

КЛИНИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ АГОНИСТА ТОЛЛ-ПОДОБНОГО РЕЦЕПТОРА 9 ПРИ РЕПАРАЦИИ ПОСЛЕ ПЕТЛЕВОЙ ЭЛЕКТРОЭКСЦИИ ШЕЙКИ МАТКИ

© Н.Н. Минаев¹, М.Н. Иванова², Д.Ю. Бугримов¹, А.А. Климович¹

¹ФГБОУ ВО «Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко» Минздрава РФ, Воронеж;

²БУЗ «Воронежский областной клинический онкологический диспансер», Воронеж

Поступила в редакцию: 26.09.2016

Принята к печати: 21.10.2016

■ **Цель** настоящего исследования — изучить, как использование агониста толл-подобного рецептора 9 (TLR 9) в послеоперационном периоде после петлевой радиоволновой эксцизии шейки матки, выполненной по поводу плоскоклеточного интраэпителиального поражения (SIL), влияет на процесс репарации тканей шейки матки. Сравнительное наблюдение за пациентками исследуемой группы в течение 6 месяцев показало, что иммунологическая коррекция процесса регенерации после LEEP агонистом TLR 9, производным дезоксирибонуклеата натрия, дает хороший клинический эффект в виде ускорения (на 6–7 дней) сроков отторжения струпа, без кольпоскопических признаков неполной регенерации, уменьшение площади ацетобелого эпителия в 4 раза, уменьшение йодонегативной зоны при пробе Шиллера в 9 раз, улучшение показателей цитологического исследования мазка, сокращение сроков лечения. **Материалы и методы.** В рандомизированное, продольное, проспективное, сравнительное исследование были включены 70 пациенток с плоскоклеточным интраэпителиальным поражением высокой и низкой степени (HSIL и LSIL). Пациентки первой, исследуемой группы ($n = 36$) в послеоперационном периоде получали в качестве агониста TLR 9 иммуномодулятор Деринат. Пациенткам второй, контрольной группы ($n = 34$) в послеоперационном периоде не назначали какие-либо медикаментозные препараты. В процессе установления диагноза всем пациенткам были выполнены обычные цитология и кольпоскопия, определение числа копий ДНК вируса папилломы человека (ВПЧ) методом ПЦР. Эти параметры были исследованы в послеоперационном периоде через 1 месяц и через 6 месяцев. **Результаты.** Системное применение агониста TLR 9 — препарата Деринат в условиях чистой послеоперационной раны шейки матки патогенетически оправдано, поскольку вместе с альтерацией приводит к синергическому воздействию на репаративные функции макрофагов, через активацию их толл-подобного рецептора 9, и последующему синтезу ими цитокинов, прямо ускоряющих процессы репарации и иммунного надзора за опухолевой трансформацией тканей интраэпителиальной цервикальной неоплазии. **Заключение.** Пациенткам после петлевой радиоволновой эксцизии шейки матки (Loop electrosurgical excision procedure, LEEP) показано назначение агониста толл-подобного рецептора 9, иммуномодулятора с репаративным эффектом препарата Деринат, путем внутримышечного введения по 75 мг через 24 часа № 10.

■ **Ключевые слова:** ВПЧ; радиоволновая электроэксцизия шейки матки; плоскоклеточные интраэпителиальные поражения высокой степени выраженности (HSIL); плоскоклеточные интраэпителиальные поражения низкой степени выраженности (LSIL); агонисты TLR 9.

CLINICAL EFFICACY OF AGONIST TOLL-LIKE RECEPTOR 9 ON THE PROCESS OF REPARATIONS AFTER LOOP CONIZATION (LEEP) OF THE CERVIX

© N.N. Minaev¹, M.N. Ivanova², D.Yu. Bugrimov¹, A.A. Klimovich¹

¹Voronezh State Medical University named after NN Burdenko, Voronezh, Russia;

²Voronezh Regional Clinical Oncology Center, Voronezh, Russia

For citation: Journal of Obstetrics and Women's Diseases. 2016;65(5):101-112

Received: 26.09.2016

Accepted: 21.10.2016

■ **The aim** of this study to explore the use of the agonist Toll-like receptors 9 (TLR 9) in the postoperative period after the LEEP, performed for cervical intraepithelial neoplasia, influences the process tissue repair cervix. **Materials and methods.** In a randomized, longitudinal, prospective, comparative study included 70 patients with squamous intraepithelial lesions (HSIL и LSIL). Patients first test group ($n = 36$) was obtained postoperatively as a TLR agonist Derinat 9 immunomodulator. Two patients, the control group ($n = 34$), postoperative not administered any medication drugs. In the process of diagnosis all patients were performed conventional cytology and colposcopy, PCR-test for human papillomavirus (HPV). These parameters were examined postoperatively at 1 month and 6 months. **Results.** Systemic administration

agonist TLR 9, drug Derinat in clean postoperative wound of the cervix pathogenetically justified because it, together with the alteration leads to a synergistic effect to the reparative function of the macrophages through activation of Toll-like receptors 9 and the subsequent synthesis of cytokines directly accelerates the process of repair and immune supervision of malignant transformation cervical intraepithelial neoplasia tissues. **Conclusion.** Patients after LEEP is recommended the appointment of the drug Derinat, agonist of toll-like receptor 9, immunomodulator with the reparative effect, intramuscular injection of 15 mg/mL, 75 mg after 24 hours number 10.

■ **Keywords:** HPV; Loop electrosurgical excision procedure (LEEP); High grade squamous intraepithelial lesion (HSIL); Low grade squamous intraepithelial lesion (LSIL), agonist TLR 9.

На сегодняшний день рак шейки матки (РШМ), несмотря на обстоятельно разработанные и достаточно широко внедренные скрининговые программы, во многих странах мира продолжает оставаться одним из самых распространенных онкологических заболеваний женских половых органов [1].

Каждый год в мире фиксируется 12,7 млн впервые установленных диагнозов злокачественных неоплазий, при этом более 1 млн — это онкологические заболевания молочных желез, яичников, матки и шейки матки. В России в 2010 г. аналогичный показатель заболеваемости достиг 47,7 тыс. (17 % от числа всех вновь выявленных онкологических заболеваний). Несмотря на целенаправленный скрининг, доля пациенток с раком шейки матки, диагностированным в ходе его проведения, в последнее десятилетие увеличилась только на 5 %. Что косвенно свидетельствует о недостаточной эффективности методик диагностики и необходимости их усовершенствования. В России выявляется только 28,9 % из числа всех женщин, заболевших РШМ [2].

Внедрение в середине XX в. в клиническую практику развитых стран стандартизированного целенаправленного скрининга существенно снизило заболеваемость РШМ (более 70 %) [3].

Рак шейки матки является вторым по частоте видом рака среди женщин всего мира. Хроническое инфицирование вирусом папилломы человека (ВПЧ) высокой степени онкогенного риска, генотипами HPV-16, -18, -45, является наиболее важным фактором в онкогенезе РШМ [4, 5].

Правильное ведение пациенток с плоскоклеточным интраэпителиальным поражением (SIL) является важным компонентом профилактики РШМ. Ошибки тактики лечения могут увеличить риск РШМ, с одной стороны, и риск осложнений от избыточного вмешательства, таких как риск преждевременных родов, — с другой [5].

Тактика ведения пациенток, носителей ВПЧ, при отсутствии интраэпителиальных поражений по-прежнему остается предметом

дискуссии, с аргументами от активного длительного наблюдения до превентивного оперативного лечения эктопий цервикального эпителия. Множественные исследования в мировой и отечественной науке подтверждают решающую роль изменений надзорной функции иммунной системы в развитии неоплазии эпителия шейки матки. Эти исследования сделали очевидной взаимосвязь между уровнем врожденного иммунного ответа организма на вирусную инвазию, выраженностью степени патоморфологических процессов в тканях и прогностическим вариантом исхода заболевания [6, 7].

В этиологии РШМ имеют значение фундаментальные изменения микробиоты влагалища и шейки матки, выявляемые при рутинной диагностике у 9–24 % клинически здоровых женщин и у 45–86 % больных гинекологических стационаров. Выраженные нарушения микробиоты влагалища значительно повышают опасность инфекций, передающихся половым путем. Дисбиотические нарушения при деструктивных операциях на шейке матки могут значительно ухудшать процессы регенерации тканей, сопровождаться неполной регенерацией тканей (субституцией) и фиброзным заживлением с образованием послеоперационного рубца, нарушающего генеративную функцию [8].

Возможными осложнениями после деструктивного воздействия на шейку матки являются гиперпластические процессы, к которым можно отнести железистую и железисто-кистозную гиперплазии, образование гранулем и гранулезной ткани, формирование рубцовой ткани. Эти осложнения чаще обусловлены воспалительным процессом и, как следствие, нарушением регенеративных процессов.

Как только процедура петлевой электроэксцизии шейки матки (Loop electrosurgical excision procedure, LEEP) была введена Prendiville et al. в 1989 г. для диагностики и лечения цервикальной интраэпителиальной неоплазии [9], она была широко признана в качестве метода

получения материала для гистологической диагностики [10, 11]. Главным образом, потому, что она может производиться в амбулаторных условиях, выполняема под местной анестезией и имеет высокую эффективность и низкий хирургический риск. Но дисбиотические процессы во влагалище ставят под угрозу процесс полноценной репарации шейчного эпителия и регенерации подлежащих тканей, что может впоследствии снижать эластичность шейки матки, создавая проблемы при родоразрешении через естественные родовые пути.

Многочисленные работы отечественных авторов [3, 4] и одна из немногих работ зарубежных авторов [10] посвящены влиянию препаратов локального действия, преимущественно иммуномодулирующих, на процессы регенерации после ЛЕЕР.

В аспекте полноценного заживления раны эпителия шейки матки после ЛЕЕР представляется перспективным применение веществ, стимулирующих регенерацию тканей. Одним из таких препаратов является дезоксирибонуклеат натрия, выпускаемый под торговой маркой «Деринат». Его высокая регенераторная активность ранее была показана в хирургической практике и при лечении язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки.

В настоящем исследовании была поставлена цель — показать регенераторный эффект дезоксирибонуклеата натрия при его системном применении как иммунорепаранта и агониста толл-подобных рецепторов 9 (Toll-like receptors 9, TLR9, CD289) в процессе восстановления тканей шейки матки после радиоволновой эксцизии.

Дезоксирибонуклеат натрия — российский препарат ДНК, Деринат (производитель ЗАО «ФП «Техномедсервис», Россия). Молекула Деринат (натриевая соль дезоксирибонуклеиновой кислоты) является олигодезоксинуклеотидом (ОДН) эукариотического происхождения с молекулярной массой до 500 кДа. Препарат является агонистом толл-подобных рецепторов 9. Он содержит в своем составе олигонуклеотиды, в 50 % случаев оканчивающиеся неметилированными CpG-мотивами, которые являются специфическими лигандами TLR9. Толл-подобные рецепторы 9 имеют внутриклеточную, точнее эндосомальную локализацию и экспрессируются моноцитами (макрофагами), нейтрофилами, плазматоцитидными дендритными клетками и В-лимфоцитами. Неметилированные CpG-мотивы распростра-

нены в бактериальной и вирусной ДНК. Именно их распознавание обеспечивают TLR9 в системе врожденного иммунного ответа. В доступной литературе высказывались предположения о том, что механизм действия лекарственного препарата Деринат на иммунокомпетентные клетки может опосредоваться TLR9 [12].

Первой линией защиты против ВПЧ-инфекции, при вирусной инвазии является система врожденного иммунного ответа, играющая решающую роль в реализации вирусной трансформации эпителия шейки матки [13].

Макрофаги уже давно считаются одними из наиболее важных иммунных эффекторных клеток, участвующих во врожденном иммунном ответе на патогены, на изменения гомеостаза нормальной ткани, в презентации чужеродных антигенов и аутоантигенов, появляющихся после заражения или альтерации, завершения процесса воспаления и заживления ран [14–16].

На основании вышеуказанной информации было сделано предположение, что системное применение иммунорепаранта Деринат (раствор для внутримышечного введения 15 мг/мл) в послеоперационном периоде после ЛЕЕР будет ускорять процесс репарации тканей шейки матки и способствовать скорейшей эпителизации влагалищной порции шейки матки, восстановлению цилиндрического эпителия цервикального канала и собственной пластинки слизистой оболочки.

Пациенты и методы

Для доказательства вышеуказанного предположения было проведено рандомизированное, продольное, проспективное, сравнительное исследование с анализом клинико-лабораторных данных и показателей инструментальных исследований.

В исследование были включены 70 пациенток с HSIL и LSIL, которые соответствовали критериям включения/исключения. Произведена независимая одномоментная рандомизация пациенток на две репрезентативные исследуемые группы. Пациентки основной группы 1 ($n = 36$) в послеоперационном периоде получали в качестве иммуномодулирующего препарата с репаративным эффектом Деринат, раствор для внутримышечного введения по 5 мл (75 мг) 1 раз в сутки через 24 часа в течение 10 дней, 10 инъекций на курс. Пациенткам контрольной группы 2 ($n = 34$) в послеоперационном периоде не назначали какие-либо медикаментозные препараты.

Критериями включения пациенток в исследование были данные результатов цитологического исследования мазка HSIL, LSIL и ASC-US (наличие у этой категории неудовлетворительной кольпоскопической картины (зона трансформации III типа)), лабораторные данные о наличии ВПЧ высокого онкогенного риска с числом ДНК-копий, определяемых методом ПЦР в мл, 3,0 lg и выше. Критериями исключения было наличие в анамнезе факта лечения ВПЧ иммуномодуляторами, а также прием иммуномодуляторов во время лечения по поводу других заболеваний.

Оценка эффективности лечения проводилась на основании динамики заживления послеоперационной раны по данным осмотра шейки матки в зеркалах Куско и по данным кольпоскопии/цитологии.

В процессе установления диагноза всем пациенткам были выполнены стандартные цитологические исследования цервикального мазка, кольпоскопия, ПЦР-тестирование на присутствие ДНК вируса папилломы человека (ВПЧ). Для цитологической оценки мазка использована классификация Bethesda system 2001 [17]. Забор материала для цитологического исследования производился цитощеткой Cytobrush Plus® GT.

Для предоперационной кольпоскопической оценки были использованы критерии Международной федерации по кольпоскопии и цервикальной патологии IFCPC (Рио-де-Жанейро, 2011).

LEEP была осуществлена в амбулаторных условиях дневного стационара под в/в анестезией раствором пропофола 1 %. Показанием к операции были: обнаружение HSIL — плоскоклеточных интраэпителиальных поражений высокой степени выраженности по результатам цитологического исследования, и/или LSIL, и/или аномальная кольпоскопическая картина на фоне цитологической атипичности (ASC-US).

LEEP проводилась радиоволновым хирургическим прибором Surgitron™, разработанным фирмой Ellman International, Inc. (США). Были выполнены эксцизия мозаичных, йод-негативных участков, пунктуации эпителия шейки матки на глубину тканей не менее 6 мм. Гемостаз осуществлялся электрокоагуляцией шариковым электродом. После LEEP всем пациенткам был произведен обычный кюретаж цервикального канала.

На протяжении всего периода наблюдения с контрольными осмотрами шейки матки в зеркалах Куско и кольпоскопом на 5, 7 и 10-е сутки

оценивалось состояние струпа на поверхности послеоперационной раны, наличие или отсутствие отделяемого из послеоперационной раны.

На протяжении 6 месяцев наблюдения (через 1 и 6 месяцев после окончания терапии) оценивали состояние шейки матки с помощью кольпоскопии/цитологии.

Результаты исследования были обработаны методом вариационной статистики и корреляционного анализа с помощью программы Microsoft Excel 7,0 (Windows 7 Microsoft Office 2007). Был определен критерий Стьюдента (t) для независимых групп. Различия между выборками признавались статистически значимыми при уровне достоверности $p \leq 0,05$.

Пациентки исследуемой группы были в возрасте $38,2 \pm 8,26$ года, имели в анамнезе $1,7 \pm 0,94$ родов и $1,9 \pm 0,32$ аборта. Аномальная кольпоскопическая картина была обнаружена в 52,8 % случаев. По результатам цитологического исследования мазка в 47,2 % случаев было обнаружено HSIL, в 27,8 % случаев — LSIL, в 25,0 % случаев были получены неклассифицируемые результаты теста. У пациенток методом ПЦР определялись копии ДНК ВПЧ с числом копий/мл более 3,0 lg. При этом ДНК генотипов высокого онкогенного риска такое число копий/мл было у 52,8 % пациенток, ДНК генотипов низкого онкогенного риска у 27,8 % и не определялись копии ДНК ВПЧ методом ПЦР у 19,4 %. Все пациентки основной исследуемой группы имели показания к LEEP: по результатам цитологического исследования мазка — HSIL 47,2 %. Из-за аномальной кольпоскопической картины на фоне LSIL и/или ASCUS — 52,8 %. Кроме того, у 19,4 % пациенток этой группы определялись атипичные кровеносные сосуды при кольпоскопическом исследовании, что в сочетании, например, с LSIL также явилось показанием к операции.

Пациентки контрольной группы, не получавшие медикаментозной терапии, были в возрасте $39,1 \pm 8,45$ года, имели в анамнезе $1,9 \pm 1,14$ родов и $1,6 \pm 0,41$ аборта. Аномальная кольпоскопическая картина была обнаружена в 52,9 % случаев. По результатам цитологического исследования мазка в 47,1 % случаев было обнаружено HSIL, в 26,5 % случаев — LSIL, в 26,5 % случаев были найдены неклассифицируемые результаты теста. У пациенток методом ПЦР определялась ДНК ВПЧ числом копий/мл более 3,0 lg. При этом такое число копий ДНК ВПЧ генотипов высокого онкогенного риска было у 59,2 % пациенток.

Характеристика пациенток

Таблица 1

Characteristics of patients

Table 1

Характеристика	Исследуемая группа с Деринатом (n = 36)	Контрольная группа без терапии (n = 34)
Клинические критерии (<i>M</i> ± <i>m</i>)		
Возраст (годы)	38,2 ± 8,26	39,1 ± 8,45
Роды	1,7 ± 0,94	1,9 ± 1,14
Аборты	1,9 ± 0,32	1,6 ± 0,41
Результаты кольпоскопического исследования		
Аномальная кольпоскопическая картина	52,8 % (19)	52,9 % (18)
Результаты цитологического исследования мазка		
High grade squamous intraepithelial lesion (HSIL)	47,2 % (17)	47,1 % (16)
Low grade squamous intraepithelial lesion (LSIL)	27,8 % (10)	26,5 % (9)
Of undetermined significance (ASC-US)	25,0 % (9)	26,5 % (9)
Более 10 ³ копий ДНК ВПЧ		
Генотипы высокого онкогенного риска, более 3,0 lg	52,8 % (19)	52,9 % (18)
Генотипы низкого онкогенного риска, более 3,0 lg	27,8 % (10)	26,5 % (9)
Методом ПЦР не обнаружены копии ДНК ВПЧ	19,4 % (7)	20,6 % (7)
Показания к LEEP		
HSIL результат цитологического исследования мазка	47,2 % (17)	47,1 % (16)
Аномальная кольпоскопическая картина на фоне LSIL и/или ASCUS	52,8 % (19)	52,9 % (18)
Наличие зон с атипичными сосудами при кольпоскопическом исследовании	19,4 % (7)	17,6 % (6)
<p><i>Примечание.</i> High grade squamous intraepithelial lesion (HSIL) — плоскоклеточные интраэпителиальные поражения высокой степени выраженности; Low grade squamous intraepithelial lesion (LSIL) — плоскоклеточные интраэпителиальные поражения низкой степени выраженности; Of undetermined significance (ASC-US) — атипичные клетки неясного значения; ВПЧ — вирус папилломы человека; ПЦР — полимеразная цепная реакция; 3,0 lg — клинически значимая концентрация копий ДНК папилломавируса при исследовании методом ПЦР; <i>M</i> — среднее арифметическое, <i>m</i> — ошибка среднеквадратичного отклонения; LEEP (Loop electrosurgical excision procedure) — петлевая электроэксцизия шейки матки</p>		

Копии ДНК генотипов низкого онкогенного риска обнаруживались методом ПЦР у 26,5 % пациенток. ВПЧ отрицательными были у 20,6 % больных. Все пациентки контрольной группы имели показания к LEEP: по результатам цитологического исследования мазка — HSIL 47,1 %. Из-за аномальной кольпоскопической картины на фоне LSIL и/или ASCUS — 52,9 %. Кроме того, у 17,6 % пациенток этой группы при кольпоскопии обнаруживались атипичные сосуды.

Пациентки обеих групп были сопоставимы по всем указанным в табл. 1 параметрам.

Результаты исследования:

- HSIL — High grade squamous intraepithelial lesion (плоскоклеточные интраэпителиальные поражения высокой степени вы-

раженности; LSIL — Low grade squamous intraepithelial lesion (плоскоклеточные интраэпителиальные поражения низкой степени выраженности). Международная классификация опухолей 4-го пересмотра (WHO/IARC, 2014). Другое: эндоцервикоз, эндометриоз, эндоцервикальный гиперкератоз.

- Уровни поражения эпителия шейки матки (HSIL и LSIL) и исходный уровень аномальной кольпоскопической картины потребовали во время операции иссечения примерно одинакового объема тканей. Размеры инцизионного биоптата сопоставимы в обеих группах: основание конуса 22,3 ± 5,03 мм и длина конуса 9,50 ± 2,90 мм

Таблица 2

Результаты патогистологического исследования операционного материала

Table 2

The results of pathological examination of surgical specimens

Характеристика	Исследуемая группа с Деринатом (n = 36)	Контрольная группа без терапии (n = 34)
Размеры инцизионного биоптата		
Основание конуса, мм	22,3 ± 5,03	22,2 ± 5,20
Длина конуса, мм	9,50 ± 2,90	9,27 ± 3,00
Патогистологическая характеристика инцизионного биоптата		
HSIL	20 % (7)	18 % (6)
LSIL	24,4 % (9)	26,1 % (9)
Другое	55,6 % (20)	55,9 % (19)
Наличие/отсутствие интраэпителиального поражения краев биоптата		
Отсутствует	94,4 % (34)	91,2 % (31)
Присутствует	5,6 % (2)	8,8 % (3)

в группе Деринат и, соответственно, основание $22,2 \pm 5,20$ мм и длина $9,27 \pm 3,00$ мм в контрольной группе. Встречаемость гистологических изменений эпителия в обеих группах также была сопоставима: HSIL и LSIL 44,4 % в группе с Деринатом и 41 % в контрольной группе. Наличие интраэпителиального поражения краев биоптата также сопоставимо: отсутствует в 94,4 % и присутствует в 5,6 % случаев в группе с Деринатом и отсутствует в 91,2 % и присутствует в 8,8 % случаев в контрольной группе соответственно (табл. 2).

Заживление раны в послеоперационном периоде у пациенток из исследуемой группы 1, получавших стимулятор к регенерации Деринат, проходило под струпом. Через 1 неделю после

вмешательства у 91,7 % (33 из 36) пациенток исследуемой группы произошло отторжение струпа без отделяемого. У 5,6 % (2) пациенток исследуемой группы отторжение струпа произошло на 5-й день и не сопровождалось выделениями. У 2,8 % (1) пациенток исследуемой группы наблюдались незначительные сукровичные выделения, не требовавшие специальной терапии или перевязки.

У пациенток контрольной группы 2 заживление проходило под струпом. У 88,2 % (30) пациенток отторжение струпа произошло на 10-й день и сопровождалось скудным сукровичным отделяемым. У 5,9 % (2) пациенток контрольной группы отторжение струпа произошло через 1 неделю и сопровождалось обильным сукровичным отделяемым. У 5,9 % (2) пациенток контрольной группы отторжение струпа произошло через 1 неделю и осложнилось умеренным кровотечением, потребовавшим тампонады раны гемостатической губкой. Процесс заживления шейки матки в послеоперационном периоде оценивали с помощью кольпоскопии через 1 месяц после операции и через 6 месяцев после операции (рис. 1).

У подавляющего числа пациенток группы 1, получавших репаративную терапию препаратом Деринат (15 мг/мл), отторжение струпа произошло через неделю и не сопровождалось выделениями из послеоперационной раны.

У большинства пациенток из контрольной группы 2, не получавших репаративную терапию после ЛЕЕР, отторжение струпа произошло к десятым суткам. При этом у 6,1 % пациенток отторжение струпа сопровождалось обильным

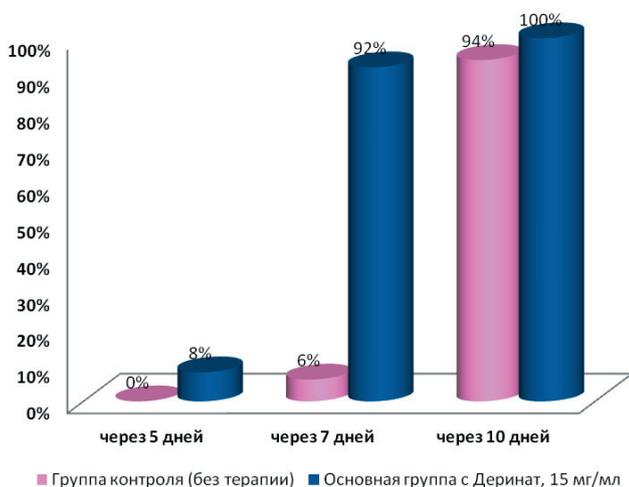


Рис. 1. Сроки отторжения струпа в исследуемых группах

Fig. 1. Terms of scab rejection in the groups studied

Динамика кольпоскопической картины у пациенток после LEEP
Dynamics of colposcopic picture in patients undergoing LEEP

Таблица 3

Table 3

Характеристика	Исследуемая группа с Деринатом (n = 36)	Контрольная группа без терапии (n = 34)
Через 1 месяц после LEEP		
Атипичические сосуды, в том числе мозаика и пунктуация	2,8 % (1)*	8,8 % (3)*
Ацетобелый эпителий	8,3 % (3)*	23,5 % (8)*
Йоднегативная зона	8,3 % (3)*	29,4 % (10)*
Через 6 месяцев после LEEP		
Атипичические сосуды, в том числе мозаика и пунктуация	0,0 % (0)*	2,9 % (1)*
Ацетобелый эпителий	2,8 % (1)*	11,8 % (4)*
Йоднегативная зона	2,8 % (1)*	17,6 % (6)*

Примечание. LEEP (Loop electrosurgical excision procedure) — петлевая электроэксцизия шейки матки; * $p \leq 0,05$

сукровичным отделяемым, а у 5,1 % пациенток — обильным геморрагическим отделяемым, потребовавшим гемостатической терапии (табл. 3).

В послеоперационном периоде у пациенток основной исследуемой группы отмечалось значительно более выраженное улучшение кольпоскопической картины по сравнению с пациентками контрольной группы. Так, при проведении кольпоскопии через 1 месяц после LEEP у пациенток группы контроля почти в трети случаев — у 29,4 % (10) — наблюдались йоднегативные участки эпителия шейки матки и почти в четверти случаев — у 23,5 % (8) — участки ацетобелого эпителия, в то время как в исследуемой группе эти показатели были у 8,3 (3) и 8,3 % (3) соответственно. Особенно показательны наличие атипичических сосудов в контрольной группе даже спустя 6 месяцев после LEEP — у 2,9 % (1) и сохранение участков ацетобелого эпителия

и йоднегативных участков эпителия шейки матки у 11,8 (4) и у 17,6 % (6) случаев соответственно. В то время как в исследуемой группе, получавшей Деринат, эти показатели были малы: по 1 случаю ацетобелого эпителия и йоднегативных участков эпителия шейки матки.

Через 1 месяц после LEEP обнаружены существенные различия кольпоскопической картины между исследуемыми группами пациенток.

Площадь участков ацетобелого эпителия в группе, получавшей репаративную терапию Деринатом, была почти в 3 раза меньше, чем в группе, не получавшей медикаментозной терапии в послеоперационном периоде, — 8,3 и 23,5 % соответственно (рис. 2). Размеры йоднегативной зоны при пробе Шиллера в контрольной группе были почти в 4 раза больше, чем в группе пациенток, получавших иммунорепарант Деринат, — 29,4 и 8,0 % соответственно (рис. 3).



Рис. 2. Динамика кольпоскопической картины после LEEP: ацетобелый эпителий

Fig. 2. Dynamics of colposcopic picture after LEEP: acetowhite epithelium

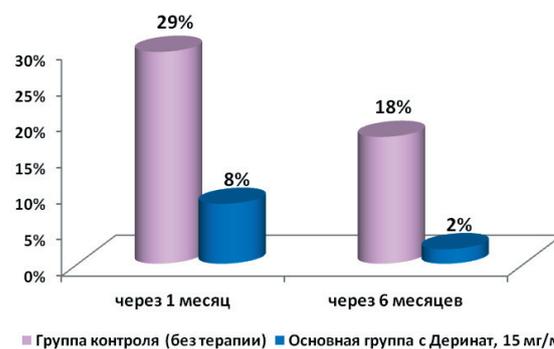


Рис. 3. Динамика кольпоскопии после LEEP: йоднегативная зона

Fig. 3. Dynamics of colposcopic picture after LEEP: iodine-negative area

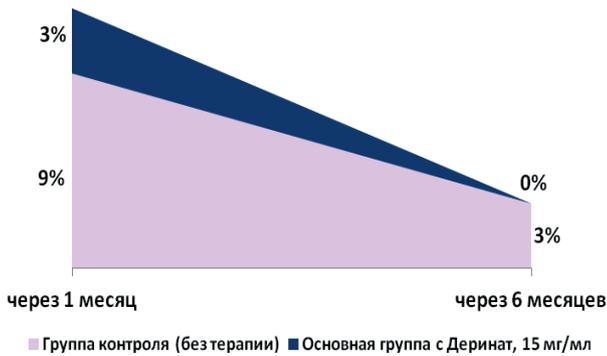


Рис. 4. Кольпоскопическая картина после LEEP в динамике: атипичные сосуды

Fig. 4. Colposcopic picture after LEEP in dynamics: atypical vessels

Через 6 месяцев после LEEP различия в исследуемых группах по кольпоскопической картине стали более наглядными. Так, в основной группе на фоне приема Дерината площадь зоны ацетобелого эпителия стала меньше, чем в контрольной, почти в 4 раза — 2,8 и 11,8 % (см. рис. 2), а йоднегативная зона в контрольной группе (см. рис. 3) сохранялась на уровне (17,6 %) и была больше, чем в группе с иммуно-репаратом (2 %), почти в 9 раз.

При кольпоскопии весьма показательно значительное уменьшение (в три раза по сравнению с контрольной группой) площади атипичных сосудов на эпителии шейки матки у пациенток, получавших репаративную терапию уже через 1 месяц после LEEP (рис. 4). Также для пациенток исследуемой группы, получавших Деринат (15 мг/мл), характерно полное исчезновение атипичных сосудов в кольпоскопической картине через 6 месяцев. При этом пациентки из контрольной группы, не получавшие репаративной терапии, демонстрировали при кольпоскопии наличие атипичных сосудов даже спустя 6 месяцев после LEEP.

Весьма показателен, на наш взгляд, эффект применения агониста TLR9 при оценке послеоперационных результатов цитологического исследования мазка. В основной группе, получавшей Деринат, уже через 1 месяц после LEEP в мазке не обнаруживались изменения эпителия высоких и низких степеней выраженности. При этом в контрольной группе эти показатели составляли 2,9 (1) и 5,9 % (2) соответственно (табл. 4). Более того, если через 6 месяцев после LEEP в основной группе изменения эпителия высоких и низких степеней выраженности так

Динамика результатов цитологического исследования мазка после LEEP

Таблица 4

Dynamics of the results of smear cytology after LEEP

Table 4

Характеристика	Основная группа с Деринатом (n = 36)	Контрольная группа без терапии (n = 34)
Через 1 месяц после LEEP		
High grade squamous intraepithelial lesion (HSIL)	0,0 % (0)*	2,9 % (1)*
Low grade squamous intraepithelial lesion (LSIL)	0,0 % (0)*	5,9 % (2)*
Of undetermined significance (ASC-US)	5,6 % (2)*	14,7 % (5)*
Через 6 месяцев после LEEP		
High grade squamous intraepithelial lesion (HSIL)	0,0 % (0)*	5,9 % (2)*
Low grade squamous intraepithelial lesion (LSIL)	0,0 % (0)*	8,8 % (3)*
(ASC-US) Atypical squamous cells underterminated significance	2,8 % (1)*	14,7 % (5)*

Примечание. High grade squamous intraepithelial lesion (HSIL) — плоскоклеточные интраэпителиальные поражения высокой степени выраженности; Low grade squamous intraepithelial lesion (LSIL) — плоскоклеточные интраэпителиальные поражения низкой степени выраженности; Atypical squamous cells underterminated significance (ASC-US) — атипичные клетки неопределенного значения; LEEP (Loop electrosurgical excision procedure) — петлевая электроэксцизия шейки матки; * $p \leq 0,05$

и не появились, то в контрольной группе эти показатели выросли почти в два раза, до 5,9 (2) и 8,8 % (3) соответственно. Объяснение этому факту, очевидно, надо искать в иммуномодулирующем эффекте агониста TLR9 препарата Деринат, который в данной ситуации реализуется в виде эффективного иммунного надзора над опухолевой трансформацией клеток многослойного плоского неороговевающего эпителия шейки матки посредством стимуляции CD4⁺ цитотоксических лимфоцитов. Известно, что многие трансформирующиеся в опухоль клетки обходят иммунный надзор за счет отсутствия синтеза у них белков МНС II класса. В этих условиях инициация клеточного ответа Th1 и Th2 на неоплазию зависит от процессинга опухолевых антигенов специализированными антигенпрезентирующими клетками. К последним относятся в том числе макрофаги, стимулируемые через TLR9 специфическим агонистом Деринатом.

Методом ПЦР ДНК ВПЧ высокого онкогенного риска не определялись копии в группе с иммунорепарантом Деринатом уже через 1 месяц после ЛЕЕР. В контрольной группе этот показатель достигал 5,9 %. ПЦР определяла ко-

пии ДНК ВПЧ низкого онкогенного риска в основной и контрольной группах — 2,8 и 8,8 % соответственно. Отсутствие копий ДНК ВПЧ в основной группе составило 97,2 %, а в контрольной — 85,3 %. Особенно выраженный эффект агониста TLR9 наблюдался через 6 месяцев после ЛЕЕР. В группе с применением препарата Деринат методом ПЦР не обнаруживались копии ДНК ВПЧ, в то время как в контрольной группе даже через полгода при исследовании методом ПЦР копии ДНК ВПЧ высокого онкогенного риска определялись в 5,9 % случаев, а копии ДНК ВПЧ низкого онкогенного риска — в 2,9 % случаев. При этом отсутствие копий ДНК ВПЧ при ПЦР наблюдалось только у 91,2 % (табл. 5).

Обсуждение результатов

Одна из доминирующих современных гипотез репаративной регенерации заключается в дихотомии между процессом полной регенерации (реституции) и неполной регенерации (субституции) фиброзного замещения, которая определяется иммунной системой.

Репаративная регенерация начинается параллельно с редукцией острой фазы воспа-

Таблица 5

Динамика показателей исследования числа копий ДНК ВПЧ методом ПЦР после ЛЕЕР

Table 5

Dynamics of PCR indicators after LEEP

Характеристика	Исследуемая группа с Деринатом (n = 36)	Контрольная группа без терапии (n = 34)
Через 1 месяц после ЛЕЕР		
Копии ДНК ВПЧ — генотипов высокого онкогенного риска, более 3,0 lg	0,0 % (0)*	5,9 % (2)*
Копии ДНК ВПЧ — генотипов низкого онкогенного риска, более 3,0 lg	2,8 % (1)*	8,8 % (3)*
Не определяются копии ДНК ВПЧ, менее 3,0 lg	97,2 % (35)*	85,3 % (29)*
Через 6 месяцев после ЛЕЕР		
Копии ДНК ВПЧ — генотипов высокого онкогенного риска, более 3,0 lg	0,0 % (0)*	5,9 % (2)*
Копии ДНК ВПЧ — генотипов низкого онкогенного риска, более 3,0 lg	0,0 % (0)*	2,9 % (1)*
Не определяются копии ДНК ВПЧ, менее 3,0 lg	100 % (36)*	91,2 % (31)*
<i>Примечание.</i> ПЦР — полимеразная цепная реакция; 3,0 lg — клинически значимая концентрация копий ДНК ВПЧ в 1 мл; ЛЕЕР (Loop electrosurgical excision procedure) — петлевая электроэксцизия шейки матки; * p ≤ 0,05		

ления и ведет либо к возмещению дефекта тканью, полностью идентичной погибшей (реституции), либо к замещению дефекта рубцом или фиброзной тканью (фиброплазии).

Пролиферация и дифференцировка являются процессами, завершающими воспаление. Они обеспечивают репаративную регенерацию тканей на участке альтерации. Процесс пролиферации инициируется иммунной системой с момента дебюта воспаления, одновременно с явлениями альтерации (повреждения) и экссудации.

Реституция, являющаяся конечным процессом регенерации, или фиброплазия, как проявление неполной регенерации, достигается в очаге альтерации за счет ускорения пролиферации и за счет ограничения апоптоза клеток. Полная регенерация характерна для тканей с преобладанием клеточной регенерации, к которой относится и многослойный плоский неороговевающий эпителий шейки матки. Она возможна после удаления из зоны альтерации клеточного детрита и микроорганизмов фагоцитирующими клетками (резидентными макрофагами, дендритными клетками, нейтрофилами). Этот процесс стимулируется воздействием на TLR9 макрофагов посредством его специфического лиганда, метилированного мотива CpG, содержащегося в олигонуклеотидах эукариотической ДНК, из которых состоит иммуномодулятор и стимулятор регенерации Деринат (дезоксирибонуклеат натрия).

Резидентные макрофаги выделяют провоспалительные или противовоспалительные цитокины. Это зависит от того, какими факторами происходит стимуляция их рецепторов TLR9, инфекционными агентами или клеточным детритом. В чистой послеоперационной ране после LEEP стимуляция резидентных макрофагов и моноцитов крови дезоксирибонуклеатом натрия, имитирующим инфекционные агенты, приводит к поляризации фенотипа макрофагов в направлении M1. Этот фенотип макрофагов, в отличие от фенотипа M2, не синтезирует TGF- β (трансформирующий фактор роста). Этот цитокин препятствует пролиферации эпителия, создает благоприятную среду для опухольтрасформированного эпителия и подавляет иммунный ответ [18].

Таким образом, индуцированная агонистом TLR9 (дезоксирибонуклеат натрия) стимуляция репаративной регенерации тканей шейки матки после LEEP предположительно происходит в результате направленной модификации фенотипа резидентных макрофагов в зоне после-

операционной альтерации [19]. Этим процессом можно объяснить ускоренное, в среднем на 6–7 суток, заживление послеоперационной раны с отторжением струпа в группе, получавшей лечение иммунорепаративным Деринатом по сравнению с группой, не получавшей медикаментозной терапии после LEEP (см. рис. 1).

Фактором стимуляции макрофагов, безусловно, является интраоперационное повреждение тканей. При этом наиболее активированными оказываются именно резидентные макрофаги в очаге альтерации. Именно у этих макрофагов отмечается наибольшая экспрессия TLR9, и они становятся наиболее чувствительными к стимуляции препаратами-агонистами [19, 20], в частности препаратом Деринат.

Регенерация соединительной ткани собственной пластинки слизистой шейки матки сопровождается выходом из просвета сосудов в межклеточное пространство фибриногена и синтезом фибрина, формирующего структуру для пролиферации клеток. На ней происходит быстрая пролиферация фибробластов. Затем начинается процесс неоангиогенеза, который приводит к формированию характерной грануляционной ткани. Заживление послеоперационных ран протекает в несколько этапов, которые включают воспаление, реваскуляризацию, миграцию и пролиферацию эпителиальных клеток. Применение агонистов способствует TLR9-зависимому накоплению макрофагов на участках повреждения тканей, стимуляции синтеза фактора роста эндотелиоцитов (VEGF) в зоне альтерации, ускорению неоангиогенеза и закрытию раны эпителия [21–23]. В некоторых работах время эпителизации 50 % площади раны после стимуляции агонистами TLR9 уменьшилось на 44 %, а время полной эпителизации площади раны уменьшено на 41 % [24].

Хотя существует несколько механизмов, объясняющих наблюдаемое ускорение заживления ран, но наиболее вероятным представляется, что применение агонистов TLR9 значительно увеличивает синтез фактора роста эндотелиоцитов (VEGF) и неоангиогенез. Это связано с увеличением числа VEGF-секретирующих макрофагов в зоне послеоперационной альтерации [25].

Системное применение агониста TLR9, препарата Деринат (дезоксирибонуклеат натрия), в виде раствора для внутримышечного введения 15 мг/мл в условиях чистой послеоперационной раны шейки матки, патогенетически оправдано. Вместе с альтерацией оно приводит к синергическому воздействию на репаратив-

ные функции макрофагов, через активацию их толл-подобных рецепторов 9, и последующему синтезу ими цитокинов, ускоряющих процессы репарации и иммунного надзора за опухолевой трансформацией тканей. Стимуляцией функции иммунного надзора макрофагов мы объясняем полное отсутствие HSIL и LSIL в результатах цитологического исследования мазка через 6 месяцев после LEEP в группе, получавшей агонист TLR9 Деринат. В то время как пациентки, не получавшие медикаментозную терапию после LEEP, демонстрировали уровень рецидива HSIL 5,9 % и LSIL 8,8 % (см. табл. 4).

На наш взгляд, полученные результаты ускорения процесса регенерации тканей шейки матки после LEEP могут представлять интерес для практических врачей.

Выводы

Сравнительное наблюдение за пациентками основной исследуемой группы в течение 6 месяцев показало, что иммунологическая коррекция процесса регенерации после LEEP агонистом TLR9, производным дезоксирибонуклеата натрия, препаратом Деринат, дает хороший клинический эффект в виде:

- отсутствия клеточной атипии при цитологическом исследовании;
- полной элиминации ВПЧ высокого онкогенного риска;
- ускорения (на 6–7 дней) сроков отторжения струпа без кольпоскопических признаков неполной регенерации.

Указанные изменения при лечении агонистами TLR9 позволяют уменьшить сроки нетрудоспособности и ускорить восстановление сексуальных нарушений, возникающих в ближайшем послеоперационном периоде.

Пациенткам после эксцизионных методов лечения показано назначение агониста толл-подобного рецептора 9, иммуномодулятора с репаративным эффектом — дезоксирибонуклеата натрия в виде раствора для внутримышечного введения (по 5 мл (75 мг) 1 раз в сутки через 24 часа в течение 10 дней).

Авторы заявляют об отсутствии возможных конфликтов интересов

Литература

1. Аксель Е.М. Статистика злокачественных новообразований женской половой сферы // Онкогинекология. — 2012. — № 1. — С. 18–23. [Aksel' EM.

Statistics of malignant tumors of female reproductive system. *Onkoginekologija*. 2012;1:18-23. (In Russ.)]

2. Меньшенина А.П., Моисеенко Т.И., Ушакова Н.Д. Возможности оптимизации предоперационной полихимиотерапии у больных инвазивным раком шейки матки // Злокачественные опухоли. — 2014. — № 3. — С. 22–29 [Men'shenina AP, Moiseenko TI, Ushakova ND. *Vozmozhnosti optimizacii predoperacionnoj polihimioterapii u bol'nyh invazivnym rakom shejki matki*. *Zlokachestvennyye opuholi*. 2014;3:22-9. (In Russ.)]
3. Роговская С.И., Шаргородская А.В., Бебнева Т.Н. Повышение эффективности лечения заболеваний шейки матки: изучение опыта применения глицирризиновой кислоты // Российский вестник акушера-гинеколога. — 2011. — № 5. — С. 94–7 [Rogovskaja SI, Shargorodskaja AV, Bebneva TN. *Increasing the efficiency of treatment for diseases of the cervix uteri: study of experience in using glycyrrizinic acid*. *Rossijskij vestnik akushera-ginekologa*. 2011;5:94-7. (In Russ.)]
4. Радзинский В.Е., Ордиянц И.М., Лебедева М.А. Эффективность препарата локального действия для эпителизации шейки матки после радиоволновой эксцизии // Акушерство и гинекология. — 2010. — № 3. — С. 58–60 [Radzinskij VE, Ordijanc IM, Lebedeva MA. *Efficacy of a locally acting drug for epitheliazation of the cervix uteri after radiowave excision*. *Akusherstvo i ginekologija*. 2010;3:58-60. (In Russ.)]
5. Прилепская В.П., Роговская И.С., Межевитинова Е.А. Кольпоскопия: практическое руководство. — М.: МИА, 2001. — 100 с. [Prilepskaja VP, Rogovskaja IS, Mezhevitinova EA. *Kol'poskopija: prakticheskoe rukovodstvo*. — М.: MIA, 2001. (In Russ.)]
6. Biswas SK, Mantovani A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nature Immunology*. 2010;11(10):889-896. doi: 10.1038/ni.1937.
7. Филатов О.Ю., Кашаева О.В., Бугримов Д.Ю., Климович А.А. Морфофизиологические принципы иммунологического действия ДНК эукариот // Российский иммунологический журнал. — 2013. — Т. 7. — № 4. — С. 385–90. [Filatov OJu, Kashaeva OV, Bugrimov DJu, Klimovich AA. *Morphophysiological principles of immunological effect of eukaryotic DNA*. *Rossijskij immunologicheskij zhurnal*. 2013;7(4):385-90. (In Russ.)]
8. Burd EM. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clinical Microbiology Reviews*. 2003;16(1):1-17. doi: 10.1128/CMR.16.1.1-17.2003.
9. Kietpeerakool C, Srisomboon J, Suprasert P, et al. Routine prophylactic application of Monsel's solution after loop electrosurgical excision procedure of the cervix: Is it necessary? *J Obstet Gynaecol Res*. 2007;33(3):299-304. doi: 10.1111/j.1447-0756.2007.00528.x.

10. Gimpelson RJ, Graham B. Using amino-cerv after cervical LEEP. *J Reprod Med*. 1999;44(3):275-8.
11. Duesing N, Schwarz J, Choschzick M, et al. Assessment of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) with colposcopic biopsy and efficacy of loop electrosurgical excision procedure (LEEP). *Arch Gynecol Obstet*. 2012;286(6):1549-54. doi:10.1007/s00404-012-2493-1.
12. Frazer IH. Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination. *Nature Reviews Immunology*. 2004;4 (1):46-54. doi: 10.1038/nri1260.
13. Hao NB, Lu MH, Fan YH, et al. Macrophages in tumor microenvironments and the progression of tumors. *Clinical Developmental Immunology*. 2012;11. doi: 10.1155/2012/948098.
14. Vollmer J, Weeratna RD, Jurk M, et al. Oligodeoxynucleotides lacking CpG dinucleotides mediate Toll-like receptor 9 dependent T helper type 2 biased immune stimulation. *J Immunol*. 2004;113(2). doi: 10.1111/j.1365-2567.2004.01962.x.
15. Sánchez-Reyes K, Bravo-Cuellar A, Hernández-Flores G, et al. Cervical cancer cell supernatants induce a phenotypic switch from u937-derived macrophage-activated m1 state into m2-like suppressor phenotype with change in tolllike receptor profiles. *Biomed Res Int*. 2014; Published online 2014 Sep 21. doi: 10.1155/2014/683068.
16. Klimovich AA. The probable mechanism of reparative effect of eukaryotic DNA oligonucleotides as agonists Toll-like receptors 9 on the model of drug Derinat®. Available at: <http://www.researchgate.net/publication/278405737> (accessed 05.11.2015) (In Eng.).
17. The 2001 Bethesda System Available at: <http://nih.techriver.net/bethesdaTable.php> (accessed 05.11.2015) (in English).
18. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Reviews Immunology*. 2008;8(12):958-69. doi: 10.1038/nri2448.
19. Pinto AP, Tuon FF, Tizzot EL, et al. Nonneoplastic findings in loop electrical excision procedure specimens from patients with persistent atypical squamous cells of uncertain significance in two consecutive pap smears. *Diagn Cytopathol*. 2002;27(2):123-7. doi: 10.1002/dc.10133.
20. Prendiville W, Cullimore J, Norman S. Large loop excision of the transformation zone (LLETZ). A new method of management for women with cervical intraepithelial neoplasia. *Br J Obstetric Gynaecol*. 1989;96:1054-60. doi: 10.1111/j.1471-0528.1989.tb03380.x.
21. Woodworth CD. HPV innate immunity. *Frontiers in Bioscience*. 2002;7:d2058-d2071. doi: 10.2741/A898.
22. Starodubova ES, Isagulians MG, Karpov VL. Regulation of Immunogen Processing: Signal Sequences and Their Application for the New Generation of DNA-Vaccines. *Acta Nature*. 2010;2(1):53-60.
23. Markowska J, Markowska A, Madry R. Evaluation of Cicatridine efficacy in healing and repairing process of uterine cervix, vagina and vulva-open no-randomized clinical study. *Ginekol Pol*. 2008;79:494-8.
24. Wilkinson EJ. 2002 IFCPC World Congress. *J Low Genit Tract Dis*. 2002;6(4):254-255. doi: 10.1097/00128360-200210000-00012.
25. Sato T, Yamamoto M, Shimosato T, Klinman DM. Accelerated wound healing mediated by activation of Toll-like receptor 9. *Wound Repair Regen*. 2010;18(6):58693. doi: 10.1111/j.1524-475X.2010.00632.x.

■ Адреса авторов для переписки (Information about the authors)

Николай Николаевич Минаев — д-р мед. наук, профессор, заведующий кафедрой акушерства и гинекологии Института дополнительного профессионального образования Воронежского государственного медицинского университета им. Н.Н. Бурденко Минздрава России, Воронеж. **E-mail:** mnn@vmail.ru.

Марина Николаевна Иванова — канд. мед. наук, врач-гинеколог Воронежского областного клинического онкологического диспансера. БУЗВО «Воронежский областной клинический онкологический диспансер», Воронеж.

Даниил Юрьевич Бугримов — канд. мед. наук, советник РАЕ, магистр МАНЭБ, доцент кафедры патологической анатомии Воронежского государственного медицинского университета им. Н.Н. Бурденко Минздрава России, Воронеж. **E-mail:** danikst@mail.ru

Андрей Алексеевич Климович — научный сотрудник НИИ экспериментальной биологии и медицины (НИИ ЭБМ) Воронежского государственного медицинского университета им. Н.Н. Бурденко Минздрава России, Воронеж. **E-mail:** klimovich@gmail.com.

Nikolay N. Minaev — PhD, MD, professor, Head of the Department of Obstetrics and Gynecology. The Institute of Advanced Training. Voronezh State Medical University named after NN Burdenko Russian Ministry of Health, Voronezh, Russia. **E-mail:** mnn@vmail.ru.

Marina N. Ivanova — PhD, gynecologist of Voronezh Regional Clinical Oncology Center. Voronezh Regional Clinical Oncology Center, Voronezh, Russia.

Daniil Ju. Bugrimov — PhD, advisor RAE master MANEB, Senior Researcher, Associate Professor, Department of Pathological Anatomy of Voronezh State Medical University named after NN Burdenko Russian Ministry of Health, Voronezh, Russia. **E-mail:** danikst@mail.ru.

Andrey A. Klimovich — Researcher of the Institute of Experimental Biology and Medicine (EBM Research Institute), Voronezh State Medical University named after NN Burdenko Russian Ministry of Health, Voronezh, Russia. **E-mail:** klimovich@gmail.com.