

©І. Б. Вовк, А. О. Калюта, Г. В. Чубей, Т. Д. Задорожна О.І. Пустовалова
СУЧАСНІ ПІДХОДИ ДО ДІАГНОСТИКИ ТА ЛІКУВАННЯ ПАПІЛОМАВІРУСНОЇ
ІНФЕКЦІЇ

ДУ „Інститут педіатрії, акушерства і гінекології НАМН України”

СУЧАСНІ ПІДХОДИ ДО ДІАГНОСТИКИ ТА ЛІКУВАННЯ ПАПІЛОМАВІРУСНОЇ ІНФЕКЦІЇ. В роботі представлено результати дослідження експресії одного з клітинних маркерів цервікального канцерогенезу – білка p16 (INK4a/CDKN2a) у пацієнток з патологією шийки матки та наявністю інфікування вірусом папіломи людини (ВПЛ). Експресія білка p16 (INK4a/CDKN2a) в клітинах епітелію шийки матки з CIN I дозволяє виявити жінок з високим ризиком розвитку раку шийки матки (РШМ) серед пацієнток із запальними захворюваннями шийки матки. Отримані дані свідчать про те, що навіть при негативному результаті тестування на ВПЛ, жінки з фоновими захворюваннями шийки матки та позитивною експресією маркера p16 (INK4a/CDKN2a) повинні складати групу ризику по розвитку неопластичних процесів шийки матки. Проведено дослідження клінічної ефективності застосування препарату альфа-2-інтерферону у вигляді вагінальних супозиторіїв (Генферон) при лікуванні жінок з фоновими процесами шийки матки та папіломавірусною інфекцією. Отримані в ході дослідження результати показали високу клінічну ефективність препарату альфа-2-інтерферону Генферон у 83,3 % пацієнток з патологією шийки матки та відсутність побічної дії при його використанні.

СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К ДИАГНОСТИКЕ И ЛЕЧЕНИЮ ПАПИЛЛОМАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ. В работе представлены результаты экспрессии одного из клеточных маркеров цервикального канцерогенеза – белка p16 (INK4a/CDKN2a) у пациенток с патологией шейки матки и инфицированием вирусом папилломы человека (ВПЧ). Экспрессия белка p16 (INK4a/CDKN2a) в клетках эпителия шейки матки с CIN I позволяет выявить женщин с высоким риском развития рака шейки матки (РШМ) среди пациенток с воспалительными заболеваниями шейки матки. Полученные данные свидетельствуют о том, что даже при негативном результате тестирования на ВПЧ, женщины с фоновыми заболеваниями шейки матки и положительной экспрессией маркера p16 (INK4a/CDKN2a) должны входить в группу риска по развитию неопластических процессов шейки матки. Проведено исследование клинической эффективности применения препарата альфа-2-интерферона в виде вагинальных супозиторий (Генферон) при лечении женщин с фоновыми процессами шейки матки и папилломавирусной инфекцией. Полученные в ходе исследования результаты показали высокую клиническую эффективность препарата альфа-2-интерферона Генферон у 83,3 % пациенток с патологией шейки матки и отсутствие побочного действия при его использовании. p16 (INK4a/CDKN2a), альфа-2-интерферон, препарат Генферон.

THE CONTEMPORARY APPROACH TO DIAGNOSTICS AND TREATMENT OF PAPILOMA VIRAL INFECTION. In work results of an expression of one of the cellular markers of cervical cancerogenic – protein p16 (INK4a/CDKN2a) at patients with a pathology of cervix of uterus and an infection a human papilloma virus (HPV) are presented. Expression of protein p16 (INK4a/CDKN2a) in cells of epithelium of cervix of uterus with CIN I allows to reveal women with high risk of development of a cancer of cervix of uterus among patients with inflammatory diseases of cervix of uterus. The obtained data testifies what even at negative result of testing on HPV, women with background diseases of cervix of uterus and an overexpression of a marker p16 (INK4a/CDKN2a) should enter into group of risk on development of neoplastic processes of cervix of uterus. The study of clinical efficiency of alfa-2-interferon preparation (Genferon) in the form of vaginal suppositories at treatment of women with the background processes of cervix of uterus and papilloma viral infection. The results received during research have shown high clinical efficiency of a preparation an alpha-2-interferon of Genferon at 83,3 % of patients with pathology of cervix of uterus and absence of collateral action at its use.

Ключові слова: вірус папіломи людини, запальні захворювання шийки матки, фонові процеси шийки матки, цервікальна інтраепітеліальна неоплазія (CIN I), цитологічне та імуноцитохімічне дослідження, гіперекспресія білка p16 (INK4a/CDKN2a), альфа-2-інтерферон, препарат генферон.

Ключевые слова: вирус папилломы человека, воспалительные заболевания шейки матки, фоновые процессы шейки матки, цервикальная интраэпителиальная неоплазия (CIN I), цитологическое и иммуноцитохимическое исследование, гиперэкспрессия белка

Key words: human papilloma virus, inflammatory diseases of cervix of uterus, background processes of cervix of uterus, cervical intraepithelial neoplasia (CIN), cytologic and immunocytohistochemical research, overexpression of protein p16 (INK4a/CDKN2a), alfa-2-interferon, Genferon.

ВСТУП. Серед групи захворювань, що передаються статевим шляхом, однією з найпоширеніших є папіломавірусна інфекція (ПВІ) геніталій [1, 2, 3]. В теперішній час існує достатньо даних, що підтверджують зв'язок між папіломавірусною інфекцією та передпухлинними захворюваннями шийки матки. ДНК вірусу папіломи людини (ВПЛ) виявляється майже у всіх хворих з передпухлинними станами та раком шийки матки (РШМ), в зв'язку з чим Міжнародне агентство по

дослідженню раку (IARC) офіційно оголосило ВПЛ типів 16 і 18 канцерогенними факторами [4, 5].

Впровадження цитологічного дослідження цервікального матеріалу (тест Папаніколау) значно підвищило ефективність ранньої діагностики РШМ. Однак і нині вірогідність як хибнопозитивних, так і хибнонегативних діагнозів залишається високою [6]. В той же час тільки виявлення ДНК високоонкогенних типів ВПЛ не може бути надійним тестом для прогнозування

розвитку передпухлинних процесів та РШМ, оскільки рак *in situ* і інвазивний РШМ виникають лише у невеликої частини жінок з інфікуванням вищезазначеними типами вірусу та цервікальними інтраепітеліальними неоплазіями (CIN) [7]. Приблизно у 70 % пацієнток відбувається елімінація ВПЛ протягом 12-24 місяців [8].

В умовах сьогодення, удосконалення ранньої діагностики передпухлинних станів та РШМ відбувається шляхом пошуку генів клітини-хазяїна, що інфікована високоонкогенними типами ВПЛ; їх експресія під впливом онкобілків вірусу незворотно змінюється. Одним з найбільш надійних клітинних маркерів цервікального канцерогенезу є p16 *ink4a*, що підтверджується різними дослідниками [9, 10].

Лікування пацієнток з ПВІ має бути комплексним, поетапним, слід враховувати можливість супутнього мікст-інфікування. Перш за все пацієнткам з ПВІ та фоновими процесами шийки матки проводять етіотропне лікування у відповідності з результатами обстеження згідно існуючих клінічних рекомендацій та протоколів МОЗ України [11, 12]. Утруднення при лікуванні фонових захворювань шийки матки можуть бути обумовлені виникненням резистентних до протимікробних лікарських препаратів штамів мікроорганізмів, проникненням патогенної мікрофлори в кріпті слизової оболонки цервікального каналу, а також з труднощами проникнення препаратів у вогнища запалення. Це змушує дослідників шукати більш ефективні методи терапії, які передбачають підвищення захисних сил організму, а також наявність противірусних і антипроліферативних властивостей. Протягом останнього десятиріччя препарати альфа-інтерферона (б-ІФН) активно використовуються в комплексній терапії ПВІ, що пов'язано з їх вираженим імуномодулюючим, противірусним та антибактеріальним ефектом [13, 14].

Метою роботи було визначення прогностичного значення експресії p16 (*INK4a/CDKN2a*) у пацієнток з диспластичними процесами епітелію шийки матки та вивчення клінічної ефективності застосування препарату альфа-2-інтерферону (Генферон) в комплексному лікуванні хворих з інфікуванням вірусом папіломи людини.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ. У дослідженні взяли участь 60 жінок віком від 18 до 39 років з патологією шийки матки. Визначення ДНК ВПЛ методом ПЛР проводилось в лабораторіях, ліцензованих МОЗ України та акредитованих Укрметртестстандартом за допомогою тест-систем для ампліфікації гомологічних фрагментів ДНК ВПЛ.

Використовували загальноцитологічні методи – забарвлення за Романовським-Гімзе та Папаніколау, інтерпретацію результатів цитологічного дослідження проводили за класифікацією „Bethesda system” (2001). Загальногістологічний метод проводили по стандартній схемі. Матеріал фіксували в нейтральному парафіні, обробляли в парафіновій заливці, зрізи фарбували гематоксилін-еозином та пікрофуксином по Ван-Гізон.

Для виявлення клітинного маркера p16*INK4a* (інгібітор цикліна залежних кіназ Cdk 4, 6) в клітинах епітелію шийки матки використовували CIN *tes* з мо-

ноклональним антитілом (Monoclonal anti p16*INK4a* protein (clone JC8)) для якісного визначення онкопротеїну p16 в цитологічних та гістологічних препаратах методами імуноцитохімії та імуногістохімії.

Всі пацієнтки після проведеного клініко-лабораторного обстеження отримали комплексну протизапальну терапію із застосуванням препаратів антибактеріальної дії. Наступним етапом було призначення препарату альфа-2-інтерферону (Генферон) з метою противірусної, імуномодулюючої і репаративної дії. Генферон застосовували по 1 супозиторію 500 тис. МО інтравагінально двічі на добу протягом 10 днів з повторним курсом через 1 місяць. При наявності ВПЛ проводили наступні протирецидивні 10-денні курси з інтервалом в 3 місяці також по 1 супозиторію 500 тис. МО двічі на добу інтравагінально. Оцінку ефективності проведеної терапії здійснювали за допомогою вищезазначених методів через 1-3 місяці після закінчення лікування.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ. Всі обстежені жінки були репродуктивного віку, середній вік їх становив (26±2,3) років. Серед основних скарг, які висловлювали жінки, були: значні виділення відмічали 52 (86,7 %) пацієнтки, печію – 17 (28,3 %) обстежених, а на свербіж вказували 13 (21,7 %) хворих.

Під час первинного огляду в дзеркалах у всіх жінок були виявлені патологічні зміни шийки матки: гіперемія навколо зовнішнього вічка цервікального каналу, набряк, плямиста яскраво-червона поверхня шийки матки, значні виділення з цервікального каналу.

Для виявлення особливостей морфологічних змін клітин епітелію шийки матки, характеру запальної інфільтрації (нейтрофіли, лімфоцити, еозинофіли, макрофаги), наявності неопластичних змін в клітинах епітелію були досліджені цитологічні мазки 30 жінок із запальними процесами шийки матки. В залежності від наявності ураження геніталій ВПЛ було виділено 2 групи жінок: вірус-позитивна (18 хворих з інфікуванням ВПЛ 16, 18-м типами, серед яких у 2-х жінок спостерігалась асоціація ВПЛ та вірусу простого герпесу 2 типу (ВПГ-2)) та вірус-негативна група (12 хворих).

При цитологічному дослідженні мазків з цервікального каналу жінок із запальними процесами шийки матки відмічались виразні дистрофічні зміни клітин плоского та залозистого епітелію, які проявлялись у вигляді каріолізису, каріопікнозу та оголеності ядер, виявлялись характерні для вірусного інфікування цитологічні ознаки, обумовлені цитопатогенною дією ДНК-вмісних вірусів папіломи людини: койлоцити, двоядерні клітини та багатоядерні симпласти, кератиноцити, відмічалась амфотілія цитоплазми.

Запальна інфільтрація в мазках з цервікального каналу шийки матки жінок з запальними процесами репродуктивних органів була досить виразною, носила вогнищевий характер і була представлена здебільшого нейтрофілами, відповідно – (21,05±0,86) %; (15,00±0,50) %, лімфоцитами – (1,90±0,07) %; (2,90±0,09) % та макрофагами – (3,10±0,09) %; (2,95±0,08) %, що свідчить про наявність запального процесу в шийці матки

Для виявлення неопластичних змін клітин епітелію цервікального каналу шийки матки жінок було проведено імуноцитохімічне дослідження CIN-тест для визначення рівня експресії білка p16INK4a, який показав позитивну експресію (від 1-ого до 3 балів) в епітелії та ядрах клітин вірус-позитивних жінок. Слід відмітити, що найбільш виражена експресія (3 бали) спостерігалась у жінок з асоціацією ВПЛ та ВПГ-2, що свідчить про наявність неопластичних змін в клітинах плоского епітелію шийки матки і підтверджується даними цитологічних досліджень, при яких були виявлені диспластичні зміни клітин плоского епітелію легкого ступеня у 18 (60,0 %) із обстежених жінок, у 12 (40,0 %) диспластичні зміни в клітинах епітелію не виявлялись.

Слабопозитивна експресія (до 1-ого балу) спостерігалась у 2-х вірус-негативних жінок з легкою дисплазією шийки матки.

Під час лікування препаратом альфа-2-інтерферону (Генферон) побічних ефектів та ускладнень не спостерігалось. При оцінці ефективності лікування через три місяці всі обстежені пацієнтки відмічали значне покращення суб'єктивного самопочуття, після лікування на значні виділення скаржились 4 (6,7 %) жінок з папіломавірусним інфікуванням на тлі запальних процесів шийки матки проти 52 (86,7 %), печію та свербіж відмічали відповідно 1 (1,7 %) і 2 (3,3 %) пацієнтки проти відповідно 17 (28,3 %) і 13 (21,7 %) хворих до лікування.

При повторному проведенні генетичного тестування на ВПЛ елімінації вірусу вдалося досягти у 50 (83,3 %) пацієнток.

Морфометричний аналіз мазків жінок із запальними процесами шийки матки в поєднанні з ВПЛ в динаміці лікування встановив достовірне зменшення кількості клітин плоского епітелію з морфологічними змінами та маркерів вірусного інфікування (койлоцити, дискератоцити, дво- та багатоядерні клітини) після проведеної терапії порівняно з мазками жінок до лікування. При аналізі результатів після проведеного лікування були виявлені позитивні зміни в цитологічних мазках у 25 (83,3 %) обстежених жінок з патологією шийки матки.

ЛІТЕРАТУРА

1. Степаненко Р.Л. Папилломавирусная генитальная инфекция: современные методы диагностики и лечения/ Р.Л. Степаненко. Т.С. Коновалова// Клінічна імунологія. Алергологія. Інфектологія. – 2011. – № 1 (40). – С. 52-57.

2. Bosch EX. The causal relation between human papillomavirus in cervical cancer/ EX. Bosch, A. Lorincz, N. Munoz et al.// J. Clin. Pathol. – 2002. – Vol. 55. – P. 244-265.

3. Вергейчик Г.И. Роль генотипа вируса папилломы человека в развитии эпителиальных дисплазий и преинвазивного рака шейки матки у женщин в республике Беларусь/ Г.И. Вергейчик// Акушерство и гинекология. – 2008. – № 2. – С. 44-46.

4. zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application/ H. zur Hausen// Nat. Rev. Cancer – 2002. – Vol. 2 (5). – P. 342-350.

Таким чином, результати проведеного дослідження показали високу чутливість та інформативність імуноцитохімічного методу для диференціювання патологічних процесів шийки матки та визначення прогнозу їх перебігу. Позитивна експресія p16INK4a в мазках з цервікального каналу та біоптатах шийки матки обстежених жінок від 1-ого до 2-х балів, а при одночасному інфікуванні ВПЛ і ВПГ-2 ? до 3-х балів є інформативним діагностичним критерієм, що свідчить про зростаючий ризик пухлинної трансформації епітеліальних клітин шийки матки у даного контингенту хворих.

ВИСНОВКИ: 1. У обстежених жінок фонові процеси шийки матки супроводжувались запальними змінами, що були верифіковані як клінічно, так і за результатами цитоморфологічного дослідження.

2. При проведенні імуноцитохімічного дослідження цитологічних мазків та біоптатів шийки матки виявлена експресія білка p16 (INK4a/CDK2a) у обстежених жінок від 1-ого до 2-х балів, а при поєднанні з вірусом простого герпесу 2-го типу ? до 3-х балів, що свідчить про зростаючий рівень онкотрансформації епітелію шийки матки у цих жінок.

3. Результати проведених досліджень свідчать, що навіть при негативних результатах генетичного тестування на вірус папіломи людини, жінки з фоновими захворюваннями шийки матки та позитивною експресією маркера p16 (INK4a/CDK2a) повинні складати групу ризику по розвитку неопластичних процесів шийки матки.

4. Отримані результати (зменшення суб'єктивних проявів захворювання, відсутність побічних ефектів, елімінація вірусу папіломи людини, що підтверджена методом ПЛР у 83,3 % випадків, регрес запальних змін екзоцервіксу, позитивні зміни в цитологічних мазках у 83,3 % обстежених) свідчать про високу клінічну ефективність препарату альфа-2-інтерферону (Генферон) в комплексній терапії папіломавірусної інфекції геніталій.

ПЕРСПЕКТИВИ ПОДАЛЬШОГО ДОСЛІДЖЕННЯ. Подальше удосконалення ранніх методів діагностичних передпухлинних станів та РШМ, що шляхом пошуку генів клітини-хазяїна дозволить виявити надійні клітинні маркери цервікального канцерогенезу.

5. Андосова Л.Д. Генодиагностика папилломавирусной инфекции высокого канцерогенного риска/ Л.Д. Андосова, К.Н. Конторщикова, С.Ю. Куделькина и др.// Российский вестник акушера-гинеколога. – 2011. – № 2. – С. 13-15.

6. Раскин Г.А. Эффективность использования жидкостной цитологии в сочетании с иммуноцитохимическим исследованием p16 (ink4a/cdk2a) в сравнении с традиционной цитологией и ПЦР-анализом ВПЧ высокого онкогенного риска в диагностике дисплазий и рака шейки матки/ Г.А. Раскин, С.В. Петров, Р.В. Орлова и др.// Вопросы онкологии. – 2009. – Т. 55. – № 2. – С. 192-195.

7. Роговская С.И. Папилломавирусная инфекция у женщин и патология шейки матки / С.И. Роговская. – М.: ГЭ-ОТАР-Медиа, 2008. – 192 с.

8. Прилепская В.Н. Профилактика рака шейки матки:

методы ранней диагностики и новые скрининговые технологии (клиническая лекция)/ В.Н. Прилепская// Гинекология. – 2010. – Т. 9. – № 1. – С. 12-14.

9. Redman R. The utility of p16 ink4a in discriminating between cervical intraepithelial neoplasia I and nonneoplastic equivocal lesions of the cervix/ R. Redman, I. Rufforny, C. Liu et al.// Arch. Pathol. Lab. Med. – 2008. – Vol. 132. – P. 795-799.

10. Волгарева Г.М. Гиперэкспрессия клеточного белка p16 ink4a в эпителиальных злокачественных опухолях, индуцированных вирусами папиллом человека/ Г.М. Волгарева, Л.Э. Завалишина, Ю.Ю. Андреева// Архив патологии. – 2008. – № 5. – С. 57-61.

11. Воробйова Л.І. Вивчення терапевтичної ефективності препарату інтерферону у формі вагінальних супози-

торіїв на етапі реабілітації після діатермохірургічних операцій у хворих на ЦІН II-III// Л.І. Воробйова, Н.Ф. Лигирда/ / Здоровье женщины. – 2010. – № 10 (56). – С. 71-75.

12. Аكوпова Е.С. Возможности диагностики и лечения заболеваний шейки матки, ассоциированных с вирусом папилломы человека/ Е.С. Аكوпова, С.И. Роговская// Вестник новых медицинских технологий. – 2010. – Т. XVII. – № 4. – С. 58-61.

13. Исаков В.А. Использование циклоферона в терапии папилломавирусной инфекции/ В.А. Исаков, Д.К. Ермоленко, Ф.Р. Кутуева и др. – СПб. – Великий Новгород, 2007. – 64 с.

14. Мелехова Н.Ю. Вирусные инфекции и патология репродукции/ Н.Ю. Мелехова. – Смоленск, 2008. – 47 с.

Отримано 06.12.11