

В настоящее время установлено, что папилломавирус (ПВ) является основным фактором риска для развития рака шейки матки (РШМ). Целью данного исследования явилась оценка чувствительности и диагностической ценности различных методов детекции ПВ – полимеразной цепной реакции (ПЦР) и молекулярной гибридизации 2-го поколения (НС₂), а также определение частоты предраковой и раковой патологии и сопутствующих инфекций у ПВ-инфицированных женщин. Было обследовано 729 женщин. Чувствительность НС₂ оказалась сравнимой с ПЦР, однако она имела преимущества в возможности определения вирусной нагрузки. Уровень инфицирования ПВ составил 30% у женщин с патологией шейки матки, у 21% из них была выявлена предраковая или раковая патология шейки матки. Было выявлено, что пик инфицирования ПВ пришелся на возраст от 20 до 30 лет, и на этот же возраст пришелся пик выявления различных патологий шейки матки, в том числе и тяжелой дисплазии и Ca in situ. У 31% ПВ-инфицированных женщин определялись сопутствующие инфекции (хламидиоз, микоплазмоз или уреоплазмоз), у 35% - генитальный герпес. Таким образом, выявление онкогенных типов ПВ поможет более своевременному выявлению предраковой и раковой патологии шейки матки. Бактериологическое и вирусологическое обследования также должны входить в комплекс по обследованию ПВ-инфицированных женщин.

Рак шейки матки является актуальной проблемой онкогинекологии, занимая у женщин 3-е место по частоте после рака яичников и рака молочной железы. Ежегодно в С.-Петербурге впервые выявляется около 350 случаев РШМ, в большинстве случаев 3-4-й степени, при этом летальность на 1-м году жизни достигает 30%. Проблема РШМ усугубляется тем, что заболевание нередко поражает женщин молодого и среднего возраста. К сожалению, в настоящее время отсутствуют эффективные скрининговые программы по ранней диагностике и профилактике РШМ. Кольпоскопическое и онкоцитологическое обследование зачастую бывает неэффективным ввиду невысокой чувствительности, которая оценивается в 50%-70% [4, 6]. Тем не менее РШМ является заболеванием, которое можно предупредить. Это стало возможным в связи с разработкой новых диагностических подходов, позволяющих на скрининговом уровне, при массовых профилактических осмотрах, выявить определенные маркеры заболевания на самых ранних стадиях малигнизации или даже до ее развития. Известно, что около 95% РШМ вызывается онкогенными типами папилломавирусов (ОПВ) [3, 5]. К ним относятся ПВ 16, 18, 31, 33, 35-го и др. типов. Длительная персистенция ПВ в цервикальном эпителии сопровождается его интеграцией в геном и появлением мутаций. При таких условиях полный процесс малигнизации может завершиться за 5 – 8 лет и наблюдаться даже у женщин молодого возраста. Поэтому, не преуменьшая роли кольпоскопического и онкоцитологического обследования и не исключая этих методов, профилактика РШМ должна быть оптимизирована с помощью других новых методов исследования, в частности путем выявления ОПВ в биологических пробах из генитального тракта с помощью молекулярно-биологических методов [1, 2]. Целью настоящей работы явилась оценка сравнительной эффективности различных методов диагностики пред-

пухолевых и опухолевых поражений шейки матки.

Материалы и методы исследования

Для выявления ОПВ с помощью различных диагностических методов были обследованы 729 женщин, из них 594 – с различной патологией шейки матки (эрозия, лейкоплакия, эктропион, дискератоз). Контрольная группа состояла из 135 женщин без гинекологической патологии, обследованных с профилактической целью. Всем женщинам проводили кольпоскопическое и онкоцитологическое обследование. Выявление ОПВ проводили методом молекулярной гибридизации 2-го поколения – Hybrid capture 2 (НС₂) у 470 человек (тест-системы “Digene-Murex”, США) и методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) – у 259 человек (диагностические наборы “Биоком”, Москва). Учет и оценку результатов при выявлении ПВ методом НС₂ производили на хемиллюминометре Digene DML 2000 путем вычисления величины относительных световых единиц - Relative Light Units (RLU). Количественную оценку реакции производили на основании определения соотношения RLU с положительным контролем (Positive Control – PC) – RLU/PC. Для ПЦР-диагностики из цервикального соскоба первоначально выделяли ДНК на мелкопористом стекле (Sigma) в стандартных условиях. Реакция состояла из 35 повторающихся циклов и проводилась на амплификаторе “Perkin Elmer” 2400 (Швейцария). Продукты реакции визуализировали в электрофореze в 6%-ном полиакриламидном геле с последующей окраской бромистым этидием и регистрацией данных с помощью видеоустройства “Люмен” (Россия). При выявлении ПВ методом ПЦР в положительных пробах обнаруживали фрагмент величиной 632 пары оснований (рис.1). Выявление сопутствующих инфекций – хламидиоза, микоплазмоза, уреоплазмоза, гарднереллеза, герпеса - проводили методом ПЦР на тест-системах НПФ “Литех” (Москва).

Метод диагностики	Hybrid capture II		ПЦР	
	количество	из них ПВ (+) число/процент	количество	из них ПВ (+) число/процент
1-я группа	413	119/28,8%	181	66/36,5%
2-я группа	57	4/7%	78	9/11,5%
Всего:	470	123/26,2%	259	75/28,9%

Характер патологии шейки матки у ПВ-инфицированных женщин

Таблица 2

Группа заболеваний	Количество чел./процент
Гинекологически здоровые	4/3,3%
Гинекологическая экстрацервикальная патология (всего):	23/18,7%
из них:	
- кольпит	11
- ПВИ наружных половых органов	6
- воспалительные гинекологические заболевания	6
Фоновая цервикальная патология (всего):	70/56,9%
из них:	
- эндоцервикоз	10
- эрозия шейки матки	42
- эндоцервицит	18
Предраковые и раковые заболевания шейки матки (всего):	26/21,1%
из них:	
- лейкоплакия	6
- умеренная дисплазия	10
- тяжелая дисплазия	4
- Ca in situ	6

Результаты

Данные о частоте инфицирования онкогенными типами ПВ, полученные при помощи НС₂ и ПЦР, представлены в табл. 1. Были обследованы женщины с различной патологией шейки матки (1-я группа) и гинекологически здоровые (2-я группа). Из данных, представленных в табл. 1, видно, что средний уровень инфицирования онкогенными типами ПВ составляет 26,2% — по данным молекулярной гибридизации и 28,9% — по данным ПЦР. Однако внутри обследованных групп имеются значительные различия: в контрольной группе уровень инфицирования ПВ составил 7% при обследовании методом НС₂ и 11,5% — при обследовании методом ПЦР, в то время как у женщин с патологией шейки матки он достигал 28,8% и 36,5% соответственно.

Была изучена зависимость между частотой инфицирования ПВ, нали-

чием гинекологической патологии и возрастом. На рис. 2 представлено распределение ПВ-инфицированных женщин по возрасту, по данным обследования методом НС₂. Как видно из данных рисунка, нами были обследованы женщины в возрасте от 18 до 65 лет. Пик инфицирования ПВ пришелся на 20 – 30 лет. С возрастом число ПВ-инфицированных женщин постепенно снижалось.

На рис. 3 и 4 представлена частота выявления гинекологической патологии у ПВ-инфицированных женщин в зависимости от возраста. На рис. 3 представлено возрастное распределение женщин с гинекологической экстрацервикальной патологией (воспалительные гинекологические заболевания, кольпиты, кондиломатоз наружных половых органов) и доброкачественными (фоновыми) процессами шейки матки (эндоцервикозом, эктропионом, эндоцервицитом, эрозией). На рис. 4 — распределение жен-

щин с предраковыми и раковыми процессами — лейкоплакией, дисплазиями (умеренной или тяжелой) и Ca in situ. Как видно из данных рис. 3 и 4, пик выявления цервикальной патологии в обеих группах также пришелся на возраст 21 – 30 лет, что коррелирует с пиком инфицирования ПВ.

В табл. 2 представлен характер патологии шейки матки у ПВ-инфицированных женщин. Как видно из данных табл. 2, гинекологическая патология не была выявлена только у 4 (3,3%) женщин. Кроме того, 23 (18,7%) женщины, имеющие только экстрацервикальную патологию (кольпит, папилломатоз наружных половых органов, сальпингоофорит), также были инфицированы ПВ и попали в группу риска по развитию РШМ. Фоновая (доброкачественная) патология шейки матки составила наибольшую часть среди всех выявленных заболеваний — у 70 (56,9%) женщин. Необходимо отметить, что

нами впервые были выявлены предраковые заболевания у 20 человек (лейкоплакия у 4, умеренная дисплазия – у 10, тяжелая дисплазия – у 4 и *Ca in situ* – у 6). Обращает на себя внимание то, что предраковая и раковая патологии шейки матки в подавляющем большинстве случаев были выявлены у женщин молодого и среднего возраста – от 18 до 42 лет.

Клинический пример. Больная А.И., 25 лет. Половая жизнь с 18 лет. Общее количество половых партнеров – 5. Способы контрацепции – презерватив и гормональные средства. Обследовалась по поводу эрозии шейки матки, которая наблюдается у нее в течение 5 лет. Выявлен ПВ с вирусной нагрузкой 33,4 RLU/PC. Данные онкоцитологии: дисплазия 3. Данные гистологии: *Ca in situ*. Больная направлена на конусовидную резекцию шейки матки.

Нами была прослежена зависимость между вирусной нагрузкой ПВ и степенью выраженности цервикальной патологии. На рис. 5 представлены данные обследования четырех групп женщин.

Как видно из данных рис. 5, уровень вирусной нагрузки был минимальным у гинекологически здоровых женщин и резко возрастал при различной гинекологической патологии. Средний уровень вирусной нагрузки 344,9 RLU/PC наблюдался у женщин с гинекологической патологией, не затрагивающей шейку матки (эрозия, эндоцервикоз, эндоцервицит) средний уровень вирусной нагрузки составил 404,6 RLU/PC. Максимальным был уровень вирусной нагрузки у женщин с дисплазиями различной степени тяжести и *Ca in situ* – он составил 656,6 RLU/PC. Имеющаяся зависимость между вирусной нагрузкой и степенью выраженности процесса может служить дополнительным критерием для более внимательного обследования таких женщин, включая повторное онкоцитологическое и гистологическое обследование для исключения возможности ложноотрицательных результатов при первичном обследовании.

Клинический пример. Больная Я.Н., 18 лет. Половая жизнь с 15 лет. Общее количество половых партнеров – 20. Не предохраняется. Перенесенные урогенитальные инфекции – гонорея, трихомониаз, хламидиоз, микоплазмоз, уреоплазмоз. Проходила лечение. Данные кольпоскопии – эрозия шейки матки. Данные онкоцитологии – без патологии. По данным

Выявление ДНК ПВ с помощью ПЦР

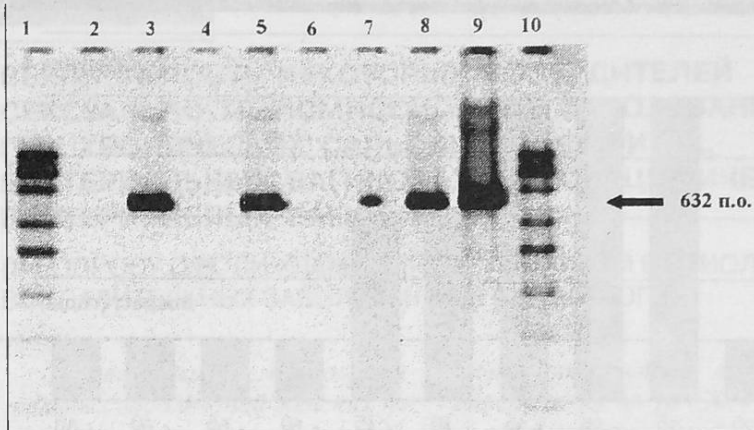


Рисунок 1

- 1, 10 – маркер молекулярного веса;
- 2, 4 – отрицательные пробы;
- 3, 5 – положительные пробы;
- 6 – (+) контроль;
- 7, 8, 9 – (+) контроли с различной концентрацией ДНК.

Распределение ПВ-инфицированных женщин по возрасту (N=123)

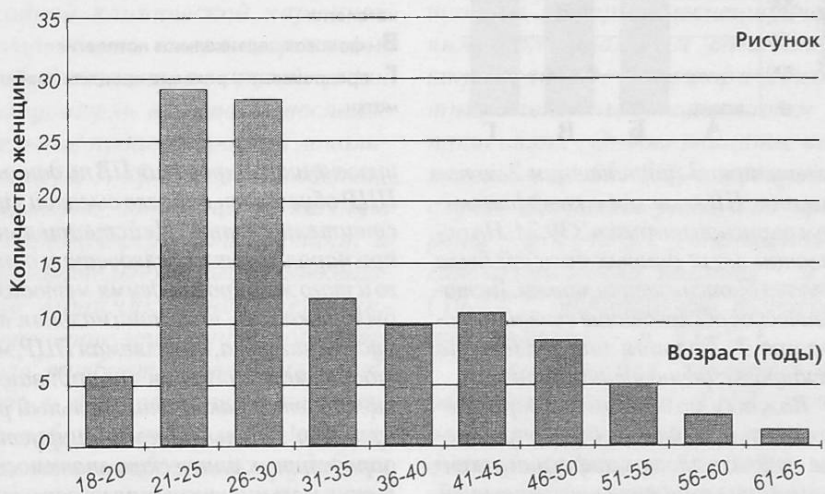


Рисунок 2

Наличие гинекологической экстрацервикальной и фоновой цервикальной патологии в различных возрастных группах у ПВ-инфицированных женщин

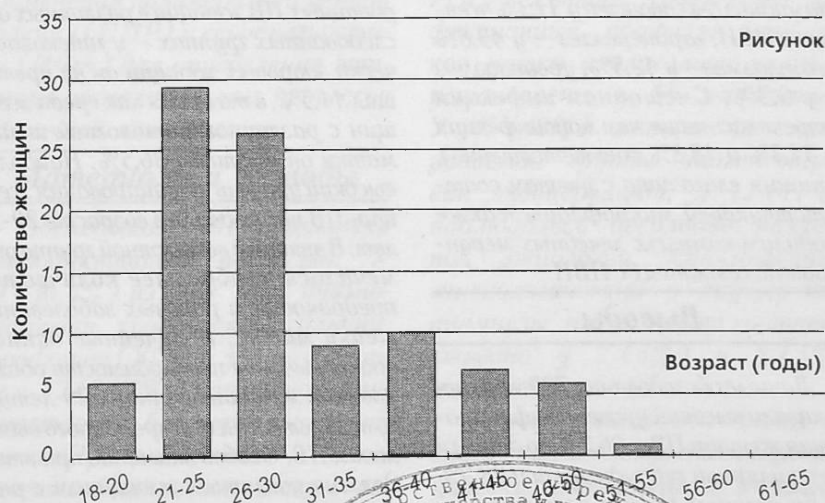
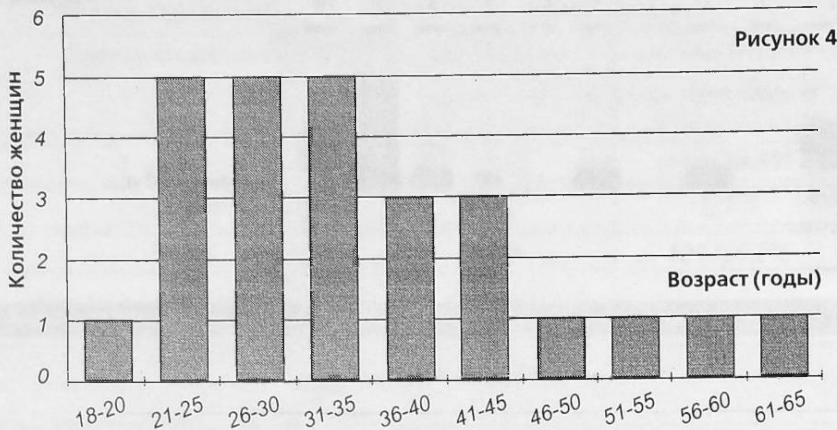
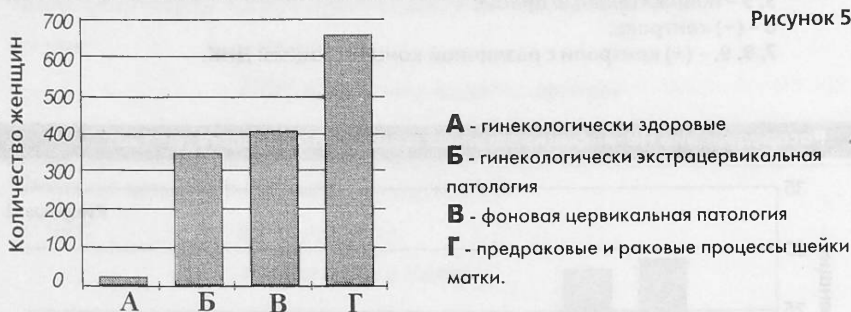


Рисунок 3

Наличие предраковых и раковых заболеваний шейки матки в различных возрастных группах у ПВ-инфицированных женщин (N=26)



Вирусная нагрузка ПВ при различной гинекологической патологии



молекулярной гибридизации 2-го поколения, ПВ выявлен с коэффициентом вирусной нагрузки 339,71. На основании этих данных больной была сделана биопсия шейки матки. Гистологическое обследование выявило дисплазию 3. Больная направлена на электроэксцизию шейки матки.

Важным моментом для определения тактики лечения было определение сопутствующих инфекций у женщин с папилломавирусной инфекцией. ДНК вируса герпеса была выявлена у 34,8% женщин с ПВИ, при этом более чем в половине случаев это был рецидивирующий генитальный герпес. Хламидиоз был выявлен у 31,3% женщин с ПВИ, гарднереллез – у 43,8% микоплазмоз – у 12,5%, уреоплазмоз – у 6,3%. Смешанная инфекция встречалась чаще, чем моноинфекция (у 31,3% и 18,8% соответственно). Санация влагалища с учетом соответствующей микрофлоры также входила в комплекс лечебных мероприятий, связанных с ПВИ.

Выводы

Данные обследования 729 женщин показали высокий уровень инфицирования женщин ПВ – 26,2% по данным молекулярной гибридизации и 28,9% – по данным ПЦР. Более высокий

уровень инфицирования ПВ по данным ПЦР обусловлен ее более высокой чувствительностью. Действительно, при параллельном обследовании одного и того же образца двумя методами было показано, что минимальная вирусная нагрузка, выявляемая ПЦР, методом молекулярной гибридизации оценивается как отрицательный результат. В дальнейшем планируется определить клиническую значимость таких малых вирусных нагрузок и оценить их роль в формировании патологических процессов шейки матки.

Необходимо отметить, что значительно отличался процент инфицированных ПВ женщин в различных обследованных группах – у гинекологически здоровых женщин он не превышал 11,5%, в то время как среди женщин с различной патологией шейки матки он достигал 36,5%. Наиболее высокий уровень инфицирования женщин ПВ наблюдался в возрасте 20-30 лет. В этой же возрастной группе отмечалось наибольшее количество предраковых и раковых заболеваний шейки матки. Полученные данные обосновывают необходимость обследования женщин начиная с 20-летнего возраста, для своевременного выявления ПВ. Особое внимание при этом должно уделяться женщинам с различной патологией шейки матки, т.к.

в этой группе оказался наиболее высоким процент инфицирования ПВ.

Выявление онкогенных типов ПВ помогло своевременно выявить у 26 человек раковые и предраковые заболевания шейки матки, в том числе 6 случаев Ca in situ. Учитывая, что процесс малигнизации эпителия происходит в течение 5-8 лет, подобное обследование с последующим онкоцитологическим и гистологическим обследованием достаточно проводить каждые 3-5 лет.

В результате проведенных исследований была выявлена зависимость между степенью выраженности патологических процессов шейки матки и уровнем вирусной нагрузки ПВ. Уровень вирусной нагрузки оказался максимальным при тяжелых дисплазиях и Ca in situ и составил 656,6 RLU/PC. Определение вирусной нагрузки ПВ может служить дополнительным критерием для определения тактики лечебно-профилактических мероприятий при той или иной патологии.

При бактериологическом обследовании у каждой 3-й женщины с ПВИ был выявлен хламидиоз, и еще у каждой 3-й – герпес. Выявление и лечение сопутствующих генитальных инфекций также должно входить в комплекс мероприятий по предотвращению РИМ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Cox J.T., Lorincz A.T., Schiffmann M.H et al. // Amer. J. of Obst. And Gyn. 1995. Vol.172. P. 946-954.
2. Cuzik J., Szarewsky A., Terry G. et al. // Lancet. 1995. Vol. 345. P. 1533-1536.
3. Hildesheim A., Schiffman M.H., Gravitt P. et al. // J. of Inf. Dis. 1994. Vol. 169. P 235-240.
4. Koutsky L.A., Holmes K.K., Critchlow C.W. et al. // N. Engl. J. of Medicine. 1992. Vol.327. P.1272-1278.
5. Sherman M.E., Schiffman M.H., Lorincz A.T. et al. // Amer. J. of Clin. Path. 1994. Vol. 101. P.182-187.
6. Slater D.N., Milner P.C., Radley H. / / J. of Clin. Path. 1994. Vol.47. P.27-28.