

## **Особенности терапии цервикальных неоплазий, ассоциированных с папилломавирусной инфекцией с использованием ультразвуковой кавитации и иммуномодулирующей терапии.**

ГБОУ ВПО Южно-Уральский государственный университет Минздрава РФ, г. Челябинск

Уральский государственный медицинский университет Минздрава РФ, г. Екатеринбург

Гизингер Оксана Анатольевна, доктор биологических наук, профессор кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии и клинической лабораторной диагностики ГОУ ВПО ЮГМУ Росздрава РФ г. Челябинск Воровского 64. 89048110562 e-mail: ogizinger@gmail.com

Кононова Ирина Николаевна доцент кафедры акушерства и гинекологии ГБОУ ВПО Уральский государственный медицинский университет Минздрава РФ, к.м.н., 622075, Екатеринбург, Ленина, 52/3А-380, тел.+7(343)9043824116, e-mail:irkon@e1.ru

### **Резюме**

Цель исследования – изучить комплексное влияние ультразвуковой кавитационной терапии и препарата Имунофан (Бионокс, Москва) на состояние антимикробной защиты цервикального канала у женщин с цервикальными неоплазиями(CIN), ассоциированными с папилломавирусной инфекцией. Для достижения поставленной цели было проведено краткосрочное, перспективное исследование комплексного влияния ультразвуковой кавитационной терапии и иммуномодулирующей терапии на состояние факторов антимикробной защиты цервикального канала у 90 пациенток в возрасте от 20 до 39 лет с установленным гистологическим диагнозом «цервикальная интраэпителиальная неоплазия (CIN) I,II степени», у которых предварительно методом ПЦР был обнаружен ВПЧ высокого онкогенного риска 16 и 18 типа. Результаты исследования показали, что включение ультразвуковых воздействий в комплексе с иммуномодулирующей терапией в схему лечения способствует исчезновению большего числа клинических проявлений по сравнению со стандартной терапией и оказывает нормализующее действие на клеточные факторы противoinфекционной защиты цервикального секрета.

Ключевые слова: ультразвуковая кавитация, Имунофан®, папилломавирусная инфекция

### **Summary**

The purpose of research is to study the combined effect of ultrasound cavitation therapy and drug Imunofan® (Bionoks, Moscow) on the state of antimicrobial protection cervix in women with Cervical intra-epithelial neoplasia (CIN) associated with HPV infection. To achieve this goal was held short-term, prospective study of the combined effect of ultrasonic cavitation treatment and therapies for the condition factors antimicrobial protection of the cervical canal in 90 patients aged 20 to 39 years with established histological diagnosis of "cervical intraepithelial neoplasia I, II, III degree" in which the pre-PCR was detected with high risk HPV

types 16 and 18. The results showed that the inclusion of the effects of ultrasound in combination with immunomodulatory therapy in the treatment regimen promotes the disappearance of an increasing number of clinical manifestations compared with standard therapy and has a normalizing effect on cellular factors of anti protect cervical secretions.

Keywords: ultrasonic cavitation, imunofan<sup>®</sup>, papillomavirusnoaya infection

На современном этапе развития медицины урогенитальная инфекция получила статус актуальной научной и клинической проблемы. Одной из самых распространенных инфекций, передаваемых половым путем (ИППП) вирусной этиологии является папилломавирусная инфекция (ПВИ), которая по данным ВОЗ признана одним из этиологических агентов рака шейки матки (РШМ) [1,10,11]. Аналитический центр CDC (США) сообщает о ежегодном инфицировании около 5,5 млн. человек. Вследствие цервикального рака, ассоциированного с ВПЧ, в сутки в Европе умирает до 40 женщин [10,12]. В России регистрируется манифестная форма ВПЧ (аногенитальные бородавки), а наличие ВПЧ высокого онкогенного риска не отражается в официальной статистике [8]. Исследования клеточных и гуморальных факторов местной антимикробной защиты свидетельствуют о её выраженных нарушениях при инфицировании ВПЧ [1]. При этом, длительная персистенция вируса приводит к запуску многостадийного процесса трансформации, развитию дисплазии и рака шейки матки [9]. При переходе высокоонкогенных типов ВПЧ в стадию интегративной инфекции онкобелок E7 вызывает возникновение различных иммунных дисфункций [6], что сопровождается усилением повреждающего действия свободнорадикальных и перекисных соединений, увеличением активности воспалительной реакции [1] и вызывает трудности лечения хронически протекающих инфекционных процессов в шейке матки, способствующих рецидивированию и прогрессированию цервикальных неоплазий [6,7]. В этой связи создание индивидуального подхода к иммунотропной терапии при цервикальных неоплазиях, позволяющего минимизировать лекарственное вмешательство в организм человека, требует разработки новых, клинически эффективных и безвредных способов введения препаратов, обеспечивающих торможение репликации вируса, устранения влияния эндогенных повреждающих агентов и восстановления иммунной реакции. Свойства пептидных гормонов тимуса сделали Имунофан<sup>®</sup> препаратом выбора при исследовании нового способа воздействия при комплексной терапии цервикальных неоплазий, ассоциированных с папилломавирусной инфекцией [2]. Для способа доставки лекарственного средства к патологическому очагу применялся низкочастотный ультразвук, поскольку ультразвуковая кавитация лечебного раствора не только обеспечивает мелкодисперсное распыление препарата, способствующее проникновению в межклеточные пространства вагинального и цервикального эпителия, фонофорез препарата на глубину 8 мм, но и обладает прямым бактерицидным действием, разрушая мембрану микробных агентов [3,5,6].

Цель исследования: оценить эффективность комплексной кавитационной и иммунотерапии препаратом Имунофан<sup>®</sup> (Бионокс, Москва) на состояние антимикробной

защиты цервикального канала у женщин с цервикальными неоплазиями I,II степени, ассоциированными с папилломавирусной инфекцией высокого онкогенного риска.

## **Материала и методы**

Проведено обследование и лечение 90 пациенток в возрасте от 20 до 39 лет с установленным гистологическим диагнозом «цервикальная интраэпителиальная неоплазия I,II степени», у которых предварительно методом ПЦР при помощи диагностических наборов «Амлисенс ВПЧ-Скрин» и «Амплиценс ВПЧ ВКР-Генотип» – производства ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора (Москва) был обнаружен ВПЧ 16 и 18 типов. План исследования соответствовал положениям Хельсинской декларации Всемирной медицинской ассоциации (ВМА) последнего пересмотра (Эдинбург, Шотландия, 2000г.) Пациентки, участвовавшие в исследовании, дали письменное добровольное информированное согласие в соответствии с требованиями Хельсинской декларации Всемирной Медицинской Ассоциации от 1964 года, дополненной в 1975 г., 1983 г., 1989 г., 2000 г., 2002г.; основами законодательства Российской Федерации «Об охране здоровья граждан, правил проведения клинической практики в РФ», (приказ МЗ РФ № 266 от 19.07.03; приказ Росздравнадзора № 2325-Пр/06 от 17.10.06).

Всем пациенткам выполнено стандартное обследование, включающее: цитологическое исследование мазков с экто- и эндоцервикса, расширенная кольпоскопия, гистологическое исследование биоптатов шейки матки, обследование содержимого влагалища и цервикального канала на вирусные, бактериальные, протозойные агенты методом ПЦР.

Для исключения сопутствующих ИППП всем женщинам было проведено бактериологическое исследование на наличие гонококков и трихомонад согласно методическим рекомендациям МЗ РФ «Стандартизация медицинской помощи больным гонококковой инфекцией» (Приказ №176 от 28.02.05), и положения МЗ РФ «О мерах по предупреждению распространения заболеваний, передающихся половым путём (Приказ № 291 от 30.07.01).

Для изучения местного иммунитета в содержимом влагалища были определены уровни  $IFN\alpha$ ,  $IFN\gamma$ ,  $IL-1\beta$ ,  $IL-6$ ,  $IL-10$  с помощью тест-систем «Вектор Бест» (Новосибирск, Россия). Материалом для исследования служил секрет цервикального канала, который забирали с помощью стерильной градуированной пипетки.

Перед назначением терапии пациентки разделены на две подгруппы. В первую подгруппу вошли 45 пациенток, которым после установления диагноза «CIN, ассоциированная с ВПЧ» на I этапе перед проведением деструктивных методов лечения назначался иммуномодулирующий препарат Имунофан®, введенный интравагинально в дозе 1мл, разведенный в 50мл физиологического раствора обработанный ультразвуком низкой частоты. В качестве источника кавитационных ультразвуковых кавитационных воздействий низкой интенсивности был использован аппарат «Фотек» (Екатеринбург, Россия), генерирующий УЗ воздействия с частотой акустических колебаний на момент

проведения терапевтических мероприятий 25 кГц, амплитудой колебаний 25 мкм. Курс лечения составил 5 ежедневных процедур длительностью 10 минут. Сеансы ультразвуковой кавитационной терапии проводились в амбулаторных условиях, в специально оборудованном кабинете. Положение больной при проведении локальной ультразвуковой терапии – лёжа в гинекологическом кресле или на кушетке, на спине, ноги были согнуты в тазобедренных суставах и разведены. Процедура ультразвуковых орошений ультраозвученным препаратом Имунофан® проводилась при помощи специальной разовой насадки. Процедура ультразвуковой кавитационной терапии осуществлялась 1 раз в сутки в течение 5 дней.

Во вторую подгруппу вошли 45 пациенток, которым после установления диагноза «CIN, ассоциированная с ВПЧ» назначена стандартная терапия: деструктивное лечение. После проведенного лечения были повторно исследованы параметры местного иммунитета цервикального секрета. Элиминация ВПЧ после проведенной терапии оценивалась наблюдением за пациентками в течение 12 месяцев с контролем клинического, вирусологического и иммунологического исследований через 6 и 12 месяцев.

Контрольную группу составили 30 женщин с отсутствием клинико-лабораторных показателей изменения шейки матки.

Полученные результаты были подвергнуты статистической обработке с использованием пакета прикладных программ «Statistica for Windows 6.0» с вычислением средней арифметической и её стандартной ошибки. О достоверности различий средних величин судили с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни. Статистические процедуры, используемые для анализа качественных признаков, включали построение таблиц сопряженности с вычислением одностороннего точного критерия Фишера. Различия считали значимыми при  $p \leq 0,05$ .

## **Результаты и обсуждение**

Сбор и анализ клинико-anamnestических и лабораторных данных показал следующее:

через 6 месяцев после окончания терапевтических мероприятий в группе «CIN, ассоциированная с ВПЧ высокого онкогенного риска 16 и 18 типов», получавшей комплексно иммуномодулирующую и физиотерапию ВПЧ выявлялся у 17,3%. В группе пациенток, получивших стандартную деструктивную терапию ДНК ВПЧ высокого онкогенного риска 16 и 18 типов выявлен у 58,3%. Исследования, проведенные через год дали следующие результаты: в группе, получившей комплексную терапию ВПЧ 16 и 18 типов выявлен у 7,8 %, в группе, получавшей стандартную терапию ВПЧ высокого онкогенного риска 16 и 18 типов выявлялся у 15,4%, Полученные данные были достоверны ( $p < 0,05$ ). При оценке клеточных факторов вагинального секрета установлено, что у пациенток с CIN, ассоциированных с ВПЧ высокого онкогенного риска 16 и 18 типов общее число лейкоцитов и абсолютное количество жизнеспособных нейтрофилов (НФ) было достоверно выше показателей здоровых женщин ( $p < 0,001$ ). В процессе лечения эти показатели нормализовались в группе пациенток, получивших комплексную терапию с

использованием иммуномодулятора Имунофан® и ультразвуковой кавитации. В группе сравнения наметилась тенденция к снижению этих показателей. Абсолютное количество жизнеспособных клеток в цервикальном секрете в группе, получавшей иммунокорректирующую и кавитационную терапию, нормализовалось через месяц после лечения, в группе сравнения лишь наметилась тенденция к снижению данного показателя. Исследуя лизосомальную активность нейтрофилов цервикального секрета, было выявлено достоверное повышение содержания лизосом у пациенток с ВПЧ до лечения по сравнению с показателями здоровых женщин. Через 6 месяцев после проведенной терапии было зарегистрировано достоверное снижение данного показателя у женщин, получавших комплексную терапию. Анализируя результаты индуцированного НСТ-теста, мы выявили тенденцию к достоверному повышению показателей активности в группе пациенток, получавших орошения шейки матки кавитированным раствором иммуномодулятора Имунофан®. В группе сравнения мы не наблюдали динамики этих показателей. В данном исследовании выявлено достоверное снижение функционального резерва нейтрофилов у женщин с ВПЧ по сравнению с группой здоровых. У пациенток, получавших комплексную терапию кавитированным раствором иммуномодулятора, отмечено достоверное повышение этого показателя через 6 месяцев после лечения, в группе сравнения функциональный резерв нейтрофилов оставался на прежнем уровне. В процессе лечения у пациенток, получавших орошения шейки матки кавитированным раствором иммуномодулятора, наметилась тенденция к повышению функционального резерва нейтрофилов, тогда как в контрольной группе этот показатель оставался без изменения. При изучении фагоцитарной активности нейтрофилов цервикального секрета, было установлено, что у больных с ВПЧ активность и интенсивность фагоцитоза Нф были достоверно ниже показателей здоровых женщин. После комплексного лечения с применением иммуномодулирующей и кавитационной терапии отмечено статистически достоверное повышение активности и интенсивности фагоцитоза (Табл. 1).

Таблица 1.

**Состояние клеточных факторов цервикального секрета у женщин с CIN, в ассоциации с ВПЧ при различных способах терапии**

Показатели	Здоровые n=30	CIN, ассоциированная с ВПЧ, стандартная терапия, n=45		CIN, ассоциированная с ВПЧ, комплексная терапия, n=45	
		До лечения	После лечения	До лечения	После лечения
Лейкоциты, 10 <sup>9</sup> /л	6,88±0,4	8,99±0,37*	6,24±0,33**	7,97±0,22*	3,11±0,22***
Лейкоциты жизнеспособные, (абс.) 10 <sup>9</sup> /л	1,85±0,3	2,11±0,18*	1,78±0,19**	2,19±0,17*	1,53±0,2***
Лейкоциты жизнеспособные,%	56,25±2,8	58,3±1,92	60,65±2,1	57,58±1,85*	56,73±1,0
Лизосомальная активность Нф, %	3,5±1,6	17,0±2,8*	10,23±1,9**	16,35±2,4	8,2±1,6***

Лизосомальная активность Нф, у.е.	14,87±0,81	24,32±5,2*	15,7±3,9**	25,3±6,2*	10,56±2,3***
Активность фагоцитоза Нф, %	35,2±1,37	26,81±1,3*	28,4±1,23	25,91±1,54*	34,85±1,2***
Интенсивность фагоцитоза Нф, у.е.	1,85±0,09	1,71±0,03*	1,77±0,04	1,73±0,06*	1,85±0,08***
НСТ-тест Нф спонтанный, %	17,8±1,1	22,2±1,06*	21,3±1,03**	22,29±1,08*	18,1±1,07***
НСТ-тест спонтанный, у.е.	0,2±0,02	0,33±0,06*	0,35±0,05**	0,36±0,04*	0,22±0,05***
НСТ-тест Нф индуцированный, %	37,22±0,8	53,59±1,11*	50,5±1,12**	51,31±1,03*	36,85±1,01** *
НСТ-тест Нф индуцированный, у.е.	0,42±0,01	0,53±0,02*	0,51±0,04	0,54±0,01*	0,47±0,02***
Функциональный резерв Нф	2,08±0,2	1,51±1,41*	1,65±0,02	1,25±0,25*	2,21±0,34***

Примечание: сравнения между группами проведены по критериям Мана-Уитни;

\* $p < 0,05$  по отношению к показателям в группе здоровых

\*\* $p < 0,05$  по отношению к показателям до лечения

\*\*\* $p < 0,05$  по отношению к показателям группы «CIN, ассоциированная с ВПЧ, комплексная терапия» после лечения по отношению к группе «CIN, ассоциированная с ВПЧ, комплексная терапия»

Анализ цитокинового состава у пациенток групп «CIN, ассоциированная с ВПЧ» до лечения выявил достоверное ( $p < 0,05$ ) повышение содержания IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 по отношению к показателям группы здоровых. Полученные данные указывают на выраженную провоспалительную реакцию факторов цервикального секрета в ответ на присутствие антигена возбудителя. Анализ содержания интерферонов после завершения терапии показал: IFN $\alpha$  в группе «CIN, ассоциированная с ВПЧ, комплексная терапия» составил 15,3±3,2 пг/мл, что достоверно не отличалось от показателей группы здоровых – 13,5±1,8 пг/мл ( $p > 0,05$ ), в группе «CIN, ассоциированная с ВПЧ, стандартная терапия» содержание IFN $\alpha$  осталось сниженным – 5,4±1,4 пг/мл ( $p < 0,05$ ). Содержание IFN- $\gamma$  в цервикальном секрете у пациенток группы «CIN, ассоциированная с ВПЧ, комплексная терапия» после лечения составил 63,45±3,13 пг/мл, что достоверно выше значений в контрольной группе – 55,6±2,12 пг/мл. В группе «CIN, ассоциированная с ВПЧ, стандартная терапия» показатели IFN- $\gamma$  в цервикальном секрете оказались ниже показателей здоровых женщин – 30,6±2,5 ( $p > 0,05$ ). Поскольку интерфероны активируют нейтрофилы и макрофаги, стимулируют цитолитическую активность НК-клеток, то их почти полная нормализация указывает на положительное воздействие Имунофана® и ультразвуковой кавитационной терапии на локальный иммунитет шейки матки, тогда как после деструкции, применявшейся в качестве метода монотерапии сохраняются дисфункции интерферонового статуса. IL-1 $\beta$ , являющийся медиатором воспалительного ответа, модулятором белков острой фазы, после интравагинального

применения Имунофана® снижался до уровня  $37,5 \pm 3,5$  пг/мл, оставаясь при этом выше показателей здоровых женщин ( $27,4 \pm 2,3$  пг/мл) ( $p < 0,05$ ). Деструкция шейки матки без использования Имунофана® привела к значительному повышению данного показателя –  $84,6 \pm 4,5$  пг/мл ( $p < 0,05$ ), что также свидетельствует о сохранении воспалительных реакций. Аналогичные изменения зарегистрированы при анализе динамики IL-6: после применения Имунофана и ультразвуковой кавитации его уровень составил  $64,3 \pm 4,7$  пг/мл и достоверно не отличался от показателей контрольной группы. Содержание IL-10 и IL-4, ингибирующего иммунный ответ, достоверно снижалось после лечения во всех сравниваемых группах независимо от метода терапии и составило в группе «CIN, ассоциированная с ВПЧ, комплексная терапия»  $42,8 \pm 2,4$  нг/мл, в группе «CIN, ассоциированная с ВПЧ, стандартная терапия» –  $2,1 \pm 0,6$  нг/мл, у здоровых –  $39,26 \pm 0,1$  пг/мл. Регистрируемое снижение интерлейкинов после деструкции без применения иммуномодулирующей и кавитационной терапии может быть признаком, свидетельствующим об усилении угнетения иммунного ответа и возможном сохранении рисков возникновения воспалительных реакций [7]. Выявленная клинико-лабораторная и иммунологическая эффективность топических терапевтических эффектов иммуномодулирующей терапии препаратом Имунофан® и ультразвуковой кавитации позволяет рекомендовать интравагинальное введение кавитированного раствора иммуномодулирующего препарата Имунофан® в качестве предварительного этапа перед деструктивным методом лечения цервикальных неоплазий, ассоциированных с папилломавирусной инфекцией [6].

## **Выводы**

Применение иммуномодулирующей терапии с использованием ультразвуковой кавитационной терапии (аппаратный комплекс «Фотек») и препарата Имунофан® в комплексном лечении CIN, ассоциированных с ВПЧ высокого онкогенного риска, способствует эффективной элиминации ВПЧ.

Устранение дисфункции факторов противoinфекционной защиты урогенитального тракта при CIN, ассоциированных с ВПЧ высокого онкогенного риска способствует снижению риска персистенции ВПЧ, что делает предложенный комплексный метод терапии патогенетически обоснованным.

## **Список литературы**

Абрамовских О.С. Ассоциация вируса папилломы человека высокого канцерогенного риска с сопутствующими урогенитальными инфекциями вирусно-бактериальной природы/ О.С. Абрамовских, Л.Ф. Телешева, М.Л. Зотова, О.И. Летяева// II Всероссийская научно-практическая конференция современные аспекты дерматовенерологии. Тезисы науч. работ. - Москва. 2010. –С.55-56.

Гизингер О.А. Иммуномодуляторы в комплексном лечении микоплазменной инфекции урогенитального тракта у женщин репродуктивного возраста/ О.И. Летяева // Врач.-2014.- №2.-С.62-67.

Гизингер О.А. Ультразвуковая кавитация в терапии женщин с кандидозно-микоплазменной инфекцией генитального тракта/ О.И. Летяева // Врач.-2014.-№1.-С.83-87.

Гизингер, О.А. Система провоспалительных цитокинов в цервикальном секрете у женщин с урогенитальным хламидиозом / О.А. Гизингер, И.И. Долгушин // Цитокины и воспаление. – 2006. – Т. 5, № 4. – С. 13-16.

Гурбатов, С.Н. Использование низкочастотных акустических волн для линейной и нелинейной диагностики медико-биологических сред / С.Н. Гурбатов, И.Ю. Демин, Н.В. Прончатов-Рубцов// Труды 4-й научной конференции по радиофизике. – НГТУ, 2004.,С.45-67

Кононова И.Н., Обоскалова Т.А., Ворошилина Е.С. Иммунокоррекция кавитированными растворами при комплексном лечении цервикальных неоплазий, ассоциированных с папилломавирусной инфекцией/ И.Н. Кононова, Т.А. Обоскалова., Е.С. Ворошилина// Уральский мед.журнал.- 2013.№4(109). С.46-51.

Кононова И.Н., Обоскалова Т.А., Ворошилина Е.С. Цитокиновый профиль при ВПЧ-ассоциированных цервикальных неоплазиях./ И.Н. Кононова, Т.А. Обоскалова., Е.С. Ворошилина// Российский иммунологический журнал.- Том 7(16), № 2-3, 2013, С.291.

Касихина Е.И. Рецидивирующие бородавки и латентная генитальная папилломавирусная инфекция у женщин: факторы риска, клиника и лечение/Е.Н. Касихина//Клиническая дерматология и венерология.-2011.-№1.-С.49-54.

Роговская С.И./ С.И. Роговская. Папилломавирусная инфекция у женщин и патология шейки матки. М: ГЭОТАР-Медиа.2010; 190с.

De Masi A., Cuming T., Ratnasingam U. et al. Multifocal intraepithelial neoplastic disease in HIV positive women: we could be missing opportunities. Abstracts 15 Wold Congress for Cervical Pathology and Colposcopy. 2014: 43.

Camargo MJ., Russomano F., Raibolt N. Post-treatment disease after electrosurgery in the cervical intraepithelial neoplasia: a retrospective cohort. Abstracts 15 Wold Congress for Cervical Pathology and Colposcopy. 2014: 46.

Stern PL. Immune control of human papilloma virus (HPV) associated anogenital disease and potential for vaccination // Journal of Clinical VIROLOGY.-2005.-Vol.32S1:S72-S81.