный участок (ЙНУ) в 73% случаях, ацетобелый эпителий (АБЭ) в пределах ЗТ — в 63% и вне ее — в 20%. Сосудистая атипия в виде мозаики и пунктуации 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. Дискериоз 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

Рисунок 2. Динамика картины цитологических мазков на фоне лечения ВПЧ-ВР позитивных женщин с LSIL (n=122)

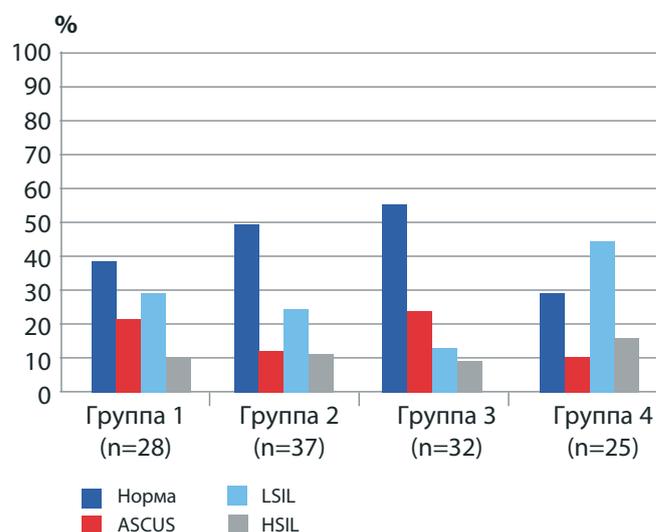
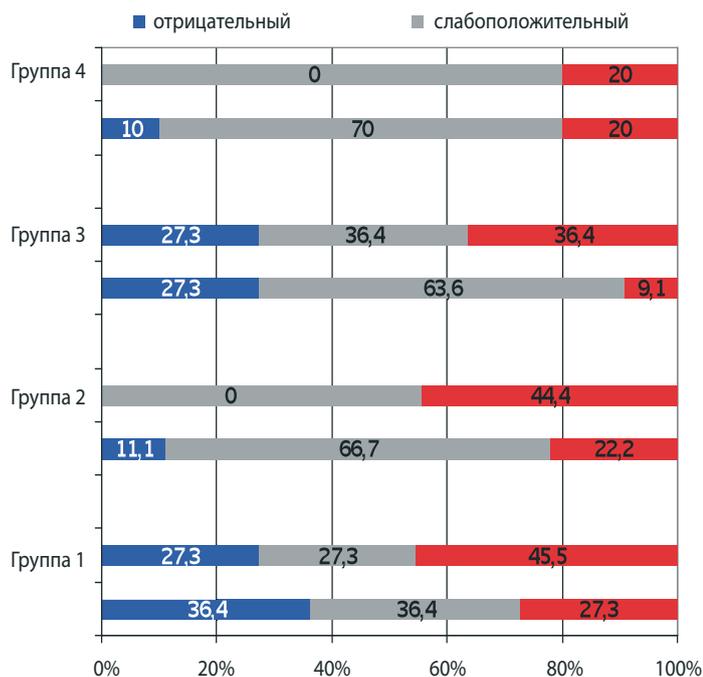
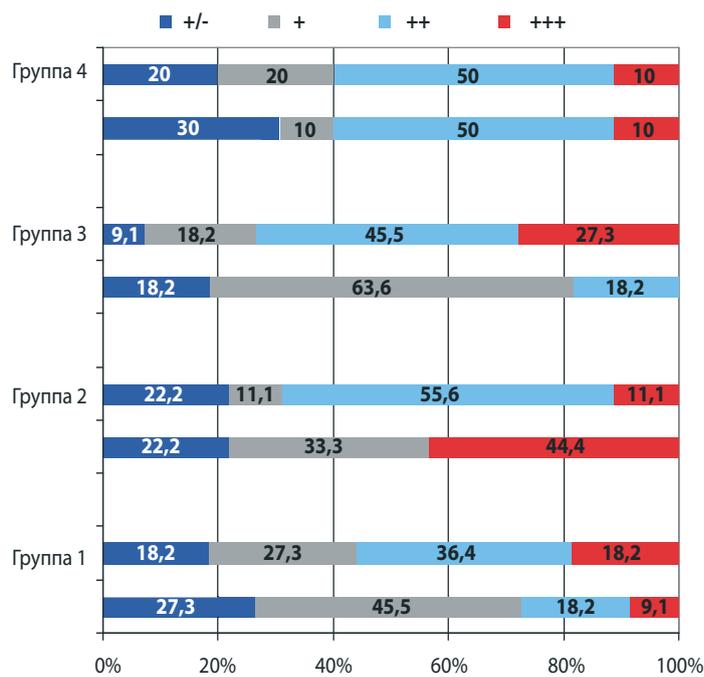


Рисунок 3. Уровень p16^{INK4a} до и после лечения в исследуемых группах (n=41)



Примечание: в каждой группе верхняя строка — результаты до лечения, нижняя — после лечения

Рисунок 4. Уровень экспрессии онкомаркера COX 2 до и после лечения в исследуемых группах (n=41)



Примечание: в каждой группе верхняя строка — результаты до лечения, нижняя — после лечения

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-ВР 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 Бетesda 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-ВР- 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 статис-

тически 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 p16INK4a 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 p16INK4a в начале наблюдения был повышен в среднем у 36% пациенток обследуемых групп. После лечения уровень p16INK4a 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 формам 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 иммуномодулирующей 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- α и α - и γ -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 сочетанном использовании 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 следует считать скрининговым методом для выявления групп риска. Определение уровня экспрессии маркера p16^{INK4a} 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^{INK4a} прогностическим, что может использоваться в качестве триажа. У 64% обследованных женщин в очагах LSIL отмечено повышение уровня экспрессии маркера COX 2, свидетельствующее 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^{INK4a} 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^{INK4a} 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, отмечено снижение экспрессии маркера p16^{INK4a} в группе пациенток, применявших только Полиоксидоний®, 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>