

Результаты лечения больных с цервикальными интраэпителиальными неоплазиями высокой степени тяжести, ассоциированными с вирусом папилломы человека

Т.В.Клинышкова¹, И.Б.Самосудова², Д.В.Турчанинов¹

¹ГБОУ ВПО Омская государственная медицинская академия Минздрава РФ;

²БУЗОО Женская консультация №1, Омск

Резюме

С целью определения эффективности лечения больных с цервикальной интраэпителиальной неоплазией (CIN) II, III степени тяжести, ассоциированными с вирусом папилломы человека (ВПЧ) обследовано 50 пациенток: 1-я группа (основная) – пациентки, получавшие комбинированное лечение на фоне лечения Изопринозином (n=30); 2-я группа (сравнения) – больные, получавшие традиционное хирургическое лечение (n=20). В основной группе после лечения отмечено статистически значимое снижение числа пациенток с экспрессией биомаркеров p16, Ki-67 и 2-кратным снижением экспрессии онкобелка E7. В группе сравнения тенденция к снижению не являлась статистически значимой. Эффективность лечения в основной группе была в 1,4 раза выше, чем при традиционном лечении.

Ключевые слова: CIN II, CIN III, ВПЧ, p16, E7, Изопринозин.

The results of treatment in patients with severe HPV-associated cervical intraepithelial neoplasia

TV.Klinskybkova, I.B.Samosudova, D.V.Turchaninov

Summary

To determine efficacy of treatment in patients with human papilloma virus-associated (HPV) cervical intraepithelial neoplasia (CIN) grade II, III, 50 female patients were examined: 1-st group (main) – patients which took combined therapy concomitantly with isoprinosine (n=30); 2-nd group (control group) – patients which took conventional surgical treatment (n=20). After the treatment, the number of female patients with expression of biomarkers p16, Ki-67 was significantly decreased in the main group, and 2-fold decrease of oncoprotein E7 expression was observed. In the control group, the decrease was not statistically significant. The treatment efficacy in the main group was 1.4 times higher than of conventional treatment.

Key words: CIN II, CIN III, HPV, p16, E7, isoprinosine.

Сведения об авторах

Клинышкова Татьяна Владимировна – д-р мед. наук, проф. каф. акушерства и гинекологии ЦДО ОмГМА. E-mail: klin_tatyana@mail.ru

Самосудова Ирина Болеславовна – врач акушер-гинеколог высшей категории женской консультации №1 г. Омска

Турчанинов Денис Владимирович – д-р мед. наук, зав. каф. гигиены с курсом питания человека ОмГМА. E-mail: omskgsen@rambler.ru

В рамках вторичной профилактики рака шейки матки существенную роль играет совершенствование методов диагностики папилломавирусной инфекции (ПВИ), правильная клиническая интерпретация результатов обследования и своевременное адекватное лечение пациенток с цервикальным предраком. Основным недостатком традиционных лечебных мероприятий является необходимость многократного повторения процедур, высокая частота рецидивов заболевания (10–35%), вариабельность лечебного эффекта, осложнения и побочные эффекты, что снижает параметры качества жизни больных [1–5]. Доказана целесообразность комбинированного применения Изопринозина при цервикальной интраэпителиальной неоплазии (CIN) II–III [6, 7], однако возможные патогенетические механизмы рецидивирования заболевания в зависимости от варианта лечения предрака пока не нашли должного отражения.

Цель исследования – определить эффективность лечения больных с CIN II, III, ассоциированной с вирусом папилломы человека (ВПЧ), при использовании комбинированной схемы лечения (хирургический метод в сочетании с Изопринозином) в сравнении с традиционным хирургическим лечением на основании оценки экспрессии p16, Ki-67, E7.

Материалы и методы

Группу исследования составили 50 пациенток с верифицированной CIN II, III. Критериями включения в исследование явились: репродуктивный возраст, наличие позитивного цервикального ВПЧ-теста, плоскоклеточного интра-

эпителиального поражения (SIL) по данным цитологического исследования и CIN II, III по результатам гистологического исследования, информированное согласие пациентки. Критерии исключения: несоответствующий возраст больных, беременность и лактация, рак шейки матки, отказ от участия в исследовании. Выделено 2 группы больных посредством адаптивной рандомизации: 1-я группа (основная) включала пациенток, получавших комбинированное лечение (радиоволновая или диатермоэлектрохирургия) на фоне лечения Изопринозином в суточной дозе 3,0 г в течение 10 дней (n=30); 2-я группа (сравнения), объединяла больных, пролеченных традиционным хирургическим методом без медикаментозного компонента (n=20). Данное разделение было предпринято ввиду распространенности как первого, так и второго подхода в лечении больных с CIN II–III, в том числе с учетом отсутствия проведения ВПЧ-тестирования в клинической практике в ряде случаев.

Комплексная диагностика включала традиционные методы: цитологическое исследование (традиционная и жидкостная цитология), кольпоскопическое исследование; гистологическое исследование цервикальных биоптатов и эндцервикальных образцов и адъювантные методы: типирование ВПЧ (тест-система «АплиСенс ВПЧ ВКР скрин-FL»), определение вирусной нагрузки [тест-система «АмплиСенс R – V 12 (RG, iQ, Mx) скрин-титр FRT»], иммуноцитохимическое определение p16, Ki-67 (тест-система «CINtecR PLUS Kit», Германия) и выявление E7 (иммуноферментный анализ, тест-система «E7-ВПЧ-16/18-Диагност», Москва).

Контроль излеченности проводили через 4, 8 и 12 мес: кольпоскопическое и цитологическое исследование – через 4,

Таблица 1. Сравнительная характеристика выявления биомаркеров p16ink4 α , Ki-67 и онкобелка E7 у больных с CIN II–III

Показатели	1-я группа (основная), n=17	2-я группа (сравнения), n=9	Φ	p
Экспрессия p16ink4 α	11	7	0,01816	0,41
Экспрессия Ki-67	9	4	0,00654	0,50
Козэкспрессия p16ink4 α и Ki-67	9	4	0,00654	0,50
Экспрессия E7	14	7	0,00305	0,58
Козэкспрессия p16ink4 α и E7	9	7	0,05899	0,21
Козэкспрессия Ki-67 и E7	8	4	0,00062	0,61
Козэкспрессия p16ink4 α , Ki-67, E7	6	4	0,00801	0,48

Таблица 2. Результаты кольпоскопического исследования у пациенток с CIN II–III в зависимости от метода лечения (через 4 мес)

Кольпоскопический признак	1-я группа (основная), n=30		2I; p	2-я группа (сравнения), n=20		2I; p
	до лечения	после лечения		до лечения	после лечения	
Норма	0	21	72,71; <0,001	0	8	5,83; >0,05
Мозаика	26	5		14	7	
Ацетобелый эпителий	14	3		9	4	
Йоднегативный эпителий	12	4		4	3	
Пунктация	10	3		4	1	
Кондилома	2	0		1	0	
Атипичные сосуды	10	3		5	1	
Всего аномальных признаков	72	18		36	16	

Таблица 3. Результаты кольпоскопического исследования у пациенток с CIN II–III в зависимости от метода лечения (через 8 мес)

Кольпоскопический признак	1-я группа (основная), n=30		ТКФ; p	2-я группа (сравнения), n=20		ТКФ; p
	до лечения	после лечения		до лечения	после лечения	
I. Нормальные кольпоскопические картины	0	26	0,76471; 0,001	0	14	0,53846; 0,001
II. Аномальные кольпоскопические картины	28	4	0,64286; 0,001	19	6	0,45067; 0,001
III. Разные результаты	2	0	0,87500; 0,001	1	0	0,02564; 0,5

Таблица 4. Результаты цитологического исследования у пациенток с CIN II–III в зависимости от метода лечения (через 4 и 8 мес)

Результат цитологии (через 4 мес)	1-я группа (основная), n=30		2I; p	2-я группа (сравнения), n=20		2I; p
	до лечения	после лечения		до лечения	после лечения	
Через 4 мес						
Норма	0	21	43,36; <0,001	0	6	11,12; <0,05
ASC-US	0	1		0	2	
LSIL	12	5		8	5	
HSIL	18	3		12	7	
Через 8 мес						
Норма	0	24	65,96; <0,001	0	13	25,24; <0,001
ASC-US	0	0		0	2	
LSIL	12	0		8	3	
HSIL	18	1		12	4	

Примечание. ASC-US – атипичные клетки плоского эпителия неясного значения.

Таблица 5. Результаты ВПЧ-типирования у больных с CIN II–III в зависимости от метода лечения (через 12 мес)

Типы ВПЧ ВКР	1-я группа (основная), n=30		Угол Φ ; p	2-я группа (сравнения), n=20		Угол Φ ; p
	до лечения	после лечения		до лечения	после лечения	
16	22	1	6,54; <0,001	17	5	4,11; <0,001
18	5	0	3,26; <0,001	3	0	2,52; <0,01
31	3	0	2,49; <0,01	1	0	1,43; >0,05
33	4	0	2,9; <0,005	2	1	0,61; >0,05
35	2	0	2,02; <0,05	0	0	0; >0,05
39	0	0	0; >0,05	3	2	0,48; >0,05
45	0	0	0; >0,05	0	0	0; >0,05
51	2	0	2,02; <0,05	2	0	2,03; <0,05
52	1	1	0; >0,05	0	0	0; >0,05
56	3	0	2,49; <0,01	1	1	0; >0,05
58	0	0	0; >0,05	1	0	1,43; >0,05
59	3	0	2,49; <0,01	1	0	1,43; >0,05

определение иммуноцитохимических биомаркеров (p16 и Ki-67) и онкобелка E7 – через 8, ВПЧ-тест – через 12 мес.

Статистический анализ данных проводился с применением пакета STATISTICA-6, пакета EpiInfo (версия 3,3), возможностей MS Excel. Проверка нормальности распределения количественных признаков проводилась по критерию Шапиро–Уилки. Во всех процедурах статистического анализа критический уровень значимости p считался равным 0,05. Данные в тексте представлены в виде $M \pm SD$, где M – среднее арифметическое, SD – стандартное отклонение средней. Для сравнения качественных показателей в группах использовалась 2I-статистика (информационная статистика Кульбака) [8], точный критерий Фишера (ТКФ), метод углового преобразования Фишера – угол φ (Е.Гублер, 1979). При сравнении количественных данных в двух независимых выборках использовался U-критерий Манна–Уитни, в двух связанных выборках – критерий Мак-Нимара [9].

Результаты исследования и обсуждение

Группы исследования были сопоставимы по анамнестическим данным, включая возраст ($M \pm SD$): $29,20 \pm 1,41$ и $28,85 \pm 1,47$ года ($p=0,992$); социальный статус ($p=0,571$); интервал между возрастом менархе и половым дебютом ($4,6 \pm 2,06$ и $3,9 \pm 1,64$ года, $p=0,219$); курение ($63,3 \pm 8,8$ и $55,0 \pm 11,1\%$, $p=0,384$); частоту деструктивного лечения шейки матки ($44,2 \pm 14,7$ и $30,0 \pm 9,6\%$, $p=0,258$); частоту инфекций, передающихся половым путем, в анамнезе ($65,2 \pm 12,1$ и $46,3 \pm 10,3\%$, $p=0,340$), использование барьерной контрацепции ($30,0 \pm 8,4$ и $35,0 \pm 10,7\%$, $p=0,471$ в 1 и 2-й группах соответственно).

Сравнительная оценка генотипирования ВПЧ свидетельствовала о преобладании в обеих группах 16 (22 и 17 случаев) и 18-го типов (5 и 3 случая в 1 и 2-й группах соответственно), другие типы ВПЧ высокого канцерогенного риска (ВКР) отмечены в 18 и 11 случаях в моно- и сочетанном вариантах. Различия в группах по структуре типов ВПЧ статистически не значимы (2I=0,26; $p>0,05$). Вирусная нагрузка ВПЧ 16/18 типов была количественно определена у 28 пациенток основной группы и 19 – в группе сравнения. Доминировала высокая вирусная нагрузка (в 78,5 и 89,0% случаев соответственно, $p=0,29$).

По результатам цитологического исследования преобладали признаки SIL высокой степени – HSIL (19 и 16 случаев, $\varphi=0,03$, $p=0,17$), в меньшей мере – SIL низкой степени – LSIL (11 и 4 случая, $p=0,17$).

При кольпоскопии использовали кольпоскопический индекс (R.Reid) и клинико-кольпоскопический индекс (M.Shafi, S.Nazeer). Результаты балльной оценки подтвердили отсутствие статистических различий между группами ($p=0,551–0,994$).

Не установлены различия в исходном уровне экспрессии p16, Ki-67, их коэкспрессии, экспрессии E7 – $p=0,210–0,612$ (табл. 1).

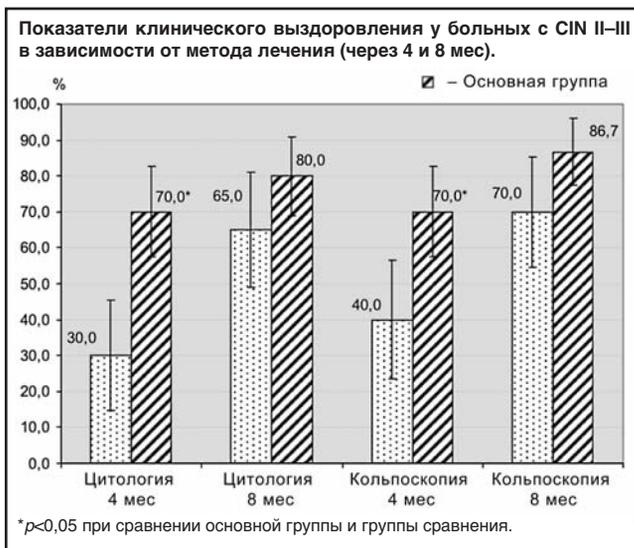
Контроль эффективности лечения через 4 мес позволил установить положительную динамику по снижению частоты аномальных кольпоскопических картин в обеих группах. Детализация кольпоскопических признаков свидетельствовала о наличии различий в группах (табл. 2): в основной отмечены значимые позитивные изменения в структуре кольпоскопических картин, в контрольной имелась лишь тенденция к аналогичным изменениям. Через 8 мес выявлено 7-кратное уменьшение числа аномальных кольпоскопических картин в основной ($p<0,001$) и 3-кратное – в группе сравнения – $p<0,001$ (табл. 3).

Результаты сравнительного анализа по данным цитологического исследования через 4 и 8 мес представлены в табл. 4. Отмечены значимые позитивные изменения в обеих группах как через 4, так и через 8 мес после лечения.

Данные ВПЧ-типирования через 12 мес свидетельствовали об элиминации ВПЧ, за исключением 16 и 52-го типов в основной группе, в группе сравнения сохранялась персистенция 16, 33, 39 и 56-го типов ВПЧ (табл. 5). В свою очередь, неполная элиминация ВПЧ 16-го типа (1 и 5 случаев) имела статистически значимые различия в сравнении с частотой до лечения.

Таблица 6. Результаты оценки биомаркеров p16, Ki-67 и E7 у пациенток с CIN II–III

Показатели	1-я группа (основная), n=17		ТКФ; p	2-я группа (сравнения), n=9		ТКФ; p
	до лечения	после лечения		до лечения	после лечения	
p16ink4 α	11	1	0,37879; 0,0004	7	6	0,01538; 0,5
Ki-67	9	1	0,26667; 0,003	4	3	0,01299; 0,5
p16ink4 α + Ki-67	9	1	0,26667; 0,003	4	3	0,01299; 0,5
Онкобелок E7	14	7	0,17949; 0,02	7	6	0,01538; 0,5



Результаты иммуноцитохимического исследования биомаркеров и онкобелка E7 через 8 мес представлены в табл. 6. Анализируя исходные данные по состоянию экспрессии биомаркеров при CIN II–III, можно заключить о повышении частоты экспрессии p16 и Ki-67, их коэкспрессии, а также о персистирующем характере течения ПВИ у большинства больных 2 групп (по уровню E7), что находит подтверждение в ряде работ [10–13]. Детекция симультанной гиперэкспрессии биомаркера p16 и маркера клеточной пролиферации Ki-67 в клетках цервикального эпителия является индикатором дисрегуляции клеточного цикла и наличия CIN и оправдана в первичном скрининге при CIN2+ [14]. В предыдущих исследованиях нами были показаны повышение частоты p16, Ki-67 и гиперэкспрессия p16 при CIN II–III в отличие от пациенток с CIN I, латентной инфекцией и здоровых женщин ($p < 0,001$) [15]. В основной группе отмечено статистически значимое снижение удельного веса пациенток с экспрессией биомаркеров после лечения, в том числе в 2 раза снизилась частота экспрессии онкобелка E7. В группе сравнения тенденция к снижению не являлась статистически значимой. Выявленные различия позволяют расценивать подобные изменения как патогенетические предпосылки неполного клинического эффекта (клинико-цитологический контроль) и отдаленного рецидивирования заболевания.

Оценка эффективности лечения проводилась по следующим критериям: этиологическое (негативный ВПЧ-тест) и клиническое выздоровление (регресс SIL и аномальных кольпоскопических картин).

В основной группе элиминация ВПЧ ВКР отмечена в 86,7%, в группе сравнения – в 63,1% наблюдений – $p = 0,048$ (см. рисунок). Результаты оценки клинического выздоровления через 4 мес различались в группах статистически значимо – $p < 0,05$. Результаты клинического выздоровления через 8 мес по данным цитологического исследования составили 80,0% в основной группе против 65,0% в группе сравнения, по данным кольпоскопии – 86,7 и 70,0% соответственно, различия в группах являлись статистически незначимыми. В итоге эффективность лечения в основной группе по окончании лечения была в 1,4 раза выше, чем при традиционном лечении.

Сохранение экспрессии биомаркеров на фоне персистирующего течения ПВИ позволяет высказать предположение, объясняющее повышение неэффективности терапии при традиционном деструктивном лечении (30% против 13,3%) и существующем высоком риске рецидивирования CIN в последующем. Таким образом, совокупная оценка клинической, этиологической эффективности в сочетании с оценкой биомаркеров позволяет прогнозировать течение заболевания.

Вывод

Комплексное лечение пациенток с ВПЧ-ассоциированными CIN II–III на основе комбинации хирургического и противовирусного компонентов (Изопринозин) способствует повышению клинической эффективности и элиминации ВПЧ на фоне снижения экспрессии p16, Ki-67, E7 в отличие от традиционного лечения, что направлено на снижение риска рецидивирования заболевания.

Литература

- Елисеева МЮ, Мынбаев ОА. Вспомогательная иммунотерапия ВПЧ-ассоциированных поражений слизистых оболочек и кожи урогенитальной и перинанальной локализации (систематический обзор литературы и метаанализ применения Инозина Пранобекса). *Гинекология*. 2009; 11 (5): 22–33.
- Подистов ЮИ, Лактионов КЛ, Петровичев НН. Эпителлиальные дисплазии шейки матки (диагностика и лечение). *Руководство для врачей*. М: ГЭОТАР-Медицина, 2006.
- Прилепская В.Н., Назарова Н.М., Бестаева Н.В. Папиллома-ассоциированные заболевания: обоснованность и эффективность комплексной терапии. *Мать и дитя: материалы XII Всероссийского научного форума*. М., 2011.
- Nagai Y, Maebayashi T, Asato T, Kanazawa K. Persistence of human papillomavirus infection after therapeutic conization for CIN 3: is it an alarm for disease recurrence? *Gynecol Oncol* 2000; 79 (2): 294–9.
- Park JY, Lee KH, Dong SM et al. The association of pre-conization high-risk HPV load and the persistence of HPV infection and persistence/recurrence of cervical intraepithelial neoplasia after conization. *Gynecol Oncol* 2008; 108 (3): 549–54.
- Кедрова А.Г., Подистов ЮИ, Кузнецов В.В. Роль противовирусной терапии в комплексном лечении больных эпителиальными дисплазиями и преинвазивным раком шейки матки. *Гинекология*. 2005; 7 (3): 170–4.
- Прилепская В.Н., Костава М.Н. Возможности терапии папилломавирусной инфекции; Шварц Г.Я., Прилепская В.Н., Мынбаев ОА. Изопринозин в лечении папилломавирусной инфекции в гинекологической практике. М: Промоуин-микс, 2011.
- Закс Л. Статистическое оценивание. М: Статистика, 1976.
- Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. М: Медиа-сфера, 2002.
- Евстигнева Н.П. Экспрессия онкобелка E7 у пациенток с урогенитальной папилломавирусной инфекцией. *Рос. журн. кожных и венерических болезней*. 2006; 2: 4–6.
- Костевич Г.В., Косенко И.А. Результаты ВПЧ-диагностики и экспрессии онкобелков E6/E7 ВПЧ 16 типа при доброкачественных и предраковых заболеваниях шейки матки. *Онкологический журнал*. 2010; 4 (1): 33–6.
- Bleutu C, Botezatu A, Goia CD et al. P16ink4 α - a possible marker in HPV persistence screening. *Roum Arch Microbiol Immunol* 2009; 68 (3): 183–9.
- Kursbumliu F, Thorns C, Gasbi-Luci L. P16ink4 α in routine practice as a marker of cervical epithelial neoplasia. *J Gynecol Oncol* 2009; 4 (1): 127–31.
- Ikenberg H, Petry W, Angeloni C et al. P16/Ki67 dual-stained cytology in primary screening for cervical cancer and as triage tool in PRP negative/HPV positive cases. *Eurogin, Lisbon* 2011; 120.
- Клинышкова Т.В., Самосудова И.Б. Результаты оценки E7 ВПЧ, p16ink4 α , Ki-67 при цервикальном предраке, ассоциированном с папилломавирусной инфекцией. *Рос. вестн. акушера-гинеколога*. 2012; (4): 21–4.
- Розовская С.И., Прилепская В.Н. Новые технологии в профилактике рака шейки матки. *Гинекология*. 2007; 10 (1): 4–7.