

СОСТАВ МИКРОБИОЦЕНОЗА УРОГЕНИТАЛЬНОГО ТРАКТА И КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ОСОБЕННОСТИ ПАПИЛОМАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ТЯЖЕСТИ ВПЧ-АССОЦИИРОВАННОГО ЦЕРВИКАЛЬНОГО ПОРАЖЕНИЯ

Л.Д. Андосова, К.Н. Конторшикова, К.А. Шахова,
О.С. Янченко, Ю.Р. Тихомирова,

ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет», г. Н. Новгород

Андосова Лариса Дмитриевна – e-mail: larisa-andosova@yandex.ru

Дата поступления
12.01.2018

Определение патогенетических аспектов инфекционно-воспалительного, неопластического цервикального процессов вызывает в настоящее время определенные трудности. **Цель исследования:** установить связь микробиоценоза урогенитального тракта с вирусной нагрузкой ВПЧ и со степенью выраженности цервикального поражения, ассоциированного с папилломавирусной инфекцией. **Материал и методы.** Было обследовано 140 женщин различных возрастных групп, средний возраст составил 33,5±1,5 года, с плоскоклеточными интраэпителиальными поражениями низкой (LSIL) и высокой (HSIL) степени, хроническими цервицитами. Контрольная группа включала 30 здоровых женщин с отрицательным ВПЧ-тестом. Большой интерес представляет связь микробиоценоза урогенитального тракта с вирусной нагрузкой ВПЧ и со степенью выраженности цервикального поражения, ассоциированного с папилломавирусной инфекцией. Лабораторные анализы выполнены методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени на анализаторе «iQ5 Cyler» («Bio-RAD», США) комплекта тест-систем ФГУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, с помощью реагентов «Фемофлор» (ООО «НПО ДНК-Технология, Россия»). **Результаты и выводы.** В работе определено, что состояние «дисбиоз» на стадии интраэпителиальных поражений высокой степени (HSIL) связано с повышенными цифрами вирусной нагрузки ВПЧ. Дисбиоз как сопутствующий фактор, возможно, не является непосредственной причиной развития и прогрессирования цервикального поражения, но на фоне высокой вирусной нагрузки, воспаления создаются условия как для дисбаланса биоты, так и для прогрессирования неопластических процессов шейки матки, ассоциированных с ВПЧ-инфекцией.

Ключевые слова: интраэпителиальные поражения шейки матки, цервицит, папилломавирусная инфекция, вирусная нагрузка, микробиоценоз.

Definition of pathogenetic aspects of infection and inflammatory, neoplastic processes of the cervical causes at present certain difficulties. The aim of the study was to establish the relationship of microbiocenosis of the urogenital tract with HPV viral load and severity of cervical lesions associated with HPV infection. Material and methods. The study surveyed 140 women of various age groups, average age 33.5±1.5 years, with squamous intraepithelial lesions of the low (LSIL) to high (HSIL) degree, chronic cervicitis. The control group included 30 healthy women with a negative HPV test. Of great interest is the relationship of microbiocenosis of the urogenital tract with HPV viral load and severity of cervical lesions associated with HPV infection. Laboratory tests were performed using the real-time polymerase chain reaction (PCR) method on the iQ5 Cyler analyzer (Bio-RAD, USA) of the Federal Service for the Epidemiology of Rospotrebnadzor, the reagents of Femoflor (DNA-Technology, Russia). The results and conclusions. We determined that the state of «dysbiosis» at the stage of intraepithelial lesions of high degree (HSIL) is associated with elevated numbers of viral load of HPV. Dysbiosis, being a contributing factor, perhaps, is not the immediate cause of the development and progression of cervical lesions, but in the context of high viral load, inflammation, conditions like imbalance of biota and progression of neoplastic processes of the cervix associated with HPV infection.

Key words: intraepithelial lesions of the cervix, cervicitis, human papillomavirus infection, viral load, microbiocenosis.

Согласно современным данным имеет место причинная связь между папилломавирусной инфекцией (ПВИ) и предраковыми заболеваниями шейки матки [1, 2]. Считая вирус папилломы человека (ВПЧ) фактором риска предрака и рака шейки матки (РШМ), нельзя не учитывать другие возможные влияния [3]. Высокая вирусная нагрузка, по мнению ряда авторов, связана с риском развития тяжелых цервикальных неоплазий [4]. Поскольку ВПЧ нарушает структуру слизистой оболочки шейки матки, это способствует проникновению и развитию в ней патогенных микроорганизмов [5]. Большой интерес представляет роль состояния микробиоценоза влагалища в прогрессии цервикальных неоплазий [6, 7]. Фоном для развития диспластических состояний мо-

жет служить воспаление – цервицит, при котором в процесс вовлекаются слизистая, а затем и строма шейки матки [8]. Большая часть женщин с хроническими цервицитами (86%) инфицирована вирусом папилломы человека. Одним из физиологических барьеров, обеспечивающих инфекционную резистентность, является микроэкология влагалища [1]. Определение патогенетических аспектов инфекционно-воспалительного, неопластического цервикального процессов вызывает в настоящее время определенные трудности.

Цель исследования: установить связь микробиоценоза урогенитального тракта с вирусной нагрузкой ВПЧ и со степенью выраженности цервикального поражения, ассоциированного с папилломавирусной инфекцией.

Материал и методы

Исходя из цели исследования, было обследовано 140 женщин различных возрастных групп, из них: а) 80 человек – с предраковыми состояниями (в зависимости от степени поражения шеечного эпителия цервикальные интраэпителиальные неоплазии (CIN) были поделены на две группы: пациентки с легкими дисплазиями – плоскоклеточные интраэпителиальные поражения низкой степени (LSIL) – 40 человек, и пациентки с тяжелыми дисплазиями – плоскоклеточные интраэпителиальные поражения высокой степени (HSIL) – 40 человек; б) 30 человек – с хроническими цервицитами вирусной этиологии; в) Контрольная группа включала 30 здоровых женщин с отрицательным ВПЧ-тестом. Возраст обследуемых составлял от 17 до 50 лет, средний возраст $33,5 \pm 1,5$ года. Клиническое обследование пациенток включало применение кольпоскопического, цитологического (традиционный метод) и гистологического исследований. Гистологическую верификацию проводили по материалам тканей шейки матки, полученным путем прицельной биопсии и (или) кюретажа, петлевой эксцизии, конизации. Для дальнейшего, более развернутого клинико-лабораторного исследования были сформированы следующие группы пациентов: легкие дисплазии (LSIL) = 40 – группа 1; тяжелые дисплазии (HSIL) = 40 – группа 2; хронические цервициты = 30 – группа 3; здоровые женщины без ВПЧ-инфекции = 30 – группа контроля. Материалом для исследования были соскобы эпителиальных клеток из влагища (заднебоковые своды), цервикального канала шейки матки. Взятие материала производилось одноразовыми универсальными зондами в транспортную среду «Амплисенс» (Россия), предназначенную для биопроб из урогенитального тракта женщин. Исследования были проведены с использованием современных лабораторных технологий. Исследование проводилось методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени на анализаторе «iQ5 Cyder» («Bio-RAD», США), с комплектом тест-систем «Амплисенс» ФГУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора. ВПЧ-тестирование включало в себя ВПЧ-скрининг на вирусы высокого канцерогенного риска, генотипирование и определение вирусной нагрузки. Все тест-системы для ПЦР-диагностики содержали внутренний контроль. С помощью внутреннего контроля осуществлялся надзор за ходом ПЦР-реакции, правильностью взятия биоматериала. ВПЧ-скрининг был выполнен с применением набора реагентов для выявления ДНК ВПЧ ВКР 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 52, 53, 56, 58, 59, 60, 70 типов, «Ампли Сенс ВПЧ ВКР скрин-EPH». Для выявления и количественного определения ДНК вируса папилломы человека использовали тест-систему «Ампли Сенс ВПЧ ВКР генотип-Fl», «Ампли Сенс ВПЧ ВКР скринитр-Fl». В возможности тест-систем входит скрининг, дифференциация и количественное определение ДНК ВПЧ ВКР 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 типов в биологическом материале. Вирусную нагрузку рассчитывали как количество копий ДНК ВПЧ, выраженное в Ig геномных эквивалентах (ГЭ) на 10^5 клеток. Материал исследовали мето-

дом ПЦР-РВ с использованием анализатора «iQ5 Cyder» («Bio-RAD», США), комплекта тест-систем ФГУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора. В условиях адекватной и стандартизированной процедуры взятия соскоба эпителиальных клеток обнаружение вируса папилломы человека в количестве менее 10^5 геномных эквивалентов (ГЭ) ВПЧ ВКР или 10^3 ГЭ, приходящихся на 10^5 клеток человека, считается клинически малозначимым. Вирус ВПЧ, выявляемый в организме в течение года и более, то есть отражающий персистирующую форму течения папилломавирусной инфекции, в количестве более 10^5 ГЭ, приходящихся на 10^5 клеток, означает наличие повышенной вирусной нагрузки [9]. Изучение биоценоза влагища проводили методом ПЦР-РВ с использованием реагентов «Фемофлор» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) в детектирующем амплификаторе ДТ-96 согласно инструкции производителя (ООО «НПО ДНК-Технология»). В работе была дана диагностически значимая оценка состояния биоценоза урогенитального тракта, заключающаяся в формировании характеристик различных его вариантов: от состояния нормоценоза до состояния выраженного дисбиоза. Определение микробиоценоза было выполнено комплексно, с учетом биоты участка в целом. Количество эпителиальных клеток во взятом материале оценивали по результатам анализа геномной ДНК человека в каждом образце. С помощью специализированного программного обеспечения в геном-эквивалентах/мл рассчитано количество общей бактериальной массы (ОБМ), лактобацилл, аэробных микроорганизмов (факультативные и облигатные анаэробы), группы микоплазм, грибов рода кандиды и абсолютных патогенов. Также проводилась оценка количества лактобацилл относительно общей бактериальной обсемененности и количества микроорганизмов в отдельных группах среди всех обнаруженных бактерий. Результат выражался в процентах. В соответствии с клиническими данными теста «Фемофлор» был предложен следующий алгоритм оценки видов биоценоза: а) нормоценоз (абсолютный нормоценоз) – вариант микробиоценоза, в котором доля лактобацилл относительно общей бактериальной массы (ОБМ) составляет более 80%, количество бактерий рода уреоплазм, микоплазм и дрожжевых грибов рода кандиды менее 10^4 гз/мл; б) относительный нормоценоз – вариант микробиоценоза, в составе которого количество лактобацилл относительно ОБМ составляет более 80%, количество бактерий рода уреоплазм, микоплазм и дрожжевых грибов рода кандиды более 10^4 гз/мл; в) умеренный (аэробный или анаэробный) дисбиоз – вариант микробиоценоза, в котором содержание нормофлоры относительно ОБМ определяется в границе 20-80%, увеличено количество аэробов или анаэробов; г) выраженный (аэробный, анаэробный или смешанный) дисбиоз – вариант микробиоценоза, в котором процентное соотношение аэробов или анаэробов приближается к 80% относительно ОБМ, а количество лактобацилл составляет менее 20% относительно ОБМ.

ТАБЛИЦА 1.

Уровень вирусной нагрузки в зависимости от состояния микробиоценоза урогенитального тракта в группе легких дисплазий (LSIL), $M \pm SE$

Показатель	Группа с абсолютным нормоценозом	Группа с относительным нормоценозом	Группа с умеренным дисбиозом	Группа с выраженным дисбиозом
Вирусная нагрузка, Ig ГЭ на 10^5	$2,8 \pm 0,5$	$2,9 \pm 0,2$	$4,9 \pm 0,2$	$5,3 \pm 0,7$

Обработка данных. Полученные результаты были обработаны общепринятыми методами вариационной статистики с использованием пакета статистических программ Statistica for Windows 6.0. Изучались различия между сравниваемыми группами и группой контроля. Использовался параметрический критерий Стьюдента для выборок с нормальным распределением, критическое значение уровня достоверности принималось $p < 0,05$, а также метод множественного сравнения с применением критерия Ньюмена-Кейлса. Для определения взаимосвязей между рассматриваемыми параметрами применялся коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Для построения прогностических моделей был использован регрессионный анализ.

Результаты и их обсуждение

В работе выполнена оценка состояния биоценоза урогенитального тракта, описывающая различные его варианты: от состояния абсолютного нормоценоза до выраженного дисбиоза. Дисбиоз (умеренный или выраженный) характеризуется разной степенью нарушения соотношения представителей нормо- и условно-патогенной биоты относительно общего количества микроорганизмов. В контрольной группе состояние нормоценоза отмечено в 100% случаев. В группах легкие дисплазии (LSIL) и цервициты дисбиозы составляют 52,5% и 50%, соответственно. В группе тяжелых дисплазий (HSIL) их частота составляет 85%, что статистически значимо выше, чем в группах легких дисплазий (LSIL), цервицитов и в группе здоровых женщин ($p = 0,011$; $p = 0,008$ и $p < 0,0001$, соответственно) (рис. 1).

Таким образом, легкие дисплазии (LSIL) и цервициты в половине случаев связаны с дисбиотическими нарушениями, а тяжелые дисплазии (HSIL) в основной своей массе ассоциированы с вагинальным дисбиозом. Угнетение ацидофильной микрофлоры влагалища, нарушение баланса анаэробных микроорганизмов приводят к нарушению функциональной активности эпителиоцитов, неадекватной реакции местного иммунного ответа. Выработка патогенных и условно-патогенных микроорганизмами протеолитических ферментов способствует дезинтеграции клеток многослойного плоского эпителия. На этом фоне создаются благоприятные условия для инфицирования эпителиальных клеток вирусом папилломы человека и дальнейшего развития инфекции. При высокой степени интраэпителиального поражения наблюдается наибольший процент дисбиотических состояний, что увеличивает риск прогрессии цервикальной неоплазии. Хронический воспалительный процесс шейки матки поддерживается постоянным воздействием различных факторов, одним из которых является вирус папилломы человека. Воспаление способствует возникновению дистрофических процессов в эпителиоцитах, нарушению дифференцировки клеток в ходе созревания, изменению их функций. Сочетание воспаления и дисбиоза может привести к возникновению благоприятных условий для развития деструктивной патологии шейки матки. Сходная картина нарушений биоты при цервицитах и начальных формах неопластического процесса, наличие воспаления цервикального канала позволяют отнести цервициты к группе заболеваний с большой долей вероятности предшествующих интраэпителиальному поражению шейки матки. Определенный интерес вызывает определение зависимости вирусной нагрузки и дисбиоза в отдельно взятых группах

ТАБЛИЦА 2.

Уровень вирусной нагрузки в зависимости от состояния микробиоценоза урогенитального тракта в группе тяжелых дисплазий (HSIL), $M \pm SE$

Показатель	Группа с нормоценозом	Группа с выраженным дисбиозом
Вирусная нагрузка, $Ig\ G$ на 10^4	$4,1 \pm 0,4$	$5,6 \pm 0,3$

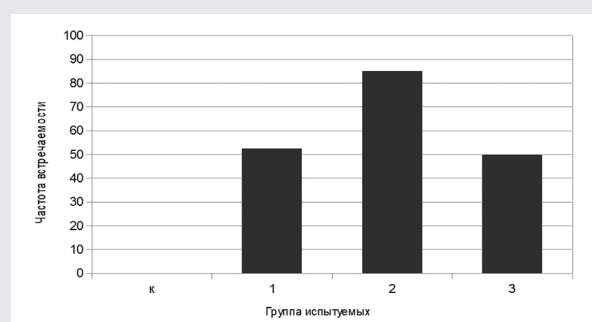


РИС. 1.

Частота встречаемости дисбиозов в группах обследуемых женщин. к – группа контроля; 1 – группа легких дисплазий (LSIL); 2 – группа тяжелых дисплазий (HSIL); 3 – группа цервицитов.

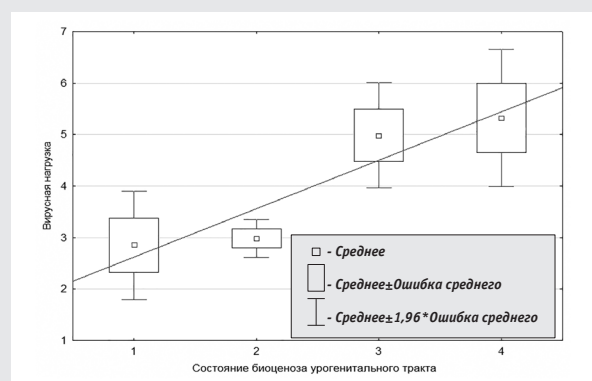


РИС. 2.

Связь уровня вирусной нагрузки и состояния биоценоза урогенитального тракта в группе легких дисплазий (LSIL). 1 – абсолютный нормоценоз; 2 – относительный нормоценоз; 3 – умеренный дисбиоз; 4 – выраженный дисбиоз.

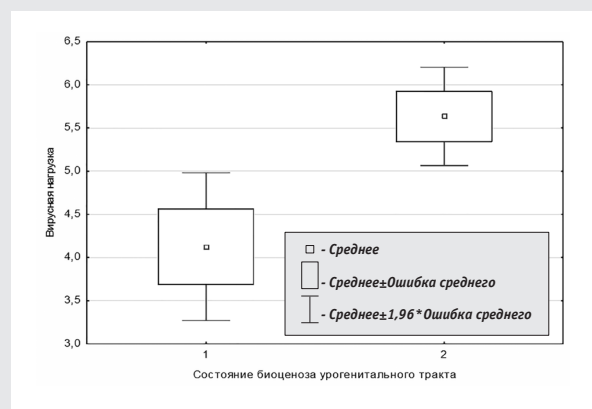


РИС. 3.

Связь уровня вирусной нагрузки и состояния биоценоза урогенитального тракта в группе тяжелых дисплазий (HSIL). 1 – относительный нормоценоз; 2 – выраженный дисбиоз.

испытуемых женщин. Статистически значимых отличий по величине вирусной нагрузки в группах легких дисплазий (LSIL), тяжелых дисплазий (HSIL) и цервицитов в работе выявлено не было. По частоте встречаемости дисбиотических состояний разной степени выраженности лидирующие позиции занимает группа тяжелых дисплазий (HSIL). Положительная связь показателей вирусной нагрузки и дисбиоза отмечена в группах легких (LSIL) и тяжелых (HSIL) дисплазий ($p < 0,05$). В группе цервицитов данная зависимость не выявлена ($p > 0,05$). Показатели вирусной нагрузки в зависимости от состояния микробиоценоза урогенитального тракта в группе легких дисплазий приведены в таблице 1.

Состояние биоценоза биотопа в группе легких дисплазий (LSIL) меняется от состояния нормоценоза до выраженного дисбиоза с увеличением показателей вирусной нагрузки в группах с дисбиотическими нарушениями урогенитального тракта. В процентном соотношении нормоценозы и дисбиозы в группе легких дисплазий (LSIL) выглядят следующим образом: абсолютный нормоценоз – 30%, относительный нормоценоз – 17,5%, умеренный дисбиоз – 20%, выраженный дисбиоз – 32,5%. Поскольку все варианты биоценоза представлены в достаточно большом проценте случаев, то это позволило рассмотреть каждый из них в связи с его вирусной нагрузкой в отдельности (рис. 2).

В группе легких дисплазий (LSIL) прослеживается четкая линейная зависимость между величиной вирусной нагрузки и состоянием биотопа влагалища: значение данного показателя тем выше, чем более выражен дисбаланс нормо- и условно-патогенной микрофлоры. Показатели вирусной нагрузки в зависимости от состояния микробиоценоза урогенитального тракта в группе тяжелых дисплазий приведены в таблице 2.

В группе тяжелых дисплазий (HSIL) под названием «нормоценоз» были объединены результаты исследования с показателями абсолютного и относительного нормоценоза, что составило 15% от общего количества результатов. Для анализа использовались данные испытуемых женщин с выраженным дисбиозом влагалища (47,5%), тем самым по вирусной нагрузке сравнивались два противоположных состояния – нормоценоз и дисбиоз (рис. 3). В группе тяжелых дисплазий (HSIL) обнаружена сходная тенденция с группой легких дисплазий (LSIL) – прослеживается четкая линейная зависимость между величиной вирусной нагрузки и состоянием биотопа влагалища. Как в группе легких, так и в группе тяжелых дисплазий наибольшая вирусная нагрузка наблюдается при выраженном дисбиозе влагалища.

Выводы

Результаты исследования микробиоценоза урогенитального тракта свидетельствуют о том, что состояние «дисбиоз» на стадии интраэпителиальных поражений высокой степени (HSIL) связано с повышенными цифрами вирусной нагрузки ВПЧ. Дисбаланс в составе колонизирующих его микроорганизмов часто сопутствует цервикальному поражению, ассоциированному с папилломавирусной инфекцией, и может отражать степень его выраженности. Дисбиоз, как сопутствующий фактор, возможно, не является непосредственной причиной развития и прогрессирования цервикального поражения, но на фоне высокой вирусной нагрузки, воспа-

ления создаются условия как для дисбаланса биоты, так и для прогрессирования неопластических процессов шейки матки, ассоциированных с ВПЧ-инфекцией. Лабораторные показатели – вирусная нагрузка, микробиоценоз биотопа – позволяют судить о сложных, взаимообусловленных действиях в системе «вирус – клетка – ткань» на различных этапах ВПЧ-ассоциированных цервикальных поражений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Прилепская В.Н., Роговская С.И. Новые технологии профилактики рака шейки матки. В кн.: Патология шейки матки и генитальной инфекции. М.: МЕДпресс-информ, 2008. С. 8-14.
Prilepskaja V.N., Rogovskaja S.I. Novye tehnologii profilaktiki raka shejki matki. V kn.: Patologija shejki matki i genital'noj infekcii. M.: MEDpress-inform, 2008. S. 8-14.
2. Семенов Д.М., Занько С.Н., Дмитраченко Т.И. Папилломавирусная инфекция. СПб.: Диалект, 2008. С. 11-35.
Semenov D.M., Zan'ko S.N., Dmitrachenko T.I. Papillomavirusnaja infekcija. SPb.: Dialekt, 2008. S. 11-35.
3. Клиническая онкогинекология: в 3 т. / под ред. Ф. Дж. Дисаи, У.Т. Кризмана; пер. с англ. под ред. Новиковой. М.: ООО «Рид Элсивер», 2011. Т. 1. С. 73-97.
Klinicheskaja onkoginekologija: v 3 t. / pod red. F. Dzh. Disai, U.T. Krismana; per. s angl. pod red. Novikovoju. M.: OOO «Rid Jelsiver», 2011. T. 1. S. 73-97.
4. Шейка матки, влагалище, вульва. Физиология, патология, кольпоскопия, эстетическая коррекция: руководство для практикующих врачей / под ред. С.И. Роговской, Е.В. Липовой. М.: Издательство журнала Status Praesens, 2014. С. 165-188.
Shejka matki, vlagalishhe, vul'va. Fiziologija, patologija, kol'poskopija, jesteticheskaja korrekcija: rukovodstvo dlja praktikujushhih vrachej / pod red. S.I. Rogovskoj, E.V. Lipovoj. M.: Izdatel'stvo zhurnala Status Praesens, 2014. S. 165-188.
5. Вакцины для профилактики рака шейки матки / под ред. П.Л. Стерна, Г.С. Китченера; пер. с англ. под общ. ред. акад. РАМН Г.Т. Сухих, проф. В.Н. Прилепской. М.: МЕДпресс-информ, 2009. С. 49-58.
Vakciny dlja profilaktiki raka shejki matki / pod red. P.L. Sterna, G.S. Kitchenera; per. s angl. pod obshh. red. akad. RAMN G.T. Suhij, prof. V.N. Prilepskoju. M.: MEDpress-inform, 2009. S. 49-58.
6. Папилломавирусная инфекция / под ред. В.М. Говоруна. М.: НПФ Литех, 2009. С. 43-45.
Papillomavirusnaja infekcija / pod red. V.M. Govoruna. M.: NPF Liteh, 2009. S. 43-45.
7. Савичева А.М. Лабораторная диагностика и терапия репродуктивно значимых инфекций. Лечащий врач. 2008. № 3. С. 50-55.
Savicheva A.M. Laboratornaja diagnostika i terapija reproduktivno znachimyh infekcij. Lechashhij vrach. 2008. № 3. S. 50-55.
8. Ашрафян Л.А., Киселев В.И. Опухоли репродуктивных органов (этиология и патогенез). М.: Издательство «Димитрейд График Групп», 2008. С. 48-68.
Ashrafjan L.A., Kiselev V.I. Opuholi reproduktivnyh organov (jetiologija i patogenez). M.: Izdatel'stvo «Dimitrejd Grafik Grupp», 2008. S. 48-68.
9. Короленкова Л.И. Ассоциированные с инфекцией вируса папилломы человека маркеры возникновения и прогрессии цервикальных интраэпителиальных неоплазий: от научных разработок к клинической практике. Опухоли женской репродуктивной системы. 2010. № 4. С. 64-70.
Korolenkova L.I. Associirovannye s infekciej virusa papillomy cheloveka markery vznikhoveniya i progressii cervikal'nyh intraepitelial'nyh neoplazij: ot nauchnyh razrabotok k klinicheskoi praktike. Opuholi zhenskoj reproduktivnoj sistemy. 2010. № 4. S. 64-70.