

Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования
«Волгоградский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

УДК 618.146-002.446

БОРОВИКОВ ИГОРЬ ОЛЕГОВИЧ

**ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫЙ ПОДХОД К ПРОФИЛАКТИКЕ И
ЛЕЧЕНИЮ АССОЦИИРОВАННЫХ С ВИРУСОМ ПАПИЛЛОМЫ
ЧЕЛОВЕКА ЦЕРВИКАЛЬНЫХ ИНТРАЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ
НЕОПЛАЗИЙ**

14.01.01 - акушерство и гинекология

Диссертация
на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Научный консультант:
д.м.н., профессор Куценко И.И.

Волгоград – 2017

ОГЛАВЛЕНИЕ

	Стр.
Введение	6
Глава 1. Обзор литературы (современное состояние проблемы заболеваний, ассоциированных с вирусом папилломы человека)	20
1.1 Биологические особенности семейства <i>Papovaviridae</i>	20
1.2 Современные представления о патогенезе папилломавирусной инфекции гениталий	21
1.3 Цервикальный скрининг	34
1.4 Основные методы терапии папилломавирусной инфекции гениталий у женщин	42
Глава 2. Материалы и методы исследования	53
Дизайн исследования	53
2.1 Клинические методы исследования	58
2.2 Диагностика папилломавирусной инфекции	60
2.3 Микробиологические методы исследования	67
2.4 Исследование состояния системных и местных параметров иммунной системы	76
2.5 Исследование окислительных процессов в шейке матки	79
2.6 Биохимический состав вагинальной жидкости	79
2.7 Методы терапии, проводимой пациенткам с латентными формами ПВИ и больным ВПЧ-ассоциированными CIN I-II	81
2.8 Статистическая обработка материала	85
Глава 3. Собственные исследования	87
Природно-климатические, демографические и экологические особенности Краснодарского края	87
3.1 Эпидемиологический анализ распространенности ПВИ и заболеваемости патологией шейки матки, ассоциированной с ВПЧ у жительниц Краснодарского края	90

3.1.1	Территориальное картографирование латентных форм ПВИ и заболеваемости цервикальными неоплазиями в Краснодарском крае	101
3.1.2	Микробиологическая характеристика пациенток с латентной формой ПВИ и больных ВПЧ-ассоциированной CIN в Краснодарском крае	108
3.1.3	Прогноз уровня заболеваемости ВПЧ-ассоциированными CIN в Краснодарском крае	112
3.2	Первичная профилактика рака шейки матки в Краснодарском крае (ВПЧ-вакцинация)	119
3.3	Изучаемые группы и предлагаемая терапия	122
3.3.1	Социально-анамнестическая характеристика пациенток с латентными формами ПВИ и больных ВПЧ-ассоциированной CIN	122
3.3.2	Клиническая и цитоморфологическая характеристика пациенток с латентными формами ПВИ и больных ВПЧ-ассоциированной CIN	124
3.3.3	Вирусологический анализ латентных форм ПВИ и больных ВПЧ-ассоциированной CIN	133
3.3.4	Определение онкобелка E7, экспрессии p16ink4D и Ki-67, соотношения метаболитов 2-гидроксиэстрогена и 16-α-гидроксиэстрогена (2-OHE1/16α-OHE1) у пациенток с латентными формами ПВИ и больных ВПЧ-ассоциированной CIN	136
3.3.5	Микробиологический анализ латентных форм ПВИ и больных ВПЧ-ассоциированной CIN	136
3.3.6	Биохимический анализ латентных форм ПВИ и больных ВПЧ-ассоциированной CIN	151
3.3.7	Иммунный статус при латентных формах ПВИ и у больных ВПЧ-ассоциированной CIN	156

3.3.8	Окислительные процессы в шейке матки при латентных формах ПВИ и у больных ВПЧ-ассоциированной цервикальной неоплазией	168
3.3.9	Расчет прогностических критериев заболеваемости ВПЧ-ассоциированными CIN	170
3.4	Обоснование предлагаемой терапии латентных форм папилломавирусной инфекции и ВПЧ-ассоциированных CIN I-II	173
3.5	Сравнительная эффективность терапии латентных форм ПВИ и больных ВПЧ-ассоциированной CIN I-II	177
3.5.1	Сравнительная эффективность профилактической терапии пациенток с латентными формами ПВИ	180
3.5.2	Сравнительная эффективность терапии пациенток с ВПЧ-ассоциированными CIN I-II (цитокольпоскопия)	183
3.5.3	Сравнительная эффективность терапии пациенток с ВПЧ-ассоциированными CIN I-II (ПЦР ВПЧ, вирусная нагрузка)	194
3.5.4	Сравнительная эффективность терапии пациенток с ВПЧ-ассоциированными CIN I-II (онкобелок E7, p16INK4A)	201
3.5.5	Изменения микробиоценоза на фоне терапии у пациенток с ВПЧ-ассоциированными CIN I-II	206
3.5.6	Сравнительная клиническая эффективность терапии пациенток с ВПЧ-ассоциированными CIN I-II	211
Глава 4. Обсуждение полученных результатов		219
Выводы		245
Практические рекомендации		248
Указатель литературы		251
Приложения		286

Список сокращений

1. АПК – антигенпрезентирующие клетки
2. ВПЧ ВКР – вирус папилломы человека высокого канцерогенного риска
3. ГК (GLA) – глицирризиновая кислота
4. ЗППП – заболевания, передающиеся половым путем
5. ИФ - интерферон
6. ИФА – иммуноферментный анализ
7. ЛК (LTA) – липотейхоевая кислота
8. ПВИ – папилломавирусная инфекция
9. ПЦР – полимеразная цепная реакция
- 10.РШМ – рак шейки матки
- 11.ASC – American Society of Cancer
- 12.ASCUS – Atypical squamous cells of undetermined
- 13.CDC – Center of Disease Control
- 14.CIN – Cervical Intraepithelial Neoplasia CIS – carcinoma in situ
- 15.E7, E6, E5 – ранние онкобелки
- 16.EUROGIN – European Organization of Genital Infections & Neoplasia
- 17.HSIL – High-Grade Squamous Intraepithelial Lesions
- 18.IARC – International Agency of Cancer Research
- 19.IFN γ - γ - интерферон
- 20.Ig – иммуноглобулин
- 21.IL – интерлейкин
- 22.IRF – interferon regulatory factor
- 23.LSIL - Low-Grade Squamous Intraepithelial Disease
- 24.MTHFR - метилентетрагидрофолатредуктаза
- 25.Пар-мазки – мазки по Папаниколау
- 26.TNF α - фактор некроза опухолей
- 27.P53 – ген-супрессор клеточной трансформации

Введение

Актуальность исследования. В настоящее время заболевания, вызванные вирусом папилломы человека (ВПЧ), в мире являются одними из самых распространенных болезней передающихся половым путем [В.Н. Прилепская, 2012; Gross G., Borasso R., 2013]. Проблема менеджмента цервикальных интраэпителиальных неоплазий (ЦИН, CIN) привлекает внимание врачей различных специальностей, что объясняется высокой контагиозностью и тенденцией к росту частоты данного заболевания (инфицированность ВПЧ в мире за последнее десятилетие увеличилась более чем в 10 раз), способностью некоторых типов ВПЧ инициировать злокачественные процессы [В.И. Козлова, А.Ф. Пухнер, 2011; Bigrigg M. et al., 2014], а также разработанными в последнее десятилетие мерами первичной профилактики, которые, по заключению ВОЗ, должны полностью предотвратить появление цервикальных интраэпителиальных неоплазий [ВОЗ, 2014; Л.И. Мальцева и др., 2012; В.Н. Прилепская, 2012; Л.М. Исакова, 2014; Bigrigg M. et al., 2015].

Поражение шейки матки в виде цервикальной интраэпителиальной неоплазии является наиболее опасным проявлением папилломавирусной инфекции (ПВИ), так как доказано, что именно они являются предраковыми заболеваниями (малигнизация составляет до 11%) [А.С. Анкирская и др., 2011; Wright T. et al., 2014]. Этапами цервикального канцерогенеза ЦИН являются: от ЦИН I (легкая дисплазия) до ЦИН III (тяжелая дисплазия) и преинвазивного рака (carcinoma in situ, CIS). Практически на каждом этапе неопластического процесса возможна персистенция, прогрессия или регрессия [Tranbaloc P., 2008]. Молекулярно-генетические механизмы персистенции, регрессии или прогрессии этих процессов, вплоть до инвазивного рака не до конца исследованы и не ясны, так как исследования немногочисленны, разрозненны, проводятся без учета комплексного подхода к оценке патогенетических факторов, степени тяжести процесса. При этом, несмотря на широкий спектр методов детекции ВПЧ-

ассоциированной патологии для установления типа вируса, степени его поражения шейки матки, ведение таких пациенток проводится без учета молекулярно-биологических факторов персистенции, пролиферации и апоптоза ВПЧ.

Манифестные формы ПВИ являются заболеваниями компрометированного организма и возникают, как правило, в условиях патогенных воздействий, к которым относятся социальные факторы, изменения иммунного статуса, наличие инфекций, передающихся половым путем, а также дисбиотических состояний. Это приводит к формированию различного происхождения вторичных системных или чаще местных дисфункций иммунной системы, индуцирующих изменения цитокинового спектра, клеточного состава, функциональной активности иммунных клеток, а также нарушению оксидативных процессов в цервикальной зоне [С.И. Роговская, 2013; А.С. Анкирская и др., 2012; Л.П. Василевская и др., 2010].

В последние годы значительное внимание уделяется изучению местных, локальных подсистем иммунитета, в частности иммунитету слизистых [В.В. Дубенский, 2009; С.И. Роговская, 2011; И.Б. Манухин и др., 2011]. Но все же, к настоящему времени остается выраженный дефицит и разноречивость информации о функционировании и регуляции местной иммунной системы слизистых цервикальной зоны в условиях нормы и патологии, ее участия и роли в механизмах резистентности, длительной бессимптомной персистенции вируса папилломы человека, активации инфекционного процесса и канцерогенеза, саногенеза, повреждения и репарации тканей.

На современном этапе считается, что полной элиминации вируса из организма достичь невозможно, т.к. специфические противовирусные препараты, действующие на ВПЧ, пока отсутствуют. Как следствие, задачей терапии является лечение клинических и субклинических форм ПВИ и, по возможности, устранение условий, приводящих к манифестации инфекции и

развитию злокачественного процесса. Сегодня в арсенале практикующих врачей имеется множество методов лечения патологии шейки матки в виде цервикальной интраэпителиальной неоплазии, однако, в России не существует стандартов по ведению больных CIN. Недостаточно изучена эффективность и целесообразность применения иммуномодуляторов, неясны критерии выбора между консервативным ведением или деструкцией [Smrkolj S., 2012; Takeda N. et al., 2012; Costa S., 2012 Wright J. et al., 2010; Rogers L., Luesley D., 2009]. Эффективность терапии варьирует от 30 до 80%, но, ни один из методов не является адекватным, так как частота рецидивов даже при самых современных способах лечения составляет 15-20%, а также не видно тенденции к снижению количества рака шейки матки. Это связано с отсутствием единого дифференцированного алгоритма ведения больных CIN в зависимости от степени тяжести поражения, типа ВПЧ, наличия молекулярно-генетических, морфологических, иммуногистохимических маркеров процесса, а также ограниченностью представлений о реакции местных иммунных и оксидативных механизмов слизистых цервикальной зоны на эти воздействия.

Степень разработанности темы

Проблеме папилломавирусной инфекции и связанной с ней заболеваемостью посвящено большое количество публикаций и исследований, в которых рассматриваются этиологические, клинические, морфологические аспекты этой нозологии. Отдельные аспекты проблемы достаточно изучены и опубликованы [Т.Н. Бебнева, 2001-2012; Т.С. Качалина, 2006-2012; В.И. Киселев, 2000-2011; В.П. Козаченко, 2006; В.И. Краснопольский, 2010; Д.А. Куевда, 2006-2007; Е.В. Липова, 2010; Г.Н. Минкина, 2001-2008; Е.Л. Муйжнек, 2011; Н.М. Подзолкова, 2002-2009; Н.Ю. Полонская, 2008-2009; В.Н. Прилепская, 2000-2014; С.И. Роговская, 2002-2016; А.М. Савичева, 2006-2008; И.П. Шабалова, 2009-2012; Н.М. Шахова, 2006; О.Ю. Шипулина, 2007-2010; Bosch X., 2002-2012; Hausen H., 2000-2009; Munoz N., 2004-2012; Sherman M.E., 2002; Szarewski A., 2012 и др.]. В

частности, достаточно полно изучена эпидемиология рака шейки матки по отдельным регионам Российской Федерации [Е.Г. Новикова, В.И. Чиссов и соавт., 2000; Т.В. Харитоновна, 2004; Л.А. Ашрафян, В.И. Киселев, 2009], имеются работы и по заболеваемости раком шейки матки в Краснодарском крае [Ю.Е. Дудик, 2003-2005; М.Г. Леонов, 2010-2012]. Но при этом практически нет исследований, посвященных эпидемиологии предраковой ВПЧ-ассоциированной патологии шейки матки, и тем более ее латентным формам. В то же время, изучение данной проблемы способно не только прогнозировать распространение цервикальных неоплазий в отдельном регионе, но и в большинстве случаев предотвратить переход вирусоносительства в истинную патологию с последующим образованием онкопатологии.

Другой стороной проблемы до настоящего времени являются дискуссионные вопросы по диагностике и лечению заболеваний, ассоциированных с папилломавирусной инфекцией. В частности, ошибки в дифференциальной диагностике эпителиальных поражений шейки матки (субъективность и низкая достоверность разделения CIN по степеням поражения при цитоморфологических исследованиях – вечный спор врача акушера-гинеколога и морфолога), объем исследования (от минимизации – только вирусологическое исследование [Bottley G. et al., 2008; Mao C. et al., 2007;], до включения в скрининг кроме ВПЧ-типирования, кольпоскопии и онкоцитологии до 3-4 маркеров пролиферации и апоптоза [Л.И. Короленкова, 2010; Г.А. Раскин, 2009]). Некоторые вопросы профилактики и лечения ВПЧ-ассоциированной патологии также не имеют окончательного ответа в связи с противоречивыми результатами исследований и отсутствием единого патогенетического подхода к этим проблемам. До сих пор дискуссионным вопросом остается влияние изменений вагинальной микробиоты, иммунного статуса на активность вируса папилломы человека [С.И. Роговская, 2015; В.Е. Радзинский, 2015; А.С. Анкирская, 2010; А.М. Савичева, 2008, Ю.В. Никогда, 2014]. Большинство этих исследований дают

оценку микробиоты и иммунного статуса без учета стадии процесса и, тем более нет исследований влагалищного микробиома при латентных формах папилломавирусной инфекции, и факторов, определяющих переход бессимптомных вирусоносителей в истинную неоплазию [Л.Д. Андросова, Н.В. Зароченцева, 2012; Г.Н. Минкина, 2010; Russomano F., 2004; Seresini S., 2007]. Опубликованы лишь единичные исследования, посвященные анализу одновременного выявления биомаркеров E7, p16ink4D и Ki67 при раке шейки матки [С.Б. Городецкая, 2012; Н.П. Евстигнеева, 2007; С.И. Роговская, 2011; Schledermann D. et al., 2008]. По поводу терапии ВПЧ-обусловленных заболеваний также до сих пор не существует единого мнения: некоторые авторы не считают латентные формы папилломавирусной инфекции заболеванием и, соответственно, рекомендуют пассивную тактику вплоть до отсутствия динамического наблюдения [Herdman M. et al., 2006], другие призывают к активному лечению вирусоносительства вплоть до применения иммуномодуляторов и даже профилактических деструктивных методов [Munoz N., 2012]. Таким образом, определение оптимальных клинико-лабораторных диагностических критериев ВПЧ-ассоциированного процесса в шейке матки, разработка прогностических коэффициентов развития данной патологии, разработка патогенетически обоснованной терапии откроет новые возможности оптимизации введения пациенток с латентными формами папилломавирусной инфекции и цервикальными интраэпителиальными неоплазиями, что в целом позволит улучшить исходы данной патологии.

Исходя из вышеизложенного, **целью настоящей работы явилось:** снижение возможности реализации неопластических процессов при латентных формах папилломавирусной инфекции и повышение эффективности терапии ВПЧ-ассоциированных цервикальных интраэпителиальных неоплазий различной степени тяжести путем разработки дифференцированного алгоритма менеджмента данной патологии.

В соответствии с этим были поставлены следующие **задачи**:

1. Изучить эпидемиологию инфицированности вирусом папилломы человека и ВПЧ-ассоциированной цервикальной интраэпителиальной неоплазии пациенток, проживающих на территории Краснодарского края в зависимости от места проживания, возраста, социального статуса и степени поражения.
2. Оценить среднее время реализации латентных форм папилломавирусной инфекции в цервикальную неоплазию у жительниц Краснодарского края.
3. На основании анализа основных факторов риска по развитию цервикальной интраэпителиальной неоплазии, разработать коэффициенты прогнозирования перехода латентных форм ПВИ в ЦИН.
4. Провести вирусологическое обследование пациенток исследуемых групп (латентные формы ПВИ и ЦИН) с типированием ВПЧ и определением вирусной нагрузки.
5. Оценить диагностическое и прогностическое значение иммуноцитобиохимических и молекулярно-биологических факторов персистенции, пролиферации, апоптоза в развитии цервикальной неоплазии и выявить наиболее информативные методы диагностики заболеваний, ассоциированных с папилломавирусной инфекцией.
6. Определить роль нарушений состава микробиоты и биохимии влагалища в прогрессировании неопластических процессов, вызванных папилломавирусной инфекцией.
7. Оценить состояние оксидативной и антиоксидантной системы, местного и системного иммунитета при латентных формах папилломавирусной инфекции и цервикальных интраэпителиальных неоплазиях.
8. Выявить особенности патогенеза папилломавирусной инфекции, обуславливающие механизмы резистентности, персистенции,

прогрессирования заболевания, тканевых повреждений и саногенеза в зависимости от степени цервикального внутриэпителиального поражения.

9. Разработать методы индивидуализированной терапии цервикальной интраэпителиальной неоплазии различной степени тяжести и оценить их эффективность.
10. Разработать дифференцированный алгоритм менеджмента пациенток с латентными формами ПВИ и цервикальной интраэпителиальной неоплазией различной степени поражения, с целью определения оптимальной диагностической и лечебной тактики.

Научная новизна. Впервые:

- проанализирована эпидемиология инфицированности вирусом папилломы человека и цервикальных интраэпителиальных неоплазий различной степени тяжести у женщин, проживающих на территории Краснодарского края с картографическим анализом пространственного распределения данной патологии по административным территориям, оценкой пятилетних динамических изменений и составлением математического прогноза дальнейшего их распространения; у женщин, инфицированных ВПЧ, определены и систематизированы основные факторы, способствующие реализации инфекции в цервикальную неоплазию, что позволило создать диагностические коэффициенты (ДК) с прогнозом (благоприятный/неблагоприятный) перехода бессимптомного вирусоносительства в CIN;
- дифференцировано, в зависимости от степени поражения (латентные формы ПВИ, CIN I-II), выявлены особенности гомеостаза, включающего системный и локальный иммунитет слизистой цервикальной зоны, оксидативный, цитобиохимический статус цервикальной зоны, а также особенности молекулярно-биологических маркеров;

- определено значение изменений микробиоты слизистой цервикагинальной зоны в патогенезе развития заболеваний, ассоциированных с вирусом папилломы человека и выработаны методы ее коррекции;
- систематизация проведенных исследований расширила представление о патогенезе папилломавирусной инфекции у женщин, механизмах резистентности, персистенции возбудителя, прогрессирования заболевания, тканевых повреждений и саногенеза;
- на основании комплексного клинического, патоцитогистологического, микробиологического, иммунологического, цитобиохимического, молекулярно-биологического обследования женщин с латентными формами папилломавирусной инфекции и цервикальной интраэпителиальной неоплазией, разработаны оптимальные критерии диагностики, включающие вирусологическое исследование (ПЦР ВКР), жидкостную цитологию, кольпоскопию, коэкспрессию маркеров неоплазии (онкопротеин E7, p16ink4a и Ki-67);
- разработаны и внедрены в практику методы профилактической терапии латентных форм папилломавирусной инфекции с местным применением препаратов, содержащих эхинацею, глицирризиновую и липотейхоевую кислоты;
- разработаны и внедрены в практику методы лечения цервикальной интраэпителиальной неоплазии легкой и средней степени тяжести с применением цитокинотерапии (рекомбинантный интерлейкин-2);
- на основании выявленных диагностических критериев, а также проведенного сравнительного клинко-микробиологического изучения эффективности лечения латентных форм папилломавирусной инфекции и CIN различных степеней поражения, создан алгоритм менеджмента данной патологии, который позволил повысить эффективность ее диагностики и терапии.

Научно-практическая значимость работы. Полученные данные позволяют существенно расширить и углубить представления о роли нарушений иммунного, оксидативного статуса, состояния микробиоты цервикальной зоны на фоне наличия молекулярно-генетических маркеров адгезии, пролиферации и экспрессии ВПЧ в патогенезе развития неопластических процессов в шейке матки, которая позволила обосновать оптимальные подходы ведения пациенток с ВПЧ-ассоциированной патологией шейки матки. Так, в частности, удалось выявить следующие позиции:

1. Для оценки математического прогноза развития CIN разработана диагностическая таблица, позволяющая определить риск перехода латентных форм ПВИ в цервикальную неоплазию. Расчет диагностических коэффициентов (ДК) выявил, что ДК от -26 до +18 бит (благоприятный исход) наблюдался у 12,2% пациенток, ДК от +19 до +26 бит (95% риска перехода в CIN) - в 74,4% случаев и ДК свыше 26 бит (99% риска перехода в CIN) – в 13,4%. Таким образом, суммарно риск реализации латентных форм ПВИ в CIN более 95% выявился у 87,8% обследованных пациенток.
2. Внедрение алгоритмов менеджмента пациенток с латентными формами ПВИ позволило повысить эффективность профилактической терапии в 1,8 раз (по критерию риска реализации неопластических процессов в CIN за пятилетний срок мониторинга) и в 1,8 раз (по критериям снижения клинически значимой вирусной нагрузки ВПЧ ВКР).
3. Внедрение алгоритмов менеджмента больных цервикальной интраэпителиальной неоплазией легкой и средней степени позволило повысить эффективность лечения по критериям нормализации кольпоскопической картины в течение годичного мониторинга на 45,1% (CIN I) и 41,6% (CIN II), по критериям снижения клинически значимой вирусной нагрузки - в 3,6 (CIN I) и 8,3 раза (CIN II), снизить частоту рецидивов заболевания на 23,1% (CIN I-

II), в 82,9% случаев избежать применения деструктивных методов воздействия на шейку матки (для CIN I).

Основные положения, выносимые на защиту

1. Картографирование стандартизованных показателей заболеваемости населения Краснодарского края по каждому городу и району позволило получить 5 групп районов, достоверно отличающихся по уровню заболеваемости цервикальными неоплазиями: 1 группа (благоприятная) - 4 района с низким уровнем заболеваемости (до 50 на 1000 женского населения); 2 группа (удовлетворительная) - 8 районов с уровнем заболеваемости ниже среднего краевого показателя (от 50 до 80); 3 группа (напряженная) - 14 районов со средним уровнем заболеваемости (от 80 до 100); 4 группа (острая) - 12 районов с уровнем заболеваемости выше среднего краевого показателя (от 100 до 130) и 5 группа (критическая) - 9 районов с высоким показателем заболеваемости (от 130 и выше). В целом из 47 районов края в зоны риска вошел 21 район, то есть 44,7% территории Краснодарского края.
2. Основными инфекционными агентами в Краснодарском крае, как при латентном ВПЧ-носительстве, так и при реализации инфекции в цервикальную неоплазию, являются высокоонкогенные типы вируса папилломы человека – 16 (25,1 и 39,3% соответственно), 18 (19,7 и 22,4%) и 51 типы (24,6 и 21,1%). Самостоятельно и в ассоциациях они встречались у 69,4% вирусоносителей и у 82,8% больных CIN.
3. По результатам исследования вагинальной микробиоты CIN I-II у значительного количества пациенток Краснодарского края манифестируется на фоне сопутствующей урогенитальной инфекции, чаще в виде анаэробных дисбиозов – 76,4% (при латентных формах ПВИ преобладают воспалительные типы микробиоценозов – в 21,4% обусловленный одновременным присутствием *Ureaplasma spp.* и *Candida spp.*).

4. В случае ВПЧ-ассоциированного поражения шейки матки имеет место угнетение макрофагального звена локального иммунитета, способствующего Th-1 девиации с уменьшением количества провоспалительных цитокинов, интенсификации образования реактивных форм азота и кислорода, которые становятся причиной изменений молекулярных, субклеточных и клеточных структур, что послужило основанием для включения в комплексную терапию цервикальной неоплазии топического применения препарата, содержащего рекомбинантный интерлейкин-2.
5. Расчет диагностического коэффициента пациенткам с латентными формами ПВИ выявил, что ДК от -26 до +18 бит (благоприятный исход) наблюдался у 12,2% обследованных, ДК от +19 до +26 бит (95% риска перехода в CIN) наблюдался в 74,4% случаев и ДК свыше 26 бит (99% риска перехода в CIN) – в 13,4%. Таким образом, суммарно риск реализации латентных форм ПВИ в CIN более 95% выявился у 87,8% обследованных.
6. Разработанный алгоритм оптимизации менеджмента пациенток с латентными формами папилломавирусной инфекции и цервикальной интраэпителиальной неоплазией, включающий цервикальный и цитологический скрининг, формирование групп риска по развитию ВПЧ-ассоциированной цервикальной патологии и утяжелению неопластических процессов в шейке матки, а также индивидуализированная терапия, позволяют повысить выявляемость предопухолевых заболеваний шейки матки, снижает риск развития CIN (в 1,8 раз), увеличивает эффективность лечения CIN I и CIN II (в 1,8 и 2,6 раза соответственно).

Соответствие диссертации Паспорту научной специальности

Диссертационное исследование соответствует п.3 «Исследование эпидемиологии, этиологии, патогенеза гинекологических заболеваний», п.4 «Разработка и усовершенствование методов диагностики и профилактики

осложненного течения беременности и родов, гинекологических заболеваний. Оптимизация диспансеризации беременных и гинекологических больных» и п.5 «Экспериментальная и клиническая разработка методов оздоровления женщины в различные периоды жизни, вне и во время беременности и внедрение их в клиническую практику» паспорта специальности 14.01.01 – «акушерство и гинекология».

Личное участие соискателя в получении результатов работы

Автором были выполнены анализ амбулаторных карт пациенток с латентными формами ПВИ и цервикальными неоплазиями, отбор пациенток для исследования, составление анкет, индивидуальных карт (100%). Результаты клинико-лабораторных показателей по оценке заболеваний шейки матки проанализированы в соответствии с критериями, разработанными соискателем для формирования базы данных и статистической обработки материалов (100%). Автором лично выполнены расширенная кольпоскопия, забор материала для цитологического, гистологического и цитобиохимического исследования, разработаны прогностические шкалы и алгоритм менеджмента ВПЧ-ассоциированной патологии шейки матки (90%). Были подготовлены в качестве первого автора доклады, статьи (80%).

Внедрение результатов работы

Результаты исследования внедрены в практическую деятельность женских консультаций и гинекологических отделений Перинатального центра ГБУЗ ККБ №2 (ул. Красных Партизан, д. 6, к. 3), Краевого перинатального центра ГБУЗ ДККБ (Пл. Победы, 1), МБУЗ Роддом г. Краснодара (ул. Комсомольская, д. 44), что подтверждается актами внедрения. Материалы диссертации используются в учебном процессе у студентов, клинических интернов, ординаторов и аспирантов ФГБОУ ВО «Кубанский Государственный Медицинский Университет» Минздрава России (Краснодар, ул. Седина, д. 4).

Апробация работы. Основные положения диссертации доложены и обсуждены на: 1) клинических конференциях кафедры акушерства, гинекологии и перинатологии ФГБОУ ВО «Кубанский Государственный Медицинский Университет» Минздрава России (КубГМУ); 2) клинических конференциях Краснодарского краевого перинатального центра; 3) региональных и всероссийских конференциях (Кубанская региональная медицинская конференция «Перинатальные центры: вчера, сегодня, завтра» (Геленджик, 2014 г.), Региональная научно-практическая конференция «Репродуктивное здоровье и как его сохранить» (Краснодар, 2014 г.), Региональная научно-практическая конференция «Заболевания шейки матки. Вульвовагинальная патология» (Краснодар, 2015 г.), Региональная научно-практическая конференция «Актуальные вопросы сохранения репродуктивного здоровья» (Краснодар, 2015 г.), Краевая конференция «Амбулаторная акушерско-гинекологическая помощь в сохранении репродуктивного здоровья» (Краснодар, 2016 г.), Научно-практическая конференция «Современные медицинские технологии в диагностике и лечении гинекологических заболеваний» (Краснодар, 2016 г.), Межрегиональная научно-практическая конференция с международным участием «Актуальные вопросы сохранения репродуктивного здоровья женского населения» (Краснодар, 2016 г.), III Конференция с международным участием «Инфекции и инфекционный контроль в акушерстве и гинекологии» (Москва, 2014 г.), Общероссийский научно-практический семинар «Репродуктивный потенциал России: донские сезоны» (Ростов-на-Дону, 2015 г.), Общероссийский семинар «Репродуктивный потенциал России: версии и контраверсии. Московские чтения» (Москва, 2016 г.), I Национальный конгресс «Онкология репродуктивных органов: от профилактики и раннего выявления к эффективному лечению» (Москва, 2016 г.), IX Региональный научно-образовательный форум «Мать и Дитя» (Сочи, 2016 г.), IX Общероссийский семинар «Репродуктивный потенциал России: версии и контраверсии» (Сочи, 2016 г.), IV

Междисциплинарный форум с международным участием «Шейка матки и вульвовагинальные болезни» (Москва, 2016 г.), III Общероссийская конференция с международным участием «Перинатальная медицина: от прегравидарной подготовки к здоровому материнству и детству» (С-Пб, 2017 г.)).

Основные положения диссертации обсуждены на заседании кафедры акушерства, гинекологии и перинатологии ФГБОУ ВО «Кубанский Государственный Медицинский Университет» Минздрава России.

Публикации

По материалам диссертации опубликована 83 печатных работы, в том числе 19 из перечня изданий, рекомендованных ВАК РФ (1 из базы SCOPUS), 1 монография.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 287 страницах машинописного текста и содержит введение, обзор литературы, материалы и методы, собственные исследования, обсуждение полученных результатов, выводы, практические рекомендации. Библиографический указатель включает 367 источников, из них 165 отечественных и 202 зарубежных авторов. Работа иллюстрирована 39 таблицами, 107 рисунками и 4 схемами.

Глава 1. Обзор литературы (современное состояние проблемы заболеваний, ассоциированных с вирусом папилломы человека)

1.1. Биологические особенности семейства *Papovaviridae*

Вирус папилломы человека (ВПЧ) содержит ДНК, по форме икосаэдрический, строго эпителиотропный, т.е. поражает только эпителий кожи и слизистых оболочек гениталий и других органов (гортань, ротовая полость, глаза и др.) [И.Б. Манухин, Г.Н. Минкина, М.А. Геворкян, 2011; Klaustermeier O., 2015]. Папилломавирусы обладают ткане- и типоспецифичностью, т.е. каждый тип ВПЧ поражает свою ткань-мишень [В.И. Козлова, А.Ф. Пухнер, 2000; Т.Н. Бебнева, В.Н. Прилепская, 2010; Woodman C., et al., 2011]. Считается, что из всех идентифицированных типов ВПЧ 34 типа ассоциированы с поражением аногенитальной области [De Villiers T., 2004]. По данным 2 масштабных скрининговых исследований Lorincz I. и соавт. в 2002 году установлены наиболее часто встречающиеся типы ПВИ гениталий, которые были распределены в группы низкого и высокого онкогенного риска. Так типы 6, 11, 42, 43, и 44 ВПЧ были отнесены к группе низкого риска опухолевой трансформации инфицированного эпителия, типы – 16, 18, 31, 33, 35, 39, 48, 51, 52, 58 – высокого и среднего риска [Н.И. Кондриков, 1999; В.И. Киселев, 2013; С.И. Роговская, 2015; Smith J. et al., 2013]. По результатам IARC (2004), в 98% случаев рака шейки матки в мире выявляются всего 13 типов ВПЧ. Наиболее онкогенными (67-93% случаев рака шейки матки) являются вирусы типов 16 и 18, ДНК которых выделена из тканей карцином шейки матки в 80-х годах прошлого века [В.Н. Прилепская, Н.И. Кондриков, Т.Н. Бебнева, 2013; В.В. Кузнецов, 2011].

Не исключено, что масштабы распространения и онкогенный потенциал редких типов ВПЧ (59, 61, 62, 70, 73 и др.) до сих пор недооценивались при развитии предраковых и раковых поражений гениталий, из них на долю плоскоклеточных интраэпителиальных поражений низкой степени тяжести приходится 12%, высокой - 8% [И.Б. Манухин и др., 2006; Meyer T., 2003].

1.2. Современные представления о патогенезе папилломавирусной инфекции гениталий

Эпидемиология, механизмы инфицирования и патогенность ПВИ

Наиболее вероятным путем передачи ВПЧ является непосредственный контакт кожных покровов и слизистых оболочек [С.И. Роговская, 2015; В.Н. Прилепская, 2014; И.Б. Манухин, Г.Н. Минкина, 2007; Sanclemente G., Gill D., 2012]. Одним или более типами ВПЧ инфицировано не менее 50% взрослых, живущих активной половой жизнью, причем в большинстве случаев генитальная ВПЧ-инфекция у них является нераспознанной, протекающей субклинически и асимптомно [Rutter J. et al., 2014]. Генитальная ВПЧ-инфекция имеет высокую контагиозность и приобретается во время первых нескольких половых контактов, заражение же при однократном половом контакте происходит в 60% случаев [В.И. Краснопольский, В.Е. Радзинский и др., 2015; Coutlee F. et al., 2007]. В то же время наиболее серьезные поражения она вызывает у женщин: по данным ВОЗ, в мире ежегодно регистрируется 600 тыс. случаев рака шейки матки, и, несмотря на проводимое лечение, 45-50% больных от него умирают [С.И. Роговская, 2015; Evander M., Edlund K., 2015]. Наиболее значимыми факторами риска, инфицирования и прогрессирования ПВИ, являются следующие [С.И. Роговская, 2015; Handiey J., Dinsmore W., 2014]: раннее начало половой жизни с многочисленными половыми партнерами; наличие других инфекций, передающихся половым путем; хронические воспалительные заболевания половых органов; анальный секс; курение; отягощенная наследственность.

Распространенность ВПЧ-ассоциированных заболеваний по данным Минздрава РФ [2014] составляет 26 на 100000 населения. По зарубежным данным она существенно выше и составляет, например, в США, 100 на 100000. Субклинические формы инфекции в США обнаружены у 20 млн. (15% популяции), из которых 75% заражены ВПЧ высокоонкогенного риска [CDC, 2014]. По наиболее распространенным данным, ПВИ гениталий встречается у

44,3% пациенток, обращающихся в гинекологическую клинику по различным причинам [С.И. Роговская, 2013; В.Е. Радзинский, 2013]. Оценка распространенности ВПЧ и его отдельных генотипов в различных популяциях и регионах России, демонстрирует значительную разнородность исследований. В Москве и Московской области скрининговое исследование распространенности ВПЧ (n=8533; с 1998 по 2003 гг.) выявила, что у 14% населения обнаружена ВПЧ-инфекция [И.П. Шабалова, К.Т. Касоян, 2014]. В Краснодарском крае ВПЧ-инфицирование женского населения оценено в 17% [Ю.В. Никогда, 2013]

Данные о частоте ВПЧ-носительства в различных странах широко варьируют. Так, в Испании инфицированы 5% женщин, в Австралии – 68% [Bosh F., 2013], в США ежегодно инфицируется около 5,5 млн. людей, а 80% сексуально активных женщин к 50 годам заражены ВПЧ. По отечественным данным, ВПЧ выявлен у 30,3% здорового населения Европейского региона страны [Ю.Н. Александрова, 2012]. Цитологическая выявляемость ПВИ в ряде исследований при осмотре мазков, взятых с шейки матки, отличается очень значительным разбросом данных. Трактовка цитологических мазков в разных странах неоднозначна, поэтому прямая связь между ВПЧ-носительством и наличием цитологических признаков ПВИ не всегда прослеживается. Так, среди женщин с нормальными цитологическими результатами ДНК ВПЧ был обнаружен у 14-19% при первичном обследовании и у 67% - при повторном [Schneider J., 2012].

В настоящее время ВПЧ, бесспорно, считается иницирующим фактором в генезе рака шейки матки, заболеваемость которым занимает одно из первых мест в мире [В.П. Козаченко, 2011]. Показано, что у женщин с троекратной выявляемостью ВПЧ высокоонкогенного типа риск развития рака шейки матки повышен в 14 раз [Moscicki A. et al., 2008]. По данным Минздрава РФ [2014], частота рака шейки матки составляет 15,2 на 100000 женского населения.

Инфицированность ВПЧ превалирует среди женщин 15-25 лет, уменьшаясь с возрастом. Распространенность ВПЧ-инфекции, по данным некоторых авторов,

варьирует от 36% у женщин моложе 25 лет до 2,8% у женщин 45 лет и старше [Burk R. et al., 2016]. Максимальная заболеваемость генитальной ВПЧ-инфекцией отмечается в возрастной группе от 18 до 28 лет [Koutsky L., 2015]. Вместе с тем отмечено, что у подростков и молодых женщин происходят более быстрое самопроизвольная элиминация от ВПЧ и регрессия имеющейся патологии. Так, при наблюдении группы молодых женщин с ПВИ персистенция ВПЧ через 1 год выявлялась только у 30% женщин, а через 2 года - всего у 9% (при этом клиническая регрессия образований произошла у 80% пациенток) [Evander M., 2015]. Регрессия плоскоклеточных интраэпителиальных поражений шейки матки низкой степени (LSIL) происходит у 90% подростков, в то время как среди взрослых женщин – только у 50-80% [ACS, 2012]. Установлено, что средний срок элиминации ВПЧ у подростков составляет 8 мес. [CDC, 2009]. Наблюдение за женщинами 18-25 лет показало, что прекращение ВПЧ носительства происходит в среднем за 1,5-2 года [Роговская С.И., 2015]. Принимая во внимание динамичность ПВИ у молодых женщин, в большинстве зарубежных практических рекомендаций призывают к более щадящей практике ведения подростков, инфицированных ВПЧ, с предпочтением наблюдения, а не деструктивных методов лечения [Mandelblatt J., 2011]. Это позволяет предположить, что обнаруженная обратно пропорциональная зависимость между распространенностью ВПЧ-инфекции и возрастом может быть обусловлена иммунитетом к ВПЧ-инфекции, формирующимся на протяжении жизни [А.А. Кубанова, В.А. Самсонов, 2015; В.И. Козлова, А.Ф. Пухнер, 2010].

Высокая частота субклинических форм заболевания затрудняет оценку факторов риска. Очевидно, что основные факторы риска генитальной ВПЧ-инфекции связаны с сексуальным поведением, применением оральных контрацептивов и недостаточностью клеточного иммунитета [В.И. Роговская, 2015; Bar-Am A., Niv J. et al., 2015].

Установлено, что 99,7% случаев цервикального рака выявляют ВПЧ

высокого онкогенного риска [Walboomers J. et al., 2009; Sun Y., 2016]. Данные литературы о скорости и частоте перехода CIN в рак шейки матки неоднозначны. После обобщения результатов различных исследований женщин с CIN в зависимости от возраста Американское общество по раку [ACS, 2012] установило, что время перехода CIN III в рак у женщин до 25 лет составляет в среднем 54-60 месяцев, у женщин 26-50 лет – 41-42 месяцев, у женщин после 51 года – 70-80 месяцев [Arends M., 2013]. Для определения факторов, воздействующих на цервикальный канцерогенез, необходимо одновременное проведение биохимических и вирусологических исследований в сочетании с выявлением известных цитопатологических и эпидемиологических факторов риска. Установлена связь клинических признаков цервикальной карциномы с типом вируса папилломы человека. Генитальная инфекция, вызванная ВПЧ-16, является существенным фактором риска развития CIN, а определение ДНК ВПЧ имеет прогностическую ценность при выявлении CIN высокой степени тяжести [Cavuslu S., 2008]. При выявлении ВПЧ-16 персистентная инфекция отличается в 56%, а при выявлении ВПЧ других типов – в 67% случаев [Bosch F., Manos M. et al., 2015; Nakagawa S. et al., 2016].

Вирусная ДНК способна персистировать в клетке в двух формах. В тканях эпителиальных дисплазий шейки матки низкой степени, в частности CIN I, чаще обнаруживаются эписомальные формы ВПЧ. В процессе канцерогенеза вирусная ДНК проникает в геном инфицированной клетки, вызывая в ней пролиферативные процессы, т.е. образуется так называемая интегрированная форма ВПЧ [Kramer M., Coen D., 2015]. Последняя образуется, как правило, при эпителиальных дисплазиях высокой степени и раке шейки матки. Роль обеих форм в патогенезе инфекции продолжает уточняться. Интеграция вирусной ДНК в клеточную может индуцировать несколько важных событий. Во-первых, она часто сопровождается потерей вирусного материала, но с обязательным сохранением генов E6 и E7 [Barnard P., McMillan N., 2009]; во-вторых,

независимо от делеций вирусный геном в интегрированной форме не способен к полной репликации; в-третьих, индуцируется нестабильность клеточного генома [В.А. Молочков, В.И. Киселев, 2004; Kobayashi A., Miaskowski C. et al., 2010]. При интеграции вирусного генома в клеточный сохраняется транскрипция вирусных генов, прежде всего Е6 и Е7, а также активируется транскрипция некоторых клеточных генов [Le Buanec H., D'Anna R. et al., 2009]. Белки Е6 и Е7 могут взаимодействовать с белками-супрессорами опухолевого роста, которые играют ключевую роль в процессах регуляции клеточного деления [Lee J., Russo A., Palvetich N., 2008]. К настоящему времени доказана роль онкопротеинов Е6 и Е7 вируса папилломы в ингибировании функций онкопротеторов р53, охарактеризованы другие свойства вируса, приводящие к индукции пролиферативных процессов [В.И. Киселев, И.В. Рудых, 2013; Werness B., Levine A., 2010; Wang Z., Li L., Li J., Shi W., 2011].

У здоровых женщин в результате нормальной работы механизмов контроля над пролиферацией (в том числе апоптоза) происходят дегенерация и последующее отторжение поврежденных клеток [Т.Е. Белокриницкая, Ю.Н. Пономарева, 2011; А.А. Берлим и др., 2014]. При нарушении механизмов контроля, тесно связанных с иммуносупрессией, инфекция персистирует, и развивается субклиническая, а затем и клиническая стадии заболевания [А.А. Берлим, В.В. Авруцкая, С.О. Дубровина, 2012; Zehbe I., Tachezy R. et al., 2011]. Клинически выраженные формы ПВИ возникают, как правило, в результате действия ряда факторов: социальных, инфекционных, иммунных. Большую роль в генезе рака шейки матки играет наследственная запрограммированность, в частности обнаружено, что у женщин с этим заболеванием чаще определяются изменения в 5, 6, 11 и 17-й хромосомах [Boer M. et al., 2014; Villada I. et al., 2012].

В настоящее время эпидемиологические исследования направлены на изучение факторов, которые могли бы объяснить различное естественное течение ПВИ и ассоциированных с ней поражений шейки матки и других половых

органов [Т.Н. Бебнева, В.Н. Прилепская, 2001; Smith E. et al., 2003]. Такими факторами могут быть высокая сексуальная активность, большое число родов, использование БАД, прием гормональных препаратов, наличие вредных привычек, эндометриоза, ИППП и др. [В.И. Киселев, 2013; В.Н. Прилепская, 2012; Alice de Zelmanowicz, 2011]. Нарушения менструального цикла, и микроценоза влагалища, прием антибиотиков, также являются факторами риска реализации неопластических процессов [Kaufmann A. et al., 2011; Walboomers J. et al., 2009; Matsumoto K. et al., 2013].

С позиции современных знаний, особенностью нормальной микрофлоры половых путей у женщин репродуктивного возраста является многообразие ее видового состава, включающего безвредные (сапрофиты) и условнопатогенные аэробные и анаэробные микроорганизмы, находящиеся в динамическом равновесии друг с другом, при этом анаэробы преобладают над аэробами [Н.В. Вознесенская, И.В. Кожемятова, 2016; Sheu B. et al., 2014]. Немаловажной функцией нормальной микрофлоры является обеспечение совместно с иммунной системой колонизационной резистентности, при которой количественное соотношение микробных ассоциантов остается стабильным [Т.Ю. Гурова и др., 2006; Woodman C. et al., 2011]. Доказано, что при дисбиотических процессах на фоне изменения рН влагалищной среды и тканевой гипоксии возрастает риск активации вирусных и других инфекций. По данным некоторых исследований [В.Ф. Долгушина, А.Я. Шерман, 2006; Анкирская А.С., 2013], выявлено, что у более чем 70% женщин с ПВИ картина биоценоза не соответствует норме. Поэтому важной составляющей тактики ведения женщин с ПВИ является лечение других генитальных инфекций и коррекция микробиоценоза влагалища.

Факторы онкологического риска при папилломавирусной инфекции

Главное преимущество канцерогенных вирусов – это их уникальная способность трансформировать клетки, используя для этой цели информацию, закодированную лишь в нескольких трансформирующих генах [Бебнева Т.Н.,

Прилепская В.Н., 2011; Г.О. Шайхаев, А.Н. Хлебникова, 2006; Sun S. et al., 2010]. ВПЧ-инфекция начинается в базальных клетках эпителиального слоя, где особая комбинация клеточных факторов начинает трансформацию вирусных онкогенов Е6 и Е7. Гены Е6 и Е7 изменяют клеточный цикл, поскольку они взаимодействуют с опухолевыми супрессорными белками и инактивируют их. В верхних слоях эпителия можно обнаружить зрелые вирионы ВПЧ [В.И. Козлова, А.Ф. Пухнер, 2010; Молочков В.А., Киселев В.И., 2014; Gissmann L. et al., 2013]. Наиболее интенсивно изучалось естественное развитие цервикальной интраэпителиальной неоплазии (CIN) или предрака по отношению к раку шейки матки [Г.Н. Минкина и др., 2011; Ф.Л. Киселев, Н.П. Киселева, В.К. Кобзева, 2011; Handiey J., Dinsmore W., 2009; Hess S. et al., 2010]. При CIN I стадии вероятность ее развития в инвазивный рак составляет 1%, вероятность обратного развития до нормы 60%, при CIN II инвазивный рак развивается в 1,5% случаев, регрессия до CIN I наступает в 40% случаев, при CIN III инвазивный рак развивается в 12% случаев, а обратное развитие до CIN II или CIN I наблюдается в 32% случаев [В.И. Кулаков и др., 2005; Haga T. et al., 2011; Kjerrstrom A. et al., 2011; Ji H. et al., 2009; Kadish A. et al., 2012].

Таблица 1.1. ДНК-маркеры, как показатели онкологического риска

Ген	Функция
p53 (экзон 4, кодон 72)	антионкоген
MMP-1 (1G/2G, промотер)	инвазивная способность клеток
IL-10 (A/G, промотер)	подавление клеточного иммунитета
MTHFR (C677T)	синтез метионина
MDR-1 (C3435T)	чувствительность к цитостатикам и противовирусным препаратам
E6-E7	взаимодействие с p53 клеток эпителия

Существенной особенностью ВПЧ является их возможность переключаться с инфекции непродуктивного типа к инфекции продуктивного типа и наоборот [В.Н. Прилепская и др., 2013; Н.Р. Сафронникова, В.М. Мерабишвили, 2015]. В первом случае вирус реплицируется синхронно с клеткой и не приносит ей вреда. Во втором случае он быстро размножается и лизирует

клетку, высвобождая массу новых вирионов, способных инфицировать другие клетки [С.Н Гайдуков, 2014; Tarkowski T. et al., 2014]. Таким образом, условиями формирования необратимой неоплазии являются [В.И. Киселев, 2004]: активная экспрессия генов Е6 и Е7 ВПЧ; индукция метаболических механизмов конверсии эстрадиола в 16α -гидроксистерон (16α -ОНЕ1), который относится к категории “агрессивных гормонов”, вызывающих длительный эффект; индукция множественных повреждений хромосомной ДНК в инфицированной клетке, которая завершает процесс перерождения.

Наиболее важными с точки зрения онкогенных потенциалов ВПЧ являются онкобелки Е5, Е6 и Е7 (онкопротеины) [Klingelhutz A. et al., 2009; Baldwin P. et al., 2012; He Z. et al., 2010]. Патогенетической основой вирус-индуцированного онкогенеза являются интеграция вирусной ДНК в хромосому инфицированных клеток с активным синтезом онкобелка Е7, и способность трансформированных клеток метаболизировать эстрадиол с образованием 16α -гидроксистерона (16α -ОНЕ1) – агрессивного метаболита, который активирует экспрессию гена Е7 (и способствует высокому устойчивому синтезу вирусного онкобелка Е7). Указанный комплекс обеспечивает пролиферативную активность формирующегося опухолевого клона, а также подавление системы иммунологического надзора [Г.А. Дмитриев и др., 2016]. Онкопротеины Е6 и Е7 имеются в составе ВПЧ ВКР и не содержатся в вирусах низкого онкогенного риска [В.И. Киселев, О.И. Киселев, 2010; Bedell M., Jones K., 2007; Reeves W. et al., 2009; Hohn H. et al., 2010; Jabbar I. et al., 2001]. Они инактивируют клеточный надзор, который минимализирует генетическую нестабильность, вследствие чего прекращается элиминация клеток с начальными вредными изменениями, связанными с развитием неоплазии [Lehtinen M., Pawlita M., 2013; Kadish A. et al., 2012].

Одним из ключевых моментов трансформации клеточного роста является взаимодействие белков высокоонкогенных типов ВПЧ (в первую очередь, Е6) с

онкосупрессором p53, что приводит к ингибированию последнего. Так, L. Rapp и J. Chen [2008] наблюдали деградацию p53, наступающую в результате связывания с ним белка E6. Полагают, что E6 подавляет активность защитного белка p53, стимулируя его деградацию путем протеолиза, в который вовлечен ассоциированный с E6 белок E6AP [Beer-Romero P. et al., 2007]. Онкобелок E6 взаимодействует с антионкобелком p53 и образует с ним устойчивый комплекс [Bontkes H. et al., 2008; Davis T. et al., 2013]. Это приводит к быстрой протеолитической деградации P53 в убиквитин-зависимом пути протеолиза [Kim J. et al., 2014]. Еще раз следует подчеркнуть, что в настоящее время установлена отчетливая корреляция между носительством генитальных ВПЧ, иммортализацией ими кератиноцитов человека, протеолитической дестабилизацией p53 и ассоциацией определенных типов (типы 16 и 18) ВПЧ с опухолями человека [В.И. Киселев, О.И. Киселев, 2013; Phelps W., Barnes J., Loba D., 2009]. Кроме того, именно белок E6 связывается с интерлейкином-18, являющимся основным индуктором γ -интерферона (IFN), что приводит к блокаде реакций клеточного цитотоксического иммунитета [Young-Sik Cho et al., 2011; Phelps W. et al., 2009].

Второй основной онкопротеин вируса папилломы человека - E7, оказывает свой эффект посредством связывания с онкосупрессором белка ретинобластомы (Rb) и его инактивации. S. Seavey и соавт. [2009] показали, что такая специализация E7 наблюдается при наличии E6, инактивирующего p53. Экспрессия белка E7 так же, как и белка E6, играет ключевую роль в репликации ВПЧ. Так как активная репликация ВПЧ происходит в дифференцирующихся кератиноцитах, ВПЧ должен задерживать терминальную дифференцировку этих клеток и экспрессию генов, контролирующих клеточное деление [Kadish A. et al., 2007; Ji H., Wang T., Chen C., Pai S., Hung C. et al., 2009]. В это же время в результате координированной экспрессии и активности белков E6 и E7 происходит выраженная экспансия шиповатого слоя эпидермиса [Young-Sik Cho

et al., 2011]. Очень важное наблюдение получено при исследовании влияния этого белка на клеточный ответ при действии IFN- γ_2 . Белок E7 подавляет индукцию генов, отвечающих активацией экспрессии под влиянием эндогенного IFN [Lee J. et al., 2008; Liu W., Gao F., 2012; Osen W. et al., 2011]. Это свидетельствует о существовании своеобразного механизма ускользания ВПЧ от IFN в условиях развивающейся инфекции.

Большой интерес представляет ассоциация между развитием рака шейки матки и «активным» (A/G или G/G-1082) генотипом IL-10 [Stanczuk G., Sibanda E. et al., 2011]. Известно, что IL-10 является «противовоспалительным» цитокином, и его активность обычно связана с подавлением противовирусного иммунитета [Н.Р. Сафронникова и др., 2014; Piyathilake C. et al., 2010; Rutter J. et al., 2008; Ye S. et al., 2011]. Метилентетрагидрофолатредуктаза (MTHFR) - фермент, катализирующий синтез незаменимой кислоты метионина и далее - S-аденозилметионина, играющего ключевую роль в процессе метилирования ДНК. При этом происходит инактивация многих клеточных генов, в том числе – онкогенов [Peng F., Labelle L., 2011]. Известна мутация этого гена, ведущая к снижению активности MTHFR в несколько раз при замещении цитозина на тимин в позиции 677 (C677T) что ведет к гипергомоцистеинемии в сочетании с недостаточной продукцией метионина, особенно при гомозиготном состоянии гена (T/T) у обследуемых лиц [Piyathilake C. et al., 2010]. Так, в исследовании [Stern L. et al., 2000] было показано снижение уровня метилирования ДНК в геноме у небольшой группы лиц, гомозиготных по данной мутации, что, по предположению авторов, может быть фактором предрасположения к раковым заболеваниям [Kim J. et al., 2010].

Защитные факторы и иммунитет при папилломавирусной инфекции

Развитие внутритканевых процессов при вирусных инфекциях определяется, с одной стороны, цитопатическим действием вируса на клетки данной ткани и органа, а с другой, реакцией внутритканевых и органных систем

защиты от вирусной инфекции. Способность к неограниченно долгому персистированию в организме обусловлена особенностями жизненной стратегии этих вирусов, основанной на блокировании механизмов врожденного и адаптивного антивирусного иммунитета [В.И. Киселев, и др., 2014; Н.Р. Сафронникова, В.М. Мерабишвили, 2015; Frazer H., 2014; Schiffman M., 2014; Zelinski G. et al., 2013]. ДНК вирусы типа паповавирусов (ВПЧ) применяют разнообразные механизмы, позволяющие им увеличивать время эффективной репликации и распространения вирусных частиц, кроме того, они способны уклоняться от реакций иммунной системы организма хозяина за счет индукции состояния латентности. Интересно, что ВПЧ при любой активации иммунной системы может переходить от состояния латентности к активной фазе жизненного цикла [Söderberg-Nauclér C. et al., 2011; Zhuravskaya T. et al., 2007].

Врожденные особенности организма, особенно состояние иммунной системы, играют такое же большое значение при развитии ПВИ, как и внешние факторы. Так, например, имеется зависимость характера течения вирусной инфекции от системы антигенов HLA (главного комплекса гистосовместимости) [В.Н. Прилепская, С.И. Роговская, 2013; А.А. Кубанова и др., 2009; Lusso P. et al., 2011; Castellanos M. et al., 2011]. Большой интерес вызывает взаимосвязь между характером инфекционного процесса и состоянием клеточного и гуморального иммунитета, уровнем экспрессии генов цитокинов, определяющих равновесие между процессами клеточной пролиферации и апоптоза [Белокриницкая Т.Е., Пономарева Ю.Н., 2009; А.А. Берлим, В.В. Авруцкая, 2012; Davidson E. et al., 2013; Cohn J. et al., 2011]. Иммунный ответ на ВПЧ характеризуется развитием клеточных и гуморальных иммунных реакций, механизм регуляции которых связан с продукцией цитокинов Т-хелперами 1-го типа (Th-1) и Т-хелперами 2-го типа (Th-2) [Ablashi D. et al., 2008; Flamand L. et al., 2013]. При этом Th-1 секретируют IL-2, IL-3, INF γ , TNF α , способствующие реализации клеточного иммунного ответа; Th-2-цитокины: IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, влияющие на

гуморальный ответ [Romagmani S., 2007]. Считается, что Th-1 цитокины отвечают за защиту от внутриклеточных паразитов, тогда как для иммунитета от внеклеточных паразитов необходима комбинация Th-1 и Th-2 [Н.Д. Беклемишев, 2015]. Таким образом, течение папилломавирусной инфекции во многом зависит от формирования определенного спектра цитокинов [Ghaem-Maghami S., Lewis D., 2009; Mazzoni S. et al., 2015]. В частности, рецидивирующая ПВИ характеризуется снижением уровня IL-1 β и IL-1 α в цервикагинальной слизи [О.Р. Зиганшин и др., 2011], повышением уровня IL-1 β в сыворотке крови [М.А. Захарова, 2011], а также увеличением спонтанной продукции IL-1 β мононуклеарами периферической крови и снижением его продукции активированными клетками (за счет IL-1-синтезирующей способности иммунокомпетентных клеток, обусловленного как особенностями антигенного стимула, так и влиянием других цитокинов) [Г.К. Спирина, В.А. Молочков, 2009], снижением спонтанной и индуцированной секреции IL-2, снижением уровня спонтанной секреции INF γ (при удовлетворительной возможности клетками его продукции), значительным повышением продукции IL-10 [А.Ф. Возианов и др., 2010]. Подобные нарушения продукции цитокинов у больных папилломавирусной инфекцией открывают новые перспективы для использования в ее лечении экзогенных цитокинов.

Огромное внимание в настоящее время уделяется роли цитокинов в реализации регуляторных иммунологических эффектов. Их роль в иммунопатогенезе ПВИ до сих пор до конца не изучена. Интерлейкины включаются во все этапы различных форм системного и локального иммунологического ответа, в том числе и на воспалительные антигены. Такими этапами являются: распознавание воспалительных антигенов; активация антигенпрезентирующих клеток; миграция иммунокомпетентных клеток к участку развития воспаления; генерация практически всех клонов цитотоксических клеток и др. [Н.М. Бережная, В.Ф. Чехун, 2010]. Цитокины

делятся на группы в соответствии с названием клеток – их основных продуцентов (лимфокины, монокины, цитокины типа Th1 и Th2), а также в соответствии с главными принципами или объектами их действия (хемокины, про- и противовоспалительные цитокины). Лимфоциты типа Th1 продуцируют преимущественно провоспалительные цитокины, интерлейкины IL-1, IL-2, IFN- γ , фактор некроза опухоли (TNF- α) [Baker D. et al., 2014; Bonagura V. et al., 2009], TNF- α – фактор противовирусной, противоопухолевой, антибактериальной защиты. Лимфоциты типа Th2 выделяют IL-4, -5, -6, -9, -10, -13, при этом IL-10 обладает выраженными противовоспалительными и иммуносупрессорными свойствами [Bonagura V., Hatam L., 2009]. Установлено, что соотношение уровней продукции ИЛ-12/ИЛ-10 клетками крови пациентов с CIN было снижено, что свидетельствует об угнетении Th1-звена цитокинов [Ю.В. Никогда, 2013; Jacobs N. et al., 2008; Clerici M., Shearer G., 2014; Lau A., Sigaroudinia M., 2006]. Изменений в секреции IFN- γ и IL-4 при этом выявлено не было. В то же время другие исследования показали активацию продукции IL-4 и IL-10 и снижение продукции IL-2 в образцах CIN с интенсивным инфекционным процессом, вызванным ВПЧ [Jacobs N. et al., 2008]. Также отмечено снижение уровня локальной экспрессии IL-2 по мере прогрессирования CIN и развития рака [Diaz-Mitoma F., Kumar A., 2015]. Также выявлено, что IL-1 и TNF- α ингибируют пролиферацию эпителиальных клеток шейки матки и стимулируют пролиферацию этих же клеток, инфицированных ВПЧ, повышая уровень транскрипции и стабилизируя мРНК E6 и E7 [Mota F. et al., 2008].

Большое значение в противовирусной защите организма придается системе интерферонов, при этом механизм непосредственного воздействия интерферонов на ВПЧ до сих пор до конца не ясен [Lebrecht A. et al., 2011]. После воздействия IFN- γ на линии клеток цервикальных кондилом, инфицированных ВПЧ типа 6/11, и карцином, трансформированных ВПЧ типа 16, значительно

возрастает продукция мРНК, IFN- γ и TNF- α [Lau A. et al., 2006; Cirelli R. et al., 2011]. IFN- γ оказывает ингибирующий эффект на экспрессию генов E6 и E7 онкогенных типов папилломавируса в цервикальных клетках, а также на пролиферацию самих клеток [Lee B. et al., 2012; Gupta M. et al., 2009]. Белок E7 ВПЧ блокирует антипролиферативное действие IFN и предотвращает лизис инфицированных клеток [Lee S. et al., 2013]. Суперэкспрессия гена E7 является одной из причин потери иммунной системой способности к противовирусной активности в ответ на развитие ПВИ [O'Brien P. et al., 2011; Lucey D. et al., 2006]. Для папилломавирусной инфекции характерно выраженное подавление интерфероногенеза.

1.3. Цервикальный скрининг

Скрининг – это идентификация не выявленного заболевания или дефекта с помощью тест исследований, которые могут проводиться быстро и в массовом порядке [ВОЗ, 2010]. Целью скрининга является раннее активное выявление предраковых состояний и бессимптомного рака и принятие мер по их терапии. Под цервикальным скринингом (ЦС) следует понимать использование определенных методов исследования для выявления среди обследуемых при гинекологическом осмотре женщин с предопухолевыми состояниями и ранними, доклиническими формами рака шейки матки [В.И. Новик, 2010]. ЦС предусматривает выявление пациенток, имеющих предрасполагающие факторы к раку шейки матки (латентное носительство папилломавирусной инфекции, цервикальные неоплазии) с последующим их углубленным обследованием и лечением. В настоящий момент одни из наиболее активных споров среди клиницистов идет по поводу необходимого объема цервикального скрининга, как метода вторичной профилактики рака шейки матки [С.И. Роговская, Т.Н. Бебнева, 2016; Л.А. Ашрафян и др., 2015; Doorbar J., 2015; Einstein M. et al., 2014]. Наиболее распространенными методами диагностики являются кольпоскопическое, цитологическое и вирусологическое исследования.

Кольпоскопическая диагностика

Кольпоскопия на настоящий момент является наиболее распространенным методом диагностики заболеваний шейки матки. Сложности в кольпоскопической диагностике обычно вызывают субклинические формы ПВИ в связи со стертой картиной, отсутствием специфического комплекса кольпоскопических признаков и сочетанием с другими доброкачественными и злокачественными образованиями эпителия [Coppleson M., 2011; Syrjanen S., 2015]. Чувствительность кольпоскопической диагностики при цервикальных интраэпителиальных поражениях составляет 60-70%, при комплексном применении с ВПЧ-тестированием или Пар-тестом – 90% [EUROGIN, 2014]. Кольпоскопия, несмотря на свою неспецифичность, является наиболее распространенным методом диагностики ПВИ в связи с возможностью выявления различных типов эпителия, оценки размеров, качества патологических образований, а также возможностью при необходимости произвести прицельную биопсию ткани.

Цитологический скрининг

Информативность цитологического метода диагностики ПВИ определяется следующими факторами: уровнем подготовки цитолога, полноценным взятием мазка с использованием специальных инструментов и правильно выбранной локализацией. Чувствительность цитологического исследования по данным разных авторов составляет 66-83%, специфичность 60-95% [В.И. Новик, 2010; А.А. Михетько, 2010; Campo M., Roden R., 2010; Nygard, J. et al., 2006; EUROGIN, 2014]. Цитологические исследования позволяют диагностировать только клиническую и субклиническую формы инфекции, существует возможность появления ложноотрицательных результатов при наличии плоскоклеточных интраэпителиальных поражений высокой степени тяжести (инвазивный рак от 15 до 55%, прединвазивный рак от 20 до 70%) [В.А. Молочков и др., 2014].

Программы цитологического скрининга работающие в других странах весьма вариабельны. Основные отличия касаются периодичности его проведения. Интервалы скрининга варьируют от 2-3 лет Исландии и Дании, до 5-6 лет в Финляндии и Нидерландах [Nygard, J. et al., 2006; Siemens F. et al.]. При этом считается, что эффективность скрининга высока только при организованном и документированном его проведении [О.Г. Иванченко и др., 2011; В.И. Новик, 2010; Arbyn M. et al., 2009; Azerkan F. et al., 2009; Rodríguez-Salés V. et al., 2013]. В России же цитологический скрининг носит спорадический характер. Более того, поскольку проведение профилактических (скрининговых) мероприятий система ОМС не предусматривает, приходится искать механизмы на региональном уровне для обеспечения финансовой стороны вопроса [Р.Ш. Хасанов и др., 2013; В. Кезик, 2014]. В тоже время Совет Евросоюза с 2003 года рекомендует проведение общегосударственного организованного скрининга РШМ во всех странах Евросоюза [Benjamin I., Echols L., 2011].

Трактовка цитологических мазков в настоящее время затруднена для практического врача ввиду путаницы в терминологии, поскольку в мировой практике одновременно используются несколько классификаций. Сегодня широко дискутируется вопрос ведения пациенток с выявленными цитологическим методом состояниями шейки матки типа LSIL и ASCUS. Так, метаанализ 62 исследований, изучающих информативность использования обычного Pap-теста в выявлении РШМ в отношении LSIL, показал широкий разброс данных: чувствительность колеблется от 11 до 99% при специфичности 14-97% [EUROGIN, 2014]. Не определена тактика в отношении результатов неопределенной значимости (ASCUS), поскольку считается, что из них большинство женщин здоровы, 6–11% имеют CIN II–III, а 1 женщина из 1000 больна раком шейки матки [Management of a patient with an abnormal cervical smear, clinical practice guidelines, Economic Evaluation Department, France, 2012].

Молекулярно-биологические методы диагностики ПВИ

В настоящее время широкое распространение получили молекулярно-биологические методы диагностики ПВИ, которые направлены на обнаружение частиц ДНК ВПЧ в материале. Однако использование этих методов как диагностического критерия для неопластических процессов шейки матки приводит к значительной гипердиагностике, т.к. в большинстве случаев инфицирование имеет кратковременный характер и заканчивается спонтанным выздоровлением и элиминацией вируса. Таким образом, положительный результат при лабораторном исследовании на ДНК ВПЧ не позволяет в большинстве случаев прогнозировать развитие цервикального рака. Однако данные методы диагностики имеют большую прогностическую значимость, особенно если на фоне ВПЧ-инфекции уже имеется картина дисплазии эпителия шейки матки, и позволяет говорить о степени канцерогенного рака [В.И. Киселев, 2003]. Прогностическая ценность данных методов возрастает при динамическом наблюдении для определения риска рецидива или прогрессирования заболевания. Кроме того, важность выявления ДНК ВПЧ и типирования вируса обусловлена тем, что у 15-28% женщин с наличием ДНК ВПЧ ВКР (при нормальной цитологии) в течение 2 лет развивается интраэпителиальная неоплазия, а у женщин с отсутствием ДНК ВПЧ заболевание развивается в 1-3% случаев [В.А. Молочков, В.И. Киселев и др., 2004].

Применение методов определения ДНК ВПЧ повышает эффективность выявления предраковых состояний, во-первых, потому, что чувствительность метода исключительно велика, его предсказательный уровень неизмеримо выше, чем цитологического, во-вторых, совпадение данных цитологического исследования и ВПЧ-диагностики позволяет избежать кольпоскопического исследования. В лабораторной диагностике применяют почти исключительно ДНК-методы.

Ведущие мировые организации, занимающиеся проблемой рака шейки матки (IARC WHO, ASCCP, EUROGIN, ESIDOG) в настоящее время

рекомендуют использовать ВПЧ-тесты для первичного скрининга. В ряде стран (Финляндия, Франция, Англия, Америка, Индия, Испания и др.) уже накоплен положительный опыт использования различных методов выявления ДНК ВПЧ в скрининговых исследованиях.

Проведённый сравнительный анализ клинической чувствительности ПЦР и ВПЧ Digene-теста на протяжении 5 лет (1999-2004 гг.) [В.Н. Прилепская и др., 2006], основанный на 1371 случае CIN II/III+ для ПЦР и 1313 случаях CIN II/III+ для ВПЧ Digene-теста. Данное исследование показало, что средняя величина клинической чувствительности ВПЧ Digene-теста составила 94%, в то время как для ПЦР – 81%. В широкомасштабном исследовании голландской группы ученых под руководством Snijders P. [2013] была изучена и подтверждена зависимость между вирусной нагрузкой ВПЧ и развитием CIN. Было установлено, что критическое значение вирусной нагрузки, вызывающей дисплазию, находится в интервале 10^4 - 10^5 (количество вирусов ВПЧ/мл) и определение меньших концентраций ВПЧ не несет клинически значимой информации. Основным пограничным критерий ВПЧ Digene-теста разработчики установили также на клинически значимом уровне - 10^5 ВПЧ/мл, ассоциированном с развитием патологии.

Таким образом, можно сделать вывод о том, что применение вирусологического исследования совместно с кольпоскопией и цитологическим исследованием в программах скрининга рака шейки матки позволяет максимально увеличить их эффективность.

Иммунологическая диагностика папилломавирусной инфекции

Имеющиеся в настоящее время серологические тесты не удовлетворительны для клинической диагностики и могут применяться для эпидемиологического исследования. Одних из самых перспективных иммунологических методов диагностики на сегодняшний момент является определение наличия онкобелка E7 [В.И. Киселев и др., 2010; Ю.Н. Кузнецова,

2013, В.А. Молочков, 2014]. Факт интеграции вирусной ДНК может быть зарегистрирован или изучением структуры гена E2 или измерением уровня синтеза онкобелка E7. Наличие онкобелка E7 в цервикальных пробах может рассматриваться как однозначное свидетельство начавшегося процесса малигнизации эпителиальных клеток, содержащих интегрированную копию генома ВПЧ. Изучение оценки информативности определения онкобелка E7 методом иммуноферментного анализа в диагностике неопластических процессов в шейке матки начато в 2002 году в НИИ молекулярной медицины ММА им. Сеченова, Всероссийском научном центре рентгенорадиологии. Полученные результаты определили, что онкобелок E7 определяется в 81% дисплазий и 75% всех цервикальных раков, остальные 25% злокачественных поражений шейки матки носили ВПЧ-независимый характер [В.А. Молочков и др., 2014].

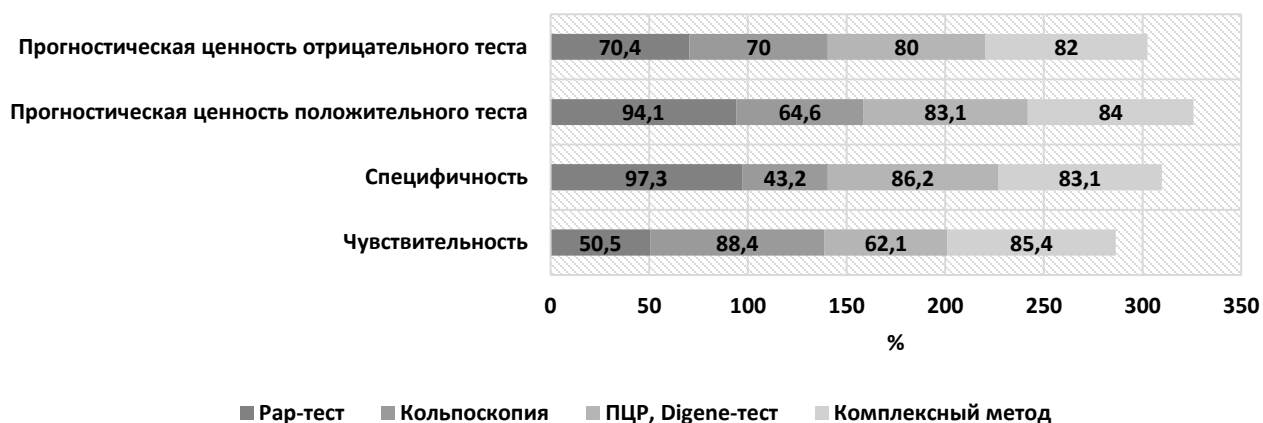
Измерение уровня онкобелка E7 в цервикальных пробах позволяет определить стадию развития вирусной инфекции (повышенное содержание E7 указывает на интегративную фазу инфекционного процесса с малой вероятностью спонтанной ремиссии), а также достоверно коррелирует с агрессивностью зарождающегося опухолевого процесса. Кроме того, онкобелок E7 является мощным иммуносупрессивным агентом, существенно снижая эффективность иммуномодулирующих препаратов.

Патогистологическая диагностика папилломавирусной инфекции

К гистологическому методу диагностики ПВИ существуют определенные показания. Данный метод ограничен в связи с высокой стоимостью исследований, невозможностью частого проведения и всегда точного забора материала, кроме того, отсутствуют четкие признаки верификации ВПЧ-инфекции. Профессор С.И. Роговская совместно с сотрудниками Научного центра акушерства, гинекологии и перинатологии РАМН [2004] сформулировала достаточно четкие показания для проведения биопсии (табл. 1.2).

Таблица 1.2. Кольпоскопические показания для проведения биопсии

Признаки	Низкоатипические признаки Биопсия не обязательна	Высокоатипические признаки Биопсия необходима
<i>Мозаика</i>	Регулярная, нежная, расположена плоско, реакция на уксус слабая	Нерегулярная, разный уровень, реакция на уксус выраженная, ранимость ткани
<i>Пунктация</i>	Регулярная, нежная, расположена плоско, реакция на уксус слабая	Нерегулярная, разный уровень, реакция на уксус выраженная, ранимость ткани
<i>Лейкоплакия (кератоз)</i>	Плоская, нерезко йоднегативная, желтоватая, небольшая	Бугорчатая, папиллярная, серо-белая, ранимость ткани
<i>Ацетобелый эпителий</i>	Плоский или слегка над уровнем, нежный, сохраняется недлительно	Длительная уксусная реакция, интенсивная реакция, ранимость ткани
<i>Сосуды</i>	Отсутствие или нормальная межкапиллярная дистанция, ветвистый рисунок с плавной градацией	Атипические: путаные, с разрывами, извитые, межкапиллярная дистанция нерегулярна, в форме запятой, трубчатые, спиралевидные
<i>Дефект эпителия</i>	Эрозия с воспалительными признаками или атрофией	Язва, экзофит

**Рисунок 1.1.** Диагностическая информативность методов диагностики ПВИ шейки матки (%) [С.И. Роговская, 2005]

Необходимо комплексное применение различных методов диагностики папилломавирусной инфекции, при этом снижается вероятность ложноположительных и ложноотрицательных результатов, т.к. различные методы обладают разной чувствительностью, специфичностью и прогностической ценностью. Данные об эффективности различных методов диагностики папилломавирусной инфекции, представленные в рисунке 1.1,

позволяют сделать вывод, что точная диагностика в основном зависит от квалификации врача, его опыта и уровня клинического мышления.

Другие молекулярные биомаркеры

В настоящее время предложены новые молекулярно-биологические тесты, направленные на определение активности ВПЧ и оценку ближайших перспектив течения инфекции. Их иногда называют молекулярными маркерами малигнизации. Они подразделяются на 2 группы: компоненты продукции вируса папилломы и компоненты клетки-хозяина [Steenbergen R. et al., 2014]. Примерами служат PreTect ВПЧ-Proofer (NorChip), разработанный для определения полномеразной мРНК генов Е6 и Е7 ВПЧ, присутствие которой в клиническом материале, как полагают, ассоциировано с повышенным риском неопластической прогрессии, а также тест CINtec p16ink4a, который представляет собой маркер цервикального дискариноза, созданный как показатель изменения состояния клетки-хозяина. Известно, что одним из регулирующих процесс малигнизации протеинов является опухолевый супрессор p16ink4a – белок, ингибирующий циклинзависимую киназу 4 и 6, который фосфорилирует протеин ретинобластомы. Обнаружена связь между продукцией белков p16ink4a и экспрессией ретинобластомы. Исследования R. Klaes и соавт. [2011] показали, что использование данного биомаркера для диагностики CIN может значительно снизить количество неясных цитологических мазков при скрининге и помочь в установке диагноза и оценке прогноза течения инфекции. Предлагаются также и другие методы оценки активности ВПЧ в тканях, что позволит выделить группу женщин-носителей ВПЧ с неблагоприятным прогнозом.

В России в настоящее время все эти методы не могут быть рекомендованы в качестве первичного теста в массовых программах обследования шейки матки, поскольку их внедрение неизбежно требует серьезного технического перевооружения клинических лабораторий и специальной подготовки персонала [В.Н. Прилепская, С.И. Роговская и др., 2007].

1.4. Основные методы терапии ПВИ гениталий у женщин

Лечение больных вирусными инфекциями представляет определенные трудности как из-за отсутствия четкого понимания отдельных механизмов патогенеза заболевания, возможности хронического и рецидивирующего течения, формирования резистентности к используемым противовирусным химиопрепаратам, так и в связи с высокой стоимостью для населения высокоэффективных противовирусных химиопрепаратов. Использование противовирусных соединений для химиотерапии и химиопрофилактики вирусных инфекций представляет собой относительно новый раздел в учении об инфекционных болезнях.

Не существует в настоящее время препаратов, специфически действующих на ВПЧ. Создание терапевтических вакцин и специфических противовирусных препаратов до сих пор находится на стадии разработки [Е.Г. Новикова и др., 2010; П.С. Русакевич, 2012]. Эффективность различных методов терапии сейчас составляет 60-80%. Частота рецидивов ПВИ достаточно не определена. Кроме того, высока вероятность самопроизвольной регрессии различных форм ПВИ (в том числе и клинических), что иногда говорит о целесообразности наблюдательной тактики в ведении данного заболевания. В то же время достаточно высок риск малигнизации ВПЧ-индуцированных поражений, что заставляет применять в некоторых случаях достаточно агрессивную методику ведения пациенток с ПВИ (особенно пораженных ВПЧ высокого онкогенного риска), а также искать новые методы лечения и профилактики этой высококонтагиозной инфекции.

В настоящее время существует довольно большое разнообразие методов лечения ПВИ гениталий у женщин, основными из которых являются:

1. Деструкция экзофитных образований и атипически измененного эпителия (электро-, крио-, лазеро-, радио- и химиокоагуляция). Метод позволяет

локально удалить очаг поражения. Эффективность его составляет 45-97%, частота рецидивирования – 15-50%;

2. Цитотоксические препараты обладают антипролиферативным действием и способствуют разрушению клеток;
3. Фотодинамическая терапия при котором на поверхность патологического образования наносят фотосенсибилизирующее вещество и под воздействием определенного спектра света происходит выброс активных форм кислорода, разрушающих патологическое образование;
4. Препараты, действующие на репликацию, транскрипцию и трансформацию ДНК ВПЧ пока достоверно не доказали эффективность при ВПЧ;
5. Иммунокорригирующие препараты (являются неспецифическими, зачастую малоэффективными и назначаются бесконтрольно);
6. Неспецифические средства (витамины, десенсибилизирующие средства, адаптогены, ретиноиды, физиотерапевтические методы и др.).

Сравнительная эффективность деструктивных методов лечения CIN

Отсутствие единого мнения среди врачей о преимуществах какого-либо из используемых методов лечения CIN сопровождается большим количеством публикаций, посвященных сравнению эффективности лечения по различным показателям. Так, К. Nordland et al. [2015] сравнили способ анестезии, продолжительность госпитализации, частоту осложнений в двух группах больных, леченных методом ножевой (212 женщин) и лазерной (439 женщин) конизации. В первой группе общая анестезия применялась у 88% пациенток, продолжительность госпитализации составила 7,6 дня, осложнения отмечены в 36,8% случаев в виде послеоперационных кровотечений, инфекций и цервикальных стенозов. Во второй группе лазерная конизация выполнялась амбулаторно под местной анестезией у 97% больных, осложнения наблюдались только в 8,4% случаев.

I. Kalliala et al. [2007] провели сравнительный анализ результатов лечения 7466 женщин с CIN I-III методами криодеструкции, диатермоэлектро- и лазерной конизации. При наблюдении в течение 3 лет число рецидивов было статистически недостоверным во всех трех группах, но выше в группе больных с CIN III. V. Persad et al. [2011] в течение 13 лет оценивали эффективность лечения 2240 пациенток с CIN I-II с помощью криодеструкции (1114 чел.) и лазерной конизации (1126 чел.). Оба метода продемонстрировали практически одинаковую эффективность. Полная излеченность была достигнута у 92% женщин в обеих группах. К таким же выводам пришли в рандомизированном исследовании P. Mathevet et al. [2007], которые сравнили 3-летнюю эффективность лечения CIN методом ножевой (28 больных), лазерной (29 больных) конизации и LEEP (29 больных). Авторы не получили достоверных различий в эффективности методов. K. Sjøborg et al. [2007] изучили процент перинатальной смертности, сроки беременности, вес новорожденных у 742 женщин, ранее подвергнутых лазерной конизации и LEEP. Авторы не обнаружили существенных различий в количестве побочных эффектов - в обеих группах наблюдалось увеличение риска преждевременных родов, самопроизвольных абортов и рождения детей с пониженным весом. M. Kyrgiou et al. [2006] провели метаанализ эффективности лечения CIN по результатам 27 опубликованных исследований. Авторы оценивали влияние метода лечения на доношенность плода при беременности. После ножевой конизации преждевременные роды наблюдались в 14% случаев, маленький вес (<2500 г) новорожденных - в 12%, а кесарево сечение применялось у 9% женщин. После диатермоэлектроконизации большой петлей (LLETZ) показатели составили 11%, 8% и 5% соответственно. Лазерная вапоризация не вызывала этих осложнений.

E. Murta et al. [2006] изучили процент неизлеченных больных с CIN II-III после LEEP ($n = 142$), ножевой конизации ($n=101$) и гистерэктомии ($n=20$). Спустя 16-44 месяца он составил 15,5%, 19,8% и 25% соответственно.

Британские ученые [Ghaem-Maghami S. et al., 2007] путем метаанализа 65 публикаций за период с 1975 по 2006 г. проанализировали сведения о результатах лечения 35109 женщин с CIN I-III и инвазивным раком шейки матки. Ножевая конизация выполнена 10790 пациенткам, лазерная - 6089, LEEP - 10906. У остальных 7324 женщин применялись комбинированные методы терапии. Наличие опухолевого процесса в краях удаленного материала было зарегистрировано в среднем у 24% пациенток, а в 9 исследованиях этот показатель составил 40%. Авторы пришли к выводу, что при использовании LEEP оценка наличия опухолевого процесса в краях удаленного материала крайне затруднена либо невозможна по сравнению с ножевой и лазерной конизацией.

Итак, результаты проведенных исследований не позволяют отдать предпочтение ни одному из методов лечения CIN. У каждого из них свои преимущества и недостатки.

Резюмируя, можно заключить, что ни один из описанных выше методов лечения не приводит к полному излечению от папилломавирусной инфекции из-за значительного числа мультифокальных поражений, что обуславливает рецидив заболевания [Fridmann S. et al., 2016; Gök M. et al., 2008; Roden R. et al., 2007]. При этом, в мире до настоящего времени нет четких рекомендаций в отношении выбора метода терапии CIN и его адекватности. Все методы лечения снижают риск возникновения рака шейки матки в дальнейшем, однако он остается высоким. Высокая частота рецидивов диктует необходимость поиска новых средств лечения CIN, воздействующих как на ВПЧ, так и на сам организм.

Противовирусная терапия папилломавирусной инфекции

В течение многих лет ведутся поиски природных и синтетических соединений, которые могут оказывать противовирусное действие, с одновременной стимуляцией факторов специфической и неспецифической защиты организма [С.Н. Гайдуков, В.О. Атласов, Р.М. Измайлов и др., 2008].

Данным требованиям отвечает препарат природного происхождения — Ферровир, действующим веществом которого является дезоксирибонуклеонат натрия в комплексе с железом (активное вещество: 1 мл раствора содержит натрия дезоксирибонуклеата 0,015 г и 0,000048 г железа окисного хлорид). Препарат активизирует противовирусный, противогрибковый и противомикробный иммунитет, воздействуя на клеточное и гуморальное звено иммунитета, способствует торможению репликации ДНК- и РНК-содержащих вирусов. Ферровир представляет собой натриевую соль нативной высокоочищенной деполимеризованной двуспиральной ДНК природного происхождения, модифицированная ионами железа. В опытах *in vitro* Ферровир на модели лимфобластоидных клеток МТ-4 оказывал цитопатический эффект в отношении ВПЧ. Противовирусная активность препарата в отношении вируса простого герпеса доказана на модели герпетического энцефалита мышей, вызванного этим вирусом [Е.Е. Воронин, Ю.Л. Фомин, 2010; Morgan D. et al., 2007]. Точный механизм действия Ферровира (как и многих других природных соединений) не определен. Показано, что молекулы ДНК в его составе способны проникать в клетки путем пиноцитоза и метаболизироваться до нуклеотидов, среди которых наиболее важными являются АТФ и АДФ [Н.Б. Серебряная и др., 2010; Г.Н. Бисага и др., 2011]. Следовательно, помимо противовирусной активности данный препарат может модулировать иммунный ответ, регулировать энергетический обмен. Ферровир является препаратом, оказывающим влияние на нуклеотидную регуляцию иммунитета. Молекулы ДНК с такой молекулярной массой проникают в клетки и подвергаются гидролизу, что приводит к повышению внутриклеточной концентрации нуклеотидов, которые активно выходят из клеток во внеклеточную среду. Здесь они связываются с пуриновыми рецепторами клеток микроокружения и циркулирующих клеток крови [Lemoli R., 2009]. Результатом этих взаимодействий являются активация процессов клеточного и гуморального

иммунитета, индукция Th1 типа ответа, увеличение количества CD8, CD16 клеток, усиление противовирусной защиты, стимуляция лейкопоэза. Кроме того, считается, что главными мишенями действия нуклеината натрия в сочетании с Fe³⁺, являются оба подтипа (Th-1 и Th-2) CD4⁺ - Т-хелперов, но в большей степени Th-1 [Н.М. Калинина, Н.И. Давыдова, 2010; Morsmann T. et al., 2009], макрофаги, которые увеличивают продукцию H₂O₂, усиливая тем самым цитотоксическую, бактерицидную и антигенпредставляющую активность [Holter W. et al., 2007] и NK-клетки с последующей трансформацией последних в лимфокинактированные киллеры (ЛАК), имеющие генотип CD16⁺CD3⁺CD5⁻, ответственные за генетически не рестриктированную цитотоксичность [Grimm E. et al., 2006; Saiki O. et al., 2008].

Иммуотропная терапия папилломавирусной инфекции

Последние годы в практике лечения папилломавирусной инфекции особый интерес уделяется иммуномодулирующей терапии, которая оказывается необходимой при длительной персистенции возбудителя, при нарушении различных звеньев системного и местного иммунитета.

В последние годы все большее внимание уделяется применению при комбинированной терапии папилломавирусной инфекции препаратам интерферонов и стимуляторам синтеза эндогенного интерферона (интерфероногенам), из которых наиболее часто применяются (Реаферон, Виферон, Лейкинферон, Неовир, Циклоферон) [В.П. Кузнецов и др., 2002; [М.Г. Романцов, 2012; Н.Д. Медуница, 2012]. Применение данных препаратов обусловлено, во-первых, прямым активирующим действием на клетки мононуклеарно-фагоцитарной системы [Кетлинский и соавт., 2002; Сухих и соавт., 1996; Vilcek J., 2014], во-вторых, они увеличивают экспрессию HLA-генов 1 и 2-го классов и, таким образом, улучшают дифференцировку антигенов Т-лимфоцитами и формирование клонов сенсibilизированных лимфоцитов-эффекторов, в том числе и эффекторов ГЧЗТ [Ф.И. Ершов, 1996], в-третьих,

активируют NK-клетки [А.М. Сорокин и соавт., 2006], неспецифически элиминирующие любые антигенно измененные клетки [В.П. Кузнецов, 2003]. Так как ВПЧ сохраняется в эпителиальных клетках и использование деструктивных методов не гарантирует от рецидивов, перспективным в этом плане является применение интерферонов как в качестве монотерапии, так и в комплексе с другими методами лечения. Установлено, что при применении IFN у пациентов в очагах поражения снижается количество вирусной ДНК (по данным ПЦР), что коррелирует с клиническим улучшением или исчезновением поражений. В то же время данные о применении вышеперечисленных препаратов отчасти противоречивы, и дальнейшее изучение их использования в терапии ПВИ, несомненно, расширит представление и создаст необходимые предпосылки для дифференцированного подхода к терапии вышеуказанной патологии.

В большинстве исследований была показана невысокая эффективность наружного применения IFN. Некоторые авторы считают, что важным показанием для наружного применения IFN является наличие субклинических очагов ВПЧ-инфекции и CIN, особенно вызванных типами ВПЧ высокого онкогенного риска. По данным различных авторов, при системном применении α -IFN полное исчезновение бородавок наблюдается у 11-100% пациентов. В.И. Козлова и А.Ф. Пухнер [2000] наблюдали хорошие результаты при лечении остроконечных кондилом, используя лейкоцитарный интерферон, который вводили в основание кондилом. Положительные результаты объяснялись тем, что IFN, введенный в ткань, вызывает образование «антивирусного белка», который блокирует репликацию вируса, в результате чего окружающие клетки становятся резистентными к этому возбудителю, и тем самым предотвращается дальнейшее развитие патологического процесса. Учитывая, что эффективность системной монотерапии IFN все-таки недостаточно предсказуема и не очень высока, а также принимая во внимание высокую стоимость такого лечения, этот метод не получил широкого распространения в клинической практике [М.А. Гомберг,

2010]. На российском рынке сегодня представлен широкий выбор интерферонов различных производителей, как отечественных, так и зарубежных. Предпочтительнее сегодня использовать рекомбинантные, а не человеческие интерфероны. Есть сообщения об эффективном применении IFN в виде монотерапии [Л.Г. Сычева, А.А. Кубанова, 2010; С.И. Роговская и др., 2014].

Особое место в лечении заболеваний, передающихся половым путем и, в частности вирусных генитальных инфекций занимает цитокиноterapia. В настоящее время одним из самых многогранных, действующим на различные звенья патологического воспалительного процесса препаратом является рекомбинантная форма интерлейкина-2 – Ронколейкин® (ООО «Биотех», СПб) [А.А. Тотолян, 2008; В.К. Козлов, М.В. Лебедев и др., 2012.]. Ронколейкин обладает выраженной плеiotропной иммуностимулирующей активностью, направленной на усиление противобактериального, противовирусного, противогрибкового, противоопухолевого иммунитета и применяется в иммунотерапии различных заболеваний, связанных с иммунодефицитами [В.Н. Егорова, М.Н. Смирнов, 2009]. В акушерско-гинекологической практике Ронколейкин применяется в комплексной терапии гнойных послеродовых заболеваний, для лечения гинекологического сепсиса, острых воспалительных заболеваний матки и придатков, урогенитального микоплазмоза, хламидиоза, герпетических инфекций [И.Е. Зазерская, И.Г. Рябцева, В.Н. Егорова, М.Н. Смирнов, 2008; К.А. Сухих, 2011]. На фоне лечения Ронколейкином при иммунопатологических состояниях наблюдается ликвидация проявлений иммунной недостаточности, прежде всего, в клеточном звене иммунной системы – восстанавливается абсолютная концентрация лимфоцитов и численность субпопуляций Т-хелперов, увеличивается концентрация и функциональная активность NK-клеток и лимфоцитов, несущих рецепторы CD25+, нормализуется значение иммунорегуляторного индекса, улучшаются функциональные характеристики клеточной иммунореактивности, формируется Th-1-девиация

функционирования клеточного и цитокинового профиля, стимуляция клеточной цитотоксичности, переключение синтеза иммуноглобулинов с IgE на IgM и IgG [А.А. Тотолян, 1998; В.К. Козлов, 2002; И.О. Боровиков, 2000]. Таким образом, интерлейкину-2 принадлежит убиквитарная роль в активации и развитии адекватного иммунного ответа и координированном функционировании основных его элементов.

Дифференцированный подход к терапии ПВИ гениталий у женщин

В настоящее время среди клиницистов нет единого мнения относительно тактики ведения пациенток с CIN I степени. Отношение к CIN как к начальной стадии развития рака приводит к неоправданно агрессивному лечению любой патологии шейки матки. Согласно рекомендациям Е.Е. Вишневской, с соавт. [2001], «...слабо выраженная дисплазия эпителия (CIN I), морфологически сохраняющаяся после проведения противовоспалительной терапии, у женщин детородного возраста, подлежит диатермоэлектрокоагуляции. При невидимой зоне трансформации, наличии сопутствующих дисплазии эктропионов, деформаций шейки матки, а также в возрасте свыше 40 лет показано конусовидное или клиновидное иссечение шейки матки (операция Штурмдорфа, Эммета)». Такого же мнения в отношении CIN I придерживается и В.П. Козаченко, считающий, что при отсутствии регрессии заболевания в течение нескольких месяцев пациенткам показана диатермокоагуляция, криодеструкция или лазерное выпаривание патологически измененных участков шейки матки [2010]. Сегодня, когда вирусная этиология цервикальных неоплазий не вызывает сомнений, меняется и точка зрения на лечение CIN I, поскольку доказана высокая вероятность их самопроизвольной регрессии.

Так, А. Ostör [2013], наблюдая за 3529 женщинами с CIN I, лечившимися в королевском госпитале Мельбурна, обнаружил, что у 57% из них отмечена регрессия заболевания, у 32% процесс остался без изменений, в 11% случаев имел место переход CIN I в III и только в 1% случаев - в инвазивный рак. О спонтанной

регрессии в 55,7% случаев вирусологической CIN I в течение 14 лет наблюдения за 530 женщинами сообщил К. Syrjänen [2006]. Прогрессия заболевания отмечена в 14,2% случаев.

При эпителиальной дисплазии средней степени (CIN II) у больных в возрасте до 40 лет, как правило, проводят диатермокоагуляцию, криодеструкцию, лазерную выпоризацию патологически измененных участков шейки матки. Пациенткам с деформацией шейки матки в возрасте более 40 лет показаны ножевая ампутация, диатермо- или лазерная конизация шейки матки. При невизуализируемой зоне трансформации в сочетании с обширным эктропионом, деформацией шейки матки, возрасте свыше 45 лет таким больным выполняют операцию Штурмдорфа. При наличии сопутствующей гинекологической патологии объем операции может быть увеличен до экстирпации матки.

При тяжелой эпителиальной дисплазии шейки матки (CIN III) требуется безотлагательное проведение лечебных мероприятий. Основным методом лечения является конизация (ножевая, диатермическая, лазерная, радиоволновая) шейки матки с последующим тщательным гистологическим исследованием полученного материала. Если по техническим причинам удаление шейки матки через влагалище затруднительно, допустима экстирпация матки [Ю.И. Подистов, К.П. Лактионов, Н.Н. Петровичев, 2013; И.И. Фролова, 2013].

Таким образом, при наличии гистологического подтверждения CIN II и CIN III необходимо применять методы эксцизии или деструкции (рекомендации Международной группы экспертов). Наиболее эффективной при CIN является сочетание деструкции с дополнительной противовирусной и иммуномодулирующей терапией. При CIN I необходим дифференцированный подход к тактике ведения, так при наличии небольшого поражения низкоонкогенными типами вируса возможно простое наблюдение с периодическим обследованием (тесты на ВПЧ, кольпоскопия и др.).

Одновременно обязательно лечение сопутствующих инфекций половых путей, которые играют значительную роль в персистенции вируса в организме.

Латентные формы ПВИ

Тактика ведения пациенток с латентной формой ПВИ до сих пор остается дискуссионной, что ведет к необоснованной агрессивной терапии, зачастую с широким применением системных иммуномодулирующих препаратов [В.Н. Прилепская, 2004]. В настоящее время считается, что самопроизвольное очищение от ВПЧ или смена серотипа происходят в течение 3 лет у 65-70% женщин [ACS, 2012]. Другие данные [НЦ АГП РАМН] свидетельствуют о возможной прогрессии латентной ПВИ в клиническую и субклиническую форму почти в каждом 10 случае (11,9%). Чаще данный процесс происходит на фоне дисбаланса иммунной системы. В связи с этим наиболее оптимальной тактикой ведения женщин с латентной формой ПВИ считается диспансерное наблюдение. Терапия проводится только при появлении клинических и субклинических признаков ВПЧ-ассоциированного заболевания.

Таким образом, резюмируя можно заключить, что в комплексном лечении папилломавирусной инфекции необходимо проводить адекватную комплексную терапию с применением современных деструктивных методов очагов цервикальной интраэпителиальной неоплазии, коррекцию иммунного статуса больных с учетом состояния системного и, в особенности, местного иммунитета, а также обязательную коррекцию нарушений вагинального микробиоценоза.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

I этап	Эпидемиологический анализ ПВИ и заболеваемости ВПЧ-ассоциированной CIN в Краснодарском крае в динамике за 5 лет (2011–2016 гг.), особенности территориального распространения			
	Математический прогноз заболеваемости ВПЧ-ассоциированной CIN в Краснодарском крае			
II этап	Проспективное исследование: формирование исследовательской когорты пациенток (n=460)			
	I группа (латентная форма ПВИ) (n=90)	II группа (CIN I) (n=180)	III группа (CIN II) (n=130)	Контрольная группа (n=60)
III этап	Методы исследования (исследование вагинальной микрофлоры, кольпоскопия, ВПЧ-типирование, ПЦР - E7, p16INK4a, Ki-67), метаболиты эстрогенов (2-OH/16α-OH), цитологический, гистологический)			
	Иммунологическое и цитобиохимическое обследование			
IV этап	Сравнительный менеджмент пациенток с латентными формами ПВИ			
	IV группа (n=45) – латентная форма ПВИ - наблюдение 5 лет		V группа (n=45) – латентная форма ПВИ – LTA+GLA	
V этап	Сравнительная терапия пациенток с CIN I-II			
	Предлагаемая терапия		Традиционная терапия	
	VI группа (n=80) – CIN I – Ферровир + Генферон	VII группа (n=80) – CIN I – rIL2	VIII группа (n=65) – CIN II – радиоабляция + Ферровир + Генферон	IX группа (n=65) – CIN II – радиоабляция + rIL2
Контроль эффективности: клиничко-микробиологический (1, 6, 12 мес., 2-5 лет), иммунобиохимический (4 дня, 1 мес.)				
VI этап	Создание алгоритмов менеджмента пациенток, выводы и практические рекомендации			

Схема 2.1. Дизайн исследования

Представленная диссертационная работа выполнялась по многоэтапной программе на клинических базах кафедры акушерства, гинекологии и перинатологии ГБОУ ВПО «Кубанский государственный медицинский университет» (заведующая кафедрой – д.м.н., профессор Куценко И.И.): Базовая акушерско-гинекологическая клиника КубГМУ, женские консультации №4 и №5 г. Краснодара, Краевой перинатальный центр ГБУЗ ДККБ, а также лаборатории ООО «ВИП Клиник групп», KDL, City-Lab г. Краснодара (схема 2.1).

На первом этапе нами проведен эпидемиологический анализ заболеваемости ВПЧ-ассоциированными цервикальными интраэпителиальными неоплазиями. Моделью настоящего исследования избрана территория Краснодарского края, отличающаяся средним уровнем рождаемости, увеличением доли лиц пожилого и старческого возраста в структуре населения, напряженной экологической обстановкой. В работе применен комплекс методов исследования: эпидемиологический, статистический, медико-географический, социологический, клинико-кольпоскопический, микробиологический, цитологический, гистологический, иммунологический, цитобиохимический. В рамках изучения состояния заболеваемости ВПЧ-ассоциированной CIN на первом этапе проводилось изучение тенденций этих показателей в динамике за 5 лет (2011–2015 гг.) и особенности территориального распространения этой патологии в Краснодарском крае. В целом комплексному анализу подвергнуты сведения о 19354 ВПЧ-носителях и 6702 впервые выявленных больных цервикальной интраэпителиальной неоплазией I-II степени, на основе анализа медицинской документации (паспорт акушерско-гинекологической службы) г. Краснодара и края, что позволило изучить частоту данной патологии, а также заболеваемость CIN среди женского населения в зависимости от возраста и места жительства (городское, сельское население) больных.

Оценка пространственных связей проведена с помощью картографирования. Использование картографирования позволило провести не

только анализ пространственного распределения ВПЧ-носительства и заболеваемости ВПЧ-ассоциированными цервикальными неоплазиями, но и выявить территории с разной степенью интенсивности явлений, на основе которых установлены зоны повышенного риска этого заболевания. Также на данном этапе было изучено состояние первичной профилактики рака шейки матки на территории Краснодарского края и осведомленность населения по данной проблеме. Состояние ВПЧ-вакцинации оценивалось по отчетам Краснодарского краевого центра вакцинации и кабинетов вакцинации на территории частных клиник.

На втором этапе (с 2011 по 2016 год) нами наблюдалось и было обследовано 470 человек. При этом было обследовано 90 пациенток с латентными формами папилломавирусной инфекции, обследовано и пролечено 320 больных женщин с ПВИ генитальной зоны в виде цервикальной интраэпителиальной неоплазии I и II степени. В контрольную группу вошло 30 здоровых женщин (группа иммунологического контроля) аналогичного возраста, семейного и социального положения, обращавшихся в женские консультации при профилактических осмотрах, по поводу планирования беременности, а также через 6 месяцев после излечения от заболеваний, передающихся половым путем. В работе с пациентками соблюдались этические принципы, предъявляемые Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы научных и медицинских исследований с участием человека» (с поправками 2008 года), «Правилами клинической практики в Российской Федерации» (Приказ Министерства здравоохранения и социального развития РФ №266 от 19.06.2003 г.), Национальным стандартом РФ «Надлежащая клиническая практика» (2005). Все пациентки дали информированное согласие на участие в исследовании и публикацию его результатов в открытой печати, ознакомлены с целью и дизайном работы. План исследования был одобрен

этическим комитетом ФГБУ ВО КубГМУ (выписка из протокола локального этического комитета №4 от 23.03.2016г.).

Для выявления риск-факторов папилломавирусной инфекции половых органов производился опрос по специально созданной анкете. Особое внимание уделялось изучению анамнеза, особенностей менструальной и репродуктивной функции, возрасту начала половой жизни, ее регулярности, методов контрацепции, наличию вредных привычек (курения).

Таблица 2.1. Критерии выборки пациентов

Критерии включения
Наличие диагностированной ВПЧ-ассоциированной цервикальной интраэпителиальной неоплазии легкой и средней степени
Отсутствие терапии иммуномодулирующими препаратами в течение последних 6 месяцев
Пролеченные до начала исследования или во время наблюдения инфекции, передающиеся половым путем (ИППП)
Способность, по мнению исследователя, выполнять требования протокола
Предоставление письменного информированного согласия
Отсутствие обострения в момент обследования и лечения хронической гинекологической патологии (ВЗОМТ вне обострения)
Критерии исключения
Возраст больных до 18 лет и старше 50 лет
Нарушение функции почек, что устанавливается при наличии уровня креатинина больше 1,5 мг/мл, или вычисленного клиренса креатинина меньше 30 мл/мин
Нарушение функции печени, что устанавливается при наличии уровня АлАТ и АсАТ, превышающего более чем в 1,5 раза верхнюю границу нормы
Положительный тест на беременность
Женщины, планирующие беременность в период приема лекарственных средств
Гиперчувствительность к иммуномодуляторам

На протяжении всего исследования женщины использовали барьерные методы контрацепции и вели дневник, в котором отмечались побочные эффекты терапии, их выраженность и продолжительность. Через 1 месяц (визит 2) после

начала терапии проводились Pap-тест, кольпоскопия, Digene-тест, бактериоскопический и бактериологический анализ содержимого влагалища, осуществлялась ПЦР-диагностика на основные группы урогенитальных инфекций в соскобе эпителия цервикального канала. Через 6 и 12 месяцев (3 и 4 визит), а затем 1 раз в 12 месяцев (5, 6, 7 и 8 визиты – всего на протяжении 5 лет) женщинам, включенным в исследование, проводились Pap-тест, Digene-тест и кольпоскопия, проверялись дневники, где были записаны все препараты, которые пациентки принимали на протяжении исследования с момента подписания информированного согласия до заключительного визита. Оценивались локальные и системные эффекты, которые могли бы быть связаны с использованием препарата. Переносимость и безопасность препарата оценивались по частоте и выраженности нежелательных явлений. Возможность досрочного выбывания из исследования была предусмотрена на любом этапе клинических испытаний – как по инициативе пациентки, так и по инициативе исследователя.

В I группу были включены пациентки с латентными формами папилломавирусной инфекции, во II и III группы включались больные с цервикальной интраэпителиальной неоплазией, соответственно, легкой и средней степени. Из исследования исключались женщины с эндокринной патологией, в том числе больные сахарным диабетом, выраженными нарушениями функции щитовидной железы, с тяжелой соматической патологией (табл. 2.2). Причины выбывания указывались в истории болезни и индивидуальной регистрационной карте (ИРК). В случае применения противовирусных и других иммуномодулирующих препаратов в процессе исследования, пациентка исключалась из исследования. ИРК пациенток заполнялась на основании опроса и осмотра, данных клинического обследования и лабораторных исследований. Диагноз ВПЧ-ассоциированной цервикальной интраэпителиальной неоплазии

ставился на основании комплексного клинико-микробиологического исследования.

2.1. Клинические методы исследования

При обследовании пациентов выяснялись жалобы, анамнез заболевания, сексуальный анамнез. Проводился осмотр наружных половых органов, осмотр в зеркалах и бимануальное исследование внутренних женских половых органов, УЗИ органов малого таза, расширенная кольпоскопия, исследование мазков на онкоцитологию. Проводилось комплексное клинико-лабораторное обследование больных в соответствии с протоколом исследования. Полученные данные вносились в регистрационную карту (см. приложение №1).

Все больные подвергались серологическому обследованию на сифилис и ВИЧ (*HIV*), вирус простого герпеса (*HSV*), цитомегаловирус (*CMV*), вирус Эпштейн-Барра (*EBV*).

Всем пациентам производился общий анализ крови и мочи, а также определение концентрации сахара в крови и моче, биохимический анализ крови. В качестве первичного материала использовали соскоб из цервикального канала и слизистой уретры с изготовлением мазка без окраски и с окраской метиленовым синим и по Граму, а также взятие мазка на онкоцитологию. Определялись показатели рН-метрии вагинального отделяемого.

Все лабораторные исследования, в том числе исследование показателей местного и системного иммунитета, оксидативной системы цервикальной зоны в группах больных проводились до лечения, через 4 дня и 1 месяц после окончания курса терапии.

Метод интегральной субъективно-объективной балльной оценки клинических симптомов заболевания.

Ввиду того, что группы по всем исследованным параметрам были однородными, нами, без определения достоверной массовой доли каждого исследуемого признака, для суждения о клиническом состоянии больной был

разработан метод интегральной субъективно-объективной балльной оценки (0 баллов – отсутствие симптома, 1 балл – средняя степень выраженности симптома, 2 балла – выраженная симптоматика) жалоб и клинических симптомов заболевания, представленных в каждой группе. При этом исследователь может количественно в динамике оценивать, как интенсивность каждого симптома, так и суммарную интегральную балльную оценку клинического состояния. Если балльная оценка каждого из мониторируемых объективных и субъективных показателей, отражающих тот или иной симптом или синдром заболевания, в особенности в динамике, позволяет оценить ведущие проявления, а также влияние каждого терапевтического фактора на саногенетический процесс, то сумма балльной оценки субъективной и объективной симптоматики является интегральным показателем интенсивности клинических проявлений болезни и ее исследование в динамике мониторинга позволяет отразить действительную клиническую эффективность терапии и сроки возникновения рецидивов как индивидуально, так и в среднем по группе. Степень выраженности симптоматики, хотя и является достаточно субъективным фактором, но при совместной оценке своих ощущений пациентом и при динамическом наблюдении за данной симптоматикой специалистом, по нашему мнению, можно дать весьма объективную оценки динамики развития патологического процесса и клинической эффективности проводимой терапии. Регистрация индивидуальной интегральной субъективно-объективной балльной оценки проводилось по формуле согласно методам вариационной статистики [Стентон Гланц., 1999]: $БИ = (B_1 + B_2 + \dots + B_n) / n$, где $БИ$ – интегральная балльная оценка отдельного пациента; B_1, B_2, B_n - балльная оценка каждого признака.

2.2. Диагностика папилломавирусной инфекции

Диагностика ПВИ проводилась в несколько этапов:

1. Клинико-визуальная диагностика, заключающаяся в осмотре наружных половых органов, перианальной области; осмотр половых путей в зеркалах.

2. Расширенная кольпоскопия, включающая осмотр и ревизию состояния слизистой оболочки шейки матки, влагалища и вульвы при увеличении микроскопа в 7-30 раз и применении определенных тестов для оценки реакции тканей в ответ на их обработку различными препаратами.

Таблица 2.2. Клинико-кольпоскопический индекс [Shafi M., Naser S., 2006]

Кольпоскопический признак	0 баллов	1 балл	2 балла
Данные цитологии	LSIL	-	HSIL
Курение	Нет	-	Да
Возраст	Менее 30 лет	Более 30 лет	-
Степень побеления после уксусной кислоты	Слабая	Выраженная	-
S поверхности поражения	Менее 1 см	Более 1 см	-
Межкапиллярная дистанция	Менее 350 нм, нежная мозаика и пунктация	Более 350 нм, грубая мозаика и пунктация	-
Очаговость поражения	Очаговое или многоочаговое поражение	Сплошное	-
Характер поверхности	Гладкая	Неровная	-

Для выявления признаков CIN проводили пробу с раствором Люголя (проба Шиллера) и с раствором 3-5% уксусной кислоты. Кольпоскопия проводилась при помощи кольпоскопа Carl Zeiss OPMI PICO (Germany), с использованием традиционных сосудистых тестов и увеличением $\times 7,5$, $\times 15$, $\times 30$. Интерпретация данных проводилась согласно Международной кольпоскопической классификации (Рио-де-Жанейро, 2011) (табл. 2.3).

Таблица 2.3. Международная классификация кольпоскопических терминов (Рио-де-Жанейро, 2011).

Шейка матки	
Общая оценка	☐ Удовлетворительная кольпоскопия (стык многослойного плоского и цилиндрического эпителия визуализируется) ☐ Неудовлетворительная кольпоскопия (стык многослойного плоского и цилиндрического эпителия не визуализируется). Причина: воспаление, кровотечение, рубцовые изменения и т.д. ☐ Зона трансформации тип 1, 2, 3
Нормальная кольпоскопическая картина	☐ Оригинальный многослойный плоский эпителий o Зрелый o Атрофичный ☐ Цилиндрический эпителий

	о Эктопия ☐ Метапластический плоский эпителий (зона трансформации) о Наботовы кисты о Открытые выводные протоки желез ☐ Децидуоз при беременности	
Аномальная кольпоскопическая картина	Общие принципы оценки	Оценка локализации поражения: В зоне трансформации или вне зоны трансформации; локализация поражений по часам условного циферблата Оценка размеров поражения: Количество квадрантов, в пределах которых локализуется поражение, размеры поражения в процентах от всей поверхности шейки матки
Стадия 1 Незначительные поражения	Тонкий ацето-белый эпителий. Неравномерные, «географические» границы	Нежная мозаика. Нежная пунктация
Стадия 2 Значительные поражения	Плотный ацето-белый эпителий. Быстрое появление ацето-белого эпителия. Валикообразный ободок вокруг выводных протоков желез	Грубая мозаика. Грубая пунктация. Четкие границы. Возвышение над уровнем слизистой оболочки
Стадия 3 Не специфические	Лейкоплакия (кератоз, гиперкератоз). Эрозия. Окрашивание р-ром Люголя: окрашивается/не окрашивается	
Кольпоскопическая картина, подозрительная на инвазивную карциному	Атипичные сосуды Дополнительные признаки: Хрупкие сосуды, неоднородная поверхность, экзофитные поражения, некроз, изъязвление, опухолевидное /крупное новообразование	
Другие кольпоскопические картины	Врожденная зона трансформации. Кондилома. Полип (эндоцервикальный/ экзоцервикальный). Воспаление	Стеноз. Врожденная аномалия. Состояние после лечения. Эндометриоз. Прочее
Шейка матки (дополнение)		
Тип эксцизии	Эксцизия тип 1, 2, 3	
Размеры иссеченного участка	Длина – расстояние от дистального/наружного до проксимального/внутреннего края Толщина – расстояние от поверхности, покрытой эпителием, до стромальной поверхности Окружность (выборочно)- периметр иссеченного участка	

Для унификации полученных результатов рассчитывали клинико-кольпоскопический индекс по методике Shafi M., Nazeer S. [Colposcopy. Apracticalguide. - 2006] и модифицированный кольпоскопический индекс Рейда. Максимальное количество баллов, которое может быть получено при использовании данного метода - 10 (табл. 2.4-2.5).

Таблица 2.4. Модифицированный кольпоскопический индекс Рейда*(КИР, RCI)

Кольпоскопические признаки	0 баллов	1 балл	2 балла
Цвет	Слабое, неполное побеление, прозрачная или полупрозрачная поверхность при воздействии уксусной кислотой. Ацетобелое окрашивание за пределами зоны трансформации. В пределах зоны трансформации – белоснежная окраска с блестящим отливом (редко)	Промежуточный оттенок – светло-серое окрашивание и блестящая поверхность (большинство повреждений)	Тусклая, непрозрачная, мутно-белая поверхность; серое окрашивание
Состояние краев повреждения и форма поверхности	Микрокондиломатозные или микропапиллярные образования ¹ . Плоские образования с нечеткими краями. Перистые или фестончатые края. Угловатые, зубчатые образования ³ . Сопутствующие образования за пределами зоны трансформации	Правильной формы, симметричные образования с гладкими, ровными контурами	Закрученные, отслоенные края ² . Внутренняя демаркация между участками с разными кольпоскопическими явлениями – с серьезными изменениями в центре и более слабыми по периферии
Сосуды	Тонкие сосуды одного калибра ⁴ , расположенные на одинаковом близком расстоянии друг от друга. Слабо выраженная нежная пунктация и/или мозаика. Сосуды видны за пределами зоны трансформации. Тонкие сосуды внутри микрокондилом или микропапиллярных образований	Отсутствие сосудов	Ярко выраженная грубая пунктация или мозаика, четко отграниченная ⁵ , широко и неравномерно разбросанная
Окрашивание йодом	Положительная реакция – бурокоричневое окрашивание. Отрицательная реакция – желтым цветом окрашиваются мелкие	Частичная реакция – неоднородное,	Большие йод-негативные участки – желтым цветом окрашиваются

	образования, оцененные в 3 и менее балла по предыдущим критериям. Йоднегативные участки за пределами зоны трансформации (часто вследствие паракератоза)	пестрое окрашивание	повреждения, уже оцененные в 4 и более бала по предыдущим критериям
--	---	---------------------	---

* - кольпоскопический индекс подразумевает пробы с 5% уксусной кислотой и раствором Люголя

1 – микроэктофитная поверхность, указывающая на очевидный рак, не включена в шкалу.

2 – эпителий по краям отслаивается от подлежащей стромы и сворачивается в трубочку.

3 – оценка 0 баллов, даже если края частично имеют ровные контуры.

4 – иногда участки мозаики с центральными сосудами имеют слабые гистологические отклонения. На эти незначительные отклонения сосудистого рисунка можно не обращать внимания.

5 – ветвящиеся атипические сосуды, указывающие на очевидный рак, не включены в шкалу.

Таблица 2.5. Кольпоскопический прогноз гистологического заключения по индексу Рейда

Количество баллов	Гистология
0-2	вероятно, CIN I
3-4	CIN I или CIN II
5-8	вероятно, CIN II-III

3. Цитологический метод диагностики папилломавирусной инфекции.

Забор материала проводился при помощи одноразовой цервикальной щеточки (cervix-brush). Нами выбран вариант жидкостной цитологии - ThinPrep® (ThinPrep 5000) с технологией контролируемого мембранного переноса. Окраска препаратов производлась по методу Папаниколау (Pap-smear test) гематоксилином, фосфорновольфрамовой кислотой и оранжевым G, а затем световым зеленым, бисмарком коричневым и эозином Y [Roberts J., Gurley A., Thurlow J. et al., 1997]. Для оценки результатов цитологического исследования принята классификация Папаниколау. До исследования были намеренно исключены женщины, у которых выявлялись CIN III и цито-гистологически подтвержденные онкологические заболевания шейки матки (carcinoma in situ (CIS), инвазивный рак шейки матки, аденокарцинома).

Обязательным критерием для цитологической оценки было выявление такого критерия соскоба, как "удовлетворительный" или

"неудовлетворительный". "Удовлетворительные" образцы должны содержать как минимум 8000-12000 хорошо визуализируемых плоских клеток в традиционном мазке и 5000 плоских клеток в жидкостном образце, кроме того, обязательно наличие компонентов эндоцервикса или зоны трансформации, которые должны были представлены не менее 10 хорошо сохраненными эндоцервикальными или метапластичными клетками. Также описание цитологической оценки включает наличие инфекции, реактивные изменения (связанные с воспалением, включая репаративные; атрофию с воспалением; изменения, связанные с внутриматочной спиралью и др.). В данном исследовании "удовлетворительный" для оценки характер образца был обязательным условием.

4. ПЦР диагностика папилломавирусной инфекции. Тест-система «АмплиСенс® FRT ВПЧ ВКР Генотип» (Россия) (набор реагентов для выявления и генотипирования вируса папилломы человека (ВПЧ) высокого канцерогенного риска (ВКР) 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 и 59 типов) с детекцией в режиме реального времени. Метод основан на одновременной амплификации (мультиплекс-ПЦР) участков ДНК E1-E2 генов трех групп ВПЧ и участка ДНК β -глобинового гена, используемого в качестве эндогенного внутреннего контроля. ПЦР-анализ на наличие ДНК 14 типов ВПЧ проводится в одной пробирке. Все амплифицируемые фрагменты имеют сходную длину.

5. Патогистологическое исследование. Гистологическое исследование биоптата пораженных участков шейки матки (экзоцервикса и соскобов эндоцервикса) проводилось с целью уточнения диагноза и исключения низкодифференцированных клеток (малигнизации). Цервикобиоптаты помещали в фиксатор (10%-й формалин на фосфатном буфере при pH=7,2-7,4) на 18-20 часов. Для гистологических резки объектов применяли ротационный микротом-полуавтомат НМ-340Е с системой водного переноса срезов STS (Microm, Германия). С целью проведения обзорной микроскопии материала применяли

окраску гематоксилином и эозином. Микроскопия проводилась в световом микроскопе (Carl Zeiss, Германия). Во всех случаях были выявлены все морфологические признаки ПВИ:

- ✓ в поверхностных эпителиальных клетках наличие койлоцитов - вакуолизация цитоплазмы с перинуклеарным «галом» на фоне гиперхромии и пикноза ядер, а также базальноклеточная гиперплазия;
- ✓ утолщение различной степени многослойного плоского эпителия с признаками гипер-, пара-, и акантоза подлежащих тканей, а также явлениями хронической воспалительной инфильтрации.

Оценка патоморфологического исследования проводилась по общей классификации.

6. Определение онкобелка E7. Исследовали в биоптатах пораженных участков шейки матки и цервикального канала. Количественное измерение онкобелка E7 в цервикальных пробах проводили с использованием иммуноферментной тест-системы НПФ "МираксФарма" (Россия), основанной на методе двойного антительного сэндвича на основе МКАТ 716-281 и 716-332 с ферментативной меткой для количественного определения онкобелка E7 ВПЧ-16 в клиническом материале.

Таблица 2.6. Характеристика праймеров и зондов к ВПЧ-специфическим нуклеотидным последовательностям

ВПЧ- генотип	Праймер /зонд	Последовательность олигонуклеотида 5'-3'
E7 ВПЧ 16	прямой	CATGGAGATACACCTACATTGCAT
	обратный	AGTGTGCCCATTAACAGGTCTT
E7 ВПЧ 18	прямой	TAAGGCAACATTGCAAGACATT
	обратный	GGGCTG GTAAATGTTGAT GATT
E7 ВПЧ 31	прямой	GAGAAACACCTACGTTGCAAGA
	обратный	GTAATTGGATGTGTCCGGTTCT

Кроме того, проводили выявление мРНК вирусных онкогенов E7 методом ПЦР, сопряженной с обратной транскрипцией, с использованием соответствующих комплектов реагентов НПО «ДНК-технология» и «Силекс» (Москва) согласно

инструкциям производителей (рис. 2.6). Продукты амплификации визуализировали методом электрофореза в 2% агарозном геле.

7. Определение маркера p16 ВПЧ ВКР. Материалом для исследования служили образцы цервикального эпителия, забранные с использованием одноразовых цервикальных цитощеток Cervix-brush и Cyrobrush в транспортную среду «Cytoscreen System» («Seroa», Италия) для жидкостной цитологии и в транспортную среду «Ампли Сенс» («Интерлабсервис», Россия) для забора материала из урогенитального тракта женщины. Клеточная суспензия обрабатывалась на цитоцентрифуге с формированием двух мазков. Количество помещаемой клеточной суспензии, скорость и ускорение центрифугирования определяли в зависимости от густоты исследуемого материала. Под действием центробежной силы клетки осаждались на стекле на участке около 0,5 см в диаметре с формированием монослойного мазка. Жидкость в процессе центрифугирования поглощалась одноразовым фильтром. Первый из мазков окрашивали экспресс-красителем MGG, результаты окрашивания аналогичны получаемым в методе Май Грюнвальд-Гимза, второй подвергался иммуноцитохимическому исследованию на белок p16. Иммуноцитохимическое исследование выполнено при помощи наборов Cintec «Цитология» компании «Биолайн» эксклюзивного дистрибьютора компании «MTM laboratories AG» (Германия). Реакцию считали позитивной, если хотя бы одна диспластическая клетка оказывалась позитивной на p16. Оценивались ядерная реакция, ядерная реакция совместно с цитоплазматической. Результаты жидкостной цитологии сопоставлялись с результатами традиционной.
8. Иммуногистохимическое исследование пролиферативной активности по экспрессии Ki-67. Забор материала для данного исследования происходит одновременно с жидкостной цитологией. Инкубация с первичными антителами к Ki-67 (клон MIB-1, «Дак») в разведении 1:400 длилась в течение 20 мин при комнатной температуре. Рассчитывали индекс пролиферативной активности (ИПА) как процентное отношение числа Ki-67-позитивных клеток ($\times 400$) к общему числу клеток в

проанализированных полях зрения.

9. Соотношения метаболитов 2-OHE1/16- α OHE1 в моче определяли с использованием тест-системы ESTRAMET 2/16 ELISA (конкурентный метод твердофазного иммуноферментного анализа).

Окончательная идентификация возбудителя папилломавирусной инфекции проводилась в лабораториях *ООО "ВИП КлиникГрупп"* г. Краснодара.

2.3. Микробиологические методы исследования

У всех пациенток проводилось исследование на наличие гонококковой инфекции - после комбинированной провокации (биологическая, химическая, алиментарная) проводилось бактериоскопическое и бактериологическое (посев на мясопептонную среду и среду ЦКВИ) обследование. Оценку состояния флоры влагалища с применением четырех степеней ее чистоты, проводили по унифицированной схеме Херлена. Для выявления трихомонад исследовались нативные и окрашенные 1% водным раствором метиленового синего препараты, и проводился посев отделяемого на питательные среды.

Диагностику инфицированности хламидийной инфекцией, микоплазмами и уреаплазмами проводили методом ПЦР с соответствующими тест-системами *ЗАО "Внедрение систем в медицину"* (Россия).

Диагностику инфицированности различными видами *Candida spp.* проводили методом прямой микроскопии и культуральным методом (автоматизированная система *"API 20 C Aux"*, Франция). Также определялся pH среды влагалища.

Клинические (косвенные) методы диагностики дисбиозов

К ним относят определение pH влагалища и аминотест. Эти тесты дают информацию об изменениях химических свойств вагинального отделяемого как результата дисбиоза вагинальной микрофлоры. При этом чувствительность и специфичность этих тестов не превышает 40%. *pH-метрия отделяемого влагалища*. Влагалищный pH - это показатель кислотно-щелочного баланса среды

влажалища женщины, выраженный в условных единицах измерения. Он замерялся непосредственно во влажалище, на поверхности влажалищного зеркала (индикаторная pH бумага с эталонной шкалой).

Аминотест (проба с KOH): в каплю вагинальной жидкости, нанесенной на предметное стекло, вносят каплю 10% KOH. В состоянии бактериального вагиноза вагинальное содержимое часто имеет запах гнилой рыбы, обусловленный выработкой диаминов (путресцин, кадаверин, триметиламин) в процессе декарбоксилирования аминокислот облигатными анаэробами. В нашем исследовании мы использовали экспресс-тест FemExam G. vaginalis Pip, который основан на определении пролин-аминопептидазной активности анаэробных бактерий, преимущественно *G. vaginalis*, в вагинальных выделениях. Чувствительность теста составляет от 89 до 92% [Calder E., Rivera R., 2007]. Тест выполняется на месте и результат его бывает готов менее чем за две минуты.

Прямые методы лабораторной диагностики вагинальной микрофлоры

Микроскопический, культуральный методы и ПЦР относят к прямым методам лабораторной диагностики. Они применяются для оценки вагинального микробиоценоза.

Микроскопический (бактериоскопический) метод.

Диагностика основывается на оценке состояния микроценоза влажалища по результатам комплексного исследования: микроскопии вагинальных мазков, окрашенных по Граму, и культурального исследования влажалищного содержимого. Оценку состояния флоры влажалища с применением четырех степеней ее чистоты, проводили по унифицированной схеме Херлена. Микроскопию вагинального отделяемого, провели всем без исключения обследованным женщинам до начала терапии. Всего было изучено 470 образцов.

При оценке микроскопической картины принимали во внимание количество и тип эпителиальных клеток, количество лейкоцитов, характер микрофлоры.

Классификацию микробиоценоза влагалища по результатам микроскопического исследования проводили в соответствии с рекомендациями Кира Е.Ф. (2001).

1. Нормоценоз - доминирование лактобацилл, отсутствие грамотрицательной микрофлоры, спор и мицелия дрожжеподобных грибов, наличие единичных лейкоцитов и «чистых» эпителиальных клеток, соответствующих фазе менструального цикла.

2. Промежуточный тип - умеренное или сниженное количество лактобацилл, наличие кокков. Обнаруживаются лейкоциты, моноциты, макрофаги, эпителиальные клетки. Является пограничным типом, часто наблюдается у здоровых женщин, редко сопровождается субъективными жалобами и клиническими проявлениями.

3. Дисбиоз влагалища - незначительное количество или полное отсутствие лактобацилл, обильная полиморфная грамотрицательная и грамположительная палочковая и кокковая микрофлора; наличие «ключевых клеток». Количество лейкоцитов варьиabelно, отмечается отсутствие или незавершенность фагоцитоза.

4. Вагинит (воспалительный тип мазка) - полимикробная картина мазка с большим количеством лейкоцитов, макрофагов, эпителиальных клеток, отмечается выраженный фагоцитоз. При обнаружении гонококков, трихомонад, мицелия, псевдогифов, спор выставляется соответствующий этиологический диагноз. В случае отсутствия этиологически значимых микроорганизмов при таком варианте микроскопической картине пациенткам ставят диагноз неспецифического вагинита.

Современная микроскопия позволяет выявить до 10 морфотипов микроорганизмов, обитающих во влагалище, включая *Lactobacillus spp.*, *Gardnerella vaginalis*, *Bacteroides spp.*, *Mobiluncus spp.*, *Leptotrichia spp.*, *Fusobacterium spp.*, *Veillonella spp.*, *Candida spp.*, грамположительные и грамотрицательные кокки, грамотрицательные палочки. Учитывают показатели:

характер вагинального эпителия, количество эпителиальных клеток в поле зрения, наличие «ключевых клеток»), наличие лейкоцитарной реакции, общую микробную обсемененность, морфологический состав микрофлоры и приблизительное количественное соотношение микробных морфотипов, в том числе наличие дрожжеподобных грибов, бластопоры или их мицелия. При микроскопии невозможно идентифицировать ряд значимых в патологии возбудителей, что обусловлено либо их малыми размерами (*Chlamydia trachomatis*), отсутствием клеточной стенки (*Mycoplasma spp.* и *Ureaplasma spp.*) или выраженной полиморфностью (*Atopobium vaginae*).

Культуральный (бактериологический) метод.

Чувствительность культурального метода исследования в диагностике вагинального дисбиоза составляет около от 25% до 60%, специфичность -около 90%. Данный метод трудоемок и продолжителен по времени (до 7-10 дней) и требует высокой квалификации врачей-бактериологов. Проведение микробиологического анализа предусматривает определение видового и количественного состава бактериальной микрофлоры влагалища. В большинстве лабораторий формат выдачи результатов бактериологического исследования подразумевает точность 1-2 т.е. «разброс» данных в 10-100 раз.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

Выявление условно-патогенных микроорганизмов (УПМ) влагалища, с помощью качественной ПЦР нецелесообразно. Доказана возможность присутствия в составе нормального микробиоценоза влагалища клинически здоровых женщин множества различных УПМ. Имеются данные о значении в патологии влагалища полимикробных ассоциаций. Для оценки этиологической роли того или иного микроорганизма необходимо учитывать количество микробных клеток и его долю в общей бактериальной массе. Определение количества микробных клеток в пробе возможно с помощью ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени — real-time PCR (ПЦР-РВ).

Таблица 2.7. Комплектация набора реагентов Фемофлор, маркировка и состав стрипов со смесью для амплификации

Фемофлор 16			
№ пробирки в ПО	название смеси	цвет буфера	цвет парафина
Стрип 1			
A	Общая бактериальная масса	голубой	белый
B	Нормофлора - <i>Lactobacillus spp.*</i> /БК	бесцветный	
C	<i>Enterobacterium spp.</i>		
D	<i>Streptococcus spp.</i>		
E	<i>Staphylococcus spp.</i> /Маркер		
F	<i>Gardnerella vaginalis</i> /Prevotella bivia /Porphyromonas spp.		
G	<i>Eubacterium spp.</i>		
H	<i>Sneathia spp.</i> /Leptotrihia spp. /Fusobacterium spp.		
Стрип 2			
A	<i>Megasphaera spp.</i> /Veillonella spp. /Dialister spp.	голубой	голубой
B	<i>Lachnobacterium spp.</i> /Clostridium spp.	бесцветный	
C	<i>Mobiluncus spp.</i> /Corynebacterium spp.		
D	<i>Peptostreptococcus spp.</i>		
E	<i>Atopobium vaginae</i>		
F	<i>Mycoplasma genitalium</i> + hominis		
G	<i>Ureaplasma (urealyticum</i> + parvum)		
H	<i>Candida spp.</i> /контроль взятия материала /Маркер		

* Под spp. подразумевается широкая группа микроорганизмов, которая относится к данному роду, но может не соответствовать полностью роду в его систематическом понимании.

Метод позволяет быстро (анализ проводится в течение дня), с высокой точностью не только выявить участников микробиоценоза влагалища, но и определить их абсолютное количество. Также, есть возможность расчета доли конкретного микроорганизма относительно суммы всех выделенных. Это позволяет более точно определить этиологическую роль условно-патогенного агента в возникновении патологии у данного пациента. ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени отличается от традиционного бактериологического исследования тем, что не требует особых условий по транспортировке и хранению биоматериала (причем без потери качества

проводимого исследования), обладает высокой аналитической чувствительностью и специфичностью.

Исследование вагинального биоценоза данным методом позволяет: определять общую микробную обсемененность биотопа; выявлять микроорганизмы, являющимися участниками вагинального микробиоценоза; выявлять трудно культивируемые облигатно-анаэробные микроорганизмы; сравнивать количество представителей различных групп УПМ, нормофлоры и общей бактериальной массы (ОБМ). Для оценки микробиоценоза влагалища методом ПЦР-РВ использовали набор реагентов Фемофлор (ООО "НПО ДНК-Технология", Москва). Всего было изучено 380 вагинальных образцов. Набор реагентов Фемофлор предназначен для выявления ДНК условно-патогенных микроорганизмов, лактобацилл и геномной ДНК человека (в качестве контроля взятия биологического материала) (табл. 2.7). использовался детектирующий амплификатор ДТ-96 (ООО "НПО ДНК-Технология", Москва).

Количественная оценка урогенитальной биоты проводилась в абсолютных и относительных показателях. Абсолютный показатель количества исходной ДНК рассчитывали методом прямого сравнения графиков накопления (Ср). В абсолютных значениях выражали следующие показатели: контроль взятия материала (КВМ), общую бактериальную массу, содержание *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma spp. (urealyticum+parvum)*, *Candida spp.* Диагностически значимый показатель для *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma spp.* был принят 10^4 ГЭ/мл, *Candida spp.* - 10^3 ГЭ/мл, что соответствовало принятым критериям (10^4 КОЕ/мл и 10^3 КОЕ/мл) для количественной оценки данных микроорганизмов при бактериологическом исследовании. Для количественной оценки нормофлоры и УПМ использовали относительные показатели, которые рассчитывали, как разницу логарифмов по основанию 10, по формуле: $\log_{10}(-) = \log_{10}x - \log_{10}y$.

Таблица 2.8. Количество микроорганизмов, определяемых в отрицательном контрольном образце

Фемофлор 16		
№	Название микроорганизма	Кол-во в К, Lg
	Общая бактериальная масса	не более 3,5
1	<i>Lactobacillus spp.</i>	не более 2,5
2	<i>Сем. Enterobacteriaceae</i>	не более 2,5
3	<i>Streptococcus spp.</i>	не более 2,5
4	<i>Staphylococcus spp.</i>	не более 2,5
5	<i>Gardnerella vagmalis /Provotella bivia /Porhylomonas spp.</i>	не более 2,5
6	<i>Eubacterium spp.</i>	не более 2,5
7	<i>Sneathia spp. /Leptotrihia spp. / Fusobactenum spp.</i>	не более 2,5
8	<i>Megasphaera spp. /Veillonella spp. /Diahster spp.</i>	не более 2,5
9	<i>Lachnobacterium spp. /Clostridium spp.</i>	не более 2,5
10	<i>Mobiluncus spp. /Corynebactenum spp.</i>	не более 2,5
11	<i>Peptostreptococcus spp.</i>	не более 2,5
12	<i>Atopobium vaginae</i>	не более 2,5
13	<i>Mycoplasma (hominis + gemtalium)</i>	Отсутствует
14	<i>Ureaplasma (urealyticum + parvum)</i>	Отсутствует
15	<i>Candida spp.</i>	не более 3,0

Относительный показатель нормофлоры представлял собой разницу логарифмов, полученных для общей бактериальной массы и нормофлоры. При величине данной разницы >1 расценивали снижение нормофлоры как значительное. Относительный показатель условно-патогенной микрофлоры представлял собой разницу логарифмов нормофлоры и конкретного микроорганизма и в норме должен быть не менее 3. Анализ результатов лабораторного заключения, позволяет учитывать взаимное содержание (доли) нормофлоры и УПМ. С целью оценки долевого содержания нормофлоры и УПМ рассчитывали сумму всех выделенных микроорганизмов. Для объективизации полученных данных и удобства интерпретации результатов, долю нормофлоры и УПМ рассчитывали, как процентное отношение абсолютного ее количества к

сумме всех выделенных микроорганизмов. Объективная оценка состояния вагинального микробиоценоза проводилась с помощью дискриминантного анализа, при этом была разработана линейная модель, включающая доли нормофлоры и УПМ (облигатных и факультативных анаэробов).



Схема 2.1. Алгоритм формирования микробиологического заключения

Интерпретация результатов ПЦР-РВ (схема 2.1):

1. абсолютный нормоценоз - доля нормофлоры в составе микробиоценоза было более 80%, а условно-патогенной микрофлоры менее 20%. В составе

микробиоценоза, *Candida spp.*, *Ureaplasma spp.*, *Mycoplasma spp.* менее 10^4 ГЭ/мл.

2. условный нормоценоз - содержание нормофлоры более 80%. *Candida spp.*, *Ureaplasma spp.* или *Mycoplasma spp.* более 10^4 ГЭ/мл.
3. умеренный дисбиоз - нормофлоры в составе микробиоценоза было более 20-80%, а условно-патогенной микрофлоры более 20%.
4. умеренный аэробный дисбиоз - факультативных анаэробов более 10% в составе микробиоценоза.
5. умеренный анаэробный дисбиоз - доля облигатных анаэробов более 10% в составе микробиоценоза.
6. умеренный аэробно-анаэробный дисбиоз - доля как факультативных анаэробов, так и облигатных анаэробов более 10%.
7. выраженный дисбиоз (выраженные инфекционно-воспалительные заболевания влагалища, ассоциированные с условно-патогенной микрофлорой) - снижение доли нормофлоры менее 20% и увеличение доли условно-патогенной микрофлоры более 80%.
8. выраженный аэробный дисбиоз — доля факультативных анаэробов более 10% в составе микробиоценоза.
9. выраженный анаэробный дисбиоз — доля облигатных анаэробов более 10%.
10. выраженный аэробно-анаэробный дисбиоз - как факультативных анаэробов, так и облигатных анаэробов более 10%.

Алгоритм интерпретации результатов ПЦР-РВ позволяет учесть не только качественный и количественный состав вагинальной микрофлоры, но и доленое участие каждой группы микроорганизмов в формировании микробиоценоза влагалища. Диагностическая чувствительность данного исследования для выявления дисбиотических состояний составляет 88,7%, специфичность - 89,6%.

2.4. Исследование состояния системных и местных параметров иммунной системы

Цитохимические показатели клеток мононуклеарно-фагоцитарной системы слизистой цервикального канала

Соскоб из цервикального канала переносился в пробирки с 0,7 мл 0,5% раствора Na_2 ЭДТА, центрифугировался. В мазках определяли цитологический состав и цитохимическим методом выявляли активность миелопероксидазы, кислой фосфатазы и неспецифической эстеразы макрофагов.

Активность миелопероксидазы в макрофагах соскобов уретры и шейки матки исследовали ультрацитохимическим методом по Gracham and Karnovsky [1966]. Этот метод по данным Nauhoe and Quagliano [1980] является наиболее чувствительным и специфичным. В качестве субстрата использовали диаминобензидинтетрагидрохлорид. Мазки фиксировали в парах формалина. Активность МПО, а также других исследованных ферментов, регистрировали по проценту клеток с выявленной активностью фермента, а также визуальным полуколичественным методом с использованием принципа Karlow [1955]. Ввиду того, что диффузии красителя в область ядра не отмечалось, клетки по степени активности фермента делили только на 4 группы с последующим вычислением среднего цитохимического показателя (СЦП) по формуле:

$$\text{СЦП} = (N_1 \times 0) + (N_2 \times 1) + (N_3 \times 2) + (N_4 \times 3)$$

Обычно в мазке подсчитывали по 100 клеток.

Активность кислой фосфатазы (КФ) в макрофагах выявляли методом одновременного азосочетания по Burstone [1958] в модификации Zeya H. et al. [1971], с использованием в качестве субстрата нафтол-AS-BI-фосфата при pH 5,0 и в качестве диазосоставляющей, прочного гранатового GBC. Мазки фиксировали в парах формалина, докрашивали гематоксилином по Mc. Manus J. and Mowry R. [1960]. Регистрировали в световом микроскопе как описано ранее.

Эстеразы клеток, мигрирующих в очаг воспаления, представляют собой еще один чрезвычайно интересный класс ферментов лейкоцитов. Биохимия эстераз или, как их еще называют, «неспецифических эстераз» очень сложна, а номенклатура еще и запутана из-за наличия большого количества изоферментов, локализующихся преимущественно в той или иной клеточной популяции. Но эта же особенность эстераз при грамотном подборе соответствующего субстрата позволяет с той или иной степенью вероятности идентифицировать клетки, а также дифференцированно оценивать функциональную активность последних. В наших исследованиях для выявления эстеразы мы использовали α -нафтилбутират. Выбор данного соединения в качестве субстрата мотивирован в первую очередь тем, что он, во-первых, реагирует с эстеразами моноцитов и лимфоцитов, не разлагаясь эстеразами нейтрофильных гранулоцитов [Ranri H. et al., 1976]. К тому же данный изофермент эстеразы также, как и КФ увеличивает выявляемость в условиях активации моноцитов и превращения их в функционирующие макрофаги в условиях иммунной стимуляции [Kaplou L., 1975; Kaplow L. et al., 1976]. Примененный нами метод выявления неспецифической эстеразы по Burgess A. [1977] с использованием в качестве диазосоставляющей прочного синего ВВ с докраской ядерным красным, позволил получать четкие стабильные результаты с возможностью выявления сравнительных идентификационных характеристик клеток моноцитарного происхождения, мигрирующих в очаг воспаления при развитии папилломавирусной инфекции.

Аллельные варианты генов, ответственных за экспрессию про- и противовоспалительных цитокинов, методом ПЦР-РВ

Для определения генетических полиморфизмов методом ПЦР-РВ в препаратах ДНК человека, полученных из периферической крови, применяли комплект реагентов производства ООО «НПО ДНК-Технология», Москва. Комплект предназначен для использования с детектирующими

амплификаторами ДТ-322 или ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-Технология», Москва) (табл. 2.9).

Таблица 2.9. Состав набора (на 48 определений)

Реактив	Количество	
Реагенты, специфичные для данного комплекта		
Смеси для амплификации		
IFN γ : 874 T>A	960 мкл	1 пробирка
IL-1 α : -889 C>T	960 мкл	1 пробирка
Adjustright3. IL-1 β : 3953 C>T	960 мкл	1 пробирка
IL-1RI: PstI 1970	960 мкл	1 пробирка
IL-1RN: 11100 mspl	960 мкл	1 пробирка
IL-2: 166 G>T (Leu38Leu)	960 мкл	1 пробирка
IL-2: -330 G>T	960 мкл	1 пробирка
IL-4: -589 O T	960 мкл	1 пробирка
IL-4: -1098 T>G	960 мкл	1 пробирка
IL-4: -33 O T	960 мкл	1 пробирка
IL-4R: +1902 A>G (Gln576Arg)	960 мкл	1 пробирка
IL-6: -174 G>C	960 мкл	1 пробирка
IL-10: -1082G>A	960 мкл	1 пробирка
IL-10: -592A>C	960 мкл	1 пробирка
IL-10: -819OT	960 мкл	1 пробирка
IL-12B: -1188 C>A	960 мкл	1 пробирка

Для получения ДНК из анализируемого материала использовали комплект реагентов для выделения ДНК «ПРОБА-ГС-ГЕНЕТИКА» или «ПРОБА-РАПИД-ГЕНЕТИКА» (ООО "НПО ДНК-Технология", Москва).

Цитокиновый статус цервикальной зоны

Концентрацию цитокинов IL-1 β , IL-8, TNF α , IFN γ , IL-4 и IL-10 в цервикальной слизи (образцы до исследования сохраняли в полипропиленовых пробирках Эппендорфа объемом 1,5 мл при 213°K) определяли твердофазным иммуноферментным методом с использованием наборов и по прилагаемым методикам (Caltag Laboratories, USA). Исследование цервикальной слизи производили методом, разработанным автором [2000]. К наружному зеву цервикального канала подводится тампон, сформированный из 50 мг стерильной нейлоновой ваты, цервикальная зона отделяется резиновой диафрагмой на 12 часов, затем тампон извлекается, слизь разжижается 0,1% раствором

дитиотреитола (DTT), отжимается, жидкость подвергается центрифугированию. Супернатант для определения концентрации цитокинов отбирали, регистрировали разведение, заключали в полипропиленовые пробирки Эппендорфа и хранили в холодильнике при 213°K. Размораживание производилось однократно перед исследованием при комнатной температуре.

2.4. Окислительные процессы в шейке матки

Состояние окислительных процессов в слизистой шейки матки на фоне ВПЧ-инфицирования в виде цервикальной интраэпителиальной неоплазии, в частности, определение NO, реактивных форм кислорода (супероксидрадикалы, O₂⁻) и липидов (пероксидрадикалы, LOO⁻) определяли методом электронного парамагнитного резонанса (ЭПР). В основе ЭПР-метода лежит феномен поглощения микроволнового излучения сверхвысоких частот частицами, обладающими некомпенсированным магнитным моментом. Образцы цервикального смыва помещали в полиэтиленовые трубочки диаметром 0,5 см и длиной 1-1,5 см и замораживали при температуре жидкого азота (-196°С). ЭПР – спектры регистрировались на радиоспектрометре РЭ-1307 (Россия), снабженном компьютерной программой накопления сигналов. Для определения содержания свободного оксида азота в образцах цервикального смыва использовали спин-метку-диэтилдитиокарбамат натрия (DETC) (SIGMA) в дозе 1,75 мг на мл жидкости. С целью определения содержания супероксидрадикалов применялась спин-ловушка 5,5диметил-1пиролин-N-оксид (DETC) (SIGMA) дозой 5 мМ DMPO на 1 мл жидкости. С целью определения содержания пероксидрадикалов использовали спин-ловушку α-фенил-tert-бутилнитрон (PBN) (SIGMA) дозой 50 мг PBN на 1 мл жидкости.

2.5. Биохимический состав вагинальной жидкости

В настоящее время установлено, что при некоторых патологических состояниях влагалища и шейки матки имеются существенные нарушения состава вагинальной жидкости. В частности, данные исследования были проведены при

изучении патогенеза бактериального вагиноза [О.Л. Молчанов, Л.В. Иванова, 2015; Е.Ф. Кира, 2015]. Выявлено, что при бактериальном вагинозе снижается уровень перекиси водорода (основного фактора бактерицидности вагинальной жидкости), повышается количество карбоновых кислот (метаболитов некоторых анаэробных микроорганизмов). Одной из задач нашего исследования, было определить изменения в составе вагинальной жидкости при цервикальной интраэпителиальной неоплазии, способствующие прогрессированию поражения шейки матки.

Таблица 2.10. Основные биохимические параметры влагалищной жидкости у здоровых небеременных женщин репродуктивного возраста [О.Л. Молчанов, Л.В. Иванова, 2015; М.Л. Беркенгейм, 2015]

Показатель (ед. измерения)	Величина
Общий белок (г/л)	0,18
Мочевина (ммоль/л)	22,47
Глюкоза (ммоль/л)	4,33
Натрий (ммоль/л)	93,36
Калий (ммоль/л)	31,26
Кальций (ммоль/л)	9,35
Фосфаты (ммоль/л)	6,22
Хлориды (ммоль/л)	92,39
Железо (ммоль/л)	388,58
Медь (ммоль/л)	25,63
Магний (ммоль/л)	0,34
Холестерин (ммоль/л)	6,95
Триглицериды	5,43
Лактат (мкмоль/мл)	4,89
Пируват (мкмоль/мл)	0,18
АЛТ (Ед/л)	4,90
АСТ (Ед/л)	67,34
ГГТП (Ед/л)	20,88
ЛДГ (Ед/л)	133,36
Амилаза (Ед/л)	59,48
Щелочная фосфатаза (Ед/л)	89,87
Креатинкиназа (Ед/л)	27,66
рН (Ед)	3,97
Осмолярность (мосмоль/кг)	301,02

Биохимические методы исследования влагалищной жидкости включали в себя определение pH влагалищной жидкости pH-метром «HannaPiccoloPlus». Определение концентрации общего белка и всех низкомолекулярных органических веществ (мочевины, креатинина, билирубина, глюкозы, триглицеридов) проводили на автоматическом биохимическом анализаторе «AlcyonAnalyzer-300». Определение активности α -амилазы (ЕС 3 2.1.1.) проводили унифицированным амилокластическим методом (по W.Caraway). Измерение активности аспаратаминотрансферазы (ЕС 2.6.1.1) и аланинаминотрансферазы (ЕС 2.6.1.2), щелочной фосфатазы (ЕС 3.1.3.1. и ЕС 3.1.3.2.), а также концентрации ионов кальция и магния проводили на автоматическом биохимическом анализаторе фирмы «Nittek» модель «SuperZ-818». γ -Глутамилтрансфераза (ЕС 2.3.2.2) определялась по расщеплению L- γ -глутамил-п-нитроанилида. Для определения активности креатинкиназы (ЕС2.7.3.2.) был использован метод с использованием креатинфосфата в качестве субстрата. Активность лактатдегидрогеназы (ЕС 1.1.1.27.) определяли унифицированным методом по реакции с 2,4-динитрофенилгидразином (Севела-Товарека). Методом иммуноферментного анализа проводили определение лактоферрина.

2.6. Методы терапии, проводимой пациенткам с латентными формами ПВИ и больным ВПЧ-ассоциированными поражениями шейки матки легкой и средней степени

Всем пациенткам с латентными формами папилломавирусной инфекции и цервикальной интраэпителиальной неоплазией легкой и средней степени, включенным в исследование, была рекомендована диета, обогащенная белками, витаминами, микроэлементами, с ограничением легкоусвояемых углеводов.

При обнаружении дисбиотических изменений вагинальной микрофлоры за 1 менструальный цикл до начала предлагаемой терапии проводилась коррекция вагинального микробиоценоза.

Методом слепой выборки участники исследования, являющиеся ВПЧ-носителями, были разделены на две группы: одной из них велось только наблюдение в течение 5 лет с ежегодным контролем вирусной нагрузки, расширенной кольпоскопией и взятием мазков на онкоцитологию. Другой, в качестве профилактической терапии манифестации ВПЧ-инфекции было предложено топическое применение препарата - «Кольпоцид-гель» (UPL).

В качестве основного препарата для терапии цервикальных интраэпителиальных неоплазий в контрольной группе нами выбран препарат «Ферровир». С целью усиления как противовирусного, так и иммуностропного эффектов «Ферровира» в комплексную терапию дополнительно был включен препарат рекомбинантного интерферона $\alpha 2\beta$ местного действия в виде вагинальных свечей – «Генферон».

В качестве экспериментального лечения CIN нами был предложен препарат рекомбинантного интерлейкина 2 – «Ронколейкин». Для оценки сравнительной эффективности современной традиционной и предлагаемой комплексной терапии методом случайной выборки все вирусоносители и больные папилломавирусной инфекцией в виде цервикального интраэпителиального поражения низкой и средней степени (CIN I-II) (320 пациенток) были разделены на 7 групп (60 условно здоровых женщин – иммуноцитобиохимический контроль):

I группа (90 пациенток) – латентные формы папилломавирусной инфекции.

II группа (190 больных) – цервикальная интраэпителиальная неоплазия легкой степени (CIN I).

III группа (130 больных) – цервикальная интраэпителиальная неоплазия средней степени (CIN II).

В процессе дифференцированной терапии пациентки были разделены на следующие группы:

IV группа (45 пациенток) – латентные формы ПВИ, которым проводилось лишь динамическое наблюдение в течение 5 лет.

V группа (45 пациенток) – латентные формы ПВИ с топической профилактической терапией препаратом «Кольпоцид CrystalMatrix-FS» гель вагинальный, который применялся 1 раз в сутки интравагинально 10 дней каждые 6 месяцев в течение пяти лет.

VI группа (80 больных CIN I) – которой проводили комплексную терапию, где в качестве основного средства терапии применяли препарат «Ферровир». Препарат вводили всем больным по 5,0 мл 1,5% раствора в/м. Общий курс - 10 инъекций. В дополнение к противовирусной терапии локально был применен иммуномодулирующий препарат рекомбинантного интерферона $\alpha 2$ с антиоксидантным воздействием (таурин 0,01 г) - «Генферон» (суппозитории по 1000000 ME №20 вводимыми интравагинально 2 раза в день).

VII группа (80 больных CIN I) – получавших топическую терапию препаратом рекомбинантного интерлейкина-2 («Ронколейкин»). Ампулу препарата (0,25 мг, 250000 Ед.) растворяли в 2 мл воды для инъекций и инсулиновым шприцом вводили с учетом лимфооттока (подкожно в 2 точки в переднюю брюшную стенку на 3 см медиальнее spina iliaca anterior superior) по 0,5 мл трижды с интервалом 72 часа.

VIII группа (65 больных CIN II) – которой проводилась терапия, аналогичная VI группе (деструкция (радиоволновая абляция или эксцизия) + «Ферровир» + «Генферон»).

IX группа (65 больных CIN II) – получавших топическую терапию препаратом «Ронколейкин» и деструкцию.

Оценку клинико-микробиологической эффективности лечения проводили на основе динамики следующих показателей:

- ✓ жалоб и оценки своего самочувствия пациентками до лечения, через 4 дня, 1, 6 и 12 месяцев после окончания лечения;

- ✓ результатов объективного осмотра и кольпоскопии (с подсчетом клинско-кольпоскопического индекса);
- ✓ данных цитологического (Pap-тест) и молекулярно-биологического (ВПЧ Digene-тест, онкобелок E7) исследования.

Критериями оценки клинической и микробиологической эффективности являлись [В.И. Роговская, 2007]:

- ✓ полное клиническое выздоровление и микробиологическая санация: отсутствие CIN и воспалительных изменений слизистой влагалища и шейки матки, а также отрицательный результат цитологического исследования цервикального соскоба после завершения курса лечения;
- ✓ улучшение: значительные уменьшения субъективных и объективных клинических симптомов при положительном результате цитологического и/или молекулярно-биологического исследований;
- ✓ рецидив: повторное появление CIN и положительных результатов цитологического и молекулярно-биологического исследований в течение 2 месяцев и более после завершения курса лечения.

Кроме того, у пациенток с обнаруженными типами ВПЧ 16 и/или 18 проводилось динамическое (в предложенные сроки: до лечения, через 1, 6 и 12 месяцев, 2-5 лет после окончания лечения) качественное определение (метод ИФА) содержания онкобелка E7, как дополнительного критерия эффективности проводимой терапии.

Об иммунологической и цитобиохимической эффективности судили на 20-е сутки от начала терапии (4-й день после окончания терапии) и через 1 месяц после окончания лечения по изменению цитохимических показателей клеток мононуклеарно-фагоцитарной и параметров антиоксидантной систем, а также по концентрации цитокинов в цервикальной слизи.

2.7. Статистическая обработка материала

Статистическая обработка полученных результатов проводилась методом вариационной статистики и корреляционного анализа с помощью программы Microsoft Excel 7,0 (Windows Office 2007). Результаты исследований были обработаны методом вариационной статистики с определением критерия Фишера (F) для оценки непараметрических показателей групп малых выборок и критерием Стьюдента (t) для независимых групп [М.Б. Славин, 1989; В.М. Зайцев и соавт., 2003]. Во всех случаях определялись среднее арифметическое, средняя ошибка среднего арифметического, стандартная ошибка среднего. Анализ проводился с использованием методов "Медико-биологической статистики" [Стентон Гланц, 1999], программы "STATISTICA" 6,0.

Кроме того, использовались описательная статистика и непараметрический анализ данных (Mann-Whitney U Test, Kolmogorov-Smirnov Test). Для статистического анализа частотных показателей использовался метод углового преобразования Фишера (вычисление Φ^2 критерия). Различие между сравниваемыми величинами признавалось достоверным при $P < 0,05$.

Соблюдение этических принципов исследования с участием человека отмечено в Протоколе №12 от 21 февраля 2017 года заседания Этического комитета по проведению научных исследований Кубанского государственного медицинского университета. Учитывая тот факт, что исследование будет проводиться на основе обследования больных с патологией шейки матки и включать в себя лабораторные методы – «in vitro» диагностика, что исключает риск для пациентов, комиссией было принято положительное решение о реализации данной научной работы.

Таблица 2.11. Количество выполненных исследований

Исследование \ Группы	Контроль (n = 60)		I группа (n=90)		II группа (n=180)		III группа (n=130)	
	n	%	n	%	n	%	n	%
<i>RW, HIV, CMV, HSV, EBV</i>	60	100	90	100	180	100	130	100
общий анализ крови, мочи	60	100	90	100	180	100	130	100
биохимический анализ крови	60	100	90	100	180	100	130	100
осмотр женских половых органов в зеркалах	60	100	90	100	760	400	520	400
мазок из влагалища	60	100	360	400	760	400	520	400
посев из влагалища и ц/к на наличие анаэробной микрофлоры	60	100	180	200	360	200	260	200
ПЦР-диагностика вагинального биоценоза (фемофлор 16)	60	100	360	400	760	400	520	400
посев из влагалища и ц/к на наличие Gp. и Trich.	60	100	270	300	570	300	520	400
диагностика хламидийной и микоплазменной инфекции	60	100	270	300	570	300	520	400
ПЦР диагностика ВПЧ ВКР	60	100	360	400	760	400	520	400
Рар-тест	-	-	360	400	760	400	520	400
p16ink4a/Ki-67	-	-	360	400	760	400	520	400
метаболиты 2-ОНЕ/16а-ОНЕi в моче	-	-	360	400	760	400	520	400
онкобелок Е7 (ИФА, ПЦ)	-	-	360	400	760	400	520	400
гистологическое исследование	-	-	360	400	760	400	520	400
мазок на онкоцитологию	60	100	360	400	760	400	520	400
расширенная кольпоскопия	60	100	360	400	760	400	520	400
ультразвуковое исследование органов малого таза	60	100	90	100	180	100	130	100
НО, реактивные формы кислорода и липиды слизистой шейки матки	-	-	360	400	760	400	520	400
состав лимфоидных клеток в крови	60	100	50	56	90	47	60	46
фагоцитарная активность нейтрофильных лейкоцитов	60	100	50	56	90	47	60	46
концентрация цитокинов в сыворотке крови и цервикальной слизи	60	100	80	89	170	89	110	85
цитохимия клеток мононуклеарно-фагоцитарной системы в цервикальной слизи	60	100	50	56	90	47	60	46
биохимическое исследование вагинального содержимого	60	100	360	400	760	400	520	400

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Природно-климатические, демографические и экологические особенности Краснодарского края

Краснодарский край является особым регионом России по разнообразию своего географического положения, природных ландшафтов, почвенных и климатических ресурсов, поверхностных и подземных вод, видов растительного и животного мира, разнообразию природных условий.

Ведущее место в структуре промышленности принадлежит перерабатывающим производствам. Пищевая отрасль обеспечивает 42,8% общего объема промышленной продукции; далее идут электроэнергетика (13,4%), топливная отрасль (10,5%), машиностроение и металлообработка (9,4%) и промышленность строительных материалов (7,9%). По некоторым видам сельскохозяйственной продукции край занимает первое место в России. Экономика края базируется на благоприятных природно-климатических условиях и многочисленном населении. Основу составляет сельское хозяйство. Черноморское и Азовское побережье края представляет собой почти непрерывную цепь курортов.

В Краснодарском крае в настоящее время сложилась сложная экологическая ситуация. Край испытывает большую антропогенную нагрузку. Высокая плотность населения, значительное развитие промышленности и транспортной сети, интенсивное сельскохозяйственное производство и, как следствие, растущие темпы загрязнения природной среды обусловили деградацию отдельных экосистем и возникновение сложных экологических проблем, приводящих к ухудшению здоровья населения. Положение также усугубляется негативными изменениями в социально-экономической и геополитической обстановке [Леонов М.Г., 2011; Дудик Ю.Е., 2003]. Край занимает третье место в России по численности населения - 5121000 человек. Несмотря на отрицательный естественный прирост, общая численность

населения края быстро растет за счет мигрантов из республик Северного Кавказа и Закавказья. Около 53% проживает в городах и 47% в сельской местности. Плотность населения - 72,23 чел./км² (2015 г.). Удельный вес городского населения - 54,06% (2015 г.).

В воздухе краевого центра Краснодарского края присутствует большое количество таких взвешенных веществ, как пыль, зола, сажа, тяжёлые металлы и другие. Повышенный уровень загрязнения всего края в целом, обусловлен выбросами в атмосферу вредных веществ автомобильным транспортом, объектами электроэнергетики, нефтепродуктопроводным транспортом, предприятиями топливной, химической, нефтехимической промышленности, стройиндустрии и агропромышленного комплекса. Высокой концентрации вредных веществ в воздухе способствуют особые климатические условия, характеризующиеся пониженной рассеивающей способностью атмосферы.

Анализ результатов экологического мониторинга показывает, что состояние водных объектов в Краснодарском крае остается неблагоприятным. Экологическое состояние прибрежных зон и районов вблизи устьев рек приближается к критическому уровню [Ц.А. Швер, Т.И. Павличенко, 2012]. За последние 10 лет отмечается увеличение выбросов загрязняющих веществ в атмосферу. Значительная доля антропогенной нагрузки на воздушный бассейн Краснодарского края, приходится на урбанизированные территории.

Земли сельскохозяйственного назначения занимают большую часть территории края (70%). Загрязнение окружающей среды пестицидами является серьезной экологической проблемой для края. Выявлено 2,7 тыс. тонн запрещенных, устаревших и пришедших в негодность пестицидов, из которых более 30% содержат сильнодействующие хлор и фосфорорганические соединения. На начало 2015 г. на балансе предприятий края имелось в наличии 11,5 млн. т отходов производства и потребления; образовалось за год 9,06 млн.т. отходов, из которых использовано и обезврежено 48,5% [И.П. Лотышев, 2015].

Считается, что 75-80% всех случаев возникновения онкологических заболеваний связаны с факторами окружающей среды [ВОЗ, 2011]. Специалистами Международного агентства по изучению рака (МАИР) установлено, что из 836 факторов, которые были оценены в отношении степени их канцерогенного риска, 74 признано безусловно канцерогенными для человека (группа 1), 56 отнесены в группу 2А (вероятно канцерогенные для человека) и 225 - в группу 2В (возможно канцерогенные для человека) [2007]. При этом экологическая ситуация является лишь одной из составляющих проблемы здоровья. Комплексная оценка, прогнозирование социально-экономической ситуации и экологической обстановки, невозможны без учета демографических показателей, изменений уровней заболеваемости и смертности населения, изучения их взаимодействия с окружающей средой. Распространенность заболеваний определяется сложным комплексом факторов, среди которых значительную роль имеют демографические процессы.

3.1. Эпидемиологический анализ распространенности папилломавирусной инфекции и заболеваемости патологией шейки матки, ассоциированной с ВПЧ у жительниц Краснодарского края

Это исследование является многоаспектным социально-гигиеническим, статистическим и медико-социальным, носит ретроспективный и проспективный характер. Для решения задач исследования разработана комплексная методика, включающая три этапа. Исследование на всех этапах – сплошное. *На первом этапе* проведен научный ретроспективный анализ показателей количества бессимптомного ВПЧ-носительства и заболеваемости цервикальными интраэпителиальными неоплазиями (CIN) в Краснодарском крае в сравнительном аспекте с общероссийскими показателями за 5 лет (2011-2015 гг.):

1. Проанализирована демографическая ситуация.
2. Изучены в динамике показатели и структура заболеваемости женского населения CIN.
3. Проведен анализ показателей инфицированности ВПЧ и заболеваемости CIN.
4. Рассчитаны показатели:
 - общей структуры заболеваемости населения края цервикальными интраэпителиальными неоплазиями;
 - уровень заболеваемости раком шейки матки и CIN среди женского населения Краснодарского края в обычных и стандартизованных коэффициентах;
 - уровень заболеваемости CIN среди женского населения края в зависимости от места проживания (городская, сельская местность) в обычных и стандартизованных коэффициентах;
 - динамика частоты заболеваемости CIN городского и сельского населения за 5 лет в обычных и стандартизованных показателях;
 - возрастные показатели заболеваемости CIN среди городского и сельского населения;

– динамика возрастных показателей заболеваемости CIN с 2011 по 2015 гг.

Единица наблюдения – случай инфицированности вирусом папилломы человека и случай заболевания женщины цервикальной неоплазией различной степени тяжести. Объект исследования – носительство ПВИ, заболеваемость CIN. Источники информации: статистические данные Министерства здравоохранения Краснодарского края, паспорта акушерско-гинекологической службы. Объем исследования: по Краснодарскому краю – 19349 случаев инфицирования ПВИ, 6702 случай заболевания CIN. *На втором этапе* проанализированы состояние акушерско-гинекологической службы и медицинской помощи больным CIN в плане профилактики и лечения данной патологии шейки матки в Краснодарском крае, в том числе в разрезе отдельных территориальных единиц (районов). Изучены показатели активной выявляемости больных с распределением по степени тяжести (CIN I-III), распространенности, индексу накопления больных. Единица наблюдения – больная с диагнозом CIN. Объект исследования – контингент больных со CIN, состоящих на учете в женских консультациях и онкологическом диспансере. В исследование были включены все больные, состоящие на учете в женских консультациях и онкологическом диспансере, которым проводили амбулаторное и/или стационарное лечение либо наблюдение в 2011-2015 гг. *Третьим этапом* статистического исследования явилось сравнительное изучение особенностей территориального распределения частоты инфицирования ВПЧ и CIN в условиях каждого из 47 административных районов Краснодарского края.

Методы сбора и обработки статистического материала: аналитический, аналитико-графический, выкопировки данных из документов, статистический (t-критерий, z-критерий, F-критерий), корреляционно-регрессионный анализ. Проверка гипотез о различиях между группами проводилась с использованием критерия Фишера для категориальных переменных и критерия Краскелла-Уоллиса для количественных и порядковых величин. Данные проверялись при

уровне достоверности $p < 0,05$. При оценке центральной тенденции использовались показатели среднего значения, при оценке вариации – стандартное отклонение и стандартная ошибка. При выборе метода сравнения данных учитывалась нормальность распределения признака в группах с учетом критерия Шапиро-Уилкса. Для оценки, сложившейся в изученном периоде ситуации использовались методы описательной статистики применительно к фактическим и стандартизованным данным; статистические методы анализа абсолютных и относительных величин, включая методы анализа временных рядов; рассчитывались средние значения анализируемых показателей и базисные темпы прироста. Для установления дальнейшей тенденции проведено краткосрочное прогнозирование с использованием метода аналитического выравнивания.

При оценке заболеваемости раком шейки матки среди населения Краснодарского края и Российской Федерации за 2011-2015 гг. выявлено, что в 2011 г. относительный показатель заболеваемости раком шейки матки в Краснодарском крае составил 20,6 на 100 тыс. женского населения, что выше, чем в целом по России (среднероссийский показатель составляет 18,1 на 100 тысяч населения) (рис. 3.1).

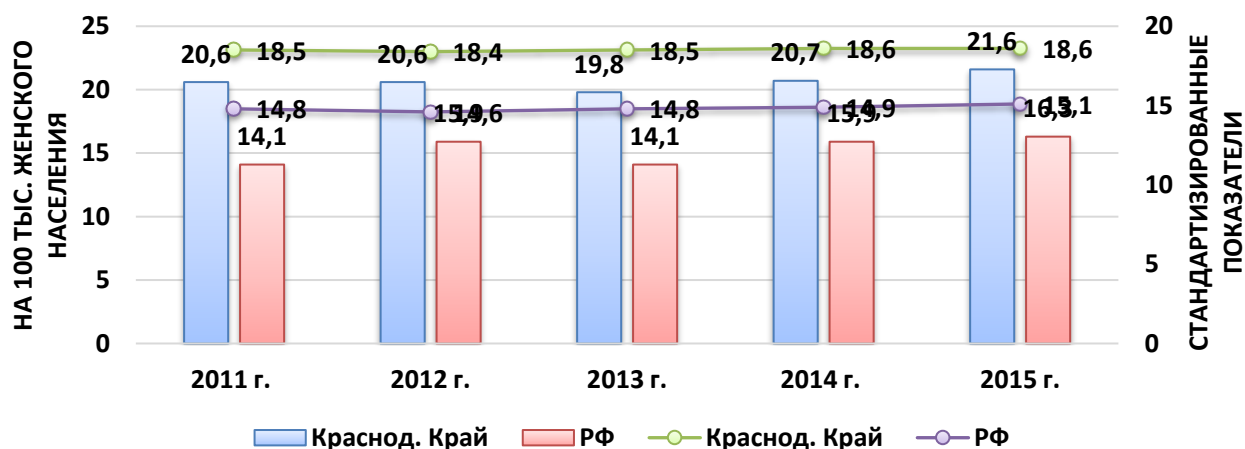


Рисунок 3.1. Среднегодовой относительный показатель заболеваемости раком шейки матки в Краснодарском крае и в РФ

Стандартизованный показатель (мировой стандарт) заболеваемости раком шейки матки в Краснодарском крае в 2011 г. составил 18,5 на 100 тыс. женского населения (по Российской Федерации $14,8 \pm 0,6$). В 2015 году ситуация еще более ухудшилась и относительный показатель заболеваемости раком шейки матки в Краснодарском крае увеличился до 21,1, на фоне его роста в целом по России (16,3), он остается высоким, как по сравнению с общероссийскими показателями, так и со стандартизированным показателем ($18,6 \pm 1,9$ против $14,5 \pm 0,5$, $p < 0,05$).

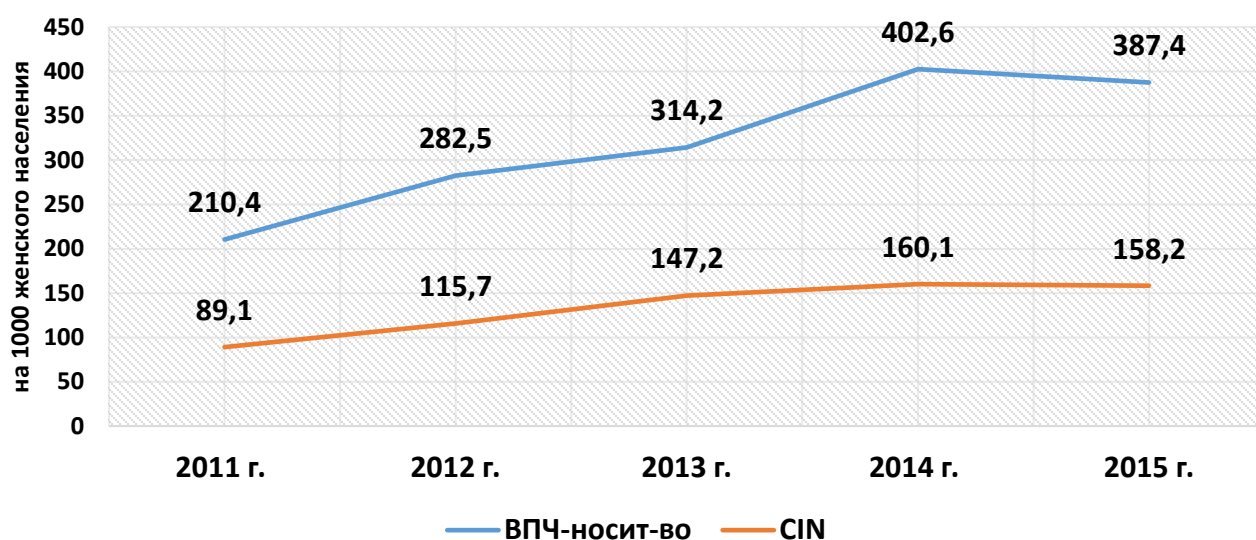


Рисунок 3.2. Динамика показателей ВПЧ-инфицирования и заболеваемости CIN в Краснодарском крае

Увеличение количества заболеваемости раком шейки матки имеет прямую пропорцию с увеличением выявляемости латентных форм папилломавирусной инфекции и патологии шейки матки в виде цервикальной интраэпителиальной неоплазии (CIN) (рис. 3.2). За 5 лет количество женщин Краснодарского края, носителей вируса папилломы человека, увеличилось на 184% (в Российской Федерации оценка распространенности ВПЧ представляет определенные трудности, т.к. наряду с наличием достоверных и ежегодно обновляемых данных о распространенности раковых заболеваний отсутствует статистика по его распространенности. Консолидация эпидемиологических данных затруднена в связи с тем, что как правило, пациенты обращаются преимущественно в

коммерческие центры, которые не занимаются учетом заболеваемости). При этом, если в 2011 году в Краснодарском крае зарегистрировано 89,1 CIN на 1000 населения, то уже к 2015 году данный показатель увеличился до 168,2, т.е. за 5 лет количество заболевших увеличилось на 177%. Необходимо отметить, что в подавляющем большинстве первично диагностируются CIN легкой степени ($87,1 \pm 4,6\%$, $p < 0,05$). Повышение заболеваемости CIN за данный промежуток времени (2011-2015 гг.) было статистически значимым ($p < 0,05$) и составило 1,8 раз. В основном данный показатель свидетельствует о развитии в стране и, особенно, в Краснодарском крае кабинетов патологии шейки матки, что позволяет проводить цервикальный скрининг и на ранних этапах выявлять CIN, но, в то же время, говорит о пока еще низком уровне первичной профилактики ВПЧ-заражения в регионе. Основной закономерностью динамики заболеваемости раком шейки матки за 5 изучаемых лет следует признать стабилизацию уровня показателей заболеваемости последние 5 лет (табл. 3.1). Средний показатель за данный промежуток времени в Краснодарском крае составил 134,1 на 1000 женского населения.

Таблица 3.1. Среднегодовые показатели заболеваемости CIN в Краснодарском крае (на 1000 женского населения)

2011 г.	2012 г.	2013 г.	2014 г.	2015 г.	в среднем за 5 лет
89,1	115,7	147,2	160,1	158,2	134,1

При сравнении показателей заболеваемости ВПЧ-ассоциированной патологией шейки матки среди городского и сельского населения (рис. 3.3) Краснодарского края выявлена статистически значимая ($p < 0,05$) зависимость от нахождения пациенток в городе или в сельской местности. Если в городах Краснодарского края в 2011 году уровень заболеваемости раком шейки матки был в пределах 14,7 на 100 тыс. населения (в России – 11,3), то в сельской местности Краснодарского края данный показатель в это же время составил 23,8 (17,3 в Российской Федерации). В 2015 году имеется незначительная тенденция

к увеличению данного показателя до 15,0 на 100 тыс. женского населения среди городских жителей Краснодарского края (2,0%), в РФ также произошло умеренное повышение данного показателя до 11,5 на 100 тыс. населения (1,7%).

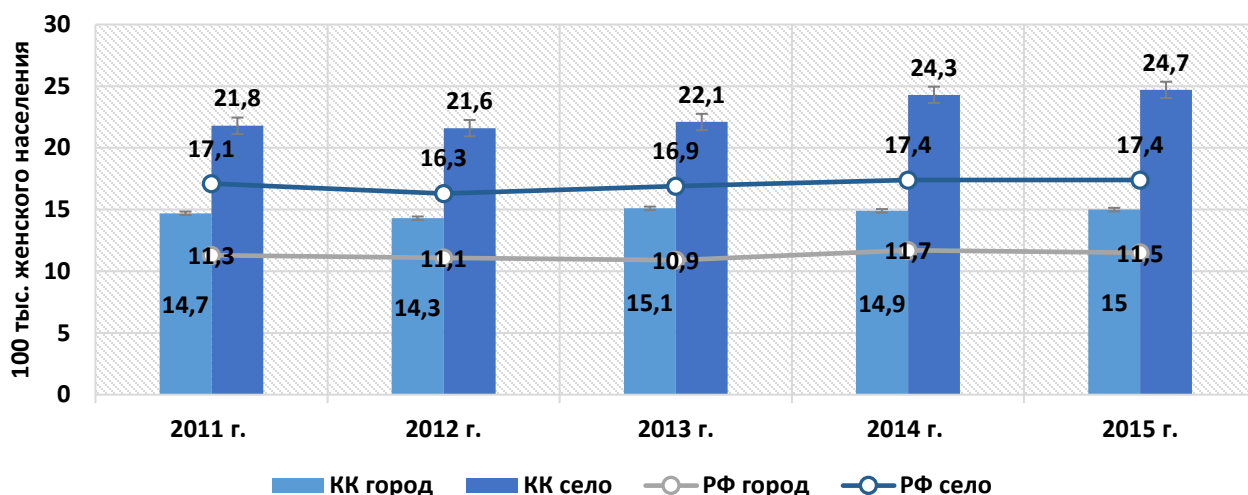


Рисунок 3.3. Сравнительная оценка показателей заболеваемости раком шейки матки среди городских и сельских женщин

При этом в сельской местности Краснодарского региона в 2011 году зарегистрирован показатель заболеваемости раком шейки матки на уровне 21,8 (повышение заболеваемости за 5 лет на 13,3%), в России данный показатель находится примерно на одном уровне (повышение на 1,7% - с 17,1 до 17,4 на 100 тыс. женского населения).

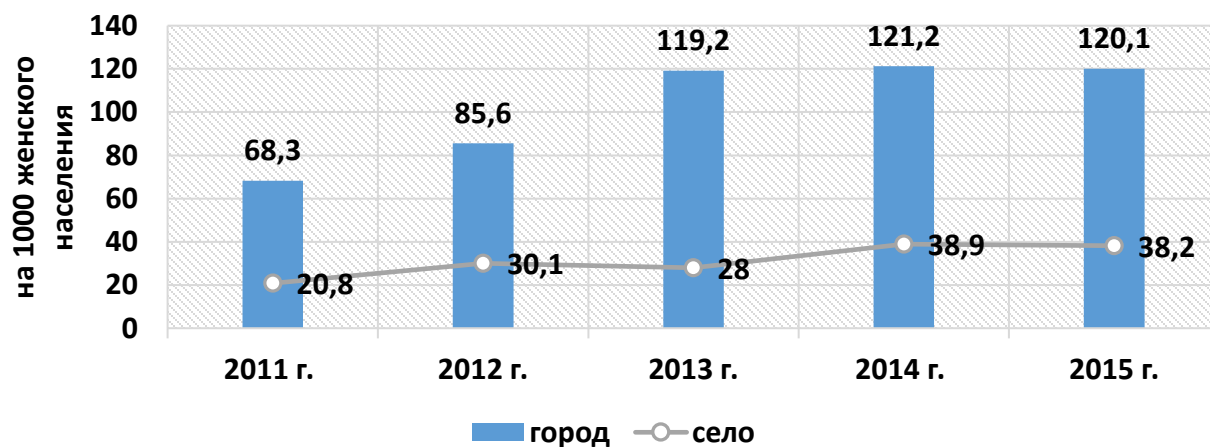


Рисунок 3.4. Сравнительная оценка показателей заболеваемости CIN среди городских и сельских женщин Краснодарского края

Противоположная зависимость прослеживается при оценке выявляемости CIN: в городах края она была достоверно выше, чем сельской местности. В 2011 году в городах Краснодарского края доля диагностированных цервикальных неоплазий составила 68,3 случаев на 1000 женского населения. В сельской местности количество выявленных CIN была заметно ниже – 39,1. В 2015 году показатели CIN возросли в городах края и в сельской местности в 1,8 раз (рис. 3.4, табл. 3.2).

Таблица 3.2. Среднегодовые показатели заболеваемости CIN в Краснодарском крае среди городских и сельских женщин (на 1000 женского населения)

Показатели	2011 г.	2012 г.	2013 г.	2014 г.	2015 г.	в среднем за 5 лет
Город						
Интенсивный	68,3	85,1	119,2	121,1	120,1	102,8
Стандартизованный (мировой стандарт)	42,1	58,7	77,2	85,1	80,0	68,6
Село						
Интенсивный	20,8	30,1	28,0	38,9	38,2	31,2
Стандартизованный (мировой стандарт)	11,9	18,2	14,2	20,5	20,1	17,0

Тем не менее в целом возрастающее количество пациенток с латентными формами ПВИ и стабилизация процента больных ВПЧ-ассоциированными цервикальными интраэпителиальными неоплазиями дает основание для сравнительно оптимистичного прогноза в отношении заболеваемости раком шейки матки. Большее количество выявленных латентных форм ПВИ и CIN, особенно на ранних стадиях, способствует их своевременному лечению с последующим активным наблюдением, что позволяет предупредить переход патологических процессов в шейке матки на неуправляемый уровень. Более низкий уровень выявляемости ВПЧ в сельской местности говорит, в первую очередь, о недостаточности лабораторного оборудования, а во вторую о низкой профилактике, а значит и обращаемости населения для проведения специализированного обследования.

Анализ инфицированности ВПЧ и заболеваемости и CIN в Краснодарском крае в возрастном аспекте дал следующие результаты (рис. 3.5). Выявлено, что основная встреча с вирусом папилломы человека происходит уже с первыми половыми контактами, при этом наибольшее количество латентных форм ПВИ приходится на возраст 17-25 лет (70,7%), затем происходит резкое снижение их количества (до 18,6%) и увеличивается доля реализованных патологий шейки матки. Пик обнаружения CIN приходился на возраст 26-30 лет (30,9%). Суммарно реализация ВПЧ-носительства в CIN происходит в возрасте 21-35 лет в 72,9%. Для большей наглядности динамики по возрасту необходимо рассмотреть изменения медианы возраста. При расчете выявлено, что медиана ВПЧ-носительства за 5 лет была равна $21,6 \pm 2,3$ лет, а возраста больных CIN - $28,4 \pm 2,6$ года. То есть, для реализации вирусоносительства в CIN необходимо в среднем $6,8 \pm 1,1$ лет ($p < 0,05$).

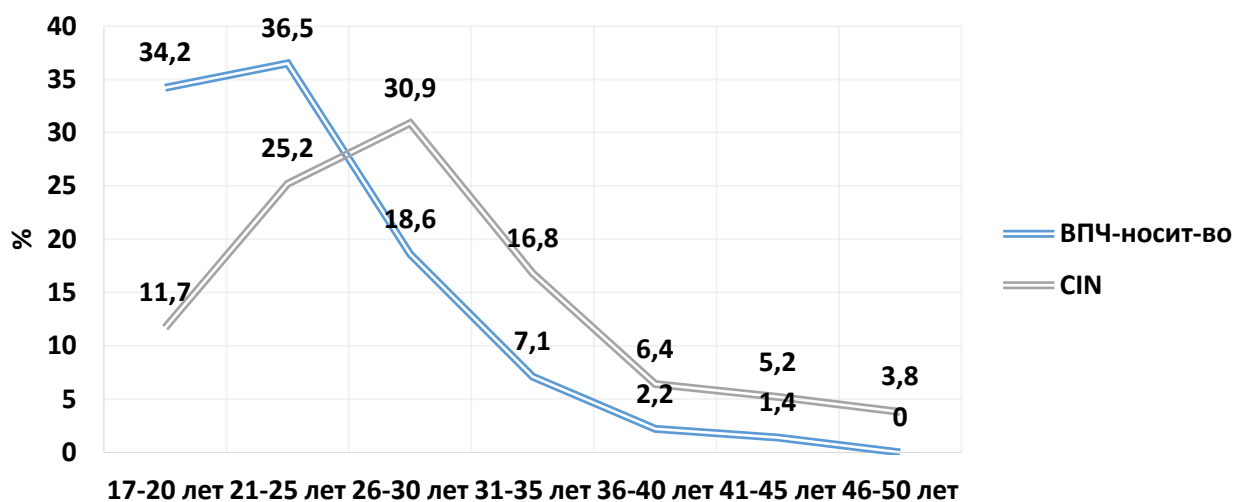


Рисунок 3.5. Повозрастные показатели латентных форм ПВИ и заболеваемости CIN в Краснодарском крае (в среднем за 5 лет)

Также, дана повозрастная оценка выявляемости CIN различной степени тяжести (рис. 3.6). Наиболее часто CIN I выявляется в возрасте 21-35 лет (суммарно 66,1%), для CIN II характерен пик диагностирования в возрастной

категории 31-41 год (55,5%), CIN III, как крайняя предраковая степень поражения шейки матки выявляется чаще в возрасте 35-45 лет (56,2%).

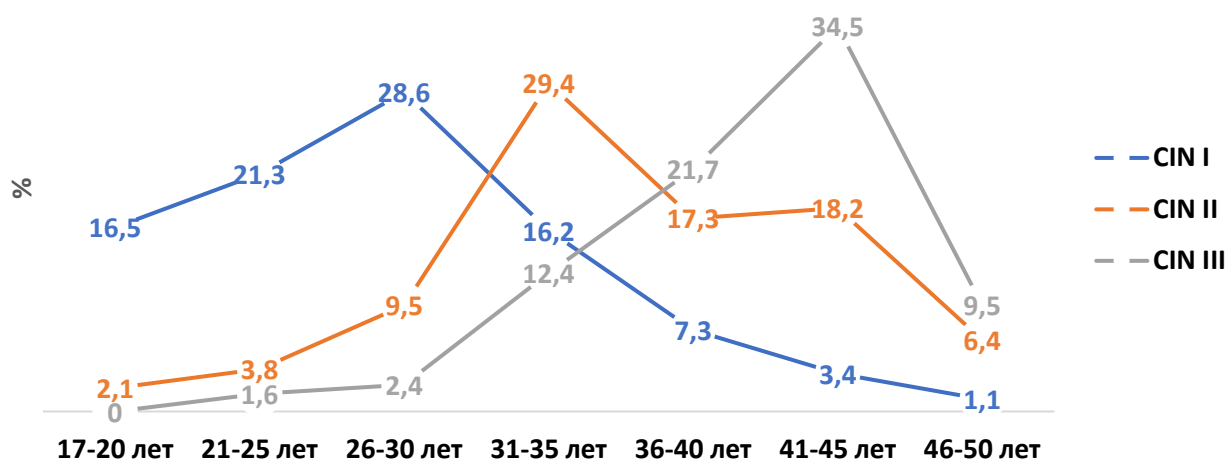


Рисунок 3.6. Повозрастная оценка выявляемости CIN различной степени тяжести в Краснодарском крае (в среднем за 5 лет)

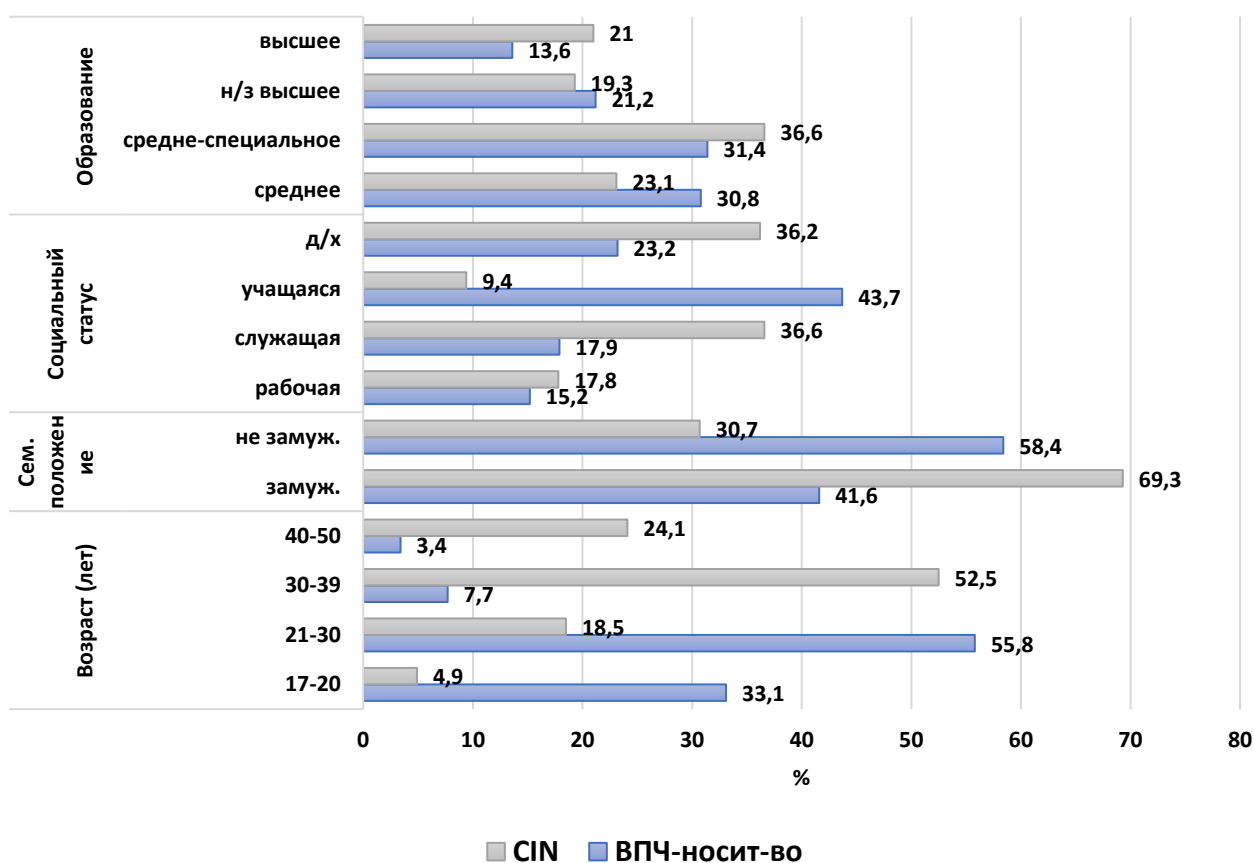


Рисунок 3.7. Социальная характеристика носителей ПВИ и больных CIN

Анализ социального статуса пациенток Краснодарского края показал недостоверные различия ($p>0,05$) по социальному и семейному положению, а также уровню образования в группах с ВПЧ-носителями и CIN (рис. 3.7). Это, в первую очередь, связано с разницей возраста у этих групп женщин. При оценке анамнестических данных (ретроспективный анализ амбулаторных карт) определенных особенностей менструальной функции и гормонального статуса не выявлено. Средний возраст менархе составил $12,4\pm 1,2$ года у бессимптомных носителей ВПЧ и $12,3\pm 1,2$ года у пациенток с CIN. Средний возраст полового дебюта – $18,2\pm 1,4$ года и $17,9\pm 1,3$ года соответственно. Интервал от менархе до сексуального дебюта в 2-3 года был зарегистрирован 39,1% вирусоносителей и 39,4% пациенток с патологией шейки матки в виде цервикальной интраэпителиальной неоплазии ($p<0,05$). На интервал 6 лет и более указали больше 29,6% ВПЧ носителей и 27,1% пациенток с CIN. Среднее значение интервала между возрастом менархе и возрастом начала половой жизни в группе пациенток с бессимптомным ВПЧ-носительством и CIN составило - 3,0 (2,0-5,0) лет (рис. 3.8).

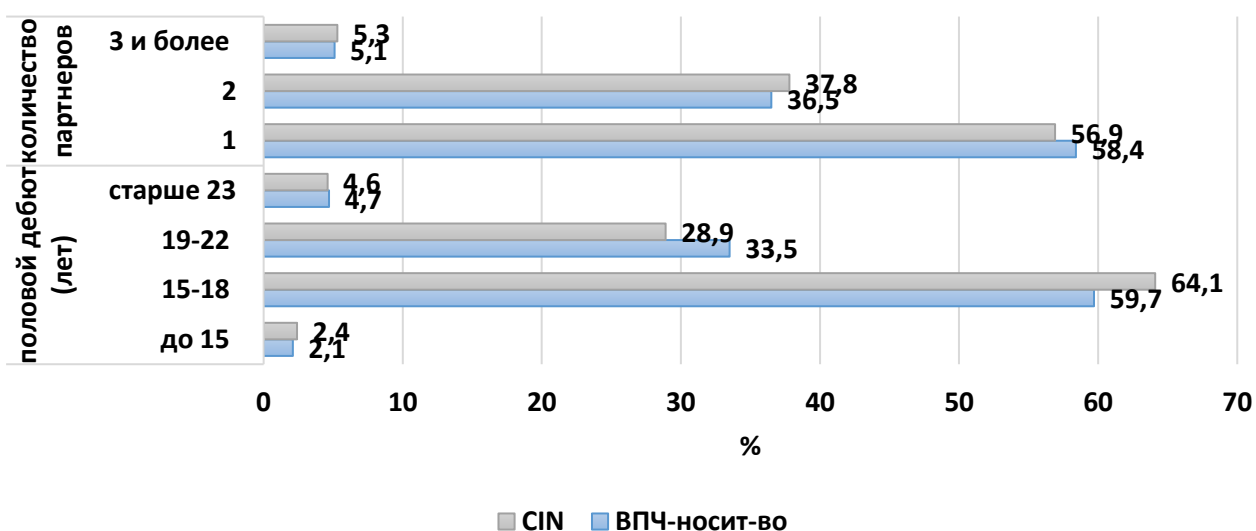


Рисунок 3.8. Сексуальное поведение латентных ВПЧ-носителей и больных CIN

Большинство пациенток (88,1% ВПЧ-носителей и 85,4% CIN) вели регулярную половую жизнь. При этом в группе ВПЧ носителей один половой

партнер был у 58,4% женщин, а в группе больных CIN – в 56,9% (разница в группах не достоверна; $p>0,05$).

На никотиновую зависимость было указано у 20,8% вирусоносителей и у 36,9% пациенток с CIN. Установлено статистически значимое преобладание курящих среди больных CIN ($p=0,0002$). То есть курение можно рассматривать как не только риск-фактор ПВИ, а также как кофактор прогрессии вирусного поражения шейки матки.

Контрацепцию (исключая прерванный половой акт и календарный метод Огино-Кнауза) использовали 44,1% пациенток с латентной формой ПВИ и 31,3% женщин с цервикальной неоплазией. При этом пациентки с бессимптомным вирусоносительством и CIN гормональную контрацепцию (КОК) использовали в 11,6 и 8,1% соответственно, внутриматочную (ВМС) в 8,1 и 14,1% и барьерные методы (презервативы) в 24,4 и 9,1% соответственно (рис. 3.10). По остальным параметрам статистически достоверных отличий в плане контрацепции у данного контингента не выявлено.

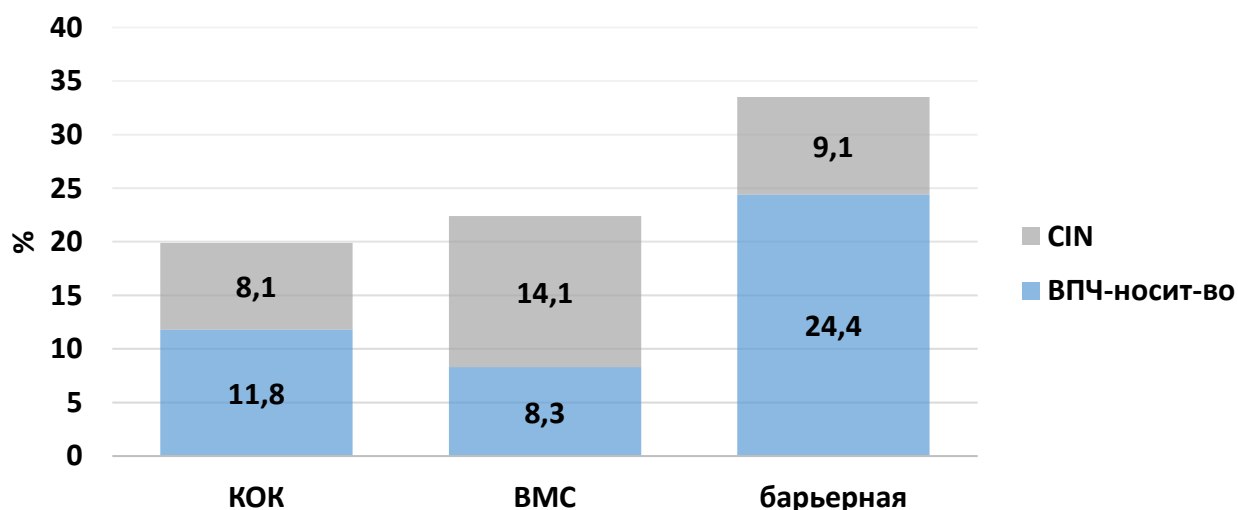


Рисунок 3.10. Контрацепция латентных ВПЧ-носителей и больных CIN

Проведенный анализ свидетельствует, что Краснодарский край относится к регионам с более высоким уровнем заболеваемости ВПЧ-ассоциированными цервикальными интраэпителиальными неоплазиями и раком шейки матки по

сравнению с общефедеральными показателями, особенно в сельской местности. При этом инфицирование вирусом папилломы человека в большом проценте случаев происходит с половым дебютом и является основным фактором, способствующим реализации в дальнейшем (5-10 лет) цервикальной патологии.

3.1.1. Территориальное картографирование ВПЧ-инфицирования и заболеваемости цервикальными неоплазиями в Краснодарском крае

Изучение географических различий распространения заболевания является важным этапом эпидемиологических исследований. Изучение географических различий патологии предусматривает выявление местных факторов, имеющих отношение к этиопатогенезу заболевания и требуют тщательного медико-географического исследования конкретных территорий, что связано с комплексным воздействием неблагоприятных факторов внешней и внутренней среды человека, а также с некоторыми поведенческими факторами. Для изучения особенностей пространственного распространения CIN в административных территориях Краснодарского края были вычислены интенсивные и стандартизованные показатели заболеваемости населения этих территорий в целом и отдельно для женского населения каждого города и района края за 2011-2015 гг. Картографический анализ пространственного распределения стандартизованных коэффициентов бессимптомного ВПЧ-носительства и заболеваемости CIN населения по административным территориям края в 2011-2015 гг. позволил с помощью математико-статистического метода оценки колебаний ряда и типичных средних величин установить 5 уровней риска заболеваемости раком шейки матки, в соответствии с которыми выделено 5 групп районов края, достоверно отличающихся по количеству латентных вирусоносителей и уровню заболеваемости CIN (табл. 3.3, 3.4; рис 3.11). Для изучения особенностей пространственного распространения ВПЧ-ассоциированной патологии шейки матки в административных территориях Краснодарского края было проведено картографирование стандартизованных

показателей заболеваемости населения этих территорий по каждому городу и району края за 2011-2015 гг.

Таблица 3.3. Показатели ВПЧ-инфицированности женщин, проживающих на территории Краснодарского края (в среднем за 5 лет; на 1000 женского населения)

№№	Район	Показатель
Благоприятный		
1	Отраднинский	121,5
2	Староминский	140,3
3	Кавказский	148,1
Удовлетворительный		
4	Тихорецкий	152,5
5	Кропоткин	152,8
6	Приморско-Ахтарский	159,1
7	Горячий Ключ	161,7
8	Щербиновский	162,7
9	Крымский	184,6
10	Брюховецкий	190,2
11	Калининский	192,5
12	Крыловский	195,8
Напряженный		
13	Павловский	208,1
14	Ейский	208,9
15	Анапский	210,1
16	Каневский	210,7
17	Гулькевичский	215,4
18	Абинский	221,8
19	Курганинский	226,9
20	Успенский	235,0
21	Северский	241,2
22	Ленинградский	265,4
23	Новопокровский	277,1
24	Мостовский	290,2
Острый		
25	Апшеронский	302,8
26	Новокубанский	311,9
27	Славянск-на-Кубани	317,2
28	Армавир	330,1
29	Лабинский	335,1
30	Куцевский	351,4
31	Темрюкский	354,7
32	Белоглинский	360,3

33	Тбилисский	363,5
34	Динской	369,1
35	Кореновский	372,4
36	Тимашевский	381,7
37	Красноармейский	390,1
38	Выселковский	393,7
Критический		
39	Геленджик	402,2
40	Сочи	402,9
41	Туапсинский	403,2
42	Туапсе	408,9
43	Краснодар	409,2
44	Белореченский	409,6
45	Тихорецк	410,1
46	Новороссийск	412,3

В результате мы получили 5 групп районов, достоверно отличающихся по количеству ВПЧ-носителей и уровню заболеваемости CIN. Для латентных ВПЧ-носителей в первую группу (благоприятная) вошли 3 района с низким уровнем инфицированности населения (до 150 на 1000 женского населения), во вторую группу (удовлетворительная) вошло 9 районов с уровнем инфицированности ниже среднего краевого показателя (от 150 до 200), в третью группу (напряженная) - 12 районов со средним уровнем инфицированности (от 200 до 300), в четвертую группу (острая) - 14 районов с уровнем инфицированности выше среднего краевого показателя (от 300 до 400) и в пятую группу (критическая) вошло 8 районов с высоким показателем инфицированности (от 400 и выше на 1000 женского населения). Разница между уровнем заболеваемости в группах районов статистически достоверна ($t = 1,68$). Для больных цервикальными неоплазиями мы также выделили 5 групп. Первую группу (благоприятная) составили 4 района с низким уровнем заболеваемости (до 50 на 100 тыс. женского населения), во вторую группу (удовлетворительная) вошло 8 районов с уровнем заболеваемости ниже среднего краевого показателя (от 50 до 80), в третью группу (напряженная) вошло 14 районов со средним уровнем заболеваемости (от 80 до 100), в четвертую группу (острая) вошло 12 районов с уровнем заболеваемости выше среднего краевого показателя (от 100

до 130) и в пятую группу (критическая) вошло 9 районов с высоким показателем заболеваемости (от 130 и выше на 1000 женского населения). Разница между уровнем заболеваемости в группах районов статистически достоверна ($t = 1,58$).

Таблица 3.4. Показатели заболеваемости CIN населения Краснодарского края (в среднем за 5 лет; на 1000 женского населения)

№№	Район	Показатель
Благоприятный		
1	Щербиновский	37,4
2	Отраднинский	48,5
3	Горячий Ключ	48,7
4	Кавказский	49,9
Удовлетворительный		
5	Щербиновский	37,4
6	Отраднинский	48,5
7	Горячий Ключ	48,7
8	Кавказский	49,9
9	Щербиновский	37,4
10	Отраднинский	48,5
11	Горячий Ключ	48,7
12	Кавказский	49,9
Напряженный		
13	Армавир	81,7
14	Павловский	82,3
15	Усть-Лабинский	89,7
16	Ейский	92,0
17	Анапский	92,6
18	Каневский	94,0
19	Гулькевичский	94,2
20	Абинский	94,9
21	Курганинский	95,2
22	Успенский	95,8
23	Северский	96,3
24	Ленинградский	96,9
25	Новопокровский	98,2
26	Мостовский	99,1
Острый		
27	Апшеронский	101,3
28	Новокубанский	101,7
29	Славянск-на-Кубани	102,5
30	Лабинский	102,8
31	Краснодар	111,7
32	Темрюкский	112,9

33	Белоглинский	114,7
34	Тбилисский	121,2
35	Динской	122,4
36	Кореновский	125,7
37	Красноармейский	126,6
38	Геленджик	128,5
Критический		
39	Куцевский	138,2
40	Сочи	141,2
41	Туапсинский	146,2
42	Выселковский	150,2
43	Туапсе	159,9
44	Тимашевский	160,3
45	Белореченский	171,3
46	Тихорецк	171,9
47	Новороссийск	172,8

Для изучения особенностей пространственного распространения ВПЧ-ассоциированной патологии шейки матки в административных территориях Краснодарского края было проведено картографирование стандартизованных показателей заболеваемости населения этих территорий по каждому городу и району края за 2009-2012 гг. В результате мы получили 5 групп районов, достоверно отличающихся по уровню заболеваемости. Первую группу (благоприятная) составили 4 района с низким уровнем заболеваемости (до 5000 на 100 тыс. женского населения), во вторую группу (удовлетворительная) вошло 8 районов с уровнем заболеваемости ниже среднего краевого показателя (от 5000 до 8000), в третью группу (напряженная) вошло 14 районов со средним уровнем заболеваемости (от 8000 до 10000), в четвертую группу (острая) вошло 12 районов с уровнем заболеваемости выше среднего краевого показателя (от 10000 до 13000) и в пятую группу (критическая) вошло 9 районов с высоким показателем заболеваемости (от 13000 и выше). Разница между уровнем заболеваемости в группах районов статистически достоверна ($t = 1,58$). Низкий уровень заболеваемости отмечен в 4 районах края: Отрадненском, Кавказском, Щербиновском, и Горячеключевском. При этом не всегда уровень

инфицированности ВПЧ совпадал с выявляемостью CIN по регионам. Что может, с одной стороны, говорить о низком уровне профилактики (диагностики) ВПЧ-инфицирования, с другой стороны, о других факторах внешней среды, способствующей реализации бессимптомного вирусоносительства в цервикальную патологию.



Рисунок 3.11. Зоны заболеваемости CIN в Краснодарском крае

Те районы, в которых уровень заболеваемости CIN выше, чем уровень заболеваемости раком шейки матки (Северский, Новопокровский, Успенский, Ейский, Анапский, Крыловский и Туапсинский), возможно, страдают качеством учета больных. Эти данные также нуждаются в более углубленном изучении. Картограмма наглядно демонстрирует особенности территориальной распространенности заболеваемости CIN в Краснодарском крае. С одной стороны, они свидетельствуют о неравномерности распространения ее частоты,

с другой стороны - в северной части территории, по всему периметру с запада на восток, далее на юг четко выделяется зона повышенного риска заболевания CIN, в которую входят 21 район. Три таких района расположены в юго-западной части. Все эти регионы отличаются развитым сельским хозяйством, полеводством и садоводством, но с разными климатическими условиями. Кроме того, один Щербиновский район - на севере края - имеет самый низкий уровень заболеваемости. Полученные данные свидетельствуют о необходимости более глубокого изучения причин высокого и низкого уровня заболеваемости раком шейки матки в Краснодарском крае.

Учитывая выше проведенный анализ, мы объединили все районы и города с высоким и выше среднего уровнем заболеваемости раком шейки матки и цервикальной интраэпителиальной неоплазией и выделили зоны повышенного риска заболеваемости раком шейки матки в Краснодарском крае (рис. 3.11). В результате мы получили три зоны риска заболеваемости раком шейки матки:

I зона – Центральная, в которую вошли 14 районов, расположенных от востока к центру, включая г. Краснодар, а затем к югу (Красноармейский, Северский, Усть-Лабинский, Кореновский, Тимашевский, Тбилисский, Динской, Белореченский, Апшеронский, районы и гг. Сочи, Геленджик); II зона – Западная, включает 3 района (Анапский, Новороссийский, Темрюкский, Крымский, Славянский); III зона – Северная, в которую вошло 4 района (Ейский, Каневской, Куцевский, Крыловской), разделенные полосой районов со средним уровнем заболеваемости. В целом из 47 районов края в зоны риска вошел 21 район, то есть 44,7% территории Краснодарского края.

3.1.2. Микробиологическая характеристика пациенток с латентной формой ПВИ и больных ВПЧ-ассоциированной цервикальной интраэпителиальной неоплазией в Краснодарском крае

В ходе проведенного исследования проанализировано 6571 амбулаторная карта пациенток с латентным ВПЧ-носительством и 8124 амбулаторных карты больных CIN I-III степени (рис. 3.12-3.13).

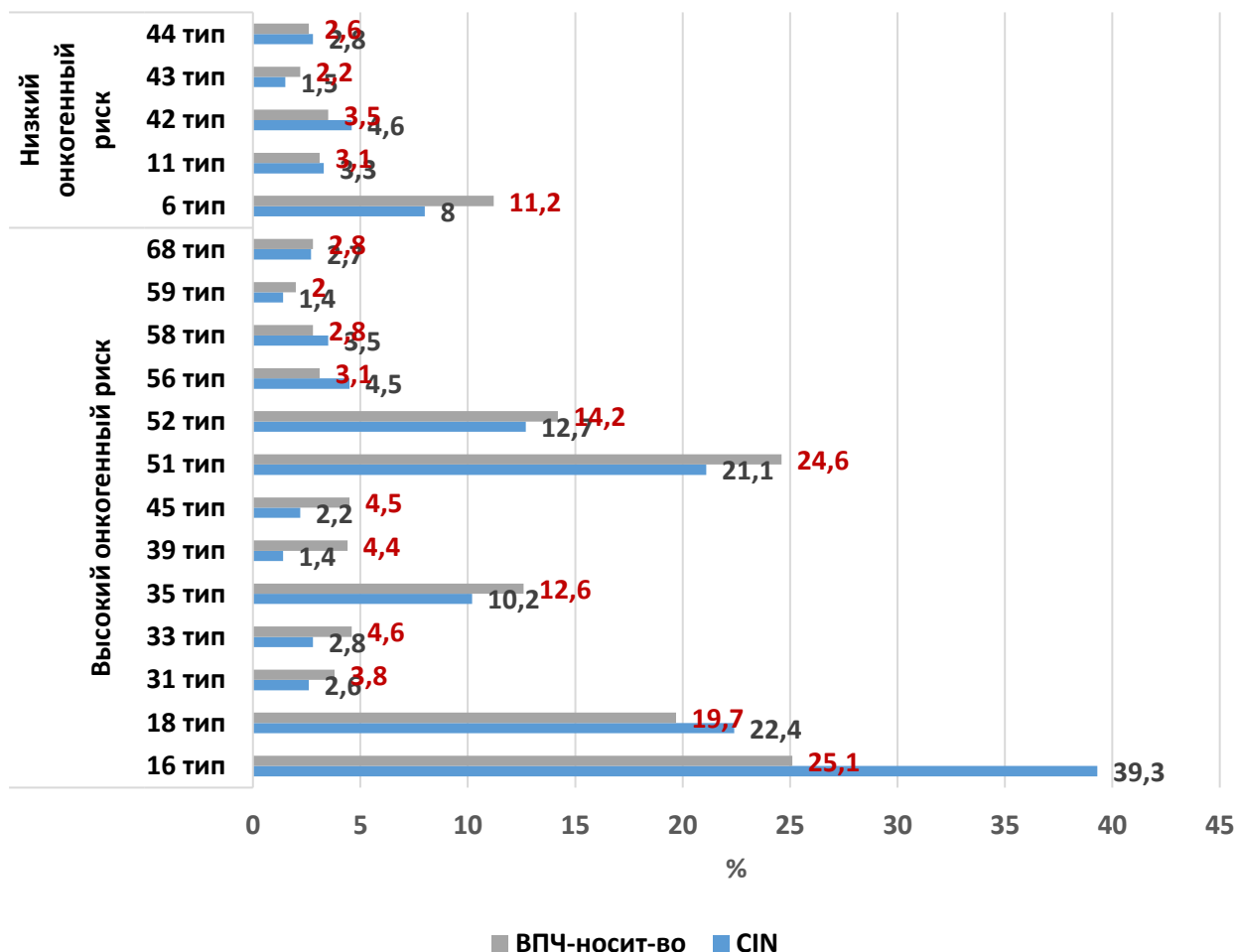


Рисунок 3.12. Типирование ВПЧ в Краснодарском крае

Обнаружено, что основными инфекционными агентами в Краснодарском крае, как при латентном ВПЧ-носительстве, так и при реализации инфекции в цервикальную неоплазию, являются высокоонкогенные типы вируса папилломы человека – 16 (25,1 и 39,3% соответственно), 18 (19,7 и 22,4%) и 51 типы (24,6 и 21,1%) (рис. 3.12-3.13). То есть, самостоятельно и в ассоциациях они встречались

у 69,4% вирусоносителей и у 82,8% больных CIN. При этом сочетание нескольких типов ВПЧ в исследованных группах составляло при латентных формах ПВИ - 13,1%, а при CIN – 12,8%.

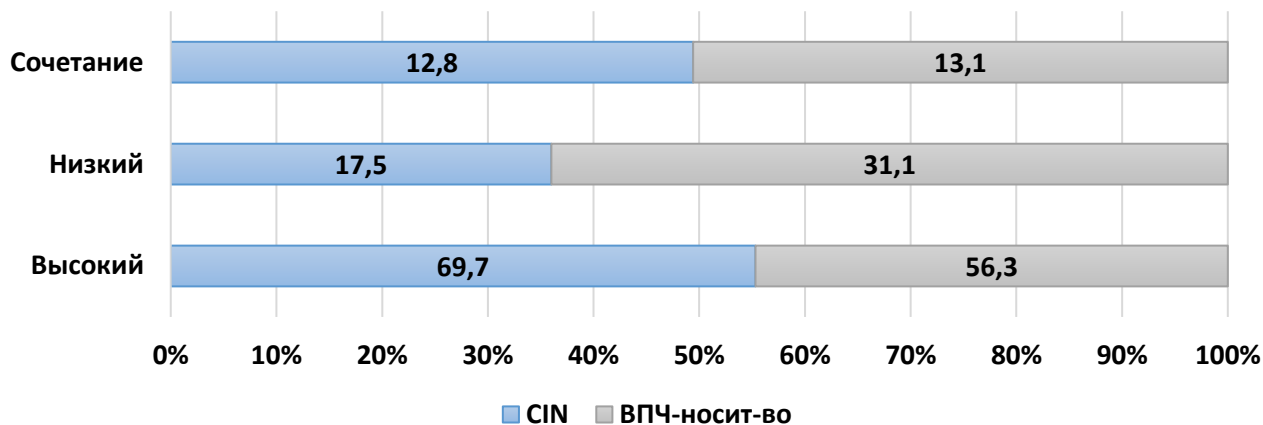


Рисунок 3.13. Встречаемость ВПЧ различного канцерогенного риска в Краснодарском крае

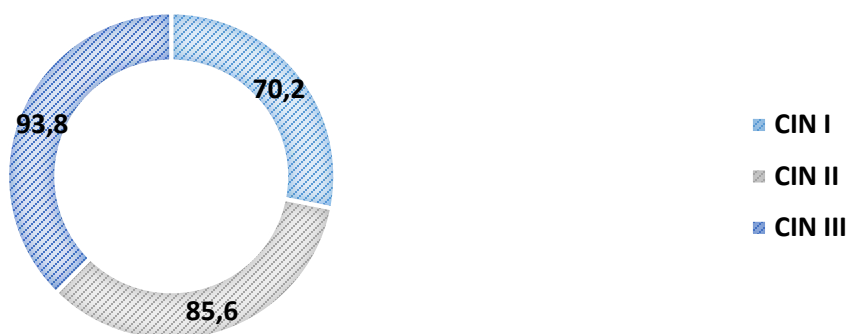


Рисунок 3.14. Частота встречаемости наиболее распространенных типов ВПЧ (16, 18 и 51) в зависимости от степени CIN в Краснодарском крае

Учитывая, что основными инициаторами патологии шейки матки в виде CIN были типы ВПЧ 16, 18 и 51, нами проанализирована частота из встречаемости у нашего контингента больных (8124 женщины) в зависимости от степени цервикального интраэпителиального поражения (рис 3.14). Выявлено, что чем выше степень поражения, тем чаще встречаются данные типы вирусов

(при CIN I – 70,2%, при CIN III доходит до 93,8%) самостоятельно или в ассоциациях.

Также был проведен эпидемиологический анализ заболеваемости сопутствующими урогенитальными инфекциями у носителей ВПЧ и больных с CIN. Выявлено, что у 81,7 вирусоносителей и 90,1% пациенток с CIN обнаружена та или иная патогенная микрофлора урогенитальной зоны, что еще раз подтверждает факт о, практически, обязательной ассоциации ПВИ с другими ИППП [В.В. Дубенский, 2006; В.А. Молочков, В.И. Киселев и др., 2004; В.Н. Прилепская, С.И. Роговская и др., 2014]. Оценку состояния флоры влагалища с применением четырех степеней ее чистоты, проводили ретроспективно по унифицированной схеме Херлена. Результаты микроскопического исследования классифицировали по Кира Е.Ф. (2001) (рис. 3.15). Исследования показали, что в группе больных CIN количество пациенток с нормоценозом влагалища было более чем в 1,5 раза ниже, чем при бессимптомном ВПЧ-носительстве (16,1 и 25,7% соответственно). При этом влагалищных дисбиозов у больных CIN было основное количество – 30,5% (при вирусоносительстве – 14,6%).

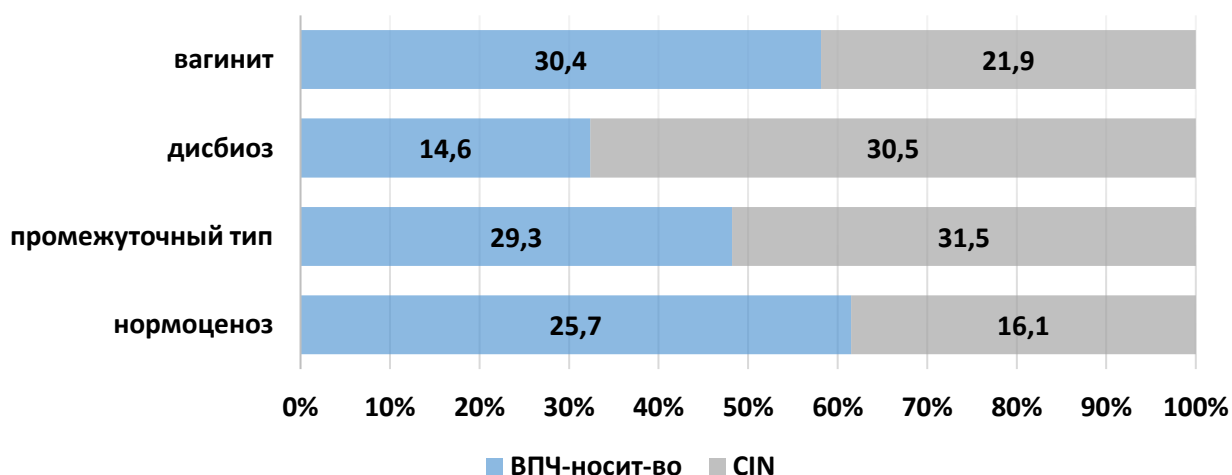


Рисунок 3.15. Микробиологическая характеристика пациенток (Кира Е.Ф., 2001)

Зато мазков воспалительного типа при ВПЧ-носительстве было больше – 30,4% (при CIN – 21,9%). Микроскопическая картина влагалищного мазка в

целом соответствовала количеству лейкоцитов и общей микробной обсемененности (рис. 3.16-3.17).

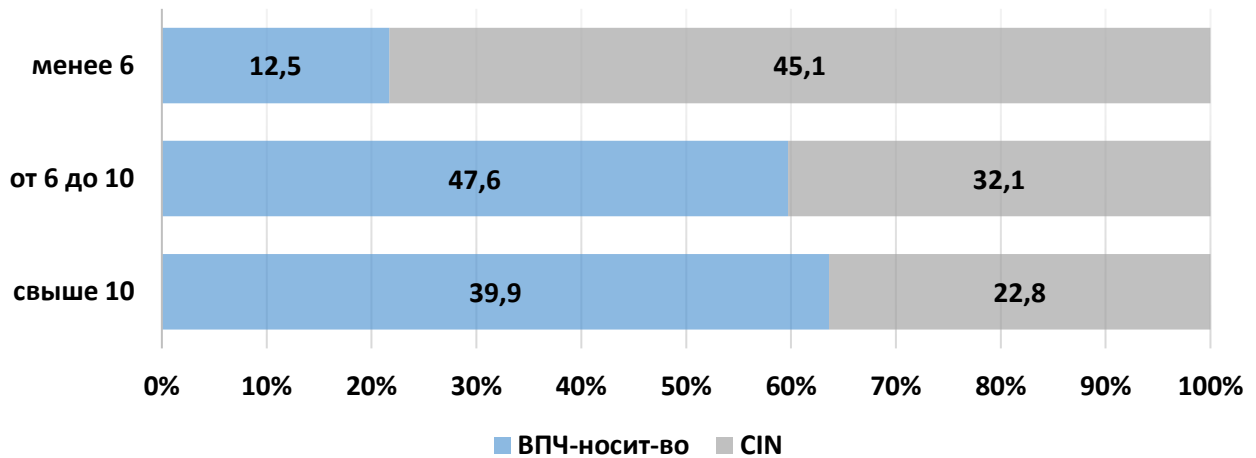


Рисунок 3.16. Лейкоцитарная реакция во влагалищных мазках

Повышенное количество лейкоцитов во влагалищных мазках регистрировалось в 1,75 раз чаще у пациенток с бессимптомным ВПЧ-носительством, зато минимальная лейкоцитарная реакция влагалища в 3,6 раза встречалась чаще у пациенток с CIN. Этот факт косвенно говорит в пользу теории о преобладании противовоспалительных реакций локального иммунного ответа для начала реализации неопластических процессов.

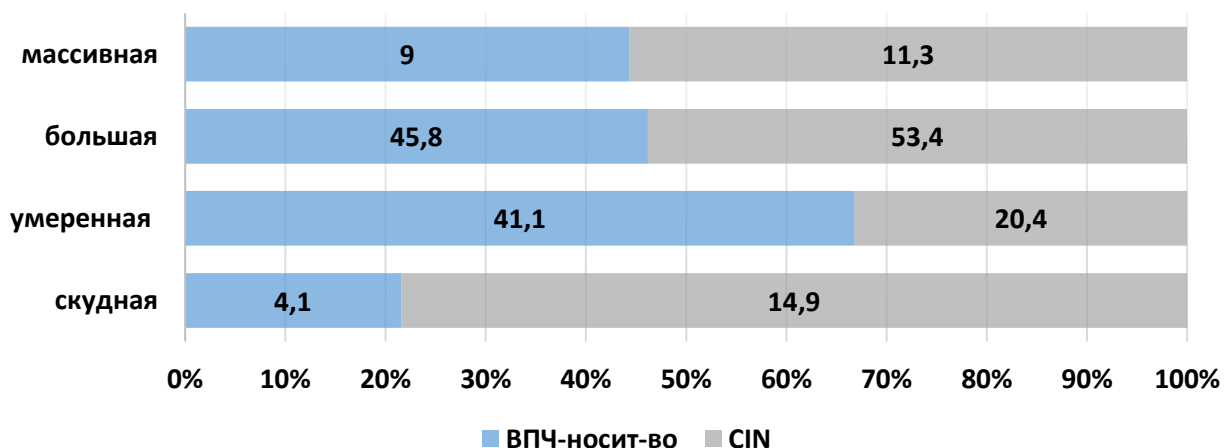


Рисунок 3.17. Общая микробная обсемененность

По микробной обсемененности цервико-вагинальной зоны, патологическая обсемененность у латентных ВПЧ-носителей (большая и массивная) выявлена в

46,8%, а у больных CIN – в 64,7% (почти в 1,5 раза чаще). Но, что интересно, скудная микробная обсемененность при CIN встречалась в 3,6 раза чаще, чем при латентном ВПЧ-носительстве (14,9 и 4,1% соответственно).

3.1.3. Прогноз уровня заболеваемости ВПЧ-ассоциированными цервикальными неоплазиями в Краснодарском крае

Одной из наиболее интересных медицинских проблем является - прогнозирование. Это обусловлено необходимостью совершенствования планирования в системе здравоохранения. При вычислении стандартизованных показателей, на основе которых определялись прогнозные уровни заболеваемости, в качестве стандарта были приняты расчетные данные об ожидаемой на 2016-17 гг. возрастной структуре женского населения Краснодарского края (данные Краевого статистического управления).

Мы рассчитали показатели заболеваемости CIN на 2016-17 гг., а также вычислили доверительные интервалы прогнозных показателей с 95% вероятной оценкой. Прогнозирование уровня заболеваемости в целом по Краснодарскому краю проводилось на основании данных за 2011-2015 гг. при допущении, что до этого года сохранится прямолинейная тенденция динамики заболеваемости (рис. 3.18). С целью прогнозирования заболеваемости был использован метод экстраполяции. Было применено аналитическое выравнивание динамического ряда методом наименьших квадратов. Это позволяет определить основную тенденцию изучаемых явлений, когда их закономерности могли быть скрыты действием случайных факторов.

Сравнение расчетных годовых показателей заболеваемости CIN женщин Краснодарского края в 2013-2015 гг., полученных путем экстраполяции тренда соответствующих показателей заболеваемости в 2011-2013 гг., с реальными коэффициентами заболеваемости в 2014-2015 гг., подтверждает достаточно высокую точность прогноза, что, в свою очередь, подтверждает эффективность применения трендовой модели прогнозирования. Прогнозные уровни

заболеваемости CIN рассчитывали лишь при условии, что для их динамики в 2011-2015 гг. была доказана достоверность прямолинейной связи ($Pf < 0,05$).

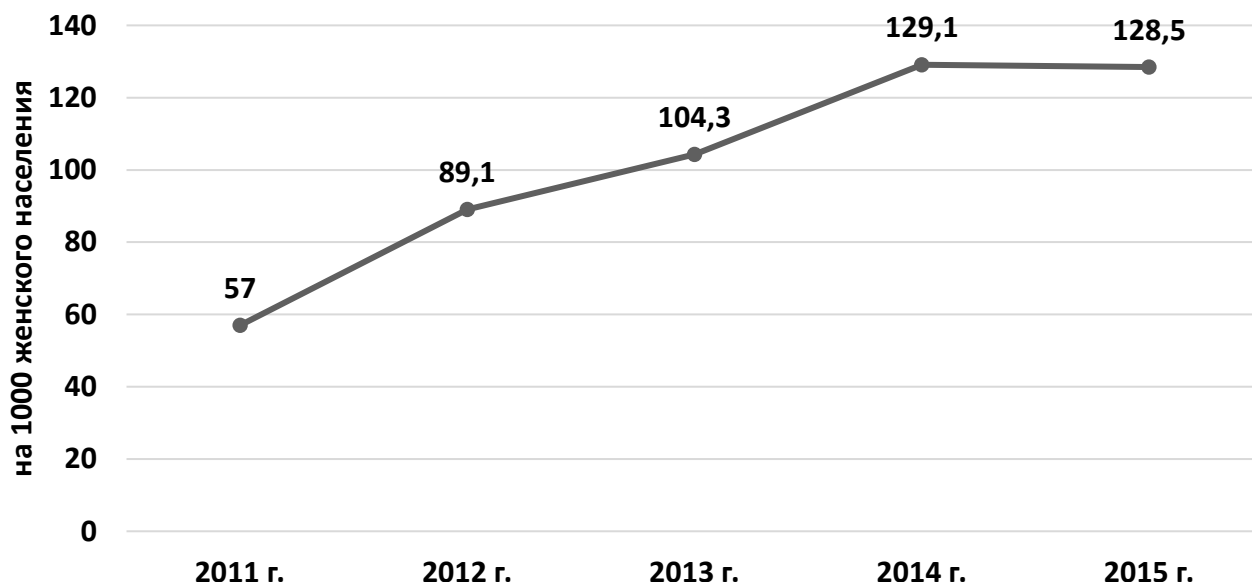


Рисунок 3.18. Заболеваемость CIN населения Краснодарского края (стандартизованные показатели на 1000 женского населения)

Анализ полученных данных показывает, что к 2016-17 гг. не следует ожидать повышение частоты заболеваемости CIN. Сопоставление ожидаемых интенсивных и стандартизованных показателей заболеваемости женского населения края в 2015 году свидетельствует о том, что эти показатели для CIN фактически равны. Это еще раз подтверждает правильность вывода о том, что при стандартизации показателей, на основе которых определяются прогнозные уровни заболеваемости, например, к 2016 году в качестве стандарта необходимо использовать расчетные данные о возрастном составе ожидаемого на середину 2016 года женского населения. Применение именно этого стандарта женского населения, отражающего будущую демографическую ситуацию, позволяет определить близкие к реальным уровни прогнозируемой частоты заболеваний.

Принимая во внимание невозможность выраженного изменения демографической ситуации в Краснодарском крае в ближайшие годы и учитывая стойкий характер динамики показателей распространенности изучаемых групп

заболеваний, можно с высоким уровнем вероятности полагать, что вычисленные нами прогнозные уровни будут близки к реальным.

Проведенный нами расчет прогноза заболеваемости до 2015 года наглядно показал тенденцию роста уровня показателя заболеваемости CIN с 57,0 в 2011 году до 128,5+71,5 в 2015 году (в стандартизованном показателе на 1000 женского населения соответственно).

Для оценки прогноза развития CIN на фоне ВПЧ-инфицирования мы попытались выявить некоторые прогностические критерии разработали диагностическую таблицу, позволяющую определить прогноз перехода латентных форм ПВИ в цервикальную неоплазию (табл. 3.5). Диагностические коэффициенты (ДК) рассчитывали для каждого из признаков посредством последовательного анализа Вальда: $(ДК = 10 \lg P1/P2)$; где ДК - диагностический коэффициент; P1 - относительная частота признака при первом верифицируемом состоянии, выраженная в долях единицы (ДЕ); P2 - относительная частота признака при втором верифицируемом состоянии. Показатель информативности признака определяли по формуле Кульбаха, позволяющей оценить степень различия между распределениями: $J = ДК \times \frac{1}{2} (P1 - P2)$; где J - информативность; ДК - диагностический коэффициент; P1 - относительная частота признака при первом верифицируемом состоянии, выраженная в долях единицы; P2 - относительная частота признака при втором верифицируемом состоянии, выраженная в долях единицы. Проведенный последовательный анализ Вальда позволил выявить наиболее информативные показатели для оценки прогноза CIN. В дальнейшем, при проведении собственного проспективного исследования, будут предложены новые клинико-кольпоскопические, гистологические и лабораторные критерии для прогноза утяжеления CIN.

Таблица 3.5. Прогностические критерии реализации латентной формы ПВИ в CIN

№№	Признак	Латентная форма ПВИ, ДЕ	CIN, ДЕ	ДК
Географические признаки				
1	Острая или критическая зона проживания	0,21	0,45	+1,6
2	Напряженная зона проживания	0,34	0,41	+1,3
3	Благоприятная или удовлетворительная зона проживания	0,48	0,29	-2,5
Анамнестические признаки				
4	Начало половой жизни			
	до 15 лет	0,11	0,85	+7,4
	15-17 лет	0,26	0,71	+3,3
	18-20 лет	0,32	0,45	+1,4
	свыше 20 лет	0,57	0,24	-2,7
5	Возраст			
	до 20 лет	0,12	0,91	+7,6
	21-25 лет	0,25	0,53	+3,1
	26-30 лет	0,41	0,29	-2,2
	свыше 30 лет			
6	Интервал от менархе до сексуального дебюта в			
	2-3 года	0,19	0,54	+4,1
	4-5 лет	0,30	0,21	-0,5
	6 лет и более	0,55	0,11	-4,5
7	Количество половых партнеров			
	0	0,10	0,54	-5,4
	1	0,22	0,15	-2,5
	2	0,27	0,56	+3,1
	3 и более	0,13	0,79	+6,0
8	Курение	0,14	0,47	+3,8
9	Прием КОК (более 5 лет)	0,16	0,25	+1,9
10	ВМС	0,23	0,37	+3,1
11	Отягощенная онкологическая наследственность	0,20	0,74	+5,5
Клинические признаки				
12	Аногенитальные бородавки	0,31	0,60	+3,9
13	Рубцовая деформация ш/м	0,12	0,55	+4,3
14	Эктопия/эктропион ш/м	0,14	0,58	+4,3
15	Хронический цервицит	0,28	0,71	+4,2
16	Вагинит/вагиноз	0,31	0,90	+4,3
Лабораторные признаки				
17	рН			
	>5,5	0,14	0,81	+6,5
	<5,5	0,62	0,15	-4,8
18	Количество лейкоцитов в вагинальном содержимом (в п/зр)			

	Менее 6	0,12	0,45	+3,7
	6-10	0,48	0,32	-1,6
	Свыше 10	0,40	0,23	-1,5
19	Общая микробная обсемененность			
	Массивная	0,09	0,23	+2,5
	Большая	0,45	0,53	+1,7
	Умеренная	0,41	0,20	-1,9
	Скудная	0,04	0,15	+4,1
20	Инфекционный фактор			
	ИППП:	0,11	0,97	+8,6
	Гонококковая инфекция	0,09	0,14	+2,5
	Трихомонадная инфекция	0,23	0,68	+4,7
	Хламидийная инфекция	0,24	0,71	+5,3
	Мико(-уреа)плазменная инфекция	0,26	0,54	+3,2
	Урогенитальный герпес	0,17	0,90	+6,6
	Урогенитальный кандидоз	0,31	0,56	+2,2
	Микстинфицирование (ИИ 3 и более)	0,13	0,83	+7,1
	Неспецифическая условно-патогенная микрофлора	0,28	0,61	+3,8
21	Вагинальный биоценоз			
	Вагинит	0,30	0,27	-0,4
	Дисбиоз	0,16	0,88	+7,3
	Промежуточный тип	0,29	0,31	+0,2
	Нормоценоз	0,68	0,11	-6,4
	Бактериальный вагиноз	0,20	0,85	+4,5
22	Микстинфицирование различными высокоонкогенными типами ВПЧ с диапазоном ИИ от 3 до 6	0,19	0,84	+6,5

Производился расчет диагностического коэффициента для каждого из признаков: при ДК от -26 до +12 битов прогнозируют благоприятный исход (перехода ВПЧ-носительства в CIN не предвидится), при ДК от +13 до плюс +23 битов вероятность перехода бессимптомного ВПЧ-носительства в цервикальную интраэпителиальную неоплазию составляет 95%, при ДК более +23 битов - 99%.

3.2. Первичная профилактика рака шейки матки в Краснодарском крае (ВПЧ-вакцинация)

С 2009 года ВОЗ рекомендует включать вакцинацию против ВПЧ в календари прививок всех стран мира. В 2012 году ВОЗ присвоила вакцинации против ВПЧ приоритетный статус для национальных и региональных программ иммунизации. В России, как и во всем мире, зарегистрированы 2 вакцины для профилактики ВПЧ-ассоциированных заболеваний: четырехвалентная, Гардасил (MSD), содержащая антигены 4 типов ВПЧ (6, 11, 16, 18) и двухвалентная, Церварикс (GSK), содержащая антигены ВПЧ 16 и 18 типа. Вакцина Гардасил, зарегистрированная в России еще в 2006 году, разрешена к применению для девочек и женщин от 9 до 45 лет и лиц мужского пола от 9 до 26 лет. Вакцина Церварикс была зарегистрирована в России в 2008 году и показана только для девочек и женщин в возрасте 9-45 лет. С 2008 года в ряде регионов России действуют финансируемые из региональных бюджетов программы вакцинации девочек с 12-летнего возраста. Всего в настоящее время в России реализуются 27 региональных программ по вакцинации против ВПЧ. Самые крупные из них реализованы в Санкт-Петербурге, ХМАО, Новосибирске, Московской, Смоленской и Свердловской областях. Пока в Российской Федерации этой программой вакцинации охвачены только девочки-подростки. Вакцинация против ВПЧ включена в региональный календарь вакцинации Москвы для девочек 12-13 лет. К сожалению, пока охват вакцинацией против ВПЧ девочек в Москве не превышает 5%. Дело в том, что вакцинация осуществляется в настоящее время на базе детских поликлиник. Между тем ВОЗ рекомендует проводить ВПЧ-вакцинацию на базе школ, так как это позволяет добиться максимального охвата и лучшего мониторинга безопасности и эффективности вакцинации. Например, в Смоленской области, где вакцинация проводится на базе школ, охват вакцинацией составляет 90%.

В Краснодарском крае нет региональной программы ВПЧ-вакцинации, и она не включена в календарь обязательных прививок. При этом большинство кабинетов вакцинации против вируса папилломы человека расположено в краевом центре и лицензированы, в основном, частные клиники. Бесплатной вакцинации против ВПЧ пока не проводится, стоимость полного пакета вакцинации (3 прививки) от 18 до 23 тысяч рублей). Профилактическая работа по информированности населения о способах профилактики шейки матки ведется только силами кафедрах акушерства, гинекологии и перинатологии акушерства, гинекологии и перинатологии ФПК и ППС КубГМУ в основных ВУЗах г. Краснодара (информационно-образовательная программа «Охрана репродуктивного здоровья молодежи», включающая курс лекций и семинаров по этиологии рака шейки матки, путях передачи вируса папилломы человека, предрасполагающих факторах и методах профилактики заболеваний, вызванных папилломавирусной инфекцией), что явно недостаточно.

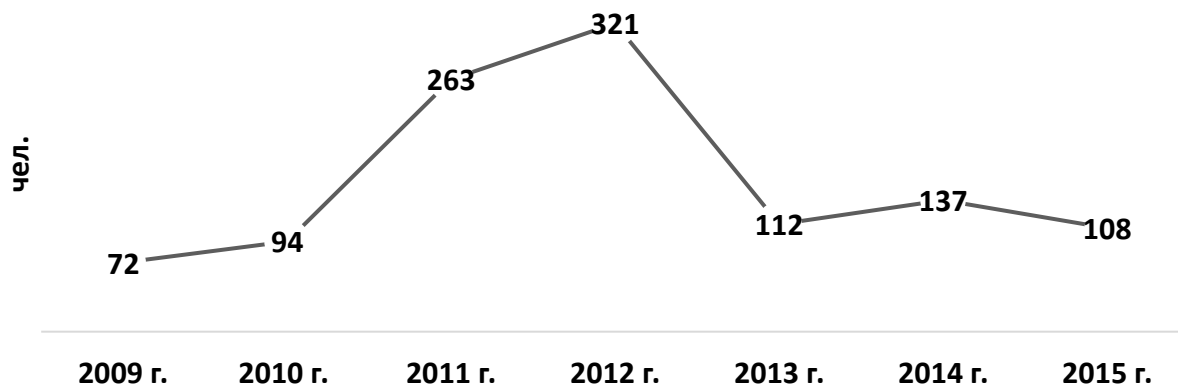


Рисунок 3.19. Динамики ВПЧ-вакцинации

Наряду с этим в прессе и интернете ведется агрессивная антипропаганда вакцинации против ВПЧ, что также не помогает успеху первичной профилактики рака шейки матки. Поэтому статистика вакцинированных в Краснодарском крае весьма печальна (рис. 3.19). При исследовании количества вакцинированных девушек в Краснодарском крае с 2012 года выявлена даже отрицательная динамика (уменьшение количества ВПЧ-вакцинированных девушек почти в 3

раза), при том, что для столь плотно населенного края данное количество и так ничтожно мало. Основная группа вакцинированных приходится на возраст от 15 до 20 лет (51,9% в 2012 году и 60,3% в 2015 году), но намечается некоторый рост в возрастной группе 9-14 лет (с 16,7 до 22,3%) и 26-30 лет (с 1,9 до 8,2%) (рис. 3.20). Но все проводимые на настоящее время мероприятия явно недостаточны, учитывая постоянный рост в Краснодарском крае количества ВПЧ-носителей и больных цервикальными неоплазиями и раком шейки матки. К сожалению, в Краснодарском крае (как и нигде в Российской Федерации) нет статистики инфицированности ВПЧ у вакцинированных женщин, что могло бы показать эффективность вакцинации, как основного средства борьбы с ассоциированными с вирусом папилломы человека заболеваниями.

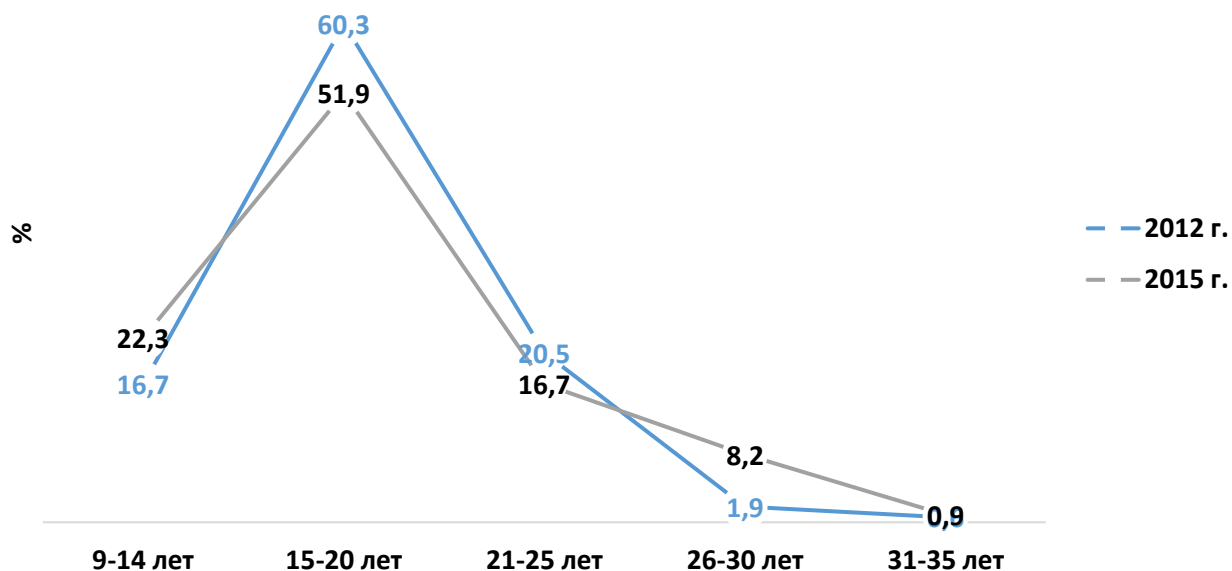


Рисунок 3.20. Распределение вакцинированных по возрастным группам

Таким образом, в Краснодарском крае выявлен достаточно слабый уровень борьбы с ВПЧ-ассоциированными заболеваниями. Первичная профилактика рака шейки матки пока находится на крайне низком уровне.

3.3. Изучаемые группы и предлагаемая терапия

3.3.1. Социально-анамнестическая характеристика пациенток с латентными формами ПВИ и больных ВПЧ-ассоциированной цервикальной интраэпителиальной неоплазией

Под нашим наблюдением находилось 410 пациенток в возрасте от 18 до 49 лет (90 пациенток с латентным ВПЧ-носительством, 190 больных цервикальной интраэпителиальной неоплазией легкой степени (CIN I), 130 больных цервикальной интраэпителиальной неоплазией средней степени (CIN II) и 60 условно здоровых женщин (иммуноцитобиохимический контроль).

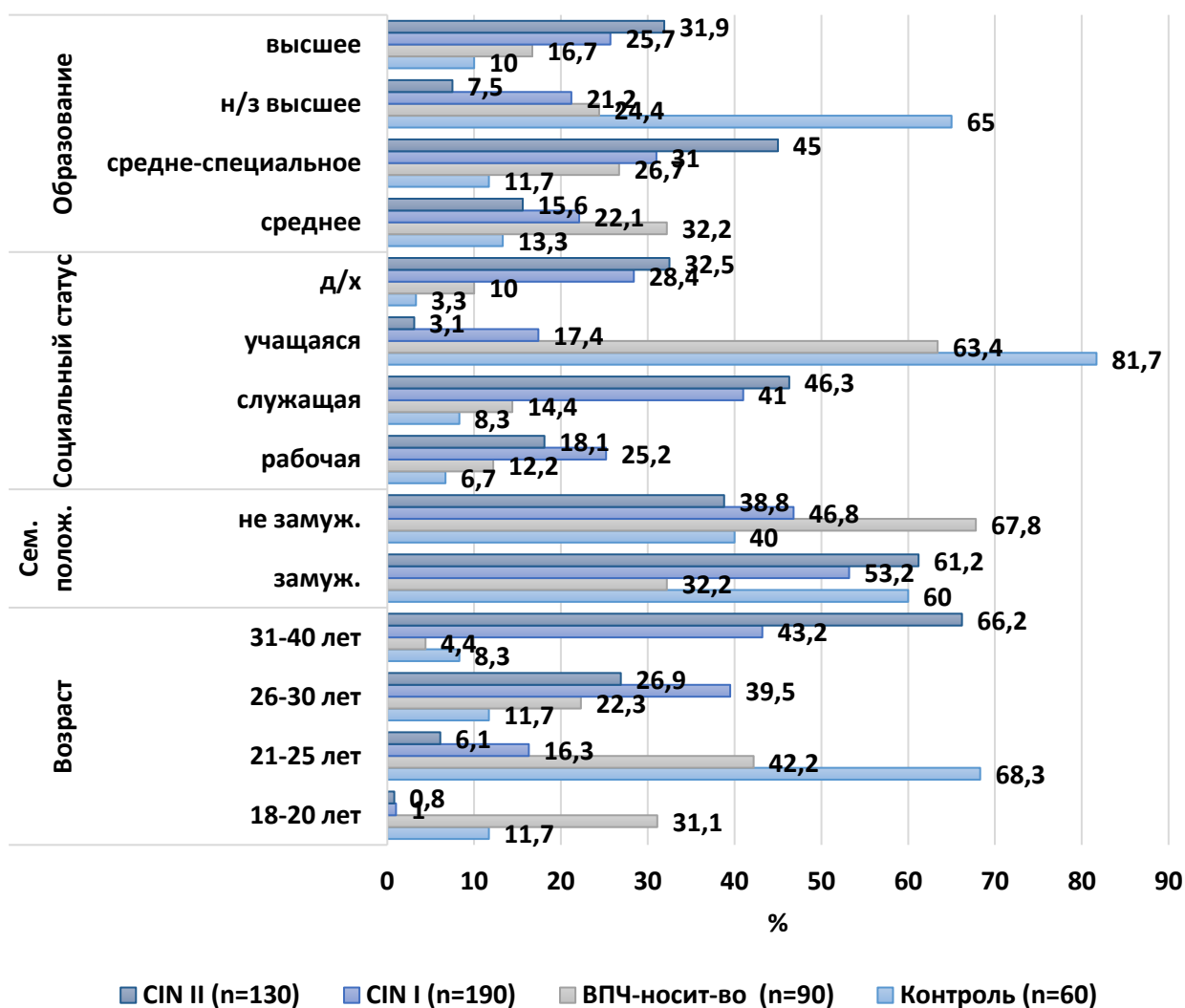


Рисунок 3.21. Социальное ранжирование женщин исследуемых групп

Все женщины исследуемых групп были стандартизированы и представлены в четырех временных интервалах (рис. 3.21). Анализ данных показывает, что наиболее часто ВПЧ-носительство встречалось у женщин недавно начавших половую жизнь (18-20 лет – в 31,1%, 21-25 лет – 42,2%), CIN I (82,7%), как и CIN II (93,1%) чаще определялся у женщин в возрасте от 26 до 40 лет. При этом чем старше возраст, тем чаще встречалось цервикальное поражение средней степени (в 31-40 лет CIN I выявлен у 43,2% больных, а CIN II у 66,2%). Данное исследование еще раз подчеркивает тот факт, что для реализации вирусоносительства в цервикальную неоплазию, как и на утяжеление патологии необходимо в среднем 4-7 лет. В целом, прямой зависимости заболеваемости от возраста, места работы и других социальных причин выявлено не было. Средний возраст менархе составил $12,8 \pm 1,2$ года во всех группах. Средний возраст полового дебюта также в исследуемых группах практически не отличался – $18,2 \pm 1,4$ года. Интервал от менархе до сексуального дебюта в 3-4 года был зарегистрирован 31,9 $\pm$ 2,8% пациенток с бессимптомным ВПЧ-носительством, 32,1 $\pm$ 3,7% больных CIN I и 30,7 $\pm$ 2,9% больных CIN II (в контрольной группе данный показатель составил 25,6 $\pm$ 1,9% ($p < 0,05$)). На интервал 5-6 лет и более указали больше 45,2 $\pm$ 3,1% вирусоносительниц и 45,7 $\pm$ 4,4% пациенток с CIN I-II ($p < 0,05$). Среднее значение интервала между возрастом менархе и возрастом начала половой жизни составило - 5,2 года для ВПЧ-носителей, и 5,1 год в группе пациенток с CIN (рис. 3.23). Современные методы контрацепции использовали 40,6 $\pm$ 1,5% вирусоносителей, 44,7 $\pm$ 3,8% больных CIN I и 47,0 $\pm$ 2,5% - CIN II. При изучении сексуального поведения пациенток с латентным ВПЧ-носительством и CIN легкой и средней степени не было выявлено статистически значимых отличий по большинству признаков ($p > 0,05$), за исключением уменьшения количества половых партнеров в группе пациенток с CIN II и предпочтительными методами контрацепции. Данный факт,

скорее всего, зависит от возрастной структуры исследуемых и семейного положения (почти в 1,5 раза больше в группе больных CIN II замужних женщин).

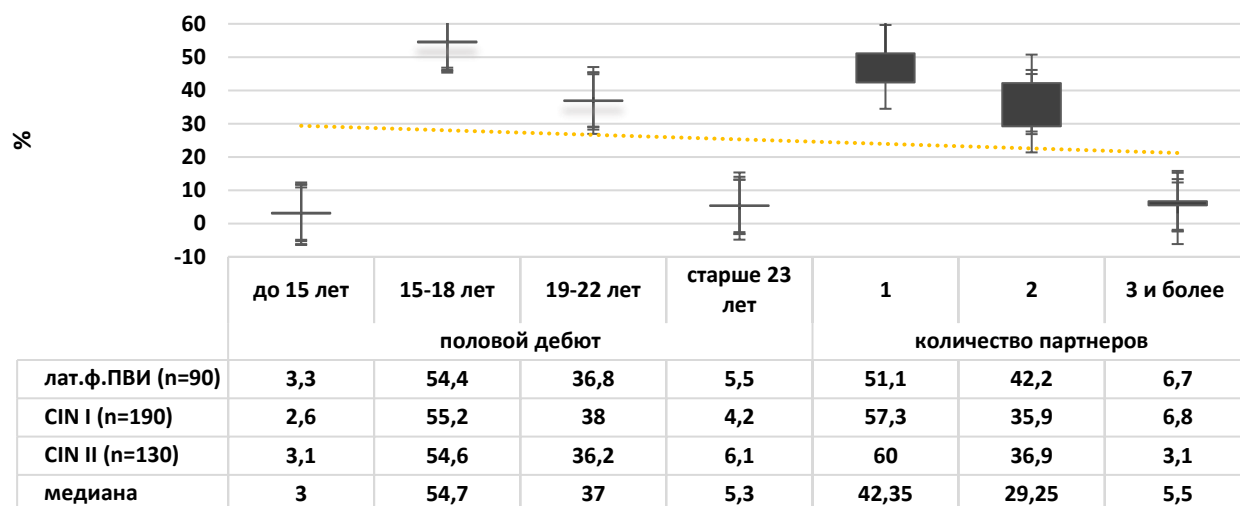


Рисунок 3.22. Сексуальное поведение в исследуемых группах

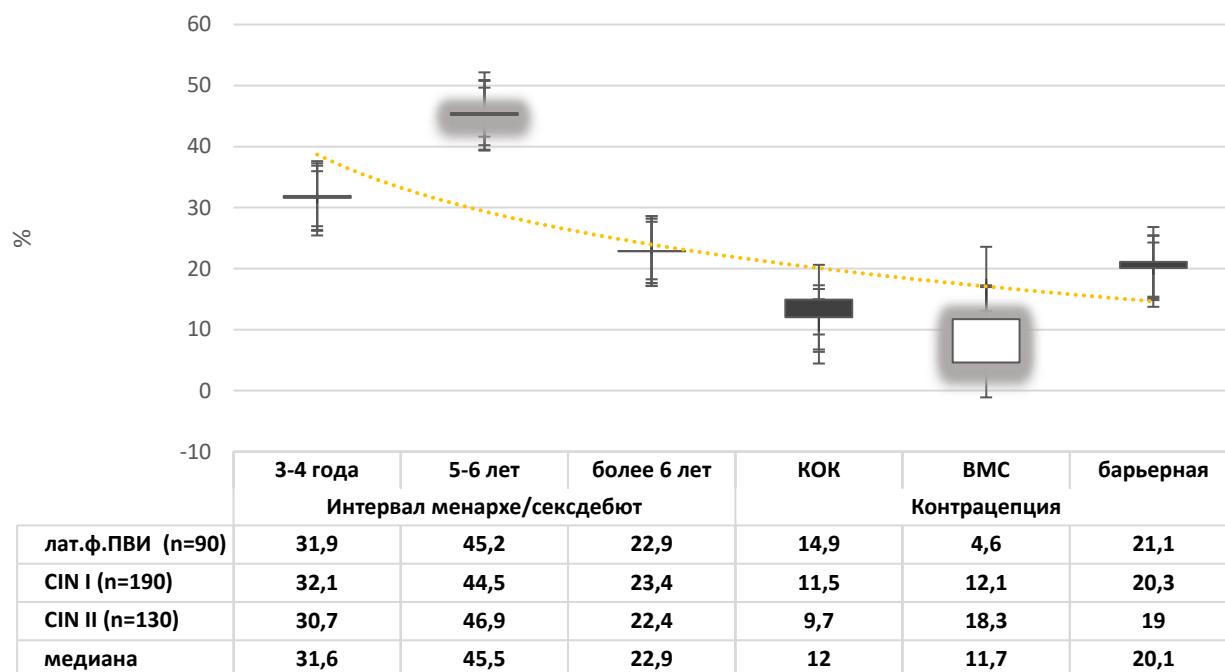


Рисунок 3.23. Сексуальное поведение в исследуемых группах (продолжение)

На никотиновую зависимость указали $17,9 \pm 2,1\%$ ВПЧ-носительниц, $33,5 \pm 4,2\%$ больных CIN I и $37,7 \pm 4,0\%$ больных CIN II. Установлено статистически значимое преобладание курящих среди больных CIN I-II ($p < 0,05$). Исходя из этого, курение можно рассматривать как не только риск-фактор ПВИ,

а также как кофактор прогрессии вирусного поражения шейки матки. Паритет, как реализация репродуктивной функции женщины, нами рассматривался с точки зрения одного из факторов индукции неопластических процессов в репродуктивных органах. Но, учитывая различие в возрасте в группах с бессимптомным носительством и CIN I-II, эти данные нельзя считать достоверными (рис. 3.24).

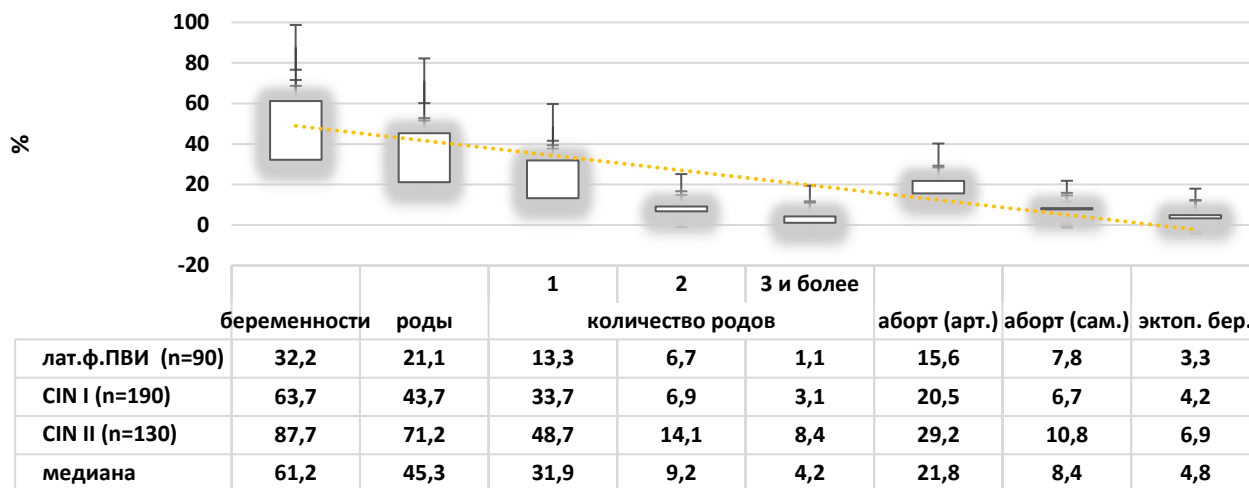


Рисунок 3.24. Паритет в исследуемых группах

При анализе осложнений в родах и послеродовом периоде необходимо отметить, что у больных CIN I-II высок травматизм мягких родовых путей, в частности разрыв шейки матки - 17,3% (у ВПЧ-носителей, соответственно - 6,3%).

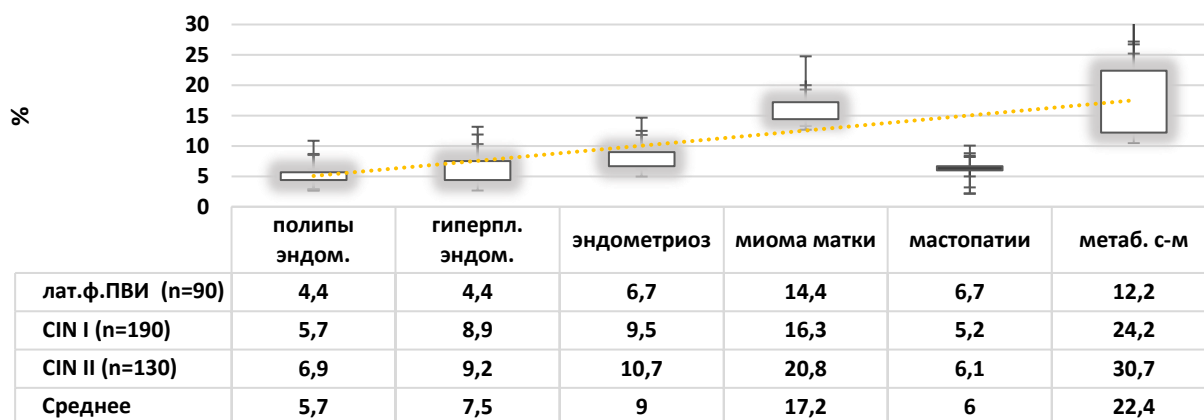


Рисунок 3.25. Распространенность эндокринзависимых заболеваний в исследуемых группах

Заболевания эндокринной системы женщины относятся к факторам, которые влияют на различные звенья ее репродуктивной системы и, в частности, на тропные органы для вируса папилломы человека: шейку матки, стенки влагалища и вульву. Данные заболевания способны создать более благоприятные условия для инвазии вируса, активации неопластических процессов в эпителии, способствуют извращению иммунного ответа. Мы проанализировали частоту и структуру эндокринзависимых заболеваний ВПЧ-носительниц и больных цервикальными неоплазиями (рис. 3.25). При этом, наиболее распространенными заболеваниями являлась патология, связанная с относительной гиперэстрогенией: эндометриоз – 6,7% у вирусоносителей и 9,5 и 10,7 у больных CIN I-II соответственно, миома матки – 14,4-16,3-20,8%, гиперплазия эндометрия и полипы эндометрия. Достаточно часто в исследуемых группах встречался метаболический синдром: 12,2% у латентных ВПЧ-носителей и 24,2 и 30,7 у больных CIN I-II.

В процессе проведенного исследования выявлено, что ВПЧ-ассоциированная цервикальная интраэпителиальная неоплазия приводит к нарушению социальной адаптации женщин, проявляющейся конфликтами в семье на фоне раздражительности, чувства беспокойства, вины, сниженной самооценки, отсутствия нормального сна, боязни интимных отношений и венерических заболеваний, бесплодия, а также канцерофобии. Это ведет к частым посещениям пациентками медицинских учреждений, пропуску работы, что в свою очередь ведет к экономическим потерям.

3.3.2. Клиническая и цитоморфологическая характеристика пациенток с латентными формами ПВИ и больных ВПЧ-ассоциированной цервикальной интраэпителиальной неоплазией

Клиническая картина в группах латентных ВПЧ-носителей и больных ВПЧ-ассоциированными CIN I-II не была выраженной. У $65,2 \pm 4,3\%$ обследованных не было выявлено никаких жалоб. У 16,7% вирусоносителей

выявлялись жалобы на бели различного характера, у 13,3% субъективные ощущения в виде зуда, жжения, 4,4% диспареунии. У больных CIN I-II патологические выделения из половых путей встречались в $40,2 \pm 3,8\%$ наблюдений, зуд, жжение – в $23,5 \pm 2,3\%$, диспареуния – в $9,4 \pm 2,0\%$. Объективная клиническая картина часто не соответствовала субъективным жалобам.

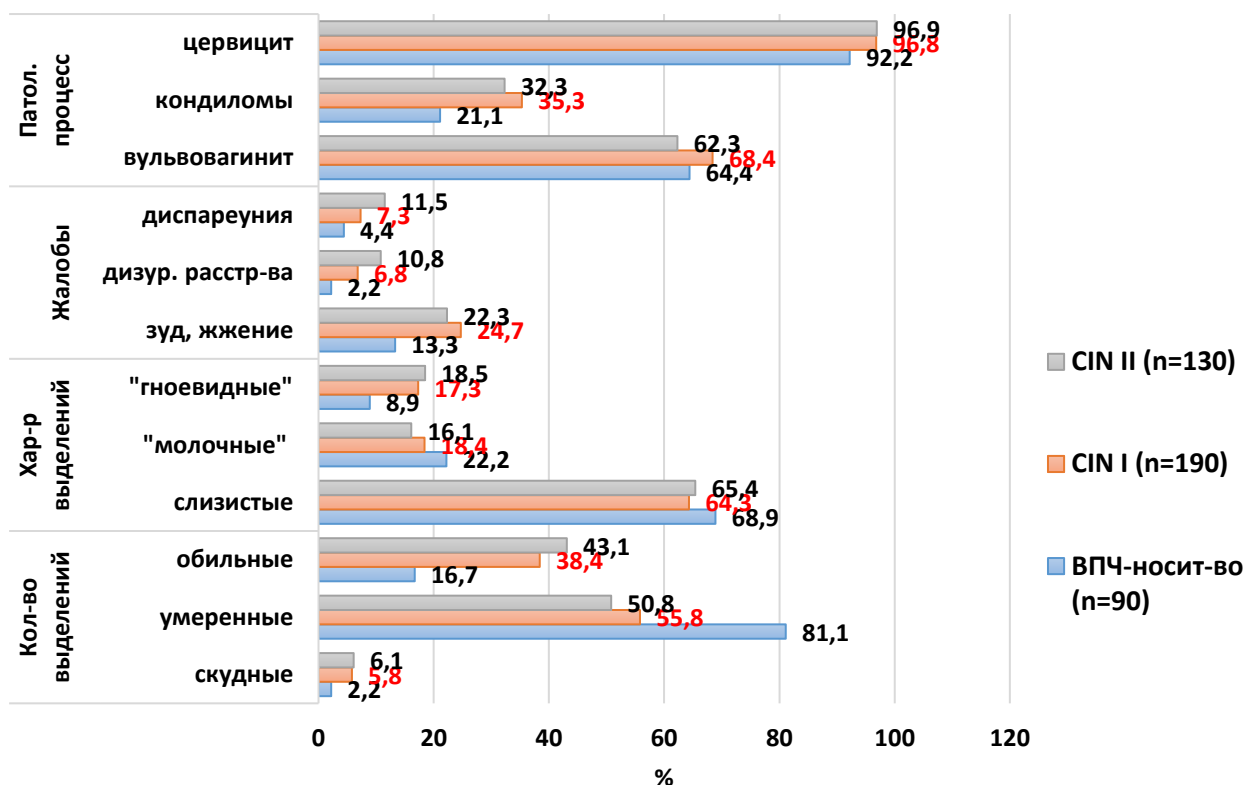


Рисунок 3.26. Клиническая характеристика пациенток исследуемых групп

Так при гинекологическом осмотре клинические признаки вульвовагинита встречались у 64,4% латентных ВПЧ-носителей и у $65,3 \pm 2,9\%$ больных CIN I-II. Вульвовагинальные кондиломы были обнаружены у 21,1% пациенток с отсутствием неоплазии шейки матки, и у $33,8 \pm 1,6\%$ больных CIN I-II. Воспалительные изменения в шейке матки (цервицит) выявлен у большинства пациенток исследуемых групп – $95,3 \pm 2,4\%$ (рис. 3.26).

Всем пациенткам исследуемых групп была проведена кольпоскопия (кольпоскоп Carl Zeiss OPMI PICO, Germany). У большинства пациенток всех групп при кольпоскопии выявлены изменения слизистых воспалительного

характера, характерные для специфического вагинита и цервицита (неярко выраженная гиперемия слизистой влагалища, волнистая поверхность на большом протяжении эпителия шейки матки и влагалища) (рис. 3.27).

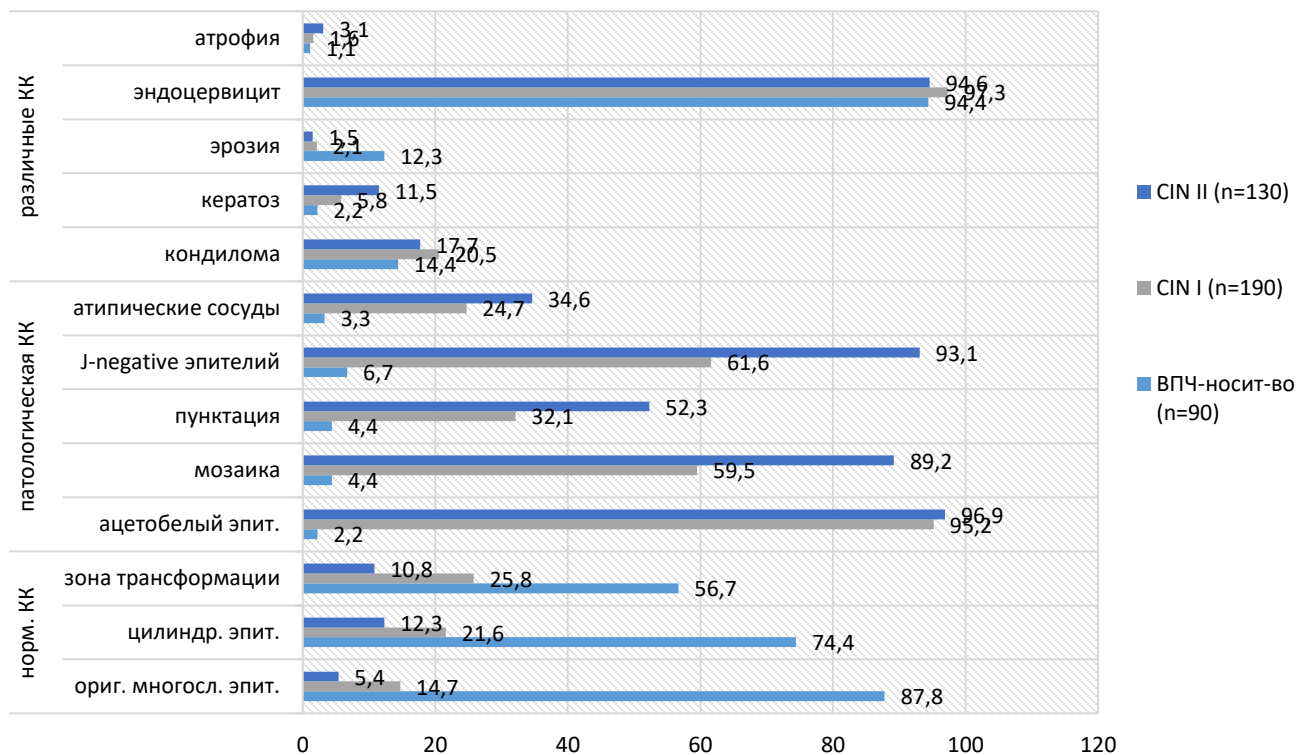


Рисунок 3.27. Кольпоскопическая характеристика пациенток

При этом, нормальная кольпоскопическая картина с преобладанием оригинального многослойного и цилиндрического эпителия у женщин, носительниц папилломавируса, встречалась почти в 90% (а зона трансформации обнаруживалась в 56,7%). Аномальная кольпоскопическая картина легкой степени тяжести в группах больных CIN I-II визуализировалась в $17,6 \pm 4,4\%$. Но после проведения расширенной кольпоскопии выявлено, что признаки цервикальной неоплазии легкой и средней степени выявлены практически у всех пациенток этих групп: ацетобелый и йоднегативный эпителий ($96,0 \pm 1,2\%$ и $77,3 \pm 21,4\%$ соответственно), мозаика - $74,3 \pm 18,6\%$, пунктация и атипичная васкуляризация ($42,2 \pm 11,0\%$ и $29,6 \pm 5,1\%$ соответственно). Сочетания нескольких аномальных кольпоскопических картин (ацетобелого эпителия, мозаики,

пунктации, йоднегативного эпителия, атипической васкуляризации) у пациенток с CIN I выявлены в $37,1 \pm 2,4\%$, а с CIN II в $86,4 \pm 3,7\%$ случаев. Сочетание аномальных кольпоскопических картин с нормальными кольпоскопическими признаками (оригинальный многослойный плоский эпителий, цилиндрический эпителий, зона трансформации) были отмечены в $44,6 \pm 10,1\%$. Кольпоскопические подозрения на инвазивный рак (плотный ацетобелый эпителий, широкая неоднородная пунктация и мозаика, неоднородная поверхность, эрозия или изъязвление, атипичные сосуды) отсутствовали. Неудовлетворительная кольпоскопия отмечена в среднем в $2,6 \pm 0,5\%$ исследований.

Цитоморфологическое исследование шейки матки методом жидкостной цитологии (Pap-Smear test) подтверждало диагноз латентной формы ПВИ или цервикальной интраэпителиальной неоплазии той или иной степени. Поэтому его проводили всем пациенткам исследуемых групп ($n=410$) (рис. 3.28). Установлено, что нормальные цитологические результаты регистрировались только у латентных ВПЧ-носителей в $42,2\%$. В остальных случаях выявлялась или воспалительная реакция ($52,2\%$), а у $5,6\%$ пациенток были обнаружены атипичные клетки плоского эпителия неясного значения (ASC-US).

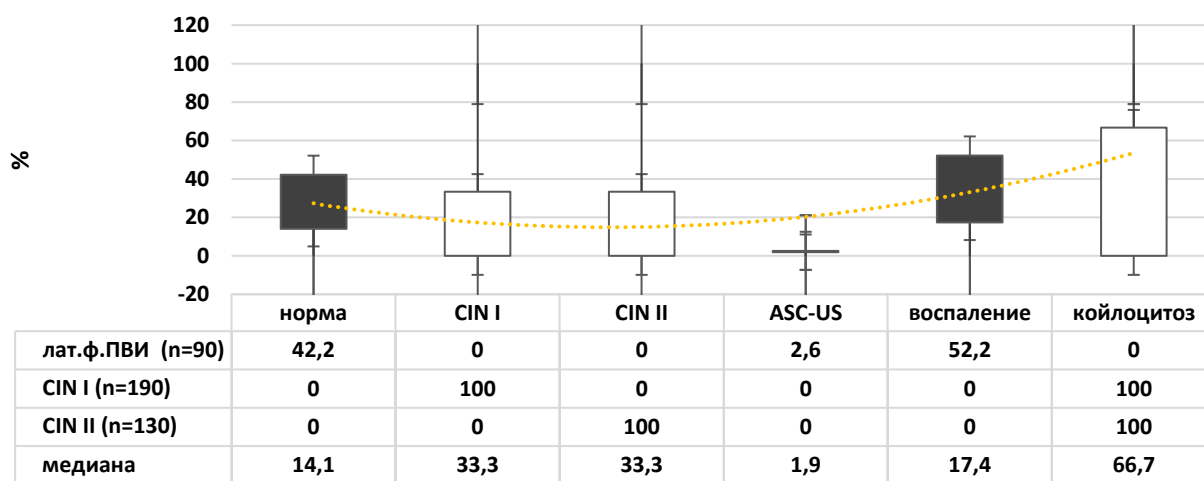


Рисунок 3.28. Цитологическая характеристика пациенток исследуемых групп

С целью установления количественных и качественных дифференциально-диагностических критериев был разработан цитоморфометрический алгоритм, который включал следующие параметры: количество койлоцитов, гиперкератоз, паракератоз, резервные клетки, железистые клетки, плоскоклеточная метаплазия, различные степени (слабое, умеренное, тяжелое) изменения ядерно-цитоплазматического соотношения. Сравнительный анализ данных цитоморфометрического исследования указывает, что для определения клеточных изменений ВПЧ, наиболее достоверными дифференциально-диагностическими критериями из алгоритма являются: 1) количество койлоцитов, 2) паракератоз, 3) плоскоклеточная метаплазия.

Возможность уточнения диагноза поражений шейки матки при папилломавирусной инфекции даёт гистологическое исследование. Исследованию подверглись биоптаты пораженных участков шейки матки. Во всех случаях был выявлен все морфологические признаки ПВИ:

- в поверхностных эпителиальных клетках наличие койлоцитов - вакуолизация цитоплазмы с перинуклеарным «галом» на фоне гиперхромии и пикноза ядер, а также базальноклеточная гиперплазия.
- утолщение различной степени многослойного плоского эпителия с признаками гипер-, пара-, и акантоза подлежащих тканей, а также явлениями хронической воспалительной инфильтрации.

Основным цитологическим признаком цервикальной интраэпителиальной неоплазии считается наличие специфических клеток - койлоцитов. При проведении гистологического исследования соскобов клеток с экзо- и эндоцервикса выявлялась койлоцитарная клеточная атипия (100% пациенток с CIN I-II). При этом у женщин латентных ВПЧ-носителей преобладали нейтрофильные лейкоциты (78,9%), лимфоциты (18,4%). Остальные изменения, характерные для ВПЧ-поражения шейки матки были в минимальном количестве (рис. 3.29). При CIN II количество измененных клеток шейки матки выявлено

значительно чаще, чем при CIN I: дискератоциты (82,3 против 42,6%), дискариоциты (28,4 против 50,8%), дистрофически измененные клетки, в т.ч. псевдодискариоз (21,6 при CIN I и 26,9% при CIN II). В зависимости от локализации материала мазка и наличия эктопии с зоной трансформации, в мазки также попадали неизмененные клетки многослойного плоского эпителия, метапластические клетки, базальные/парабазальные клетки и клетки цилиндрического эпителия, клетки, свидетельствующие о хроническом воспалении.

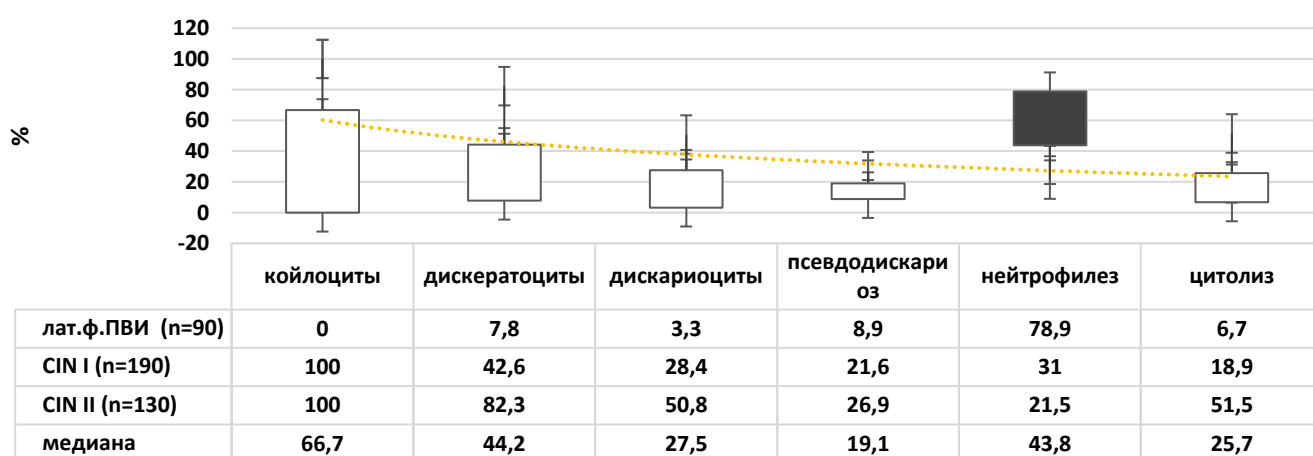


Рисунок 3.29. Цитологическая характеристика шейки матки

При анализе биоптатов шейки матки также установлено, что морфологическим субстратом кроме интраэпителиальной неоплазии различной степени тяжести являются цервициты (рис. 3.30).

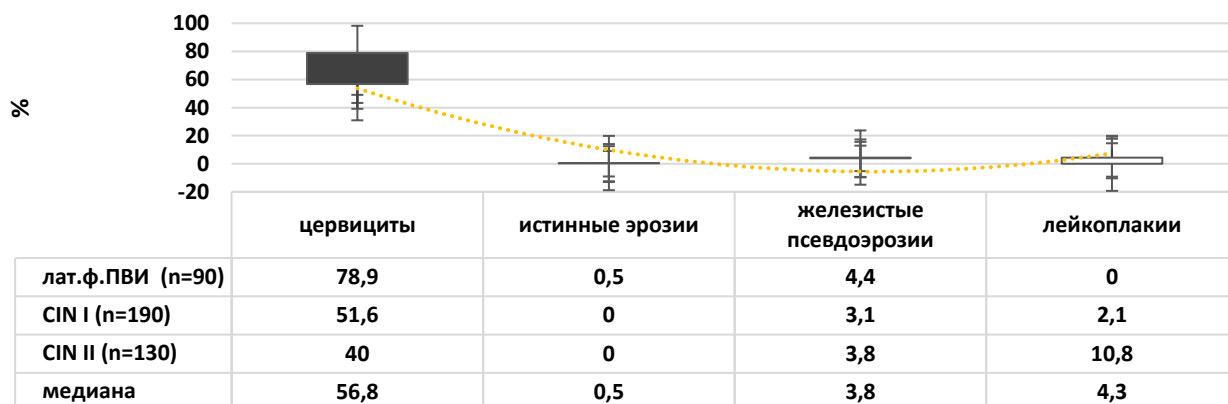


Рисунок 3.30. Патология шейки матки при гистологических исследованиях

Кроме того, при проведении гистологического исследования на фоне характерного поражения шейки матки по типу цервикальной интраэпителиальной неоплазии легкой степени было отмечено наличие частого сочетания данной патологии с другими проявлениями папилломавирусной инфекции.

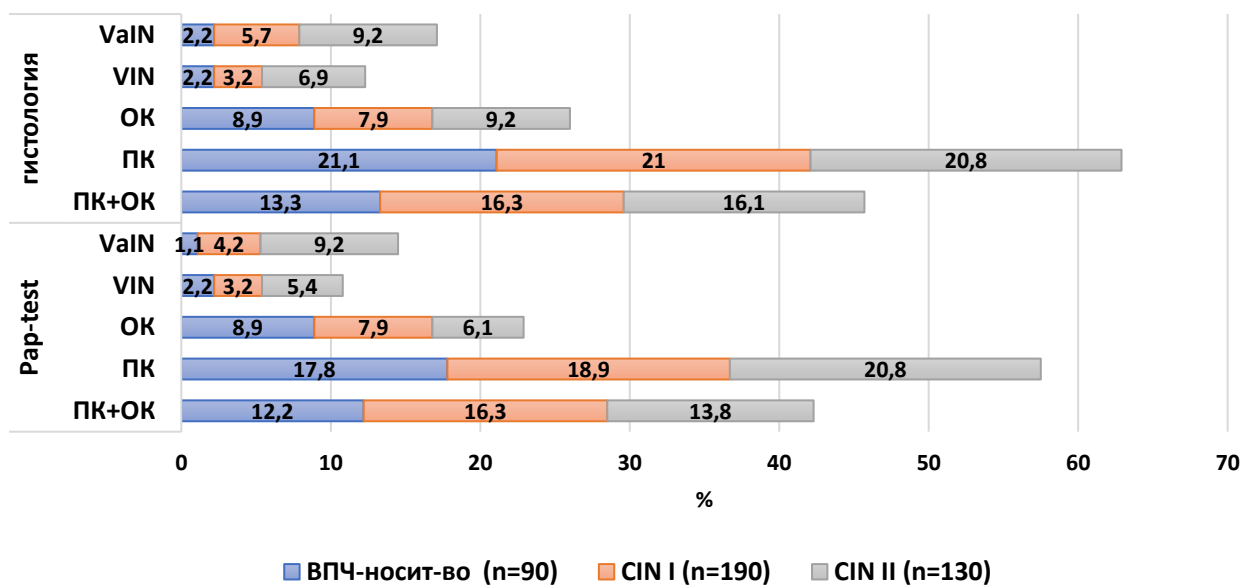


Рисунок 3.31. Корреляция Pap-теста и гистологического исследования при сочетанных с ВПЧ поражениях

В частности, были выявлены различные виды кондилом влагалища и шейки матки (плоские и остроконечные), а также характерное для ПВИ поражение слизистой влагалища в виде вульварной и вагинальной интраэпителиальной неоплазии (VIN и VaIN), характеризующуюся умеренной пролиферацией клеток базального и парабазального слоев многослойного плоского эпителия (не более 1/3 всего эпителиального пласта). Морфологические особенности – полиморфизм клеток нижней трети эпителиального пласта (базальный и парабазальный слои), акантоз, выраженный зернистый слой с пара- и гиперкератозом. В поверхностных слоях эпителия – койлоцитоз и другие признаки ВПЧ.

В ходе данного обследования с проведением Pap-теста выявлено сочетание цервикальной интраэпителиальной неоплазии с различными видами кондилом шейки матки и влагалища у $32,2 \pm 4,6\%$ пациенток исследуемых групп (рис. 3.31). Кроме того, при исследовании соскобов по Папаниколау и гистоморфологических биоптатов выявлено наличие специфических признаков поражения вульвы и влагалища в виде вульварной (VIN) - $3,6 \pm 1,4\%$ - $4,1 \pm 1,9\%$ (Pap-тест - гистология) и вагинальной интраэпителиальной неоплазии (VaIN) - $4,8 \pm 2,1\%$ - $5,7 \pm 2,2\%$ соответственно. При этом у пациенток с латентными формами ПВИ различные виды кондилом обнаруживались как при латентных формах ПВИ – $31,2 \pm 1,5\%$, так при CIN I - $43,1 \pm 1,9\%$ и CIN II - $40,7 \pm 1,6\%$.

Для суммирования и объективизации полученных в ходе исследования данных использовали клинко-кольпоскопический индекс (ККИ) [Shafi M., Nazeer S., 2006] с бальной градацией кольпоскопических признаков в зависимости от степени побеления эпителия после уксусной кислоты, площади поверхности поражения, оценки межкапиллярной дистанции и очаговости поражения, характера поверхности с учетом данных цитологии, возраста, курения и модифицированный кольпоскопический индекс Рейда (КИР), включающий такие кольпоскопические признаки, как цвет, состояние краев повреждения и форма поверхности, сосуды и окрашивание йодом. Соответственно, латентная форма папилломавирусной инфекции не сопровождающаяся достоверными клиническими проявлениями поражения шейки матки в 100% случаев соответствовала оценке от 0 до 3 баллов ККИ и 0-2 балла КИР (рис. 3.32-3.33). При легкой степени цервикального поражения шейки матки с бальной оценкой клинко-кольпоскопических признаков частота минимальных значений (0-1 балл) отмечена в 13,3%, а при CIN II – в 6,1%. Наибольшее количество больных цервикальными неоплазиями легкой и средней степени приходилось на оценку в 4-5 баллов - 82,3 и 66,2% соответственно (в среднем $74,2 \pm 9,8\%$), а по мере увеличения степени тяжести CIN возрастали и

баллы и 6-7 баллов было зарегистрировано лишь у 4,4% женщин с CIN I и у 27,7% с CIN II. Оценка в 8-10 баллов не отмечена ни у одной пациентки.

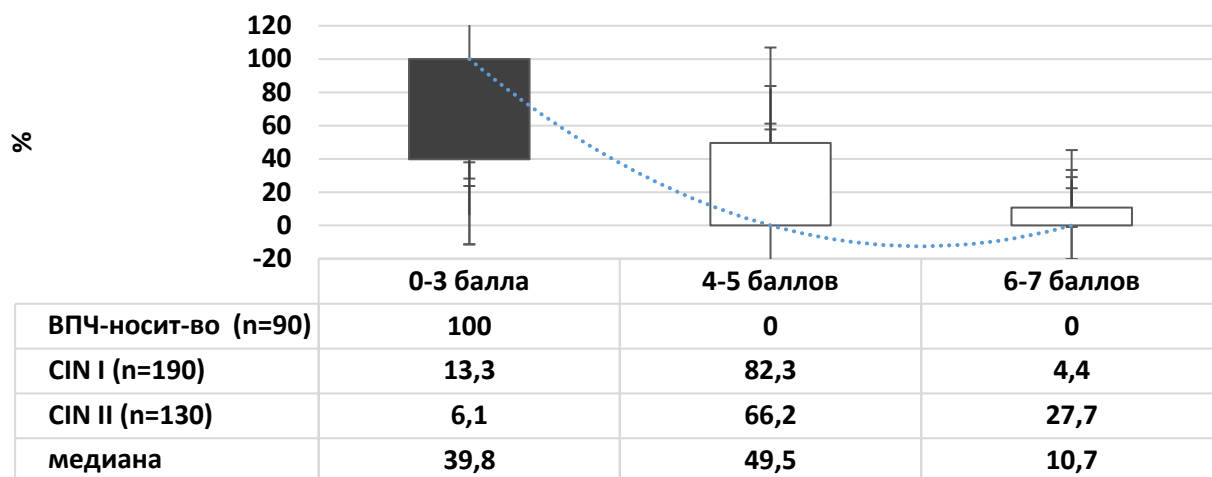


Рисунок 3.32. Клинико-кольпоскопический индекс в исследуемых группах

В наших исследуемых группах КИР 0-2 балла наблюдался у 35,3% больных CIN I (рис. 3.33). В остальных 64,7% в данной группе оценка соответствовала 3-4 баллам. В группе больных CIN II 80,8% имели оценку 3-4 балла и 17,7% - 5-8 баллов. Корреляционный анализ по Спирмену установил прямую средней силы связь по обоим кольпоскопическим индексам между латентными формами ПВИ и CIN: для ККИ ($r_s=+0,34$; $p<0,001$), для КИР ($r_s=+0,45$; $p<0,001$).

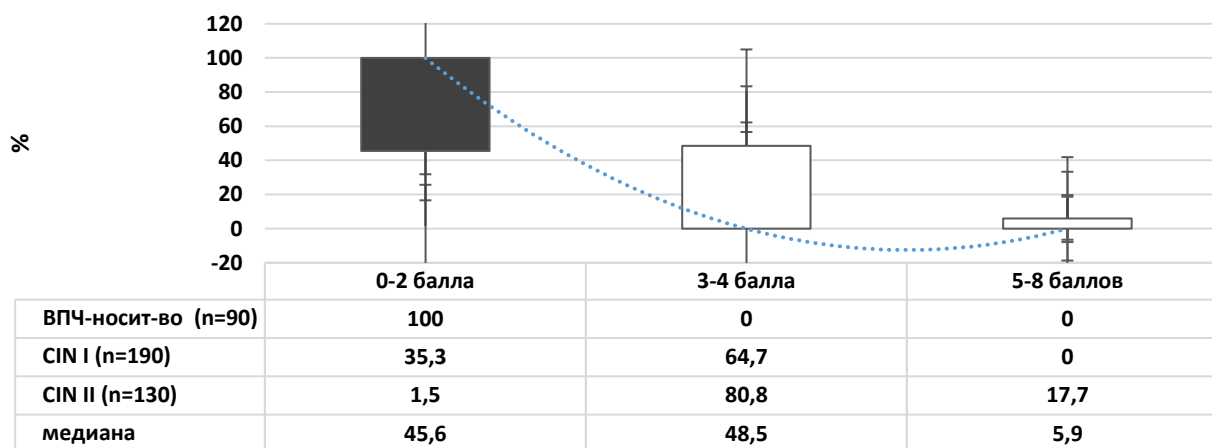


Рисунок 3.33. Кольпоскопический индекс Рейда в исследуемых группах

Таким образом, переходу латентных форм папилломавирусной инфекции в цервикальную интраэпителиальную неоплазию в большинстве случаев

сопутствует плоскоклеточная метаплазия и воспаление. Полученные данные указывают на полисистемность нарушений, возникающих при реализации папилломавирусной инфекции и свидетельствуют о наличии у данных больных медицинских и социальных факторов, которые создают неблагоприятный преморбидный фон и вызывают переход инфекции в клиническую форму. Кофакторами ВПЧ-инфицирования и последующих неопластических процессов, еще раз подтвердились раннее начало половой жизни, промискуитет, курение. Расчет кольпоскопических индексов позволит объективизировать клиническую картину заболевания и, в дальнейшем, поможет в правильной интерпретации результатов лечения данного контингента больных.

3.3.3. Вирусологический анализ латентных форм ПВИ и больных ВПЧ-ассоциированной цервикальной интраэпителиальной неоплазией

Известно, и подтверждено в проведенном исследовании, что основными возбудителями ВПЧ-ассоциированной патологии шейки матки, в виде цервикальной интраэпителиальной неоплазии, являются вирусы папилломы человека высокого канцерогенного риска (ВПЧ ВКР) (в нашем исследовании участвовали пациентки, которые были носителями «чистых» высокоонкогенных типов ВПЧ или их сочетанием с низкоонкогенными) (рис. 3.34-3.35).

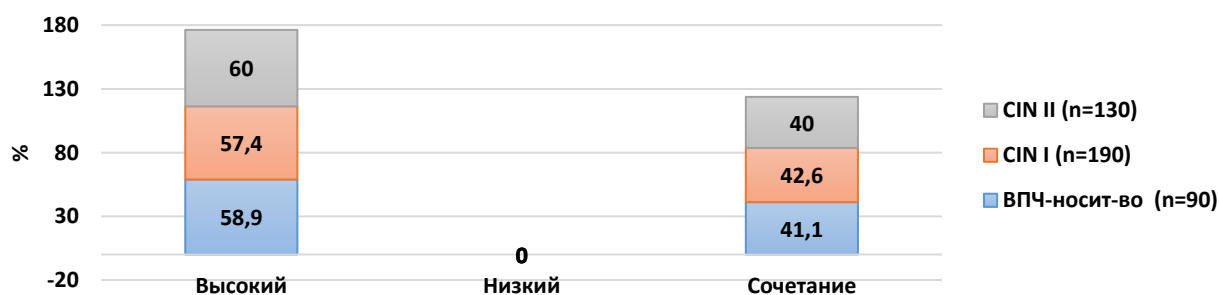


Рисунок 3.34. Частота встречаемости ВПЧ различного онкогенного риска

Основными типами вируса папилломы человека при латентных формах ПВИ, как и при цервикальных неоплазиях легкой и средней степени являлись типы 16 ($53,7 \pm 2,2\%$), 18 ($19,4 \pm 2,1\%$), 31 ($11,5 \pm 1,7\%$) и 51 ($15,1 \pm 1,9\%$). Из низкокканцерогенных типов вирусов эпидемиологическое значение имеют также

типы - 6 ($22,9 \pm 1,7\%$) и 11 ($19,1 \pm 1,4\%$) (рис. 3.35). Следует учесть, что они всегда встречались в сочетании с высокоонкогенными типами ВПЧ, причем наличие данных типов вируса обычно ассоциировалось с сочетанным поражением влагалища и вульвы в виде кондилом, и цервикальной интраэпителиальной неоплазией. Сочетания нескольких типов ВПЧ зарегистрировано в $41,2 \pm 1,4\%$ образцов. Различия между группами по эпидемиологическому преобладанию того или иного типа вируса папилломы человека была недостоверной ($p > 0,05$).

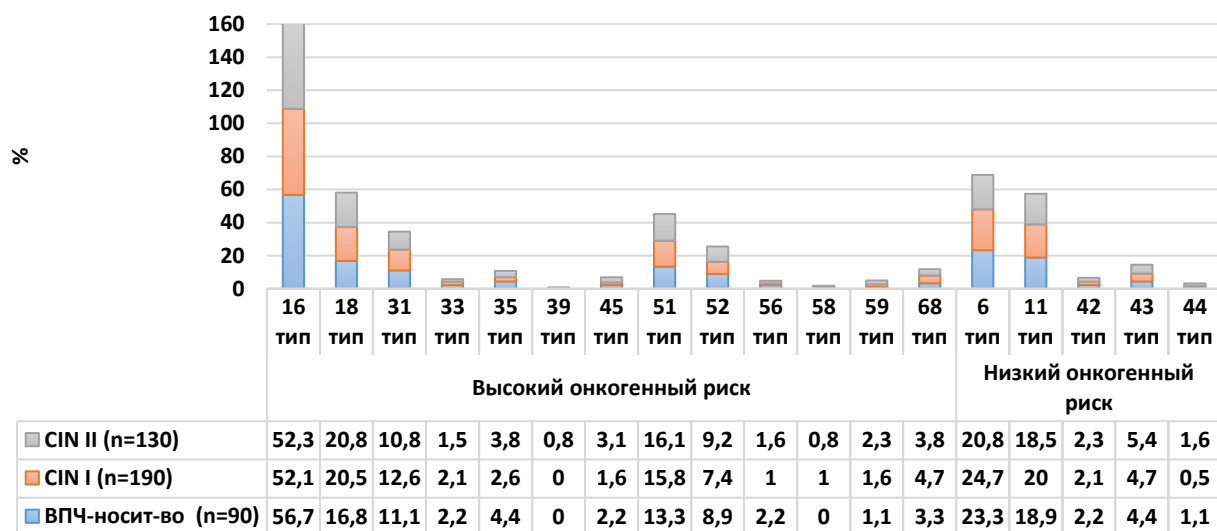


Рисунок 3.35. Встречаемость различных типов ВПЧ (Digene-test)

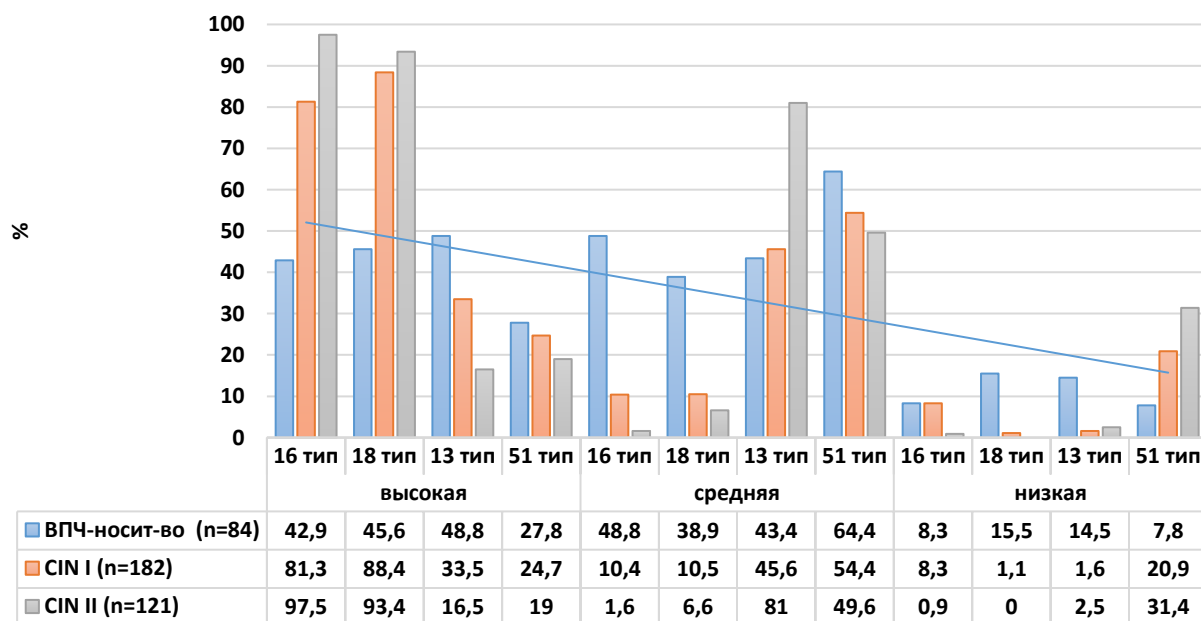


Рисунок 3.36. Вирусная нагрузка ВПЧ 16, 18, 13 и 51 типов (ПЦР диагностика)

Кроме качественного типирования вируса папилломы человека изучали количественную вирусную нагрузку основных его высококанцерогенных типов. Оценка вирусной нагрузки 16, 18, 31 и 51 типов ВПЧ (в случае их обнаружения). Отобрано в общей сложности 387 пациенток трех групп (84 с латентной формой ПВИ, 182 с CIN I и 121 с CIN II).

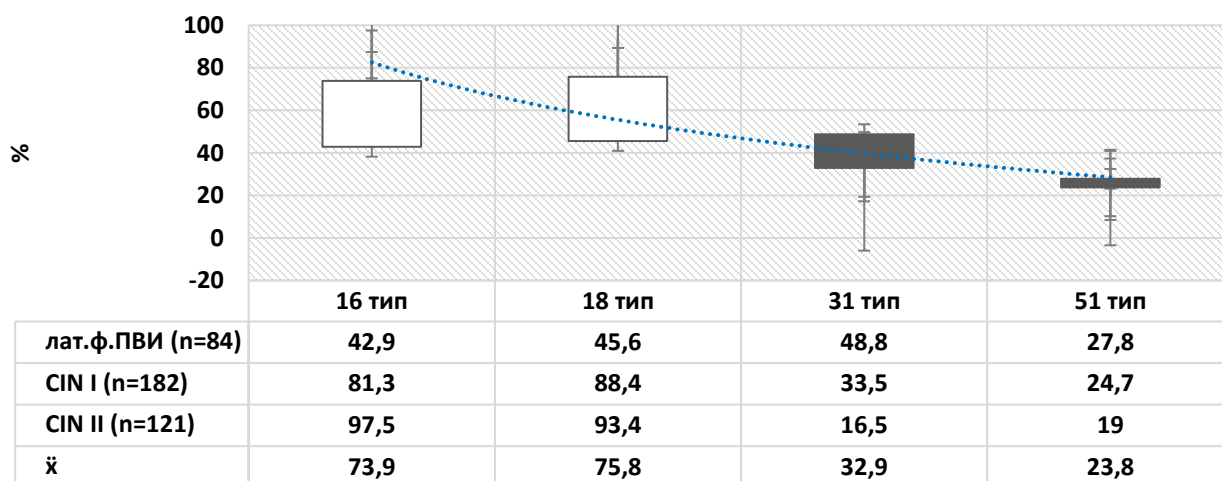


Рисунок 3.37. Высокая (>5 lg) вирусная нагрузка ВПЧ 16, 18, 31 и 51 типов

Высокой вирусная нагрузка считалась в концентрации ВПЧ >5 lg, средняя (3-5 lg) и низкая (<3 lg). Высокая вирусная нагрузка для ВПЧ 16 типа установлена в целом у $73,9 \pm 26,3\%$ пациенток, причем при латентной форме ПВИ она была высокой лишь в 42,9% случаев (почти половина женщин (48,8%) имели среднюю вирусную нагрузку), зато при CIN I-II в большинстве случаев нагрузка была высокой (84,3 и 97,5% соответственно) (рис. 3.36-3.37). Такая же ситуация для ВПЧ 18 типа: высокая вирусная нагрузка отмечена в целом в $75,8 \pm 29,6\%$ образцов, но при этом она определялась лишь у 45,6% пациенток с латентным ВПЧ-носительством (38,9% имели среднюю вирусную нагрузку), а при CIN I-II высокая вирусная нагрузка была у 88,4 и 93,4% больных. Оценка вирусной нагрузки ВПЧ 13 и 51 типов показала несколько другие результаты: высокая нагрузка ВПЧ была у $32,9 \pm 21,1\%$ пациенток с выявленным 13 типом ВПЧ (48,8% при латентной форме и 33,5-16,5% соответственно при CIN I-II), для 51 типа высокая нагрузка вирусами была в среднем в $23,8 \pm 6,3\%$ исследованных образцов

(латентная форма – 27,8%, CIN I – 24,7%, CIN II – 19,0%). Это свидетельствует, что, несмотря на начавшееся распространение на территории Краснодарского края ВПЧ 13 и 51 типов, они, в настоящее время, не имеют высокой вирусной нагрузки, и, чаще всего, вызывают транзитное носительство.

Таким образом, еще раз доказано преобладание вирусов папилломы человека высокого онкогенного риска (а именно, 16 и 18 типов) в реализации неопластических процессов в шейке матки. При этом, чаще всего переход латентной формы ВПЧ в цервикальную неоплазию требует наличия большой концентрации вирусов, т.е. высокой вирусной нагрузки.

3.3.4. Определение онкобелка E7, экспрессии p16ink4D и Ki-67, соотношения метаболитов 2-гидроксиэстрогена и 16- α -гидроксиэстрогена (2-OHE1/16 α -OHE1) у пациенток с латентными формами ПВИ и больных ВПЧ-ассоциированной цервикальной интраэпителиальной неоплазией

При обнаружении ДНК ВПЧ 16-го и (или) 18-го типов в исследуемых группах мы проводили определение онкопротеина E7 в цервикальных пробах методом иммуноферментного анализа (тест-система E7-ВПЧ16/18-Диагност). Общее количество таких пациенток составило 304 человека (74,1%) (56,7% с латентной формой ПВИ, 71,6% с CIN I и 90,0% с CIN II). Онкобелок E7 в сравниваемых группах определялся с различной частотой. Положительные на онкобелок E7 пробы выявлены у $58,3 \pm 29,7\%$ больных (23,5% при латентной форме ПВИ, 67,6 и 83,8% при CIN I-II соответственно) ($p < 0,001$) (рис. 3.38). Это статистически значимо по сравнению с группой женщин с латентным носительством ВПЧ ($p < 0,01$). При проведении корреляционного анализа по Спирмену установлена прямая средней силы статистически значимая корреляционная связь между степенью CIN и частотой выявления онкобелка E7 ($rs = +0,36$; $p < 0,001$), то есть, чем выше степень цервикальной неоплазии, тем вероятнее обнаружение онкобелка E7 ВПЧ.

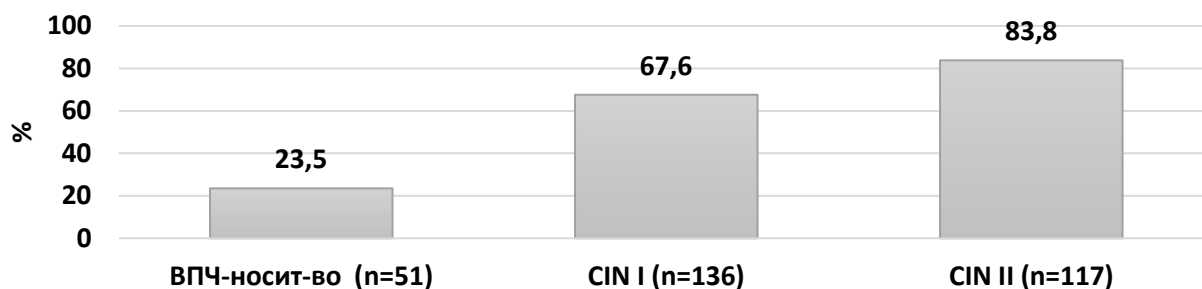


Рисунок 3.38. Положительный тест на онкобелок E7 16 и 18 типов в исследуемых группах (ИФА)

Кроме иммуноферментного анализа, проводилась детекция мРНК вирусного онкогена E7 методом ПЦР у 16, 18 и 31 типа вируса папилломы человека, с использованием комплектов реагентов («Силекс», Москва). Онкобелок E7 в цервикальном материале обнаруживают на стадии репродукции ВПЧ, когда ДНК вируса находится не в свободном (эписомальном) состоянии, а в стадии интеграции, т.е. встроена в геном инфицированных клеток [С.И. Роговская, Е.В. Липова, 2014], при этом обнаружение мРНК E7 в тканях по сравнению с рутинным определением ДНК ВПЧ имеет большую прогностическую ценность [Sotlar K. et al., 2004; Lie A. et al., 2015]. Исследование в наших группах проведено у пациенток с идентифицированными в ходе исследования вирусами типов 16, 18 и 31 отдельно и в сочетании (64 женщины с латентной формой ВПЧ, 158 – с CIN I, 124 - с CIN II) (рис 3.39). ПЦР-анализ обнаружения онкобелка E7 выявил, что при латентной форме ПВИ детекция мРНК ВПЧ 16, 18 и 31 типов была в среднем $4,1 \pm 2,7\%$ (наиболее часто (6,2%) определялся ВПЧ 16 типа) ($p=0,005$). В группах больных цервикальными неоплазиями детекция E7 при данных типах ВПЧ выявила на порядок больший процент: в среднем $20,2 \pm 4,7\%$ для CIN I и $49,1 \pm 9,1\%$ для CIN II ($p=0,05$). То есть по мере утяжеления индуцированного ВПЧ инфекционного процесса экспрессия онкобелка E7 увеличивается в 5, а затем и в 12 раз. При этом ПЦР-детекция мРНК вируса папилломы человека является более информативным методом по сравнению и его ИФА диагностикой.

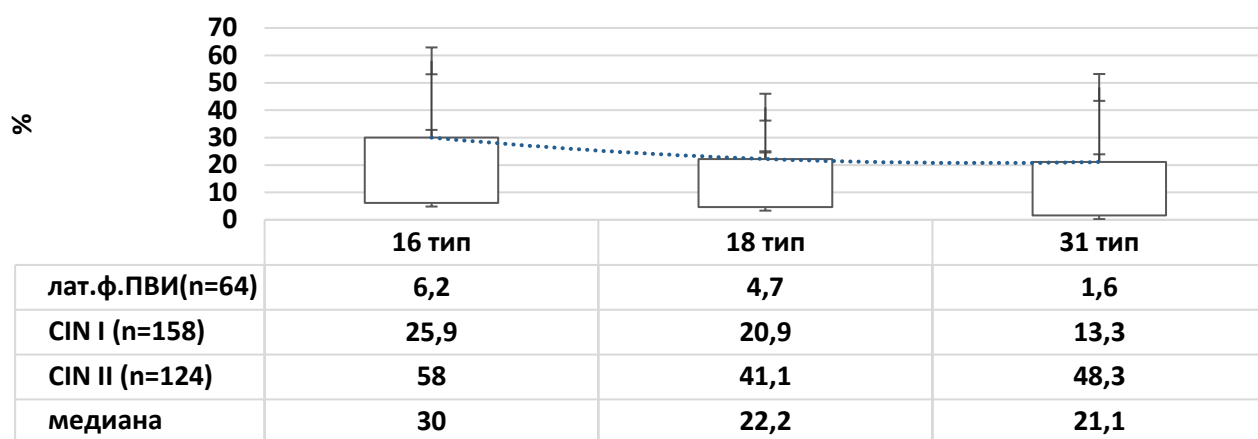


Рисунок 3.39. Положительный ПЦР на мРНК онкобелка E7 16, 18 и 31 типов

При проведении кольпоскопии нами брались цитологические образцы, которые в дальнейшем подвергались иммуноцитохимическому исследованию на наличие экспрессии p16ink4 α и Ki-67. При получении позитивной реакции оценивалась количественная составляющая экспрессии (диффузная и фокальная) в виде единичных клеток и гиперэкспрессии p16, Ki-67, а также производилась оценка коэкспрессии p16ink4 α и Ki-67 (рис. 3.40).

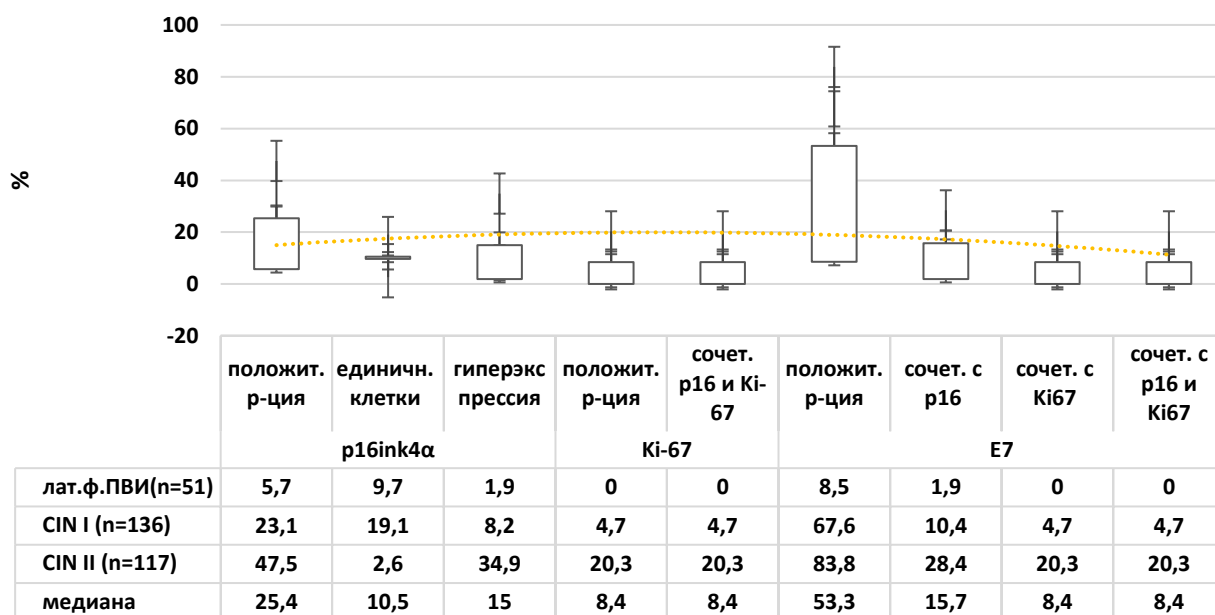


Рисунок 3.40. Сравнительная характеристика частоты выявления p16ink4 α , Ki67 и E7 в исследуемых группах

Всего позитивных p16ink4 α пациенток, исследуемых трех групп выявлено

- 5,7% латентных ВПЧ-носителей, 23,1% пациенток CIN I, 47,5% - с CIN II. У больных с CIN I единичные p16-позитивные клетки с цитоплазматической реакцией встречались в 19,1% образцов, а с CIN II преобладала гиперэкспрессия p16 (ядерная и ядерно-цитоплазматическая) – 34,9%. В группе женщин с латентной формой ПВИ зарегистрирован единичный случай гиперэкспрессии p16 – 1,9% ($p=0,0001$).

При детекции экспрессии Ki-67 выявлено заметное его преобладание в группе больных CIN II (20,3%), что в 4,3 раза больше, чем при CIN I ($p=0,005$) (при латентных формах ПВИ экспрессия Ki-67 не выявлена), но при этом у всех пациенток Ki-67 детектировался менее чем в 15% клеток. Коэкспрессия биомаркеров p16ink4D и Ki-67 преобладала в группе больных CIN II с таким же результатом ($p=0,001$ и $p=0,005$ соответственно). Корреляционный анализ по Спирмену установил прямую средней силы связь между степенью CIN и p16 ($rs=+0,37$; $p<0,001$), между степенью CIN и Ki-67 ($rs=+0,43$; $p<0,001$), а также между степенью CIN, p16 и Ki-67 ($rs=+0,41$; $p<0,001$). У пациенток с положительным тестом на онкобелок E7 данные также были схожими: экспрессия p16 преобладала группе больных CIN II – 28,4% относительно CIN I – 10,4% ($p=0,05$) и латентных форм ВПЧ – 1,9% ($p=0,001$). Это касается и экспрессии Ki-67 – преобладание при CIN II составило 20,3% (в 4,3 раза по сравнению с CIN I) ($p=0,005$). Оценка совместной экспрессии маркеров p16ink4D и Ki-67 у E7-позитивных женщин установила аналогичные статистически значимые изменения. Полученные нами данные позволяют сказать, что детекция онкомаркера p16 и маркера пролиферации Ki-67 при ПВИ зависит от степени тяжести цервикальной интраэпителиальной неоплазии. Это диктует необходимость более широкого использования определения маркеров E7, p16 при первичном скрининге, что позволит усовершенствовать тактику ведения больных с различными формами ПВИ.

Наряду с экспрессией онкобелка E7, гиперэкспрессией онкобелка p16ink4 α

и обнаружением маркера пролиферации Ki-67, показательным фактом неблагоприятного влияния ВПЧ-инфекции на экзо- и эндоцервикс считается нарушенный обмен метаболитов эстрогена 2-ОНЕ1 и 16 α -ОНЕ1. Проведенный анализ соотношения этих метаболитов эстрогена у пациенток с выявленными вирусами типов 16, 18 и 31 отдельно и в сочетании (346 женщин), показал, что только у 32,8% латентных ВПЧ-носителей и у 17,5 $\pm$ 4,7% больных CIN данный показатель соответствует уровню здоровых женщин (в среднем 2,33 $\pm$ 0,11 для вирусоносителей и 21,1 $\pm$ 0,14 для пациенток с CIN I-II) (табл. 3.6, рис. 3.41).

Таблица 3.6. Показатели уровня метаболитов эстрогенов и соотношение их коэффициента в исследуемых группах ($X \pm m$)

показатель	латентные формы ПВИ (n=64)	CIN I (n=158)	CIN II (n=124)
2-ОНЕ1 (нг/мл)	9,17 $\pm$ 1,12	7,15 $\pm$ 1,04	5,81 $\pm$ 0,09
16 α ОНЕ1 (нг/мл)	5,4 $\pm$ 0,11	9,92 $\pm$ 1,15	11,62 $\pm$ 3,01
2-ОНЕ1/16 α ОНЕ1	1,70 $\pm$ 0,04	0,72 $\pm$ 0,08	0,50 $\pm$ 0,1

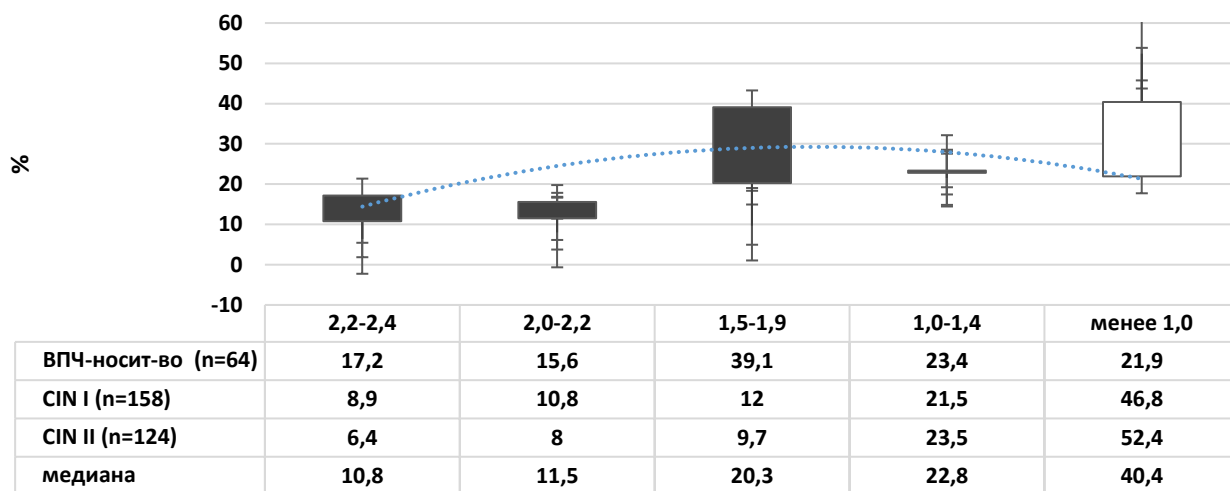


Рисунок 3.41. Коэффициент 2-ОНЕ1/16 α -ОНЕ1 в исследуемых группах

У 72,1 $\pm$ 6,1% больных цервикальными неоплазиями баланс метаболитов эстрогена оказался измененным, при этом уровень 16 α -ОНЕ1 превышал 2-ОНЕ1 в 2 и более раз, что выражалось в снижении значений до 0,2. Наибольшее количество женщин с латентной ВПЧ-инфекцией (39,1%) имело соотношение 1,52 $\pm$ 0,28 (отличия от здоровых статистически значимы - $p < 0,05$).

Корреляционный анализ по Спирмену установил прямую средней силы связь между степенью CIN и снижением коэффициента 2-OHE1/16 α -OHE1 менее 1,5 ($r_s=+0,28$; $p<0,001$). При значительном повышении 16 α -OHE1, когда у наших пациенток коэффициент 2-OHE1/16 α -OHE1 был менее 1,5, мы выяснили сочетание данного коэффициента с положительным тестом на онкобелок E7 и коэкспрессией биомаркеров p16ink4D и Ki-67 (рис. 3.42). При этом выявлены заметные отличия в группах CIN I-II по сравнению с латентным ВПЧ-носительством. Коэкспрессия биомаркеров p16ink4D и Ki-67 в группе больных CIN I встречалась в 5,85 раз чаще и в 29 раз чаще в группе с CIN II, чем в группе пациенток с латентными формами ПВИ (11,7% – CIN I, 58,1% - CIN II против 2,0%) ($p=0,001$ и $p=0,005$ соответственно). У E7+ пациенток выявлены схожие данные: у латентных вирусоносителей коэффициент 2-OHE1/16 α -OHE1 менее 1,5 тестировался в 23,5%, в группе больных CIN II – 83,8% относительно CIN I – 67,6% ($p=0,05$).

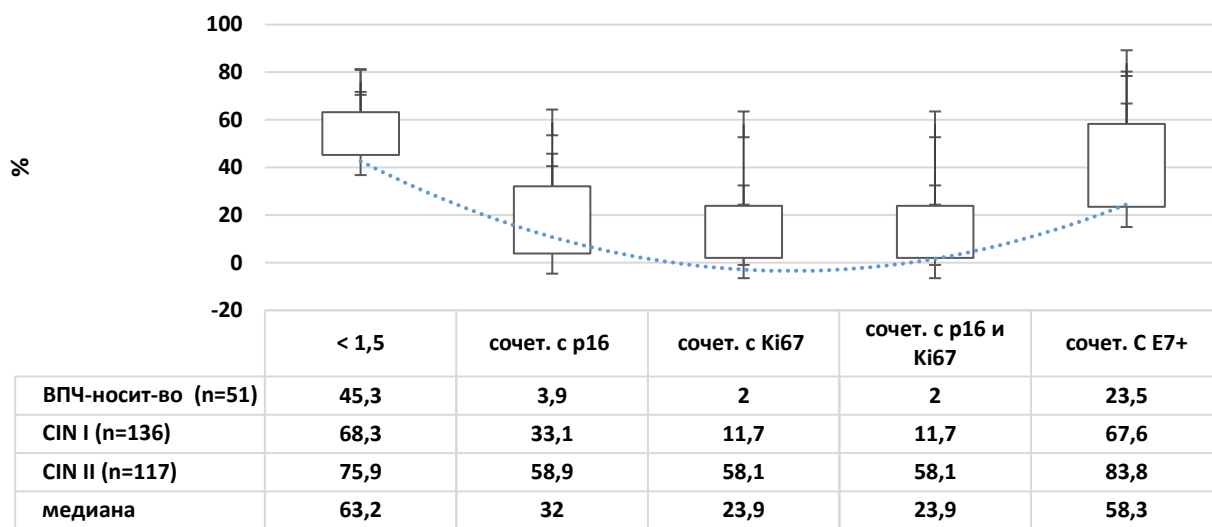


Рисунок 3.42. Сравнительная характеристика частоты выявления низкого коэффициента 2-OHE1/16 α -OHE1 (менее 1,5) в сочетании с p16ink4 α , Ki67 и E7

Таким образом, совместное определение онкобелка E7, экспрессии p16ink4D и Ki-67, соотношения метаболитов 2-гидроксиэстрогена и 16- α -гидроксиэстрогена (2-OHE1/16 α -OHE1) у пациенток с папилломавирусной

инфекцией позволит более точно, как диагностировать форму ПВИ и степень цервикального интраэпителиального поражения, так и определить индивидуальный прогноз развития заболевания, и, соответственно, дифференцировать лечебные мероприятия для каждой отдельной пациентки.

3.3.5. Микробиологический анализ латентных форм ПВИ и больных ВПЧ-ассоциированной цервикальной интраэпителиальной неоплазией

Учитывая, что, как в группе пациенток с латентной формой папилломавирусной инфекции, так и в группах больных CIN I-II процент воспалительных заболеваний женских половых органов превышал среднепопуляционный и достигал почти 90% (для вульвовагинитов и цервицитов), был проведен эпидемиологический анализ заболеваемости сопутствующими урогенитальными инфекциями.

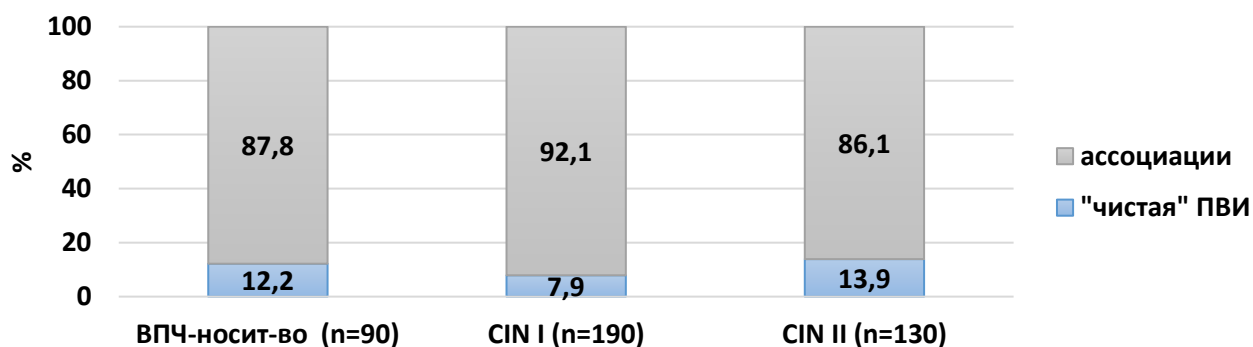


Рисунок 3.43. Частота встречаемости "чистой" ПВИ и ее ассоциацией с другими видами патогенной микрофлоры урогенитальной зоны

В дальнейшем это определило необходимость проведения санации урогенитального тракта до проведения специфической терапии. В ходе исследования обнаружено, что у $88,7 \pm 3,5\%$ наших пациенток имеется та или иная патогенная микрофлора урогенитальной зоны (рис. 3.43). При этом она определялась в большом количестве как при латентной форме ПВИ (87,8%), так и при CIN I-II (92,1-86,1% соответственно). Разница по данному факту между группами была недостоверной ($p > 0,05$).

pH-метрия отделяемого влагалища

Для первичного выявления дисбиотических вагинальных нарушений мы использовали экспресс тест FemExam (исследование на триметиламин и pH-метрия), как наиболее простого в исполнении метода. При этом средние значения влагалищной pH в группе пациенток с латентной формой папилломавирусной инфекции было на уровне $3,9 \pm 0,4$, а в группах с CIN I-II контроля $5,8 \pm 0,5$ и $6,3 \pm 0,3$ ($p < 0,01$) (рис. 3.44). Количество положительных аминотестов в проведённом исследовании возрастало по мере утяжеления симптомов ПВИ. Так, при CIN легкой степени их было в 2,4 раза больше, чем при латентном носительстве ВПЧ (16,3 против 6,7% соответственно) ($p > 0,05$), а при CIN средней степени тяжести показатель больных с положительным аминотестом достиг 24,6%, т.е. в 3,7 раз больше чем при латентной форме ПВИ и в 1,5 раз больше, чем при CIN I.

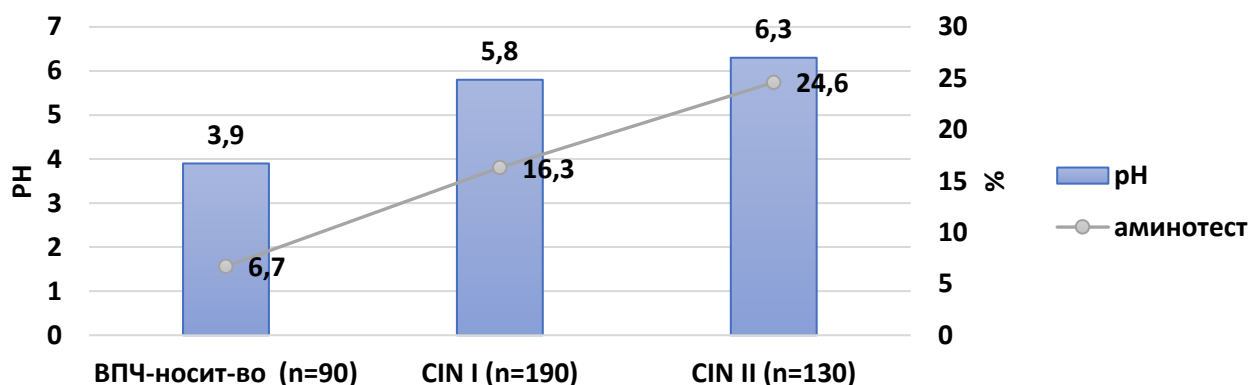


Рисунок 3.44. pH влагалища и аминотест в исследуемых группах

Данное исследование косвенно подчеркивает, что ощелачивание влагалищной среды, наличие признаков вагинального дисбиоза создаёт условия для прогрессирования неопластических процессов в шейке матки.

Исследование влагалищных мазков

Общая микроскопическая картина влагалищного мазка в целом соответствовала количеству лейкоцитов и характеристике микрофлоры (рис. 3.43-3.44). Нормальное количество лейкоцитов (от 6 до 10 в поле зрения) практически не отличалась в исследуемых группах и в среднем составило

практически половину - $44,9 \pm 2,2\%$ ($p > 0,01$). Выраженные отличия были выявлены между латентными формами ПВИ и CIN в патологическом количестве лейкоцитов (более 10 лейкоцитов в поле зрения) при латентном ВПЧ-носительстве наблюдалось в 3,6 раза больше (48,9%), чем при CIN I-II ($13,5 \pm 3,1\%$) ($p < 0,05$).

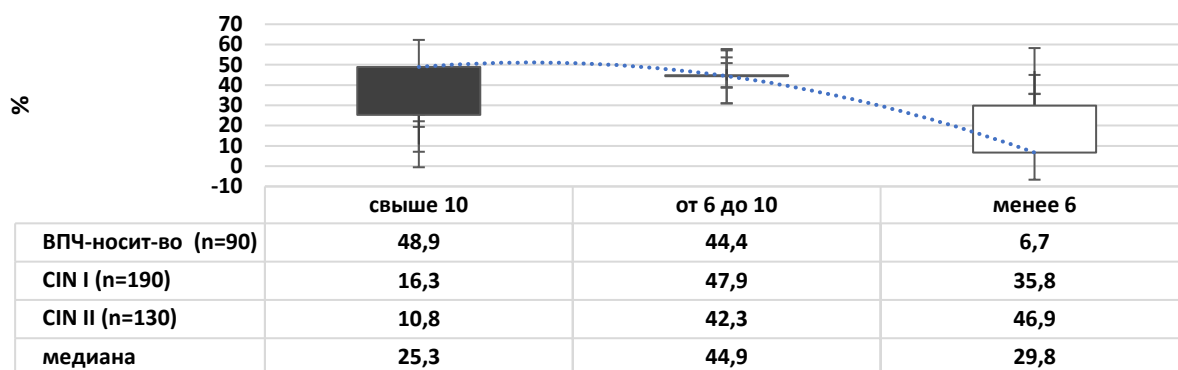


Рисунок 3.45. Лейкоцитарная реакция вагинального содержимого

И, наоборот, чем тяжелее поражение шейки матки, тем меньшая лейкоцитарная реакция вагинальных мазков – менее 6 лейкоцитов в поле зрения наблюдалось у 6,7% женщин с латентными формами ПВИ, 35,8% с CIN I и 46,9% с CIN II (рис 3.45). Корреляционный анализ по Спирмену установил прямую среднюю силу связи между степенью CIN и сниженным количеством лейкоцитов влагалища ($r_s = +0,31$; $p < 0,005$). Наряду с количеством лейкоцитов в вагинальных мазках проводили анализ общей микробной обсемененности (ОМО) (рис. 3.46).

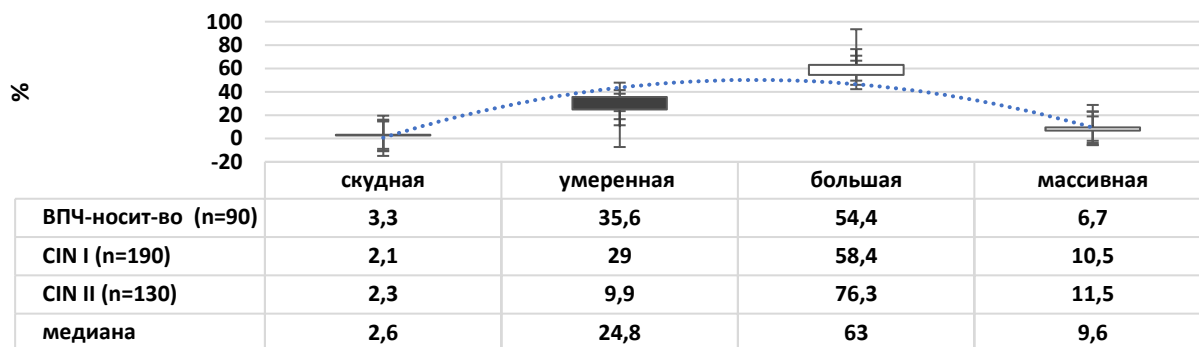


Рисунок 3.46. Общая микробная обсемененность

Скудного количества микроорганизмов в исследуемых группах было минимально - суммарно $2,6 \pm 0,9\%$ ($p > 0,01$). Наибольшее количество обследованных мазков подходили к понятию большая микробная обсемененность – в сумме $63,0 \pm 2,2\%$ ($p > 0,01$), при этом достоверные различия между группами были только между легкой и средней степенью цервикальной неоплазии – большая обсемененность присутствовала в 1,3 раза чаще ($p > 0,01$). Для других параметров корреляционный анализ Спирмена не установил достоверной связи ($p > 0,05$).

Состояние вагинальной микрофлоры оценивали по унифицированной схеме Херлена с классификацией результатов по Кира Е.Ф. (2001). Общее количество нормальных мазков в исследуемых группах было незначительным (в среднем $6,3 \pm 2,8\%$) ($p < 0,05$), но при этом в группе пациенток с латентными формами ПВИ их было в 1,7 раза больше, чем у больных с лёгкой степенью CIN ($6,3\%$) и в 2,3 раза больше, чем у больных с CIN II ($8,9\%$) (рис 3.47).



Рисунок 3.47. Микробиоз влагалища в исследуемых группах (по Е.Ф.Кира, 2001)

Наибольшее количество вагинальных мазков в наших группах соответствовало картине дисбиоза (в среднем $58,5 \pm 18,4\%$) ($p < 0,01$) и чем выше степень тяжести CIN, тем чаще они встречались, хотя разница между группами была недостоверной ($p > 0,05$) (при CIN I - $69,9\%$, CIN II – $74,6\%$). Достоверная разница ($p < 0,05$) выявлена между группами с латентным ВПЧ-носительством и

CIN I-II – количество дисбиотических мазков было в 2,3 раза меньше у вирусоносителей. Зато мазков воспалительного типа в группе пациенток с латентными формами ПВИ было в 4,4 раза больше – 46,7% (при CIN I-II – $10,7 \pm 0,2\%$) ($p < 0,01$).

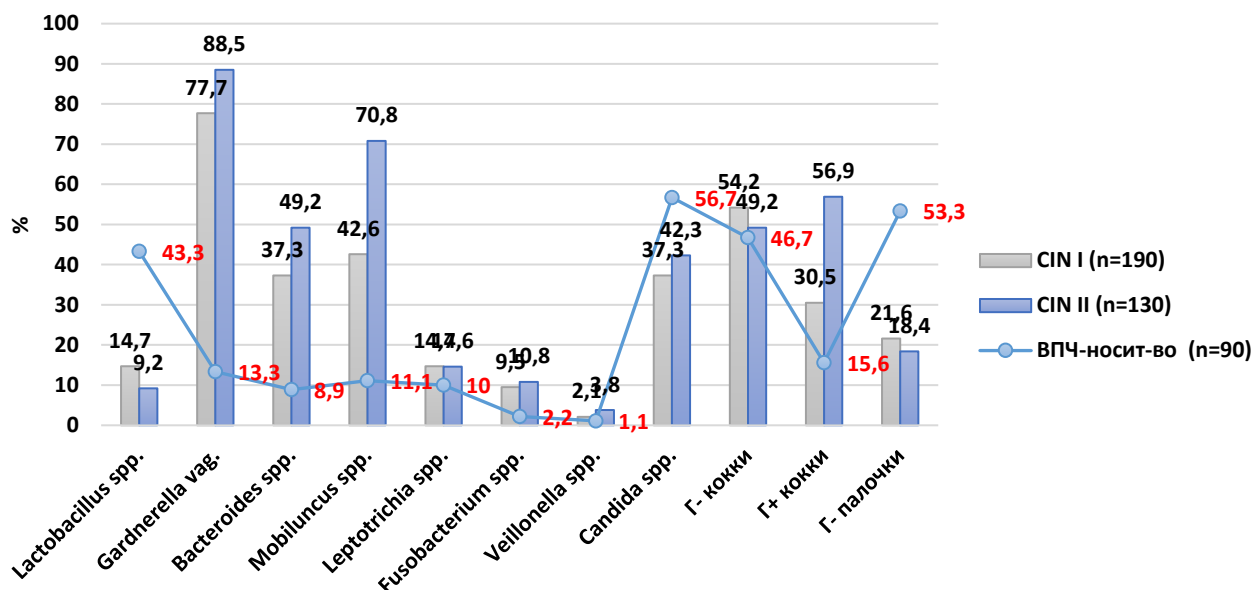


Рисунок 3.48. Морфотипы микроорганизмов влагалища

Вагинальная микроскопическая картина морфотипов микроорганизмов различалась в группах пациенток с латентными формами ПВИ и CIN. Так, у пациенток с латентным ВПЧ-носительством нормальное количество лактобацилл определялось в 43,3% (у больных CIN I-II в среднем $11,9 \pm 3,1\%$) ($p < 0,01$), при этом условно-патогенная микрофлора, в основном, была представлена *Candida spp.* – 56,7%, а *Gardnerella vaginalis*, *Mobiluncus spp.* и *Bacteroides spp.* было 13,3, 11,1 и 8,9% соответственно. Преобладающими микроорганизмами были грамотрицательные палочки (53,3%) (рис. 3.48). При CIN I-II преобладали условно-патогенные микроорганизмы, характерные для бактериального вагиноза (*Gardnerella vaginalis* – $83,1 \pm 5,3\%$, *Bacteroides spp.* – $43,2 \pm 6,1\%$, *Mobiluncus spp.* – $56,7 \pm 14,8\%$), также преобладала кокковая микрофлора (в сумме $47,7 \pm 8,9\%$). Корреляционный анализ по Спирмену установил прямую средней силы связь лишь между степенью CIN и количеством

Mobiluncus spp. и количеством грамположительной кокковой микрофлоры ($r_s=+0,35$; $p<0,001$). Между латентными формами ПВИ и CIN прямая средней силы связь выявлена для лактобацилл ($r_s=+0,41$; $p<0,001$) и наиболее значимых анаэробов (*Gardnerella vaginalis*, *Mobiluncus spp.* и *Bacteroides spp.*) ($r_s=+0,39$; $p<0,001$).

Учитывая, что при микроскопическом исследовании вагинального содержимого больных цервикальными неоплазиями выявлен высокий процент микроорганизмов, ответственных за развитие бактериального вагиноза, мы провели балльную оценку признаков бактериального вагиноза по методу Ньюджента (1991) (табл. 3.7).

Таблица 3.7. Подсчет баллов по Ньюдженту (1991)

Баллы*	Морфотип <i>Lactobacillus</i>	Морфотип <i>Gardnerella</i>	Морфотип <i>Mobiluncus</i>
0	Более 30	0	0
1	5-30	Менее 1	1-5
2	1-4	1-4	Более 5
3	Менее 1	5-30	
4	0	Более 30	

* 0-3 балла – физиологический микробиоценоз; 4-6 баллов – промежуточный вариант микробиоценоза; 7-10 баллов – бактериальный вагиноз

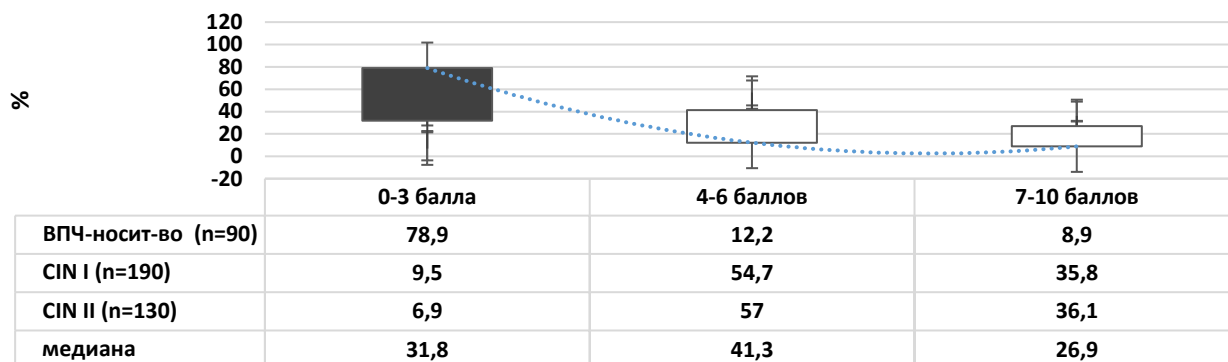


Рисунок 3.49. Балльная оценка критериев бактериального вагиноза по Ньюдженту в исследуемых группах

Признакам бактериального вагиноза (7-10 баллов по Ньюдженту) соответствовало $26,9 \pm 16,8\%$ ($p<0,05$) пациенток исследуемых групп ($8,9\%$ латентных ВПЧ-носителей и $35,9 \pm 0,4\%$ ($p<0,01$) больных CIN I-II (рис. 3.49). Это еще раз подчеркивает тот факт, что бактериальный вагиноз является одним из

основных факторов прогрессирования папилломавирусной инфекции. Корреляционный анализ Спирмена не установил достоверной связи между CIN I и II ($p > 0,05$).

Таким образом, при микроскопическом исследовании влагалищных мазков выявлено, что количество влагалищных дисбиозов с преобладанием условно-патогенной анаэробной и грамотрицательной кокковой микрофлоры было выше у пациенток с CIN I-II относительно уровня латентных форм папилломавирусной инфекции, с преобладанием условно-патогенной анаэробной и грамотрицательной кокковой микрофлоры. У латентных ВПЧ-носителей на фоне статистически достоверного ($p < 0,05$) преобладания влагалищного нормоценоза, выше, чем при CIN было количество воспалительного типа мазков. У больных цервикальными интраэпителиальными неоплазиями выявлено достоверное снижение количества лактобактерий с преобладанием вариантов с промежуточными вариантами микроценоза – в среднем $55,8 \pm 1,9\%$ и бактериального вагиноза - $35,9 \pm 0,4\%$ ($p < 0,01$).

Микробиоценоз влагалища (ПЦР-РВ)

Дополнительно нами проведено исследование вагинального микробиоценоза у пациенток с латентной формой папилломавирусной инфекции и цервикальными интраэпителиальными неоплазиями легкой и средней степени. По результатам данного исследования микрофлоры влагалища методом ПЦП-РВ количество вагинальных нормоценозов с сохраненной долей нормофлоры (абсолютных и условных) в исследуемых группах в сумме составило $26,5 \pm 7,3\%$ ($p > 0,05$). Эпидемиологический анализ состояния микробиоценоза влагалища выявил, что у пациенток с латентной формой ПВИ количество вагинальных нормоценозов было более чем в 2 раза выше, чем в группах с CIN I-II ($40,0\%$ против $20,4\%$ и $19,2\%$ соответственно) (рис. 3.50). Влагалищных дисбиозов (умеренных и выраженных) в исследуемых группах зарегистрировано $73,4 \pm 9,7\%$

($p>0,05$). Наибольшее количество дисбиозов зарегистрировано при CIN II – 80,8% (при этом выраженных дисбиозов было 19,2%).

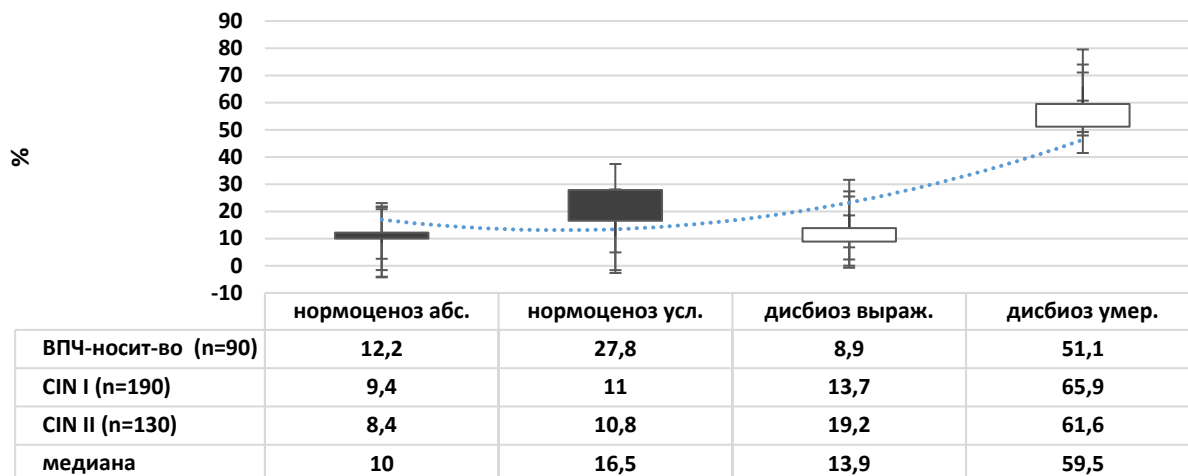


Рисунок 3.50. Общая оценка состояния микробиоценоза влагалища в исследуемых группах

У больных с CIN I выявлено почти такое же количество вагинальных дисбиозов - 79,8%, но состоянию выраженного дисбиоза соответствовало на 5,5% меньше женщин. При латентном ВПЧ-носительстве также было выявлено достаточно большое количество влагалищных дисбиозов – в сумме 60,0%, но при этом понятию выраженного дисбиоза соответствовало только 8,9%. При общем (качественно-количественном) анализе состояния влагалищной микрофлоры пациенток исследуемых групп методом ПЦР-РВ получены следующие результаты (табл. 3.8, рис. 3.51-3.52). У пациенток с латентной формой ПВИ и у больных CIN выявлены изменения в составе вагинальной микрофлоры. При этом, общая бактериальная масса (ОБМ) у больных CIN I-II на $11,8 \pm 2,9\%$ превышала ОБМ у женщин с латентным ВПЧ-носительством ($p=0,025$). Лактобактерии при латентных формах ПВИ обнаружены 41,3% проб и лишь в $11,7 \pm 3,7\%$ CIN I-II. Условный нормоценоз, ассоциированный с *Candida spp.*, присутствовал у $7,8 \pm 2,4\%$ женщин с CIN I-II и у $21,4\%$ латентных форм ПВИ, а обусловленный одновременным присутствием *Ureaplasma spp.* и *Candida spp.* - у $5,9 \pm 3,1\%$ CIN I-II и у 13,7% латентных вирусоносителей.

Таблица 3.8. Количественный состав (Lg ГЭ/мл) микробиоценоза влагалища в исследуемых группах

показатель	медиана	25-75 процентиль	75-95 процентиль
общая бактериальная масса	8,4	8,0-8,6	6,6-8,5
нормофлора			
<i>Lactobacillus spp.</i>	6,6	5,1-7,2	6,4-8,4
факультативно-анаэробные (аэробные) микроорганизмы			
Сем. <i>Enterobacteriaceae</i>	3,2	2,7-3,6	2,4-4,5
<i>Streptococcus spp.</i>	2,8	0-3,8	0-4,4
<i>Staphylococcus spp.</i>	3,6	2,9-4 0	1,9-4,7
облигатно-анаэробные микроорганизмы			
<i>Gardnerella vaginalis</i> \ <i>Prevotella bivia</i> \ <i>Porphyromonas spp.</i>	7,8	7,3-8,2	0-5,5
<i>Eubacterium spp.</i>	6,7	6,2-7,0	0-5,9
<i>Sneathia spp.</i> \ <i>Leptotrihia spp.</i> \ <i>Fusobacterium</i>	7,0	4,2-7,6	0-3,7
<i>Megasphaera spp.</i> \ <i>Veillonella spp.</i> \ <i>Dialister spp.</i>	7,2	6,5-7,6	0-4,7
<i>Lachnobacterium spp.</i> \ <i>Clostridium spp.</i>	5,5	3,9-7,5	0-5,2
<i>Mobiluncus spp.</i> \ <i>Corynebacterium spp.</i>	4,6	3,8-6,0	2,2-1,7
<i>Peptostreptococcus spp.</i>	6,2	5,6-6,8	0-4,9
<i>Atopobium vaginae</i>	7,3	6,4-7,7	0-3,8
микоплазмы			
<i>Mycoplasma spp.</i>	3,8	0-5,8	0-2,6
<i>Ureaplasma (urealyticum + parvum)</i>	4,2	2,0-5,0	0-5,3
дрожжеподобные грибы			
<i>Candida spp.</i>	3,2	2,8-3,5	2,4-4,5

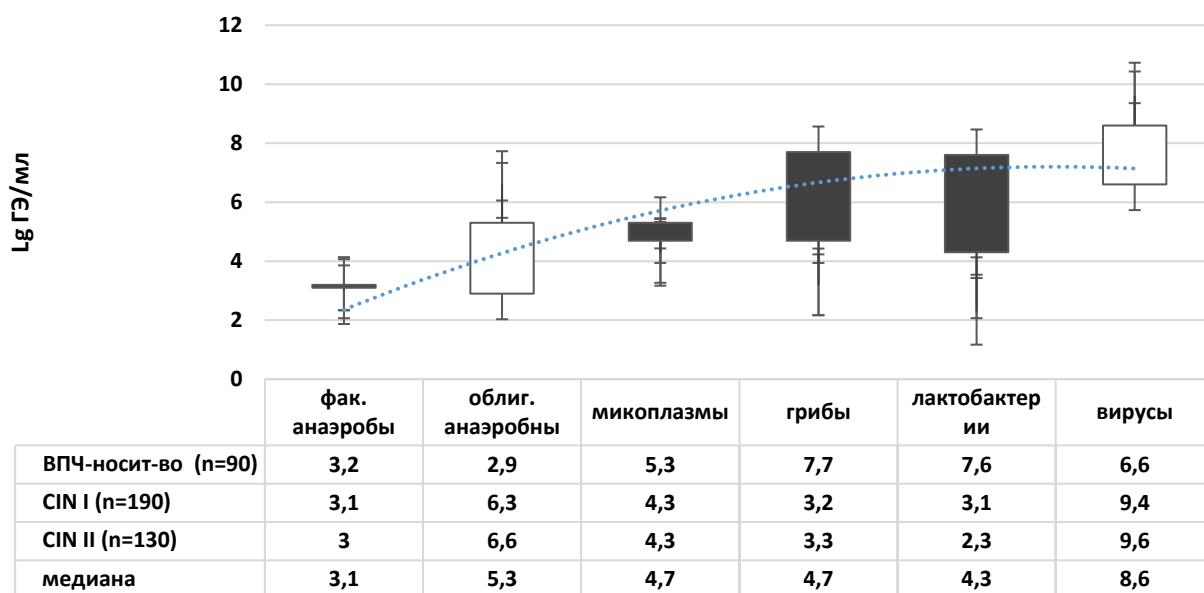


Рисунок 3.51. Среднеколичественный состав микробиоценоза влагалища

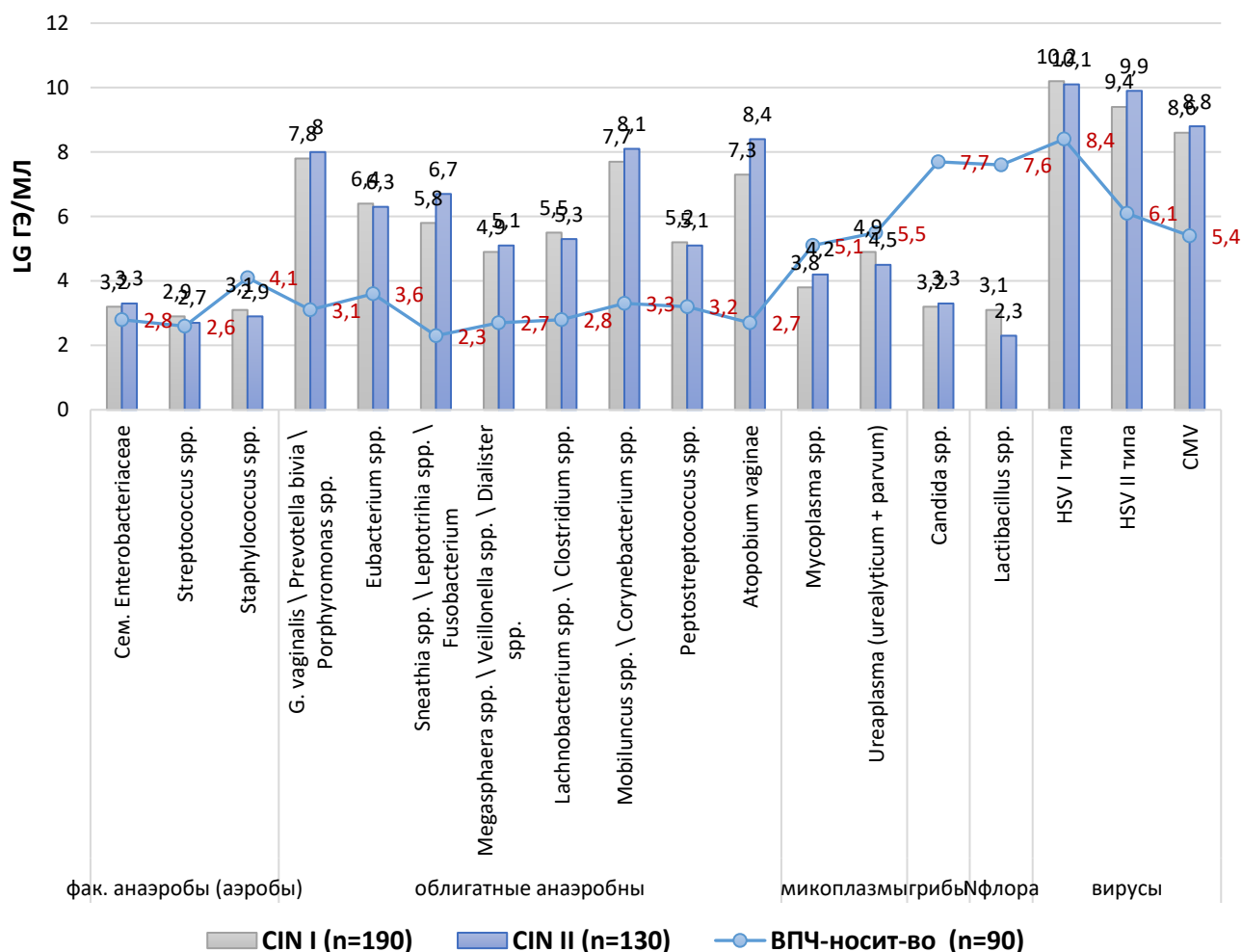


Рисунок 3.52. Количественный состав (Lg ГЭ/мл) микробиоценоза влагалища

Выявленные случаи выраженного дисбиоза в 94,1% случаев были обусловлены доминированием облигатных анаэробов в составе микробиоценоза, в то время как при умеренном дисбиозе имели значение также и факультативные анаэробы. Из группы факультативных анаэробов отмечено незначительно повышенное количество *Staphylococcus* spp. в группе латентных ВПЧ-носителей, но это повышение не было достоверным. Количество всех облигатных анаэробов и микоплазм было в 2,2 раза выше в группе больных CIN I-II ($6,4 \pm 1,5$ Lg ГЭ/мл), чем у латентных вирусоносителей (2,9 Lg ГЭ/мл) ($p=0,0033$). Зато грибы рода *Candida* достоверно ($p=0,0033$) преобладали в группе латентных носителей ПВИ ($7,7$ Lg ГЭ/мл) против $3,2 \pm 0,5$ Lg ГЭ/мл при CIN I-II. Количество выявляемых вирусов простого герпеса I и II типов было высоким во всех группах (вирусы

обнаруживались в $81,9 \pm 9,9\%$ проб латентных носителей ПВИ и в $92,1 \pm 13,5\%$ CIN I-II. При этом корреляционный анализ Спирмена не установил достоверной связи между группами ($p > 0,05$).

Таким образом, по результатам ПЦР-РВ микробиоценоза влагалища в структуре биоценозов у женщин с CIN I-II можно констатировать, что папилломавирусная инфекция, проявляющаяся в виде цервикальной интраэпителиальной неоплазии у значительного количества женщин, манифестируется на фоне сопутствующей урогенитальной инфекции, чаще в виде анаэробных дисбиозов.

3.3.6. Биохимический анализ латентных форм ПВИ и больных ВПЧ-ассоциированной цервикальной интраэпителиальной неоплазией

Изучение биохимических свойств вагинальной жидкости проведено всем пациенткам исследуемых групп. Получены следующие результаты (табл. 3.9, рис. 3.53). Общая масса содержимого влагалища была в среднем $2,0 \pm 0,6$ г/сут ($p < 0,01$).

Таблица 3.9. Биохимические показатели влагалищной жидкости

показатель	латентные формы ПВИ (n=90)	CIN I (n=190)	CIN II (n=130)
Масса содержимого влагалища (г/сутки)	$1,84 \pm 0,18^{**}$	$2,14 \pm 0,13^{**}$	$2,19 \pm 0,17^{**}$
pH (ед.)	$3,9 \pm 0,2^*$	$5,8 \pm 0,2^*$	$6,3 \pm 0,2^*$
Аминовый тест (ед.)	$0,35 \pm 0,07$	$1,94 \pm 0,13^{**}$	$1,97 \pm 0,11^{**}$
Перекись водорода (мкмоль/л)	$256,12 \pm 16,15$	$168,15 \pm 12,12^{**}$	$142,15 \pm 10,14^{**}$
Молочная кислота (мкмоль/л)	$5,0 \pm 0,13^{**}$	$4,2 \pm 0,13^{**}$	$4,1 \pm 0,15^{**}$
sIgA (нг/мл)	$39,7 \pm 8,2^*$	$24,9 \pm 9,4^*$	$17,4 \pm 5,3^*$
Мочевина (ммоль/л)	$18,94 \pm 2,14$	$16,11 \pm 1,44^*$	$13,86 \pm 1,15^*$
Общий белок (г/л)	$1,73 \pm 0,1$	$2,41 \pm 0,11^*$	$2,92 \pm 0,13^*$
Глюкоза (моль/л)	$3,16 \pm 0,18^*$	$2,74 \pm 0,32^*$	$2,47 \pm 0,41^*$
Железо (мкмоль/л)	$294,12 \pm 22,14^*$	$176,43 \pm 38,40^{**}$	$151,14 \pm 26,72^{**}$
Медь (мкмоль/л)	$19,15 \pm 4,03$	$5,02 \pm 0,93^{**}$	$3,86 \pm 0,77^{**}$
Кальций (ммоль/л)	$7,93 \pm 0,22^*$	$6,44 \pm 0,17^*$	$6,22 \pm 0,15^*$
Калий (ммоль/л)	$28,6 \pm 2,02$	$29,32 \pm 2,16$	$31,07 \pm 2,05$
Натрий (ммоль/л)	$99,3 \pm 4,2$	$98,0 \pm 3,8$	$100,3 \pm 4,7$

различия достоверны * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$ (относительной латентных форм ПВИ)

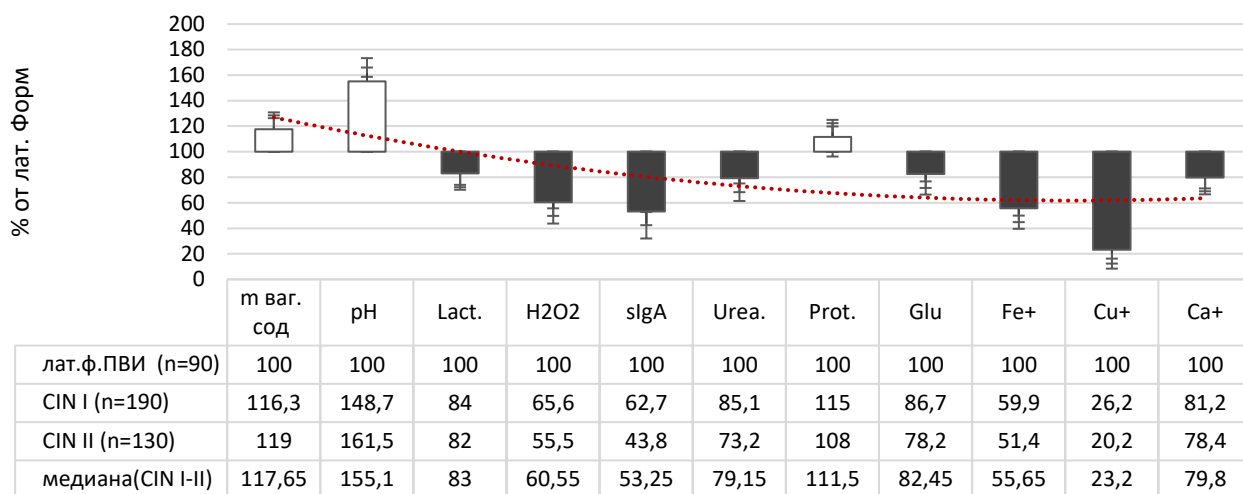


Рисунок 3.53. Биохимический состав влагалищной жидкости в исследуемых группах (% от латентных форм ПВИ)

При этом у женщин с латентными формами папилломавирусной инфекции данный показатель на $17,5 \pm 1,4\%$ был выше, чем при CIN I-II ($1,84 \pm 0,18$ г/сут против $2,16 \pm 0,21\%$ соответственно) (корреляционный анализ Спирмена не установил достоверных связей между группами ($p > 0,05$)). Средние значения влагалищной pH в группе пациенток с латентной формой ПВИ было на уровне $3,9 \pm 0,2$ (слабокислую реакцию), а в группах с CIN I-II - $5,8 \pm 0,2$ и $6,3 \pm 0,2$ соответственно, т.е. прослеживалось достоверное смещение pH влагалищного содержимого в щелочную сторону ($p < 0,01$). Данные различия в группах латентных ВПЧ-носителей и CIN коррелировали с положительным аминотестом группами (положительных аминотестов в группах больных CIN I-II было в 3 и 4 раза больше, чем у латентных ВПЧ-носителей). Между группами больных CIN I и II статистически значимых различий в значениях вагинальной pH выявлено не было ($p > 0,05$). Также зарегистрировано достоверное ($p < 0,01$) снижение уровня перекиси водорода и молочной кислоты у больных с CIN I-II (в среднем на $39,5 \pm 5,5\%$ и $17,0 \pm 1,5\%$ соответственно). Механизм данного процесса объясняется изменениями биоценоза влагалища при хронической инфекции, когда титр лактобактерий, обеспечивающих образование H_2O_2 и молочной

кислоты, снижается ниже 10^4 - 10^5 КОЕ/мл, что, в свою очередь, препятствует благоприятному росту лактобактерий, а, напротив, приемлемо для роста условно-патогенной и патогенной микрофлоры.

У больных с CIN выявлено достоверное снижение уровня глюкозы в вагинальном содержимом (в среднем на $17,6 \pm 5,7\%$ по сравнению с латентными формами ПВИ) ($p < 0,01$). Глюкоза является конечным продуктом гидролиза гликогена, который в свою очередь, является субстратом для метаболизма лактобацилл и образования молочной кислоты. Снижение уровня глюкозы, как маркера содержания гликогена в поверхностном клеточном слое эпителия влагалища, отражает большинство биохимических изменений при дисбиотических процессах во влагалище - от снижения уровня гликогена до увеличения концентрации ионов натрия. Отмечено отсутствие достоверных различий в уровне глюкозы и общего белка в содержимом влагалища пациенток с CIN I и II ($p > 0,05$). Ожидаемым было выявление снижения уровня железа и меди у больных с CIN (в среднем на $44,4 \pm 3,8\%$ и $76,8 \pm 6,1\%$ соответственно, по сравнению с латентными носителями ВПЧ). Данные микроэлементы необходимы большинству бактерий, особенно анаэробным, для роста. Конкурентные взаимоотношения за этот микроэлемент между бактериями могут играть довольно большую роль в развитии дисбиотических процессов во влагалище [Е.Ф. Кира, 2011]. Статистически значимых различий в концентрации ионов натрия между группами не зарегистрировано. При исследовании уровня активности ферментов вагинальной жидкости, у больных цервикальными интраэпителиальными неоплазиями по сравнению с латентными ВПЧ-носителями выявлено достоверное повышение активности внутриклеточных ферментов, в частности, аланинаминотрансферазы (в среднем на $488 \pm 82,5\%$), аспартатаминотрансферазы (в среднем на $304 \pm 41,5\%$) и амилазы (в среднем на $310,5 \pm 33,5\%$) (табл. 3.10, рис. 3.54). Это может свидетельствовать об активации цитолитических процессов, которые могут быть связаны с воздействием на

клетки продуктов жизнедеятельности условно-патогенных микроорганизмов, с другой стороны с усилением неопластических процессов в шейке матки, что подтверждается достоверными различиями между группами с легкой и средней степенью цервикальной неоплазии. Корреляционный анализ по Спирмену установил прямую средней силы связь между степенью CIN и АЛТ ($r_s=+0,44$; $p<0,001$), между степенью CIN и АСТ ($r_s=+0,37$; $p<0,001$), а также между степенью CIN и амилазой ($r_s=+0,39$; $p<0,001$).

Таблица 3.10. Уровень активности ферментов влагалищной жидкости

фермент	латентные формы ПВИ (n=90)	CIN I (n=180)	CIN II (n=130)
АЛТ (Ед/л)	5,18±1,18	21,12±3,59**	29,74±4,18**
АСТ (Ед/л)	82,51±19,16	215,16±19,83**	286,62±21,11**
Амилаза (Ед/л)	56,18±13,18	155,59±44,12**	193,12±49,02**
ЛДГ (Ед/л)	212,48±14,22**	412,88±30,86**	502,16±32,17**
Щелочная фосфатаза (Ед/л)	124,19±23,80	303,15±32,12**	384,27±39,01**
Креатинкиназа (Ед/л)	29,54±7,16	47,93±9,04*	55,61±9,57*

различия достоверны * - $p<0,05$; ** - $p<0,01$ (относительной латентных форм ПВИ)

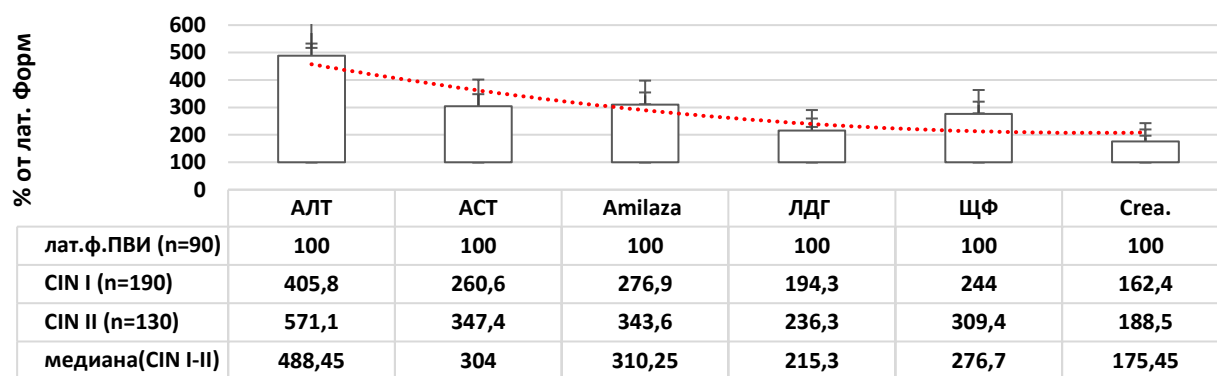


Рисунок 3.54. Активность ферментов вагинальной жидкости в исследуемых группах (% от латентных форм ПВИ)

Таким образом, анализ биохимического состава вагинальной жидкости выявил достоверные изменения, происходящие при наличии неопластических изменений в шейке матки, характеризующиеся в уменьшении количества перекиси водорода, молочной кислоты, ионов железа и кальция и меди, а также повышением уровня внутриклеточных ферментов (АЛТ, АСТ, щелочной

фосфатазы и амилазы), которые являются предикторами активации цитолитических процессов.

3.3.7. Исследование системного и местного иммунитета при латентных формах ПВИ и ВПЧ-ассоциированной цервикальной неоплазии

Концентрация, морфологический состав клеток периферической крови, популяционный и субпопуляционный состав лимфоидных клеток

При исследовании параметров системного и локального иммунитета была введена контрольная группа условно здоровых женщин, прошедших плановую диспансеризацию в женских консультациях г. Краснодара (30 человек) (иммунологический контроль). Первое, что было выявлено, это отсутствие различий по всем параметрам системного иммунитета между контрольной группой и пациентками с латентным носительством папилломавирусной инфекции. Кроме того, в периферической крови пациенток с латентными формами ПВИ и больных ВПЧ-ассоциированной цервикальной неоплазией легкой и средней степени количество лейкоцитов и другие параметры, отражающие морфологический состав клеточных элементов, во-первых, не различались между собой и, во-вторых, не выходили за пределы физиологических показателей нормы (табл. 3.10, рис. 3.55).

Таблица 3.10. Лейкоцитарная формула в исследуемых группах ($M \pm m$; P)

Показатели	Концентрация клеток							
	Лейкоциты	Лимфоциты		Нейтрофильные лейкоциты			Эозинофи- лы	Моноци- ты
	$n \times 10^9/l$	%	$n \times 10^9/l$	п/я %	с/я %	$n \times 10^9/l$	%	%
Контроль (n=30)	5,76 $\pm$ 0,24	36,1 $\pm$ 1,7	1,91 $\pm$ 0,11	2,5 $\pm$ 0,1	56,2 $\pm$ 2,2	3,18 $\pm$ 0,2 1	3,6 $\pm$ 0,2	5,4 $\pm$ 0,2
Латентная ф. ПВИ (n=90)	5,68 $\pm$ 0,46	34,2 $\pm$ 2,1	1,94 $\pm$ 0,13	2,6 $\pm$ 0,2	54,5 $\pm$ 3,2	3,24 $\pm$ 0,3 3	3,8 $\pm$ 0,2	5,6 $\pm$ 0,3
CIN I (n=190)	5,79 $\pm$ 0,44	31,7 $\pm$ 2,6	1,83 $\pm$ 0,13	2,2 $\pm$ 0,2	57,3 $\pm$ 4,4	3,44 $\pm$ 0,2 9	3,3 $\pm$ 0,3	5,5 $\pm$ 0,3
CIN II (n=160)	5,44 $\pm$ 0,45	36,9 $\pm$ 2,6	2,01 $\pm$,15	3,2 $\pm$ 0,3	51,2 $\pm$ 4,1	2,96 $\pm$ 0,2 6	4,8 $\pm$ 0,4	7,4 $\pm$ 0,5

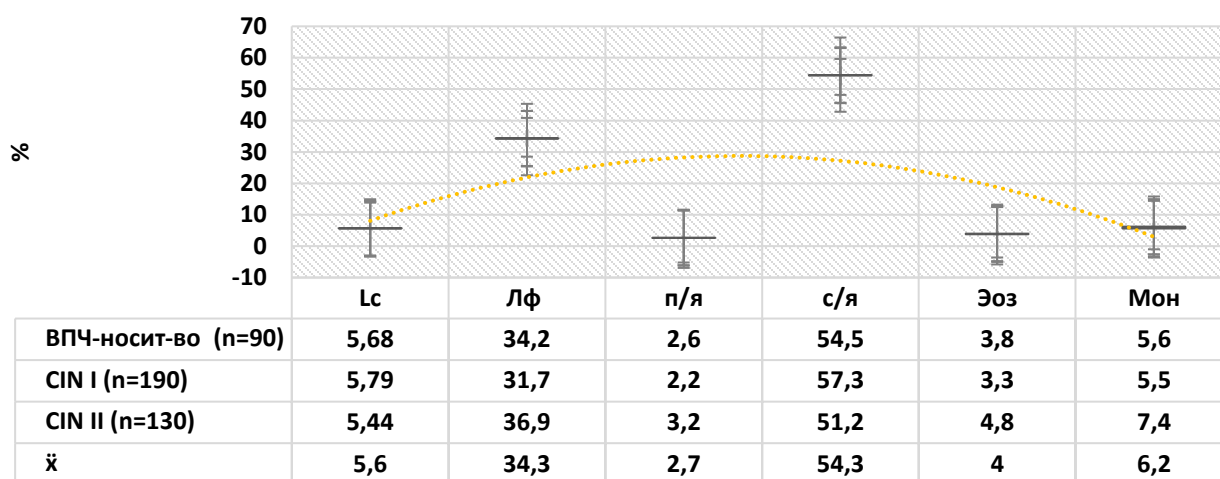


Рисунок 3.55. Лейкоцитарная формула женщин исследуемых групп

При исследовании популяционного и субпопуляционного состава лимфоидных клеток у женщин, с латентными формами ПВИ и больных CIN I-II по некоторым параметрам обнаружены достоверные отличия (табл. 3.11; рис. 3.56). Так, у больных CIN I-II отмечается тенденция к снижению Т-лимфоцитов (CD3+) за счет относительной ($P>0,05$) и, в особенности, абсолютной ($P<0,05$) концентрации Т-хелперов (CD4+) ($p<0,01$). Абсолютная и относительная концентрация Т-клеток эффекторов (CD8+) при этом практически не изменялась. Этот дисбаланс особенно отчетливо проявляется при анализе соотношения CD4+/CD8+, которое у CIN I-II было достоверно ($P<0,01$) более низким по сравнению с группой ВПЧ-носителей и, тем более, с контрольной группой. Еще более патогномичным для CIN является снижение ($P<0,05$) относительной и абсолютной концентрации лимфоцитов, несущих мембранный рецептор к IL-2 (CD25+) – в 1,7 (CIN I) и 3,1 раза (CIN II), а также повышение относительного ($P<0,01$) и абсолютного ($P<0,05$) количества HLA-DR-положительных лимфоцитов (в 1,6 и 2,0 раза соответственно). Оба этих мембранных маркера с разных сторон отражают активационные потенции соответствующих лимфоцитарных пулов, следовательно, у больных цервикальными неоплазиями отмечается снижение количества лимфоцитов с преимущественной Th1 потенцией и активация преимущественно Th2-поляризованных лимфоцитов.

Таблица 3.11. Популяционный и субпопуляционный состав лимфоидных клеток периферической крови в группах (M±m; P)

		Контроль (n=30)	Латентная ф. ПВИ (n=90)	CIN I (n=190)	CIN II (n=160)
CD3+	%*	53,2±10,1	59,8±15,9	46,9±10,6	40,8±9,5
	абс. $\times 10^9/\text{л}$	1,24±0,03	1,38±0,07	0,65±0,03	0,59±0,09
	p			P=0,003	<0,0001
CD4+	%	39,6±5,2	41,8±9,7	36,5±7,3	29,8±6,5
	абс. $\times 10^9/\text{л}$	1,45±0,2	1,64±0,4	0,48±0,06	0,44±0,05
	p			P=0,002	<0,001
CD8+	%	28,8±4,9	29,6±8,2	31,7±3,8	36,4±3,4
	абс. $\times 10^9/\text{л}$	1,44±0,04	1,52±0,06	0,60±0,04	0,55±0,05
	p			P=0,002	<0,001
CD4+ /CD8+		1,4±0,1	1,4±0,2	1,15±0,2	0,8±0,1
	p			<0,01	<0,01
CD25+	%	14,7±2,4	15,2±4,3	8,9±2,1	4,9±1,4
	абс. $\times 10^9/\text{л}$	0,32±0,02	0,36±0,04	0,15±0,02	0,07±0,003
	p			<0,05	<0,001
CD16+ CD56+	%	10,6±0,3	9,8±0,8	13,6±0,9	15,3±1,1
	абс. $\times 10^9/\text{л}$	0,13±0,01	0,12±0,03	0,17±0,05	0,57±0,08
	p			P=0,01	<0,002
CD19+	%	10,2±0,9	9,4±1,6	14,2±2,4	18,6±4,6
	абс. $\times 10^9/\text{л}$	0,36±0,01	0,30±0,01	0,45±0,08	0,83±0,10
	p			P=0,01	0,199
HLA- DR+	%	6,1±0,2	5,3±0,8	7,7±1,4	9,2±1,5
	абс. $\times 10^9/\text{л}$	0,10±0,01	0,07±0,01	0,12±0,03	0,15±0,05
	p			P=0,01	<0,001

% - доля CD-позитивных клеток от общего числа лимфоцитов,

p – достоверность отличий от латентных форм ПВИ (тест Уилкоксона-Манна-Уитни)

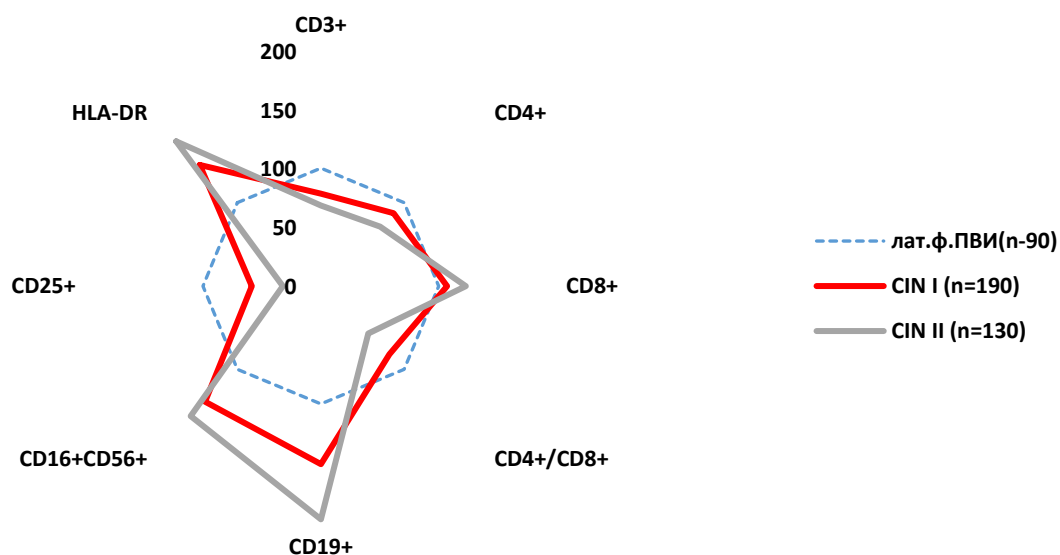


Рисунок 3.56. Популяционный и субпопуляционный состав лимфоидных клеток крови (% от латентных форм ПВИ).

При этом концентрация NK-клеток (CD16+) у больных CIN несколько превышала контрольные значения, правда эти различия не были достоверными ($P>0,05$). Для полиномиальной модели II порядка зависимости численности CD16+ и CD20+ клеток от стадии заболевания коэффициент R^2 равен 0,72 и 0,58, соответственно. Также при CIN I-II выявлено увеличение количества клеток, экспрессирующих на поверхности мембраны CD95-маркер ($p<0,01$), и CD25+ Т-клеток ($p<0,01$). При этом показатель CD25+ Т-лимфоцитов достоверно снижался ($P<0,05$). Диагностировано скачкообразное изменение численности циркулирующих CD4+, CD8+, CD16+ и CD95+ лимфоцитов в группе пациенток с CIN II в сравнении с CIN I и латентными формами ПВИ, что является отражением длительного этапа развития иммунных отклонений.

Цитокиновый статус периферической крови (полиморфизм генов про- и противовоспалительных цитокинов)

Проведена сравнительная оценка содержания ДНК основных цитокинов периферической крови у пациенток с латентными формами ПВИ и у больных с CIN I-II для выявления взаимосвязи между носительством полиморфизмов генов про- и противовоспалительных цитокинов и тенденцией к развитию неоплазии. Исследовали образцы ДНК, полученные от 60 пациенток с цервикальными неоплазиями I-II степени и 30 женщин с латентными формами папилломавирусной инфекции (табл. 3.12).

Таблица 3.12. Полиморфизмы генов цитокинов в группах

Аллели/ Генотипы	Контроль (n=30)	Латентная ф. ПВИ (n=30)	CIN I (n=30)	CIN II (n=30)	p
IL-1β -31 T>C					
C	54,7 $\pm$ 2,9	59,2 $\pm$ 5,4	81,2 $\pm$ 11,4	93,4 $\pm$ 13,1	NS*
T	30,1 $\pm$ 3,4	34,6 $\pm$ 6,0	19,1 $\pm$ 4,7	16,3 $\pm$ 3,9	*
C/C	10,3 $\pm$ 1,6	13,5 $\pm$ 3,5	5,4 $\pm$ 1,1	3,5 $\pm$ 0,9	*
T/C	40,4 $\pm$ 2,2	44,7 $\pm$ 5,1	35,9 $\pm$ 4,2	28,5 $\pm$ 3,8	*
T/T	44,9 $\pm$ 2,6	42,7 $\pm$ 5,3	59,5 $\pm$ 7,0	64,1 $\pm$ 6,6	*
IL-1-RA -15858 GT					
C	53,5 $\pm$ 6,4	53,5 $\pm$ 6,4	61,1 $\pm$ 6,3	72,9 $\pm$ 6,3	*
T	46,8 $\pm$ 3,7	46,8 $\pm$ 3,7	32,5 $\pm$ 4,1	29,1 $\pm$ 3,3	*
C/C	31,6 $\pm$ 6,1	31,6 $\pm$ 6,1	38,7 $\pm$ 5,4	43,8 $\pm$ 6,2	*

C/T	45,9±5,3	45,9±5,3	54,2±6,0	60,4±5,9	*
T/T	20,6±3,4	20,6±3,4	10,5±3,1	6,8±1,6	*
IL-1-RN -390 T>C					
C	53,2±3,4	56,8±6,2	47,2±7,4	39,5±3,7	*
T	45,3±2,0	41,1±3,3	54,5±4,1	60,5±4,9	*
C/C	19,5±1,3	15,1±2,5	29,9±3,7	46,7±4,2	*
T/C	60,2±3,1	65,9±5,9	48,1±2,4	35,2±2,8	*
T/T	21,7±1,6	23,0±1,4	19,3±2,6	16,3±1,5	*
IL-18 -137 G>C					
C	30,8±2,6	32,6±5,3	28,2±4,9	19,4±2,6	*
G	70,4±4,2	68,1±6,6	75,7±6,4	82,9±6,8	*
C/C	5,8±1,1	6,1±1,3	4,3±0,8	3,7±0,7	*
G/C	49,9±3,6	51,3±5,3	44,9±5,5	39,9±4,2	*
G/G	43,1±3,2	40,9±4,6	51,2±4,8	62,4±5,2	*
СЭФР-А 936 C>T					
C	81,7±5,1	89,3±6,8	73,1±6,2	66,2±5,7	*
T	16,9±1,7	13,1±2,9	27,8±3,0	34,5±3,6	*
C/C	70,5±3,5	76,8±6,1	63,9±5,4	52,7±4,2	*
C/T	26,2±2,8	21,5±3,4	30,1±3,7	39,5±4,0	*
T/T	3,6±0,2	2,2±0,3	8,6±1,2	15,9±2,1	*
СЭФР-А -634 G>C					
G	29,6±2,4	31,4±3,9	22,5±3,2	17,1±2,4	*
C	72,1±4,2	68,2±5,7	81,7±5,5	103,1±9,2	*
G/G	8,1±0,8	6,2±1,1	12,3±2,6	19,9±2,1	*
G/C	40,3±2,8	42,5±4,4	19,6±2,9	13,4±2,2	*
C/C	53,1±4,2	50,4±4,8	67,1±5,0	80,6±6,3	*
IL-10 -592 A>C					
A	24,6±2,9	29,9±3,7	16,3±2,4	8,5±1,2	*
C	76,0±4,4	71,4±5,6	86,2±5,8	94,9±5,6	*
A/A	4,3±1,1	5,1±1,3	1,2±0,4	0	*
A/C	42,8±2,5	49,2±3,1	31,7±3,3	25,1±2,9	*
C/C	56,1±3,3	51,5±4,1	68,1±4,6	77,3±5,1	*
IL-12β -1188 C>A					
A	78,0±4,6	74,2±5,9	85,7±5,1	92,4±6,3	*
C	21,4±2,2	23,8±3,6	18,2±3,4	13,1±2,8	*
A/A	60,9±3,8	59,7±4,0	63,3±4,7	68,1±4,5	*
A/C	33,7±2,4	32,4±3,3	38,4±3,6	40,9±3,6	*
C/C	2,9±0,3	3,7±0,3	0	0	*
IL-6 -174 G>C					
G	40,2±3,4	34,3±4,7	67,9±6,1	92,4±4,3	0,01
C	66,4±4,2	71,8±5,1	35,2±3,3	22,0±2,5	0,01
G/G	13,1±1,5	10,4±2,1	69,2±4,6	104,7±6,8	0,04
G/C	65,7±4,04	72,1±5,0	39,8±3,1	26,4±2,4	*
C/C	30,9±2,2	36,7±3,6	17,3±2,4	10,7±2,2	0,5
TNF -308 G>A					
G	67,1±4,6	62,4±5,1	87,7±5,6	99,3±5,3	0,08
A	11,8±2,2	17,7±2,8	4,0±1,1	1,0±0,2	*
G/G	72,6±4,1	65,4±4,9	96,6±6,1	113,8±7,0	0,02
G A	20,2±1,6	26,8±2,2	4,1±0,9	0	*
A/A	3,3±1,1	2,9±0,8	7,2±1,6	9,8±2,3	0,2

NS* - not significant (статистически незначимые различия)

Выявлено, что при CIN I-II нет существенных различий по сравнению с латентными формами ПВИ и здоровыми женщинами в частоте встречаемости аллелей и генотипов IL-12 β в локусе -1188(C>A), IL-10 в области -592A>C и в двух позициях гена СЭФР-А 936C>Т и -634G>C). Также, при определении полиморфизмов генов цитокинов, относящихся к членам семейства IL-1, не выявлено их клинической значимости в отношении возникновения неопластических процессов в шейке матки (рис. 3.57; табл. 3.12).

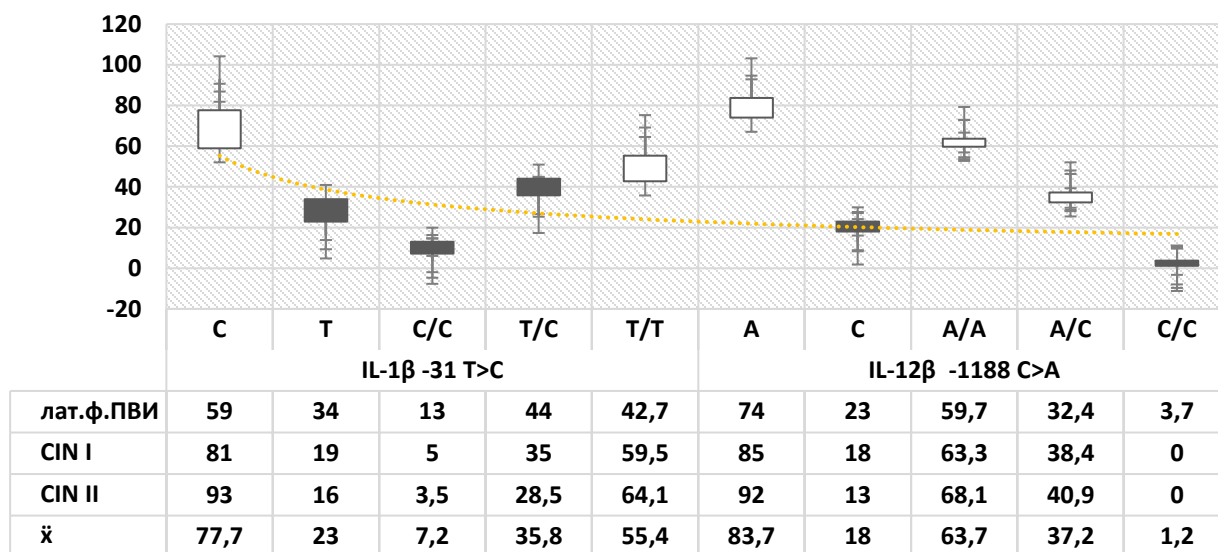


Рисунок 3.57. Аллели генов цитокинов IL-1 β -31T>C и IL-12 β -1188C>A

Обнаружены достоверные различия ($P>0,05$) в полиморфизмах генов, кодирующих белки провоспалительных цитокинов - IL-6 и TNF α , в группе больных CIN I-II (рис. 3.57, табл. 3.11): отмечены полиморфизмы генов: аллели С гена IL-6 (гаплотипы C/C и G/C) и гомозиготный вариант гена TNF α (G/G). Была изучена взаимосвязь между степенью цервикального интраэпителиального поражения и наличием в генотипе пациенток сочетания этих гаплотипов. Выявлено, что сочетание гаплотипов C/C и G/C гена IL-6 и G/G гена TNF α встречалось у 66,8% пациенток с CIN I и у 89,3% с CIN II. Также отмечено, что выделение у пациенток аллели С гена IL-6 сопровождается двукратным увеличением частоты цервикальной неоплазии, тогда как гомозиготный генотип G/G был типичен для пациенток латентными формами ПВИ. У бессимптомных

носителей вируса папилломы человека, замена нуклеотидов G>A в позиции -308 промотора гена TNF α выявлялась более часто. В то время как при цервикальных неоплазиях в 95,1% были обнаружены гомозиготы по аллели G. Также, прогностически подходит в плане развития неопластического процесса сочетание в генотипе полиморфной аллели C гена IL-6 и генотипа G/G гена TNF α (шансы перехода латентной формы ПВИ в CIN увеличиваются в 7,1 раза) (рис. 3.58). При этом не наблюдалось взаимосвязи между полиморфизмами генов противовоспалительных цитокинов IL-12 β , IL-10, цитокинов, относящихся к семейству IL-1 и степенью цервикального интраэпителиального поражения.

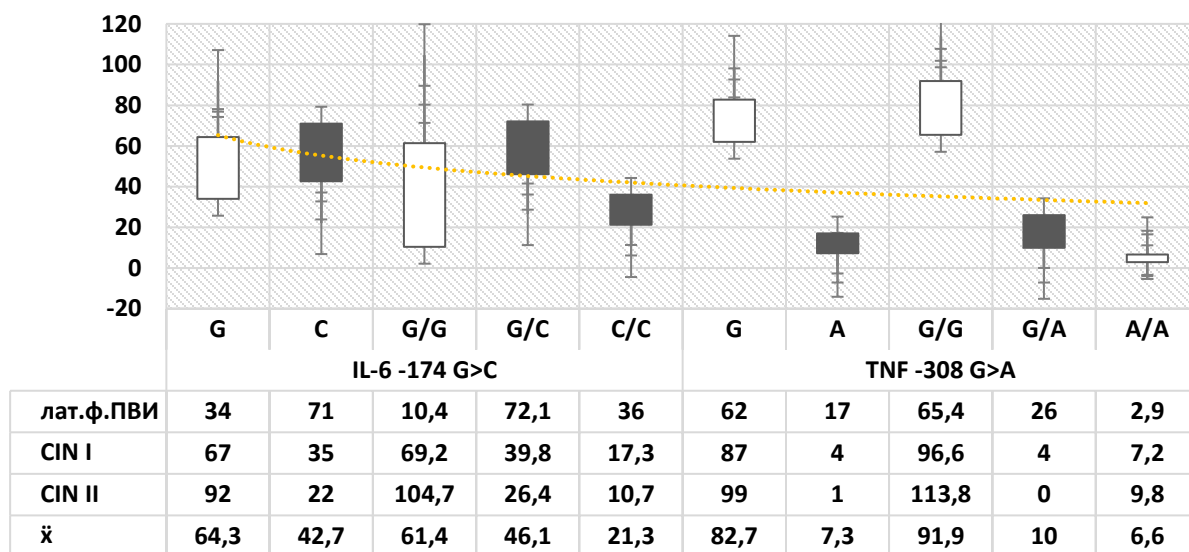


Рисунок 3.58. Аллели генов цитокинов IL-6-174G>C и TNF-308G>A

Частота выявления полиморфных аллелей гена IL-4 выявила следующие особенности в исследуемых группах (табл. 3.13, рис. 3.59): IL-4-589C>T, IL-4-1098T>G и IL-4R+1902A>G(Gln576Arg) с равной частотой выявлялись у женщин как с латентными формами папилломавирусной инфекции, так и при CIN I-II. Различия были выявлены в частоте детекции аллеля T гена IL-4-33C>T. Данный полиморфизм в гетерозиготном или гомозиготном варианте статистически значимо чаще выявляли у женщин с бессимптомным вирусоносительством (аллель T выявлен у 80% обследованных этой группы), в то время как у половины женщин с CIN I-II данная аллель отсутствовала.

Таблица 3.13. Частота выявления полиморфизмов генов IL-4 и IL-2 (%)

Полиморфизм	Группы	Генотип нн*	Генотип нв**	Генотип вв***
IL-4 589 C>T	Лат.ф. ПВИ	39,1±2,9	56,5±3,6	4,4±0,2
	CIN I	53,8±3,7	35,9±2,4	10,3±1,4
	CIN II	62,4±3,9	21,8±2,1	15,8±1,6
IL-4 -1098 T>G	Лат.ф. ПВИ	71,7±4,2	26,1±2,5	2,2±0,1
	CIN I	84,6±4,2	15,4±1,6	0
	CIN II	86,9±4,4	13,1±1,3	0
IL-4 -33 C>T	Лат.ф. ПВИ	19,5±1,8	54,3±2,8	27,2±1,6
	CIN I	51,3±3,1	35,9±2,2	12,8±1,2
	CIN II	62,9±3,2	30,3±1,9	6,8±0,7
IL-4R H902A>G(Gln576Arg)	Лат.ф. ПВИ	82,6±4,4	17,4±1,6	0
	CIN I	82,1±4,3	17,9±1,6	0
	CIN II	79,6±3,5	20,4±2,4	0
IL-2 166G>T(Leu38Leu)	Лат.ф. ПВИ	67,4±3,0	28,3±1,7	4,3±0,4
	CIN I	28,7±2,6	48,5±2,4	12,8±1,1
	CIN II	10,5±2,2	70,3±2,2	19,2±1,4
IL-2 330 G>T	Лат.ф. ПВИ	21,7±1,6	37,0±2,6	41,3±2,8
	CIN I	38,4±2,3	33,3±2,5	28,3±2,1
	CIN II	44,1±2,7	29,7±2,3	26,2±2,1

* генотип нн — гомозигота по «диному» (низкопродуцирующему) аллелю

** генотип нв — гетерозигота

*** генотип вв — гомозигота по полиморфному (высокопродуцирующему) аллелю

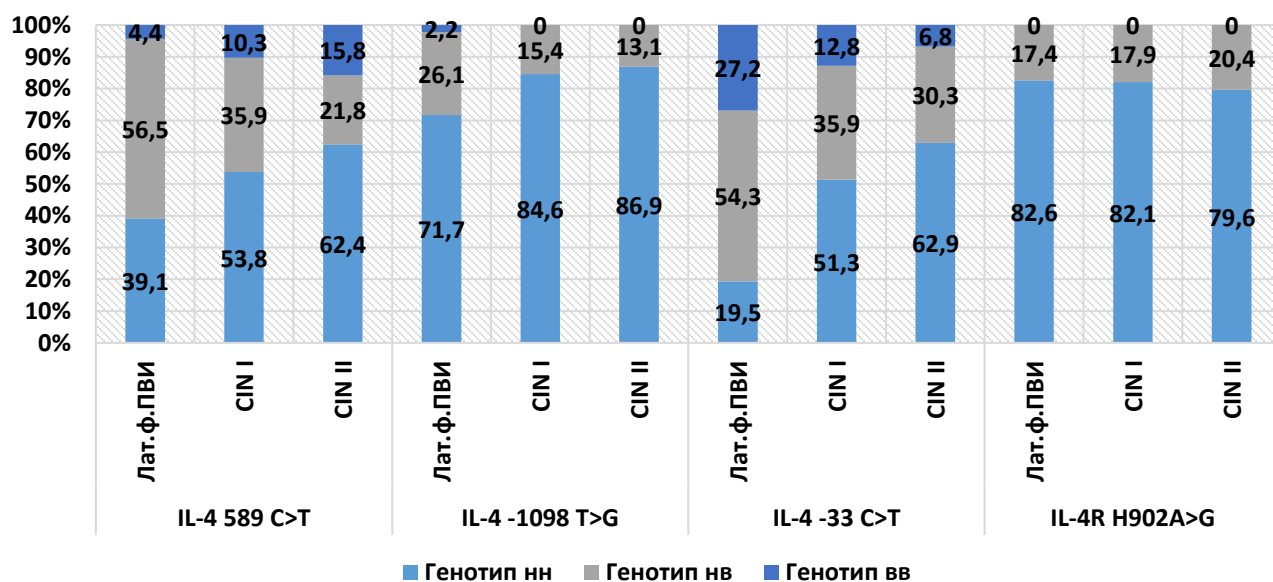


Рисунок 3.59. Аллели генов цитокинов IL-4

Таким образом, возможно предполагать, что носительство данного полиморфизма оказывает протективный эффект на защиту от неопластических процессов в шейке матки.

Детекция полиморфных аллелей гена IL-2 выявила преобладание аллели G (особенно в гетерозиготном варианте) в локусе IL-2166G>T(Leu38Leu) у пациенток с латентными формами ПВИ (табл. 3.13; рис 3.60). Это косвенно может свидетельствовать о том, что недостаток данного гена ведет к уменьшению защиты от цервикальных неопластических изменений.

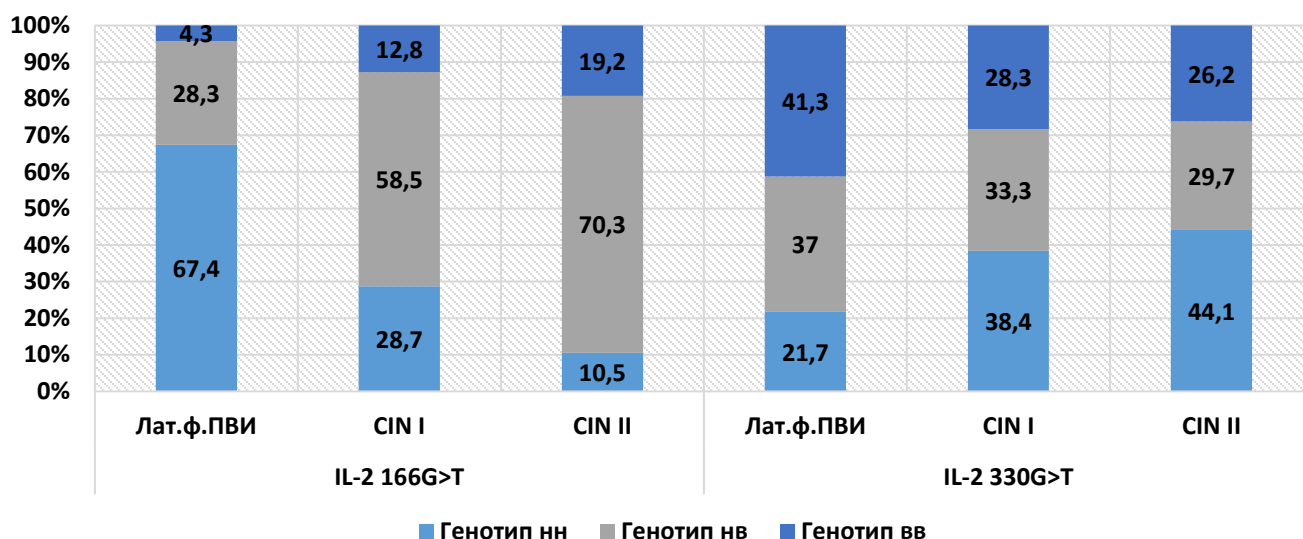


Рисунок 3.60. Аллели генов цитокинов IL-2

Частота выявления полиморфизмов генов IL-6, IL-18 и TNF не различалась между группами.

В зависимости от преобладания генома про- или противовоспалительных цитокинов в исследуемых клинических группах мы выделили 3 генотипа: сбалансированный, провоспалительный и противовоспалительный. При этом нами выявлено, что в группе больных CIN I-II преобладают противовоспалительные генотипы (54,7% и 71,2% соответственно), при латентных формах ПВИ преобладал провоспалительный генотип (56,7%) ($P>0,05$) (рис. 3.61).

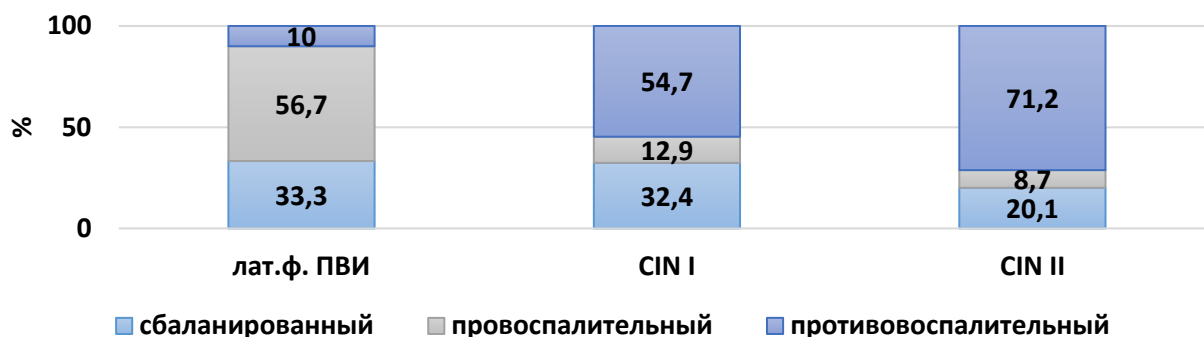


Рисунок 3.61. Распределение генотипов в исследуемых группах

Данное исследование еще раз подтверждает факт, что преобладание аллелей противовоспалительных цитокинов в геноме пациенток может способствовать активации неопластических процессов.

Концентрация цитокинов в цервикальной слизи

Известный факт, что большинство цитокинов, являясь регуляторными и эффекторными молекулами клеточного взаимодействия, оказывают свое влияние короткодистантно и достаточно быстро распадаются в системном кровотоке. Исходя из изложенного, наиболее репрезентативное суждение о вероятных механизмах иммунопатогенеза любого, в том числе и инфекционного процесса, можно составить, только исследуя цитокиновый спектр (про-, противовоспалительные и регуляторные цитокины) *in situ* (цервикальная зона). Нами был проведен анализ цитокинового статуса цервикальной зоны у 320 больных с цервикальными неоплазиями I-II степени и 90 женщин с латентными формами папилломавирусной инфекции.

Обнаружено, что концентрация основного макрофагального цитокина IL-1 β в цервикальной слизи женщин, больных CIN I-II была в среднем в 2 раза ниже, чем у бессимптомных ВПЧ-носителей, но эта разница из-за высокого коэффициента вариации не была достоверной ($P > 0,05$) (рис. 3.62). Концентрация IL-8, как и TNF α у больных CIN I-II женщин также имела тенденцию к повышению ($P > 0,05$). Концентрация IFN γ в цервикальной слизи у больных CIN I

была в 2, а при CIN II – в 3 раза ниже, чем в группе пациенток с латентными формами ПВИ ($P < 0,05$).

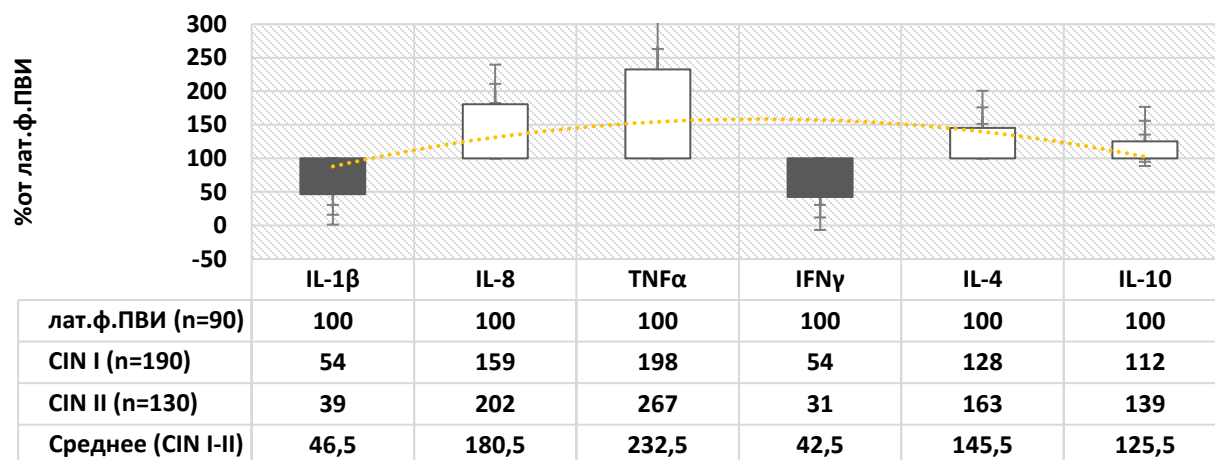


Рисунок 3.62. Концентрация цитокинов в цервикальной слизи (% от латентных форм ПВИ)

Что касается концентрации IL-4 в цервикальной слизи женщин, больных CIN, то таковая в 1,5 раза (недостаточно) превышала данный показатель в группе бессимптомных ВПЧ-носителей ($P > 0,5$). При исследовании концентрации IL-10 в цервикальной слизи больных CIN I-II, прежде всего, отмечена чрезвычайно высокая вариабельность индивидуальных значений, что привело, соответственно, к высоким показателям коэффициентов вариации, достигающих 40%. Все же, исходя из полученных результатов, можно сделать заключение, что исследование данного параметра не является патогномоничным для этого варианта патологии, т.к. какой-либо динамики концентрации IL-10 в цервикальной слизи ни в процессе развития заболевания, ни в условиях терапии не было выявлено.

Активность ферментов макрофагов цервикальной зоны

В настоящее время доказано, что миелопероксидаза (МПО) в присутствии перекиси водорода и окисляемого кофактора действует против различных микроорганизмов, вирусов, микоплазм, патогенных грибов и участвует в обезвреживании их токсинов [Klebanoff S., 2005]. МПО, перекись водорода и

окисляемый кофактор образуют в фагоцитах мощную бактерицидную систему. Механизм действия миелопероксидазной системы состоит в йодировании микроорганизмов и их токсинов, переокислительном дезаминировании и декарбоксилировании [Diamond R. et al., 2002; Zgliczinsky J. et al., 2004]. Миелопероксидазная система является основной бактерицидной системой макрофагов, дифференцирующихся из моноцитов при эмиграции последних из крови в очаг воспаления. По количеству пероксидазоположительных макрофагов и по содержанию в них активного фермента можно судить о потенциальной защитной активности слизистой, в том числе и при воспалении урогенитальной системы, вызванном инвазией папилломавирусов.

Таблица 3.14. Активность ферментов (СЦП) макрофагов цервикальной зоны в группах

	Миелопероксидаза	Кислая фосфатаза	Неспецифическая эстераза
Контроль	141,1±10,3	126,4±7,2	81,2±6,8
Латентная ф. ПВИ (n=90)	158,4±12,7	139,2±9,1	85,6±7,4
CIN I (n=190)	67,6±5,2	127,6±8,6	44,6±5,0
CIN II (n=130)	44,5±3,9	103,3±7,2	38,3±3,3

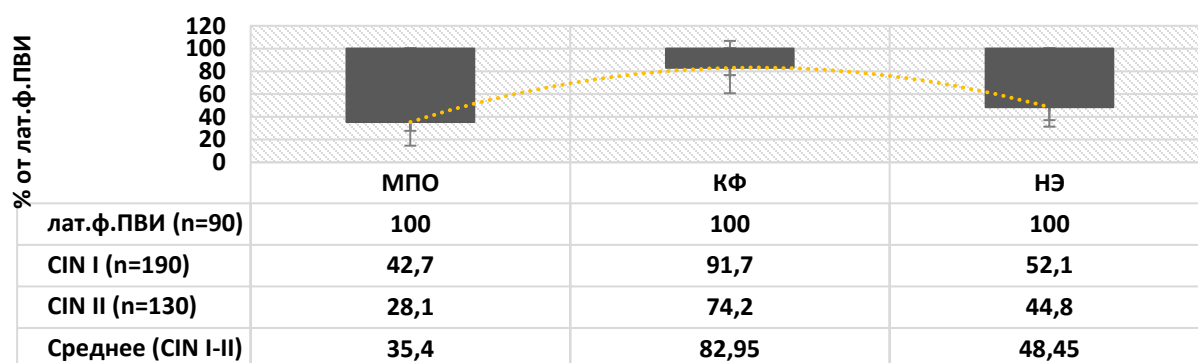


Рисунок 3.63. Активность ферментов (СЦП) макрофагов цервикальной зоны (% от латентных форм ПВИ)

Выявляемая активность миелопероксидазы, отражающей один из компонентов кислородзависимой бактерицидной системы макрофагов цервикальной зоны, у больных цервикальной интраэпителиальной неоплазией,

была более чем на треть ($P < 0,05$) ниже таковой определенной у пациенток с латентными формами папилломавирусной инфекции (табл. 3.14; рис. 3.63).

Активность кислой фосфатазы (КФ), коррелирующая с функциональной активностью макрофагов (в особенности их бактерицидной функцией), как у бессимптомных ВПЧ-носителей, так и у пациенток с CIN I-II практически не отличалась от соответствующего параметра контроля, тогда как выявляемая активность неспецифической эстеразы (НЭ), коррелирующая с субактивационными характеристиками макрофагов, у женщин с CIN, находилась на достоверно более низком уровне ($P < 0,05$).

3.3.8. Окислительные процессы в шейке матки при латентных формах ПВИ и у больных ВПЧ-ассоциированной цервикальной неоплазией

Состояние окислительных процессов в слизистой шейки матки на фоне бессимптомного ВПЧ-инфицирования и CIN I-II определяли методом электронного парамагнитного резонанса (ЭПР). Исследованы изменения парамагнитных центров слизистой шейки матки и влагалища у 200 женщин исследуемой группы и у 30 контрольной группы, в частности, исследовался свободный NO, реактивные формы кислорода (супероксидрадикалы, O_2^-) и липидов (пероксидрадикалы, LOO^-). В патогенезе каждого паранеопластического процесса значительную роль играют молекулярные и субклеточные механизмы: нарушение транспорта электронов, усиление образования генераторов свободных форм кислорода и пероксидрадикалов, понижение антиоксидантной активности крови. Из анализа приведенных данных следует, при ВПЧ-ассоциированных поражениях шейки матки легкой и средней степени (CIN I-II) интенсивность ЭПР сигнала спинмеченных пероксидрадикалов (LOO^-) увеличивается в среднем в 1,5 раза (119 – CIN I и 184% - CIN II) по сравнению с латентными формами ПВИ ($p < 0,05$), также регистрируются сигналы супероксидрадикалов (O_2^-), которые при бессимптомном ВПЧ-носительстве практически не регистрируются, увеличение интенсивности сигнала ЭПР оксида

азота (NO) также возрастает почти в 2 раза (167 – CIN I и 219% - CIN II) (рис. 3.64).

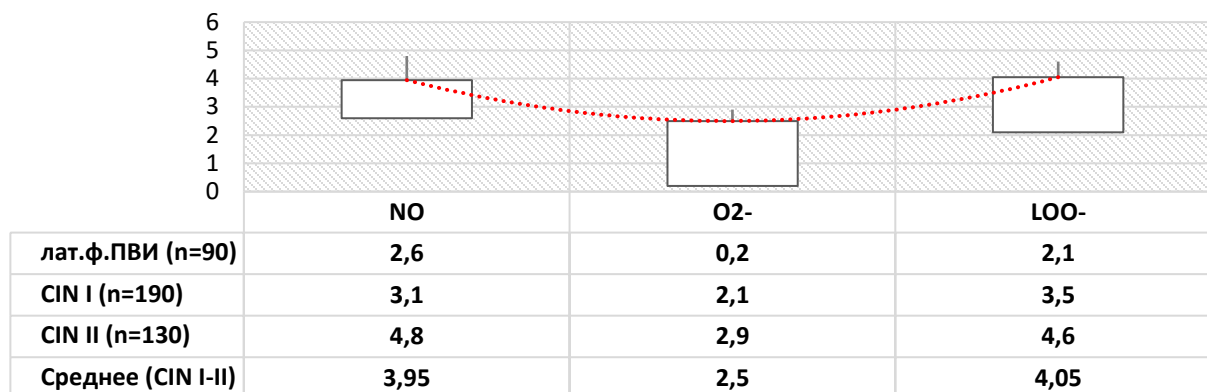


Рисунок 3.64. Содержание свободного оксида азота (NO), реактивных форм кислорода (O^{2-}) и липидов ($LOO^{\cdot}$) в слизистой шейки матки

Таким образом, можно заключить, что в случае ВПЧ-ассоциированного поражения шейки матки имеет место угнетение макрофагального звена локального иммунитета, способствующего Th-1 девиации с уменьшением количества провоспалительных цитокинов, интенсификации образования реактивных форм азота и кислорода, которые становятся причиной изменений молекулярных, субклеточных и клеточных структур. Кроме того, в эпителиоцитах усиливается образование реактивных форм кислорода и азота (O^{2-} и NO), что вызывает пероксидативные процессы липидов ($LOO^{\cdot}$) и интенсивное образование свободнорадикальных форм кислорода. Имеющиеся иммунологические и цитобioхимические изменения при ВПЧ-ассоциированных цервикальных неоплазиях легкой и средней степени становятся факторами, нарушающими структуры клеточных мембран, а изменение метаболических процессов играет значительную роль в патогенезе, переходу процесса в более тяжелые формы и малигнизации.

3.3.9. Расчет прогностических критериев заболеваемости ВПЧ-ассоциированными цервикальными неоплазиями

После проведенного комплексного исследования гомеостаза пациенток с латентными формами папилломавирусной инфекции и цервикальными интраэпителиальными неоплазиями, для оценки риска развития CIN и утяжеления процесса была составлена таблица прогностических критериев, позволяющая определить прогноз перехода латентных форм ПВИ в CIN с расчетом диагностического коэффициента (ДК) для каждого из признаков (последовательный анализ Вальда и показатель информативности признака - формула Кульбаха) (табл. 3.15).

Таблица 3.15. Прогностические критерии реализации латентной ПВИ в CIN

№№	Признак	Латентная форма ПВИ, ДЕ	CIN, ДЕ	ДК
Географические признаки				
1	Острая или критическая зона проживания	0,21	0,45	+1,6
2	Напряженная зона проживания	0,34	0,41	+1,3
3	Благоприятная или удовлетворительная зона проживания	0,48	0,29	-2,5
Анамнестические признаки				
4	Начало половой жизни			
	до 15 лет	0,11	0,85	+7,4
	15-17 лет	0,26	0,71	+3,3
	18-20 лет	0,32	0,45	+1,4
	свыше 20 лет	0,57	0,24	-2,7
5	Возраст			
	до 20 лет	0,12	0,91	+7,6
	21-25 лет	0,25	0,53	+3,1
	26-30 лет	0,41	0,29	-2,2
	свыше 30 лет			
6	Интервал от менархе до сексуального дебюта			
	2-3 года	0,19	0,54	+4,1
	4-5 лет	0,30	0,21	-0,5
	6 лет и более	0,55	0,11	-4,5
7	Количество половых партнеров			
	0	0,10	0,54	-5,4
	1	0,22	0,15	-2,5
	2	0,27	0,56	+3,1
	3 и более	0,13	0,79	+6,0
8	Курение	0,14	0,47	+3,8

9	Прием КОК (более 5 лет)	0,16	0,25	+1,9
10	ВМС	0,23	0,37	+3,1
11	Отягощенная онконаследственность	0,20	0,74	+5,5
Клинические признаки				
12	Аногенитальные бородавки	0,31	0,60	+3,9
13	Рубцовая деформация ш/м	0,12	0,55	+4,3
14	Эктопия/эктропион ш/м	0,14	0,58	+4,3
15	Хронический цервицит	0,28	0,71	+4,2
16	Вагинит/вагиноз	0,31	0,90	+4,3
Лабораторные признаки				
17	pH			
	>5,5	0,14	0,81	+6,5
	<5,5	0,62	0,15	-4,8
18	Количество лейкоцитов в вагинальном содержимом (в п/зр)			
	Менее 6	0,12	0,45	+3,7
	6-10	0,48	0,32	-1,6
	Свыше 10	0,40	0,23	-1,5
19	Инфекционный фактор			
	ИППП:	0,11	0,97	+8,6
	Гонококковая инфекция	0,09	0,14	+2,5
	Трихомонадная инфекция	0,23	0,68	+4,7
	Хламидийная, микоплазменная инфекции	0,24	0,71	+5,3
	Урогенитальный герпес	0,17	0,90	+6,6
	Урогенитальный кандидоз	0,31	0,56	+2,2
	Микстинфицирование (ИИ 3 и более)	0,13	0,83	+7,1
	Неспецифическая УПМ	0,28	0,61	+3,8
20	Вагинальный биоценоз			
	Вагинит	0,30	0,27	-0,4
	Дисбиоз	0,16	0,88	+7,3
	Промежуточный тип	0,29	0,31	+0,2
	Нормоценоз	0,68	0,11	-6,4
	Бактериальный вагиноз	0,20	0,85	+4,5
21	Клинико-кольпоскопический индекс			
	0-3 балла	0,99	0,13	-7,6
	4-5 баллов	0,11	0,74	+6,7
	6-7 баллов	0,00	1,0	+10,0
22	Кольпоскопический индекс Рейда			
	0-2 балла	0,96	0,11	-8,7
	3-4 балла	0,11	0,73	+6,6
	5-8 баллов	0,00	1,0	+10,0
23	Маркеры неоплазии			
	Онкобелок E7	0,13	0,74	+5,7
	Гиперэкспрессия p16ink4a	0,03	0,39	+13,0
	Экспрессия Ki-67	0,02	0,36	+18,0
	Коэффициент 2-ONE1/16α-ONE1			
	-выше 2,0	0,81	0,17	-4,8
	-1,5-2,0	0,18	0,39	+2,6

	-менее 1,5	0,15	0,72	+4,8
24	Вирусная нагрузка (ВПЧ высокого онкогенного риска)			
	низкая (<3 lg)	0,11	0,08	-4,8
	средняя (3-5 lg)	0,48	0,32	-1,5
	высокая (>5 lg)	0,41	0,68	+1,6
	Микстинфицирование высокоонкогенными типами ВПЧ с диапазоном ИИ от 3 до 6	0,19	0,84	+6,5

Это позволило выявить наиболее информативные показатели для оценки прогноза CIN. С учетом клинико-кольпоскопические, гистологические и лабораторные критерии для прогноза утяжеления CIN. Производился расчет диагностического коэффициента для каждого из признаков: при ДК от -26 до +18 битов прогнозируют благоприятный исход (перехода ВПЧ-носительства в CIN не предвидится), при ДК от +19 до плюс +26 битов вероятность перехода бессимптомного ВПЧ-носительства в цервикальную интраэпителиальную неоплазию составляет 95%, при ДК более +26 битов - 99%.

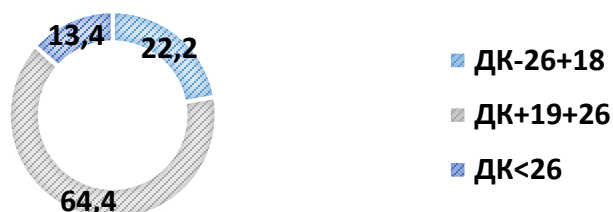


Рисунок 3.65. Диагностический коэффициент при латентных формах ПВИ (%)

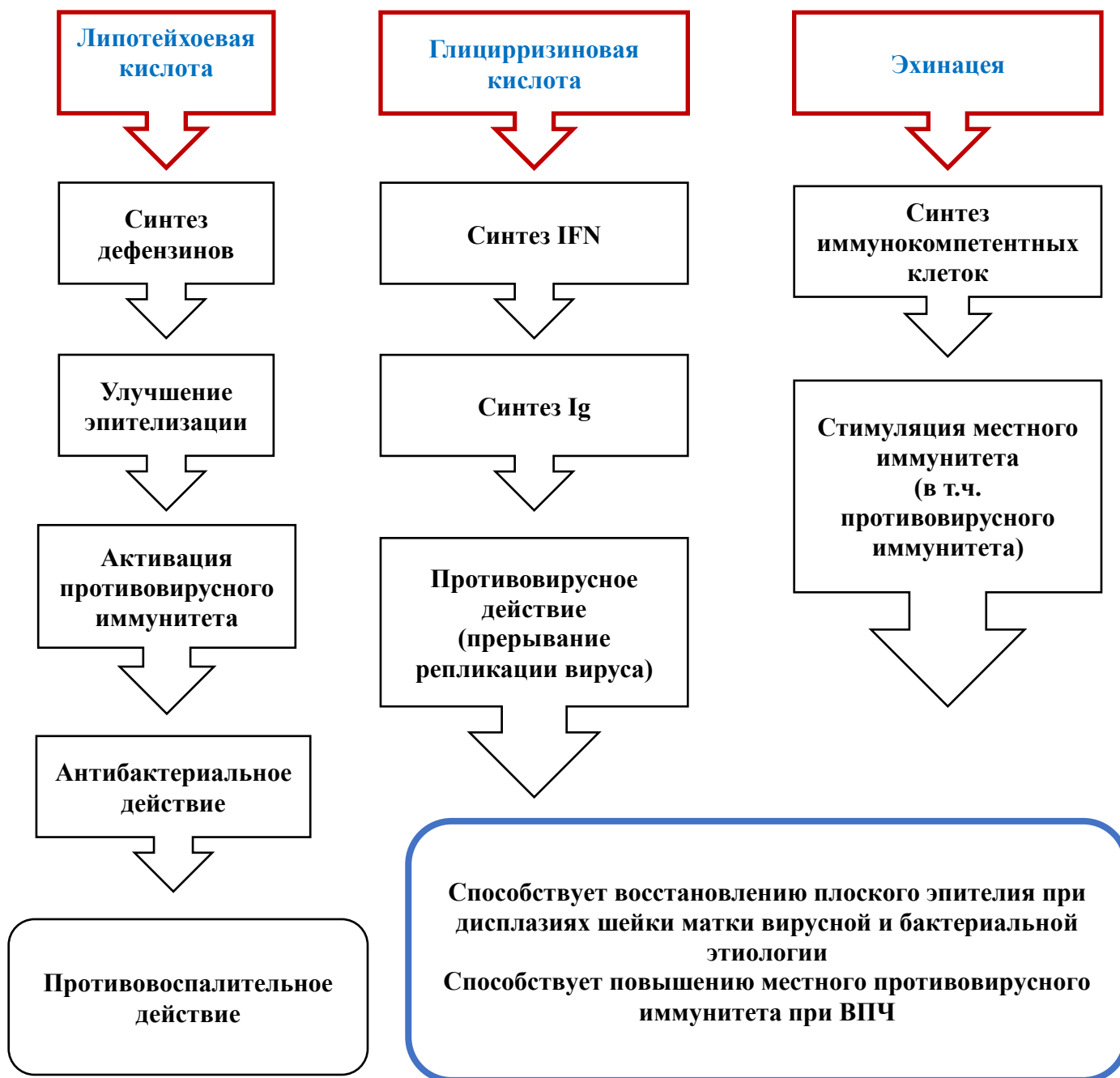
На основании проведенных исследований был произведен расчет диагностического коэффициента пациенткам с латентными формами папилломавирусной инфекции, включенными в наше исследование (90 женщин) (рис. 3.65). Выявлено, что ДК от -26 до +18 бит (благоприятный исход) наблюдался у 22,2% обследованных, ДК от +19 до +26 бит (95% риска перехода в CIN) наблюдался в 64,4% случаев и ДК свыше 26 бит (99% риска перехода в CIN) – в 13,4%. Таким образом, суммарно риск реализации латентных форм ПВИ в CIN более 95% выявился у 87,8% обследованных пациенток (поэтому было в дальнейшем нецелесообразно выделять отдельно группу с низким риском, ввиду ее невысокой репрезентативности).

3.4. Обоснование предлагаемой терапии латентных форм папилломавирусной инфекции и ВПЧ-ассоциированных цервикальных неоплазий легкой и средней степени

Обоснование предлагаемой профилактической терапии латентных форм ПВИ

Необходимость терапии бессимптомных носителей вируса папилломы человека в настоящий момент является одним из самых спорных вопросов в данной сфере. В связи с этим нами методом слепой выборки участники исследования, являющиеся ВПЧ-носителями, были разделены на две группы: одной из них велось только наблюдение в течение 5 лет с ежегодным контролем вирусной нагрузки, расширенной кольпоскопией и взятием мазков на онкоцитологию. Другой, в качестве профилактической терапии манифестации ВПЧ-инфекции было предложено топическое применение препарата - «Кольпоцид-гель» (UPL). Основными действующими веществами препарата являются пептидогликаны (PTG) и липотейхоевая кислота (LTA), полученные из продуктов ферментации лактобактерий, а также глицирризиновая кислота (ГК). Липотейхоевая кислота в комплексе с протеогликанами стимулирует выработку дефензинов, которые являются естественными защитными пептидами организма человека, стимулируя репаративные процессы, активируя локальный противовирусный иммунитет. Катионные антимикробные белки играют ключевую роль в обеспечении первой линии защиты макроорганизма от инфекции. Дефензины составляют большое семейство низкомолекулярных катионных пептидов, которые способны к киллингу широкого спектра патогенов. Они эффективны в отношении ДНК- и РНК-вирусов, ингибируя их репликацию [А.С. Будихина, Пинегин Б.В., 2011; Peretti S. et al., 2015]. Антивирусная активность ГК была обнаружена в последние годы. В исследованиях на культуре клеток, зараженных ВПЧ, выявлено, что ГК в концентрациях, хорошо переносимых неинфицированными клетками, ингибирует рост и

цитопатическую активность вируса [Coen D., Schaffer P., 2015]. Как было показано в последних исследованиях, молекулярный механизм противовирусного действия ГК заключается в ингибировании киназы Р, что приводит к подавлению фосфорилирования клеточных и кодируемых вирусом белков в инфицированных клетках. Таким образом, ГК относится к классу киназных ингибиторов, развитие толерантности вирусов к которым затруднено [Coen D., Schaffer P., 2015] (схема 3.2).



Обоснование предлагаемой терапии ВПЧ-ассоциированных CIN I-II

Проведенные нами исследования выявили у больных цервикальной интраэпителиальной неоплазией признаки активной вирусной инфекции (ВПЧ) на фоне изменений в иммунитете (особенно локальном) и оксидативном статусе шейки матки. При таких нарушениях локального гомеостаза целесообразно использовать комплекс препаратов, обладающих одновременно противовирусной, иммуномодулирующей и антиоксидантной активностью. Таким комплексом является сочетание противовирусного препарата «Ферровир» – 1,5% раствор дезоксирибонуклеата Na с железом (Fe^{3+}) с иммуномодулятором, обладающим антиоксидантной активностью – «Генферон». Молекулы ДНК в составе Ферровира способны проникать в клетки путем пиноцитоза и метаболизироваться до нуклеотидов, среди которых наиболее важными являются АТФ и АДФ. Выходя активно из клеток во внеклеточную среду, нуклеотиды связываются с пуриновыми рецепторами, которые представлены на клетках иммунной системы [Ю.Л. Житнухин и др., 2011]. Следовательно, помимо противовирусной активности данный препарат может модулировать иммунный ответ, регулировать энергетический обмен путем реализации оксидативного каскада в тканях. В пилотных клинических исследованиях показана способность Ферровира снижать количество активированных Т-лимфоцитов ($CD3+DR+$), и НКТ-клеток ($CD3+CD56+CD16+$) у больных вирусными заболеваниями половых органов на фоне существенного уменьшения выраженности клинических симптомов и вирусной нагрузки [Н.Б. Серебряная, М.Н. Карпенко, 2010]. Интерферон-альфа, входящий в состав «Генферона» обладает противовирусным, противомикробным и иммуномодулирующим действием. Последнее проявляется в активации $CD8+$ цитотоксических Т-лимфоцитов, НК-клеток, усилении дифференцировки В-лимфоцитов и продукции ими антител со сменой их изотипа и повышением аффинности, активацией моноцитарно-макрофагальной системы и фагоцитоза, что способствует, в первую очередь,

амплификации клеточно-опосредованных реакций иммунной системы, которые играют основную роль в противовирусной и противоопухолевой защите организма. Кроме того, таурин, условно незаменимая аминокислота, входящая в состав «Генферона», оказывает репаративное, антиоксидантное и противовоспалительное действие. Все вышеперечисленное послужило патогенетическим основанием для применения препарата «Ферровир» в комплексе с «Генфероном» при цервикальных интраэпителиальных неоплазиях легкой степени тяжести.

Полученные данные об изменениях иммунного и оксидативного статусов явились патогенетическим обоснованием для назначения иммунотерапии ВПЧ-ассоциированных CIN. В качестве экспериментального лечения CIN нами была предложена локальная цитокинотерапия препаратом рекомбинантного интерлейкина-2 (rIL-2). В настоящее время одним из самых многогранных, действующим на различные звенья патологического воспалительного процесса препаратом является рекомбинантная форма интерлейкина-2 – «Ронколейкин®» (ООО «Биотех», СПб) [В.К. Козлов, М.В. Лебедев и др., 2012; А.А. Тотолян, 2008]. IL-2 обладает выраженной иммуностимулирующей активностью, направленной на усиление противобактериального, противовирусного, противогрибкового, противоопухолевого иммунитета и применяется в иммунотерапии различных заболеваний, связанных с иммунодефицитами [В.Н. Егорова, М.Н. Смирнов, 2009].

Активная субстанция rIL-2 вырабатывается на векторе непатогенных дрожжей, в генетический аппарат которых встроен ген человеческого IL-2. Интерлейкин-2 является аутокринным фактором роста, дифференцировки и активации всех популяций лимфоидных клеток [И.Е. Зазерская и др., 2008; К.А. Сухих, 2011; Morgan D. et al., 2007]. Главными мишенями действия IL-2, являются оба подтипа (Th-1 и Th-2) CD4⁺ - Т-хелперов, но в большей степени Th-1 [Morsmann T. et al., 2006], макрофаги, которые увеличивают продукцию H₂O₂,

усиливая тем самым цитотоксическую, бактерицидную и антигенпредставляющую активность [Holter W. et al., 2007] и NK-клетки с последующей трансформацией последних в лимфокиноактивированные киллеры (ЛАК), имеющие генотип CD16+CD3- CD5-, ответственные за генетически не рестриктированную цитотоксичность [Grimm E. et al., 2006]. Таким образом, IL-2 является ключевым фактором в развитии иммунологических реакций, т.к. его эффекты приводят к плеiotропному ответу с участием практически всех популяций и субпопуляций клеток иммунной системы. К тому же, описанные стимулирующие прямые и опосредованные эффекты IL-2 не касаются в основном индукции синтеза TNF- α , являющегося в данных условиях основным, вызывающим десквамацию эпителия и повреждение тканей, цитокином. Следует также учесть, что благодаря аутокринному эффекту, введение даже небольших количеств rIL-2 при контакте с чувствительными клетками в основном Th-1 субпопуляций индуцирует каскадный синтез эндогенного IL-2 *in situ* и увеличение на клетках количества рецепторов к IL-2, преимущественно CD25+, причем эффект сохраняется до 96 часов. Исходя из вышеизложенного, а также из того, что основным вариантом дисфункциональных нарушений иммунной системы, выявленных у больных с CIN, являлись системный и, в большей степени, местный дефицит по CD4+, вероятнее всего по Th-1, а также определенные дисфункциональные изменения макрофагального звена, мы применили «Ронколейкин».

3.5. Сравнительная эффективность терапии латентных форм ПВИ и больных ВПЧ-ассоциированной цервикальной интраэпителиальной неоплазией легкой и средней степени

Для оценки сравнительной эффективности современной традиционной и предлагаемой комплексной терапии методом случайной выборки все вирусоносители и больные папилломавирусной инфекцией в виде цервикального интраэпителиального поражения низкой и средней степени (CIN I-II) (320

пациенток) были разделены на 3 группы (60 условно здоровых женщин – иммуноцитобиохимический контроль):

I группа (90 пациенток) – латентные формы папилломавирусной инфекции.

II группа (190 больных) – цервикальная интраэпителиальная неоплазия легкой степени (CIN I).

III группа (130 больных) – цервикальная интраэпителиальная неоплазия средней степени (CIN II).

В процессе дифференцированной терапии все пациентки были разделены на следующие группы:

IV группа (45 пациенток) – латентные формы ПВИ, которым проводилось лишь динамическое наблюдение в течение 5 лет.

V группа (45 пациенток) – латентные формы ПВИ с топической профилактической терапией препаратом «Кольпоцид CrystalMatrix-FS» гель вагинальный (тюбик 5 мл с наконечником, упаковка 5); (Рег. № RU.77.99.32.001. от 26.09.2011 г.) производства Лаборатория Эманси (Россия), который применялся 1 раз в сутки интравагинально 10 дней каждые 6 месяцев в течение пяти лет.

VI группа (80 больных CIN I) – которой проводили комплексную терапию, где в качестве основного средства терапии применяли препарат «Ферровир» (Рег. № 000630/01 от 08.12.2006 г.) производства ЗАО ФП «Техномедсервис», Москва. Препарат вводили всем больным по 5,0 мл 1,5% раствора, внутримышечно (первые 5 инъекций ежедневно, следующие 5 - с интервалом с интервалом 48 часов). Общий курс составил 10 инъекций (16 дней). В дополнение к противовирусной терапии локально был применен иммуномодулирующий препарат рекомбинантного интерферона $\alpha 2$ (Рег. № 01-11/88-09 от 15.07.2009 г.) с антиоксидантным воздействием (таурин 0,01 г) - «Генферон» производства ЗАО ФП «Биокад», Россия (суппозитории по 1000000 МЕ №20 вводимыми интравагинально 2 раза в день).

VII группа (80 больных CIN I) – получавших топическую терапию препаратом рекомбинантного интерлейкина-2 («Ронколейкин») (Рег. № 000122/01 – 2000). Ампулу препарата (0,5 мг, 1000000 Ед.) растворяли в 2 мл воды для инъекций и инсулиновым шприцом вводили с учетом лимфооттока (подкожно в 2 точки в переднюю брюшную стенку на 3 см медиальнее spina iliaca anterior superior) по 0,5 мл трижды с интервалом 72 часа.

VIII группа (65 больных CIN II) – которой проводилась терапия, аналогичная VI группе (деструкция + «Ферровир» + «Генферон»).

IX группа (65 больных CIN II) – получавших топическую терапию препаратом «Ронколейкин» и деструкция.

Оценку клинико-микробиологической эффективности лечения проводили на основе динамики следующих показателей:

- ✓ жалоб и оценки своего самочувствия пациентками до лечения, через 4 дня, 1, 6 и 12 месяцев после окончания лечения;
- ✓ результатов объективного осмотра и кольпоскопии (с подсчетом клинико-кольпоскопического индекса);
- ✓ данных цитологического (Pap-тест) и молекулярно-биологического (ВПЧ Digene-тест, онкобелок E7) исследования.

Критериями оценки клинической и микробиологической эффективности являлись [В.И. Роговская, 2007]:

- ✓ полное клиническое выздоровление и микробиологическая санация: отсутствие CIN и воспалительных изменений слизистой влагалища и шейки матки, а также отрицательный результат цитологического исследования цервикального соскоба после завершения курса лечения;
- ✓ улучшение: значительные уменьшения субъективных и объективных клинических симптомов при положительном результате цитологического и/или молекулярно-биологического исследований;

- ✓ рецидив: повторное появление CIN и положительных результатов цитологического и молекулярно-биологического исследований в течение 2 месяцев и более после завершения курса лечения.

Кроме того, у пациенток с обнаруженными типами ВПЧ 16 и/или 18 проводилось динамическое (в предложенные сроки: до лечения, через 1, 6 и 12 месяцев, 2-5 лет после окончания лечения) определение (метод ПЦР) содержания онкобелка E7, как дополнительного критерия эффективности проводимой терапии.

Об иммунологической и цитобиохимической эффективности судили на 20-е сутки от начала терапии (4-й день после окончания терапии) и через 1 месяц после окончания лечения по изменению цитохимических показателей клеток мононуклеарно-фагоцитарной и параметров антиоксидантной систем, а также по концентрации цитокинов в цервикальной слизи.

3.5.1. Сравнительная эффективность профилактической терапии пациенток с латентными формами ПВИ

В ходе проведенного клинико-микробиологического исследования в исследуемых группах в течение пяти лет, выявлено, что реализация латентного носительства папилломавирусной инфекции в цервикальную интраэпителиальную неоплазию зависит большого количества факторов, но в первую очередь кофакторами перехода являются дисбиотические нарушения вагинальной микрофлоры, наличие онкопротеинов E6 и E7, экспрессии p16ink4D и Ki-67, и нарушение обмена эстрогенов с повышением синтеза 16- α -гидроксиэстрона (16 α -ОНЕ1). Кроме того, мы решили оценить эффективность профилактики неопластических процессов в шейке матки, путем интравагинального введения препарата «Кольпоцид-гель CrystalMatrix-FS». Для этого, группа пациенток с латентным ВПЧ-носительством была разделена пополам: *IV группа* (45 пациенток), которым проводилось лишь динамическое наблюдение в течение 5 лет; *V группа* (45 пациенток), которым проводилась топическая профилактика препаратом «Кольпоцид» гель вагинальный (1 раз в сутки интравагинально 10 дней каждые 6 месяцев в течение пяти лет). Кроме того, перед исследованием была проведена санация цервико-вагинальной зоны с коррекцией дисбиотических изменений во влагалище.

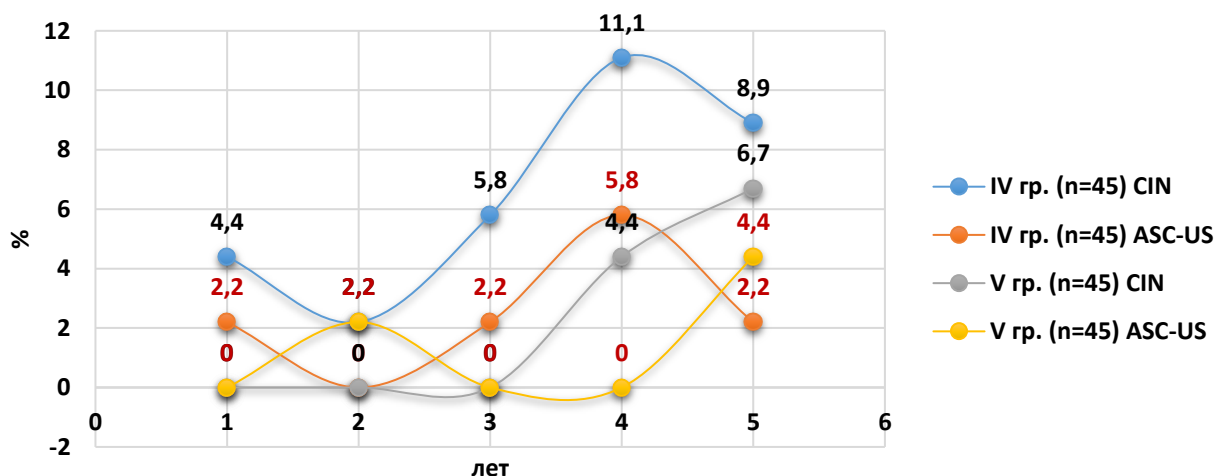


Рисунок. 3.66. Реализация вирусоносительства в CIN

При пятилетнем мониторинге выявлена следующая динамика (рис. 3.66): в первый год наблюдения неопластические процессы в шейке матки обнаружены у 4,4% пациенток IV группы (в V группе реализации латентных форм в CIN не наблюдалось), в последующие 4 года их количество увеличилось до 32,4 и 12,4% соответственно в IV и V группах. При этом в обеих группах выявлялись лишь цервикальные интраэпителиальные неоплазии легкой степени. Определенный процент также составляли пациентки с неопределенной кольпоцитологической структурой соскоба шейки матки - atypical squamous cells of undetermined significance (ASC-US), требующие наблюдения и дальнейшей верификации: в IV группе таких пациенток за 5 лет обнаружено 12,4%, а в V группе – 6,6%.

Кроме изменений кольпоскопической картины пациенток с латентными формами папилломавирусной инфекции, мы попытались оценить динамику вирусной нагрузки высокоонкогенными типами ВПЧ в исследуемых группах (рис 3.67). Средняя вирусная нагрузка в группе пассивного наблюдения (IV) за пятилетний срок была равна 45,6, при этом в группе с профилактическим топическим применением препарата «Кольпоцид» (V группа) она оказалась в 1,8 раз ниже (25,0).

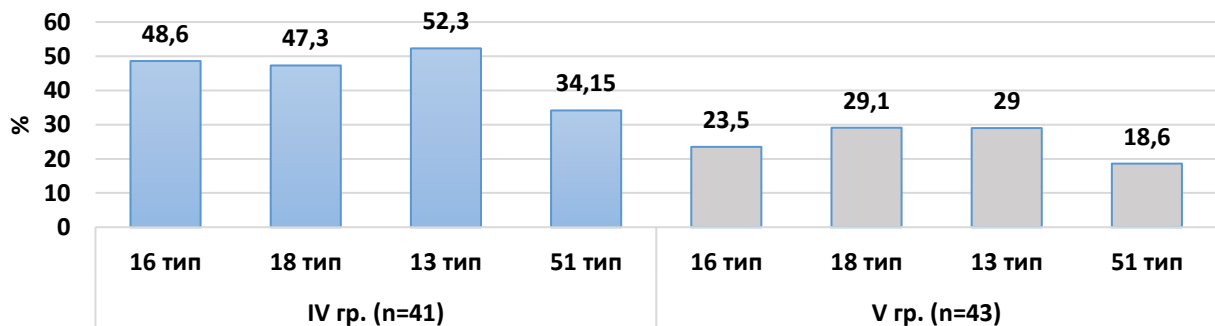


Рисунок. 3.67. Динамика вирусной нагрузки высокоонкогенными типами ВПЧ у пациенток с латентной формой ПВИ (5 лет)

Также была проведена динамическая оценка содержания метаболитов эстрогенов в исследуемых двух группах пациенток с латентными формами папилломавирусной инфекции. Выявлена достоверна динамика уменьшения

пациенток с коэффициентом 2-OHE1/16 α -OHE1 менее 1,5 в V группе ($P>0,05$). В среднем низкий коэффициент 2-OHE1/16 α -OHE1 в V группе уменьшился за 5 лет в 1,7 раза по сравнению со стабильным (и даже несколько возросшим) коэффициентом в IV группе (рис. 3.68).

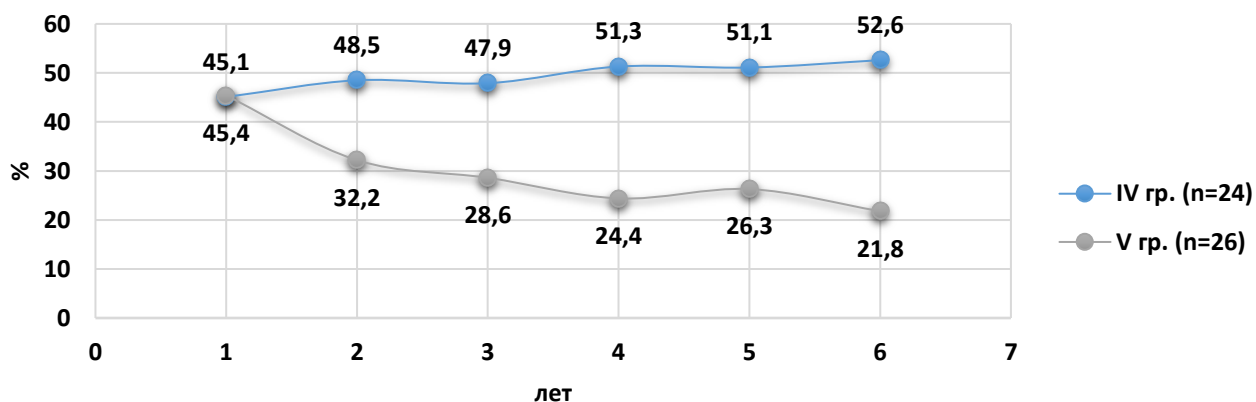


Рисунок. 3.68. Динамика частоты выявления низкого коэффициента 2-OHE1/16 α -OHE1 (менее 1,5) у латентных ВПЧ-носителей

По-видимому, глицирризиновая, липотейхоевая кислоты и пептидогликаны, входящие в состав препарата «Кольпоцид» стимулируют выработку дефензинов с последующим ингибированием киназы Р, что приводит как к подавлению фосфорилирования клеточных и кодируемых вирусом белков в инфицированных клетках, так и воздействует на группы ферментов цитохрома Р450 с увеличением выработки 2-гидроксиэстрогенов и уменьшением, соответственно, количества 16-гидроксиэстриола.

Таким образом, в группе пациенток, которым с профилактической целью применяли препарат, содержащий глицирризиновую и липотейхоевую кислоты («Кольпоцид CrystalMatrix-FS®») (V) выявлено в 1,8 раз меньшую реализацию латентных форм ПВИ в CIN, статистически значимое уменьшение вирусной нагрузки высокоонкогенными типами ВПЧ, снижение количества пациенток с низким коэффициентом метаболитов эстрогенов (OHE1/16 α -OHE1).

3.5.2. Сравнительная эффективность терапии пациенток с ВПЧ-ассоциированными цервикальными интраэпителиальными неоплазиями легкой и средней степени тяжести (цитокольпоскопия)

При проведении кольпоскопии у 63,1% больных CIN I и 93,1% - CIN II диагностированы аномальные кольпоскопические картины, в виде мозаики, пунктуации, йод негативных зон, атипических сосудов, где выполнялась биопсия (табл. 3.16, рис. 3.69).

Таблица 3.16. Кольпоскопическая картина у пациенток исследуемых групп (%)

Кольпоскопическая картина	Группа исследования			
	VI гр. (n=80)	VII гр. (n=80)	VIII гр. (n=65)	IX гр. (n=65)
Эктопия с нормальной зоной трансформации	12,5	11,25	6,2	7,7
Эктопия с аномальной кольпоскопической картиной	62,5	63,75	93,8	92,3
- мозаика	6,25	6,5	8,2	6,7
- пунктуация	40,75	42,5	29,5	30,0
- сочетание мозаики и пунктуации	15,5	14,75	62,3	63,3

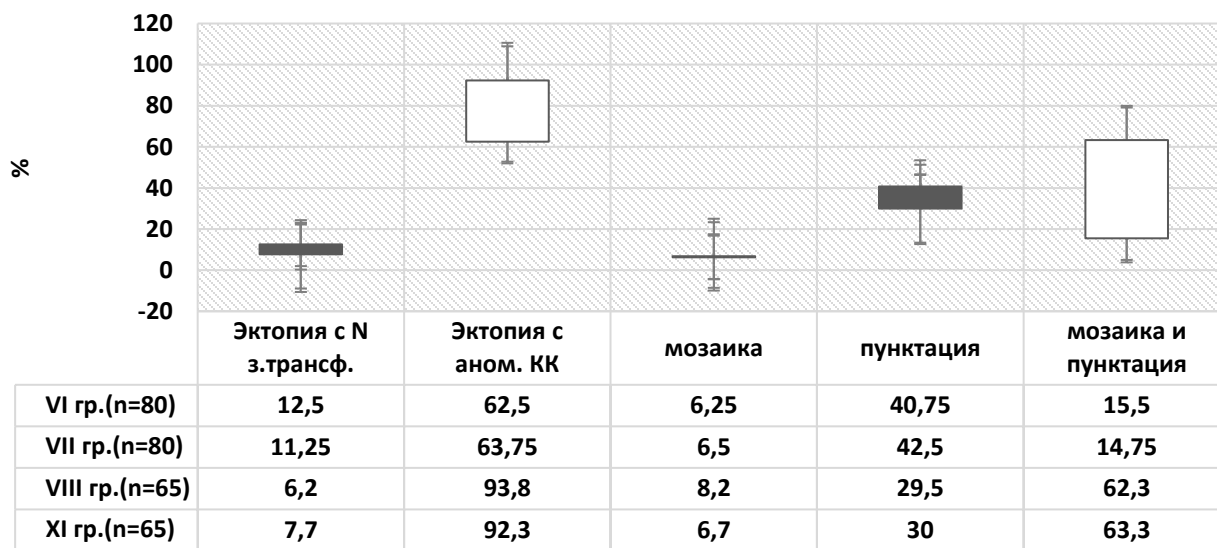


Рисунок. 3.69. Кольпоскопическая картина у пациенток исследуемых групп

При расширенной кольпоскопии выявляется зона трансформации, которая и является мишенью для воздействия ВПЧ. В связи с подозрением по данным кольпоскопического исследования на аномальные кольпоскопические

образования (АКО) у вышеперечисленных пациенток выполнена прицельная биопсия (табл. 3.17).

Таблица 3.17. Патология шейки матки у пациенток исследуемых групп по данным гистологического исследования (%)

Гистологический диагноз	Группа исследования			
	VI гр. (n=50)	VII гр. (n=51)	VIII гр. (n=60)	IX гр. (n=61)
Стационарный эндоцервикоз	16,0	13,7	11,7	11,5
Железисто-кистозный эндоцервикоз	8,0	9,8	8,3	9,8
Эндоцервикоз с эпидермизацией	4,0	3,9	6,7	8,1
Эндоцервикоз с воспалением	24,0	23,5	18,3	19,7
Эндоцервикоз с паракератозом	4,0	5,8	5,0	8,2
Лейкоплакия	-	-	3,3	1,6
Дисплазия шейки матки I степени	96,0	92,2	5,0	4,9
Дисплазия шейки матки II степени	-	-	95,0	95,1
Фиброзно-железистый полип + эндоцервикоз	-	2,0	3,3	4,9

При исследовании динамики цитокольпоскопической картины у женщин с ВПЧ-ассоциированными цервикальными интраэпителиальными неоплазиями легкой степени выявлено, что в группе пациенток которым проводили комплексную противовирусную и иммуномодулирующую терапию препаратами «Ферровир» и «Генферон» (VI группа - 80 больных CIN I) через 1 месяц после окончания лечения у 26,25% пациенток выявлен регресс патологических изменений эпителия шейки матки вплоть до нормальной кольпоскопической картины. В группе с той же степенью поражения шейки матки на фоне предлагаемой терапии (Ронколейкин) (VII группа - 80 больных CIN I) – нормальная кольпоскопическая картина выявлена у 72,5% больных (рис. 3.70). Через 6 месяцев от начала терапии в данных группах количество пациенток с нормальной кольпоскопической картиной составляло, соответственно, 28,75% в VI группе и 76,25% во VII группе. Еще через полгода (12 месяцев мониторинга) зарегистрировано увеличение рецидивов папилломавирусной инфекции у женщин VI группы, и отсутствие патологических изменений шейки матки обнаружено лишь в 21,25% случаев. Количество пациенток с нормальной

кольпоскопической картиной в VII группе практически не изменилось и составило 78,75%.

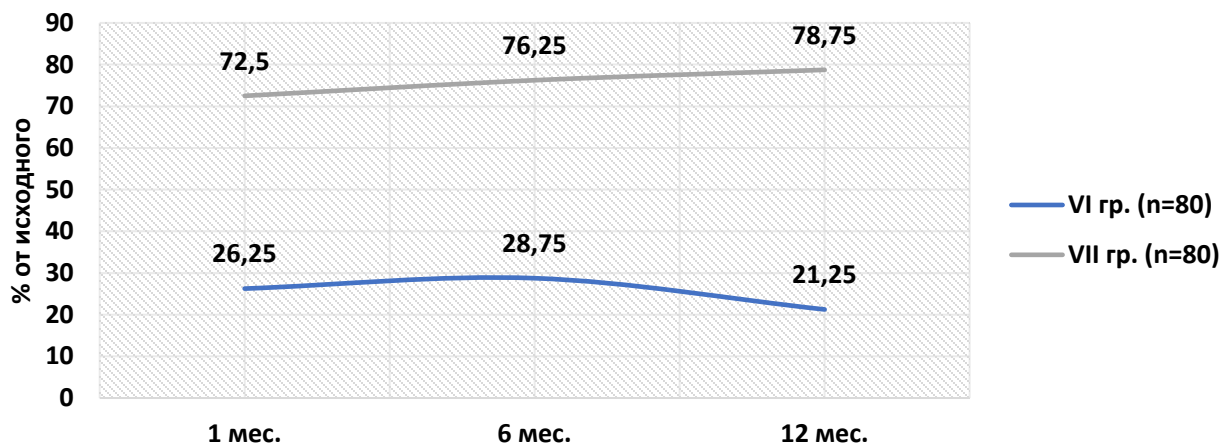


Рисунок. 3.70. Динамика появления нормальной кольпоскопической картины в процессе терапии в исследуемых группах (CIN I)

Кроме того, в ходе динамического наблюдения был выявлено некоторое количество пациенток с неопределенной кольпоцитологической структурой соскоба шейки матки (ASC-US). Так, в VI группе через 1 месяц после проведенной терапии женщин с ASC-US оказалось 8,75%, а в VII группе 3,75% (рис. 3.71). Через полгода от начала терапии в данных группах количество пациенток с ASC-US составило в VI группе 13,75%, а в VII группе неопределенная кольпоцитологическая структура соскоба была обнаружена у одной пациентки (1,25%). Через 12 месяцев количество пациенток с ASC-US в VI группе осталось прежним (при общем увеличении количества рецидивов цервикальной интраэпителиальной неоплазии), а в VII группе данный показатель остался на том же уровне, что и через 1 месяц наблюдения — 3,75%. Утяжеление процесса до CIN II в ходе годичного мониторинга было зарегистрировано у двух пациенток VI группы (2,5%). Всем больным VI и VII групп, у которых не было зарегистрировано улучшение состояния шейки матки на фоне проводимой консервативной терапии в дальнейшем была проведена радиоволновая абляция.

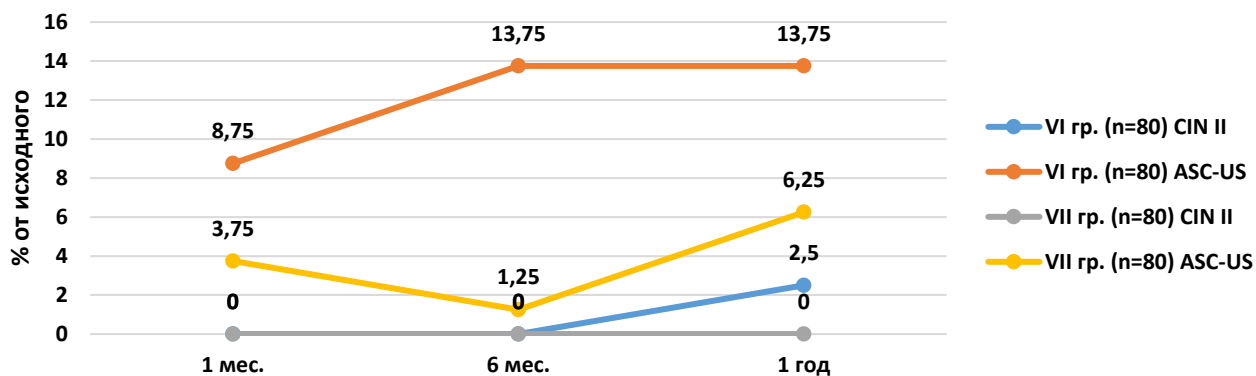


Рисунок. 3.71. Динамика появления CIN II и ASC-US в процессе терапии в исследуемых группах

Также была произведена оценка динамики кольпоскопической картины в группах у больных со средней степенью цервикального интраэпителиального поражения (CIN II) – VIII и IX группы (по 65 пациенток). Через 1 месяц от начала проведения противовирусной и иммуномодулирующей терапии (Ферровир + Генферон) в комплексе с деструктивной радиоволновой терапией аппаратом «Сургитрон» у женщин VIII группы нормализация цитокольпоскопической картины зарегистрирована у 69,2% больных. У остальных женщин выявлены вновь появившиеся изменения эпителия экзо- и эндоцервикса, характерные для ВПЧ-инфекции. В IX группе, которой в комплекс мероприятий кроме вышеперечисленной деструктивной терапии был включен иммуномодулирующий препарат (Ронколейкин) регресс патологических изменений эпителия шейки матки выявлен у 86,1% пациенток (рис. 3.72). Через 6 месяцев мониторинга в VIII группе количество пациенток с нормальной кольпоскопической картиной несколько снизилось и составило 58,4%. В IX группе на данном отрезке времени количество женщин с выявленной кольпоскопически нормальной картиной эпителия шейки матки составило 89,2%. Через 12 месяцев от начала терапии количество пациенток с нормальной кольпоскопической картиной уменьшилось в обеих группах и стало составлять - 41,5% в VIII и 83,1% в IX группе.

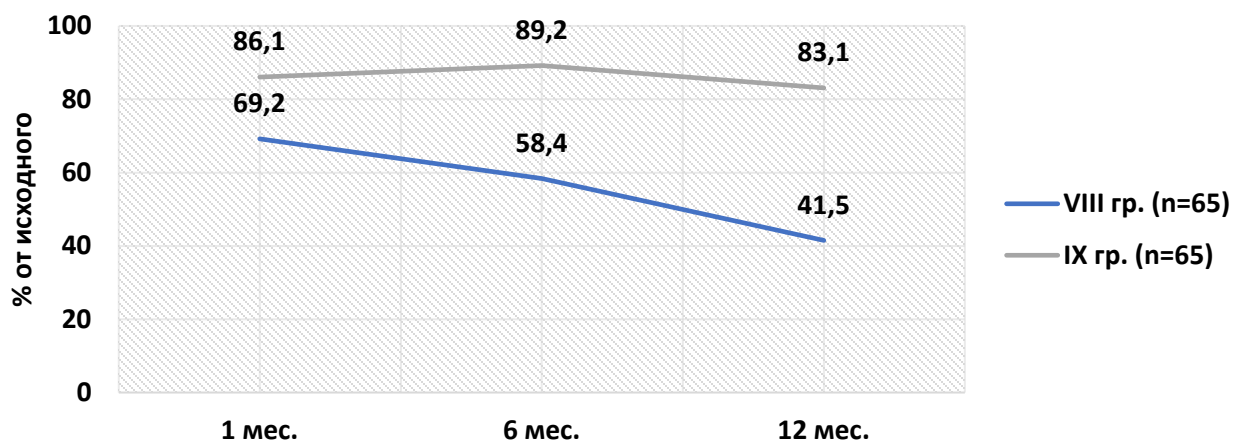


Рисунок. 3.72. Динамика появления нормальной цитокольпоскопической картины в процессе терапии в исследуемых группах (CIN II)

Уменьшения тяжести процесса в группах со средней степенью цервикальной неоплазии (переход в CIN I) через 1 месяц после окончания лечения зафиксировано у 4,6% пациенток VIII и у 3,1% IX групп. При годичном наблюдении в VIII группе данная цифра осталась неизменной, а IX группе выросла до 7,7% (рис. 3.73).

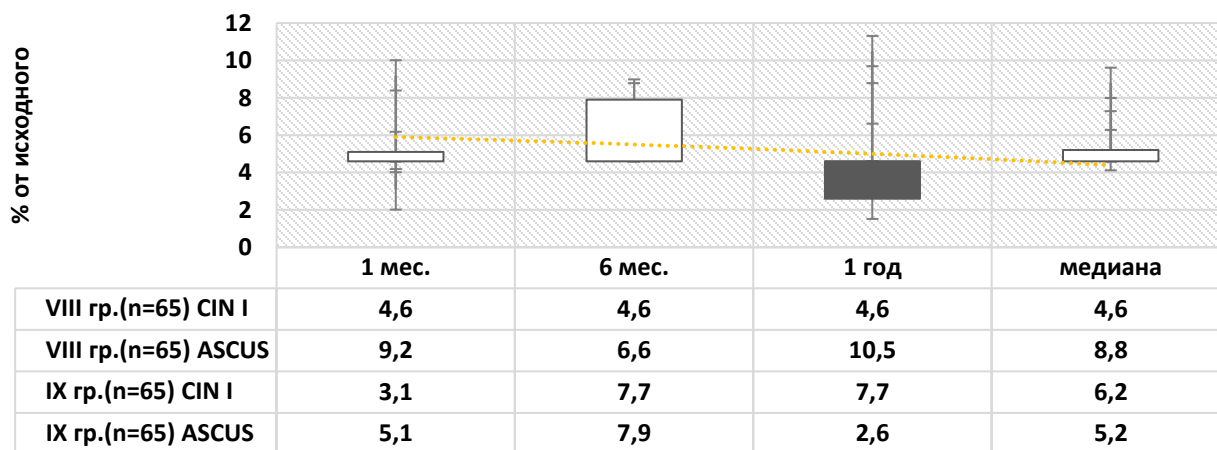


Рисунок. 3.73. Динамика появления CIN I и ASC-US в процессе терапии в исследуемых группах

Утяжеление цервикальной интраэпителиальной неоплазии до CIN III в течение пятилетнего мониторинга не зафиксировано в одном случае (VIII группа, 4 год наблюдения). Пациентки с ASC-US после проведенной терапии CIN II в VIII группе после 1 месяца наблюдения составили 9,2%, а в IX группе – 5,1%,

Одновременно, в ходе проводимой терапии и последующего наблюдения, нами в исследуемых группах с CIN I-II была проведена оценка клинско-кольпоскопического индекса (ККИ) и кольпоскопического индекса Рейда (КИР). Через месяц после окончания комплексной иммуномодулирующей терапии (Ферровир + Генферон) в VI группе (CIN I) на 23,75% (в 3 раза) увеличилось количество пациенток с ККИ 0-3 балла (табл. 3.18, рис. 3.74-3.75). В VII группе (топическое применение препарата «Ронколейкин» при CIN I) ККИ 0-3 балла вырос на 53,75% (в 6 раз). В течение годичного мониторинга показатели клинско-кольпоскопического индекса в 0-3 балла в VI группе составили (среднее увеличение за год - 222%): 22,5% (6 месяцев) и 17,5% (12 месяцев), т.е. имело место возвращение клинической симптоматики CIN, отраженное в увеличении ККИ.

		до лечения		1 месяц		6 месяцев		12 месяцев	
VI группа (n=80)		п	%	п	%	п	%	п	%
	0-3 балла	9	11,25	27	35	18	22,5	14	17,5
	4-5 баллов	67	83,75	53	65	61	56,25	64	80
	6-7 баллов	4	5,0	0	0	1	1,25	2	2,5
VII группа (n=80)	0-3 балла	8	10,0	51	63,75	53	66,25	50	62,5
	4-5 баллов	66	82,5	29	36,25	27	33,75	30	37,5
	6-7 баллов	6	7,5	0	0	0	0	0	0

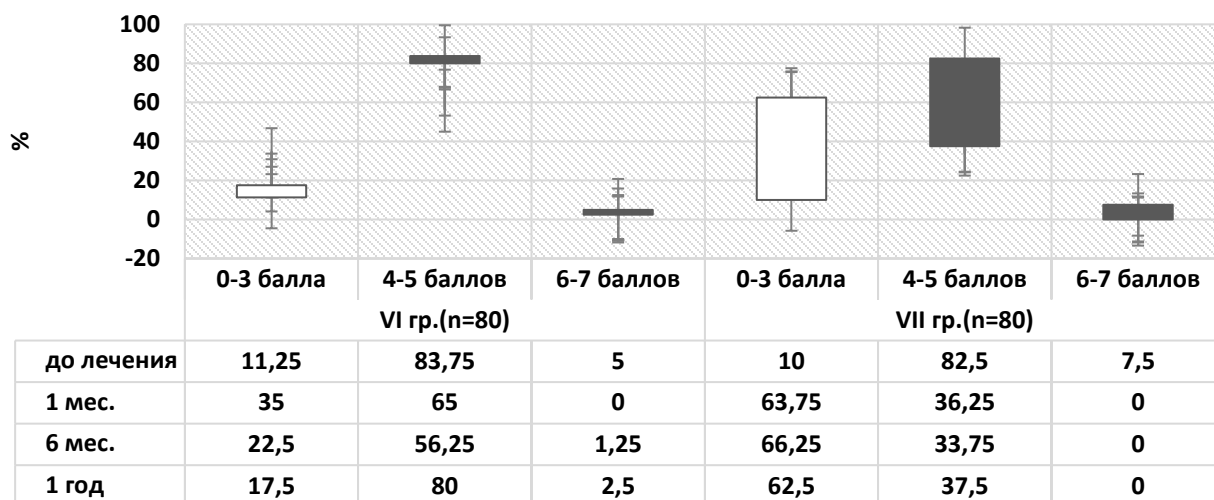


Рисунок 3.74. ККИ в процессе лечения (CIN I)

В VII группе на данных сроках ККИ в 0-3 балла зафиксирован у 66,25 и 62,5% (6 и 12 месяцев соответственно), т.е. существенной динамики ККИ не отмечено (среднее увеличение за год составило 642%).

Таким образом, по результатам оценки сравнительной эффективности лечения с использованием клинико-кольпоскопического индекса выявлена более высокая эффективность цитокинотерапии («Ронколейкин») (в среднем в 2,3 раза).

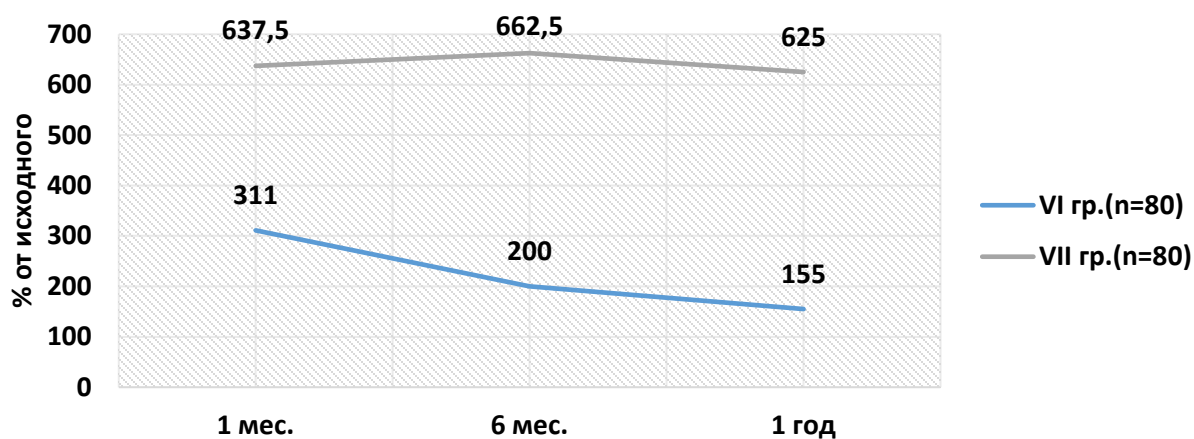


Рисунок 3.75. Динамика ККИ у пациенток с CIN I (0-3 балла)

Учитывая, что при оценке ККИ существуют неизменные критерии (возраст, курение), по нашему мнению, более объективной будет динамическая оценка эффективности проводимой терапии с помощью кольпоскопического

индекса Рейда, в котором отсутствуют анамнестические критерии. Через месяц после окончания лечения в VI группе (CIN I) увеличилось количество пациенток с КИР 0-2 балла на 21,25% (в 1,6 раза) (табл. 3.19, рис. 3.76-3.77). В VII группе КИР 0-2 балла вырос на 57,5% (в 2,6 раз). В течение годичного мониторинга показатели кольпоскопического индекса Рейда в 0-3 балла в VI группе составили: 38,75% (6 месяцев) и 36,25% (12 месяцев) (годовая медиана составила 132%). В VII группе на данных сроках КИР в 0-2 балла определялся у 90,0 и 93,75% пациенток (6 и 12 месяцев соответственно) (годовая медиана составила 263%).

Таблица №3.19. Динамика КИР CIN I в исследуемых группах

		до лечения		1 месяц		6 месяцев		12 месяцев	
VI группа (n=80)		п	%	п	%	п	%	п	%
	0-2 балла	26	32,5	43	53,75	31	38,75	29	36,25
	3-4 балла	54	67,5	37	46,25	49	61,25	51	63,75
	5-8 баллов	0	0	0	0	0	0	0	0
VII группа (n=80)	0-2 балла	28	35,0	74	92,5	72	90,0	75	93,75
	3-4 балла	52	65,0	6	7,5	8	10,0	5	6,25
	5-8 баллов	0	0	0	0	0	0	0	0

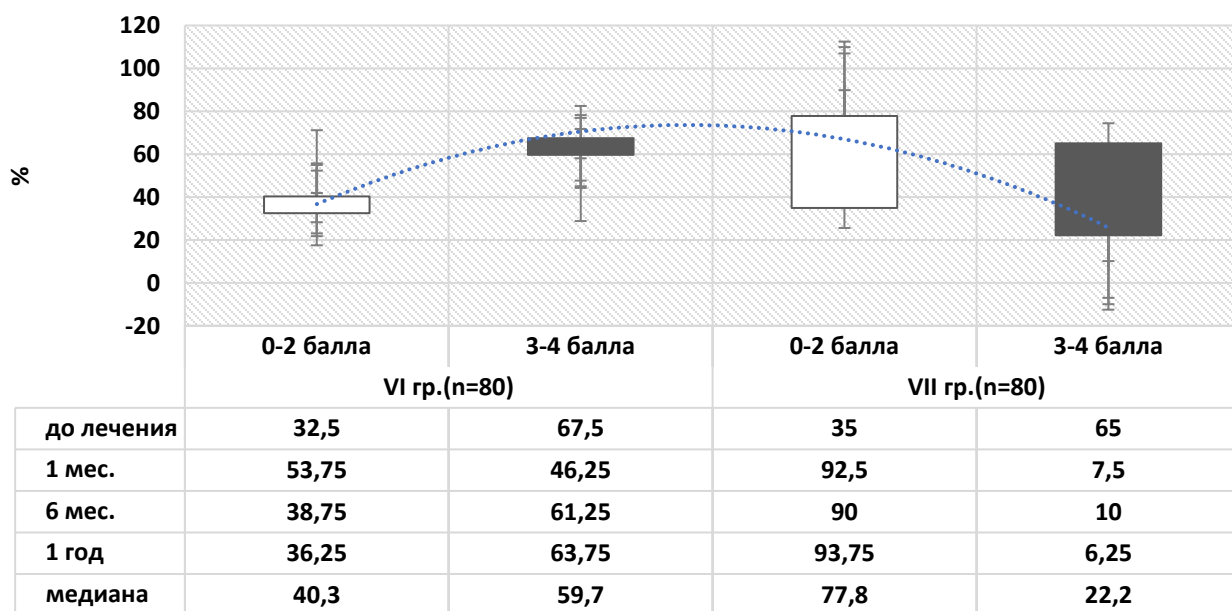


Рисунок 3.76. КИР в процессе лечения (CIN I)

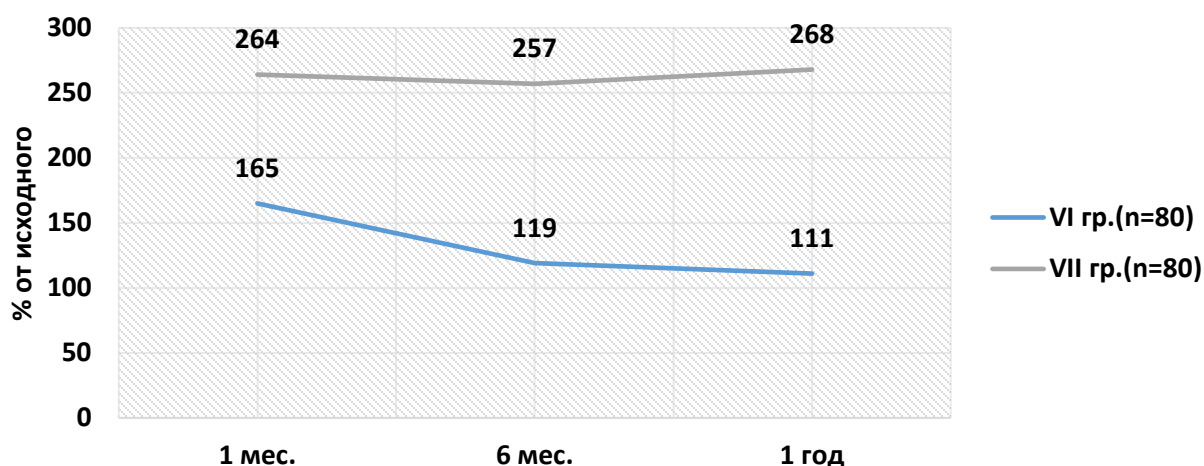


Рисунок 3.77. Динамика КИР у пациенток с CIN I (0-2 балла)

Оценка динамики кольпоскопических индексов (ККИ и КИР) в группах у больных со средней степенью цервикального интраэпителиального поражения (CIN II) – VIII и IX группы (по 65 пациенток) показала, что через 1 месяц от начала проведения противовирусной и иммуномодулирующей терапии (Ферровир + Генферон) в комплексе с деструктивной радиоволновой терапией аппаратом «Сургитрон» у женщин VIII группы ККИ 0-3 балла зарегистрирован у 72,3% больных (увеличился на 66,15% - в 11,7 раз), при этом ККИ свыше 5 баллов в это время не был высчитан ни у одной женщины (табл. 3.20, рис 3.78-3.79).

Таблица №3.20. Динамика ККИ CIN II в исследуемых группах

		до лечения		1 месяц		6 месяцев		12 месяцев	
VIII группа (n=65)		п	%	п	%	п	%	п	%
	0-3 балла	4	6,15	47	72,3	31	47,7	28	43,05
	4-5 баллов	42	64,6	18	27,7	30	46,15	33	50,8
	6-7 баллов	19	29,2	0	0	4	6,15	4	6,15
IX группа (n=65)	0-3 балла	3	4,6	53	81,5	56	86,15	54	83,1
	4-5 баллов	41	63,1	12	18,5	8	12,35	9	13,8
	6-7 баллов	21	32,3	0	0	1	1,5	2	3,1

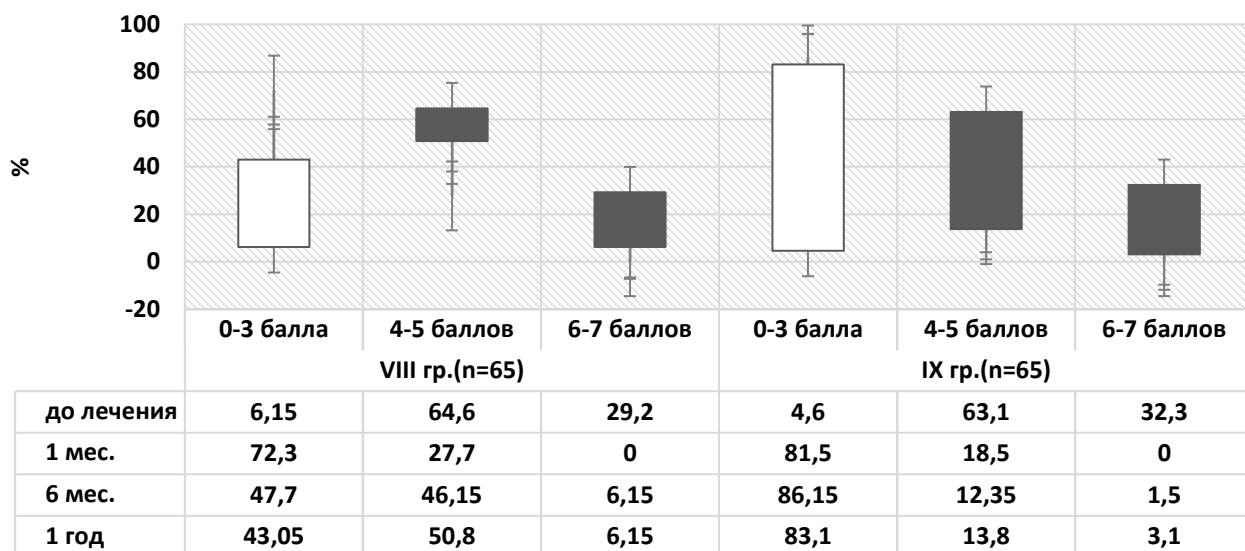


Рисунок 3.78. ККИ в процессе лечения (CIN II)

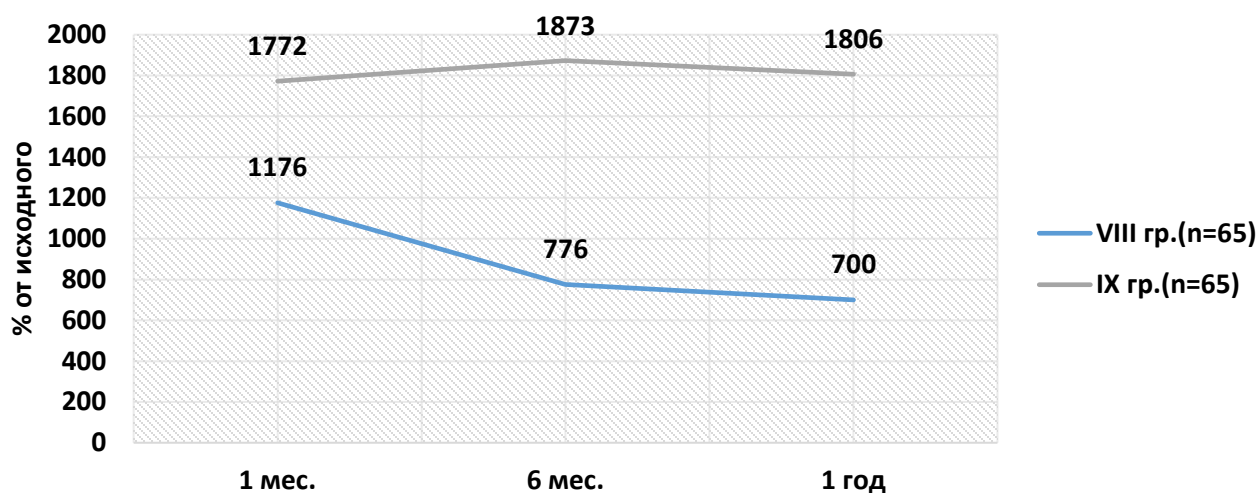


Рисунок 3.79. Динамика ККИ у пациенток с CIN II (0-3 балла)

У остальных женщин выявлены вновь появившиеся изменения эпителия экзо- и эндоцервикса, характерные для ВПЧ-инфекции. В IX группе (топическое применение препарата «Ронколейкин» с деструктивной радиоволновой аблацией при CIN II) ККИ 0-3 балла вырос до 81,5% (на 76,9% - в 17,7 раз). В течение года показатели ККИ в 0-3 балла в VIII группе составили (среднее увеличение за год - 884%): 47,7% (6 месяцев) и 43,05% (12 месяцев), т.е. имело место увеличение ККИ при годичном мониторинге, а значит и возвращение клинической симптоматики цервикальной неоплазии. В IX группе на данных сроках ККИ в 0-3 балла зафиксирован у 86,15 и 63,1% (6 и 12 месяцев соответственно), т.е. ККИ

практически не изменился при наблюдении в течение года (медиана за год составила 1817%).

Кольпоскопический индекс Рейда 0-2 балла через месяц после окончания лечения в VIII группе (CIN II) увеличился до 43,1% (учитывая, что до лечения КИР 0-2 балла имела лишь одна пациентка с цитогистологически подтвержденным CIN II) (табл. 3.21, рис. 3.80-3.81). В IX группе КИР 0-2 балла до лечения не наблюдался ни у одной больной, через месяц после окончания терапии таких пациенток стало большинство – 60,0%.

Таблица №3.21. Динамика КИР CIN II в исследуемых группах

		до лечения		1 месяц		6 месяцев		12 месяцев	
		п	%	п	%	п	%	п	%
VIII группа (n=65)	0-2 балла	1	1,5	28	43,1	21	32,3	19	29,2
	3-4 балла	51	78,1	34	52,3	39	60,0	38	58,5
	5-8 баллов	13	20,4	3	4,6	5	7,7	8	12,3
IX группа (n=65)	0-2 балла	0	0	39	60,0	43	66,2	36	55,4
	3-4 балла	53	81,5	25	38,5	19	29,2	26	40,0
	5-8 баллов	12	18,5	1	1,5	3	4,6	3	4,6

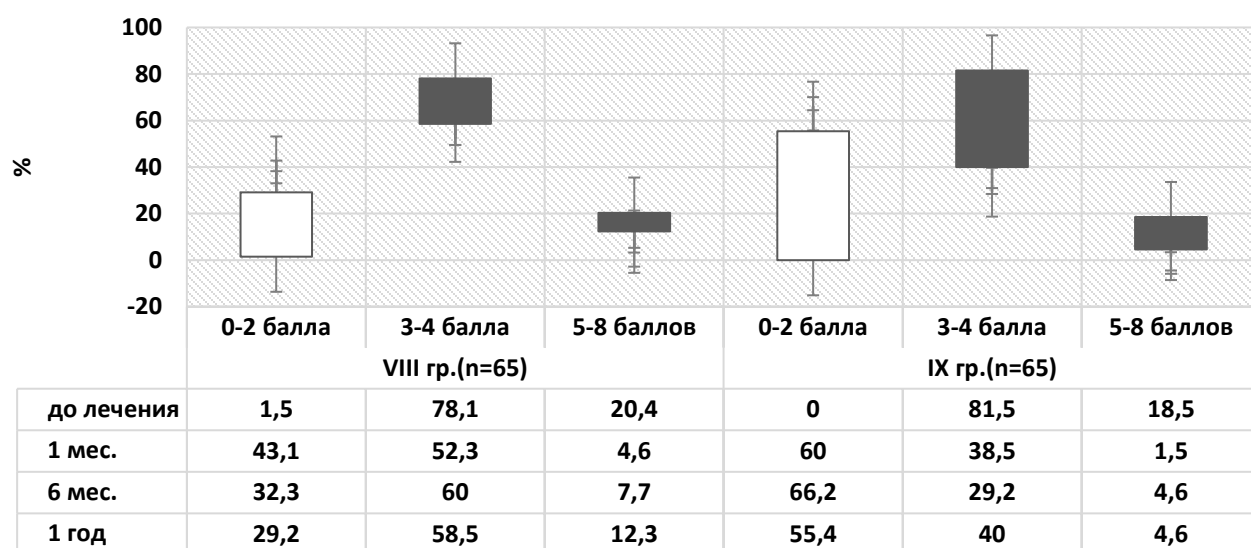


Рисунок 3.80. КИР в процессе лечения (CIN II)

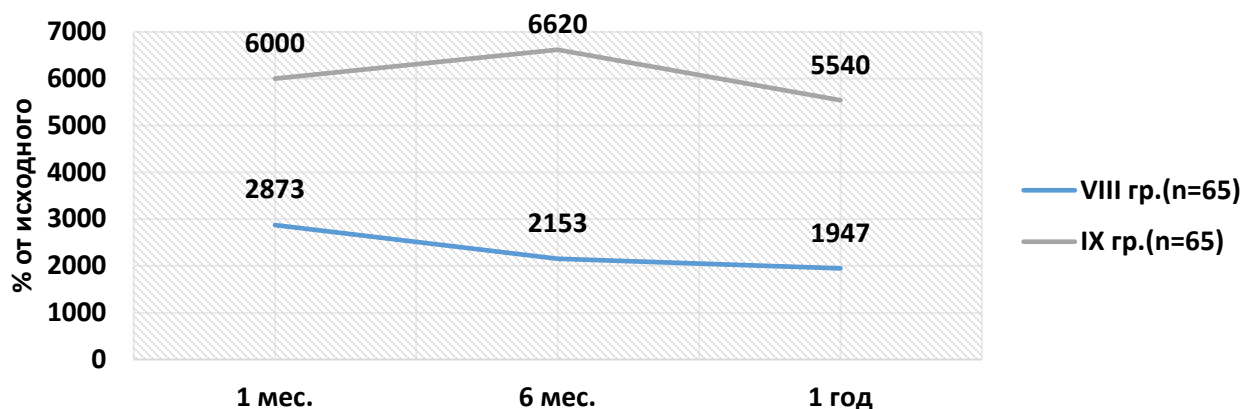


Рисунок 3.81. Динамика КИР у пациенток с CIN II (0-2 балла)

В течение годичного мониторинга показатели КИР в 0-3 балла в VIII группе уменьшились составили: 32,3% (6 месяцев) и 29,2% (12 месяцев) (годовая медиана составила 2324%). В IX группе на данных сроках КИР в 0-2 балла определялся у 66,2 и 55,4% больных (6 и 12 месяцев соответственно) (годовая медиана - 6053%).

Таким образом, цитокольпоскопическая оценка лечения с использованием двух индексов (клинико-кольпоскопического и кольпоскопического Рейда) показало более высокую эффективность предлагаемой топической иммуномодулирующей терапии препаратом рекомбинантного IL-2 («Ронколейкин»), как в виде монотерапии (при цервикальных интраэпителиальных неоплазиях легкой степени) (в среднем в 1,8 раза), так и совместно с радиоволновой аблацией (при цервикальных интраэпителиальных неоплазиях средней степени) (в среднем в 2,6 раза).

3.5.3. Сравнительная эффективность терапии пациенток с ВПЧ-ассоциированными цервикальными интраэпителиальными неоплазиями легкой и средней степени (ПЦР ВПЧ, вирусная нагрузка)

Пациенткам исследуемых групп с CIN I-II (n=290) через 6 и 12 месяцев после окончания терапии было проведено молекулярно-генетическое исследование эпителиальных клеток цервикального канала, методом качественной полимеразной цепной реакции с определением типа ВПЧ,

клинически значимой вирусной нагрузки (количество копий генетического материала вирусного патогена в анализируемом объеме).

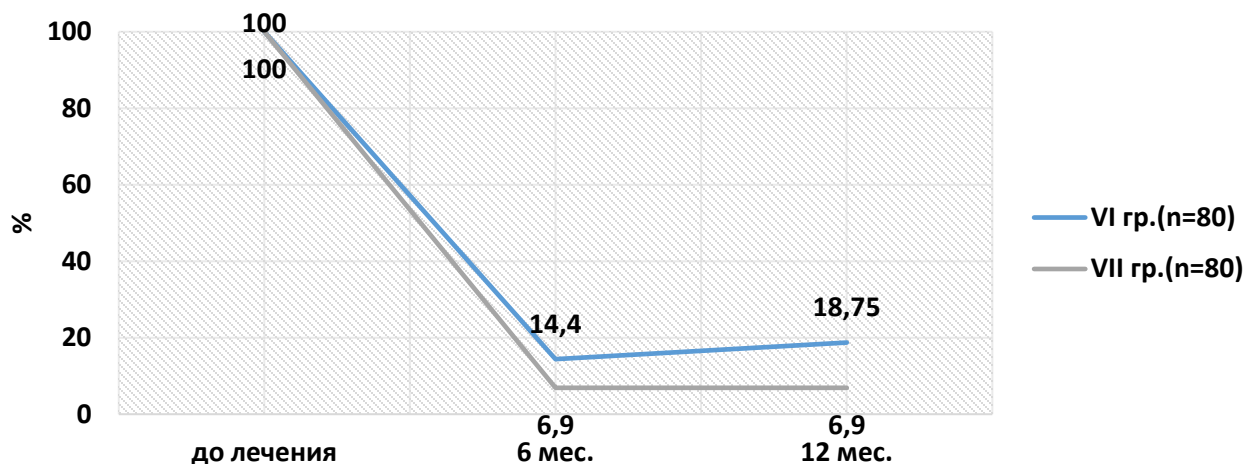


Рисунок 3.82 Динамика ПЦР HPV в исследуемых группах (CIN I)

Через полгода после окончания комплексной иммуномодулирующей и противовирусной терапии (Ферровир + Генферон) в VI группе (CIN I) ПЦР-негативация ДНК ВПЧ обнаружена у 85,6% пациенток, через год – у 81,25% (рис. 3.78). В VII группе (топическое применение препарата «Ронколейкин» при CIN I) на данных сроках ПЦР-негативация выявлена у 93,1% (6-12 месяцев). Таким образом, в группе пациенток с CIN I, которым проводилась топическая иммуномодулирующая терапия препаратом «Ронколейкин» количество ВПЧ-негативных больных было в среднем на 9,7% больше, чем при применении комплексной терапии (Ферровир + Генферон).

Также был проведен анализ динамики выявления различных по канцерогенности типов вируса папилломы человека при цервикальном интраэпителиальном поражении легкой и средней степени тяжести (CIN I). Учитывая, что у пациенток исследуемых групп не выявлено «чистых» низкоонкогенных штаммов ВПЧ, мониторинг проводился по высокоонкогенным типам или их сочетанию друг с другом и низкоонкогенными типами папилломавирусов (табл. 3.22; рис. 3.83-3.84).

Таблица 3.22. Динамика встречаемости различных типов ВПЧ в процессе мониторинга (CIN I-II)

		до лечения		6 месяцев		12 месяцев	
VI гр. (n=80)	ВПЧ	n	%	n	%	n	%
	Высокий онкориск	46	57,5	14	17,5	17	21,25
VII гр. (n=80)	Сочетание типов ВПЧ	34	42,5	9	11,25	13	16,25
	Высокий онкориск	44	55,0	5	6,25	3	3,75
VIII гр. (n=65)	Сочетание типов ВПЧ	36	45,0	7	8,75	8	10
	Высокий онкориск	41	63,1	12	18,4	15	23,1
IX гр. (n=65)	Сочетание типов ВПЧ	24	36,9	10	15,4	11	16,9
	Высокий онкориск	38	58,5	3	4,6	2	3,1
	Сочетание типов ВПЧ	27	41,5	2	3,1	5	7,7

В VI группе (CIN I; Ферровир + Генферон) в течение годового мониторинга динамика нивелирования ВПЧ высокого канцерогенного риска была не столь значительна (при наличии «чистых» высокоонкогенных типов до лечения в 57,5% - к 6 месяцам их было 17,5%, а к 12 месяцам – 21,25%). Сочетание различных типов ВПЧ в данной группе до начала терапии составляло 42,5%, через 6 месяцев после проведенной терапии оно уменьшилось до 11,25%, а через 12 месяцев незначительно возросло (на 5,0%). Причем наименьшую динамику можно увидеть в оценке более редко встречающихся типов ВПЧ – 13 и 51 типе (медиана снижения для них составила $15,6 \pm 2,3$ и $11,9 \pm 1,15\%$ соответственно) ($p < 0,05$) (рис. 3.82).

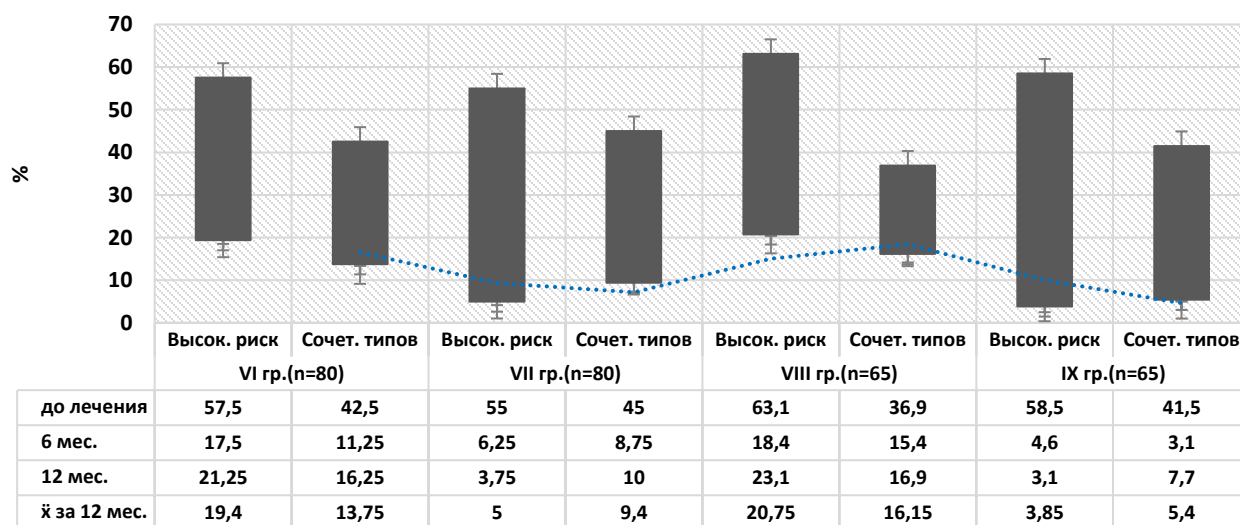


Рисунок 3.83. Динамика типов ВПЧ в исследуемых группах (CIN I-II)

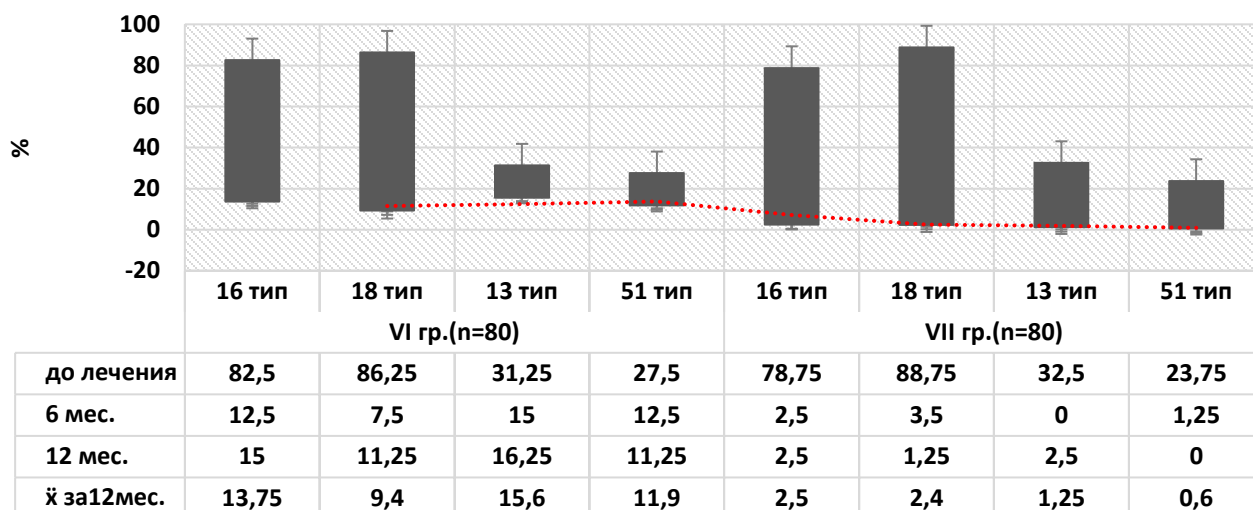


Рисунок 3.84. Динамика высокоонкогенных типов ВПЧ в группах (CIN I)

В VII группе (CIN I; Ронколейкин) через 6 месяцев количество «чистых» высокоонкогенных типов ВПЧ снизилось до 6,25% (исходный уровень 55,0%), а через год составило 3,75%. Сочетание различных типов ВПЧ в VII группе до начала лечения было 45,0%, через 6 месяцев уменьшилось до 8,75%, через 12 месяцев увеличилось на 1,25% (до 10,0%).

При оценке ПЦР-негативации ВПЧ у больных со средней степенью цервикального интраэпителиального поражения (CIN II) – VIII и IX группы выявлено, что у пациенток, получавших помимо современной деструктивной (радиоволновой) терапии предложенную иммуномодуляцию Ронколейкином (IX группа) через 6 месяцев от окончания лечения количество высококанцерогенных типов ВПЧ составило 4,6%, т.е. снизилось на 53,9%. Через 12 месяцев мониторинга количество ВПЧ данного типа даже еще понизилось на 1,5%. Сочетание нескольких типов ВПЧ во данной группе до начала терапии было 41,5%, через 6 и 12 месяцев после лечения – 3,1 и 7,7% соответственно (табл. 3.22, рис. 3.83). В VIII группе (CIN II; Ферровир + Генферон) в течение годового мониторинга также выявлена динамика нивелирования ВПЧ высокого канцерогенного риска с 63,1% до 44,6 и 46,1% через 6 и 12 месяцев (т.е. в 1,4

раза). Уменьшение сочетания нескольких типов вируса составило в процессе годичного наблюдения – 1,2 раза (с 36,9% до 29,2 и 32,3% в 6 и 12 месяцев).

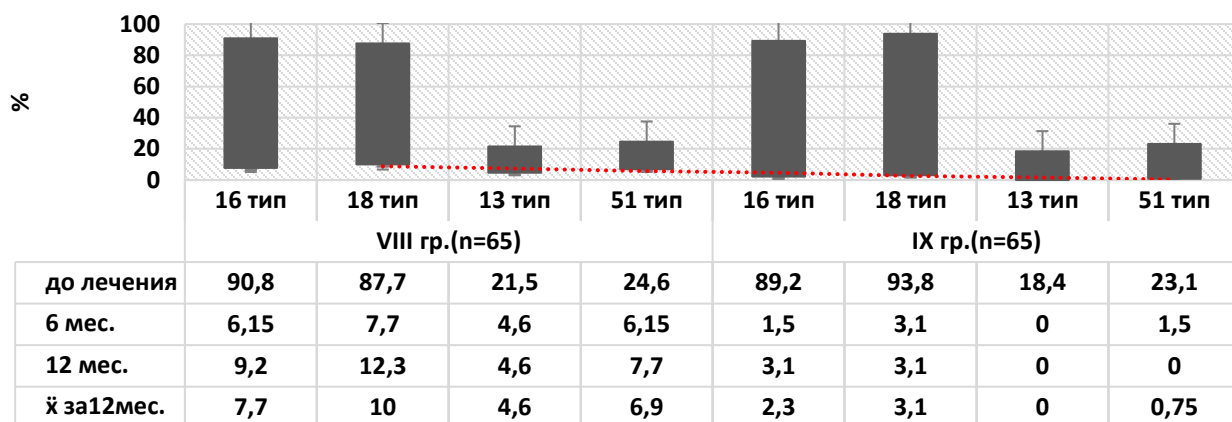


Рисунок 3.85. Динамика высокоонкогенных типов ВПЧ в группах (CIN II)

Результаты исследования вирусной нагрузки в наших группах выявили, что высокая ($>5 \text{ Lg}$) и значимая ($>3 \text{ Lg}$) нагрузки в среднем наблюдаются у $93,1 \pm 2,25\%$ больных с CIN I (группы VI и VII соответственно) ($p < 0,05$). После комплексного лечения (Ферровир + Генферон) пациентов VI группы в течение годичного мониторинга зарегистрировано уменьшение повышенной и значимой вирусной нагрузки до 12,5% (6 месяцев) и некоторое увеличение до 17,5% в 12 месяцев (медиана увеличения составила $13,5 \pm 2,0\%$) (табл. 3.23; рис. 3.86-3.88).

Таблица 3.23. Распределение вирусной нагрузки в группах (CIN I-II)

		Средний логарифм вирусной нагрузки ($\text{Lg ДНК ВПЧ}/10^5$ клеток)					
		до лечения		6 месяцев		12 месяцев	
VI гр. (n=80)		п	%	п	%	п	%
	$>5 \text{ Lg}$	45	56,25	6	7,5	8	10,0
	$>3 \text{ Lg}$	29	36,25	4	5,0	6	7,5
	$<3 \text{ Lg}$	6	7,5	13	16,25	16	20,0
VII гр. (n=80)	$>5 \text{ Lg}$	48	60,0	0	0	1	1,25
	$>3 \text{ Lg}$	27	33,75	2	2,5	3	3,75
	$<3 \text{ Lg}$	5	6,25	10	12,5	9	11,25
VIII гр. (n=65)	$>5 \text{ Lg}$	48	73,8	5	7,7	7	10,8
	$>3 \text{ Lg}$	16	24,6	6	9,2	9	13,8
	$<3 \text{ Lg}$	1	1,5	11	16,9	11	16,9
IX гр. (n=65)	$>5 \text{ Lg}$	52	80,0	0	0	1	1,5
	$>3 \text{ Lg}$	13	20,0	1	1,5	1	1,5
	$<3 \text{ Lg}$	0	0	4	6,15	5	7,7

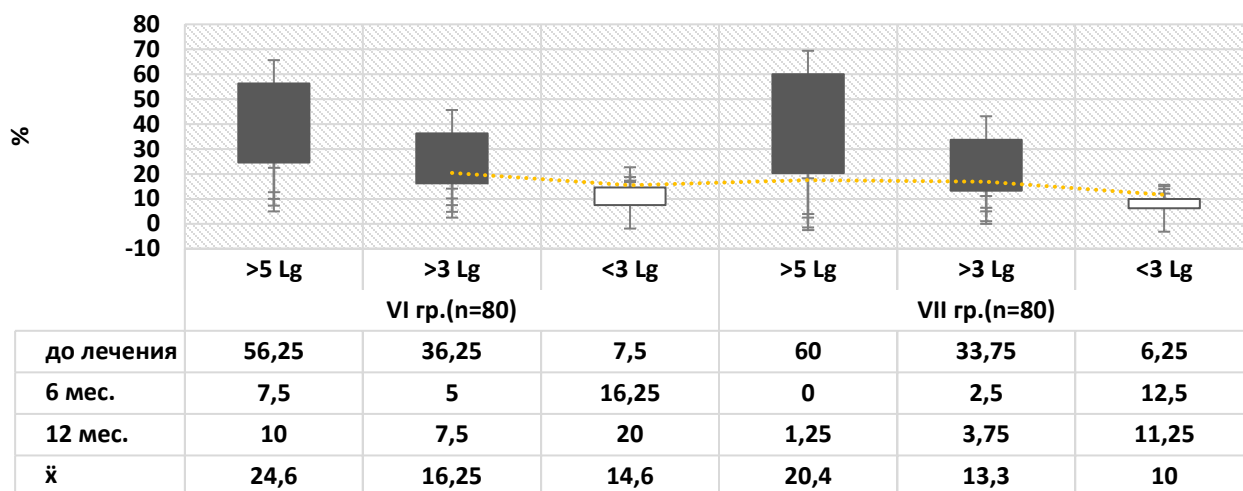


Рисунок 3.86. Вирусная нагрузка в исследуемых группах (CIN I)

В группе с топическим применением препарата «Ронколейкин» (VII; CIN I) отмечено еще более выраженное снижение пациенток с повышенной и значимой вирусной нагрузкой: до 2,5% на 6 месяце наблюдения и до 5,0% на 12 месяце (медиана $3,75 \pm 1,25\%$) (т.е. в VII группе уменьшение вирусной нагрузки регистрировалось в среднем в 3,6 раза чаще, чем в VI). В группах с CIN II (VIII и IX соответственно) повышенная (>5 Lg) и значимая (>3 Lg) вирусная нагрузка отмечена, практически, у всех пациенток (в среднем $99,0 \pm 0,5\%$) ($p < 0,05$).

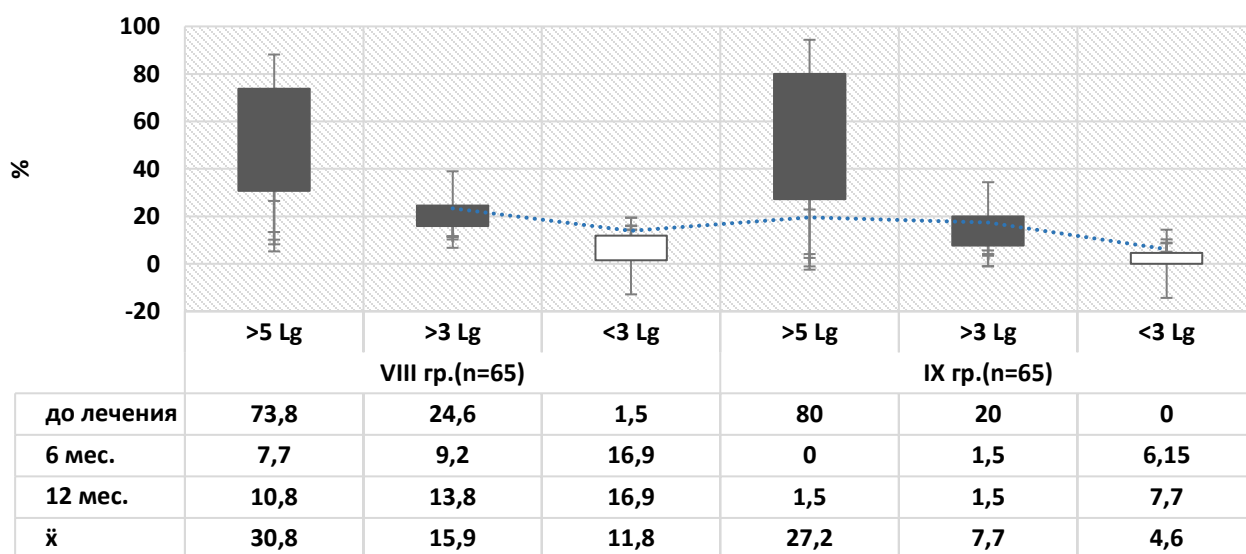


Рисунок 3.87. Вирусная нагрузка в исследуемых группах (CIN II)

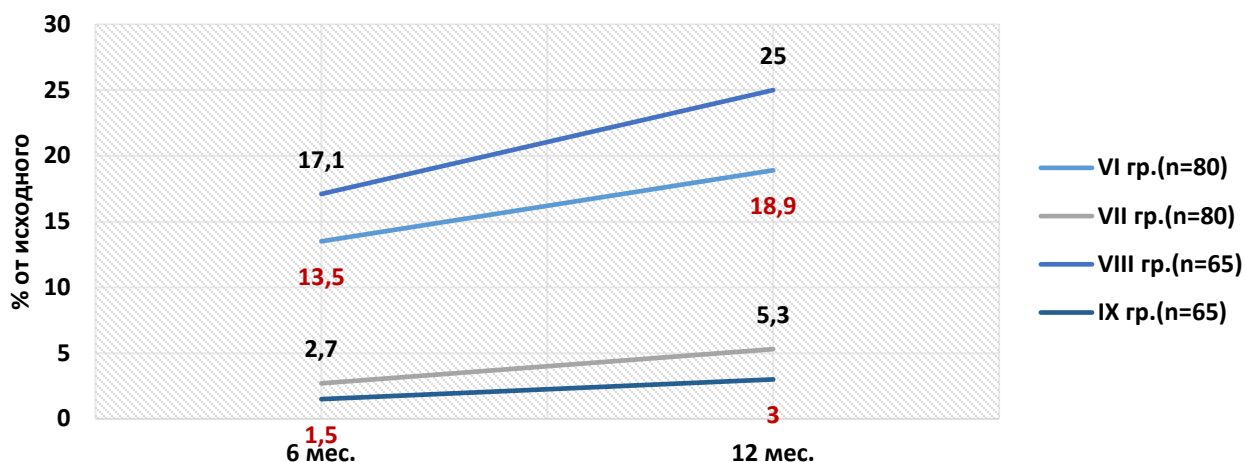


Рисунок 3.88. Динамика средней вирусной нагрузки в группах (CIN I-II)

После лечения в VIII группе в течение годичного мониторинга зарегистрировано уменьшение повышенной и значимой вирусной нагрузки до 16,9% (6 месяцев) и увеличением до 24,6% к 12 месяцам (медиана возрастания составила $20,75 \pm 4,3\%$) (табл. 3.23; рис. 3.87-3.88). В эти сроки в IX группе повышенной вирусной нагрузки после полугодового мониторингирования не наблюдалось, количество пациенток со значимой вирусной нагрузкой снизилось до 1,5% (6 и 12 месяцев) (медиана – $2,5 \pm 0,25\%$) (в IX группе уменьшение вирусной нагрузки регистрировалось в среднем в 8,3 раза чаще, чем в VIII).

Таким образом, оценка сравнительной эффективности лечения цервикальных интраэпителиальных неоплазий легкой и средней степени по ПЦР-негативации вируса папилломы человека в эпителиальных клетках цервикального канала и динамике вирусной нагрузки выявило для CIN I в среднем в 2,5 раза большую (по критериям как ПЦР-негативации ВПЧ, так и уменьшения вирусной нагрузки) эффективность топической иммуномодулирующей терапии препаратом рекомбинантного IL-2 («Ронколейкин»). Для CIN II эффективность Ронколейкина в комплексе с радиоволновой деструкцией очагов поражения была в 1,3 раза (по критериям ПЦР-негативации ВПЧ) и в 8,3 раза выше (по критериям уменьшения вирусной нагрузки).

3.5.4. Сравнительная эффективность терапии пациенток с ВПЧ-ассоциированными цервикальными интраэпителиальными неоплазиями легкой и средней степени (онкобелок E7, p16INK4A, Ki-67, 2-ONE1/16 α -ONE1)

Изучение наличия онкобелка E7 у больных с цервикальными интраэпителиальными неоплазиями весьма актуально ввиду того, что интеграция ДНК ВПЧ в геном клеток сопровождается нарушением структуры гена E2, который является репрессором E7. При этом его синтез прекращается и активируется синтез белка E7. Таким образом, онкобелок E7 является маркером неопластических процессов в шейке матки. При этом измерение уровня онкобелка E7 позволяет уточнить характер вирусной инфекции, а также возможность злокачественной трансформации при интегрированной форме ВПЧ. Детекция мРНК вирусного онкогена E7 методом ПЦР у 16, 18 и 31 типа вируса папилломы человека, с использованием соответствующих комплектов реагентов НПО «ДНК-технология» (Москва). Исследование в наших группах проведено у пациенток с идентифицированными в ходе исследования вирусами типов 16, 18 и 31 отдельно и в сочетании (CIN I-II). ПЦР-обнаружение онкобелка E7 в динамике выявило следующую картину в группах больных CIN I (VI-VII): детекция E7 в VI группе (CIN I; Ферровир + Генферон) при данных типах ВПЧ выявила чрез 1 месяц после окончания терапии детекция E7 снизилась в среднем на 20,85%, в последующем она имела некоторую тенденцию к увеличению (на 4,2% через 6 месяцев от окончания терапии и еще на 6,6% - через 1 год). То есть клиническая годовая эффективность в VI группе составила $13,2 \pm 3,1\%$ ($p < 0,05$) (рис. 3.87-3.88). В VII группе (CIN I; Ронколейкин) через 1 месяц после окончания терапии среднее количество ПЦР детектируемого онкобелка E7 уменьшилось на 30,85%, а при годовом мониторинге данный показатель остался практически неизменным (клиническая годовая эффективность составила $31,25 \pm 1,5\%$, т.е. в 2,4 раза больше, чем в VI группе) ($p < 0,05$).

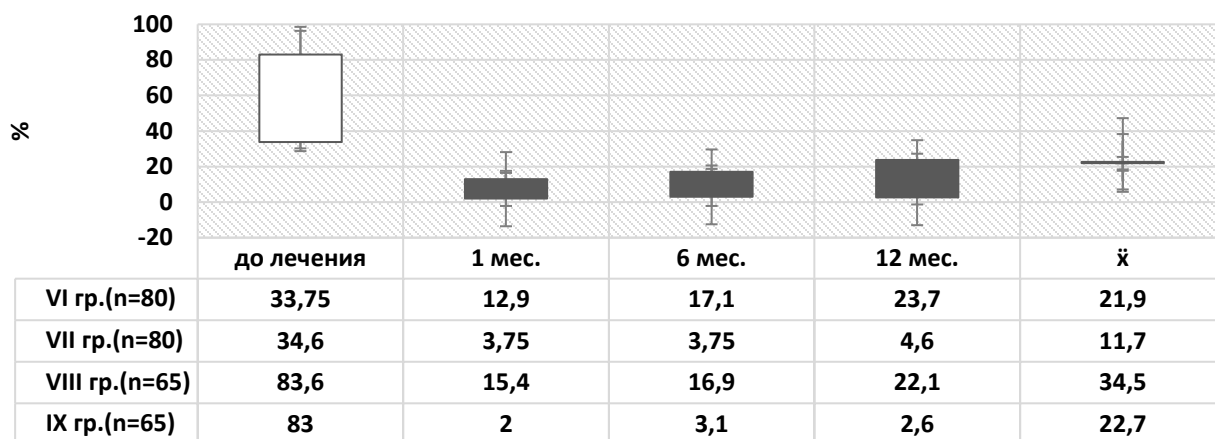


Рисунок 3.89. Динамика мРНК онкобелка E7 в группах (CIN I-II)

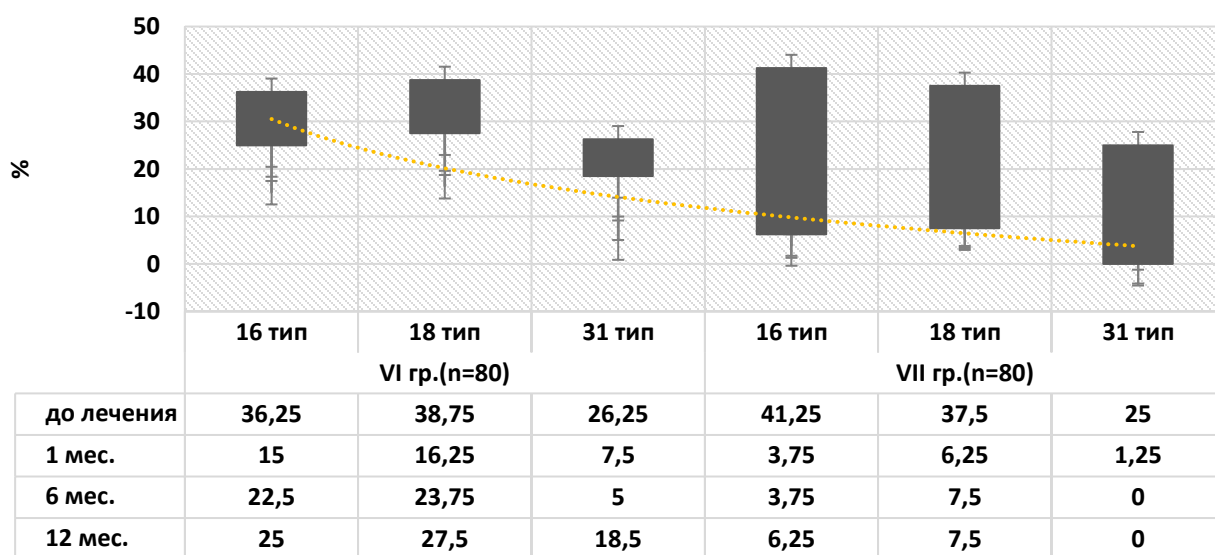


Рисунок 3.90. Динамика мРНК онкобелка E7 16, 18 и 31 типов ВПЧ в исследуемых группах (CIN I)

Онкобелок E7 в группах больных CIN II (VIII-IX) до начала терапии выявлялся в среднем в $83,4 \pm 0,2\%$: при данных типах ВПЧ выявила чрез 1 месяц после окончания терапии в VIII группе (CIN II; Ферровир + Генферон + радиоволновая абляция) зафиксировано уменьшение E7 в среднем на $68,2\%$, в последующем содержание онкобелка E7 составило: $16,9\%$ через 6 месяцев и $22,1\%$ - через 1 год). Клиническая годовая эффективность в VIII группе составила $61,5 \pm 4,2\%$ ($p < 0,05$) (рис. 3.89-3.92).

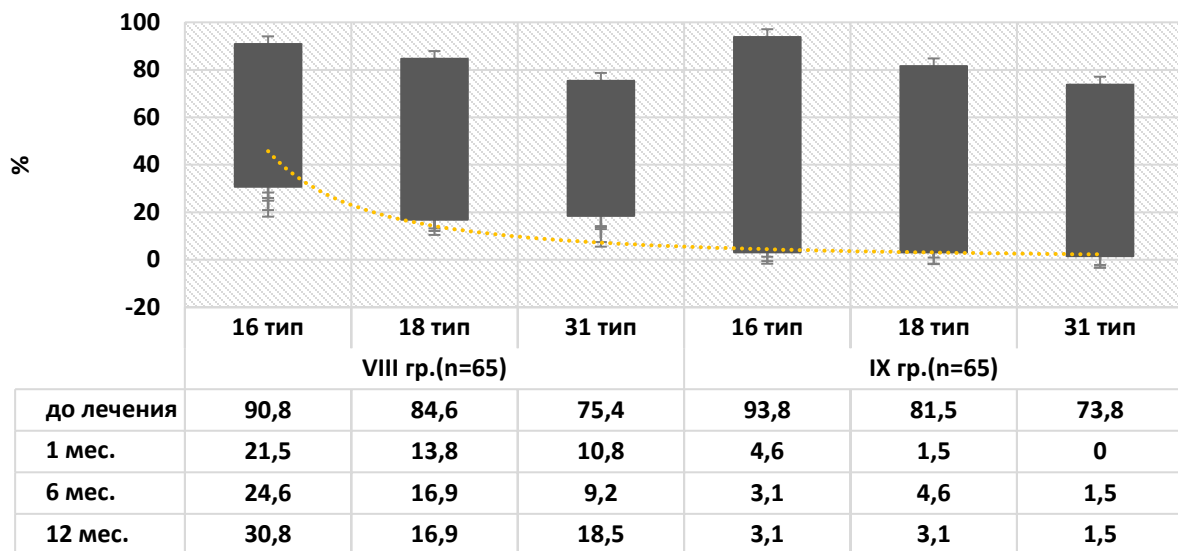


Рисунок 3.91. Динамика мРНК онкобелка E7 16, 18 и 31 типов ВПЧ в исследуемых группах (CIN II)

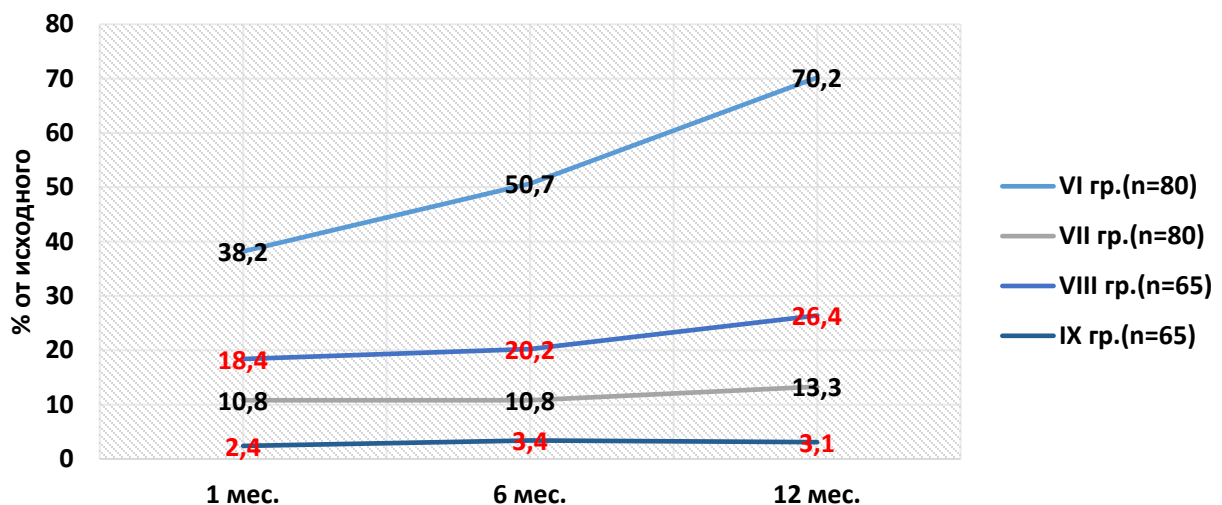


Рисунок 3.92. Средняя динамика мРНК онкобелка E7 в группах (CIN I-II)

В IX группе (CIN II; Ронколейкин + радиоволновая абляция) через 1 месяц после окончания терапии среднее количество ПЦР детектируемого онкобелка E7 уменьшилось на 81,0% (исходный 83,0%), а при годовом мониторинге данный показатель остался практически неизменным (клиническая годовая эффективность составила $80,4 \pm 1,8\%$, т.е. в 1,3 раза больше, чем в VIII группе) ($p < 0,05$).

В нашем исследовании также был проведен анализ динамики онкобелка E7

в сочетании с коэкспрессией биомаркеров p16ink4D и Ki-67 и низкого коэффициента 2-ONE1/16α-ONE1 (менее 1,5). Были обнаружены заметные отличия в исследуемых группах. Коэкспрессия биомаркеров p16ink4D и Ki-67 в VI группе уменьшилась в среднем в $2,2 \pm 0,25$ раза (с 13,75 до 6,25% - p16ink4D; с 11,25 до 5,0% - Ki-67), затем в течение годового мониторинга она несколько увеличилась (на 2,5% - p16ink4D и 3,75% - Ki-67) (рис. 3.93). В VII группе через 1 месяц после окончания лечения данные биомаркеры не были обнаружены ни у одной женщины, в течение годового мониторинга их количество уменьшилось в среднем в $11,0 \pm 1,0$ раз (с 15,0 до 1,25% - p16ink4D; с 12,5 до 1,25% - Ki-67). Коэффициент 2-ONE1/16α-ONE1 менее 1,5 VI группе в течение годового мониторинга тестировался в среднем в $26,7 \pm 5,2\%$ (уменьшился в среднем 2,7 раза), в VII группе на этих сроках он тестировался в среднем в $11,7 \pm 2,5\%$ случаев (уменьшился в среднем 5,7 раза) ($p=0,05$).

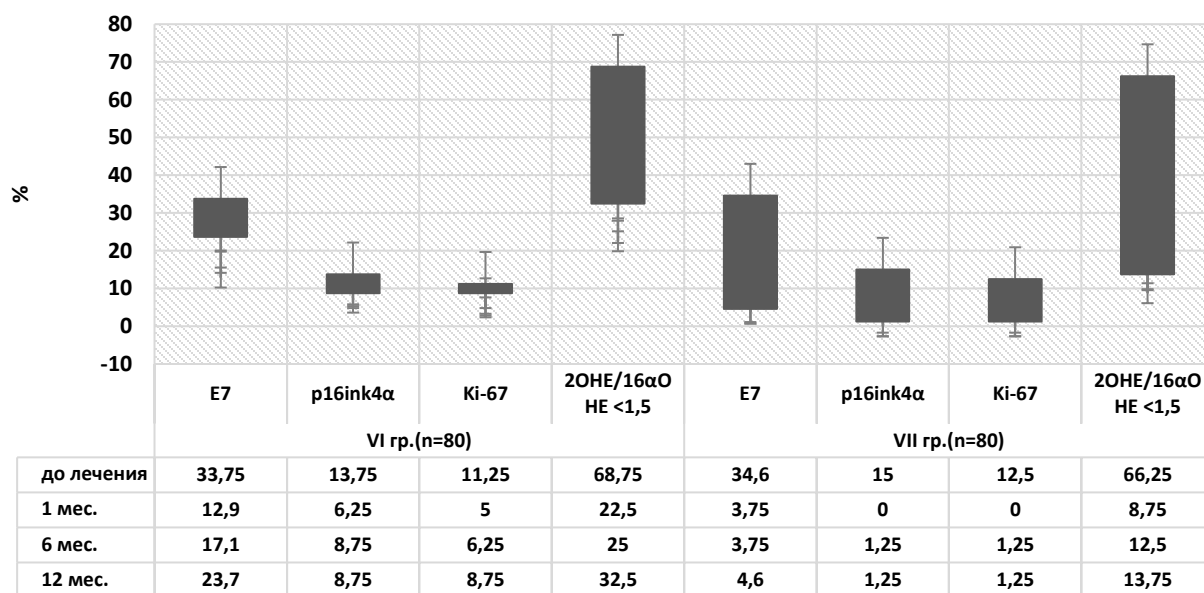


Рисунок 3.93. Динамика онкобелка E7, гиперэкспрессии p16ink4α, Ki67 и 2-ONE1/16α-ONE1 (менее 1,5) в исследуемых группах (CIN I)

У пациенток с CIN II динамика коэкспрессии биомаркеров p16ink4D и Ki-67 в ходе лечения была следующей. В VIII группе в 1 месяц наблюдения она уменьшилась в среднем в $19,2 \pm 8,5$ раза (с 47,7 до 4,6% - p16ink4D; с 43,1 до 1,5%

- Ki-67), затем в течение годового мониторинга она практически не изменилась (на 5,5% - p16ink4D и 3,2% - Ki-67) (рис. 3.94). В IX группе в течение годового мониторинга данные биомаркеры не были обнаружены ни у одной женщины. Коэффициент 2-OHE1/16 α -OHE1 менее 1,5 VIII группе в течение годового мониторинга определялся в среднем в 29,2 $\pm$ 3,15% (уменьшился в 2,4 раза), в IX группе на этих сроках он тестировался в среднем в 11,7 $\pm$ 3,2% случаев (уменьшился в среднем 7,1 раза) ($p < 0,05$).

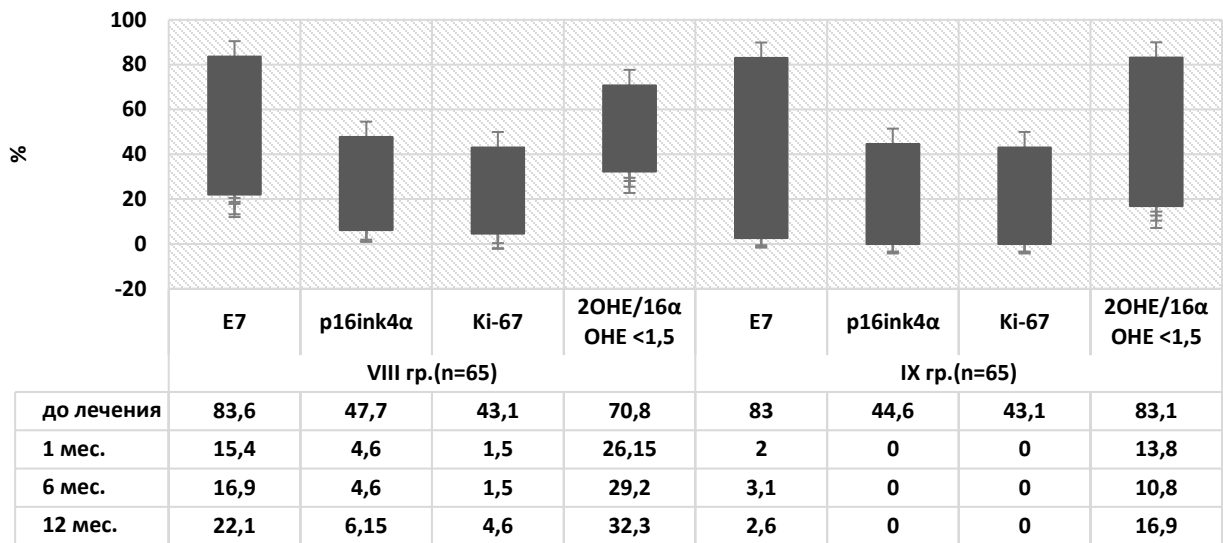


Рисунок 3.94. Динамика онкобелка E7, гиперэкспрессии p16ink4 α , Ki67 и 2-OHE1/16 α -OHE1 (менее 1,5) в исследуемых группах (CIN II)

Таким образом, изучение сравнительной эффективности лечения цервикальных интраэпителиальных неоплазий легкой и средней степени по динамике изменения онкобелка E7, гиперэкспрессии p16ink4 α , Ki67 и 2-OHE1/16 α -OHE1 выявило для CIN I в среднем в 3,2 раза большую эффективность цитокинотерапии препаратом rIL-2 («Ронколейкин»). Для CIN II эффективность Ронколейкина в комплексе с радиоволновой деструкцией очагов поражения была в среднем в 3,4 раза выше.

3.5.5. Изменения микробиоценоза на фоне терапии у пациенток с ВПЧ-ассоциированными цервикальными интраэпителиальными неоплазиями легкой и средней степени тяжести

Ранее говорилось, что у 79,6% больных с манифестацией папилломавирусной инфекции в виде цервикальной интраэпителиальной неоплазии легкой и у 80,8% средней степени была обнаружены те или иные нарушения вагинального микробиоценоза, которые являются одним из предрасполагающих, а также поддерживающих факторов для реализации патогенных особенностей папилломавирусной инфекции. В связи с этим, за 1 менструальный цикл до начала лечения CIN I-II проводилась комплексная индивидуализированная контаминационно-деконтаминационная терапия с последующим контролем излеченности, который проводился через 6 и 12 месяцев. При анализе результатов санации урогенитальной зоны у пациенток, включенных в исследование выявлено, что через 6 месяцев в VI группе (CIN I; Ферровир + Генферон) общая инфекционная нагрузка составила 13,75% от исходного уровня, причем у большинства женщин выявлены те же микроорганизмы, что и до лечения, через 12 месяцев в данной группе она составляла 17,5% от исходного уровня (медиана годовой инфекционной нагрузки составила 15,6) (рис. 3.95-3.96).

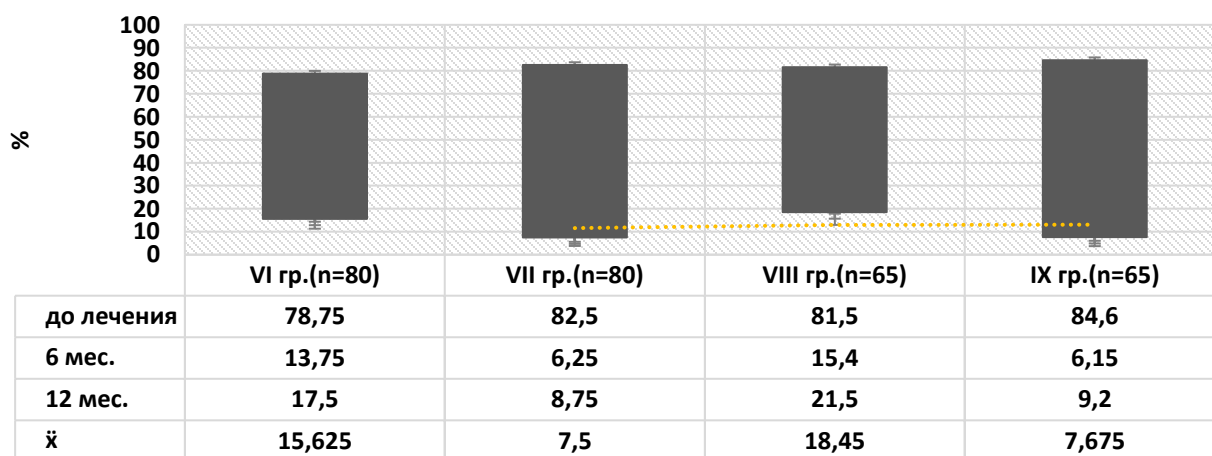


Рисунок 3.95. Динамика общей инфекционной нагрузки в группах (CIN I-II)

Частично, возможно, данный факт связан с реинфекцией, несмотря на обязательную санацию полового партнера и настойчивые рекомендации исследуемым пациентам пользоваться барьерными методами контрацепции (презервативы). Но, учитывая, что в VII группе (CIN I; Ронколейкин) результаты статистически достоверно отличались – через 6 месяцев общая инфекционная нагрузка составила 6,25% от исходного уровня, через 12 месяцев – 8,75% (медиана годовой нагрузки – 7,5), можно говорить о том, что комплексная терапия урогенитальной инфекции на фоне применения Ронколейкина, способствует более качественной санации не только папилломавирусной, но и других видов урогенитальной инфекции (в среднем в 2 раза). В группах с цервикальной неоплазией средней степени была зарегистрирована та же динамика инфекционной общей нагрузки: VIII группа (CIN II; Ферровир + Генферон) медиана годовой вирусной нагрузки – 22,65; IX группа (CIN II; Ронколейкин) – 9,1 (средняя разница эффективности составила 2,5 раза).

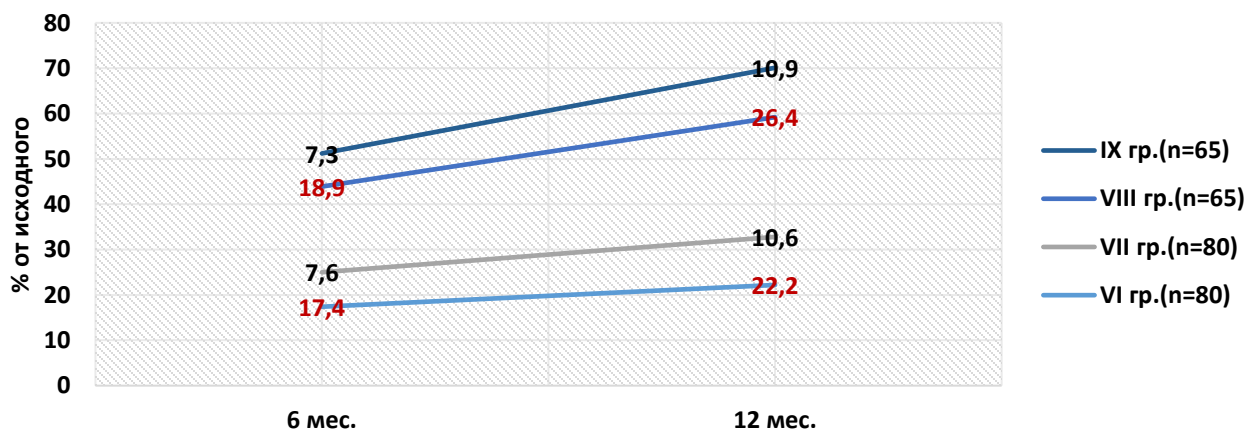


Рисунок 3.96. Средняя динамика инфекционной нагрузки в группах (CIN I-II)

Анализ вагинальных мазков на предмет значительной и массивной общей микробной обсемененности (ОМО) выявил следующие результаты (рис. 3.97-3.98). Значительная и массивная ОМО в VI группе в 6 и 12 месяцев составила 13,75 и 16,25% соответственно (годовая медиана – 23,55). В VII группе на данных сроках ОМО была стабильно 3,75% (годовая медиана 6,1) ($p > 0,01$).

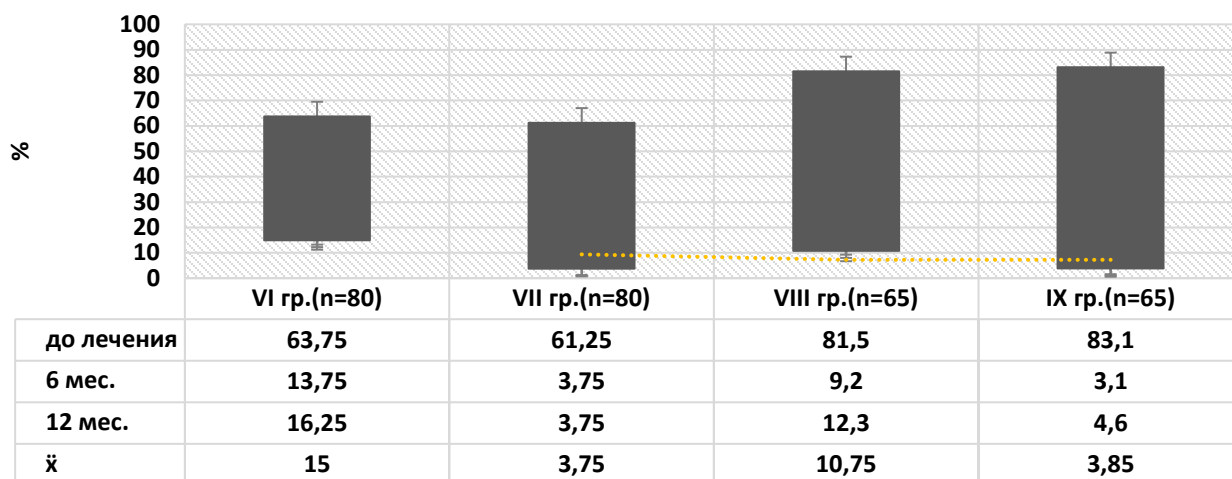


Рисунок 3.97. Динамика значительной и массивной ОМО в группах (CIN I-II)

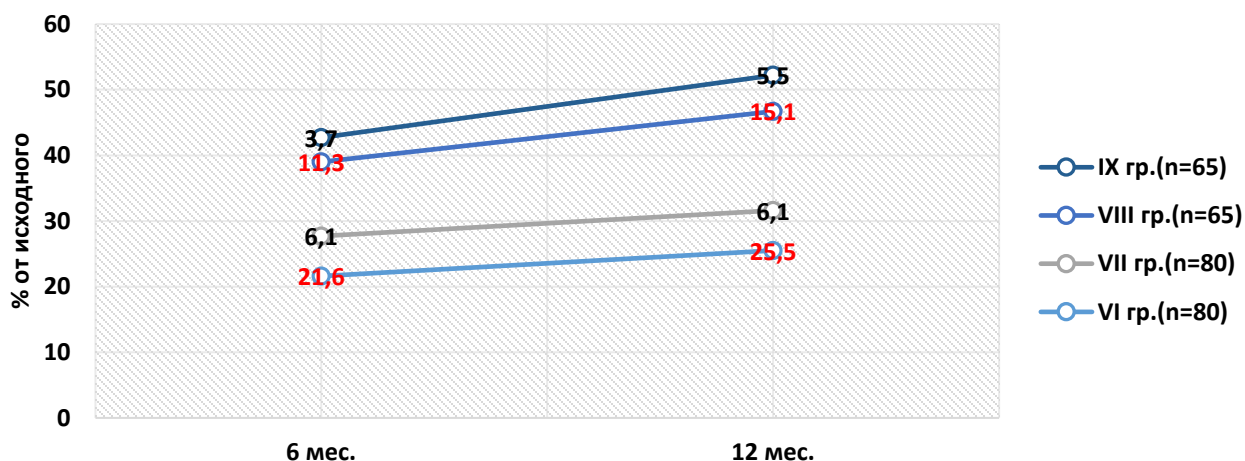


Рисунок 3.98. Средняя динамика значительной и массивной ОМО в группах (CIN I-II)

В VIII группе значительная и массивная микробная обсемененность в процессе наблюдения была 9,2% (6 месяцев) и 12,3% (12 месяцев) (годовая медиана составила 13,2). В IX группе эти цифры были 3,1 и 4,6% соответственно (годовая медиана – 4,6) ($p>0,05$).

Состояние вагинальной микрофлоры по унифицированной схеме Херлена через 6 и 12 месяцев мониторинга выявило количество мазков с определением «дисбиоз» в VI группе было 7,5 и 11,25% соответственно (в среднем $9,4\pm 2,25\%$), при этом в VII группе таких пациенток было в среднем $5,6\pm 1,5\%$ (т.е. в 1,7 раза меньше ($p<0,05$) (рис 3.99).

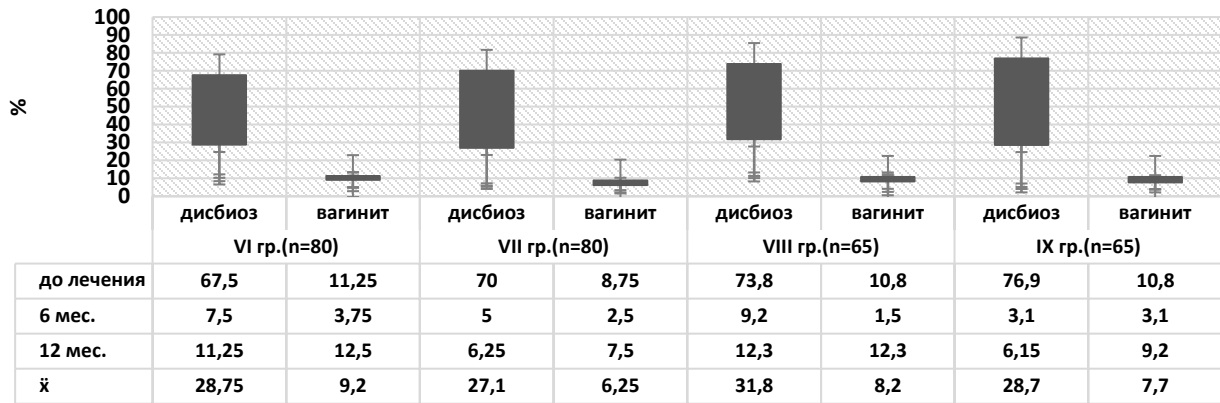


Рисунок 3.99. Динамика вагинального микробиоза в группах (CIN I-II)

В VIII и IX группах в течение годового наблюдения среднее количество мазков, отвечающим понятию «дисбиоз», было $10,75 \pm 2,5\%$ и $4,6 \pm 1,5\%$ соответственно (т.е. в 2,3 раза реже) ($p < 0,01$). Достоверной разницы ($p < 0,05$) в динамике вагинальных мазков исследуемых групп, отвечающим понятию «вагинит», выявлено не было.

Бальная оценка признаков бактериального вагиноза по методу Ньюджента показала, что признакам бактериального вагиноза (7-10 баллов по Ньюдженту) соответствовало в среднем $35,9 \pm 0,4\%$ больных CIN I-II ($p < 0,01$).

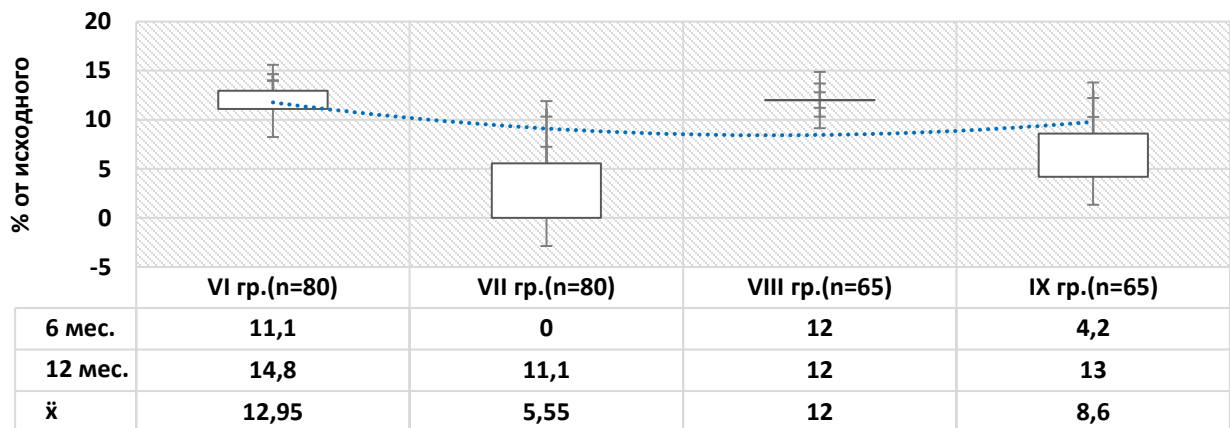


Рисунок 3.100. Динамика бальной оценки критериев бактериального вагиноза (7-10 баллов по Ньюдженту) в группах (CIN I-II)

После проведенной комплексной терапии с санацией влагалища и через 6 месяцев после окончания комплексной противовирусной и иммуномодулирующей терапии в VI группе количество таких больных

уменьшилось на 30,0%, а еще через 6 месяцев возросло на 1,25% (годовая медиана составила $4,4 \pm 1,25\%$) (рис. 3.100). В VII группе через 6 месяцев количество пациенток с оценкой 7-10 баллов по Ньюдженту не наблюдалось, на двенадцатимесячном сроке их было 3,75%. В группах больных с CIN II (VIII-IX) выявлена следующая динамика: за 6 месяцев количество женщин с признаками бактериального вагиноза снизилось на 33,8% в VIII и на 33,9% в IX группе, за 12 месяцев таких пациентов группах оказалось равное количество – 4,6%. В данном случае корреляционный анализ Спирмена не установил достоверной разницы между группами ($p > 0,05$).

По результатам исследования динамики влагалищной микрофлоры методом ПЦР количество вагинальных дисбиозов (умеренных и выраженных) в исследуемых группах до начала проведения терапии зарегистрировано $73,4 \pm 9,7\%$. После проведения вагинальной санации и через 12 месяцев после лечения ВПЧ-ассоциированной патологии шейки матки их количество снизилось до $10,3 \pm 3,2\%$ ($p > 0,05$) (рис. 3.101).

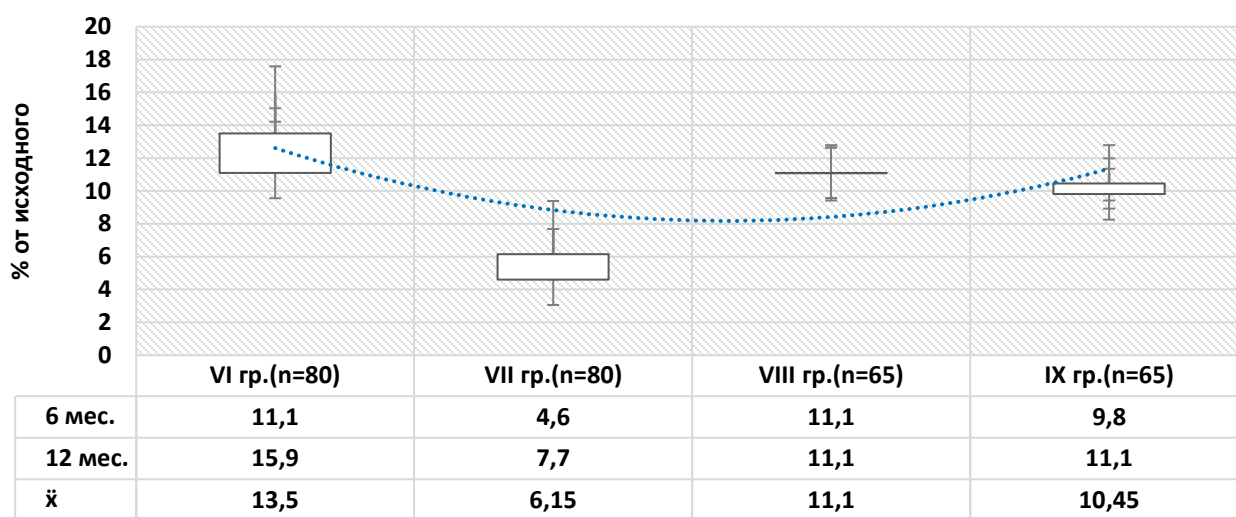


Рисунок 3.101. Изменения вагинальных дисбиозов (ПЦР) в группах (CIN I-II)

При этом в VI и VIII группах (CIN I-II; Ферровир + Генферон) среднее снижение за 12 месяцев наблюдения составило $12,3 \pm 2,4\%$, а в VII и IX группах (CIN I-II; Ронколейкин) – $8,3 \pm 2,25\%$ (т.е. в 1,5 раза больше).

3.5.6. Сравнительная клиническая эффективность терапии пациенток с ВПЧ-ассоциированными цервикальными интраэпителиальными неоплазиями легкой и средней степени тяжести

На основании жалоб, клинического и кольпоскопического исследования у больных исследуемых групп выявлены признаки специфического (ВПЧ-индуцированного) и неспецифического воспаления.

Таблица 3.24. Динамика клинических показателей женщин исследуемых групп в процессе мониторинга (%)

		Жалобы			Патологический процесс		
		зуд, жжение	дизурические расстройства	диспареуния	вульвовагинит	кондиломы	цервицит
до лечения	VI гр.	22,5	6,25	8,75	67,5	32,5	93,75
	VII гр.	26,25	7,5	7,5	68,75	35	96,25
	VIII гр.	27,7	9,2	12,3	62,3	32,3	96,9
	IX гр.	26,1	10,8	12,3	61,5	33,8	96,9
1 мес.	VI гр.	3,75	1,25	2,5	6,25	2,5	26,25
	VII гр.	1,25	0	2,5	3,75	0	15
	VIII гр.	6,15	3,1	6,15	10,8	4,6	16,9
	IX гр.	1,5	0	3,1	7,7	1,5	9,2
6 мес.	VI гр.	6,25	3,75	7,5	11,25	6,25	32,5
	VII гр.	1,25	0	1,25	5	0	16,25
	VIII гр.	4,6	3,1	4,6	12,3	7,7	21,5
	IX гр.	3,1	1,5	3,1	9,2	3,1	10,8
12 мес.	VI гр.	6,25	2,5	2,5	8,75	6,25	26,25
	VII гр.	2,5	1,25	2,5	6,25	1,25	17,5
	VIII гр.	8,75	3,1	3,1	16,9	10,7	20
	IX гр.	1,5	1,5	3,1	7,7	1,5	12,3

В ходе проведения терапии на месячном сроке наблюдения в VI группе (CIN I; Ферровир + Генферон) отмечена следующая динамика: субъективная и объективная симптоматика вульвовагинита/цервицита осталась у 6,25% и 26,5% респонденток соответственно (в среднем $18,65 \pm 4,15\%$ от исходного), а в VII группе (CIN I; Ронколейкин) у 3,75 и 15,0% (в среднем $10,5 \pm 2,5\%$ от исходного) (табл. 3.24; рис. 3.102). Через 1 месяц наличие экзо- и эндофитных кондилом шейки матки и влагалища (которые до лечения присутствовали у $33,75 \pm 2,25\%$

женщин с CIN I) зарегистрировано у 2,5% больных VI группы (7,7% от исходного) (в VII группе ни одной пациентки кондилом не было).

У пациенток с CIN II через 1 месяц от окончания терапии симптомы вульвовагинита/цервицита остались у 10,8% и 16,9% пациенток VIII группы (17,3 и 17,4% от исходного), и у 7,7 и 9,2% IX группы (12,5 и 9,5% от исходного).

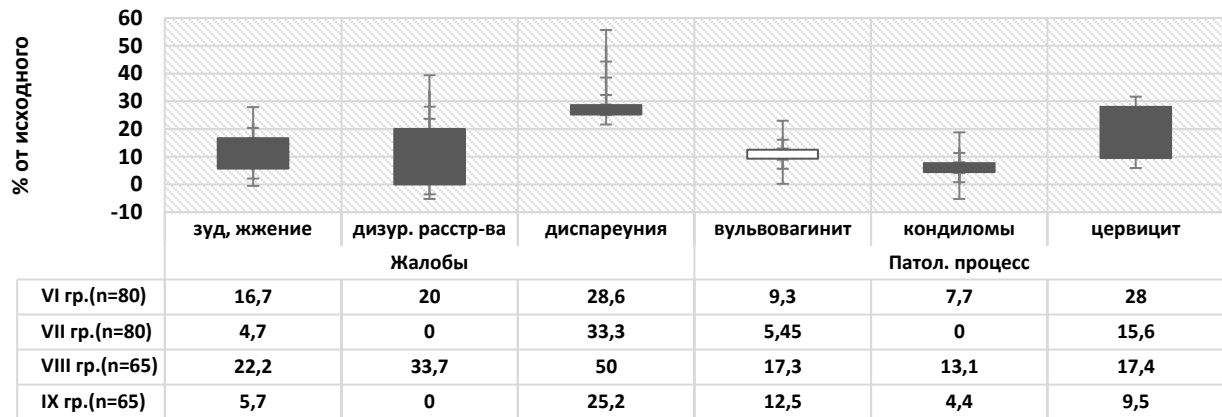


Рисунок 3.102. Сравнительная клиническая эффективность лечения больных CIN I-II (1 месяц)

Через 6 месяцев после начала мониторинга у женщин с CIN I зарегистрирована симптоматика вульвовагинита/цервицита (как специфического, так и неспецифического) у 11,25/32,5% исследуемых VI группы (в среднем $25,7 \pm 1,5\%$ от исходного), в VII группе - у 9,2/10,8% пациентов (в среднем $12,1 \pm 3,6\%$ от исходного) (табл. 3.24; рис. 3.103).

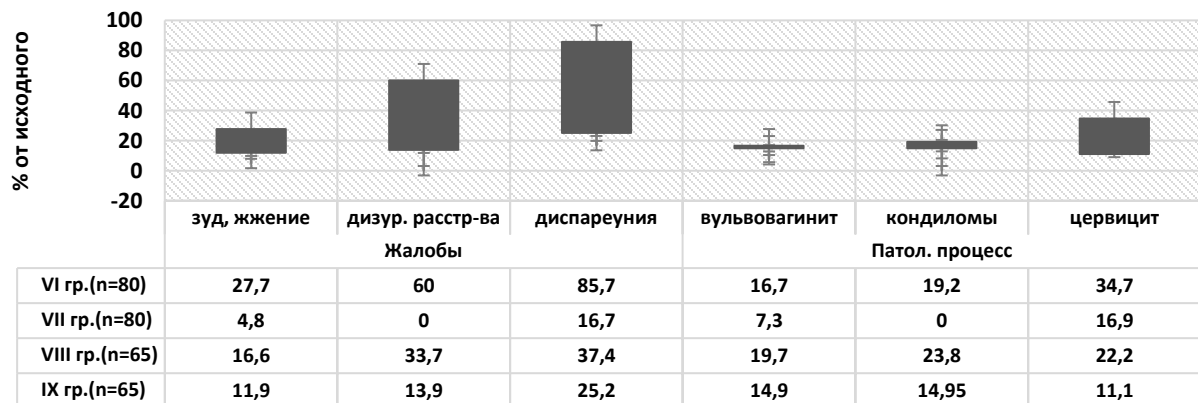


Рисунок 3.103. Сравнительная клиническая эффективность лечения больных CIN I-II (6 месяцев)

В VIII группе на этом сроке клиническая картина вульвовагинита/цервицита присутствовала у 12,3/21,5% женщин (в среднем $20,95 \pm 1,5\%$ от исходного), а в IX группе у 9,2/10,8% (в среднем $13,0 \pm 2,0\%$ от исходного).

Еще через полгода (12 месяцев мониторинга) воспалительные изменения во влагалище и цервикальном канале во всех группах остались практически на прежнем уровне (табл. 3.24; рис. 3.104). Некоторое увеличение симптоматики воспаления на сроках мониторинга 6 и 12 месяцев, по-видимому, можно объяснить контаминацией женских половых органов различной микрофлорой при несоблюдении адекватных правил полового поведения, дисбиотическими расстройствами, отсутствием санации полового партнера.

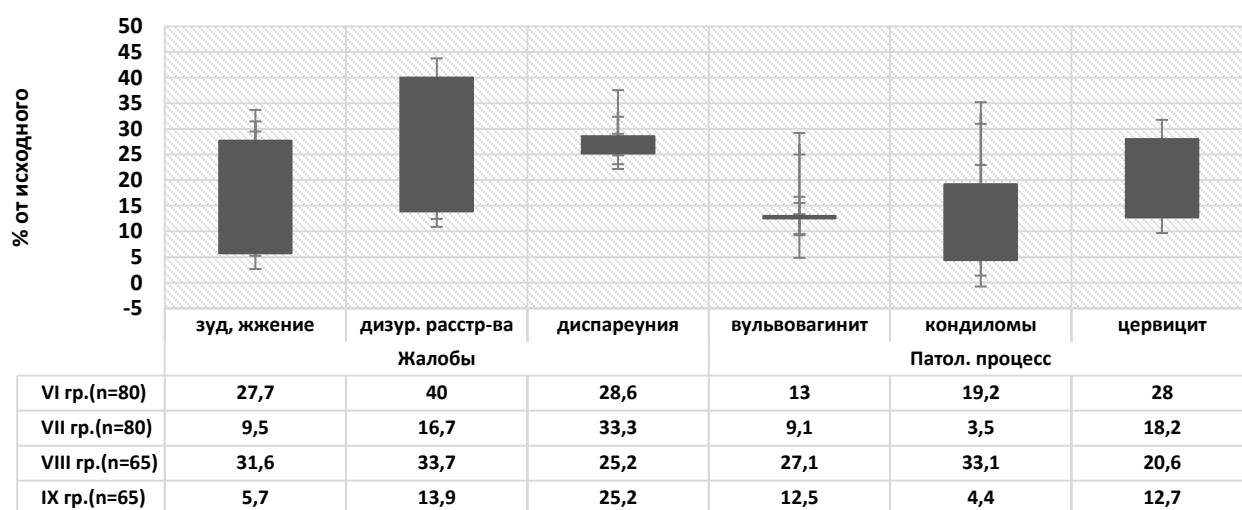


Рисунок 3.104. Сравнительная клиническая эффективность лечения больных CIN I-II (12 месяцев)

В ходе мониторинга проводилось исследование, в котором большое содействие врачу оказывал сам больной. Каждый пациент вел дневник, в котором самостоятельно отмечал свои жалобы, оценивал степень их интенсивности и наблюдал за симптомами заболевания во время и после окончания терапии, а исследователь, сравнивая субъективные ощущения пациента, проводил объективное исследование (гинекологический осмотр, микробиологическое

исследование, расширенная кольпоскопия) и заносил эти данные в индивидуальную карту больного и историю болезни (амбулаторную карту). Кроме того, в дневнике отмечалось время приема препаратов и сведения о динамике симптомов заболевания. Оценка эффективности лечения в группах осуществлялась по балльной системе, разработанной на основании анализа динамики жалоб и симптомов (см. главу 2.2 – «Клинические методы исследования»). Балльная оценка клинических проявлений проводилась до начала терапии, через 1, 6 и 12 месяцев после окончания терапии (табл. 3.25-3.26, рис. 3.105-3.106). При этом, если балльная оценка каждого из мониторируемых объективных и субъективных показателей, отражающих тот или иной симптом или синдром заболевания, позволяет оценить ведущие проявления, а также влияние каждого терапевтического фактора на саногенетический процесс, то сумма их балльной оценки является интегральным показателем интенсивности клинических проявлений болезни и ее исследование в динамике мониторинга позволяет в наибольшей степени отразить действительную клиническую интенсивность терапии и сроки возникновения рецидивов.

В ходе изучения клинических проявлений в группах пациенток с легкой степенью цервикальной неоплазии, через 1 месяц после окончания терапии зарегистрировано достоверное уменьшение клинической симптоматики. До лечения суммарная балльная оценка клинических проявлений ВПЧ инфекции в обеих клинических группах была одинаковой, что еще раз подтверждает репрезентативность выборки. Через 1 месяц после окончания проводимой терапии в обеих группах отмечено достоверное ($P < 0,001$) снижение суммы баллов клинической оценки, что свидетельствует о правильности выбора комплексного лечения, но, если в VI группе (CIN I; Ферровир + Генферон), данный показатель снизился в 3,6 раза, то в VII группе (CIN I; Ронколейкин), сумма балльной оценки снизилась в 7,5 раза. В течение последующих 6 месяцев динамического наблюдения выявлено возрастание клинических признаков у

больных VI группы (до $2,11 \pm 0,22$ балла, т.е. в 1,5 раза повысилось по сравнению с первым месяцем наблюдения).

Таблица 3.25. Клиническая эффективность (баллы) у больных CIN I ($M \pm m$; P) †

	VI группа				VII группа			
	До лечения	1 мес.	6 мес.	12 мес.	До лечения	1 мес.	6 мес.	12 мес.
Патологич. бели	$1,26 \pm 0,13$	***	***	***	$1,22 \pm 0,12$	*** *	*** **	*** **
Зуд, жжение	$1,28 \pm 0,14$	***	***	***	$1,36 \pm 0,15$	*** *	*** **	*** *
Диспареуния	$0,35 \pm 0,06$	**	*	*	$0,36 \pm 0,06$	***	$0,05 \pm 0,02$	$0,07 \pm 0,02$
Дизурические расстройства	$0,45 \pm 0,04$	***	***	*	$0,48 \pm 0,05$	*** ***	*** **	*** $0,11 \pm 0,02$ ***
Вульвовагинит, цервицит	$1,37 \pm 0,09$	***	***	***	$1,37 \pm 0,09$	*** ***	***	*** ***
Кондиломы	$0,32 \pm 0,03$	$0,25 \pm 0,03$	$0,29 \pm 0,03$	$0,26 \pm 0,03$	$0,27 \pm 0,03$	*** ***	* *	** ***
Сумма баллов	$5,03 \pm 0,38$	*** $1,42 \pm 0,11$	*** $2,11 \pm 0,22$	*** $2,36 \pm 0,19$	$5,06 \pm 0,43$	*** $0,67 \pm 0,06$ ***	*** $0,74 \pm 0,07$ ***	*** $0,83 \pm 0,11$ ***

†Примечание: знак "*" обозначает достоверность различий $P < 0,05$; знак "***" достоверность различий $P < 0,01$; знак "****" достоверность различий $P < 0,001$; знак "*", проставленный над параметром – достоверность различий между данным параметром и исходными данными, соответственно, под параметром – между данными основной (VI) группы и группы сравнения (VII) на данном сроке мониторинга

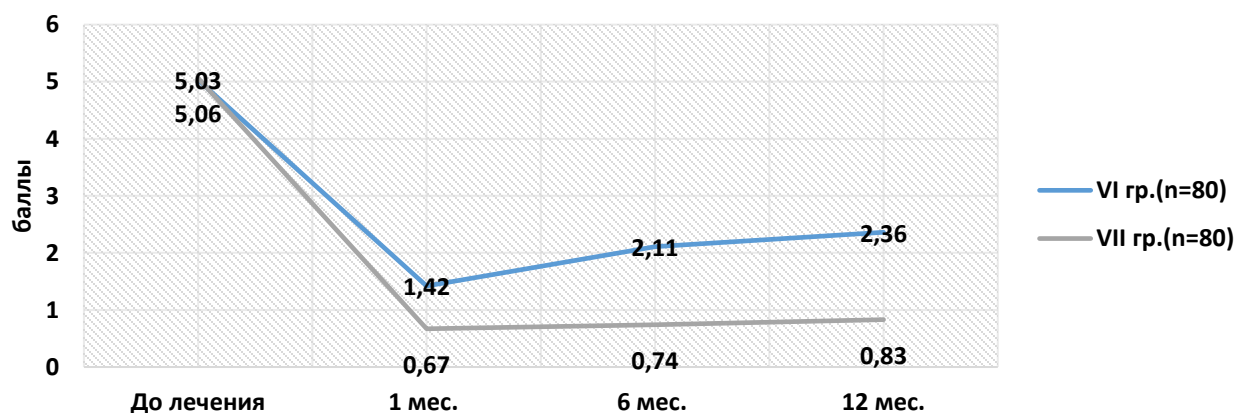


Рисунок 3.105. Динамика клинической эффективности (сумма баллов) у больных CIN I

Увеличение интенсивности проявлений ПВИ происходило в основном за счет увеличения количества субъективных жалоб на зуд и жжение в области

половых органов (в 1,8 раза; $P<0,05$) и количества патологических белей (в 1,5 раза; $P<0,05$). Объективная симптоматика вульвовагинита возросла в этой группе за 5 месяцев наблюдения в 1,6 раза ($P<0,05$). В то же время, в VII группе на данном сроке мониторинга, бальная оценка хотя и увеличилось, но это увеличение было незначительным ($0,74\pm0,07$ балла, т.е. всего лишь в 1,1 раза выше по сравнению с первым месяцем наблюдения; $P>0,05$). Динамика клинической картины ВПЧ-ассоциированной патологии урогенитального тракта в группе со средней степенью цервикальной интраэпителиальной неоплазии сходна с легкой степенью. Исходная суммарная субъективно-объективная оценка соответствовала $9,9\pm0,54$ баллам в обеих группах. Через месяц она уменьшилась на 7,9 баллов в VIII группе и на 8,38 баллов в IX группе (т.е. санация урогенитальной зоны с уменьшением клинической симптоматики в группе с топическим применением IL-2 проходила в 1,7 раз лучше) ($P<0,05$).

Таблица 3.26. Клиническая эффективность (баллы) у больных CIN II ($M\pm m$; P)

	VIII группа				IX группа			
	До лечения	1 мес.	6 мес.	12 мес.	До лечения	1 мес.	6 мес.	12 мес.
Патологические бели	$2,11\pm0,12$	***	***	***	$2,13\pm0,15$	***	***	***
		$0,31\pm0,06$	$0,47\pm0,05$	$0,68\pm0,08$		$0,14\pm0,03$ *	$0,12\pm0,03$ **	$0,18\pm0,04$ **
Зуд, жжение	$1,76\pm0,16$	***	***	***	$1,8\pm0,2$	***	***	***
		$0,38\pm0,04$	$0,36\pm0,04$	$0,62\pm0,08$		$0,2\pm0,06$ *	$0,18\pm0,04$ **	$0,26\pm0,04$ *
Диспареуния	$1,15\pm0,1$	**	*	*	$1,13\pm0,12$	***		
		$0,12\pm0,06$	$0,19\pm0,06$	$0,17\pm0,05$		$0,15\pm0,04$	$0,15\pm0,03$	$0,14\pm0,05$
Дизурические расстройства	$0,81\pm0,07$	***	***	*	$0,81\pm0,09$	***	***	***
		$0,31\pm0,05$	$0,21\pm0,03$	$0,29\pm0,04$		$0,06\pm0,01$ ***	$0,11\pm0,02$ **	$0,11\pm0,02$ ***
Вульвовагинит, цервицит	$2,59\pm0,3$	***	***	***	$2,62\pm0,3$	***	***	***
		$1,25\pm0,2$	$1,32\pm0,3$	$1,12\pm0,1$		$1,06\pm0,1$ ***	$1,16\pm0,2$	$1,18\pm0,1$ ***
Кондиломы	$1,48\pm0,2$				$1,5\pm0,2$	0	0	**
		$0,34\pm0,06$	$0,23\pm0,03$	$0,26\pm0,04$				$0,09\pm0,02$ ***
Сумма баллов	$9,9\pm0,42$	***	***	***	$9,99\pm0,61$	***	***	***
		$2,71\pm0,22$	$2,78\pm0,24$	$3,14\pm0,37$		$1,61\pm0,15$ ***	$1,72\pm0,14$ ***	$1,95\pm0,18$ ***

†Примечание: знак "*" обозначает достоверность различий $P<0,05$; знак "***" достоверность различий $P<0,01$; знак "****" достоверность различий $P<0,001$; знак "*", проставленный над параметром – достоверность различий между данным параметром и исходными данными, соответственно, под параметром – между данными основной (IX) группы и группы сравнения (VIII) на данном сроке мониторинга.

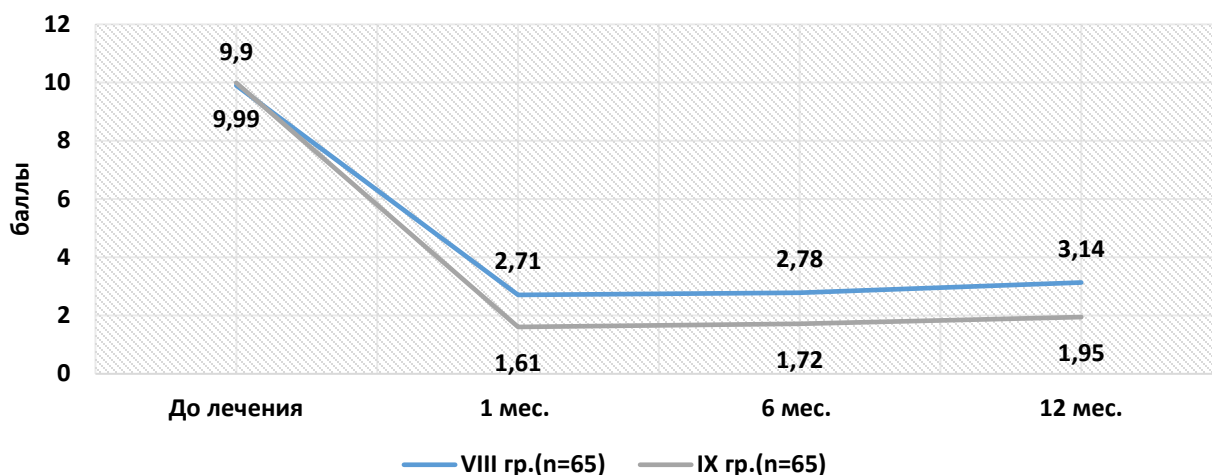


Рисунок 3.106. Динамика клинической эффективности (сумма баллов) у больных CIN II

Это можно объяснить с одной стороны более эффективной, как было показано ранее, микробиологической санацией вульвовагинальной зоны на фоне сочетанного применения местной иммуномодулирующей терапии, с другой, тенденцией к нормализации параметров местного иммунитета с восстановлением естественного микробиоценоза влагалища и повышением противовирусной резистентности, как в микробиологическом, так и в клиническом аспектах. Данная гипотеза подтверждается тем, что динамика микробиологических рецидивов заболевания в группах, во-первых, практически повторяет динамику балльной оценки клинических симптомов, и, во-вторых, появление манифестной папилломавирусной инфекции в первые 6 месяцев чаще всего зависит от рецидива неполноценно санированного очага с выделением того же типа микроорганизмов на фоне имеющих место условий для его активации, тогда как в условиях 12-месячного мониторинга в значительной степени начинает проявляться фактор реинфекции. При анализе следует все же учитывать эпидемиологические данные по обнаружению того или иного типа ВПЧ в конкретных условиях, а также наличие генетической предрасположенности к рецепции того или иного вида микроорганизмов.

Подтверждением этого являются результаты динамического наблюдения пациентов исследуемых групп в течение года. При этом обнаружено, что рецидивирование заболевания с возвращением прежней симптоматики по сумме баллов в 2,5 раза чаще ($2,36 \pm 0,19$ против $0,83 \pm 0,11$ баллов соответственно; $P < 0,001$) происходило в группе, которая не получала топическую иммуномодулирующую терапию Ронколейкином.

Таким образом, при сравнительном анализе клинико-микробиологической эффективности лечения с рецидивирующей папилломавирусной инфекцией в виде цервикальной интраэпителиальной неоплазии легкой и средней степени, показано, что предлагаемый комплексный метод лечения с использованием местного введения иммуностропного препарата IL-2 – Ронколейкина является более эффективным в отношении ранней и поздней (6 и 12 месяцев) микробиологической санации, а также имеет значительно более высокую клиническую эффективность, заключающуюся в более полноценном исчезновении проявлений заболевания и создании условий для повышения местной резистентности к заражению, уменьшении количества манифестных форм заболевания, а также активации иммунных механизмов саногенеза.

Глава 4. Обсуждение полученных результатов

В структуре патологии шейки матки цервикальные интраэпителиальные поражения находятся на лидирующих позициях. Роль папилломавирусной инфекции в онкотрансформации не оставляет сомнений. При этом гетерогенность предикторов неопластических процессов, таких как состояние локального иммунитета, микробиоценоза, гормонального статуса, психосоциальные, фенотипические факторы, позволяют рассматривать цервикальные неоплазии, как мультифакториальное заболевание.

Существенную проблему для российского здравоохранения представляет заболеваемость раком шейки матки (в России за последние 10 лет она увеличилась с 15,1 до 17,3 на 100 тыс. населения) [В.И. Чиссов и соавт., 2014]. Ежегодно в России рак шейки матки диагностируется более чем у 14000 женщин [В.М. Мерабишвили, Э.И. Лалианци, О.Ю. Субботина, 2013], при этом около 40% на момент выявления, имеют III-IV стадии [М.И. Давыдов, Е.М. Аксель, 2014; В.В. Ежов, А.М. Торчинов и соавт., 2014]. При этом не последнюю роль играют региональные особенности распространения и течения данной патологии. В настоящее время в большинстве регионов РФ организованный цитологический скрининг находится в неудовлетворительном состоянии, что не позволяет эффективно проводить вторичную профилактику РШМ [М.Г. Леонов, 2011; Л.В. Лялина, Е.В. Касаткин, 2011; В.М. Мерабишвили и соавт., 2013; А.А. Михетько, 2010; Л.Ф. Писарева, А.П. Бояркина и соавт., 2010; А.А. Савченко, В.Б. Цхай, Д.Ю. Круглова, 2011; Р.Ш. Хасанов, Р.С. Куртасанов, 2011; Ю.В. Никогда, 2012]. В связи с этим целесообразно провести анализ эпидемиологической обстановки в отдельном регионе (Краснодарский край) за пятилетний период (2011-2015 гг.), который позволит оценить распространенность различных форм папилломавирусной инфекции у женщин, уровень их ранней диагностики, меры профилактики, проводимые в регионе. С другой стороны, рост цервикальной патологии, вызываемой вирусом папилломы человека, низкая эффективность

терапии определяют необходимость поиска новых алгоритмов менеджмента данного заболевания.

В настоящее время большое внимание уделено вопросам этиопатогенеза заболеваний, связанных с вирусом папилломы человека, что позволяет обосновать методы диагностики и коррекции дисбиотических, иммунологических расстройств его сопровождающих. Несмотря на значительные сдвиги в изучении патогенеза ВПЧ-ассоциированных патологических состояний, вопросы, связанные с профилактикой, ранним выявлением, диагностикой, тактикой менеджмента поражений шейки матки, вызванным ВПЧ окончательно не решены. Особенный интерес представляет выявление роли молекулярных маркеров апоптоза, пролиферации, изменений микробиоты, иммунных нарушений в механизмах реализации неопластических процессов. В совокупности результаты исследования, с учетом проведенного клинического, вирусологического, иммунологического и молекулярно-генетического анализа при латентных формах папилломавирусной инфекции и цервикальных интраэпителиальных неоплазиях легкой и средней степени, позволили предложить модель вторичной профилактики рака шейки матки в условиях Краснодарского края. Все вышеперечисленное создает предпосылки для создания диагностических и лечебных алгоритмов ведения пациенток с папилломавирусной инфекцией высокого канцерогенного риска.

На первом этапе исследования был проведен ретроспективный эпидемиологический анализ показателей количества ВПЧ-инфицированности и заболеваемости CIN в Краснодарском крае за 5 лет (2011-2015 гг.): проанализирована демографическая ситуация, рассчитаны показатели общей структуры заболеваемости населения края цервикальными интраэпителиальными неоплазиями, уровень заболеваемости CIN в зависимости от места проживания (городская, сельская местность), динамика частоты заболеваемости CIN городского и сельского населения за 5 лет, возрастные

показатели заболеваемости CIN, динамика возрастных показателей. Проведен анализ 19354 случаев латентной формы ПВИ, 6702 случаев заболевания CIN. Зарегистрировано, что за 5 лет количество женщин, носителей ВПЧ, в Краснодарском крае увеличилось на 184%, а количество заболевших CIN на 177% (в подавляющем большинстве первично диагностируются CIN легкой степени ($87,1 \pm 4,6\%$, $p < 0,05$)). За 5 выявляемость CIN возросла в городах края на 175,9%, при этом в сельской местности этот показатель увеличился на 183,5%. При расчете возрастного показателя выявлено, что медиана бессимптомного ВПЧ-носительства за 5 лет была равна $21,6 \pm 2,3$ лет, а возраста больных CIN - $28,4 \pm 2,6$ года. То есть, для реализации вирусоносительства в CIN необходимо в среднем $6,8 \pm 1,1$ лет ($p < 0,05$).

Картографический анализ пространственного распределения стандартизованных коэффициентов заболеваемости ВПЧ-патологией шейки матки по административным территориям края, который позволил установить 5 уровней заболеваемости, в соответствии с которыми выделено 5 групп районов края. 1 группа (благоприятная) - 4 района с низким уровнем заболеваемости (до 50 на 1000 женского населения), 2 группа (удовлетворительная) - 8 районов с уровнем заболеваемости от 50 до 80, 3 группа (напряженная) - 14 районов с уровнем заболеваемости от 80 до 100, 4 группа (острая) - 12 районов с уровнем заболеваемости от 100 до 130 и 5 группа (критическая) - 9 районов с показателем заболеваемости от 130 и выше. В целом из 47 районов края в зоны риска вошел 21 район, то есть 44,7% территории Краснодарского края.

Типирование вируса папилломы человека у нашего контингента выявило, что основными инфекционными агентами в Краснодарском крае, как при латентном ВПЧ-носительстве, так и при реализации инфекции в CIN, являются высокоонкогенные типы вируса – 16 (25,1 и 39,3% соответственно), 18 (19,7 и 22,4%) и 51 типы (24,6 и 21,1%). То есть, самостоятельно и в ассоциациях они встречались у 69,4% вирусоносителей и у 82,8% больных CIN.

Проведенный эпидемиологический анализ позволил вычислить доверительные интервалы прогнозных показателей с 95% вероятной оценкой заболеваемости CIN на 2016-17 гг. Анализ полученных данных показывает, что к 2016-17 гг. не следует ожидать повышение частоты заболеваемости CIN.

Основным методом первичной профилактики рака шейки матки в мире служит ВПЧ-вакцинация. В 2012 году нами была предложена информационно-образовательная программа «Охрана репродуктивного здоровья молодежи», пропагандирующая в ВУЗах Краснодарского края в том числе и способы защиты от инфицирования вирусом папилломы человека, меры по первичной профилактике ВПЧ-заражения. Уже через год внедрения этой программы в учебных заведениях Краснодарского края выявлено значительное повышение знаний студентов о данных проблемах – осведомленными по данным вопросам оказались в среднем половина студентов (46,4%). Несмотря на активную пропаганду ВПЧ-вакцинации, анализ работы центров вакцинации выявил, что за 2012 год были вакцинированы от ВПЧ 321 человек, а в 2015 году – 108 (уменьшение почти в 3 раза). Основная группа вакцинированных приходится на возраст от 15 до 20 лет (51,9% в 2012 году и 60,3% в 2015 году), но намечается некоторый рост в возрастной группе 9-14 лет (с 16,7 до 22,3%) и 26-30 лет (с 1,9 до 8,2%). Таким образом, вакцинация в Краснодарском крае пока находится на низком уровне. По нашему мнению, это связано с одной стороны с дороговизной вакцины, с другой – с агрессивной антипропагандой вакцинации в СМИ.

Главным аспектом предлагаемой модели вторичной профилактики рака шейки матки является комплексная диагностика с использованием географических, анамнестических, клинических, вирусологических, иммунологических и молекулярно-генетических маркеров, что позволит выделить основные риски перехода латентного вирусоносительства в цервикальную неоплазию и своевременно провести профилактические мероприятия. Вторым аспектом предлагаемой модели является сам алгоритм

менеджмента цервикальных неоплазий различной степени тяжести – CIN I-II (CIN III не включен в наше исследование, т.к. ведение пациенток с тяжелой степенью цервикальной интраэпителиальной неоплазии находится в ведении врачей-онкологов), позволяющий включить в комплексное лечение данного контингента больных коррекцию вагинального микробиоценоза и применение топической иммуномодулирующей терапии (с применением деструктивных методов – радиоабляция шейки матки при CIN II) с оценкой эффективности терапии в динамике с помощью предлагаемых биомаркеров.

В рамках диссертационной работы у наших пациенток (90 пациенток с латентным ВПЧ-носительством, 190 больных CIN I, 130 больных CIN II) проведено клиническое исследование с бальной оценкой кольпоскопических признаков, цитологическое исследование клеток экзо- и эндоцервикса (жидкостная цитология), изучение вагинальной микробиоты, биомаркеров, характеризующих иммунный и молекулярно-генетический статус пациенток, биохимический и оксидативный статус цервиковагинальной зоны, что является важным этапом для прогностических и лечебных мероприятий.

Для бальной градации кольпоскопических признаков использовали клинико-кольпоскопический индекс (ККИ) и модифицированный кольпоскопический индекс Рейда (КИР). Соответственно, латентная форма ПВИ не сопровождающаяся достоверными клиническими проявлениями поражения шейки матки в 100% случаев соответствовала оценке от 0 до 3 баллов ККИ и 0-2 балла КИР. Наибольшее количество больных CIN I-II приходилось на оценку ККИ в 4-5 баллов - 82,3 и 66,2% соответственно (в среднем $74,2 \pm 9,8\%$), а по мере увеличения степени тяжести CIN возрастали и баллы и 6-7 баллов было зарегистрировано лишь у 4,4% женщин с CIN I и у 27,7% с CIN II. В остальных 64,7% в группе CIN I оценка КИР соответствовала 3-4 баллам. В группе больных CIN II 80,8% имели оценку 3-4 балла и 17,7% - 5-8 баллов.

Вирусологический анализ (ПЦР-РВ) в исследуемых группах показал, что основными типами вируса папилломы человека при латентных формах ПВИ, как и при CIN I-II являлись типы 16 ($53,7 \pm 2,2\%$), 18 ($19,4 \pm 2,1\%$), 31 ($11,5 \pm 1,7\%$) и 51 ($15,1 \pm 1,9\%$). При этом высокая вирусная нагрузка для ВПЧ 16 типа установлена у $73,9 \pm 26,3\%$ пациенток (при латентной форме ПВИ – в 42,9%, а при CIN I-II – 84,3 и 97,5% соответственно). Аналогично для ВПЧ 18 типа: у 45,6% пациенток с латентным ВПЧ-носительством и 88,4-93,4% больных CIN I-II. Оценка вирусной нагрузки ВПЧ 13 и 51 типов показала несколько другие результаты: высокая нагрузка ВПЧ была у $32,9 \pm 21,1\%$ пациенток с выявленным 13 типом ВПЧ (48,8% при латентной форме и 33,5-16,5% соответственно при CIN I-II), для 51 типа высокая нагрузка вирусами была в среднем в $23,8 \pm 6,3\%$ исследованных образцов (латентная форма – 27,8%, CIN I – 24,7%, CIN II – 19,0%). Это свидетельствует, что, несмотря на начавшееся распространение на территории Краснодарского края ВПЧ 13 и 51 типов, они, в настоящее время, не имеют высокой вирусной нагрузки, и, чаще всего, вызывают транзитное носительство.

Основным свойством белка E7 ВПЧ является взаимодействие с продуктом гена Rb и высвобождением из комплекса pRb-E2F транскрипционного фактора E2F, регулирующего клеточную пролиферацию [С.И. Роговская, 2015; И.Б. Манухин, Г.Н. Минкина и др., 2014]. Высокая активность фактора E2F может привести к апоптозу в клетках, экспрессирующих E7, так как при этом активируется синтез ингибитора циклинзависимых киназ p16ink4a. В пролиферирующих HPV-инфицированных клетках существует механизм защиты от малигнизации путем подавления функций вирусных онкобелков за счет ингибиторов циклинзависимых киназ, в первую очередь p16ink4a. Каждый из генов E6 и E7 способен immortalizировать культуры клеток. Immortalization клеток *in vitro*, т.е. способность неограниченно долго пассироваться в культуре ткани, скорее всего, соответствует клинической стадии легкой дисплазии [Ф.Л.

Киселев, Н.Н. Мазуренко, Н.П. Киселева и др., 2012]. Поскольку накопление p16ink4 α в клетках свидетельствует о трансформации вирусами папиллом, предложено выявлять такие клетки в цитологических мазках по окраске специфическими антителами к p16ink4 α [Frega A., Stentella P. et al., 2003]. Одной из причин устойчивости ВПЧ к терапии и высокого показателя рецидивирования является его способность модулировать своеобразный иммунный ответ. Среди механизмов иммуносупрессивного действия онкобелков Е6 и Е7 ВПЧ можно выделить следующие [В.Н. Прилепская, С.И. Роговская, Т.Н. Бебнева и др., 2014; В.А. Молочков и др., 2013; Steben M., Duarte-Franco E., 2013]:

- За счет особенностей генетического кода вируса синтез капсидных белков, обладающих хорошей иммуногенностью, протекает очень медленно и в малых количествах, тормозя, таким образом, развитие противовирусного иммунитета. Тогда как ранние белки Е6 и Е7 синтезируются активно и индуцируют процессы малигнизации инфицированных клеток.
- Белок Е7 ВПЧ нейтрализует противовирусную и противоопухолевую активность интерферона- $\alpha 2$ за счет его способности избирательно блокировать большинство генов, индуцируемых интерфероном.
- Белок Е7 ингибирует экспрессию генов HLA, затрудняя распознавание опухолевых клеток иммунной системой хозяина.
- Белок Е6 нейтрализует действие лимфокина IL-18, который играет важную роль в формировании иммунного ответа с участием CD8⁺ лимфоцитов.

Повышение эффективности прогнозирования и профилактика предрака шейки матки во многом обусловлена методами, которые позволяют установить стадию папилломавирусной инфекции, а также объективно оценить клиническую ситуацию. При этом особенно актуальным является внедрение новых высокоинформативных диагностических методов, включая методы определения биомаркеров онкопротеина Е7, p16ink4 α и Ki-67. ПЦР-анализ мРНК Е7 в наших группах проведено у пациенток с идентифицированными в ходе

исследования вирусами типов 16, 18 и 31. Определено, что при латентной форме ПВИ детекция мРНК E7 была в среднем $4,1 \pm 2,7\%$ ($p=0,05$). В группах больных CIN детекция E7 выявила на порядок больший процент: в среднем $20,2 \pm 4,7\%$ для CIN I и $49,1 \pm 9,1\%$ для CIN II ($p=0,05$). То есть по мере утяжеления индуцированного ВПЧ инфекционного процесса экспрессия онкобелка E7 увеличивается в 5, а затем и в 12 раз.

Иммуноцитохимическая оценка экспрессии p16ink4 α и Ki-67 выявила $37,4 \pm 29,7\%$ позитивных p16ink4 α пациенток (11,7% латентных ВПЧ-носителей, 33,1% - CIN I, 67,5% - CIN II). У больных с CIN II преобладала гиперэкспрессия p16 – 64,9% (при латентной форме ПВИ зарегистрирован единичный случай гиперэкспрессии p16 – 2,6%). Ki-67 преобладал в группе больных CIN II (60,7%), что в 30 раз больше, чем при латентных формах ПВИ и в 5 раз больше, чем у пациенток с CIN I. Коэкспрессия биомаркеров p16ink4D и Ki-67 преобладала в группе больных CIN II с таким же результатом. Оценка совместной экспрессии маркеров p16ink4D и Ki-67 у E7-позитивных женщин установила аналогичные статистически значимые изменения. Полученные нами данные позволяют сказать, что детекция онкомаркера p16 и маркера пролиферации Ki-67 при ПВИ зависит от степени тяжести CIN. Это диктует необходимость более широкого использования определения маркеров E7, p16 и Ki-67 при первичном скрининге, что позволит усовершенствовать тактику ведения больных с различными формами ПВИ. Проведенный анализ соотношения этих метаболитов эстрогена у пациенток с выявленными вирусами типов 16, 18 и 31 отдельно и в сочетании (346 женщин), показал, что только у 32,8% латентных ВПЧ-носителей и у $17,5 \pm 4,7\%$ больных CIN данный показатель соответствует уровню здоровых женщин (в среднем $2,33 \pm 0,11$ для вирусоносителей и $21,1 \pm 0,14$ для пациенток с CIN I-II). У $72,1 \pm 6,1\%$ больных CIN баланс метаболитов эстрогена оказался измененным, при этом уровень 16 α -ОНЕ1 превышал 2-ОНЕ1 в 2 и более раз, что выражалось в снижении значений до 0,2. Наибольшее количество женщин с

латентной ВПЧ-инфекцией (39,1%) имело соотношение $1,52 \pm 0,28$ (отличия от здоровых статистически значимы - $p < 0,05$). При значительном повышении 16 α -ОНЕ1, когда у наших пациенток коэффициент 2-ОНЕ1/16 α -ОНЕ1 был менее 1,5, мы выяснили его сочетание с положительным тестом на онкобелок Е7 и коэкспрессией биомаркеров p16ink4D и Ki-67. При этом коэкспрессия p16ink4D и Ki-67 в группе больных CIN I встречалась в 5,85 раз чаще и в 29 раз чаще в группе с CIN II, чем в группе пациенток с латентными формами ПВИ (11,7% – CIN I, 58,1% - CIN II против 2,0%). Таким образом, данные исследования позволяют более точно, как диагностировать форму ПВИ и степень цервикального поражения, так и помогают определить индивидуальный прогноз развития заболевания, и, соответственно, дифференцировать лечебные мероприятия каждой отдельной пациентки.

Известно, что в реализации неопластических процессов не последнюю роль играет состояние вагинальной микробиоты. Ее изменения являются фактором, поддерживающим хронический воспалительный процесс, приводящему к изменению функциональных и морфологических свойств эпителия. Проведенный комплексный микробиологический анализ выявил, что количество влагалищных дисбиозов было выше у пациенток с CIN I-II относительно уровня латентных форм ПВИ, с преобладанием условно-патогенной анаэробной и грамотрицательной кокковой микрофлоры (достоверное снижение количества лактобактерий с преобладанием вариантов с промежуточными вариантами микроценоза – в среднем $55,8 \pm 1,9\%$ и бактериального вагиноза - $35,9 \pm 0,4\%$). У латентных ВПЧ-носителей на фоне преобладания влагалищного нормоценоза, выше (в 4,4 раза – 46,7%), чем при CIN было количество воспалительного типа мазков ($10,7 \pm 0,2\%$). Оценка вагинальной микрофлоры по унифицированной схеме Херлена показало, что наибольшее количество вагинальных мазков в наших группах соответствовало картине дисбиоза (в среднем $58,5 \pm 18,4\%$) ($p < 0,05$) и чем выше степень тяжести CIN, тем чаще они встречались, хотя

разница между группами была недостоверной ($p > 0,05$) (при CIN I - 69,9%, CIN II – 74,6%). Достоверная разница ($p < 0,05$) выявлена между группами с латентным ВПЧ-носительством и CIN I-II – количество дисбиотических мазков было в 2,3 раза меньше у вирусоносителей. Признакам бактериального вагиноза (7-10 баллов по Ньюдженту) соответствовало $26,9 \pm 16,8\%$ ($p < 0,05$) пациенток исследуемых групп (8,9% латентных ВПЧ-носителей и $35,9 \pm 0,4\%$ больных CIN I-II). Это еще раз подчеркивает тот факт, что бактериальный вагиноз является одним из основных факторов реализации ПВИ. Эпидемиологический анализ состояния микробиоценоза влагалища методом ПЦР-РВ (фемофлор 16) выявил, что у пациенток с латентной формой ПВИ количество вагинальных нормоценозов было более чем в 2 раза выше, чем в группах с CIN I-II (40,0% против 20,4% и 19,2% соответственно). Влагалищных дисбиозов (умеренных и выраженных) зарегистрировано $73,4 \pm 9,7\%$ ($p > 0,05$): при CIN II – 80,8% (выраженных дисбиозов - 19,2%), при CIN I - 79,8% (выраженных - на 5,5%). При латентном ВПЧ-носительстве также было выявлено достаточно большое количество влагалищных дисбиозов – в сумме 60,0%, но при этом понятию выраженного дисбиоза соответствовало только 8,9%.

Нарушение состава вагинальной микробиоты со снижением количества лактобактерий, ведет к снижению образования H_2O_2 и молочной кислоты, что благоприятно для роста условно-патогенной и патогенной микрофлоры. Глюкоза и гликоген являются субстратом для метаболизма лактобацилл и образования молочной кислоты. Снижение уровня глюкозы, отражает большинство биохимических изменений при дисбиотических процессах во влагалище. Биохимический состав вагинальной жидкости у наших пациенток показал снижение уровня перекиси водорода и молочной кислоты у больных с CIN I-II (в среднем на $39,5 \pm 5,5\%$ и $17,0 \pm 1,5\%$ соответственно), уровня глюкозы и железа (в среднем на $17,6 \pm 5,7\%$ и $44,4 \pm 3,8\%$ соответственно по сравнению с латентными формами ПВИ). Исследование уровня активности ферментов вагинальной

жидкости у больных CIN по сравнению с латентными ВПЧ-носителями выявлено достоверное повышение активности внутриклеточных ферментов, в частности, АЛТ (в среднем на $488 \pm 82,5\%$), АСТ (в среднем на $304 \pm 41,5\%$) и амилазы (в среднем на $310,5 \pm 33,5\%$). Это может свидетельствовать об активации цитолитических процессов, которые могут быть связаны с воздействием на клетки продуктов жизнедеятельности условно-патогенных микроорганизмов, с другой стороны с усилением неопластических процессов в шейке матки, что подтверждается достоверными различиями между группами с CIN I-II.

Иммунный ответ на ВПЧ характеризуется развитием клеточных и гуморальных иммунных реакций, механизм регуляции которых связан с продукцией цитокинов Т-хелперами 1-го (Th-1) и 2-го типа (Th-2). При этом Th-1 секретируют IL-2, IL-3, $\text{INF}\gamma$, $\text{TNF}\alpha$, способствующие реализации клеточного иммунного ответа, Th-2 - IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, влияющие на гуморальный ответ. Таким образом, течение ПВИ во многом зависит от формирования определенного спектра цитокинов. Отмечены значительные изменения по сравнению с нормой уровня локальной продукции основных провоспалительных (TNF) и противовоспалительных (IL-10) цитокинов у пациенток с ПВИ [Л.Д. Андосова, 2014; Lucey D., Clerici M., 2013]. Для выявления взаимосвязи между носительством полиморфизмов генов про- и противовоспалительных цитокинов и тенденцией к развитию неоплазии нами проведена оценка содержания ДНК основных цитокинов периферической крови. В зависимости от преобладания генома про- или противовоспалительных цитокинов были выделены 3 генотипа: сбалансированный, провоспалительный и противовоспалительный. При этом в группе больных CIN I-II преобладают противовоспалительные генотипы (54,7% и 71,2% соответственно), которые могут способствовать активации неопластических процессов, а при латентных формах ПВИ преобладал провоспалительный генотип (56,7%). При этом концентрация основного макрофагального цитокина IL-1 β в цервикальной слизи больных CIN I-II была в

среднем в 2 раза ниже, чем у бессимптомных ВПЧ-носителей, но эта разница из-за высокого коэффициента вариации была недостоверной ($P>0,05$). Концентрация IL-8, как и TNF α у больных CIN I-II женщин также имела тенденцию к повышению (в среднем в 4 раза) ($P<0,05$). Концентрация IFN γ в цервикальной слизи у больных CIN I была в 2, а при CIN II – в 3 раза ниже, чем в группе пациенток с латентными формами ПВИ (при более чем двукратно увеличенной концентрации IL-4 и стабильной концентрации IL-10). Данные изменения локального цитокинового статуса могут предполагать развитие индуцированной папилломавирусами Th2-девиации иммунной системы, что способствует прогрессированию неопластических процессов, что также подтверждается снижением активности макрофагальных ферментов слизистой шейки матки ($P<0,05$).

В патогенезе каждого неопластического процесса значительную роль играет молекулярные и субклеточные механизмы: нарушение транспорта электронов, усиление образования генераторов свободных форм кислорода и пероксидрадикалов, понижение антиоксидантной активности крови. Состояние окислительных процессов в слизистой шейки матки определяли методом электронного парамагнитного резонанса (ЭПР). При CIN I-II интенсивность ЭПР сигнала спинмеченных пероксидрадикалов (LOO-) увеличивается в среднем в 1,5 раза (119 – CIN I и 184% - CIN II), регистрируются сигналы супероксидрадикалов (O $_2$ -), которые при латентной форме ПВИ практически не регистрируется, увеличение интенсивности сигнала ЭПР оксида азота (NO) также возрастает почти в 2 раза (167 – CIN I и 219% - CIN II). Т.е. изменения оксидативного статуса цервикальной зоны при ВПЧ-ассоциированных поражениях шейки матки становятся факторами, нарушающими структуры клеточных мембран, с изменением метаболических процессов, что играет значительную роль в патогенезе и переходе процесса в более тяжелые формы [М. Топурия, 2010].

Главной характеристикой любой относительно закрытой системы является целостность ее гомеостаза, что проявляется наличием корреляционных связей (положительных и отрицательных). Для их изучения мы провели внутригрупповой корреляционный анализ с помощью коэффициента ранговой корреляции Спирмена (табл. 4.1, рис. 4.1).

Таблица 4.1. Корреляционные связи основных показателей в исследуемых группах

показатель	коэффициент корреляции		
	латентная форма ПВИ (n=90)	CIN I (n=180)	CIN II (n=130)
вирусная нагрузка >5 lg	-0,341	0,116	0,138
E7	-0,293	0,184	0,326
коэкспрессия p16/Ki-67	0	0,431	0,589
2-OHE1/16 α -OHE1 <1,5	-0,119	0,088	0,164
нормоценоз/дисбиоз	+ 0,209 -	- 0,089 +	- 0,006 +
бактериальный вагиноз	-0,011	0,141	0,218
про-/противовоспалительный генотип	+ 0,206 -	- 0,126 +	- 0,302 +

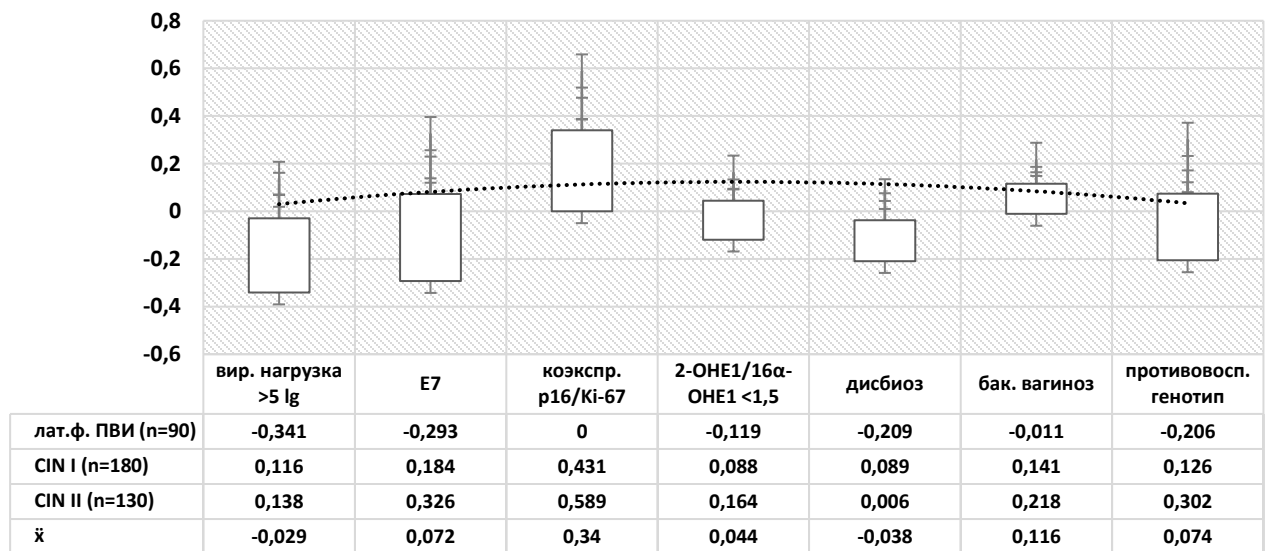


Рисунок 4.1. Корреляционные связи при различных видах ВПЧ-инфекции

При латентной форме ПВИ выявлена отрицательная взаимосвязь с вирусной нагрузкой ($R=-0,341$), обнаружением онкобелка E7 ($R=-0,293$) и нарушенным балансом метаболитов эстрогенов 2-OHE1/16 α -OHE1 ($R=-0,119$) и положительная связь с провоспалительным генотипом ($R=0,206$). При CIN I-II

установлена положительная связь между вирусной нагрузкой ($R=0,116-0,138$), онкобелком E7 ($R=0,184-0,326$), коэкспрессией p16/Ki-67 ($R=0,431-0,589$) и нарушенным балансом метаболитов эстрогенов 2-OHE1/16 α -OHE1 ($R=0,088-0,164$) и отрицательная связь с провоспалительным генотипом ($R=-0,126-0,302$).

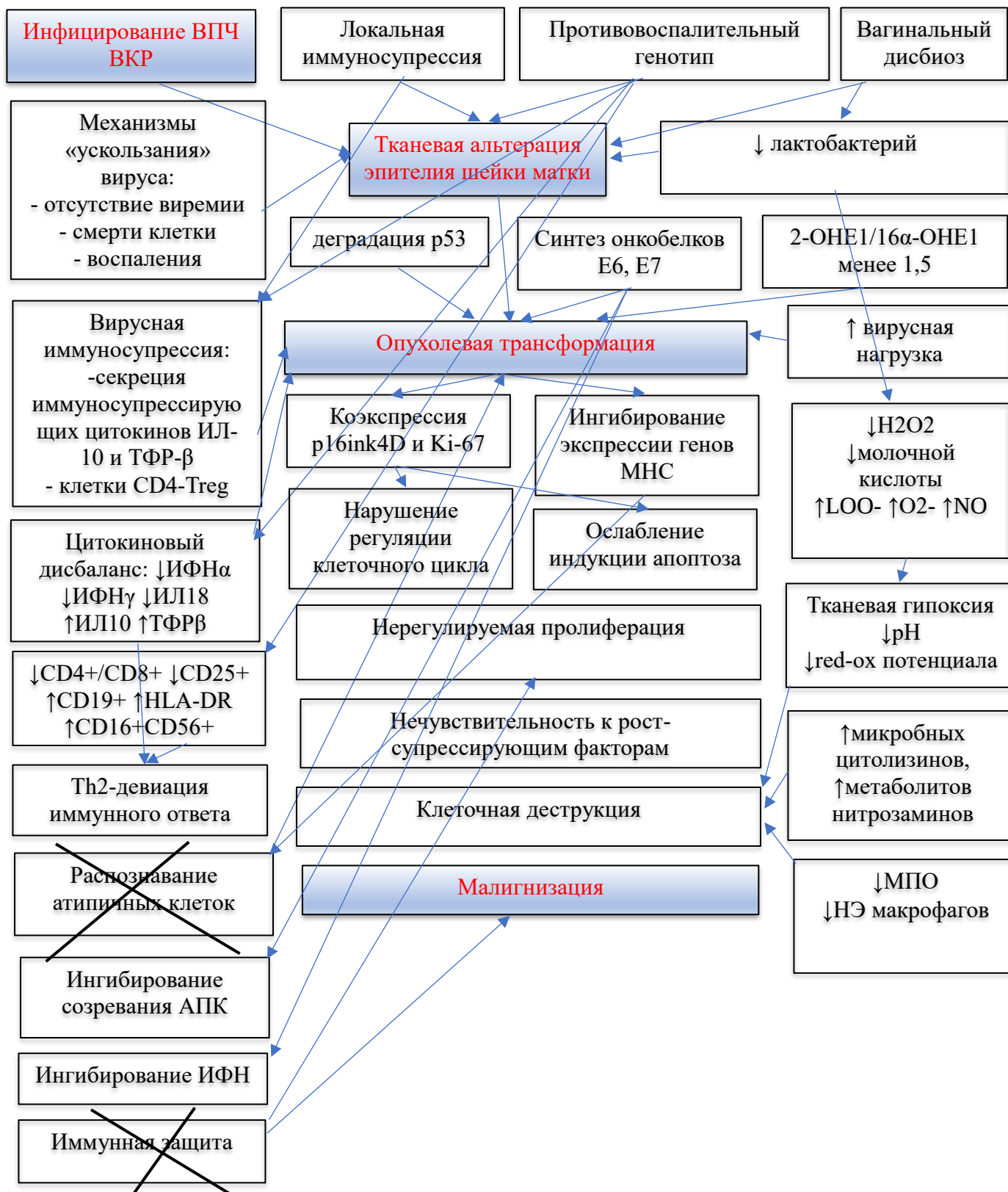


Схема 4.1. Патогенетические механизмы формирования цервикального поражения при ПВИ

До сих пор остается открытым вопрос, что же является predisposing факторами для развития манифестной формы папилломавирусной инфекции и какие из них способствуют малигнизации [С.И. Роговская, 2011; В.Н. Прилепская, 2010; И.Б. Манухин, 2010; О.В. Лазарева, 2011; Castle P., et al., 2011]. Поэтому для оценки прогноза развития CIN на фоне ВПЧ-инфицирования нами была разработана диагностическая таблица, в которую были включены географические, анамнестические, клинические и лабораторные данные, позволяющая определить прогноз перехода латентных форм ПВИ в цервикальную неоплазию. Диагностические коэффициенты (ДК) рассчитывали для каждого из признаков посредством последовательного анализа Вальда: при ДК от -26 до +18 битов прогнозируют благоприятный исход (перехода латентной формы ПВИ в CIN не предвидится), при ДК от +19 до плюс +26 битов вероятность перехода составляет 95%, при ДК более +26 битов - 99%. Был произведен расчет диагностического коэффициента пациенткам с латентными формами папилломавирусной инфекции, включенными в наше исследование выявил, что ДК от -26 до +18 бит (благоприятный исход) наблюдался у 12,2% обследованных, ДК от +19 до +26 бит (95% риска перехода в CIN) - в 74,4% случаев и ДК свыше 26 бит (99% риска перехода в CIN) – в 13,4%. Таким образом, суммарно риск реализации латентных форм ПВИ в CIN более 95% выявился у 87,8% обследованных пациенток.

При выявлении пациенток с латентными формами папилломавирусной инфекции и уже имеющимися цервикальными интраэпителиальными неоплазиями своевременное лечение является единственной мерой вторичной профилактики рака шейки матки. При этом, особенно актуальная своевременная диагностика бессимптомного ВПЧ-носительства и лечение цервикальных неоплазий легкой степени, которое, со одной стороны будет препятствовать возникновению

неопластических процессов в шейке матки, а с другой, если этого избежать не удалось, провести наиболее эффективную и «щадящую» терапию без применения деструктивных методов.

Несмотря на доказанную вирусную этиологию рака шейки матки, наличие большого числа клинических, субклинических и латентных форм ВПЧ-инфекции, специфических препаратов для подавления вируса папилломы человека не существует, что заставляет искать новые подходы к терапии этого заболевания [В.И. Козлова, 2009; В.Н. Прилепская, 2011; В.Е. Радзинский и др., 2014; О.В. Лазарева, 2011; В.А. Исаков и др., 2011; С.И. Роговская, 2010; Г.А. Дмитриев и др., 2009; Н.С. Логинова и др., 2008].

В современной медицине при лечении папилломавирусной инфекции наиболее активно применяются комплексные методы терапии, включающие противовирусные препараты и иммуномодуляторы. Препаратами для лечения заболеваний, ассоциированных с вирусом папилломы человека чаще всего служат производные пуриновых нуклеотидов (изопринозин, гроприносин и др.), действие которого связано с подавлением синтеза ДНК и мРНК вирусов в рибосоме клеток, активацией Т-лимфоцитов, стимуляции фагоцитирующих клеток, активации синтеза интерферонов [В.Н. Прилепская, С.И. Роговская, 2007; А.В. Забелев, О.К. Долматова и др., 2005; В.А. Потапов, Т.В. Демченко и др., 2006; Galli M., Lazzarin A., 2004], интерфероны (особенно альфа) (виферон, генферон и др.), обладающие выраженным опосредованным противовирусным, противомикробным и иммуномодулирующим действием, противовирусные препараты (ферровир). «Ферровир» (действующее вещество - дезоксирибонуклеонат натрия в комплексе с железом) активизирует противовирусный (торможение репликации РНК- и ДНК-содержащие вирусы), противогрибковый и противомикробный иммунитет, воздействуя на клеточное и гуморальное звенья [Ю.В. Никогда, 2014; Н.Б. Серебряная и др., 2010; Г.Н. Бисага, И.А. Абдурасулова, 2011; Morgan D. et al., 2009]. Результатом

взаимодействий клеток иммунной системы являются активация процессов клеточного и гуморального иммунитета, индукция Th1 типа ответа, увеличение количества CD8, CD16 клеток, усиление противовирусной защиты, стимуляция лейкопоза [Н.М. Калинина, Н.И. Давыдова, 2010; Lazarowski E., 2009; Lemoli R., 2009; Morsmann T. et al., 2009; Grimm E. et al., 2006; Saiki O. et al., 2008; Luger T. et al., 2012].

Препараты интерферона-альфа, кроме интерферонозамещающего эффекта, стимулируют синтез эндогенного интерферона альфа и гамма типов. При этом топическое применение (гели, суппозитории и т.д.) представляется более эффективным (более высокие концентрации действующего вещества непосредственно в очаге поражения при отсутствии побочных эффектов) [Kanodia S., Da Silva D., Kast W., 2008]. При этом, в большинстве исследований была показана невысокая эффективность применения IFN. Некоторые авторы считают, что важным показанием для применения IFN является наличие субклинических очагов ВПЧ-инфекции [В.И. Козлова и А.Ф. Пухнер, 2010; М.А. Гомберг, 2010]. Есть сообщения об эффективном применении индукторов IFN в виде монотерапии [Л.Г. Сычева, А.А. Кубанова, 2009; С.И. Роговская, Н.С. Логинова, Л.З. Файзуллин, Г.Т. Сухих, 2008]. Изучено воздействие α IFN при лечении CIN I, которое привело к излечению 45% больных (контроль в течение 12 месяцев) [С.И. Роговская, 2009; А.Б. Манухин, Г.Н. Минкина и др., 2009]. В то же время имеются исследования, в которых отрицается высокий результат от лечения ВПЧ-инфекции интерферонами, что связано с торможением воздействия интерферона в присутствии онкобелков E6 и E7 [М.А. Захарова, 2011; Garner R., Childress A., Human G., Domer E., 2010; Hisatsune T., Nishijima K., 2009; Ghaem-Maghami S., Lewis D., 2009; Mazzoni S. et al., 2007].

В литературе имеются исследования по применению рекомбинантного интерлейкина-2 (rIL-2) в лечении ВПЧ-ассоциированной цервикальной патологии [В.Н. Егорова А.М. Попович и др., 2010; Е.С. Свердлова, Т.В. Дианова,

2012; А.А. Олина, В.М. Падруль, 2006; М.Р. Щербань, С.А. Галустян, 2007]. Препарат «Ронколейкин» представляет собой рекомбинантную форму человеческого интерлейкина-2. Интерлейкин-2 является аутокринным фактором роста, дифференцировки и активации всех популяций лимфоидных клеток [Morgan D. et al., 2007]. Главными мишенями действия IL-2, являются оба подтипа (Th-1 и Th-2) CD4⁺ - Т-хелперов, но в большей степени Th-1 [Morsmann T. et al., 2006], макрофаги, которые увеличивают продукцию H₂O₂, усиливая тем самым цитотоксическую, бактерицидную и антигенпредставляющую активность [Holter W. et al., 2007] и NK-клетки с последующей трансформацией последних в лимфокинактированные киллеры (ЛАК), имеющие генотип CD16⁺CD3⁻CD5⁻, ответственные за генетически не рестриктированную цитотоксичность [Grimm E. et al., 2006]. Таким образом, IL-2 является ключевым фактором в развитии иммунологических реакций, т.к. его эффекты приводят к плеiotропному ответу с участием практически всех популяций и субпопуляций клеток иммунной системы. К тому же, описанные стимулирующие прямые и опосредованные эффекты IL-2 не касаются в основном индукции синтеза TNF- α , являющегося в данных условиях основным, вызывающим десквамацию эпителия и повреждение тканей, цитокином. Следует также учесть, что благодаря аутокринному эффекту, введение даже небольших количеств rIL-2 при контакте с чувствительными клетками в основном Th-1 субпопуляций индуцирует каскадный синтез эндогенного IL-2 *in situ* и увеличение на клетках количества рецепторов к IL-2, преимущественно CD25⁺.

В последние годы появились исследования о противовирусной активности препаратов глицирризиновой кислоты и дефензинов (эпиген, кольпоцид) [А.С. Вишневский, Н.Р. Сафронникова, 2012; И.Г. Михайлов, С.Я. Максимов и др., 2010; А.С. Будихина, Б.В. Пинегин, 2011]. Глицирризиновая кислота (ГК) оказывает противовоспалительное и репаративное действие вследствие инактивации простагландина E₂, кроме того она способна ингибировать ДНК и

РНК вирусы. В исследованиях на культуре клеток, зараженных различными вирусами, выявлено, что ГК в концентрациях, хорошо переносимых неинфицированными клетками, ингибирует рост и цитопатическую активность вирусов, причём некоторые вирусы ингибируются необратимо [Л.С. Вишневский, 2005]. Полученные результаты позволили считать, что ГК взаимодействует со структурой вирусов (вероятно с белками), вызывая различные изменения в стадиях вирусного цикла, что сопровождается: инактивацией вирусных частиц, находящихся в свободном латентном состоянии вне клеток, блокированием внедрения активированных вирусных частиц через клеточную мембрану внутрь клетки, нарушением способности вируса к синтезу новых цитопатичных частиц внутри клетки [А.С. Вишневский, Н.Р. Сафронникова, 2012]. Молекулярный механизм противовирусного действия ГК заключается в ингибировании киназы Р, что приводит к подавлению фосфорилирования клеточных и кодируемых вирусом белков в инфицированных клетках. Кроме того, активированная глицирризиновая кислота является выраженным иммуностимулятором, влияя как на гуморальные, так и клеточные факторы иммунитета. Иммуностимулирующий эффект проявляется индукцией выработки собственных интерферонов, повышением активности Т-лимфоцитов, уменьшением концентрации иммуноглобулинов класса G и увеличением концентрации иммуноглобулинов класса A и M [И.Г. Михайлов, С.Я. Максимов и др., 2010]. Липотейхоевая кислота в комплексе с протеогликанами стимулирует выработку дефензинов, которые являются естественными защитными пептидами организма человека, стимулируя репаративные процессы, активируя локальный противовирусный иммунитет. Катионные антимикробные играют ключевую роль в обеспечении первой линии защиты макроорганизма от инфекции. Дефензины составляют большое семейство низкомолекулярных катионных пептидов, которые способны к киллингу широкого спектра патогенов. Они эффективны в отношении ДНК- и РНК-вирусов, ингибируя их репликацию [А.С.

Будихина, Б.В. Пинегин, 2011; Van't Hof W., Veermann E., et al., 2011]. Исходя из вышеизложенного, с целью усовершенствования метода профилактики возникновения неопластических процессов у бессимптомных носителей вирусов папилломы человека высокого канцерогенного риска, нами проведена терапия препаратом липотейхоевой и глицирризиновой кислот («Кольпоцид CrystalMatrix-FS» гель вагинальный, Эманси, РФ) - 1 раз в сутки интравагинально 10 дней каждые 6 месяцев в течение пяти лет (время мониторинга). Женщин с латентным носительством ПВИ разделили на 2 группы: IV - 45 пациенток, которым проводилось лишь динамическое наблюдение в течение 5 лет; V - 45 пациенток, которым проводилась топическая профилактика препаратом «Кольпоцид». Кроме того, была проведена коррекция сопутствующих нарушений вагинального микробиоценоза. Мониторинг исследуемых групп выявил, что в первый год CIN I обнаружен у 4,4% пациенток IV группы (в V группе таких пациенток не было), в последующие 4 года количество CIN I увеличилось до 32,4 и 12,4% соответственно в IV и V группах. Пациентки с неопределенной кольпоцитологической структурой соскоба шейки матки (ASC-US), требующие наблюдения и дальнейшей верификации составили: в IV группе - 12,4%, а в V – 6,6%. Средняя динамика вирусной нагрузки в группе пассивного наблюдения (IV) за пятилетний срок была равна 45,6, при этом в V группе она оказалась в 1,8 раз ниже (25,0). Динамическая оценка содержания метаболитов эстрогенов выявила достоверную динамика уменьшения пациенток с коэффициентом $2\text{-ОНЕ1}/16\alpha\text{-ОНЕ1}$ менее 1,5 в V группе ($P>0,05$). В среднем низкий коэффициент $2\text{-ОНЕ1}/16\alpha\text{-ОНЕ1}$ в V группе уменьшился за 5 лет в 1,7 раза по сравнению со стабильным (и даже несколько возросшим) коэффициентом в IV группе.

Полученные нами данные об изменениях локального гомеостаза при патологии шейки матки, ассоциированной с вирусом папилломы человека явились патогенетическим обоснованием для проведения цитокинотерапии больным с

цервикальной интраэпителиальной неоплазией легкой и средней степени (рекомбинантный IL-2 – «Ронколейкин»). Причиной выбора данного иммуномодулятора явились, во-первых, его описанные ранее плейотропные воздействия на различные звенья функционирования иммунной системы и, во-вторых, выявленные у женщин с CIN нарушения синтеза и рецепции IL-2, а также макрофагальные дефекты. Интерлейкин-2, как и большинство известных цитокинов, действует в наибольшей степени короткодистантно. Поэтому, для того, чтобы достичь достаточных эффективных концентраций IL-2 в условиях его воздействия на иммунологически активные клетки слизистой цервикальной зоны, мы вводили его подкожно в две точки в переднюю брюшную стенку на 3 см медиальнее *spina iliaca anterior superior* с учетом лимфооттока. Это также позволило снизить дозу вводимого препарата до 0,25 мг (250000 ЕД) по 0,5 мл трижды с интервалом 72 часа. При CIN II совместно с цитокинотерапией проводилось деструктивное лечение патологических очагов на шейке матки (радиоволновая абляция).

В качестве альтернативной терапии нами выбран один из наиболее эффективных, на сегодняшний момент [Ю.В. Никогда, 2011], комплексов терапии, включающий противовирусную терапию препаратом «Ферровир», способным супрессировать размножение ВПЧ и элиминировать измененные и несущие чужеродные антигены клетки, в том числе и онкобелки Е6 и Е7, в сочетании с препаратом рекомбинантного интерферона $\alpha 2\beta$ местного действия в виде вагинальных свечей – «Генферон».

Нами был произведен сравнительный анализ клинко-микробиологической, иммунологической и цитобиохимической эффективности терапии CIN I-II в течение годичного мониторинга. Для этого все больные CIN I-II были разделены на группы: VI - 80 больных CIN I – комплексная терапия «Ферровир» + «Генферон»; VII - 80 больных CIN I – топическая терапию препаратом «Ронколейкин»; VIII - 65 больных CIN II – радиоволновая абляция +

«Ферровир» + «Генферон»; IX - 65 больных CIN II – радиоволновая абляция + «Ронколейкин». При исследовании динамики цитокольпоскопической картины у женщин с CIN I, что в VI группе через 1 месяц после окончания лечения у 26,25% пациенток выявлена нормальная кольпоскопическая картина, при этом в VII группе таких пациенток было 72,5% (через 6 месяцев их количество составляло, соответственно, 28,75% и 76,25%, а через 12 месяцев было зарегистрировано некоторое увеличение рецидивов ПВИ в VI группе - 21,25% нормальных кольпоскопических картин, при этом в VII группе их количество практически не изменилось - 78,75%). По данным клинико-кольпоскопического индекса (ККИ) и кольпоскопического индекса Рейда (КИР), через месяц в VI группе на 23,75% (в 3 раза) увеличилось количество пациенток с ККИ 0-3 балла, а в VII группе - на 53,75% (в 6 раз) (в течение годичного мониторинга ККИ в 0-3 балла в VI группе составили: 22,5% и 17,5% (6 и 12 месяцев), а в VII группе - 66,25 и 62,5%). КИР 0-2 балла в VI группе увеличился на месячном сроке на 21,25% (в 1,6 раза), а в VII группе - на 57,5% (в 2,6 раз) (через 6 и 12 месяцев в VI группе он составил 38,75% и 36,25%, в VII группе - 90,0 и 93,75%). У больных CIN II через 1 месяц от начала проведения лечения нормализация цитокольпоскопической картины зарегистрирована у 69,2% пациенток VIII группы, в IX группе регресс патологических изменений эпителия шейки матки выявлен в 86,1% (через 6 месяцев количество пациенток с нормальной кольпоскопической картиной составило в этих группах, соответственно, 58,4% и 89,2%, через 12 месяцев - 41,5% и 83,1%). Оценка динамики ККИ и КИР у больных CIN II показала, что через 1 месяц у женщин VIII группы ККИ 0-3 балла зарегистрирован в 72,3% (увеличился на 66,15% - в 11,7 раз), в IX группе ККИ 0-3 балла вырос до 81,5% (на 76,9% - в 17,7 раз) (через 6 и 12 месяцев в VIII группе ККИ в 0-3 балла составили 47,7% и 43,05%, а в IX группе - 86,15 и 63,1%). На данных сроках мониторинга КИР 0-2 балла в VIII группе увеличился до 43,1% (1 месяц), 32,3% (6 месяцев) и 29,2% (12 месяцев) (в IX группе эти показатели составили: 60,0-

66,2-55,4% - 1, 6 и 12 месяцев). Соответственно, цитокольпоскопическая оценка лечения показала более высокую эффективность иммуномодулирующей терапии препаратом гИЛ-2 (при CIN I в среднем в 1,8, а при CIN II - в 2,6 раза).

Молекулярно-генетическое исследование эпителиальных клеток цервикального канала методом ПЦР с определением типа ВПЧ ВКР и вирусной нагрузки показало, что через 6 месяцев в VI группе ПЦР-негативация ДНК ВПЧ обнаружена у 85,6% пациенток, через 12 месяцев – у 81,25%, в VII группе на данных сроках ПЦР-негативация выявлена у 93,1%, т.е. в среднем на 9,7% больше. После комплексного лечения пациентов VI группы зарегистрировано уменьшение повышенной (>5 Lg) и значимой (>3 Lg) вирусной нагрузки до 12,5% (6 месяцев) и некоторое увеличение до 17,5% в 12 месяцев (медиана увеличения составила $13,5 \pm 2,0\%$). В VII группе снижение пациенток с повышенной и значимой вирусной нагрузкой было: до 2,5% на 6 месяце наблюдения и до 5,0% на 12 месяце (медиана $3,75 \pm 1,25\%$) (т.е. в VII группе уменьшение вирусной нагрузки регистрировалось в среднем в 3,6 раза чаще, чем в VI). В IX группе через 6 месяцев от окончания лечения ВПЧ ВКР составило 4,6% (снизилось на 53,9%), а через 12 месяцев еще понизилось на 1,5%, в VIII группе на данных сроках мониторинга - 44,6 и 46,1% соответственно (в 1,4 раза). После лечения в VIII группе зарегистрировано уменьшение повышенной и значимой вирусной нагрузки до 16,9% (6 месяцев) и увеличением до 24,6% к 12 месяцам (медиана возрастания составила $20,75 \pm 4,3\%$). В эти сроки в IX группе количество пациенток со значимой вирусной нагрузкой снизилось до 1,5% (6 и 12 месяцев) (медиана – $2,5 \pm 0,25\%$) (в IX группе уменьшение вирусной нагрузки регистрировалось в среднем в 8,3 раза чаще, чем в VIII). Таким образом, оценка сравнительной эффективности лечения CIN I-II по уменьшению ПЦР-негативации ВПЧ ВКР и динамике вирусной нагрузки выявило для CIN I в среднем в 2,5 раза большую эффективность терапии препаратом рекомбинантного ИЛ-2. Для CIN II эффективность Ронколейкина в комплексе с

радиоволновой деструкцией очагов поражения была в 1,3 раза (по критериям ПЦР-негативации ВПЧ) и в 8,3 раза выше (по критериям уменьшения вирусной нагрузки).

ПЦР-обнаружение онкобелка E7 в динамике выявило следующую картину в группах больных CIN I (VI-VII): в VI группе выявила через 1 месяц после окончания терапии уменьшение E7 в среднем на 20,85%, в последующем содержание E7 в этой группе имела некоторую тенденцию к увеличению (на 4,2% через 6 месяцев и еще на 6,6% - через 1 год) (т.е. клиническая годовая эффективность составила $13,2 \pm 3,1\%$ ($p < 0,05$)). В VII группе через 1 месяц среднее количество E7 уменьшилось на 30,85%, а при годовом мониторинге данный показатель остался неизменным (клиническая годовая эффективность - $31,25 \pm 1,5\%$, т.е. в 2,4 раза больше, чем в VI группе) ($p < 0,05$). В группах больных CIN II (VIII-IX) до начала терапии E7 выявлялся в среднем в $83,4 \pm 0,2\%$: через 1 месяц после окончания терапии в VIII группе зафиксировано уменьшение E7 в среднем на 68,2%, в последующем содержание онкобелка E7 составило: 16,9% через 6 месяцев и 22,1% - через 1 год): клиническая годовая эффективность - $61,5 \pm 4,2\%$ ($p < 0,05$). В IX группе через 1 месяц среднее количество E7 уменьшилось на 81,0% (исходный 83,0%), а при годовом мониторинге данный показатель остался неизменным (клиническая годовая эффективность составила $80,4 \pm 1,8\%$, т.е. в 1,3 раза больше, чем в VIII группе) ($p < 0,05$). Анализ динамики онкобелка E7 в сочетании с коэкспрессией биомаркеров p16ink4D и Ki-67 и низкого коэффициента 2-ONE1/16 α -ONE1 (менее 1,5) выявил заметные отличия в группах: коэкспрессия биомаркеров p16ink4D и Ki-67 в VI группе уменьшилась в среднем в $2,2 \pm 0,25$ раза (с 13,75 до 6,25% - p16ink4D; с 11,25 до 5,0% - Ki-67), затем в течение годового мониторинга она несколько увеличилась (на 2,5% - p16ink4D и 3,75% - Ki-67). В VII группе через 1 месяц данные биомаркеры не были обнаружены ни у одной женщины, в течение годового мониторинга их количество уменьшилось в среднем в $11,0 \pm 1,0$ раз (с 15,0 до 1,25% - p16ink4D; с

12,5 до 1,25% - Ki-67). Коэффициент 2-OHE1/16 α -OHE1 менее 1,5 VI группе в течение годового мониторинга тестировался в среднем в 26,7 $\pm$ 5,2% (уменьшился в среднем 2,7 раза), в VII группе - в 11,7 $\pm$ 2,5% случаев (уменьшился в среднем 5,7 раза) ($p=0,05$). В VIII группе в 1 месяц наблюдения коэкспрессия p16ink4D и Ki-67 уменьшилась в среднем в 19,2 $\pm$ 8,5 раза (с 47,7 до 4,6% - p16ink4D; с 43,1 до 1,5% - Ki-67), затем в течение годового мониторинга она практически не изменилась (на 5,5% - p16ink4D и 3,2% - Ki-67). В IX группе в течение годового мониторинга данные биомаркеры не были обнаружены ни у одной женщины. Коэффициент 2-OHE1/16 α -OHE1 менее 1,5 в VIII группе в течение годового мониторинга определялся в среднем в 29,2 $\pm$ 3,15% (уменьшился в 2,4 раза), в IX группе на этих сроках - в 11,7 $\pm$ 3,2% случаев (уменьшился в среднем 7,1 раза) ($p<0,05$). Таким образом, изучение сравнительной эффективности лечения CIN I-II по динамике изменения онкобелка E7, гиперэкспрессии p16ink4 α , Ki67 и 2-OHE1/16 α -OHE1 выявило для CIN I в 3,2, а для CIN II в 3,4 раза большую эффективность цитокинотерапии препаратом rIL-2.

При анализе состояния микробиоценоза на фоне терапии у наших пациенток выявлено, что в VI группе общая инфекционная нагрузка через 6 месяцев составила 13,75% от исходного уровня, а через 12 месяцев - 17,5%, причем у большинства женщин обнаружены те же микроорганизмы, что и до лечения (медиана годовой инфекционной нагрузки составила 15,6), в VII группе на данных сроках общая инфекционная нагрузка составила соответственно 6,25% и 8,75% от исходного уровня (медиана - 7,5), т.е. в 2 раза меньше. В группах с CIN II была зарегистрирована та же динамика инфекционной общей нагрузки: VIII группа медиана – 22,65; IX группа – 9,1 (средняя разница эффективности составила 2,5 раза). Состояние вагинальной микрофлоры по унифицированной схеме Херлена за 12 месяцев мониторинга выявило количество мазков с определением «дисбиоз» в VI группе в среднем 9,4 $\pm$ 2,25%, а в VII группе - 5,6 $\pm$ 1,5% (т.е. в 1,7 раза меньше ($p<0,05$), в VIII и IX группах «дисбиоз»

зарегистрирован в $10,75 \pm 2,5\%$ и $4,6 \pm 1,5\%$ соответственно (т.е. в 2,3 раза реже) ($p < 0,01$). Оценка по методу Ньюджента показала, что признакам бактериального вагиноза (7-10 баллов) соответствовало в среднем $35,9 \pm 0,4\%$ больных CIN I-II ($p < 0,01$). Через 6 месяцев в VI группе этот показатель уменьшился на 30,0%, а еще через 6 месяцев возрос на 1,25% (годовая медиана составила $4,4 \pm 1,25\%$), в VII группе через 6 месяцев количество пациенток с оценкой 7-10 баллов по Ньюдженту не наблюдалось, на двенадцатимесячном сроке их было 3,75%. В VIII и IX группах за 6 месяцев количество женщин с признаками бактериального вагиноза снизилось на 33,8% в VIII и на 33,9% в IX группе, за 12 месяцев таких пациентов группах оказалось равное количество – 4,6%. По результатам исследования влагалищной микрофлоры методом ПЦР через 12 месяцев после лечения количество вагинальных дисбиозов (умеренных и выраженных) снизилось до $10,3 \pm 3,2\%$. При этом в VI и VIII группах среднее снижение за 12 месяцев наблюдения составило $12,3 \pm 2,4\%$, а в VII и IX группах – $8,3 \pm 2,25\%$ (т.е. в 1,5 раза больше).

При динамической оценке клинической картины специфического вульвовагинита и цервицита в исследуемых группах с балльной оценкой каждого из мониторируемых объективных и субъективных показателей на месячном сроке наблюдения в обеих группах с CIN I отмечено снижение суммы баллов, но, если в VI группе, данный показатель снизился в 3,6 раза, то в VII группе - в 7,5 раза. Через 6 месяцев отмечено возрастание клинических признаков в VI группе (до $2,11 \pm 0,22$ балла, т.е. в 1,5 раза повысилось по сравнению с первым месяцем наблюдения) и в 1,1 раза в VII группе ($0,74 \pm 0,07$ балла) ($P > 0,05$). Исходная суммарная субъективно-объективная оценка у больных CIN II составляла $9,9 \pm 0,54$ баллов, через месяц она уменьшилась на 7,9 баллов в VIII и на 8,38 баллов в IX группе. При этом в ходе годичного мониторинга обнаружено, что возвращение прежней симптоматики по сумме баллов в 2,5 раза чаще ($2,36 \pm 0,19$ против $0,83 \pm 0,11$ баллов соответственно) происходило в VIII группе.

Таким образом, в проведенном доказана высокая клинико-микробиологическом, цитобиохимическом и иммунологическом исследовании пациенток с CIN I-II, показано, что предлагаемый метод лечения с использованием rIL-2 (при CIN II в сочетании с радиоволновой аблацией очагов поражения на шейке матки), является более эффективным в отношении ранней и поздней (6 и 12 месяцев) санации, а также имеет более высокую клиническую эффективность (на $23,1 \pm 3,7\%$ - по критериям «полного клинического выздоровления» и на $18,9 \pm 2,8\%$ - по критериям «клинического улучшения»), заключающуюся в более полноценном исчезновении проявлений заболевания и создании условий для повышения местной резистентности к заражению, уменьшении количества манифестных форм заболевания, а также активации иммунных и оксидативных механизмов саногенеза.

ВЫВОДЫ

1. В Краснодарском крае за 5 лет (2011-2015 гг.) количество женщин с латентными формами папилломавирусной инфекции увеличилось на 184% (в Российской Федерации на 224%), а количество заболевших цервикальными интраэпителиальными неоплазиями увеличилось на 177% (в основном за счет CIN легкой степени - $87,1 \pm 4,6\%$, $p < 0,05$) (в РФ – 218%). Заболеваемость CIN повысилась в 1,8 раз как в интенсивном, так и в стандартизованном исчислении, причем ($p < 0,05$) достоверно выше у жительниц городов (6825 случаев на 100 тысяч женского населения против 3913). В 2015 году показатель CIN возрос в городах края на 175,9% (в сельской местности - на 183,5%). В зону повышенного риска заболеваемости ВПЧ-ассоциированной патологией шейки матки входит 44,7% территории края.
2. Анализ латентного ВПЧ-носительства и заболеваемости и CIN в возрастном аспекте выявил, что суммарно реализация ВПЧ-носительства в CIN происходит в возрасте 21-35 лет в 72,9%. (медиана латентных форм ПВИ за 5 лет составила $21,6 \pm 2,3$ лет, а возраста больных CIN - $28,4 \pm 2,6$ года). То есть, для реализации вирусоносительства в CIN необходимо в среднем $6,8 \pm 1,1$ лет ($p < 0,05$).
3. Расчет диагностических коэффициентов (ДК) риска по развитию цервикальной неоплазии позволила прогнозировать исход (благоприятный или неблагоприятный) перехода латентных форм ПВИ в CIN: ДК от -26 до +18 бит (благоприятный исход) наблюдался у 12,2% обследованных, ДК от +19 до +26 бит (95% риска перехода в CIN) в 74,4% случаев и ДК свыше 26 бит (99% риска перехода в CIN) – в 13,4%. В целом, суммарно риск реализации латентных форм ПВИ в CIN более 95% выявился у 87,8% пациенток.
4. Основными инфекционными агентами в Краснодарском крае, как при латентных формах ПВИ, так и при CIN, являются высокоонкогенные типы ВПЧ – 16 (25,1 и 39,3% соответственно), 18 (19,7 и 22,4%) и 51 типы (24,6 и

21,1%), которые самостоятельно и в ассоциациях встречались у 69,4% вирусоносителей и у 82,8% больных CIN. При этом, высокая вирусная нагрузка для ВПЧ 16 и 18 типа установлена в целом у $73,9 \pm 26,3\%$, а для ВПЧ 13 и 51 типов - у $23,8 \pm 6,3\%$ пациенток. Поэтому начавшееся распространение на территории Краснодарского края ВПЧ 13 и 51 типов, которые, в настоящее время, не имеют высокой вирусной нагрузки, чаще всего, вызывают транзитное ВПЧ-носительство.

5. Внедрение в практику комплексной диагностики ВПЧ-ассоциированных заболеваний у женщин с расчетом предлагаемых диагностических коэффициентов риска (географические, анамнестические, клинско-кольпоскопические, цитологические и микробиологические критерии) позволяют объективизировать стадию, клиническую картину заболевания, адекватно оценить прогноз заболевания и, соответственно, правильно индивидуализировать методы терапии.
6. Комплексное определение онкобелка E7, экспрессии p16ink4D и Ki-67, соотношения метаболитов 2-гидроксиэстрогена и 16- α -гидроксиэстрогена (2-OHE1/16 α -OHE1) у пациенток с папилломавирусной инфекцией позволит более точно, как диагностировать степень цервикального интраэпителиального поражения, так и определить индивидуальный прогноз развития заболевания, и, соответственно, дифференцировать лечебные мероприятия каждой отдельной пациентки.
7. Папилломавирусная инфекция, проявляющаяся в виде цервикальной интраэпителиальной неоплазии, в большинстве случаев манифестируется на фоне сопутствующей урогенитальной инфекции, чаще в виде анаэробных дисбиозов. При этом прогрессированию процесса способствует изменение биохимического состава вагинальной жидкости, характеризующиеся уменьшением количества молочной кислоты, ионов железа и кальция и меди, а также повышением уровня внутриклеточных ферментов (АЛТ, АСТ,

щелочной фосфатазы и амилазы), которые являются предикторами активации цитолитических процессов.

8. В зависимости от преобладания генома про- или противовоспалительных цитокинов периферической крови были выделены 3 генотипа: сбалансированный, провоспалительный и противовоспалительный. При этом у больных CIN I-II (54,7% и 71,2% соответственно) выявлено преобладание противовоспалительного генотипа и провоспалительного при латентных формах ПВИ (56,7%) ($P > 0,05$). Локальные иммунные изменения при CIN, характеризующиеся снижением концентрации $IFN\gamma$ и $IL-1\beta$, активности миелопероксидазы и неспецифической эстеразы в макрофагах цервикальной зоны, приводят к оксидативным нарушениям в эпителиоцитах с повышением образования реактивных форм кислорода и азота, вызывающего пероксидативные процессы липидов, интенсивное образование свободнорадикальных форм кислорода.
9. При латентных формах папилломавирусной инфекции на фоне коррекции дисбиотических вагинальных нарушений с профилактической целью целесообразно применять препараты, содержащие глицирризиновую и липотейхоевую кислоты, которые при нашем клиническом исследовании показали уменьшение реализации латентных форм ПВИ в CIN (в 1,8 раз), снижение вирусной нагрузки высокоонкогенными типами ВПЧ и количества пациенток с низким коэффициентом метаболитов эстрогенов ($ONE1/16\alpha-ONE1$).
10. Разработанное патогенетически обоснованное лечение ВПЧ-ассоциированных цервикальных интраэпителиальных неоплазий лёгкой и средней степени тяжести с топической иммуномодулирующей терапии препаратом рекомбинантного $IL-2$ показало более высокую эффективность, как в виде монотерапии (CIN I) (в среднем в 1,8 раза), так и совместно с радиоволновой аблацией (CIN II) (в среднем в 2,6 раза).

Предложенный алгоритм менеджмента пациенток с латентными формами ПВИ и цервикальной интраэпителиальной неоплазией различной степени поражения с расчетом диагностических коэффициентов позволяет оптимизировать диагностическую, профилактическую и лечебную составляющие их ведения, и снизить заболеваемость раком шейки матки

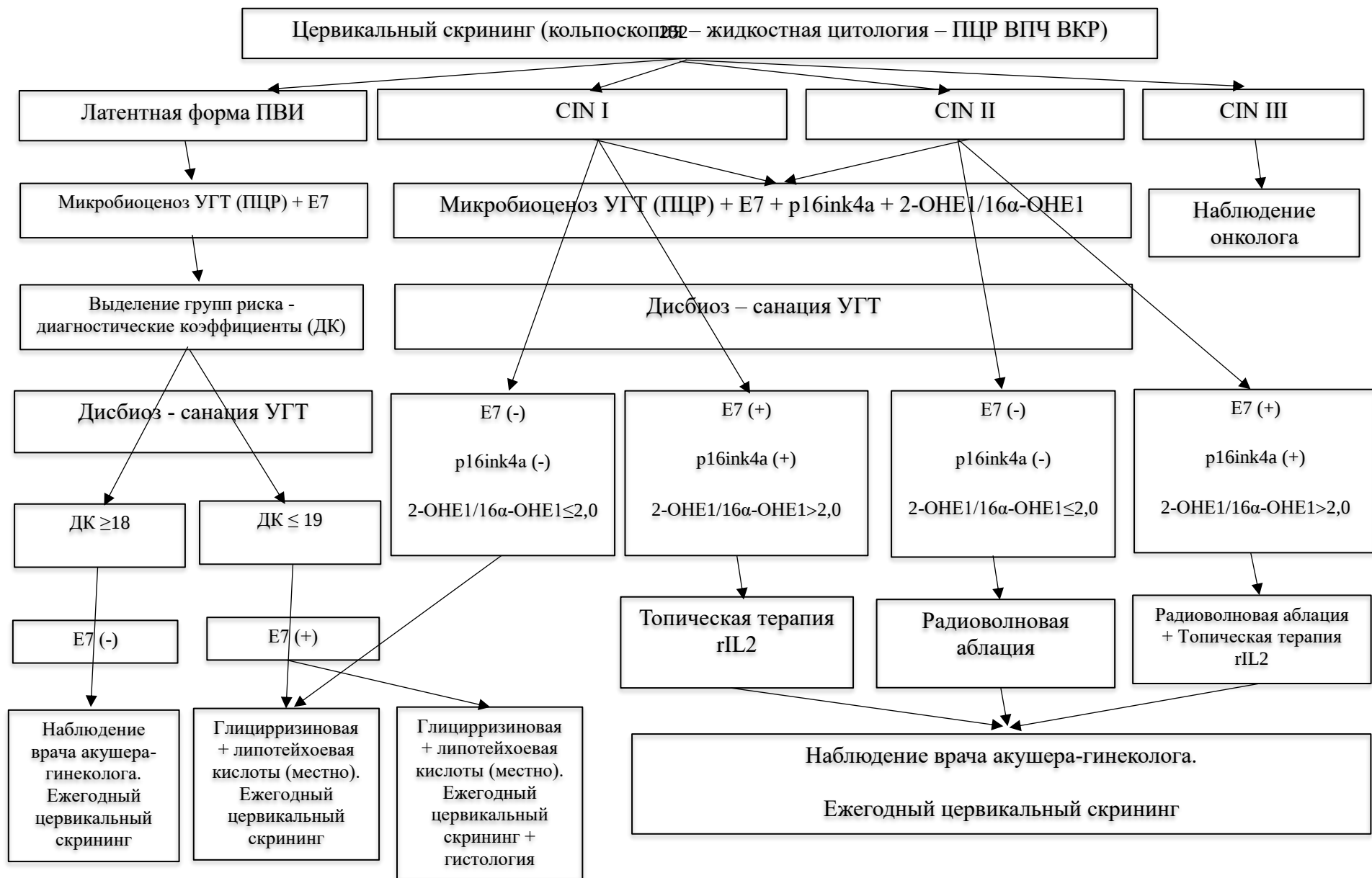
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Необходимо активное внедрение первичной (пропаганда здорового образа жизни, отказ от курения, ВПЧ-вакцинация) и вторичной (цервикальный и ВПЧ-скрининг, выделение групп риска, профилактическая терапия пациентов с латентными формами ПВИ) профилактики ВПЧ-ассоциированных поражений шейки матки.
2. Пациенток с латентным носительством ВПЧ ВКР с диагностическим коэффициентом риска по развитию CIN выше +19 бит или положительным тестом на онкопротеин E7 рекомендуется назначение топической профилактической терапии препаратом, содержащим глицирризиновую и липотейхоевую кислоты - «Кольпоцид CrystalMatrix-FS» гель вагинальный (тюбик 5 мл с наконечником, упаковка 5 - применялся 1 раз в сутки интравагинально 10 дней каждые 6 месяцев).
3. У больных с ВПЧ-ассоциированными CIN I-II (после санации урогенитального тракта с учетом этиологического фактора и контролем излеченности), целесообразно проведение терапии препаратом рекомбинантного интерлейкина-2 («Ронколейкин»). Для этого ампулу препарата (1,0 мг, 1000000 Ед.) растворяли в 2 мл воды для инъекций и инсулиновым шприцом вводили с учетом лимфооттока (подкожно в 2 точки в переднюю брюшную стенку на 3 см медиальнее spina iliaca anterior superior) по 0,5 мл трижды с интервалом 72 часа. При CIN II целесообразно совместно

с топической иммуномодулирующей терапией провести деструктивное лечение шейки матки (радиоволновая абляция).

4. Критериями эффективности терапии следует считать, помимо ВПЧ-типирования с контролем вирусной нагрузки, кольпоскопии и цитологии, коэкспрессию онкобелка E7 и p16ink4D.
5. *Алгоритм менеджмента латентных форм папилломавирусной инфекции и цервикальных интраэпителиальных неоплазий:*

Комплексный лабораторный анализ факторов, способствующих неопластическим процессам в шейке матки позволил разработать алгоритм ведения данной патологии. Диагностика, направленная на прогнозирование развития цервикальной неоплазии, должна основываться на комплексном цервикальном скрининге, включающем проведение расширенной кольпоскопии, жидкостной цитологии и ПЦР-тестировании ВПЧ ВКР с тестированием вирусной нагрузки, а при выявлении CIN – внедрение в диагностику определение молекулярных биомаркеров (коэкспрессия онкобелка E7 и p16ink4D) позволит установить степень угрозы и принять правильное клиническое решение (схема 4.1).



СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Автандилов Г.Г., Глухова Ю.К. Сравнительная оценка точности плоидометрической диагностики предрака и рака шейки матки по результатам гистологических и цитологических исследований // Российские медицинские вести. - 2014 - Т.9, №2. - 35-38
2. Автандилов Г.Г., Глухова Ю.К., Шабалова И.П. Плоидометрическая диагностика предраковых процессов и рака шейки матки по цитологическим препаратам// Клиническая лабораторная диагностика. — 2014 - №11. - 45-47
3. Адамян Р.Т. Сравнительная оценка эффективности цитологического и гистологического методов диагностики онкопатологии эндометрия и слизистой оболочки цервикального канала // Вопросы онкологии. - 2012 - №3. - 377-379
4. Азамова З.Ш. Современная диагностика фоновых и предраковых процессов шейки матки как профилактика малигнизации // Материалы международного конгресса "Практическая гинекология: от новых возможностей к новой стратегии". Москва, 2009. – С.5
5. Азамова З.Ш. Тактика лечения фоновых и предраковых процессов шейки матки. // Материалы международного конгресса "Практическая гинекология: от новых возможностей к новой стратегии". Москва, 2009. – С.6
6. Аковбян В.А., Анкирская А.С., и соавт. Лечение и профилактика проявлений папилломавирусной инфекции урогенитального тракта. // ЗППП. – 2009. - №1. – с. 73-75.
7. Александреску Д., Лука В., Паску Ф. Атлас кольпоскопии: Пер.с рум. - Бухарест. - 2003 – 234 с.
8. Александрова Ю.Н., Лыщев А.А., Сафронникова Н.Р. и др. Папилломавирусная инфекция у здоровых женщин С-Петербурга // Вопр. Онкол. – 2010. – т.6. - №2. – с. 175-179.
9. Анкирская А.С. Вагинальные инфекции, вызванные условно-патогенными микроорганизмами (бактерии, грибы, микоплазмы): критерии диагностики // Современные методы диагностики, терапии и профилактики ИППП и других урогенитальных инфекций. – 2009. – с. 6-7.

- 10.Аполихина И.А. Оптимизация диагностики и лечебных мероприятий у больных папилломавирусной инфекцией гениталий: Дисс.... канд. мед. наук. – М., 1999. – 22 с.
- 11.Аполихина И.А. Папилломавирусная инфекция гениталий у женщин. Под ред. В.И. Кулакова. М: ГэотарМед. 2002.
- 12.Арипджанова Д.С. Новый подход к лечению ПВИ гениталий у женщин // Материалы первого регионального научного форума "Мать и дитя". Казань, 2009. С. 201.
- 13.Артамонова Н.В., Беляев А.А. Роль эпидемиологических факторов в возникновении цервикальной интраэпителиальной неоплазии шейки матки у женщин разных возрастных групп // Материалы международного конгресса "Практическая гинекология: от новых возможностей к новой стратегии". Москва, 2009. – С. 12.
- 14.Ахмедова М.П., Иванова Н.Б. Оценка скрининговых методов выявления предраковых заболеваний шейки матки. // Материалы международного конгресса "Практическая гинекология: от новых возможностей к новой стратегии". Москва, 2006. – С. 14.
- 15.Ашмарин Ю.К., Хлебни К.Н. Вирусные папилломы человека // Вестник дерматологии. 2007. №12. С. 23-30.
- 16.Ашрафян, Л.А., Боженко, В.К., Антонова, И.Б., и др. Анализ экспрессии генов пролиферации и апоптоза при цервикальных интраэпителиальных неоплазиях и раке шейки матки //Опухоли репродуктивной системы. - 2011. - №4. - С.54-59
- 17.Ашрафян Л.А. и др. Молекулярно-биологические аспекты злокачественной трансформации цервикальных интраэпителиальных неоплазий // Современные технологии в диагностике и лечении гинекологических заболеваний. — Москва, 2007 - 440 - 441.
18. Ашрафян Л. А., Киселёв В. И., Алешикова О. И., Пономарева Ю. В. Результаты консервативной терапии пациенток с цервикальной интраэпителиальной неоплазией I-II степени (CIN I-II)//Акушерство и гинекология. 2015. №12. С. 103-109.

19. Ашфарян Л.А., Антонова И.Б., Бабаева Н.А., Бударина С.О., Басова И.О. Онкобелок E7 как диагностический маркер цервикальных интраэпителиальных неоплазий и рака шейки матки. // Материалы 8 всероссийского научного форума "Мать и дитя". Москва, 2006. – С. 323-324.
20. Бажутова Г.А., Тамразова Л.И. Возможности цитологического метода исследования при профилактическом осмотре материала шейки матки// Клини.лаб. д-ка. - 2014 - №10 - 38 - 40.
21. Баррассо Р. Кольпоскопическая диагностика патологии шейки матки. ЗППП. – 1995. – №5.
22. Бауэр Г. Цветной атлас по кольпоскопии. – ГЭОТАР-Мед., 2012.
23. Бебнева Т.Н., Прилепская В.Н. Папилломавирусная инфекция и патология шейки матки // Гинекология. – 2011. – Т.3., №3. – с. 77-81.
24. Белокриницкая Т.Е. Роль цитокинов в патогенезе нарушений иммунитета и гемостаза у больных с тяжелыми дисплазиями и раком шейки матки// Вопросы онкологии. - 2011 - Т.49, №1. - 51 - 54.
25. Белокриницкая Т.Е., Пономарева Ю.Н., Бунина Е.Н., Ломнева Г.М. Апоптоз-модулирующее влияние папилломавирусной инфекции при цервикальных эпителиальных дисплазиях. // Материалы 8 всероссийского научного форума "Мать и дитя". Москва, 2006. – С. 330-331.
26. Белокриницкая Т.Е., Пономарева Ю.Н., Витковский Ю.А., Мочалова М.Н., Ладыгина Н.М. Провоспалительные цитокины цервикального секрета при цервикальных интраэпителиальных дисплазиях. // Материалы 8 всероссийского научного форума "Мать и дитя". Москва, 2006. – С. 331.
27. Белокриницкая Т.Е., Пономарева Ю.Н., Ломнева Г.М. Роль мутированного гена-супрессора p-53, антигена ядер пролиферирующих клеток и рецепторов половых стероидов в определении прогноза цервикальных интраэпителиальных дисплазий. // Материалы международного конгресса "Практическая гинекология: от новых возможностей к новой стратегии". Москва, 2006. – С. 21.

28. Белоцерковцева Л.Д. и др. Сравнительный анализ различных методов лечения цервикальной интраэпителиальной неоплазии, ассоциированной с ВПЧ-инфекцией // Акушерство и гинекология. - 2015. — №5. — С. 55–60
29. Берлим А.А., Авруцкая В.В. Характеристика пролиферативной активности и состояние апоптоза при продуктивных папилломавирусных поражениях слизистой оболочки шейки матки. // Материалы международного конгресса "Практическая гинекология: от новых возможностей к новой стратегии". Москва, 2006. – С. 22.
30. Берлим А.А., Авруцкая В.В., Дубровина С.О. Способ прогнозирования развития неопластических заболеваний шейки матки на основе анализа гистохимических показателей пролиферации и апоптоза. // Материалы 8 всероссийского научного форума "Мать и дитя". Москва, 2006. – С. 331-332.
31. Благодыр О.В., Иванян А.Н., Мелехова Н.Ю. и др. Эффективность различных методов скрининга рака шейки матки. // Материалы 8 всероссийского научного форума "Мать и дитя". Москва, 2006. – С. 333.
32. Богдасаров А.Ю. Дисплазия шейки матки у женщин, проживающих в условиях воздействия неблагоприятных факторов окружающей среды // Гинекология. - 2015 - №3. - 174 - 177.
33. Борзенко Е.В., Кашуба Э.А., Чернецова Л.Ф. Роль воспаления в патогенезе заболеваний шейки матки // Материалы международной научно-практической конференции «Профилактика рака шейки матки: взгляд в будущее». — Москва, 2008 - 11 - 12.
34. Ботоева Е.А., Борголов А.В., Хитрихеев В.Е., Убеева И.П. Фитокоррекция эктопии шейки матки на фоне дисбиозов влагалищного биотопа. // Материалы международного конгресса "Практическая гинекология: от новых возможностей к новой стратегии". Москва, 2006. – С. 25.
35. Бургхардт. Атлас по патологии шейки матки и кольпоскопии. Лондон-Нью-Йорк, 1991.
36. Быковская О.В. Новые возможности иммуномодулирующей терапии при воспалительных заболеваниях шейки матки, влагалища и вульвы. // Материалы первого регионального научного форума "Мать и дитя". Казань, 2007. С. 208

- 37.Вергейчик Г.И. Формирование групп риска по развитию рака шейки матки среди женщин. Адаптационно-компенсаторные механизмы регуляции функций в современных экологических условиях: Материалы. Мозырь 2010; 39-41
- 38.Взаимодействие вирусных и клеточных генов в опухолях шейки матки / Ф.Л. Киселев, Н.Н. Мазуренко, Г.М. Волгарева, Н.П. Киселева // Молекулярная биология. - 2014 - Т. 38, №2. - 224 - 232.
- 39.Вирусно-бактериальная природа дисплазии и рака шейки матки / М.С. Афанасьев, В.А. Алешкин, С. Афанасьев и др. // Вестник Российской академии медицинских наук. - 2014 - №6. - 35 - 40.
- 40.Вишнякова С.В., Пекарев О.Г. Эффективность современных методов лечения фоновых заболеваний шейки матки. // Материалы 8 всероссийского научного форума "Мать и дитя". Москва, 2006. – С. 345.
- 41.Вознесенская Н.В., Кожемятова И.В. Особенности морфологической картины цервикальной слизи у здоровых женщин. // Материалы 8 всероссийского научного форума "Мать и дитя". Москва, 2006. – С. 345-346.
- 42.Вознесенская Н.В., Кожемятова И.В., Албутова М.Л. Актуальность изучения морфологии цервикальной слизи у женщин с патологией шейки матки. // Материалы III регионального научного форума "Мать и дитя". Саратов, 2009. С. 54.
- 43.Волков В.Г., Захарова Т.В. Опыт применения СО₂-лазерной хирургии в комплексном лечении патологии шейки матки, ассоциированной с вирусом папилломы человека // Вестник новых мед. технологий. – 2010. – Т.VII., №1. – с. 95-97.
- 44.Всесторонняя борьба против рака шейки матки: Руководство по клинической практике. - Женева: ВОЗ, 2014. - 278 с.
- 45.Гайдуков С.Н., Комиссарова О.Н. Использование иммуномодулятора аллокин-альфа в комплексном лечении папилломавирусных поражений шейки матки. // Материалы первого регионального научного форума "Мать и дитя". Казань, 2007. С. 217.
- 46.Гайдуков С.Н., Комиссарова О.Н. Клиническая эффективность иммуномодулятора Аллокин-альфа в комплексном лечении

- папилломавирусных поражений шейки матки. // Материалы III регионального научного форума "Мать и дитя". Саратов, 2009. С. 61.
47. Гайдуков С.Н., Петряева М.А., Ключ О.С., Комисарова О.Н. Роль иммуномодулятора Аллокин-альфа в комплексном лечении папилломавирусных поражений шейки матки. // Terra Medica, 2007, №2 (46). – С. 44–46.
48. Галустян В.С., Почтаренко О.В., Галустян С.А. Радиоволновая хирургия в лечении патологических состояний шейки матки. // Материалы 2-го регионального научного форума "Мать и дитя". Сочи, 2008. – С. 131-132.
49. Голованова В.А., Новик В.И., Гуркин Ю.А. Частота и факторы риска папилломавирусной инфекции и дисплазии эпителия шейки матки у сексуально-активных девушек-подростков // Вопр онкол 2009. 45:6:623—626.5.
50. Горяева Я.С., Попандопуло К.И. Эпидемиология папилломавирусной инфекции высокой степени онкогенного риска (HPV 16/18) на юге Краснодарского края. // Материалы международного конгресса "Практическая гинекология: от новых возможностей к новой стратегии". Москва, 2009. – С. 41.
51. Грибова С.Н., Хрипунова Г.И., Захарова Н.Б., Молчанова Л.Г., Бериханова Р.Р. Локальный уровень интерлейкина-8 при осложненной приобретенной псевдозерозии шейки матки. // Материалы III регионального научного форума "Мать и дитя". Саратов, 2009. С. 76.
52. Григорьева И.И., Глазкова О.Л., Кедрова А.Г. и др. Эпителиальные дисплазии и преинвазивный рак шейки матки, комплексное лечение с учетом этиопатогенеза заболевания. // Материалы 8 всероссийского научного форума "Мать и дитя". Москва, 2006. – С. 366-367.
53. Дмитриев Г.А., Биткина О.А. Папилломавирусная инфекция. М.: Медицинская книга. - 2006. - 76с.
54. Доброхотова Ю.Э. и др. Комплексный подход к лечению предраковых заболеваний шейки матки (HSIL) на фоне ВПЧ // Акушерство и гинекология. — 2011. - №11. - С. 90–94
55. Долгушина В.Ф., Бойко И.В., Евтушенко В.П. Фоновые и предраковые заболевания шейки матки у женщин с генитальной папилломавирусной

- инфекцией. // Материалы международного конгресса "Практическая гинекология: от новых возможностей к новой стратегии". Москва, 2006. – С. 51.
56. Дресвянская Т.В., Окладников Д.В., Цхай В.Б. и др. Оптимизация комплексной терапии папилломавирусной инфекции гениталий у женщин репродуктивного возраста. // Материалы первого регионального научного форума "Мать и дитя". Казань, 2007. С. 234.
57. Дубенский В.В., Кузнецов В.П., Беляев Д.Л., Слюсарь Н.Н. Эффективность иммунокоррекции цитокинами при лечении папилломавирусной инфекции // ЖМЭИ. – 2011. - №5. – с. 54-58.
58. Дяткова А.В., Тулупова М.С. Оптимизация скрининговой диагностики онкологических заболеваний шейки матки // Материалы международной научно — практической конференции «Профилактика рака шейки матки: взгляд в будущее». - Москва, 2008 - 45 - 46.
59. Елисеева М.Ю. и др. Противовирусный эффект инозина пранобекса при ВПЧ-ассоциированных заболеваниях // Акушерство и гинекология. - 2012. - №2. - С. 107–114
60. Ершов Ф. И. Антивирусные препараты. Справочник (2-е издание). М.: ГЭОТАР-Медиа. 2006.-311с.
61. Ершов Ф. И., Киселев О.И. Интерфероны и их индукторы (от молекул до лекарств). М.: ГЭОТАР-Медиа. 2005.-356с.
62. Журкова И.В., Кобызева Т.Ю. Инфекции, передаваемые половым путем и доброкачественные заболевания шейки матки. // Материалы III регионального научного форума "Мать и дитя". Саратов, 2009. С. 102.
63. Заболевания шейки матки, влагалища и вульвы (клинические лекции). М.: МЕДпресс, 2009; 427 с.
64. Зудикова С.И., Костанова С.В. Повышение эффективности радиоволнового метода лечения патологии шейки матки. // Материалы III регионального научного форума "Мать и дитя". Саратов, 2009. С. 112.
65. Зуев В.М., Джигладзе Т.А., Пальцева Е.М. Сканерная лазерная абляция – новый подход в лечении предраковых заболеваний шейки матки. // Материалы первого регионального научного форума "Мать и дитя". Казань, 2007. С. 247.

- 66.Зуева Т.П., Карахалис Л.Ю. Распространенность патологии шейки матки вирусной этиологии среди женщин края. // Материалы 2-го регионального научного форума "Мать и дитя". Сочи, 2008. – С. 144.
- 67.Иванова И.М., Ли Б., Борзых Е.В. Оптимизация диагностики и лечения фоновой патологии шейки матки у женщин репродуктивного возраста. // Материалы международного конгресса "Практическая гинекология: от новых возможностей к новой стратегии". Москва, 2006. – С. 69.
- 68.Иванова И.М., Лищук В.Д., Исакова Л.И. Комплексная терапия субклинических проявлений папилломавирусной инфекции у женщин с патологией шейки матки // Журн. Акушерства и женских болезней. Спец. выпуск. - 2008. - С. 50.
- 69.Иванова Л.В., Симчера И.А., Федина Е.В. Новые подходы в лечении фоновых и предраковых заболеваний шейки матки с использованием высокоэнергетического лазера. // Материалы международного конгресса "Практическая гинекология: от новых возможностей к новой стратегии". Москва, 2006. – С. 67.
- 70.Иванян А.Н., Мелехова Н.Ю., Кондратенко Н.Н. Папилломавирусные инфекции шейки матки как фактор женского бесплодия // Гинекология. - 2013 - Т.5, №4.
- 71.Иванян А.Н., Мелехова Н.Ю., Овсянкина Н.Л. и др. Современные скрининговые программы в патологии шейки матки. // Материалы первого регионального научного форума "Мать и дитя". Казань, 2007. С. 248.
- 72.Иванян А.Н., Мешкова Р.Я., Крюковский С.Б., Мелехова Н.Ю. Комплексное лечение патологии шейки матки, обусловленной вирусом папилломы человека, с применением СО₂-лазерной вапоризации и комплекса эндогенных цитокинов // Вестник Российской ассоциации акушеров-гинекологов. – 2009. - №2. – С. 114-118.
- 73.Иглесиас-Кортит Л., Иглесиас Г.Д. Инфекции половых органов и неопластические изменения шейки матки. Репродуктивное здоровье. Редкие инфекции. М 2008; 2:390—402.7.
- 74.Игошина С.А., Базина М.И., Конных Т.Н., Дряпак Н.С. Зверева С.А., Тростянская А.В. Опыт применения препарата "Панавир" в комплексном лечении папилломавирусной инфекции при фоновых заболеваниях шейки

- матки. // Материалы международного конгресса "Практическая гинекология: от новых возможностей к новой стратегии". Москва, 2006. – С. 70.
- 75.Исаков В.А., Ермоленко Д.К., Ермоленко Е.И.– Герпесвирусные и папилломавирусные инфекции. //Глава в кн: “Инфекции, передаваемые половым путем”. /под ред. В.А.Аковбяна, В.И.Прохоренкова, Е.В.Соколовского. Учебное пособие для системы послевузовского профобразования врачей. М.: Медиа Сфера. 2007.-С.448-513.
- 76.Казачков Е.Л., Сычуглов Г.В., Казачкова Э.А. Ангиогенез в слизистой оболочке шейки матки при плоскоклеточных интраэпителиальных поражениях. // Материалы международного конгресса "Практическая гинекология: от новых возможностей к новой стратегии". Москва, 2006. – С. 73.
- 77.Каллаева А.Х., Алиханова З.М. Роль неспецифической противовирусной терапии в комплексном лечении больных с папилломавирусной инфекцией. // Материалы первого регионального научного форума "Мать и дитя". Казань, 2007. С. 255.
- 78.Каухова Е.Н., Лугуева А.Ю., Панкова О.Ю. Современные подходы к диагностике и лечению эктопии шейки матки// Российский вестник акушера - гинеколога. - 2014 - Т.4, №6. - 65 - 70.
- 79.Качалина Т.С., Качалина О.В., Кузнецова И.А., Январева И.А. Алгоритм обследования пациенток с патологией шейки матки. // Материалы международного конгресса "Практическая гинекология: от новых возможностей к новой стратегии". Москва, 2006. – С. 75.
- 80.Кедрова А.Г. и др. Роль противовирусной терапии в комплексном лечении больных эпителиальными дисплазиями и преинвазивным раком шейки матки // Гинекология. - 2015. - №7. - С. 170–174.
- 81.Кедрова А.Г., Леваков С.А., Челнокова Н.Н. Оптимизация медикаментозной терапии начальных повреждений эпителия шейки матки, ассоциированных с вирусом папилломы человека // Акушерство и гинекология. - 2014. - №8. - С. 88-93
- 82.Кедрова А.Г., Подистов Ю.И., Кузнецов В.В., Брюзгин В.В., Козаченко В.П. Эпителиальные дисплазии и преинвазивный рак шейки матки. Необходимо ли

противовирусное лечение? // Материалы международного конгресса "Практическая гинекология: от новых возможностей к новой стратегии". Москва, 2006. – С. 77.

83. Кетлинский С.А. Перспективы клинического применения рекомбинантных цитокинов. // Иммунология. – 1993 – Т. 13 – С. 87-94.
84. Кетлинский С.А., Симбирцев А.С., Воробьев А.А. Эндогенные иммуномодуляторы. Санкт-Петербург, Гиппократ, 2012.
85. Киселев В.И. Вирусы папилломы человека в развитии рака шейки матки. М.: Компания "Димитрейд График Групп". - 2004. -180с.
86. Киселев В.И. Папилломавирусная инфекция. М., 2013.
87. Кисина В.И., Воробьев П.А. Инфекции, передаваемые половым путём: Протоколы ведения больных. - М.: НЬЮДИАМЕД, 2011. - 255 с.
88. Клинышкова Т.В. и др. Результаты лечения больных с цервикальными интраэпителиальными неоплазиями высокой степени тяжести, ассоциированными с вирусом папилломы человека // Гинекология. - 2012. - Т.14. - №4. - С. 62–66.
89. Клинышкова Т.В., Каратюк Т.И., Самосудова И.Б. ВПЧ-ассоциированные плоскоклеточные интраэпителиальные поражения шейки матки. // Материалы III регионального научного форума "Мать и дитя". Саратов, 2009. С. 125.
90. Ковалев М.И. Лечение гинекологических заболеваний с помощью излучения СО₂-лазера. // Материалы международного конгресса "Практическая гинекология: от новых возможностей к новой стратегии". Москва, 2006. – С. 78.
91. Ковчур П.И., Олейник Е.К., Бахлаев И.Е., Чуров А.В., Олейник В.М. Клиническая эффективность «Аллокина-альфа» и его влияние на экспрессию маркеров регуляторных лимфоцитов Treg при лечении больных с хронической ВПЧ-инфекцией. // Материалы III регионального научного форума "Мать и дитя". Саратов, 2009. С. 127.
92. Козлова В.И., Пухнер А.Ф. Атлас вирусных, хламидийных заболеваний гениталий и цитопатологии. Москва: Авиценна, 1996. 207 с.
93. Козлова В.И., Пухнер А.Ф. Вирусные, хламидийные и микоплазменные заболевания гениталий. Руководство для врачей. – "Ольга", СПб. – 2010.

94. Колесникова Т.Н., Глухов Е.Ю., Кузина Т.В., Громова Л.М. Лечение доброкачественных заболеваний шейки матки методом аргонплазменной коагуляции. // Материалы международного конгресса "Практическая гинекология: от новых возможностей к новой стратегии". Москва, 2006. – С. 80.
95. Кондратьева Е.А. Алгоритм диагностики и ведения больных с патологией шейки матки // Гинекология. — 2013 — Т.5, №4. - 166 - 169.
96. Кондриков Н.И. Неадекватная терминология состояния неизменной и патологически измененной шейки матки. // Материалы международного конгресса "Практическая гинекология: от новых возможностей к новой стратегии". Москва, 2006. – С. 83.
97. Кравинская Т.А. Морфологические особенности доброкачественных заболеваний шейки матки, ассоциированных с папилломавирусной инфекцией в условиях высокой нагрузки ВПЧ. // Материалы III регионального научного форума "Мать и дитя". Саратов, 2009. С. 139.
98. Краснопольский В.И., Радзинский В.Е., Буянова С.Н., Манухин И.Б., Кондриков Н.И. Патология влагалища и шейки матки. М.: Медицина, 1997, 128-35.
99. Кубанов А.А. Содержание интерферона- γ , фактора некроза опухоли- α , интерлейкинов-4 и -12 в цервикальном секрете у пациенток с папилломавирусной инфекцией. // Vestn Dermatol Venerol 2015; 2:36-39.
100. Кудинов С.В. Некоторые иммунно-эндокринные характеристики эктопии шейки матки. // Материалы международного конгресса "Практическая гинекология: от новых возможностей к новой стратегии". Москва, 2006. – С. 89.
101. Куевда Д.А., Шипулина О.Ю., Минкина Г.Н. Диагностика папилломавирусной инфекции: количественный подход. // Материалы международного конгресса "Практическая гинекология: от новых возможностей к новой стратегии". Москва, 2006. – С. 90.
102. Кузьменко Е.Т., Лабыгина А.В. Роль определения ВПЧ высокого и среднего онкогенного риска у женщин с патологией шейки матки. // Материалы международного конгресса "Практическая гинекология: от новых возможностей к новой стратегии". Москва, 2006. – С. 92.

103. Кулаков В.И., Тохиян А.А. Проблемы злокачественных новообразований репродуктивной системы в практике гинеколога // Журн. Акушер. и женск. болезней. – 2000. – С. 9-12.
104. Кустаров В.Н., Веселова О.Н., Жаринов Г.М. Опыт применения препарата «Индинол» в лечении дисплазий шейки матки. // Материалы III регионального научного форума "Мать и дитя". Саратов, 2009. С. 156.
105. Лазарева О.В., Рудакова Е.Б., Цыганкова О.Ю. Болезни шейки матки на фоне папилломавирусной инфекции и влагалищного дисбиоза. // Материалы международного конгресса "Практическая гинекология: от новых возможностей к новой стратегии". Москва, 2006. – С. 98.
106. Лебедева М.И., Тутельян А.В., Роговская С.И. Оптимизация диагностики и лечения больных цервицитами, ассоциированными с папилломавирусной инфекцией. // Материалы 8 всероссийского научного форума "Мать и дитя". Москва, 2006. – С. 435-436.
107. Левицкий В.А., Мационис А.Э., Буштырева И.О. Клиническое значение P53 при цервикальных интраэпителиальных неоплазиях. // Материалы III регионального научного форума "Мать и дитя". Саратов, 2009. С. 272.
108. Логинова Н.С. Повышение эффективности терапии папилломавирусной инфекции с помощью коррекции индивидуальных особенностей интерферонового статуса // Terra Medica №1(1), 2013.
109. Магакян С.Г., Шварев Е.Г. О перспективах применения метода морфологического анализа шеечной слизи при фоновых и предраковых заболеваниях шейки матки. // Материалы международного конгресса "Практическая гинекология: от новых возможностей к новой стратегии". Москва, 2006. – С. 102.
110. Макаров Э.В., Давидян Л.Ю., Багдасаров А.Ю., Олейникова Д.В. Результаты микроскопического исследования содержимого влагалища у женщин с патологией шейки матки. // Материалы международного конгресса "Практическая гинекология: от новых возможностей к новой стратегии". Москва, 2006. – С. 104.

111. Макаров Э.В., Давидян Л.Ю., Канн Н.И., Багдасаров А.Ю., Олейникова Д.В. Результаты бактериологического исследования содержимого влагалища у женщин с патологией шейки матки. // Материалы международного конгресса "Практическая гинекология: от новых возможностей к новой стратегии". Москва, 2006. – С. 105.
112. Манухин И.Б., Минкина Г.Н. Жидкостная цитология в диагностике заболеваний шейки матки. // Материалы международного конгресса "Практическая гинекология: от новых возможностей к новой стратегии". Москва, 2006. – С. 112.
113. Манухин И.Б., Минкина Г.Н., Геворкян М.А. Генитальная папилломавирусная инфекция: Метод. реком. М., 1997; 10 с.
114. Манухин И.Б., Минкина Г.Н., Сапрыкина О.А., Багирова М.О. Иммунные и микробиологические аспекты заболеваний шейки матки. // Актуальные вопросы клинической медицины. – М., ЮН. – 2013.
115. Манухин И.Б., Назаренко З.Н., Петрович Ю.А. и др. Биохимический метод ранней диагностики генитальной папилломавирусной инфекции. // Материалы 8 всероссийского научного форума "Мать и дитя". Москва, 2006. – С. 452-453.
116. Мараззо Д., Котски Л.А., Стейн К.Л. и др. Генитальная инфекция, вызванная вирусом папилломы человека у женщин, имеющих сексуальные отношения с женщинами. ИППП 2009; 6:8—12.10.
117. Мелехова Н.Ю. Вирусные поражения гениталий у женщин. – М. – 2005. – С. 31-56.
118. Минкина Г.Н., Гаврикова М.В., Фириченко С.В., Калинина В.С. Роль ВПЧ-тестирования в менеджменте цервикальных интраэпителиальных поражений низкой степени тяжести. // Материалы международного конгресса "Практическая гинекология: от новых возможностей к новой стратегии". Москва, 2006. – С. 119.
119. Новик В.И. Гистоцитологические сопоставления при предопухолевых заболеваниях и плоскоклеточном раке шейки матки. // Лабораторное дело. – 2004. №6. С. 328-331.

120. Об утверждении Порядка оказания медицинской помощи по профилю «акушерство и гинекология» (за исключением использования вспомогательных репродуктивных технологий): Приказ Министерства здравоохранения РФ №572н от 1 ноября 2012 года.
121. Об утверждении порядка проведения диспансеризации определённых групп взрослого населения: Приказ Министерства здравоохранения РФ №36ан от 3 февраля 2015 года.
122. Олина А.А. Вирусно-бактериальные инфекции и патология шейки матки// Материалы международной научно-практической конференции «Профилактика рака шейки матки: взгляд в будущее». - Москва, 2008 – 104-105.
123. Олина А.А., Метелева Т.А. Эффективность терапии клинических форм папилломавирусной инфекции у женщин молодого фертильного возраста // Фарматека. - 2016. - №3. - С. 78–83
124. Патология шейки матки и генитальные инфекции / Под ред. проф. В.Н. Прилепской. - М.: МЕД пресс - информ, 2008. - 384.
125. Перфильева Г.Н., Федоровский А.В., Дерявкина Р.С., Ивкина Г.П. Системный подход к диагностике и лечению патологии шейки матки у молодых нерожавших женщин. // Материалы международного конгресса "Практическая гинекология: от новых возможностей к новой стратегии". Москва, 2006. – С. 139.
126. Подготовка к внедрению вакцин против вируса папилломы человека: руководство для стран по разработке политики и программ. // Всемирная организация здравоохранения, 2007.
127. Подистов Ю.И. Сопоставление результатов цитологического исследования данных молекулярно-биологического метода Hybrid Capture II у больных предраком шейки матки// Клин.лаб.д-ка. - 2015 - №8. - 43 - 45.
128. Подистов Ю.И., Лактионов К.Л., Петровичев Н.Н. Современные диагностические возможности в определении предрака и рака шейки матки// Клинич. лаб. д-ка. - 2013 - №3. - 15 - 24.
129. Подистов Ю.И., Лактионов К.П., Петровичев Н.Н., Брюзгин В.В. Эпителиальные дисплазии шейки матки (диагностика и лечение). - М.: ГЭОТАР -Медиа, 2006.-136.

130. Прилепская В.Н. ПВИ: современный взгляд на проблему. // Материалы III регионального научного форума "Мать и дитя". Саратов, 2009. С. 220.
131. Прилепская В.Н. Роль инфекций, передаваемых половым путем, в канцерогенезе шейки матки. В кн. "Генитальные инфекции и патология шейки матки". – Омск, 2004.
132. Прилепская В.Н., Довлетханова Э.Р., Абакарова П. Р. Возможности терапии ВПЧ-ассоциированных заболеваний гениталий у женщин // Акушерство и гинекология. - 2011. - №5. - С. 123–128
133. Прилепская В.Н., Роговская С.И. Возможности Изопринозина в лечении хронических цервицитов и вагинитов // РМЖ. - 2007. - Т.16. - №3. - С.14
134. Прилепская В.Н., Роговская С.И., Кондриков Н.И., Сухих Г.Т. Папилломавирусная инфекция: диагностика, лечение и профилактика. Пособие для врачей. М.: "МЕДэкспресс-информ". 2007. – 31с.
135. Прилепская В.Н., Роговская С.И., Межевитинова Е.А. // Кольпоскопия (практическое руководство). Изд. ГЭОТАР, 1997, 2000.
136. Роговская С.И. Апоптоз при патологии шейки матки, ассоциированной с вирусом папилломы человека // Гинекология. - 2010 - Т.2, №3.
137. Роговская С.И. Бактериальный вагиноз и папилломавирусная инфекция гениталий. // Гинекология. – 2012. - №6.
138. Роговская С.И. Папилломавирусная инфекция гениталий: Клиника, диагностика, лечение. Автореф. дис. ... д-ра мед. наук, 2003.
139. Роговская С.И. Папилломавирусная инфекция у женщин и патология шейки матки: (руководство практикующего врача) // М.: ГЭОТАР-Медиа, - 2005. – 144 с.
140. Роговская С.И., Бебнева Т.Н. Цервикальная Папилломавирусная инфекция. Возможности комбинированной терапии // Акушерство и гинекология. 2016. №10. С. 26-32.
141. Роговская С.И., Бебнева Т.Н. Папилломавирусная инфекция гениталий: Клиника и лечение // Заболевания шейки матки. – М., 1999. – с. 240-253.
142. Роговская С.И., Бебнева Т.Н., Прилепская В.Н. Латентная папилломавирусная инфекция у женщин: тактика ведения. // Материалы

- международного конгресса "Практическая гинекология: от новых возможностей к новой стратегии". Москва, 2006. – С. 155.
143. Роговская С.И., Логинова Н.С., Файзуллин Л.З., Сухих Г.Т. Препараты интерферона и интерфероногены в лечении заболеваний половых органов, вызванных папилломавирусной инфекцией // ЗППП. - 2008. - № 5. - с. 27-30.
 144. Рудакова Е.Б., Лазарева О.В., Цыганкова О.Ю. Выбор врачебной тактики при CIN VI Материалы международной научно-практической конференции «Профилактика рака шейки матки: взгляд в будущее». - Москва, 2008 - 119-120.
 145. Руководство по амбулаторно-поликлинической помощи в акушерстве и гинекологии / Под ред. В. Е. Радзинского. - 2-е изд. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2014. - 944 с.
 146. Свердлова Е.С. Роль папилломавирусной инфекции при различных заболеваниях шейки матки. // Материалы международного конгресса "Практическая гинекология: от новых возможностей к новой стратегии". Москва, 2006. – С. 159.
 147. Сельков А.В. Ранняя диагностика и лечение предраковых состояний шейки матки// Акушерство и гинекология. — 2005 - №3. — 17 — 20.
 148. Сергеева С.Л., Стародубова Н.И. Папилломавирусная инфекция высокого онкогенного риска у женщин с фоновыми и предраковыми заболеваниями шейки матки // Материалы международного конгресса "Практическая гинекология: от новых возможностей к новой стратегии". Москва, 2006. – С. 160.
 149. Сидорова И.С., Леваков А.А. Фоновые и предраковые процессы шейки матки. - М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2006. – 96.
 150. Соколовский Е.В., Игнатовский А.В. Иммуномодулирующая терапия папилломавирусной инфекции // Вопросы гинекологии, акушерства и перинат 2015, Т.4 - №4 – С. 27-30.
 151. Сорокин В.Д. Частота ВПЧ-инфекции у женщин при патологии шейки матки // Материалы III регионального научного форума "Мать и дитя". Саратов, 2009. С. 259.

152. Сухих Г.Т., Прилепская В.Н. Новые скрининговые технологии в профилактике рака шейки матки // Материалы международной научно-практической конференции «Профилактика рака шейки матки: взгляд в будущее». - Москва, 2008 - С. 110-111.
153. Твердикова М.А. Проблема папилломавирусной инфекции в акушерстве и гинекологии // Материалы 8 всероссийского научного форума "Мать и дитя". Москва, 2006. – С. 264-265.
154. Терещенко С.Ю. Факторы риска фоновых и предраковых заболеваний шейки матки // Материалы международного конгресса "Практическая гинекология: от новых возможностей к новой стратегии". Москва, 2006. – С. 177.
155. Трубин В.Б., Глебова Н.Н., Трубина Т.Б. Патология шейки матки и влагалищный дисбиоз на фоне папилломавирусной инфекции. // Материалы международного конгресса "Практическая гинекология: от новых возможностей к новой стратегии". Москва, 2006. – С. 183.
156. Филатенков А.Г., Богатырева И.И., Самсонов В.А., Кириллов В.Б. Особенности клиники и лечения урогенитальных поражений папилломавирусом человека у женщин на фоне других заболеваний, передаваемых половым путем. Вестн дерматол и венерол 2007. 3:73—75.12.
157. Фомина О.А. К вопросу о причинах эктопий шейки матки. // Материалы III регионального научного форума "Мать и дитя". Саратов, 2009. С. 290.
158. Фролова И.И., Бабиченко И.И. Изучение про- и антиапоптозных факторов при фоновых и предраковых состояниях экзоцервикса // Материалы международного конгресса "Практическая гинекология: от новых возможностей к новой стратегии". Москва, 2006. – С. 201.
159. Хмельницкий О.К. О возможности дифференциальной диагностики заболеваний шейки матки и влагалища на основе алгоритмизации гистологического исследования // Архив патологии. - №11. – 2001. – С. 81-85.
160. Хмельницкий О.К. Прижизненная морфологическая диагностика как синтез двух микроскопических методов исследования – цитологического и гистологического. // Новости клинической цитологии России. Т.1, №3, 1997. С. 98-101.

161. Хмельницкий О.К. Цитологическая и гистологическая диагностика заболеваний шейки и тела матки: Руководство. – СПб.: Сотис, 2000. – 332 с.
162. Черныш С.И. Аллокины, противовирусные и противоопухолевые препараты нового типа, XII национальный конгресс «Человек и лекарство», М., 2005, с. 723.
163. Шейка матки, влагалище, вульва. Физиология, патология, кольпоскопия, эстетическая коррекция: Руководство для практикующих врачей / Под ред. С. И. Роговской, Е. В. Липовой. — М.: Издательство журнала StatusPraesens, 2016. — 832 с.
164. Шехтер М.С., Салов И.А., Рогожина И.Е., Хворостухина Н.Ф. Факторы риска и причины запущенности рака шейки матки. // Материалы III регионального научного форума "Мать и дитя". Саратов, 2009. С. 317.
165. Шогенова Ф.М. Генитальная инфекция и экзоцервикс. // Материалы III регионального научного форума "Мать и дитя". Саратов, 2009. С. 322.
166. Щербань М.Р., Соболев Т.В., Галустян С.А. Сочетанное применение радиоволновой хирургии и иммунотерапии в лечении патологии шейки матки. // Материалы 2-го регионального научного форума "Мать и дитя". Сочи, 2008. – С. 235.
167. Ярилин А.А. Апоптоз. Природа феномена и его роль в целостном организме // Патол. физиол. эксп. терап. 1998; 2: 38-48.
168. Abu J., Davies Q. Endocervical Curettage at the Time of Colposcopic Assessment of the Uterine Cervix// Obstetrical & Gynecological Survey. - 2015 - Vol.60, №5. - P.315 - 320.
169. ACOG Practice bulletin №157: Cervical cancer screening and prevention // Obstet. Gynecol. - 2016. - Vol. 127. - №1. - P. e1–e20. [PMID: 26695583]
170. Adams M. et al. Clinical studies of human papilloma vaccines in pre-invasive and invasive cancer. Vaccine. 2011. 19:2549.
171. Ahr A., Scharl A., Lutke K., Staszewski S., Kacer P., Kaufmann M. Cervical intraepithelial neoplasia in human immunodeficiency virus-positive patients. Cancer Detect Prev 2010; 24(2):179-85

172. Alani R., Munger K. Human papillomaviruses and associated malignancies. J Clin Oncol 2008;16:330—337.14.
173. Allen A., Siegfried E. What's new in human papillomavirus infection? Curr Opin Pediatr 2010; 12:365–9.
174. Alvarez R., Wright T. Optical Detection Group. Effective cervical neoplasia detection with a novel optical detection system: A randomized trial// Gynecologic Oncology. - 2013 - Vol.104, №2. - P.281 - 289.
175. Amina E., Hongxiang L., Yun Z., Ving-Oing D. Archival cervical smears: a versatile resource for molecular investigations// Cytopathology. - 2012 - Vol.13, №5. - P.291 - 299.
176. Anderson M. et al. Intergrated Colposcopy. Chapman & Hall Medical, 2006, ed. II.
177. Andreasson B., Bock J. Intraepithelial neoplasia in the vulvar region. Gynecol Oncol 2015; 21:300–5.
178. Antinore M., Birrer M., Patel D., Nader L., McCance D. The human papillomavirus type 16 E7 gene product interacts with and trans-activates the AP1 family of transcription factors. EMBO J 2010; 15:1950–60.
179. Arbyn M., Bergeron C., Klinkhamer P. et al. Liquid compared with conventional cervical cytology: A systematic review and metaanalysis // Obstet. Gynecol. - 2008. - Vol. 111. - P. 167–177. [PMID: 18165406]
180. Ault K. Vaccines for the Prevention of Human Papillomavirus and Associated Gynecologic Diseases: A Review// Obstetrical & Gynecological Survey. - 2016 - Vol.61, №6. - P.26-31.
181. Azoury-Ziadeh R., Herd K., Fernando G. et al. Low level expression of human papillomavirus type 16 (HPV16) E6 in squamous epithelium does not elicit E6 specific B- or T-helper immunological responses, or influence the outcome of immunisation with E6 protein. Virus Res 2011 Mar;73(2):189-99
182. Baker D., Butler D., Scallon B., O'Neill J., Turk J., Feldmann M. Control of established experimental allergic encephalomyelitis by inhibition of tumor necrosis factor (TNF) activity within the central nervous system using monoclonal antibodies

- and TNF receptor-immunoglobulin fusion proteins. *Eur. J. Immunol.* 2014. 24:2040-2048.
183. Balaram P., Radhakrishna Pillai M., Padmanabhan T. et al. Immune function in malignant cervical neoplasia: a multiparameter analysis. *Gynecol Oncol* 2008. 31:409–23.
 184. Baldwin P., van der Burg S., Boswell C. et al Vaccinia-expressed human papillomavirus 16 and 18 E6 and E7 as a therapeutic vaccination for vulval and vaginal intraepithelial neoplasia. *Clin Cancer Res*, 9: 5205-13, 2013.
 185. Band V., Zajchowski D., Kulesa V., Sager R. Human papilloma virus DNAs immortalize normal human mammary epithelial cells and reduce their growth factor requirements. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 87:463–7.
 186. Barnard P., McMillan N. The human papillomavirus E7 oncoprotein abrogates signaling mediated by interferon-alpha. *Virology* 2009 Jul 5;259(2):305-13
 187. Barnholtz-Sloan J., Patel N., Rollison D. et al. Incidencetrends of invasive cervical cancer in the United States by combined race and ethnicity // *Cancer causes control.* - 2009. - Vol. 20. - №7. - P. 1129–1138. [PMID: 19253025]
 188. Bartholdy C., Nansen A., Maerker O. et al. Soluble tumor necrosis factor (TNF) -receptor levels in serum as markers of anti-viral host reactivity. *Clin Exp Immunol* 2009; 116:299–306.
 189. Bauknecht T., Randelzhofer B., Schmitt B., Ban Z., Hernando J. Response to IL-6 of HPV-18 cervical carcinoma cell lines. *Virology* 2009 Jun 5;258(2):344-54
 190. Beer-Romero P., Glass S., Rolfe M. Antisense targeting of E6AP elevates p53 in HPV-infected cells but not in normal cells. // *Oncogene* 2007; 14(5): 595-602.
 191. Behbakht K., Friedman J., Heimler I., Aroutcheva A., Simoes J., Faro S. Role of the vaginal microbiological ecosystem and cytokine profile in the promotion of cervical dysplasia: a case-control study. *Infect Dis Obstet Gynecol* 2012;10(4):181-6
 192. Benedetti-Pannici P., Scambia G., Baocchi G. et al. Randomised clinical trial comparing systemic interferon with diatermocoagulation in primary multiple and widespread anogenital condylomata. *Obstet. Gynecol.* 2009; 74 (3): 393-397
 193. Benjamin I., Echols L. *The Pap Test: Cervical Changes and Health Care.* 2011.

194. Benton E., Arends M. Human papillomavirus in the immunosuppressed. In: Lacey C(Ed) Papillomavirus Reviews: Current Research on Papillomaviruses. Leeds: Leeds University Press, 271-297, 2016
195. Berezutskaya E., Bagchi S. The human papillomavirus E7 oncoprotein functionally interacts with the S4 subunit of the 26 S proteasome. J Biol Chem 2007; 272:30135–40.
196. Bharani B., Phatak S. Acetic acid visualization of the cervix an alternative to colposcopy in evaluation of cervix at risk// Obstetrics and Gynecology of India. - 2015 - Vol.55, №6. - P.530 - 533.
197. Bharani Bharti, Phatak Satish. Role of Colposcopy in Evaluation of Lower Female Genital Tract In 175 Symptomatic Women// Obstetrics and Gynecology of India. - 2014 - Vol.54, №4. - P.372 - 375.
198. Bollmann R., Mehes G., Torka R., Speich N. et al. Determination of features indicating progression in atypical squamous cells with undetermined significance. Cancer 2013 Apr 25;99 (2):113-7
199. Bontkes H., de Gruijl T., Bijl A., Verheijen R. et al. Human papillomavirus type 16 E2-specific T-helper lymphocyte responses in patients with cervical intraepithelial neoplasia. J Gen Virol 2009 Sep;80 (Pt 9):2453-9
200. Bontkes H., de Gruijl T., van den Muysenberg A. et al. Human papillomavirus type 16 E6/E7-specific cytotoxic T lymphocytes in women with cervical neoplasia. Int J Cancer 2010 Oct 1;88(1):92-8
201. Bornstein J., Lahat N., Kinarty A., Revel M., Abramovici H., Shapiro S. Interferon-beta and -gamma, but not tumor necrosis factor-alpha, demonstrate immunoregulatory effects on carcinoma cell lines infected with human papillomavirus. Cancer 2007; 79:924–34.
202. Bosch F., Manos M., Munoz N. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: A worldwide perspective. J. Natl. Cfncer Inst 87:796-802, 2015.
203. Boyer S., Wazer D., Band V. E7 protein of human papilloma virus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway. Cancer Res 2006; 56:4620–4.

204. Boyle D., Barton S., Uthayakumar S., Hay P. et al. Is bacterial vaginosis associated with cervical intraepithelial neoplasia? *Int. J. Gynecol. Cancer* 2013 Mar-Apr;13 (2):159-63
205. Braun L., Durst M., Mikumo R., Gruppuso P. Differential response of nontumorigenic human papillomavirus type 16-positive epithelial cells to transforming growth factor beta 1. *Cancer Res* 2010; 50:7324–32.
206. Brinton L. Epidemiology of cervical cancer - an overview. In: *The Epidemiology of Cervical Cancer and Human Papillomavirus*. Muñoz N et al., eds. Lyon: International Agency for Research on Cancer, IARC Scientific Publication No. 119:3-23 (2012).
207. Brown D., Legge D., Qadadri B. Distribution of human papillomavirus types in cervicovaginal washings from women evaluated in a sexually transmitted diseases clinic. *Sex Transm Dis* 2012. 29:763-768.17.
208. Brown J., Higo H., McKalip A., Herman B. Human papillomavirus (HPV) 16 E6 sensitizes cells to atractyloside-induced apoptosis: role of p53, ICE-like proteases and the mitochondrial permeability transition. // *J Cell Biochem* 2007; 66(2): 245-55.
209. Bubenik J., Mikyskova R., Vonka V., Mendoza L. et al. Interleukin-2 and dendritic cells as adjuvants for surgical therapy of tumours associated with human papillomavirus type 16. *Vaccine* 2013 Feb 14;21(9-10):891-6
210. Burk R., Kelly P., Feldman J. et al. Declining prevalence of cervicovaginal human papillomavirus infection with age is independent of other risk factors. *Sex Transm Dis* 2016; 3:333–41.
211. Buscema J., Naghashfar Z., Sawada E., Daniel R., Woodruff J., Shah K. The predominance of human papillomavirus type 16 in vulvar neoplasia. *Obstet Gynecol* 2008; 71:601–6.
212. Casana H., Hernandez H., Arana M. Interleukin-2 inhibits proliferation of HPV-associated tumor cells and halts tumor growth in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 2012 Dec 20;299(5):818-24
213. Castle P., Hildesheim A., Bowman F., Strickler H. et al. Cervical concentrations of interleukin-10 and interleukin-12 do not correlate with plasma levels. *J Clin. Immunol* 2012 Jan;22(1):23-7

214. Chen T., Pecoraro G, Defendi V. Genetic analysis of in vitro progression of human papillomavirus-transfected human cervical cells. *Cancer Res* 2013; 53:1167–71.
215. Cho N., Kim Y., Kim J. Alteration of cell cycle in cervical tumor associated with human papillomavirus: cyclin-dependent kinase inhibitors. *Yonsei Med J* 2012. 43:722—728.19.
216. Chopra V., Dinh T., Hannigan E. Circulating serum levels of cytokines and angiogenic factors in patients with cervical cancer. *Cancer Invest* 2008; 16:152–9.
217. Cintonino M., Tripodi S., Romagnoli R., Ietta F., Ricci M., Paulesu L. Interferons and their receptors in human papillomavirus lesions of the uterine cervix. *Eur J Gynaecol Oncol* 2012;23(2):145-50
218. Cirelli R., Tying S. Interferons in human papillomavirus infections. *Antiviral Res* 2004; 24:191–204.
219. Claus E., Stowe M., Carter D. Oral contraceptives and the risk of ductal breast carcinoma in situ. *Breast Cancer Res Treat* 2013. 81:129—136.20.
220. Clerici M., Merola M., Ferrario E. et al. Cytokine production patterns in cervical intraepithelial neoplasia: association with human papillomavirus infection. *J Natl Cancer Inst* 2007; 89:245–50.
221. Clerici M., Shearer G. The Th1-Th2 hypothesis of HIV infection: new insights. *Immunol Today* 2004; 15:575–81.
222. Cobas HPV Test P100020/S008. Silver Spring (MD). - FDA; 2014. - URL: <http://www.fda.gov/MedicalDevices/ProductsandMedicalProcedures/DeviceApprovalsandClearances/Recently-ApprovedDevices/ucm254518.htm>
223. Coutlee F., Mayrand M., Provencher D. The future of HPVtesting in clinical laboratories and applied virology research. *J. Cl & Diagn Virol* 2007; 8:123-41.
224. Cuzick N. et al. Management of Women Who Test Positive for High–Risk Types of Human Papillomavirus: the HART Study. *Lancet*. 2013; 362:1871–1876.
225. Dasgupta S. Immunology of cancer cervix. *J Indian Med. Assoc.* 2010 Feb; 98(2):56-59

226. Davidson E., Davidson J. et al. Association between human leukocyte antigen polymorphism and human papillomavirus 16-positive vulval intraepithelial neoplasia in British women. *Cancer Res.* 2013 Jan 15;63(2):400-3
227. Davidson E., Faulkner R., Sehr P. et al. Effect of TA-CIN (HPV16 L2E6E7) booster immunisation in vulval intraepithelial neoplasia patients previously vaccinated with TA-HPV (vaccinia virus encoding HPV16/18 E6E7). *Vaccine*. In press. 2004.
228. De Jong A., van der Burg S., Kwappenberg K. et al. Frequent detection of human papillomavirus 16 E2-specific T-helper immunity in healthy subjects. *Cancer Res* 2012;62:472–9.
229. De Sanjose S., Santamaria M., Alonso de Ruiz P. et al. HPV types in women with normal cervical cytology. In: *The epidemiology of cervical and human papillomavirus*. Eds. N. Munos, F.X. Bosch, K.V. Shan, A. Meheus. Lyon (France): IARC 2012;75-84
230. De Wolf C. *Organization and Results of Cervical Cancer Screening in Europe over the Past 20 Years*. Blackwell Science. 2007:209-19
231. Denny L., Wright Jr.T. Human papillomavirus testing and screening// *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*. - 2015 - Vol.19, №4. -P.501-515.
232. DeVilliers E. Relationship between steroid hormone contraceptives and HPV, cervical intraepithelial neoplasia and cervical carcinoma. *Virology* 2013 Feb 1;306(1):162-9
233. Diaz-Mitoma F., Kumar A., Karimi S., Kryworuchko M., Daftarian M., Creery W., Filion L., Cameron W. Expression of IL-10, IL-4 and interferon-gamma in unstimulated and mitogen-stimulated peripheral blood lymphocytes from HIV-seropositive patients. *Clin Exp Immunol*. 2015; 102:31-39
234. Duensing S., Duensing A., Crum C., Munger K. Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein-induced abnormal centrosome synthesis is an early event in the evolving malignant phenotype. *Cancer Res* 2011. 61:2356-2360.22
235. Durst M., Bosch F., Glitz D., Schneider A., Zur Hausen H. Inverse relationship between human papillomavirus (HPV) type 16 early gene expression and cell

- differentiation in nude mouse epithelial cysts and tumors induced by HPV-positive human cell lines. *J Virol* 2001; 65:796–804.
236. El-Deiry W., Tokino T., Velculescu V. et al. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 1993. 75:817-825.
 237. El-Sherif A., Seth R., Tighe P., Jenkins D. Decreased synthesis and expression of TGF-beta1, beta2, and beta3 in epithelium of HPV 16-positive cervical precancer: a study by microdissection, quantitative RT-PCR, and immunocytochemistry. *J Pathol* 2010 Dec;192(4):494-501
 238. Evander M., Edlund K., Gustafsson A. et al. Human papillomavirus infection is transient in young women: a population-based cohort study. *J Infect Dis* 2015; 171:1026-30
 239. Evans E., Man S., Evans A., Borysiewicz L. Infiltration of cervical cancer tissue with human papillomavirus-specific cytotoxic T-lymphocytes. *Cancer Res.* 2007. 57:2943
 240. Fernando G., Tindle R., Frazer R. T-helper epitopes of the E7 transforming protein of cervical-cancer associated human papillomavirus type-18 (Hpv18). *Virus Res.* 2015. 36:1
 241. Franco E., Rohan T., Villa L. Epidemiologic evidence and human papillomavirus infection as a necessary cause of cervical cancer. *J Natl Cancer Inst* 2009;1:506-511.
 242. Franco E., Villa L., Richardson H., Rohan T., Ferenczy A. Epidemiology of Cervical Human Papillomavirus Infection. Blackwell Science. 2007:14-22.
 243. Frega A., Stentella P., Villani C. et al. Correlation between cervical intraepithelial neoplasia and human papillomavirus male infections: a longitudinal study. *EurJ Gynaecol Oncol* 2009; 20(3):228-230.
 244. Gavrieli Y., Sherman Y., Ben-Sasson S. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. // *J Cell Biol* 2012; 119(3): 493-501.
 245. Gemignani M., Maiman M., Fruchter R. et al. CD4 lymphocytes in women with invasive and preinvasive cervical neoplasia. *Gynecol Oncol* 2005; 59:364–9.

246. Gissmann L., Osen W., Muller M., Jochmus I. Therapeutic vaccines for human papillomaviruses. *Intervirology* 2001;44(2-3):167-75
247. Greenfield I., Cuthill S. Antivirals. Human papillomaviruses. Clinical and scientific advances. London (U.K.): Arnold; 2011. p. 120–30.
248. Gross G., Barrasso R. Humman Papilloma Virus Infection. A Clinical Atlas. 2007
249. Gross G., Ikenberg H., Roussaki A., Drees N., Schopf E. Systemic treatment of condyloma acuminata with recombinant interferon- α 2a: low dose superior to high dose regime. *Chemotherapy*. 2016; 32: 537-541
250. Grossman S., Laimins L. E6 protein of human papillomavirus type 18 binds zinc. *Oncogene* 2009. 9:1089—1093.26.
251. Gul N., Ganesan R., Luesley D. Characterizing T-cell response in low-grade and high-grade vulvar intraepithelial neoplasia, study of CD3, CD4 and CD8 expressions. *Gynecol Oncol* 2014; 94:48–53.
252. Hale A., Smith C., Sutherland L., Stoneman V., Longthorne V., Culhane A., Williams G. Apoptosis: molecular regulation of cell death. // *Eur J Biochem* 2016; 236 (1): -26.
253. Havre P., Yuan J., Hedrick L., Cho K., Glazer P. p53 inactivation by HPV16 E6 results in increased mutagenesis in human cells. *Cancer Res* 2015; 55:4420–4.
254. Ho G., Bierman R., Beardsley L., Chang C., Burk R. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med*. 2008; 338:423–428.
255. Ho G., Burk R., Klein S. et al. Persistent genital human papillomavirus infection as a risk factor for persistent cervical dysplasia. *Journal of the National Cancer Institute* 87(18):1365-1371 (September 2015).
256. Hoda R. S., Loukeris K., Abdul-Karim F. W. Gynecologic cytology on conventional and liquid-based preparations: A comprehensive review of similarities StatusPraesens / 20 and differences // *Diagn. Cytopathol.* - 2012. - Vol. 41. - №3. - P. 257–278 [PMID: 22508662]

257. Holowaty P., Miller A., Rohan T. et al. Natural history of dysplasia of the uterine cervix. *Journal of the National Cancer Institute* 91(3):252-258 (February 2009).
258. Hopfl R., Heim K., Christensen N., Zumbach K. et al. Spontaneous regression of CIN and delayed-type hypersensitivity to HPV-16 oncoprotein E7. *Lancet* 2010 Dec 9;356(9246):1985-6
259. Howlader N., Noone A., Krapcho M. et al. Technical notes to the SEER cancer statistics review, 1975–2012. - Bethesda (MD): National cancer institute, 2015. — URL: http://seer.cancer.gov/csr/1975_2012/results_figure/sect_01_intro2_24pgs.pdf.
260. Hubbert N., Sedman S., Schiller J. Human papillomavirus type 16 E6 increases the degradation rate of p53 in human keratinocytes. *J Virol* 2012. 66:10:6237—6241.28.
261. Huh W., Ault K., Chelmow D. et al. Use of primary high-risk human papillomavirus testing for cervical cancer screening: interim clinical guidance // *Obstet. Gynecol.* — 2015. - Vol. 125. - P. 330-337. [PMID: 25574659]
262. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Human Papillomaviruses. Vol. 64. Lyon: IARC, 2015.
263. IARC Working Group on Cervical Cancer Screening. Summary chapter. In: Hakama M., Miller A., Day N. eds. *Screening for Cancer of the Uterine Cervix*. Lyon, International Agency for Research on Cancer, IARC Scientific Publications 7: 33-144 (2016)
264. Iglesias M., Plowman G., Woodworth C. Interleukin-6 and interleukin-6 soluble receptor regulate proliferation of normal, human papillomavirus-immortalized, and carcinoma-derived cervical cells in vitro. *Am J Pathol* 2015; 146:944–53
265. Iglesias M., Yen K., Gaiotti D., Hildesheim A., Stoler M., Woodworth C. Human papillomavirus type 16 E7 protein sensitizes cervical keratinocytes to apoptosis and release of interleukin-1alpha. // *Oncogene* 2008; 17(10): 1195-205.
266. International Agency for research on Cancer. GLOBOCAN 2010. Lyon, France: IARC (2010)

267. Jach R., Basta A. Iscador QuS and human recombinant interferon alpha (Intron A) in cervical intraepithelial neoplasia (CIN). *Przegl Lek* 2009; 56(1):86-8
268. Jackson R., Ramsay A., Christensen C., Beaton S., Hall D., Ramshaw I. Expression of mouse interleukin-4 by a recombinant ectromelia virus suppresses cytolytic lymphocyte responses and overcomes genetic resistance to mousepox. *J. Virol.* 2011. 75:1205-1210
269. Jeon J., Cho S., Kim C., Shin D., Kwon J., Choi K., Kim I. Improved immunodetection of human papillomavirus E7. *Exp Mol Med* 2012 Dec 31;34(6):496-9
270. Jewers R., Hildebrandt P., Ludlow J., Kell B., McCance D. Regions of human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein required for immortalization of human keratinocytes. *J Virol* 2002; 66:1329–35.
271. Jin G., LanLan Z., Li C. et al. Pregnancy outcome following loop electrosurgical excision procedure (LEEP) a systematic review and meta-analysis // *Arch. Gynecol. Obstet.* - 2014. - Vol. 289. - №1. - P. 85–99. [PMID: 23843155]
272. Jong Soo Lee. The importance of statistics in an advancement of cancer research// *Gynecologic Oncology.* - 2007 - Vol. 107, №1. - P.S44 - S45.
273. Kadish A., Timmins P., Wang Y., Ho G. et al. Regression of cervical intraepithelial neoplasia and loss of human papillomavirus (HPV) infection is associated with cell-mediated immune responses to an HPV type 16 E7 peptide. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2012 May;11(5):483-8
274. Katki H. A., Schiffman M., Castle P. E. et al. Benchmarking CIN3+ risk as the basis for incorporating HPV and Pap cotesting into cervical screening and management guidelines // *J. Low Genit. Tract Dis.* - 2013. - Vol. 17. — P. s28–s35. [PMID: 23519302]
275. Katki H. A., Schiffman M., Castle P. E. et al. Five-year risk of cervical cancer and CIN3 for HPV-positive and HPV-negative high-grade Pap results // *J. Low Genit. Tract. Dis.* — 2013. — Vol. 17. — P. s50–s55. [PMID: 23519305]
276. Kaufman R., Adam E. Is human papillomavirus testing of value in clinical practice? *Am J Obstet Gynecol* 2009 May; 180(5):1049-1053

277. Kaufmann A., Stern P., Rankin E. et al. Safety and immunogenicity of TA-HPV, a recombinant vaccinia virus expressing modified human papillomavirus (HPV)-16 and HPV-18 E6 and E7 genes, in women with progressive cervical cancer. *Clin Cancer Res*, 8: 3676-85, 2012.
278. Kesis T., Conolly D., Hedrick L., Cho K. Expression of HPV16 E6 or E7 increases integration of foreign DNA. *Oncogene* 2016; 13:427–31.
279. Kim T., Myoung H., Kim J., Moon I., Kim T., Ahn W., Sin J. Both E7 and CpG-oligodeoxynucleotide are required for protective immunity against challenge with human papillomavirus 16 (E6/E7) immortalized tumor cells: involvement of CD4+ and CD8+ T cells in protection. *Cancer Res* 2012 Dec 15;62(24):7234-40.
280. Kiyono T., Foster S., Koop I., McDougall J., Galloway D., Klingelutz A. Both Rb/p16INK4a inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells. *Nature* 2008; 396:84–8.
281. Kjaer S., Chakerian B., van der Brule A. et al. High-risk human papillomavirus is sexually transmitted: evidence from a follow-up study of virgins starting sexual activity. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2011; 10:101–6.
282. Kjaer S., Jensen O. Comparison studies of HPV detection in areas at different risk for cervical cancer. *The Epidemiology of Cervical Cancer and Human Papillomavirus*. Eds. N. Munoz, F.X. Bosch, K.W. Shah, A. Meheus. Lyon: IARC 2012; 243—249.
283. Klencke B., Matijevic M., Urban R., Lathey J. et al. Encapsulated plasmid DNA treatment for human papillomavirus 16-associated anal dysplasia: a phase I study of ZYC101. *Clin Cancer Res* 2012; 8:1028–37.
284. Koromilas A., Li S., Matlashewski G. Control of interferon signaling in human papillomavirus infection. *Cytokine Growth Factor Rev* 2011 Jun-Sep;12(2-3):157-70.
285. Koutsky L. Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Am J Med* 2007; 102:3–8.
286. Kruse A., Baak J., Janssen E., Bol M., Kjellefold K., Fianne B., Lovslett K., Bergh J. Low- and high-risk CIN 1 and 2 lesions: prospective predictive value of grade, HPV, and Ki-67 immuno-quantitative variables. *J Pathol* 2013; 199(4):462-70.

287. Kyo S., Inoue M. et al. Regulation of early gene expression of human papillomavirus type 16 by inflammatory cytokines. *Virology* 2014; 200:130–9
288. Lakatos V., Lazarenko L., Spivak M., Lianenko L., Azarskova M., Mikhailenko O. The determination of the cellular immunity indices in papillomavirus infection of the female genitalia. *Lik Sprava* 2009; (4):98-102
289. Lebrecht A., Hefler L., Tempfer C. et al. Serum cytokine concentrations in patients with cervical cancer: interleukin-4, interferon- γ , and monocyte chemoattractant protein-1. *Gynecol Oncol* 2011; 83:170–1
290. Lee C., Mancuso V., Contant T., Jackson R., Smith-Mccune K. Treatment of women with low-grade squamous intraepithelial lesions on cytologic evidence or biopsy results by board-certified gynecologists. *Am J Obstet Gynecol* 2013 Mar;188(3):693-8.
291. Lindeque B. Management of cervical premalignant lesions // Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology. - 2015 - Vol., №4. - P.545 - 561
292. Lonky N., Felix J., Naidu Y., Wolde-Tsadik G. Triage of atypical squamous cells of undetermined significance with hybrid capture II: colposcopy and histologic human papillomavirus correlation. *Obstet Gynecol* 2013 Mar;101(3):481-9.
293. Lopez M., Stanley M. Cytokine profile of draining lymph node lymphocytes in mice grafted with syngeneic keratinocytes expressing human papillomavirus type 16 E7 protein. *J Gen Virol* 2010; 81(Pt 5):1175-82.
294. Magnusson P., Sparen P., Gyllensten U. Genetic link to cervical tumours. *Nature* 2009; 400:29–30.
295. Man S., Fiander A. Immunology of human papillomavirus infection in lower genital tract neoplasia. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2011 Oct;15(5):701-14
296. Manos M., Kinney W., Hurley L. et al. Identifying women with cervical neoplasia: using human papillomavirus DNA testing for equivocal Papanicolaou results. Division of Research, Northern California Kaiser Permanente Med Group, USA. 2009 281(17):1605-1610
297. Mao C., Balasubramanian A., Koutsky L. Should Liquid- Based Cytology Be Repeated at the Time of Colposcopy? // Obstetrical & Gynecological Survey. - 2015 - Vol.60, №7. - P.437-438

298. Massad L., Einstein M., Huh W. 2012 Updated consensus guidelines for the management of abnormal cervical cancer screening tests and cancer precursors // *Obstet. Gynecol.* - 2013. - Vol. 121. - №4. - P. 829–846. [PMID: 23635684]
299. Massad S., Collins Y. Strength of correlations between colposcopic impression and biopsy histology // *Gynecologic Oncology.* - 2013 -Vol.89, P.424-428
300. McCance D. Human papillomavirus (HPV) infection in the aetiology of cervical cancer. *Cancer Surv* 2008 7: 499–506.
301. McDougall J. Immortalization and transformation of human cells by human papillomavirus. *Curr Top Microbiol Immunol* 2014; 186:101-19
302. McKinley Health Center: Pap Test and Colposcopy: Questions and Answers. 2009
303. Miller A. Cervical Cancer Screening Programmers: Managerial Guidelines. Geneva: World Health Organization (2012)
304. Moscicki A., Ellenberg J., Farhat S. et al. Persistence of human papillomavirus infection in HIV-infected and -uninfected adolescent girls: risk factors and differences by phylogenetic type. *J Infect Dis* 2014; 190:37-45
305. Munger K., Howley P. Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus Res* 2012. 89:213-228
306. Munger K., Phelps W. The human papillomavirus E7 protein as a transforming and transactivating factor. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1155:111-23
307. Munoz N. et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N. Engl. J. Med.* 2013; 348:518
308. Nair P., Nair K., Jayaprakash P., Pillai M. Decreased programmed cell death in the uterine cervix associated with high risk human papillomavirus infection. // *Pathol Oncol Res* 2009; 5(2): 95-103.
309. Nakagawa M., Stites D., Palefsky J., Kneass Z., Moscicki A. CD4-positive and CD8-positive cytotoxic T lymphocytes contribute to human papillomavirus type 16 E6 and E7 responses. *Clin Diagn Lab Immunol* 2009 Jul;6(4):494-8.
310. National Cancer Institute: Questions and Answers About the Pap Test. 2011.
311. Negri G., Egarter-Vigl E., Kasal A., Romano F., Haitel A., Mian C. p16INK4a is a useful marker for the diagnosis of adenocarcinoma of the cervix uteri

- and its precursors: an immunohistochemical study with immunocytochemical correlations. *Am J Surg Pathol* 2013; 27(2):187-93.
312. Nimako M., Fiander A., Wilkinson G., Borysiewicz L., Man S. Human papillomavirus-specific cytotoxic T lymphocytes in patients with cervical intraepithelial neoplasia grade III. *Cancer Res* 2007; 57:4855–61.
 313. Östor A. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review. *Int J Gynecol Pathol* 2013; 12:186–92.
 314. Peterson C., Bjerring P., Carsen J. et al. Systemic interferon- α 2b increases the cure rate in laser treated patients with multiple persistent genital warts: a placebo-controlled study. *Genitourin. Med.* 2011; 76 (2): 99-102.
 315. Phelps W., Barnes J., Loba D. Human papillomavirus: molecular targets and prospects for antiviral therapy. *Internat Antiviral News* 2009; 7: 4–8.
 316. Pillai M., Halabi S., McKalip A., Jayaprakash P., Rajalekshmi T., Nair M., Herman B. The presence of human papillomavirus-16/-18 E6, p53, and bcl-2 protein in cervicovaginal smears from patients with invasive cervical cancer. // *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2016; 5(5): 329-35.
 317. Rapp L., Chen J. The papillomavirus E6 proteins. // *Biochim Biophys Acta* 2008; 1378(1): 1-19.
 318. Reeves W., Rawls W., Brinton L. Epidemiology of genital papillomavirus and cervical cancer. *Rev Infect Dis* 2009; 11: 426–39.
 319. Reichel R., Fitz R., Neumann R. et al. Clinical study with recombinant interferon-gamma versus interferon- α c in patients with condyloma acuminata. *Int. J. STD AIDS* 2012; 3 (5): 350-354
 320. Riethmuller D., Seilles E. Immunity of the female genital tract mucosa and mechanisms of papillomavirus evasion. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 2010; 29(8):729-740.
 321. Roberts J., Gurley A., Thurloe J. et al. Evaluation of the ThinPrep Pap test as an adjunct to the conventional Pap smear. 2007.

322. Ronco L., Karpova A., Vidal M., Howley P. Human papillomavirus 16 E6 oncoprotein binds to interferon regulatory factor-3 and inhibits its transcriptional activity. *Genes Dev* 2008; 12:2061–72.
323. Sanclemente G., Gill D. Human papillomavirus molecular biology and pathogenesis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2012 May;16(3):231-40.
324. Sasieni P., Castanon A., Cuzick J. Effectiveness of cervical screening with age: Population based casecontrol study of prospectively recorded data // *BMJ*. - 2009. — Vol. 339. — P. b2968. [PMID: 19638651]
325. Sawaya G., McConnell K., Kulasingam S., Lawson H. Risk of cervical cancer associated with extending the interval between cervical-cancer screenings// *New England Journal of Medicine*. - 2013 - Vol.349, №16.-P.1501.
326. Scheffner M., Romanczuk H., Munger K., Huibregtse J., Mietz J., Howley P. Functions of human papillomavirus proteins. *Curr Top Microbiol Immunol* 2014; 186:83–96.
327. Schiffman M. Epidemiology of cervical human papillomavirus infection. *Curr Top Microbiol Immunol* 2014; 186:83-96
328. Scott M., Stites D., Moscicki A. Th1 cytokine patterns in cervical human papillomavirus infection. *Clin Diagn Lab Immunol* 2009 Sep;6(5):751-5
329. Sheets E., Urban R., Crum C., Hedley M. et al. Immunotherapy of human cervical high-grade cervical intraepithelial neoplasia with microparticle-delivered human papillomavirus 16 E7 plasmid DNA. *Am J Obstet Gynecol* 2013 Apr;188(4):916-26
330. Sheets E., Yeh J. The role of apoptosis in gynaecological malignancies. // *Ann Med* 2007; 29(2): 121-6
331. Sherman M. et al. Baseline Cytology, Human Papillomavirus Testing, and Risk for Cervical Neoplasia: A 10–Year Cohort Analysis. *JNCI*. 2013; 95:46–52.
332. Sherman M., Lorincz A., Scott D. et al. Baseline cytology, human papillomavirus testing, and risk for cervical neoplasia: a 10-year cohort analysis. *J Natl Cancer Inst* 2013; 95:46-52
333. Siebers A. G., Klinkhamer P. J., Grefte J. M. et al. Comparison of liquid-based cytology with conventional cytology for detection of cervical cancer precursors: a

randomized controlled trial // JAMA. - 2009. - Vol. 302. — №16. — P. 1757–1764.
[PMID: 19861667]

334. Smith J., Green J., Berrington de Gonzalez A., Appleby P. et al. Cervical cancer and use of hormonal contraceptives: a systematic review. *Lancet* 2003 Apr 5;361(9364):1159-67
335. Solomon F. et al. Comparison of Three Management Strategies for Patients with Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance: Baseline Results from a Randomized Trial. *JNCI*. 2011; 93:293–299
336. Song Seung-Hun, Lee Jae-Kwan, Lee Nak-Woo, Saw Ho-Suk, Kang Jae-Sung, Lee Kyu-Wan. Interferon- γ (IFN- γ): A possible prognostic marker for clearance of high-risk human papillomavirus (HPV)// *Gynecologic Oncology*. - 2008 -Vol.108, №3.-P.543-548
337. Spellberg B., Edwards J. Type1/type 2 immunity in infectious diseases. *Clin Infect Dis* 2011; 32:76–102
338. Spitzbart H., Hoyme U. Immunotherapy of gynaecological high-risk human papilloma virus infection with human leukocyte ultrafiltrate. *Infect Dis Obstet Gynecol* 2010; 8:120-3
339. Stanley A. Human papillomavirus and cervical carcinogenesis// *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*. - 2012 - Vol.15, №5. -P.663-676
340. Stanley M. Prevention strategies against the human papillomavirus: The effectiveness of vaccination // *Gynecologic Oncology*. – 2007; Vol.107, №2.-P.19-23
341. Stanley M. Prognostic factors and new therapeutic approaches to cervical cancer. *Virus Res* 2012 Nov;89(2):241-8
342. Stanley M. The immunology of genital human papilloma virus infection. *Eur J Dermatol* 2008; 8(7 Suppl):8-12; discussion 20-2
343. Stoler M., Rhodes C., Whitbeck A., Wolinsky S., Chow L., Broker T. Human papillomavirus type 16 and 18 gene expression in cervical neoplasias. *Hum Pathol* 2012; 23:117–28.
344. Storey A., Thomas M., Kalita A., Harwood C., Gardiol D., Mantovani F. et al. Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. *Nature* 2008; 393:229–34.

345. Swartz R., Cox D., Cantor S. A new methodology to compare clinical strategies with application in screening and diagnosis for caervical intraepithelial neoplasia (CIN). ASCO 2014., abs. 6105
346. Tabriz S., Failley C., Chen S. et al. Epidemiological characteristics of women with high grade CIN who do and do not have human papillomavirus. *Br J Obstet Gynaecol* 2009; 106(3): 252-257
347. Tan T., Ting R. In vitro and in vivo inhibition of human papillomavirus type 16 E6 and E7 genes. *Cancer Res* 2015; 55:4599–605
348. Tay Sun-Kuie, Tay Kae-Jack. Passive cigarette smoking is a risk factor in cervical neoplasia// *Gynecologic Oncology*. - 2014 - Vol.93, №1. - P. 116 - 120
349. Thornburg C., Boczkowski D., Gilboa E. Induction of cytotoxic T lymphocytes with dendritic cells transfected with human papillomavirus E6 and E7 RNA: implications for cervical cancer immunotherapy. *J Immunother* 2010; 23(4):412-8
350. Tindle R. Immune evasion in human papillomavirus-associated cervical cancer. *Nat Rev Cancer* 2012; 2(1):59-65
351. Tsu V., Pollack A.E. Preventing cervical cancer in low-resource settings: How far have we come and what does the future hold? // *International Journal of Gynecology&Obstetrics*. - 2015 - Vol.89, №2. - P.55-59
352. Tsutsui T., Kumakura S., Yamamoto A. et al. Association of p16(INK4a) and pRb inactivation with immortalization of human cells. *Carcinogenesis* 2012; 23:2111—2117.42
353. Tying S. Human papillomavirus infections: epidemiology, pathogenesis, and host immune response. *J Am Acad Dermatol* 2010; 43(1 Pt 2):S18-26
354. Ung A., Kramer T., Schiffman M. et al. Soluble interleukin-2 receptor levels and cervical neoplasia: results from a population-based case-control study in Costa Rica. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009 Mar; 8(3):249-253
355. Villada I., Barracco M., Ziol M. et al. Spontaneous regression of grade 3 vulvar intraepithelial neoplasia associated with human papillomavirus-16-specific CD4+ and CD8+ T-cell responses. *Cancer Res* 2014; 64:8761–6
356. Werness B., Levine A., Howley P. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* 248:76-79 2010

357. Wilcox R., Chen L. Immunotherapy of human papillomavirus-associated malignancies and the challenges posed by T-cell tolerance. Department of Immunology, USA. 2012; 7:d853-71.
358. Wohlfahrt J., Melbye M. Age at any birth is associated with breast cancer risk. *Epidemiology* 2011. 12:68—73.46.
359. Woodman C. et al. Human papillomavirus type 18 and rapidly progressing cervical intraepithelial neoplasia. *Lancet* 2013. 361:40
360. Woodman C., Collins S., Winter H. Natural history of cervical Human papillomavirus infection in young women: a longitudinal cohort study. *Lancet* 2011; 357: 1831-1836
361. World Health Organization (WHO). Primary prevention of cervical cancer. WHO, Geneva, October 3-November 2, CAN/85.1 (2015)
362. Wright T., Cox J., Massad L., Twiggs L., Wilkinson E. Consensus guidelines for the management of women with cervical cytological abnormalities. *JAMA* 2012; 287:2120–9
363. Wu SuFang, Meng Li, Wang ShiXuan, Ma Ding. A comparison of four screening methods for cervical neoplasia// *International Journal of Gynecology & Obstetrics*. - 2015 - Vol.91, №2. - P. 189 - 193
364. Wu T., Kurman R. Analysis of cytokine profiles in patients with human papillomavirus-associated neoplasms. *J Natl Cancer Inst* 2012; 89:185–6
365. Zanotti K., Belinson J. Update on the diagnosis and treatment of human papillomavirus infection. *Cleve Clin J Med* 2012; 69(12):948, 951-5
366. Zumbach K., Kisseljev F., Sacharova O. et al. Antibodies against oncoproteins E6 and E7 of human papillomavirus types 16 and 18 in cervical-carcinoma patients from Russia. *Int J Cancer* 2010; 85(3):313-8
367. Zur Hausen H. Cell-virus gene balance hypothesis of carcinogenesis. *Behring Inst Mitt* 1997; 61:23–30.
368. Zur Hausen H. Genital papillomavirus infections. In: Rigby P., Wilkie N., editors. *Viruses and cancer*. Cambridge (U.K.): Cambridge University Press; 1996. p. 83-90