

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ КАЧЕСТВЕННЫХ И КОЛИЧЕСТВЕННЫХ МАРКЕРОВ ПАПИЛЛОМАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ФОРМАХ ВПЧ-АССОЦИИРОВАННОЙ ПАТОЛОГИИ ГЕНИТАЛИЙ У БЕРЕМЕННЫХ

С. С. КРАВЧЕНКО, Г. И. ВЕРГЕЙЧИК

УО «Гомельский государственный медицинский университет»

Реферат

Целью данного исследования явилось выявление клинического значения качественных и количественных маркеров генитальной папилломавирусной инфекции у беременных пациенток.

Материалы и методы. Была обследована 151 беременная женщина с различными формами генитальной папилломавирусной инфекции. Для определения ДНК ВПЧ высокого и низкого онкогенного риска, а также вирусной нагрузки использовали метод ПЦР в реальном времени тест-системами «АмплиСенс®» (РФ).

Результаты. В генитальном тракте всех обследованных пациенток превалирует 16 генотип, причем частота встречаемости данного генотипа имеет тенденцию к возрастанию при утяжелении степени дисплазии (40% – 53,6% – 64,3%). Прослеживается тенденция к снижению количества вируса при утяжелении степени дисплазии от CIN 1 к CIN 3 с 5,86 до 4,66 Ig г.э. на 10^5 клеток.

Заключение. Проведение углубленного молекулярно-генетического исследования папилломавирусной инфекции у беременных пациенток целесообразно при наличии дисплазии легкой степени, латентной формы ВПЧ-инфекции и папилломатоза наружных половых органов (НПО) для выявления групп риска по развитию или прогрессии степени тяжести дисплазии.

Ключевые слова: папилломавирусная инфекция, беременность, папилломатоз, дисплазия шейки матки.

ВВЕДЕНИЕ

Вирусные инфекции в настоящее время представляют серьезную проблему, учитывая высокий уровень заболеваемости, длительное течение, отсутствие высокоэффективного специфического лечения, нередкое формирование осложнений. Развитию вирусной инфекции способствует множество факторов, среди которых неблагоприятный социально-экономический статус, молодой возраст, иммуногормональные дисфункции, иммунодефицитные состояния [1]. Наибольший интерес у специалистов вызывает вирус папилломы человека (ВПЧ), так как доказанной и общепризнанной считают роль носительства и агрессии ВПЧ в патогенезе цервикальных интраэпителиальных неоплазий (ЦИН) и рака шейки матки. Число инфицированных за последнее десятилетие увеличилось более чем в десять раз. По данным ВОЗ ежегодно в мире диагностируется около 2,5-3 миллионов случаев папилломавирусной инфекции [1, 2].

Папилломавирусная инфекция требует специализированного обследования и довольно сложна в лечении. Длительное присутствие ВПЧ с активной экспрессией онкогенов вируса многократно увеличивает риск развития неопластических изменений эпителия. Факт инфицирования ВПЧ даже высокого онкогенного риска не позволяет судить о вероятности возникно-

вения рака у конкретной пациентки. Выявление роли ВПЧ в развитии заболеваний шейки матки нуждается в применении новых, более совершенных методов диагностики. Прежде всего, это касается возможности определения количественной оценки вирусной нагрузки, степени онкогенности вируса, его репликативной активности, воспроизводимости, достоверности и специфичности [1,2].

По данным современных исследований на фоне беременности вирус папилломы человека выявляется гораздо чаще (28-65%) по сравнению с небеременными женщинами того же возраста (12,5-18,6%). Во время беременности наблюдается снижение иммунитета – физиологическая иммуносупрессия, ВПЧ-инфекция в данной ситуации реализуется в виде субклинических или клинических проявлений за короткий период времени [3,4,5].

Высокая чувствительность эпителия шейки матки к ВПЧ во время беременности связана с гормональными изменениями, возрастающим влиянием эстрогенов и прогестерона, которые увеличивают экспрессию ВПЧ высокого канцерогенного риска в цервикальном эпителии, а также с особенностями иммунной системы во время беременности. На фоне увеличения числа первородящих в возрасте старше 30–35 лет мнение о том, что лечение доброкачественных заболеваний шейки матки следует проводить женщинам только

после родов, приводит к тому, что большинство беременных репродуктивного возраста имеют заболевания шейки матки [6].

Существует несколько методов диагностики предраковых заболеваний шейки матки, однако у каждого из них имеется определенная специфичность и чувствительность, что ограничивает их использование. Во время гестации под воздействием гормонов на эпителий шейки матки кольпоскопическая, цитологическая и гистологическая картины меняются, что, в свою очередь, затрудняет постановку диагноза [8]. В настоящее время отсутствует система цитологического и кольпоскопического скрининга беременных, отсутствует также алгоритм их обследования и ведения при наличии фоновых и доброкачественных заболеваний шейки матки, сведения об особенностях течения гестации при доброкачественных заболеваниях шейки матки, что, несомненно, представляет научный и практический интерес.

Кроме вышеперечисленных «классических» методов диагностики ВПЧ-ассоциированной патологии шейки матки существуют современные - молекулярно-генетические. Самой широко используемой в настоящее время диагностической методикой для выявления ВПЧ является полимеразная цепная реакция (ПЦР), так как ДНК вируса длительно сохраняется в образцах тканей и ее легко можно идентифицировать. Это позволяет осуществлять диагностику даже при наличии минимального количества исследуемого материала. Однако «качественное» определение ДНК имеет спорную клиническую значимость, поскольку не позволяет прогнозировать течение инфекции, которая может элиминироваться без лечения [8].

Генотипирование вируса методом ПЦР позволяет дифференцировать персистенцию и реинфицирование. При инфицировании несколькими генотипами ВПЧ одновременно повышается риск персистенции, но и ухудшается прогноз течения заболевания вплоть до развития рака шейки матки (РШМ) [8].

В качестве одного из критериев клинически значимой инфекции, с высокой степенью вероятности развития неоплазии, рассматривается вирусная нагрузка, хотя ее прогностическая ценность на сегодняшний день до конца не определена. Однако на основании данных мировой литературы были валидированы пороговые значения концентрации ВПЧ в образце: 3 Ig (или 10^3) геномных эквивалентов (г.э.) ВПЧ на 10^5 клеток человека - порог клинической значимости, а 5 Ig г.э. ВПЧ на 10^5 клеток - порог прогрессии. Причем в ходе валидации было показано, что введение порога клинической значимости позволяет более чем на 20% повысить диагностическую специфичность исследования при сохранении диагностической чувствительности. [9].

Определенной информацией обладает мониторинг вирусной нагрузки. Так, считается, что снижение количества ДНК ВПЧ более чем на 1 Ig может являться маркером транзитной инфекции. Рост вирусной

нагрузки через 3, 6 и 9 месяцев после проведенного лечения свидетельствует о возможности рецидива [11]. Многие исследования показали, что у пациентов с высокими концентрациями вирусных геномов в образцах на начальных этапах ВПЧ-инфекции риск развития CIN I / CIN III выше, чем у пациенток, имевших низкую вирусную нагрузку [8].

Таким образом, использование молекулярно-генетических методов обследования у беременных женщин может позволить усовершенствовать не только диагностические критерии наличия, но и критерии прогнозирования развития предраковых процессов шейки матки.

Целью данного исследования явилось выявление клинического значения качественных и количественных маркеров генитальной папилломавирусной инфекции у беременных пациенток.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для изучения молекулярно-генетических характеристик папилломавирусов при разных клинических проявлениях папилломавирусной инфекции у беременных женщин была обследована 151 беременная пациентка с выявленной генитальной папилломавирусной инфекцией. Для диагностики патологии шейки матки всем пациенткам проведена расширенная кольпоскопия, цитологическое исследование цервикальных мазков, гистологическое исследование биоптатов шейки матки - по показаниям.

Каждой обследованной пациентке проводили углубленное молекулярно-генетическое исследование соскобов поверхностного слоя эпителия шейки матки, папиллом наружных половых путей и влагалища (при их наличии). Определяли высоко- и низкоонкогенные генотипы, а также вирусную нагрузку ВПЧ. Для постановки полимеразной цепной реакции (ПЦР) использовались тест-системы «АмплиСенс® ВПЧ ВКР генотип-FL» и «АмплиСенс® ВПЧ 6,11-FL» (АмплиСенс, РФ) для выявления ДНК ВПЧ 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 52, 56, 58, 59, 66 генотипов. Принцип метода заключается в одновременной амплификации (мультиплекс-ПЦР) в одной пробирке участков ДНК трех типов ВПЧ и β -глобинового гена, используемого в качестве эндогенного внутреннего контроля. Выявление определенного генотипа происходит благодаря регистрации канала флуоресценции, соответствующему каждому из генотипов. Для количественного определения вируса использовали тест-систему «АмплиСенс® ВПЧ ВКР титр-скрин-FL». Количественное определение ДНК ВПЧ основывается на существовании линейной зависимости между циклом начала увеличения флуоресценции образца (пороговый цикл, Ct) и исходной концентрацией ДНК-мишени. Для реализации количественного определения в реакцию амплификации параллельно берутся ДНК-калибраторы - образцы с известной концентрацией ДНК ВПЧ. По результатам

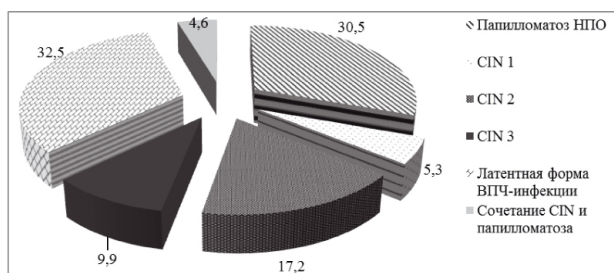


Рисунок 1 Структура клинических форм папилломавирусной инфекции у беременных пациенток, %

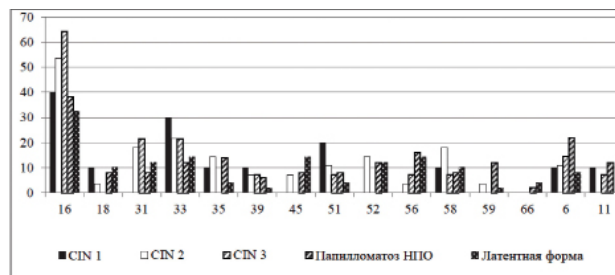


Рисунок 2 Частота обнаружения генотипов ВПЧ в половых путях беременных в зависимости от клинической формы папилломавирусной инфекции, %

амплификации ДНК-калибраторов выстраивается калибровочная прямая, по которой происходит определение концентрации ДНК ВПЧ в образцах.

Для статистической обработки количественных данных применялись методы вариационной статистики Фишера-Стьюдента с определением доли (P, %) изучаемого признака и стандартной ошибки доли (sP, %). При межгрупповом и внутригрупповом сравнении по долям использованы критерии Фишера и χ^2 . Для описания центральной тенденции рассчитаны медиана (Me) и интерквартильный размах (25; 75). Для установления различий в группах признаков вычисляли критерий Манна-Уитни (Z). Статистическая обработка данных производилась при помощи программ «Statistica 7.0» и «MedCalc 10.2.0.0».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рисунке 1 представлена структура клинических форм папилломавирусной инфекции.

Как видно из рисунка 1, латентная форма ВПЧ-инфекции, папилломатоз наружных половых органов и дисплазия шейки матки различных степеней встречаются практически с одинаковой частотой (соответственно 32,5%, 35,1% и 37%). В структуре дисплазий преобладают CIN 2 в 19,8% случаев (в 17,2% изолировано и в 2,6% случаев в сочетании с папилломатозом НПО). У 7 пациенток (4,6%) дисплазии сочетаются с папилломатозом, причем с дисплазией легкой степени в 1,3%, средней степени в 2,6%, тяжелой степени – 0,7%.

У всех беременных были определены генотипы

Таблица 1 Вирусная нагрузка ВПЧ у беременных в зависимости от клинической формы папилломавирусной инфекции

Форма ВПЧ-инфекции	Медиана вирусной нагрузки, lg г.э. на 10 ⁵ клеток	Интерквартильный размах, (25%; 75%)
Папилломатоз НПО	4,7	(3,25; 5,76)
CIN 1	5,86	(3,73; 7,4)
CIN 2	5,28	(4,84; 5,9)
CIN 3	4,66	(3,86; 6,07)
Латентная форма	4,25	(3,51; 5,13)

вируса папилломы в половых путях – их частота в зависимости от клинической формы папилломавирусной инфекции представлена на рисунке 2.

Установлено, что во всех группах превалирует 16 генотип, статистически значимых различий между группами по частоте генотипов выявлено не было. Следует отметить, что частота встречаемости 16 генотипа имеет тенденцию к возрастанию при утяжелении степени CIN (40% – 53,6% – 64,3%). Доля 16, 18, 31, 33, 56 генотипов при дисплазии тяжелой степени (72,7%) была выше, нежели при CIN 1-2 и латентной форме (53,3%, 54% и 57,3% соответственно). Доля вышеперечисленных генотипов в группе пациенток с папилломатозом НПО была ниже, чем во всех остальных группах и составила 44,1%. Низкоонкогенные 6, 11 генотипы ВПЧ наиболее часто верифицировались у пациенток с папилломатозом (у 34% беременных данной группы), что, с одной стороны, подтверждает их роль в развитии папиллом, а с другой – указывает, что у более чем половины таких пациенток при папилломатозе этиологическую роль в развитии папиллом сыграли высокоонкогенные генотипы.

Частота моно- и микст-инфекций при различных проявлениях ВПЧ-инфекции изображена на рисунке 3.

Статистически значимых различий по частоте обнаружения одного или нескольких генотипов ВПЧ при различной клинике папилломавирусной инфекции не было определено ($p \geq 0,05$), однако в группе женщин с дисплазией тяжелой степени 1 генотип вируса встречался чаще, чем в других группах. Это может стать поводом к предположению о значимости одного генотипа в злокачественной трансформации, независимо

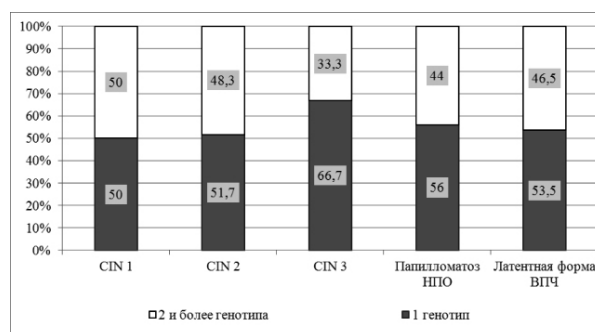


Рисунок 3 Частота папилломавирусной инфекции в виде моно- и микст инфекции у беременных, %

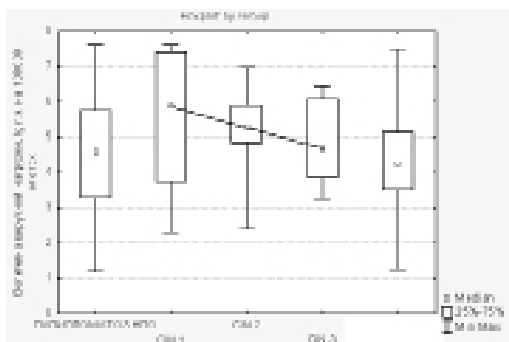


Рисунок 4 Вирусная нагрузка ВПЧ в половых путях беременных в зависимости от клинической формы папилломавирусной инфекции

от присутствия или отсутствия других генотипов.

Данные о вирусной нагрузке ВПЧ в генитальном тракте женщин с различными проявлениями папилломавирусной инфекции представлены в таблице 1 и на рисунке 4.

Представленные на рисунке и в таблице данные показывают отсутствие статистически значимых различий по величине вирусной нагрузки ВПЧ ($p=0,2$). Однако прослеживается тенденция к снижению количества вируса при утяжелении степени дисплазии от CIN 1 к CIN 3 с 5,86 до 4,66 lg г.э. на 10⁵ клеток.

Частота встречаемости различных клинических форм в зависимости от диапазона вирусной нагрузки ВПЧ представлена на рисунке 5.

Из вышеприведенного графика видно, что при дисплазиях легкой и средней степеней высокая вирусная нагрузка (более 5 lg г.э. на 10⁵ клеток) встречается в половине и более случаев. При дисплазиях тяжелой степени и бессимптомном вирусоносительстве в 66,7% и 61,5% случаев соответственно вирусная нагрузка ВПЧ находится в диапазоне от 3 до 5 lg г.э. на 10⁵ клеток. Все полученные данные о нагрузке вируса папилломы при различных проявлениях дают повод предположить, что высокий ее уровень играет роль при дисплазиях легкой и средней степеней тяжести.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведение углубленного молекулярно-генетического исследования папилломавирусной инфекции у беременных пациенток с клинических и экономических позиций следует проводить по показаниям. Генотипирование следует проводить всем инфицированным вирусом папилломы пациенткам, независимо от наличия или отсутствия клинических проявлений, с целью дифференцирования персистенции и реинфицирования папилломавирусной инфекции, а также прогнозирования дальнейшего течения патологического процесса, вызванного ВПЧ. Определять вирусную нагрузку целесообразно при наличии дисплазии легкой степени, латентной формы ВПЧ-инфекции и папилломатоза НПО, высокий уровень которой позволит выявить группу риска по развитию тяжелой степени дис-

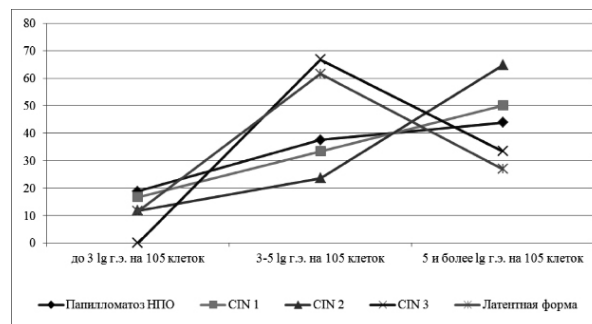


Рисунок 5 Частота различных клинических форм в зависимости от диапазона вирусной нагрузки ВПЧ в половых путях беременных

плазии и рака шейки матки.

ВЫВОДЫ

1. Во всех группах обследованных беременных пациенток превалирует 16 генотип, причем частота встречаемости 16 генотипа имеет тенденцию к возрастанию при утяжелении степени CIN (40% – 53,6% – 64,3%).
2. Доля 16, 18, 31, 33, 56 генотипов при дисплазии тяжелой степени (72,7%) была выше, нежели при CIN 1-2 и латентной форме (53,3%, 54% и 57,3% соответственно).
3. По величине вирусной нагрузки прослеживается тенденция к снижению количества вируса при утяжелении степени дисплазии от CIN 1 к CIN 3 с 5,86 до 4,66 lg г.э. на 10⁵ клеток. Причем при дисплазиях легкой и средней степеней высокая вирусная нагрузка (более 5 lg г.э. на 10⁵ клеток) встречается в половине и более случаев.

ЛИТЕРАТУРА

1. Акберова, Д.Р. Папилломавирусная инфекция: современная диагностика и терапия / Д.Р. Акберова, С.В. Батыршина // Практическая медицина, 2012. - № 9 (65). - С. 168-169.
2. Яковлева, Н.Г. Количественная оценка вирусной нагрузки вирусом папилломы человека при заболеваниях шейки матки / Н.Г. Яковлева, Т.В. Трунова // Тезисы Международного междисциплинарного форума «Шейка матки и вульвовагинальные болезни» (14–17 ноября 2012 года, Москва). - С. 103-104.
3. Макацария, А.Д. Беременность, роды и послеродовый период у больных с вирусной инфекцией / А.Д. Макацария, Н.В. Долгушина. - М.: 2005. - С. 63-64.
4. Долгушина, Н.В. Вирусные инфекции у беременных. Руководство для врачей / Н.В. Долгушина, А.Д. Макацария. - М.: 2004. - С. - 44-45.
5. Guerra, V. Combined cytology and colposcopy o screen for cervical cancer in pregnancy/ V. Guerra, P. De Simone, S. Gabrielli // Reprod Med. - 1998. - V.43. - P. 647-653.
6. Долгушина, В.Ф. Распространенность различных генотипов вируса папилломы человека при патологии шейки

- матки / В.Ф. Долгушина, О.С. Абрамовских // Акушерство и гинекология, 2011. - № 4. - С. 69-74.
7. Сидорова, И.С. Кольпоскопия во время беременности / Сидорова И.С., Макаров И.О., Куликов И.А. // Российский вестник акушера-гинеколога. -2009. - №4. - с. 27-30
 8. Роговская, С.И. Клиническое значение молекулярных маркеров при папилломавирусной инфекции / С.И. Роговская, Д.Ю. Трофимов, Е.А. Коган, Э.Х. Сабдулаева // Акушерство и гинекология, 2011. - № 4. - С. 4-10.
 9. Кувейда, Д.А. Современная концепция диагностики папилломавирусной инфекции // Тез. докл. Межрегиональной научно-практической конференции «Дерматовенерология в период реформирования здравоохранения и реализации национальных проектов». - Екатеринбург, 22-23 мая 2007. - С.112-113.
 10. Зароченцева Н.В., Серова О.Ф., Титченко Л.И., Капустина М.В. Течение беременности и родов после применения инвазивных методов лечения больных с цервикальными интраэпителиальными неоплазиями // Российский вестник акушера-гинеколога. — 2008. — Т. 8. — №4. — С. 37–41.
 11. Андосова, Л.Д. Генодиагностика папилломавирусной инфекции у женщин с различной гинекологической патологией / Л.Д. Андосова, К.Н. Конторщикова, О.Л. Блатова, О.В. Михалева, С.Ю. Куделькина // Материалы IV Регионального научного форума «Мать и дитя», Екат-ринбург 28-30 июня. 2010 г. / ФГУ «Урал. научно – иссл. инст. охр. материнства и младенчества»; редкол.: В.В. Ковалев [и др.]. - М., 2010 – С. 13-14.

**CLINICAL RELEVANCE OF QUALITY AND
QUANTITY MARKERS OF PAPILLOMA VIRAL INFECTION
IN CASE OF DIFFERENT FORMS OF HPV-ASSOCIATED PATHOLOGY
OF GENITALS AMONG PREGNANT WOMEN**

S.S. KRAVCHENKO, G.I. VERGEICHIK

Educational institution “GomelStateMedicalUniversity”

Abstract

The aim of this research was to detect the clinical relevance of quality and quantity markers of genital papilloma viral infection among pregnant patients.

Materials and methods: 151 pregnant women with different forms of genital papilloma viral infection were examined. In order to determine the DNA of HPV of high and low oncogenous risk and also of viral load was used PCR method insitu with test systems “AmpliSens®” (Russia).

Results: In genital tract of all examined patients dominates the 16th genotype, the degree of incidence of this genotype has the tendency to decrease in case of retrogression of dysplasia rate (40% – 53,6% – 64,3%). The can be seen the tendency to the decrease of the quantity of virus in case of retrogression of dysplasia rate from CIN 1 to CIN 3 from 5,86 till 4,66 lg y.e. per 105 cells.

Conclusion: The carrying out of advanced molecular genetic testing of papilloma viral infection among pregnant women is expedient in case of presence of dysplasia of mild case, latent form HPV-infection and papillomatosis of external genital organs in order to determine risk group for development or progression of dysplasia severity rate.

Key words: papilloma viral infection, pregnancy, papillomatosis, cervix uteri dysplasia.