

© ВИНОГРАДОВА О. П., АРТЕМОВА О. И., АНДРЕЕВА Н. А., ЕПИФАНОВА О. В.

УДК 618.146

DOI: 10.20333/25000136-2022-6-71-77

Изменение факторов иммунного ответа при терапии цервикальных интраэпителиальных неоплазий

О. П. Виноградова¹, О. И. Артемова², Н. А. Андреева³, О. В. Епифанова¹¹ Пензенский институт усовершенствования врачей – филиал «Российская медицинская академия последипломного образования», Пенза 440060, Российская Федерация² Пензенский государственный университет, Пенза 440026, Российская Федерация³ Национальный исследовательский Мордовский государственный университет имени Н.П. Огарёва, Саранск, Республика Мордовия 430005, Российская Федерация

Цель исследования. Оценка изменений факторов иммунного ответа при противовирусной терапии цервикальных интраэпителиальных неоплазий 1-2 степени на фоне вируса папилломы человека.

Материал и методы. Проведено амбулаторное обследование 232 женщин репродуктивного возраста. Из них 172 женщины с гистологически подтвержденным диагнозом- цервикальная интраэпителиальная неоплазия легкой и средней степени тяжести (Cervical Intraepithelialneoplasia-CINI-II), ассоциированной с папилломавирусной инфекцией. Каждой пациентке в ходе работы выполнялось цитологическое, кольпоскопическое исследования, так же проводилось ВПЧ-типирование в режиме реального времени с оценкой вирусной нагрузки. Для установки заключительного диагноза при необходимости применялась мультифокусная биопсия шейки матки. В рамках обозначенной цели были изучены и проанализированы изменения цервикальной зоны, по средствам оценки caspase 3, caspase-9, IFN- γ , IL-18.

Результаты. В рамках проведенного исследования были проанализированы изменения каспазного и цитокинового профиля при цервикальных интраэпителиальных неоплазиях I-II степени, ассоциированных с ВПЧ, которые и обосновали применение иммунокоррекции для успешного лечения пациенток с диспластическими процессами легкой и средней степени тяжести.

Заключение. Полученные в исследовании результаты, делают возможным оптимизацию ведения пациенток с ВПЧ-ассоциированными цервикальными интраэпителиальными неоплазиями 1 и 2 степени тяжести.

Ключевые слова: полимеразная реакция, генотипирование, каспаза 3, каспаза 9, апоптоз, цервикальная неоплазия, интерлейкин-18, фактор некроза опухоли альфа, вирусная нагрузка.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Для цитирования: Виноградова ОП, Артемова ОИ, Андреева НА, Епифанова ОВ. Изменение факторов иммунного ответа при терапии цервикальных интраэпителиальных неоплазий. *Сибирское медицинское обозрение.* 2022;(6):71-77. DOI: 10.20333/25000136-2022-6-71-77

Changes in immune response factors in therapy of cervical intraepithelial neoplasia

O. P. Vinogradova¹, O. I. Artemova², N. A. Andreeva³, O. V. Epifanova¹¹ Penza Institute for Postgraduate Medical Education - branch of the Russian Medical Academy of Postgraduate Education, Penza 440060, Russian Federation² Penza State University, Penza 440026, Russian Federation³ National Research Mordovian State University named after N. P. Ogaryova, Saransk, Republic of Mordovia 430005, Russian Federation

The aim of the research. Assessment of changes in immune response factors during antiviral therapy of cervical intraepithelial neoplasia of severity grades I and II against the background of human papillomavirus.

Material and methods. An outpatient examination of 232 female subjects of reproductive age was carried out. Among these, 172 women were with a histologically confirmed diagnosis of mild to moderate cervical intraepithelial neoplasia (CIN I-II) associated with papillomavirus infection. During the work, each patient underwent cytological and colposcopic examination as well as real-time HPV typing with viral load evaluation. To establish the final diagnosis, if necessary, a multifocal biopsy of the cervix was used. Within the framework of the designated goal, changes in the cervical zone were studied and analysed by means of assessing caspase-3, caspase-9, IFN- γ , IL-18.

Results. As part of the study, changes in the caspase and cytokine profile were analysed in HPV-associated cervical intraepithelial neoplasia of grades I-II, which substantiated the use of immune system correction for successful treatment of patients with mild to moderate dysplastic processes.

Conclusion. The results obtained in the study make it possible to optimise management of patients with HPV-associated cervical intraepithelial neoplasia of severity degrees I-II.

Key words: polymerase reaction, genotyping, caspase-3, caspase-9, apoptosis, cervical neoplasia, interleukin-18, tumor necrosis factor alpha, viral load.

Conflict of interest. The authors declare the absence of obvious and potential conflicts of interest associated with the publication of this article.

Citation: Vinogradova OP, Artemova OI, Andreeva NA, Epifanova OV. Changes in immune response factors in therapy of cervical intraepithelial neoplasia. *Siberian Medical Review.* 2022;(6):71-77. DOI: 10.20333/25000136-2022-6-71-77

Введение

До настоящего время активно ведется обсуждение и разработка новых мероприятий для снижения показателей летальности от рака шейки матки (РШМ). Ввиду того, что данная онкопатология не имеет молниеносного

течения, что отличает её от других онкологических заболеваний, правильно выбранная тактика лечения и своевременное выявление интраэпителиального процесса шеечного эпителия даёт огромную возможность стопроцентной излечиваемости. Скрининговые методы

диагностики и исследование цервикальной зоны при помощи зеркал не дает высоких результатов по выявлению патологии [2]. По-прежнему дискуссионным остается вопрос полноценности скрининга для женщин по выявлению атипических процессов в цервикальной зоне, решение которого сейчас возможно в трех направлениях: ПАП-тестирование, ПАП-тестирование совместно с тестом на вирус папилломы человека (принято в некоторых странах) и проведение расширенного кольпоскопического исследования совместно с определением наличия вируса папилломы человека (ВПЧ) [4, 6].

Однако для поиска новых и эффективным лечебно-диагностических мероприятий в настоящее время отдельное внимание уделяется иммунологическим аспектам патогенеза рака шейки матки с целью рассмотрения вопроса о применении иммуномодулирующих препаратов при лечении цервикальных интраэпителиальных неоплазий для исключения рецидива и дальнейшего прогрессирования заболевания [1, 3, 5].

Исходя из вышесказанного целью исследования была обозначена оценка изменений факторов иммунного ответа при противовирусной терапии цервикальных интраэпителиальных неоплазий 1–2 степени на фоне вируса папилломы человека.

Материал и методы

Проведено обследование 172 женщины фертильного возраста с гистологически подтвержденной цервикальной интраэпителиальной неоплазией первой степени тяжести (CIN I) или цервикальной интраэпителиальной неоплазией второй степени тяжести (CIN II), ассоциированной с вирусом папилломы человека, обратившихся на амбулаторно-поликлинический прием гинекологического профиля в г. Пенза и г. Саранск в период с 2017 по 2021 гг.

Исследование было одобрено Этическим Комитетом ФГБОУ ВО «Пензенский государственный университет» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (протокол заседания № 5), ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава Российской Федерации (протокол заседания № 7), Пензенский институт усовершенствования врачей – филиал ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия последипломного образования» Минздрава России (протокол заседания № 3).

Пациенты подписали информированное согласие на публикацию своих данных.

В рамках данной научно-исследовательской работы с женщинами были соблюдены принципы этики, а также актуальные медицинские стандарты ведения пациентов с выбранными патологиями.

Критериями включения явились: возраст 18–45 лет, наличие ВПЧ, определенное методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) – исследованием в режиме «real-time»; диагноз CIN I и CIN II, верифицированные и подтвержденные гистологически; зона трансформации 1 или 2 тип; «нормоценоз» по результатам оценки

нижнего отдела гинекологического тракта; использование барьерного метода контрацепции на всем протяжении исследования.

Из исследования исключались пациентки младше 18 и старше 49 лет, с беременностью или в период лактации, принимавшие лекарственные препараты, которые смогли бы повлиять на исследуемые показатели. Так же не анализировались результаты женщин при обнаружении других половых инфекций.

В исследование учитывались: клиничко-анамнестические параметры, цитологическое исследование мазков с шейки матки, результаты которого интерпретировали согласно общим положениям системы информативной классификации Bethesda (The Bethesda System), разработанной в США в 1988 г., кольпоскопическое исследование и мультифокусная биопсия шейки матки с дальнейшим гистологическим исследованием для установки диагноза CIN I–II [2].

Для выявления и дифференциация ДНК вирусов папилломы человека в качестве материала для ПЦР-диагностики использовали соскобное отделяемое цервикального канала и набор реагентов с гибридационной-флуоресцентной детекцией «Ампли Сенс® ВПЧ ВКР скрин-титр-FL» (ФБУН «ЦНИИЭ» Роспотребнадзора, г. Москва).

Следующий этап исследования предполагал оценку иммунологических показателей цитокиновой регуляции: IL-18, IFN- γ и маркеров апоптоза: caspase 3, caspase 9.

Оценка локального иммунитета проводилась по средствам определения уровней экспрессии caspase 3 и caspase 9 при помощи набора реагентов компании Cloud-Clone Corp., предназначенного для количественного определения уровней caspase 3 и caspase 9 сэндвич-методом ИФА в гомогенатах тканей, клеточных лизатах, супернатантах клеточных культур и в других биологических жидкостях человека. Для данного этапа собирался соскоб клеток слизистого слоя цервикального канала, а полученный результат выражался в нг/мл.

Для получения информации по показателям caspase 3 и caspase 9 был проведен литературный поиск, по результату которого не оказалось общедоступных данных по выбранным показателям. Поэтому для определения значений caspase 3 и caspase 9 была сформирована группа относительно здоровых женщин-группа контроля (n=60): ВПЧ – негативные женщины в возрасте от 18 до 45 лет, без патологии шейки матки и с диагнозом «нормоценоз» по результатам оценки нижнего отдела гинекологического тракта.

Статистическую обработку полученных в ходе работы данных при оценке зависимых групп проводили с использованием стандартизированного пакет прикладных программ для персонального компьютера (STATISTICA for Windows). Для решения поставленной цели при оценке изменений исследуемых показателей маркеров апоптоза и цитокиновой регуляции по временным

промежуткам описывалась разность между исходными и конечными величинами отдельно в каждой группе/подгруппе. Распределение соответствовало нормальному, полученные параметры представлены в виде средних значений (M) и их стандартных отклонений (m), абсолютных значений (абс.) и процентов (%). Оценка достоверности отличий результатов исследования определялась по t-критерию Стьюдента (t) для независимых групп. Статистически значимыми считались различия результатов при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

Согласно дизайну проводимой работы были сформированы группы исследования, в которые вошли женщины с наличием вируса папилломы человека (ВПЧ), имеющие по результату онкоцитологического мазка и результатов гистологии категории CIN I (группа 1, n=86) и CIN II (группа 2, n=86).

Средний возраст в группе женщин с CIN I был равен $28,4 \pm 0,7$ лет, в группе с CIN II $29,5 \pm 2,6$ года, а в группе контроля $29,2 \pm 1,8$ лет.

Первоначально были проанализированы уровни цитокинов и каспаз и их изменения в сравнении с показателями условно-здоровых женщин (таблица 1). Так как в литературе отсутствуют данные о значениях исследуемых маркеров был проведен анализ уровней цитокинов и каспаз у условно-здоровых ВПЧ-негативных женщин – группа контроля (n=60) с картиной NILM по заключению онкоцитологии (табл. 1).

Как видно из таблицы 1, оценивая факторы цитокинового ответа и маркеры апоптоза на фоне ВПЧ, относительно показателей условно здоровых пациенток определено повышение IFN- γ в 1,5 раза при цервикальной интраэпителиальной неоплазии 1 степени и почти в 2 раза при CIN II.

Так как IFN- γ является интерфероном иммунного значения, то его синтезирование возможно исключительно иммунокомпетентными клетками при реализации полного ответа иммунной системы [12], поэтому,

Таблица 1

Уровни каспаз и цитокинов в цервикальной слизи у обследованных групп женщин

Table 1

Levels of caspases and cytokines in cervical mucus in the examined groups of female subjects

Группа исследования	Caspase 3, нг/мл	Caspase 9, нг/мл	IFN- γ , пг/мл	IL-18, пг/мл
Группа контроля (n=60)	0,18 \pm 0,041	0,21 \pm 0,032	89,44 \pm 0,857	8,12 \pm 0,072
CIN I (n=86)	2,38 \pm 0,042*	2,41 \pm 0,049*	123,85 \pm 1,661**	8,97 \pm 0,125*
CIN II (n=86)	3,21 \pm 0,044*	2,81 \pm 0,044*	163,61 \pm 2,061*	5,78 \pm 0,122*

Примечание: Символом * – маркированы значения, имеющие статистически значимые различия между группами ($p \leq 0,05$). ** – присутствует тенденция к возникновению статистической разницы.

Note: * – values with significant difference between the groups ($p \leq 0.05$). ** – presence of a trend to statistical difference.

изложенные выше данные говорят о специфическом клеточном ответе под влиянием вируса папилломы человека на различных этапах формирования патологического процесса в цервиксе.

При оценке апоптотических маркеров при диспластическом процессе I–II степени определены статистически значимые различия между группами исследования и группой условно-здоровых женщин по caspase 3, caspase 9 ($p=0,031$, $p=0,042$). Такие результаты возможны при активности процессов апоптоза на фоне персистенции вируса папилломы человека. Таким образом, при интерпретации полученных результатов определяется активное воздействие вируса на клетки эпителия, по средствам усиления влияния на программу апоптоза, что, способствует формированию апоптоз-резистентного фенотипа в клетках цервикса [2, 7].

Другим отличием явилось повышение IL-18 у пациенток в группе с CIN I и снижение его у пациенток в группе с CIN II, то есть повышение синтеза IFN- γ объясняется активирующим действием IL-18 при цервикальной неоплазии легкой степени [9,10].

По мере прогрессирования патологического процесса происходит реализация онкопотенциала вируса папилломы человека, который определяется включением вирусного генома в состав клеточных хромосом. Изменение уровня IL-18 в сторону понижения, играет важную роль в становлении ответа иммунной системы, в котором ведущим звеном является комплекс CD8+ Т-лимфоциты в цервикальном содержимом у женщин с гистологически подтвержденной цервикальной интраэпителиальной неоплазией 2 степени тяжести. Данный процесс связан с супрессивным воздействием белка Е6 [8, 13, 16]. Именно он при связывании с интерлейкином-18, который в свою очередь является основным индуктором гамма-интерферона, приводит к блокаде реакций клеточного цитотоксического иммунитета. Уже доказано, негативное влияние белков Е6 и Е7 на экспрессию гена, кодирующего IL-18, что свидетельствует о наличии у ВПЧ специфического механизма иммуносупрессии, подавляющего продукцию IL-18 [14].

Диагностированные вариации цитокинового профиля сопоставимы с недостаточной фагоцитарных реакций, кислород-зависимой и кислород-независимой биоцидности, что говорит о внедрении этих процессов формирование диспластических изменений в цервиксе, под воздействием вируса папилломы человека [7].

Учитывая наличие физиологического апоптоза в здоровых клетках полученные значения маркеров – активность каспазы 3 и каспазы 9 среди условно здоровых женщин свидетельствуют о наличии естественно текущего отмирания, благодаря которому происходит регуляция клеточного обновления в цервикальной зоне [7, 13].

При определении уровней каспазного ответа при CIN I полученные результаты показателей caspase 3 – $2,38 \pm 0,042$ нг/мл и caspase 9 – $2,41 \pm 0,049$ нг/мл, которые

Определение уровней caspase 3 и caspase 9, IL-18, IFN-γ через 3 и 12 месяцев при CIN I

Evaluation of caspase-3, caspase-9, IL-18 and IFN-γ levels at 3 and 12 months in CIN I

Подгруппа	Группа контроля (n=60)	До лечения	Через 3 месяца для caspase 3 и 9/ через 10 дней для IL-18, IFN-γ		Через 12 месяцев	
			1b (n=43)	1a (n=43)	1b (n=43)	1a (n=43)
Caspase 3 (нг/мл)	0,18 ±0,041	2,38 ±0,042*	2,16±0,046*	1,63 ±0,049*	1,9 ±0,048*	1,21 ±0,452*
Caspase 9 (нг/мл)	0,21 ±0,032	2,41 ±0,049*	1,91±0,047*	1,49 ±0,048*	1,5 ±0,049*	1,13 ±0,049*
IL-18, (пг/мл)	8,12 ±0,072	8,97 ±0,125*	9,12±0,101*	12,61±0,351	9,10±0,101	11,58 ±0,214
IFN-γ, (пг/мл)	89,45 ±0,857	123,84±0,22*	116,46±1,662*	159,65±4,833	115,68±1,805	127,23±3,969

Примечание: символом * – маркированы значения, которые имеют статистические различия ($p \leq 0,05$).

Note: * – values with significant difference ($p \leq 0.05$).

статистически отличались от показателей условно-здоровых пациенток ($p=0,049$, $p=0,049$), позволяют сделать вывод о том, что внедрение вируса в клетки цервикса запускает апоптотических каскад реакций, который направлен на уничтожение пораженной клетки. По мере утяжеления интраэпителиального повреждения апоптотические программы протекают более выражено с запуском иницирующих и эффекторных каспаз, активность которых заметно повышалась, что определяет дальнейшее увеличение показателя caspase 3 до $3,21 \pm 0,044$ нг/мл и caspase 9 до $2,81 \pm 0,044$ нг/мл у пациенток с CIN II.

Далее все пациентки случайным образом внутри каждой группы были разделены на равные по численности подгруппы:

1a подгруппа – 43 пациентки с CIN I, которые находились под динамическим наблюдением без применения терапии;

1b подгруппа – 43 пациентки с CIN I, получали терапию препаратом Аллоферон по схеме согласно клиническим рекомендациям.

2a подгруппа – 43 пациентки с CIN II, которые после хирургического этапа лечения находились под динамическим наблюдением согласно клиническим рекомендациям

2b подгруппа- 43 пациентки с CIN II, которым проводилась эксцизия на фоне терапии противовирусным препаратом Аллоферон.

Данный этап исследования заключался в наблюдении через 3 месяца и через 12 месяцев.

Эффективность выбранной тактики оценивали посредством цитологического исследования, вирусной нагрузки, а также измерялись уровни IL-18, IFN – γ, caspase 3, caspase 9. Ведущим фактором для оценки качества подобранного лечения являлось: отсутствие или снижение концентрации ниже клинически значимых значений вируса папилломы человека, отсутствие отрицательной динамики у результатов ПАП-теста.

В исследовании использовался препарат Аллоферон, который обладает эффективностью в отношении вируса папилломы человека и разрешен для применения в его лечении клиническими рекомендациями. Механизм

действия данного препарата обусловлен индукцией синтеза эндогенных интерферонов, а также стимуляцией системы естественных киллеров. За счет чего Аллоферон может цитотоксическими лимфоцитами активировать лизис клеток с дефектом, чем и обеспечивается противовирусный эффект данного препарата.

Учитывая период полувыведения выбранного иммуномодулирующего препарата (6–8 часов) и сохранение противовирусной активности на протяжении 7 дней после однократного введения препарата под кожу, а также принимая во внимание особенности цитокинового взаимодействия, целесообразным было взятие параметров на 10 день и через 12 месяцев с целью отслеживания отдаленного эффекта терапии [6, 9].

Установлено, что исследуемые показатели цервикальной слизи до и после терапии были статистически различные с группой контроля (табл. 2).

Из таблицы видно, что значения IL-18 достигали максимальных через 10 суток по окончании лечения среди пациенток, применявших препарат Аллоферон. Среди женщин, которые находились под наблюдением, показатели IL-18 статистически не отличались от показателей на начальном этапе исследования.

Интерпретируя результаты IFN-γ в слизи цервикального канала у пациенток с диспластическими изменениями на шейке матки, ассоциированными с ВПЧ, принималась во внимание особенность IL-18 к повышению продукции интерферона. Проводя параллельную взаимосвязь по принципу прямого воздействия и способности IL-18 индуцировать IFN-γ, в действительности, его концентрация статистически отличалась и была выше в подгруппе 1b, чем в подгруппе сравнения женщин, не получавших противовирусную терапию. Однако спустя 12 месяцев наблюдения концентрация IFN-γ снижается ниже фоновых показателей (с $159,65 \pm 4,833$ пг/мл до $127,23 \pm 3,969$ пг/мл), что, вероятно, связано с подавлением репликации ВПЧ и устранением местного воспалительного процесса в шеечном эпителии.

Динамическое снижение уровней caspase 3 и caspase 9 через 3 и 12 месяцев наблюдения в подгруппе 1b у пациенток на фоне проводимого противовирусного лечения связано с выраженным процессом лизиса пораженных

клеток цервикального эпителия ввиду выраженной активации Т-лимфоцитов под воздействием Аллоферона.

Поскольку для активации процесса программированной клеточной гибели по внешнему или внутреннему путям необходимо воздействия триггера на рецепторы клетки, то в этой роли в данном случае выступает вирус папилломы человека. Однако, полученные результаты говорят о том, что ВПЧ, проникая в клетку, еще в эпизодической форме способен влиять на жизнедеятельность клетки, за счет активации рецепторов смерти на внешней мембране и за счет воздействия на митохондрии [7,15]. Данные взаимодействия приводят к усилению апоптоза, как защитной реакции поврежденной клетки. То есть, при ВПЧ-ассоциированной CIN I происходит усиление апоптоза за счет непрерывной стимуляции рецепторов эпителиальных клеток.

Анализ цитокинового профиля у женщин в подгруппе с индексом «b» свидетельствует о нарушении работы клеточных механизмов, что, возможно, является отражением персистирующего течения папилломавирусной инфекции.

В подгруппе Ib снижение вирусной нагрузки и/или полное исчезновение ВПЧ наблюдалось у 30% женщин через 3 месяца и у 63 % через 12 месяцев. У пациенток подгруппы Ia, находящихся под динамическим наблюдением этот показатель составил не более 20 % через 12 месяцев.

Касательно цитологического исследования мазков, улучшение результатов отмечено у 44 % случаев пациенток подгруппы Ib, соответствующие картине NILM (интраэпителиальные изменения и злокачественные процессы отсутствуют). И лишь у 15 женщин сохранялась слабая дисплазия шейки матки (в 35 %). У женщин подгруппы Ia у 5 % пациенток выявилось изменение, соответствующее CIN II, и у 7 % – CIN I-II. В 21 % результаты соответствовали нормальной цитограмме. Интраэпителиальные поражения легкой степени остались у 28 (65 %) через 3 и 12 месяцев.

Анализ данных в группе пациенток с CIN II степени показал следующие результаты (табл. 3).

Благодаря тому, что противовирусная активность Аллоферона обусловлена активацией биохимических



Рисунок 1. Оценка эффективности и излеченности ВПЧ у пациенток с CIN I*.

*на основании снижения вирусной нагрузки (менее 3lg вируса)/полного исчезновения ВПЧ и категорииNILM (интраэпителиальные изменения и злокачественные процессы отсутствуют) по данным жидкостной онкоцитологии.

Figure 1. Evaluation of the effectiveness and cure of HPV in patients with CIN I*.

*based on the decrease of viral load (below 3lg of the virus) / complete disappearance of HPV and the NILM category (absence of intraepithelial changes and malignant changes) according to the liquid oncocytology data.

процессов в макрофагах, которые в свою очередь способствуют продукции интерлейкинов, наблюдается повышение показателя IL-18 в подгруппе женщин с комплексным методом терапии через 10 дней (табл. 3).

В то время как в подгруппе пациенток без применения препарата аллоферона средний показатель IL-18 составил 5,65±0,153 нг/мл, чем статистически не отличался от исходного значения 5,77±0,151 нг/мл.

Однако через 12 месяцев приближался к своим исходным значениям. Таким образом, подавление репликационной активности вируса, объясняется тем, что IFN-γ через 12 месяцев после лечения стремился к исходным значениям. Принимая во внимание, что IFN-γ имеет иммуностимулирующую активность, то, возможно, при определенных факторах, может оказывать иммуносупрессивное действие, что будет, в свою очередь, способствовать персистенции. Поэтому отсутствие его повышения в группе с проведенной эксцизией без применения иммуномодулирующей терапии создавало благоприятные условия для возникновения рецидива и персистенции ВПЧ.

Таблица 3

Определение уровней caspase 3 и caspase 9, IL-18, IFN-γ через 3 и 12 месяцев при CIN II

Table 3

Evaluation of caspase-3, caspase-9, IL-18 and IFN-γ levels at 3 and 12 months in CIN II

Подгруппа	Группа контроля (n=60)	До лечения	Через 3 месяца для caspase 3 и 9 / через 10 дней для IL-18, IFN-γ		Через 12 месяцев	
			Ib (n=43)	Ia (n=43)	Ib (n=43)	Ia (n=43)
Caspase 3 (нг/мл)	0,18±0,041	2,38±0,042*	0,57 ± 0,031*	0,61 ± 0,049*	0,17 ± 0,042*	0,63 ± 0,041*
Caspase 9(нг/мл)	0,21±0,032	2,41±0,049*	0,48 ± ,033*	0,52 ± 0,043*	0,27 ± 0,048*	0,71±0,048*
IL-18, (пг/мл)	8,12±0,072	8,82±0,125*	8,22±0,346	5,65±0,153	6,98±0,281	5,43±0,152
IFN-γ, (пг/мл)	89,45±0,857	123,84±0,22*	169,81±2,751	168,03±2,762	131,94±3,515	167,14±2,793

Примечание: символом * – маркированы значения, которые имеют статистические различия (p≤0,05).

Note: * – values with significant difference (p≤0.05).

При интерпретации полученных уровней caspase 3 и 9 среди пациенток определено, что все значения после рекомендованной терапии были статистически отличны от значений группы контроля. Через 12 месяцев показатели caspase 3 и caspase 9 ($0,17 \pm 0,042$ и $0,27 \pm 0,048$ нг/мл соответственно) в подгруппе IIb были статистически ниже, чем в подгруппе с индексом Ia за аналогичный временной промежуток, а именно: caspase 3: $0,63 \pm 0,041$ нг/мл, caspase 9: $0,69 \pm 0,048$ нг/мл. Колебания уровней caspase 3 и caspase 9 в подгруппе с индексом Ib объясняется воздействием терапии с противовирусной активностью на звенья естественного иммунитета, например, на NK-киллеры. Такой механизм не мог реализоваться в подгруппе IIa. Среди пациенток, которые получали терапевтический этап лечения, за счет воздействия на процессы лизиса клеток макрофагами, было зафиксировано повышение продукции IL и пролиферации T-лимфоцитов [4, 10]. Таким образом, полностью блокировалась экспрессия bcl-2, отсутствовала экспрессия p53, что способствовало повышению концентрации caspase 3, за счет стимуляции внешнего апоптотического пути.

При анализе разных подходов к ведению пациенток с определением уровней цитокинов и апоптотического профиля статистически значимые различия были получены во всех подгруппах, однако в подгруппах именно с терапией аллофероном исследуемые показатели caspase 3, caspase 9, IL-18 и IFN- γ были статистически ниже, относительно подгрупп без использования препарата. Возможно, это связано с тем, что при проведении противовирусного лечения происходила медикаментозная активация NK-клеток, которые опосредованно запускали цитокиновые реакции и приводили к прямому лизису зараженных клеток. В то время как у пациенток без противовирусного лечения клетки с ВПЧ были «защищены» от лимфоцитов за счет блокирования активности NK-клеток [11, 12].

При сравнительном исследовании пациенток с CIN II и проведении ПАП-теста через 3 месяца в подгруппе «IIb» у 95 % пациенток и у 93 % через 12 месяцев было заключение-NILM. Однако, через 3 месяца внутри исследуемой подгруппы заключение LSIL было у 5 % (2 пациентки) и у 7 % (3 пациентки) через 12 месяцев.

В подгруппе, где не использовался препарат аллоферон (подгруппа IIb) у 88 % (33 пациентки) зафиксирован нормальный результат цитологии (NILM). Но через 12 месяцев у 19 % (8 пациенток) отмечается рецидив в виде появления CIN I, а у 1 пациентки (2 %) сохраняется картина CINII. И только у 34 пациенток (79 %) отмечалась картина NILM.

Таким образом, сравнивая подгруппы по результатам ПАП-теста больше положительных результатов цервикального скрининга определено в подгруппе IIb, у которых было проведено комбинированное лечение: эксцизия в совокупности с иммуномодулирующей противовирусной терапией.

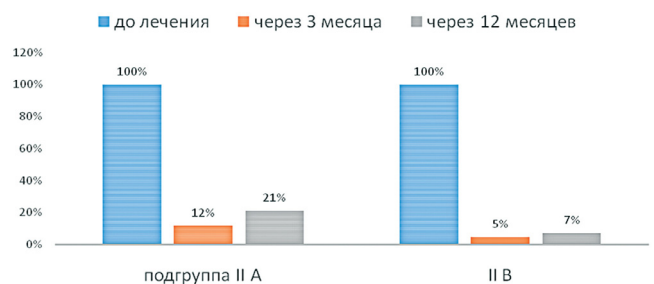


Рисунок 2. Оценка эффективности и излеченности ВПЧ у пациенток с CIN II*.

*на основании снижения вирусной нагрузки и категории NILM (интраэпителиальные изменения и злокачественные процессы отсутствуют) по данным жидкостной онкоцитологии.

Figure 2. Evaluation of the effectiveness and cure of HPV in patients with CIN II*.

*based on the decrease of viral load (below 3lg of the virus) / complete disappearance of HPV and the NILM category (absence of intraepithelial changes and malignant changes) according to the liquid oncology data.

Ухудшение цитологических результатов в виде картины HSIL у пациентки обеих групп не было зарегистрировано. А сохранение CIN II через 12 месяцев пациенток в подгруппах IIa и IIb, соответственно, связано в первом варианте с возможным нарушением процессов регуляции иммунного ответа, во-втором – с более длительной персистенцией вируса и возникновением рецидива.

Для оценки эффективности лечения, пациенткам обеих групп было проведено повторное контрольное обследование на определение вирусной нагрузки ВПЧ. Через 3 месяца в подгруппе IIa снижение вирусной нагрузки зафиксировано лишь у 86 % пациенток, в то время как в подгруппе с применением противовирусной терапии (IIb) – в 95 %. Через 12 месяцев в подгруппе IIb у 74 % пациенток диагностировано снижение вирусной нагрузки ниже клинически значимой и у (8) 19 % было отмечено полное исчезновение ВПЧ (суммарная эффективность излеченности составила 93 %). В то время как у 9 (21 %) женщин в подгруппе без терапии наблюдается вновь ее повышение и снижение отмечено в 79 % случаев. Полного исчезновения ВПЧ внутри данной подгруппы IIa зафиксировано не было.

Выводы

Изучение каспазного и цитокинового профилей при диспластических процессах в цервиксе является важным этапом при иммунологическом обследовании пациенток, с вирусной инфекцией, так как интерфероны, каспазы и цитокины являются главными медиаторами межклеточных взаимодействий.

Проведенный анализ уровней цитокинов интерлейкина-18 и гамма-интерферона, а также маркеров апоптоза caspase 3, caspase 9 в цервикальной слизи у женщин с CIN I–II, которые частично отражают картину иммунологического статуса, позволяет оптимизировать терапию патологий шейки матки с целью повышения точности и персонализации подходов к лечению.

В ходе проведенного исследования, определена тенденция к снижению выявляемости ВПЧ у женщин, получавших противовирусную терапию препаратом аллоферона, по сравнению с пациентками, которые не получали данную терапию.

Полученные результаты позволяют считать, что применение комплексных методов лечения с использованием иммуномодулирующих препаратов с противовирусной активностью позволяют оптимизировать тактику ведения пациенток с CIN I и CIN II и предупредить дальнейшую прогрессию патологии.

Литература / References

1. He YH, Su RJ, Zheng J. Detection of DKK-1 gene methylation in exfoliated cells of cervical squamous cell carcinoma and its relationship with high risk HPV infection. *Archives of Gynecology and Obstetrics*. 2021;304(3):743–750. DOI:1007/s00404-021-05982-3
2. Liu Y, Liao J, Yi X, Pan Z, Pan J, Sun C, Zhou H, Meng Y. Diagnostic value of colposcopy in patients with cytology-negative and HR-HPV-positive cervical lesions. *Archives of Gynecology and Obstetrics*. 2022; 198. DOI: 1007/s00404-022-06415-5]
3. Asadi M, Taghizadeh S, Kaviani E Caspase-3: Structure, function, and biotechnological aspects. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 2022;69(4):1633-1645. DOI:10.1002/bab.2233
4. Zhang Y, Wang J, Zhang R, Lei F, Lai S. Application Value of Detection of High-Risk HPV Infection in Early Cervical Cancer Patients in Disease Diagnosis and Prognosis *Clinical Laboratory*. 2020;66(12): 1123-1131. DOI: 10.7754/Clin.Lab.2020.200245
5. Erbylyk HI, Palalioğlu RM. HPV Infection, HPV Vaccines and Cervical Cancer Awareness: A Multi-Centric Survey Study in Istanbul, Turkey. *Women Health*. 2021;61(8):771-782. DOI:10.1080/03630242.2021.1969612
6. Zhao J, Guo Z, Wang Q, Si T, Pei S, Qu H, Shang L, Yang Y, Wang L. HPV infection associated DNA damage correlated with cervical precancerous lesions and cancer in the highest area of cervical cancer mortality, Longnan, China. *Cancer Management and Research*.2019;(11): 7197–7210. DOI: 2147/CMAR.S201415
7. Vinogradova OP, Artemova OI. The Efficacy of Human Papillomavirus Elimination during Treatment of Cervical disorders. *DoctorRu*. 2020;19(8):80–85. DOI: 10.31550/1727-2378-2020-19-8-80-85
8. Calagna G, Maranto M, Paola C. 'Secondary prevention' against female HPV infection: literature review of the role of carrageenan. *Expert Review of Anti-infective Therapy*. 2020;18(9):865-874. DOI:10.1080/14787210.2020.1770082
9. Klein C, Gonzalez D, Samwel K, Kahesa C, Mwaiselage J, Aluthge N, Fernando S, West JT, Wood C, Angeletti PC. Relationship between the Cervical Microbiome, HIV Status, and Precancerous Lesions. *MBio*. 2019;10(1). DOI: 1128/mBio.02785-18

10. Araya LE, Soni IV, Hardy JA, Julien O. Deorphanizing Caspase-3 and Caspase-9 Substrates In and Out of Apoptosis with Deep Substrate Profiling. *ACS Chemical Biology*. 2021;16(11):2280-2296. DOI:10.1021/acscchembio.1c00456

11. Masood N, Dubey V, Luqman S. Activation of Caspase-3 by Terpenoids and Flavonoids in Different Types of Cancer Cells. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2020;20(21): 1876–1 DOI:2174/1568026620666200710101859

12. Dong Z, Hu R, Du Y. Immunodiagnosis and Immunotherapeutics Based on Human Papillomavirus for HPV-Induced Cancers. *Front Immunology*. 2021;(11):586796. DOI:10.3389/fimmu.2020.586796

13. Silva NT, Sabino A. de P, Tafuri A, Lima AA. Lack of association between methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism, HPV infection and cervical intraepithelial neoplasia in Brazilian women. *BMC Medical Genetics*. 2019;20(1): DOI:/10.1186/s12881-019-0831-x

14. Wang R, Pan W, Jin L. Human papillomavirus vaccine against cervical cancer: Opportunity and challenge. *Cancer Letters*. 2020; (471):88-102. DOI:10.1016/j.canlet.2019.11.039

15. Lugović-Mihčić L, Cvitanović H, Djaković I, Kuna M, Šešerko A. The Influence of Psychological Stress on HPV Infection Manifestations and Carcinogenesis. *Cell Physiological Biochemistry*. 2021;55(S2):71-88. DOI:10.33594/000000395

Сведения об авторах

Виноградова Ольга Павловна, д.м.н., профессор, Пензенский институт усовершенствования врачей – филиал Российской медицинской академии последипломного образования Минздрава России; Адрес: Российская Федерация, 440060, г. Пенза, улица Стасова 7; тел.: +79272887867; e-mail: o_vinogradova69@mail.ru, <http://orcid.org/0000-0002-9094-8772>

Артемова Ольга Игоревна, к.м.н., доцент, Медицинский институт Пензенский государственный университет; Адрес: Российская Федерация, 440026, г. Пенза, ул. Красная, 40; тел.: +79631024551; e-mail: artyomovaolg@gmail.com, <http://orcid.org/0000-0002-4996-026X>

Андреева Наталья Анатольевна, к.м.н., доцент, Национальный исследовательский Мордовский государственный университет имени Н.П. Огарёва; Адрес: Российская Федерация, Республика Мордовия, г. Саранск, ул. Большевикская, д. 68; тел.: +79272759306; e-mail: andreeva_77@list.ru, <http://orcid.org/0000-0002-2207-7039>

Епифанова Ольга Викторовна, ассистент, Пензенский институт усовершенствования врачей – филиал «Российская медицинская академия последипломного образования»; Адрес: Российская Федерация, 440060, г. Пенза, улица Стасова 7; тел.: +79610996885; E-mail: epifanova.vrt@gmail.com. <http://orcid.org/0000-0002-3961-809X>

Author information

Olga P. Vinogradova, Doctor of Medical Sciences, Professor of the Department, Penza Institute for Postgraduate Medical Education – branch of the Russian Medical Academy of Postgraduate Education of the Ministry of Health of Russia; Address: 7 Stasova Street, Penza, Russian Federation 440060; Phone: +79272887867; E-mail: o_vinogradova69@mail.ru, <http://orcid.org/0000-0002-9094-8772>.

Olga I. Artemova, Cand. of Med. Sci., Associate Professor of the Department, Medical Institute Penza State University; Address: 40 st. Red, Penza, Russian Federation 440026; Phone: +79631024551; e-mail: artyomovaolg@gmail.com, <http://orcid.org/0000-0002-4996-026X>

Natalya A. Andreeva, Cand. of Med. Sci., Associate Professor of the Department, National Research Mordovian State University named after N.P. Ogaryov; Address: 68 st. Bolshevik, Saransk, Republic of Mordovia, Russian Federation 430005; Phone: +79272759306; e-mail:andreeva_77@list.ru, <http://orcid.org/0000-0002-2207-7039>

Olga V. Epifanova, assistant, Penza Institute for Postgraduate Medical Education - branch of the Russian Medical Academy of Postgraduate Education of the Ministry of Health of Russia; Address: 7 Stasova Street, Penza, Russian Federation 440060; Phone: +79610996885; e-mail: epifanova.vrt@gmail.com, <http://orcid.org/0000-0002-3961-809X>

Дата поступления 07.04.2022

Дата рецензирования 19.10.2022

Принята к печати 03.11.2022

Received 07 April 2022

Revision Received 19 October 2022

Accepted 03 November 2022