

Качалина О.В., Андосова Л.Д., Елисева Д.Д., Засыпкина С.В., Микаилова Г.А.

Современные подходы к диагностике и лечению ВПЧ - ассоциированных заболеваний шейки матки у женщин репродуктивного возраста

Кафедра акушерства и гинекологии ГБОУ ВПО "Нижегородская государственная медицинская академия"
Министерства здравоохранения Российской Федерации . г. Нижний Новгород

Kachalina O.V., Andosova L.D., Eliseev D.D., Zasypkina S.V., Mikailova G.A.

The modern approaches to diagnosis and treatment of HPV - associated cervical disease in women of reproductive age

Резюме

В статье обоснована целесообразность определения онкобелка E7 16 и 18 типов ВПЧ в комплексном обследовании больных с цервикальной патологией. Белок E7 является продуктом «жизн-недеятельности» ВПЧ, вызывающим процессы клеточной трансформации. Соответственно, при выявлении E7 в цервикальных пробах, можно говорить об инициации канцерогенеза. Совместное использование традиционных методов диагностики с определением онкобелка E7 позволит выявлять онкопатологию на начальных этапах развития. Этапное ведение больных и применение Панавира в комплексной терапии ПВИ способствует ускорению заживления тканей после эксцизии и стойкой ремиссии.

Ключевые слова: папилломавирусная инфекция, неинвазивная диагностика, онкобелок E7, Панавир.

Summary

In this article the feasibility of determining oncoprotein E7 HPV types 16 and 18 in the complex examination of patients with cervical pathology. E7 protein is the product of 'life' HPV that cause cell transformation processes. Accordingly, the detection of E7 in cervical samples, we can talk about the initiation of carcinogenesis. Joint use of traditional methods of diagnosis as defined oncoprotein E7 will detect cancer pathology in the early stages of development. Landmark case management and use in the treatment of Panavir IMC promotes healing of tissues after excision and sustained remission.

Keywords: human papillomavirus infection, non-invasive diagnostics, oncoprotein E7, Panavir.

Введение

Среди вирусных инфекций, передающихся половым путем, наибольшего внимания заслуживает возрастающая заболеваемость папилломавирусной инфекцией (ПВИ), инфицированность сексуально активного населения планеты которой составляет 20-60% [1]. ВПЧ является доказанным экзогенным этнопатогенетическим фактором в развитии цервикальной интраэпителиальной неоплазии (ЦИН), в 15-20% инициирует развитие рака шейки матки (РШМ) [2,3], в связи с чем многие авторы рассматривают ВПЧ-ассоциированный цервицит, как ранний показатель предракового состояния [4]. Частота прогрессии ЦИН в более высокую степень или инвазивный рак колеблется в очень широких пределах - от 1,4 до 60% [5]. Онкогенная стратегия ВПЧ определяется интегративной вирусной ДНК, т.е. включением вирусного генома в состав клеточных хромосом [6]. Тем не менее, некоторые исследователи утверждают, что ДНК ВПЧ убиквитарная, распространена повсеместно, и вероятность ее обнаружения в женских половых органах достаточно

высока [7]. В настоящее время не существует ни одного метода прогнозирования течения ЦИН у конкретной больной, определяющего возможность стойкой персистенции или прогрессии в более высокую степень либо инвазивный РШМ с указанием точного времени длительности этого процесса [8].

Известно, что в нашей стране нет единого подхода к диагностике и лечению ВПЧ-ассоциированных заболеваний - воспалений и преинвазивных неоплазий шейки матки у молодых женщин. Так, существующие стандарты оправдывают агрессивный радикализм, который зачастую ведет к нарушению репродуктивной функции, а тактика, основанная на индивидуализации решения вопроса о биопсии и минимизации лечения, удлинит динамическое наблюдение, что может повлечь за собой осложнения процесса.

Сотрудниками кафедры акушерства и гинекологии Нижегородской государственной медицинской академии был проведен анализ результатов 956 гистологических исследований фрагментов шейки матки, полученных

после эксцизий, произведенных пациенткам с цервикальной патологией. Установлено, что 80,29 % эксцизий, выполненных в ЦРБ и 18,53 % эксцизий, выполненных в ОКБ им. Семашко, не имели данных о патологии ЦИН II+, т.е. оказались неоправданными. На наш взгляд такая диагностическая агрессия являлась следствием недостаточности скринингового контроля ввиду ограниченных возможностей традиционных методов обследования.

Основная задача при обследовании больных с вирусными поражениями шейки матки заключается в выявлении преинвазивных интраэпителиальных неоплазий, стоимость лечения которых значительно меньше, чем РШМ. Известно, что эффективность затрат – важная составляющая любой диагностической программы, а биопсия шейки матки является не только травматическим вмешательством, но и затратным методом диагностики. Поэтому продолжается поиск новых методов диагностики (оптических, молекулярных) для оптимизации вопроса о необходимости гистологического исследования. Выше изложенное диктует необходимость поиска и возможностей терапии цервикальной патологии, нацеленных на снижение хронических (персистентных) папилломатозных инфекций, которые служат предшественниками инвазивных раковых опухолей [6].

Решение этих задач также стало возможным вследствие применения в клинической онкогинекологии новейших методов визуализации биотканей – ОКТ-кольпоскопии в новой скоростной модификации и молекулярно-биологического метода – определение онкобелка E7 в цервикальных пробах, который как известно является маркером интегративной вирогенности.

Известно, что продуктивная репликация ВПЧ возможна лишь в клетках, вступивших на путь дифференцировки, а иначе инфекция принимает abortивный характер. Вирусный геном элиминируется или начинает персистировать, используя механизм интегративной вирогенности, когда вирусная ДНК транслицируется в ядро, где и происходят основные события. Вопреки нумерации, репликация ДНК ВПЧ начинается с образования онкопротеннов E6 и E7, ответственных за трансформацию клеток, таким образом, E6 и E7 следует считать вирусными онкогенами [9]. Онкобелок E7 присутствует во всех клетках, инфицированных ВПЧ и начавших неопластическую трансформацию вплоть до РШМ, поэтому его определение очень важно для оценки риска развития РШМ у конкретной пациентки [10]. Очевидно, что выявление онкобелка E7 ВПЧ 16 и 18 типов в образцах цервикальных проб имеет важное значение для диагностики неопластических заболеваний шейки матки, а также способствует повышению достоверности при ранней диагностике РШМ, вызванной ВПЧ 16 и/или 18 типов.

Цель исследования: повысить эффективность диагностики цервикальной патологии у женщин репродуктивного возраста путём включения в комплекс диагностических процедур определения наличия онкобелка E7 16 и 18 типов ВПЧ в цервикальных пробах.

Материалы и методы

Обследовано 416 пациенток в возрасте от 17 до 46 лет с ВПЧ-ассоциированными заболеваниями шейки матки – цервицитами и интраэпителиальными неоплазиями. Все пациентки, по результатам обследования на ВПЧ с типированием и определением вирусной нагрузки, были разделены на 3 группы: ВПЧ ВКР (высокого канцерогенного риска) были выявлены у 221 больной, ВПЧ НКР (низкого канцерогенного риска) – у 134, у 61 пациентки ДНК ВПЧ не было обнаружено. Всем женщинам было проведено комплексное обследование, включающее следующие этапы диагностики: оптическая когерентная томография с кольпоскопией (ОКТ-кольпоскопия); оценка биоты нижнего отдела гениталий с назначением при необходимости этиотропного лечения и восстановлением лактофлоры; ВПЧ – типирование с определением вирусной нагрузки – ПЦР в реальном времени; повторная ОКТ-кольпоскопия; жидкостная цитология, иммуноцитохимическое определение онкомаркера p16ink4a; определение онкобелка E7 ВПЧ 16 и 18 типов; биопсия шейки матки, выскабливание цервикального канала по показаниям.

ОКТ-кольпоскопия предусматривает расширенную кольпоскопию с применением традиционных тестов и использованием терминологии, принятой в г.Рио де Жанейро в 2011г, и параллельное ОКТ-сканирование с помощью "скоростной" модификации прибора ОКТ-1300У (ИПФ РАН, ООО "Биотехмед", Н.Новгород). Для получения изображения зонд приставляли к кольпоскопически визуализируемой зоне интереса и фиксировали легким прижатием на 5-7 секунд. Сбор и отражение данных на мониторе компьютера осуществляли в режиме реального времени с использованием программы, входящей в комплект ОКТ-установки.

Оценка биоты нижнего отдела гениталий осуществлялась с помощью качественного ПЦР анализа на абсолютные патогены и исследования биоценоза уrogenитального тракта методом "Фемофлор".

Для цитологического исследования материал забирал из цервикального канала, переходной зоны и экзоцервикса с помощью одноразовой цервикальной щетки cyto-brush, а при III типе зоны трансформации, с помощью щетки cervix-brush. Оценку результатов производили согласно классификационной системе Папаниколау в соотношении с классификациями Бетесда и ЦИН.

Иммуноцитохимическое определение онкомаркеров p16ink4a и E7 ВПЧ 16 и 18 типов, гистологическое исследование проводились по общепринятой методике.

Забор материала для морфологической оценки осуществлялся с помощью биопсийной петли для радиоволновой хирургии.

В качестве одного из методов лечения применялась фотодинамическая терапия (ФДТ), в основе которой лежит фотохимическая реакция введенного в организм фотосенсибилизатора, в нашем исследовании Фотодитазина, и лазерного излучения определенной длины волны в аэробных условиях. В результате этой реакции выделяются активные формы кислорода, разрушающие пораженные клетки. ФДТ позволяет не только выполнить

локальную деструкцию патологических очагов, но и воздействовать на резервуар ВПЧ, который остается в окружающих тканях.

Результаты и обсуждение

Возраст обследованных пациенток составил от 17 до 46 лет (средний возраст составил 29 лет). При первом визите всем пациенткам проводилась ОКТ-кольпоскопия. Согласно общим положениям по кольпоскопической классификации Рио де Жанейро, неадекватная картина отмечалась в 87% случаев из-за проявлений воспаления, контактных кровотечений, рубцовых деформаций, III типа зоны трансформации. При ОКТ-зондировании влажной порции шейки матки у 66% пациенток были получены изображения в соответствующей желто-коричневой палитре, где оттенки желтого соответствуют большей, а оттенки коричневого – меньшей оптической плотности. Данные изображения были отнесены к доброкачественным из-за наличия субэпителиальных включений, нормальной скорости угасания сигнала и четкой двуслойности изображения. Кроме доброкачественности, изображения отражали интенсивность воспалительного процесса эктоцервикса. В 23% случаев были получены сомнительные изображения ОКТ.

У 75% пациенток наблюдалась сопутствующая патология шейки матки, из них у 70% женщин ПВИ протекала на фоне эктопии либо эктропиона, рубцовая деформация цервикса отмечалась в 13% случаев, эндометриоз шейки матки – в 8%, полипы цервикального канала – в 3,5%. Генитальные кондиломы были выявлены у 9,5% пациенток, в 3,5% были диагностированы кондиломы шейки матки, в 5% – вульвы и влагалища.

Лечение генитальных кондилом являлось обязательным этапом ведения пациенток с ВПЧ-цервицитам. Наиболее популярным видом лечения генитальных кондилом является их деструкция различными физическими методами. Но наряду с деструктивными методами лечения существуют и лекарственные. В настоящее время к этiotропным препаратам против ВПЧ можно отнести отечественный противовирусный препарат растительного происхождения Панавир, который выпускается в различных формах: раствора для инъекций, суппозитория ректального и вагинального, и геля для местного применения. Механизм действия препарата многогранен, его применение эффективно при различных вирусных инфекциях. Панавир препятствует адгезии и ингибирует пенетрацию вируса, останавливает раскрытие вирусного капсида, нарушает транскрипцию и репликацию вирусной ДНК, синтез капсидных белков, приостанавливает сборку вирионов и выход их из клетки, обладает комплексным иммуномодулирующим действием [11]. Доказано, что комбинированное использование препарата и деструктивных методов лечения способствует удлинению межрецидивного периода, к прекращению вирусывыделения, в том числе при выявлении нескольких серотипов, включая высоко онкогенные 16 и 18 тип, со слизистых оболочек мочеполовых органов и уменьшению количества местных деструктивных воздействий [12].

Так, у обследованных пациенток метод деструкции определялся индивидуально в зависимости от вида образований, их размера, обширности поражения, необходимости гистологического исследования; осуществлялась криодеструкция, либо эксцизия и деструкция с помощью аппарата радиоволновой хирургии “Сургитрон”.

Всем пациенткам с генитальными кондиломами проводилось противовирусное лечение Панавиром по схеме, рекомендуемой фирмой-изготовителем: системно – 5 в/в инъекций 0,04 мг/мл раствора по 5,0 мл (3 инъекции с интервалом 48 часов, а 2 последующие с интервалом 72 часа) или ректальные суппозитории №10 по 1 свече на ночь ежедневно в течение 10 дней, а местно – 3 дня до деструкции, в день деструкции и последующие 10 дней 2 раза в день проводились аппликации гелем, а с появлением новой формы пациенткам назначались вагинальные суппозитории №5 по 1 свече на ночь ежедневно в течение 5 дней.

На втором этапе диагностического исследования выявлялась этиология воспалительного процесса. По нашим данным, ПВИ чаще всего сочетается с уреоплазмозом (35%) и кандидозом (10%), в 7,5% случаев был обнаружен микоплазмоз, в 5% - гонорея и цитомегаловирус, в 2,5% - трихомониаз и хламидиоз. В 30% случаев ВПЧ-инфекция протекала на фоне дисбаланса за счет снижения количества лактобактерий, а в 32,5% случаев – на фоне анаэробного дисбиоза.

На третьем диагностическом этапе проводилось ВПЧ-типирование. У 53,12% обследованных были выявлены ВПЧ ВКР (16,18,31,33,35,39,45,48,51,52,56), были инфицированы ВПЧ НКР (6,11,42,43,44), а в 15,62 % их сочетание. У 16,69% пациенток ДНК ВПЧ не было обнаружено. После восстановления биоценоза нижнего отдела гениталий и, соответственно, после купирования признаков воспаления, для динамического контроля на четвертом диагностическом этапе, проводилась повторная ОКТ-кольпоскопия. Слабовыраженные поражения эпителия шейки матки, т.е I степень по классификации Рио де Жанейро была выявлена в 84,5% случаев. Кольпоскопические поражения II степени встречались в 8%, из них 4,7% пришлось на грубую мозаику и грубую пунктацию, а 3,3% случаев – на симптом “поражения в поражении”. Кольпоскопических данных, подозрительных на инвазию выявлено не было.

На 4 диагностическом этапе ОКТ-кольпоскопия имела прицельный характер, шёл “поиск кольпоскопически замаскированных изменений” эпителия и субэпителиальных структур, которые могут быть резервуаром инфекции.

Следующим важнейшим диагностическим шагом являлось контролируемое ОКТ-кольпоскопией прицельное цитологическое исследование, производимое методом жидкостной цитологии. У 87% пациенток цитологический мазок был отнесен к LSIL по классификации Бетесда, из них 59,7% - мазки типа ASCUS, то есть II класс мазка по Папаниколу, а 27,3% мазков были отнесены к III классу по Папаниколу или к ЦИН I. У 13% женщин была выявлена нормальная цитологическая картина.

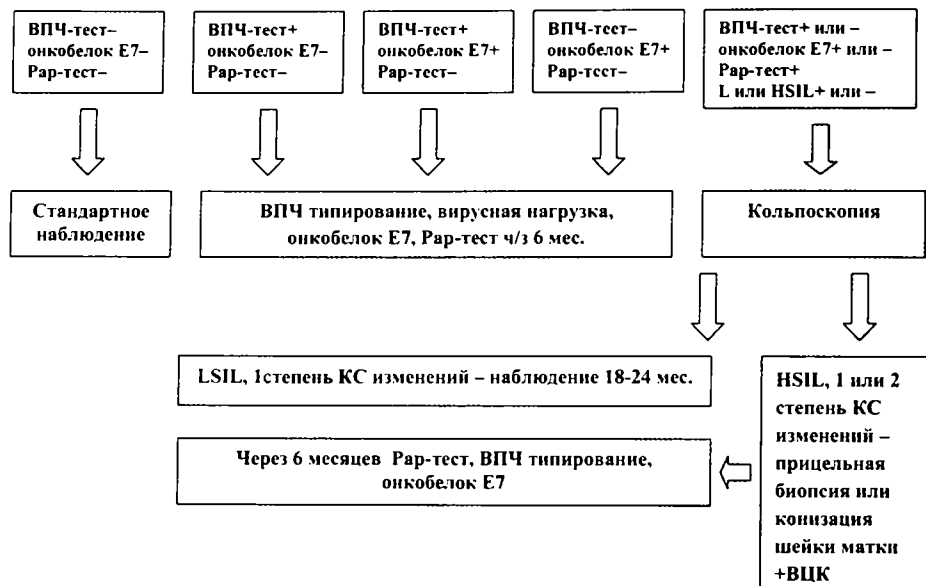


Схема 1.

Сокращения в схеме:

КС изменения – кольпоскопические изменения
 ВЦК – выскабливание цервикального канала

Пятый диагностический этап – иммуноцитохимическое определение онкобелков p16ink4a и E7 ВПЧ 16 и 18 типов. Повышенный уровень экспрессии маркера p16ink4a был отмечен у 14, 28% женщин. У 87,5% p16ink4a-положительных пациенток цитологически была выявлена ЦИН I, негативная реакция у 12,5% пациенток может свидетельствовать как о ложно положительных данных жидкостной цитологии и ложно негативных данных определения онкомаркера p16ink4a, так и о реактивном характере дисплазии.

Шестой диагностический этап - определение онкобелка E7 в цервикальных пробах. E7 – положительные пациентки составляют по нашим данным 78,33% среди женщин, страдающих ВПЧ-цервицитами. У 30,77% пациенток с цитологически подтвержденной ЦИН I онкобелок E7 16 и 18 типов ВПЧ был отрицательным, что может свидетельствовать о том, что ВПЧ находился в клетке в эписомальной форме, либо ЦИН I развилась на фоне других высокоонкогенных типов ВПЧ.

Гистологическое исследование должно являться заключительным седьмым диагностическим этапом, так как этот метод является инвазивным, травматичным и может нарушить репродуктивные планы пациентки. Показаниями к проведению биопсии пациенткам с ВПЧ-ассоциированными цервицитами, по нашему мнению, являются: наличие злокачественных ОКТ-локусов при отсутствии данных за HSIL, LSIL без положительной динамики при проведении патогенетической терапии и динамическом наблюдении 18-24 месяца, планирование сэнса ФДТ, возраст пациентки более 35 лет, невозможность дальнейшего наблюдения, при III типе зоны трансформации обязательным является выскабливание цервикально-

го канала. Биопсия должна быть ОКТ-кольпоскопически ориентированной и максимально щадящей, поэтому в нашем исследовании мы применяли методы радиоволновой хирургии, что позволяло контролировать размер иссекаемого участка, глубину биопсии, получать образцы с минимальными коагуляционными повреждениями.

При выборе тактики дальнейшего ведения пациентки были разделены на три группы, в зависимости от конкретной клинической ситуации и согласно совокупности полученных результатов на этапах диагностики: 1) 40% пациенток, у которых имело место сочетание доброкачественного типа ОКТ, I степени кольпоскопических изменений, LSIL и p16ink4a-негативной реакции, была определена тактика активного динамического наблюдения после курса противовирусной и иммуномодулирующей терапии при E7-отрицательной реакции, в том числе и в группе планирующих беременность женщин; 2) 18% пациенток, у которых отмечалось наличие злокачественных ОКТ-локусов, I-II степени кольпоскопических изменений, LSIL, p16ink4a-негативной или положительной реакции, было выполнено прицельное гистологическое исследование, ФДТ, далее динамическое наблюдение; 3) в 42% случаев при персистирующей субклинической ПВИ более 18-24 месяцев тактика ведения была прицельная биопсия, ФДТ, далее динамическое наблюдение с определением онкобелка E7 16 и 18 типов ВПЧ. При выявлении цервикальных изменений, соответствующих HSIL, C-r in situ производилась конизация шейки матки с последующим выскабливанием цервикального канала.

Гистологическое исследование включало тщательную оценку краёв резекции с последующим решением

вопроса о необходимости дальнейшего лечения - ФДТ. Положительным краем резекции считалось наличие гистологических признаков ВПЧ-инфицирования. Размер зоны воздействия также уточняется при ОКТ-кольпоскопии, как и последующий контроль после лечения + жидкостное цитологическое исследование + иммуноцитохимическое определение p16ink4a + определение онкобелка E7 16 и 18 типов ВПЧ.

Всем небеременным больным с ВПЧ-ассоциированным цервицитом наряду с противовирусным и иммуномодулирующим лечением проводилась вакцинация квадριвалентной вакциной с целью профилактики повторного инфицирования.

По окончании данного исследования нами предложен следующий алгоритм диагностических мероприятий по выявлению цервикальной патологии, представленный на схеме 1.

Заключение

Нами подтверждена значимость определения онкобелка E7 16 и 18 типов ВПЧ в комплексном обследовании больных с цервикальной патологией в репродуктивном возрасте.

Так, у больных с латентными и субклиническими формами ВПЧ-инфекции (ЦИН I-) определение онкобелка E7 необходимо для уточнения фазы существования ВПЧ в клетке-хозяине, и, соответственно, оптимизации прогнозирования реализации его онкогенного потенциала для индивидуализации тактики ведения пациентки.

В то же время, по нашему мнению, назначение данного исследования нецелесообразно больным с уже

установленным диагнозом ЦИН II+ и раке in situ, в связи с уже известной тактикой лечения.

Предложенная схема лечения генитальных кондилом у пациенток с ВПЧ-цервицитами комбинацией системного и местного применения Панавира в сочетании с последующей их деструкцией даёт хороший и стойкий эффект.

Наличие в цервикальных пробах онкобелка E7 16 и 18 типов ВПЧ после проведённой комплексной терапии может указывать на продолжающуюся персистенцию инфекции в наиболее опасной в плане рецидивирования ЦИН-интегративной форме и являться показанием для активного наблюдения и/или принятия своевременного решения о дальнейшем лечении.

Типирование папилломавирусов, определение титра высокоонкогенных ВПЧ, определение в цервикальных пробах онкобелка E7 16 и 18 типов ВПЧ - реальная основа для прогнозирования злокачественной эволюции HPV-инфекции, контроля эффективности проведённого лечения и дифференцирования эндогенных рецидивов от реинфекции. ■

Качалина О.В. (к.м.н), Андосова Л.Д. (к.м.н), Елисеева Д.Д., Засыпкина С.В., Михайлова Г.А., кафедра акушерства и гинекологии ГБОУ ВПО "Нижегородская государственная медицинская академия" Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Нижний Новгород; Автор, ответственный за переписку- Михайлова Г.А., г. Нижний Новгород, ул. Невзоровых 1-81, gulja260290@rambler.ru

Литература:

1. Краснопольский В.И. и др. Инфицированность вирусом папилломы человека среди девочек-подростков в Московской области. Российский вестник акушера-гинеколога. 2010; 5: 46-49.
2. Дмитриев Г.А., Биткина О.А. Папилломавирусная инфекция. М.: Медицинская книга, 2006.
3. Ершов В.А., Нарвская О.В. Фоновые процессы и неоплазия эпителия шейки матки. СПб.: Человек, 2007.
4. Аппар Б.С., Бродман Г.Л., Шпицер М. Клиническая кольпоскопия. М.: Практическая медицина, 2012.
5. Harlan L.C. et al. Cervical cancer screening: who is not screened and why? Am J Public Health 1991.
6. Маянский А.Н. Папилломавирусы человека: возбудители доброкачественных и злокачественных неоплазий. Вопросы диагностики в педиатрии. 2010; 2: 5-11.
7. Moscicki A.B., Ma Y. et al. The role of sexual behavior and HPV persistence in predicting repeated infections with new HPV types. 2010; 19 (8): 2055-2065.
8. Роговская С.И. Папилломавирусная инфекция у женщин и патология шейки матки. 2-издание. М.: Издательство: ГЭОТАР-Медиа, 2011.
9. Маянский А.Н. Патогенетическая микробиология: руководство. Н.Новгород, издательство Нижегородской государственной медицинской академии, 2006.
10. Селиванов Е.В., Звягинцев Е.Н., Такмакова В.А. Определение белка E7 вирус папилломы 16/18 типов: новая ступень в профилактике развития рака шейки матки // Вестник «Лаборатории ДНК-диагности». 2011; 2(11): 16-19.
11. Сергиенко В.И. Панавир в лечении вирусных инфекций: Сборник «Панавир». М 2005: 51-86.
12. Мальцева Л.И., Фаррахова Л.Н., Кучеров В.А., Стовбун С.В., Сафронов Д.Ю. Генитальные кондиломы у женщин: факты и противоречия // Российский вестник акушера-гинеколога, 2012; 2:78-80.