



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **37097** (13) **U**
(51) МПК (2006)
G01N 33/48
G01N 33/554

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ РИЗИКУ МАЛІГНІЗАЦІЇ ІНВЕРТОВАНОЇ ПАПІЛОМИ ШИЙКИ МАТКИ

1

(21) u200810857

(22) 03.09.2008

(24) 10.11.2008

(46) 10.11.2008, Бюл.№ 21, 2008 р.

(72) КАМУЗ НАТАЛІЯ ЮРІЇВНА, UA, ЛАКАТОШ
ВОЛОДИМИР ПАВЛОВИЧ, UA, ЛАЗАРЕНКО ЛЮ-
ДМИЛА МИКОЛАЇВНА, UA, ПРОЩЕНКО ОЛЬГА
МИКОЛАЇВНА, UA, АНТОНЮК МАР'ЯНА ІВАНІВ-
НА, UA

(73) НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ О.О. БОГОМОЛЬЦЯ, UA

(57) Спосіб визначення ризику малігнізації інвер-
тованої папіломи шийки матки, що передбачає
морфологічні дослідження біопатів, який **відріз-**

2

няється тим, що додатково в цервікальних біопта-
тах імуноферментним методом визначають рівень
онкобілків Е6-Е7, одночасно в сироватці крові ви-
значають показники, які характеризують клітинну
ланку імунітету (кількість CD3+/HLA/DR+, імуноре-
гулятор індексу CD4/CD8, активність фагоцитів),
вміст інтерферону, спонтанну та індуквану проду-
кцію інтерферону 1 та 2 типу та фактор некрозу
пухлини, і при наявності онкобілка Е7 в цервікаль-
них пробах, зниженні концентрації імуноглобулінів
класу G, продукції інтерферону 1 та 2 типу, факто-
рів некрозу пухлини прогнозують ризик малігнізації
інвертованої папіломи шийки матки.

Спосіб належить до медицини, а саме гінеко-
логії, і може бути використаний для визначення
ризiku малігнізації ІПШМ (інвертованої папіломи
шийки матки) у хворих на ІПШМ.

Злоякісні пухлини жіночої репродуктивної сис-
теми є найбільш поширеними в структурі онкологі-
чної захворюваності (37%) і залишаються невір-
шеною проблемою людства, оскільки в ній
сконцентровані медичні, соціальні, біологічні, де-
мографічні, екологічні та інші питання, пов'язані з
ростом захворюваності й смертності. Проте, така
тенденція характерна лише для країн СНД, Схід-
ної Європи. Країнам же Західної Європи вдалося
досягти значного зниження у показниках онкологі-
чної захворюваності і смертності, в тому числі ста-
тевої сфери, що свідчить про достатній рівень
профілактичних програм, а також високий рівень
діагностично-лікувального процесу. Причетність
до розвитку перед раку та раку ШМ вірусу папіло-
ми людини вимагає від практичного лікаря засто-
сування певних діагностичних підходів у його ви-
явленні. Однак слід пам'ятати, що лише однієї
вірусної інфекції недостатньо для розвитку злоякіс-
них пухлин у людини. Цей процес вимагає довгі
латентні періоди, що проходили після первинної
інфекції до розвитку ЦІН та РШМ, при цьому лише
у невеликій кількості інфікованих індивідумів з
рештою розвивається відповідний тип РШМ [1].
Сьогодні вважається, що для активації ВПЛ пови-
нна існувати ціла система зв'язків, побудованих на

взаємодії факторів зовнішнього середовища і ха-
зяїна. Для визначення ризику малігнізації ІПШМ
рекомендується дослідження стану імунореактив-
ності організму, насамперед визначення показни-
ків, які характеризують клітинну ланку імунітету, а
також продукції інтерферонів (ІФН), яким, як відо-
мо притаманна широка контрольно-регуляторна
функція, що дає підставу віднести їх до поліфунк-
ціональних біорегуляторів широкого спектру дії та
до агентів, які регулюють гомеостаз [2].

Дані літературних джерел свідчать про ключо-
ву роль клітинного імунітету у контролі над перебі-
гом ПВІ та асоційованих з нею передпухлинних і
пухлинних захворювань ШМ [3]. Результати про-
ведених нами досліджень фенотипового складу Т-
лімфоцитів та їх окремих субпопуляцій у перифе-
рійній крові за допомогою методу лазерної пото-
чної цитометрії з використанням моноклональних
антитіл до CD-антигенів показали, що найхаракте-
рнішим порушенням показників клітинного імуні-
тету у хворих на інвертовану папілому є суттєве
зменшення кількості Т-лімфоцитів з ознаками ак-
тивації (CD3+/HLA-DR+ клітин) відносно показників
як для клінічно-здорових осіб (контроль), так і для
хворих з легким ступенем перебігу ПВІ ШМ (доб-
роякісними процесами ШМ). Разом з тим перероз-
поділ CD4+ та CD8+ клітин у хворих на інвертова-
ну папілому викликав зменшення імуноре-
гуляторного індексу CD4/CD8, згідно якого оці-
нюють силу імунної відповіді, тоді як при доброякіс-

(19) **UA** (11) **37097** (13) **U**

сних процесах ШМ цей показник вірогідно не змінювався. Тобто перебіг патологічного процесу супроводжувався порушенням нормального співвідношення між імунорегуляторними субпопуляціями CD4+ та CD8+ Т-клітин за рахунок зниження хелперної активності, що підвищує чутливість до розвитку пухлин.

Водночас встановлено дисфункцію клітин фагоцитарної системи: зменшення інтенсивності поглинальної функції нейтрофілів на тлі гіперактивності киснезалежної бактерицидності у поєднанні зі зменшенням їх функціонального резерву, що з одного боку може сприяти інфікуванню хворих іншими патогенами, які передаються статевим шляхом, з іншого - призвести до формування малоефективної специфічної клітинної та гуморальної імунної відповіді відносно папіломавірусів [4]. У гуморальній ланці імунітету спостерігали зниження концентрації імуноглобулінів класу G у сироватці крові на тлі незмінного вмісту IgA та IgM. Однак, слід зазначити, що такі зміни характерні і для більш легкого перебігу патологічного процесу.

Встановлено, що в основі порушення клітинної ланки імунітету у хворих на інвертовану папілому лежить зниження продукції цілої низки імунорегуляторних цитокінів, насамперед ІФН I та II типу, а також фактора некрозу пухлин- α (ФНП α). Вміст циркулюючого сироваткового ІФН не змінювався. Фоновою виявилась і спонтанна продукція ІФН клітинами периферійної крові, що свідчить про низьку інтерфероніндукуючу активність папіломавірусів. Однак результати аналізу індивідуальних імунограм хворих виявили порушення продукції ІФН- γ та α клітинами периферійної крові *in vitro* у відповідь на адекватну індукцію практично в усіх хворих (100% випадків), тоді як при доброякісних процесах ШМ - відповідно у 54,5 та 10% випадків. Тобто ступінь пригнічення продукції ІФН- γ та α корелював з тяжкістю перебігу захворювання. Супресія γ -інтерфероногенезу є найвиразнішою, якщо імунорегуляторний індекс CD4/CD8 був нижчим за одиницю, а кількість CD3+/HLA-DR+ клітин зменшувалась більш ніж удвічі. Встановлено пряму кореляційну залежність між імунорегуляторним індексом CD4/CD8 та титрами ІФН- γ ($R=0,70$; $P<0,05$). Виявлено пряму кореляційну залежність між титрами ІФН- α та абсолютною кількістю CD19+ В-лімфоцитів ($R=0,57$; $P<0,05$), а також титрами ІФН- γ та абсолютною кількістю CD3+/HLA-DR+ клітин ($R=0,59$; $P<0,05$). Отримані дані дають підставу стверджувати про наявність прямого кореляційного зв'язку між зміною показників імунологічної реактивності та інтерфероногенезом: зменшення кількості лімфоцитів у периферійній крові та їх функціональної активності може призвести до пригнічення продукції ІФН- α та γ . З іншого боку доведено, що зниження продукції інтерферонів призводило до пригнічення клітинного імунітету, який відіграє ключову роль у контролі над перебігом ПВІ та ростом пухлин. Разом з тим перебіг інвертованої папіломи призводив до гіперпродукції ФНП α клітинами периферійної крові на тлі одночасного виснаження їх функціональних можливостей, що свідчить про порушення у сис-

темі ФНП α , який є коstimулятором IL-2 залежної продукції ІФН- γ лейкоцитами периферійної крові людини [5].

Отже, визначення показників, які характеризують клітинну ланку імунітету (кількості CD3+/HLA-DR+, імунорегуляторного індексу CD4/CD8, активності фагоцитів), а також показників інтерферонового статусу (вмісту ІФН у сироватці крові, спонтанної та індукованої продукції ІФН I та II типу клітинами периферійної крові *in vitro*) і продукції ФНП α має важливе прогностичне значення для визначення ризику малігнізації інвертованої папіломи.

Лабораторна діагностика папіломавірусної інфекції, насамперед спрямована на раннє виявлення носійства вірусу, і є важливим інструментом, який дозволяє контролювати розповсюдженість інфекції і своєчасно призначати комплексні лікувально-профілактичні заходи, які упереджують розвиток онкологічних ускладнень.

Діагностика патології ШМ на Україні передбачає два етапи:

1 Етап - цитологічний скринінг;

2 Етап - кольпоскопія та прицільна біопсія з подальшим морфологічним дослідженням.

Цитологічний метод до теперішнього часу широко застосовується в багатьох країнах світу, де прийняті державні програми по скринінгу населення, спрямовані насамперед на раннє виявлення неопластичного процесу. Інформативність метода досягає від 60 до 96%. Однак метод не дає можливості остаточно (кінцево) встановити діагноз, не дає можливості встановити локалізацію процесу. Нажаль, наукові дискусії на національному рівні в Україні із залученням експертів ВООЗ щодо заміни застарілих неефективних підходів до методики фарбування матеріалу із залученням високоефективних технологій, не знайшло свого відображення на практиці, що також впливає на зниження діагностичної цінності скринінгу. Відомий основний метод діагностики ІПШМ - морфологічний, який визначає не тільки характер патології, але і ризик малігнізації [6]. Основним недоліком морфологічного методу є його інвазивність, високий ступінь суб'єктивності та трудоемкості аналізу. Визначення морфологічних критеріїв ВПЛ та критеріїв малігнізації потребує досвіду та високої кваліфікації патоморфолога. В основу корисної моделі поставлена задача підвищення ефективності визначення ризику малігнізації інвертованих папілом ШМ шляхом морфологічного дослідження біопатів ШМ та паралельного визначення в цервікальних біоптатах онкобілка Е6-Е7 та визначення в крові показників, які характеризують клітинну ланку імунітету, а також показників інтерферонового статусу і продукції ФНП α .

Поставлена задача вирішується тим, що у відомому способі який передбачає морфологічне дослідження біопатів, згідно корисної моделі, додатково в цервікальних біоптатах імуноферментним методом визначають рівень онкобілків Е6-Е7, одночасно в сироватці крові визначають показники які характеризують клітинну ланку імунітету (кількість CD3+/HLA-DR+, імунорегулятор індексу CD4/CD8, активність фагоцитів), вміст інтерферо-

ну, спонтанну та індуковану продукцію інтерферону 1 та 2 типу та фактор некрозу пухлини і при наявності онкобілка E7 в цервікальних пробах, знижені концентрації імуноглобулінів класу G, продукції інтерферону 1 та 2 типу, факторів некрозу пухлини прогнозують ризик малігнізації інвертованої папіломи шийки матки.

Запропонований спосіб виконують наступним чином: після проведеного комплексного клініко-лабораторного обстеження хворих, які поступили до стаціонару в плановому порядку та визначення патологічних змін в імунологічних та в загальних аналізах крові та сечі, біохімічних аналізах крові проводять кольпоскопію шийки матки та цитологічні дослідження шийки матки. Далі проводять біопсію ділянки тканини інвертованої папіломи шийки матки з послідовним морфологічним дослідженням біоптатів. Паралельно імуноферментним методом в цервікальних біоптатах визначають онкобілки E6-E7, а в сироватці крові визначають рівень CD3+/HLA/DR+, імунорегуляторного індексу CD4/CD8, активність фагоцитів, а також показники інтерферонового статусу (вміст ІФН у сироватці крові, спонтанну та індуковану продукцію ІФН I та II типу клітинами периферійної крові *in vitro*), і продукцію ФНП α .

Наявність онкобілка E7 в цервікальних пробах може розглядатися як однозначне свідчення початку процесу малігнізації епітеліальних клітин, які містять інтегровану копію генома ВПЛ. Визначення рівня онкобілка E7 в цервікальних пробах дозволяє визначити стадію вірусної інфекції, а саме підвищений синтез білка E7 вказує на інтегративну фазу інфекційного процесу є потужним імуносупресивним агентом, знижуючи ефективність імунокоригуючих методів лікування і є небезпечним прогностичним фактором малігнізації.

Наводимо приклади застосування запропонованого способу.

Приклад 1. Хвора А іст. хв. №642831, 1966т р.н. поступила в гінекологічне відділення в плановому порядку з приводу патології шийки матки. За результатами загального клінічного обстеження у хворої не виявлено змін загальних аналізів крові та сечі, кольпоскопічно: шийка матки деформована в зоні I, II, частково III ектопія циліндричного епітелію по периферії доброякісна зона трансформації. В зоні I в 17-00 має місце потовщення епітелію, яке різко біліє після застосування оцтової проби. Взята цитологія. Цитологія цервікального мазка: койлоцитарна атипія, двоядерні клітини, дискератоцити.

Під контролем кольпоскопа проводяться біопсія ділянки потовщеного епітелію в зоні I на 17-00 для морфологічного дослідження. Паралельно імуноферментним методом в цервікальній пробі визначають онкобілки E6-E7, а в сироватці крові показники імунітету.

Морфологічний діагноз: інвертована папілома шийки матки з явищами дисплазії.

Імуноферментний діагноз: виявлено онкобілок E7.

Дані імунограми: має місце зменшення кількості Т-лімфоцитів з ознаками активації (CD3+/HLA-DR+ клітин), зменшення імунорегуляторного індек-

су CD4/CD8, спостерігається зменшення інтенсивності поглинальної функції нейтрофілів на тлі гіперактивації киснезалежної бактеріцидності у поєднанні зі зменшенням їх функціонального резерву, у гуморальній ланці імунітету спостерігали зниження концентрації імуноглобулінів класу G у сироватці крові на тлі незміненого вмісту IgA та IgM, а також зниження продукції імунорегуляторних цитокінів: ІФН I та II типу, а також ФНП α .

Клінічний діагноз: інвертована папілома шийки матки з явищами дисплазії. Високий ступінь ризику малігнізації.

Приклад 2. Хвора Б., історія хвороби №243618, 1968р.н., поступила в гінекологічне відділення з приводу патології шийки матки. За результатами загального клінічного обстеження у хворої не виявлено змін в крові і сечі. Кольпоскопічно: шийка матки циліндричної форми, передня губа дещо деформована. В зоні I ектопія циліндричного епітелію. В зоні I на 11-00 має місце потовщення епітелію, яке після застосування оцтової кислоти нагадує симптом "лимонної шкіри". Взята цитологія. Цитологічне дослідження: поодинокі койлоцити, дискератоцити, двоядерні клітини, циліндричний епітелій.

Під контролем кольпоскопа взята біопсія ділянки шийки матки на 11-00 в зоні I.

Паралельно імуноферментним методом в цервікальній пробі визначають онкобілки E6-E7, а в сироватці крові вивчалися показники імунітету: кількість CD3+/HLA/DR+, імунорегуляторний індекс CD4/CD8, активність фагоцитів, а також показники інтерферонового статусу (вміст ІФН у сироватці крові, спонтанна та індукована продукція ІФН I та II типу клітинами периферійної крові *in vitro* і продукція ФНП α).

Патоморфологічний висновок: інвертована папілома шийки матки.

Імуноферментний аналіз: онкобілків E6-E7 не виявлено.

Дані імунології: показники імунограми в межах норми.

Клінічний діагноз: інвертована папілома шийки матки. Низький ступінь ризику малігнізації.

Таким чином, спосіб визначення ризику малігнізації інвертованої папіломи шийки матки дає можливість більш ефективніше визначати процеси малігнізації, а лікувально-діагностичними засобами адекватно реагувати на ці процеси, що сприятиме зменшенню частоти малігнізації. ІПШМ. Ефективність способу 75-81%.

Джерела інформації:

1. Киселев В.И. Вирусы папилломы человека в развитии рака шейки матки: Монография. -М: ДмитрейдГрафик Групп, 2004. -184с.

2. Ершов Ф.И. Система интерферона в норме и при патологии: Монография. -М: Медицина, 1996. -240с.

3. Stern P.L. Immunity to human papillomavirus-associated cervical neoplasia //Advanc. Canc. Res. - 1996. -69. -P.175-211.

4. Возианов А.Ф., Бутенко А.К., Зак К.П. Цитокнины. Биологические и противоопухолевые свойства: Монография - К.: Наукова думка, 1998. -313с.

5. Baccala R., Kono D.H., Theofilopoulos A.N. Interferons as pathogenic effectors in autoimmunity //Immunol. Rev. -2005. -204. -P.9-26.

6. Башмакова М.А., Савичева А.М. Папилломавирусная инфекция: Монография -Н. Новгород: НГМА, 2002. -21с.