

ПАПИЛЛОМАВИРУСНАЯ ИНФЕКЦИЯ У ПАЦИЕНТОК С ЭКТОПИЕЙ ШЕЙКИ МАТКИ

Мелехова Наталья Юрьевна, профессор, д.м.н.
Иванян Александр Николаевич, профессор, д.м.н.
Овсянкина Наталья Леонидовна, врач акушер-гинеколог
Чернякова Анна Леонидовна, врач акушер-гинеколог
кафедра акушерства и гинекологии ФПК и ППС ГОУ ВПО
Смоленская государственная медицинская академия
14.00.01
alexey.ovsyankin.95@mail.ru

Аннотация. В статье приведены данные обследования 173 пациенток с эктопией шейки матки. Проводились кольпоскопическое, цитологическое, молекулярно-биологическое исследования, констатировалось наличие инфицирования онкогенными типами вируса папилломы человека, установление типа вируса, его количественная нагрузка и качественное определение онкопротеина E7, что связывалось с возможным высоким онкологическим потенциалом. Установлено, что основным инфекционным агентом, препятствующим нормальному течению физиологической эктопии шейки матки, является вирус папилломы человека, преимущественно 18 типа, в количествах превышающих клинически значимые цифры, а так же наличие онкопротеина E7 в цервикальных пробах.

Таким образом, установлен онкологический потенциал ВПЧ инфицированной эктопии шейки матки и предложен алгоритм ведения пациенток с данной патологией.

Ключевые слова: Папилломавирусная инфекция (ПВИ); плоскоклеточные интраэпителиальные поражения (ПИП); цервикальная интраэпителиальная неоплазия (ЦИН); вирус папилломы человека (ВПЧ); полимеразная цепная реакция (ПЦР).

PAPILLOMAVIRUS INFECTION IN PATIENTS WITH CERVICAL UTERUS ECTOPIA

Melekhova Natalia Uryevna (professor, M.D.)
Ivanyan Alexander Nicolaevich (professor, M.D.)
Ovsyankina Natalia Leonidovna (doctor obstetrician-gynecologist),
Chernyakova Anna Leonidovna (doctor obstetrician-gynecologist)
Obstetrics and Gynecology Department of Advanced Training and Professional Retraining of Specialists Faculty,
Smolensk State Medical Academy

Abstract. In this article we cite data of 173 patients with cervix of the uterus ectopias examinations. Colposcopy, cytological, molecular-biological researches were carried out as well as quantitative virus load and oncological protein E 7 testing. It was established that the main infectious agent which interfere with the normal course of cervix of the uterus physiological ectopia is human papilloma virus in quantities exceeding clinical significant figures and occurrence of oncological protein E7 in cervical tests.

Hereby oncological potential of HPV- infected ectopias was established and the treatment algorithm of patients with this pathology was suggested.

Keywords: papilloma viral infection (PVI), planocellular intraepithelial affections (PIA), cervical intraepithelial neoplasia (CIN), human papilloma virus (HPV), polymerase chain reaction (PCR).

Введение

Последние годы ведется активная дискуссия о тактике ведения пациенток с эктопией шейки матки. Рядом отечественных исследователей эктопия шейки матки позиционируется как состояние гистофизиологической нормы, с чем нельзя не со-

гласиться [1]. Разнообразие клинических картин, размеров и особенностей течения данных состояний вызывают интерес большого числа клиницистов [1, 5].

Достаточно давно определена этиологическая роль вируса папилломы человека высокого канцерогенного риска в развитии плоскоклеточного рака шейки матки, влага-

лица и вульвы. Доминирует в этом процессе 16 тип ВПЧ [4, 5, 6, 11]. Однако в последнее время появились данные о развитии аденокарциномы шейки матки на фоне персистирующей папилломавирусной инфекции, где основная роль отводится ВПЧ 18 типа [7, 10, 11, 15]. Учитывая сходное гистологическое строение железистого эпителия цервикального канала шейки матки и эктопии, можно предположить и возможный этиологический потенциал ВПЧ-инфицированной эктопии [9, 12, 15]. По данным ряда авторов факторами, инициирующими нарушение процессов метаплазии, являются иммунологические, гормональные (гиперэстрогения), инфекционные агенты, сексуально-трансмиссивные заболевания в частности [1, 2]. Описаны особенности состояния эктопии при хламидийной, микоплазменной и герпетической инфекциях. Общеизвестным является факт высокого канцерогенного потенциала вируса папилломы человека [5, 6, 11, 12, 13, 14]. По данным В.П.Козаченко (2009г) определена роль 18 и 45 типов вируса папилломы человека в канцерогенезе железистого эпителия. По данным литературы установлено, что только интегрированная форма вируса папилломы человека, продуцирующая онкопротеины Е6 и Е7 является предшественником онкологического процесса на шейке матки [4, 11, 15, 18]. Но все эти данные приведены, в основном для плоскоклеточных интраэпителиальных поражений и нигде в литературе не указано на патогенез предрака и рака железистого эпителия. Мы посчитали целесообразным соотнести особенности течения эктопии с типами вируса, количественной вирусной нагрузкой и другими данными исследования с целью определить онкологический потенциал этой патологии [3, 9, 10, 13, 17].

Целью нашего исследования явилось изучение влияния инфицирования шейки матки вирусом папилломы человека на течение физиологической эктопии.

Материалы и методы исследования

Для решения поставленных задач нами проведено обследование 173 пациенток с кольпоскопически констатируемой эктопией шейки матки. Все пациентки были обследованы на наличие других патологических состояний женской репродуктивной сферы: гормональных нарушений, опухолевых заболеваний. Из исследования были исключены женщины с нарушением менструального цикла, изменениями в гормональном статусе, миомой матки, опухолевыми образованиями яичников и патологией молочной железы. В зависимости от распространенности, размеров и признаков плоскоклеточной метаплазии пациентки были разделены на 2 группы: 1-ую группу составили 100 (57,8%) женщин с эктопией шейки матки больших и средних размеров без признаков нормальной эпидермизации, во 2-ую группу вошли 73 (42,2%) пациентки, у которых эктопия находилась в стадии выраженной эпидермизации.

Пациенткам проводилось кольпоскопическое, цитологическое, морфологическое исследования, тестирование методом ПЦР на 7 основных сексуально-трансмиссивных заболеваний, определение вирусной нагрузки методом гибридного захвата (Hybrid Capture), уточнение количественной вирусной нагрузки по основным типам ВПЧ методом ПЦР Real team и качественное определение онкопротеина Е7, являющегося маркером интегрированной формы папилломавирусной инфекции по 16 и 18 типам вируса на экспериментальных тест системах предоставленных нам ЦНИИ Эпидемиологии МЗ РФ. В качестве терапевтических методов использовалась лазерная эксцизия, в послеоперационном периоде применялся препарат ПАНАВИР в виде 0,004% раствора внутривенно, по 5,0 мл с перерывом 24-72 часа. Исследование на ИППП, ПЦР, количественное определение вирусной нагрузки и Hybrid Capture проводилось по договору в аккредитованной лабораторией ООО «ДиаЛаб Плюс».

Относительные единицы по каждому типу вируса папилломы человека Hybrid Capture, получены путем пересчета. Исследование ПЦР Real time проводилась с помощью амплификаторов фирм «Био-Рад» и «Эббот» с применением тест-систем «Амплисенс FRT ВПЧ ВКР скрининг» и «Био-Рад». Качественное определение онкопротеина E7 проводилось методом НАСБА технология которой используется в тесте PreTect HPV-Proofer (NorChip), основанном на амплификации РНК и предназначенном для выявления мРНК пяти онкогенных типов ВПЧ [16, 18]. Все полученные данные обрабатывались методами вариационной статистики. Среднюю статистическую величину M , среднее квадратичное отклонение, ошибку средней m вычисляли с помощью компьютерной программы Epi info, версия 6,0. Достоверность отличий оценивали методами вариационной статистики с использованием критериев Фишера и Стьюдента. Все лечебно-диагностические мероприятия проводились на базе ООО «Медицинский центр ГИНЕЯ» г. Смоленск. Все инвазивные манипуляции проводились с письменного информированного согласия пациенток.

Результаты исследования и их обсуждение

Для оценки особенностей течения и определения инициирующих факторов проводилось изучение анамнеза заболевания, особенностей менструальной и репродуктивной функции.

Средний возраст пациенток составил $21,2 \pm 0,2$ года. Учитывая относительно молодой возраст данной группы, основная масса наших больных не успела реализовать свою репродуктивную функцию. Особенности менструальной функции не отличались от таковых в популяции. Обращало на себя внимание большое число половых партнеров $3,4 \pm 0,1$ на одну пациентку и ранний возраст начала половой жизни $16,7 \pm 0,2$ года. Из используемых методов контрацепции для данной группы пациенток характерно отсутствие таковой у 45,2%. Из применяемых эффективных методов конт-

рацепции использовалась оральная (18,4%) и внутриматочная (11%). Остальные пациентки (25,6%) применяли барьерную контрацепцию.

При анализе выявленных сексуально-трансмиссивных заболеваний у пациенток с эктопией шейки матки чаще всего встречалась хламидийная, микоплазменная инфекции и генитальный герпес, что подтверждает наше предположение о наличии у пациенток с осложненной эктопией факторов риска, идентичных факторам риска развития ПИП. Сравнение проводилось со статистическими среднепопуляционными данными.

Выявляемость сексуально-трансмиссивных заболеваний среди пациенток с эктопией шейки матки по некоторым нозологическим формам выше, чем среди пациенток без патологии шейки матки и незначительно ниже по сравнению с больными с папилломавирусными поражениями шейки матки.

Основным методом для выявления эктопии шейки матки нами был избран кольпоскопический в виду его высокой информативности и практической доступности. Для исследования были отобраны пациентки, имевшие на шейке эктопию - цилиндрический эпителий с признаками начальной плоскоклеточной метаплазией и незавершенной метаплазией.

В зависимости от степени выраженности пролиферативных процессов все больные были разделены на две репрезентативные группы: 1-ю группу составили 100 (57,8%) женщин с эктопией шейки матки больших и средних размеров без признаков нормальной эпидермизации, во 2-ю группу вошли 73 (42,2%) пациентки, у которых эктопия находилась в стадии выраженной эпидермизации. В дальнейшем при тестировании на ВПЧ высокого канцерогенного риска методом «гибридной ловушки», из 2-х групп положительными оказались 111 (64,2%) женщин: 85 (85%) женщин 1-ой группы и 26 (35,6%) пациенток 2-ой группы. При проведении расширенной кольпоскопии у всех пациенток визуализировался цилиндрический эпителий в различной степени плоскоклеточной метаплазии, но чаще с не резко выраженными признаками и элементами трансформации, что

Таблица 1

Определение типов ВПЧ

Тип ВПЧ	Количество пациенток n=111		Средний абс. результат копий/обр.	Результат в условных единицах (Hybrid Capture усл. единиц)
	абс.	%		
6	6	5,4	-	-
11	7	6,3	-	-
16	18	16,2	10 ⁶ ±	274
16, 31, 33, 35, 52, 58	27	24,3	10 ⁶ ±	362
18	11	9,9	10 ⁸ ±	381
18, 39, 45, 59	35	31,5	10 ⁸ ±	216
51, 56, 68	7	6,3	10 ⁶ ±	200

является гистофизиологической нормой по международной классификации кольпоскопических результатов (2003 г.) и относится к нормальным кольпоскопическим результатам. Однако в 1-й группе пациенток достоверно чаще (23%), чем во 2-й (13,6%) встречались, так называемые, «неблагоприятные» признаки эпидермизации желез (открытые протоки с кератинизацией). На сегодняшний день, нигде в кольпоскопических классификациях нет указаний на атипию желез.

При обследовании наших больных с применением цитологического исследования полученные результаты были ожидаемы. При градации их по различным цитологическим результатам основное число пациенток из 1-ой группы имели 1 класс мазка по Папаниколу. У каждой 3-ей имелся 2 тип мазка, и только 7% заключений имели 3 класс мазка. Для 2-ой группы характерно преобладание 1 типа мазка по Папаниколу, что обусловлено физиологическим течением процесса.

Особого интереса, по нашему мнению заслуживает тестирование пациенток на ДНК вируса папилломы человека высокого канцерогенного риска. В 1-й группе положительными на ДНК ВПЧ оказались 85 (85%) пациенток, во 2-й группе - 26 (34,2%). При определении косвенной вирусной нагрузки по ВПЧ методом «гибридной ловушки» положительными в 1-ой группе оказались 35 (41, 2%) пациенток, причем вирусная нагрузка составила в сред-

нем 398,2±34,1 относительных единиц (1 единица соответствует RLU 100000 копий /мл, для впервые выявленных случаев 1 единица говорит о значимой вирусной нагрузке). Во 2-й группе положительными было всего 2 (7,7%) пациентки, что составило 7,7% от ВПЧ положительных женщин, и средняя нагрузка составляла 23,4±7,1 относительных единиц. При типировании на 11 типов ВПЧ нами установлено, превалирующим являлся вирус папилломы 18 и 45 типов, что не противоречит данным В.П. Козаченко (2008г). Учитывая невозможность определения вирусной нагрузки по каждому из этих типов конкретно нами были применены тесты расширенного ВПЧ скрининга, предложенные компанией «ДиаЛаб Плюс» (15+кмв), представленные в таблице 1.

Как видно из данных таблицы это может подтвердить предположение о том, что 18 и 45 типы вируса папилломы человека имеют наибольшее этиологическое значение в развитии железистого рака шейки матки. Для определения дальнейшей тактики ведения больных мы посчитали целесообразным продолжить обследование на наличие онкопротеина E7, являющегося маркером интегрированной формы папилломавирусной инфекции. В ходе нашего исследования было установлено, что замедленные процессы метаплазии могут быть обусловлены высоким количеством вируса папилломы человека. Но количественные пока-

затели только косвенно указывают на онкологический потенциал процесса. Общеизвестно, что при интегрированных формах ВПЧ в цервикальных пробах определяется онкопротеин E7. Они могут выявляться методом иммуногистохимии (Polyar probe) в морфологическом и цитологическом материале. В своем исследовании для выявления онкопротеина E7 мы использовали молекулярно-биологический метод диагностики НАСБА, предложенный ЦНИИ Эпидемиологии МЗ РФ. При тестировании на онкопротеин E7 цервикальных проб пациенток 1-ой и 2-ой групп нами установлено, что наибольшая вирусная нагрузка и экспрессия онкопротеина E7 наблюдалась у 12% пациенток 1 группы и 14,1% у ВПЧ инфицированных женщин из этой же группы. Во 2-ой группе качественный тест на онкопротеин E7 был только у 1(1,4%) пациентки, у нее же была максимальная вирусная нагрузка.

После получения информированного согласия 12 (12%) пациенткам 1-ой группы и 1 (1,4%) пациентке 2-ой проводилась морфологическая диагностика - забор биопсии. Результаты морфологического исследования были различными, но преобладало заключение железистый эндометриоз (69,3%). Полученные нами данные позволяют усомниться в ценности морфологической диагностики при определении онкологического потенциала ВПЧ инфицированного железистого эпителия. Так как ни в одной современной классификации нет понятия «предрака», предшествующего аденокарциноме шейки матки, как цервикальная интраэпителиальная неоплазия предшествует плоскоклеточному неороговевающему раку шейки матки, поэтому, учитывая высокий онкологический потенциал эктопии шейки матки в сочетании с папилломавирусной инфекцией с клинически значимыми цифрами вирусной нагрузки и положительным тестом на онкопротеин, мы посчитали правомочным предложить этим женщинам проведение деструктивной терапии.

Деструктивному лечению (лазерная эксцизия) подверглись 12 (12%) пациенток 1-ой группы и 1 (1,4%) из 2-й. В послеоперационном пе-

риод проводилась системная противовирусная терапия отечественным препаратом широкого спектра действия 0,004% раствор Панавира по 5,0 мл с перерывом 24-72 часа всего 5 инъекций и местным назначением вагинальных свечей «Генферон» 500 ЕД, ежедневно на 10 дней. Повторный осмотр и определение вирусной нагрузки у пациенток, подвергнутых деструктивному лечению, проводились через 6 недель. При проведении расширенной кольпоскопии, отмечено полное или частичное исчезновение цилиндрического эпителия. Повторное определение вирусной нагрузки проводилось через 1 месяц после окончания лечения. Нами констатировано, что в группе пациенток, после комплексной терапии отмечено достоверное снижение вирусной нагрузки в среднем с $398,2 \pm$ относительных единиц до $176,2 \pm$ относительных единиц ($p < 0,05$), а исчезновение качественных проб на онкопротеин E7 имело место у 10 (76,9%) пациенток.

Выводы

1. Пациентки с эктопией шейки матки, инфицированной вирусом папилломы человека, имеют те же факторы риска развития онкологического процесса, что и пациентки с цервикальной интраэпителиальной неоплазией.
2. Эктопию шейки матки чаще инфицируют вирусы папилломы человека высокого онкологического риска, с преобладанием 18 типа.
3. Основным маркером предракового процесса цилиндрического эпителия (аденокарциномы) у пациенток с эктопией шейки матки является наличие ВПЧ с высокими цифрами вирусной нагрузки и экспрессией онкопротеина E7 в цервикальных пробах.
4. Проведению деструктивного лечения подлежат пациентки с эктопией шейки матки, инфицированной вирусом папилломы человека высокого канцерогенного риска с высокими цифрами вирусной нагрузки и наличием онкопротеина E7 - маркера интегрированной формы ВПЧ.

Список литературы:

1. Заболевания шейки матки, влагалища и вульвы (клинические лекции) / Под ред. проф. В.Н. Прилепской. – М.: 2-е изд.- М.: МЕДпресс, 2003. – 432 с.
2. Иванян А.Н., Мелехова Н.Ю., Шкредова И.Н., Калоева З.В. Оптимизация комплексной терапии патологии шейки матки, обусловленной вирусом папилломы человека // Гинекология. – 2003. – том 5. - №5. – с.28 – 29.
3. Куевда Д.А., Шипулина О.Ю., Минкина Г.Н. и др. Количественный подход в диагностике генитальной папилломавирусной инфекции // Сборник трудов 6-ой Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика – 2007» - Москва, 2007. – Том III - стр. 120-123.
4. Куевда Д.А. ВПЧ-тесты. Рекомендации, требования, возможности //Материалы VIII научно-практического семинара в помощь практикующим врачам: ” Новые алгоритмы диагностики заболеваний урогенитального тракта на основе последних разработок молекулярно-биологических методов: ПЦР в количественном формате, формате мультипрайм и технологии NASBA”. – М., 2009 г.
5. Мелехова Н.Ю. Папилломавирусные поражения шейки матки у пациенток различного возраста: Дисс...д-ра м. н.-М.-2005.-297 с.
6. Минкина Г.Н., Манухин И.Б., Франк Г.А. Предрак шейки матки. – М.: Аэрограф-медиа, 2001.- 112 с.
7. Роговская С.И. Папилломавирусная инфекция нижних отделов гениталий (клиника, диагностика и лечение) // Дисс. До-ра мед.наук. – М., - 2003. – 273 с.
8. Фролова И.И. Клинико–морфологические исследования дискератоза и неопластических изменений эктоцервикса при сопутствующей гинекологической патологии.// Автореф... дисс. к.м.н. М., - 2002.
9. Шипулин Г.А., Шипулина О.Ю. Разработка и апробация ПЦР-тестов для проведения скрининговых исследований на наличие папилломавирусной инфекции и предраковых заболеваний шейки матки г. Москвы, ФГУН «Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, 15 марта 2006.
10. Arbyn M, Dillner J, Schenk U et al. Chapter 3: Methods for screening and diagnosis. In: European Guidelines for Quality Assurance in Cervical Cancer Screening. - 2008. – P.69-152.
11. Barnard P. et al. The human papillomavirus E 7 oncoprotein abrogates signaling mediated by interferon-alfa // Virology. - 1999. – Vol. 259. - №2. – P. 305-313.
12. Berkhout R. J. M., Bouwes Bavinck J. N., ter Schegget J. Persistence of Human Papillomavirus DNA in Benign and (Pre)malignant Skin Lesions from Renal Transplant Recipients. J. Clin. Microbiol. 38: 2087-2096, 2000.
13. Bosch F. X., Lorincz A., Munoz N., Meijer C. J. L. M., Shah K. V. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. J Clin Pathol 55: P.244-265, 2002.
14. Cubie H. A., Seagar A. L., Beattie G. J., Monaghan S., Williams. A longitudinal study of HPV detection and cervical pathology in HIV infected women. Sex Transm Infect 2000; 76: P.257-261.
15. Cuschieri K., Whitley M., Cubie H. Human papillomavirus type specific DNA and RNA persistence-implications for cervical disease progression and monitoring // J Med Virol. 2004 May; 73(1):65-70.
16. Denton KJ (2007). Liquid based cytology for cervical screening. In James Underwood. Massimo Pignatelli, eds. Recent advances in histopathology, 22pp. Royal Society of Medicine Press, London.
17. Gross G.E. & Barrasso R. Humman Papilloma Virus Infection. A Clinical Atlas.1997. Howley PM, Lowy DR(2007). Papilloma viruses. In DM Knipe and PM Howley, eds. Fields virology. 2nd edition, 2299-354.
18. Kraus I., Molden T., Holm R. et al. Presence of E6 and E7 mRNA from human papillomavirus types 16, 18, 31, 33, and 45 in the majority of cervical carcinomas // J Clin Microbiol. 2006 Apr;44(4):1310-1307.
19. Kyrgiou M, Koliopoulos G, Martin-Hirsch P, Arbyn M,Preddiville W, Paraskevaidis E(2006). Obstetric outcomes after conservative treatment for intraepithelial or early invasive cervical lesions: systematic review and meta-analysis. Lancet, 367:489-926.