

УДК: 616.98; 578.827-1]-097.07

DOI: 10.14427/jipai.2015.3.8

Иммунологические критерии прогноза течения цервикальной патологии, ассоциированной с папилломавирусной инфекцией

О.С. Абрамовских, Л.Ф. Телешева, В.Ф. Долгушина

Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Челябинск, Россия

Immunological criteria for prognosis of cervical lesions, associated with HPV infection

O.S. Abramovskikh, L.F. Telesheva, V.F. Dolgushina

South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russia

Аннотация

Важную роль в генезе малигнизации играет иммунная система. Показано, что характер изменений компартаментов иммунной системы при цервикальной патологии, ассоциированной с папилломавирусной инфекцией имеет как однонаправленные тенденции, так и отличительные характеристики, что позволило с помощью метода бинарной логистической регрессии определить иммунологические критерии прогноза течения заболеваний шейки матки, ассоциированных с папилломавирусной инфекцией.

Ключевые слова

Вирус папилломы человека, цервикальные интраэпителиальные неоплазии, иммунитет

Введение

На протяжении многих лет единственной реальной профилактикой рака шейки матки (РШМ) является цервикальный скрининг, направленный на своевременное выявление и лечение предраковых заболеваний [1, 2]. Несмотря на то, что доказательство роли вируса папилломы человека (ВПЧ) в этиологии цервикальных неоплазий привело к пересмотру некоторых позиций в отношении стратегии профилактики ВПЧ-ассоциированных заболеваний, проблема РШМ еще далека от своего решения.

РШМ является поздним осложнением папилломавирусной инфекции (ПВИ), и возникает на

Summary

An important role in the genesis of malignancy plays the immune system. It is shown that the origin of the changes in the compartments of the immune system in cervical pathology, associated with HPV infection has both unidirectional trends and distinctive characteristics that allow by the method of binary logistic regression to determine the immunological criteria for prognosis of cervical diseases, associated with HPV infection.

Keywords

Human papillomavirus infection, cervical intraepithelial neoplasia, immunity.

фоне цепи взаимосвязанных процессов, в большинстве случаев протекающих в течение многих лет [3, 4, 5]. При постоянном носительстве ВПЧ высокого риска (ВПЧ ВР) сначала возникает легкая, затем умеренная и, наконец, тяжелая дисплазия шейки матки, которая и заканчивается развитием инвазивного рака [6]. Однако доказанный на сегодняшний день факт обратимости опухолевого процесса в цервикальном эпителии свидетельствует о возможности предотвращения прогрессирования заболевания при условии своевременного обнаружения предраковых заболеваний. В связи с чем, важное клиническое значение имеют исследования, направленные

на поиск ранних прогностических маркеров, имеющих прямое или опосредованное отношение к реализации онкогенного потенциала ВПЧ и, как следствие, способствующих прогрессии заболевания.

Одной из основных причин клинической манифестации ВПЧ-инфекции, её рецидивирующего и персистирующего течения является наличие дисбаланса в иммунной системе [7, 8, 9, 10], такие корреляции прослеживаются и при другой генитальной и цервикальной инфекционно-обусловленной патологии [11, 12, 13, 14]. Учитывая вышесказанное, мы предположили, что иммунологические показатели цервикальной слизи и периферической крови могут служить маркерами прогрессии цервикальных неоплазий, ассоциированных с ПВИ.

Цель исследования - установить критерии прогноза течения цервикальных интраэпителиальных неоплазий (ЦИН), ассоциированных с папилломавирусной инфекцией, используя иммунологические показатели цервикальной слизи и периферической крови.

Материалы и методы

Проведено комплексное иммунологическое обследование 156 женщин с патологией шейки матки и наличием ВПЧ ВР в цервикальном канале. В соответствии с целью исследования были сформированы 4 группы больных: 1 группа - 40 пациенток с хроническим цервицитом; 2 группа - 40 больных с ЦИН I; 3 группа - 38 больных с ЦИН II; 4 группа - 38 больных с ЦИН III. Диагноз был выставлен врачами акушерами-гинекологами на основании анамнестических, клинических, кольпоскопических и гистологических методов исследования. Исследуемые группы больных были сопоставимы по возрасту, средний возраст - $27,2 \pm 1,84$ лет. Контрольную группу составили 40 женщин без клинико-морфологических изменений на шейке матки и другой гинекологической патологии с наличием ВПЧ ВР. Средний возраст - $24,05 \pm 1,11$ лет.

В качестве метода выявления ДНК ВПЧ ВР (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 типы) в соскобах эпителия цервикального канала использовалась ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени при помощи диагностического набора «Амплиценс ВПЧ ВКР - СКРИН-ТИТР FRT» производства ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора (г. Москва) на приборе «Rotor-Gene» 6000 («Corbett Research», Австралия).

Для оценки иммунологических показателей проводили изучение функциональной активности нейтрофилов (фагоцитарная и лизосомальная активности, кислородзависимый метаболизм и функциональный резерв нейтрофилов в НСТ-тесте), уровней иммуноглобулинов А, М, G (Ig A, M, G), секреторного IgA (sIgA) и уровни цитокинов (ИНФ- α , ИНФ- γ , ИЛ-1 β , ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-8, ИЛ-10, ФНО- α) в цервикальной слизи и периферической крови, а также содержание субпопуляций CD3+19-, CD3+CD4+, CD3+8+, CD3+16+56+, CD3-16+56+, CD3-CD19+, CD3+CD25+, CD3+HLA-DR+ лимфоцитов в периферической крови.

Концентрации Ig A, M, G, sIgA и уровни цитокинов (ИНФ- α , ИНФ- γ , ИЛ-1 β , ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-8, ИЛ-10, ФНО- α) в цервикальной слизи и периферической крови определяли методом ИФА с помощью соответствующих тест-систем производства ООО «Хема» (г. Москва) и ООО «Цитокин» (г. Санкт-Петербург) на автоматическом ИФА-анализаторе Personal LAB (Италия). Содержание субпопуляций CD3+19-, CD3+CD4+, CD3+8+, CD3+16+56+, CD3-16+56+, CD3-CD19+, CD3+CD25+, CD3+HLA-DR+ лимфоцитов в периферической крови определяли методом проточной цитометрии с использованием соответствующих реагентов линии IQTest производства Beckman Coulter (США) на лазерных проточных цитометрах Epics™ XLTM и Cytomics FC (Beckman Coulter, США).

Полученные результаты исследования были обработаны общепринятыми методами вариационной статистики и представлены в виде средней арифметической и ее стандартной ошибки ($M \pm m$). При анализе количественных признаков оценка достоверности различий между группами производилась с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Для оценки диагностической эффективности различных показателей системного и местного иммунитета использовали бинарную логистическую регрессию. Во всех случаях различия, связи и зависимости считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Расчеты и графические построения выполнены в пакетах ROCKIT (v. 1.0.1 beta 2), KyPlot (v.2.0 beta 15) и «Statistica 6.0».

Результаты исследования

Проведенное комплексное иммунологическое исследование показало, что характер изменений показателей как местного, так и системного иммунитета при хроническом цервиците и ЦИН

I, II, III, ассоциированными с ПВИ, имеет как однонаправленные тенденции, которые выразились в повышении активности лизосомальных ферментов нейтрофилов и уровня ИФН- γ цервикальной слизи, так и отличительные характеристики, характеризующиеся дисбалансом всех звеньев иммунной системы, от легкого к тяжелому, осложненному течению заболевания. У больных с хроническим цервицитом, ассоциированным с ПВИ, по сравнению с женщинами без патологии шейки матки отмечалось повышение активности фагоцитоза нейтрофилов и уровня ИЛ-1 β в цервикальной слизи, повышение активности фагоцитоза нейтрофилов, снижение показателей спонтанного НСТ-теста и концентрации Ig G в периферической крови. У больных с ЦИН I, ассоциированной с ПВИ, относительно пациенток с хроническим цервицитом изменения иммунологических показателей характеризовались снижением активности и интенсивности фагоцитоза нейтрофилов, повышением sIg A, падением уровней ИЛ-2 и ИЛ-8 в цервикальной слизи, снижением содержания лимфоцитов и количества CD3-19+ клеток, повышением активности спонтанного НСТ-теста нейтрофилов при увеличении их количества и росте концентрации Ig G, падением уровней ИЛ-1 β , ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-8, ИЛ-10, ФНО- α в периферической крови. У больных с ЦИН II, ассоциированной с ПВИ, по сравнению с изучаемыми показателями больных с ЦИН I определялось повышение показателей спонтанной НСТ-редуцирующей активности нейтрофилов, концентрации IgG и уровней ИФН- α , ИЛ-2 в цервикальной слизи, снижение соотношения CD4+/CD8+ при повышенном содержании CD3+CD8+ клеток и лимфоцитов, снижение показателей индуцированного НСТ-теста, фагоцитарного числа нейтрофилов, рост уровней РАИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-8, ИЛ-10, ФНО- α в периферической крови. У больных с ЦИН III, ассоциированной с ПВИ, относительно пациенток с ЦИН II регистрировалось снижение показателей спонтанной, индуцированной НСТ-редуцирующей активности и количества жизнеспособных нейтрофилов, уровней ИФН- α , ИЛ-4, ФНО- α в системе локальной защиты, снижение числа лимфоцитов, несущих CD3+CD16+56+ и CD3+HLA-DR+ рецепторы, лизосомальной активности нейтрофилов, уровней ИФН- γ , ИЛ-2, ИЛ-10 и ФНО- α , повышение показателей индуцированного НСТ-теста, интенсивности фагоцитоза и фагоцитарного числа нейтрофилов, концентрации Ig A, M, G, уровня РАИЛ-1 в периферической крови.

Учитывая полученные данные, мы предположили, что выявленные в ходе исследования иммунологические показатели цервикальной слизи и периферической крови, по которым различались исследуемые нами группы больных, могут служить прогностическими маркерами прогрессии цервикальных неоплазий, ассоциированных с ПВИ. С этой целью нами был применен метод бинарной логистической регрессии.

Бинарная логистическая регрессия – это разновидность множественной регрессии, общее назначение которой состоит в анализе связи между несколькими независимыми переменными (называемыми также регрессорами или предикторами) и зависимой переменной. С помощью логистической регрессии можно оценить вероятность того, что событие наступит для конкретного испытуемого (больной/здоровый, риск/отсутствие риска).

Для определения объективной ценности любого бинарного классификатора используются такие понятия как чувствительность и специфичность модели. Чувствительность – это доля истинно положительных случаев, специфичность – доля истинно отрицательных случаев, которые были правильно идентифицированы моделью. В нашей работе под чувствительностью подразумевается доля правильно классифицированных пациенток с прогрессией заболевания, под специфичностью – доля правильно классифицированных пациенток без прогрессии заболевания.

Несомненным преимуществом логистической регрессии является возможность оценки качества модели, которое определяется таким показателем, как площадь под ROC-кривой (Receiver Operator Characteristic). Чем ближе показатель площади под ROC-кривой к 1, тем лучшей прогностической силой обладает модель, так как в такой модели доля истинно положительных случаев будет максимально приближаться к 100% или 1.0 (идеальная чувствительность), а доля ложноположительных примеров – к 0.0. Так, если показатель площади под ROC-кривой находится в интервале 0,9–1,0 – это отличное качество, 0,8–0,9 – очень хорошее качество, 0,7–0,8 – хорошее качество модели.

Предварительные расчёты показали, что при увеличении числа вводимых в модель показателей, их статистическая значимость резко снижалась. Поэтому было принято решение ограничиться лишь такими моделями, в которых при общей статистической значимости сохранялась, по крайней мере, тенденция к влиянию отдельных предикторов ($P \leq 0,05$).

Для всех четырех интересующих переходов одного заболевания в другое полученные модели содержали по два показателя, для каждого из которых приводится коэффициент регрессии. Для прогноза развития ЦИН I у женщин с ПВИ без клинико-морфологических изменений на шейке матки такими показателями стали: количество CD3+4+ (x10⁹/л) и лизосомальная активность нейтрофилов (у.е.) крови. Полученная модель в 100% случаев прогнозирует развитие ЦИН I у женщин с ПВИ без клинико-морфологических изменений на шейке матки.

Для прогноза развития ЦИН I у пациенток с хроническим цервицитом показателями, вошедшими в модель, стали активность фагоцитоза нейтрофилов (%) слизи и количество CD3-19+ (x10⁹/л) крови. Полученная модель в 80 % случаев прогнозирует развитие ЦИН I у пациенток с хроническим цервицитом.

Для прогноза развития ЦИН II у пациенток с ЦИН I в модель вошли следующие по-

казатели: количество CD3+8+ (%) и уровень ФНО-α (пг/мл) крови. Полученная модель в 85,7% случаев прогнозирует развитие ЦИН II у больных с ЦИН I.

Для прогноза развития ЦИН III у пациенток с ЦИН II показателями, вошедшими в модель, стали уровень ИФН-α (пг/мл) слизи и ФНО-α (пг/мл) крови. Полученная модель в 100% случаев прогнозирует развитие ЦИН III у больных с ЦИН II.

Параметры уравнений логистической регрессии с оценкой статистической значимости и диагностической эффективности полученных моделей представлены в табл. 1.

Модель логистической регрессии имеет вид:

$$\text{Логит}(P) = \text{Константа} + a_1X_1 + a_2X_2 + \dots + a_nX_n \quad (1)$$

где P – вероятность отнесения пациента к группе риска, a_i – коэффициенты регрессии, X_i – значения вошедших в модель показателей.

Таблица 1. Параметры и характеристики логистической регрессии для прогноза прогрессии цервикальных интраэпителиальных неоплазий, ассоциированных с папилломавирусной инфекцией

Показатели	Коэффициент регрессии ± станд. ошибка	Отношение шансов (95% ДИ)	Оценка значимости P
ПВИ без клинико-морфологических изменений на шейке матки – ЦИН I			
Лизосомальная активность нейтрофилов крови, у.е.	0,05835 ± 0,02961	1,06 (1,00 – 1,12)	0,049
CD3+4+, ×10 ⁹ / л	-0,01062 ± 0,006472	0,99 (0,98 – 1,00)	0,100
Константа	-6,1852		
Модель полностью: $\chi^2_{[2]} = 18,76$; P<0,0001; Чувствительность - 100%, Специфичность - 90,91 %; Площадь под ROC-кривой - 0,982 ± 0,0315.			
Хронический цервицит - ЦИН I			
Активность фагоцитоза нейтрофилов слизи, %	-0,2973 ± 0,1610	0,74 (0,54 – 1,02)	0,065
CD3-19+, ×10 ⁹ /л	-0,03757 ± 0,02116	0,96 (0,92 – 1,00)	0,076
Константа	21,8200		
Модель полностью: $\chi^2_{[2]} = 19,22$; P=0,0001; Чувствительность - 80,0 %, Специфичность - 83,33%; Площадь под ROC-кривой - 0,933 ± 0,0597			
ЦИН I - ЦИН II			
CD3+8+, %	0,3798 ± 0,2203	1,46 (0,95 – 2,25)	0,085
ФНО-α крови, пг/мл	0,6303 ± 0,9792	1,88 (0,26 – 12,8)	0,520
Константа	-9,646		
Модель полностью: $\chi^2_{[2]} = 15,71$; P=0,0004; Чувствительность – 85,7%, Специфичность – 100%; Площадь под ROC-кривой - 0,905 ± 0,061.			
ЦИН II - ЦИН III			
ИФН –α слизи, пг/мл	-0,0007052 ± 0,000416	0,999 (0,9985 – 1,00)	0,090
ФНО-α крови, пг/мл	-3,4158 ± 1,3393	0,033 (0,002 – 0,45)	0,011
Константа	6,3552		
Модель полностью: $\chi^2_{[2]} = 20,69$; P<0,0001; Чувствительность - 100%, Специфичность - 87,5%; Площадь под ROC-кривой - 0,929 ± 0,0368.			

Зная коэффициенты регрессии, рассчитывается Логит(P) и далее – само значение P:

$$P = \left(\frac{1}{1 + e^{-\text{Логит}(P)}} \right) \quad (2)$$

где e - константа, равная 2,718281828.

Применение указанных формул подразумевает формальную подстановку значений иммунологических показателей, полученных при обследовании конкретной пациентки, и вычисление значения вероятности отнесения ее к группе риска прогрессии заболевания. Если $P < 0,5$ пациентку следует причислить к группе отсутствия риска, если $P \geq 0,5$ пациентку следует отнести к группе наличия риска прогрессии заболевания.

Приведем пример использования данной модели в клинической практике:

Пациентка М., 32 года, диагноз: ЦИН II, ВПЧ 16, 45 типа. Результаты иммунологического обследования: ФНО- α крови - 1,352 пг/мл, ИФН- α слизи - 489,99 пг/мл.

Из данных табл. 1 следует, что в модели перехода пациентки из группы ЦИН II в группу ЦИН III коэффициенты регрессии и константа равны: для показателя ФНО- α крови (пг/мл) параметр $a = -3,4158$, для ИФН- α слизи (пг/мл) параметр $a = -0,0007052$, константа = 6,3552.

Следовательно, модель логистической регрессии будет иметь следующий вид:

$$\text{Логит}(P) = 6,3552 + (-3,4158) \times \text{ФНО-}\alpha \text{ крови} + (-0,0007052) \times \text{ИФН-}\alpha \text{ слизи}$$

Расчёт по модели:

$$\text{Логит}(P) = 6,3552 + (-3,4158) \times 1,352 + (-0,0007052) \times 489,99 = 1,391497452$$

$$P = \left(\frac{1}{1 + 2,718281828^{-1,391497452}} \right) = 0,801$$

Литература

1. Stanley MA, Pett MR, Coleman N. HPV: from infection to cancer. *Biochem Soc Trans.* 2007; 35(6): 1456-60.
2. Караулов А.В., Блинов Д.В. Профилактика и лечение заболеваний, вызываемых вирусом папилломы человека. *Вакцинация.* 2011; 1: 37-42.
3. Bosch FX, de Sanjose S. The epidemiology of human papillomavirus infections and cervical cancer. *Dis Markers.* 2007; 23(4): 213-27.
4. Zur Hausen H. Papillomaviruses in the causation of human cancers – a brief historical account. *Virology.* 2009; 384(2): 260-5.

Поскольку $P > 0,5$, то пациентку М. с диагнозом ЦИН II, ассоциированной с ПВИ, следует причислить к группе риска по развитию ЦИН III.

На разработанную методику прогноза прогрессии цервикальных интраэпителиальных неоплазий, ассоциированных с папилломавирусной инфекцией, получен Патент 2520746 РФ [15].

Заключение

В результате проведенного исследования при помощи бинарной логистической регрессии определены иммунологические маркеры, позволяющие с высокой точностью определить риск прогрессии цервикальных интраэпителиальных неоплазий I, II, III степени, ассоциированных с папилломавирусной инфекцией. Для выбора рациональной тактики ведения женщин с папилломавирусной инфекцией целесообразно проведение иммунологического обследования, включающего следующие показатели: в цервикальной слизи - активность фагоцитоза нейтрофилов (%) и уровень ИФН- α (пг/мл); в периферической крови - лизосомальная активность нейтрофилов (у.е.), количество CD3+4+ ($\times 10^9$ /л), CD3+8+ (%), CD3-19+ ($\times 10^9$ /л) и уровень ФНО- α (пг/мл). С учетом полученных результатов иммунологического обследования по предложенным математическим моделям возможно формирование группы пациенток высокого риска развития цервикальных интраэпителиальных неоплазий I, II, III.

Установленные в результате проведенных исследований, иммунологические маркеры позволяют дифференцированно подходить к тактике ведения женщин с ВПЧ-ассоциированной патологией шейки матки, индивидуально прогнозировать развитие цервикальных неоплазий и повысить эффективность лечебных мероприятий, что своевременно будет способствовать ранней профилактике РШМ.

5. Doorbar J, Egawa N, Griffin H, Kranjec C, Murakami I. Human papillomavirus molecular biology and disease association. *Rev Med Virol.* 2015; 25(Suppl.1): 2-23. doi: 10.1002/rmv.1822.

6. Инфекции, передаваемые половым путем. Клиника, диагностика, лечение. Под ред. В.А. Молочкова, О.Л. Иванова, В.В. Чеботарева. М., 2006: 124-131.

7. Долгушина В.Ф., Долгушин И.И., Телешева Л.Ф. Местная противоионфекционная защита репродуктивного тракта женщин различного возраста. *Журн. микробиол., эпидемиол. иммунобиол.* 2000; 2: 86-9.

8. Frazer I. Correlating immunity with protection for HPV infection. *J Infect.* 2007; 11(2): 10-6.
9. Stanley MA. Immune responses to human papilloma viruses. *Indian J Med Res.* 2009; 130(3): 266-76.
10. Абрамовских О.С., Телешева Л.Ф., Беренда М.А., Ахматова А.Н. Особенности местного иммунитета цервикального канала у женщин с доброкачественными заболеваниями шейки матки, ассоциированными с одним и более типами ВПЧ ВКР. *Мед. иммунол.* 2009; 11(4-5): 400.
11. Абрамовских О.С., Телешева Л.Ф., Летяева О.И. и соавт. Иммунологические аспекты патогенеза папилломавирусной инфекции репродуктивного тракта женщин. *Иммунопатология, аллергол., инфектол.* 2012; 2: 95-101.
12. Телешева Л.Ф., Долгушина В.Ф., Абрамовских О.С. и соавт. Цитокиновый статус цервикальной слизи у женщин с транзитным и персистирующим течением папиллома-вирусной инфекции. *Журн. микробиол. эпидемиол. иммунобиол.* 2012; 4: 118-21.
13. Сергеев А.Ю., Сергеев Ю.В. Факторы резистентности и иммунитет при грибковых инфекциях кожи и слизистых оболочек. *Иммунопатология, аллергология, инфектология,* 2004; 1: 6-14.
14. Новиков В.В., Евсегнеева И.В., Караулов А.В., Барышников А.Ю. Растворимые формы мембранных антигенов клеток иммунной системы при социально значимых инфекциях. Исследование их роли при вирусных инфекциях. *Российский биотерапевтический журнал.* 2005; Т. 4, №3: 131-145
15. Пат. 2520746 Рос. Федерация, (51) МПК G01N33/53. Абрамовских О.С., Телешева Л.Ф., Долгушина В.Ф. и соавт. Способ использования иммунологических маркеров для прогноза прогрессии цервикальных интраэпителиальных неоплазий, ассоциированных с папилломавирусной инфекцией. 2012153253/15; заявл. 10.12.2012; опубл. 27.06.2014.

Сведения об авторах:

Абрамовских Ольга Сергеевна – профессор кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии и клинической лабораторной диагностики ГБОУ ВПО ЮУГМУ Минздрава России, доктор медицинских наук. Тел.: 8 902 868 62 23, e-mail: abramoschel@mail.ru
 Телешева Лариса Федоровна – проректор по научной работе и международным связям ГБОУ ВПО ЮУГМУ Минздрава России, профессор, доктор медицинских наук
 Долгушина Валентина Федоровна – заведующая кафедрой акушерства и гинекологии ГБОУ ВПО ЮУГМУ Минздрава России, профессор, доктор медицинских наук

Поступила 16.06.2015 г.