

Оригинальное исследование

УДК: 618.146-002.446

<https://doi.org/10.21886/2219-8075-2022-13-2-34-43>

Управляемые факторы риска прогрессии ВПЧ-ассоциированных цервикальных плоскоклеточных интраэпителиальных неоплазий

В. Г. Ануфриева¹, Е. Ю. Лебеденко¹, О. В. Гайда¹, А. А. Михельсон¹, Т. Е. Карнушин²,
П. А. Евсеев³

¹ Ростовский государственный медицинский университет, Ростов-на-Дону, Россия

² Общество с ограниченной ответственностью Медицинский центр «Славия», Ростов-на-Дону, Россия

³ Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия

Автор, ответственный за переписку: Виталия Геннадьевна Ануфриева, vitaliya@list.ru

Аннотация. Цель: выявить информативные маркеры прогрессии цервикальных плоскоклеточных интраэпителиальных поражений низкой степени. **Материалы и методы:** проанализирована динамика результатов цитологического исследования цервикального эпителия, генотипирования вирусов папилломы человека высокого канцерогенного риска (ВПЧ ВКР) с оценкой вирусной нагрузки, иммуноцитохимического исследования экспрессии белка p16 (p16INK4a), сывороточного уровня фолиевой кислоты (витамина B9) у 90 ВПЧ-позитивных пациенток репродуктивного возраста. У 43 из 90 пациенток (47,8%), составивших I группу, был выявлен регресс заболевания. Во II группу вошли 30 из 90 пациенток (33,3%) с персистенцией заболевания - отсутствием значимых изменений в результатах лабораторных и инструментальных методов исследования. III группу составили 17 из 90 пациенток (18,9%) с прогрессом заболевания. Статистическую обработку результатов проводили с использованием методов параметрического и непараметрического анализа с помощью программ IBM SPSS Statistics 28.0.1.1 (разработчик — IBM Corporation), STATISTICA 13.5.0.17 (разработчик — StatSoft.Inc) и пакет MedCalc 20.027. **Результаты:** факторами, значимо отличающими пациенток с персистенцией или прогрессией цервикальных интраэпителиальных поражений низкой степени от женщин с регрессом заболевания, являлись более ранний возраст полового дебюта, обнаружение атипических изменений цервикального эпителия низкой степени, клинически значимая вирусная нагрузка ВПЧ ВКР, обнаружение экспрессии белка p16INK4a, сывороточный уровень фолиевой кислоты ниже 3,1 нг/мл. **Выводы:** дефицит сывороточного уровня фолиевой кислоты у ВПЧ-позитивных пациенток следует рассматривать как патогенетически значимый фактор риска реализации инфицирования в клиническую форму заболевания, что подтверждается его корреляционной взаимосвязью с цитологическим обнаружением LSIL, прогрессивным повышением копийности ВПЧ ВКР, экспрессией p16INK4a. Тактика ведения пациенток, предусматривающая персонализированную оценку риска прогрессии цервикальных интраэпителиальных поражений, расширяет возможности мониторинга пациенток с цервикальными неоплазиями, ассоциированными с ВПЧ.

Ключевые слова: цервикальная интраэпителиальная неоплазия, патология шейки матки, вирус папилломы человека, CIN, LSIL

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Для цитирования: Ануфриева В. Г., Лебеденко Е. Ю., Гайда О. В., Михельсон А. А., Карнушин Т. Е., Евсеев П. А. Управляемые факторы риска прогрессии ВПЧ-ассоциированных цервикальных плоскоклеточных интраэпителиальных неоплазий. *Медицинский вестник Юга России*. 2022;13(2):34-43. DOI 10.21886/2219-8075-2022-13-2-34-43.

Manageable risk factors for progression of HPV-associated cervical intraepithelial neoplasia

V. G. Anufrieva¹, E. Yu. Lebedenko¹, O. V. Gaida¹, A. A. Mikhelson¹, T. E. Karnushin², P. A. Evseev³

¹ Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russia

² Limited Liability Company Medical Centre "Slavia", Rostov-on-Don, Russia

³ Academician I. P. Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russia

Corresponding author: Vitaliya G. Anufrieva, vitaliya@list.ru

Abstract. Objective: to identify informative markers of the progression of cervical intraepithelial lesions of low degree. **Materials and methods:** the dynamics of the results of the cytological study of cervical epithelium, genotyping of human papilloma viruses of high carcinogenic risk (HPV) with an assessment of the viral load, an immunocytochemical study of the expression of protein p16 (p16INK4a), serum folic acid in 90 HPV-positive patients of reproductive age was analyzed. 43 of the 90 patients (47.8%) who made up group I had regression of the disease. Group II included 30 of 90 patients (33.3%) with

disease persistence - no significant changes in the results of laboratory and instrumental research methods. Group III was 17 out of 90 patients (18.9%) with disease progression. Statistical processing of the results was carried out using parametric and non-parametric analysis methods using IBM SPSS Statistics 28.0.1.1 (developed by IBM Corporation), STATISTICA 13.5.0.17 (developed by StatSoft.Inc) and MedCalc 20.027. **Results:** factors that significantly distinguish patients with persistence or progression of low grade cervical intraepithelial lesions from women with regression of the disease are: earlier age of sexual onset, detection of atypical changes in low grade cervical epithelium, clinically significant HPV viral load, detection of p16INK4a protein expression, serum folic acid below 3.1 ng/ml. **Conclusions:** deficiency of serum folic acid in HPV of positive patients should be considered as a pathogenetically significant risk factor for the implementation of infection into the clinical form of the disease, which is confirmed by its correlation with the cytological detection of LSIL, progressive increase in the copy of HPV, and p16INKa expression. The patient management strategy, which provides a personalized assessment of the risk of progression of cervical intraepithelial lesions, expands the monitoring of patients with cervical neoplasias associated with HPV.

Keywords: cervical intraepithelial neoplasia, cervical pathology, human papillomavirus, CIN, LSIL

Financing. The study did not have sponsorship

For citation: Anufrieva V. G., Lebedenko E. Yu., Gaida O. V., Mikhelson A. A., Karnushin T. E., Evseev P. A. Manageable risk factors for progression of HPV-associated cervical intraepithelial neoplasia. *Medical Herald of the South of Russia*. 2022;13(2):34-43. DOI 10.21886/2219-8075-2022-13-2-34-43.

Введение

Рак шейки матки (РШМ) остается одной из наиболее значимых медицинских и социальных проблем женского репродуктивного здоровья [1]. Известно, что в глобальном масштабе во всем мире каждые 40 секунд одна женщина умирает от данного заболевания [2]. С 2008 г. доказана роль ВПЧ как основного этиологического фактора цервикальных интраэпителиальных неоплазий (CIN) и инвазивного рака. В связи с этим наиболее перспективной стратегией в цервикальном скрининге считается сочетание проведения ВПЧ-типирования и цитологического исследования эпителиальных клеток шейки матки, регламентированное российскими клиническими рекомендациями 2020 г. и Приказом Минздрава РФ №1130н. Согласно данным документам, у молодых пациенток с LSIL (признаки ВПЧ инфекции, койлоцитоз) или пациенток, планирующих беременность, предпочтительна выжидательная тактика с динамическим наблюдением за состоянием шейки матки в течение 18–24 месяцев в виде цитологического контроля 1 раз в 6 мес. и ВПЧ-тестирования 1 раз в год. Хирургическое лечение рекомендуется в случае отсутствия регрессии через 18–24 мес.¹²

Рядом исследований установлено, что персистенция ВПЧ, развитие CIN и РШМ зависят от метилирования генов-супрессоров опухолевого роста. После внедрения в клетку ВПЧ использует донаторы метильных групп человека (фолаты и витамин B12), что ведет к значительному повышению синтеза онкобелков E6 и E7, которые стимулируют клеточную пролиферацию, препятствуют апоптозу раковых клеток, блокируют выработку интерферона, нарушают протективные регуляторные механизмы репарации ДНК, что в целом дестабилизирует геном. Для снижения экспрессии генов онкобелков в клетках, инфицированных ВПЧ, необходим оптимальный уровень фолатов [3, 4].

Известно, что активно пролиферирующие клетки (кроветворные и эпителиальные) чутко реагируют на

нарушение процесса репликации, возникающее при дефиците фолатов, что сопровождается нарушением гемопоэза (анемией, тромбоцитопенией и лейкопенией), а также высоким риском развития злокачественных новообразований, вследствие нарушения пролиферации эпителиальных клеток кожных покровов и слизистых. Доказанной является также роль низкого уровня фолиевой кислоты в повышении риска ряда других состояний, включающих нарушения эмбриогенеза, нейродегенеративных и сердечно-сосудистых заболеваний [5, 6].

Однако исследования, устанавливающие ассоциативные связи между риском развития или прогрессии CIN и концентрацией фолатов в сыворотке крови ограничены и представлены лишь зарубежными авторами прошлого десятилетия [7, 8, 9].

В связи с высокой распространённостью ВПЧ, естественной историей его течения, возможностью как регрессировать, так и прогрессировать поиск информативных прогностических маркёров, позволяющих сформировать группы «высокого» и «низкого» риска реализации инфицирования ВПЧ в цервикальные плоскоклеточные интраэпителиальные поражения, представляет научный и практический интерес.

Цель исследования — выявить информативные маркёры прогрессии цервикальных плоскоклеточных интраэпителиальных поражений низкой степени.

Материалы и методы

Обследовано 127 пациенток, у которых 6 месяцами ранее в ходе рутинного цервикального скрининга в амбулаторных лечебных учреждениях г. Ростова-на-Дону был выявлен позитивный тест типирования ВПЧ высокого канцерогенного риска (ВКР). У 44 женщин инфицированность ВПЧ ВКР не сопровождалась цервикальными интраэпителиальными поражениями плоского эпителия (NILM), у 83 больных (65,4%) выявляли цервикальные интраэпителиальные неоплазии плоского эпителия низкой степени (LSIL). Для всех пациенток в соответствии с актуальными клиническими рекомендациями была избрана выжидательная тактика, а именно динамическое наблюдение, регламентирующее повторное консультирование спустя 6 месяцев.

¹ Клинические рекомендации «Цервикальная интраэпителиальная неоплазия, эрозия и эктропион шейки матки». М.; 2020

² Приказ МЗ РФ от 20.10.20 №1130н «Об утверждении порядка оказания медицинской помощи по профилю акушерство и гинекология»

Анализ ВПЧ-тестирования 127 пациенток показал, что наиболее распространённой была инфицированность 16, 18 и 33 генотипами, которые были выявлены у 90 женщин (70,9%) и в структуре ВПЧ ВКР составляли соответственно 43,2%, 16,3% и 17,1%.

Для выбора дальнейшей тактики ведения 90 пациенток по прошествии 6 месяцев с момента первичного обследования был проведен сравнительный анализ динамики лабораторных и инструментальных методов диагностики шейки матки (цитологическое исследование цервикального мазка, молекулярно-биологическое исследование отделяемого из цервикального канала на ВПЧ с проведением генотипирования и определения вирусной нагрузки, расширенная кольпоскопия, иммуноцитохимическое исследование соскоба шейки матки с определением белка p16INK4a).

Полученные результаты выявили значимые отличия в исходах динамического наблюдения, которые определили распределение пациенток в три клинические группы.

У 43 из 90 пациенток (47,8%), составивших I группу, был выявлен регресс заболевания. Во II группу вошли 30 из 90 пациенток (33,3%) с персистенцией заболевания — отсутствием значимых изменений в результатах лабораторных и инструментальных методов исследования. III группу составили 17 из 90 пациенток (18,9%) с прогрессом заболевания.

В исследуемых группах проанализированы жалобы и состояние микрофлоры влагалища на момент консультирования, возраст пациенток, половой дебют, социальный статус больных с анализом промискуитета и семейного положения, применение методов контрацепции, гинекологический и акушерский анамнез, перенесенные экстрагенитальные заболевания, сывороточный уровень концентрации витамина B9.

Критерии включения в исследование — возраст от 18 до 49 лет, позитивный цервикальный ВПЧ-тест на наличие 16, 18 и 33-го типов, наличие цервикального интраэпителиального поражения плоского эпителия низкой степени (LSIL), либо его отсутствие (NILM), информированное согласие пациентки.

Критерии исключения — верифицирование цервикального интраэпителиального поражения высокой степени (HSIL), введение интравагинально любых лекарственных средств, приём иммуномодуляторов, противовирусных и антибактериальных препаратов в течение 6 месяцев, беременность и лактация, отказ от участия в исследовании.

Для жидкостной цитологии шейки матки клеточный материал получали из зоны трансформации и цервикального канала с помощью Cervex-Brush. Интерпретацию результатов осуществляли согласно классификации TBS (The Bethesda System) [10].

Генотипирование ДНК ВПЧ типов высокого канцерогенного риска 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 и 59, выделенных из клинических проб проводили с помощью набора «РеалБест ДНК ВПЧ ВКР генотип», методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени на амплификаторе CFX-96 «REAL TIME» (Bio-Rad США).

Оценку состояния экзо- и эндоцервикса проводили с помощью расширенной кольпоскопии по стандартной методике с помощью оптического кольпоскопа Carl Zeiss E. (Germany). Полученные данные интерпретировали согласно Международной классификации кольпоскопических терминов³.

Определение сывороточного уровня концентрации фолиевой кислоты проводили однократно утром натощак с 08:00 до 11:00 часов методом хемилюминесцентного иммуноанализа на микрочастицах, Architect i2000 (Abbott) с использованием набора реагентов ADVIA Centaur FOL производства Siemens Healthcare Diagnostics (Германия). Референсные значения концентрации фолиевой кислоты — 3,1–20,5 нг/мл.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием методов параметрического и непараметрического анализа с использованием программ IBM SPSS Statistics 28.0.1.1 (разработчик — IBM Corporation), STATISTICA 13.5.0.17 (разработчик — StatSoft.Inc) и пакет MedCalc 20.027.

Для сравнения межгрупповых различий использовали непараметрический критерий Краскала-Уоллиса для независимых выборок с поправкой Бонферрони. Для нахождения решающих правил с помощью пакета SPSS применяли алгоритм RANFOR (случайный лес) и TREE (деревья классификации). Сравнение номинальных данных проводилось при помощи критерия χ^2 Пирсона.

Связь между явлениями оценивали расчётом коэффициента ранговой корреляции Спирмена. Для прогнозирования определенного исхода заболевания применяли метод анализа ROC-кривых. Качество прогностической модели, оценивали исходя из значений площади под ROC-кривой со стандартной ошибкой и 95% доверительным интервалом (ДИ) и уровня статистической значимости.

Результаты

Структура жалоб пациенток на момент консультирования была представлена сопоставимой частотой патологических влагалищных выделений ($p > 0,005$, $\chi^2 = 4,218$), ощущений зуда и жжения во влагалище и в области наружных половых органов ($p > 0,005$, $\chi^2 = 5,302$), диспареунии ($p > 0,005$, $\chi^2 = 3,437$). Доли пациенток с отсутствием жалоб в исследуемых группах значимо не различались ($p > 0,005$, $\chi^2 = 2,371$).

Возраст исследуемых пациенток находился в диапазоне от 21 до 49 лет. Распределение пациенток по пятилетним возрастным периодам не выявило значимых межгрупповых отличий ($p > 0,05$, $\chi^2 = 8,641$). При этом в I группе (с регрессом заболевания) доля женщин в возрасте от 21 до 24 лет была наибольшей и превышала таковую во II и III группах в 2,1 раза.

Изучение социального статуса, семейно-брачных отношений и промискуитета не выявило значимых межгрупповых отличий (соответственно ($p > 0,005$, $\chi^2 = 2,651$ и $p > 0,005$, $\chi^2 = 3,597$). Однако наибольшая доля

³ Международная классификация кольпоскопических терминов, одобренная в Рио-де-Жанейро, 2011, IFCPC [Электронный ресурс]. URL: <http://ragin-std.ru/assets/files/int-classification.pdf>

Таблица / Table 1

Социальный статус пациенток исследуемых групп
Social status of patients in the study groups

Социальный статус / Social status	Клинические группы / Clinical groups					
	I группа / Group I (n= 43)		II группа / Group II (n=30)		III группа / Group III (n=17)	
	abc/abs	%	abc/abs	%	abc/abs	%
Замужем / Married	21	48,8	16	53,3	5	13,5
Не замужем / Single	22	51,2	14	46,7	12	70,7
Работающие / Working	21	48,8	13	43,3	11	64,7
Учащиеся / Students	18	41,8	11	36,7	4	23,5
Домохозяйки / Housewives	4	9,4	6	20,0	2	11,8
Половой партнёр постоянный / Permanent sexual partner	24	55,8	16	53,3	5	29,4
Промискуитет / Promiscuity	19	44,2	14	46,7	12	70,6

Таблица / Table 2

Возраст полового дебюта у пациенток исследуемых групп
Age of Sexual Onset in Patients in Study Groups

Возрастной период / Age period (лет / y.o.)	Клинические группы / Clinical groups					
	I группа / Group I (n= 43)		II группа / Group II (n=30)		III группа / Group III (n=17)	
	abc/abs	%	abc/abs	%	abc/abs	%
12–14	15	34,9	17	56,7	5	58,8
15–17	28	65,1	13	43,3	10	29,4
≥18	10	0,0	0	0	2	11,8

незамужних пациенток с частой сменой половых партнеров была в III группе (с прогрессией заболевания), что отражено в табл. 1.

Среди пациенток исследуемых групп большинство было некурящими ($p>0,005$, $\chi^2=1,027$). При этом наиболее часто приверженность к табакокурению выявлена у пациенток III группы (41,2% против 30,0% во II и 27,9% в I группе).

У пациенток всех исследуемых групп возраст менархе находился в диапазоне от 10 до 13 лет и значимо не различался ($p>0,005$, $\chi^2=2,167$). С наибольшей частотой во всех клинических группах начало менструальной функции приходилось на период от 12 до 13 лет.

Исследование параметров менструального цикла также не выявило значимых межгрупповых отличий по длительности менструального цикла, продолжительности менструального кровотечения и его объёму ($p>0,005$, $\chi^2=1,472$). Различные нарушения менструального цикла у пациенток исследуемых групп встречались с сопоставимой частотой ($p>0,005$, $\chi^2=5,035$).

При анализе полового дебюта, приведенного в табл. 2, который анализировали по периодам от 12 до 14 лет, 15–17 годам, 18 и более лет, выявлено, что в I группе возраст такового было значимо более поздним, чем во II и III группах ($p<0,0001$, $\chi^2=12,82$).

Аналитическое изучение использования средств защиты от нежелательной беременности продемонстрировало закономерно низкую частоту использования барьерных методов во всех исследуемых группах.

Прием КОК с наибольшей частотой отмечен у пациенток I и II групп (60,5% и 53,3% соответственно). Предпочтительными методами контрацепции для пациенток III группы (с прогрессией заболевания) были внутриматочные средства и прерванный половой акт (29,4%). В этой же группе неиспользование методов защиты от нежелательной беременности встречалось у 5,9% пациенток. Несмотря на некоторые особенности по используемым средствам контрацепции, значимых отличий между исследуемыми группами выявлено не было ($p>0,005$, $\chi^2=10,3$).

Сравнительный анализ данных акушерского анамнеза показал, что пациентки исследуемых групп не имели значимых отличий по паритету беременностей ($p>0,005$, $\chi^2=3,605$) и родов ($p>0,005$, $\chi^2=1,841$). В каждой из клинических групп у большинства женщин в анамнезе были беременности (соответственно по группам — 69,8%; 80,0% и 64,7%), которые практически у каждой второй пациентки завершились родами (48,8%; 50,0% и 41,5%).

Анамнестические данные о перенесённых гинекологических заболеваниях не обнаружили значимых отличий по частоте встречаемости различных нозологий ($p>0,005$, $\chi^2=3,611$). Эти данные отражены в табл. 3.

Достоверных различий в нарушении влагалищной микрофлоры в анамнезе (бактериальный вагиноз, аэробный вагинит) ($p>0,005$, $\chi^2=1,12$) ($p>0,005$, $\chi^2=5,73$) у пациенток в исследуемых группах выявлено не было. ИППП

Таблица / Table 3

Структура гинекологических заболеваний у пациенток исследуемых групп
Structure of gynecological diseases in patients in the study groups

Нозологии / Nosology	Клинические группы/ Clinical groups					
	I группа/ Group I (n= 43)		II группа / Group II (n=30)		III группа / Group III (n=17)	
	abc/abs	%	abc/abs	%	abc/abs	%
Миома матки / Myoma	4	9,3	3	10,0	2	11,8
Эндометриоз / Endometriosis	6	13,9	4	13,3	2	11,8
ВЗОМТ / Pelvic inflammatory diseases	4	9,3	2	6,7	1	5,9
Гиперпластические процессы эндометрия / Endometrial hyperplasia	3	7,0	2	6,7	1	5,9
Доброкачественные заболевания молочных желез / Benign breast diseases	6	13,0	5	16,7	3	17,6
Сочетание заболеваний / Combinations of diseases	8	18,6	4	13,3	3	17,6
Отсутствие заболеваний / Absence of diseases	12	27,9	6	20	4	23,5

Таблица / Table 4

Структура экстрагенитальных заболеваний у пациенток исследуемых групп
Structure of extragenital diseases in patients in the study groups

Нозологии / Nosology	Клинические группы/ Clinical groups					
	I группа/ Group I (n= 43)		II группа / Group II (n=30)		III группа / Group III (n=17)	
	abc/abs	%	abc/abs	%	abc/abs	%
Сердечно-сосудистая система / Cardiovascular system	2	4,7	2	6,7	1	5,9
Желудочно-кишечный тракт / Digestive tract	4	9,3	4	13,3	3	17,6
Мочевыделительная система / Urinary system	4	9,3	4	13,3	2	11,8
Дыхательная система / Breathing system	2	4,7	2	6,7	1	5,9
Эндокринная система / Endocrine system	2	4,7	5	16,7	3	17,6
Сочетание заболеваний / Combination of diseases	4	9,3	3	10,0	3	17,6
Отсутствие заболеваний / Absence of diseases	25	58,1	10	30,0	4	23,5

(хламидиоз, трихомониаз, гонококковую инфекцию) в анамнезе с наибольшей частотой отмечали у пациенток II и III групп (43,3% и 52,9% против 25,6% в I группе). В I группе доля женщин с неотягощённым инфекционным анамнезом была наибольшей ($p>0,05$, $\chi^2=2,965$).

Соматический анамнез был также сопоставимо отягощен различными экстрагенитальными заболеваниями ($p>0,005$, $\chi^2=2,724$) и отражен в табл. 4.

Лабораторное обследование состояния влагалищной микробиоты при обращении пациенток не выявило значимых различий между исследуемыми группами ($p>0,005$, $\chi^2=2,305$). Из табл. 5 следует, что при этом в I группе (с регрессом заболевания) сочетанные формы неспецифических инфекционных заболеваний влагалища (бактериальный вагиноз (БВ), аэробный вагинит (АВ), кандидозный вульвовагинит (КВВ)) выявляли в 4 раза

Таблица / Table 5

Вагинальные инфекции, вызванные условно-патогенными представителями микробиоты влагалища у пациенток исследуемых групп
Vaginal infections caused by opportunistic vaginal microbiota in patients in the study groups

Нозологии / Nosology	Клинические группы / Clinical groups					
	I группа / Group I (n= 43)		II группа / Group II (n=30)		III группа / Group III (n=17)	
	abc/abs	%	abc/abs	%	abc/abs	%
AB / Aerobic vaginitis	1	2,3	1	3,3	0	0
BB / Bacterial vaginosis	2	4,7	2	6,7	0	0
KBB / Candida vulvovaginitis	1	2,3	1	3,3	0	0
BB+AB / Bacterial vaginosis+aerobic vaginitis	0	0	1	3,3	2	11,8
BB+AB+KBB / Bacterial vaginosis+aerobic vaginitis+candida vulvovaginitis	0	0	1	3,3	2	11,8
BB+KBB / Bacterial vaginosis+candida vulvovaginitis	1	2,3	2	6,7	1	5,9
AB+KBB / Aerobic vaginitis+candida vulvovaginitis	0	0	0	0	1	5,9
Отсутствие нарушений влагалищной микробиоты / Normocenosis	38	88,4	12	40,0	0	64,7

Таблица / Table 6

Микроскопическая оценка воспалительной реакции влагалища и уровень pH влагалищной жидкости у пациенток исследуемых групп
Microscopic evaluation of vaginal inflammatory response and vaginal fluid pH in study groups

Нозологии / Nosology	Клинические группы / Clinical groups					
	I группа / Group I (n= 43)		II группа / Group II (n=30)		III группа / Group III (n=17)	
	abc/abs	%	abc/abs	%	abc/abs	%
ПМЯЛ/ЭК ≥ 1 PML/EC ≥ 1	1	2,3	2	6,7	5	29,4
ПМЯЛ/ЭК < 1 PML/EC < 1	36	83,7	23	76,7	12	70,6
pH=3,5- 4,5	38	88,4	5	16,7	1	5,9
pH>4,5	5	11,6	25	83,3	15	88,2

Примечание. ПМЯЛ — полиморфноядерные лейкоциты, ЭК — эпителиальные клетки.

Note. PML — polymorphonuclear leukocytes, EC — epithelial cells

реже по сравнению со II (персистенция инфекции) и III (прогресс заболевания) группами.

Результаты исследования вагинального отделяемого на наличие воспалительной реакции продемонстрировали, что в III группе (с прогрессирующей болезнью) отмечалась наибольшая по сравнению с I и II группами частота воспалительной реакции влагалища (в 4,4 раза). Данные результаты продемонстрированы в табл. 6. Значимо большая доля пациенток с физиологическим уровнем pH влагалищной жидкости выявлена в группе женщин с регрессом заболевания ($p < 0,002$, $\chi^2 = 3,512$).

Исследование вирусной нагрузки, одного из критериев стратификации пациенток по клиническим группам,

показало принципиальные различия, указанные на рис. 1. Через 6 месяцев динамического наблюдения в I группе отмечено отсутствие клинически значимых концентраций ВПЧ-ВКР (более 10^5 геномных эквивалентов). Частота пациенток с клинически малозначимым уровнем вирусной нагрузки (менее 10^{3-5} геномных эквивалентов ВПЧ ВКР) сократилась в 3,2 раза (90,7% женщин) ($p < 0,003$, $\chi^2 = 1,341$). Доля женщин с клинически незначимой вирусной нагрузкой (менее 10^3 геномных эквивалентов ВПЧ-ВКР) увеличилась в 2,4 раза ($p < 0,002$, $\chi^2 = 1,413$) (рис. 1). У данных пациенток также отмечалась нормализация результатов цервикального мазка и кольпоскопической картины, отсутствовала экспрессия белка p16INK4a (рис. 2).

Во II группе (с персистенцией заболевания) значимые изменения в параметрах лабораторных и инструментальных методов исследования не выявлены (рис. 1). Результаты цитологии цервикального эпителия (LSIL), частота выявления аномальных кольпоскопических картин I степени, а также уровень вирусной нагрузки и экспрессия белка p16INK4a не имели значимых отличий в динамике наблюдения. Суммарно наибольшую долю на момент консультирования, как и 6 месяцами ранее составляли больные с клинически малозначимой и незначимой нагрузкой ВПЧ ВКР (соответственно 90,0% и 93,3% пациенток) (рис. 1). Частота обнаружения экспрессии онкобелка p16ink4a не отличалась от предыдущей и выявлена соответственно у 16,7% и 13,3% пациенток данной группы.

В III группе (с прогрессом заболевания) выявлено значимое по сравнению с I и II группами увеличение (в 2,7 раза) вирусной нагрузки ВПЧ ВКР до уровня клинически значимого и выше (10^5 и более геномных эквивалентов ВПЧ-ВКР) ($p < 0,001$, $\chi^2 = 39,192$) (рис. 1). У данных больных цитологические изменения цервикального эпителия и аномальные кольпоскопические картины соответствовали стойким изменениям в пределах LSIL. Также отмечалась значимо более высокая экспрессия белка p16INK4a по сравнению с группами сравнения ($p < 0,001$, $\chi^2 = 24,4$) (рис. 2).

Результаты проведенного сравнительного клинко-статистического анализа пациенток с ВПЧ-ассоциированными LSIL, а также оценка диагностической значимости полученных экспрессионных данных

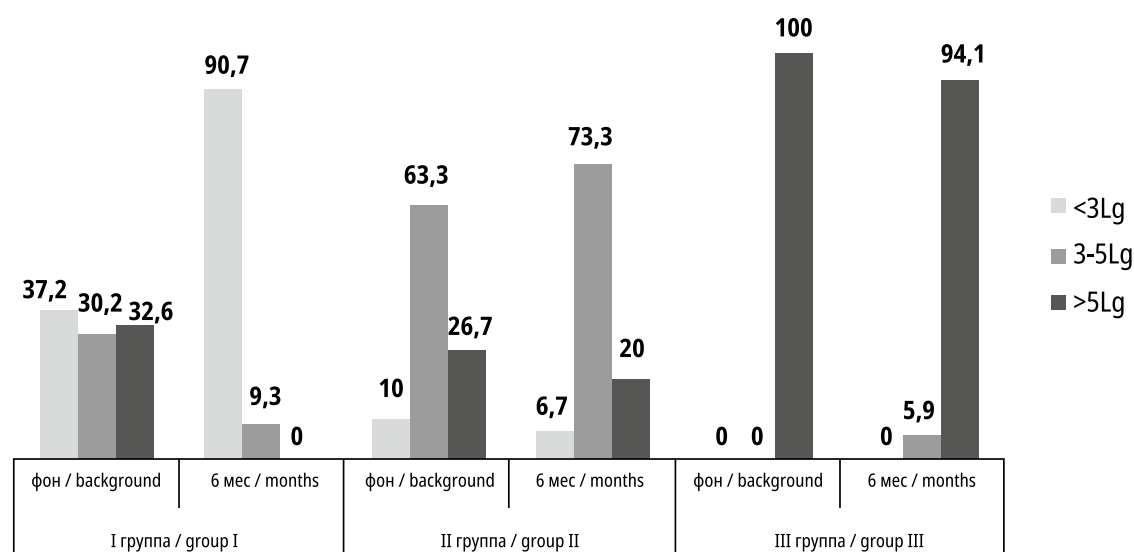


Рисунок 1. Динамика вирусной нагрузки ВПЧ ВКР у пациенток исследуемых групп.

Figure 1. Dynamics of HPV viral load in patients in the study groups.

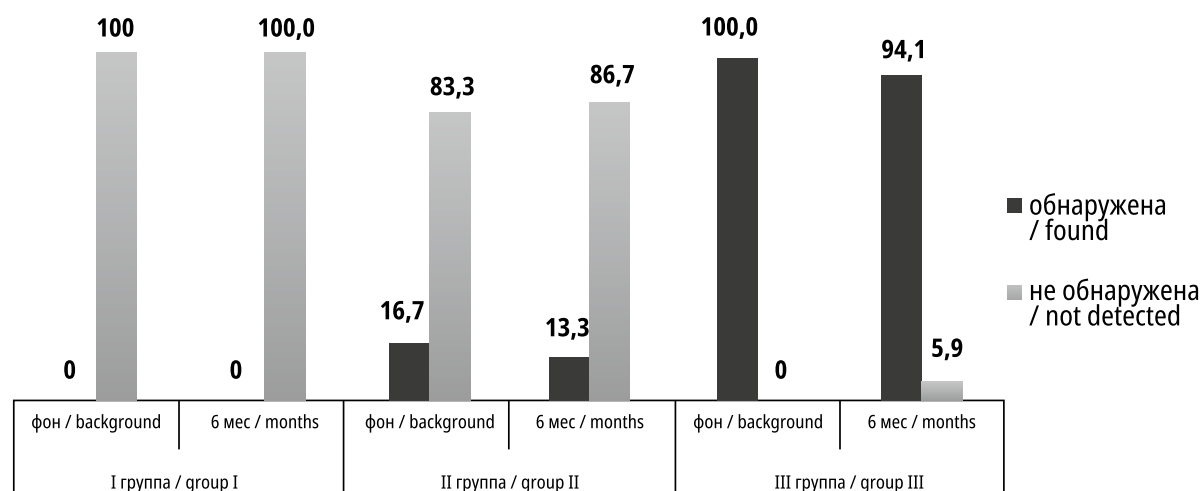


Рисунок 2. Обнаружение экспрессии онкобелка p16ink4a у пациенток исследуемых групп в динамике наблюдения.

Figure 2. Detection of cancer protein expression p16ink4a in patients of the study groups in the course of follow-up

с помощью ROC-анализа не продемонстрировали достаточной прогностической значимости отличительных параметров, которые можно было бы использовать в качестве предикторов исхода заболевания: регресса, персистенции или прогрессии. Площадь под кривой составляла 0,768.

Учитывая низкий прогностический потенциал ряда параметров, отличающих больных исследуемых групп, были исследованы сывороточные концентрации витамина В₉ (фолиевой кислоты) как возможного информативного параметра риска прогрессии цервикальных плоскоклеточных интраэпителиальных неоплазий.

В I группе (с регрессом заболевания через 6 месяцев), уровень фолиевой кислоты оказался значительно более высоким, по сравнению со II группой (соответственно $17,59 \pm 1,069$ и $8,91 \pm 1,996$; $p=0,0003$), а также с III группой (с прогрессией заболевания), в которой концентрация этого параметра в сыворотке крови была наименьшей ($2,98 \pm 0,112$; $p=0,0001$).

Оценка диагностической значимости полученных экспрессионных данных с помощью ROC-анализа продемонстрировала достаточную прогностическую значимость совокупности параметров (ранний половой дебют, цитологическое обнаружение LSIL, уровень вирусной нагрузки ВПЧ ВКР $\geq 10^5$ геномных эквивалентов ВПЧ ВКР, экспрессия онкобелка p16INK4a, сывороточный уровень фолиевой кислоты менее 3,1 нг/мл), которые можно рассматривать маркерами прогрессии заболевания. Площадь под кривой составила 0,849. При сравнении площадей под ROC-кривыми при проведении сравнительного клинико-статистического анализа следует, что при учете сывороточного уровня фолиевой кислоты прогностическая значимость модели прогноза прогрессии заболевания выше.

Обсуждение

Распространённость LSIL варьируется в диапазоне от 1,6 до 7,7 % женской популяции репродуктивного возраста, что указывает на социальную значимость разработки и применения четких алгоритмов ведения таких пациенток. Поскольку большинство случаев LSIL завершается спонтанной регрессией, зарубежные и отечественные клинические рекомендации активной лечебной тактики не предполагают [11].

По данным проведенного исследования факторами, значимо отличающими пациенток с персистенцией или прогрессией цервикальных интраэпителиальных поражений низкой степени от женщин с регрессом заболевания являются более ранний возраст полового дебюта, обнаружение атипических изменений цервикального эпителия низкой степени, клинически значимый уровень вирусной нагрузки ВПЧ ВКР, а также обнаружение экспрессии белка p16INK4a.

При этом проведенный клинико-статистический анализ пациенток не позволил ответить на ряд

вопросов. Почему при сопоставимости большинства анамнестических данных и катамнеза сценарий ВПЧ ассоциированных цервикальных интраэпителиальных поражений низкой степени у одних пациенток реализовался в прогрессию заболевания, а у других нет? Какие механизмы лежат в основе роста вирусной нагрузки (10^5 и более геномных эквивалентов ВПЧ ВКР)? Что определяет более выраженную экспрессию в пораженном ВПЧ цервикальном эпителии белка p16INK4a, чувствительного показателя перехода легких потенциально обратимых повреждений (LSIL) в тяжёлые?

В настоящее время рядом многочисленных исследований установлено, что низкий уровень фолиевой кислоты связан с повышенным риском ряда состояний (дефектов нервной трубки, сердечно-сосудистых заболеваний, анемии) [12, 13].

Убедительно доказано, что фолаты, химические соединения на основе фолиевой кислоты, незаменимы для синтеза нуклеотидов и репликации ДНК, которые являются основными обменными процессами, обеспечивающими физиологическое деление и нормальный рост всех клеток человеческого организма [14]. Обсуждается причастность фолатного статуса и к развитию некоторых видов рака — колоректального, молочной железы и быстро растущего числа его других локализаций, таких как лёгкие, поджелудочная железа, желудок, пищевод, лейкемия, кожа и эндометрий [15].

Выводы

В нашем исследовании установлена взаимосвязь концентраций витамина В₉ с уровнем копийности ВПЧ ВКР, а также с активностью экспрессии белка p16INK4a, что позволяет рассматривать сывороточный уровень фолиевой кислоты в качестве информативного фактора, играющего значимую роль в прогнозе течения цервикальных плоскоклеточных интраэпителиальных неоплазий низкой степени⁴. Уточнение роли фолатного статуса в установлении индивидуального риска персистенции ВПЧ, развития цервикальных дисплазий, а также их прогрессии представляет важный инструмент мониторинга за ВПЧ-инфицированными пациентками. Полученные результаты обосновывают необходимость выбора тактических вариантов ведения пациенток на основе достаточно точного метода прогнозирования прогрессии LSIL, который, не нарушая алгоритма актуальных клинических рекомендаций, позволяет снизить риск реализации инфицирования ВПЧ в клиническую форму заболевания.

⁴ Патент № 2766719, Российская Федерация, МПК A61B 10/00 (2006.01). Способ прогнозирования прогрессии цервикального плоскоклеточного интраэпителиального поражения низкой степени на фоне папилломавирусной инфекции / В.Г. Ануфриева, Е.Ю. Лебеденко, О.В. Гайда // Заявка № 2021127672, 20.09.202; Оpubл. 15.03.2022., Бюллетень № 8.

ЛИТЕРАТУРА

1. Назарова Н.М., Прилепская В.Н., Гусаков К.И., Сычева Е.Г. ВПЧ-ассоциированные заболевания у женщин и мужчин: клинические и практические аспекты. *Медицинский оппонент*. 2018;(4):22-29. eLIBRARY ID: 36574688
2. Состояние онкологической помощи населению России в 2019 году. Под ред. Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена — филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России; 2020.
3. Полатова Д.Ш., Мадаминов А.Ю. Основные молекулярные механизмы канцерогенеза, индуцированного вирусом папилломы человека. *Злокачественные опухоли*. 2021; 11(4):39-47. DOI: 10.18027/2224-5057-2021-11-4-39-47
4. Kono T, Laimins L. Genomic Instability and DNA Damage Repair Pathways Induced by Human Papillomaviruses. *Viruses*. 2021;13(9):1821. DOI: 10.3390/v13091821.
5. Михайлюкова В.А. Идеальный фолат: миф или реальность? *Доктор.Ру*. 2020;19(8):55–60. DOI: 10.31550/1727-2378-2020-19-8-55-60
6. Демидова М.А., Малыгин А.С. Фолаты и репродуктивное здоровье женщин: современный взгляд на проблему. *Акушерство и гинекология: новости, мнения, обучение*. 2021;9(3):29-34. DOI: 10.33029/2303-9698-2021-9-3-29-34
7. Kondo A, Asada Y, Shibata K, Kihira M, Ninomiya K, et al. Dietary folate intakes and effects of folic acid supplementation on folate concentrations among Japanese pregnant women. *J Obstet Gynaecol Res*. 2011;37(4):331-6. DOI: 10.1111/j.1447-0756.2010.01358.x.
8. Asemi Z, Vahedpoor Z, Jamilian M, Bahmani F, Esmailzadeh A. Effects of long-term folate supplementation on metabolic status and regression of cervical intraepithelial neoplasia: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Nutrition*. 2016;32(6):681-6. DOI: 10.1016/j.nut.2015.12.028.
9. Протасова А.Э. Цервикальная интраэпителиальная неоплазия и рак шейки матки. Вирус папилломы человека – единственный фактор риска? *Эффективная фармакотерапия*. 2019;15(32):42–46. DOI 10.33978/2307-3586-2019-15-32-42-46
10. Nayar R., Wilbur D.C., eds. *The Bethesda System for Reporting Cervical Cytology*. Cham: Springer International Publishing, 2015.
11. Grigore M, Cruickshank ME, Nieminen P, Tjalma W, Moss E, Redman C. National guidelines for management of cervical squamous intraepithelial lesion: A survey of European Federation for colposcopy members. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2021;256:46-50. DOI: 10.1016/j.ejogrb.2020.10.028.
12. Mikkelsen K, Prakash MD, Kuol N, Nurgali K, Stojanovska L, Apostolopoulos V. Anti-Tumor Effects of Vitamin B2, B6 and B9 in Promonocytic Lymphoma Cells. *Int J Mol Sci*. 2019; 20(15):3763. DOI: 10.3390/ijms20153763.
13. Padmanabhan S, Waly MI, Taranikanti V, Guizani N, Ali A, et al. Folate/Vitamin B12 Supplementation Combats Oxidative Stress-Associated Carcinogenesis in a Rat Model of Colon Cancer. *Nutr Cancer*. 2019;71(1):100-110. DOI: 10.1080/01635581.2018.1513047.

REFERENCES

1. Nazarova N.M., Prilepskaya V.N., Gusakov K.I., Sycheva E.G. HPV-associated diseases in women and men: clinical and practical aspects. *Medical opponent*. 2018;(4):22-29. (In Russ.). eLIBRARY ID: 36574688
2. Kaprin AD, Starinsky V.V., Petrova G.V., eds. *State of oncological care for the population of Russia in 2019*. Moscow: MNII named after P.A. Herzen - branch of the Federal State Budgetary Institution «National Medical Research Center of Radiology» of the Ministry of Health of Russia; 2020. (In Russ.).
3. Polatova D.S., Madaminov A.Y. Main molecular mechanisms of carcinogenesis induced by human papillomavirus. *Malignant tumours*. 2021;11(4):39-47. (In Russ.). DOI: 10.18027/2224-5057-2021-11-4-39-47
4. Kono T, Laimins L. Genomic Instability and DNA Damage Repair Pathways Induced by Human Papillomaviruses. *Viruses*. 2021;13(9):1821. DOI: 10.3390/v13091821.
5. Mikhailyukova V.A. An Ideal Folate: Myth or Reality? *Doctor.Ru*. 2020;19(8):55–60. (in Russian). DOI: 10.31550/1727-2378-2020-19-8-55-60
6. Demidova M.A., Malygin A.S. Folate and women's reproductive health: a modern view on the problem *Akusherstvo i ginekologiya: novosti, mneniya, obucheniye [Obstetrics and Gynecology: News, Opinions, Training]*. 2021;9(3):29-34. (in Russian)DOI: 10.33029/2303-9698-2021-9-3-29-34
7. Kondo A, Asada Y, Shibata K, Kihira M, Ninomiya K, et al. Dietary folate intakes and effects of folic acid supplementation on folate concentrations among Japanese pregnant women. *J Obstet Gynaecol Res*. 2011;37(4):331-6. DOI: 10.1111/j.1447-0756.2010.01358.x.
8. Asemi Z, Vahedpoor Z, Jamilian M, Bahmani F, Esmailzadeh A. Effects of long-term folate supplementation on metabolic status and regression of cervical intraepithelial neoplasia: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Nutrition*. 2016;32(6):681-6. DOI: 10.1016/j.nut.2015.12.028.
9. Protasova A.E. Cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer. Is Human Papillomavirus the Only Risk Factor? *Effective pharmacotherapy*. 2019;15(32):42–46. (In Russ.). DOI 10.33978/2307-3586-2019-15-32-42-46
10. Nayar R., Wilbur D.C., eds. *The Bethesda System for Reporting Cervical Cytology*. Cham: Springer International Publishing, 2015.
11. Grigore M, Cruickshank ME, Nieminen P, Tjalma W, Moss E, Redman C. National guidelines for management of cervical squamous intraepithelial lesion: A survey of European Federation for colposcopy members. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2021;256:46-50. DOI: 10.1016/j.ejogrb.2020.10.028.
12. Mikkelsen K, Prakash MD, Kuol N, Nurgali K, Stojanovska L, Apostolopoulos V. Anti-Tumor Effects of Vitamin B2, B6 and B9 in Promonocytic Lymphoma Cells. *Int J Mol Sci*. 2019;20(15):3763. DOI: 10.3390/ijms20153763.
13. Padmanabhan S, Waly MI, Taranikanti V, Guizani N, Ali A, et al. Folate/Vitamin B12 Supplementation Combats Oxidative Stress-Associated Carcinogenesis in a Rat Model of Colon Cancer. *Nutr Cancer*. 2019;71(1):100-110. DOI: 10.1080/01635581.2018.1513047.

14. Hartmann N, McMurtrey C, Sorensen ML, Huber ME, Kurapova R, et al. Riboflavin Metabolism Variation among Clinical Isolates of *Streptococcus pneumoniae* Results in Differential Activation of Mucosal-associated Invariant T Cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2018;58(6):767-776. DOI: 10.1165/rcmb.2017-0290OC.
14. Hartmann N, McMurtrey C, Sorensen ML, Huber ME, Kurapova R, et al. Riboflavin Metabolism Variation among Clinical Isolates of *Streptococcus pneumoniae* Results in Differential Activation of Mucosal-associated Invariant T Cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2018;58(6):767-776. DOI: 10.1165/rcmb.2017-0290OC.
15. Kim YI. Folate and cancer: a tale of Dr. Jekyll and Mr. Hyde? *Am J Clin Nutr*. 2018;107(2):139-142. DOI: 10.1093/ajcn/nqx076.
15. Kim YI. Folate and cancer: a tale of Dr. Jekyll and Mr. Hyde? *Am J Clin Nutr*. 2018;107(2):139-142. DOI: 10.1093/ajcn/nqx076.

Информация об авторах

Ануфриева Виталия Геннадьевна, врач акушер-гинеколог, Ростовский государственный медицинский университет, Ростов-на-Дону, Россия, vitaliya@list.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8347-3222>

Лебеденко Елизавета Юрьевна, д.м.н, доцент, заведующий кафедрой акушерства и гинекологии №3, Ростовский государственный медицинский университет, Ростов-на-Дону, Россия, lebedenko08@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-2602-1486>

Гайда Оксана Владимировна, доцент кафедры акушерства и гинекологии №3, Ростовский государственный медицинский университет, Ростов-на-Дону, Россия, gajdaoksana@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-6966-1793>

Михельсон Александр Александрович, к.м.н., доцент кафедры акушерства и гинекологии № 3, Ростовский государственный медицинский университет, Ростов-на-Дону, Россия, mikhelson_aa@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5053-5941>

Карнушин Тимур Евгеньевич, главный врач, Медицинский центр «Славия», Ростов-на-Дону, Россия, le1to2393@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8499-9701>

Евсеев Петр Андреевич, студент, Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия, anarch1st61@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-4663-0775>

Вклад авторов:

Вклад авторов в написание работы равнозначен.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Information about the authors

Vitaliya G. Anufrieva, obstetrician-gynecologist, Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russia, vitaliya@list.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8347-3222>

Elizaveta Yu. Lebedenko, Dr.Sci. (Med.), associate professor, head of the Department of obstetrics and gynecology №3, Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russia, lebedenko08@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-2602-1486>

Oksana V. Gaida, Cand. Sci. (Med.), associate professor of the Department of Obstetrics and Gynecology, Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russia, gajdaoksana@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-6966-1793>

Alexander A. Mikhelson, Cand. Sci. (Med.), associate professor of the Department of Obstetrics and Gynecology, Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russia, mikhelson_aa@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5053-5941>

Timur Ev. Karnushin, Chief Physician of the Medical Center "Slavia" Rostov-on-Don, Russia, le1to2393@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8499-9701>

Pyotr A. Evseev, student, First St. Petersburg State Medical University named after I.P. Pavlova, St. Petersburg, Russia, anarch1st61@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-4663-0775>

Authors' contribution:

The contribution of the authors in writing the work is equivalent.

Conflict of interest

Authors declares no conflict of interest.

Поступила в редакцию / Received: 25.03.2022

Доработана после рецензирования / Revised: 11.05.2022

Принята к публикации / Accepted: 11.05.2022