

Zaporozhn V N, Marichereda V G, Dimcheva L I. Застосування флавонових глікозидів у терапії генітальної папіломавірусної інфекції у жінок = Application of flavonivuh glycosides papilomavirusnoy therapy of genital infection in women. Journal of Health Sciences. 2014;4(12):93-104. ISSN 1429-9623 / 2300-665X.

<http://journal.rsw.edu.pl/index.php/JHS/article/view/2014%3B4%2812%29%3A93-104>

<http://ojs.ukw.edu.pl/index.php/johs/article/view/2014%3B4%2812%29%3A93-104>

<https://pbn.nauka.gov.pl/works/490819>

The journal has had 5 points in Ministry of Science and Higher Education of Poland parametric evaluation. Part B item 1107. (17.12.2013).

© The Author (s) 2014;

This article is published with open access at Licensee Open Journal Systems of Radom University in Radom, Poland

Open Access. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Noncommercial License which permits any noncommercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author(s) and source are credited. This is an open access article licensed under the terms of the Creative Commons Attribution Non Commercial License

(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted, non commercial use, distribution and reproduction in any medium, provided the work is properly cited.

This is an open access article licensed under the terms of the Creative Commons Attribution Non Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted, non commercial use, distribution and reproduction in any medium, provided the work is properly cited.

Conflict of interest: None declared. Received: 06.11.2014. Revised 18.11.2014. Accepted: 20.11.2014.

ЗАСТОСУВАННЯ ФЛАВОНІДНИХ ГЛІКОЗИДІВ У ТЕРАПІЇ ГЕНІТАЛЬНОЇ ПАПІЛОМАВІРУСНОЇ ІНФЕКЦІЇ У ЖІНОК APPLICATION OF FLAVONIVYH GLYCOSIDES PAPILOMAVIRUSNOY THERAPY OF GENITAL INFECTION IN WOMEN

Запорожан В. М., Маричереда В. Г., Дімчева Л. І.

Zaporozhn V N, Marichereda V G, Dimcheva L I

Одеський національний медичний університет, м. Одеса

Odessa National Medical University, Odessa, Ukraine

medtrans@rambler.ru

Реферат. Запорожан В. Н., Маричереда В. Г., Димчева Л. И. **ПРИМЕНЕНИЕ ФЛАВОНОИДНЫХ ГЛИКОЗИДОВ В ТЕРАПИИ ГЕНИТАЛЬНОЙ ПАПИЛОМАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ У ЖЕНЩИН.** - *Одесский национальный медицинский университет, Одесса, Украина.* Цель работы - оценить клиническую эффективность производных флавоноидных гликозидов при лечении доброкачественных и предраковых заболеваний шейки матки. Исследование проведено на базе Одесской облклинбольницы в 2010-2013 гг. В исследовании принимали участие 80 женщин репродуктивного возраста (средний возраст 28,4±0,2 лет) с верифицированной эпителиальной дисплазией шейки матки легкой и средней степени (основная группа) и 30 практически здоровых женщин, обследованных в порядке диспансеризации. Вирус папилломы человека определяли количественно в

фиксированных препаратах с помощью ПЦР в реальном времени по стандартной методике. Для иммуногистохимического определения CD1a использовали мышинные моноклональные антитела в разведении 1 : 25. У всех пациенток имела место дисплазия плоского эпителия шейки матки, в т.ч. в стадии CIN I - 27 (54,0 %) случаев, CIN II - 15 (30,0 %) случаев, CIN III - 8 (16,0 %) случаев. У некоторых пациенток на фоне дисплазии имели место и другие заболевания гениталий. Вирус папилломы человека в 84,5% случаев относился к группе A9 (типы 16, 31, 33, 35, 52, 58) Применение в комплексном лечении протекфлазида 3,0 Ig D50 уменьшило вирусную нагрузку при генитальной папилломавирусной инфекции и способствовало увеличению количества антигенпрезентирующих клеток. Стандартная терапия уступала по виростатическому и противорецидивному эффекту комбинированному способу лечения с использованием протекфлазида.

Ключевые слова: флавоноидный гликозид , доброкачественное заболевание шейки матки, предраковое заболевание шейки матки.

Summary. Zaporozhan VN, Marichereda VG, Dimcheva LI. **APPLICATION OF FLAVONIVYH GLYCOSIDES PAPILOMAVIRUSNOY THERAPY OF GENITAL INFECTION IN WOMEN.** - *Odessa National Medical University, Odessa, Ukraine.*

Objective - to assess the clinical efficacy of flavonoid glycosides derivatives in the treatment of benign and precancerous cervical disease. The study was conducted at the Odessa Regional Clinic Hospita in 2010-2013. The study involved 80 women of reproductive age (mean age $28,4 \pm 0,2$ years) with verified epithelial cervical dysplasia mild to moderate (index group) and 30 healthy women surveyed in order of medical examination. Human papilloma virus was quantified in fixed preparations using real-time PCR according to standard procedure. For immunohistochemical determination CD1a murine monoclonal antibody in a dilution of 1: 25 was used. All patients had dysplasia of cervical squamous epithelium, including in the stage of CIN I in 27 (54.0%) cases, CIN II - 15 (30.0%) cases, CIN III - 8 (16.0%) cases. Some patients had dysplasia and comorbided diseases of the genitals. Human papillomavirus in 84.5% of cases belong to the group A9 (types 16, 31, 33, 35, 52, 58). Application in the complex treatment

proteflazid 30% reduced viral load in genital human papillomavirus infection and helped to increase the number of antigen-presenting cells. Standard therapy was less effective by virostatic and anti-relapse effect than the combined method of treatment with the use of proteflazid.

Keywords: flavonoid glucoside, benign disease of uterine cervix, precancer disease of uterine cervix.

Рак шийки матки (РШМ) є найбільш поширеною після раку молочної залози злоякісною пухлиною у жінок в розвинених країнах [1]. За даними Національного канцер - реєстру України захворюваність на РШМ в 2011 р. склала 15,4 на 100 тис. населення, смертність - 5,5 на 100 тис. населення [2].

Провідну роль в етіопатогенезі передпухлинних процесів шийки матки та РШМ відіграє вірус папіломи людини [3-5]. З огляду на те, що ділянки дисплазії епітелію шийки різного ступеня тяжкості в 85 % випадків виявляються поряд з ділянками преінвазивного раку, рання діагностика та лікування подібної патології набуває неабиякого значення [6].

Розвиток епітеліальної дисплазії - процес динамічний, перебіг якого залежить від ряду клінічних та біологічних параметрів, таких як активність імунної системи, агресивність типу ВПЛ, вік пацієнтки, давність захворювання, наявність супутньої інфекції. Згідно з даними літератури до 57% дисплазій легкого ступеня, 44 % дисплазій середнього, 32 % дисплазій важкого ступеня спонтанно регресують [1, 3, 5]. Однак причини цього феномену досі є невідомими.

В останні роки було показано, що в інфекційному процесі ВПЛ розрізняють дві стадії: стадію репродуктивної інфекції, коли вірусна ДНК знаходиться у вільному стані, і стадію інтегративної інфекції, коли ДНК вірусу вбудовується в геном інфікованих клітин. Перша стадія є оборотною, і у багатьох інфікованих

настає ремісія. Стадія інтегративної інфекції є першим кроком до пухлинного переродження клітини і дуже часто закінчується розвитком карциноми [1, 3, 4, 6]. Пухлинна трансформація виникає з більшою ймовірністю при взаємодії ВПЛ з іншими канцерогенами або інфекційними агентами. Інтеграція вірусу в геном супроводжується збільшенням синтезу білків E6 і E7, що через ряд реакцій веде до нестримної клітинної проліферації. Стимує її білок P16^{ink-4a}, синтез якого різко збільшується при інтегративній формі ПВІ. Крім того, за даними низки дослідників, одним із шляхів малігнізації клітин, інфікованих ВПЛ, є те, що вірус модифікує клітинний метаболізм таким чином, що клітина набуває здатність перетворювати естрадіол переважно на 16 α -гідроксістерон (16 α -ОН), який є прямим активатором експресії гена E7, відповідального за пухлинну трансформацію клітин [5, 6]. Онкобілок E7, що продукується при цьому з одного боку, активує механізми патологічної проліферації клітин, а з іншого, блокує механізми розвитку імунологічного захисту, які мають певні особливості при ГПВІ [7, 8]. Як і у випадках з іншими хронічними захворюваннями з тривалістю персистування вірусів, при ГПВІ закономірно розвиваються імунодефіцитні стани, які розглядаються як вторинні імунодефіцити, обумовлені недостатністю різних ланок імунної системи [8]. Слід зазначити, що ВПЛ не здатні інфікувати антиген-презентуючі дендритні клітини, що власно й є причиною відсутності прямого шляху активації системи імунітету при ПВІ. Тривалій персистенції ВПЛ сприяє встановлена в низці досліджень здатність вірусу «вислизати» від системного імунного нагляду. Хоча ВПЛ інфікує переважно базальні клітини, реплікація вірусу і збірка вірусних часток відбувається в диференційованих клітинах поверхневого шару епітелію, які піддаються подальшому апоптозу. Цей процес не супроводжується ознаками запалення, а імунна система його практично ігнорує [8, 9]. Однак ефекторні клітини імунної системи при цьому продукують ряд цитокінів (в т. ч. α , β , γ -інтерферони), які знижують транскрипцію генів E6 і E7 у ВПЛ 16, 18 і 33 типів у трансформованих вірусами клітинах. Дисбаланс клітинного імунітету при ПВІ підтверджується такими даними, як поєднання спонтанної регресії гіперпластичних проявів ПВІ з інфільтрацією навколишніх їхніх тканин

лімфоцитами і макрофагами, а також результатами деяких досліджень, які свідчать про зв'язок елімінації ВПЛ з організму з появою відповідей Т - хелперів на С - кінцевий домен вірусного білка Е2 [8].

Одним з найбільш перспективним напрямком у лікуванні та вторинній профілактиці вірусних інфекцій є застосування флавонових глікозидів, які є потужними імуномодуляторами та здатні впливати на активність апоптозу. Нарешті, завдяки здатності впливати безпосередньо на активність вірусоспецифічних ферментів тимидинкінази, ДНК - полімерази, зворотної транскриптази [10, 11] та ДНК - залежної РНК - полімерази, застосування даної групи лікарських засобів чинить виражений віростатичний ефект [10]. Втім, досі ефективність застосування похідних флавонових глікозидів при ГПВІ не була досліджена.

Метою дослідження є оцінка клінічної ефективності похідних флавоноїдних глікозидів при лікуванні доброякісних та передракових захворювань шийки матки.

Матеріали і методи.

Дослідження проведено на базі Обласної клінічної лікарні (м. Одеса , Україна) в 2010 - 2013 р.р. У дослідженні взяли участь 80 жінок репродуктивного віку з верифіковані епітеліальної дисплазією шийки матки легкого та середнього ступеня (основна група) і 30 практично здорових жінок, обстежених в порядку диспансеризації.

Всі пацієнтки, відібрані для участі в дослідженні, були комплексно обстежені згідно і діючих клінічних протоколів, регламентованих наказами № 582 МОЗ України від 15.12.2003 , № 676 від 31.12.2004 та № 624 від 03.11.2008 [12] .

ВПЛ у фіксованих препаратах визначали кількісно за допомогою real-time ПЛР за стандартною методикою.

Для імуногістохімічного визначення CD1a (маркер дендритних клітин) були застосовані мишачі моноклональні антитіла до CD1a (Clone O10, Cat. No.: 1590, Immunotech, Франція) у розведенні 1 : 25. Аналіз мікрофотографій отриманих препаратів проведено з використанням програмного забезпечення ImageJ 1.48d (НИН, США) . Антиген CD207 (трансмембранний лектин II типу - лангерін), що має специфічність до манози і функціонує як рецептор ендоцитозу, визначали кількісно

за допомогою методу імуноблотинга (Langerin Antibody (E -17), Santa Kruz Biotechnology, США). В якості вторинних антитіл використовували Cruz Marker™ протимишачі антитіла IgG-HRP: sc - 2031 (розведення: 1:2000-1:5000). Додатково застосовували реагенти Cruz Marker™ Molecular Weight Standards: sc - 2035, TBS Blotto A Blocking Reagent sc - 2333 і Western Blotting Luminol Reagent: sc - 2048 (США).

Основна група була рандомізовано розділена на дві клінічні підгрупи в залежності від застосованих методів лікування. У I групі (n=40) застосовували стандартну медикаментозну терапію, а у II групі (n=40) призначали прямих противірусний препарат з імуномодулюючою дією протефлазід перорально в краплях протягом 4 - 8 тижнів, і місцево (вагінальними тампонами) по 14 днів 2 рази з перервою в 10 днів у розведенні 1/4 Протефлазід / фізіологічний розчин хлориду натрію.

Статистична обробка проведена методами дисперсійного та кореляційного аналізу з використанням програмного забезпечення Statistica 10.0 (StatSoft Inc., США) [13].

Результати дослідження.

Середній вік обстежених склав $28,4 \pm 0,2$ років. У всіх пацієнток визначалася дисплазія плоского епітелію шийки матки, в т.ч. у стадії CIN I - 27 (54,0 %) випадків, CIN II - 15 (30,0 %) випадках, CIN III - у 8 (16,0 %). У деяких пацієнток на тлі дисплазії спостерігалися різні запальні захворювання геніталій: вульвовагініт (6,0 %), бактеріальний вагіноз (12,0 %), цервіцит (6,0 %), кандидоз (4,0 %), хронічний ендометрит (10,0 %).

У структурі екстрагенітальної патології переважали захворювання ЛОР - органів (назофарингіт (6,0 %), тонзиліт (4,0%), гайморит (2,0 %), верхніх дихальних шляхів (бронхіт, 4,0 %), сечовидільної системи (хронічний пієлонефрит, 4,0 %), гломерулонефрит (2,0 %), цистит (4,0 %), шлунково - кишкового тракту (гастрит, 4,0 %), гастродуоденіт (4,0 %), ДЖВШ (2,0 %), нейроциркуляторна дистонія (10,0 %) та алергічні захворювання (поліноз, atopічний дерматит і т.п.). До групи осіб, що часто хворіють (чотири і більше випадків гострих респіраторних інфекційних захворювань на рік) належали 14 (28,0 %) пацієнток ВПЛ - інфекція була

верифікована у 82,0 % обстежених пацієнток. Значення ВПЛ-контролю варіювали в межах 1000-6628 копій-пар. Встановлено, що в більшості випадків (78,0 %) пацієнток рівень вірусного навантаження не перевищував 5 lg на 10^5 клітин. У жінок контрольної групи безсимптомний перебіг ГПВІ зазначалося в 13,3 % випадків з вірусним навантаженням на рівні порога клінічної значущості (2-3 lg на 10^5 клітин). У переважній більшості випадків (85,4 %) визначалися віруси папіломи людини групи А9, до якої належать типи 16, 31, 33, 35, 52, 58. В одному випадку були визначені високі (6,5 lg на 10^5 клітин) титри ВПЛ групи А5/А6, до якої відносяться типи 51, 56). Випадків виділення ВПЛ групи А7 (типи 18, 39, 45, 59) не було .

У всіх пацієнток з цервікальними неоплазіями відзначалося зменшення популяції CD1a+ і CD83+ клітин в цервікальному епітелії. При цьому число незрілих CD1a+ дендритних клітин у пацієнток з цервікальною інтраепітеліальною неоплазією в середньому склало $2,7 \pm 0,1$ в полі зору, а зрілих CD83+ дендритних клітин - $0,02 \pm 0,002$ в полі зору , тоді як у здорових жінок ці показники склали відповідно $3,1 \pm 0,1$ CD1a + в полі зору , і $0,04 \pm 0,003$ CD83 + в полі зору.

Подальші дослідження показали, що стандартна терапія поступалася за віростатичним та протирецидивним ефектом лікуванню із застосуванням протеплазиду. Так, вірусне навантаження ВПЛ після лікування знизилося на 3,0 lg D. 50 (рис. 1)

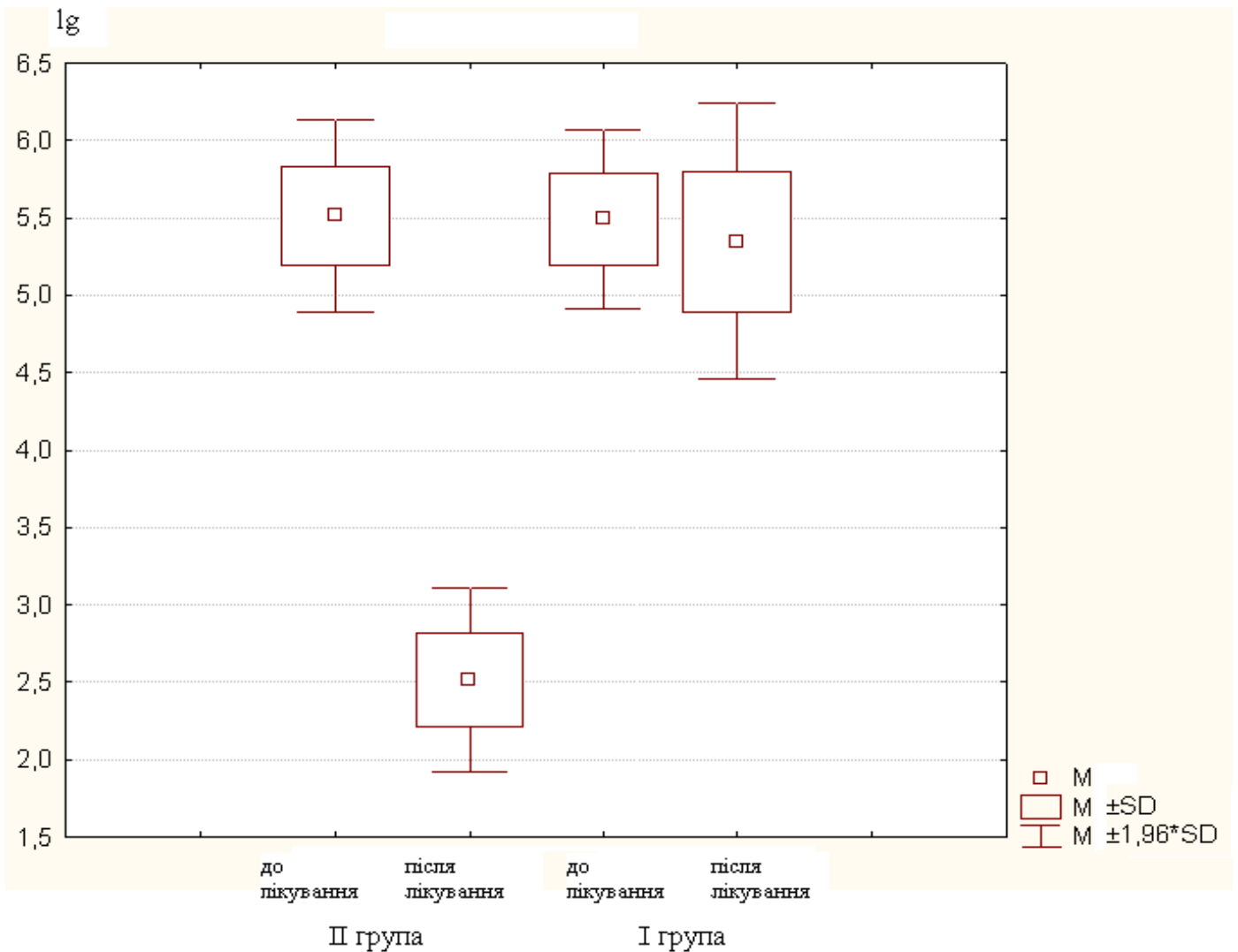


Рис. 1 Динаміка вірусного навантаження ВПЛ у групах дослідження

Як видно з наведеного рисунка у пролікованих за звичайною схемою вірусне навантаження практично не змінилося при суттєвому зростанні дисперсії показника, тоді як у II групі було досягнуто суттєве зниження кількості вірусу, на 3,0 lg D50.

Водночас, відбулося збільшення кількості дендритних клітин, що свідчить про позитивний вплив флавоноїдних глікозидів на стан клітинного імунітету. Так під впливом проведеного лікування значно зросла кількість незрілих ДК, маркером яких є CD1a (рис. 2).

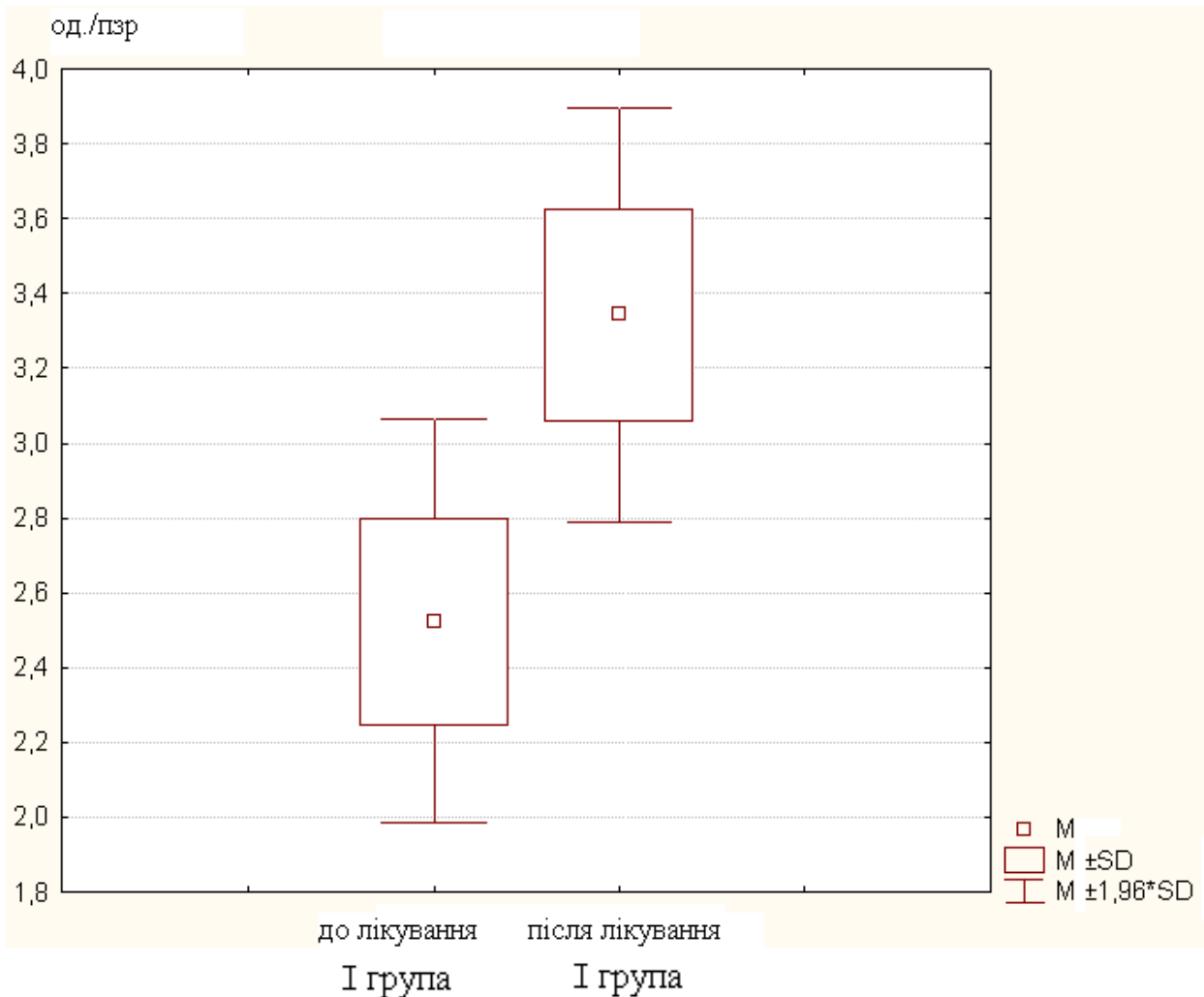


Рис. 2. Динаміка популяції незрілих дендритних клітин у обстежених жінок

Подібна динаміка спостерігалася й щодо чисельності зрілих ДК, зокрема CD83+ (рис. 3)

Таким чином, результати клінічного досвіду системного та вагінального застосування похідних флавоноїдних глікозидів у лікування доброякісної та передракової патології шийки матки дозволяють констатувати достатньо високу ефективність цього препарату. Стандартна терапія поступається за віростатичним та протирецидивним ефектом комбінованому лікуванню із застосуванням протекфлазиду. Зважаючи на те, що застосування протекфлазиду на 3,0 Іg D50 зменшує вірусне навантаження при ГПВІ, а також при цьому зростає кількість антигенпрезентуючих клітин, доцільне застосування даного препарату у складі комплексної терапії в усіх пацієнтів з ГПВІ є очевидним.

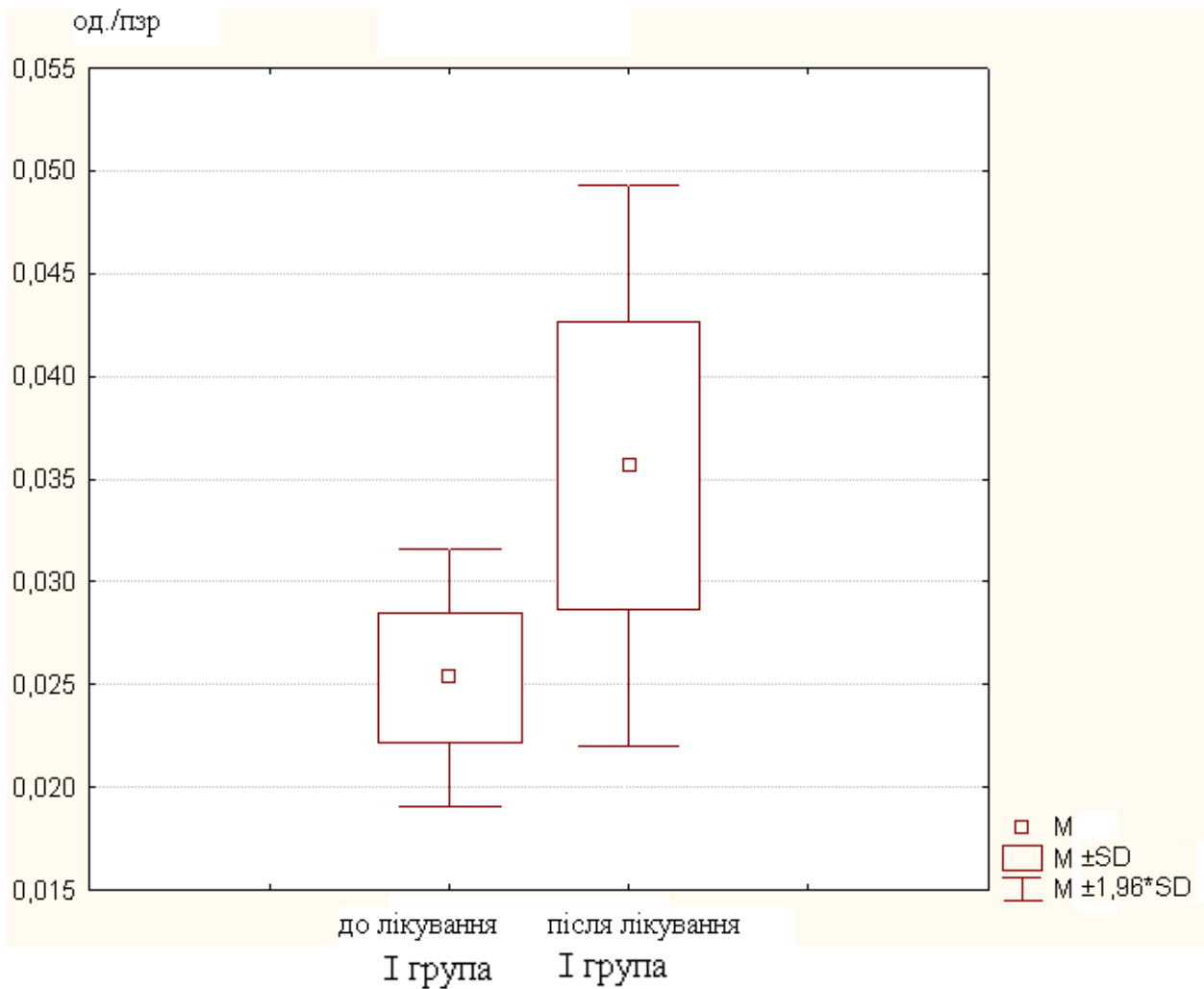


Рис. 3. Динаміка популяції зрілих дендритних клітин у обстежених жінок

Висновки:

1. Застосування протекфлазиду на 3,0 Іg D50 зменшує вірусне навантаження при ГПВІ
2. Під дією протекфлазиду зростає кількість антигенпрезентуючих клітин.
3. Стандартна терапія поступається за віростатичним та протирецидивним ефектом комбінованому лікуванню із застосуванням протекфлазиду.

Литература:

1. Mild obesity, physical activity, calorie intake, and the risks of cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer. / Lee JK, So KA, Piyathilake CJ, Kim MK. // PLoS One. 2013 Jun 12;8(6):e66555
2. Comprehensive control of human papillomavirus infections and related diseases. / Bosch FX, Broker TR, Forman D [et al.] // Vaccine. - 2013 – Vol. 31 Suppl 6: G1-G31
3. The Globocan project. Estimated Cancer Incidence, Mortality & Prevalence Worldwide in 2012. Електронний ресурс. Режим доступу: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx
4. Національний канцер-реєстр України. Рак шийки матки. Електронний ресурс. Режим доступу: http://www.ncru.inf.ua/publications/BULL_14/PDF/16-shm.pdf
5. Михайлович Ю.Й. Скринінг раку в Україні: коли теорія відповідає реальності. Соціально-економічне обґрунтування популяційного скринінгу раку шийки матки. / Михайлович Ю.Й., Журбенко А.В. // Клінічна онкологія. - 2011 - №3 - С. 6-11
6. Developing role of HPV in cervical cancer prevention. / Kitchener HC, Denton K, Soldan K, Crosbie EJ. // BMJ. - 2013 – Vol. 347 - f4781
7. Шелестова Л.П. Фонові й передракові захворювання жіночих статевих органів. / Л.П. Шелестова // Медико-соціальні проблеми сім'ї. – 2012 – т. 17, № 3–4 – С. 120-123
8. Schiffman M. Clinical practice. Cervical-cancer screening with human papillomavirus and cytologic cotesting. / Schiffman M, Solomon D. // N Engl J Med. - 2013 – Vol. 369(24) – P. 2324-2331
9. Risk factors and clinical aspects of recurrent invasive cervical carcinoma. / Ghaemmaghami F, Saleh-Gargari S, Sahebdel B [et al.] // J Obstet Gynaecol India. - 2012 – Vol. 62(6) – P. 674-648
10. Годлевська Н. А. Ефективність системного та місцевого застосування препарату Протефлазід у лікуванні патології шийки матки, спричиненої

