

Роль противовирусной терапии в комплексном лечении больных эпителиальными дисплазиями и преинвазивным раком шейки матки

А.Г.Кедрова, Ю.И.Подистов, В.В.Кузнецов, В.В.Брюзгин, В.П.Козаченко, С.О.Никогосян

ГУ Российский онкологический научный центр им. Н.Н.Блохина (дир. – акад. РАН и РАМН М.И.Давыдов) РАМН, Москва

Краткое содержание исследования

Цель исследования: оценка эффективности и токсичности противовирусного препарата «Изопринозин» в комплексном лечении больных эпителиальными дисплазиями I–III степени (CIN I–III) и преинвазивным раком шейки матки (Ca in situ ШМ), а также больных с рецидивами CIN ШМ или Ca in situ в оставшейся части ШМ, инфицированных вирусом папилломы человека (HPV).

Учреждение: отделение гинекологии, отделение амбулаторных методов диагностики и лечения злокачественных новообразований ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН.

Материал и методы исследования: сбор анамнеза, гинекологический осмотр с кольпоскопическим исследованием, забор материала для бактериологического исследования, ПЦР-диагностика. Морфологическое исследование материала. При выявлении HPV 16 и/или 18 типов – противовирусное лечение:

Изопринозин 1000 мг 3 раза в сутки в течение 10 дней.

Контрольное обследование через 10 дней после окончания приема препарата.

При повторном обнаружении HPV проводится 2-й курс лечения. Возможно проведение 3 курсов терапии. При смешанной флоре влагалища изопринозин сочетался с антибиотиками.

При эпителиальной дисплазии легкой и умеренной степеней выполнялась криодеструкция или лазеровапоризация, при CIN III и Ca in situ – конизация ШМ.

Включено 45 больных, оценено 45 больных, проведено 56 курсов лечения изопринозином.

Оценивали клиническую эффективность изопринозина как противовирусного препарата на основании ежемесячного бактериологического и ПЦР-контроля.

Результаты исследования: у 35(77,8%) пациенток HPV 16 не обнаружен после одного курса лечения изопринозином, при этом HPV 18 не определялся у 4 больных (50%), инфицированных двумя типами вирусов. 9 больным (20%) потребовалось 2 курса лечения с 10-дневным интервалом. У 1 пациентки (2%) HPV 16 и 18 обнаружился после 2 курсов лечения и операции, что потребовало проведения 3-го курса лечения. Среднее время без рецидива инфекции не менее 4,2±2,1 мес при ежемесячном контрольном обследовании.

Заключение: на первом этапе лечения больные с CIN и Ca in situ ШМ должны по показаниям подвергаться электрокоагуляции, криодеструкции, лазеровапоризации, электроконизации ШМ. Противовирусное же лечение должно проводиться на втором этапе обязательно, так как персистенция вируса является ключевым фактором для возникновения рецидива заболевания. Применение противовирусного препарата «Изопринозин» до операции сопровождается значительным снижением активности вируса HPV 16 и 18 типов, определяемых при ПЦР-диагностике. При этом уже после первого курса лечения тест на HPV-инфекцию отрицательный у 77,8% больных.

Рак шейки матки (РШМ) в настоящее время остается одной из наиболее часто встречающихся злокачественных опухолей женских гениталий. Частота заболеваемости во всем мире варьирует от 10 до 40 на 100 тыс. женского населения, при этом почти половина больных умирают в течение первого года в связи с поздним диагностированием заболевания [12]. Приведенные различия обусловлены организацией и качеством медицинской помощи в том или ином регионе (прежде всего развитие скрининговых программ), сексуальными традициями, а также, по последним данным, зависят от типа HPV-инфекции [5,7].

Возрастной пик заболеваемости РШМ падает на возраст 45–55 лет, хотя отмечается быстрое нарастание частоты РШМ среди женщин моложе 30 лет. На сегодняшний день лучевая терапия (ЛТ) и хирургические методы лечения местно-распространенных форм РШМ

являются наиболее эффективными и считаются стандартными [10, 15]. Применение высоких доз ЛТ приводит к повреждению тканей и нарушению функций органов малого таза, что в свою очередь лимитирует повышение дозы облучения. Поэтому постоянно изучаются возможности внедрения в клиническую практику профилактических мер для предотвращения развития распространенных форм РШМ (вакцинация), уделяется большое внимание скринингу и лечению предраковых заболеваний.

В настоящее время известен основной этиологический фактор возникновения РШМ – вирус папилломы человека (HPV). Исследованиями Международной ассоциации биологического изучения РШМ (IBSCC) показано, что HPV, преимущественно 16 и 18 типов, содержится в 99,7% образцов РШМ [16]. Доказано, что HPV инфицирует эпителиальные клетки базального слоя ШМ,

где обнаруживается эписомальный вирусный геном. Также было продемонстрировано, что от 11 до 20% молодых сексуально активных женщин инфицированы HPV [6].

Репликация вирусной ДНК и синтез, связанных с ней капсидных белков изменяют клеточный цикл и приводят к клеточной атипии, занимая время от 1 года до 3 лет [18]. Именно поэтому пока вирус находится в эписомальном состоянии наблюдаются доброкачественные процессы. Эпителиальная дисплазия возникает при интеграции вируса в геном клетки, что сопровождается делецией гена E2, влияющего на синтез двух важных белков онкогена E6 и E7. Их повышенный уровень влияет на белки апоптоза: p53 (E6) и Rb (E7), что преждевременно активирует переход клетки в S-фазу цикла [17]. Таким образом, этот последовательный механизм имеет два ключевых момента: блокирование факторов транскрипции и моди-

фикация структуры хроматина, что впоследствии приводит к сверхэкспрессии белков Е6 и Е7. Отсюда уже на стадии дисплазии одни противовирусные препараты бессильны остановить процесс опухолевой трансформации, так как инфицированные клетки не содержат вирус в традиционном понимании. Эти клетки должны быть удалены любым из известных методов: электрокоагуляция, криодеструкция, лазероабляция, электроконизация ШМ. Противовирусное же лечение должно проводиться обязательно, так как персистенция HPV-инфекции является ключевым фактором для возникновения заболевания. Учитывая все известные факторы, можно предположить, что развитие РШМ является многостадийным процессом, который занимает период времени от 2 до 10 лет [1, 2, 18].

Диагностика предраковых состояний ШМ осуществляется при гинекологическом осмотре, кольпоскопии, цитологическом и гистологическом исследованиях. Контролировать эффективность лечения можно кольпоскопически, не прибегая к инвазивным методам обследования [3]. В настоящее время все хирургические методы лечения должны сочетаться с этиопатогенетической терапией. Это обстоятельство обусловлено тем, что частота рецидивов дисплазии и преинвазивного РШМ после деструктивных методов лечения достаточно высока. Причина этого явления состоит в том, что остается этиопатогенетический фактор, т.е. вирусная инфекция. Отсюда при наблюдении за женщинами, перенесшими хирургическое лечение по поводу диспластических процессов и Ca in situ ШМ, целесообразно проводить обследование на HPV и при персистенции вируса проводить противовирусное лечение [3, 4, 11].

В настоящее время препаратов, избирательно воздействующих на вирус папилломы человека, не существует. Наиболее часто для лечения HPV-инфекции применяют интерфероны и различные иммуномодуляторы. Однако даже длительная интерферонотерапия зачастую не приводит к излечению HPV. Эффективность лечения напрямую зависит от уровня синтеза онкобелка Е7, который нейтрализует противовирусную активность интерферонов [8, 9, 13, 14].

Противовирусный препарат «Изопринозин» (активное вещество – ино-

зиплекс – inosine pranobex, methisopriol) подавляет репликацию ДНК и РНК вирусов посредством связывания с рибосомой клетки и изменения ее стереохимического строения. Кроме противовирусного действия, препарат обладает и иммуномодулирующим свойством за счет комплекса инозина, что повышает его доступность для лимфоцитов. Препарат стимулирует неспецифический иммунитет, усиливает продукцию интерлейкинов, повышает синтез антител, стимулирует хемотаксическую и фагоцитарную активность моноцитов, макрофагов и полиморфно-ядерных клеток [3].

Фармакокинетика препарата хорошо изучена. Максимальная концентрация изопринозина достигается через 1 ч после приема 1,5 г препарата. Первый период полувыведения (50 мин) связан с образованием мочевой кислоты. Второй период полувыведения 3–5 ч, при этом метаболиты выводятся почками. Во время приема изопринозина нельзя применять иммунодепрессанты и аналогичные препараты, а также лекарственные препараты, обладающие нефротоксическим действием. Первичные результаты лечения изопринозином HPV у больных с наличием остроконечных кондилом были перспективны, но требовали дальнейшего изучения в связи с малочисленностью изученных групп [3].

Целью нашего исследования явилась оценка эффективности и токсичности изопринозина в комплексном лечении больных эпителиальными дисплазиями I–III степени (CIN I–III) и преинвазивным РШМ (Ca in situ), а также больных с рецидивами CIN или Ca in situ в оставшейся части шейки матки, инфицированных вирусом папилломы человека (HPV).

Материал и методы исследования

Исследование являлось проспективным, открытым и несравнительным. Обследовано 54 больных CIN I–III степени и Ca in situ ШМ, а также больных рецидивами CIN или Ca in situ в оставшейся части ШМ. Из них 45 (83,3%) пациенток были отобраны для лечения изопринозином, по признаку инфицирования HPV 16 и/или 18 типа.

Все больные разделены на три подгруппы в зависимости от диагноза, ко-

торый устанавливался на основании цитологического и/или гистологического исследований. Средний возраст пациенток составил $32,3 \pm 2,7$ года (от 18 до 55 лет), общее состояние по шкале активности ВОЗ 0–1, у всех пациенток был выявлен вирус папилломы человека (тип 16 и/или 18) по результатам ПЦР-диагностики.

В исследование не включались больные, подвергнутые ранее любому виду противовирусной терапии, и пациентки, имеющие серьезные сопутствующие заболевания. Не включались в исследование беременные или кормящие грудью, больные, имеющие интеллектуальные или другие нарушения, влияющие на способность адекватно дать согласие или следовать диагностическим и лечебным процедурам, предусмотренным протоколом, а также больные, имеющие аллергические реакции на любой ингредиент применяемых лекарственных препаратов или ранее страдающие злокачественными новообразованиями. Все пациентки детородного возраста должны были соблюдать меры контрацепции на период лечения.

Скрининг для отбора больных на исследование проходил в отделении амбулаторных методов диагностики и лечения злокачественных новообразований, а дальнейшее хирургическое лечение больных проводилось в отделении гинекологии ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН.

Каждая пациентка проходила обследование и оценивалась в соответствии с критериями протокола. Лабораторные методы диагностики выполнялись в лаборатории ДНК-технологий института иммунологии МЗ РФ (руководитель – канд. наук Д.Ю. Трофимов)¹.

Группа А (20 больных): больные CIN I–II степени (легкая и умеренная степень дисплазии) с цитологической верификацией диагноза, у которых при ПЦР-диагностике выявлена HPV-инфекция (тип 16 и/или 18). Последовательность лечения для этой группы больных была следующей:

1. Подробный сбор анамнеза. Особенно отмечалось ранее проводимое противовоспалительное (антибиотикотерапия) и противовирусное лечение, а также все инвазивные методы воздействия на шейку матки.

2. Гинекологический осмотр с кольпоскопическим исследованием, забор

¹ Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) для определения ДНК вирусов “высокого риска” 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68 проводился по следующей методике: соскоб эпителиальных клеток из цервикального канала и эктоцервикса отправлялся в лабораторию, где с помощью праймеров, позволяющих амплифицировать фрагмент ДНК всех серотипов вируса отбирались образцы, в которых был выявлен HPV. На втором этапе эти образцы амплифицировали с применением двух других праймеров, один из которых позволял амплифицировать ДНК HPV 6 и 11-го типов (группа низкого риска онкогенности), другая ДНК HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68-го типов. Реакцию амплификации проводили в объеме 25 мкл. В реакционную смесь последовательно вносили деионизованную воду до объема 2,5 мкл 10-кратного буфера для ПЦР (660 мМ трис-HCL, pH – 8,8; 166 мМ сульфата аммония, 0,1% твин – 20, 0,001% желатин, 30 мМ хлористого магния) по 250 мкМ каждого дНТФ, по 1 пМ праймеров и 0,8 акт. единиц Taq- полимеразы, 5 мкл рас-ра ДНК, 30 мкл минерального масла. Для положительного контроля вносили 1–5 пг ДНК HPV. Реакция проводилась в течение 35 циклов на программируемом термостате “PCR express” (Великобритания) при 940 С – 30 с, 600 С – 20 с, 720 С – 30 с. Продукты реакции анализировали методом электрофореза в 1,5% агарозном геле. Разделение продуктов амплификации проводили при напряжении электрического поля 10 В/см в течение 30 мин. Учет образцов проводился визуально на трансиллюминаторе при длине волны от 254 нм. Положительными считали образцы, в которых регистрировалась светящаяся оранжевая полоса (длина волны – 594 нм), соответствующая по электрофоретической подвижности положительному контролю: 410 пар нуклеотидов – для HPV недифференцированных типов, 370 пар нуклеотидов – для серотипов HPV высокого риска онкогенности и 284 пары нуклеотидов – для серотипов низкого риска онкогенности.

Результаты лечения изопринозином больных CIN, Ca in situ и рецидивами CIN и Ca in situ оставшейся части ШМ.

<p>Всего больных (n=45)</p>	<p>Средний возраст: 32,3±2,7 года (от 18 до 55 лет; 42 больные репродуктивного возраста, 3 – менопаузального возраста).</p> <p>Цитологическая верификация:</p> <p>дисплазии I – 13 (28,9%) больных дисплазия II – 7 (15,5%) больных дисплазия III – 8 (17,9%) больных Ca in situ ШМ – 7(15,5%) больных</p> <p>Рецидивы CIN и Ca in situ ШМ in situ – 10 (22,2%) больных</p> <p>ПЦР-диагностика до лечения:</p> <p>тип вируса HPV 16 – 45 (100%) больных HPV 18 – 8 (17,8%) больных HPV 16, 31, 33, 35H, 58, 52, 67 – 45 (100%) больных HPV 18, 45, 39, 59–7 (17,8%) больных HPV 6, 11 – 2 (2,2%) больная HPV 51, 26 – 2 (2,2%) больная</p> <p>Смешанная флора (<i>Gardnerella vaginalis</i>, <i>Streptococcus pyogenes</i>, <i>Ureaplasma urealyticum</i>) – 16 (35,5%) больных.</p> <p>Лечение: 35 (77,8%) больных получили 1 курс лечения изопринозином, из них 8 больных в сочетании с антибиотиками. 9 (20%) больных получили 2 курса лечения изопринозином, из них 8 больных – в сочетании с антибиотиками</p> <p>Криодеструкция шейки матки выполнена 15 больным (эпителизация в стандартные сроки), 3 – лазеровапаризация, 2 – радиоволновая эксцизия на аппарате “Сургитрон”. Осложнений не выявлено. Раздельное диагностическое выскабливание матки и электроконизация шейки матки проведена 14 (35%) больным (эпителизация в стандартные сроки), осложнений не было; раздельное диагностическое выскабливание матки и ампутация шейки матки выполнена у 7 (17,5%) больных (некроз культи влагалища отмечен у 3 больных), у одной больной выполнена экстирпация матки с придатками</p>
-----------------------------	---

Примечание. Среднее время наблюдения 4,2 мес

материала для бактериологического исследования флоры влагалища и определения ее чувствительности к антибиотикам, а также для ПЦР диагностики. Далее проводилась прицельная биопсия шейки матки или забор материала для цитологического исследования (эктоцервикс и цервикальный канал).

3. Лечение вирусносительства проводилось изопринозином по 1000 мг (2 таблетки) 3 раза в день, курс лечения 10 дней с контрольным обследованием через 10 дней после окончания лечения. При выявлении смешанной флоры влагалища изопринозин назначался в комбинации с антибиотиками в зависимости от бактериологической чувствительности флоры. На данном этапе местное лечение не проводилось. У 5 больных было проведено 2 курса лечения изопринозином, а затем выполнена криодеструкция ШМ, так как после первого курса лечения при ПЦР-диагностике обнаруживался вирус папилломы человека. При контрольном обследовании после второго курса лечения вирус не обнаружен. Больных с вирусом, резистентным к изопринозину, в данной группе пациенток не выявлено.

4. При эффективности первого этапа лечения (отсутствие вируса при ПЦР-диагностике и нормализация флоры влагалища) проводились цитологический контроль материала и операция: криодеструкция или лазеровапаризация ШМ. Контрольное обследование проводилось ежемесячно в течение 3–4 мес с контролем HPV-инфекции.

Группа Б (15 больных). Больные CIN III (тяжелая степень дисплазии) или Ca

in situ ШМ морфологической верификаций диагноза, у которых при ПЦР-диагностике выявлен вирус папилломы человека 16 и/или 18-й тип. Подробный сбор анамнеза, гинекологический осмотр с кольпоскопическим исследованием, лечение вирусносительства проводились аналогично группе А. После оценки первого этапа лечения выполнялась операция: раздельное диагностическое выскабливание матки и электро- или ножевая конизация ШМ с последующим морфологическим исследованием и определением белков Е6 и Е7 в HPV 16 положительных образцах². Через месяц после операции проводилось контрольное обследование на вирус папилломы человека (ПЦР-диагностика).

Группа С (10 больных). Больные рецидивами CIN или Ca in situ в оставшейся части ШМ после ранее проведенного хирургического лечения с цитологической верификацией диагноза, у которых при ПЦР-диагностике выявлен вирус папилломы человека (16 и/или 18-й тип). Последовательность обследования и лечения HPV у этих больных была аналогичной группе В.

После оценки первого этапа лечения больные были подвергнуты следующим операциям: экстирпация матки с придатками – выполнена одной больной (ранее произведена ампутация шейки матки), ампутация культи шейки матки – 2-м больным (ранее проводилась электроконизация шейки матки), электроконизация шейки матки – 4 больным (ранее проводилась криодеструкция или диатермокоагуляция ШМ),

криодеструкция культи ШМ – 3 пациенткам (ранее проводилась диатермокоагуляция ШМ или радиоволновая эксцизия ШМ на аппарате “Сургитрон”). Через месяц проводилось контрольное обследование на вирусносительство. Двум больным проведено 2 курса лечения изопринозином, так как через месяц определялся вирус папилломы человека. При контрольном обследовании после второго курса вирус не обнаружен.

Результаты

При оценке эффективности противовирусного лечения изопринозином установлено, что после одного курса терапии у 35 (77,8%) больных HPV (16-й тип) и у 4 (50%) пациенток HPV (18-й тип) не обнаружены. Девяти больным (20%) потребовалось 2 курса лечения с 10-дневным интервалом и только у одной пациентки (2%) HPV (16 и 18-й типы) обнаруживался после 2 курсов лечения и операции, что потребовало проведения третьего курса лечения. Среднее время без рецидива HPV-инфекции оказалось равным 4,2 ± 2,1 мес.

Всего проведено 58 курсов лечения изопринозином, при этом только у одной пациентки (1,7%) при втором курсе лечения была отмечена аллергическая реакция в виде сыпи, которая купировалась в течение 3 дней при отмене изопринозина и назначении антигистаминных препаратов. Других побочных проявлений при приеме препарата отмечено не было, препарат переносился хорошо. Четыре пациентки (8,8%) отмечали легкое недомогание и тошноту,

² Для определения белков Е6 и Е7 были взяты образцы ткани шейки матки из парафиновых блоков послеоперационного материала у больных после конизации шейки матки (CIN III и Ca in situ). Для определения Е6 применяли праймер 1: nt46-65 5'-ttgaaccgaaaccggtagt-3', nt 237-256 5'-ttgcttttcgggattatgc-3' и праймер2: nt 204-224 5'-gcaacagttactgacagcgg-3', nt 419-438 5'-tgtcaaaagccactgtgtcc-3', а также праймер3: nt 371-391 5'-cagcaatacaacaaccgttg-3', nt 568-590 5'-ggagatacactacattgcatga-3', nt 568-590 5'-ggagatacactacattgcatga-3'. Для определения Е7 применяли праймеры: 1. nt520-540 5'-ttgcagatcatsaagaacacg-3', nt 742-761 5'-tgtgactctacgcttcgg-3' и 2. nt 691-710 5'-asaagcagaaccggcagag-3', nt 878-898 5'-caggaccatggggaagag-3'. Полимеразная реакция проводилась при 950 С – 5 мин в течение 40 циклов, при 550 С – 45 с и при 720 С – 60 с с выдержкой при этой температуре до 7 мин. Продукты реакции анализировали методом электрофореза в 2% агарозном геле. Разделение продуктов амплификации проводили при напряжении электрического поля 10 В/см в течение 30 мин согласно производственному протоколу BigDye Terminator Cycle sequencing kit: Applied Biosystems. [11 b 12 из статьи].

