

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«ВОЛГОГРАДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ  
УНИВЕРСИТЕТ»  
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

*На правах рукописи*

**ГОРРИНГ ХАВА ИЗРАИЛОВНА**

**СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ТАКТИКИ ВЕДЕНИЯ ЛАТЕНТНЫХ  
И СУБКЛИНИЧЕСКИХ ФОРМ ПАПИЛЛОМАВИРУСНОЙ  
ИНФЕКЦИИ У ЖЕНЩИН**

(3.1.4 – Акушерство и гинекология)

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

д.м.н., проф. Куценко Ирина Игоревна

КРАСНОДАР – 2023

# ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>Введение</b>	6
<b>Глава 1. Обзор литературы (современное состояние проблемы заболеваний, ассоциированных с вирусом папилломы человека)</b>	13
<b>1.1. Современные представления о патогенезе папилломавирусной инфекции гениталий</b>	13
<b>1.2. Клиника папилломавирусной инфекции у женщин</b>	25
<b>1.3. Цервикальный скрининг</b>	26
<b>1.4. Основные методы терапии папилломавирусной инфекции гениталий у женщин</b>	32
<b>1.5. Профилактика рака шейки матки</b>	41
<b>Глава 2. Материалы и методы исследования</b>	49
Дизайн исследования	49
<b>2.1. Клинические методы исследования</b>	61
<b>2.2. Микробиологические методы исследования</b>	61
<b>2.3. Исследование состояния системных и местных параметров иммунной системы</b>	70
<b>2.4. Исследование окислительных процессов в шейке матки</b>	71
<b>2.5. Биохимический состав вагинальной жидкости</b>	71
<b>2.6. Методы профилактической терапии, проводимой пациенткам с латентными и субклиническими формами папилломавирусной инфекции</b>	73
<b>2.7. Статистическая обработка материала</b>	74
<b>Глава 3. Результаты исследования</b>	77
<b>3.1. Эпидемиологический анализ латентных и субклинических форм папилломавирусной инфекции у жительниц Краснодарского края</b>	77
<b>3.2. Первичная профилактика рака шейки матки в Краснодарском крае (ВПЧ-вакцинация)</b>	95

<b>3.3</b>	<b>Рандомизация с разделением пациенток с латентными и субклиническими формами папилломавирусной инфекции на группы для проведения наблюдения и предлагаемой профилактической терапии (проспективное исследование)</b>	<b>98</b>
<b>3.4.</b>	<b>Сравнительная эффективность профилактической терапии латентных и субклинических форм папилломавирусной инфекции</b>	<b>131</b>
<b>Глава 4.</b>	<b>Обсуждение полученных результатов</b>	<b>140</b>
<b>Глава 5.</b>	<b>Алгоритм менеджмента пациенток с латентными и субклиническими формами папилломавирусной инфекции</b>	<b>166</b>
	<b>Выводы</b>	<b>169</b>
	<b>Практические рекомендации</b>	<b>171</b>
	<b>Список литературы</b>	<b>172</b>
	<b>Приложения</b>	<b>184</b>

## Список сокращений

1. АПК – антигенпрезентирующие клетки
2. АПП – абсолютный показатель поглощения
3. ВПЧ – вирус папилломы человека
4. ВПЧ ВКР – вирус папилломы человека высокого канцерогенного риска
5. ДИМ - 3,3'-дииндолилметан
6. ИБ - индекс бактерицидности
7. ИППП – инфекции, передающиеся половым путем
8. ИФ - интерферон
9. ИФА – иммуноферментный анализ
- 10.МКА – моноклональные антитела
- 11.ПВИ – папилломавирусная инфекция
- 12.ПЦР – полимеразная цепная реакция
- 13.РНГА – реакция непрямой гемагглютинации
- 14.РШМ – рак шейки матки
- 15.ASC – American Society of Cancer (Американское общество по раку)
- 16.ASCUS – Atypical squamous cells of undetermined (атипические клетки плоского эпителия неопределенной значимости)
- 17.bcl-2 – ген регулятор апоптоза
- 18.CD – маркер кластера дифференцировки
- 19.CDC – Center of Disease Control (Центр по контролю за болезнями)
- 20.c-erb-B2 – протоонкоген, кодирующий рецептор 2 эпидермального фактора роста человека
- 21.CIN – Cervical Intraepithelial Neoplasia (цервикальная интраэпителиальная неоплазия)
- 22.CIS – carcinoma in situ
- 23.CMV - цитомегаловирус

- 24.E7, E6, E5 – ранние онкобелки, контролирующие репликацию вируса, транскрипцию и клеточную трансформацию
- 25.EBV – вирус Эпштейн-Барра
- 26.EUROGIN – European Organization of Genital Infections & Neoplasia (Европейское общество по ИППП и неоплазиям)
- 27.HSIL – High-Grade Squamous Intraepithelial Lesions (плоскоклеточное интраэпителиальное поражение высокой степени тяжести)
- 28.IARC – International Agency of Cancer Research
- 29.IFN $\gamma$  -  $\gamma$ - интерферон
- 30.Ig – иммуноглобулин
- 31.IL – интерлейкин
- 32.IRF – interferon regulatory factor
- 33.ISSDV – International Society for Study Vulvar Disease
- 34.LSIL - Low-Grade Squamous Intraepithelial Disease (плоскоклеточное интраэпителиальное поражение низкой степени тяжести)
- 35.MTHFR - метилентетрагидрофолатредуктаза
- 36.p53mut – мутантный ген-супрессор клеточной трансформации
- 37.Пап-мазки – мазки по Папаниколау
38. PCNA - ядерный антиген пролиферирующей клетки
- 39.TGF $\beta$  – трансформирующий фактор роста
- 40.TNF $\alpha$  - фактор некроза опухолей

## Введение

**Актуальность темы исследования.** В настоящее время особое внимание уделяется эпидемиологическим аспектам инфицирования вирусом папилломы человека (ВПЧ), играющего основную роль в этиологии рака шейки матки и вульвы [Ашрафян Л.А., 2020; Зароченцева Н.В., 2021; Chen L. et al., 2021]. При этом до сих пор отсутствуют единые алгоритмы ведения пациенток с отсутствием клинических проявлений папилломавирусной инфекции (ПВИ) (латентные и субклинические формы) [Роговская С.И., 2020; Бибнева Т.Н., 2020; Joura E. et al., 2019]. Консервативные методы вторичной профилактики, применяемые в настоящее время при латентных и субклинических формах ВПЧ не обладают высокой эффективностью - после применения противовирусных и иммуномодулирующих препаратов в 26–82% наблюдений отмечаются рецидивы [Аполихина И.А., 2019; Боровиков И.О., 2021; Loorik D., 2020]. Перспективным представляется адъювантное использование вакцины против ВПЧ, которая уже показала эффективность в отношении профилактики прогрессирования интраэпителиальных неоплазий и цервикального рака [Зароченцева Н.В., 2021; Petrillo M., 2020]. Вопросы менеджмента латентных и субклинических форм ПВИ по-прежнему остаются важной и не до конца решенной медицинской и социальной проблемой.

**Степень разработанности темы.** В последнее время появились единичные публикации, посвященные оценке влияния вакцинации против ВПЧ на снижение риска развития рецидива цервикальных интраэпителиальных неоплазий (CIN) после эксцизионного лечения [Зароченцева Н.В., 2021; Vogani G., 2021; Karimi M., 2020]. Тем не менее, до сих пор остается спорным вопрос о терапевтическом эффекте вакцинации для пациентов с предшествующим воздействием ВПЧ [Mariz F., 2020; Athanasiou A., 2020]. Механизм лечебного воздействия вакцины против ВПЧ остается дискуссионным и должен потенцировать новые исследования [Дубровина С.О., 2021; Зароченцева Н.В., 2021; Давыдов А.И., 2020; Olsson S., 2019; De Martel C., 2020; Cohen P., 2019]. Поэтому представляется актуальным проведение

исследования по возможному терапевтическому использованию вакцины против ВПЧ при латентных и субклинических формах ПВИ.

Исходя из вышеизложенного, **целью настоящей работы явилось:** повышение эффективности вторичной профилактики предрака и рака нижнего отдела гениталий путем разработки алгоритма ведения латентных и субклинических форм папилломавирусной инфекции у женщин.

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

- 1) изучить эпидемиологию инфицированности вирусом папилломы человека, оценить состояние профилактики предраковых заболеваний и рака шейки матки в Краснодарском крае в зависимости от места проживания, возраста, социального статуса и стадии поражения;
- 2) оценить особенности нарушений вагинального микробиоценоза, цитокинового статуса, характера экспрессии белков-регуляторов апоптоза, маркеров пролиферации, соотношения метаболитов эстрогенов, экспрессии рецепторов половых гормонов цервиковагинальной зоны при латентных и субклинических формах ПВИ;
- 3) установить основные патогенетические факторы, способствующие переходу латентных и субклинических форм ПВИ в интраэпителиальную неоплазию, и оценить их диагностическое и клиническое значение;
- 4) оценить эффективность применения квадριвалентной вакцины против ВПЧ (6, 11, 16, 18-го типов) с целью вторичной профилактики неопластических процессов нижнего отдела гениталий у пациенток с латентными и субклиническими формами папилломавирусной инфекции;
- 5) разработать алгоритм ведения пациенток с латентными и субклиническими формами папилломавирусной инфекции.

### **Научная новизна**

В настоящем исследовании **впервые:**

1. проанализированы состояние первичной профилактики заболеваний, вызванных ПВИ, у женщин, эпидемиология инфицированности ВПЧ в Краснодарском крае с оценкой динамических изменений и разработкой математического прогноза дальнейшего ее распространения;
2. определены и систематизированы основные факторы, способствующие реализации инфекции в вагинальную и цервикальную неоплазию (VIN/CIN) у женщин, инфицированных ВПЧ (латентная и субклиническая форма ПВИ), с созданием диагностических коэффициентов для прогноза;
3. выявлены особенности гомеостаза (микробиота, локальный иммунитет, оксидативный, цитобиохимический статус цервикавагинальной зоны, особенности молекулярно-биологических маркеров) при латентных и субклинических формах ПВИ;
4. установлено, что формирование неоплазии у пациенток с латентными и субклиническими формами ПВИ тесно взаимосвязано с нарушением вагинального микробиоценоза, увеличением локальной продукции TGF $\beta$  и IL-1 $\beta$ , ростом экспрессии p53mut и bcl-2, гиперэкспрессией c-erbB-2, снижением экспрессии рецепторов эстрогенов, повышением концентрации 16a-OHE1;
5. показано, что повышение локального содержания TGF $\beta$  может являться критерием неблагоприятного прогноза для перехода латентных и субклинических форм ПВИ в интраэпителиальную неоплазию;
6. доказана высокая эффективность квадριвалентной вакцины против ВПЧ при латентных и субклинических формах ПВИ снижающая риск развития VIN\CIN (в 1,8 раз).

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

1. Систематизированы наиболее значимые прогностические клинические, микробиологические, иммунологические и молекулярно-биологические факторы риска развития интраэпителиальной неоплазии.



2. Сформулирована концепция о роли нарушений иммунного, оксидативного статуса, состояния микробиоты цервикальной зоны на фоне наличия молекулярно-генетических маркеров адгезии, пролиферации и экспрессии ВПЧ в патогенезе ассоциированных с ПВИ заболеваний у женщин, которая позволила разработать оптимальные подходы к ведению пациенток с данной патологией.
3. Создан алгоритм менеджмента пациенток с латентными и субклиническими формами ПВИ, позволивший снизить риск реализации неопластических процессов нижнего отдела гениталий, нормализовать иммуногистохимические и оксидативные процессы в данной зоне.

**Связь с планом научно-исследовательских работ университета и отраслевыми программами:** исследование выполнено в рамках научной программы КубГМУ «Приоритет 2030» и НИР кафедры акушерства и гинекологии «Пути сохранения репродуктивного здоровья женщин при наиболее значимой акушерской и гинекологической патологии».

**Методология и методы исследования.** Работа выполнялась на клинических базах кафедры акушерства, гинекологии и перинатологии КубГМУ. На первом (ретроспективном) этапе проведен пятилетний (2016–2020 гг.) анализ в отдельном регионе (Краснодарский край): оценена распространенность латентных и субклинических форм ПВИ, уровень их диагностики, меры профилактики (6239 латентных и 1806 случаев субклинических форм ПВИ) (схема 1). На II-IV этапах на протяжении 36 месяцев комплексное обследование и мониторинг 436 пациенток (182 с латентными и 254 субклиническими формами ПВИ (МКБ 10 - A63.0); 30 женщин – группа контроля). Далее в зависимости от варианта менеджмента пациентки были разделены на 4 группы: **Ia группа** (n=105) – латентная форма ПВИ – наблюдение с ежегодным контролем вирусной нагрузки, кольпоскопией и онкоцитологией; **Ib группа** (n=77) – латентная форма ПВИ – квадριвалентная рекомбинантная вакцину против ВПЧ (6, 11, 16, 18-го типов) (в/м 3 дозы: вторая и третья дозы вводились через 1 и 3 месяца после первой); **IIa группа** (n=165) –

субклиническая форма ПВИ – наблюдение, аналогичное Ia гр.; **Пв группа** (n=89) – субклиническая форма ПВИ – вакцина против ВПЧ – 3 дозы по той же схеме. Оценку эффективности лечения проводили на основе динамики следующих показателей: кольпоскопии; цитологического (Pap-тест), молекулярно-биологического (ПЦР), иммуногистохимического (ИГХ) исследования. Основные критерии включения: диагностированная латентная или субклиническая форма ПВИ; согласие на участие в исследовании (правила GCP). Критерии исключения: возраст до 18 и старше 45 лет; планирование беременности в период наблюдения.

Статистическая обработка результатов проводилась методом вариационной статистики с использованием пакетов программ Statistica 6.0 и SPSS 16.0 for Windows. Различия между группами считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. За 5 лет в Краснодарском крае количество ВПЧ-носителей увеличилось в 1,7 раз, а субклинических форм ПВИ в 10 раз. Основными инфекционными агентами при латентных и субклинических формах ПВИ являются высокоонкогенные типы ВПЧ – 16, 18, 31 и 51 ( $72,4 \pm 5,8\%$ ). При этом первичная профилактика ВПЧ-инфекции находится на весьма низком уровне.
2. Папилломавирусная инфекция манифестируется на фоне сопутствующей генитальной инфекции, чаще - анаэробных дисбиозов. Прогрессирование заболеваний, ассоциированных с ПВИ связано с нарушением продукции цитокинов (преобладание иммуносупрессивного влияния  $TGF\beta$  и нивелированием цитотоксического и антипролиферативного эффектов  $TNF\alpha$  и  $IL-1\beta$ ), угнетением макрофагального звена локального иммунитета, способствующего Th-2 девиации, уменьшением рецепторов эстрогенов в сочетании с увеличением содержания  $16\alpha$ -гидроксиэстрогена в сочетании с высоким индексом массы тела, гиперэкспрессией онкогенов p53mut и bcl-2, маркеров пролиферации c-erb-B2 и PCNA.

3. Расчет диагностических коэффициентов с учетом клинико-анамнестических, лабораторных и инструментальных данных позволяет определить риск перехода латентных и субклинических форм ПВИ в VIN\CIN - суммарно риск реализации более 95% выявлен у 87,8% пациенток с латентными и субклиническими формами ПВИ.
4. Разработанный алгоритм менеджмента пациенток с латентными и субклиническими формами ПВИ, включающий цервикальный и цитологический скрининг, формирование групп риска по развитию ВПЧ-ассоциированных неопластических процессов, а также индивидуализированная терапия с применением вакцины против ВПЧ снижает риск развития VIN\CIN.

**Личный вклад автора в исследовании.** Автором выполнены анализ, отбор для исследования амбулаторных карт пациенток для исследования, составление анкет, индивидуальных карт. Результаты клинико-лабораторных показателей проанализированы в соответствии с критериями, разработанными соискателем для формирования базы данных и статистической обработки материалов. Лично выполнены кольпоскопия, забор материала для цитологического, гистологического и цитобиохимического исследования, разработаны прогностические шкалы и алгоритм менеджмента ВПЧ-патологии. Подготовлены доклады, статьи.

**Степень достоверности и апробация результатов.** *Основные положения диссертации доложены и обсуждены на:* 1) клинических конференциях кафедры акушерства, гинекологии и перинатологии КубГМУ; 2) клинических конференциях Краевого перинатального центра; 3) региональных и всероссийских конференциях (X региональный научно-образовательный форум «Мать и дитя» (Геленджик, 2017), XI общероссийский семинар «Репродуктивный потенциал России: версии и контраверсии» (Сочи, 2018), Межрегиональная научно-практическая конференция с международным участием «Акушерство и гинекология: от науки к практике» (Краснодар, 2018), Научно-практическая

конференция «Амбулаторная акушерско-гинекологическая помощь в сохранении репродуктивного здоровья» (Краснодар, 2019)).

**Реализация результатов исследования.** 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 ординаторов и аспирантов КубГМУ (Краснодар, ул. Седина, д. 4).

### **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 3.1.4 – «акушерство и гинекология».

**Объем и структура диссертации.** Материалы диссертационной работы изложены на 187 страницах компьютерного текста и содержат введение, обзор литературы, материалы и методы, собственные исследования, обсуждение полученных результатов, выводы, практические рекомендации, иллюстрирована 61 таблицами, 47 рисунками и 3 схемами. Библиографический указатель включает 107 источников, из них 50 отечественных и 57 зарубежных авторов.

**Публикации.** По материалам диссертации опубликована 11 печатных работ, в том числе 8 из перечня изданий, рекомендованных ВАК РФ (3 из базы SCOPUS).

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

### **1.1. Биологические особенности семейства *Papovaviridae*, современные представления о патогенезе папилломавирусной инфекции гениталий**

Вирус папилломы человека (ВПЧ) содержит ДНК, строго эпителиотропный, то есть поражает только эпителий кожи и слизистых оболочек гениталий и других органов. В отличие от вируса герпеса, ВПЧ не определяется в крови или нервных ганглиях, поэтому его выявляют в биоптатах или соскобах эпителия [14, 21, 36, 94]. Папилломавирусы обладают ткане- и типоспецифичностью [7, 34, 81]. Считается, что из всех идентифицированных типов вирусов папиллом 34 типа ассоциированы с поражением аногенитальной области [29, 36, 63]. 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 [16, 24, 49, 60]. В настоящее время ВПЧ рассматривается как этиологический фактор плоскоклеточной карциномы шейки матки, рака вульвы и влагалища. По результатам IARC (International Agency for Research on Cancer) (2017), в 98% случаев рака шейки матки в мире выявляются всего 13 типов ВПЧ [27, 31, 63, 90].

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% [2, 33, 40, 64].

#### **1.1.1. Эпидемиология, механизмы инфицирования и патогенность ПВИ**

Наиболее вероятным путем передачи ВПЧ является непосредственный контакт кожного покрова и слизистых оболочек [23, 38, 41, 60, 88]. Поскольку генитальная ВПЧ-инфекция передается половым путем, она, как и другие ИППП, часто бывает

многоочаговой и ассоциированной (более чем с одним типом ВПЧ и/или с другим возбудителем ИППП). 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 [ 11, 26, 54] . Генитальная ВПЧ-инфекция имеет высокую контагиозность и приобретается во время первых нескольких половых контактов, заражение же при однократном половом контакте происходит в 60% случаев [1, 14, 18, 43, 56]. 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 [12, 24, 47, 69]. Наиболее значимыми факторами риска, инфицирования и прогрессирования ПВИ, являются следующие [3, 25, 30, 61]: 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 ПВИ оценивается несколькими путями: клинические проявления в виде экзофитных кондилом; субклинические и внутриэпителиальные формы по данным клинико-морфологических исследований; клинические проявления в виде цервикальной интраэпителиальной неоплазии ( CIN) и рака шейки матки; выявляемость ДНК ВПЧ в содержимом цервикального канала (вирусоносительство или инфицированность); выявляемость признаков ПВИ при цитологическом исследовании мазков.

Распространенность ВПЧ-ассоциированных заболеваний по данным Минздрава РФ [2019] 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 [21, 74]. По наиболее

распространенным данным, ПВИ гениталий встречается у 44,3% пациенток, обращающихся в гинекологическую клинику по различным причинам [22, 26, 41]. 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 [57]. В Краснодарском крае ВПЧ-инфицирование женского населения оценено в 17–24% [11, 24]. В настоящее время ВПЧ, бесспорно, считается иницирующим фактором в генезе рака шейки матки, заболеваемость которым занимает одно из первых мест в мире [21, 36]. Показано, что у женщин с трехкратной выявляемостью ВПЧ высокоонкогенного типа риск развития рака шейки матки повышен в 14 раз [28, 64].

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 [16, 28, 36, 81]. Максимальная заболеваемость генитальной ВПЧ-инфекцией отмечается в возрастной группе от 18 до 28 лет [17, 25, 48, 63]. Вместе с тем отмечено, что у подростков и молодых женщин происходят более быстрое самопроизвольное очищение (элиминация) от ВПЧ и регрессия имеющейся ВПЧ-ассоциированной патологии по сравнению с женщинами более старшего возраста. 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 [9, 20, 76]. Регрессия плоскоклеточных интраэпителиальных поражений шейки матки низкой степени (LSIL) происходит у 90% подростков, в то время как среди взрослых женщин – только у 50–80% [7, 24, 39, 74]. Установлено, что средний срок элиминации ВПЧ у подростков составляет 8 мес. [22, 69]. Наблюдение за женщинами 18–25 лет показало, что прекращение ВПЧ носительства происходит в среднем за 1,5–2 года

[34, 91]. 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 [4, 21, 70]. 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 [11, 26, 42, 69].

Высокая частота субклинических форм заболевания затрудняет оценку факторов риска. Очевидно, что основные факторы риска генитальной ВПЧ-инфекции связаны с сексуальным поведением и в особенности с наличием многочисленных половых партнеров и недостаточностью клеточного иммунитета [36, 41, 59].

Внедрение вируса при инфицировании осуществляется в зрелые эпителиоциты поверхностных слоев или в незрелые клетки базальных слоев эпителия генитального тракта [1, 13, 26, 50, 78] , причем наиболее уязвимой считается область перехода многослойного плоского эпителия шейки матки в цилиндрический – зону трансформации [23, 45, 80]. Вирус папилломы человека инфицирует пролиферирующие эпителиальные клетки базального слоя эпителия и отличается высоким тропизмом именно к этому типу клеток [21, 64] . Репликация ДНК ВПЧ происходит только в клетках базального слоя, а в клетках других слоев вирусные частицы лишь персистируют [6, 19, 24, 48, 92] . В данное время в эпителиальных тканях отмечается продукция большого количества поздних капсидных белков, которые и характеризуют начальную, продуктивную фазу вирусной инфекции. Именно поэтому данный белок был избран мишенью для создания профилактической вакцины, которая должна затормозить продукцию ВПЧ и предотвратить образование критической концентрации для возникновения заболевания [32, 45, 60, 83] . Трансформация и малигнизация клеток эпидермиса контролируется генами ВПЧ, кодирующими ранние белки Е6 и Е7 [10, 26, 44, 78] .



Течение ПВИ имеет 3 периода – латентный, субклинический и клинический [2, 26, 34, 58, 81]:

1. латентный период – состояние, когда вирус находится в базальном слое и не обнаруживается кольпоскопически, цитологически и гистологически (бессимптомное вирусоносительство). Считается, что в этот период вирус находится в клетке в эписомальном состоянии в небольшом числе копий. Было показано, что ткани эпителия с латентным инфицированием прилежат к участкам эпителия с клиническими проявлениями болезни [18, 20, 63]. Последующий период активизации инфекции до сих пор не совсем понятен, поскольку папилломавирусы не размножаются в клеточной культуре и процесс их изучения, в связи с этим весьма затруднен [ 16, 33, 79 ];
2. период клинических проявлений – происходит реализация закодированной в геноме программы с участием онкогенов E6 и E7, которая приводит к пролиферации и усиленному синтезу клеткой – хозяином ДНК, необходимой вирусу; при этом клетки эпителия начинают делиться (продуктивная фаза). При этом отмечают высвобождение клеточного фактора роста, который, как известно, стимулирует эпителиальную пролиферацию. Поскольку синтез собственных клеточных белков подавлен, дифференцировки и созревания клеток плоского эпителия не происходит. Поэтому динамика клеточного обновления всего эпителиального пласта нарушается и возникает дисплазия, в основе которой лежат пролиферация и структурная перестройка эпителиальных клеток, начинающаяся с базального и парабазального слоев эпителия [5, 19, 26, 40, 77].

У здоровых женщин в результате нормальной работы механизмов контроля над пролиферацией (в том числе апоптоза) происходят дегенерация и последующее отторжение поврежденных клеток [ 11, 20, 54, 60, 98] . При нарушении механизмов контроля, тесно связанных с иммуносупрессией, инфекция персистирует, и развивается субклиническая, а затем и клиническая стадии заболевания [23, 24, 45, 83, 101]. Клинически выраженные формы ПВИ возникают, как правило, в результате

действия ряда факторов: социальных, инфекционных, иммунных.

### **1.1.2. Морфологические особенности ВПЧ-ассоциированной патологии у женщин**

Наиболее специфичными клетками для ПВИ считаются койлоциты, образующиеся в тканях в результате цитопатического эффекта ВПЧ и представляющие собой клетки многослойного плоского эпителия промежуточного типа с увеличенными в разной степени ядрами, неровной складчатой мембраной и гиперхроматозом [17, 29, 33, 61, 87]. Второй по специфичности клеткой при ПВИ является дискератоцит - мелкие клетки многослойного плоского эпителия с пикнотическими ядрами различной формы и величины и интенсивной эозинофильной цитоплазмой, которые располагаются комплексами в поверхностных слоях эпителия [19, 28, 64, 90].

Структура ВПЧ-ассоциированной патологии, согласно заключениям патоморфологов, в 16,9% случаев представлена плоскими и остроконечными кондиломами, в 28,2 – различными изменениями метапластического или плоского эпителия шейки матки при наличии единичных клеток с койлоцитозом, в 16,9% CIN в сочетании с плоской кондиломой, в 27,4% CIN разной степени тяжести без койлоцитов, в 10,4% наблюдений – раком шейки матки [6, 13, 28, 85] .

Субклинические формы ПВИ характеризуются нарушением структуры плоского эпителия в нескольких гистологических разновидностях, включающих плоскую и инвертирующую формы. В клинической практике все гистологические формы обычно объединяют под названием «плоская кондилома» [14, 36, 51, 87]. Их можно обнаружить только кольпоскопически и гистологически. Плоские кондиломы нередко возникают в зоне трансформации (ЗТ) шейки матки, располагаясь как в проксимальных, так и в дистальных ее отделах. В настоящее время выделено несколько разновидностей субклинических форм ПВИ [2, 26, 74]:

- эндофитные кондиломы шейки матки, которые гистологически разделяются на плоские и инвертированные с локализацией в криптах;

- кондиломатозный вагинит и цервицит, когда при осмотре крапчатость слизистой оболочки с мелкими шипообразными возвышениями над ее поверхностью. В отличие от плоских кондилом этот тип поражения не имеет четких контуров и нередко выявляется только при кольпоскопии.

### **1.1.3. 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 [8, 13, 27, 44, 83]. ВПЧ специфически инфицирует клетки эпителия, вызывая доброкачественные и злокачественные неоплазии. 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 [33, 39, 41, 68] . Наиболее интенсивно изучалось естественное развитие цервикальной интраэпителиальной неоплазии ( CIN) или предрака по отношению к раку шейки матки [ 3, 17, 20, 34, 65, 89 ]. CIN I стадии вероятность ее развития в инвазивный рак составляет 1%, вероятность обратного развития до нормы 60%, CIN II рак развивается в 1,5% случаев, регрессия CIN I наступает в 40% случаев, CIN III рак развивается в 12% случаев, а обратное развитие CIN II CIN I наблюдается в 32% случаев [26, 28, 32, 68 ]. Инвазивные раки в 93% случаев обусловлены ПВИ, для рака шейки матки в 50% случаев это связано инфицированием ВПЧ 16 типа [ 14, 17, 39, 56, 70, 102 ].

Существенной особенностью ВПЧ является их возможность переключаться с инфекции непродуктивного типа к инфекции продуктивного типа и наоборот [24, 27, 39, 51, 90]. 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 [19,

26, 83]. Таким образом, условиями формирования необратимой неоплазии являются [31, 47, 72, 95]:

- активная экспрессия генов E6 и E7 ВПЧ;
- индукция метаболических механизмов конверсии эстрадиола в 16-гидроксистерон (16-ОНЕ1), который относится к категории «агрессивных гормонов», вызывающих длительный эффект;  $\alpha\alpha$
- индукция множественных повреждений хромосомной ДНК в инфицированной клетке, которая завершает процесс перерождения.

Наиболее важными с точки зрения онкогенных потенциалов ВПЧ являются онкобелки E5, E6 и E7 (онкопротеины) [4, 62, 88, 103]. Пролиферация клеток активируется ферментом теломеразой, экспрессию которой осуществляет E6. Таким образом, патогенетической основой вирус-индуцированного онкогенеза являются интеграция вирусной ДНК в хромосому инфицированных клеток с активным синтезом онкобелка E7, и способность трансформированных клеток метаболизировать эстрадиол с образованием 16 $\alpha$ -гидроксистерона (16 $\alpha$ -ОНЕ1) – агрессивного метаболита, который активирует экспрессию гена E7 (и способствует высокому устойчивому синтезу вирусного онкобелка E7). Указанный комплекс обеспечивает пролиферативную активность формирующегося опухолевого клона, а также подавление системы иммунологического надзора [21, 69]. Онкопротеины E6 и E7 имеются в составе ВПЧ ВКР и не содержатся в вирусах низкого онкогенного риска [ 23, 37, 40, 74, 82 ]. Они инактивируют клеточный надзор, который минимизирует генетическую нестабильность, вследствие чего прекращается элиминация клеток с начальными вредными изменениями, связанными с развитием неоплазии [ 30, 47, 84, 88 ]. Одним из ключевых моментов трансформации клеточного роста является взаимодействие белков высокоонкогенных типов ВПЧ (в первую очередь, E6) с онкосупрессором p53, что приводит к ингибированию последнего. Так, Rapp Chen [2018] 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 [ 36, 71, 94 ]. Онкобелок E6 высокоонкогенных типов ВПЧ классифицируется как белок высокого риска ( high risk proteins), взаимодействует с антионкобелком p53 и образует с ним устойчивый комплекс [11, 29, 48, 67, 83]. Это приводит к быстрой протеолитической деградации P53 в убиквитин-зависимом пути протеолиза [ 76, 91 ]. 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 [ 31, 79, 100 ]. Кроме того, именно белок E6 связывается с интерлейкином-18, являющимся основным индуктором  $\gamma$ -интерферона ( IFN), что приводит к блокаде реакций клеточного цитотоксического иммунитета [ 12, 80, 93 ]. Установлено действие белков E6/E7 на экспрессию гена, кодирующего IL-18, что свидетельствует о наличии у ВПЧ специфического механизма иммуносупрессии и ускользания от иммунного ответа [ 6, 14, 69 ]. Вместе с тем следует отметить, что онкобелок E6 вряд ли можно отнести к ключевым молекулярным мишеням. Его функция реализуется в отношении онкогенеза в очень узком интервале жизненного цикла ВПЧ и уже не играет роли в дальнейшем развитии опухоли в связи с частой делецией гена E6 в интегрированном геноме ВПЧ [ 19, 82, 99 ].

Второй основной онкопротеин вируса папилломы человека - E7, являющийся наряду с E6 фактором развития цервикального рака, оказывает свой эффект посредством связывания с онкосупрессором белка ретинобластомы ( Rb) и его инактивации. Seavey и соавт. [2019] показали, что такая специализация E7 наблюдается при наличии E6, инактивирующего p53. Однако в искусственно созданной клеточной системе, в которой E6 не было, E7 связывался с p53, стабилизируя его, что сохраняло его функцию как индуктора транскрипции и активировало продолжительное клеточное деление и утрату клетками

чувствительности к индукции апоптоза ультрафиолетовым излучением. 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, контролирующей клеточное деление [9, 14, 37, 91]. В это же время в результате координированной экспрессии и активности белков E6 и E7 происходит выраженная экспансия шиповатого слоя эпидермиса [ 22, 48, 85, 96 ]. Очень важное наблюдение получено при исследовании влияния этого белка на клеточный ответ при действии IFN- $\gamma_2$ . Белок E7 подавляет индукцию генов, отвечающих активацией экспрессии под влиянием эндогенного IFN [24, 62, 80]. Это свидетельствует о существовании своеобразного механизма ускользания IFN в условиях развивающейся инфекции. В последние годы предпринимаются попытки создания противовирусных препаратов, направленных на подавление функций онкобелка E7 [ 13, 37, 64, 83 ].

#### **1.1.4. 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 органов 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 противовирусного иммунитета [11, 26, 49, 74]. Используя различные приемы молекулярной мимикрии, подавления активности иммунокомпетентных клеток, вирусы папилломы человека обеспечивают защиту зараженных ими эпителиальных клеток от уничтожения T-лимфоцитами и естественными киллерами, беспрепятственную репликацию вирусного генома и инфицирование новых клеток-хозяев [ 38, 41, 69, 82 ]. ДНК вирусы типа 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 [29, 36, 71, 84]. Механизмы избегания вирусом иммунной атаки в целом могут быть разделены на три группы:

1. уклонение от распознавания компонентами гуморального иммунитета, например, за счет изменения иммунодоминантных эпитопов. В этом случае вирус усиливает продукцию FcR в инфицированных клетках, что может способствовать ускоренной элиминации циркулирующих вирусоспецифических антител. Помимо этого, мутации вирусных антигенных детерминант (иммунодоминантных эпитопов) могут приводить к избеганию его элиминации с участием гуморального иммунного ответа [83];
2. препятствование клеточному иммунитету, например, за счет подавления презентации вирусных пептидов, а также подавление активности НК клеток;
3. подавление реализации эффекторных функций, например экспрессии цитокинов, а также апоптоза инфицированных клеток.

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. 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) [2, 14, 29, 65]. При этом Th-1 секретируют IL-2, IL-3, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , способствующие реализации клеточного иммунного ответа; Th-2-цитокины: IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, влияющие на гуморальный ответ [20, 43, 67, 81]. Считается, Th-1 цитокины отвечают за защиту от внутриклеточных паразитов, тогда как для иммунитета от внеклеточных паразитов необходима комбинация Th-1 Th-2 [9, 11, 84]. Таким образом, течение папилломавирусной инфекции во многом зависит от

формирования определенного спектра цитокинов [14, 79, 93]. В частности, рецидивирующая ПВИ характеризуется снижением уровня  $IL-1\beta$   $IL-1\alpha$  в цервикагинальной слизи [11, 49, 81], повышением уровня  $IL-1\beta$  в сыворотке крови [13, 26, 90], а также увеличением спонтанной продукции  $IL-1\beta$  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) [36, 71, 105], снижением спонтанной и индуцированной секреции  $IL-2$ , снижением уровня спонтанной секреции  $IFN\gamma$  (при удовлетворительной возможности клетками его продукции), значительным повышением продукции  $IL-10$  [25, 64, 88]. Подобные нарушения продукции цитокинов у больных папилломавирусной инфекцией открывают новые перспективы для использования в ее лечении экзогенных цитокинов. Таким образом, изучение механизмов индукции иммуносупрессии, иными словами, избегания иммунного надзора, поможет понять аспекты разных звеньев иммунной системы и улучшить иммунотерапию для профилактики и лечения ПВИ.

Большое значение в противовирусной защите организма придается системе интерферонов, при этом механизм непосредственного воздействия интерферонов на ВПЧ до сих пор до конца не ясен [16, 21, 69]. Считается,  $IFN$  вызывает снижение содержания в клетках мРНК вируса, оказывает антипролиферативный эффект на трансформированные клетки хозяина, повышая уровень экспрессии гена онкосупрессора ретинобластомы [34, 85]. После воздействия  $IFN$ - $\gamma$  на линии клеток цервикальных кондилом, инфицированных ВПЧ типа 6/11, и карцином, трансформированных ВПЧ типа 16, значительно возрастает продукция мРНК,  $IFN$ - $\gamma$   $TNF$ - $\alpha$  [61, 78, 83]. Снижение числа вирусных частиц в инфицированных клетках связано с подавлением синтеза ДНК и экспрессии генов ВПЧ. Так,  $IFN$ - $\gamma$  оказывает ингибирующий эффект на экспрессию генов E6 и E7 онкогенных типов папилломавируса в цервикальных клетках, а также на пролиферацию самих клеток [



61, 89 ]. Обнаружен цитопатический эффект, оказываемый только IFN-  $\alpha$  и  $\gamma$  инфицированные ВПЧ типа 16 кератиноциты человека, проявляющейся в снижении уровня транскрипции генов E6 и E7 [ 43, 71, 81 ]. Белок E7 ВПЧ блокирует антипролиферативное действие IFN и предотвращает лизис инфицированных клеток. Суперэкспрессия гена E7 является одной из причин потери иммунной системой способности к противовирусной активности в ответ на развитие ПВИ [ 25, 103 ]. Для папилломавирусной инфекции характерно выраженное подавление интерферогенеза. При этом более значительно продукция IFN угнетена у больных с тяжелым течением хронического заболевания. Фоновые показатели сывороточного IFN сочетаются с резко угнетенной способностью иммуноцитов синтезировать IFN $\alpha$  и IFN $\gamma$  [21, 34, 86]. Доказано, IFN I -го типа играют основную роль в местной и системной противовирусной защите.

## **1.2. Клиника папилломавирусной инфекции у женщин**

Спектр известных клинических проявлений папилломавирусной инфекции довольно разнообразен и в последнее время, в связи с накоплением новых сведений, связанных с диагностикой и тактикой ведения ВПЧ инфицированных женщин, расширяется.

Инкубационный период ПВИ достоверно определить весьма проблематично. В связи с возможностью бессимптомного вирусоносительства длительность его, по данным различных авторов, составляет от 1 до 8 месяцев [В.Н. Прилепская, 2013]. Отмечается вариабельность клинических и субклинических проявлений папилломавирусной инфекции: способность спонтанно регрессировать и рецидивировать, в связи с чем изменяется визуальная и кольпоскопическая картина, а также различные морфологические признаки.

### *Классификация ВПЧ-ассоциированных поражений нижнего отдела гениталий*

Наиболее современной классификацией [2007] на настоящий момент является систематизированная проф. С.И. Роговской и проф. В.Н. Прилепской совместно с

патоморфологами Н.И. Кондриковым и Л.С. Ежовой, и базирующаяся на классификации J. Handley и W. Dinsmore [1994].

1. Клинические формы (видимые невооруженным глазом):
  - экзофитные кондиломы (типичные остроконечные, папиллярные, папуловидные и др.);
  - симптоматические CIN.
2. Субклинические формы (не видимые невооруженным глазом, бессимптомные, выявляемые только при кольпоскопии и/или цитологическом или гистологическом исследовании):
  - плоские кондиломы (типичная структура с множеством койлоцитов);
  - малые формы (различные изменения многослойного плоского и метапластического эпителия с единичными койлоцитами);
  - инвертированные кондиломы с локализацией в криптах;
  - кондиломатозный цервицит и вагинит.
3. Латентные формы (отсутствие клинических, морфологических и гистологических изменений при обнаружении ДНК ВПЧ).
4. Цервикальная интраэпителиальная неоплазия ( CIN) и плоскоклеточные интраэпителиальные поражения ( SIL), и рак шейки матки:
  - CIN – слабая дисплазия с койлоцитозом, дискератозом или без них;
  - CIN II – умеренная дисплазия с койлоцитозом, дискератозом или без них;
  - CIN III - тяжелая дисплазия с койлоцитозом, дискератозом или без них;
  - микроинвазивная плоскоклеточная и железистая карцинома.

### **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, 2018]. 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 [4, 16, 31, 54, 86]. Цервикальный скрининг предусматривает выявление пациенток, имеющих предрасполагающие факторы к раку нижнего отдела женских гениталий (латентное носительство ПВИ, субклинические формы, 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. Наиболее распространенными методами диагностики являются кольпоскопическое, цитологическое и вирусологическое исследования.

### **1.3.1. Кольпоскопическая диагностика**

Кольпоскопия на настоящий момент является наиболее распространенным методом диагностики заболеваний шейки матки. Чаще всего применяется расширенная кольпоскопия. 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 [13, 26, 34, 61, 78].

В связи с большим разнообразием проявлений субклинической инфекции специфического комплекса, кольпоскопических признаков нет. Кольпоскопически обнаруживаются ЗТ (нормальная и атипическая), ацетобелые участки, не возвышающиеся над поверхностью, шиловидные выросты эпителия, мозаика, пунктация, негативные участки, атипические сосуды и др. Наиболее специфичными признаками являются ацетобелый эпителий (прогностическая ценность - 91,7%), йодопозитивные мозаика и пунктация (77,8%), АЗТ (77,4%). Некоторые авторы

специфическим кольпоскопическим признаком ПВИ шейки матки считают неравномерное поглощение йодного раствора Люголя беловатым после нанесения уксусной кислоты участком эпителия (в виде йодопозитивных пунктации и мозаики). Полагают, что это связано с неравномерным распределением койлоцитов внутри поражения. Иногда ПВИ может встречаться в виде клинической формы цервицита.

Чувствительность кольпоскопической диагностики при цервикальных интраэпителиальных поражениях составляет 60–70%, при комплексном применении с ВПЧ-тестированием Pap-тестом - 90% [8, 24, 73]. Точно диагностировать внутриэпителиальные кондиломы с помощью кольпоскопического метода возможно только при сочетании плоских форм кондилом с экзофитными. С помощью только кольпоскопии весьма трудно различить участки доброкачественной ПВИ и CIN. Считают, что признаки папилломавирусного поражения могут обнаруживаться не только в ткани зоны трансформации, но и в естественном плоском эпителии вне зоны трансформации, что при CIN наблюдается редко. Кроме того, участки ПВИ иногда имеют не гладкую, а микропапиллярную поверхность. Сосудистая сеть при плоских формах ПВИ бывает подозрительной в отношении малигнизации, поскольку, несмотря на регулярность и однотипность сосудистых изменений, они могут быть странной формы и калибра. Некоторые из них могут быть ориентированы вертикально в виде петель и кольпоскопически представлять пунктацию, другие проходят параллельно поверхности и представляют мозаику. Аналогичная картина может соответствовать и неоплазии. Инвертирующие кондиломы морфологически выявляются редко, развиваются в криптах эндоцервикса; при визуальном осмотре практически не определяются. Специфическая кольпоскопическая картина не описана. При применении кольпоскопии вместе с ВПЧ-тестированием Pap-тестом чувствительность диагностики повышается до 90% (EUROGIN, 2014). Кольпоскопия, несмотря на свою неспецифичность, является наиболее распространенным методом диагностики ПВИ в связи с возможностью выявления различных типов эпителия, оценки качества

патологических образований, состояния сосудистого рисунка, а также возможностью при необходимости произвести прицельную биопсию ткани.

### **1.3.2. 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% [21, 39, 52, 68, 91]. Этот метод не рекомендуется для проведения рутинных исследований. 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%) [13, 28, 56, 81]. При этом гистологический метод не является «золотым стандартом» в диагностике субклинических и клинических проявлений ПВИ из-за технических сложностей и инвазивности.

Следует подчеркнуть, что цервикальная цитология – это первичный скрининговый тест для плоскоклеточных эпителиальных поражений и плоскоклеточного рака. Дизайн цитологического заключения не является жестким стандартом и может быть адаптирован цитологической лабораторией. BS цитологических заключений была создана как унифицированная система терминологии для более эффективной передачи информации (цитологических результатов) от лабораторий клиницистам, чтобы обеспечить ясное руководство для клинического менеджмента.

### **1.3.3. Молекулярно-биологические методы диагностики папилломавирусной инфекции**

В настоящее время широкое распространение получили молекулярно-биологические методы диагностики ПВИ, которые направлены на обнаружение

частиц ДНК ВПЧ в материале (из цервикального канала, с поверхности аномального эпителия и экзофитных кондилом). Однако использование этих методов как диагностического критерия для неопластических процессов приводит к значительной гипердиагностике, так как 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 [11, 24, 35, 74]. Прогностическая ценность данных методов возрастает при динамическом наблюдении для определения риска рецидива или прогрессирования заболевания. 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. На современном этапе используются наборы реагентов, предназначенные для обнаружения в биопсийных гистологических препаратах ДНК ВПЧ различных типов, интегрированных в хромосомы инфицированных клеток.

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.

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.

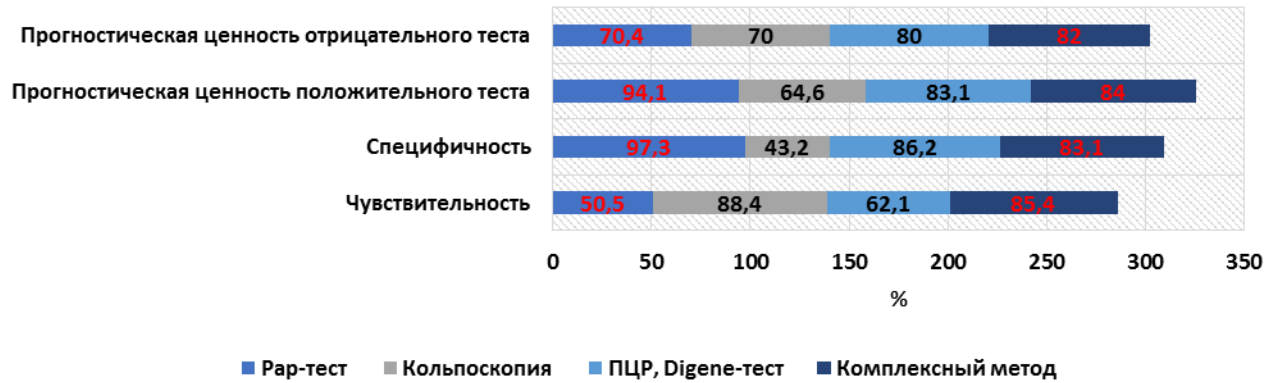
### **1.3.4. Иммунологическая диагностика папилломавирусной инфекции**

Имеющиеся в настоящее время серологические тесты не удовлетворительны для клинической диагностики и могут применяться для эпидемиологического исследования. Одним из самых перспективных иммунологических методов диагностики на сегодняшний момент является определение наличия онкобелка E7 [10, 34, 52, 67, 81]. Интеграция ДНК ВПЧ в геном клеток сопровождается двумя молекулярными событиями: встраивание вирусной ДНК в хромосому всегда сопровождается нарушением структуры гена E2, который является репрессором E7; при интеграции ДНК ДНК-вируса синтез белка E2 прекращается вследствие нарушения структуры соответствующего гена, и активируется синтез белка E7. Наличие онкобелка E7 в цервикальных пробах может рассматриваться как однозначное свидетельство начавшегося процесса малигнизации эпителиальных клеток, содержащих интегрированную копию генома ВПЧ. Происхождение данного онкобелка полностью связано с жизненным циклом интегративной формы ВПЧ-инфекции и в норме E7 в тканях не синтезируется и, соответственно, не определяется.

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.

### **1.3.5. Патогистологическая диагностика папилломавирусной инфекции**

К гистологическому методу диагностики ПВИ существуют определенные показания. Профессор С.И. Роговская совместно с сотрудниками Научного центра акушерства, гинекологии и перинатологии РАМН (2014) сформулировала достаточно четкие показания для проведения биопсии).



**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, так как 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.

#### **1.4. Основные методы терапии папилломавирусной инфекции 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. Не существует в настоящее время препаратов, специфически действующих на ВПЧ. Эффективность различных методов терапии сейчас составляет 60–80%. Частота рецидивов ПВИ 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- 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. иммунокорректирующие препараты (являются неспецифическими, зачастую малоэффективными и назначаются бесконтрольно);
6. неспецифические средства (витамины, десенсибилизирующие средства, адаптогены, ретиноиды, физиотерапевтические методы и др.).

### **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 [9, 14, 17, 34].

Данным требованиям отвечает препарат природного происхождения - ферровир, действующим веществом которого является дезоксирибонуклеонат натрия в комплексе с железом. Препарат активизирует противовирусный, противогрибковый и противомикробный иммунитет, воздействуя на клеточное и гуморальное звено иммунитета, способствует торможению репликации ДНК- и РНК-содержащих вирусов. Он представляет собой натриевую соль нативной деполимеризованной двуспиральной дезоксирибонуклеиновой кислоты природного происхождения, модифицированная ионами железа. Субстанция препарата представляет собой высокоочищенную вытяжку из молок осетровых рыб. Препарат проявляет противовирусное действие в отношении различных РНК- и ДНК-содержащих вирусов. Клинический опыт применения препарата показал его высокую активность, хорошую переносимость. При рецидивирующей герпетической инфекции сокращается тяжесть и продолжительность рецидива, наступает быстрая и длительная ремиссия [37, 49]. Результатом клеточных взаимодействий на фоне применения ферровира являются активация процессов клеточного и гуморального иммунитета, индукция Th1 типа ответа, увеличение количества CD8, CD16 клеток, усиление противовирусной защиты, стимуляция лейкопоэза [8, 21, 34], макрофаги, которые увеличивают продукцию H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, усиливая тем самым цитотоксическую, бактерицидную и антигенпредставляющую активность [14, 87] и NK-клетки с последующей трансформацией последних в лимфокинактивированные киллеры (ЛАК), имеющие генотип CD16+CD3-CD5-, ответственные за генетически не рестриктированную цитотоксичность [69, 84]. В несколько меньшей степени нуклеинат натрия стимулирует В-лимфоциты [91] и CD8+ цитотоксические лимфоциты [73]. К тому же, описанные стимулирующие прямые и опосредованные эффекты нуклеината натрия не касаются в основном индукции синтеза TNF, являющегося в данных условиях основным, вызывающим десквамацию эпителия и повреждение тканей, цитокином.

В последние годы обсуждается эффект препарата на основе индол-3-карбинола (I3C) для лечения ПВИ. Это фитонутриент, содержащийся в овощах семейства крестоцветных. Многочисленные данные литературы указывают на то, что прием более 3 месяцев I3C предупреждает развитие опухолей кишечника, легких и органов женской репродуктивной системы [3, 12, 29, 41, 86, 103]. Данное соединение отличается крайней нестабильностью и легко подвергается олигомеризации, которая многократно усиливается в кислой среде. При этом основным олигомерным продуктом I3C является его димерная форма 3,3-дииндолилметан (DIM) [3, 13, 21, 48, 96]. Фармакокинетические исследования показали, что под воздействием кислой среды желудка принятый перорально I3C почти мгновенно превращается в DIM. Большинство клинических эффектов, наблюдаемых при его приеме, на самом деле обусловлены димерной формой I3C-DIM [2, 13, 26, 29, 30, 76, 92]. I3C относится к препаратам, способным деметилировать ген WIF1 - гиперметилирование гена WIF1 сопровождает процесс неоплазии за счет снижения уровня его экспрессии и синтеза белка с дальнейшей неконтролируемой активацией WNT-сигнального пути [19, 23, 48, 96]. Одним из важнейших механизмов антипролиферативного действия I3C является его способность индуцировать апоптоз – «программируемую гибель» опухолевых клеток через систему Вах-Bcl [4, 32, 47, 83]. Восстановление способности клеток к апоптозу, в свою очередь, приводит к снижению степени гиперплазии ткани, так как апоптоз уравнивает усиленную пролиферацию ткани. Важным фактом является способность DIM проявлять антинеоангиогенную активность. Патологический рост сосудов практически всегда сопровождает гипер- и неопластические процессы. Показано, что в условиях *in vitro* микромолярные концентрации DIM эффективно подавляют пролиферацию и миграцию эндотелиальных клеток, а также их способность образовывать сосуды. *vivo* введенный подкожно экспериментальным животным DIM (5 мг/кг, ежедневно) на 74% подавлял патологический неоангиогенез [5, 13, 27, 41, 84, 93]. В условиях *in vitro* в опухолевых клетках DIM стимулирует IFN $\gamma$ -зависимые сигнальные каскады

посредством активации экспрессии рецепторов IFN $\gamma$ , а также других IFN-респонсивных регуляторных белков [15, 21, 68, 81]. В этой связи, с большой вероятностью ИЗС обладает высокой противоопухолевой и противовирусной активностью в отношении ВПЧ-инфицированных клеток.

Еще одними из препаратов, в перспективе влияющих на пролиферативную активность клеток, инфицированных ВПЧ являются пептидогликаны (PTG) и липотейхоевая кислота (LTA), полученные из продуктов ферментации лактобактерий, а также глицирризиновая кислота (ГК) («Кольпоцид-гель» (UPL)). 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 [17, 21, 37]. 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 [17, 64, 68]. 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 [19, 67].

### **Иммуотропная терапия папилломавирусной инфекции**

Последние годы в практике лечения ПВИ особый интерес уделяется иммуномодулирующей терапии, которая оказывается необходимой при длительной

персистенции возбудителя, при нарушении различных звеньев системного и местного иммунитета.

Интерфероны ( IFN) являются эндогенными цитокинами, обладающими противовирусным, антипролиферативным и иммуномодулирующим свойством [16, 24, 39] . Точкой приложения иммунокорректирующего действия данных препаратов являются главным образом Т-лимфоциты (выполняющие регуляторную и цитолитическую функции), а также фагоцитирующие клетки (макрофаги и полиморфноядерные лейкоциты) [8, 19, 46]. Применение данных препаратов обусловлено, во-первых, прямым активирующим действием на клетки мононуклеарно-фагоцитарной системы [24, 39, 69], 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 [34, 82], в-третьих, активируют НК-клетки [41, 79], неспецифически элиминирующие любые антигенно измененные клетки [21, 48, 94]. 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. Существует три основных класса интерферонов:  $\alpha$ - IFN (лейкоцитарный),  $\beta$ - IFN (фибробластный) и  $\gamma$ - IFN (Т-лимфоцитарный). 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 отрывочны и отчасти противоречивы, и дальнейшее изучение их использования в терапии ПВИ, несомненно, расширит представление и создаст необходимые предпосылки для дифференцированного подхода к комплексной терапии вышеуказанной патологии. Также следует подчеркнуть, что данные препараты назначаются строго по показаниям, при обязательном исследовании иммунного

статуса пациента и, как уже говорилось выше, состояние системного иммунитета не всегда отражает те изменения, которые происходят на уровне местного иммунитета урогенитальной зоны, который нам еще предстоит изучать. 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 CIN, особенно вызванных типами ВПЧ высокого онкогенного риска [4, 9, 11, 35, 64, 82].

В 2003 году в России появился Аллокин-альфа (« BRAND-PHARM», Москва) - отечественный противовирусный препарат нового типа. Действующим веществом препарата является цитокиноподобный пептид аллоферон, обладающий выраженной противовирусной и противоопухолевой активностью [13, 24, 46]. Действующим веществом препарата является цитокиноподобный пептид аллоферон-1. Аллофероны – новая группа противовирусных препаратов природного происхождения. Сначала это семейство биологически активных пептидов было выделено из клеток иммунной системы «хирургических личинок», насекомых семейства *Calliphoridae*. Исследованиями последних лет показано, что иммунная система этих насекомых синтезирует ряд мощных антимикробных факторов и содержит клетки, функционально сходные с естественными киллерами млекопитающих. Высокая эффективность аллокин-альфа в терапии рецидивирующего герпеса и других инфекций показана в ряде исследований [19, 26, 38]. Действие аллокина-альфа направлено на усиление распознавания вирусных антигенов и инфицированных клеток натуральными киллерами, нейтрофилами и другими эффекторными системами естественного иммунитета, ответственными за элиминацию вируса [12, 24, 49]. Применение аллокина-альфа улучшает распознавание пораженных клеток и позволяет подавить очаги репликации вируса. Аллокин-альфа обладает иммуотропным эффектом, препарат усиливает продукцию IFN  $\gamma$   $\kappa$ -клетками в ответ на стимуляцию IL-12 [21, 24, 35]. В отличие от известных индукторов IFN, аллокин-альфа выступает в качестве кофактора, позволяя продуцирующим IFN $\alpha$

лейкоцитам эффективно реагировать на вирусный антиген. Это дает возможность сфокусировать эффект препарата в месте размножения вируса и избежать избыточной реакции лейкоцитов за пределами очага инфекции. Высокая эффективность аллокина-альфа в терапии рецидивирующего простого герпеса показана в ряде исследований [5, 24, 29]. В России проводились исследования по изучению влияния аллокин-альфа на эффективность лечения и частоту рецидивов папилломавирусных поражений шейки матки у женщин репродуктивного возраста [11, 23]. Выявлено, что аллокин-альфа наряду со стимуляцией активности функций естественных киллеров способствует восстановлению функциональной активности Т-клеточного иммунитета (Th-1 тип иммунного ответа), который наиболее предпочтителен в процессе выздоровления от вирусных инфекций.

Инозин пранобекс (ИП) – давно используемый в медицинской практике иммуностимулятор, который считается эффективным при различных вирусных инфекциях. ИП – синтетическое комплексное производное пурина, обладающее иммуностимулирующей активностью и неспецифическим противовирусным действием. Противовирусное действие препарата основано на его способности подавлять репликацию ДНК и РНК вирусов при помощи связывания с рибосомой клетки и тем самым изменять ее стереохимическое строение. При комбинированном назначении ИП усиливает действие интерферона- $\alpha$ , противовирусных средств. Кроме противовирусного действия инозин пранобекс обладает иммуномодулирующим свойством за счет комплекса инозина, что повышает его доступность для лимфоцитов. Изопринозин восстанавливает функции лимфоцитов в условиях иммунодепрессии, повышает бластогенез в популяции моноцитарных клеток, стимулирует экспрессию мембранных рецепторов на поверхности Т-хелперов, предупреждает снижение активности лимфоцитарных клеток. Изопринозин оказывает стимулирующее влияние на активность цитотоксических Т-лимфоцитов и естественных киллеров, функции Т-супрессоров и Т-хелперов, повышает продукцию иммуноглобулина G, интерферона- $\gamma$ , интерлейкина (ИЛ)-1 и

ИЛ-2, снижает образование провоспалительных цитокинов – ИЛ-4 и ИЛ-10, потенцирует хемотаксис нейтрофилов, моноцитов и макрофагов. Подобные свойства препарата позволяют изменять механизм взаимодействия ВПЧ и макроорганизма, препятствуя переходу вируса из транзитной в персистирующую форму, а также влияя на клиническую манифестацию инфекции. Обычно природные аналоги ИП поступают в организм из разнообразных пищевых продуктов. Поэтому при правильном назначении ИП в качестве иммуностимулятора с учетом противопоказаний к его применению частота побочных эффектов минимальна.

### **Дифференцированный подход к терапии ПВИ гениталий у женщин**

#### *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 [12, 26, 34]. В настоящее время считается, что самопроизвольное очищение от ВПЧ или смена серотипа происходят в течение 3 лет у 65–70% женщин [9, 25, 71]. Другие данные [24, 69] 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 оптимальной тактикой ведения женщин с латентной формой ПВИ считается диспансерное наблюдение. Терапия проводится только при появлении клинических и субклинических признаков ВПЧ-ассоциированного заболевания.

#### *ВПЧ-индуцированные субклинические поражения.*

Основными методами терапии данной формы ПВИ являются системная и локальная иммуномодулирующая терапия, облучение и применение химиопрепаратов. Наиболее эффективен в данном случае комбинированный метод лечения, сочетающий в себе локальную деструкцию очагов ПВИ с назначением иммуномодулирующей терапии.

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 [26, 48, 54].

### **1.5. Профилактика рака шейки матки**

Широкое внедрение скрининговых программ позволило своевременно выявить доброкачественные поражения и предопухолевые состояния шейки матки, определить экологические факторы, приводящие к развитию последних, и проводить адекватное лечение [23, 35, 48]. Результаты скринингового обследования женщин дают возможность сформировать группы риска и, наблюдая за ними, определять больных, в отношении которых необходимо проведение профилактических мероприятий [17, 39]. В настоящее время определилась двухэтапная система профилактики рака шейки матки [25, 33, 46]:

1. Первичная профилактика – система мер по выявлению факторов риска развития РШМ и их устранение (пропаганда здорового образа жизни, борьба с курением, повышение образования населения, использование барьерных методов контрацепции, профилактика и выявление факторов риска распространения папилломавирусной инфекции, разработка и внедрение профилактических вакцин).
2. Вторичная профилактика (цервикальный скрининг) – обследование женщин с целью выявления и своевременного лечения предраковых изменений шейки матки.

Программа скрининга для выявления РШМ должна отвечать двум основным требованиям: быть эффективной и недорогой. Скрининговый тест должен быть простым, неинвазивным, чувствительным и специфичным, безопасным, недорогим и доступным.

Доказательство того, что рак шейки матки является ВПЧ-ассоциированным заболеванием, поставило его в ряд болезней, потенциально предотвратимых с

помощью вакцинации, что потребовало создания профилактических вакцин против штаммов папилломавируса, которые наиболее часто ассоциируются с развитием новообразования, в первую очередь, против типов 16 и 18, доминирующих во всех регионах мира [31, 40, 56, 74, 90]. Международная ассоциация по исследованиям в области рака ( IARC) заявляет, что предотвращение заражения и персистенции ВПЧ можно считать профилактикой РШМ. Другими словами, вакцина, показавшая свою эффективность в профилактике этих ВПЧ-ассоциированных заболеваний, предшествующих развитию РШМ, может считаться вакциной против РШМ [39, 41, 66, 70, 92].

ВПЧ-вакцины – рекомбинантные, то есть не содержат вирусный генетический материал. В их состав входят вирусоподобные частицы – VLP-фрагменты белка внешней оболочки вируса, иммунологически имитирующие естественную инфекцию ВПЧ и стимулирующие образование типоспецифических антител к белку L1 капсида. причем выраженность антителообразования в 100 раз превосходит ту, что наблюдается в естественных условиях при контакте с генитальными типами ВПЧ. Также вакцины содержат гидроксид алюминия, необходимый для активизации сильного иммунного ответа, что особенно важно в препубертатном возрасте (пятый критический период созревания иммунной системы) [17]. Полученные в ходе многочисленных клинических исследований данные свидетельствуют о том, что иммунная защита осуществляется опосредованно путем индуцирования вирусоподобными частицами L1 образование в плазме крови высоких концентраций IgG (преимущественно нейтрализующих IgG) – основного иммуноглобулина в составе цервикального секрета. Этот иммуноглобулин способен к транссудации через базальную мембрану эпителиальных клеток в шейке матки, в частности в месте перехода плоского эпителия в цилиндрический. Антитела накапливаются в достаточно больших концентрациях для того, чтобы инактивировать вирусные частицы, тем самым предотвращая возникновение инфекционного процесса [18]. Согласно результатам проспективных исследований, сероконверсия к вирусоподобным

частицам ВПЧ 16-го типа наблюдается у 70–90% женщин, её средняя продолжительность составляет 8 месяцев [19].

Потенциально вакцинация может предупреждать до 70% всех случаев РШМ, до половины случаев предраковых изменений. Иными словами, стратегия специфической профилактики РШМ способна уменьшить частоту возникновения цитопатологических изменений в шейке матки. Степень защиты зависит от наличия контактов с ВПЧ до проведения вакцинации, в связи с чем целесообразно проведение иммунизации до начала половой жизни. Целевую группу должны составлять девочки 9–13 лет, не ведущие половую жизнь [20].

В мире зарегистрированы три вакцины против ВПЧ:

- 2006 г. – тетравалентная (против типов 6, 11, 16, 18) 4ВПЧ: защищает от РШМ, рака вульвы, влагалища, анального рака, аногенитальных кондилом, цервикальной, анальной, вульварной и вагинальной интраэпителиальных неоплазий и аденокарциномы *in situ*. Вакцинация рекомендована девочкам и женщинам в возрасте от 9 до 45 лет, а также мальчикам и мужчинам в возрасте от 9 до 26 лет;
- 2007 г. – двухвалентная (против типов 16 и 18) 2ВПЧ: защищает от РШМ (плоскоклеточный, аденокарцинома), рака вульвы, влагалища, цервикальных интраэпителиальных неоплазий различных степеней (а также вульварной и вагинальной интраэпителиальной неоплазии), ASC-US и персистирующей ВПЧ-инфекции. Вакцинация рекомендована девочкам и женщинам от 9 до 45 лет.
- 2014 г. – девятивалентная (против типов 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52, 58) 9ВПЧ: рекомендована девочкам и женщинам от 9 до 26 лет – профилактика рака и предраковых поражений шейки матки, анального канала, вульвы, влагалища, а также аногенитальных кондилом [21].

Эксперты ВОЗ указывают на то, что для оценки влияния вакцинации против ВПЧ в профилактике РШМ в качестве конечных точек могут быть выбраны:

- распространенность папилломавирусной инфекции (ПВИ) среди молодых женщин (и мужчин) сразу после вступления в половую жизнь;
- число случаев CIN II–III и аденокарциномы *in situ* (AIS);
- число случаев РШМ [22].

Вакцинация против ВПЧ-ассоциированных заболеваний широко внедряется в различных странах мира. В настоящее время 86 стран (большинство стран Европы, США, Австралия, страны Африки) уже включили вакцинацию против ВПЧ в национальные календари профилактических прививок [23]. В связи с особенностью течения вызываемого ВПЧ инфекционного процесса и ассоциированных с ним предраковых и раковых заболеваний, оценка эффективности вакцинации проводится в кратко-, средне- и долгосрочной перспективе: к краткосрочным ранним результатам относят снижение инфицированности ВПЧ и заболеваемости аногенитальными кондиломами;

к промежуточным – снижение частоты предраковых поражений (CIN); к долгосрочным – снижение заболеваемости и смертности от РШМ у женщин репродуктивного возраста. Максимальный эффект от вакцинации достигим лишь при высоком охвате прививками целевого контингента [24].

Несмотря на большое число государств, где профилактика ПВИ проводится посредством вакцинации, немногие из них могут продемонстрировать ее эффективность в виду крайне сложной оценки быстрого эффекта начала вакцинации против ВПЧ, так как процесс развития CIN и инвазивного РШМ занимает длительный период (8–10 лет). Кроме того, в странах должна быть хорошо развита система мониторинга как распространенности вируса, так и вызываемых им заболеваний [25, 26].

На данный момент опубликованы итоги нескольких национальных программ по оценке эффективности профилактической иммунизации женщин против ВПЧ. В Скандинавских странах (Дания, Исландия, Норвегия, Швеция) в рамках первого международного клинического исследования FUTURE II, у 2084 женщин в возрасте

от 15 до 26 лет, получивших 3 дозы тетравалентной ВПЧ вакцины с 2002 по 2006 гг., выполнялась оценка эффективности вакцинопрофилактики. С 2006 по 2018 гг. каждые 2 года в течение 12 лет в популяции вакцинированных и не вакцин женщин проводили сравнительный анализ частоты случаев ВПЧ типов 16, 18, ассоциированных с CIN 2+. Результаты исследования Kjaer S. и соавт. показали отсутствие новых случаев патологии цервикального эпителия за длительный период наблюдения. Продемонстрирована продолжительная защита женщин, вакцинированных тетравалентной ВПЧ вакциной, в течение, по меньшей мере, 10 лет с тенденцией сохранения непрерывной защиты вплоть до 12 лет последующего наблюдения [27, 28]. В Финляндии, где национальная программа вакцинации против ВПЧ стартовала в 2013 г. в рамках исследований FUTURE и PATRICIA (регистрационных исследований тетравалентной и бивалентной вакцин соответственно), в группе не вакцинированных женщин ( $n = 17\ 838$ , возраст 14–19 лет) зарегистрировано 8 случаев ВПЧ-ассоциированного РШМ, тогда как в группе вакцинированных женщин ( $n = 9\ 529$ , возраст 14–17 лет) не выявлено ни одного случая ВПЧ-ассоциированного цервикального рака. Таким образом, достигнута 100% (95% ДИ:16;100) общая эффективность в предотвращении инвазивного РШМ среди вакцинированных девушек в сравнении с невакцинированными [24]. Вакцинация против ВПЧ входит в Национальный календарь вакцинации США с 2006 г. Согласно данным популяционных исследований, отмечена значительно более низкая распространенность у женщин 15–19 лет типов ВПЧ, против которых проводилась вакцинация (2007–2010 гг.), в сравнении с периодом до вакцинации (2003–2006 гг.). Распространенность ВПЧ типов 6, 11, 16, 18 снизилась на 56%, 16, 18 – на 50% [29]. Зарегистрировано сокращение распространенности ВПЧ типов 16, 18, ассоциированных с CIN2+, с 53,6% (2008 г.) до 28,4% (2012 г.) среди женщин ( $n = 259$ ), которые получили хотя бы одну дозу тетравалентной ВПЧ вакцины ( $p < 0,001$ ). Значимого снижения CIN2+ среди невакцинированных женщин ( $n = 364$ ) и женщин с неизвестным статусом ( $n = 455$ ) не отмечено [30]. В исследовании,

целью которого явилось проведение сравнительного анализа числа случаев РШМ до и после вакцинации против ВПЧ (старт в 2006 г.), с 2001 г. по 2014 г., зарегистрировано снижение заболеваемости на 29% у женщин в возрасте 15–24 лет и на 13% – 25–39 лет [31]. Таким образом, отмечено сокращение числа случаев CIN2+ и РШМ среди молодых женщин после начала вакцинации против ВПЧ. Важные данные по снижению заболеваемости РШМ среди вакцинированных женщин были получены в Австралии. Эта страна одна из первых в мире в 2007 г. внедрила широкомасштабную финансируемую государством национальную программу вакцинации против ВПЧ четырех типов (6, 11, 16, 18) по 3-х дозовой схеме. В основную вакцинируемую когорту вошли девочки 12–13 лет, в наверстывающую когорту – девушки и молодые женщины в возрасте от 13 до 26 лет. Охват вакцинацией составил около 70% (максимальный охват был среди девочек 12–13 лет). По данным из регистра цервикальной цитологии одного из штатов Австралии, к 2009 г., то есть через 3 года после начала плановой вакцинации, зарегистрировано снижение частоты предраковых поражений шейки матки на 38% среди девушек младше 18 лет. В других возрастных группах статистически значимой разницы не выявлено [32]. Популяционный анализ эффективности тетравалентной ВПЧ вакцины в рамках клинического исследования у вакцинированных (не менее 1 дозы) в сравнении с невакцинированными за 9-летний период наблюдения показал снижение распространенности типов ВПЧ 6, 11, 16, 18, входящих в состав ВПЧ, на 92% в когорте женщин 18–35 лет независимо от прививочного статуса. Установлено значительное снижение распространенности определенных типов ВПЧ, против которых не было иммунизации, в частности ВПЧ 31, 33 и 45 типов [33]. Результаты исследования, выполненные на протяжении 12 лет после осуществления вакцинации, продемонстрировали снижение доли предраковых поражений шейки матки на 48%, отсутствие зарегистрированных случаев ВПЧ-ассоциированного РШМ у пациенток. Полученные результаты позволяют сказать, что Австралия может стать первой страной, искоренившей РШМ [34]. В пользу такого предположения

свидетельствуют прогнозы ведущих экспертов по проблеме РШМ и в области вакцинации: случаи цервикального рака в среднем к 2020 г. (2018–2022 гг.) ежегодно будут снижаться и составят менее чем 6 на 100 тыс. женщин, к 2028 г. (2021–2035 гг.) – менее 4 случаев на 100 тыс. женщин и к 2066 г. (2054–2077 гг.) – один случай на 100 тыс. женщин. Таких успехов в предупреждении РШМ позволит достичь разработанная комплексная программа по борьбе с этим заболеванием: вакцинация против ВПЧ девочек 12–13 лет, цитологический скрининг каждые 2 года в возрастной когорте – 18–20 лет до 69 лет, ВПЧ-тестирование каждые 5 лет женщин в возрасте 25–69 лет и завершение в 70–74 г. С января 2018 г вакцинация девятивалентной ВПЧ вакциной (2 дозовая схема) заменила тетравалентную ВПЧ вакцину в Национальной программе иммунизации Австралии.

ВОЗ в 2019 г. представил стратегию профилактики и контроля РШМ на национальном уровне как комплексный междисциплинарный подход к профилактике данного заболевания и борьбе с ним. С учетом знаний естественного течения болезни стратегия предусматривает на протяжении жизни женщины проводить эффективные мероприятия в соответствующих возрастных группах:

- первичная и специфическая профилактика: девочки 9–14 лет. Просветительская работа о вреде употребления табака, наркотиков; половое воспитание с учётом возраста и культурных особенностей; пропаганда использования презервативов и их распространение среди ведущих половую жизнь; ВПЧ вакцинация;
- вторичная профилактика: женщины >30 лет: скрининг-диагностика ранних стадий заболевания;
- лечение: женщин любого возраста: лечение CIN, неинвазивного и инвазивного РШМ [40].

Вакцинация против ВПЧ является основным средством профилактики РШМ, но она не отменяет скрининг, так как пока вакцины не защищают от всех типов ВПЧ высокого риска. При работе с вакцинированным населением целесообразно проводить разъяснительную работу о важности скрининга, который играет важную

роль в выявлении гинекологической патологии, и это необходимо понимать всем молодым женщинам, поскольку именно среди них отмечается самая низкая охваченность этим профилактическим мероприятием [41].

В России реализуется более 50 региональных программ вакцинации против ВПЧ. Самые крупные из них: в Санкт-Петербурге, Московской, Смоленской, Свердловской областях, Ханты-Мансийском автономном округе-Югра. Однако в России вакцинопрофилактика ПВИ не предусмотрена в Национальном календаре профилактических прививок и Календаре профилактических прививок по эпидемическим показаниям. ВОЗ и ведущие регуляторные организации рекомендуют включение вакцинации против ВПЧ в национальные календари прививок всех стран мира.

Таким образом, внедрение новых скрининговых технологий и вакцинации открывает новые возможности для профилактики рака нижнего отдела гениталий, что является основой для снижения частоты заболевания в целом и открывает новые перспективы в сохранении здоровья женщин. Создание вакцин для профилактики типов ВПЧ, обладающих наибольшей онкогенностью, является большим достижением биомедицинской научно-исследовательской области в целом. Демонстрация эффективности и целесообразности программ плановой вакцинации против ВПЧ в ряде стран свидетельствует о достигнутых обнадеживающих успехах в решении проблемы РШМ.

Вакцинация против ВПЧ обеспечит не только эпидемиологическое благополучие, но и приведет к снижению заболеваемости и смертности от такого грозного осложнения папилломавирусной инфекции как РШМ. Вакцинация против ВПЧ не заменяет цервикальный скрининг, напротив, организация вакцинации и системы скрининговых мероприятий способна принести максимальную пользу в предотвращении и борьбе с этим заболеванием.



## Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

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

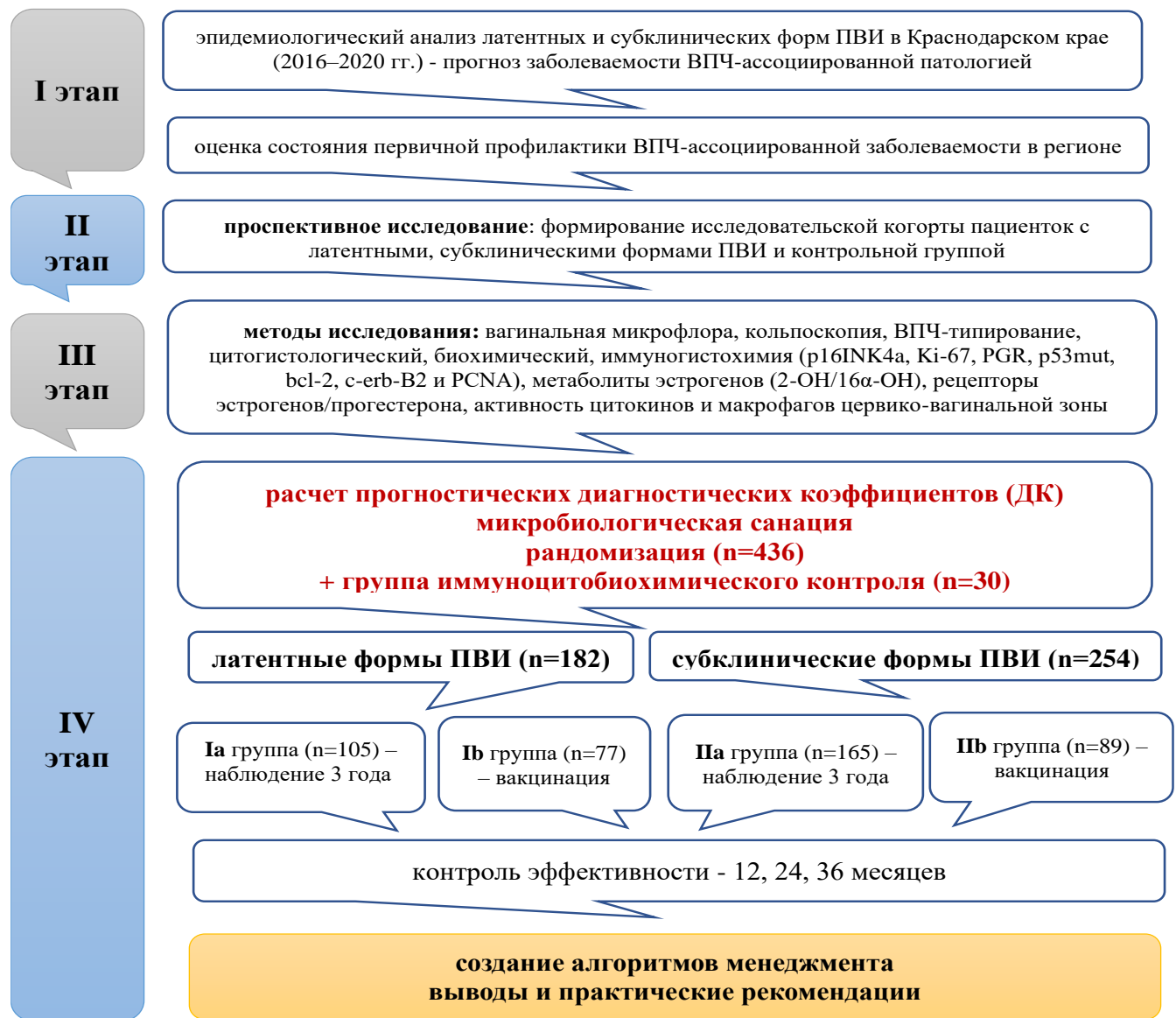


Схема 2.1. Дизайн исследования

На первом этапе проведен эпидемиологический анализ заболеваемости латентными и субклиническими формами папилломавирусной инфекции. Моделью исследования выбрана территория Краснодарского края. Применен комплекс методов исследования: эпидемиологический, статистический, медико-географический, социологический, санитарно-гигиенический, клинико-кольпоскопический, микробиологический, цитологический, гистологический, иммунологический, цитобиохимический. В рамках изучения состояния ВПЧ-инфицированности латентными и субклиническими поражениями ПВИ у женщин вначале проведено изучение тенденций данных показателей в пятилетней динамике (2015–2020 гг.) с выделением территориальных особенностей. В целом комплексному анализу подвергнуты сведения о 6239 латентных и 1806 случаев субклинических форм папилломавирусной инфекции, на основе анализа медицинской документации женских консультаций г. Краснодара и края, что позволило изучить частоту данной патологии среди женского населения в зависимости от возраста, образования и места жительства. Использование картографирования для оценки пространственных связей позволило выявить территории с разной степенью интенсивности инфицирования и первичной заболеваемости, ассоциированной с ПВИ патологией с установлением зон повышенного риска. 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 исследования (2018–2020 гг.) нами наблюдалось, было обследовано и пролечено 182 пациентки с латентными и 254 с субклиническими формами ПВИ. В контрольную группу вошло 30 здоровых женщин (группа иммуноцитобиохимического контроля) аналогичного возраста, обращавшихся в женские консультации при профилактических осмотрах. В работе с пациентками

соблюдались этические принципы, предъявляемые Хельсинкской декларацией ВМА (пересмотр 2013 г., Форталеа, Бразилия), правила Надлежащей клинической практики (Good Clinical Practice; GCP; 2016 г., Астана) и Правила клинической практики в Российской Федерации (Приказ МЗ РФ №200н, 2016 г.). 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 ФГБОУ ВО КубГМУ МЗ РФ (выписка из протокола локального этического комитета №4 от 23.09.2019 г.). Для выявления риск-факторов инфицированности и реализации ПВИ производился опрос по специально созданной анкете.

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, ПЦР-тест инфицированности ВПЧ высокого и низкого канцерогенного риска, бактериоскопический и бактериологический анализ содержимого влагалища. Через 6 и 12 месяцев (3 и 4 визит), а затем 1 раз в 12 месяцев (5-6 визиты – всего на протяжении 3 лет) проводились Pap-тест, ПЦР-тест и кольпоскопия, проверялись дневники, где были записаны все препараты, которые пациентки принимали на протяжении исследования с момента подписания информированного согласия до заключительного визита.

**Таблица 2.1.** График проведения исследований

<b>ВИЗИТ</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3-4</b>	<b>5-6</b>
оценка критериев включения/исключения		+			
рандомизированное включение в группы		+			
кольпоскопия	+		+	+	+
Pap-тест	+		+	+	+
ВПЧ Digene-тест	+		+	+	+
бактериоскопический и бактериологический анализ содержимого влагалища		+	+	+	+
назначение лечения		+			
контроль эффективности терапии			+	+	+

Оценивались локальные и системные эффекты, которые могли бы быть связаны с использованием препарата. Комплаентность препаратов оценивались по частоте и выраженности нежелательных явлений, а также по клинико-психологической тестовой методике - шкала Мориски-Грин. Возможность досрочного выбывания из исследования была предусмотрена на любом этапе клинических испытаний – как по инициативе пациентки, так и по инициативе исследователя. 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).

**Таблица 2.2.** Критерии выборки пациенток

<b>Критерии включения</b>
Наличие диагностированной субклинической формы ПВИ
Отсутствие терапии иммуномодулирующими препаратами в течение последних 6 месяцев
Способность, по мнению исследователя, выполнять требования протокола
Подписанное информированное согласие на участие в исследовании в соответствии с правилами Good Clinical Practice (GCP)
Отсутствие обострения в момент обследования и лечения хронической гинекологической патологии (ВЗОМТ вне обострения)
<b>Критерии исключения</b>
Возраст пациенток до 18 лет и старше 45 лет
Сопутствующая тяжелая экстрагенитальная патология
Положительный тест на беременность
Женщины, планирующие беременность в период приема лекарственных средств
Гиперчувствительность к предлагаемым лекарственным средствам
Отсутствие готовности к сотрудничеству со стороны пациентки

Пациентки с латентными и субклиническими формами ПВИ в возрасте от 18 до 39 лет (средний возраст  $29,7 \pm 3,6$  лет ( $p=0,396$ )), и 30 условно здоровых женщин

(иммуно-биохимический контроль), были стандартизированы и представлены в трех возрастных интервалах (табл. 2.3). Наиболее часто данные формы ПВИ диагностировались в возрасте 21–30 лет – 70,9% (129/182) и 68,1% (173/254) соответственно.

**Таблица 2.3.** Возраст пациенток исследуемых групп

	возраст						p
	18–20 лет		21–30 лет		31–39 лет		
	n	%	n	%	n	%	
субклин. форма ПВИ (n=254)	13	5,1	173	68,1	68	26,8	0,396
латентная форма ПВИ (n= 182)	22	12,1	129	70,9	31	17,0	0,261
контроль (n=30)	3	10,0	7	23,3	5	16,7	0,243

Не выявлено статистически достоверной ( $p>0,05$ ) разницы между семейным положением, социальным статусом и образованием пациенток основной и контрольной групп (табл. 2.4–2.5; рис. 2.1).

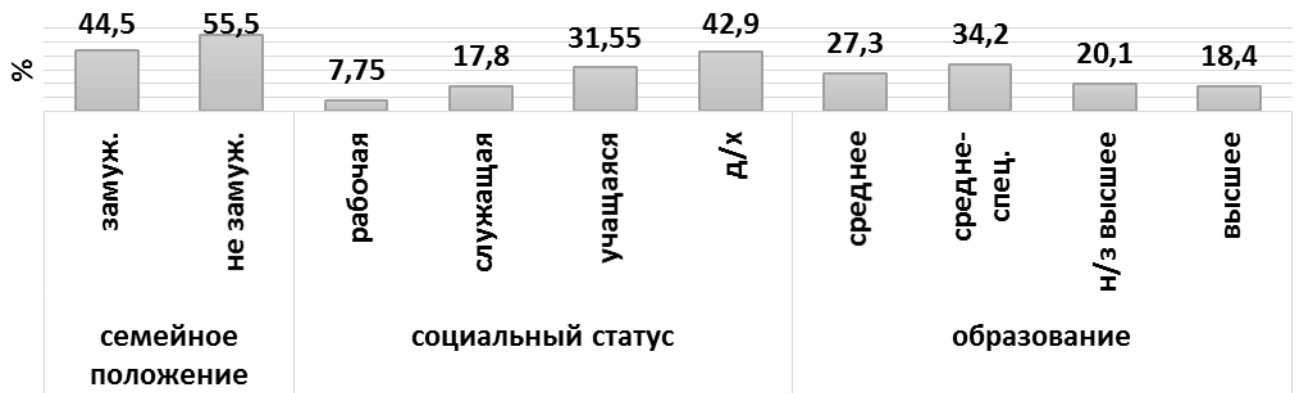
**Таблица 2.4.** Семейное положение пациенток исследуемых групп

	семейное положение			
	замужем		не замужем	
	n	%	n	%
субклин. форма ПВИ (n=254)	116	45,7	138	54,3
латентная форма ПВИ ( 182)	81	44,5	101	55,5
контроль (n=30)	13	43,3	17	56,7
$\chi^2$	12,34		6,48	
p	<0,005		<0,005	

Большинство пациенток с латентными и субклиническими формами ПВИ официально не работали -  $43,5\pm 1,3\%$  ( $p=0,089$ ;  $\chi^2=2,91$ ), имели средне-специальное образование –  $42,05\pm 1,4\%$  ( $p=0,030$ ;  $\chi^2=21,48$ ) и статистически достоверно не отличались от показателей контрольной группы ( табл. 2.5, рис. 2.1).

Таблица 2.5. Социальный статус и образование пациенток исследуемых групп

	социальный статус							
	рабочая		служащая		учащаяся		д/х	
	п	%	п	%	п	%	п	%
субклин. форма ПВИ (n=254)	14	5,5	48	18,9	84	33,1	108	42,5
латентная форма ПВИ (n=182)	10	5,5	31	17,0	60	33,0	81	44,5
контроль (n=30)	3	10,0	5	16,7	9	30,0	13	43,3
$\chi^2$	1,75		19,34		13,27		2,91	
<b>p</b>	0,186		<0,001		<0,001		0,089	
	образование							
	среднее		средне-спец.		н/з высшее		высшее	
	п	%	п	%	п	%	п	%
субклин. форма ПВИ (n=254)	54	21,3	106	40,7	43	16,9	51	20,1
латентная форма ПВИ (n=182)	41	22,5	79	43,4	28	15,4	34	18,7
контроль (n=30)	10	33,3	8	26,7	7	23,3	5	16,7
$\chi^2$	15,79		21,48		34,19		46,23	
<b>p</b>	0,249		0,030		<0,001		<0,001	

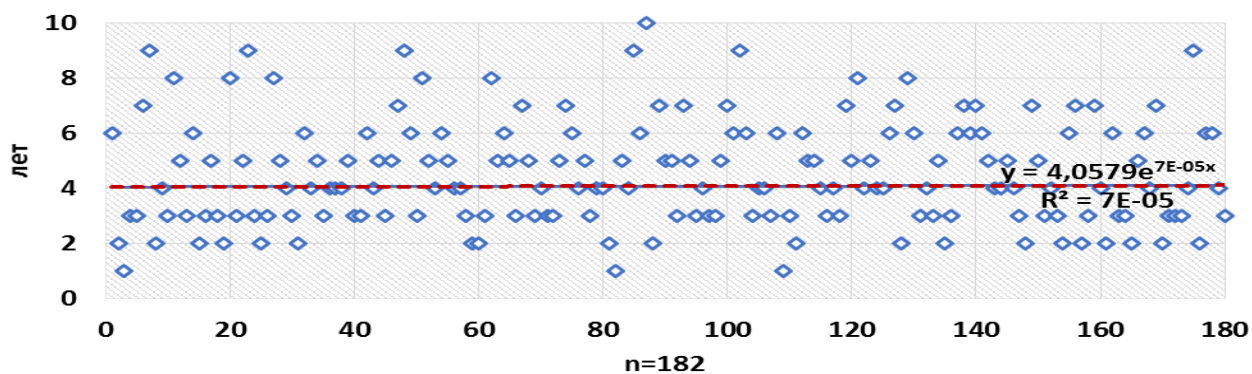
Рисунок 2.1. Медиана ( $\bar{x}$ ) с оциального ранжирования женщин латентных, субклинических форм ПВИ и контрольной группы

Средний возраст полового дебюта в группе пациенток с латентными формами 17,4±1,6 лет, субклиническими – 17,1±1,9 лет. Интервал от возраста менархе до сексуального дебюта в среднем составил 4,7±1,4 года для латентных и 4,2±1,6 лет

для субклинических форм, в группе контроля  $5,4 \pm 1,2$  года ( $p < 0,05$ ) (табл. 2.6, рис 2.2-2.3).

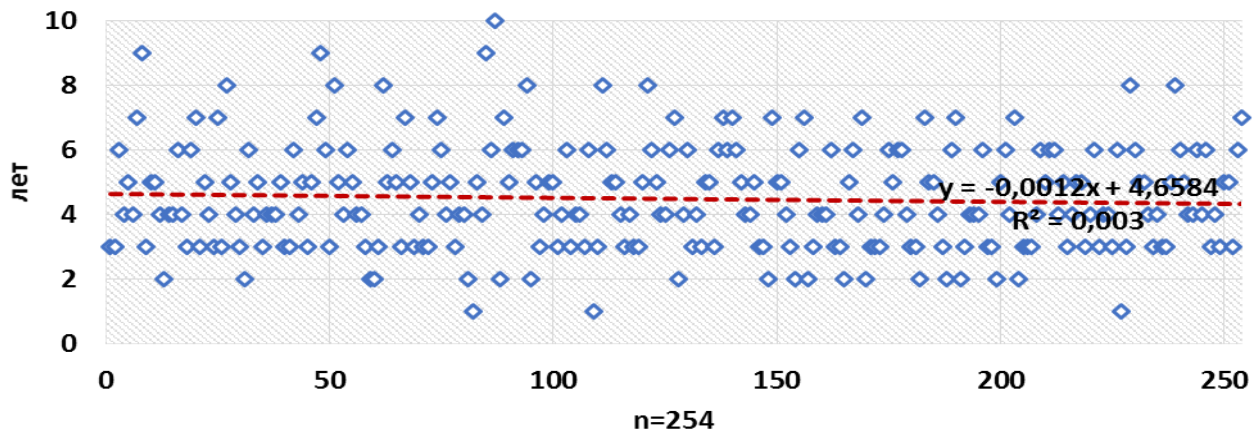
**Таблица 2.6.** Сексуальная активность пациенток исследуемых групп

	сексуальный дебют							
	до 15 лет		15–18 лет		19–22 лет		старше 23 лет	
	n	%	n	%	n	%	n	%
субклин. форма ПВИ (n=254)	11	4,3	153	60,2	73	28,7	17	6,8
латентная форма ПВИ (182)	8	4,4	114	62,6	46	25,3	16	8,8
контроль (n=30)	-	-	11	36,7	16	53,3	3	10
	интервал менархе/сексдебют							
	3–4 года		5–6 лет		более 6 лет			
	n	%	n	%	n	%		
субклин. форма ПВИ (n=254)	101	39,8	113	44,5	40	15,7		
латентная форма ПВИ (182)	57	31,3	99	54,4	26	14,3		
контроль (n=30)	4	13,3	22	73,3	4	13,3		
	количество партнеров							
	1		2		3 и более			
	n	%	n	%	n	%		
субклин. форма ПВИ (n=254)	122	48,0	94	37,0	38	15,0		
латентная форма ПВИ (182)	87	47,8	72	39,6	23	12,6		
контроль (n=30)	19	63,3	8	26,7	3	10,0		

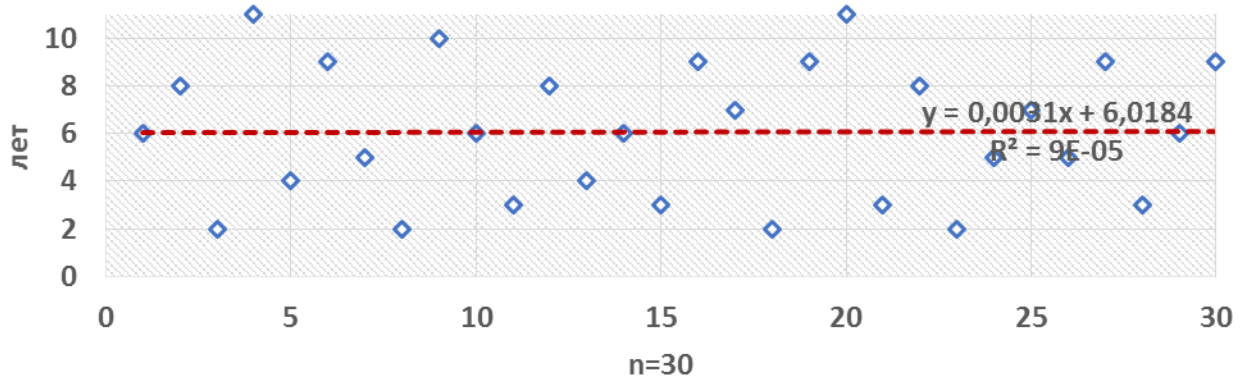


**Рисунок 2.2.** Корреляционная связь возраста менархе и сексуального дебюта у пациенток с латентными формами ПВИ ( $r=0,64$ )

Сексуальное поведение пациенток с латентными и субклиническими формами ПВИ характеризуется более ранним возрастом полового дебюта, чем в контрольной группе - прямая корреляционная зависимость возраста менархе пациентки и её сексуального дебюта со средней силой взаимосвязи ( $r=0,72$ ,  $p<0,05$ ) (табл. 2.5; рис. 2.2-2.4).



**Рисунок 2.3.** Корреляционная связь возраста менархе и сексуального дебюта у пациенток с субклиническими формами ПВИ ( $r=0,72$ )

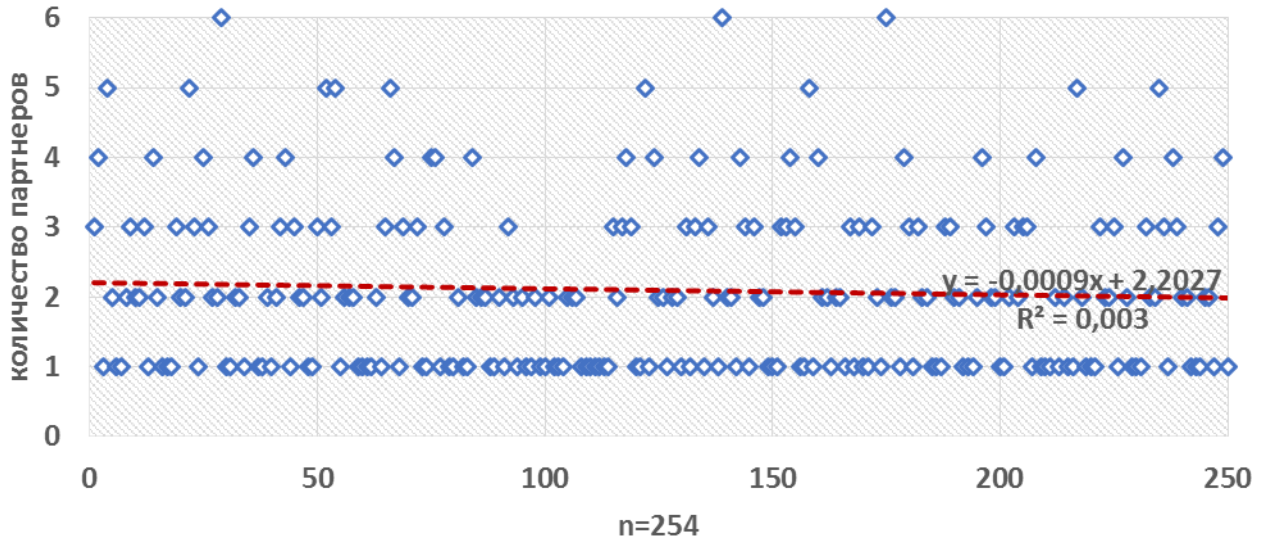


**Рисунок 2.4.** Корреляционная связь возраста менархе и сексуального дебюта в контрольной группе ( $r=0,18$ )

Гипотеза, что сексуальное поведение с более ранним вступлением в половую жизнь, будет predispose к большему числу половых партнеров и большей вероятности заражения, в том числе и вирусными инфекциями, передающимися



половым путем, не подтвердилась - зависимость возраста и количества половых партнеров в течение жизни не выявлена (рис. 2.5).



**Рисунок 2.5.** Корреляционная связь количества половых партнеров пациенток с субклиническими формами ПВИ ( $r=0,11$ )

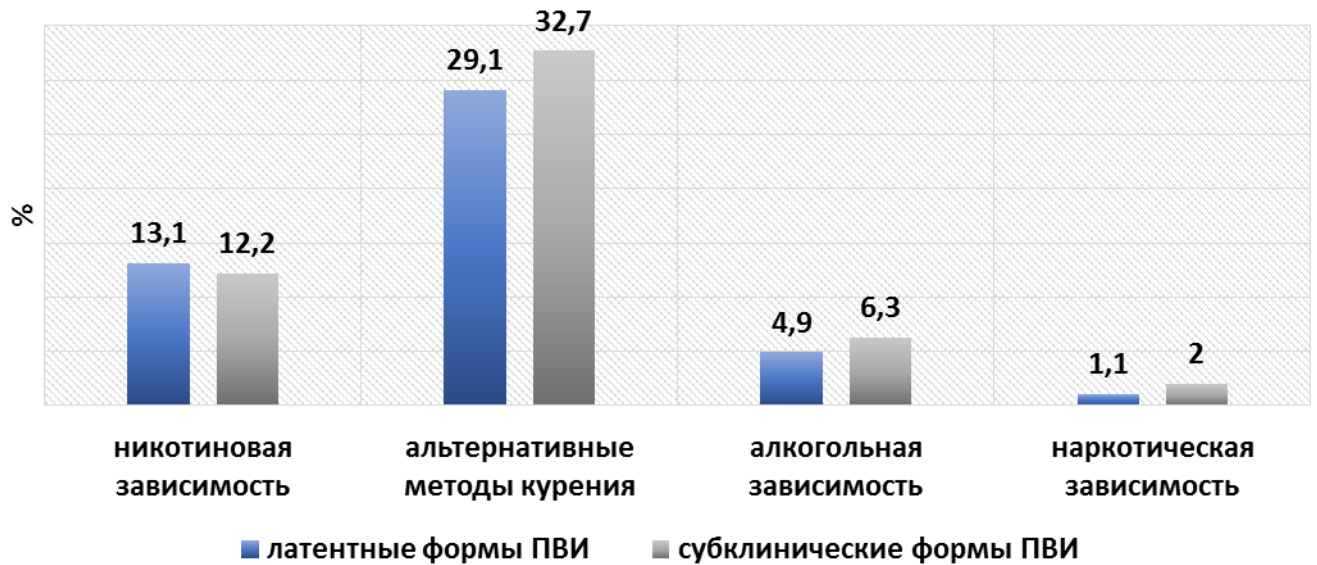
Различные методы контрацепции использовали  $70,8 \pm 1,6\%$  женщин с латентными и субклиническими формами ПВИ. При этом наибольшее количество пациенток пользовалось методами с достаточно низкой эффективностью (календарный метод Огино-Кнауса (Pearl Index 9), прерванный половой (PI 4), спермициды (PI 18) и др.). Барьерную контрацепцию (мужские презервативы) использовали  $19,9 \pm 2,6\%$  респондентов (PI 2), комбинированные оральные контрацептивы (КОК) –  $15,6 \pm 1,3\%$  (PI 0,3) (табл. 2.7).

**Таблица 2.7.** Контрацепция пациенток с латентными и субклиническими формами ПВИ (n=436)

ВМС		КОК		барьерная		другое		не пользуются		$\chi^2$	p
n	%	n	%	n	%	n	%	n	%		
21	4,8	68	15,6	87	19,9	128	29,3	132	30,3	8,23	0,026

Таким образом, при изучении сексуального поведения пациенток с латентными и субклиническими формами ПВИ не было выявлено статистически

значимых отличий по большинству признаков ни от группы контроля (кроме интервала между менархе и сексуальным дебютом) ( $p < 0,05$ ), ни от среднестатистических значений в популяции. >



**Рисунок 2.6.** Вредные привычки пациенток с латентными и субклиническими формами

Никотиновая зависимость указана у  $12,65 \pm 0,4\%$  пациенток исследуемых групп, но при этом  $30,9 \pm 1,6\%$  респонденток указало на альтернативные методы курительной зависимости (электронные сигареты и их аналоги), действие которых на репродуктивную систему женщины еще недостаточно изучено (рис. 2.6). Алкогольная и наркотическая зависимости не отличались от общепопуляционных значений.

Средний индекс массы тела в группе женщин с латентными и субклиническими формами ПВИ составил  $27,3 \pm 3,6$ , в группе контроля -  $24,8 \pm 1,9$  ( $p = 0,412$ ).

Уровень хронических соматических заболеваний у пациенток с латентными и субклиническими формами ПВИ статистически достоверно не отличался от контрольной группы ( $96,7$  и  $97,4\%$  соответственно) (табл. 2.8).

**Таблица 2.8.** Соматические воспалительные заболевания у пациенток исследуемых групп

	контроль (n=30)		латентная и субклин. формы ПВИ (n=436)		$\chi^2$	p
	n	%	n	%		
<b>соматические заболевания</b>						
хронический гастродуоденит	8	26,7	109	25,0	12,36	<0,005
хронический холецистопанкреатит	4	13,3	77	17,7	11,24	>0,005
хронический тонзиллит	7	23,3	84	19,2	17,28	>0,005
хронический синусит	5	16,7	68	15,6	9,45	>0,001
хронический бронхит	2	6,7	29	6,6	3,22	>0,001
хронический пиелонефрит	3	10,0	58	13,3	14,12	>0,001
<b>всего</b>	<b>29</b>	<b>96,7</b>	<b>425</b>	<b>97,4</b>		

Среди экстрагенитальных заболеваний у женщин с латентными и субклиническими формами ПВИ наиболее часто фиксировались хронический гастродуоденит, холецистопанкреатит – в сумме  $42,7 \pm 2,6\%$  и хронический тонзиллит и синусит – в сумме  $34,8 \pm 1,9\%$ .

Эндокринные заболевания относятся к факторам, которые, кроме влияния на различные звенья репродуктивной системы женщины, способны потенцировать пролиферативные процессы и извращение локальных иммунных реакций). Анализ частоты и структуры эндокринзависимых заболеваний пациенток выявил, что наиболее распространенной являлась патология, связанная с относительной гиперэстрогенией: эндометриоз –  $15,8 \pm 2,4\%$ , миома матки –  $19,7 \pm 1,8\%$  (табл. 2.9). Метаболический синдром, который также может служить одной из причин изменения локального вагинального гомеостаза на фоне нарушения синтеза стероидных гормонов, встречался чаще, чем в региональной популяции и в группе контроля –  $24,3 \pm 3,1\%$  против  $10,0\%$ . Доминирующей гинекологической патологией у пациенток с латентными и субклиническими формами ПВИ являлись инфекционные заболевания женских половых органов: хронический эндометрит и сальпингофорит (в сумме  $36,9 \pm 4,2\%$ ).

**Таблица 2.9.** Распространенность гинекологической патологии

	контроль (n=30)		латентная и субклин. формы ПВИ (n=436)		$\chi^2$	p
	n	%	n	%		
<b>эндокринзависимые заболевания</b>						
полипы эндометрия	1	3,3	38	8,7	10,02	<0,005
гиперплазия эндометрия	2	6,7	43	9,9	16,31	<0,005
эндометриоз	4	13,3	69	15,8	21,48	>0,005
миома матки	4	13,3	86	19,7	13,16	<0,005
мастопатии	6	20,0	70	16,0	8,54	>0,005
метаболический синдром	3	10,0	106	24,3	23,95	<0,005
нарушения менструального цикла	7	23,3	68	15,6	5,63	>0,005
кисты яичников	6	20,0	54	13,1	9,81	<0,005
<b>заболевания, связанные с инфекционными факторами</b>	n	%	n	%		
хронический эндометрит	3	10,0	72	16,5	11,64	<0,005
хронический сальпингоофорит	3	10,0	89	20,4	29,23	<0,005

**Таблица 2.10.** Распространенность инфекций, передаваемых половым путем

ИППП	контроль (n=30)		латентная и субклин. формы ПВИ (n=436)		$\chi^2$	p
	n	%	n	%		
трихомониаз	-	-	24	5,5		
гонорея	-	-	8	1,8		
хламидийная инфекция	2	6,7	48	11,0	18,61	<0,005
микоплазменная инфекция	5	16,7	63	14,4	3,36	<0,005
генитальный герпес	-	-	42	9,6		
вульвовагинальный кандидоз	19	63,3	374	85,8	20,04	<0,005
неспецифический вульвовагинит	11	36,7	336	77,1	11,72	<0,005
<b>всего</b>	<b>40</b>	<b>133,4</b>	<b>895</b>	<b>205,2</b>		

Среди инфекций, передаваемых половым путем, которые были анамнестически зарегистрированы у женщин с латентными и субклиническими формами ПВИ, наиболее часто встречались: вульвовагинальный кандидоз –

85,8±5,2%, и неспецифический вульвовагинит – 77,1±6,4%, при этом количество зарегистрированных инфекции урогенитального тракта в основной группе статистически значимо ( $p < 0,005$ ) отличалось от показателей контрольной группы (табл. 2.10).

Таким образом, у пациенток с латентными субклиническими формами имела место более высокая, чем в популяции, частота сопутствующей гинекологической (воспалительной и гормональной) патологии, что предрасполагает, под влиянием папилломавирусной инфекции, развитию патологических пролиферативных процессов в нижнем отделе репродуктивной системы.

### **2.1. Клинические методы исследования**

При обследовании пациентов выяснялись жалобы, анамнез заболевания, сексуальный анамнез. Проводилось комплексное клиничко-лабораторное обследование больных в соответствии с протоколом исследования: гинекологический осмотр, УЗИ органов малого таза, расширенная кольпоскопия, обследование на сифилис, ВИЧ, вирус простого герпеса I–II, цитомегаловирус, общий анализ крови и мочи, определение концентрации сахара в крови и моче, биохимический анализ крови. Полученные данные вносились в регистрационную карту (см. приложение №1).

Все лабораторные исследования, в том числе исследование показателей местного и системного иммунитета, оксидативной системы вагинальной зоны проводились до лечения и через 1 и 12 месяцев, после окончания курса терапии.

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.

### **2.2. Микробиологические методы исследования**

У всех пациенток проводилось исследование на наличие гонококковой и трихомонадной инфекции (микроскопия, ПЦР). Диагностику инфицированности

хламидийной и микоплазменной инфекциями проводили методом ПЦР с соответствующими тест-системами (ЗАО «Внедрение систем в медицину», РФ). Оценку состояния вагинальной микрофлоры с применением четырех степеней ее чистоты, проводили по унифицированной схеме Херлена.

Диагностику инфицированности различными видами *Candida spp.* проводили методом прямой микроскопии и культуральным методом (автоматизированная система «API Auh», France). Мазок из цервикального канала на онкоцитологию (жидкостная цитология) проводился с последующей окраской препаратов по методу Папаниколау (Pap-smear test).

### **2.2.1. Клинико-микробиологические (косвенные) методы диагностики**

К ним относят определение рН влагалища и аминотест. рН-метрия отделяемого влагалища осуществлялась при помощи Кольпотеста рН («Биосенсор АН», РФ) с возможностью его определения в диапазоне от 3,0 до 7,0 с шагом деления 0,2-0,3-0,5 (норма 3,8–4,4). Аминотест (проба с КОН): в каплю вагинальной жидкости, нанесенной на предметное стекло, вносят каплю 10% КОН. Бактериальный вагиноз верифицировался на основании критериев Амсея и микроскопии мазка, окрашенного по Граму с подсчетом баллов по методике Ньюджента.

Диагностика папилломавирусной инфекции 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. Проводили пробу с раствором Люголя (проба Шиллера) и с раствором 3–5% уксусной кислоты. Кольпоскопия проводилась при помощи кольпоскопа фирмы Leisegang, (Germany), с использованием традиционных сосудистых тестов и увеличением

×7,5, ×15, ×30. Интерпретация данных проводилась согласно Международной кольпоскопической классификации (Рио-де-Жанейро, 2011, предложенной Номенклатурным комитетом Международной Федерации по кольпоскопии и патологии шейки матки (IFCPC)). Для унификации полученных результатов рассчитывали модифицированный кольпоскопический индекс Рейда. Максимальное количество баллов, которое может быть получено при использовании данного метода - 10 (табл. 2.11–2.12).

**Таблица 2.11.** Модифицированный кольпоскопический индекс Рейда\*(КИР)

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 <sup>1</sup> . Плоские образования с нечеткими краями. Перистые или фестончатые края. Угловатые, зубчатые образования <sup>3</sup> . Сопутствующие образования за пределами зоны трансформации	Правильной формы, симметричные образования с гладкими, ровными контурами	Закрученные, отслоенные края <sup>2</sup> . Внутренняя демаркация между участками с разными кольпоскопическими явлениями – с серьезными изменениями в центре и более слабыми по периферии
Сосуды	Тонкие сосуды одного калибра <sup>4</sup> , 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 <sup>5</sup> , широко и неравномерно разбросанная
Окрашивание йодом	Положительная реакция – буро-коричневое окрашивание.	Частичная реакция –	Большие йод-негативные участки –

	Отрицательная реакция – желтым цветом окрашиваются мелкие образования, оцененные в 3 и менее балла по предыдущим критериям. Йоднегативные участки за пределами зоны трансформации (часто вследствие паракератоза)	неоднородное, пестрое окрашивание	желтым цветом окрашиваются повреждения, уже оцененные в 4 и более бала по предыдущим критериям
--	---	-----------------------------------	--

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

1 – микроэкзофитная 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 имеют слабые гистологические отклонения.

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

**Таблица 2.12.** Кольпоскопический прогноз гистологического заключения по индексу Рейда

Количество баллов	Гистология
0-2	вероятно, CIN I
3-4	CIN 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). Щеточку с материалом опускают в контейнер с жидкой транспортной средой. Нами выбран вариант жидкостной цитологии ThinPrep® (ThinPrep 5000) с технологией контролируемого мембранного переноса. Окраска препаратов производилась по методу Папаниколау (Pap-smear test). Для оценки результатов цитологического исследования принята классификация Папаниколау. 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 сохранными эндоцервикальными или метапластичными клетками.



4. ВПЧ Digene-тест. Система двойной генной ловушки — Digene Hybrid Capture System II использует РНК-ДНК гибридизацию в растворе с последующей «хвостовой» иммунологической реакцией между гибридом РНК пробы - ДНК мишени и специфическими антителами к этому гибриду. Digene-тест позволяет выявить ВПЧ и провести его типирование, а также определить его клинически значимую концентрацию в ткани. Для проведения Digene-теста использовали клеточный материал, собранный с помощью эндобранша, стекла с нанесенным цитологическим материалом, образцы биопсийного материала. Для настоящего исследования применялась система «HPV Digene-test®» ( Abbot-Digene, USA) дифференцирующая 13 типов ВПЧ с высокой степенью онкогенного риска (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 и 68) и 5 типов ВПЧ с низкой степенью риска (6, 11, 42, 43 и 44).
5. Патогистологическое исследование. Гистологическое исследование биоптата пораженных участков нижнего отдела гениталий 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. Перед проводкой материал помещали в гистологические кассеты TurboFlow, обезвоживали в абсолютном изопропиловом спирте и пропитывали парафином в гистологическом аппарате карусельного типа STP-120 ( Microm, Germany). С целью проведения обзорной микроскопии материала применяли окраску гематоксилином и эозином. Микроскопия проводилась в световом микроскопе ( Carl Zeiss, Germany). Во всех случаях были выявлены все морфологические признаки ПВИ: в поверхностных эпителиальных клетках наличие койлоцитов - вакуолизация цитоплазмы с перинуклеарным «галло» 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. Субклиническая форма ПВИ сопровождается такими морфологическими признаками как акантоз, гиперплазия клеток базального и парабазального слоев многослойного плоского эпителия, пара- или гиперкератоз, клеточные элементы с койлоцитарной атипией.
6. Определение онкобелка E7 . Исследовали в биоптатах пораженных участков шейки матки и цервикального канала. Выявление мРНК вирусных онкогенов E7 проводили методом ПЦР, сопряженной с обратной транскрипцией, с использованием соответствующих комплектов реагентов НПО «ДНК-технология» (РФ).
  7. Определение молекулярно-генетических маркеров (мРНК функциональных генов человека (p16, Ki67, PGR, BCL2) ВПЧ ВКР . Выполнено определение экспрессии мРНК генов p16, Ki67, а также генов апоптоза (BCL2), прогестеронового рецептора (PGR1) в соскобах эпителия шейки матки методом ПЦР в режиме реального времени (ДНК-Технология, РФ). В качестве меры центральной тенденции всех количественных показателей использовали медиану (Me), в качестве интервальной оценки – нижний Q1 (0,25) и верхний Q3 (0,75) квартили. В качестве праймеров для обратной транскрипции использовали специфические олигонуклеотиды. Нормировка проводилась по трем референсным генам B2M, TBP и GUSB.
  8. Иммуногистохимическое исследование онкомаркеров p53mut, bcl-2, cerb-B2, PCNA проводили с использованием двухэтапного с демаскировкой антигена стрептавидин-биотинпероксидазного метода с использованием стандартных наборов антител « Dako» (Дания). В случае оценки экспрессии p53mut и PCNA определяли отношение позитивно окрашенных ядер к общему числу ядер. При исследовании препаратов, окрашенных антителами к bcl-2, рассчитывали процент клеток с окрашенной цитоплазмой к общему числу клеток. При оценке C-erb-B2 использовали качественный метод оценки реакции, включающий интенсивность и полноту окрашивания цитолеммы клеток. Слабая реакция небольшого количества клеток соответствовала низкой экспрессии C-erb-B2 (+), при наличии умеренной окраски с прерывающимся контуром клеток реакцию расценивали как умеренную (++) и яркая мембранная непрерывная по контуру клетки реакция

соответствовала выраженной экспрессии белка (+++). Цитоплазматическое окрашивание исследуемого онкопротеина в расчет не принималось. Для оценки экспрессии рецепторов эстрогенов и прогестерона использовали количественный метод с подсчетом Histochemical score (H.S.). Система подсчета включала интенсивность иммуногистохимической окраски, оцениваемой по 3-хбальной шкале и процент окрашенных клеток, и представляла собой сумму произведений процентов, отражающих долю клеток с различной интенсивностью окраски на балл, соответствующий интенсивности реакции. Интенсивность окраски оценивалась следующим образом: 0 - нет окрашивания, 1 - слабое окрашивание, 2 - умеренное и 3 - сильное окрашивание. Формула подсчета: H-score =  $\sum P_i i$ ,  $P_i$ - процент клеток, окрашенных с разной интенсивностью,  $i$  — интенсивность окрашивания, выраженная в баллах от 0 до 3.

9. Соотношения метаболитов 2-OHE1/16- $\alpha$ 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 Клиник Групп» г. Краснодара.

### **2.2.1. Прямые методы лабораторной диагностики вагинальной микрофлоры**

#### *Микроскопический (бактериоскопический) метод.*

Оценку состояния флоры влагалища с применением четырех степеней ее чистоты, проводили по унифицированной схеме Херлена. Оценка вагинального дисбиоза проводилась по критериям Hay/Ison (микроскопия окрашенного по Граму мазка): степень 0: нет связи с бактериальным вагинозом, определяются только эпителиальные клетки, отсутствуют лактобактерии, свидетельствует о недавней терапии антибиотиками; степень 1 (норма): преобладают морфотипы лактобактерий; степень 2 (промежуточная): смешанная флора с небольшим количеством лактобактерий, а также присутствуют морфотипы *Gardnerella Mobiluncus*; степень 3 (бактериальный вагиноз): преобладают морфотипы *Gardnerella Mobiluncus*, присутствуют ключевые клетки, небольшое количество или отсутствие

лактобактерий; степень 4: нет связи с бактериальным вагинозом, только грамположительные кокки, отсутствие лактобактерий (флора, соответствующая анаэробному вагинозу).

### 2.2.3. Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

В данном исследовании была применена система набора реагентов для определения *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Lactobacillus spp.* и общего количества бактерий (*Bacteria*) в биологическом материале (отделяемое слизистой оболочки влагалища) методом мультиплексной ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени» «АмплиПрайм® Флороценоз-Бактериальный вагиноз» (ООО «НекстБио», РФ). Набор реагентов обнаруживает фрагменты ДНК заявленных микроорганизмов и фрагмент ДНК, общий *Bacteria* (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum*, *Mycoplasma genitalium*, *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria flava*, *Neisseria subflava*, *Neisseria sicca*, *Neisseria mucosa*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis*, *Treponema pallidum*, *Toxoplasma gondii*, *HSV 1 и 2 tina*, *CMV*, *HPV*). В данном исследовании определялось соотношение логарифмов концентраций *Lactobacillus spp.* и общего количества бактерий, соотношение логарифмов концентраций условно-патогенной микрофлоры (*Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*) и общего количества бактерий, а также соотношение логарифмов концентраций *Lactobacillus spp.* и условно-патогенной микрофлоры. Аналитическая чувствительность (ГЭ/мл) *Gardnerella vaginalis* –  $1 \times 10^3$ , *Atopobium vaginae* –  $3 \times 10^3$  *Lactobacillus spp.* –  $1 \times 10^2$  (линейный диапазон измерения -  $1 \times 10^4$ - $1 \times 10^8$ ). На основании полученных значений порогового цикла и исходя из заданных значений концентраций для ДНК-калибраторов К1 и К2 происходит автоматическое построение калибровочной прямой и расчет значений геномных эквивалентов (ГЭ) *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Lactobacillus spp.* *Bacteria* в 1 мл исследуемых образцов (табл.

2.13). Полученные значения для исследуемых образцов используются для расчета коэффициентов соотношений (КС1, КС2 и КС3), на основании которых производится интерпретация полученных данных, по следующим формулам: КС1 отражает соотношение концентраций *Lactobacillus spp.* (Lac) и анаэробных микроорганизмов *Gardnerella vaginalis* и *Atopobium vaginae* (Gv+Av), равен разнице логарифмов концентраций ДНК указанных микроорганизмов:  $КС1 = \lg [ДНК Lac] - \lg [ДНК (Gv+Av)]$ . Коэффициент КС2 отражает соотношение концентраций *Bacteria* (Bac) *Lactobacillus spp.* (Lac), равен разнице логарифмов концентраций ДНК указанных микроорганизмов:  $КС2 = \lg [ДНК Bac] - \lg [ДНК Lac]$ . Коэффициент КС3 отражает соотношение концентраций *Bacteria* (Bac) и анаэробных микроорганизмов (Gv+Av), равен разнице логарифмов концентраций ДНК указанных микроорганизмов:  $КС3 = \lg [ДНК Bac] - \lg [ДНК (Gv+Av)]$ .

**Таблица 2.13.** Интерпретация результатов для исследуемых образцов

Соотношения концентраций ДНК микроорганизмов соответствуют бактериальному вагинозу	$КС1 < 0,5$
Бактериальный вагиноз не установлен	$КС1 > 1$ и общее количество ДНК бактерий более $10^6$ ГЭ/мл
Промежуточное состояние микрофлоры	$0,5 \leq КС1 \leq 1$
Дисбиоз неуточненной этиологии	$КС2 > 1$ и $КС3 > 2$ , любое значение КС1
Снижение степени бактериальной обсеменённости	$КС1 > 1$ и общее количество ДНК бактерий менее $10^6$ ГЭ/мл и более $10^5$ ГЭ/мл
Количество бактерий недостаточно для анализа	общее количество ДНК бактерий менее $10^5$ ГЭ/мл

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%.

### **2.3. Исследование состояния 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  $\text{Na}_2$  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 Gracham and Karnovsky [1966]. 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 (на 100 клеток):  $СЦП = (N_1 \times 0) + (N_2 \times 1) + (N_3 \times 2) + (N_4 \times \text{Активность кислой фосфатазы (КФ)})$  в макрофагах выявляли методом одновременного азосочетания Burstone [1958] в модификации Zea H. et al . [1971], с использованием в качестве субстрата нафтол-AS-VI-фосфата рН 5,0 и в качестве диазосоставляющей, прочного гранатового ГВС. Мазки фиксировали в парах формалина, докрасивали гематоксилином Mc. Manus J . and Mowry R . [1960]. Регистрировали в световом микроскопе как описано ранее.

#### ***Состояние местного цитокинового статуса цервиковагинальной зоны***

Концентрацию цитокинов IL-1 $\beta$ , IL-8, TNF $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IFN $\gamma$ , IL-4 IL-10 в цервиковагинальной слизи определяли твердофазным иммуноферментным методом с использованием наборов и по прилагаемым методикам ( Caltag Laboratories, USA). После стандартного режима инкубации образцов цервикальной слизи с моноклональными антителами, и последующих промывок в лунки микропланшета

вносили конъюгат пероксидазы со стрептавидином, вновь инкубировали, и добавляли субстрат с реагентом цветной реакции (3-диметиламинобензоат). После развития окраски измеряли активность связанной пероксидазы с использованием фотометра для микропланшета с длиной волны 450 нм. По данным титрования стандартных образцов строили калибровочные графики, по которым определяли концентрацию цитокинов и метаболитов эстрогенов в опытных образцах.

#### **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, O<sub>2</sub><sup>-</sup>) и липидов (пероксидрадикалы, LOO<sup>-</sup>) 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°C). 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 5,5-диметил-1-пиролин-N-оксид (DETC) (SIGMA) дозой mM DMPO на 1 мл жидкости. С целью определения содержания пероксидрадикалов использовали спин-ловушку α-фенил-tert-бутилнитрон (PBN) (SIGMA).

#### **2.5. Биохимический состав вагинальной жидкости**

Одной из задач нашего исследования, было определить изменения в составе цервико-вагинальной жидкости при субклинических формах ПВИ, способствующие прогрессированию вирусного поражения нижнего отдела гениталий. Биохимические методы исследования влагалищной жидкости включали в себя определение

концентрации общего белка и низкомолекулярных органических веществ (мочевина, креатинин, билирубин, глюкоза, триглицериды) (автоматический биохимический анализатор «AlcyonAnalyzer-300» (табл. 2.14).

**Таблица 2.14.** Основные биохимические параметры влагалищной жидкости у здоровых небеременных женщин репродуктивного возраста

<b>Показатель (ед. измерения)</b>	<b>Величина</b>
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 (ммоль/л)	5,43
Лактат (мкмоль/мл)	4,89
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
Осмолярность (мосмоль/кг)	301,02

Определение активности  $\alpha$ -амилазы (ЕС 3 2.1.1.) проводили унифицированным амилокластическим методом Caraway W.). Активность аспартатаминотрансферазы (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.), лактатдегидрогеназы (ЕС 1.1.1.27.), креатинкиназы (ЕС2.7.3.2.),  $\gamma$ - глутамилтрансферазы (ЕС 2.3.2.2), лактоферрина, а также концентрация ионов кальция и магния оценивалась с помощью автоматического биохимического анализатора («Nittek - SuperZ-818»).



## **2.6. Методы профилактической терапии, проводимой пациенткам с латентными и субклиническими формами папилломавирусной инфекции**

Всем пациенткам с субклиническими формами ПВИ, включенным в исследование, при обнаружении дисбиотических изменений вагинальной микрофлоры за 1 менструальный цикл до начала предлагаемой терапии проводилось этиотропное лечение урогенитальной инфекции с обязательным контролем излеченности и последующей контаминацией влагалища.

В соответствии с заданными критериями включения были отобраны пациентки, подписавших добровольное информированное согласие на участие в исследовании (30 женщин – группа иммуноцитобиохимического контроля).

Пациентки с латентными формами ПВИ (n=182) были рандомизированы и разделены на 2 группы: одной из них (**Ia группа**) велось только наблюдение в течение 3 лет с ежегодным контролем вирусной нагрузки, расширенной кольпоскопией и взятием мазков на онкоцитологию (n=105), другая **Ib группа** (n=77) получала квадριвалентную рекомбинантную вакцину против ВПЧ (6, 11, 16, 18-го типов) – «Гардасил®» (суспензия для внутримышечного введения, 0,5 мл/доза – 3 дозы: вторая и третья дозы вводились через 1 и 3 месяца после первой прививки; «Мерк Шарп Доум Идея, Инк.», Switzerland).

В процессе лечения пациентки с субклиническими формами ПВИ (n=254) также были рандомизированы и разделены на 2 группы: одной из них (**IIa группа**) велось только наблюдение в течение 3 лет с ежегодным контролем вирусной нагрузки, расширенной кольпоскопией и взятием мазков на онкоцитологию (n=165), другой **IIb группа** (n=89) - квадριвалентная рекомбинантная вакцина против ВПЧ (6, 11, 16, 18-го типов) 3 дозы по той же схеме.

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

- ✓ результатов кольпоскопии;
- ✓ HPV Digene-test® с определением степени вирусной нагрузки;

- ✓ данных цитологического ( Pap-тест) и молекулярно-биологического ( ВПЧ Digene-тест) исследования.

Критериями оценки клинической и микробиологической эффективности являлись [В.И. Роговская, 2017]:

- ✓ полное клиническое выздоровление и микробиологическая санация: отсутствие латентных и субклинических форм ПВИ и воспалительных изменений слизистой влагалища и шейки матки, а также отрицательный результат цитологического исследования цервикального соскоба и неопределяемая вирусная нагрузка при ПЦР-исследовании после завершения курса лечения;
- ✓ улучшение: значительные уменьшения объективных кольпоскопических признаков при положительном результате цитологического и/или молекулярно-биологического исследований для субклинических форм ПВИ, снижение вирусной нагрузки для латентных форм;
- ✓ рецидив: повторное появление субклинической формы ПВИ и положительных результатов микробиологического, цитологического и молекулярно-биологического исследований в течение 2 месяцев и более после завершения курса лечения;
- ✓ ухудшение: переход латентных и субклинических форм ПВИ в вульварную или цервикальную интраэпителиальную неоплазию.

## **2.7. Статистическая обработка материала**

Статистическая обработка полученных результатов, построение графиков проводилась на персональном компьютере с использованием программ IBM SPSS версия 22 таблиц «Microsoft Excel 2013» ( Windows Office 2010) методом вариационной статистики и корреляционного анализа. Результаты исследований (количественные анамнестические, клинические, лабораторные и инструментальные данные) были обработаны методом вариационной статистики с определением критерия Фишера ( $F$ ) для оценки непараметрических показателей групп малых выборок и критерием Стьюдента ( $t$ ) для независимых групп. Во всех случаях

использовался показатель SD – среднее квадратичное отклонение: качественные в виде абсолютных (n) и относительных (%) величин. Анализ проводился с использованием методов «Медико-биологической статистики», программы «STATISTICA» 6,0. Ввиду нормального распределения количественных переменных в каждой из сравниваемых групп различия между переменными проверялись при помощи t-критерия Стьюдента для двух переменных и при помощи однофакторного дисперсионного анализа для трех и более переменных с проверкой нормальности распределения Гаусса. Для статистического анализа частотных показателей использовался метод углового преобразования Фишера (вычисление ФИ\* критерия). Различие между сравниваемыми величинами признавалось статистически значимым при уровне значимости (p) меньшем или равном 0,05. Для сравнения непараметрических данных применялись критерии Уилкоксона и Манна-Уитни. Статистически значимыми считались отличия при  $p < 0,05$  (95%-й доверительный интервал) и при  $p < 0,01$  (99%-й доверительный интервал). Для сравнения качественных данных определяли показатели частоты качественных признаков проверялась при помощи критерия Хи-квадрат и отношения шансов (ОШ).

Соблюдение этических принципов исследования с участием человека отмечено в Протоколе №4 от 23 сентября 2019 года заседания Этического комитета по проведению научных исследований ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Минздрава России. 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 2.1 5. Количество выполненных исследований

исследование \ группы	контроль (n 30)		латентные формы ПВИ (n=182)		субклинические формы ПВИ (n=254)	
	n	%	n	%	n	%
<i>RW, HIV, CMV, HSV, EBV</i>	30	100	182	100	254	100
общий анализ крови, мочи	30	100	182	100	254	100
биохимический анализ крови	30	100	182	100	254	100
осмотр женских половых органов в зеркалах	30	100	182	100	254	100
мазок из влагалища	30	100	728	400		
посев из влагалища и ц/к на наличие анаэробной микрофлоры	30	100	182	100	254	100
ПЦР-диагностика вагинального биоценоза	30	100	360	400	1016	400
посев из влагалища и ц/к на наличие Gn. Trich.	30	100	526	300	762	300
диагностика хламидийной и микоплазменной инфекции	30	100	526	300	762	300
Digene диагностика ВПЧ	30	100	728	400	1016	400
Рар-тест	-	-	728	400	1016	400
p16ink4a, p53mut, bcl-2, c-erb-B2, PCNA	-	-	728	400	1016	400
рецепторы эстрогенов и прогестерона ( ER; PgR)	30	100	728	400	1016	400
метаболиты 2-ОНЕ/16а-ОНЕ <sub>i</sub> в моче	30	100	728	400	1016	400
онкобелок E7 (ИФА, ПЦ)	-	-	728	400	1016	400
гистологическое исследование	-	-	728	400	1016	400
мазок на онкоцитологию	30	100	728	400	1016	400
расширенная кольпоскопия	30	100	728	400	1016	400
ультразвуковое исследование органов малого таза	30	100	182	100	254	100
НО, реактивные формы кислорода и липиды слизистой шейки матки	-	-	728	400	1016	400
состав лимфоидных клеток в крови	30	100	182	100	254	100
фагоцитарная активность нейтрофильных лейкоцитов	30	100	182	100	254	100
концентрация цитокинов в сыворотке крови и цервикальной слизи	30	100	182	100	254	100
цитохимия клеток мононуклеарно-фагоцитарной системы в цервикальной слизи	30	100	182	100	254	100
биохимическое исследование вагинального содержимого	30	100	728	400	1016	400
<b>всего</b>	<b>600</b>	<b>2000</b>	<b>11968</b>	<b>6800</b>	<b>16256</b>	<b>6400</b>

### Глава 3. Результаты собственных исследований

#### 3.1. Эпидемиологический анализ латентных и субклинических форм папилломавирусной инфекции у жительниц Краснодарского края

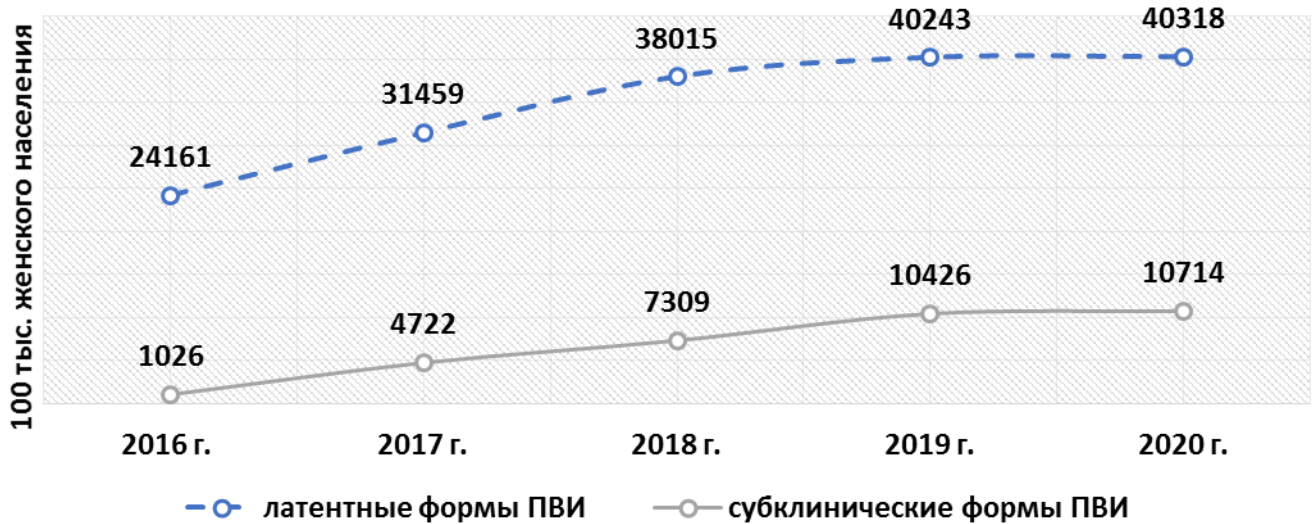
Это исследование является многоаспектным социально-гигиеническим, статистическим и медико-социальным, носит ретроспективный и проспективный характер. Для решения задач исследования разработана комплексная методика, включающая три этапа. Исследование на всех этапах – сплошное. *На первом этапе* проведен научный ретроспективный анализ показателей количества женщин с латентными и субклиническими формами папилломавирусной инфекции в Краснодарском крае в сравнительном аспекте с общероссийскими показателями за 5 лет (2016–2020 гг.):

1. проанализирована демографическая ситуация.
2. изучены в динамике показатели и структура заболеваемости женского населения латентными и субклиническими формами папилломавирусной инфекции и проведен детальный анализ этих данных.
3. рассчитаны показатели:
  - общей структуры заболеваемости населения региона латентными и субклиническими формами папилломавирусной инфекции;
  - уровень заболеваемости с латентными и субклиническими формами папилломавирусной инфекции среди женского населения края в зависимости от места проживания (городская, сельская местность);
  - динамика частоты заболеваемости латентными и субклиническими формами папилломавирусной инфекции городского и сельского населения за 5 лет;
  - динамика возрастных показателей заболеваемости субклиническими формами папилломавирусной инфекции с 2016 по 2020 гг.

Единица наблюдения – случай латентной или субклинической формы папилломавирусной инфекции. Объект исследования – латентная, субклиническая форма папилломавирусной инфекции. Источники информации: статистические

данные Росстата, Министерства здравоохранения Краснодарского края. Объем исследования: по Краснодарскому краю – 6239 латентных и 1806 случаев субклинических форм папилломавирусной инфекции. *Вторым этапом* статистического исследования явилось сравнительное изучение особенностей территориального распределения частоты латентных и субклинических форм папилломавирусной инфекции в условиях каждого из 47 административных районов Краснодарского края.

Стандартизованный показатель (мировой стандарт) заболеваемости раком шейки матки в Краснодарском крае в 2016 году составил 18,5 на 100 тыс. женского населения (по Российской Федерации  $14,8 \pm 0,6$ ). В 2020 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 стандартизованным показателем ( $18,6 \pm 1,9$  против  $14,5 \pm 0,5$ ;  $p < 0,05$ ). Увеличение количества заболеваемости патологией шейки матки в виде цервикальной интраэпителиальной неоплазии (CIN) и рака имеет прямую пропорциональную связь с увеличением количества латентных и субклинических форм папилломавирусной инфекции, но, к сожалению, учет данных форм патологии в РФ не ведется, что не позволяет судить о динамике этих состояний в целом о стране и в регионе. В данном исследовании мы попытались, на основании амбулаторных карт женских консультаций Краснодарского края, в которых велся учет носительства папилломавирусной инфекции (латентные формы ПВИ) и кольпоскопически визуализируемой патологии вульвы, влагалища и шейки матки (субклинические формы ПВИ), проанализировать пятилетнюю динамику этой патологии в регионе в зависимости от географии, возраста и социальных данных. За 5 лет количество женщин, носителей вируса папилломы человека, увеличилось в 1,7 раза, а субклинических форм возросло в более чем 10 раз (рис. 3.1).



**Рисунок 3.1.** Динамика показателей латентных и субклинических форм ПВИ в Краснодарском крае

Данные показатели, по нашему мнению, хотя и косвенно связаны с увеличением инфицированности населения вирусом папилломы человека (и пока еще низком уровне первичной профилактики ВПЧ-заражения в регионе), но, в большинстве случаев, говорят об улучшении выявляемости данной инфекции в регионе за счет оптимизации мониторинга пациенток с урогенитальными инфекциями, кольпоскопического скрининга, повышения профессионального уровня специалистов не только в центре, но и в регионах. В дальнейшем это должно позволить выявлять ВПЧ-инфекцию на ранних стадиях, проводить необходимые мероприятия по вторичной профилактике рака вульвы и шейки матки с динамическим наблюдением и своевременным скринингом.

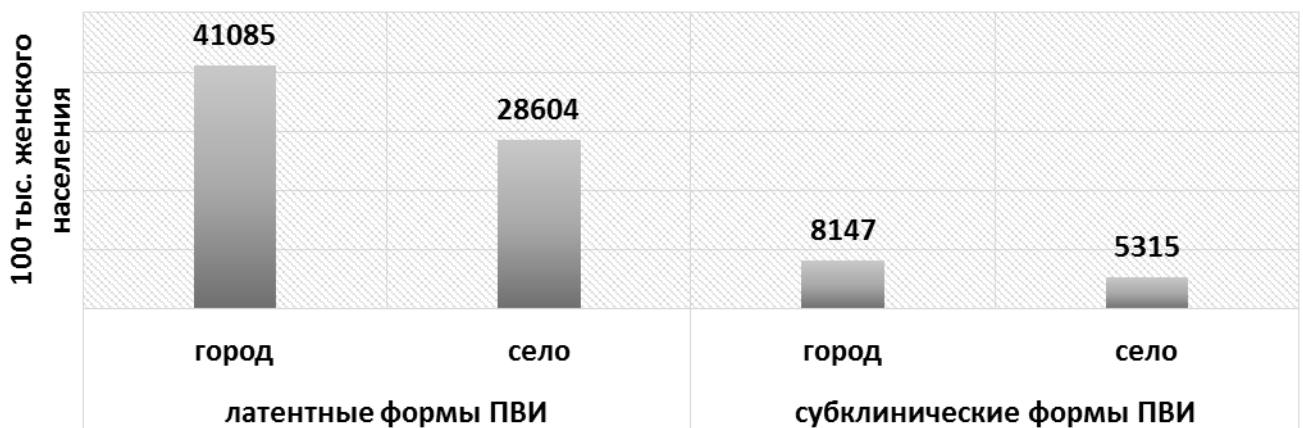
При сравнении показателей инфицированности вирусом папилломы человека и выявляемости латентных субклинических его форм среди городского и сельского населения Краснодарского края выявлена статистически значимая ( $p < 0,05$ ) зависимость от нахождения пациенток в городе или в сельской местности. Противоположная зависимость прослеживается при оценке выявляемости латентных и субклинических форм ПВИ: в городах края она была достоверно выше, чем сельской местности. В 2016 году в городах Краснодарского края доля латентных и

субклинических форм ПВИ составила соответственно 31025 и 1241 случаев на 100 тысяч женского населения, а в сельской местности их количество была заметно ниже – соответственно 17313 и 894 (табл. 3.1). При этом за последние 5 лет все более нивелируется разница в детекции вышеназванных форм папилломавирусной инфекции и в 2020 году количество выявленных форм латентного и субклинического ПВИ в городе составила уже 44603 и 11595 случаев на 100 тысяч женского населения, а в селе – 36005 и 9741 соответственно.

**Таблица 3.1.** Сравнительная оценка показателей латентных и субклинических форм ПВИ среди городских и сельских женщин Краснодарского края (на 100 тыс. женского населения)

		2016	2017 г.	2018 г.	2019 г.	2020 г.
<b>латентные формы ПВИ</b>	город	31025	39426	46154	44217	44603
	село	17313	23472	29906	36326	36005
<b>субклинические формы</b>	город	1241	6511	9474	11917	11595
	село	894	2437	4941	8582	9741

Соответственно среднее количество диагностированных латентных форм ПВИ в городе составило 41085, а в сельской местности - 28604 случаев на 100 тысяч женского населения (в 1,4 раза ниже), субклинических форм соответственно 8147 и 5315 (в 1,5 раза ниже) (рис. 3.2).

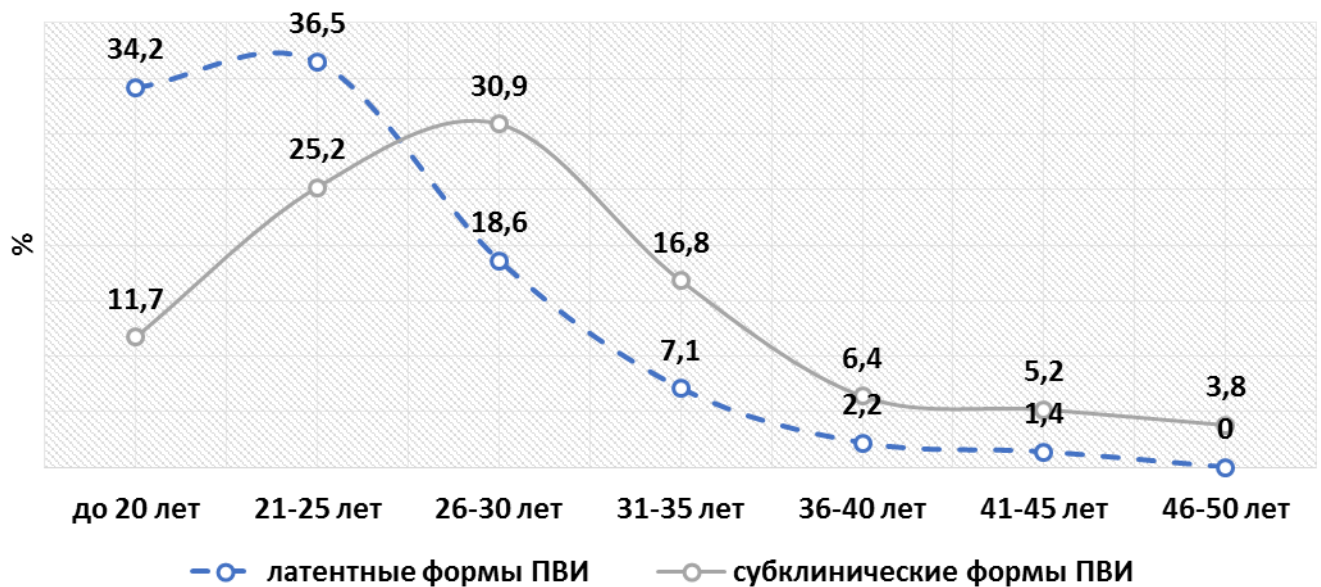


**Рисунок 3.2.** Пятилетняя медиана показателей латентных и субклинических форм ПВИ в Краснодарском крае (город – село)



Тем не менее в целом возрастающее количество пациенток с латентными и субклиническими формами ПВИ дает основание для сравнительно оптимистичного прогноза в отношении заболеваемости раком шейки матки. Большое количество выявленных данных форм ПВИ, свидетельствует о детекции папилломавирусной инфекции на ранних стадиях, способствует их динамическому наблюдению и своевременной профилактике, лечению с последующим активным наблюдением, что позволяет предупредить переход патологических неопластических процессов нижнего отдела гениталий на неуправляемый уровень. Более низкий уровень выявляемости латентных и субклинических форм ПВИ в сельской местности говорит, в первую очередь, о недостаточности лабораторного и инструментального оборудования, квалифицированных специалистов, а во вторую - о низкой активной профилактике, а значит и обращаемости населения для проведения специализированного обследования.

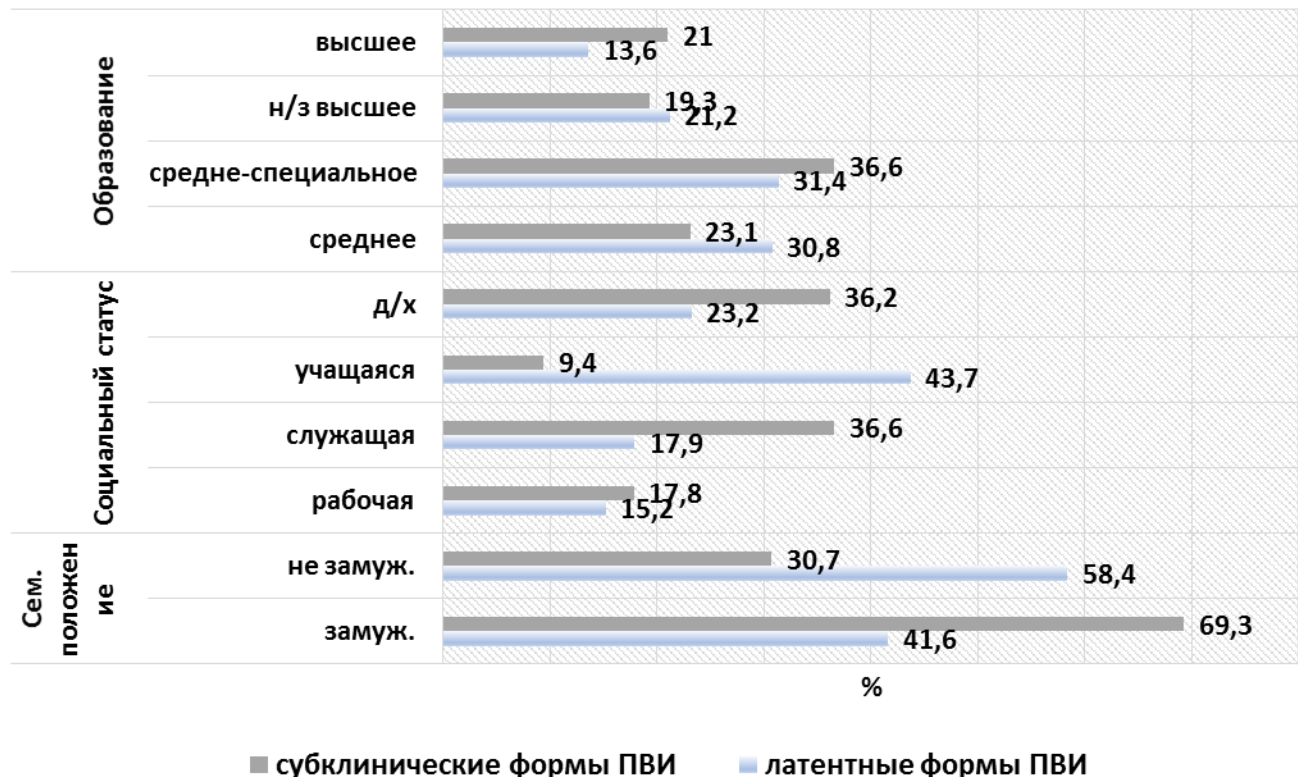
Анализ латентного ВПЧ-носительства и субклинических форм папилломавирусной инфекции в Краснодарском крае в возрастном аспекте дал следующие результаты (рис. 3.3).



**Рисунок 3.3.** Возрастные показатели латентных и субклинических форм ПВИ в Краснодарском крае (в среднем за 5 лет)

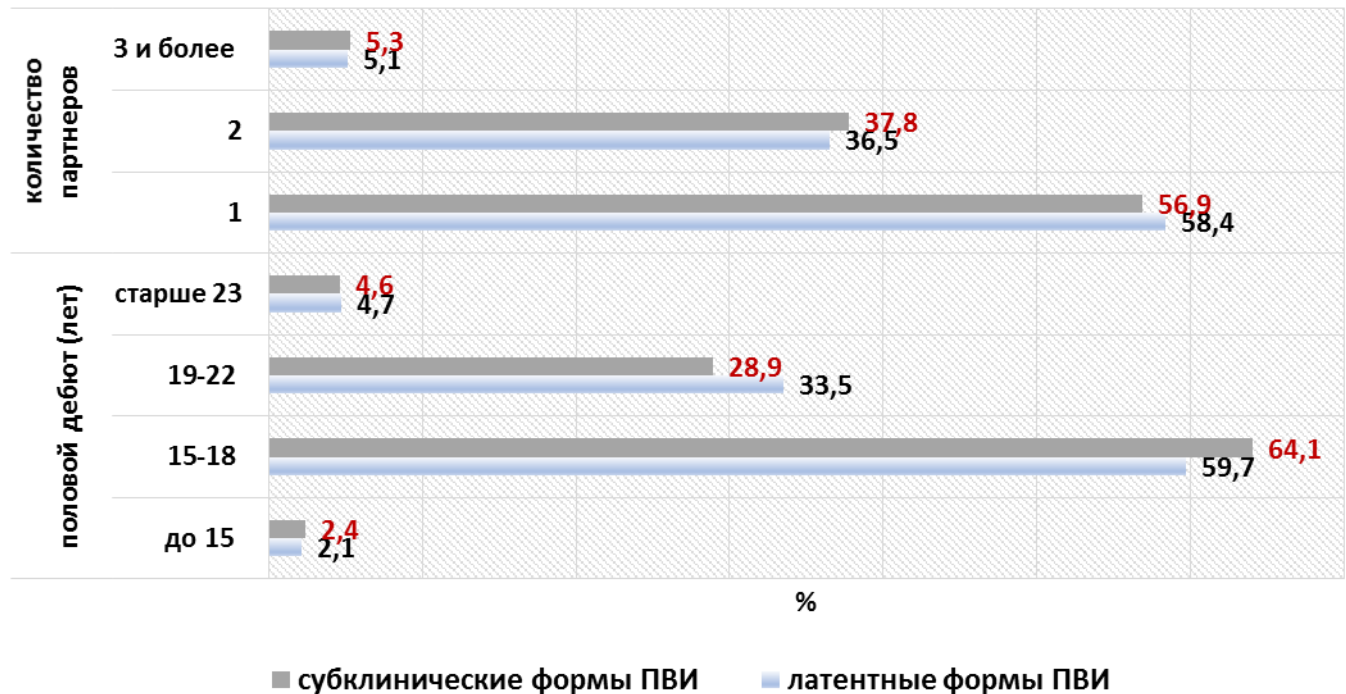
Выявлено, что основной уровень инфицированности ВПЧ происходит уже с первыми половыми контактами, при этом наибольшее количество латентных форм ПВИ приходится на возраст 18–25 лет (70,7%), затем происходит снижение количества бессимптомных вирусоносителей (до 18,6%) и увеличивается доля реализованных субклинических форм, пик обнаружения которых приходился на возраст 26–30 лет (30,9%). Суммарно реализация ВПЧ-носительства в субклинические формы происходит в возрасте 21–35 лет - 72,9%.

Анализ социального статуса пациенток Краснодарского края показал отсутствие различий ( $p < 0,05$ ) по социальному и семейному положению, а также уровню образования у пациенток с латентными и субклиническими формами ПВИ (рис. 3.4). >



**Рисунок 3.4.** Социальная характеристика женщин с латентными и субклиническими формами ПВИ

Определенных особенностей менструальной функции и гормонального статуса при оценке анамнестических данных не выявлено. Средний возраст менархе составил  $12,4 \pm 1,4$  года у латентных ВПЧ-носителей и  $12,3 \pm 1,2$  года у пациенток с субклиническими формами ПВИ. Средний возраст полового дебюта также не отличался у женщин с латентными и субклиническими формами ПВИ –  $18,2 \pm 1,4$  года и  $17,9 \pm 1,3$  года, интервал от менархе до сексуального дебюта в 2-3 года был зарегистрирован 39,1% вирусоносителей и 39,4% пациенток с субклиническими формами ПВИ ( $p < 0,05$ ). На интервал 6 лет и более указали больше 29,6% в обеих группах. Среднее значение интервала между возрастом менархе и возрастом начала половой жизни в обеих группах составило - 3,0 (2,0–5,0) лет (рис. 3.5).

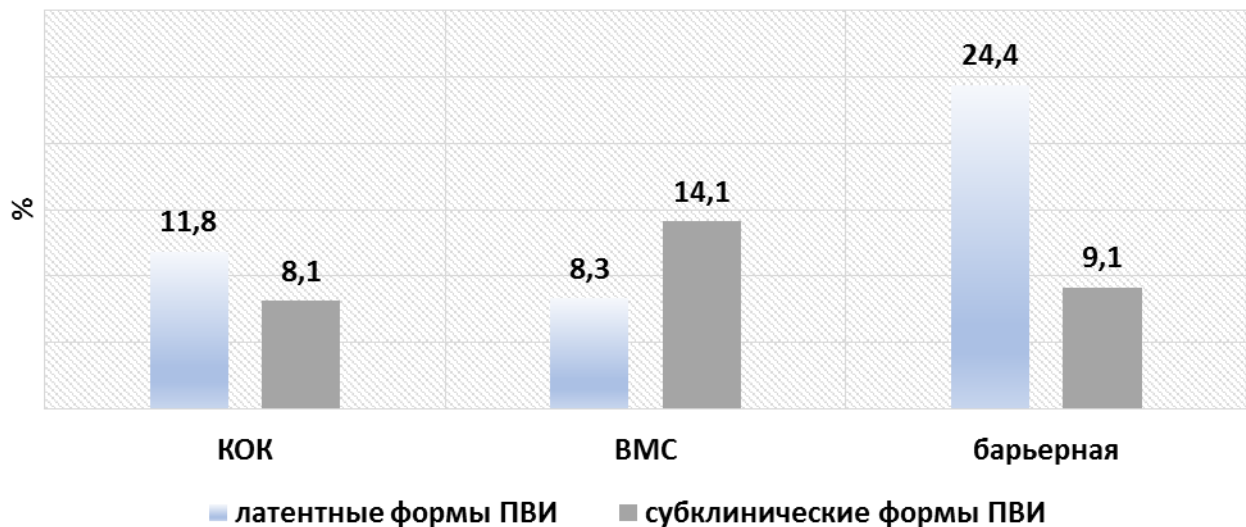


**Рисунок 3.5.** Сексуальное поведение женщин с латентными и субклиническими формами ПВИ

В группе латентных ВПЧ-носителей один половой партнер был у 58,4% женщин, а в группе пациенток с субклиническими формами ПВИ – в 56,9% (разница в группах недостоверна;  $p > 0,05$ ).

На никотиновую зависимость было указано у 20,8% вирусоносителей и у 26,9% пациенток с субклиническими формами ПВИ. Обращает на себя внимание возрастающее с каждым годом использование для курения альтернативных способов (аналоги электронных сигарет, ароматические смеси и др.), которые в обеих группах доходят до  $52,3 \pm 3,6\%$  ( $p=0,0002$ ). При этом в общедоступной научной литературе практически не встречается данных о влиянии этих альтернативных способов курения на реализацию папилломавирусной инфекции. Хотя, по нашему мнению, альтернативные способы курения можно рассматривать, как не только риск-фактор инфицированности ПВИ, а также как кофактор прогрессии вирусного поражения нижнего отдела гениталий.

Контрацепцию (исключая прерванный половой акт и календарный метод Огино-Кнауса) использовали 44,1% пациенток с латентными и 31,3% женщин с субклиническими формами ПВИ, при этом гормональную контрацепцию (КОК) пациентки 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. 3.6). По остальным параметрам статистически достоверных отличий в плане контрацепции у данного контингента не выявлено.



**Рисунок 3.6.** Контрацепция женщин с латентными и субклиническими формами ПВИ

Проведенный анализ свидетельствует, что Краснодарский край относится к регионам с высоким уровнем инфицированности вирусом папилломы человека, а также более высоким уровне заболеваемости ВПЧ-ассоциированной патологией нижнего отдела женских гениталий и раком шейки матки по сравнению с общефедеральными показателями, особенно в сельской местности. При этом инфицирование ВПЧ в большом проценте случаев происходит с половым дебютом и является основным фактором, способствующим реализации в дальнейшем (через 5–10 лет) данной патологии.

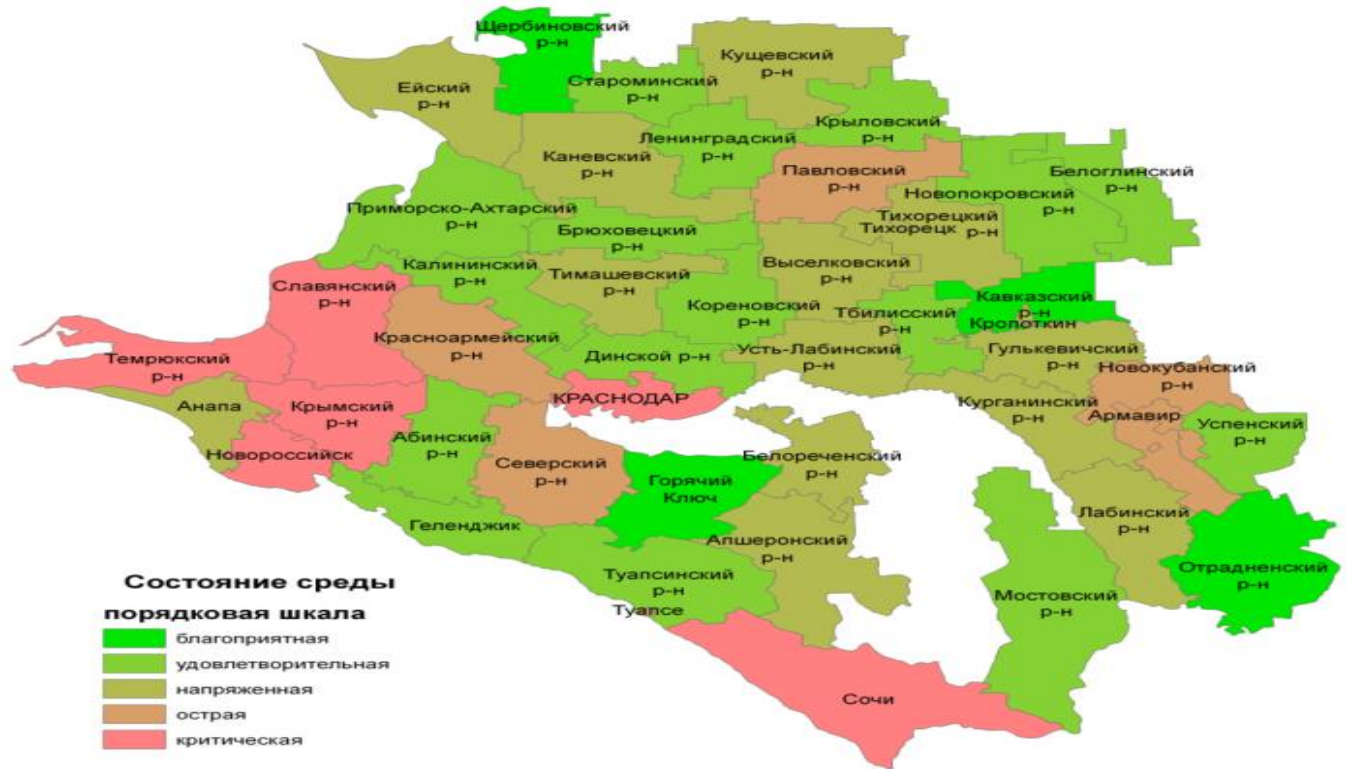
### **3.1.1. Территориальное картографирование латентных и субклинических форм ПВИ в Краснодарском крае**

Изучение географических различий распространения патологии, как один из необходимых этапов эпидемиологических исследований, предусматривает выявление местных факторов, имеющих отношение к этиопатогенезу заболевания и требуют тщательного анализа 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 латентных и субклинических форм папилломавирусной инфекции на административных территориях Краснодарского края были определены стандартизованные показатели заболеваемости населения этих территорий в целом и отдельно для женского населения каждого города и района края за 2016-2020 гг., а картографический анализ их стандартизованных коэффициентов пространственного распределения населения по административным территориям края позволил с помощью математико-статистического метода оценки колебаний ряда и типичных средних величин установить 5 уровней риска заболеваемости ВПЧ-ассоциированной патологией нижнего отдела гениталий, в соответствии с которыми выделено 5 групп районов края, достоверно отличающихся по количеству латентных и субклинических форм ПВИ (табл. 3.2; рис 3.7).

**Таблица 3.2.** Стандартизованные показатели латентных и субклинических форм ПВИ у женщин Краснодарского края (в среднем за 5 лет)

№.№	Район	Стандартизованный показатель
Благоприятный		
1	Отраденский	12146
2	Староминский	14030
3	Кавказский	14811
Удовлетворительный		
4	Тихорецкий	15246
5	Кропоткин	15283
6	Приморско-Ахтарский	15912
7	Горячий Ключ	16170
8	Щербиновский	16271
9	Крымский	18459
10	Брюховецкий	19016
11	Калининский	19247
12	Крыловский	19583
Напряженный		
13	Павловский	20811
14	Ейский	20894
15	Анапский	21013
16	Каневский	21072
17	Гулькевичский	21541
18	Абинский	22177
19	Курганинский	22696
20	Успенский	23489
21	Северский	24116
22	Ленинградский	26542
23	Новопокровский	27714
24	Мостовский	29018
Острый		
25	Апшеронский	30281
26	Новокубанский	31194
27	Славянск-на-Кубани	31722
28	Армавир	33006
29	Лабинский	33509
30	Кущевский	35143
31	Темрюкский	35471
32	Белоглинский	36028
33	Тбилисский	36352
34	Динской	36912
35	Кореновский	37240
36	Тимашевский	38173
37	Красноармейский	39009
38	Выселковский	39366

Критический		
39	Геленджик	40217
40	Сочи	40285
41	Туапсинский	40316
42	Туапсе	40894
43	Краснодар	40917
44	Белореченский	40962
45	Тихорецк	41013
46	Новороссийск	41226



**Рисунок 3.7.** Зоны заболеваемости латентными и субклиническими формами ПВИ в Краснодарском крае

Для латентных и субклинических форм ПВИ в первую группу (благоприятная) вошли 3 района с низким уровнем инфицированности населения (до 15000 на 100 тыс. женского населения), во вторую группу (удовлетворительная) вошло 9 районов с уровнем инфицированности ниже среднего краевого показателя (от 15000 до 20000), в третью группу (напряженная) - 12 районов со средним уровнем инфицированности (от 20000 до 30000), в четвертую группу (острая) - 14 районов с уровнем инфицированности выше среднего краевого показателя (от 30000 до 40000)

и в пятую группу (критическая) вошло 8 районов с высоким показателем инфицированности (от 40000 и выше на 100 тыс. женского населения). Разница между уровнем заболеваемости в группах районов статистически достоверна ( $t=1,6\delta$ ). Эти данные также нуждаются в более углубленном изучении. Картограмма демонстрирует особенности территориальной распространенности латентных и субклинических форм ПВИ 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 ВПЧ-ассоциированной патологией женских половых органов, в которую входят 21 район. Эти регионы отличаются с одной стороны развитым сельским хозяйством и химической промышленностью (север региона), с другой стороны – курортная зона со своими особенностями полового поведения (юг региона). Полученные данные свидетельствуют о необходимости более глубокого изучения причин высокого и низкого уровня ВПЧ-инфицированности в крае. Учитывая выше проведенный анализ, мы объединили все районы с высоким уровнем и выделили зоны повышенного риска заболеваемости ВПЧ-ассоциированной патологией нижнего отдела гениталий заболеваемости в Краснодарском крае. 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, Кушевский, 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 латентными и субклиническими формами ПВИ в Краснодарском крае

В ходе исследования проанализировано 6239 амбулаторных карт пациенток с латентным ВПЧ-носительством и 1806 с субклиническими формами ПВИ (рис. 3.8–3.9). Обнаружено, что основными инфекционными агентами в Краснодарском крае, как при латентном ВПЧ-носительстве, так и при реализации инфекции в субклиническую форму, 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% пациенток с субклиническими формами ПВИ.

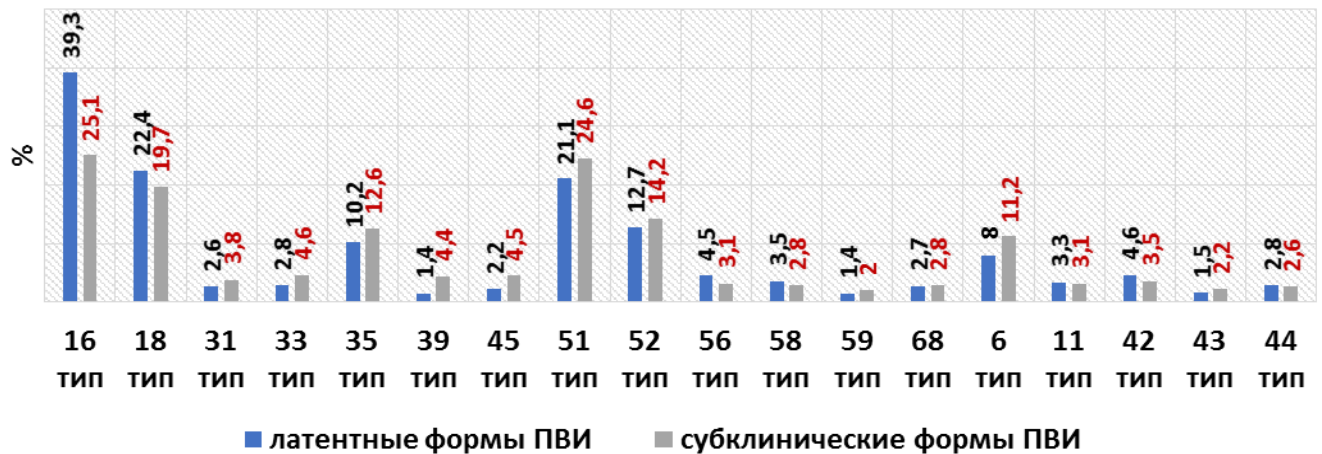


Рисунок 3.8. Типирование ВПЧ в Краснодарском крае

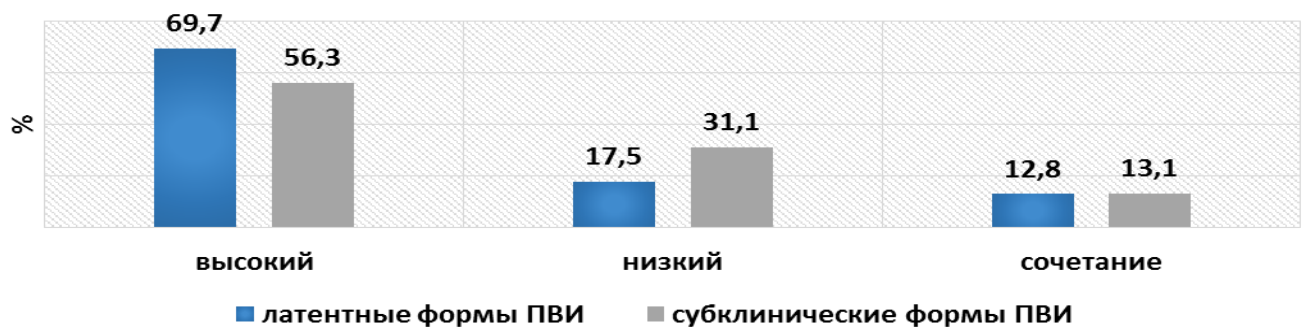
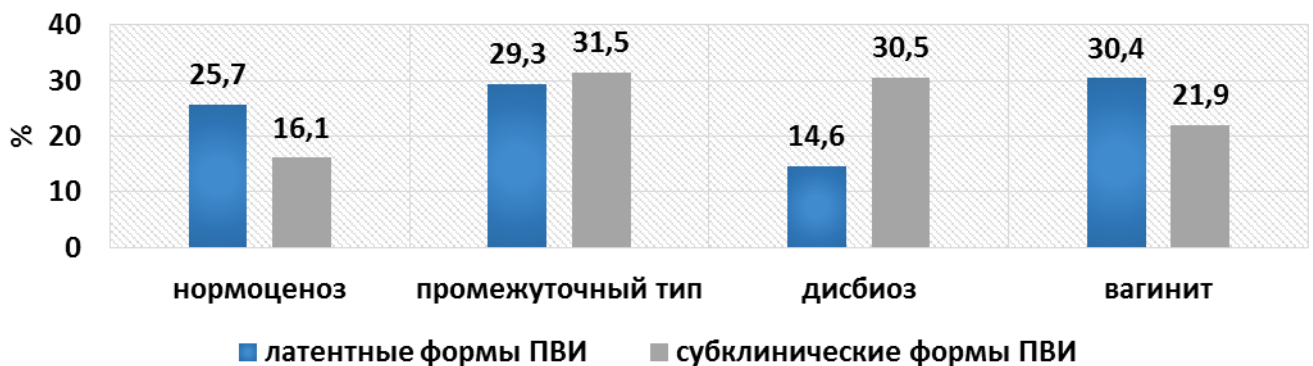


Рисунок 3.9. Встречаемость ВПЧ различного канцерогенного риска при латентных и субклинических формах в Краснодарском крае

При этом сочетание нескольких типов ВПЧ в исследованных группах составляло при латентных формах ПВИ - 13,1%, а при субклинических – 12,8%.

Также был проведен эпидемиологический анализ заболеваемости сопутствующими урогенитальными инфекциями у пациенток с латентными и субклиническими формами ПВИ при этом у 81,7 вирусоносителей и у 90,1% женщин с субклиническими формами ПВИ обнаружена та или иная патогенная и условно-патогенная микрофлора. Результаты микроскопического исследования классифицировали по Е.Ф. Кира (2001) (рис. 3.10).



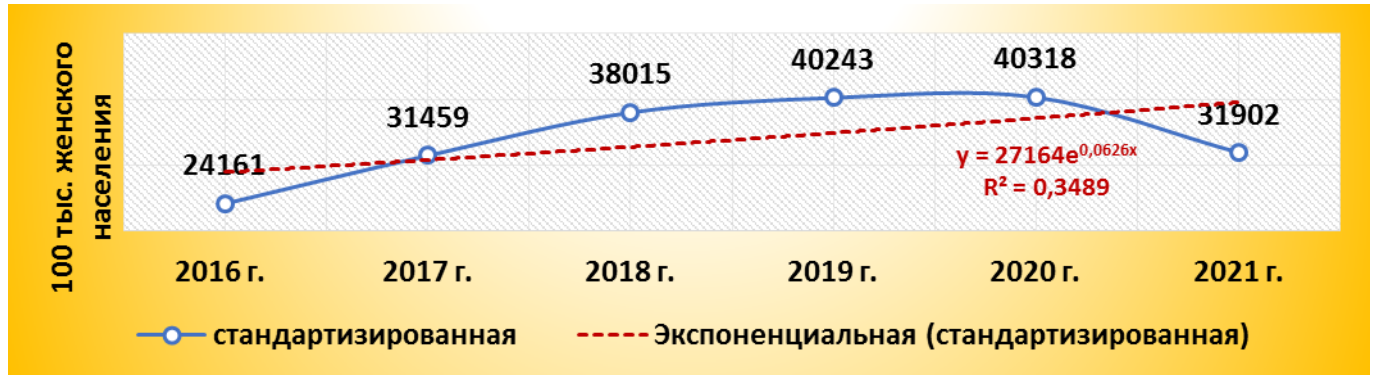
**Рисунок 3.10.** Микробиологическая характеристика пациенток

Исследования показали, что при субклинических формах ПВИ количество пациенток с нормоценозом влагалища было более чем в 1,5 раза ниже, чем при латентных (16,1 и 25,7% соответственно). При этом влагалищных дисбиозов у них было 30,5% (при латентном вирусоносительстве – 14,6%).

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

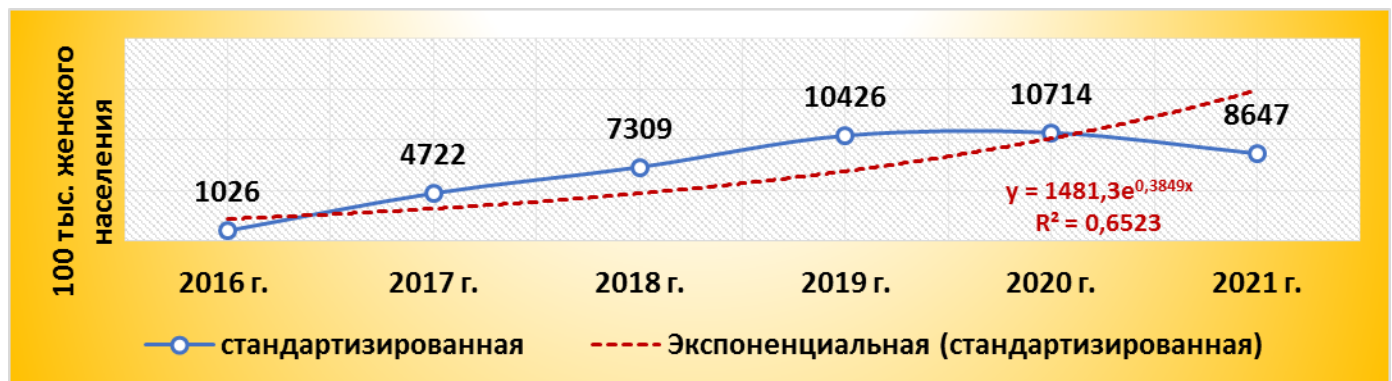
Прогнозирование, как медицинская проблема, обусловлена необходимостью планирования в системе здравоохранения уровня заболеваемости различными нозологическими единицами, в качестве стандарта были приняты расчетные данные об ожидаемой на 2022–2023 гг. возрастной структуре женского населения Краснодарского края (данные Краевого статистического управления). Мы рассчитали показатели заболеваемости ассоциированной с папилломавирусом

патологией нижнего отдела гениталий на 2022–2023 гг., а также вычислили доверительные интервалы прогнозных показателей с 95% вероятной оценкой.



**Рисунок 3.11.** Детекция латентных форм ВПЧ среди населения Краснодарского края (стандартизованные показатели на 100 тыс. женского населения)

Прогнозирование уровня заболеваемости в целом по региону проводилось на основании данных за 2016–2021 гг. при допущении, что до этого года сохранится прямолинейная тенденция динамики заболеваемости с использованием метода экстраполяции и аналитическим выравниванием динамического ряда методом наименьших квадратов, что позволило определить основную тенденцию изучаемых явлений, когда их закономерности могли быть скрыты действием случайных факторов (рис. 3.11-3.12).



**Рисунок 3.12.** Детекция субклинических форм ВПЧ среди населения Краснодарского края (стандартизованные показатели на 100 тыс. женского населения)



**Рисунок 3.13.** Детекция ВПЧ-ассоциированных заболеваний нижнего отдела гениталий среди населения Краснодарского края (стандартизованные показатели на 100 тыс. женского населения)

Сравнение расчетных годовых показателей ВПЧ-ассоциированной патологии нижнего отдела гениталий среди женщин Краснодарского края в 2022–2023 гг., полученных путем экстраполяции тренда соответствующих показателей заболеваемости и бессимптомного носительства ВПЧ в 2016–2021 гг., подтверждает эффективность применения трендовой модели прогнозирования (при условии доказанной достоверности прямолинейной связи  $P < 0,05$ ). Анализ полученных данных показывает, что в 2022–2023 гг. следует ожидать незначительное повышение частоты заболеваемости ВПЧ-ассоциированной патологии нижнего отдела гениталий, что связано, с одной стороны, скринингом уже детектируемой заболеваемости, с другой стороны, существующей на данный момент эпидемиологической и социальной обстановкой. Сопоставление ожидаемых интенсивных и стандартизованных показателей заболеваемости женского населения края в 2021 году свидетельствует о том, что эти показатели для ВПЧ-ассоциированных неопластических процессов фактически равны. 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.

Для оценки прогноза развития патологии нижнего отдела гениталий на фоне латентного ВПЧ-инфицирования мы попытались выявить некоторые прогностические критерии разработали диагностическую таблицу, позволяющую определить прогноз перехода латентных форм ПВИ в вульварную ( VIN) или цервикальную ( CIN) неоплазию (табл. 3.3).

**Таблица 3.3.** Прогностические критерии реализации латентных и субклинических форм VIN/CIN

№№	Признак	латентная и субклиническая формы ПВИ, ДЕ	VIN/CIN, ДЕ	ДК
<b>Географические признаки</b>				
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
<b>Анамнестические признаки</b>				
4	Начало половой жизни			
	до 15 лет	0,11	0,85	<b>+7,4</b>
	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	<b>+7,6</b>
	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	<b>+6,0</b>
8	Курение	0,14	0,47	<b>+6,8</b>
9	Прием КОК (более 5 лет)	0,16	0,25	+0,9
10	ВМС	0,23	0,37	+2,1
11	Отягощенная онкологическая наследственность	0,20	0,74	+3,5

12	Метаболический синдром	0,24	0,61	<b>+5,8</b>
<b>Клинические признаки</b>				
13	Аногенитальные бородавки	0,31	0,60	<b>+6,9</b>
14	Рубцовая деформация ш/м	0,12	0,55	<b>+5,3</b>
15	Эктопия/эктропион ш/м	0,14	0,58	<b>+7,3</b>
16	Хронический цервицит	0,28	0,71	<b>+5,2</b>
17	Вагинит/вагиноз	0,31	0,90	<b>+4,3</b>
<b>Лабораторные признаки</b>				
18	рН			
	>5,5	0,14	0,81	<b>+6,5</b>
	<5,5	0,62	0,15	<b>-3,8</b>
19	Инфекционный фактор			
	ИППП:	0,11	0,97	<b>+3,6</b>
	Гонококковая инфекция	0,09	0,14	<b>+2,5</b>
	Трихомонадная инфекция	0,23	0,68	<b>+4,7</b>
	Хламидийная \ микоплазменная инфекция	0,24	0,71	<b>+6,8</b>
	Урогенитальный герпес	0,17	0,90	<b>+7,6</b>
	Урогенитальный кандидоз	0,31	0,56	<b>+3,2</b>
	Микстинфицирование (ИИ 3 и более)	0,13	0,83	<b>+7,1</b>
	Неспецифическая условно-патогенная микрофлора	0,28	0,61	<b>+6,4</b>
20	Вагинальный биоценоз			
	Вагинит	0,30	0,27	<b>+3,4</b>
	Дисбиоз	0,16	0,88	<b>+7,3</b>
	Промежуточный тип	0,29	0,31	<b>+1,2</b>
	Нормоценоз	0,68	0,11	<b>-6,4</b>
	Бактериальный вагиноз	0,20	0,85	<b>+7,5</b>
21	Микстинфицирование различными высокоонкогенными типами ВПЧ с диапазоном ИИ от 3 до 6	0,19	0,84	<b>+8,5</b>

Диагностические коэффициенты (ДК) рассчитывали для каждого из признаков посредством последовательного анализа Вальда:  $(ДК Lg P1/P2)$ ; 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:  $J \times \frac{1}{2} (P1 P2)$ ; 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 развития ВПЧ-ассоциированных неопластических процессов нижнего отдела женских гениталий.

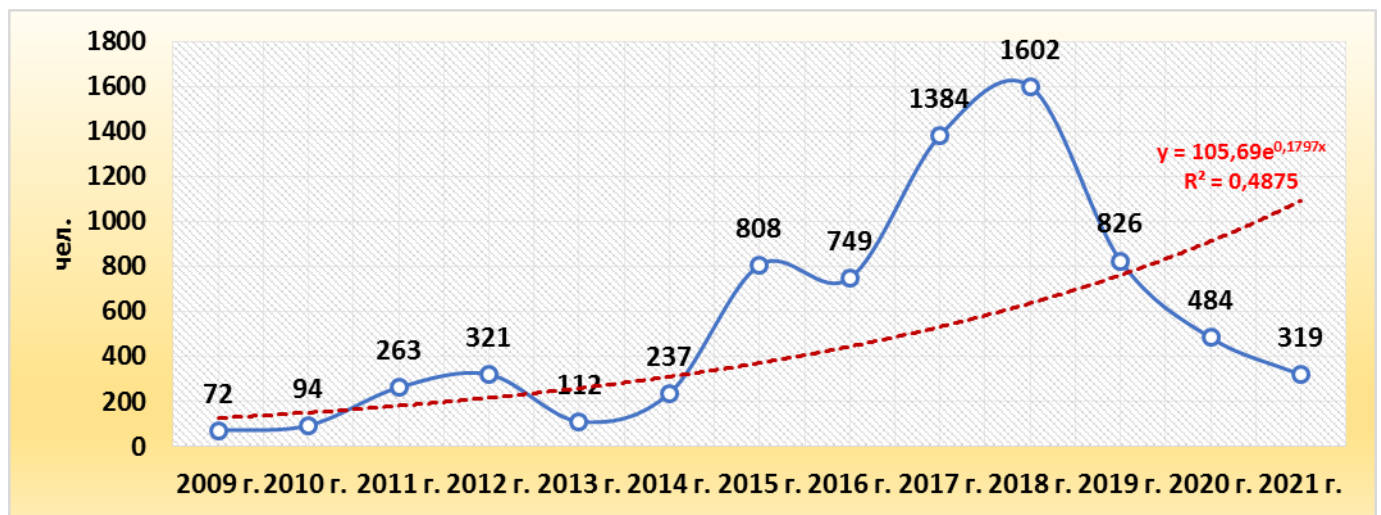
Производился расчет диагностического коэффициента для каждого из признаков: при ДК от -16 до +12 битов прогнозируют благоприятный исход (перехода ВПЧ-носительства VIN-CIN не предвидится), при ДК от +13 до плюс +23 битов вероятность перехода бессимптомного ВПЧ-носительства и субклинических форм ПВИ в вульварную или цервикальную интраэпителиальную неоплазию составляет 95%, при ДК более +23 битов - 99%.

В последующем исследовании в эту таблицу были включены молекулярно-биологические и иммунные маркеры неоплазии (иммуногистохимические маркеры экспрессии и апоптоза, участвующие в развитии неопластических процессов), вызванные вирусом папилломы человека (табл. 3.18). При этом целесообразность использования одной из представленных таблиц диктуется возможностями клинической лаборатории учреждения, где наблюдается пациентка и экономической составляющей.

### **3.2. Первичная профилактика рака шейки матки в Краснодарском крае (вакцинация против ВПЧ)**

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, а коммерческая стоимость полного пакета вакцинации практически в 3 раза превышает прожиточный минимум. Профилактическая работа по информированности населения о способах профилактики шейки матки в основном ведется только силами кафедр акушерства, гинекологии и перинатологии

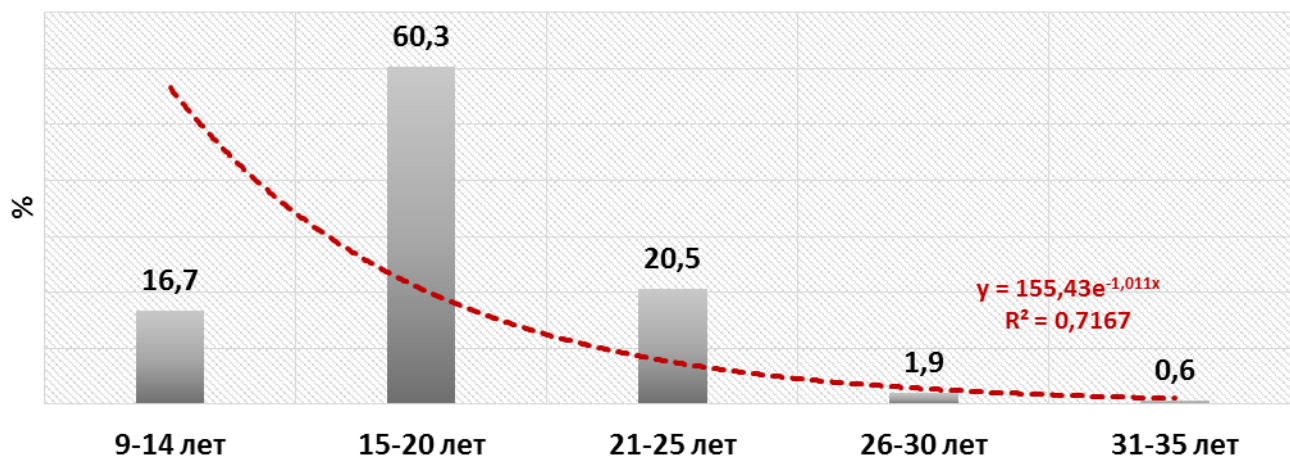
КубГМУ в основных ВУЗах г. Краснодара (информационно-образовательная программа «Охрана репродуктивного здоровья молодежи», включающая курс лекций и семинаров по этиологии рака шейки матки, путях передачи вируса папилломы человека, предрасполагающих факторах и методах профилактики заболеваний, вызванных папилломавирусной инфекцией), что явно недостаточно. 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. 3.14). При исследовании количества вакцинированных девушек в Краснодарском крае за 12 лет выявлена непостоянная динамика с наибольшим подъемом в 2015–2018 гг. (количество вакцинированных зарегистрировано в 2018 г. – 1602 человека) и последующим уменьшением количества ВПЧ-вакцинированных, что, скорее всего, связано с эпидемиологическими ограничениями периода пандемии COVID-19 (всего за 12 лет вакцинировался против 7271 человек – 0,24% от всего женского населения региона).



**Рисунок 3.14.** Динамика ВПЧ-вакцинации в Краснодарском крае

Основная группа вакцинированных приходится на возраст от 15 до 20 лет (77,0%), 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. 3.15).





**Рисунок 3.15.** Распределение вакцинированных по возрастным группам (медиана за 12 лет – 2009–2021 гг.)

Но все проводимые на настоящее время мероприятия явно недостаточны, учитывая постоянный рост в Краснодарском крае количества ВПЧ-носителей, 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.

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

### **3.3. Рандомизация с разделением пациенток с латентными и субклиническими формами папилломавирусной инфекции на группы для проведения наблюдения и предлагаемой профилактической терапии (проспективное исследование)**

#### **3.3.1. Клиническая и цитоморфологическая характеристика пациенток с субклиническими формами папилломавирусной инфекции**

Под нашим наблюдением находилось 182 пациентки с латентными и 254 субклиническими формами папилломавирусной инфекции (МКБ 10 - А63.0), также 30 условно здоровых женщин (иммуно-биохимический контроль). Подробная характеристика их социо-anamнестического статуса дана в главе «Материалы и методы исследования».

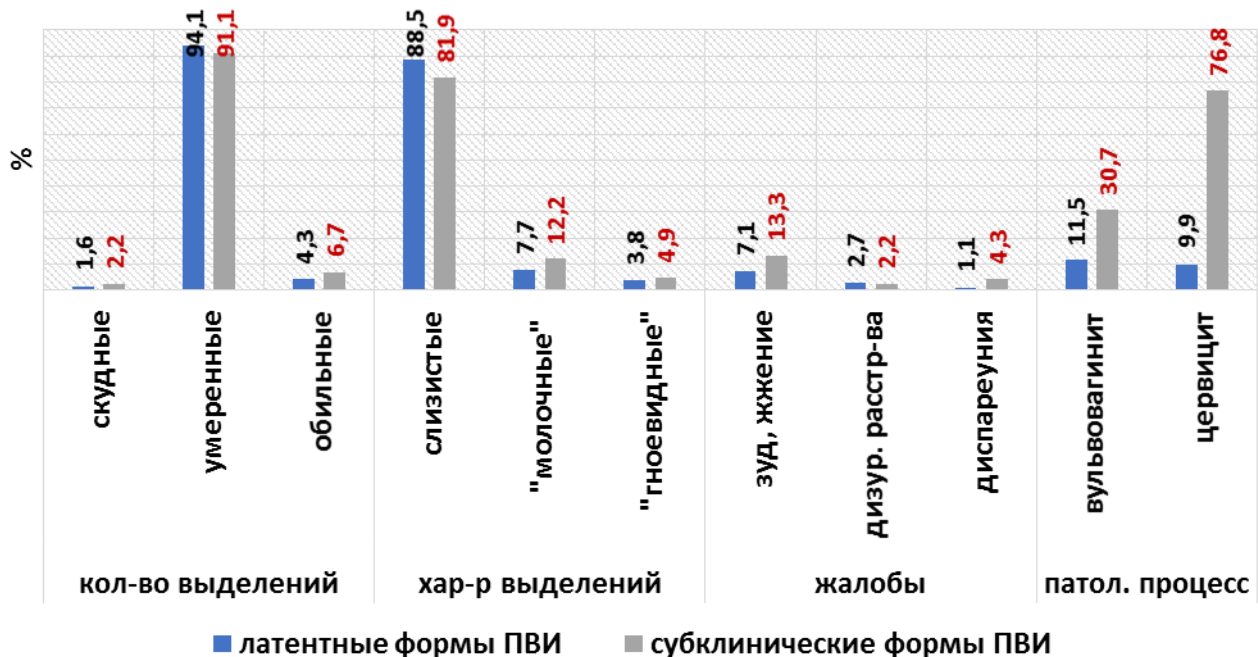
До составления клинического «портрета» пациенток с субклиническими формами ПВИ, представляет интерес регистрация анамнестических провоцирующих факторов (табл. 3.4). При этом, более половины респонденток (191/254; 75,2%) не связывает развитие данного неопластического процесса с какими-либо провоцирующими факторами, а другая часть женщин (36/254; 14,2%) указывает на сочетание нескольких провокаторных факторов.

**Таблица 3.4.** Провоцирующие факторы у пациенток с субклиническими формами ПВИ (n=254)

<b>провоцирующие факторы</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
смена полового партнера	13	5,1
антибактериальные препараты и местные антисептики	32	12,6
гормональная контрацепция	5	2,0
спермициды	19	7,5
спиртное	24	9,4
легкоусвояемые углеводы (сладкая, мучная пища)	36	14,2
острая и соленая пища	22	8,7
курение (в том числе альтернативные курительные смеси)	28	11,0

При отсутствии субъективных признаков латентных и субклинических форм ПВИ основное внимание пациенток уделялось сопутствующим проявлениям, среди которых наиболее часто – 25,8% (47/182) при латентных и 29,5% (75/254) при субклинических формах ПВИ встречались нарушения вагинального микробиоценоза с характерной клинической картиной, которые являлись причиной обращения к специалисту, где, на фоне проведенного исследования с кольпоскопией, и были детектированы латентные или субклинические формы ПВИ. Среди анамнестических факторов, способствующих клиническим проявлениям патологического процесса, наиболее часто упоминались применение антибактериальных препаратов и местных антисептиков (32/254; 12,6%), различные изменения пищевого и алкогольного поведения (40/254; 15,7%), а также курение (28/254; 11,0%).

В начале составления «клинического портрета» проводился сбор жалоб с активным опросом. Клиническая картина у наших пациенток либо отсутствовала, либо, в большинстве случаев, не была выраженной.



**Рисунок 3.16.** Клиническая характеристика пациенток с латентными (n=182) субклиническими формами ПВИ (n=254)

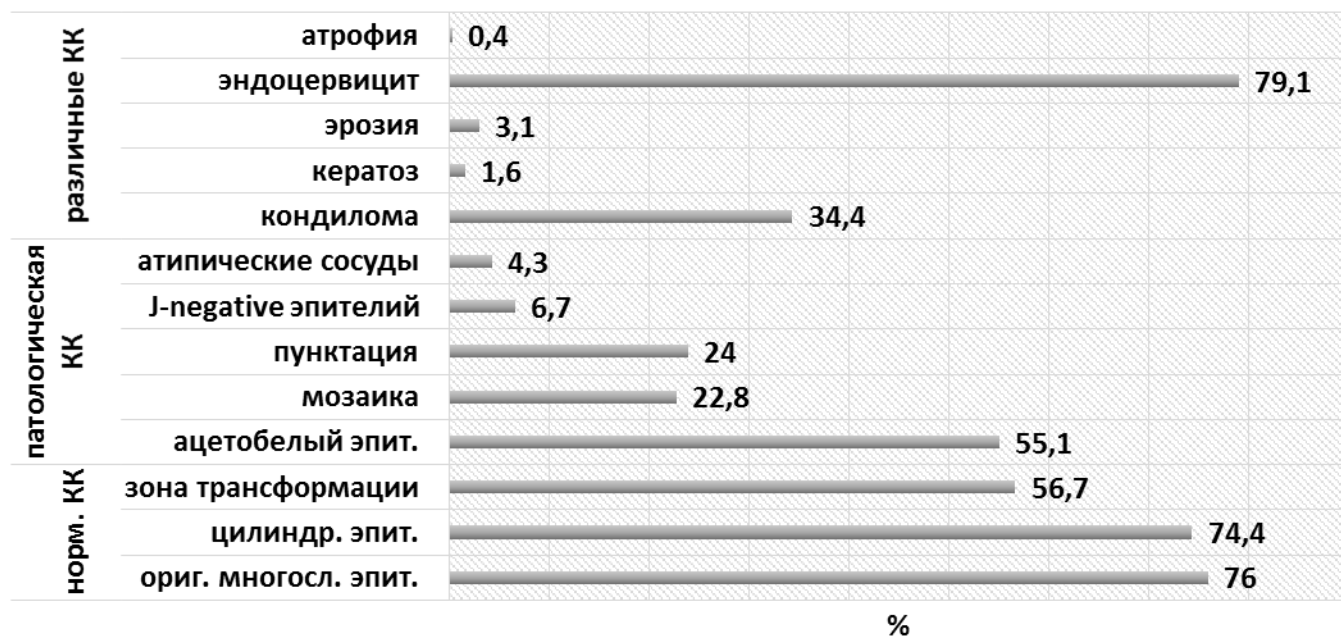
У 76,4% (139/182) латентных и 68,5% (174/254) субклинических форм ПВИ не было выявлено никаких жалоб, у 10,4% (19/182) латентных и 14,8% (38/256) субклинических форм выявлялись жалобы на патологические бели различного характера, 7,1% (13/182) и 12,2% (31/254) испытывали субъективные ощущения в виде зуда, жжения, 2,7% (5/182) и 4,3% (11/254) диспареунии (рис. 3.16). При этом объективная клиническая картина часто не соответствовала жалобам. Так при гинекологическом осмотре клинические признаки вульвовагинита встречались у 11,5% (21/182) пациенток с латентными и 30,7% (78/254) субклиническими формами ПВИ. Воспалительные изменения в шейке матки (цервицит) выявлены у большинства пациенток с субклиническими формами ПВИ – 76,8% (195/254), при латентных формах цервицит определялся в 9,9% (18/182).

Всем пациенткам была проведена расширенная кольпоскопия у пациенток с субклиническими формами ПВИ обнаружены 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) (табл. 3.5, рис. 3.17). У пациенток с латентными формами ПВИ, соответственно, такие изменения слизистых отсутствовали. Характерно, что у 41,7% (106/254) пациенток с субклиническими формами проявления ПВИ диагностировались как в зоне трансформации, так и за ее пределами (во влагалищных сводах, на стенках влагалища, вульве).

**Таблица 3.5.** Кольпоскопия у пациенток с субклиническими формами ПВИ (n=254)

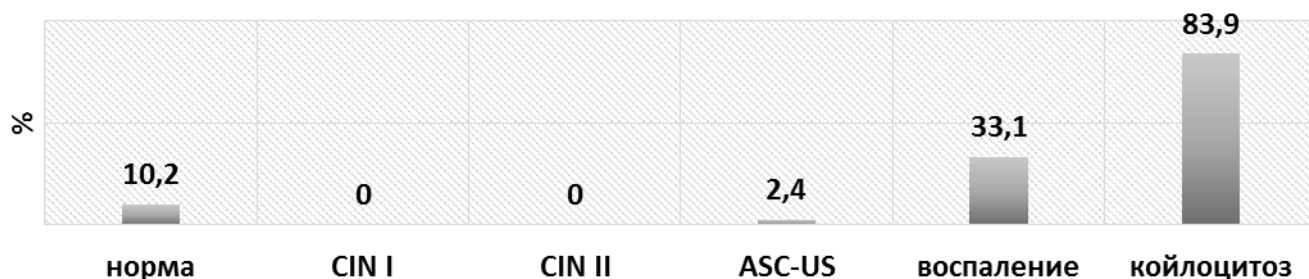
<b>кольпоскопические признаки</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
остроконечные кондиломы	9	3,5
плоские кондиломы	81	31,9
ацетобелый плоский эпителий	67	26,4
ацетобелый микропапиллярный эпителий	73	28,7
кондиломатозный вагинит	134	52,7
мозаика	58	22,8
пунктация	61	24,0

Сочетание аномальных кольпоскопических картин с нормальными признаками (оригинальный многослойный плоский эпителий, цилиндрический эпителия, зона трансформации) были отмечены в  $44,6 \pm 5,1\%$ . Неудовлетворительная кольпоскопия отмечена в среднем в  $1,8 \pm 0,5\%$  исследований.



**Рисунок 3.17.** Кольпоскопия пациенток с субклиническими формами ПВИ (n=254)

Цитоморфологическое исследование шейки матки методом жидкостной цитологии (Pap-Smear test) проводили всем пациенткам для подтверждения диагноза субклинической формы ПВИ (подтверждение ВПЧ-индуцированной койлоцитарной трансформации клеток вагинального и цервикального эпителия) (рис. 3.18).



**Рисунок 3.18.** Цитологическая характеристика пациенток с субклиническими формами ПВИ (n=254)

У всех пациенток с латентными формами ПВИ цитологическое исследование не выявило специфических изменений слизистых нижнего отдела гениталий. Установлено, что нормальные цитологические результаты регистрировались 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).

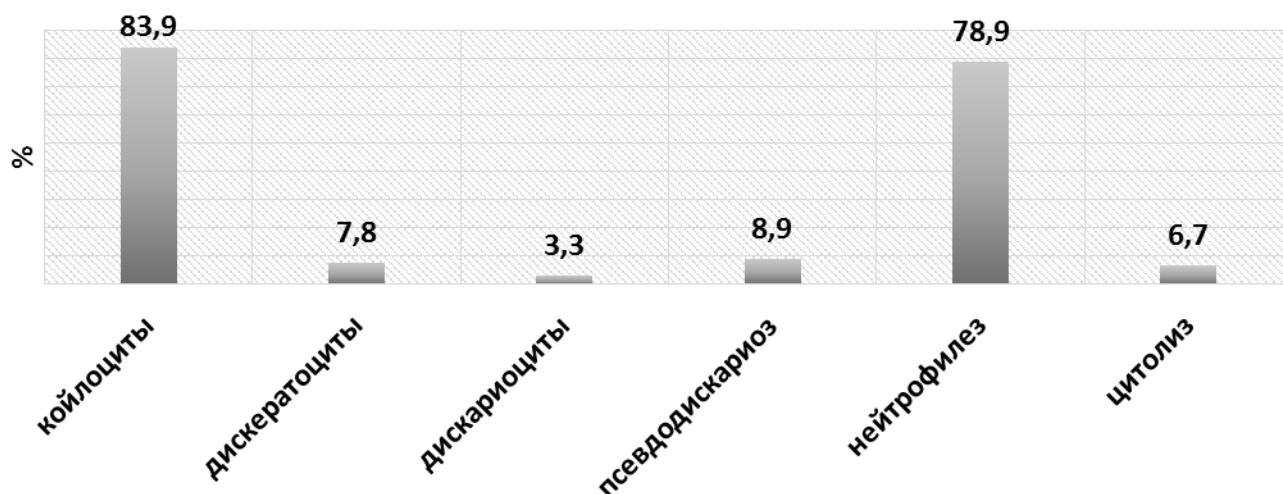
С целью установления количественных и качественных дифференциально-диагностических критериев был применен цитоморфометрический алгоритм, который включал следующие параметры: количество койлоцитов, гиперкератоз, паракератоз, резервные клетки, железистые клетки, плоскоклеточная метаплазия, изменения ядерно-цитоплазматического 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 ВПЧ-ассоциированного субклинического поражения нижнего отдела гениталий даёт гистологическое исследование биоптатов пораженных участков. Оценивались следующие 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 ВПЧ-поражения эпителия считается наличие специфических клеток - койлоцитов. При проведении гистологического исследования соскобов стенок влагалища, экзо- и эндоцервикса выявлялась койлоцитарная клеточная атипия (83,9% (212/254) пациенток с субклиническими

формами ПВИ), среди других клеточных элементов преобладали нейтрофильные лейкоциты (78,9%), лимфоциты (18,4%). Остальные изменения, характерные для ВПЧ-поражения нижнего отдела гениталий были в минимальном количестве (рис. 3.19). В зависимости от локализации материала мазка и наличия зоны трансформации, в мазки также попадали неизмененные клетки многослойного плоского эпителия, метапластические, базальные/парабазальные клетки и клетки цилиндрического эпителия, свидетельствующие о хроническом воспалении.



**Рисунок 3.19.** Цитологическая характеристика поражения эпителия нижнего отдела гениталий пациенток с субклиническими формами ПВИ (n=254)

Анализ биоптатов экзо- и эндоцервикса также установил, что основным морфологическим субстратом субклинических форм ПВИ был цервицит (81,9%; 208/254).

Использование клинико-кольпоскопического индекса (ККИ) 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 модифицированного кольпоскопического индекса Рейда (КИР), включающий такие кольпоскопические признаки, как цвет, состояние краев повреждения и форма поверхности, сосуды и

окрашивание йодом показало, что субклиническая 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.

Полученные данные указывают на полисистемность нарушений, возникающих при реализации папилломавирусной инфекции и свидетельствуют о наличии у данных пациенток с субклиническими формами папилломавирусной инфекции медицинских и социальных факторов, которые могут создавать неблагоприятный преморбидный фон и вызывают переход инфекции с субклинической в клиническую форму. Кофакторами ВПЧ-инфицирования и последующих неопластических процессов, еще раз подтвердились раннее начало половой жизни, promiscuitet, курение.

### 3.3.2. Вирусологический анализ латентных и субклинических форм папилломавирусной инфекции

Известно, и подтверждено в проведенном исследовании, что основными возбудителями ВПЧ-ассоциированной патологии нижнего отдела гениталий, являются вирусы папилломы человека высокого канцерогенного риска (ВПЧ ВКР), которые в исследуемых группах встречались  $72,4 \pm 5,8\%$  (рис. 3.20–3.21).

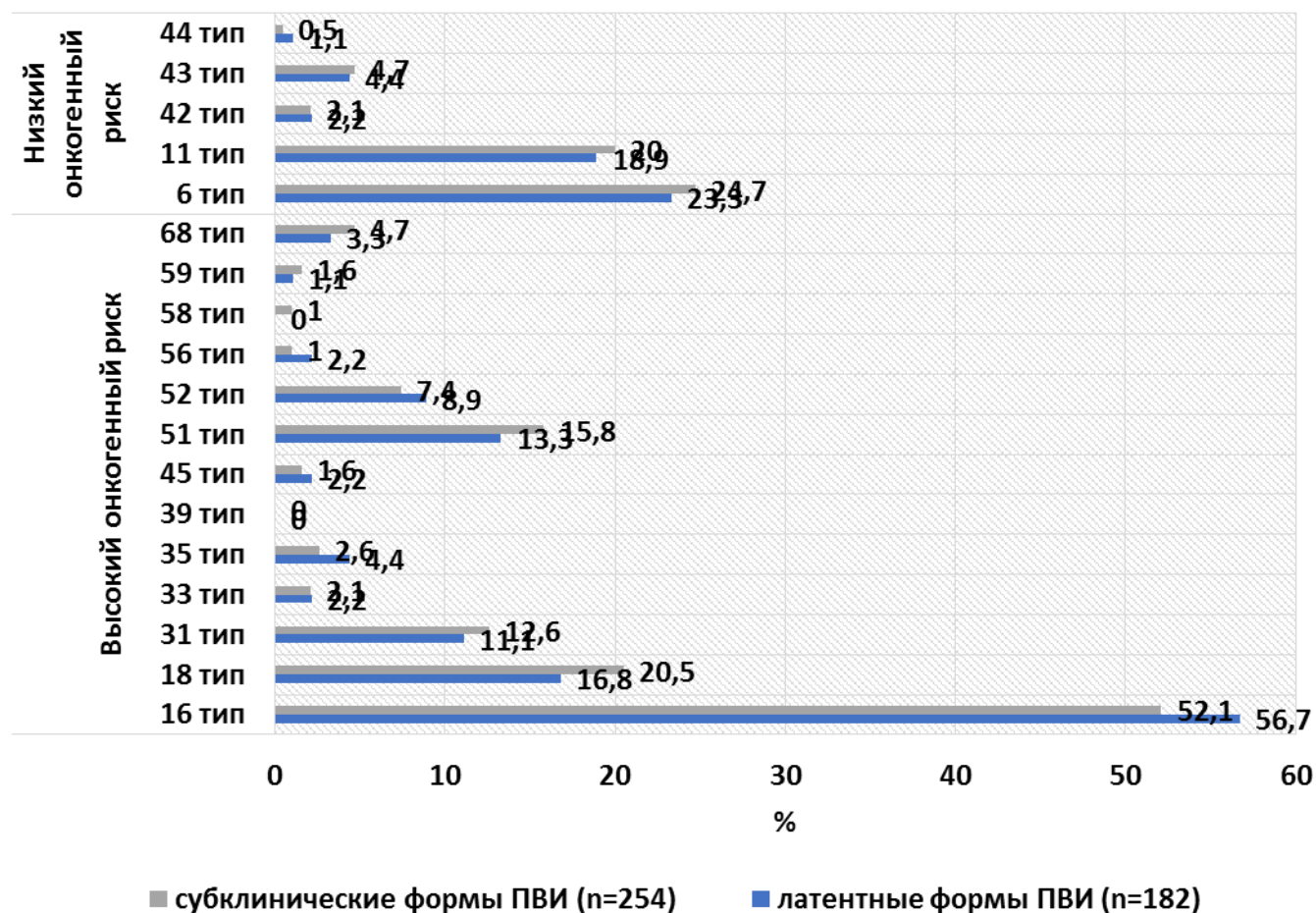


**Рисунок 3.20.** Частота встречаемости ВПЧ различного онкогенного риска

Основными типами вируса папилломы человека как при латентных, так и при субклинических формах папилломавирусной инфекции являлись типы 16



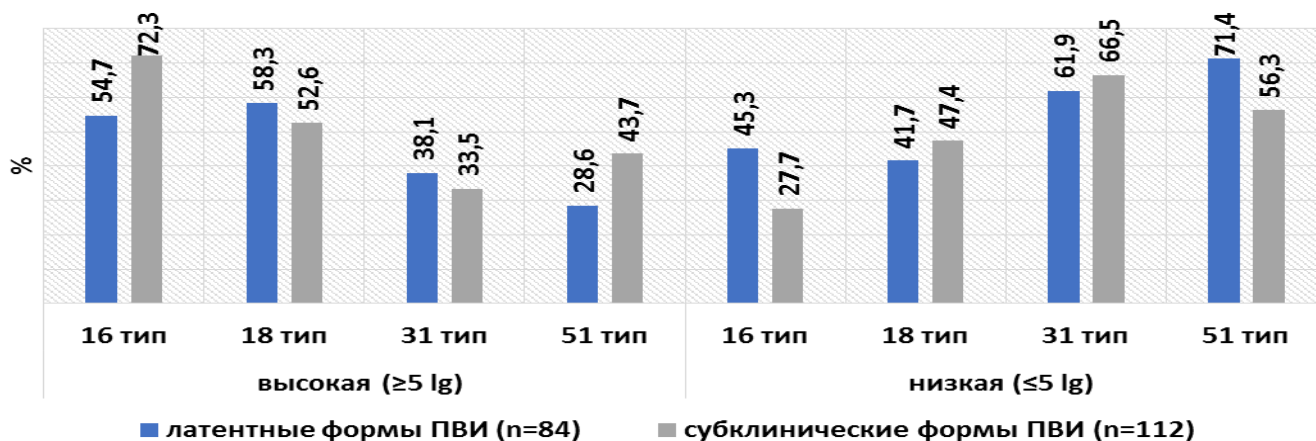
(54,4±3,1%), 18 (18,65±2,4%), 31 (11,85±1,9%) и 51 (14,6±1,4%). Из низкокканцерогенных типов вирусов эпидемиологическое значение имеют также типы - 6 (24,0±1,4%) и 11 (19,45±1,3%) (рис. 3.21). Сочетания нескольких типов ВПЧ зарегистрировано в 27,95±2,2% ПЦР-образцов. Различия между группами по эпидемиологическому преобладанию того или иного типа вируса папилломы человека была недостоверной ( $p>0,05$ ).



**Рисунок 3.21.** Встречаемость различных типов ВПЧ ( Digene-test)

Кроме качественного ВПЧ-типирования изучали количественную вирусную нагрузку основных его высококанцерогенных типов (16, 18 31 и 51 типы ВПЧ в случае их обнаружения). Отобрано в общей сложности 196 пациенток двух групп (84 с латентной формой ПВИ и 112 с субклинической). Высокая вирусная нагрузка для ВПЧ 16 типа установлена в целом у 63,5±11,3% пациенток с латентными и

субклиническими формами ПВИ (латентная 54,7%, субклиническая форма – 72,3%) (рис. 3.22).



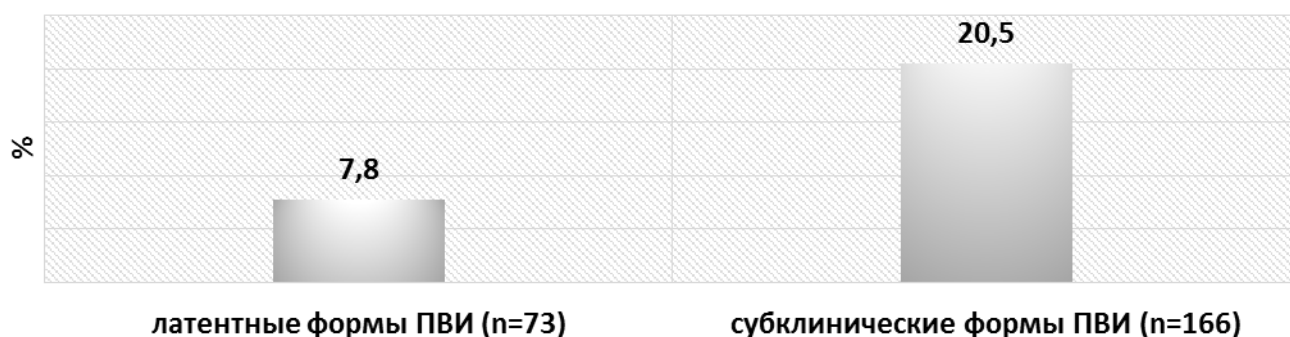
**Рисунок 3.22.** Вирусная нагрузка ВПЧ 16, 18, 13 и 51 типов

Для ВПЧ 18 типа высокая вирусная нагрузка отмечена в  $55,45 \pm 3,4\%$  образцов, без статистически значимой разницы между пациентками с латентными и субклиническими формами ПВИ ( $p > 0,05$ ). Оценка вирусной нагрузки ВПЧ 31 и 51 типов показала следующие результаты: высокая нагрузка ВПЧ была у  $35,8 \pm 3,6\%$  пациенток с выявленным 13 типом ВПЧ (38,1% латентные формы и 33,5% субклинические), для 51 типа высокая нагрузка вирусами была в среднем в  $45,7 \pm 7,6\%$  исследованных образцов со статистически достоверной разницей между группами (латентная форма – 28,6%, субклиническая – 43,7%).

Многочисленными исследованиями доказано, переход латентных и субклинических форм папилломавирусной инфекции в клинически значимую форму неоплазии требует наличия большой концентрации вирусов, то есть высокой вирусной нагрузки, что косвенно подтверждается и в нашем исследовании, при этом, в настоящее время, на фоне преобладания 16 и 18 типов ВПЧ, существенную роль начинают играть другие типы высококанцерогенных вирусов, а именно 31 и 51, что может утяжелить в дальнейшем клиническую картину (особенно при сочетании различных типов ВПЧ) и ускорить неопластические изменения в эпителиальных клетках нижнего отдела гениталий.

### 3.3.3. Определение онкобелка E7, экспрессии p53, bc1-2, c-erb-B2, PCNA, p16ink4D и Ki-67, соотношения метаболитов 2-гидроксиэстрогена и 16- $\alpha$ -гидроксиэстрогена (2-OHE1/16 $\alpha$ -OHE1), рецепции эстрогенов и прогестерона у пациенток с латентными и субклиническими формами папилломавирусной инфекции

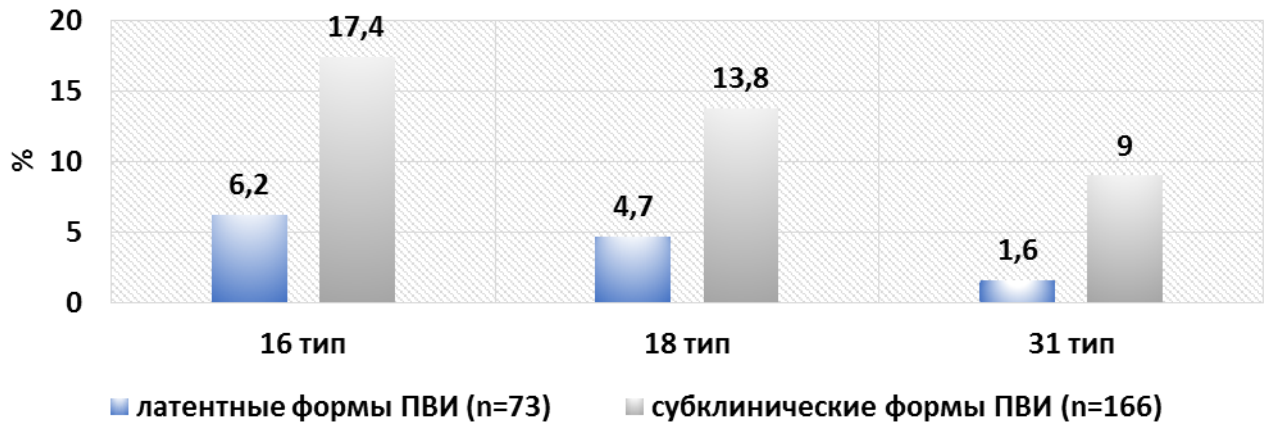
Проводилась детекция мРНК вирусного онкогена E7 16, 18 и 31 типа ВПЧ методом ПЦР с использованием комплектов реагентов («Силекс», Москва). Онкобелок E7 ВПЧ в цервикальном материале выявлялся на стадии репродукции, когда ДНК вируса находится не в свободном (эписомальном) состоянии, а в стадии интеграции, то есть встроена в геном инфицированных клеток. Общее количество пациенток обследованных на онкобелок E7 с данными типами ВПЧ составило в двух группах  $54,8 \pm 12,6\%$  ( $p < 0,005$ ) ( $40,1\%$  ( $73/182$ ) с латентной и  $65,3\%$  ( $166/254$ ) с субклинической формой ПВИ).



**Рисунок 3.23.** Положительный тест на онкобелок E7 16 и 18 типов в группах

Положительный тест зарегистрирован в этих группах в  $14,5 \pm 6,3\%$ , при этом в группе с субклиническими формами ПВИ их было в 2,6 раза больше (рис. 3.23).

Также ПЦР-анализ обнаружения онкобелка E7 с идентифицированными в ходе исследования вирусами типов 16, 18 и 31 отдельно и в сочетании выявил, что при латентных и субклинических формах ПВИ наиболее часто определялся ВПЧ 16 и 18 типов -  $5,45 \pm 0,75\%$  и  $15,8 \pm 1,8\%$  соответственно ( $p = 0,005$ ), то есть онкобелок E7 при субклинических формах ПВИ встречался почти в 3 раза чаще (рис 3.24).



**Рисунок 3.24.** Положительный ПЦР на мРНК онкобелка E7 16, 18 и 31 типов

Регуляторные гены *bc1-2* в настоящее время считаются одними из основных регуляторов механизмов запуска и исполнения программы апоптоза. Одним из механизмов нарушения гибели поврежденных и потенциально опасных для организма клеток являются мутации, происходящие в них. В ряду этих процессов находятся мутации в гене *p53*, препятствующие функционированию кодируемого им белка как индуктора апоптоза и гиперэкспрессия *bc1-2*, тормозящего апоптоз. Проведено иммуногистохимическое изучение экспрессии мутантного *p53* (*p53mut*) *bc1-2* в неизменном цервикальном эпителии латентных носителей папилломавируса (73 образца) и в эпителии с пациенток с субклиническими формами ПВИ (166 образцов). В нормальном цервикальном эпителии *p53mut* не был обнаружен, при субклинических формах ПВИ частота выявления *p53mut* составила  $11,6 \pm 3,8\%$  ( $p < 0,005$ ;  $t = -4,08$ ) (табл. 3.6).

**Таблица 3.6.** Экспрессия *p53mut* при латентных и субклинических формах ПВИ

	экспрессия <i>p53mut</i> (%)		
	позитивные случаи	уровень экспрессии	p
контроль (n=30)	-	-	
латентные формы ПВИ (n=73)	-	-	
субклинические формы ПВИ (n=166)	$11,6 \pm 3,8$	$2,3 \pm 0,9$	0,036

Таким образом, позитивные цифры экспрессии *p53mut* косвенно свидетельствуют о нарушении апоптоза в эпителиальных клетках нижнего отдела

гениталий, которые могут способствовать прогрессированию неопластического процесс и могут рассматриваться, как один из наиболее значимых маркеров прогрессирования ВПЧ-ассоциированной патологии.

Функция bcl-2 в регуляции апоптоза противоположна p53 и связана с торможением его программы. Поэтому определение экспрессии bcl-2 характеризует, с одной стороны, потенциальную способность клеток к апоптозу, и с другой - отражает степень изменения механизмов его развития, связанных с изменением функции гена-супрессора p53 при его повреждениях. Проведенное иммуногистохимическое исследование показало, что абсолютное большинство случаев ( $97,9 \pm 0,9\%$ ) было представлено либо bcl-2-положительными наблюдениями при отсутствии экспрессии p53mut, либо bcl-2-негативные поражения экспрессировали p53mut. Изучение bcl-2 в цервикальном эпителии здоровых женщин и латентных носителей ПВИ показало экспрессию bcl-2 в  $90,0 \pm 9,9\%$  случаев с преимущественной локализацией положительно окрашенных клеток в зоне пролиферации эпителиального пласта - базальной части слизистой (табл. 3.7).

**Таблица 3.7.** Экспрессия bcl-2 при латентных и субклинических формах ПВИ

	экспрессия bcl-2 (%)			p
	положительные случаи	негативные случаи	уровень экспрессии	
контроль (n=30)	$96,8 \pm 2,2$	$3,2 \pm 0,8$	$1,9 \pm 0,2$	
латентные формы ПВИ (n=73)	$94,1 \pm 9,5$	$5,9 \pm 4,5$	$2,1 \pm 0,4$	
субклинические формы ПВИ (n=166)	$87,5 \pm 5,8$	$12,5 \pm 5,8$	$4,5 \pm 0,6$	0,004

В случае субклинических форм ПВИ уровень экспрессии bcl-2 составил  $87,5 \pm 5,8\%$  незначительно отличаясь от контроля и латентных форм, при которых уровень bcl-2-негативных случаев соответствовал минимальным значениям.

В процессы неопластической трансформации клеток участвуют белки регуляции митотического цикла и клеточной дифференцировки, среди которых выделяется протоонкоген c-erb-B2, участвующий в регуляции процессов пролиферации и дифференцировки эпителиальных клеток. Гиперэкспрессия c-erb-B2

связана с активацией механизмов, ускоряющих темпы клеточного роста и придающих клеткам свойство неограниченного деления. В исследуемых группах частота выявления c-erb-B2 не различалась: в неизменном цервикальном эпителии контрольной группы и пациенток с субклиническими формами ПВИ c-erb-B2 экспрессировался  $20,0 \pm 12,6\%$  случаев, при субклинических формах - в  $19,1 \pm 4,1\%$  наблюдений ( $p=0,933$ ;  $t=0,84$ ) (табл. 3.8).

**Таблица 3.8.** Экспрессия c-erb-B2 при латентных и субклинических формах ПВИ

	экспрессия c-erb-B2			
	+	++	+++	частота экспрессии (%)
контроль (n=30)	$9,1 \pm 1,2$	-	-	$9,1 \pm 1,2$
латентные формы ПВИ (n=73)	$17,4 \pm 2,5$	-	-	$17,4 \pm 2,5$
субклинические формы ПВИ (n=166)	$20,1 \pm 2,8$	$2,5 \pm 0,4$	-	$22,6 \pm 3,2$ ; $p=0,006$

При этом, как при латентных, так и при субклинических формах ПВИ иммунное окрашивание на c-erb-B2 отмечалось только в эпителиальных клетках базального слоя с низким уровнем его экспрессии. Изучение прогностической роли c-erb-B2 в течении неопластических процессов рекомендуется проводить с другими молекулярно-биологическими маркерами, такими bc1-2, p53 и p16ink4a.

Пролиферативная активность клеток является важным клинимо-морфологическим параметром неопластических процессов, таким маркером является оценка пролиферативной активности по экспрессии PCNA - ядерного белка делящихся клеток во всех активных фазах митотического цикла.

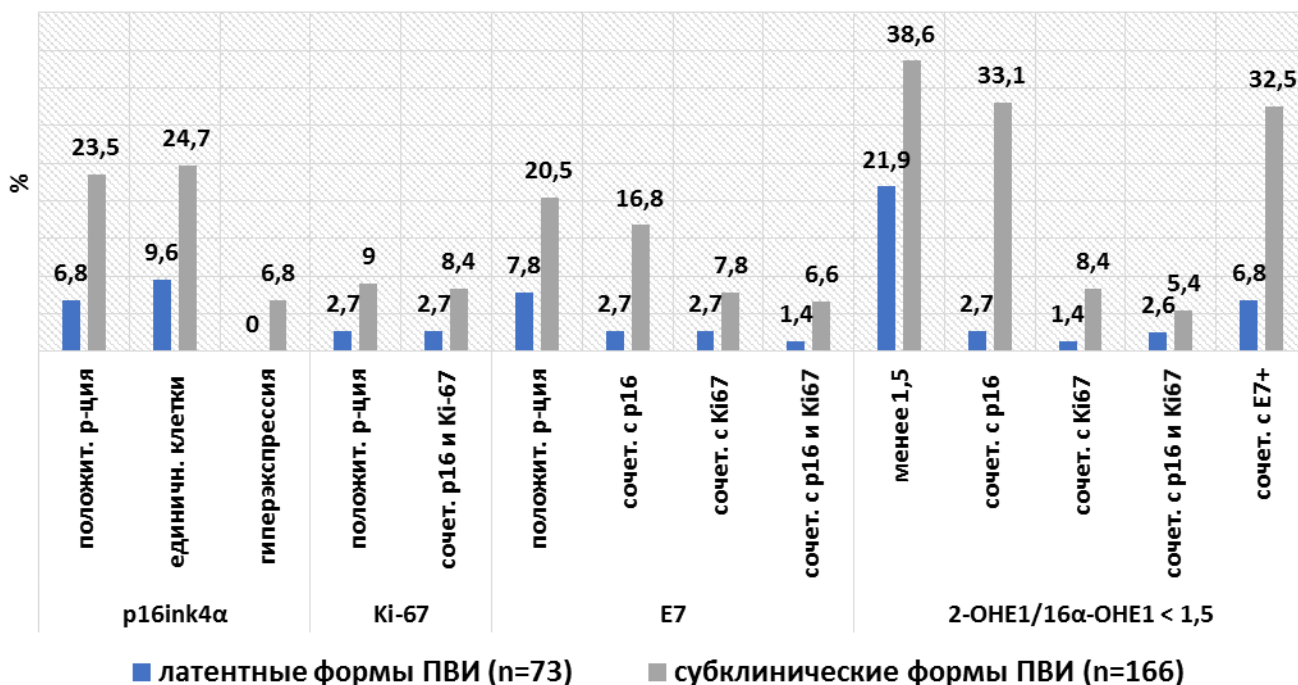
**Таблица 3.9.** Экспрессия PCNA при латентных и субклинических формах ПВИ

	PCNA (%)	p
контроль (n=30)	$3,5 \pm 1,5$	
латентные формы ПВИ (n=73)	$4,2 \pm 2,1$	0,040
субклинические формы ПВИ (n=166)	$6,1 \pm 3,3$	0,048

Исследование экспрессии PCNA в эпителии шейки матки при латентных и субклинических формах ПВИ при показало, что его средний уровень определения составлял  $5,15 \pm 0,95\%$  при отсутствии статистически значимых отличий как между

группами, так и с показателями контрольной, с преимущественным окрашиванием клеток базального и парабазального эпителиальных слоев (табл. 3.9).

Цитологические образцы для иммуноцитохимического исследования на наличие экспрессии p16ink4 $\alpha$  и Ki-67 также брались при проведении кольпоскопии, при позитивной реакции образца оценивалась количественная составляющая экспрессии (диффузная и фокальная) в виде единичных клеток и их гиперэкспрессии, также оценивалась коэкспрессия p16ink4 $\alpha$  и Ki-67 (рис. 3.25).



**Рисунок 3.25.** Сравнительная характеристика частоты выявления p16ink4 $\alpha$ , Ki67 и E7 в группах

Всего позитивных p16ink4 $\alpha$  пациенток исследуемых групп выявлено 15,5 $\pm$ 8,3% (6,8% пациенток с латентными и 23,5% субклиническими формами ПВИ – в 3,4 раза больше) ( $p=0,0005$ ). При латентных формах ПВИ случаев гиперэкспрессии p16ink4 $\alpha$  не наблюдалось, при субклинических формах ПВИ их зарегистрировано 6,8%, что прогностически неблагоприятно в плане прогрессирования неопластических процессов. При детекции экспрессии Ki-67 обращает внимание на его трехкратное преобладание в группе пациенток с

субклиническими формами ПВИ (9,0% против 2,7% латентных форм), но при этом у всех пациенток Ki-67 исследуемых групп детектировался менее чем в 10% клеток. Коэкспрессия биомаркеров p16ink4D и Ki-67 также преобладала при субклинических формах ПВИ с таким же результатом ( $p=0,005$ ). Корреляционный анализ по Спирмену установил прямую слабой силы связь между субклиническими формами ПВИ, p16 и Ki-67 ( $r_s=+0,41$ ;  $p<0,005$ ).

У пациенток с положительным тестом на онкобелок E7 данные также были схожими: экспрессия p16 заметно (в 6 раз) преобладала группе пациенток с субклиническими формами ПВИ – 16,8% относительно латентных форм – 2,7% ( $p=0,001$ ). Это касается и экспрессии Ki-67 – преобладание при субклинических формах составило 7,8% (в 2,9 раз по сравнению с латентными формами) ( $p=0,005$ ). Оценка совместной экспрессии маркеров p16ink4D и Ki-67 у E7-позитивных женщин установила аналогичные статистически значимые изменения ( $p=0,005$ ). Полученные данные свидетельствуют, что детекция онкомаркера p16 и маркера пролиферации Ki-67 при папилломавирусной инфекции зависит от начала реализации неопластических процессов в эпителиальных клетках вульвовагинальной и цервикальной зоны, что является важным фактором в понимании патогенеза этой патологии.

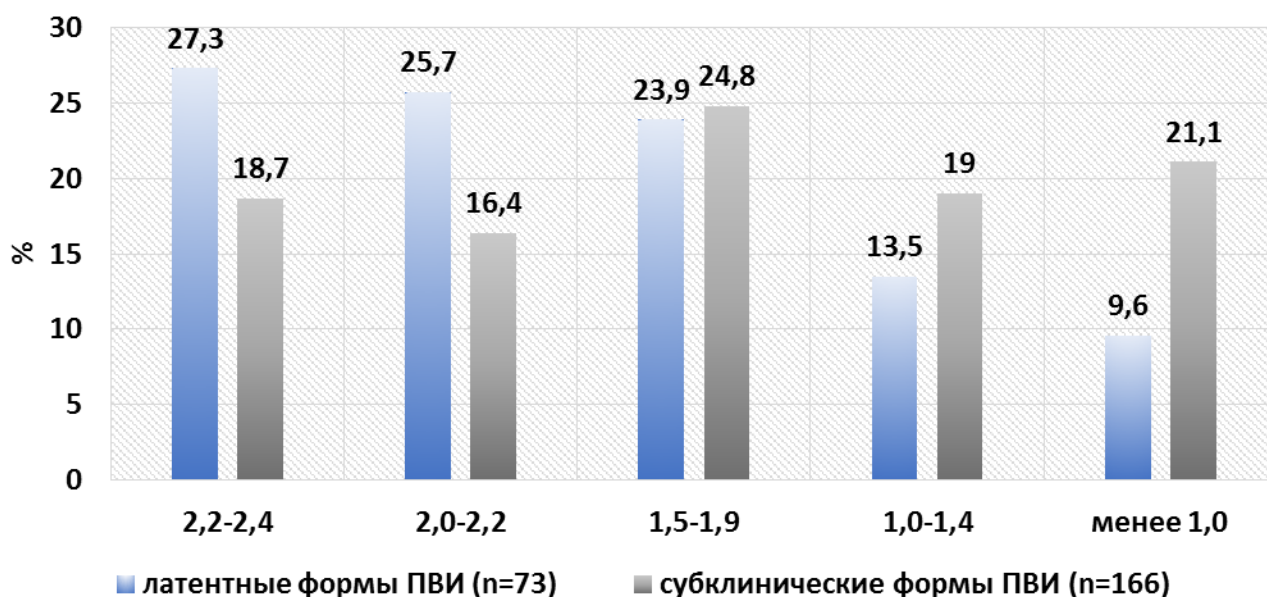
Наряду с вышеперечисленными данными об изменении экспрессии и гиперэкспрессии онкобелков E7 и p16ink4 $\alpha$ , а также фиксации маркера пролиферации Ki-67, одним из фактов неблагоприятного влияния ВПЧ-инфекции на эпителий нижнего отдела гениталий считается девиация обмена метаболитов эстрогенов 2-OHE1 и 16 $\alpha$ -OHE1. Анализ их соотношения у пациенток с выявленными вирусами типов 16, 18 и 31 отдельно и в сочетании ( $n=249$ ) показал, что только у 56,1% латентных ВПЧ-носителей и у 30,7% пациенток с субклиническими формами ПВИ ( $44,3\pm 12,7\%$ ;  $p<0,005$ ) (табл. 3.10, рис. 3.26). У 21,1% (35/166) пациенток с субклиническими формами ПВИ баланс метаболитов эстрогена оказался измененным, с превышением уровня 16 $\alpha$ -OHE1 над 2-OHE1



(среднее значение соотношения метаболитов 2-ОНЕ1/16 $\alpha$ ОНЕ в данной группе составило 1,25 $\pm$ 0,08). Средний коэффициент 2-ОНЕ1/16 $\alpha$ -ОНЕ1 у женщин с латентной ВПЧ-инфекцией был 1,89 $\pm$ 0,04 (отличия от здоровых статистически значимы -  $p < 0,05$ ), а превышение уровня 16 $\alpha$ -ОНЕ1 над 2-ОНЕ1 зарегистрировано в 9,6% (7/73) случаев (в 2,2 раза меньше, чем при субклинических формах ПВИ).

**Таблица 3.10.** Показатели уровня метаболитов эстрогенов и соотношение их коэффициента в исследуемых группах ( $X \pm m$ )

	латентные формы ПВИ (n=73)	субклинические формы (n=166)
2-ОНЕ1 (нг/мл)	10,17 $\pm$ 1,12	8,65 $\pm$ 1,04
16 $\alpha$ ОНЕ1 (нг/мл)	5,44 $\pm$ 0,11	6,92 $\pm$ 1,15
2-ОНЕ1/16 $\alpha$ ОНЕ1	1,89 $\pm$ 0,04	1,25 $\pm$ 0,08

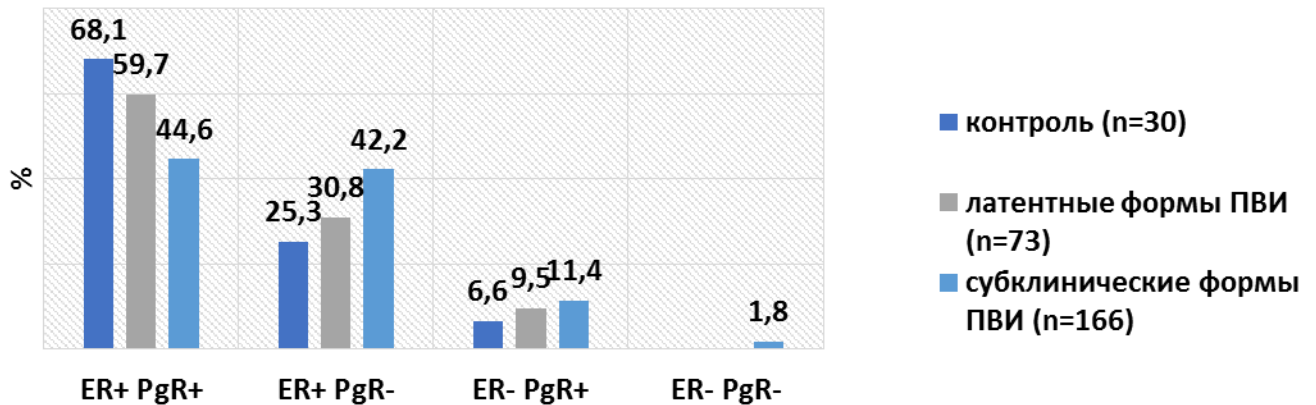


**Рисунок 3.26.** Коэффициент 2-ОНЕ1/16 $\alpha$ -ОНЕ1 в исследуемых группах

Корреляционный анализ по Спирмену установил прямую средней силы связь между снижением коэффициента 2-ОНЕ1/16 $\alpha$ -ОНЕ1 менее 1,5 и переходом латентных форм ПВИ в субклинические ( $r_s = +0,28$ ;  $p < 0,005$ ). При этом обращает на себя внимание, что наибольшее количество нарушений соотношения метаболитов эстрогенов (2-ОНЕ1/16 $\alpha$ -ОНЕ1  $\leq 1,5$ ) определялось у женщин с высоким индексом массы тела (ИМТ более 30) и наличием признаков метаболического синдрома (в

группе женщин с латентной формой ПВИ их было 41,3%, с субклинической – 58,1%).

Иммуногистохимический анализ рецепторного статуса сочетания эстрогенов и прогестерона пациенток с латентными и субклиническими формами ПВИ в цервикальном эпителии с распределением всех случаев на рецепторположительных (ER+PgR+), с экспрессией одного из рецепторов ER или PgR и рецепторнегативных (ER-PgR-) показал, что частоту выявления рецепторов этих стероидных гормонов в группах (рис. 3.27). Рецепторы половых стероидов в эпителии нижнего отдела гениталий выявлялись во всех образцах контрольной группы и у пациенток с латентными формами ПВИ.



**Рисунок 3.27.** Частота выявления рецепторов эстрогенов и прогестерона в исследуемых группах

При этом частота выявления сочетанной экспрессии обоих рецепторов в латентной группе составила  $59,7 \pm 6,9\%$ , ER+ детекция - в  $30,8 \pm 8,3\%$  и PgR+ - в  $11,4 \pm 3,5\%$  наблюдений. При субклинических формах ПВИ экспрессия рецепторов эстрогенов и прогестерона отмечалась в  $90,2 \pm 5,9\%$  случаев со статистически незначимым количеством рецепторнегативных образцов ( $1,8 \pm 0,6\%$ ). Случаев положительной реакции на оба рецептора составляло  $44,6 \pm 5,4\%$  ( $p=0,261$ ;  $t=1,04$ ) при этом частота выявления ER+ и PgR+ была статистически незначима как по сравнению с контролем, так и группой пациенток с латентными формами ПВИ ( $p>0,05$ ).

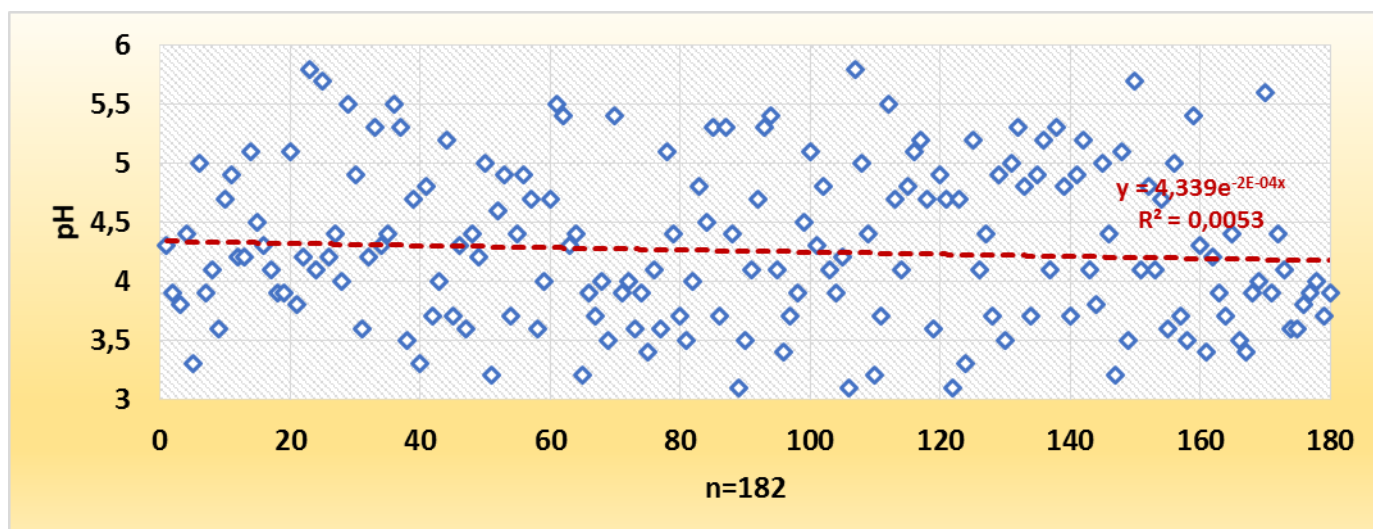
Таким образом, комплексный анализ экспрессии онкобелков E7, p53mut, bc1-2, c-erb-B2, PCNA, p16ink4D и Ki-67, соотношения метаболитов 2-гидроксиэстрогена и 16- $\alpha$ -гидроксиэстрогена с рецепцией эстрогенов и прогестерона у пациенток с латентными и субклиническими формами папилломавирусной инфекции позволит более точно, как диагностировать форму ПВИ, так и определить прогноз развития неопластического процесса, и, соответственно, дифференцировать терапевтические мероприятия. А, учитывая выявленные сочетания изменений экспрессии вышеперечисленных онкогенов, метаболитами эстрогенов и рецепторов половых гормонов существует возможность определять селективные свойства трансформированных эпителиальных клеток цервикального эпителия, детерминируя варианты клинического развития этих поражений.

### **3.3.4. Микробиологический анализ латентных и субклинических форм папилломавирусной инфекции**

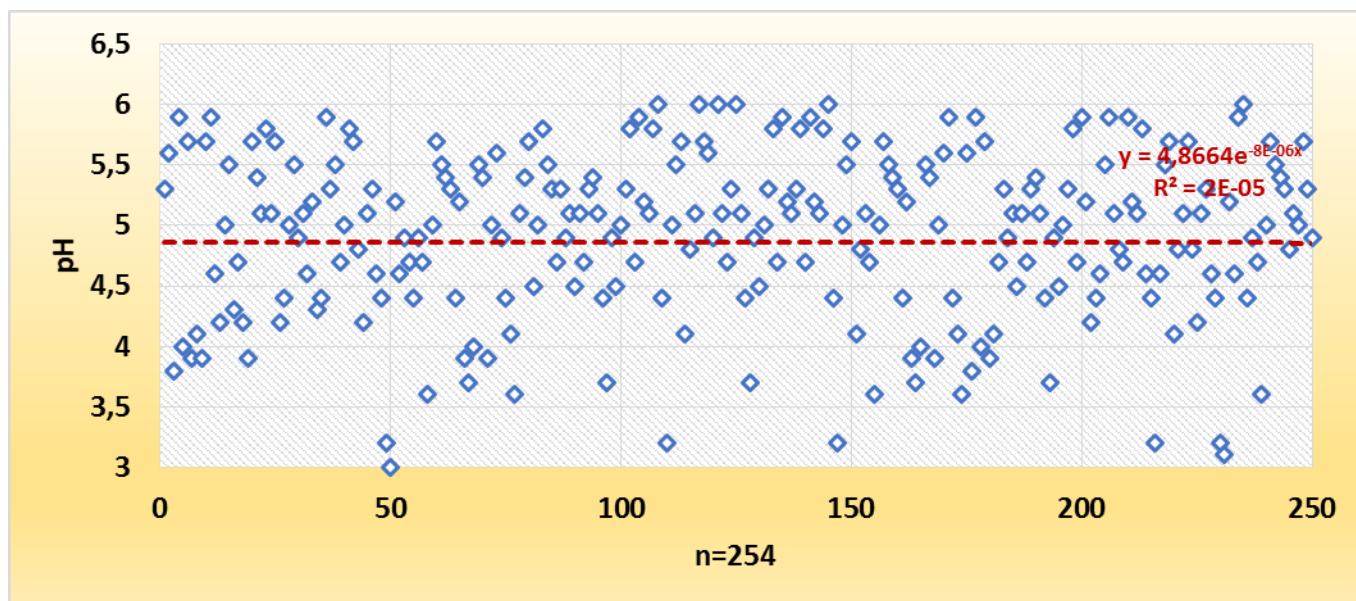
Учитывая, что, как в группах женщин с латентными и субклиническими формами папилломавирусной инфекции процент воспалительных заболеваний женских половых органов превышал среднепопуляционный и достигал почти  $85,1 \pm 13,4\%$  (для вульвовагинитов и цервицитов) (разница между группами недостоверна -  $p > 0,05$ ), был проведен эпидемиологический анализ заболеваемости сопутствующими урогенитальными инфекциями, что в дальнейшем определило необходимость проведения санации урогенитального тракта до проведения специфической профилактической терапии..

#### *pH-метрия отделяемого влагалища*

Для первичного выявления дисбиотических вагинальных изменений использовался экспресс тест FemExam (исследование на триметиламин и pH-метрия) с возможностью определения pH в диапазоне от 3,0 до 7,0 (норма 3,8–4,4). Среднее значение влагалищной pH при латентных формах ПВИ было на уровне  $4,3 \pm 1,7$ , а при субклинических формах повышалось до патологических значений -  $4,9 \pm 3,1$  ( $p < 0,05$ ) (рис. 3.28-3.29).



**Рисунок 3.28.** pH вагинального секрета пациенток с латентными формами ПВИ (линия тренда  $4,3 \pm 1,7$ )



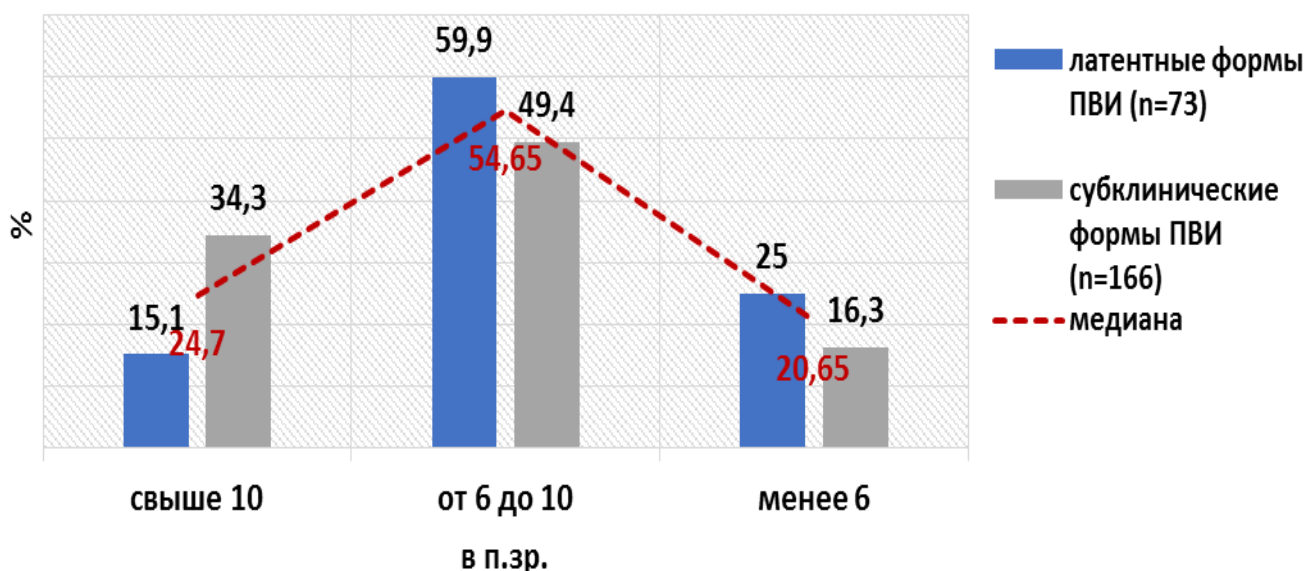
**Рисунок 3.29.** pH вагинального секрета пациенток с субклиническими формами ПВИ (линия тренда  $4,9 \pm 3,1$ )

При этом положительные аминотесты определены у 51/182 (28,0%) пациенток с латентными и 93/254 (36,6%) с субклиническими формами ПВИ – в 1,3 раза чаще (среднее –  $32,3 \pm 4,3\%$ ;  $p < 0,05$ ).

Данное исследование косвенно подчеркивает, что наличие признаков вагинального дисбиоза создаёт условия для прогрессирования ВПЧ-ассоциированных неопластических процессов в нижнем отделе гениталий.

### Исследование влагалищных мазков

Общая микроскопическая картина влагалищного мазка в целом соответствовала количеству лейкоцитов и характеристике микрофлоры. Выявлены статистически достоверные отличия между латентными и субклиническими формами ПВИ в патологическом количестве лейкоцитов (более 10 в поле зрения), которые при латентном ВПЧ-носительстве наблюдались в 2,3 раза реже, чем при субклинической форме ПВИ (среднее  $24,7 \pm 9,6\%$ ;  $p < 0,005$ ) (рис. 3.30).



**Рисунок 3.30.** Лейкоцитарная реакция вагинального содержимого пациенток с латентными и субклиническими формами ПВИ

Для оценки клеточного состава вагинальной жидкости использовались следующие показатели: количество лейкоцитов (КЛ), количество эпителиальных клеток (КЭК), сумма клеток (СК), цитологический коэффициент ( $ЦК = КЛ/КЭК$ ). Среднее количество лейкоцитов в группе контроля составило  $3,9 \pm 1,3$ , количество эпителиальных клеток -  $3,6 \pm 1,5$ , сумма клеток -  $7,5 \pm 1,8$ , соответственно цитологический коэффициент был  $1,1 \pm 0,1$  (табл. 3.11). При латентных формах ПВИ клеточный состав несколько менялся: увеличилось КЛ и КЭК соответственно до  $9,1 \pm 2,7$  и  $8,3 \pm 2,1$ , соответственно возросла СК -  $17,4 \pm 2,3$ , при этом ЦК остался прежним.

**Таблица 3.11.** Клеточный состав вагинальной жидкости в исследуемых группах

<b>клеточный состав вагинальной жидкости</b>	контроль (n=30)	латентные формы ПВИ (n=182)	субклинические формы ПВИ (n=254)	<b>p</b>
количество лейкоцитов (КЛ)	3,9±1,3	9,1±2,7	12,1±4,8	<0,05
количество эпителиальных клеток (КЭК)	3,6±1,5	8,3±2,1	14,4±2,7	<0,05
сумма клеток (СК)	7,5±1,8	17,4±2,3	26,5±4,9	<0,05
цитологический коэффициент (ЦК)	1,1±0,1	1,1±0,2	0,8±0,1	<0,05

У пациенток с субклинической формой ПВИ выявлено достоверное ( $p>0,05$ ) увеличение данных параметров по сравнению как с показателями контроля, так и с латентными формами: КЛ – 12,1±4,8, КЭК – 14,4±2,7, СК – 26,5±4,9, ЦК при это снижался до 0,8±0,1 (преобладание эпителиальных клеток в вагинальной жидкости).

Среднее количество нормальных вагинальных мазков в двух группах определялось в 17,8±6,4% ( $p>0,05$ ), при этом при субклинических формах ПВИ таких мазков было в 2,1 раза меньше (11,4% против 24,2%) (табл. 3.12). Оценка признаков вагинального дисбиоза (критерии Nay/Ison) при латентных формах показало 2 (промежуточную) степень у 21,4%, 3 степень (бактериальный вагиноз) у 31,9% и 4 (анаэробный вагиноз) у 22,5% женщин.

**Таблица 3.12.** Микробиом влагалища (критерии Nay/Ison) в группах

	латентные формы ПВИ (n=182)		субклинические формы ПВИ (n=254)		$\chi^2$	<b>p</b>
	<b>n</b>	<b>%</b>	<b>n</b>	<b>%</b>		
критерии Nay/Ison						
степень 1 (норма)	44	24,2	29	11,4	10,24	0,318
степень 2 (промежуточная)	39	21,4	66	26,0	9,61	0,264
степень 3 (баквагиноз)	58	31,9	107	42,1	14,18	0,213
степень 4 (аэробный вагиноз)	41	22,5	52	20,5	9,25	0,301

Вагинальный нормоценоз обычно характеризуется преобладанием палочковидных бактерий, а дисбиотические перверсии связывают с преобладанием

кокковых форм. При проведении нашего обследования в контрольной группе соотношение кокковых и палочковидных форм бактерий составило 1:4,2, в группе пациенток с латентными формами ПВИ – 1:3,3, а с субклиническими - 1:2,6 (снижение количества палочковой микрофлоры с активацией бациллярных бактерий).

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 субклиническими формами ПВИ (преобладание вариантов с промежуточными типами микроценоза – в среднем 26,0% и бактериального вагиноза – 42,1%) относительно как уровня контроля, так и латентных форм.

#### *Микробиоценоз влагалища (ПЦР-РВ)*

В нашем исследовании использовалась новая ПЦР-система, работающая в режиме «реального времени» - «АмплиПрайм® Флороценоз-Бактериальный вагиноз» (РФ) для определения *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Lactobacillus spp.* и общего количества бактерий (*Bacteria*), на основании полученных значений, с целью интерпретации результатов данного исследования, рассчитывались коэффициенты соотношений (КС1, КС2 и КС3) (см. «Материалы и методы исследования»). Интерпретация результатов ПЦР-РВ-системы «АмплиПрайм® Флороценоз-Бактериальный вагиноз» показало, что КС1 в среднем в двух группах был  $0,73 \pm 0,3$  (латентные формы ПВИ – 1,0, субклинические – 0,47) (КС1 < 0,5 - баквагиноз); КС2 –  $1,25 \pm 0,55$  (латентные формы ПВИ – 0,7, субклинические – 1,8), а КС3 –  $0,77 \pm 0,07$  (латентные формы ПВИ – 0,7, субклинические – 0,85) (дисбиоз неуточненной этиологии) ( $p > 0,05$ ) (табл. 3.13). Данный анализ состояния микробиоценоза влагалища выявил, что у пациенток с латентной формой ПВИ количество вагинальных нормоценозов было в 2,4 раза выше, чем с субклиническими (58,8% против 24,0% соответственно).

**Таблица 3.13.** Микробиоценоз влагалища у женщин исследуемых групп («АмплиПрайм® Флороценоз-Бактериальный вагиноз») (lg; ГЭ/мл)

	<i>Lactobacillus spp.</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Atopobium vag.</i>	<i>Bacteria</i>
латентные формы ПВИ (n=182)	6,4±1,2	2,6±0,9	3,5±3,6	4,3±2,1
субклинические формы ПВИ (n=254)	4,9±1,4	4,9±2,4	5,6±2,1	8,9±1,4

Также обращает на себя внимание высокое количество в группах детектируемых вирусов простого герпеса I и II типов и цитомегаловирусов - в сумме 68,1±6,9% у латентных носителей ПВИ и в 88,6±9,4% при субклинических формах. При этом корреляционный анализ Спирмена не установил достоверной связи между группами (p>0,05).

Таким образом, по результатам ПЦР-РВ микробиоценоза влагалища можно констатировать, что в большинстве случаев для реализации папилломавирусной инфекции необходима компрометация организма в виде нарушений вагинального микробиоценоза, которые являются кофакторами развития неопластических процессов в эпителии нижнего отдела гениталий.

### **3.3.6. Биохимический анализ вагинальной жидкости у пациенток с латентными и субклиническими формами папилломавирусной инфекции**

При анализе биохимических свойств получены следующие результаты (табл. 3.14, рис. 3.31). Общая масса содержимого влагалища была в среднем 1,99±0,6 г/сут (1,84±0,18 г/сут латентные, 2,14±0,13% субклинические формы ПВИ) (корреляционный анализ Спирмена не установил достоверных связей между группами - p0,05). Также зарегистрировано достоверное (p<0,01) снижение уровня перекиси водорода и молочной кислоты у пациенток с субклиническими формами ПВИ (в среднем на 39,5±5,5% и 17,0±1,5% соответственно), что, скорее всего связано с изменениями биоценоза влагалища, когда титр лактобактерий, обеспечивающих образование >H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и молочной кислоты, снижается, что, в свою

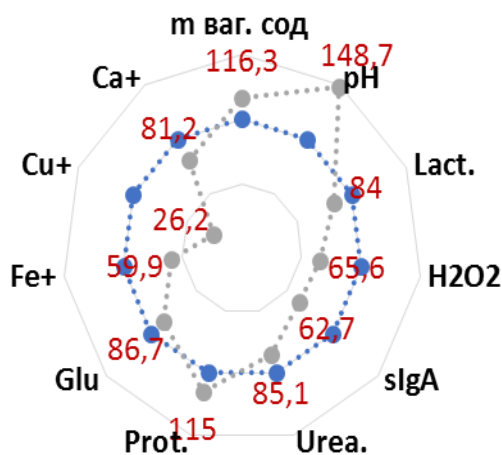


очередь, препятствует благоприятному росту лактобактерий, а, напротив, приемлемо для роста условно-патогенной и патогенной микрофлоры.

**Таблица 3.14.** Биохимические показатели влагалищной жидкости

	латентные формы ПВИ (n=182)	субклинические формы ПВИ (n=254)
Масса содержимого влагалища (г/сутки)	1,84±0,18**	2,14±0,13**
pH (ед.)	3,9±0,2*	4,8±0,2*
Аминовый тест (ед.)	0,35±0,07	1,94±0,13**
Перекись водорода (мкмоль/л)	256,1±16,1	168,1±12,1**
Молочная кислота (мкмоль/л)	5,0±0,13**	4,2±0,13**
sIgA (нг/мл)	39,7±8,2*	24,9±9,4*
Мочевина (ммоль/л)	18,94±2,14	16,11±1,44*
Общий белок (г/л)	1,73±0,1	2,41±0,11*
Глюкоза (моль/л)	3,16±0,18*	2,74±0,32*
Железо (мкмоль/л)	294,12±22,14*	176,43±38,40**
Медь (мкмоль/л)	19,15±4,03	5,02±0,93**
Кальций (ммоль/л)	7,93±0,22*	6,44±0,17*
Калий (ммоль/л)	28,6±2,02	29,32±2,16
Натрий (ммоль/л)	99,3±4,2	98,0±3,8

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



●●● латентные формы ПВИ (n=73)    ●●● субклинические формы ПВИ (n=166)

**Рисунок 3.31.** Биохимический состав влагалищной жидкости в исследуемых группах (% от латентных форм ПВИ)

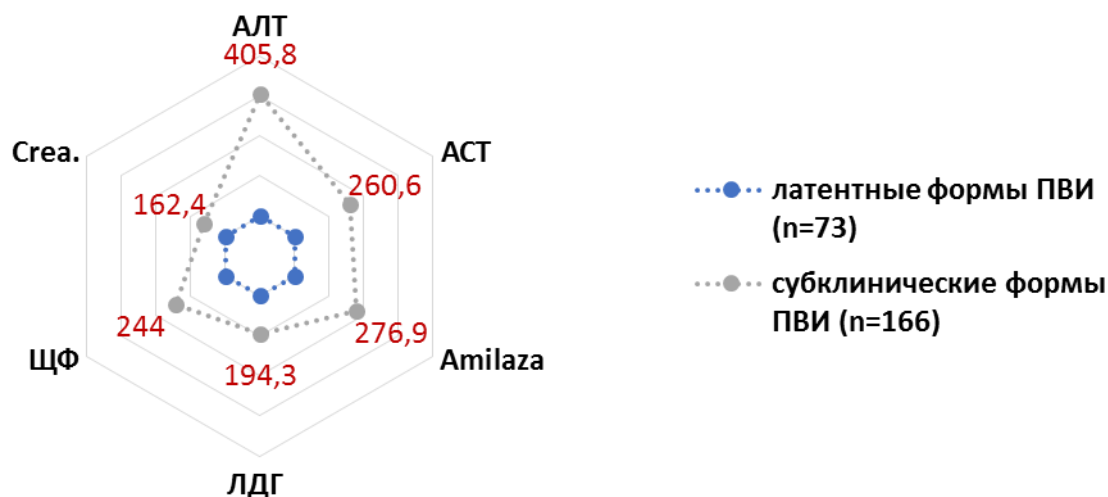
У пациенток с субклиническими формами ПВИ выявлено статистически значимое снижение уровня глюкозы (на 13,3% по сравнению с латентными формами

ПВИ), железа и меди (на 40,1% и 73,8% соответственно) ( $p < 0,01$ ). Снижение уровня глюкозы, как маркера содержания гликогена в поверхностном клеточном слое эпителия влагалища, отражает большинство биохимических изменений при вагинальных дисбиотических процессах. Железо и медь необходимы большинству бактерий, особенно анаэробным, для роста, а конкурентные взаимоотношения между бактериями за них могут играть роль в развитии дисбиотических процессов во влагалище. При исследовании уровня активности ферментов вагинальной жидкости, у пациенток с латентными и субклиническими формами ПВИ выявлено значимое повышение активности внутриклеточных ферментов у последних - АЛТ в 4,1 раза, АСТ в 2,6 раза и амилазы в 2,8 раза (табл. 3.15, рис. 3.32).

**Таблица 3.15.** Уровень активности ферментов влагалищной жидкости

фермент	латентные формы ПВИ (n=182)	субклинические формы ПВИ (n=254)
АЛТ (Ед/л)	5,18±1,18	21,12±3,59**
АСТ (Ед/л)	82,51±19,16	215,16±19,83**
Амилаза (Ед/л)	56,18±13,18	155,59±44,12**
ЛДГ (Ед/л)	212,48±14,22**	412,88±30,86**
Щелочная фосфатаза (Ед/л)	124,19±23,80	303,15±32,12**
Креатинкиназа (Ед/л)	29,54±7,16	47,93±9,04*

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



**Рисунок 3.32.** Активность ферментов вагинальной жидкости в исследуемых группах (% от латентных форм ПВИ)

Это может свидетельствовать об активации цитолитических процессов, которые могут быть связаны с одной стороны с воздействием на клетки продуктов жизнедеятельности условно-патогенных микроорганизмов, с другой - с усилением неопластических процессов в эпителии влагалища и шейки матки. Таким образом, анализ биохимического состава вагинальной жидкости выявил достоверные изменения, происходящие при первичных признаках неопластических изменений эпителия нижнего отдела гениталий, 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 местного иммунитета при латентных и субклинических формах папилломавирусной инфекции**

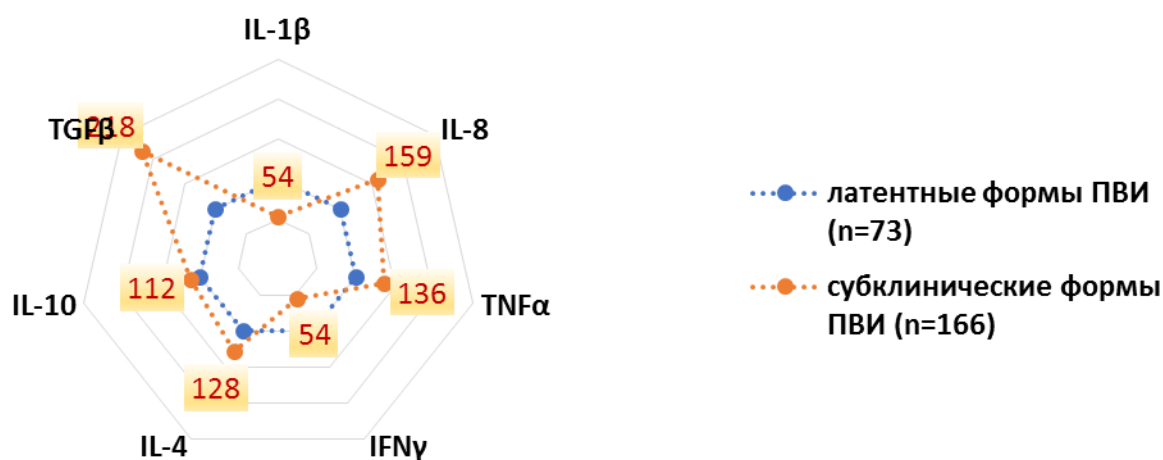
#### **Активность цитокинов цервика-вагинальной зоны**

Наиболее репрезентативное суждение о вероятных механизмах иммунопатогенеза инфекционного процесса можно составить, исследуя локальный цитокиновый спектр (про-, противовоспалительные и регуляторные цитокины). Был проведен анализ цитокинового статуса цервика-вагинальной зоны у пациенток с латентными и субклиническими формами ПВИ. Обнаружено, что концентрация основного макрофагального цитокина IL-1 $\beta$  в цервикальной слизи женщин с субклиническими формами ПВИ была в среднем в 2 раза ниже, чем латентными, но эта разница из-за высокого коэффициента вариации не была достоверной ( $p > 0,05$ ) (табл. 3.16; рис. 3.33). Концентрация IL-8, как и TNF $\alpha$  у с пациенток субклиническими формами ПВИ также имела тенденцию к повышению ( $P > 0,05$ ), а концентрация IFN $\gamma$  была в 2 раза ниже, чем в группе пациенток с латентными формами ПВИ ( $p < 0,05$ ). При этом концентрация IL-4 у женщин с субклиническими формами ПВИ в 1,5 раза (недостоверно) превышала данный показатель латентных форм ( $p > 0,5$ ). Концентрация IL-10 в цервикальной слизи

пациенток с субклиническими формами ПВИ характеризовалась высокой вариабельностью значений, что (коэффициенты вариации достигали 40%).

**Таблица 3.16.** Содержание цитокинов в цервикальной слизи (пг/мл)

	IL-1 $\beta$	TNF $\alpha$	TGF $\beta$	p
контроль ( n=30)	86,3 $\pm$ 7,9	54,9 $\pm$ 2,4	61,7 $\pm$ 6,3	
латентные формы ПВИ (n=182)	49,5 $\pm$ 5,1	37,2 $\pm$ 1,8	59,9 $\pm$ 5,9	0,048
субклинические формы ПВИ (n=254)	26,3 $\pm$ 6,0	64,4 $\pm$ 7,2	141,9 $\pm$ 18,2	0,027



**Рисунок 3.33.** Концентрация цитокинов в цервику-вагинальной зоны (% от латентных форм ПВИ)

В то же время, стимулирующий преимущественно гуморальное звено иммунитета TGF $\beta$  у пациенток с латентными формами ПВИ не отличался от параметров контроля, а при субклинических формах более чем в два раза превышал свои значения как по показателям здоровых неинфицированных женщин, так и латентных форм (p=0,133). Причем наиболее высокий уровень TGF $\beta$  определялся у пациенток с наличием высококанцерогенных типов ВПЧ.

Таким образом, обнаруженные нами закономерности содержания цитокинов в цервикувагинальном секрете могут быть использованы для оценки течения воспалительных и иммунных реакций при ВПЧ-инфицировании слизистых нижнего

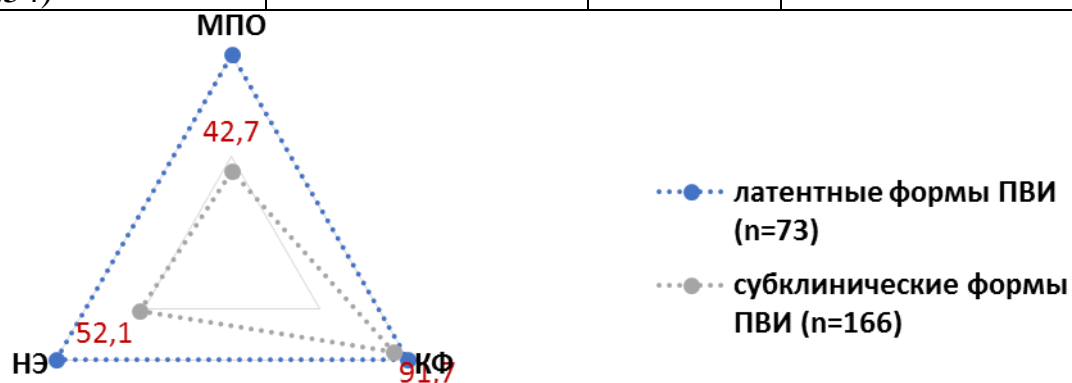
отдела гениталий, а, учитывая выявленную корреляцию между начальными проявлениями неопластического процесса и TGF $\beta$ , возможно его применение с целью определения прогностической значимости утяжеления процесса.

### Активность ферментов макрофагов цервико-вагинальной зоны

Миелопероксидаза (МПО) в присутствии перекиси водорода и окисляемого кофактора действует против различных микроорганизмов и, совместно перекисью водорода и окисляемого кофактора образуют в фагоцитах мощную бактерицидную систему с йодированием микроорганизмов, переокислительном дезаминировании и декарбоксилировании.

**Таблица 3.17.** Активность ферментов (СЦП) макрофагов цервико-вагинальной зоны

	миелопероксидаза	кислая фосфатаза	неспецифическая эстераза
контроль (n=30)	141,1 $\pm$ 10,3	126,4 $\pm$ 7,2	81,2 $\pm$ 6,8
латентные формы ПВИ (n=182)	158,4 $\pm$ 12,7	139,2 $\pm$ 9,1	85,6 $\pm$ 7,4
субклинические формы ПВИ (n=254)	67,6 $\pm$ 5,2	127,6 $\pm$ 8,6	44,6 $\pm$ 5,0



**Рисунок 3.34.** Активность ферментов макрофагов цервико-вагинальной зоны (% от латентных форм ПВИ)

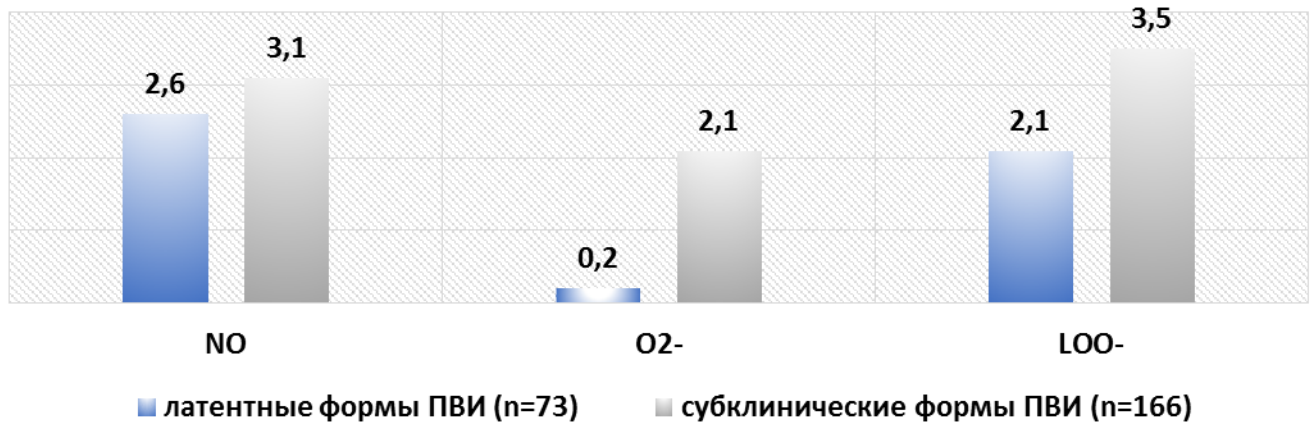
По количеству пероксидазоположительных макрофагов и содержанию в них активного фермента можно судить о потенциальной защитной активности слизистой, в том числе и при воспалении, вызванном инвазией папилломавирусов. Активность МПО у пациенток с субклиническими формами ПВИ была более чем на

треть ( $p < 0,05$ ) ниже таковой определенной у пациенток с латентными (табл. 3.17; рис. 3.34). Активность кислой фосфатазы (КФ), коррелирующая с бактерицидной функцией макрофагов, у пациенток как с латентными, так и с субклиническими формами ПВИ практически не отличалась от соответствующего параметра контроля, тогда как выявляемая активность неспецифической эстеразы (НЭ), коррелирующая с субактивационными характеристиками макрофагов, у женщин с субклиническими формами ПВИ, находилась на статистически значимо более низком уровне ( $p < 0,05$ ).

### **3.3.8. Окислительные процессы в слизистых влагалища и шейки матки при латентных и субклинических формах папилломавирусной инфекции**

Состояние окислительных процессов в слизистых влагалища и шейки матки на фоне латентных и субклинических форм папилломавирусной инфекции оценивали с использованием метода электронного парамагнитного резонанса (ЭПР). 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 субклинических формах ПВИ интенсивность ЭПР сигнала спинмеченных пероксидрадикалов ( $LOO^-$ ) увеличивается в среднем в 1,5 раза (119%) по сравнению с латентными формами ( $p < 0,05$ ), также регистрируются сигналы супероксидрадикалов ( $O_2^-$ ), которые при латентных формах практически не регистрируются. Увеличение интенсивности сигнала ЭПР оксида азота (NO) также возрастает почти в 2 раза (167%) (рис. 3.35).



**Рисунок 3.35.** Содержание свободного оксида азота (NO), реактивных форм кислорода ( $O^{2-}$ ) и липидов ( $LOO^-$ ) в слизистой цервико-вагинальной зоны

Таким образом, можно заключить, что в случае ВПЧ-ассоциированной субклинической форме, несмотря на скудность клинических проявлений, уже 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 ( $LOO^-$ ) и интенсивное образование свободнорадикальных форм кислорода. Имеющиеся иммунологические и цитобиохимические изменения на ранних стадиях неопластического процесса становятся факторами, нарушающими структуры клеточных мембран, а изменение метаболических процессов играет значительную роль в патогенезе, переходу процесса в более тяжелые формы с возможностью малигнизации.

### 3.3.9. Расчет прогностических критериев заболеваемости ВПЧ-ассоциированной патологией нижнего отдела гениталий

После проведенного комплексного исследования гомеостаза пациенток с латентными и субклиническими формами папилломавирусной инфекции для оценки

риска развития неопластических процессов в вульве, влагалище и шейке матки была составлена таблица прогностических критериев, позволяющая определить прогноз перехода латентных и субклинических форм ПВИ в вульварную или цервикальную интраэпителиальную неоплазию с расчетом диагностического коэффициента (ДК) для каждого из признаков (последовательный анализ Вальда и показатель информативности признака - формула Кульбаха) (табл. 3.18).

**Таблица 3.18.** Прогностические критерии реализации латентных и субклинических форм папилломавирусной инфекции VIN/CIN

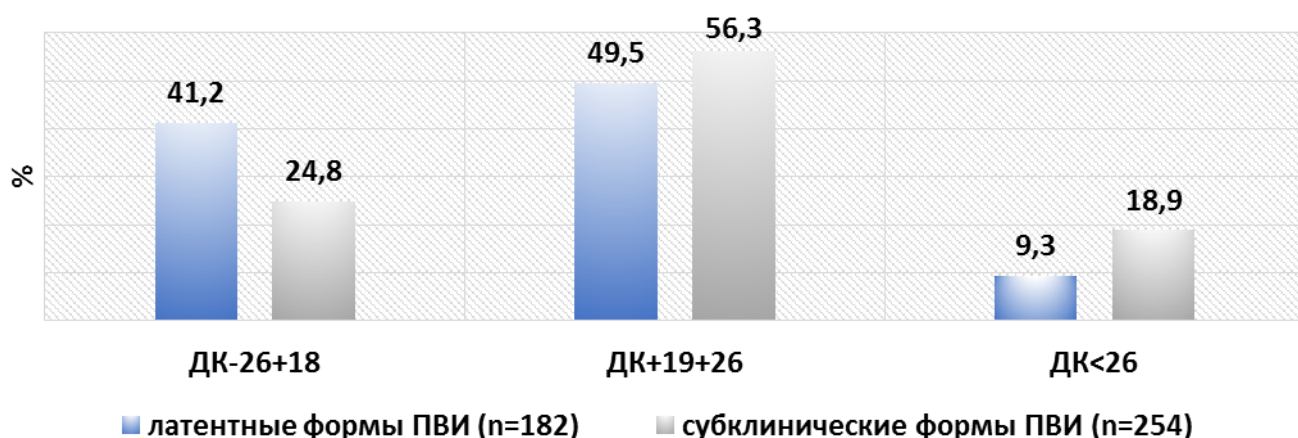
№№	Признак	латентная и субклиническая формы ПВИ, ДЕ	VIN-CIN, ДЕ	ДК
<b>Географические признаки</b>				
1	Острая или критическая зона проживания	0,21	0,45	+1,6
2	Напряженная зона проживания	0,34	0,41	+1,3
3	Благоприятная или удовлетворительная зона проживания	0,48	0,29	-2,5
<b>Анамнестические признаки</b>				
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	+6,8
9	Прием КОК (более 5 лет)	0,16	0,25	+0,9
10	ВМС	0,23	0,37	+2,1
11	Отягощенная онкологическая наследственность	0,20	0,74	+3,5



12	Метаболический синдром	0,24	0,61	+6,8
<b>Клинические признаки</b>				
13	Аногенитальные бородавки	0,31	0,60	+6,9
14	Хронический цервицит	0,28	0,71	+5,2
15	Вагинит/вагиноз	0,31	0,90	+4,3
<b>Лабораторные признаки</b>				
16	рН			
	>5,5	0,14	0,81	+6,5
	<5,5	0,62	0,15	-3,8
17	Инфекционный фактор			
	ИППП:	0,11	0,97	+3,6
	Гонококковая, трихомонадная инфекция	0,09	0,14	+2,5
	Хламидийная \ микоплазменная инфекция	0,24	0,81	+6,8
	Урогенитальный герпес, цитомегаловирус	0,17	0,90	+7,6
	Урогенитальный кандидоз	0,31	0,56	+3,2
	Микстинфицирование (ИИ 3 и более)	0,13	0,83	+7,1
	Неспецифическая условно-патогенная микрофлора	0,28	0,61	+6,4
18	Вагинальный биоценоз			
	Вагинит	0,30	0,27	+3,4
	Дисбиоз	0,16	0,88	+7,3
	Нормоценоз	0,68	0,11	-6,4
	Бактериальный вагиноз	0,20	0,85	+7,5
19	Молекулярно-биологические и иммунные маркеры неоплазии			
	Онкобелок E7	0,13	0,74	+5,7
	Экспрессия p53, bc1-2, c-erb-B2	0,06	0,28	+9,4
	Экспрессия PCNA	0,11	0,82	+6,2
	Гиперэкспрессия p16ink4a	0,03	0,39	+13,0
	Экспрессия Ki-67	0,02	0,36	+18,0
	Коэффициент 2-ONE1/16 $\alpha$ -ONE1			
	-выше 2,0	0,81	0,17	-4,8
	-1,5-2,0	0,18	0,39	+3,6
	-менее 1,5	0,15	0,72	+9,8
	ER+ PgR+	0,95	0,18	-5,1
	ER- PgR-	0,11	0,76	+9,9
	Повышение TGF $\beta$	0,21	0,64	+6,3
22	Вирусная нагрузка (ВПЧ высокого онкогенного риска)			
	низкая (<5 lg)	0,11	0,08	-4,8
	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 неопластических процессов в эпителиальных клетках нижнего отдела гениталий с учетом клиничко-кольпоскопических, гистологических и лабораторных критерии для данного прогноза. Расчет диагностического коэффициента для каждого

из признаков показал, что при ДК от -26 до +18 битов прогнозировался благоприятный исход (перехода латентных и субклинических форм VIN/CIN не предвидится), при ДК от +19 до плюс +26 битов вероятность реализации интраэпителиального поражения нижнего отдела гениталий составляет 95%, при ДК более +26 битов - 99%. На основании проведенных исследований был произведен расчет диагностического коэффициента пациенткам с латентными и субклиническими формами ПВИ (рис. 3.36). Выявлено, что ДК от -26 до +18 бит (благоприятный исход) наблюдался у  $33,0 \pm 8,2\%$  пациенток (при латентных формах в 1,7 раза больше, чем при субклинических), ДК от +19 до +26 бит (95% риска перехода VIN/CIN) наблюдался в  $52,9 \pm 3,4\%$  случаев и ДК свыше 26 бит (99% риска перехода в VIN/CIN) – в  $14,1 \pm 4,8\%$  (при субклинических формах в 2 раза больше, чем при латентных).



**Рисунок 3.36.** Диагностический коэффициент при латентных и субклинических формах ПВИ (%)

Таким образом, суммарно риск реализации латентных форм ПВИ в VIN/CIN более 95% выявился у 58,8% женщин, а субклинических форм у 75,2% пациенток – суммарно  $67,0 \pm 8,2\%$  ( $p < 0,05$ ).

В дальнейшем мы упростили подсчет диагностических коэффициентов, для большей комплаентности использования в клинической практике практическими врачами (см. практические рекомендации, приложение 1–2).

### **3.4. Сравнительная эффективность профилактической терапии латентных и субклинических форм папилломавирусной инфекции**

Полученные нами данные об изменениях локального гомеостаза при латентных и субклинических формах ПВИ явились патогенетическим обоснованием для введения с лечебно-профилактической целью квадривалентной рекомбинантной вакцины против ВПЧ 6, 11, 16, 18-го типов (3 дозы: вторая и третья дозы вводились через 1 и 3 месяца после первой). Причиной выбора вакцинации, во-первых, ее плейотропные воздействия на различные звенья функционирования иммунной системы и, во-вторых, с целью повышения защиты здоровых эпителиоцитов от ВПЧ-инфицирования.

Как уже говорилось выше, методом случайной выборки все пациентки с латентными (I группа; n=174) и субклиническими (II группа; n=237) формами папилломавирусной инфекции в дальнейшем были разделены на 4 группы (из исследования по разным причинам и невозможностью выполнения клинического протокола выбыли 8 женщин I и II группы): *Ia группа (n=98) латентные формы ПВИ* - наблюдение в течение 3 лет с ежегодным контролем вирусной нагрузки, расширенной кольпоскопией и взятием мазков на онкоцитологию; *Ib группа (n=74) - латентные формы ПВИ* - квадривалентная рекомбинантная вакцина против ВПЧ 6, 11, 16, 18-го типов; *IIa группа (n=158) – субклинические формы ПВИ* - наблюдение в течение 3 лет с ежегодным контролем вирусной нагрузки, расширенной кольпоскопией и взятием мазков на онкоцитологию; *IIb группа (n=79) – субклинические формы* - вакцина против ВПЧ 6, 11, 16, 18-го типов.

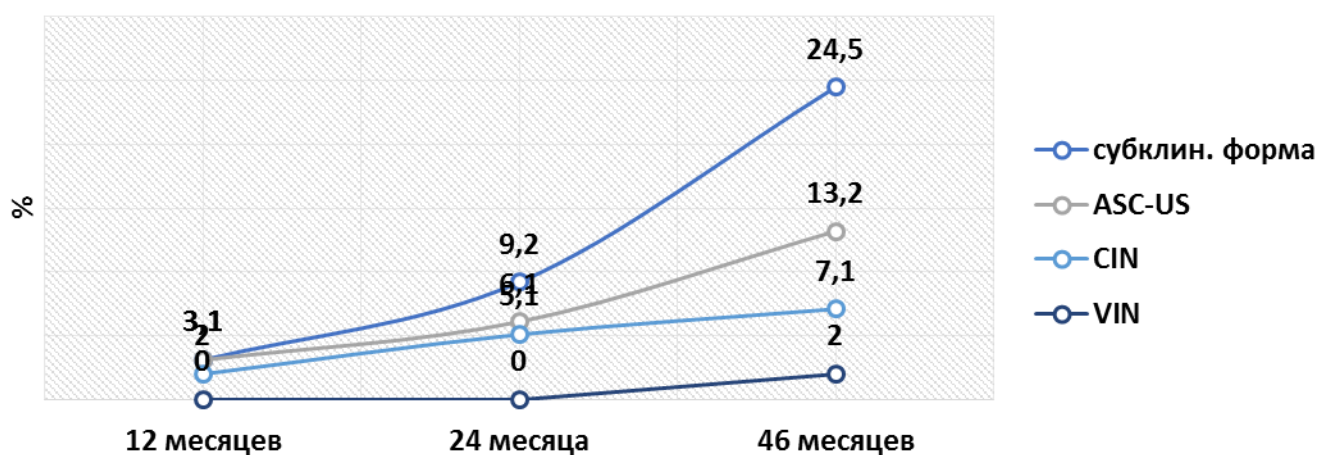
Оценку эффективности лечения проводили через 12, 24 и 36 месяцев после окончания профилактической терапии.

#### **3.4.1. Сравнительная эффективность профилактической терапии пациенток с латентными формами папилломавирусной инфекции**

В ходе проведенного клинко-микробиологического исследования в течение трех лет, выявлено, что реализация латентного носительства папилломавирусной

инфекции в субклинические формы, вульварную и 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- $\alpha$ -гидроксиэстрогена (16 $\alpha$ -ОНЕ1).

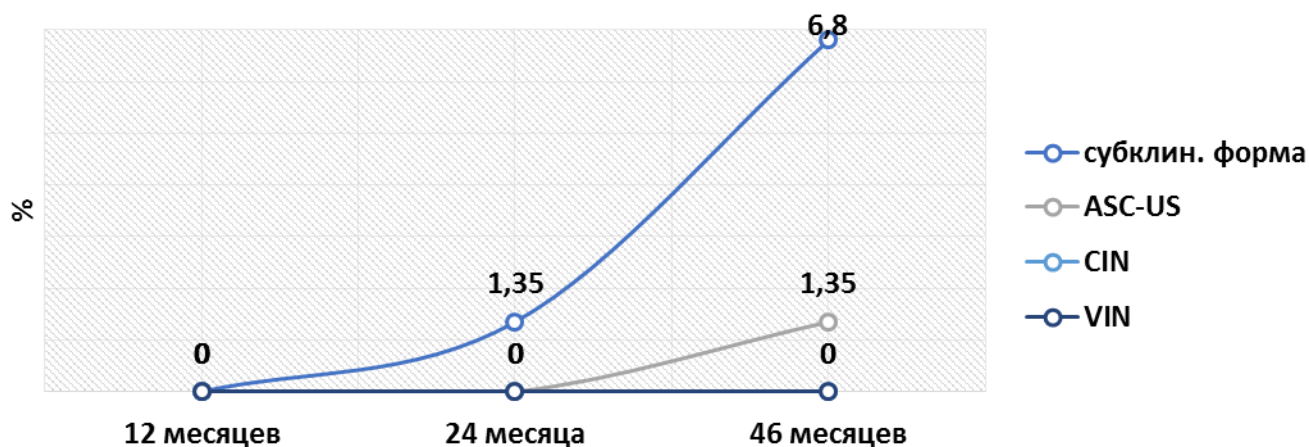
Всем женщинам перед исследованием была проведена санация цервиковагинальной зоны с коррекцией дисбиотических изменений во влагалище.



**Рисунок. 3.37.** Реализация вирусоносительства у пациенток Ia группы (n=98)

При 46-месячном мониторинге пациенток с латентными формами ПВИ выявлена следующая динамика (рис. 3.37-3.38): в первый год наблюдения Ia группе при кольпоскопическом контроле выявлен 3,1% (3/98) случаев субклинической формы ПВИ и 2 пациентки с неопределенной кольпоцитологической структурой соскоба шейки матки (ASC-US), цервикальных и вульварных интраэпителиальных неоплазий на данном сроке мониторинга не диагностировано (рис. 3.37).

При дальнейшем трехгодичном наблюдении Ia группе выявлено 24,5% женщин (25/98), у которых латентное ВПЧ-носительство перешло в субклиническую форму. Неопластические процессы в шейке матки (CIN I) в этой группе обнаружены у 7,1% пациенток, во влагалище (VIN I) - у 2,0%.



**Рисунок. 3.38.** Реализация вирусоносительства у пациенток Ib группы (n=74)

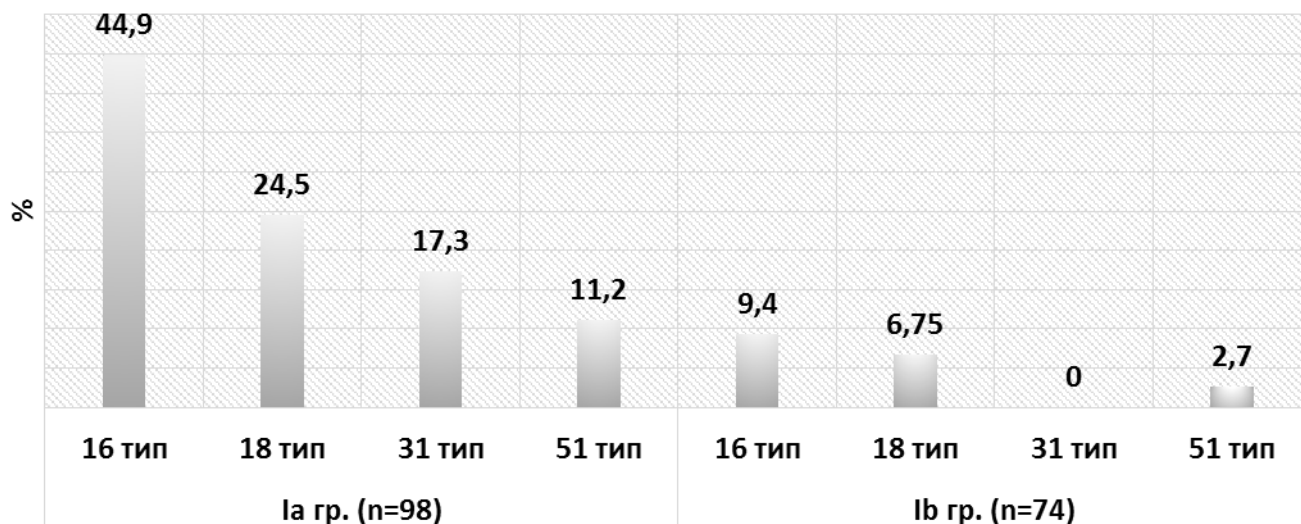
Ib группе реализации латентных форм VIN/CIN не наблюдалось на всем сроке мониторинга. Субклинических форм за 3 года диагностировано 6,8% (5/74), ASC-US определен у 2/74 (1,35%) женщин на третий год наблюдения.

В различные сроки трехгодичного наблюдения положительный статус по вирусу папилломы человека (обнаружение ВПЧ высокого и низкого канцерогенного риска в детектируемых титрах вирусной нагрузки) был зафиксирован у 64,3% (63/98) пациенток Ia и у 17,6 (13/74) – Ib группы ( $p=0,046$ ). При этом у подавляющей части пациенток обеих групп наблюдалось персистирование генотипов ВПЧ, диагностированных при рандомизации, что свидетельствует о высокой частоте как персистенции ВПЧ (50,0%), так и возможности повторного инфицирования новыми генотипами ВПЧ (14,3%) женщин с латентными формами ВПЧ, которым не проводилась вакцинация (табл. 3.18). Что касается небольшого числа случаев повторного инфицирования среди вакцинированных пациенток (5,4%), то все были связаны с не входящими в состав квадριвалентной вакцины генотипами ВПЧ (44, 45 и 58). А среди пациенток Ia группы, наоборот, встречались генотипы высокого канцерогенного риска (16 и 18), что повышает риск развития неопластических процессов нижнего отдела гениталий и закономерно проявилось в нашем исследовании.

**Таблица 3.19.** Инфицированность ВПЧ в процессе трехгодичного мониторинга пациенток с латентными формами ПВИ

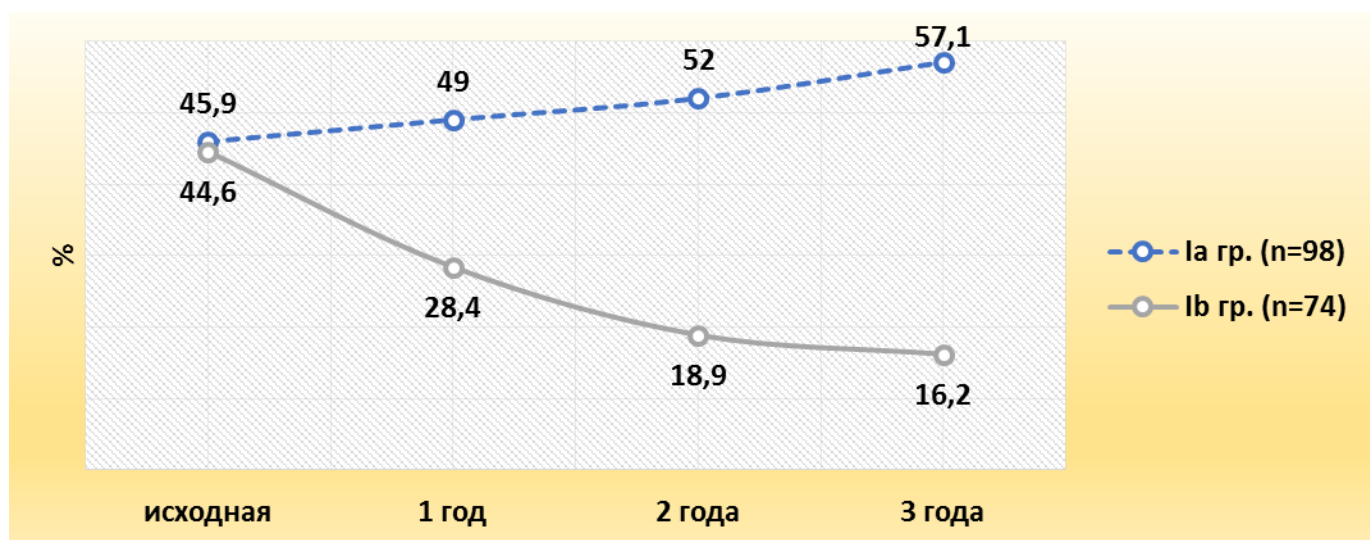
	Ia группа (n=98)		Ib группа (n=74)	
	n	%	n	%
<b>персисстирование ВПЧ</b>				
<b>всего</b>	49	50	9	12,1
16	18	18,3	4	5,4
18	9	9,2	2	2,7
31	7	7,1	-	-
33	2	2,1	1	1,3
45	1	1,0	-	-
51	5	5,1	2	2,7
52	1	1	-	-
56	2	2,1	-	-
58	3	3,1	-	-
59	-	-	-	-
66	1	1,0	-	-
68	-	-	-	-
<b>новые генотипы ВПЧ</b>				
<b>всего</b>	14	14,3	4	5,4
16	5	5,1	-	-
18	4	4,1	-	-
44	-	-	2	2,7
45	1	1,0	1	1,3
51	2	2,1	-	-
52	-	-	-	-
56	1	1,0	-	-
58	1	1,0	1	1,3
66	-	-	-	-
68	-	-	-	-

Кроме оценки кольпоскопической картины женщин с латентными формами ПВИ, проводился мониторинг динамики вирусной нагрузки высококанцерогенными типами ВПЧ (рис 3.39). Средняя вирусная нагрузка в группе пассивного наблюдения (Ia) за трехлетний срок была равна  $45,6 \pm 6,3$ , при этом в группе с профилактическим применением квадριвалентной рекомбинантной вакцины против ВПЧ (Ib группа) она оказалась в 1,8 раз ниже ( $25,0 \pm 4,1$ ).



**Рисунок. 3.39.** Динамика вирусной нагрузки высококанцерогенными типами ВПЧ у пациенток с латентной формой ПВИ (3 года)

Также была проведена динамическая оценка содержания метаболитов эстрогенов. Выявлена достоверна динамика уменьшения пациенток с коэффициентом 2-ОНЕ1/16 $\alpha$ -ОНЕ1 менее Ib группе ( $p < 0,05$ ) (рис. 3.40).



**Рисунок. 3.40.** Динамика частоты детекции низкого коэффициента 2-ОНЕ1/16 $\alpha$ -ОНЕ1 (менее 1,5) у пациенток с латентными формами ПВИ

В среднем низкий коэффициент 2-ОНЕ1/16 $\alpha$ -ОНЕ1 Ib группе уменьшился за 3 года в 1,7 раза по сравнению со стабильным (и даже несколько возросшим) коэффициентом Ia группе. По-видимому, квадριвалентная вакцинопрофилактика,

опосредовано уменьшая вирусную нагрузку ВПЧ ВКР, приводит как к подавлению фосфорилирования клеточных и кодируемых вирусом белков в инфицированных клетках, так и воздействует на ферменты цитохрома P450 с увеличением выработки 2-гидроксиэстрогенов и уменьшением, соответственно, количества 16-гидроксиэстриола.

Таким образом, в группе пациенток, которым применяли квадριвалентную рекомбинантную вакцину против ВПЧ (Ib) в ходе трехгодичного мониторинга диагностировано в 3,6 раз меньшее количество субклинических форм ПВИ и отсутствие реализации латентных форм ПВИ в вульварную и цервикальную неоплазии. Также зарегистрировано статистически значимое уменьшение (в 4,1 раза) персистенции ВПЧ и появление их новых генотипов (в 2,6 раза), вирусной нагрузки высокоонкогенными типами ВПЧ (в 1,8 раза), снижение количества пациенток с низким коэффициентом метаболитов эстрогенов (ОНЕ1/16 $\alpha$ -ОНЕ1) - в 1,7 раза.



### Сравнительная эффективность терапии пациенток с субклиническими формами папилломавирусной инфекции (цитокольпоскопия)

В начале исследования при проведении кольпоскопии у пациенток с субклиническими формами ПВИ обнаружены изменения слизистых воспалительного характера, характерные для специфического вагинита и цервицита (неярко выраженная гиперемия слизистой влагалища, волнистая поверхность эпителия шейки матки и влагалища). Диагностированы признаки аномальных кольпоскопических картин, характерные для субклинических форм ПВИ в виде мозаики, пунктуации -  $32,8 \pm 4,1\%$ , где выполнялась прицельная биопсия (табл. 3.41–3.42).

**Таблица 3.41.** Кольпоскопические признаки пациенток с субклиническими формами папилломавирусной инфекции

кольпоскопические признаки	Па гр. (n= 158)		Пб гр. (n= 79)	
	n	%	n	%
остроконечные кондиломы	6	3,8	3	3,8
плоские кондиломы	47	30,4	24	30,4
ацетобелый плоский эпителий	41	25,9	20	25,3
ацетобелый микропапиллярный эпителий	44	27,8	22	27,8
кондиломатозный вагинит	84	53,2	43	54,4
мозаика	37	23,4	18	22,8
пунктуация	39	24,7	21	26,6

**Таблица 3.42.** Изменения шейки матки у пациенток исследуемых групп (данные гистологического исследования)

гистологические признаки	Па гр. (n= 158)		Пб гр. (n= 79)	
	n	%	n	%
стационарный эндоцервикоз	18	11,4	9	11,4
железисто-кистозный эндоцервикоз	9	5,7	4	5,1
эндоцервикоз с эпидермизацией	7	4,4	3	3,8
эндоцервикоз с воспалением	82	51,9	43	54,4

При исследовании динамики кольпоскопической картины у женщин с субклиническими формами ПВИ выявлено, что в группе пациенток которым

проводили наблюдение в течение 3 лет с расширенной кольпоскопией, контролем вирусной нагрузки и взятием мазков на онкоцитологию (Па группа) через 1 год у 4,4% (7/158) пациенток выявлены патологические изменения эпителия шейки матки характерные для цервикальной интраэпителиальной неоплазии, при этом нормализация кольпоскопической картины наблюдалась в 25,9% (41/158) случаев, что, по-видимому, обусловлено улучшением состояния вагинального гомеостаза после проведения микробиологической санации (табл. 3.43). При последующем трехлетнем наблюдении количество CIN во Па группе увеличилось с 4,4 до 6,9% на второй и до 18,3% на третий год мониторинга, а нормальная кольпоскопическая картина уменьшилась до 21,5% (34/158).

**Таблица 3.43.** Динамика кольпоскопических признаков у пациенток с субклиническими формами ПВИ в процессе мониторинга (3 года)

	Па группа (n=158)		Пб группа (n=79)	
	п	%	п	%
<b>12 месяцев</b>				
нормализация кольпоскопической картины	41	25,9	56	70,9
ASC-US	5	3,2	-	-
переход CIN	7	4,4	-	-
переход VIN	-	-	-	-
<b>24 месяца</b>				
нормализация кольпоскопической картины	47	36,1	61	77,2
ASC-US	4	2,5	2	2,5
переход в CIN	11	6,9	1	1,3
переход в VIN	-	-	-	-
<b>36 месяцев</b>				
нормализация кольпоскопической картины	34	21,5	63	79,7
ASC-US	4	2,5	1	1,3
переход в CIN	29	18,3	3	3,8
переход в VIN	6	3,8	2	2,5

В группе, где применялась вакцинация против ВПЧ (II b) на годичном сроке мониторинга нивелирование кольпоскопических признаков субклинических форм ПВИ диагностировано у 70,9% (56/79) больных (утяжеления неопластических

процессов в виде VIN/CIN в данной группе не наблюдалось). Через 24 месяца наблюдения (после окончания противовирусной терапии и вакцинации) нормальная кольпоскопическая картина присутствовала у 77,2% (61/79) пациенток, а на трехлетнем сроке таких женщин было уже 79,7% (63/79).

Кроме того, в ходе динамического наблюдения был выявлено некоторое количество пациенток с неопределенной кольпоцитологической структурой соскоба шейки матки (ASC-US): во IIa группе в ходе трехгодичного наблюдения – 2,5% (4/158), во IIb группе – 1,3% (1/79). Всем пациенткам, у которых не было зарегистрировано улучшение состояния шейки матки, в дальнейшем была проведена радиоволновая абляция пораженных участков.

Таким образом, по результатам оценки кольпоскопических признаков ВПЧ-поражения нижнего отдела гениталий с трехгодичным мониторингом пациенток с субклиническими формами ПВИ выявлено, что пассивное динамическое наблюдение с микробиологической санацией урогенитального тракта ведет к нормализации кольпоскопической картины в  $27,8 \pm 7,3\%$ , а применение вакцинации против ВПЧ улучшает кольпоскопическую картину на  $75,9 \pm 4,4\%$  - эффективность выше в 2,7 раза.

## Глава 4. Обсуждение полученных результатов

Папилломавирусная инфекция нижнего отдела гениталий одно из наиболее широко распространенных заболеваний у женщин репродуктивного возраста. По данным официальной государственной статистики РФ показатели заболеваемости клиническими формами ПВИ в 2020 году составили 26,0 на 100 тысяч населения. При этом не последнюю роль играют региональные особенности распространения и течения данной патологии. К сожалению данный показатель полностью не может отражать настоящие масштабы инфицированности населения вирусами папилломы человека, так как не подлежат регистрации латентные и субклинические и формы инфекции, притом, особое внимание исследователей привлекают эпидемиологические именно аспекты инфицирования ВПЧ в связи с его широкой распространенностью (за последнее десятилетие количество ИППП, выявляемых в асимптомной или атипичной форме, резко возросло - по данным различных авторов от 5,5% до 37,5% случаев, что приближается к обнаружению ВПЧ при неопластических поражениях влагалища и шейки матки) [2, 15, 28, 34, 51, 89, 106]. У пациенток с латентными и субклиническими формами ПВИ могут выявляться ВПЧ как низкого, так и высокого онкогенного риска, последние ассоциируются с интраэпителиальной неоплазией и раком наружных половых органов, влагалища и шейки матки [14, 27, 31, 58, 61, 76, 101]. [185, 216, 303]. При этом до сих пор отсутствуют единые алгоритмы менеджмента пациенток при отсутствии клинических проявлений ПВИ - варианты ведения могут различаться от пассивного наблюдения до проведения курсов иммуностимулирующих и противовирусных препаратов, что не позволяет клиницистам выработать единый алгоритм и ведет к увеличению количества интраэпителиальных неоплазий [7, 12, 26, 59, 65, 80].

Безусловно, детекция типа ВПЧ как диагностического критерия неопластических процессов нижнего отдела гениталий достоверно не позволяет прогнозировать малигнизацию в связи с кратковременным характером персистенции вируса с его элиминацией у достаточного количества женщин. Поэтому до сих пор

дискутабельным остается вопрос о патогенетической роли молекулярно-биологических и иммунных маркеров канцерогенеза (апоптоза, пролиферации) при папилломавирусной инфекции. Наиболее перспективным в этом плане является изучение так называемых онкогенов и продуктов их экспрессии - онкобелков [9, 14, 20, 34, 85, 103]. Особый интерес представляет длительная персистенция вирусов и, связанный с этим, коканцерогенный эффект других патогенов, с инициацией многостадийного процесса трансформации, что предполагает, прогрессирование неопластических процессов в эпителии нижнего отдела гениталий [6, 11, 30, 72, 83]. Среди них выделяются цитокиновые каскады, регулирующие функционирование онкобелков, клеточные онкогены, участвующие в презентации вирусных антигенов и модулирующие процессы апоптоза и пролиферации клеток [18, 52, 67, 95, 106].

Одним из наиболее эффективных направлений профилактики ВПЧ-ассоциированных заболеваний является разработка методов прогнозирования течения и осложнений патологического процесса, позволяющих оценить вероятность их возникновения и предупредить развитие при этом ВПЧ-скрининг, цитологическое исследование наряду с кольпоскопией имеют решающее значение, при этом лица с положительным результатом тестирования на ВПЧ рассматриваются, как имеющие потенциальный риск развития онкологической патологии [3, 8, 17, 20, 36, 84, 92, 98].

Вторичная профилактика ВПЧ-ассоциированного рака вульвы, влагалища и шейки матки основывается на своевременном выявлении и лечении предраковых заболеваний в виде интраэпителиальных неоплазий [2, 6, 17, 29, 44, 61, 90]. Персистирующая инфекция ВПЧ высокого онкогенного риска имеет выраженную корреляцию с прогрессированием неопластического процесса [1, 4, 18, 26, 58, 73, 104]. Консервативные методы профилактики, применяемые в настоящее время при латентных и субклинических формах ВПЧ, не позволяют с достаточно высокой эффективностью избавиться от его персистенции [12, 35, 41, 54, 66]. После применения различных неспецифических противовирусных и

иммуномодулирующих препаратов практически в 26–82% наблюдений отмечаются реинфекции или присоединение ВПЧ другого генотипа, что диктует необходимость последующего наблюдения и повторной профилактики, что увеличивает риск развития неопластической трансформации эпителиальных клеток [4, 16, 39, 41, 64, 92, 103]. Поэтому в настоящее время продолжается поиск новых возможностей к эффективной элиминации персистирующего ВПЧ. Перспективным представляется адъювантное использование вакцины против ВПЧ, которые уже показали высокую эффективность в отношении профилактики развития интраэпителиальных неоплазий и цервикального рака у неинфицированных соответствующим типом ВПЧ женщин [61, 83]. В последнее время появились единичные публикации, посвященные оценке влияния вакцинации на снижение риска развития рецидива цервикальных неоплазий после проведенного оперативного лечения в которых зарегистрировано значимое снижение частоты рецидивов после эксцизионных методов лечения CIN [15, 16]. В связи с чем представляется актуальным проведение исследования по адъювантному профилактическому использованию вакцины против ВПЧ при латентных и субклинических формах ПВИ, что и определило цель нашего исследования. В совокупности результаты исследования, с учетом проведенного клинического, вирусологического, иммунологического и молекулярно-генетического анализа при латентных и субклинических формах ПВИ, позволили предложить модель вторичной профилактики неопластических процессов в эпителии нижнего отдела гениталий у женщин в условиях региона, что создает предпосылки для создания диагностических и профилактических алгоритмов ведения пациенток с латентной и субклинической формами папилломавирусной инфекции.

Данная диссертационная работа выполнялась по двухэтапной программе. На первом (ретроспективном) этапе мы посчитали целесообразным провести пятилетний (2015–2019 гг.) анализ эпидемиологической обстановки в отдельном регионе (Краснодарский край), который позволил оценить распространенность латентных и субклинических форм ПВИ у женщин репродуктивного возраста,

уровень их ранней диагностики, меры профилактики, проводимые в регионе. Проанализирована демографическая ситуация, рассчитаны показатели общей структуры ВПЧ-инфицированности населения края, ее уровень в зависимости от места проживания (городская, сельская местность), динамика возрастных показателей. Анализу подвергнуты сведения о 6239 латентных и 1806 случаях субклинических форм ПВИ. Зарегистрировано, что за 5 лет количество женщин, носителей ВПЧ, увеличилось в 1,7 раза (с 24161 на 100 тысяч женского населения до 40318), а субклинических форм ПВИ возросло в более чем 10 раз (с 1026 до 10714), при этом за последние 5 лет нивелируется разница в их детекции и в 2020 году количество выявленных форм латентного и субклинического ПВИ в городе составила уже 44603 и 11595 случаев на 100 тысяч женского населения, а в селе – 36005 и 9741 (пока среднее количество латентных форм ПВИ в 1,4 раза, а субклинических форм в 1,5 раза ниже в сельской местности). Расчет возрастного показателя ВПЧ-носителей выявил, что основной уровень инфицированности ВПЧ чаще всего происходит уже с первыми половыми контактами, при этом наибольшее количество латентных форм ПВИ приходится на возраст 17–25 лет ( $70,7 \pm 6,9\%$ ), затем происходит снижение количества бессимптомных вирусоносителей (до  $18,6 \pm 4,5\%$ ) и увеличивается доля субклинических форм, пик обнаружения которых приходился на возраст  $30,9 \pm 5,3$  лет. Суммарно реализация ВПЧ-носительства в субклинические формы происходит в возрасте 21–35 лет -  $72,9 \pm 9,4\%$ . По социальному и семейному положению, а также уровню образования у пациенток с латентными и субклиническими формами ПВИ различия отсутствовали ( $p > 0,05$ ). По нашему мнению, в случае инфицирования ВПЧ более критическим является не сам возраст, а временной интервал между первым половым контактом и моментом обследования, что у ряда пациенток активизирует факторы иммунной защиты и помогает элиминировать вирус, у других, наоборот, переводит ВПЧ-носительство в продуктивную фазу с активацией неопластических процессов. >

К сожалению, информация, касающаяся сексуального анамнеза, не всегда объективна, но нами не обнаружено достоверных отличий ни в среднем возрасте полового дебюта, ни в количестве половых партнеров от значений контроля (среднее значение интервала между возрастом менархе и возрастом начала половой жизни в обеих группах составило - 3,0 (2,0–5,0) года; в группе латентных носителей один половой партнер был у 58,4% женщин, а в группе с субклиническими формами ПВИ – в 56,9%). Особенности менструальной, репродуктивной функции и гормонального статуса не выявлено.

На никотиновую зависимость было указано у 20,8% вирусоносителей и у 26,9% пациенток с субклиническими формами ПВИ - данные согласуются с результатами исследований, свидетельствующих о тесной взаимосвязи курения и ПВИ с синергичным коканцерогенным влиянием на эпителий гениталий [20, 28, 32, 105]. Обращает внимание возрастающее использование для курения альтернативных способов (аналоги электронных сигарет, ароматические смеси и др.), которые в обеих группах доходят до  $52,3 \pm 3,6\%$  ( $p=0,0002$ ), при этом в научной литературе практически не встречается данных об их влиянии на реализацию ПВИ.

Картографический анализ распределения коэффициентов заболеваемости ВПЧ-ассоциированной патологией нижнего отдела гениталий 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 ВПЧ выявило, что основными инфекционными агентами в регионе, как при латентном носительстве, так и при субклинической форме являются высокоонкогенные типы – 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% пациенток с субклиническими формами ПВИ (сочетание нескольких типов ВПЧ составляло при латентных формах ПВИ - 13,1%, а при субклинических – 12,8%).

Эпидемиологический анализ с вычислением доверительных интервалов прогнозных показателей с 95% вероятной оценкой заболеваемости показывает, что в 2022–2023 гг. следует ожидать незначительное повышение частоты заболеваемости ВПЧ-ассоциированной патологией нижнего отдела гениталий, что связано, с одной стороны, скринингом уже детектируемой заболеваемости, с другой - существующей эпидемиологической и социальной обстановкой.

Основным методом первичной профилактики рака вульвы, влагалища и шейки матки служит вакцинация против ВПЧ, при этом за 12 лет в крае выявлена непостоянная динамика вакцинации с наибольшим подъемом в 2015–2018 гг. и последующим уменьшением их количества (всего за 12 лет вакцинировался 7271 человек). Основная группа вакцинированных приходится на возраст от 15 до 20 лет (77,0%), 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%). По нашему мнению невысокие цифры вакцинированных связаны с одной стороны с дороговизной вакцины, с другой – с агрессивной антипропагандой вакцинации.

Основной акцент предлагаемой модели вторичной профилактики злокачественных новообразований нижнего отдела гениталий, позволяющая выделить основные риски прогрессирования неопластических процессов, делается на комплексную диагностику с использованием географических, анамнестических, клинических, вирусологических, иммунологических и молекулярно-генетических маркеров. Вторым ее аспектом является сам алгоритм менеджмента латентных и

субклинических форм ПВИ, позволяющий включить в комплексную профилактическую терапию коррекцию вагинального микробиоценоза и применение адьювантной вакцинации против ВПЧ.

В рамках второго этапа исследования у выбранных пациенток (182 с латентными и 254 субклиническими формами (МКБ 10 - А63.0); 30 условно здоровых женщин - иммуноцитобиохимический контроль) проведено клиническое, кольпоскопическое, цитологическое, микробиологическое, иммуногистохимическое исследование. Составлен «клинический портрет» пациенток с субклиническими формами ПВИ с регистрацией анамнестических провоцирующих факторов показал, что более половины респонденток (75,2%) не связывает развитие данной формы ПВИ с какими-либо провоцирующими факторами, а другая часть женщин (14,2%) указывает на сочетание нескольких провокаторных факторов среди которых наиболее значимыми оказались применение антибактериальных препаратов и местных антисептиков (12,6%), нарушение пищевого и алкогольного поведения (33,1%) и курение, в том числе новых курительных смесей (11,6%), при этом смена полового партнёра, несмотря на существующие представления, не играла первостепенную роль в этом процессе (5,1%).

Расширенная кольпоскопия у пациенток с субклиническими формами ПВИ в основном показала изменения слизистых воспалительного характера, характерные для специфического вагинита и цервицита - 52,7% (неярко выраженная гиперемия слизистой влагалища, волнистая поверхность на большом протяжении эпителия шейки матки и влагалища), также характерными для данной формы ПВИ были плоские кондиломы (31,9%) и проявления аномальных кольпоскопических картин - ацетобелый плоский (26,4%) и микропапиллярный (28,7%) эпителий, мозаика (22,8%), пунктация (24,0%) и атипичные сосуды (4,3%) (при латентных формах, соответственно, такие изменения отсутствовали). Характерно, что у 41,7% пациенток с субклиническими формами проявления ПВИ диагностировались как в зоне трансформации, так и за ее пределами (во влагалищных сводах, на стенках

влагалища, вульве). Сочетание аномальных кольпоскопических картин с нормальными признаками (оригинальный многослойный плоский эпителий, цилиндрический эпителий, зона трансформации) были отмечены в  $44,6 \pm 5,1\%$ .

Нормальные цитологические результаты (жидкостная цитология) регистрировались в  $42,2\%$  (в  $52,2\%$  отмечена воспалительная реакция, а у  $5,6\%$  ASC-US). При проведении гистологического исследования койлоцитарная клеточная атипия выявлялась у  $83,9\%$  пациенток с субклиническими формами ПВИ, а основным морфологическим субстратом был цервицит ( $81,9\%$ ).

Вирусологический анализ (ПЦР-РВ ВПЧ Digene-тест) в группах показал, что основными типами ВПЧ как при латентных, так и при субклинических формах ПВИ являлись типы 16 ( $54,4 \pm 3,1\%$ ), 18 ( $18,65 \pm 2,4\%$ ), 31 ( $11,85 \pm 1,9\%$ ) и 51 ( $14,6 \pm 1,4\%$ ). Из низконкогенных эпидемиологическое значение имеют также 6 ( $24,0 \pm 1,4\%$ ) и 11 ( $19,45 \pm 1,3\%$ ) типы. Сочетания нескольких типов ВПЧ зарегистрировано в  $27,95 \pm 2,2\%$  ПЦР-образцов. Высокая вирусная нагрузка для ВПЧ 16 типа установлена в целом у  $63,5 \pm 11,3\%$  пациенток с латентными и субклиническими формами ПВИ (латентная  $54,7\%$ , субклиническая форма –  $72,3\%$ ), для ВПЧ 18 типа в  $55,45 \pm 3,4\%$  образцов, без статистически значимой разницы между латентными и субклиническими формами ПВИ. Высокая нагрузка ВПЧ была у  $35,8 \pm 3,6\%$  пациенток с 13 типом ВПЧ ( $38,1\%$  латентные формы и  $33,5\%$  субклинические) и  $45,7 \pm 7,6\%$  с 51 типом со статистически достоверной разницей между группами (латентная форма ПВИ –  $28,6\%$ , субклиническая –  $43,7\%$ ).

Многочисленные исследования свидетельствуют, что одним из наиболее существенных факторов реализации неопластических процессов является нарушение микробиоценоза с превалированием патогенной и условно-патогенной микрофлоры, в результате растет пролиферативная активность эпителия с хронизацией процесса. Согласно нашим исследованиям среднее количество нормальных вагинальных мазков в двух группах определялось в  $17,8 \pm 6,4\%$  ( $p > 0,05$ ), при этом при субклинических формах ПВИ таких мазков было в 2,1 раза меньше ( $11,4\%$  против

24,2%), при этом оценка клеточного состава при субклинической форме ПВИ выявило достоверное ( $p > 0,05$ ) увеличение количества лейкоцитов (КЛ) –  $12,1 \pm 4,8$ , эпителиальных клеток (КЭК) –  $14,4 \pm 2,7$  и, соответственно, суммы клеток СК –  $26,5 \pm 4,9$  по сравнению как с показателями контроля, так и с латентными формами, при этом цитологический коэффициент (ЦК) снижался до  $0,8 \pm 0,1$  (преобладание эпителиальных клеток в вагинальной жидкости). Анализ состояния микробиоценоза влагалища методом ПЦР-РВ («АмплиПрайм® Флороценоз-Бактериальный вагиноз» для определения *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Lactobacillus spp.* и общего количества бактерий) с расчетом трех коэффициентов соотношений подтвердил, что у пациенток с латентной формой ПВИ количество вагинальных нормоценозов было в 2,4 раза выше, чем с субклиническими (58,8% против 24,0% соответственно). Также обратило на себя внимание высокое количество в группах детектируемых вирусов простого герпеса (HSV) и цитомегаловирусов (CMV) - в сумме  $68,1 \pm 6,9\%$  при латентных и  $88,6 \pm 9,4\%$  при субклинических формах ПВИ. Возможно, что ВПЧ-поражение эпителиальных клеток в присутствии других эпителиотропных вирусов способствует более длительной персистенции и реализации патогенного эффекта ВПЧ в результате развития локального иммунодефицита слизистых нижнего отдела гениталий на этапе предраковых изменений, что может приводить к нарушению экспрессии генов главного комплекса гистосовместимости, затрудняет распознавание инфицированных эпителиоцитов иммунокомпетентными клетками, увеличению темпов клеточного обновления с замедлением терминальной дифференцировки клеток с преобладанием незрелых форм. Достоверное установление ассоциации нарушений микробиоты с развитием неопластических изменений в нижнем отделе гениталий позволяет оценивать возможную ее взаимосвязь с клиническими особенностями и прогнозом дальнейшего развития ВПЧ-инфекции.

Персистенция патогенной и условно патогенной микрофлоры ведет за собой изменения биохимических параметров в вульвовагинальной зоне за счет, с одной

стороны, уменьшения количества лактобактерий, обеспечивающих образование  $H_2O_2$  и молочной кислоты, с другой стороны, за счет конкуренции за ресурсы (гликоген, железо, медь), активации цитолитических процессов, которые связаны как с воздействием на клетки продуктов жизнедеятельности условно-патогенных микроорганизмов, так и с усилением неопластических процессов в эпителии влагалища и шейки матки. В исследовании зарегистрировано достоверное ( $p < 0,01$ ) снижение уровня перекиси водорода и молочной кислоты у пациенток с субклиническими формами ПВИ (в среднем на  $39,5 \pm 5,5\%$  и  $17,0 \pm 1,5\%$  соответственно). Также у них выявлено статистически значимое снижение уровня глюкозы (на  $13,3\%$  по сравнению с латентными формами), железа и меди (на  $40,1\%$  и  $73,8\%$  соответственно) ( $p < 0,01$ ). Снижение уровня глюкозы, как маркера содержания гликогена в поверхностном клеточном слое эпителия влагалища, отражает большинство биохимических изменений при вагинальных дисбиотических процессах. Железо и медь необходимы большинству бактерий, особенно анаэробным, для роста, а конкурентные взаимоотношения между бактериями за них могут играть роль в развитии дисбиотических процессов во влагалище. Также выявлено значимое повышение активности внутриклеточных ферментов у пациенток с субклиническими формами ПВИ - АЛТ в 4,1 раза, АСТ в 2,6 раза и амилазы в 2,8 раза.

Не вызывает сомнений, что регрессия или прогрессия обусловленных вирусами изменений эпителия нижнего отдела гениталий определяется не только ВПЧ-генотипом, но и в значительной степени зависит от состояния иммунной системы. Защитные механизмы организма, способные эффективно подавлять и элиминировать инфекционные патогены сложны, многофакторны, и зависят от функционального состояния иммунокомпетентных клеток, способа переключения цитокинового ответа по Th-1 или Th-2 типу, уровней секреции цитокинов и многих других составляющих. Доказано, что при длительной персистенции вирусов, может формироваться стойкая иммуносупрессия, что связано с прямым действием

возбудителя на структурную и функциональную полноценность иммунокомпетентных клеток, ингибирующим влиянием на иммунную систему факторов, освобождающихся из поврежденных клеток, и с дисбалансом цитокиновой регуляции. Иммунный ответ на ВПЧ характеризуется развитием клеточных и гуморальных 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, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , способствующие реализации клеточного иммунного ответа, Th-2 - IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, TGF $\beta$  влияющие на гуморальный ответ. Нами отмечены значительные изменения по сравнению с нормой уровня локальной продукции основных провоспалительных (TNF) и регуляторных (IL-10) цитокинов у пациенток с ПВИ. При этом концентрация основного макрофагального цитокина IL-1 $\beta$  в цервикальной слизи пациенток с субклиническими формами ПВИ была в среднем в 2 раза ниже, чем при латентных, но эта разница из-за высокого коэффициента вариации была недостоверной ( $p > 0,05$ ). Концентрация IL-8, как и TNF $\alpha$  при субклинических формах также имела тенденцию к повышению (в среднем в 4 раза), а IFN $\gamma$  была в 2 раза ниже (при более чем двукратно увеличенной концентрации IL-4 и стабильной концентрации IL-10) ( $p < 0,05$ ). При этом, стимулирующий преимущественно гуморальное звено иммунитета TGF $\beta$  при субклинических формах ПВИ более чем в два раза превышал свои значения как по показателям здоровых неинфицированных женщин, так и латентных форм, причем наиболее высокий уровень TGF $\beta$  определялся у пациенток с наличием высококанцерогенных типов ВПЧ. Таким образом, проведенная сравнительная оценка локальной продукции цитокинов IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  и TGF $\beta$  в зависимости от варианта инфицирования, позволила выявить следующие особенности. При субклинических формах ПВИ отмечено увеличение продукции TGF $\beta$  на фоне стабильных по отношению к контрольной группе и латентным формам значений IL-1 $\beta$  и TNF $\alpha$ . Отсутствие клеточных реакций защитных систем, благодаря которым и развивается воспаление, как адекватная реакция слизистых, при ВПЧ связано с

иммуносупрессивными свойствами персистирующего вируса, который в отличие от других не реплицируется и не обладает цитопатическими. Кроме того, синтез вирусных капсидных белков, обладающих наибольшей иммуногенностью, за счет особенностей генетического кода ВПЧ протекает очень медленно и в малых количествах, тормозя, таким образом, развитие противовирусного иммунитета. Но длительная персистенция вируса приводит к изменению антигенной структуры эпителиоцитов, инициируя длительную активацию иммунокомпетентных клеток, что закономерно приводит к увеличению продукции TGF $\beta$  и, в свою очередь, к преобладанию Th-2 иммунного ответа. Обнаруженные изменения локального цитокинового баланса могут быть использованы для оценки течения воспалительных и иммунных реакций при ВПЧ-инфицировании слизистых нижнего отдела гениталий, а, учитывая выявленную корреляцию между начальными проявлениями неопластического процесса и TGF $\beta$ , возможно его применение с целью определения прогностической значимости утяжеления процесса.

Структурное постоянство эпителиального покрова поддерживают процессы пролиферации, дифференцировки клеток и апоптоза. Факторами, нарушающими клеточный гомеостаз, являются, в первую очередь, нарушения вагинального микробиоценоза, изменяющие баланс анти- и проапоптозных потенциалов инфицированных клеток, и формирующие предпосылки для неконтролируемого ускорения клеточной пролиферации на фоне локальной иммуносупрессии. В процессы иммортализации и трансформации вовлечены клеточные факторы, участвующие в регуляции клеточного цикла и дифференцировке клеток. Считается, что усиление атипии эпителиоцитов связано со снижением активности апоптоза. Существуют гены-протеины, которым принадлежит ключевая роль в регуляции апоптоза, это, способствующие ему - p53, и его подавляющие bcl-2, которые могут рассматриваться как прогностические факторы при диспластических поражениях эпителия нижнего отдела гениталий. Центральную роль в развитии апоптоза играет «дикий» тип гена-онкосупрессора p53, который контролирует начальную фазу цикла

клеточного деления с блокадой митоза и запуском программы, направленной либо на удаление поврежденного участка ДНК и ее репарацию, либо на уничтожение поврежденной клетки, т.е. развитие апоптоза. Девиация апоптоза наступает при нарушении функции p53 в результате его блокады другими протеинами с образованием мутантного типа p53mut (например блокируют его функцию некоторые вирусные белки, в частности, E6). Обнаружено, что протеин E6 ВПЧ ВКР способен инактивировать p53 и предупреждать апоптоз уже на ранних стадиях развития неоплазии. Нами выявлено отсутствие p53mut в нормальном цервикальном эпителии, а при субклинических формах ПВИ частота выявления p53mut составила  $11,6 \pm 3,8\%$  ( $p < 0,005$ ), что может косвенно свидетельствовать о нарушении апоптоза в эпителиальных клетках нижнего отдела гениталий, которые могут способствовать прогрессированию неопластического процесса и рассматриваться, как один из наиболее значимых маркеров прогрессирования ВПЧ-ассоциированной патологии.

Проявление проапоптозной активности гена p53 связано с экспрессией другого онкогена bcl-2, проявляющего противоположную направленность, что, в случае действия повреждающих факторов, ведет к стимуляции канцерогенеза. Известно, что bcl-2 участвует в поддержании антиоксидантного гомеостаза клеток и при развитии злокачественной трансформации, взаимодействуя с митохондриями и внутриклеточными мембранами, блокирует липидные пероксидазные реакции, предохраняя ее от кислородного повреждения, поэтому выявленная нами экспрессия bcl-2 в базальном слое неизмененного цервикального эпителия, связана именно с этими проективными функциями. Подтверждением этого может быть и снижение экспрессии стабилизирующего клеточную мембрану эпителиоцитов bcl-2 при субклинических формах ПВИ - нарастание атипических изменений в многослойном плоском эпителии связано со снижением интенсивности апоптоза в результате сверхэкспрессии bcl-2. При этом нами была обнаружена взаимосвязь между экспрессией этого онкопротеина и продукцией TGF $\beta$ , что подтверждает его участие в качестве модулятора апоптоза. Таким образом, основной точкой приложения



онкогенов и онкосупрессоров является регуляция апоптоза, при этом подавление его индукции при ВПЧ-инфицировании, может повышать жизнеспособность клеток, и, таким образом, увеличивает вероятность сохранения генетических нарушений, индуцируя генетическую нестабильность клеток и прогрессирования неопластических процессов.

Одной из причин неконтролируемого роста клеток служит продукция окружающими их клетками факторов роста, которые, взаимодействуя со специфическими рецепторами, индуцируют их пролиферацию. К числу наиболее известных регуляторов относятся EGF и TGF  $\alpha$ , взаимодействующие с общим рецепторами эпидермального фактора роста (EGFR), одним из которых является c-erb-B2. который экспрессируется на поверхности как нормальных, так и трансформированных эпителиоцитов и участвует в регуляции роста и дифференцировки клеток. Проведенные нами исследования показали, что частота выявления c-erb-B2 в группах практически не различалась: в неизменном эпителии c-erb-B2 экспрессировался  $20,0 \pm 12,6\%$  случаев, при субклинических формах ПВИ - в  $19,1 \pm 4,1\%$  наблюдений, при этом в группах иммунное окрашивание на c-erb-B2 отмечалось только в эпителиальных клетках базального слоя с низким уровнем его экспрессии.

Онкопротеины E6 и E7 ВПЧ являются основными ростостимулирующими генами вируса - E7 связывает Rb-родственные белки, ответственные за регуляцию нормального клеточного цикла, высвобождая из комплекса pRb-E2F транскрипционного фактора E2F и активируя синтез ингибитора циклинзависимых киназ p16ink4 $\alpha$ , что приводит к нерегулируемой клеточной пролиферации, E6, взаимодействует с белками клеточного цикла, и, прежде всего, с p53. В неинфицированных клетках эпителия p53 увеличиваются в ответ на клеточную альтерацию или повреждение ДНК - высокие уровни p53 блокируют PCNA и ряд других регуляторных белков, что необходимо для остановки клеточного цикла с восстановлением ДНК или удалением генетически изменившихся клеток

посредством апоптоза. ВПЧ-инфицирование с реализацией неопластического процесса в большинстве случаев ассоциируется с повышением TGF $\beta$ , участвующего в активации bcl-2 и снижении активности p53 - антиапоптотический эффект с индукцией клеточного роста. При этом прослеживается прямая связь между уровнем PCNA, TGF $\beta$  и экспрессией bcl-2. Кроме того E7 и TGF $\beta$  при на фоне начинающейся ВПЧ-трансформации эпителия, начинают конкурентно взаимодействовать за связывание белка Rb, подавляя гены, ответственные за связывание pRb, что приводит к остановке деления клетки. Прогрессия неопластического процесса сопровождается последовательным увеличением экспрессии PCNA, при этом степень дифференцировки клеток, распространенность неоплазии напрямую зависят от темпов клеточного роста. В исследовании экспрессии PCNA в эпителии шейки матки было установлено, что при латентных и субклинических формах ПВИ, что его средний уровень определения составлял  $5,15 \pm 0,95\%$  при отсутствии статистически значимых отличий как между группами (контрольной и латентными формами) с преимущественным окрашиванием клеток базального и парабазального эпителиальных слоев.

В пролиферирующих инфицированных ВПЧ клетках существует механизм защиты от малигнизации путем подавления функций вирусных онкобелков за счет ингибиторов циклинзависимых киназ, в первую очередь p16ink4 $\alpha$ . Каждый из генов E6 и E7 способен иммортализовать культуры клеток. Поскольку накопление p16ink4 $\alpha$  в клетках свидетельствует о ВПЧ-трансформации, предложено выявлять такие клетки в цитологических мазках по окраске специфическими антителами к p16ink4 $\alpha$ . Повышение эффективности прогнозирования и профилактики развития неопластических процессов нижнего отдела гениталий обусловлена методами, которые позволяют установить стадию ПВИ и в данном случае актуальным является внедрение диагностических критериев, включая методы определения биомаркеров онкопротеина E7, p16ink4 $\alpha$  и Ki-67. ПЦР-анализ мРНК E7 проведено у пациенток с идентифицированными ВПЧ генотипов 16, 18 и 31 -  $54,8 \pm 12,6\%$  от общего

количества наблюдаемых женщин (40,1% с латентной и 65,3% с субклинической формой ПВИ). Положительный тест зарегистрирован в  $14,5 \pm 6,3\%$ , при этом в группе с субклиническими формами ПВИ их было в 2,6 раза больше, при этом наиболее часто онкобелок E7 определялся при ВПЧ 16 и 18 типов и при субклинических формах ПВИ встречался почти в 3 раза чаще -  $5,45 \pm 0,75\%$  и  $15,8 \pm 1,8\%$  соответственно.

Иммуноцитохимическая оценка экспрессии p16ink4a и Ki-67 выявила  $15,5 \pm 8,3\%$  p16ink4a пациенток исследуемых групп (6,8% с латентными и 23,5% субклиническими формами ПВИ – в 3,4 раза больше). При латентных формах ПВИ случаев гиперэкспрессии p16ink4a не наблюдалось, при субклинических - 6,8%, что прогностически неблагоприятно в плане прогрессирования неопластических процессов. При детекции экспрессии Ki-67 выявлено его трехкратное преобладание при субклинических формах ПВИ (9,0% против 2,7% латентных форм). Оценка коэкспрессии p16ink4D и Ki-67 у E7-позитивных женщин установила аналогичные статистически значимые изменения ( $p=0,005$ ). Полученные данные свидетельствуют, что детекция онкомаркера p16 и маркера пролиферации Ki-67 при ПВИ зависит от начала реализации неопластических процессов в эпителиальных клетках, что является важным фактором в понимании патогенеза этой патологии.

Одним из факторов, способствующих формированию неопластических поражений, следует рассматривать гиперэстрогению, на фоне которой резко увеличивается количество активно пролиферирующих клеток базального и парабазального эпителиальных слоев, необходимых для активной персистенции вирусов, при этом эстрогены и их метаболиты способны стимулировать ВПЧ E2-индуцированный апоптоз в инфицированных клетках. Анализ соотношения метаболитов эстрогена показал, что у 21,1% пациенток с субклиническими формами ПВИ баланс метаболитов эстрогена оказался измененным, с превышением уровня 16 $\alpha$ -ОНЕ1 над 2-ОНЕ1 (среднее значение соотношения метаболитов 2-ОНЕ1/16 $\alpha$ ОНЕ в данной группе составило  $1,25 \pm 0,08$ ), средний коэффициент у

женщин с латентной ВПЧ-инфекцией был  $1,89 \pm 0,04$  (отличия от здоровых статистически значимы -  $p < 0,05$ ), а превышение уровня  $16\alpha$ -ОНЕ1 над 2-ОНЕ1 зарегистрировано в 9,6% случаев (в 2,2 раза меньше, чем при субклинических формах ПВИ). При этом обращает на себя внимание, что наибольшее количество нарушений соотношения метаболитов эстрогенов ( $\leq 1,5$ ) определялось у женщин с высоким индексом массы тела (ИМТ более 30) и наличием признаков метаболического синдрома (в группе женщин с латентной формой ПВИ их было 41,3%, с субклинической – 58,1%).

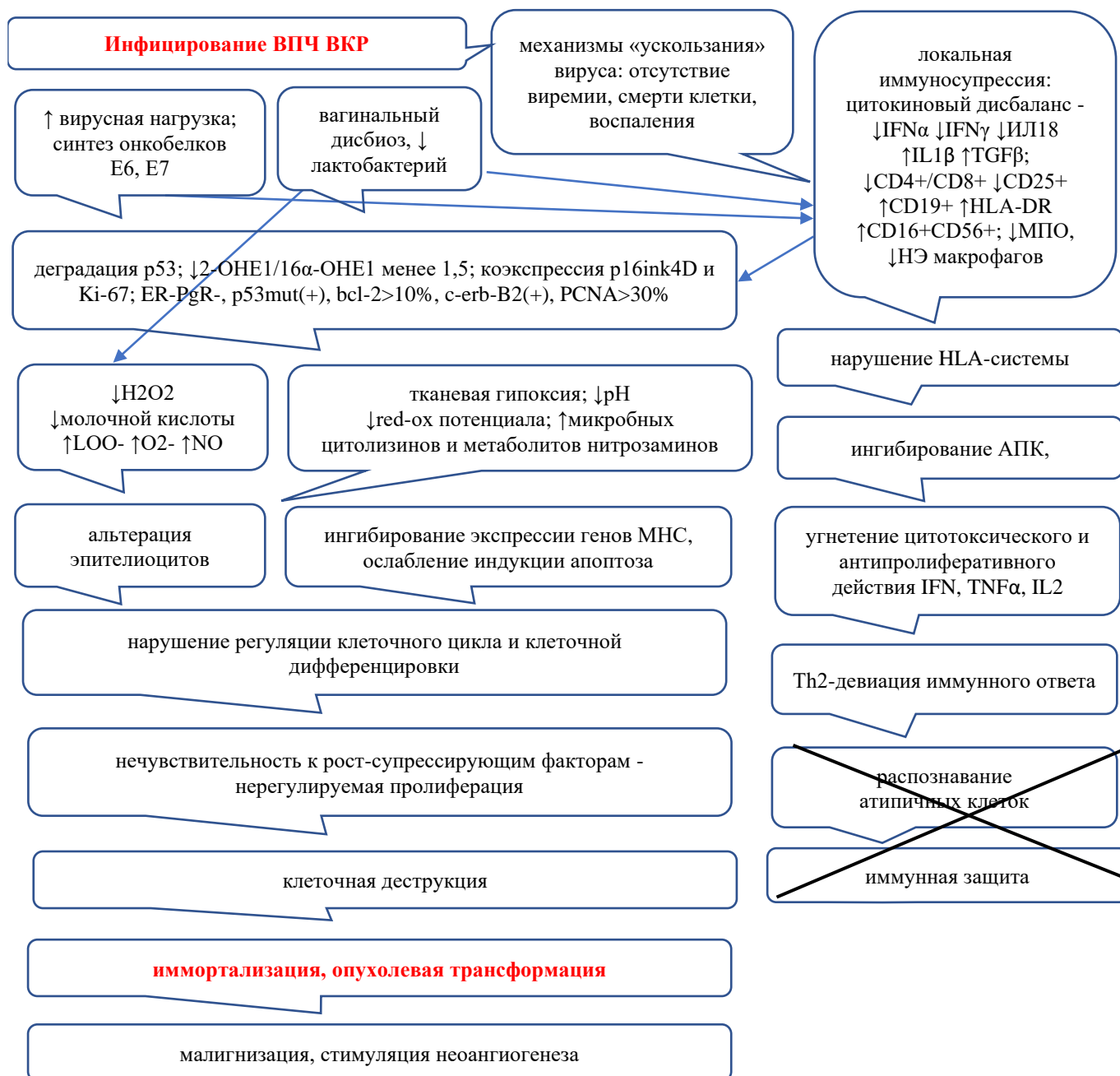
Пролиферативная активность эпителиальных клеток определяется уровнем эстрогенов, а гормоночувствительность эпителиоцитов связана с наличием специализированных рецепторов, а снижение уровня стероидной рецепции при неопластических поражениях свидетельствует о постепенной утрате чувствительности тканей по мере повышения степени неоплазии. Одной из характерных особенностей неопластических клеток является возможная полная или частичная утрата зависимости от внешних центральных регуляторов, в частности, стероидных гормонов, и, как следствие, автономный «самоподдерживающийся» рост, который может активироваться за счет самодостаточности в пролиферативных сигналах или за счет локально продуцирующихся ростовых факторов. Иммуногистохимический анализ рецепторного статуса сочетания эстрогенов и прогестерона в цервикальном эпителии с распределением всех случаев на рецепторпозитивных (ER+ PgR+), с экспрессией одного из рецепторов ER или PgR и рецепторонегативных (ER- PgR-) показал, что частота выявления сочетанной экспрессии обоих рецепторов в латентной группе составила  $59,7 \pm 6,9\%$ , ER+ детекция - в  $30,8 \pm 8,3\%$  и PgR+ - в  $11,4 \pm 3,5\%$  наблюдений. При субклинических формах ПВИ экспрессия рецепторов эстрогенов и прогестерона отмечалась в  $90,2 \pm 5,9\%$  случаев со статистически незначимым количеством рецепторонегативных образцов ( $1,8 \pm 0,6\%$ ). Случаев ER+ PgR+ было  $44,6 \pm 5,4\%$ , при этом частота

выявления ER<sup>+</sup> и PgR<sup>+</sup> статистически незначима как по сравнению с контролем, так и группой пациенток с латентными формами ПВИ.

Таким образом, анализ коэкспрессии онкобелков E7, p53mut, bcl-2, c-erb-B2, PCNA, p16ink4D и Ki-67, соотношения метаболитов 2-гидроксиэстрогена и 16- $\alpha$ -гидроксиэстрогена с рецепцией эстрогенов и прогестерона у пациенток с латентными и субклиническими формами ПВИ позволяет более точно, как диагностировать форму ПВИ, так и определить прогноз развития неопластического процесса, и, соответственно, дифференцировать терапевтические мероприятия.

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 субклинических формах ПВИ интенсивность ЭПР сигнала спинмеченных пероксидрадикалов (LOO<sup>-</sup>) увеличивается в среднем в 1,5 раза (119%) по сравнению с латентными ( $p < 0,05$ ), также регистрируются сигналы супероксидрадикалов (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), которые при латентных формах практически не регистрируются. Увеличение интенсивности сигнала ЭПР оксида азота (NO) также возрастает почти в 2 раза (167%). То есть изменения окислительного статуса в эпителии нижнего отдела гениталий могут быть факторами, которые даже на начальных стадиях, способны нарушать структуры клеточных мембран, с изменением метаболических процессов, что играет значительную роль в патогенезе и переходе процесса в более тяжелые формы.

Исходя из данных литературы и результатов собственных исследований, была представлена концептуальная схема патогенеза формирования интраэпителиальной неоплазии нижнего отдела гениталий с возможностью малигнизации (схема 4.1).



**Схема 4.1.** Патогенетические механизмы формирования внутриэпителиального поражения нижнего отдела гениталий при папилломавирусной инфекции

Остается открытым вопрос о предрасполагающих факторах развития манифестных форм ПВИ и способности к малигнизации. Поэтому для оценки прогноза развития VIN/CIN на фоне латентных и субклинических форм ПВИ нами была разработана диагностическая таблица, в которую были включены географические, анамнестические, клинические и лабораторные данные,

позволяющая определить прогноз развития неопластической трансформации в нижнем отделе гениталий. 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%. Произведенный расчет выявил, что ДК от -26 до +18 бит (благоприятный исход) наблюдался у  $33,0 \pm 8,2\%$  пациенток (при латентных формах в 1,7 раза больше, чем при субклинических), ДК от +19 до +26 бит (95% риска перехода в VIN/CIN) наблюдался в  $52,9 \pm 3,4\%$  случаев и ДК свыше 26 бит (99% риска) – в  $14,1 \pm 4,8\%$  (при субклинических формах в 2 раза больше, чем при латентных). Таким образом, суммарно риск реализации латентных форм ПВИ в VIN/CIN более 95% выявился у 58,8% женщин, а субклинических форм у 75,2% пациенток – суммарно  $67,0 \pm 8,2\%$ .

При выявлении пациенток с латентными и субклиническими формами ПВИ до сих пор ведется дискуссия о необходимости какой-либо терапии для предотвращения их перехода в клинические формы. По нашему мнению адекватное ведение данного контингента женщин является единственной мерой вторичной профилактики рака нижнего отдела гениталий. Несмотря на доказанную вирусную этиологию рака вульвы, влагалища и 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 настоящее время продолжается поиск новых подходов к профилактической терапии, направленной на минимизацию перехода латентных и субклинических форм ПВИ в клинические. Наиболее перспективным направлением, с нашей точки зрения, представляется адъювантное использование вакцины против ВПЧ. В литературе представлены единичные публикации, посвященные оценке ее влияния на CIN после оперативного лечения, в которых отмечено уменьшение частоты

рецидивов заболевания [18, 26, 66, 76, 79, 82]. Механизм профилактического действия вакцин против ВПЧ обусловлен выработкой нейтрализующих антител, способных связываться с вирусом вне клеток, препятствуя тем самым их инфицированию, но даже если уже присутствует ВПЧ-инфицированность организма, вакцинация может приводить к появлению локальных антител в базальной мембране экзо- и эндоцервикса, которые предотвращая реинфицирование. В нашей работе было проведено исследование по профилактической терапии вакцины против ВПЧ. Методом случайной выборки все пациентки с латентными (I группа; n=174) и субклиническими (II группа; n=237) формами ПВИ были разделены на 4 группы (из исследования по разным причинам и невозможностью выполнения клинического протокола выбыли 8 женщин I и II группы): *Ia группа (n=98) латентные формы ПВИ* - наблюдение в течение 3 лет с ежегодным контролем вирусной нагрузки, расширенной кольпоскопией и взятием мазков на онкоцитологию; *Ib группа (n=74) - латентные формы ПВИ* квадριвалентная рекомбинантная вакцина против ВПЧ 6, 11, 16, 18-го типов (3 дозы: вторая и третья дозы вводились через 1 и 3 месяца после первой); *IIa группа (n=158) – субклинические формы ПВИ* - наблюдение в течение 3 лет с ежегодным контролем вирусной нагрузки, расширенной кольпоскопией и взятием мазков на онкоцитологию; *IIb группа (n=79) – субклинические формы* - квадριвалентная рекомбинантная вакцина против ВПЧ 6, 11, 16, 18-го типов (3 дозы по той же схеме). Оценку эффективности лечения проводили через 12, 24 и 36 месяцев после окончания профилактической терапии. Кроме того, была проведена коррекция сопутствующих нарушений вагинального микробиоценоза.

Мониторинг групп с латентными формами ПВИ показал при 36-месячном мониторинге следующую динамику: через 12 месяцев в Ia группе при кольпоскопическом контроле выявлен 3,1% случаев субклинической формы ПВИ; при трехгодичном наблюдении выявлено 24,5% женщин, у которых латентное ВПЧ-носительство перешло в субклиническую форму (неопластические процессы в шейке матки (CIN I) в этой группе обнаружены у 7,1% пациенток, во влагалище (VIN I) - у



2,0%). В Ib группе реализации латентных форм ПВИ в VIN/CIN не наблюдалось на всем сроке мониторинга. Субклинических форм за 3 года диагностировано 6,8%.

Положительный статус по ВПЧ (обнаружение ВПЧ высокого и низкого канцерогенного риска в детектируемых титрах вирусной нагрузки) был зафиксирован у 64,3% пациенток Ia и у 17,6 – Ib группы. При этом у подавляющей части пациенток обеих групп наблюдалось персистирование генотипов ВПЧ, диагностированных при рандомизации, что свидетельствует о высокой частоте как персистенции вирусов (50,0%), так и возможности повторного инфицирования новыми генотипами (14,3%) женщин, которым не проводилась вакцинация. Что касается небольшого числа случаев повторного инфицирования среди вакцинированных пациенток (5,4%), то все были связаны с не входящими в состав квадριвалентной вакцины генотипами ВПЧ (44, 45 и 58). А среди пациенток Ia группы, наоборот, встречались генотипы высокого канцерогенного риска (16 и 18), что повышает риск развития неопластических процессов нижнего отдела гениталий, что и закономерно проявилось в нашем исследовании. Также в этих группах проводился мониторинг динамики вирусной нагрузки ВПЧ ВКР: средняя вирусная нагрузка в группе пассивного наблюдения (Ia) за трехлетний срок была равна  $45,6 \pm 6,3$ , при этом в группе с применением вакцины против ВПЧ (Ib) она оказалась в 1,8 раз ниже ( $25,0 \pm 4,1$ ). Оценка содержания метаболитов эстрогенов выявила достоверную ( $p > 0,05$ ) динамику уменьшения пациенток с коэффициентом  $2\text{-ОНЕ}1/16\alpha\text{-ОНЕ}1$  менее 1,5 в Ib группе (в среднем низкий коэффициент  $2\text{-ОНЕ}1/16\alpha\text{-ОНЕ}1$  в ней группе уменьшился за 3 года в 1,7 раза по сравнению со стабильным (и даже несколько возросшим) коэффициентом в Ia группе). По-видимому, вакцинопрофилактика, опосредовано уменьшая вирусную нагрузку, приводит как к подавлению фосфорилирования клеточных и кодируемых вирусом белков в инфицированных клетках, так и воздействует на ферменты цитохрома P450 с увеличением выработки 2-гидроксиэстрогенов и уменьшением, соответственно, количества 16-гидроксиэстриола.

Таким образом, в группе пациенток, которым профилактически применяли квадριвалентную рекомбинантную вакцину против ВПЧ (Ib) в ходе трехгодичного мониторинга диагностировано в 3,6 раз меньшее количество субклинических форм ПВИ и отсутствие реализации латентных форм ПВИ в вульварную и цервикальную неоплазии. Также зарегистрировано статистически значимое уменьшение (в 4,1 раза) персистенции ВПЧ и появление их новых генотипов (в 2,6 раза), вирусной нагрузки высокоонкогенными типами ВПЧ (в 1,8 раза), снижение количества пациенток с низким коэффициентом метаболитов эстрогенов (ОНЕ1/16 $\alpha$ -ОНЕ1) - в 1,7 раза.

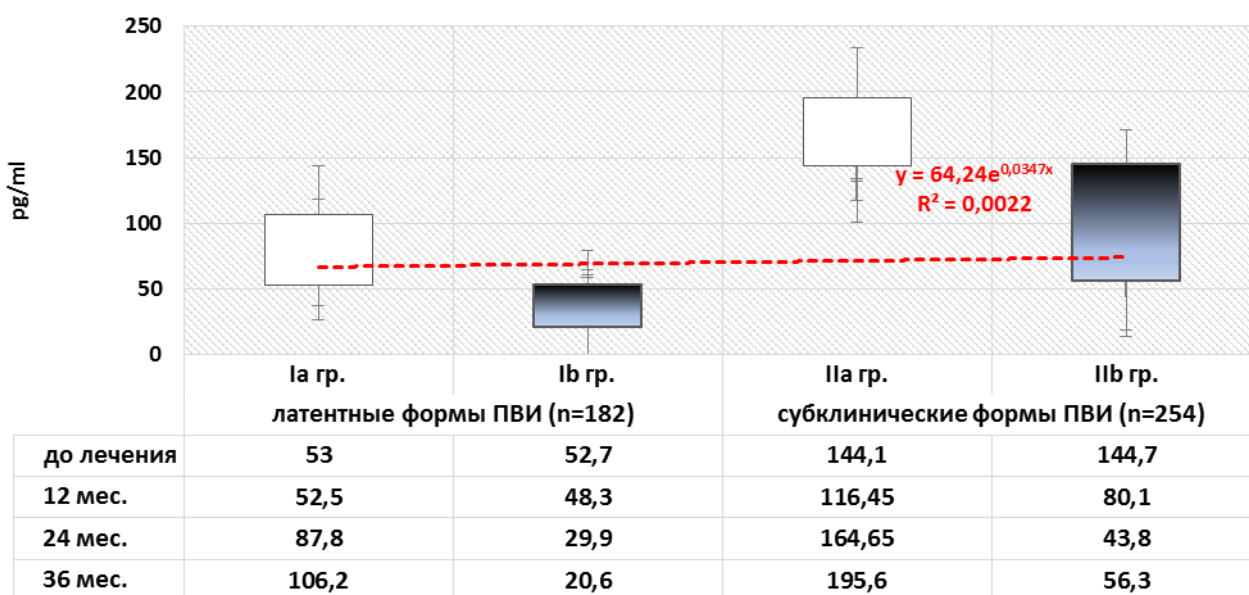
В начале исследования у пациенток с субклиническими формами ПВИ обнаружены кольпоскопические изменения слизистых, характерные для специфического вагинита и цервицита и признаки аномальных картин в виде мозаики, пунктуации, атипических сосудов 32,8 $\pm$ 4,1%, где выполнялась прицельная биопсия. При исследовании динамики кольпоскопической картины выявлено, что в группе пациенток которым проводили наблюдение в течение 3 лет (IIa группа) через 1 год у 4,4% женщин выявлены изменения эпителия шейки матки характерные CIN, при этом нормализация картины наблюдалась в 25,9% случаев, что, по-видимому, обусловлено улучшением состояния вагинального гомеостаза после проведения микробиологической санации. При последующем трехлетнем наблюдении количество CIN во IIa группе увеличилось с 4,4 до 6,9% на второй и до 18,3% на третий год мониторинга, а нормальная кольпоскопическая картина уменьшилась до 21,5%. В группе с применением вакцины против ВПЧ (IIb) на годичном сроке мониторинга нивелирование кольпоскопических признаков субклинических форм ПВИ диагностировано у 70,9% (утяжеления неопластических процессов в виде VIN/CIN не наблюдалось), а через 36 месяцев наблюдения нормальная кольпоскопическая картина присутствовала у 79,7% пациенток. Кроме того, в ходе динамического наблюдения был выявлен женщины с ASC-US: во IIa группе – 2,5%, во IIb группе – 1,3%. Таким образом, по результатам оценки кольпоскопических признаков ВПЧ-поражения нижнего отдела гениталий с

трехгодичным мониторингом пациенток с субклиническими формами ПВИ выявлено, что пассивное динамическое наблюдение с микробиологической санацией урогенитального тракта ведет к нормализации кольпоскопической картины в  $27,8 \pm 7,3\%$ , а применение при данной патологии вакцинации против ВПЧ улучшает кольпоскопическую картину на  $75,9 \pm 4,4\%$  - эффективность выше в 2,7 раза. Детекция генотипа ВПЧ пациенткам субклиническими формами ПВИ с определением клинически значимой вирусной нагрузки выявило, что во Па группе ПЦР-негативация ДНК ВПЧ обнаружена у  $71,1 \pm 11,7\%$  пациенток, во Пб – у  $18,1 \pm 1,9\%$  (в 3,9 раз чаще, чем во Па). Персистирование генотипов ВПЧ, диагностированных при рандомизации, наблюдалось у  $72,1\%$  пациенток Па и  $10,1\%$  Пб группы (в 7 раз реже), повторное инфицирование среди вакцинированных пациенток было в минимальном количестве -  $6,3\%$  и, в основном, было связано с не входящими в состав квадριвалентной вакцины генотипами ВПЧ (45, 52 и 66). Результаты анализа вирусной нагрузки в этих группах, что высокая ВПЧ нагрузка ( $>5 \text{ Lg}$ ) в среднем наблюдалась в  $53,15 \pm 1,25\%$ . Снижение высокой вирусной нагрузки у пациенток Па группы зарегистрировано в среднем до  $29,7 \pm 2,6\%$ , во Пб -  $2,1 \pm 0,4\%$  (в 14 раз больше). Оценка сравнительной эффективности профилактической терапии субклинических форм ПВИ (вакцинация против ВПЧ) по сравнению с динамическим наблюдением выявило, в среднем, в 10 раз большую (по критериям как ПЦР-негативации ВПЧ, так и уменьшения вирусной нагрузки) эффективность проведения противовирусной терапии и вакцинопрофилактики.

Оценка динамики сочетания экспрессии биомаркера p16ink4D и низкого коэффициента 2-ОНЕ1/16 $\alpha$ -ОНЕ1 (менее 1,5) у пациенток с субклиническими формами ПВИ показал следующие результаты: в течение годичного мониторинга экспрессия биомаркера p16ink4D во Па группе уменьшилась с 6,7 до 3,1%, в последующие 2 года она несколько увеличилась (средние трехгодичные значения составили  $4,1 \pm 0,95\%$ ), то есть снизились в 1,6 раз; во Пб группе через 1 год данный биомаркер не был обнаружен, в течение последующего мониторинга его количество определялось в 7,7 раз меньше исходного ( $0,9 \pm 0,1\%$ ). Низкий коэффициент 2-

ОНЕ1/16 $\alpha$ -ОНЕ1 (менее 1,5) во IIa группе тестировался в среднем в  $25,8 \pm 4,85\%$  (снизился в 0,6 раза), во IIb - в  $7,2 \pm 1,2\%$  случаев (уменьшился в 5,6 раза). Изучение сравнительной эффективности лечения субклинических форм ПВИ по динамике изменения гиперэкспрессии p16ink4 $\alpha$  и снижению коэффициента 2-ОНЕ1/16 $\alpha$ -ОНЕ1 выявило высокую терапевтическую эффективность вакцинации против ВПЧ (в 3,1 раза больше, чем при динамическом наблюдении).

Одним из маркеров активности вируса папилломы человека может служить в качестве диагностического критерия как активности процесса, так и тяжести поражения при субклинических и клинических неопластических процессах эпителия нижнего отдела гениталий, концентрация в цервикагинальной слизи цитокина TGF $\beta$ , что позволяет прогнозировать течение инфекции и контролировать качество менеджмента. При уровне продукции TGF $\beta$  менее 150 пкг/мл у ВПЧ-позитивных пациенток возможно проведение ежегодного скринингового обследования, выявление его концентраций TGF $\beta$ , превышающих 150 пкг/мл пациенток требует дополнительного цитологического обследования и проведения соответствующих терапевтических мер.



**Рисунок 4.1.** Динамика TGF $\beta$  в группах в процессе терапии

В нашем исследовании анализ динамики локальной концентрации TGF $\beta$  в исследуемых группах показал следующие результаты: в группах латентных и субклинических форм ПВИ, где проводилось лишь наблюдение, средние значения TGF $\beta$  за трехлетний период менеджмента были в пределах  $74,9 \pm 11,7$  пг/мл ( Ia группа) и  $155,2 \pm 21,9$  пг/мл ( Па группа), то есть повысились от исходных значений в 1,4 и 1,1 раза соответственно (рис. 4.1). В группах, где применялась вакцинация против ВПЧ данный провоспалительный цитокин уменьшился до  $37,9 \pm 9,1$  пг/мл (Ib группа) и  $81,2 \pm 49,3$  пг/мл (IIa группа) – снизился в 1,4 и 1,8 раз.

Таким образом, сравнительный анализ клинико-микробиологической эффективности менеджмента пациенток с субклиническими формами ПВИ показал, что предлагаемый комплексный профилактический метод лечения с использованием вакцинации квадривалентной вакциной против ВПЧ является более эффективным в отношении микробиологической санации, а также имеет значительно более высокую клиническую эффективность, заключающуюся в исчезновении кольпоскопических проявлений субклинических форм ПВИ, практически отсутствию их утяжеления с переходом в вульварную и цервикальную неоплазии, активации иммунных механизмов саногенеза и нормализации вагинального гомеостаза.

## **Глава 5. Алгоритм менеджмента пациенток с латентными и субклиническими формами папилломавирусной инфекции**

На основании систематизация проанализированных клинических, микробиологических, иммунологических, цитохимических и молекулярно-биологических факторов, ассоциированных с ВПЧ-поражением нижнего отдела женских гениталий с возможной неопластической трансформацией эпителиоцитов этой области, был разработан алгоритм ведения пациенток с латентными и субклиническими формами ПВИ, который позволяет индивидуализировать объем лечебно-диагностических мероприятий и повысить эффективность ведения данной категории пациенток (схема 5.1).

В проблеме профилактики, ранней диагностики и менеджмента латентных и субклинических форм ПВИ можно выделить несколько направлений: во-первых, обнаружение ВПЧ (особенно высокого канцерогенного риска) с определением степени вирусной активности, во-вторых, подтверждение наличия и оценка степени тяжести неопластического процесса, и, в-третьих, индивидуализация тактики ведения таких пациенток.

В настоящее время в РФ, как и во всем мире рекомендуется проведение комплексного исследования, включающего расширенную кольпоскопию, позволяющую обнаружить патологически изменённые участки ткани и выявить границы поражения, что является необходимым условием для проведения биопсии, цитологическое исследование (предпочтительно жидкостной Pap-тест) и типирование ВПЧ. Особого внимание заслуживает активно используемое в последнее время первичной диагностике ПЦР ВПЧ-тестирование, которое в отличие от цитологии, является более объективным с низкой лабораторной вариабельностью. К числу современных методов относится ПЦР-анализ с определением вирусной нагрузки и установлением порога клинически значимого количества вируса, что, по нашему мнению, может быть критерием не только диагностики, но и стать одним из прогностических маркеров излеченности.

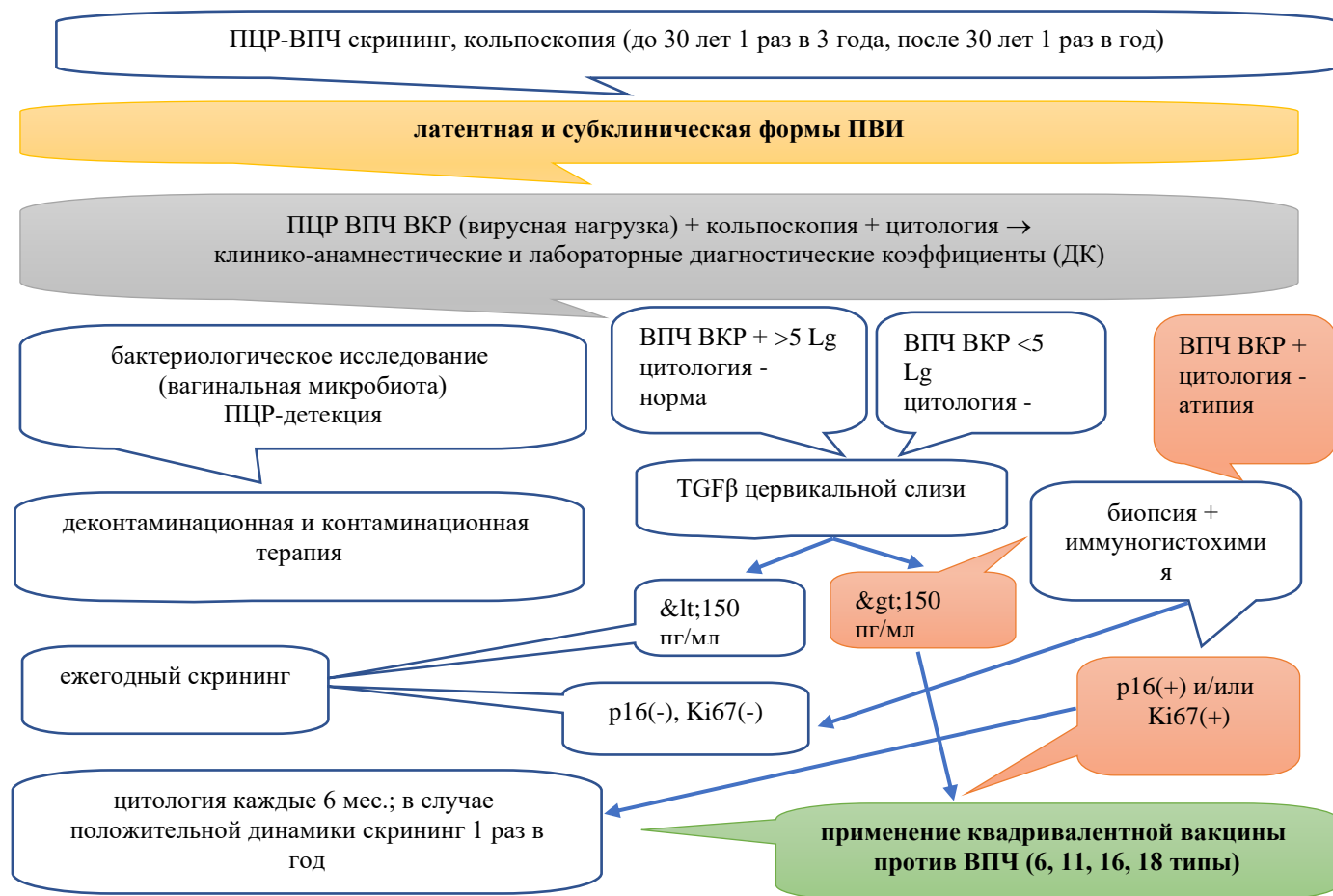
Также особый интерес представляют факторы, помогающие прогнозировать течение ПВИ и, соответственно, развитие интраэпителиальной неоплазии. Также в прогнозировании течения заболевания немаловажно определить не только присутствие вируса, но и подтвердить, находится он в активной или латентной стадии. Особого внимания заслуживают пациентки с латентной и субклинической формами ПВИ, вызванной высококанцерогенными типами, но без цитологических признаков предраковых заболеваний нижнего отдела гениталий. При таких вариантах основной задачей является оценка вирусной активности и своевременная диагностика реализации вирусной инфекции. В качестве критерия оценки тяжести неопластического поражения может использоваться анализ концентрации TGF  $\beta$  в цервиковагинальной слизи, позволяющего прогнозировать как течение инфекции, так и контролировать качество менеджмента - при уровне продукции TGF  $\beta$  менее 150 пкг/мл возможно проведение ежегодного скринингового обследования, при более высоких концентрациях требуется дополнительное цитологическое обследование с возможным применением вакцинации против ВПЧ.

Необходимо обратить внимание на пациенток с детектированной субклинической формой ПВИ при положительных результатах кольпоскопии и цитологии и отсутствием ВПЧ, которых не стоит исключать из скринингового обследования в связи с погрешностью в заборе материала, наличии редких типов ВПЧ, не идентифицирующихся в используемых тест-системах, проведение анализа на невалидных тест-системах.

Прогнозирование течения ВПЧ-инфекции основывается на проведении иммуногистохимического исследования материала влагалища и шейки матки. Благоприятное клиническое течение процесса взаимосвязано с отсутствием экспрессии p16ink4 $\alpha$ , p53mut, умеренным уровнем bcl-2, низкой экспрессией c-erb-B2 и PCNA, наличием экспрессии рецепторов эстрогенов и прогестерона.

Предложенное разделение пациенток на группы низкого и высокого риска реализации интраэпителиальных неоплазий с расчетом диагностических

коэффициентов предполагают возможность выбора оптимальной тактики ведения, что позволяет прогнозировать течение заболевания и контролировать терапию. При выборе тактики ведения пациенток с латентными и субклиническими формами ПВИ в первую очередь необходимо учитывать контроль качества вторичной профилактики и лечения, с минимизацией их перехода в более выраженный патологический процесс.



**Схема 5.1.** Алгоритм ведения пациенток с латентными и субклиническими формами папилломавирусной инфекции

Дифференциальная диагностика с латентных и субклинических форм ПВИ при сочетании с молекулярно-биологическими факторами, должна проводиться с фоновыми воспалительными процессами, которые способствуют персистенции вируса и прогрессированию степени пренеоплазии., при этом необходимо



обязательный комплексный анализ состояния вагинальной микробиоты с проведением этиотропной контаминационной и деконтаминационной терапии.

В заключение необходимо отметить, что своевременная диагностика и рациональное ведение латентных и субклинических форм папилломавирусной инфекции является реальной основой профилактики интраэпителиальных неоплазий и рака шейки матки.

## ВЫВОДЫ

1. В Краснодарском крае за 5 лет (2016–2020 гг.) количество женщин, носителей ВПЧ, увеличилось в 1,7 раза, а субклинических форм - в более чем 10 раз. В зону повышенного риска заболеваемости ВПЧ-ассоциированной патологией входит 44,7% территории края. Основными типами ВПЧ являлись 16 ( $54,4 \pm 3,1\%$ ), 18 ( $18,65 \pm 2,4\%$ ), 31 ( $11,85 \pm 1,9\%$ ) и 51 ( $14,6 \pm 1,4\%$ ); из низконкогенных эпидемиологическое значение имеют 6 ( $24,0 \pm 1,4\%$ ) и 11 типы ВПЧ ( $19,45 \pm 1,3\%$ ).
2. Основной уровень инфицированности ВПЧ происходит уже с первыми половыми контактами, наибольшее количество латентных форм ПВИ приходится на возраст 17–25 лет (70,7%), пик обнаружения субклинических форм - в возрасте 26–30 лет (30,9%); суммарно реализация ВПЧ-носительства в субклинические формы происходит в возрасте  $28,4 \pm 2,6$  лет. При этом первичная профилактика ВПЧ-инфекции в регионе находится на достаточно низком уровне (за 12 лет ВПЧ-вакцинацию прошли 7271 жительницы края - 0,24% от всего женского населения региона).
3. Предикторами активации цитолитических и неопластических процессов в эпителии нижнего отдела гениталий служат нарушения вагинального микробиоценоза (изменение коэффициентов соотношений условно-патогенной микрофлоры к лактобактериям), биохимического состава вагинальной жидкости (снижение уровня перекиси водорода и молочной кислоты, глюкозы, железа и меди, повышение активности внутриклеточных ферментов и амилазы).

4. Локальные иммунные изменения при латентных и субклинических формах ПВИ, характеризующиеся снижением концентрации провоспалительных цитокинов  $IFN\gamma$ ,  $IL-1\beta$  и  $TNF\alpha$ , активности миелопероксидазы и неспецифической эстеразы в макрофагах цервиковагинальной зоны, приводят к оксидативным нарушениям в эпителиоцитах с повышением образования реактивных форм кислорода и азота, вызывающего пероксидативные процессы липидов, интенсивное образование свободнорадикальных форм кислорода, предопределяя возникновение локальной иммуносупрессии и возможность перехода в клиническую стадию.
5. Комплексный анализ экспрессии  $p16ink4\alpha$ ,  $p53mut$ ,  $bcl-2$ ,  $c-erb-B2$ , PCNA, соотношения метаболитов 2-гидроксиэстрогена и 16- $\alpha$ -гидроксиэстрогена, локальной продукции  $TGF\beta$  позволяет более точно диагностировать стадию инфекции, определить прогноз развития неопластического процесса и дифференцировать терапевтические мероприятия.
6. Расчет диагностических коэффициентов риска перехода латентных и субклинических форм ПВИ в неопластические процессы нижнего отдела гениталий позволяет прогнозировать их исход. Риск реализации латентных форм ПВИ в VIN/CIN более 95% был выявлен у 58,8% женщин, а субклинических форм у 75,2% – суммарно  $67,0\pm 8,2\%$ .
7. При латентных формах ПВИ на фоне коррекции дисбиотических вагинальных нарушений вакцинация квадριвалентной рекомбинантной вакциной против ВПЧ 6, 11, 16, 18-го типов позволила в ходе трехгодичного мониторинга снизить в 3,6 раз количество субклинических форм ПВИ с отсутствием ее реализации в вульварную и цервикальную неоплазию, уменьшить (в 4,1 раз) персистенцию ВПЧ и появление их новых генотипов (в 2,6 раз), вирусную нагрузку высокоонкогенными типами ВПЧ (в 1,8 раз), количество пациенток с низким коэффициентом метаболитов эстрогенов ( $ONE1/16\alpha-ONE1$ ) в 1,7 раз.

8. При субклинических формах ПВИ применение вакцинации против ВПЧ показало высокую эффективность - в 2,7 раза ( $75,9 \pm 4,4\%$  «нормальных» кольпоскопических картин против  $27,8 \pm 7,3\%$  - пассивное наблюдение).
9. Разработанный алгоритм менеджмента пациенток с латентными и субклиническими формами с расчетом диагностических коэффициентов и вакцинацией против ВПЧ позволяет оптимизировать диагностическую и лечебную тактики их ведения, и снизить реализацию данной патологии в интраэпителиальные неоплазии.

### **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

1. На этапе диагностики ВПЧ-ассоциированных заболеваний нижнего отдела гениталий необходимо комплексное обследование, включающее кольпоскопию, цитологию, ПЦР-тестирование ВПЧ высокого канцерогенного риска.
2. При составлении прогноза течения латентных и субклинических форм ПВИ необходимо учитывать клинико-anamnestические и лабораторные данные, позволяющие произвести индивидуальный расчет диагностических коэффициентов - суммы полученных битов (приложение 1-2). Для повышения качества прогноза целесообразно оценить уровень TGF $\beta$  в цервикальной слизи: при значении TGF $\beta$   $\geq 150$  пкг/мл требуется продолжить обследование на экспрессию иммуногистохимических маркеров (p16ink4 $\alpha$  и/или Ki-67). При отсутствии возможности оценки молекулярных и иммунных маркеров неоплазии можно ориентироваться на клинико-anamnestические данные.
3. Пациенткам с латентными и субклиническими формами ПВИ рекомендуется микробиологическая санация (деконтаминационная и контаминационная терапия) с ежегодным контролем ВПЧ ВКР, цитологическим исследованием и кольпоскопией. При выявлении высоких ( $\geq 95\%$ ) коэффициентов риска, рассчитанных по таблице прогностических признаков (или высоких клинико-anamnestическим рискам), рекомендуется проведение вакцинации против ВПЧ (обязательное взятие информированного добровольного согласия) (схема 5.1).

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Акопова Е.С., Роговская С.И., Бебнева Т.Н., Бадалова Л.А. ВПЧ - ассоциированная патология гениталий: актуальные вопросы диагностики и лечения. Российский вестник акушера-гинеколога. 2018;4:94-98.
2. Акуленко Л.В. Клиническая лекция: о наследственном раке органов женской репродуктивной системы. Онкогинекология. 2016;1:24-31.
3. Аполихин О.И., Баранов А.А., Зароченцева Н.В., Краснопольский В.И. Вакцинопрофилактика заболеваний, вызванных вирусом папилломы человека. Методические рекомендации для врачей. Москва, 2021.
4. Аполихина И.А., Денисова Е.Д. Лечебные и профилактические аспекты папилломавирусной инфекции гениталий. Эффективная фармакотерапия в акушерстве и гинекологии. 2019;1:26-28.
5. Ашрафян Л.А., Киселев В.И. Современные возможности профилактики и ранней диагностики предрака и рака репродуктивных органов. Акушерство и гинекология. 2019;4:50-52.
6. Ашрафян Л.А., Харченко Н.В., Огрызкова В.Л., Антонова И.Б. Принципы лечения пре- и инвазивного рака шейки матки. Практическая онкология. 2020;3(3):173-177.
7. Бахидзе Е.В., Аршавская И.Л. Роль вируса папилломы человека в диагностике, мониторинге и прогнозе рака шейки матки. Сибирский онкологический журнал. 2018;3(51):34- 40.
8. Бебнева Т.Н., Прилепская В.П. Папилломавирусная инфекция и патология шейки матки. Гинекология. 2017;3(3):77–81.
9. Блатова О.Л., Конторщикова К.Н., Андросова Л.Д. и соавт. Анализ частоты выявления онкогенных типов вируса папилломы человека у женщин с гинекологической патологией. Вестник дерматовенеролога. 2017;1:66-68.
10. Боровиков И.О., Герасименко Е.Э. Коррекция нарушений цитобиохимических процессов в слизистой шейки матки при цервикальной интраэпителиальной

- неоплазии. РМЖ. Мать и Дитя. 2018;1(2):108-111 DOI: 10.32364/2618-8430-2018-1-2-108-111
- 11.Боровиков И.О., Кравцова Е.И., Булгакова В.П. Место аммония глицирризината в лечении и профилактике ВПЧ-ассоциированных поражений шейки матки. Медицинский совет. Акушерство и гинекология. 2017;2:116-121.
  - 12.Боровиков И.О., Куценко И.И. Опыт применения иммуномодулирующего препарата в терапии папилломавирусной инфекции гениталий у женщин. Акушерство и гинекология. 2018;3:122-128 DOI: <https://dx.doi.org/10.18565/aig.2018.3.122-128>
  - 13.Боровиков И.О., Холина Л.А., Кравцова Е.И., Авакимян В.А., Никогда Ю.В. Сравнительный анализ вирусологического исследования и определения маркеров пролиферации у пациенток с латентными формами папилломавирусной инфекции и цервикальным интраэпителиальным поражением легкой степени. Современные проблемы науки и образования. 2016;6:URL: <https://www.science-education.ru/ru/article/view?id=25926>
  - 14.Вишневский А.С., Сафронникова Н.Р. Дискуссионные вопросы лечения папилломавирусной инфекции шейки матки. Практическая онкология. 2020;3(3):166-172.
  - 15.Гайворонская А.Г., Галицкая М.Г. Новая вакцина для профилактики рака шейки матки. Педиатрическая фармакология. 2016;5(6):2-8
  - 16.Гинекология: национальное руководство. Под ред. Савельевой Г.М., Сухих Г.Т., Серова В.Н., Радзинского В.Е., Манухина И.Б. 2-е изд., перераб. и доп. М.:ГЭОТАР Медиа, 2017;1017
  - 17.Давыдов А.И., Шахламова М.Н., Лебедев В.А. Хирургическое и послеоперационное лечение патологии шейки матки, ассоциированной с вирусом папилломы человека. Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. 2019;18(1):11-19. DOI: 10.20953/1726-1678-2019-1-11-19
  - 18.Долгушина В.Ф., Абрамовских О.С. Распространенность различных генотипов ВПЧ при патологии шейки матки. Акушерство и гинекология. 2017;4:69-74.

19. Долгушина В.Ф., Ахматова А.Н., Телешева Л.Ф. и соавт. Персистенция папилломавирусной инфекции у женщин с хроническим цервицитом. Уральский медицинский журнал. 2017;3(68):91-94.
20. Долгушина В.Ф., Телешева Л.Ф., Ахматова А.Н., Абрамовских О.С. Клинико-иммунологическое обоснование иммуотропной терапии хронического цервицита, ассоциированного с папилломавирусной инфекцией. Уральский медицинский журнал. 2019;3(57):58-62.
21. Евстигнеева Н.П. Экспрессия онкобелка E7 у пациенток с урогенитальной папилломавирусной инфекцией. Российский журнал кожных и венерических болезней. 2016;2:4-6.
22. Евстигнеева Н.П., Кузнецова Ю.Н., Герасимова Н.М. Способы диагностики папилломавирусной инфекции. Описание изобретения к патенту. 2018;1-14.
23. Зароченцева Н.В., Джиджихия Л.К., Набиева В.Н. Мониторинг пациенток с цервикальной интраэпителиальной неоплазией после эксцизионных методов лечения. Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. 2021;20(1):113–120. DOI: 10.20953/1726-1678-2021-1-113-120
24. Зароченцева Н.В., Джиджихия Л.К., Набиева В.Н. Рецидивы цервикальных интраэпителиальных неоплазий после применения эксцизионных методов лечения. Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. 2020;19(2):68-77. DOI: 10.20953/1726-1678-2020-2-68-77
25. Зароченцева Н.В., Джиджихия Л.К., Набиева В.Н. Эффективность вакцинации против ВПЧ в профилактике рецидивов цервикальных интраэпителиальных неоплазий после эксцизионных методов лечения. Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. 2021;20(4): 38–44. DOI: 10.20953/1726-1678-2021-4-38-44
26. Зароченцева Н.В., Краснопольская К.В., Исакова К.М., Башанкаева Ю.Н. Эффективность программы экстракорпорального оплодотворения при бесплодии

- у пациенток с вирусом папилломы человека. Проблемы репродукции. 2021;27(4):108-116.
27. Киселёв В.А., Свешников П.Г., Барановская П.М. и соавт. Онкомаркер E7 вируса папилломы человека - новый маркер ранних стадий канцерогенеза. Terra medica. 2017;1:39-44.
28. Киселев В.И. Этиологическая роль вируса папилломы человека в развитии рака шейки матки: генетические и патогенетические механизмы. Цитокины и воспаление. 2017;2(4):31-38.
29. Киселева В.И., Крикунова Л.И., Любина Л.В. Инфицирование вирусом папилломы человека высокого канцерогенного риска и прогноз рака шейки матки. Вопросы онкологии. 2020;56(2):185-190.
30. Климов Е.А. Интеграция вирусов папилломы человека в геном клетки хозяина и патогенез рака шейки матки. Успехи современной биологии. 2020;130(4):381-389.
31. Коломиец Л.А. Клинико-морфологические аспекты цервикальной папилломавирусной инфекции. Вопросы онкологии. 2016;48(1):43-46.
32. Комарова Е.В., Минкина Г.Н., Гаврикова М.В., Храмова О.К. Вирус папилломы человека - тестирование и генотипирование в диагностике цервикальных интраэпителиальных неоплазий. Акушерство и гинекология. 2018;1:54-61.
33. Короленкова Л.И. Снижение вирусной нагрузки, определённой методом гибридного захвата, у больных тяжелыми интраэпителиальными неоплазиями шейки матки, как результат эффективной предэксцизионной терапии аллокином-альфа. Акушерство и гинекология. 2016;4(2):78-82.
34. Краснопольский В.И., Зароченцева Ю.М., Белая О.Ю. и соавт. Инфицированность вирусом папилломы человека среди девочек-подростков в Московской области. Российский вестник акушера-гинеколога. 2017;10(5):46-49.
35. Кубанов А.А. Факторы риска инфицирования вирусом папилломы человека и молекулярные механизмы злокачественной трансформации инфицированных тканей. Вестник дерматологии и венерологии. 2017;3:21-24.

36. Кузнецова Ю.Н., Евстигнеева Н.П., Обоскалова Т.А. Комплексная терапия манифестных проявлений папилломавирусной инфекции урогенитального тракта. Современные проблемы дерматовенерологии, иммунологии и врачебной косметологии. 2019;3(6):27-31.
37. Мальцева Л.И., Фаррахова Л.Н., Кучеров В.А. и соавт. Генитальные кондиломы у женщин: факты и противоречия. Российский вестник акушера-гинеколога. 2017;2:78-80.
38. Минкина О.В. Генитальная папилломавирусная инфекция и возможность её профилактики. Современные проблемы дерматовенерологии, иммунологии и врачебной косметологии. 2017;1(3):3-10.
39. Молочков А.В., Хлебникова А.Н., Баграмова Г.Э., Гуреева М.А. Противовирусная терапия в лечении генитальной папилломавирусной инфекции. Эффективная фармакотерапия в дерматовенерологии и в дерматокосметологии. 2018;2:3-6.
40. Намазова-Баранова Л.С., Краснопольский В.И., Сухих Г.Т., Прилепская В.Н., Зароченцева Н.В. Достижения и перспективы в профилактике рака шейки матки в России. Профилактика рака шейки матки. Руководство для врачей под редакцией Г.Т. Сухих и В.Н. Прилепской. 2017. М. МЕДпресс-информ. 182 с.
41. Овчинников Ю.М., Киселев В.И., Солдатский Ю.Л. Распространенность типов вируса папилломы человека и их влияние на течение заболевания у детей, страдающих рецидивирующим папилломатозом. Вестник отоларингологии. 2017;2:9-11.
42. Подзолкова Н.М., Роговская С.И., Фадеев И.Е., Дамиров М.М., Созаева Л.Г. Папилломавирусная инфекция в акушерстве и гинекологии Практическое руководство для врачей. Москва. ГЭОТАР-Медиа. 2017.
43. Прилепская В.Н. Костава М.Н. Возможности терапии папилломавирусной инфекции. Гинекология. 2019;17(1):16-19.
44. Роговская С.И. Клинико-морфологические особенности папилломавирусной инфекции гениталий у женщин. Гинекология. 2018;6(2):36-42.



- 45.Роговская С.И., Михеева И.В., Шипулина О.Ю. Распространенность папилломавирусной инфекции в России. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2017;1:25-33.
- 46.Серов В.Н., Твердикова М.А., Тютюнник В.Л. Папилломавирусная инфекция гениталий: основные принципы лечения. РМЖ. Мать и дитя. Акушерство и гинекология. 2019;1170-1174.
- 47.Сингер А.Н., Хан А.А. Предраковые заболевания шейки матки, влагалища, вульвы. Диагностика и лечение. Под ред. С.И. Роговской ГЭОТАР Медиа, 2017.
- 48.Унанян А.Л., Сидорова И.С., Коссович Ю.М. и соавт. Вопросы патогенеза и терапии заболеваний шейки матки, ассоциированных с папилломавирусной инфекцией. Акушерство, гинекология и репродукция. 2019;1:27-30.
- 49.Хрянин А.А., Решетников О.В., Коломиец Л.А. Новые возможности профилактики папилломавирусной инфекции. Вестник дерматологии и венерологии. 2019;5:49-55.
- 50.Чулкова О.В., Новикова Е.Г., Соколова В.В. Диагностика и лечение фоновых и предраковых заболеваний вульвы. Сибирский онкологический журнал. 2017;5(53):18-22.
- 51.Alonso Torné A ж, Puig-Tintoré L. et al. Pre- and post-conization high-risk HPV testing predicts residual/recurrent disease in patients treated for CIN 2-3. Gynecol Oncol. 2016;103(2):631-636. DOI: 10.1016/j.ygyno.2016.04.016
- 52.Arbyn M. Schenck U., Ellison Metaanalysis of the accuracy of rapid prescreening relative to full screening of pap smears. Cancer. 2019;99:9-16.
- 53.Athanasiou Veroniki Efthimiou O. et al. Comparative efficacy and complication rates after local treatment for cervical intraepithelial neoplasia and stage 1a1 cervical cancer: protocol for a systematic review and network meta-analysis from the CIRCLE Group. BMJ Open. 2019;9(8):028008. DOI: 10.1136/bmjopen-2018-028008

54. Barken Lyng E., Andersen Rebolj M. Long-term adherence to follow-up after treatment of cervical intraepithelial neoplasia: nationwide population-based study. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2019;92(7):852-7. DOI: 10.1111/aogs.12116
55. Basu Taghavi K., Hu S. Management of cervical premalignant lesions. *Curr Probl Cancer.* 2018;42(2):129-136. DOI: 10.1016/j.currproblcancer. 2018.01.010
56. Bekkers R., Meijer Massuger L. et al. Effects of HPV detection in population-based screening programmes for cervical cancer. *Gynecol Oncol.* 2016;100(3):451-454.
57. Bjørnerem Sørbye Skjeldestad F. Recurrent disease after treatment
58. Bollman Mehes Torka R. et al. Human papillomavirus typing and DNA ploidy determination of squamous intraepithelial lesions in liquid-based cytologic samples. *Cancer ( Cancer Cytopathology).* 2016;99:57-62.
59. Bosch Castellsague X. HPV and cervical cancer: screening or vaccination? *British Journal of Cancer.* 2018;98:15-21.
60. Bosch Lorinez Munos N. The causal relation between papillomavirus and cervical cancer. *Journal of clinical partology.* 2020;55(4):244-265.
61. Brown D., Shew Qadadri B. et al. A longitudinal study of genital human papillomavirus infection in a cohort of closely followed adolescent women. *J. Infect. Dis.* 2017;191(2):182-192.
62. cervical intraepithelial neoplasia – The importance of a flawless definition
63. Chen L., Liu L., Tao X. et al. Analysis of recurrence and its influencing factors in patients with cervical HSIL within 24 months after LEEP. *Zhonghua Fu Chan Ke Zhi.* 2019;54(8):534-540. DOI: 10.3760/cma.j.issn. 0529-567x.2019.08.006. Chinese.
64. *Comprehensive Cervical Cancer Control: A Guide to Essential Practice.* 3d edition. Geneva: World Health Organization; 2019.
65. Cristiani P., De Nuzzo M., Costa S. et al. Workgroup on Treatment of Emilia-Romagna Region Committee for Clinical Quality Assurance in Cervical Screening. Follow-up of screening patients conservatively treated for cervical intraepithelial neoplasia grade 2-3.

- Eur Obstet Gynecol Reprod Biol. 2017;133(2):227-31. DOI: 10.1016/j.ejogrb.2017.05.020
- 66.Critchlow Koutsky L. Epidemiology of human papillomavirus infection. Mindel A., editor. Genital warts. Human papillomavirus infection. London. Edward Arnold. 2016:53-81.
- 67.Cuschieri K., Bhatia R., Cruickshank M. HPV testing in the context of post-treatment follow up (test of cure). J Clin Virol. 2018;76(1):56-61. DOI: 10.1016/j.jcv.2015.10.008
- 68.De Sanjose S. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papilloma virus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. Lancet Infectious Diseases. 2017;7:453-9.
- 69.De Vuyst H. Prevalence and type distribution of human papillomavirus in carcinoma and intraepithelial neoplasia of the vulva, vagina and anus: A meta-analysis // Int. J. Cancer. 2019;124(7):1626-1636.
- 70.Eijsink J., de Bock G., Kuiper J. et al. Routine follow-up intervals in patients with high-grade squamous intraepithelial lesions (HSIL) and free excision margins can safely be increased in the first two years after Large Loop Excision of the Transformation Zone (LLETZ). Gynecol Oncol. 2009;113(3):348-51. DOI: 10.1016/j.ygyno.2008.11.022
- 71.El-Nashar Shazly S. Electrosurgical Excision Procedure Instead of Cold-Knife Conization for Cervical Intraepithelial Neoplasia in Women with Unsatisfactory Colposcopic Examinations: A Systematic Review and Meta-Analysis. J Low Genit Tract Dis. 2017;21(2):129-136. DOI: 10.1097/LGT.0000000000000287
- 72.Fairley C., Donovan B. What can surveillance of genital warts tell Sexual health. 2020;7(3):325-337.
- 73.Garland Paavonen Jaisamrarn U. et al. Prior human papillomavirus-16/18 AS04-adjuvanted vaccination prevents recurrent high grade cervical intraepithelial neoplasia after definitive surgical therapy: Post-hoc analysis from a randomized controlled trial. Int Cancer. 2016;139(12):2812-2826. DOI: 10.1002/ijc.30391

74. Gosvig Huusom L., Andersen K. et al. Long-term follow-up of the risk for cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or worse in HPV-negative women after conization. *Int Cancer*. 2016;137(12):2927-33. DOI: 10.1002/ijc.29673
75. Greenspan Faubion Coonrod D. Compliance after loop electrosurgical excision procedure or cold knife cone biopsy. *Obstet Gynecol*. 2017;110(3):675-80. DOI: 10.1097/01.AOG.0000278568.29660.9b
76. Hampl Deckers-Figiel Hampl D. Rain H. Bender New aspects in vulvar cancer: changes in localization and age of onset. *Gynecol. Oncol*. 2018;109:340-5.
77. Hoffman S., Le T., Lockhart A. et al. Patterns of persistent HPV infection after treatment for cervical intraepithelial neoplasia (CIN): A systematic review. *Int Cancer*. 2017;141(1):8-23. DOI: 10.1002/ijc.30623
78. Joura E., Garland Paavonen J. et al. Effect of the human papillomavirus (HPV) quadrivalent vaccine in a subgroup of women with cervical and vulvar disease: retrospective pooled analysis of trial data. *BMJ*. 2019;344:e1401. DOI: 10.1136/bmj.e1401
79. Kanayama S, Nakagawa E, Ueno Muraji Wakahashi Sudo T, et al. Outcomes of Laser Conization for Cervical Intraepithelial Neoplasia 2–3 and Microinvasive Cervical Cancer. *World Oncol*. 2017;5(2):62-67. DOI: 10.14740/wjon799w
80. Katki H., Kinney W., Fetterman B. Cervical cancer risk for women undergoing concurrent testing for human papillomavirus and cervical cytology: a population - based study in routine clinical practice *Lancet Oncol*. 2017;12(7):663-72.
81. Kenter G. Vaccination against HPV-16 Oncoproteins for Vulvar Intraepithelial Neoplasia. *New England Journal of Medicine*. 2016;362:655-656.
82. Kocken Helmerhorst Berkhof Louwers Nobbenhuis Bais AG, et al. Risk of recurrent high-grade cervical intraepithelial neoplasia after successful treatment: a long-term multi-cohort study. *Lancet Oncol*. 2018;12(5):441-50. DOI: 10.1016/S1470-2045(18)70078-X

83. Loopik IntHout Ebisch R. et al. The risk of cervical cancer after cervical intraepithelial neoplasia grade 3: A population-based cohort study with 80,442 women. *Gynecol Oncol.* 2020;157(1):195-201. DOI: 10.1016/j.ygyno.2020.01.023
84. Massad L., Einstein M., Huh W. et al. 2017 updated consensus guidelines for the management of abnormal cervical cancer screening tests and cancer precursors. *Obstet Gynecol.* 2018;121(4):829-46. DOI: 10.1097/AOG.0b013e3182883a34
85. Morrell S., Qian L. A whole-population profile of HPV testing as a test of cure for high-grade cervical dysplasia in NSW, Australia. *J Med Screen.* 2018;21(3):151-162. DOI: 10.1177/0969141314542667
86. Munro Spilsbury K., Leung Y. et al. The human papillomavirus Test of Cure: A lesson on compliance with the NHMRC guidelines on screening to prevent cervical cancer. *Aust Obstet Gynaecol.* 2017;55(2):185-90. DOI: 10.1111/ajo.12309
87. Onuki M., Matsumoto K., Sakurai M. et al. Posttreatment human papillomavirus testing for residual or recurrent high-grade cervical intraepithelial neoplasia: a pooled analysis. *J Gynecol Oncol.* 2016;27(1):e3. DOI: 10.3802/jgo.2016.27.e3
88. Paavonen Naud P., Salmeron J. et al. Efficacy of human papillomavirus (HPV)-16/18 AS04 - adjuvanted vaccine against cervical infection and precancer caused by oncogenic HPV types (PATRICIA): final analysis of a double-blind, randomised study in young women. *Lancet.* 2019;374:301-14.
89. Palmer J., Ravenscroft S., Ellis K. et al. Does LLETZ excision margin status predict residual disease in women who have undergone post-treatment cervical cytology and high-risk human papillomavirus testing? *Cytopathology.* 2016;27(3):210-7. DOI: 10.1111/cyt.12260
90. Penna Fambrini Fallani M. Laser CO2 conization in postmenopausal age: risk of cervical stenosis and unsatisfactory follow-up. *Gynecol Oncol.* 2017;96(3):771-775. DOI: 10.1016/j.ygyno.2017.11.012
91. Peto J., Plummer Franceschi S. Time since first sexual intercourse and the risk of cervical cancer. *Int Cancer.* 2016;130(11):2638-2644.

92. Reich Lahousen Pickel H., Cervical intraepithelial neoplasia III: long-term follow-up after cold-knife conization with involved margins. *Obstet Gynecol.* 2019;99(2):193-196. DOI: 10.1016/s0029-7844(01)01683-0
93. residual disease and length of follow-up. *Eur Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2020;248:44-49. DOI: 10.1016/j.ejogrb.2020.03.022
94. Rijkaart Berkhof Rozendaal L. et al. Human papillomavirus testing for the detection of high - grade cervical intraepithelial neoplasia and cancer: final results of the POBASCAM randomized controlled trial. *Lancet Oncol.* 2019;13:78-88.
95. Ronco Dillner Elfsrom K. et al. Efficacy of HPV-based screening for prevention of invasive cervical cancer: follow-up of four European randomized controlled trials. *The Lancet.* 2016. doi:10.1016/S0140-6736(13)62218-7.
96. Smith J., Lindsay L., Hoots B. et al. Human papillomavirus type distribution in invasive cancer and high-grade cervical lesions: A meta-analysis update. *Int Cancer.* 2017;121:621-632.
97. Snijders J., Meijer C. The value of viral load in HPV detection in screening. *HPV Today.* 2016;8:8-15.
98. Soutter P. Radical surgery or radiotherapy for stage Ib-IIa cervical cancer. *Lancet.* 2017;350(9077):532. DOI: 10.1016/s0140-6736(05)63134-0
99. Soutter W., Moss B., Perryman Kyrgiou M. et al. Long-term compliance with follow-up after treatment for cervical intra-epithelial neoplasia. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2018;91(9):1103-8. DOI: 10.1111/j.1600-0412.2018.01477.x
100. Strander Ryd Wallin K. et al. Does HPV-status 6-12 months after treatment of high-grade dysplasia in the uterine cervix predict long term recurrence? *Eur Cancer.* 2017;43(12):1849-55. DOI: 10.1016/j.ejca.2007.05.016
101. Ueda M., Ueki Kanemura M. et al. Diagnostic and therapeutic laser conization for cervical intraepithelial neoplasia. *Gynecol Oncol.* 2016;101(1):143-146. DOI: 10.1016/j.ygyno.2016.10.001

102. Uijterwaal Kocken Berkhof J. et al. Posttreatment assessment of women at risk of developing high-grade cervical disease: proposal for new guidelines based on data from the Netherlands. *J Low Genit Tract Dis.* 2019;18(4):338-43. DOI: 10.1097/LGT.0000000000000012
103. Van der Heijden E., Lopes A., Bryant A. et al. Follow-up strategies after treatment (large loop excision of the transformation zone (LLETZ)) for cervical intraepithelial neoplasia (CIN): Impact of human papillomavirus (HPV) test. *Cochrane Database Syst Rev.* 2018;1:CD010757. DOI: 10.1002/14651858. CD010757.pub2
104. Velentzis L., Brotherton Canfell K. Recurrent disease after treatment for cervical pre-cancer: determining whether prophylactic HPV vaccination could play a role in prevention of secondary lesions. *Climacteric.* 2019;22(6):596-602. DOI: 10.1080/13697137.2019.1600500
105. Wang X., Li L., Bi Y., Wu H. The effects of different instruments and suture methods of conization for cervical lesions. *Sci Rep.* 2019;9(1):19114. DOI: 10.1038/s41598-019-55786-4
106. Weinmann Naleway A., Swamy G. et al. Pregnancy Outcomes after Treatment for Cervical Cancer Precursor Lesions: An Observational Study. *PLoS One.* 2017;12(1):0165276. DOI: 10.1371/journal.pone.0165276
107. Wright T., Schiffman M., Solomon D. Interim guidance for the use of human papillomavirus DNA testing as an adjunct to cervical cytology for screening. *Obstet Gynecol.* 2016;103(2):304-309.

**Приложение 1 .** Таблица прогностических критериев реализации латентных и субклинических форм папилломавирусной инфекции VIN/CIN (без молекулярно-биологических и иммунных маркеров неоплазии)

№№	ПРИЗНАК	ДК
	<b>Анамнестические признаки</b>	
1	Начало половой жизни	
	до 15 лет	+6
	15–17 лет	+3
	18–20 лет	+1
2	Возраст	
	до 20 лет	+4
	21–25 лет	+3
	26–30 лет	-2
	свыше 30 лет	+4
3	Интервал от менархе до сексуального дебюта в	
	2–3 года	+4
	4–5 лет	-1
	6 лет и более	-4
4	Количество половых партнеров	
	0	-7
	1	-2
	2	+3
	3 и более	+6
5	Курение	+6
6	Прием КОК (более 5 лет)	+1
7	ВМС	+3
8	Отягощенная онкологическая наследственность	+3
9	Метаболический синдром	+6
	<b>Клинико-лабораторные признаки</b>	
10	Аногенитальные бородавки	+7
11	Хронический цервицит	+5
12	Вагинит/вагиноз	+4
13	pH>5,5	+6
14	Инфекции, передаваемые половым путем	+4
	Гонококковая, трихомонадная инфекция	+3
	Хламидийная \ микоплазменная инфекция	+6
	Урогенитальный герпес, цитомегаловирус	+8
	Урогенитальный кандидоз	+3
	Микстинфицирование (ИИ 3 и более)	+8
	Неспецифическая условно-патогенная микрофлора	+6
15	Вагинальный биоценоз	
	Вагинит	+3
	Дисбиоз	+7
16	ВПЧ высокого онкогенного риска	+3
	Микстинфицирование высокоонкогенными типами ВПЧ	+7



Расчет диагностического коэффициента (ДК):

ДК до +12 битов - благоприятный исход (перехода латентных и субклинических форм ПВИ в VIN/CIN не предвидится)

ДК от +13 до +20 битов - вероятность реализации интраэпителиального поражения нижнего отдела гениталий

ДК более +20 битов - вероятность реализации интраэпителиального поражения нижнего отдела гениталий 99%.

**Приложение 2 .** Таблица прогностических критериев реализации латентных и субклинических форм папилломавирусной инфекции VIN/CIN

№№	ПРИЗНАК	ДК
	<b>Анамнестические признаки</b>	
1	Начало половой жизни	
	до 15 лет	+6
	15–17 лет	+3
	18–20 лет	+1
2	Возраст	
	до 20 лет	+4
	21–25 лет	+3
	26–30 лет	-2
	свыше 30 лет	+4
3	Интервал от менархе до сексуального дебюта в	
	2–3 года	+4
	4–5 лет	-1
	6 лет и более	-4
4	Количество половых партнеров	
	0	-7
	1	-2
	2	+3
	3 и более	+6
5	Курение	+6
6	Прием КОК (более 5 лет)	+1
7	ВМС	+3
8	Отягощенная онкологическая наследственность	+3
9	Метаболический синдром	+6
	<b>Клинические признаки</b>	
10	Аногенитальные бородавки	+7
11	Хронический цервицит	+5
12	Вагинит/вагиноз	+4
	<b>Лабораторные признаки</b>	
13	рН	
	>5,5	+6
	<5,5	-3
14	Инфекционный фактор	
	ИППП:	+4
	Гонококковая, трихомонадная инфекция	+3
	Хламидийная \ микоплазменная инфекция	+6
	Урогенитальный герпес, цитомегаловирус	+8
	Урогенитальный кандидоз	+3
	Микстинфицирование (ИИ 3 и более)	+8
	Неспецифическая условно-патогенная микрофлора	+6
15	Вагинальный биоценоз	
	Вагинит	+3
	Дисбиоз	+7

	Нормоценоз	-6
	Бактериальный вагиноз	+7
16	Молекулярно-биологические и иммунные маркеры неоплазии	
	Онкобелок E7	+6
	Экспрессия p53, bc1-2, c-erb-B2	+9
	Экспрессия PCNA	+6
	Гиперэкспрессия p16ink4 $\alpha$	+13
	Экспрессия Ki-67	+15
	Коэффициент 2-ONE1/16 $\alpha$ -ONE1	
	-выше 2,0	-5
	-1,5-2,0	+4
	-менее 1,5	+10
	ER+ PgR+	-5
	ER- PgR-	+10
	Повышение TGF $\beta$	+16
17	Вирусная нагрузка (ВПЧ высокого онкогенного риска)	
	низкая (<5 Ig)	-5
	высокая (>5 Ig)	+2
	Микстинфицирование высокоонкогенными типами ВПЧ с диапазоном ИИ от 3 до 6	+7

Расчет диагностического коэффициента (ДК):

ДК до +18 битов - благоприятный исход (перехода латентных и субклинических форм ПВИ в VIN/CIN не предвидится)

ДК от +19 до +26 битов - вероятность реализации интраэпителиального поражения нижнего отдела гениталий

ДК более +26 битов - вероятность реализации интраэпителиального поражения нижнего отдела гениталий 99%.