

А.Г. КЕДРОВА
В.В. КУЗНЕЦОВ
Ю.И. ПОДИСТОВ
В.В. БРЮЗГИН
В.П. КОЗАЧЕНКО

Российский
онкологический научный
центр им. Н.Н. Блохина
РАМН

Роль ИЗОПРИНОЗИНА В КОМПЛЕКСНОМ ЛЕЧЕНИИ БОЛЬНЫХ ЭПИТЕЛИАЛЬНЫМИ ДИСПЛАЗИЯМИ И ПРЕИНВАЗИВНЫМ РАКОМ ШЕЙКИ МАТКИ

Частота заболеваемости раком шейки матки (РШМ) во всем мире варьирует от 10 до 40 на 100тыс. женского населения, при этом почти половина больных умирают в течение первого года в связи с поздним диагностированием заболевания. Приведенные различия обусловлены организацией и качеством медицинской помощи в том или ином регионе (прежде всего развитие скрининговых программ), сексуальными традициями, а также, по последним данным, зависят от типа HPV инфекции.

Возрастной пик заболеваемости РШМ падает на возраст 45-55 лет, хотя отмечается быстрое нарастание частоты РШМ среди женщин моложе 30 лет. Поэтому, постоянно изучаются возможности внедрения в клиническую практику профилактических мер для предотвращения развития распространенных форм РШМ (вакцинация), уделяется большое внимание скринингу и лечению предраковых заболеваний.

В настоящее время известен основной этиологический фактор возникновения РШМ – вирус папилломы человека (HPV). Исследованиями международной ассоциации биологического изучения РШМ (IBSCC) показано, что HPV, преимущественно 16 и 18 типов, содержится в 99,7% образцов РШМ [16]. Доказано, что HPV инфицирует эпителиальные клетки базального слоя ШМ, где обнаруживается эписомальный вирусный геном. Также было продемонстрировано, что от 11 до 20% молодых сексуально активных женщин инфицированы HPV [6].

Репликация вирусной ДНК и синтез, связанных с ней капсидных

белков изменяют клеточный цикл и приводят к клеточной атипии, занимая время от одного года до трех лет [18]. Именно поэтому, пока вирус находится в эписомальном состоянии, наблюдаются доброкачественные процессы. Эпителиальная дисплазия возникает при интеграции вируса в геном клетки, что сопровождается делецией гена E2, влияющего на синтез двух важных белков онкогенеза E6 и E7. Их повышенный уровень влияет на белки апоптоза: p53 (E6) и Rb (E7), что преждевременно активирует переход клетки в S – фазу цикла [17]. Таким образом, этот последовательный механизм имеет два ключевых момента: блокирование факторов транскрипции и модификация структуры хроматина, что впоследствии приводит к сверхэкспрессии белков E6 и E7. Отсюда, уже на стадии дисплазии одни противовирусные препараты бесцельны остановить процесс опухолевой трансформации, так как инфицированные клетки не содержат вирус в традиционном понимании. Эти клетки должны быть удалены любым из известных методов: электрокоагуляция, криодеструкция, лазероапаризация, электроконизация ШМ. Противовирусное же лечение должно проводиться обязательно, так как персистенция HPV инфекции является ключевым фактором для возникновения заболевания. Учитывая все известные факторы, можно предположить, что развитие РШМ является многостадийным процессом, который занимает период времени от 2 до 10 лет [1,2,18].

Диагностика предраковых со-

стояний ШМ осуществляется при гинекологическом осмотре, кольпоскопии, цитологическом и гистологическом исследованиях. Контролировать эффективность лечения можно кольпоскопически, не прибегая к инвазивным методам обследования [3]. В настоящее время все хирургические методы лечения должны сочетаться с этиопатогенетической терапией. Это обстоятельство обусловлено тем, что частота рецидивов дисплазии и преинвазивного РШМ после деструктивных методов лечения достаточно высока. Причина этого явления состоит в том, что остается этиопатогенетический фактор, т.е. вирусная инфекция. Отсюда при наблюдении за женщинами, перенесшими хирургическое лечение по поводу диспластических процессов и Ca in situ ШМ, целесообразно проводить обследование на HPV и при персистенции вируса проводить противовирусное лечение [3,4,11].

В настоящее время не существует препаратов, избирательно воздействующих на вирус папилломы человека. Наиболее часто для лечения HPV- инфекции применяются интерфероны и различные иммуномодуляторы. Однако, даже длительная интерферонотерапия зачастую не приводит к излечению HPV. Эффективность лечения напрямую зависит от уровня синтеза онкобелка E7, который нейтрализует противовирусную активность интерферонов [8,9, 13,14].

Противовирусный препарат ИЗОПРИНОЗИН (активное вещество – инозиплекс – inosine pranobex, methisoprinol) подавляет репликацию ДНК и РНК вирусов посред-

твом связывания с рибосомой клетки и изменения ее стереохимического строения. Кроме противовирусного действия, препарат обладает и иммуномодулирующим свойством за счет комплекса инозина, что повышает его доступность для лимфоцитов. Препарат стимулирует неспецифический иммунитет, усиливает продукцию интерлейкинов, повышая синтез антител, стимулирует хемотоксическую и фагоцитарную активность моноцитов, макрофагов и полиморфноядерных клеток [3].

Фармакокинетика препарата хорошо изучена. Максимальная концентрация ИЗОПРИНОЗИНА через 1 час после приема 1,5 граммов препарата. Первый период полувыведения (50 мин.) связан с образованием мочевой кислоты. Второй период полувыведения – 3-5 часов, при этом метаболиты выводятся почками. Во время приема ИЗОПРИНОЗИНА нельзя применять иммунодепрессанты и аналогичные препараты, а также лекарственные препараты, обладающие нефротоксичным действием. Первичные результаты лечения ИЗОПРИНОЗИНОМ НРV у больных с наличием остроконечных кондилом были перспективны, но требовали дальнейшего изучения в связи с малочисленностью изученных групп [3].

Целью нашего исследования явилась оценка эффективности и токсичности ИЗОПРИНОЗИНА в комплексном лечении больных эпителиальными дисплазиями I-III степеней (CIN I-III) и преинвазивным раком шейки матки (Ca in situ), а также больных с рецидивами CIN или Ca in situ в оставшейся части шейки матки, инфицированных вирусом папилломы человека (НРV).

Материал и методы исследования

Исследование являлось проспективным, открытым и несравнительным. Обследовано 54 больных CIN I-III степени и Ca in situ ШМ, а также больные рецидивами CIN или Ca in situ в оставшейся части ШМ. Из них 45 (83,3%) пациенток были отобраны для лечения ИЗОПРИНОЗИНОМ, по признаку – инфицирования НРV 16 и/или 18 типа.

Все больные разделены на три подгруппы в зависимости от диагноза, который устанавливался на основании цитологического и/или гистологического исследований. Средний возраст пациенток составил $32,3 \pm 2,7$ лет (от 18 до 55 лет), общее состояние по шкале активности ВОЗ 0-1, у всех пациенток был выявлен вирус папилломы человека (тип 16 и/или 18) по результатам ПЦР диагностики.

В исследование не включались больные, подвергнутые ранее любому виду противовирусной терапии и пациентки, имеющие серьезные сопутствующие заболевания. Не включались в исследование беременные или кормящие грудью, больные, имеющие интеллектуальные или другие нарушения, влияющие на способность адекватно дать согласие или следовать диагностическим и лечебным процедурам, предусмотренным протоколом, а также больные, имеющие аллергические реакции на любой ингредиент применяемых лекарственных препаратов или ранее страдающие злокачественными новообразованиями. Все пациентки детородного возраста должны были соблюдать меры контрацепции на период лечения.

Скрининг для отбора больных на исследование проходил в отделении амбулаторных методов диагностики и лечения злокачественных новообразований, а дальнейшее хирургическое лечение больным проводилось в отделении гинекологии ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН.

Каждая пациентка проходила обследование и оценивалась в соответствии с критериями протокола. Лабораторные методы диагностики выполнялись в лаборатории ДНК – технологий института иммунологии МЗ РФ (руководитель – к.б.н. Трофимов Д.Ю.)¹

Группа А (20 больных). Больные CIN I-II степени (легкая и умеренная степень дисплазии) с цитологической верификацией диагноза, у которых при ПЦР диагностике выявлена НРV инфекция (16 и/или 18 тип).

Последовательность лечения.

1. Подробный сбор анамнеза. Особенно отмечалось ранее проводимое противовоспалительное

(антибиотикотерапия) и противовирусное лечение, а также все инвазивные методы воздействия на шейку матки.

2. Гинекологический осмотр с кольпоскопическим исследованием, забор материала для бактериологического исследования флоры влагалища и определения ее чувствительности к антибиотикам, а также для ПЦР диагностики. Далее проводилась прицельная биопсия шейки матки или забор материала для цитологического исследования (эктоцервикс и цервикальный канал).

3. Лечение вирусносительства проводилось ИЗОПРИНОЗИНОМ по 1000мг (2 таблетки) x 3 раза в день, курс лечения – 10 дней с контрольным обследованием через 10 дней после окончания лечения. При выявлении смешанной флоры влагалища ИЗОПРИНОЗИН назначался в комбинации с антибиотиками в зависимости от бактериологической чувствительности флоры. На данном этапе местное лечение не проводилось. У 5 больных было проведено 2 курса лечения ИЗОПРИНОЗИНОМ, а затем выполнена криодеструкция ШМ, так как после первого курса лечения при ПЦР – диагностике обнаруживался вирус папилломы человека. При контрольном обследовании после второго курса лечения вирус не обнаружен. Больных с вирусом,

¹ Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) для определения ДНК вирусов “высокого риска” 16,18,31,33,35,39,45,51,52,56,58,59,68 проводился по следующей методике: соскоб эпителиальных клеток из цервикального канала и эктоцервикса отправлялся в лабораторию, где с помощью праймеров, позволяющих амплифицировать фрагмент ДНК всех серотипов вируса отбирались образцы, в которых был выявлен НРV. На втором этапе эти образцы амплифицировали с применением двух других праймеров, один из которых позволял амплифицировать ДНК НРV 6 и 11 типов (группа низкого риска онкогенности), другая ДНК НРV 16,18,31,33,35,39,45,51,52,56,58,59,68-го типов. Реакцию амплификации проводили в объеме 25 мкл. В реакционную смесь последовательно вносили деионизованную воду до объема 2,5мкл 10-кратного буфера для ПЦР (660мМ трис-НСl, pH – 8,8; 166мМ сульфата аммония, 0,1% твин -20, 0,001% желатин, 30мМ хлористого магния) по 250мкМ каждого дНТФ, по 1 пМ праймеров и 0,8 акт. единиц Taq – полимеразы, 5 мкл рас-ра ДНК, 30 мкл минерального масла. Для положительного контроля вносили 1-5 пг ДНК НРV. Реакция проводилась в течение 35 циклов на программируемом термостате “PCR express” (Великобритания) при 940 С – 30с, 600 С – 20с, 720 С – 30с. Продукты реакции анализировали методом электрофореза в 1,5% агарозном геле. Разделение продуктов амплификации проводили при напряжении электического поля 10 В/см в течение 30 мин. Учет образцов проводился визуально на трансиллюминаторе при длине волны от 254 нм. Положительными считали образцы, в которых регистрировалась светящаяся оранжевая полоса (длина волны – 594нм), соответствующая по электрофоретической подвижности положительному контролю: 410 пар нуклеотидов – для НРV недифференцированных типов, 370 пар нуклеотидов – для серотипов НРV высокого риска онкогенности и 284 пары нуклеотидов – для серотипов низкого риска онкогенности.

Результаты лечения ИЗОПРИНОЗИНОМ больных CIN, Ca in situ и идами CIN и Ca in situ оставшейся части шейки матки

Всего больных (n =45)

Средний возраст: 32,3± 2,7 лет (от 18 до 55 лет): 42 – больные репродуктивного возраста, 3 – менопаузального возраста.

Цитологическая верификация.

Дисплазии I -13 (28,9%) больных.

Дисплазия II -7 (15,5%) больных.

Дисплазия III – 8 (17,9%) больных.

Ca in situ ШМ- 7(15,5%) больных.

Рецидивы CIN и Ca in situ ШМ in situ – 10(22,2%) больных.

ПЦР – диагностика до лечения:

тип вируса HPV 16 – 45 (100%) больных;

HPV 18 – 8(17,8%) больных;

HPV 16,31,33,35,58,52,67 – 45(100%) больных;

HPV 18,45,39,59 -7(17,8%) больных;

HPV 6,11 – 2(2,2%) больных;

HPV 51,26 – 2(2,2%) больных.

Смешанная флора (*Gardnerella vaginalis*, *Streptococcus pyogenes*, *Ureaplasma urealyticum*)- 16 (35,5%) больных.

Лечение: 35 (77,8%) больных получили 1 курс лечения ИЗОПРИНОЗИНОМ, из них 8 больных – в сочетании с антибиотиками. 9 (20%) больных получили 2 курса лечения ИЗОПРИНОЗИНОМ, из них 8 больных – в сочетании с антибиотиками.

Криодеструкция шейки матки выполнена 15 больным (эпителизация в стандартные сроки), 3 –лазеровапаризация, 2 – радиоволновая эксцизия на аппарате “Сургитрон”. Осложнений не выявлено. Раздельное диагностическое выскабливание матки и электроконизация шейки матки проведена 14 (35%) больным (эпителизация в стандартные сроки), осложнений не было; раздельное диагностическое выскабливание матки и ампутиация шейки матки выполнена у 7 (17,5%) больным (некроз культи влагища отмечен у 3 больных), у одной больной выполнена экстирпация матки с придатками.

Среднее время наблюдения – 4,2 месяца

резистентным к ИЗОПРИНОЗИНУ, в данной группе пациенток не выявлено.

4. При эффективности первого этапа лечения (отсутствие вируса при ПЦР – диагностике и нормализации

флоры влагища) проводился цитологический контроль материала и операция: криодеструкция или лазеровапаризация ШМ. Контрольное обследование проводилось ежемесячно в течение 3-4 месяцев с контролем HPV инфекции.

Группа Б (15 больных). Больные CIN III (тяжелая степень дисплазии) или Ca in situ ШМ морфологической верификаций диагноза, у которых при ПЦР диагностике выявлен вирус папилломы человека 16 и/или 18 тип. Подробный сбор анамнеза, гинекологический осмотр с кольпоскопическим исследованием, лечение вирусносительства, проводились аналогично группе А. После оценки первого этапа лечения выполнялась операция: раздельное

диагностическое выскабливание матки и электро – или ножевая конизация шейки матки с последующим морфологическим исследованием и определением белков Е6 и Е 7 в HPV 16 положительных образцах². Через месяц после операции проводилось контрольное обследование на вирус папилломы человека (ПЦР – диагностика).

Группа С (10 больных). Больные рецидивами CIN или Ca in situ в оставшейся части шейки матки после ранее проведенного хирургического лечения с цитологической верификацией диагноза, у которых при ПЦР диагностике выявлен вирус папилломы человека (16 и/или 18 тип). Последовательность обследования и лечения HPV у этих больных была аналогичной группе В.

После оценки первого этапа лечения больные были подвергнуты следующим операциям: экстирпация матки с придатками – выполнена одной больной (ранее произведена ампутиация шейки матки); ампутиация культи шейки матки – двум больным (ранее проводилась электроконизация шейки матки); электроконизация шейки матки – четырем больным (ранее проводилась криодеструкция или диатермокоагуляция шейки матки); криодеструкция культи шейки матки – трем пациенткам (ранее проводилась диатермокоагуляция шейки матки или радиоволновая эксцизия ШМ на аппарате “Сургитрон”). Через месяц проводилось контрольное обследование на вирусносительство. Двум больным проведено 2 курса лечения ИЗОПРИНОЗИНОМ, так как через месяц определялся вирус папилломы человека. При контрольном обследовании после второго курса вирус не обнаружен.

Результаты

При оценке эффективности противовирусного лечения ИЗОПРИНОЗИНОМ установлено, что после одного курса терапии у 35(77,8%) больных HPV (16 тип) и у 4(50%) пациенток HPV (18 тип) не обнаружены. Девяти больным (20%) потребовалось 2 курса лечения с 10 дневным интервалом и только у одной пациентки (2%) HPV (16 и 18 типы) обнаружился после 2 курсов ле-

² Для определения белков Е6 и Е7 были взяты образцы ткани шейки матки из парафиновых блоков послеоперационного материала у больных после конизации шейки матки (CINIII и Ca in situ). Для определения Е6 применяли праймер 1: nt46-65 5'-ttgaaccgaaaccggtagt-3'; nt 237-256 5'tgtctttcgggatttatgc-3' и праймер2: nt 204-224 5'-gcaacagttactgcgacgg-3'; nt 419-438 5'-tgtcaaaagccactgtgtcc-3'; а также праймер3: nt 371-391 5'-cagcaatacaacaaccgttg-3'; nt 568-590 5'-ggagatacacctactgcatga-3'; nt 568-590 5'-ggagatacacctactgcatga-3'. Для определения Е7 применяли праймеры: 1. nt520-540 5'-ttgcagatcatcaagaacacg-3'; nt 742-761 5'-tgtgactctcagctctggtt и 2. nt 691-710 5'-acaagcagaaccggacagag-3'; nt 878-898 5'-caggacaatggggaagag-3'. Полимеразная реакция проводилась при 950 С - 5мин. в течении 40 циклов, при 550 С -45с. и при 720С -60с. с выдержкой при этой температуре до 7 мин. Продукты реакции анализировали методом электрофореза в 2% агарозном геле. Разделение продуктов амплификации проводили при напряжении электрического поля 10 В/см в течение 30 мин., согласно производственному протоколу BigDye Terminator Cycle sequencing kit: Applied Biosystems. [11 b 12 из статьи].

чения и операции, что потребовало проведения третьего курса лечения. Среднее время без рецидива HPV инфекции оказалось равным $4,2 \pm 2,1$ месяца.

Всего проведено 58 курсов лечения ИЗОПРИНОЗИНОМ, при этом только у одной пациентки (1,7%) при втором курсе лечения была отмечена аллергическая реакция в виде сыпи, которая купировалась в течение 3 дней при отмене ИЗОПРИНОЗИНА и назначении антигистаминных препаратов. Других побочных проявлений при приеме препарата отмечено не было, препарат переносился хорошо. Четыре пациентки (8,8%) отмечали легкое недомогание и тошноту, возможно связанные с приемом ИЗОПРИНОЗИНА. Все они принимали ИЗОПРИНОЗИН в комплексной терапии с антибиотиками.

ДНК белков E6 и E7 вируса HPV (16 тип) определена в 15 послеоперационных образцах ткани шейки матки. E6 обнаружен в 5 (71,4%) из 7 образцов ткани ШМ при Ca in situ и в 4 (50%) из 8 образцов ткани при CIN III. E7 обнаружен в 7 (100%) из 7 образцов ткани при Ca in situ и в 5 (62,5%) из 8 образцов ткани при CINIII. Эти результаты еще раз доказывают, что при тяжелой степени эпителиальной дисплазии и преинвазивном раке шейки матки вирус уже находится в геноме клетки и



приводит к необратимым нарушениям клеточного цикла, что резко снижает эффективность противовирусного лечения.

Таким образом, уже на стадии эпителиальной дисплазии ШМ одни противовирусные препараты не могут остановить процесс опухолевой трансформации, так как инфицированные клетки не содержат вирус в традиционном понимании. Отсюда, на первом этапе лечения больные с CIN и Ca in situ ШМ должны по показаниям подвергаться электрокоагуляции, криодеструк-

ции, лазероапаризации, электроконизации ШМ. Противовирусное же лечение должно проводиться на втором этапе обязательно, так как персистенция вируса является ключевым фактором для возникновения рецидива заболевания.

Применение ИЗОПРИНОЗИНА до операции сопровождается значительным снижением активности вируса HPV 16 и 18 типов, определяемых при ПЦР-диагностике. При этом уже после первого курса лечения тест на HPV- инфекцию отрицательный у 77,8% больных. 

Список литературы:

1. Киселев В.И., Ашрафян Л.А., Бударина С.О. Этиологическая роль вируса папилломы человека в развитии рака шейки матки: генетические и патогенетические механизмы, возможности терапии и профилактики. // Гинекология №4 том 6/2004 стр.174-179.
2. Киселев Ф.Л., Киселева Н.П., Кобзева В.К. Статус ДНК вируса папилломы человека в опухолях шейки матки. // Молекулярная биология. 2001 т.35 №3 стр. 470-476.
3. Забелев А.В., Долматова О.К., Сивоконева Е.Н. Результаты кольпоскопического скрининга и опыт применения изопринозина в лечении папилломавирусных поражений шейки матки. "ЕвроДон" 2003г.
4. Benton E.C., Arends M.J., Human papillomavirus in the immunosuppressed. In: Lacey S(ed) Papillomavirus Reviews: Current Research on Papillomaviruses. Leeds: Leeds University Press, 271-297, 1996
5. Boer M.A., Peters Lex A., Mohammed Farid Aziz., et.al. Human papillomavirus type 16 E6, E7 and L1 variants in cervical cancer in Indonesia, Suriname., and the Netherlands.// G.O. 94(2004) 488-494
6. Bosch F.X., Manos M.M., Munoz N. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: A worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. J.Natl. Cfncr Inst 87:796-802,1995
7. Khleif S.N. Molecular mechanisms of human papillomavirus-induced carcinogenesis: insights on potential targets for prevention // Orlando, ASCO 2005, Educational book p. 407410
8. Klingelutz A.J., Foster S.A., McDougall J.K. Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. Nature 380: 79-82, 1996
9. Lee J.O. Russo A.A., Palvetich N.P. Structure of the retinoblastoma tumor-suppressor pocket domain bound to a peptide from HPV E7. Nature 391: 859-865, 1998
10. Minagawa Y., Kigawa J., Itamochi H. The outcome of radiation therapy in elderly patients with advanced cervical cancer//Int. J. Gyn. Obst. – 1997. – Vol.58. -P.305-309.
11. Muderspach L., Wilczynski S., Roman L., A phase I trial of a human papillomavirus (HPV) peptide vaccine for women with high-grade cervical and vulvar intraepithelial neoplasia who are HPV 16 positive. Clin Cancer Res 6: 3406-3416, 2000
12. Parkin DM. Death from cervical cancer // Lancet. – 1999. – N8484. – P. 797.
13. Stanley M.A. Human papillomavirus and cervical carcinogenesis. Best Pract. Res Clin. Obstet Gynecol. 15:663-676, 2001
14. Swartz R.J., Cox D.D., Cantor S.B. A new methodology to compare clinical strategies with application in screening and diagnosis for caervical intraepithelial neoplasia (CIN). ASCO 2004., abs. 6105
15. Thippen T., Vance R.B., Khansur T. Carcinoma of the uterine cervix: current status and future directions //Semin Oncol – 1994. – Vol.21(suppl. 2).-P.43-54.
16. Werness B.A., Levine A.J. Howley P.M. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. Science 248:76-79 1990.
17. Wojtowicz M., Hamilton J.M., Khong H., et.al. Vaccination of cervical cancer patients with papillomavirus type 16 T6 and E7 peptides. Proc Am Soc Clin Oncol 18: 441a, 1999
18. Woodman C.B., Collins S., Winter H. Natural history of cervical human papillomavirus infection in young women: a longitudinal cohort study. Lancet 2001: 357: 1831-1836