

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
УРГЕНЧСКИЙ ФИЛИАЛ ТАШКЕНТСКОЙ МЕДИЦИНСКОЙ
АКАДЕМИИ**

« УТВЕРЖДАЮ»

Председатель научно-технического совета

Министерства Здравоохранения

_____ **Ш.К.Атажанов**

« ____ » _____ 2025 г.

Ш.А.Юсупова, Ваисов А. Ш., И.А.Ваисов

**«КЛИНИЧЕСКИЕ, ИММУНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ
НАРУШЕНИЯ РЕГУЛЯЦИИ ПРОТИВОВИРУСНОГО ИММУНИТЕТА
И РАЗВИТИЕ ПАПИЛЛОМАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ У ЖЕНЩИН»**

(Монография)

Ташкент – 2025

УДК: 618.146-006.6-022.7:578.827.1:575-036

Составители:

Юсупова Ш.А. –старший преподаватель кафедры “Внутренних болезней и дерматовенерологии” Ургенчского филиала ТМА

Ваисов А. Ш. – профессор кафедры дерматовенерологии и косметологии ТМА.

Ваисов И.А. – доктор медицинских наук, доцент кафедры дерматовенерологии и косметологии ТМА.

Рецензенты:

Юсупова М.А.- Заведующая кафедры подготовки семейных врачей ТМА Ургенчского филиала, д.м.н., доцент.

Алиев А.Ш. - Старший преподаватель кафедры дерматовенерологии и косметологии ТМА, PhD

Монография утверждена и разобрана на заседании кафедры Внутренних болезней и дерматовенерологии при Ургенчском филиале ТМА

« 6 » 02 2025 г. №10

Утверждено и разобрано на проблемной комиссии терапевтических направлений при Ургенчском филиале ТМА

« 18 » 02 2025 г. № 6

Утверждено и разобрано на учебном совете при Ургенчском филиале ТМА

« 28 » 02 2025 г. № 7

Монография посвящена основным проблемам клиники, диагностики, терапии и профилактики папилломавирусной инфекции у женщин, а также содержит новейшую информацию о методах генотипической диагностики в зависимости от предрасположенности к данной инфекции.

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	6
ВВЕДЕНИЕ.....	7
ГЛАВА I. СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ ОБ ЭТИОЛОГИИ, ПАТОГЕНЕЗЕ, КЛИНИЧЕСКОМ ТЕЧЕНИИ, ИММУНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРАХ ПРИ ОСТРОКОНЕЧНЫХ КОНДИЛОМАХ	9
§1.1. Патолофизиология папилломавирусной инфекции	9
§1.2. Классификация вирусов папилломы человека	10
§1.3. Геномная организация	12
§1.4. Иммунный ответ	16
§1.5. Роль иммуногенетических вариаций при ВПЧ.....	17
§1.6. Роль цитокинов при ВПЧ.....	18
§1.7. Роль врожденного иммунитета при ВПЧ	22
ГЛАВА II. СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРИ ОСТРОКОНЕЧНЫХ КОНДИЛОМАХ	28
§2.1. Клинические методы исследования	28
§2.2. Характеристика методов исследования.....	29
§2.3. Методы исследования.....	30
2.3.1. Клинико-anamнестические методы исследования.....	30
2.3.2. Исследование основных гематологических показателей	31
2.3.3. Микроскопические исследования мазков генитального тракта	31
2.3.4. Метод кольпоскопии	32
2.3.5. Выявление ДНК ВПЧ 12 высокоонкогенных типов.	32
2.3.6. Молекулярно-генетические методы исследования.....	32
§2.4. Методы терапии	34
2.4.1. Проведение лазерной вапоризации.....	34
2.4.2. Техника местного применения 5% крема Имиквимод	35
§2.5. Статистические методы обработки результатов исследования	35

ГЛАВА III. КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНО-ИНСТРУМЕНТАЛЬНЫЕ АСПЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ БОЛЬНЫХ С ОСТРОКОНЕЧНЫМИ КОНДИЛОМАМИ	36
§3.1. Инструментальные методы исследования при помощи расширенной кольпоскопии	44
§3.2. Анализ показателей ВПЧ-типирования обследуемых женщин	45
ГЛАВА IV. АНАЛИЗ РАСПРОСТРАНЕННОСТИ АЛЛЕЛЬНЫХ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ ЦИТОКИНОВ (TNF-α RS1800629, IL-10 RS1800896), ТОЛЛ-ПОДОБНОГО РЕЦЕПТОРА - 9 (TLR - 9 RS5743836) И СУПРЕССОРА ОПУХОЛИ (TP-53 RS1042522) У ЖЕНЩИН С ОСТРОКОНЕЧНЫМИ КОНДИЛОМАМИ С ОПРЕДЕЛЕНИЕМ ИХ РОЛИ В РАЗВИТИИ ЗАБОЛЕВАНИЯ	48
§4.1. Анализ распределения аллельного полиморфного гена цитокина фактора некроза опухоли – α (TNF - α rs1800629) в группах пациенток с остроконечными кондиломами и здорового контроля с оценкой его ассоциативных связей в повышении риска развития остроконечных кондилом	55
§4.2. Анализ распределения аллельного полиморфного гена цитокина интерлейкина – 10 (IL-10 rs1800896) в группах пациенток с остроконечными кондиломами и здорового контроля с оценкой его ассоциативных связей в повышении риска развития остроконечных кондилом	61
§4.3. Анализ распределения аллельного полиморфного гена Толл подобного рецептора – 9 (TLR - 9 rs5743836) в группах пациенток с остроконечными кондиломами и здорового контроля с оценкой его ассоциативных связей в повышении риска развития остроконечных кондилом	67
§4.4. Анализ распределения аллельного полиморфного гена супрессора опухоли (Tp-53 rs1042522) в группах пациенток с остроконечными кондиломами и здорового контроля с оценкой его ассоциативных связей в повышении риска развития остроконечных кондилом	73
ГЛАВА V. ТЕРАПИЯ БОЛЬНЫХ С ОСТРОКОНЕЧНЫМИ КОНДИЛОМАМИ	81
§5.1. Методы терапии пациентов с остроконечными кондиломами	81
§5.2. Оценка клинической эффективности лечения остроконечных кондилом	85

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	92
ПРИЛОЖЕНИЯ	109

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ИППП	– инфекции, передаваемые половым путем
ВЗОМТ	– воспалительные заболевания органов малого таза
ВОЗ	– Всемирная Организация Здравоохранения
ВПЧ	– вирус папилломы человека
ПВИ	– папилломавирусная инфекция
ПЦР	– полимеразная цепная реакция
МПЭ	– многослойный плоский эпителий
TLR	– толл подобные рецепторы
TNF	– фактор некроза опухоли
IL	– интерлейкин
ASC-US	– atypical squamous cell undertermined significance (атипические клетки плоского эпителия неопределенного значения)
CIN	– cervical intraepithelial neoplasia (цервикальная интраэпителиальная неоплазия)
L-SIL	– low grade squamous intraepithelial lesion (плоскоклеточные интраэпителиальные поражения низкой степени тяжести)
H-SIL	– high grade squamous intraepithelial lesion (плоскоклеточные интраэпителиальные поражения высокой степени тяжести)
ОК	– остроконечные кондиломы
ПИЧ	– папилломавирусная инфекция человека
РМЖ	– рак молочной железы
РШМ	– рак шейки матки

ВВЕДЕНИЕ

В мире, в последние годы все больший интерес ученых и практических специалистов привлекают вопросы изучения папилломавирусной инфекции человека. Данный интерес, прежде всего связан с неуклонным ростом ее распространенности, высокой контагиозностью и доказанной онкогенностью. По данным Всемирной организации здравоохранения, «...50-80% населения инфицировано вирусом папилломы человека, но лишь 5-10% инфицированных лиц имеют клинические проявления заболевания...»¹. Известно, что вирус папилломы человека, имеет более 300 разновидностей, которые и обуславливают многообразие поражений кожи и слизистых оболочек. До настоящего времени недостаточно изучены факторы, лежащие в основе неблагоприятного течения папилломавирусной инфекцией кожи и слизистых оболочек аногенитального тракта, в частности при остроконечных кондиломах: роль обще-средовых воздействий неблагоприятных факторов окружающей среды, общего состояния организма, наследственной предрасположенности, изменений механизмов реализации процессов, ассоциированных с папилломавирусной инфекцией и частота неблагоприятных иммуно-генетических вариаций.

В мире проводится целый ряд научных исследований, направленных на совершенствование ранней диагностики, лечения и профилактики инфекции передоваемой половым путём, в том числе инфекции, вызванной вирусом. В этом отношении определение значимых патогенетических факторов развития вируса папилломы человека, выявление молекулярно-генетических особенностей, а также оценка наличия рецидивов ее течения и исходов, представляют важное значение.

В нашей стране проводится большая работа по совершенствованию системы здравоохранения и социальной защиты населения, адаптации медицинской системы к требованиям мировых стандартов, ранней

¹ WHO Cervical Cancer Prevention and Control Costing (C4P) tool. Geneva: World Health Organization ([https://www.who.int/tools/who-cervical-cancer-prevention-and-control-costing-\(c4p\)-tool](https://www.who.int/tools/who-cervical-cancer-prevention-and-control-costing-(c4p)-tool), accessed 6 October 2020).

диагностики, лечения и профилактики заболеваний. В поднятии уровня медицинского обслуживания населения на новый уровень важны задачи, направленные на «...внедрение современных методов диагностики и лечения, оказание качественных медицинских услуг, в том числе внедрение и развитие телемедицины...»² были определены. При реализации этих задач желательно не допускать распространения различных инфекций передающихся половым путем среди населения, поднимать на новый уровень уровень современного медицинского обслуживания, использовать современные технологии, разрабатывать эффективные методы лечения и профилактики.

Данное диссертационное исследование способствует реализации важных задач, предусмотренных в Указе Президента Республики Узбекистан от 12 ноября 2020 года УП-6110 «О мерах по внедрению совершенно новых механизмов в деятельности учреждений первичной медико-санитарной помощи и дальнейшему повышению эффективности реформ в системе здравоохранения», в Постановлении Президента Республики Узбекистан от 2 октября 2020 года ПП-4847 «О мерах по дальнейшему совершенствованию системы государственного управления в сфере здравоохранения», в Постановлении Президента Республики Узбекистан от 12 ноября 2020 года ПП - 4891 «О дополнительных мерах по обеспечению общественного здоровья путем дальнейшего повышения эффективности работ по медицинской профилактике», в Постановлении Президента Республики Узбекистан от 11 ноября 2021 года ПП-6 и других нормативно-правовых документах, связанных с данной деятельностью.

² Указ Президента Республики Узбекистан УП-5124 от 25 мая 2021 года «О дополнительных мероприятиях по комплексному развитию системы здравоохранения».

ГЛАВА I. СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ ОБ ЭТИОЛОГИИ, ПАТОГЕНЕЗЕ, КЛИНИЧЕСКОМ ТЕЧЕНИИ, ИММУНО- ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРАХ ПРИ ОСТРОКОНЕЧНЫХ КОНДИЛОМАХ

§1.1. Патопфизиология папилломавирусной инфекции

Существенные трудности в определении персистенции, своевременной диагностики, лечения основного заболевания связанных с вирусом папилломы человека, обуславливает крутой скачок заболевания населения, максимальной контагиозностью вируса и особенностью порождать злокачественные патологии [2; с. 63, 4; с. 71, 6; с. 7, 7; с. 23]. В настоящее время вирус папилломы человека (ВПЧ) считается причиной нескольких изменений в шейке матки, которые считаются причинами развития рака шейки матки высокого риска, и основным критерием является заражение вирусом, ранняя диагностика, частые рецидивы и длительное сохранение вируса [1; с. 361, 3; с. 30].

В 1933 году был описан первый вирус папилломы - вирус папилломы Шоупа [10; с. 43]. Через некоторое время этот вирус был назван вирусом папилломы кролика с хлопковым хвостом (CRPV), и было обнаружено, что он вызывает появление бородавок у кроликов [132; с. 128]. Несколько лет спустя исследования показали, что бородавки, вызванные CRPV, потенциально могут переродиться в злокачественные. У семи из десяти домашних кроликов, у которых папилломы сохранялись более 200 дней, развился рак из-за папиллом [102; с. 1830].

В 1972 году у пациентов с редким наследственным заболеванием иммунодефицита, называемым эпидермодисплазией бородавок, была обнаружена связь между вирусом папилломы человека (ВПЧ) и кожными бородавками [9; с. 75]. Несколько лет спустя первый вирус папилломы человека был выделен из кожных бородавок [17; с. 832, 18; с. 256].

В 1980 году ВПЧ 6 типа был идентифицирован как основная причина ОК [20; с. 260]. В то время предполагалось, что два типа вирусов могут играть роль в развитии рака шейки матки - вирус простого герпеса (ВПГ) и вирус папилломы человека (ВПЧ) как этиологический фактор ОК [14; с. 192]. Однако связь между генитальными типами ВПЧ и раком шейки матки не была подтверждена Харальдом Цурхаузенем и его сотрудниками до конца 1970-х годов, поскольку они не смогли обнаружить ВПГ в образцах рака шейки матки [148; с. 1]. В 1983 году первый вирус онкогена папилломы человека (ВПЧ 16) был выделен из рака шейки матки путем гибридизации ВПЧ 11 с ДНК [50; с. 22]. В 1999 году было установлено, что ВПЧ является причиной почти всех случаев рака шейки матки в мире [51; с. 3]. В 2008 году Харальд Цур Хаузен был удостоен Нобелевской премии по медицине и физиологии за свою исследовательскую работу, которая доказала этиологическую связь между вирусом папилломы человека и раком шейки матки [148; с. 1].

§1.2. Классификация вирусов папилломы человека

«Различные виды папилломавирусов (ПВ) классифицируются как "типы", а классификация основана на последовательности наиболее консервативного гена в геноме ПВ» - гене L1 с открытой рамкой считывания (ORF) [8; с. 34, 11; с. 359, 66; с.8]. Данная идентичность гена L1 в порядке ДНК, делит новый ПВ на род, вид, подтип или вариант. ПВ в пределах одного рода имеют сходство более чем на 60%, и новый ПВ имеет менее чем 90% сходства с любым другим известными типами ПВ. Определение подтип имеет сходство нуклеотидов на 90-98%. Варианты разделяют при сходстве более 98% [67; с. 18, 68; с. 100].

Вирусы папилломы человека (ВПЧ) подразделяются на пять различных родов: альфа, бета, гамма, ню и мю. Наиболее крупными родами являются альфа, бета и гамма, в то время как роды ню и мю состоят только из трех типов ВПЧ: 1, 41 и 63 [82; с. 97, 84; с. 44].

Вирус папилломы человека (ВПЧ) также можно разделить на типы поражающие слизистые оболочки и типы, поражающие кожу. Вирусы альфа-папилломы обычно обнаруживаются на слизистых оболочках, в то время как вирусы бета- и гамма-папилломы обнаруживаются на коже [16; с. 103, 27; с. 70, 28; с. 75].

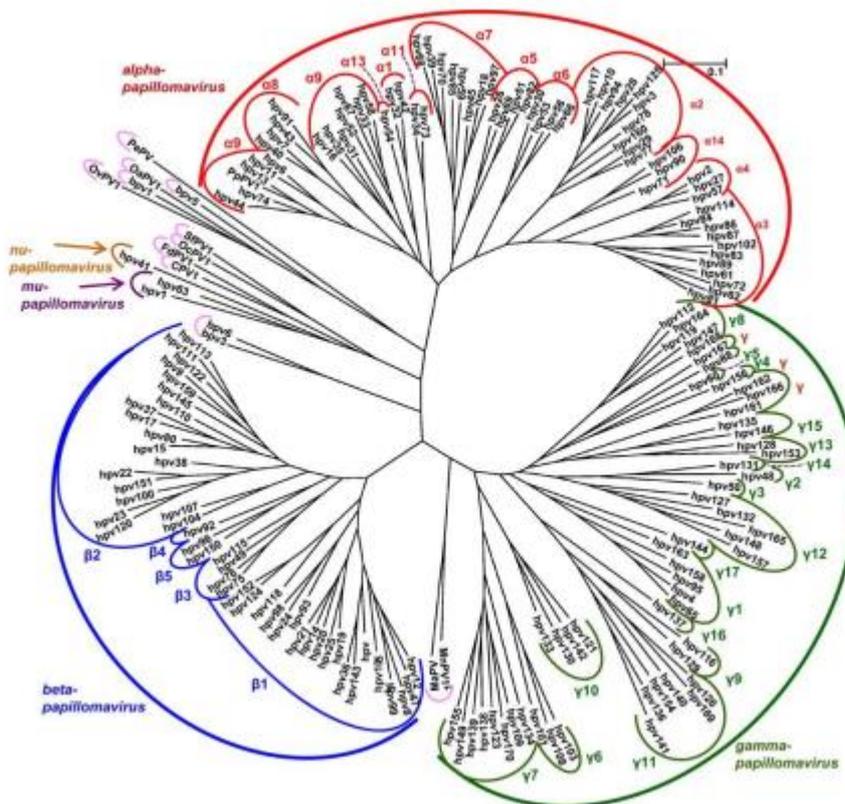


Рис. 1.1. «Изображение филогенетического дерева на основе последовательностей гена L1 в 170 типах вирусов папилломы человека (ВПЧ), а также вирусов папилломы животных», было перепечатано из работы de Villiers "Crossroads in the classification of papillomaviruses" *Virology* 2013; 445:2-10, [29; с. 233; 66; с. 8].

Вид ВПЧ поражающий слизистую оболочку

Род альфапапилломавирусов включает в себя 65 различных типов вирусов папилломы человека (ВПЧ), которые разделены на 13 видов и обычно обнаруживаются на слизистых оболочках. Однако существует несколько альфа-типов, которые в основном обнаруживаются на коже и относятся к типам 2, 4 и 8 [113; с. 74]. Род альфа делится на типы высокого риска (онкогенный / канцерогенный) и типы низкого риска

(неонкогенный) в зависимости от их способности вызывать рак, в основном рак шейки матки [52; с. 895, 54; с. 39]. Согласно Международному агентству по исследованию рака (IARC) (2012 г.), следующие типы ВПЧ считаются канцерогенными: «ВПЧ 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 и 59» [34; с. 40, 80; с. 27]. К этому списку также могут быть добавлены типы ВПЧ 68, 73 и 82, а ВПЧ 16 считается потенциально высокорисковым типом [111; с. 106]. ВПЧ 16 и 18 обнаруживаются чаще всего при раке шейки матки. Остальные типы ВПЧ рода альфапапиллом считаются типами низкого онкогенного риска – это типы 6 и 11, которые являются основной причиной остроконечных кондилом (генитальные бородавки) [120; с. 41, 121; с. 77].

Первые типы вирусов папилломы человека (ВПЧ), включая ВПЧ 1, 2, 3 и 4, были выделены из человеческих бородавок в 1970-х годах с использованием расщепления рестрикционными ферментами и гель-электрофорезом [124; с. 280]. Полный геном был клонирован в 1980 году [126; с. 3]. Несколько лет спустя, были изолированы ВПЧ 16 и 18 [127; с. 229]. После появления полимеразной цепной реакции (ПЦР) ген L1 и вырожденные праймеры сыграли большую роль в открытии новых типов ВПЧ, таких как пара праймеров CP65/CP70 для обнаружения бородавчатой эпидермодисплазии, ассоциированной с ВПЧ [128; с. 314], праймеры GP5/6 для выявления типов ВПЧ слизистых оболочек [130; с. 387], праймеры GP5+/6+ (39), праймеры MY09/11 для обнаружения ВПЧ так же слизистых оболочек [33; с. 504], праймеры PGMY09/11 для обнаружения широкого спектра типов ВПЧ [36; с. 377] и других типов [57; с. 667, 58; с. 953].

§1.3. Геномная организация

Папилломавирусы – это вирусы без оболочки диаметром около 60 нм. кольцевой геном представляет собой двухцепочечную ДНК, защищенную икосаэдрический капсидом, состоящий из двух протеинов; L1 и L2. Согласно последним сообщениям Mastutik G и соавт. 2021 «геном вируса папилломы (ПВ) разделен на три области: I) начальная область, начинающаяся с гена E6

и заканчивающаяся генами E2 или E5; II) конечная область с генами L2 и L1; и III) область обратной регуляции (upstream regulatory region, URR) между генами L1 и E6 (см. Рисунок 1.2). URR также называется длинной контрольной областью (LCR) или некодирующей областью (NCR). Транскрипция осуществляется только с одной цепью ДНК в качестве шаблона» [99; с. 27; 102; с. 1833].

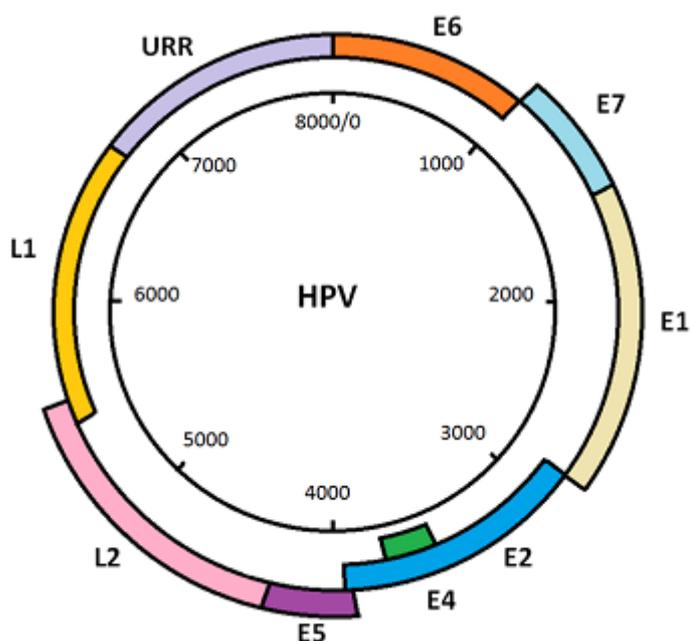


Рис. 1.2. Схематическое изображение геномной организации ВПЧ.

Фактически, E6 и E7 являются наиболее важными онкогенными белками генома вируса папилломы человека (ВПЧ). Когда в дифференцированных кератиноцитах происходит аномальный синтез вирусной ДНК, обычно запускается механизм клеточной защиты, который разрушает такие клетки посредством апоптоза, дифференцировки и старения [105; с. 268]. Основная роль E6 с высоким риском заключается в устранении апоптотического ответа путем убиквитинирования и мечения для деградации белка p53 [87; с. 88, 107; с. 35]. p53 является белком-супрессором опухолей, который косвенно вызывает остановку клеточного цикла или апоптоз в ответ на повреждение ДНК [90; с. 110, 109; с. 1864].

Во время каждого цикла репликации ДНК теломеры на хромосомах укорачиваются, что ограничивает пролиферативную способность здоровых клеток. Однако, E6 высокого риска вируса папилломы человека может

стимулировать экспрессию гена hTERT, субъединица теломеразы, которая способствует увеличению продолжительности жизни клетки и ее увековечиванию [110; с. 101, 112; с. 1513].

Одной из главных функций белка E7 является связывание и деградация белков, принимающих участие в регуляции клеточного цикла, к ним относятся, в частности белки семейства ретинобластомы (Rb). Данная деградация белка-супрессора опухоли Rb поддерживает размножение вируса, способствуя включению клетки в клеточный цикл в дифференцированных эпителиальных клетках [92; с. 79, 125; с. 2880]. E7 высокого риска связывают и расщепляют pRb более эффективно, чем другие типы ВПЧ. Персистирующая инфекция, так же, приводит к повышенной экспрессии онкогенов ВПЧ E6 и E7, необходимые для злокачественной трансформации [93; с. 265, 131; с. 100].

Тем не менее поражение эпителиального ряда клеток ВПЧ – этиологически необходимое, но не основополагающее событие в появлении опухолевого процесса, перерождение в раковые клетки происходит по причине длительно протекающей персистенции ВПЧ [56; с. 227, 77; с. 2037]. До сегодняшнего дня исследователям не удается точное определение сроков нахождения вируса в клетках женщины для появления неоплазии, так во многих случаях малигнизация может появляться после короткого периода персистирования, в то же время при других эпизодах ВПЧ самопроизвольно исчезает после длительного пребывания в организме [5; с. 31]. Промежуточное время, которое необходимо для развития инфекции и появления предраковых изменений, около 5 лет, латентный период перехода в РШМ – 15 лет. Из вышеуказанного следует, что развитие из одной стадии атипизации эпителия в другую проистекает довольно длительное время, доставляя потенциал врачу предпринимать все надобные для предупреждения необратимого онкологического отклонения [15; с. 45, 59; с. 430, 65; с. 413].

Разбор проведенных обследований изобразил, свыше 90% больных до 30 лет, заражены низкоонкогенными типами ВПЧ, и у 70% инфицированных типами высокого онкогенного риска ПВИ, вероятен неожиданный регресс ВПЧ – инфекции [43; с. 192, 48; с. 60]. С возрастом инфицированность ВПЧ убавляется, но возможность вирусной персистенции увеличивается. Следовательно, у женщин до 30 лет совершается стремительная элиминация от вируса и снижение симптомов заболевания, чем у женщин в более старшем возрасте [71; с. 1016]. Значительными исследованиями о роли ВПЧ в неоплазиях обосновано, что длительное протекание типов ВПЧ среднего и высокого онкогенного риска выше 20 лет увеличивает риск развития РШМ в 100 раз. Следовательно, длительная персистенция, внезапная регрессия и формирование только у 1 больной из 5 больных РШМ позволяют сделать вывод, что ВПЧ высоко-онкогенного типа проявляется не одним-фактором, но потребным причинным фактором-риска разностороннего процесса канцерогенеза [73; с. 526].

Возможно, одной из главных этиологических обстоятельств продолжительного наличия вируса, резистентности к лечению, значительной частоты рецидивирования и присутствие цитопатологических трансформаций может быть свойство ВПЧ «скрываться» от иммунного распознавания [12; с. 77]. Для реализации предоставленного механизма у вируса располагается несколько картин иммуносупрессивного воздействия. Во-первых, так как размножается вирус в кератиноцитах, а у эпителиальных клеток недолгий срок жизни – вирус не разрушает пораженные клетки [13; с. 28]. Во-вторых, вирус не выявляет цитопатических способностей, что так же уменьшает его воспалительную возможность и мощь иммунного ответа. В – третьих фаза виремии отсутствует в периодах формирования ПВИ, по этой причине антитела к ВПЧ либо не формируются, либо появляются в очень небольшой концентрации, что иммунная система не способна обеспечить защиту от болезни [45; с. 390]. В – четвертых сдерживание иммунитета связано с деятельностью вирусных белков ВПЧ. В следствии этого процесса,

синтез иммуногенных протеинов проходит медленно, задерживая силу противовирусного иммунитета. Наряду с вышеупомянутыми, белки Е6 и Е7 вируса задерживают образование антигенпрезентирующих клеток, при этом в несколько раз понижается распознавание пораженных клеток иммунными клетками хозяина и снижается активность внутренних интерферонов. Результатом является то, что отсутствие баланса в иммунной системе служит главной причиной клинических симптомов ПВИ, её долговременного персистирующего и рецидивирующего течения [62; с. 60].

Физиология противoinфекционной защиты слизистой мембраны гениталий изучены недостаточно, чем локальный иммунитет дыхательной системы, кишечника, или полости рта. Роль местного иммунитета в защите от ВПЧ изучена у пациенток с иммунодефицитами: выявлено, что от иммунного статуса ВИЧ-инфицированных пациенток напрямую зависит степень поражения шейки матки [78; с. 3050]. Дисплазия шейки матки и остроконечные кондиломы половых органов у пациентов повышается в 16 раз при иммуносупрессии после трансплантации почки по сравнению с общей популяцией. Осложнением иммунных нарушений, является уменьшение контроля над размножением вируса, а также проявления клинических симптомов или наличие рецидивов [89; с. 81].

Доказано, что ВПЧ является причиной хронических воспалительных заболеваний половых органов, кроме того, развивает данные процессы. При протекании этих процессов происходит недостаточность многих систем иммунной системы: т.е. снижение показателей Т-клеточного иммунитета, функциональная деятельность НК-клеток и акцентирование главных классов иммуноглобулинов также уменьшается [95; с. 1027].

§1.4. Иммунный ответ

Клеточно-опосредованный иммунный ответ (СМІ) отвечает за клиренс, связанный с ВПЧ инфекцией и доброкачественными поражениями, и сопровождается реакцией с преобладанием CD4+ Т-клеток [98; с. 16].

Отсутствие эффективного ответа на клеточно-опосредованный иммунитет, сопровождаемое инфекцией ВПЧ высокого риска, может привести к персистирующей инфекции и повышенной вероятности интраэпителиальной неоплазии высокой степени и инвазивной карциномы [100; с. 7]. Инфекция ВПЧ эффективно уклоняется от распознавания врожденным иммунитетом, благодаря тому факту, что ВПЧ является исключительно внутриклеточной инфекцией; при котором отсутствует вирусемия, вирус-индуцированная гибель клеток и воспаление, связанное с репликацией [108; с. 1093]. ВПЧ также подавляет врожденные иммунные сигналы; что приводит к ингибированию интерферонов I типа (ИФН- α и ИФН- β), отсутствию сигналов для активации/миграции клеток Лангерганса и отсутствие рекрутирования стромальных дендритных и макрофагальных клеток [104; с. 5]. Уклонение от этих иммунных реакций позволяет инфекциям сохраняться в течение месяцев до нескольких лет, и это может привести к интраэпителиальной неоплазии высокой степени и активизации белков E6 и E7, что еще больше подавляет иммунный ответ [116; с. 1082]. После инфицирования ВПЧ, неделящиеся эпителиальные клетки сохраняют нормальный активный клеточный цикл, что может привести к утолщению эпителия и экзофитным поражениям. Вирус высвобождается по мере отслаивания эпителиальных клеток [122; с. 54].

§1.5. Роль иммуногенетических вариаций при ВПЧ

Современная медицина все больше развивается с развитием принципов персонифицированной, или профилактической медицины, которые на сегодняшний день решают многие проблемы улучшение качества диагностики и лечения. Данные методы возможны при помощи учета редких свойств его генома у определенного человека [133; с. 127]. Изучение генов-маркеров позволяет осознание патогенетических механизмов большого числа заболеваний [139; с. 24].

В фундаментальную нишу профилактической медицины заложены тезисы о генетическом полиморфизме. При определенных условиях часть полиморфизмов предрасполагают, часть из них препятствует развитию болезни. Кроме того, для развития болезни необходим не один полиморфизм, а комбинация нескольких [30; с. 90]. За генетическую предрасположенность SNP - отвечают точечные замены. SNP-мутации представляют собой аллели, ассоциированные с разными мультифакториальными заболеваниями [32; с. 310]. Масштабные исследования подтвердили, что генетические полиморфизмы - распространены [35; с. 800] но аллельные вариации генов цитокинов и рецепторов врожденного иммунитета появляются в результате мутаций в не расшифровываемых участках генов [40; с. 1308].

Генетическая изменчивость иммунных рецепторов, включая TLR, может влиять на чувствительность к различным заболеваниям, включая аутоиммунные болезни и опухоли. Это связано с тем, что иммунные рецепторы играют важную роль в распознавании и борьбе с инфекционными агентами и аномальными клетками, и их генетические вариации могут привести к изменению функции и эффективности иммунной системы [55; с. 768].

В отношении ВПЧ, такие генетические изменения могут влиять на чувствительность к инфекции, развитие иммунного ответа и риск развития РШМ. Поэтому понимание генетических вариаций иммунных рецепторов может помочь разработать более эффективные методы лечения, основанные на индивидуальных особенностях пациента [74; с. 133].

§1.6. Роль цитокинов при ВПЧ

Цитокины играют важную роль в формировании и укреплении иммунного ответа на различные инфекции, включая вирусы. Существуют различные способы классификации маркерных единиц, но главным критерием является разделение на воспалительные и противовоспалительные цитокины. Хемоаттрактантные цитокины - это еще одна группа хемокинов, которые, как правило, участвуют в хемотаксисе, то есть привлекают

иммунные клетки к определенному месту для формирования локального воспалительного ответа. Среди наиболее распространенных цитокинов следует выделить интерлейкины, которые оказывают влияние на формирование и дифференциацию лимфоцитов и гемопоэтических клеток [53; с. 101; 147; с. 101].

Провоспалительные цитокины. Das G. и соавт. 2016 сообщили о нескольких полиморфизмах в генах, транскрибирующих различные интерлейкины, которые были изучены в связи с раком шейки матки и его предшественниками [60; с. 38]. Исследователи сообщили, что: «в промоторной области гена IL1B, который кодирует интерлейкин 1β - однонуклеотидный полиморфизм (SNP) с.-511C>T является маркером воспалительной реакции, дифференцировки, клеточной пролиферации и апоптоза, и он наиболее часто встречается в различных популяциях. Исследования показали, что этот полиморфизм связан с увеличенным риском рака шейки матки в китайской, корейской, индийской, ханьской и египетской популяциях, указывая на его важную роль в развитии этой опухоли» [69; с. 20, 75; с. 340, 76; с. 932]. Были проведены исследования, связывающие некоторые полиморфизмы в гене, кодирующем фактор некроза опухоли (TNF), с вирусом папилломы человека (ВПЧ). TNF является одним из наиболее важных проапоптотических цитокинов, участвующих в росте и дифференцировке клеток, что также играет важную роль в иммунном ответе на инфекции, включая ВПЧ. Одним из исследований было выявлено, что полиморфизмы в гене TNF связаны с риском развития высокоонкогенных типов ВПЧ. Однако, необходимо отметить, что данные результаты неоднозначны и требуют дополнительных исследований для подтверждения [128; с. 145]. Мутации в сайте 1 промоторной области гена TNF (с.-308G>A) были связаны с возникновением цервикальной интраэпителиальной неоплазии (CIN), инфицированием ВПЧ16 и повышенным риском развития РШМ в разных популяциях. Считается, что минорные аллели этого полиморфизма могут стимулировать индукцию ангиогенеза, который

необходим для роста и развития раковых клеток, за счет повышенной продукции фактора некроза опухоли (TNF). Однако, генотипы, связанные с эпителиальной трансформацией, вызванной ВПЧ, могут различаться в зависимости от исследуемой популяции. Например, в исследованиях на когорте Великобритании, минорные аллели были связаны с гомозиготностью по мажорным аллелям у пациенток индоарийского происхождения и португальских женщин. У последних было отмечено двукратное увеличение риска формирования рака шейки матки и трехкратное увеличение склонности к развитию рака шейки матки [49; с. 466, 72; с. 137, 83; с. 480]. Действительно, информация о других полиморфизмах гена TNF, в том числе микросателлитных полиморфизмах, есть, но она может различаться из-за небольшого размера выборки в разных исследованиях. Более широкомасштабные исследования с большими выборками необходимы для подтверждения связи между этими полиморфизмами и развитием ВПЧ [115; с. 1007, 117; с. 77].

Интерлейкин 10 (IL-10) - это цитокин, который обладает как иммуносупрессивным, так и ангиогенным действием. IL-10 может проявлять как опухолепромотирующий, так и противоопухолевый эффекты, в зависимости от контекста и условий микроокружения опухоли. В некоторых случаях IL-10 может способствовать выживанию опухолевых клеток и подавлению иммунного ответа против опухоли. Однако, в других случаях IL-10 может стимулировать иммунный ответ и способствовать контролю опухоли [70; с. 963]. Полиморфизм с.-1082A>G в гене IL10 влияет на степень выработки интерлейкина-10 (IL-10). Гомозиготы по мажорному аллелю имеют более низкий уровень IL-10, гетерозиготы - промежуточный уровень, а гомозиготы по минорному аллелю - более высокий уровень. Это может быть связано с различными уровнями транскрипции и/или стабильности мРНК, а также с различной активностью промотора гена IL10 [135; с. 252, 150; с. 637]. Некоторые исследования изучали этот SNP при карциноме шейки матки с разными и часто разноречивыми итогами [137; с. 1879, 140; с.

115]. Недавний мета-анализ, включающий данные 1 498 случаев и 1 608 контролей, не выявил значительной ассоциации между полиморфизмом с.-1082A>G гена IL10 и риском развития РШМ [134; с. 271]. Однако в том же мета-анализе был обнаружен минорный аллель для другого SNP (с.-592C>A) в промоторе IL10, который, как было установлено, значительно связан с повышенным риском развития РШМ, особенно у азиатских женщин [106; с. 977]. Кажущийся двойственный эффект IL-10 на канцерогенез может иметь различные последствия для ВПЧ-инфекции и рака шейки матки, предполагая, что ангиогенез может быть более важным, чем вирусная инфекция и персистенция в поздней стадии злокачественной опухоли [118; с. 12]. Как следствие, гетерогенные эффекты полиморфизмов IL-10 в ВПЧ могут быть связаны со стадией поражения.

ВПЧ развиваются на фоне изменений в системе интерферона, и научно доказано, что ВПЧ 6 и 11 типов обладают активностью, повышающей уровень интерферона-альфа в крови. Папилломавирусы значительно подавляют способность моноцитов и лимфоцитов, циркулирующих в крови, вырабатывать интерферон, как самостоятельно, так и под воздействием индукторов [119; с. 4716]. Это связано с формированием иммунной гипореактивности, которая является особенностью тяжелых хронических воспалительных инфекций. Максимальные уровни гамма- и альфа-интерферонов в цервикальной слизи обнаруживаются у пациенток с персистирующей инфекцией [123; с. 842].

Хемокины. До настоящего времени сообщалось об одном полиморфизме гена хемокина CXCL12, связанном с ВПЧ-инфекцией. Хемокин CXCL12, называемый стромальным клеточным (SDF-1)-производным фактором 1, направлен на миграцию лейкоцитов и, совместно со своим собственным рецептором CXCR4, способствует миграции лейкоцитов [144; с. 802], кроме того принимает участие в урегулировании метастатического нарушения отдельных направлений опухолевых клеток [145; с. 200]. В одном исследовании, проведенном в Северной Америке, была

изучена роль нескольких полиморфизмов одного гена CXCL12 в развитии рака шейки матки. В результате исследования был обнаружен один полиморфизм в интроне (rs266085), связанный с уменьшением риска развития РШМ при наличии минорного аллеля. Кроме того, анализ взаимодействия нескольких гаплотипов в этой группе показал, что комбинация трех полиморфизмов (rs266085, rs266093 и rs17885289) связана с риском развития рака шейки матки [31; с. 390]. Эти SNP расположены в гене CXCL12 в областях 5' UTR (rs17885289), втором интроне (rs266085) и 3' UTR (rs266093), что может привести к нескольким возможным патогенным механизмам, связанным с раком шейки матки, таким как альтернативный сплайсинг и регуляция индукции CXCL12 [88; с. 35]. Другое исследование на женщинах китайской национальности подтвердило высокую связь между минорным аллелем rs266085 и риском развития РШМ [97; с. 40]. Усиленная индукция CXCL12 может привести к аналогичным последствиям, наблюдаемым у пациентов с мутациями в гене CXCR4, так как это может привести к повышенному клеточному ответу на CXCL12. Это условие может быть связано с одним из редких синдромов, проявляющихся в виде иммунодефицита и существенных повреждений, вызванных ВПЧ [96; с. 10].

§1.7. Роль врожденного иммунитета при ВПЧ

Принимая во внимание тропность ПВИ к эпителию мочевого тракта, можно предположить, что основная роль относится к системе локального иммунитета органов уrogenитальной системы. Главными структурно-функциональными основами данного иммунитета считаются - механический барьер, система врожденного специфического иммунитета и неспецифической защиты [136; с. 638].

Ткани наружных генитальных органов имеют развитую локальную иммунную систему, за счет клеточных (лейкоциты, фибробласты, стромальные и эпителиальные клетки) факторов и гуморальных (иммуноглобулины, интерфероны, интерлейкины и лизоцим,). При

первоначальном этапе заболевания стадии вирусной идентификации, воспаления, клеточного апоптоза соединены между собой и регулируются системой врожденного иммунитета. Врожденный иммунитет – это система иммунного ответа, первая отвечающая за только что внедрившуюся инфекцию, и её главная задача — сразу распознать этот патоген [114; с. 988, 103; с. 70]. Узнавание рецепторов клеток, обнаруживающих молекулярный тип (паттерн) инфекции, имело углубленный концепт для раскрытия внутриклеточных регуляторных механизмов и способствовало заметному влиянию на медицину. Данные рецепторы были названы толл-подобными (Toll-like receptor) — TLR. Это открытие, удостоено Нобелевской премии. У человека на сегодняшний день распознано 10 толл-подобных рецепторов (TLR1–10). Типы рецепторов — TLR1, 2, 4, 5, 6, 10 — экспрессированы на поверхности клетки, остальные виды — TLR 3, 7, 8, 9 — расположены в эндосомах [79; с. 520]. TLR4 может располагаться как на клеточной поверхности, так и в эндосоме [85; с. 197].

Установленный специфичный механизм распознавания. Например, бактерии (бактериальные антигены, бактериальные полисахариды и др.) идентифицируются внешними TLR, в то время как вирусы, некоторые синтетические молекулы и нуклеиновые кислоты — внутренними рецепторами. В итоге этой связи и подходящих им рецепторов начинается последовательность молекулярных реакций, опорной мишенью которого служит устранение инфекции или его предоставление системе приобретенного (адаптивного) иммунитета для последующего образования специфических веществ (клеточных и гуморальных) и формирования иммунной памяти [86; с. 756]. При результативной функциональной работе локальных механизмов противовирусной защиты, нарушение может прерваться на произвольной стадии развития. В том случае если данный механизм не гарантирует полную ликвидацию микроба, то приступает к формированию адаптивная иммунная реакция, деятельность которого выполняют Т- и В-лимфоциты [61; с. 5].

Особенностью TLR считается их основная деятельность идентифицировать не отличительные эпитопы, а эволюционные строения ПАМП, обширно распространенных у всех типов микроорганизмов и вирусов в частности [46; с. 180]. Идентифицирование патоген-ассоциированных молекулярных паттернов TLR рецепторами крайне значимо для начала работы Th1-лимфоцитов и активации клеточной иммунной реакции [31; с. 388]. До нынешнего дня у человека обнаружено примерно 23 видов TLR. Полностью изученными считаются с TLR-1 до TLR-9. В частности, Toll-подобные рецепторы на цитоплазме (TLR-1-2, TLR-4-6 и TLR-10), лизосомах, эндосомах и мембранах Гольджи (TLR-3, TLR-7, TLR-8 и TLR-9) отличаются своим субклеточным расположением [37; с. 964; 38; с. 2211]. Из всех толл-подобных рецепторов, TLR-3,7,8 и 9 идентифицируют нуклеиновые кислоты и участвуют в главном звене противовирусного иммунитета, синтезируют продукцию интерферонов (ИНФ) разных классов [39; с. 138]. Лигандами TLR-1, 2, 4, 5 и 6 видов считаются молекулярные рецепторы жгутиков бактерий (гликолипиды, флагеллин, липопептиды) и клеточной стенки, [3; с. 355]. TLR транслируются как клетками иммунитета, так и клетками других органов и тканей. Некоторые данные доказывают важную роль TLR в патофизиогенетическом развитии многих болезней – инфекционных, иммунодефицитах, аутоиммунных заболеваниях, аллергии и др. [64; с. 1310].

Современная медицина все больше развивается с развитием принципов персонифицированной, или профилактической медицины, которые на сегодняшний день решают многие проблемы улучшение качества диагностики и лечения. Данные методы возможны при помощи регистрации неповторимых характеристик его генома у конкретного человека.

В углублённую нишу предикативной медицины положены основы генетического полиморфизма. При определенных условиях часть полиморфизмов предрасполагают, часть из них препятствует развитию болезни. Кроме того, для развития болезни необходим не один полиморфизм,

а комбинация нескольких [110; с. 101, 112; с. 1513]. За генетическую предрасположенность SNP - отвечают точечные замены. SNP-мутации представляют собой аллели, ассоциированные с разными мультифакториальными заболеваниями [150; с. 637]. Масштабные исследования подтвердили, что генетические полиморфизмы - распространены [66; с. 8], но аллельные типы генов рецепторов ВИ и интерлейкинов считаются итогом мутаций в некодирующих областях генов [148; с. 1].

На сегодняшний день, не вызывает сомнения, что восприимчивость к заболеваниям не только соматического характера, но и инфекционным возможна генетически предрасположена. В этом главную роль играют мутации генов иммунного ответа [102; с. 1830]. Аллельные полиморфизмы генов рецепторов распознавания образов, цитокинов и других иммуномодулирующих частиц врожденного иммунитета связаны с иммунными механизмами проникновения инфекционных агентов и развития заболеваний. Эти полиморфизмы могут влиять на тяжесть клинического течения, так как они имеют значение для функционирования иммунной системы [110; с. 101, 112; с. 1513].

Роль врожденного иммунитета в противо инфекционном ответе при ВПЧ инфекции – это распознавание вируса при помощи толл-подобных рецепторов приводит к появлению чистого противовирусного иммунитета. Исходя из вышеуказанного можно сказать что дисрегуляция функции идентификации за счет ответственного аллельного полиморфизма генов этих рецепторов или внутриклеточных его органелл, могут привести к развитию и трансформации инфекции в хроническую форму, кроме того развитию онко - способности ВПЧ вируса [112; с.1513]. По данной причине, каждый день, обновляются исследования, акцентированные на уточнение роли аллельных полиморфизмов в генах TLR с разными заболеваниями урогенитального тракта [110; с. 101].

Доказано, что функциональные клетки врожденного иммунитета половых путей у женщин выделяют все 10 видов TLR каждый из них контактирует с определенными лигандами [66; с. 8].

TLR-3,7,8 и 9 распознают нуклеиновые кислоты и участвуют в противовирусном иммунитете. Самым основным медиатором противовирусного иммунного механизма считается TLR-9 [150; с.637].

Вирус папилломы человека в своем эволюционном развитии ускользает от иммунной защиты организма. Доказано, что онкологические протеины E6 и E7 вируса папилломы человека 16 вида подавляют выделение TLR-9 на клетках кожи и дендритных клетках [146; с. 146]. Некоторые источники говорят о многих и разносторонних результатах воздействия TLR-9 на риск формирования неоплазий при ПВИ. В одной публикации оговорено, что у женщин с длительно присутствующей ВПЧ в эпителии шейки матки не идентифицировались клетки, содержащие TLR-9, однако другие научные труды показали выраженную экспрессию TLR-9 онко клетками [141; с. 1105]. Доказано, что ВПЧ 16 типа останавливает формирование врожденного иммунитета, в следствии этого увеличение продукции TLR-9 и активация продукции цитокинов, является основным фактором для максимального клиренса вируса. Однако, нарушенное увеличение продукции TRL 9 при персистенции ВПЧ, может поддерживать ход хронического воспаления, приводящего к формированию онкологического процесса [136; с. 639]. Из этого можно заключить, что TLR-9 оказывает влияние как на вероятность возникновения ПВИ, так и на избавления организма от вируса. На сегодняшний день выполнен ряд научных работ по исследованию функции полиморфизма гена TLR-9 в развитии онкологических изменений мочевого пузыря, молочной и предстательной железы, шейки матки [101; с. 11]. Соответственно научным данным, часто изучаемыми SNP полиморфизмами TLR-9 были T-1237C (rs5743836) и T-1486C (rs187084), TLR-9 (2848G/A, rs352140). Имеются данные о роли полиморфизмов гена TLR-9, в формировании цервикальных

дисплазий при ВПЧ [55; с. 769]. Несмотря на это, результаты исследований в этой области неоднозначны и требуют дополнительных объяснений. Некоторые исследования показали, что полиморфизм rs352140 является фактором риска развития РШМ и персистенции ВПЧ [88; с. 35], другие данные эту взаимосвязь не подтвердили [148; с. 1]. Также, полиморфизм TLR-9, T-1237C в некоторых научных публикациях не отвечал за персистенцию ВПЧ [150; с. 637], остальные исследования определили эту ассоциацию [66; с. 8]. Отчет о метаанализе взаимодействия между полиморфизмами TLR-9 и риском развития РШМ указал на связь SNP rs187084 TLR-9 с повышенным риском развития РШМ, тогда как полиморфизмы rs352140 и rs5743836, напротив, могут снижать риск развития рака молочной железы и желудочно-кишечного тракта. [101; с. 11].

Таким образом, изучение роли генетически детерминированных характеристик иммунной устойчивости, связанных с аллельным полиморфизмом толл-подобных рецепторов IL-10, TNF α и TR 53, в патогенезе рецидивирующего течения ОК, рассматривается как многообещающий раздел для изучения патогенетических каскадов хронической ВПЧ-инфекции. Результаты, полученные при таких исследованиях, помогут приумножить современный протокол диагностики заболеваний наружных половых органов. Кроме того, применение в лечении комплексного метода терапии позволит снизить частоту рецидива тем самым снизить риск развития неоплазий вульвы и влагалища.

ГЛАВА II. СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРИ ОСТРОКОНЕЧНЫХ КОНДИЛОМАХ

§2.1. Клинические методы исследования

Для проведения работы использовались клинические и лабораторные данные, полученные от больных, обратившихся в дерматологическую клинику лазерной и фотодинамической терапии «M-shifo» города Ургенч, Хорезмской области (n=235) с 2020 по 2023 годы, под наблюдение были взяты женщины, у которых были манифестные формы ВПЧ – остроконечные кондиломы. Отбор больных производился методом случайной выборки.

В исследование вошли 235 женщин с диагнозом по МКБ А.63.0 – остроконечные кондиломы. Из них 101 пациентке были проанализированы полиморфизмы генов Trp-53 (rs1042522), TNF α (rs 1800629), IL-10 (rs 1800896), TLR - 9 (rs 5743836) в периферической крови, которым была проведена CO₂ вапоризация ОК. Далее пациентки находились под наблюдением в течении 6 месяцев. После в зависимости от наличия рецидива, пациенток разделили на 2 подгруппы: 66 пациенток, у которых наблюдался хоть 1 рецидив в течении 6 месяцев и 35 женщин без рецидивов ОК. В конечное исследование вошли 200 пациенток с рецидивами ОК, в том числе и 66 пациенток, которым были проведены иммуногенетические исследования. Все пациентки в зависимости от проведенной терапии были разделены на 2 группы. I группа (группа сравнения n=75), где проводили лечение CO₂ лазером, причем в данную группу вошли 22 пациенток с рецидивами, которым были проведены иммуногенетические исследования и II группа (основная группа n=125), которым проводили комбинированное лечение лазерной деструкцией (CO₂), с последующим применением 5% крема Имиквимод. В данную группу также вошли (44) пациенток с рецидивами ОК, которым были проведены иммуногенетические исследования. Возраст пациентов был в диапазоне от 18 до 50 лет (медиана возраста $28,5 \pm 6.7$ лет), у пациентов первой группы медиана возраста -

28.7±6.7 лет и соответственно у пациентов второй группы - 28.3±6.5 лет. Для исключения межнациональных особенностей для исследования отобраны лица узбекской национальности.

Таблица 2.1

Демографические показатели в I и II группе больных

Показатель	Контрольная группа, n=75	Основная группа, n=125
Медиана возраста, M±σ	28.7±6.7	28.3±6.5
P	0.8	
Max	50	50
Min	16	16

§2.2. Характеристика методов исследования

Всем пациентам по стандарту были проведены общеклинические лабораторные исследования: общий анализ крови, общий анализ мочи, микрореакция, микроскопия мазка из 3-х точек (vagina, uterus, cervix). Из специфических методов исследования проводили полимеразная цепная реакция (ПЦР) real time – для исключения средне и высокоонкогенных типов ВПЧ при остроконечных кондиломах. Проводили также кольпоскопию (вульвоскопию) с применением 3% уксусной кислоты для определения не видимых невооруженным глазом видов кондилом (субклиническая форма и эндофитная кондилома). Пациентов наблюдали на протяжении 6 месяцев с ежемесячным клиническим осмотром и кольпоскопией (вульвоскопией).

Критериями включения в исследование являлись:

- 1) Возраст обследуемых от 18 до 50 лет;
- 2) При клиническом осмотре и при кольпоскопии (вульвоскопии) наличие экзофитных и эндофитный остроконечных кондилом ;

- 3) Наличие результатов общеклинического лабораторного исследования, микроскопии мазка и микрореакции;
- 4) Письменное согласие пациенток.

Критерии исключения исследования:

- 1) Пациент проходивший ранее лечение имиквимодом, ИФН, ИФН-индуктором, иммуномодулятором, пероральными противовирусными препаратами, противовирусными препаратами для местного применения, цитостатическими препаратами.
- 2) Ранее проведенная химическая и/или хирургическая терапия бородавок в течение нескольких недель до начала исследования;
- 3) Беременные женщины или кормящие грудью, девочки вирго
- 4) Пациенты с воспалительными заболеваниями кожи на месте проведения терапии
- 5) Онкологические заболевания;
- 6) Иммуносупрессорная терапия и иммуносупрессивное состояние организма;
- 7) Предъявление нежелание принимать участие в исследовании.
- 8) Пациенты, получившие вакцинацию против ВПЧ.

§2.3. Методы исследования

2.3.1. Клинико-anamнестические методы исследования

При наблюдении женщин выяснялись жалобы пациенток, сексуальный анамнез, анамнез заболевания. Для выявления факторов риска развития папилломавирусной инфекции производился тщательный опрос пациенток, уделяя внимание образу жизни, функционированию менструальной и репродуктивной системы, возрасту дебюта половой жизни, ее регулярности, методов контрацепции, наличию таких вредных привычек как: курения, употребления спиртных напитков.

Проводили обследование наружных гениталий, осмотр в зеркалах и бимануальное исследование внутренних женских половых органов. Во время обследования в качестве материала для анализов применяли соскоб из канала

шейки матки, слизистой оболочки уретры и влагалища с изготовлением мазка, также проводили микрореакция приципитации для исключения сифилиса.

Клиническое состояние пациентов оценивали до и после терапии по следующим признакам и критериям ПВИ: - отсутствие субъективных жалоб и клинической манифестации. Рецидивирования остроконечных кондилом в период наблюдения дают возможность провести анализ эффективности проводимого лечения в группах пациентов.

Клинический осмотр пациенток проводили перед каждым сеансом терапии, через 14 дней после ее окончания, а также по истечении 1, 3 и 6 месяцев после лечения.

2.3.2. Исследование основных гематологических показателей

Для измерения основных гематологических показателей, таких как общее количество эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов, гемоглобина и других параметров, использовался гематологический анализатор АСТ diff, производства Beckman Coulter, в лаборатории клиники "M-shifo".

2.3.3. Микроскопические исследования мазков генитального тракта

Для данного исследования использовались пробы, взятые из заднего и бокового вагинального свода, и уретры путем использования дакроновых тампонов. Микроскопические образцы были окрашены по Граму и метиленовым синим, используя автоматизированный мультиконтейнер TISSUE-TEK DRS 2000 (Sakura, Япония) и реагенты компании "Эколаб" (Россия), согласно инструкциям производителя. Характер микрофлоры, количество эпителиальных клеток и лейкоцитов оценивали в окрашенных образцах. Воспалительную реакцию во влагалище оценивали с помощью увеличительного микроскопа с увеличением 1000х, подсчитывая соотношение полиморфноядерных лейкоцитов (ПМЯЛ) и эпителиальных

клеток (ЭК). Отсутствие воспаления оценивалось при соотношении ПМЯЛ/ЭК $\leq 1:1$, а наличие воспаления - при соотношении ПМЯЛ/ЭК $> 1:1$.

2.3.4. Метод кольпоскопии

Кольпоскопия (вульвоскопия), является специальным методом исследования слизистых оболочек вульвы, влагалища и шейки матки. Она включает осмотр и коррекцию при макроскопическом увеличении в 7-30 раз для оценки реакции тканей на лечение 3% раствором уксусной кислоты. Кольпоскопия проводилась с помощью кольпоскопа CarlZeiss OPMI PICO (Германия) при увеличении $\times 7,5$, $\times 15$, $\times 30$.

Во время расширенной кольпоскопии влагалищную часть шейки матки обрабатывали 3% раствором уксусной кислоты, который вызывает коагуляцию внеклеточной и внутриклеточной слизи, кратковременное набухание эпителия и сужение субэпителиальных сосудов. Этот эффект проявляется через 30-60 секунд после нанесения раствора и длится 3-4 минуты. При субклинической форме остроконечных кондилом (эндотелиальные поражения) слизистая ткань приобретает белый цвет, что является отрицательной реакцией.

2.3.5. Выявление ДНК ВПЧ 12 высокоонкогенных типов.

Выявление и дифференциация ДНК вируса папилломы человека 12 онкогенных генотипов также проводилась методом AmpliSense HPV 16/18-FL PCR с гибридизационно-флуоресцентной детекцией (описание метода описано в приложении 1). Материалом для данного метода исследования послужили соскобы с поверхности остроконечных кондилом и цервикального эпителия.

2.3.6. Молекулярно-генетические методы исследования

В данном исследовании были проанализированы полиморфизмы генов Trp-53 (rs1042522), TNF α (rs 1800629), IL-10 (rs 1800896) и TLR-9 (rs

5743836) у 101 женщины, зараженной ВПЧ, и 95 здоровых женщин. Для этого использовалась венозная кровь, взятая в пробирки с антикоагулянтом 0,05М раствором ЭДТА. Пациентки были разделены на две подгруппы в зависимости от наличия рецидива остроконечных кондилом: 66 пациенток с рецидивами и 35 женщин с безрецидивным течением.

Молекулярно-генетические методы включали в себя забор биологического материала, выделение ДНК из лимфоцитов периферической крови, стандартную полимеразную цепную реакцию (ПЦР) и электрофорез с визуализацией результатов.

Таким образом, была проведена детекция полиморфизмов генов Тр-53 (rs1042522), TNF α (rs 1800629), IL-10 (rs 1800896) и TLR-9 (rs 5743836) с помощью молекулярно-генетических методов.

Изученные полиморфные сайты генов

№	Ген	Локализация в хромосоме	SNP	Идентификатор db SNP
1	TNF- α	6p 21.3	G308A	rs1800629
2	IL-10	1q31-32	1082G>A	rs 1800896
3	TLR - 9	3p21.2	T-1237C	rs 5743836
4	Тр-53	17p13.1	215G>C	rs1042522

Оборудование и материалы для данного метода приведены в приложении 2.

Этапы молекулярно-генетического исследования приведены в приложении 3.

Усовершенствованный метод детекции полиморфных вариантов генов Тр-53 (rs1042522), TNF α (rs 1800629), IL-10 (rs 1800896), TLR - 9 (rs 5743836)

Для этого сначала была подобрана и оптимизирована система олигопримеров для выявления полиморфизмов в исследуемых генах. Последовательности были подобраны с помощью программы Oligo v.6.31

(Molecular Biology Insights Inc, США) и синтезированы в НПФ "Литех" (Москва) (см. табл. 2.2).

Таблица 2.2

Характеристика олигонуклеотидных праймеров, использованных для проведения ПЦР

Ген	Полиморфизм	Структура олигопраймеров
TNF- α	rs1800629	F: 5'ААТАGGTTTTGAGGGCCATG-3' R: 5'АТСТGGAGGAAGCGGTAGTG-3'
IL-10	rs 1800896	F: 5'-СТСГСТGCAACCCAACTGGC-3' R: 5'-ТСТТАССТАТСССТАСТТСС-3'
Trp-53	rs1042522	F:5'TGCAGGGGGGATACGGCCAGGCATTGAAGTC 3' R: 5'TGGGGGGGCTGAGGACCTGGTCCTCT3'
TLR-9	rs 5743836	F: CGCCCTGCACCCGCTGTCTCT R: CGGGGTGCTGCCATGGAGAAG

§2.4. Методы терапии

2.4.1. Проведение лазерной вапоризации

Лазерная вапоризация - это процедура, при которой область воздействия предварительно очищается и обрабатывается раствором антисептика, затем проводится местная инфильтрационная анестезия 2% раствором лидокаина (если нет аллергии на этот препарат). Далее, лазерное излучение с параметрами длины волны 10600 и мощностью 150 Вт применяется для деструкции кондиломов в постоянном импульсном режиме дистанционным методом. После процедуры остатки карбонизированных тканей удаляются водным раствором антисептиков, и на область накладывается повязка.

2.4.2. Техника местного применения 5% крема Имиквимод

Для пациентов второй группы после заживления ран на 14-й день назначается местное применение 5% крема Имиквимод на сухую, чистую аногенитальную область через каждый день, смывая крем водой через 6-10 часов. Крем следует применять в течение 4-16 недель.

§2.5. Статистические методы обработки результатов исследования

Для сравнения частоты встречаемости признаков в исследуемых группах использовался тест Манна-Уитни, точный тест Фишера или тест χ^2 . Статистически значимые различия определялись как значения с уровнем значимости $p \leq 0,05$), χ^2 и p-значения использовался пакет статистических программ «OpenEpi 2009, Version 2.3».

ГЛАВА III. КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНО-ИНСТРУМЕНТАЛЬНЫЕ АСПЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ БОЛЬНЫХ С ОСТРОКОНЕЧНЫМИ КОНДИЛОМАМИ

Частота и характер папилломавирусной инфекции в аногенитальной области были подробно изучены с учетом возраста, истории болезни, продолжительности заболевания и сексуального поведения с целью выявления предрасполагающих факторов и факторов риска.

Учитывая критерии исключения в наше исследование вошли 235 пациенток с папилломавирусной инфекции наружных половых органов города Ургенч Хорезской области. Наше исследование проводилось в 2 этапа. На первом этапе на выявления наличия рецидивов было проведено иммуногенетическое исследование у 101 пациентки с остроконечными кондиломами с последующим наблюдением за ними в течении 6 месяцев. На втором этапе непосредственно было проведено сравнение 2-х методов терапии с применением CO₂ лазерного удаления и последующим применением 5% крема Имиквимода 200 пациентам с остроконечными кондиломами. Для сравнительной характеристики методов лечения пациентов разделили на 2 группы: I группа 75 пациентов получивших CO₂ лазерное лечение и II группа 125 пациентов получивших комбинированное лечение (CO₂ лазерное удаление с последующим нанесением 5% крема Имиквимод).

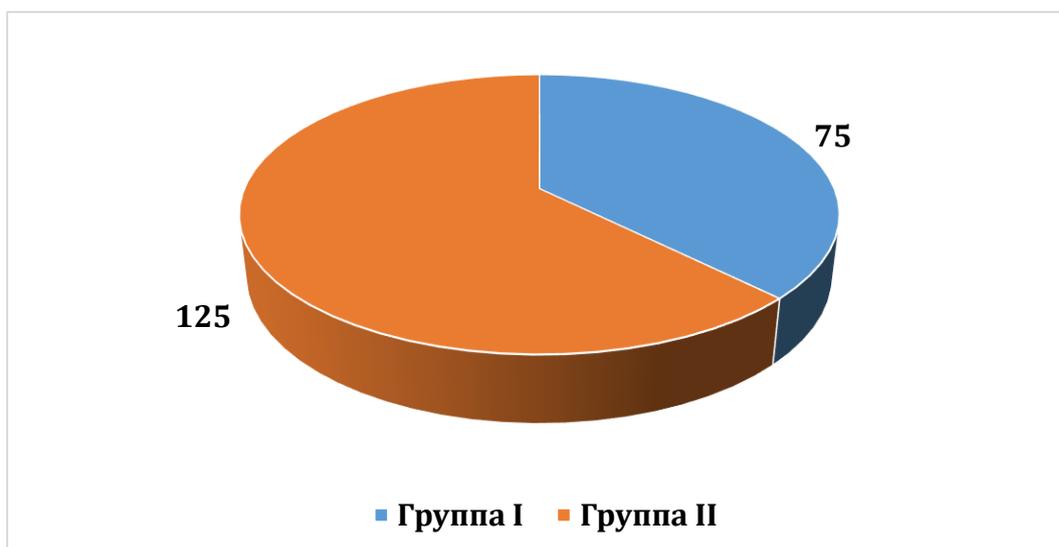


Рис. 3.1. Распределение больных по группам

Всем пациенткам проводилось обследование с применением общеклинических, инструментальных, иммуно-генетических и статистических методов исследования. Для оценки эффективности лечения, после первого этапа обследованные наблюдались еще на протяжении 6 месяцев на возникновения рецидива.

На основе специально разработанной анкетной карты мы записали информацию о возрасте пациентов, профессиональной занятости, особенностях половой жизни, субъективных жалобах, информации о локализации и величине патологического процесса, результатах общепринятых анализов и перенесенных ИППП.

Возраст пациентов в обеих группах варьировался от 18 до 50 лет. Средний возраст составил $(28,3 \pm 6,5)$ лет для основной группы и $(28,7 \pm 6,7)$ лет для контрольной группы ($p > 0,05$).

Таблица 3.1

Возрастной состав пациенток

Возраст женщин, лет	I группа n-75		II группа n-125	
	абс.	%	абс.	%
18-25	47	62,7	68	54,4
26-35	20	2,6	41	32,8
36-45	6	8	10	8
>45	2	2,7	6	4,8

Из таблицы 3.1. можно сделать вывод, что чаще всего генитальные ВПЧ-инфекции поражают женщин в 18-25 лет (62,7%), т.е. частота генитальных кондилом снижается с увеличением возраста, что, вероятно, коррелирует со снижением сексуальной активности.

При анализе сексуального поведения в рамках данного исследования учитывались как возраст начала половой жизни, так и число сексуальных

партнеров. Результаты исследования сексуального поведения указали на то, что средний возраст первого полового акта для первой группы составил 17,23±3,52, а для второй группы - 17,67±2,78 (табл. 3.2). Однако данные по группам не имели статистически значимых отличий ($p>0,05$), что говорит о том, что результаты не различались достоверно.

Таблица 3.2

Распределение пациенток по возрасту начала сексуальной активности

Возраст начала половой жизни, лет	I группа n-75		II группа n-125	
	абс.	%	абс.	%
<17	3	4	6	4,8
18-20	36	48	62	49,6
20-22	23	30,7	46	36,8
>22	13	17,3	9	7,2

С учетом этого, ранний возраст начала половой жизни может рассматриваться как один из факторов риска для развития папилломавирусной инфекции.

Таблица 3.3

Число половых партнеров

Число половых партнеров	I группа n-75		II группа n-125	
	абс.	%	абс.	%
1	37	49,3%	78	62,4%
2	20	26,7%	27	21,6%
3 и более	18	24%	20	16%

При проведении бесед с пациентами, было выявлено, что 85 (42,5%) больных имеют 2, 3 и более количество половых партнеров, кроме того течение заболевания у данной группы пациентов протекала в тяжелой степени с большим количеством высыпаний и высокой частотой рецидива.

Основной жалобой, приводящих женщин с остроконечными кондиломами к врачу были различного рода субъективные чувства в виде: зуда и жжения вульвы у 72 (36%), наличие белей (мокнущие) у 28 (14%), болезненность во время половых контактов (диспареуния) у 35 (17,5%), кровоточивость и трещины у 35 (17,5%), дизурические расстройства у 4 (2%), парестезия у 16 (8%) и бессимптомное течение у 10 (5%) пациентов из числа больных входивших в исследования (n=200). Статистически значимых различий между группами не обнаружено (p>0,05).

Таблица 3.4
Субъективные жалобы пациентов с ОК. (n=200)

Жалобы	Зуд и жжение	Бели (мокнущие)	Диспареуния	Кровоточивость	Дизурия	Парестезии	Бессимптомное течение
n (%)	72 (36%)	28 (14%)	35 (17,5%)	35 (17,5%)	4 (2%)	16 (8%)	10 (5%)

По расположению остроконечные кондиломы занимали большую площадь начиная от анального отверстия доходя при нескольких случаях до шейки матки. Излюбленной локализацией очагов были следующие места поражения: большие и малые половые губы, которые наблюдались у 70 (35%) женщин, преддверие влагалища и влагалище у 80 (40%), перианальная область у 40 (20%), шейка матки у 5 (2,5%) и наружное отверстие уретры у 5 (2,5%).



Рис. 3.2. Распределение по локализации очага поражения

Из представленной информации можно сделать вывод, что папилломавирусная инфекция в области наружных половых органов может протекать без клинических жалоб при наличии незначительных высыпаний, однако наличие вышеперечисленных жалоб у женщин, скорее всего, коррелирует с образованием больших разрастаний, которые могут инициировать дискомфорт, даже - кровоточивость, в следствии большой вероятности травматизации. Дополнительно, стоит отметить, что у пациентов с высыпаниями на наружных половых органах высока вероятность развития вторичной инфекции, что может привести к появлению раздражения, зуда, чувства жжения, боли во время полового акта и неприятных выделений.

Из вышеуказанных выводов следует, что факторы риска инфицирования и развития остроконечных кондилом наружных половых органов, которые были выявлены в данном исследовании, не отличаются от факторов риска при ВПЧ-поражениях шейки матки. Это позволяет предполагать наличие определенного онкологического потенциала ПВИ вульвы и возможность развития на этом фоне вульварных интраэпителиальных неоплазий (VIN).

Для диагностики других видов инфекций, передающихся половым путем, нами было использовано микроскопическое исследования вагинального содержимого из трех точек, всем пациенткам проводили

дополнительные методы исследования (ПЦР), для установки окончательного диагноза.

Таблица 3.5

Распределение исследуемых пациентов по нозологиям при моноинфицировании

Заболевание	I группа n-75		II группа n-125	
	абс.	%	абс.	%
Gardnerella vaginalis	30	40	62	49,6
Candida spp.	21	28	42	33,6
Trichomonas vaginalis	3	4	7	5,6
N. gonorrhoeae	4	5,3	6	4,8
Chlamydia trachomatis	3	4	7	5,6
Treponema pallidum	1	1,3	2	1,6

Среди женщин, больных с остроконечными кондиломами, достаточно часто отмечались заболевания, передающиеся половым путем в виде моноинфекции - 70 (35%) случаев и микст-инфекции (2 и более инфекции) – 20 (10%) случаях. Достоверных различий по группам не было ($p > 0,05$). Из ИППП бактериальный вагиноз и кандидоз чаще всего диагностировались у женщин, без существенных различий между группами ($p > 0,05$). Следует отметить, что эти симптомы наблюдались у пациентов с двумя и более партнерами (84,8%) по сравнению с пациентами с одним партнером (12,8%).

Перед началом лечения женщин, у которых были признаки инфекционного процесса в нижних отделах генитального тракта, проводилась этиотропная санация и адекватная терапия их половых партнеров. Затем проводился лабораторный контроль для подтверждения их излеченности.

Для верификации диагноза остроконечных кондилом, при исследовании слизистых оболочек, как наружных, так и внутренних половых органов нами использовались дополнительные методы диагностики: вульвоскопия (расширенная кольпоскопия).

Таблица 3.6

Клинические формы ОК

Виды кондилом	I группа n-75		II группа n-125	
	абс.	%	абс.	%
остроконечные кондиломы	68	91%	101	80,8%
бородавки в виде папул	5	6,7%	18	14,4%
поражения в виде пятен;	2	2,7%	6	4,8%

В результате осмотра были выявлены различные формы папилломавирусной инфекции вульвы, однако статистически значимых различий между группами не было обнаружено ($p > 0,05$). При осмотре вульвы 169 пациенток (84,5%) имели ВПЧ-инфекцию в виде экзофитных кондилом. Эти образования представляют собой фиброэпителиальные образования, которые выступают над поверхностью слизистой или кожи вульвы и могут иметь тонкую ножку или широкое основание.

Аногенитальных бородавок в виде папул было больше во второй группе 18 (14,4%), в первой 5 (6,7%). Поражений в виде пятен в первой группе было 2 (2,7%) и во второй группе 6 (4,8%).



Рис. 3.3. Пациентка М., 28 лет. Экзофитные кондиломы (увеличение x15).



Рис. 3.4. Пациентка П., 24 г. Экзофитные кондиломы, папулезный тип (x15).

При вульвоскопии экзофитные кондиломы имеют характерный вид, представляя собой участки гипертрофического эпителия в форме белых папиллярных разрастаний с пальцеобразными или конусовидными выростами, которые могут объединяться в сливные бляшки и иметь неправильную форму. После обработки этих участков 3% раствором уксусной кислоты можно наблюдать правильную капиллярную сеть внутри выростов. При вульвоскопии плоских кондилом определяются участки с ровными контурами, не выступающие над поверхностью эпителия, которые имеют белесоватый цвет. После обработки этих участков 3% раствором уксусной кислоты можно наблюдать атипичный, белый эпителий.



Рис. 3.5. Ацетобелый эпителий при ОК при вульвоскопии.



Рис. 3.6. Пациент Ш., 31год. ОК вульвы. Вульвоскопия.

§3.1. Инструментальные методы исследования при помощи расширенной кольпоскопии

Всем 200 пациенткам была проведена расширенная кольпоскопия по классификации от 2011 года Рио де Жанейро. У 120 (60%) из них была обнаружена нормальная кольпоскопическая картина, а у 80 (40%) - аномальная. При кольпоскопии обнаруженные изменения эпителия могут свидетельствовать о степени тяжести процесса в шейке матки, который может возникать при остроконечных кондиломах. Среди таких изменений могут выделяться слабовыраженные, такие как нежный ацетобелый эпителий (АБЭ), нежная мозаика или пунктация, а также выраженные изменения, такие как грубый АБЭ, грубая пунктация и наличие атипичных сосудов.

Как можно увидеть из таблицы 3.7, обе группы пациенток имели изменения эпителия шейки матки, обнаруженные при кольпоскопии, причем статистически значимых различий между группами не обнаружено ($p > 0,05$). В I группе нормальная кольпоскопическая картина встречалась у 40 больных 53,3% в первой группе и у 80 пациентов 64% во второй группе соответственно. Аномальная кольпоскопическая картина со слабовыраженными изменениями была диагностирована у 17 женщин 23% и у 19 пациентов 15,2% женщин первой и второй группы. Выраженные изменения шейки матки при кольпоскопии в виде плотного АБЭ, грубой мозаики и нежной пунктации были диагностированы у 10 пациентов 13,3%

1 группы и у 8 пациентов 6,4% второй группы. Кольпоскопическая картина в виде воспаления и полипов была продиагностирована у 8 больных – 10,7% первой группы и у 18 пациентов 14,4% второй группы соответственно.

Таблица 3.7

**Распределение пациентов в зависимости от картины расширенной
кольпоскопии**

Кольпоскопическая картина	I группа n-75		II группа n-125	
	абс.	%	абс.	%
Нормальная кольпоскопическая картина	40	53,3	80	64
Аномальная кольпоскопическая картина				
Слабовыраженные изменения	17	23	19	15,2
Выраженные изменения	10	13,3	8	6,4
Другая кольпоскопическая картина (воспаления, полипы)	8	10,7	18	14,4

§3.2. Анализ показателей ВПЧ-типирования обследуемых женщин

Для проведения типирования ВПЧ методом ПЦР и определения вирусной нагрузки методом ПЦР реального времени у всех пациенток был взят биологический материал из двух локализаций: мазки с шейки матки и соскобы с поверхности остроконечных кондилом.

Частота обнаружения типов ВПЧ и их вирусная нагрузка были сравнены между эпителием шейки матки и соскобами с поверхности поражения. Были проанализированы различия в частоте обнаружения ВПЧ в этих локализациях, их вирусной нагрузке, а также зависимость значений вирусной нагрузки от локализации поражения (на коже или слизистой наружных половых органов).

Таблица 3.8

Результаты ПЦР-типирования ВПЧ инфекции

Тип ВПЧ	I группа п-75		II группа п-125	
	абс.	%	абс.	%
ДНК ВПЧ А5 А6 (тип 51,56)	3	(4%)	4	(5.3)
ДНК ВПЧ А7 (тип 18,39,45,59)	7	(9.3%)	5	(6.7%)
ДНК ВПЧ А9 (тип 16,31,33,35,52,58)	9	(12%)	7	(9.3%)
ДНК ВПЧ А9 (тип 6-11)	56	74,6	109	87,2

Результаты показали, что ВПЧ типов 6 и 11 наиболее часто выявлялись у пациентов с остроконечными кондиломами во всех локализациях. Анализ частоты обнаружения ВПЧ типов 6 и 11 в тканях показал, что типы 6 и 11 были обнаружены у 56 (74,6%) и 109 (87,2%) пациентов в 1-й и 2-й группах соответственно. Высокоонкогенные типы встречались (51,56,18,39,45,59,16,31,33,35,52,58) в первой группе пациентов встречались у 19 (15,3%) пациентов и во второй группе у 16 (21,3%) женщин второй группы.

Высокоонкогенные типы ВПЧ, включая типы 51, 56, 18, 39, 45, 59, 16, 31, 33, 35, 52 и 58, также были обнаружены в ткани кондиломы, и их вирусная нагрузка была статистически значимо выше ($p < 0,05$) в образцах эпителия шейки матки. Кольпоскопия показала более или менее выраженные изменения в эпителии у данных пациенток с высокоонкогенными типами ВПЧ. Анализ вирусной нагрузки для наиболее часто выявляемых типов ВПЧ 6 и 11 между двумя местными эпителиальными образцами показал, что вирусная нагрузка в ткани остроконечной кондиломы была статистически значимо выше, чем в цервикальном эпителии.

Таблица 3.9

**Средняя величина вирусной нагрузки с поверхности остроконечных
кондиллом и цервикального эпителия**

Уровень косвенной вирусной нагрузки	I группа n-75		II группа n-125	
	абс.	%	абс.	%
Незначимый	14	18,6%	24	19,2%
Клинически значимый	42	56%	70	56%
Высокий	19	25,3%	31	24,8%

Из исследования следует, что наиболее распространенными типами ВПЧ, обнаруженными у женщин с остроконечными кондиломами всех локализаций, были ВПЧ 6 и 11, которые были выявлены в тканевом материале. Эти ВПЧ типы статистически значимо чаще встречались в ткани остроконечных кондиллом, чем в эпителии шейки матки. Кроме того, высококанцерогенные ВПЧ типов 51, 56, 18, 39, 45, 59, 16, 31, 33, 35, 52 и 58 также были обнаружены в ткани кондиллом. Таким образом, можно сделать вывод, что остроконечные кондиломы являются потенциальным источником передачи как низкоканцерогенных, так и высококанцерогенных типов ВПЧ.

ГЛАВА IV. АНАЛИЗ РАСПРОСТРАНЕННОСТИ АЛЛЕЛЬНЫХ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ ЦИТОКИНОВ (TNF- α rs1800629, IL-10 rs1800896), ТОЛЛ-ПОДОБНОГО РЕЦЕПТОРА - 9 (TLR - 9 rs5743836) И СУПРЕССОРА ОПУХОЛИ (Tp-53 rs1042522) У ЖЕНЩИН С ОСТРОКОНЕЧНЫМИ КОНДИЛОМАМИ С ОПРЕДЕЛЕНИЕМ ИХ РОЛИ В РАЗВИТИИ ЗАБОЛЕВАНИЯ

Сейчас одним из важных направлений исследований в области профилактической медицины является определение риска развития патологии на основе поиска генетических предикторов. В последнее время большое внимание уделяется и проблеме генетической предрасположенности к персистенции папилломавирусной инфекции и ее прогрессированию до злокачественной формы. Для проведения иммуно-генетических исследований изучается возможное участие белкового продукта тестируемого гена в патогенезе заболевания.

При ВПЧ в патогенезе образования иммунорезистентности немаловажную вклад могут иметь целый ряд полиморфных генов, которые способны регулировать процесс антигенной обработки (TNF- α rs 1800629, IL-10 rs 1800896, TLR - 9 rs 5743836, Tp-53 rs1042522) [142; с. 169-238]. Более того, индивидуальный характер иммунитета, направленного против инфекции, во многом зависит от активности вариантов генов, участвующих в кодировании рецепторов иммунных клеток [137, с. 114-119].

Таким образом, все это послужило основой для проведения нами молекулярно-генетического анализа распространенности аллельных полиморфизмов генов цитокинов (TNF- α rs 1800629, IL-10 rs 1800896), толл-подобного рецептора - 9 (TLR - 9 rs 5743836) и супрессора опухоли (Tp-53 rs1042522) у женщин с остроконечными кондиломами с определением их роли в развитии заболевания.

Молекулярно-генетические исследования вышеуказанных генов нами было изучено у 101 больных с остроконечными кондиломами. Контрольную группу составили здоровые лица без остроконечных кондилом. Пациенты в

зависимости от частоты рецидива были разделены на 2 группы: безрецидивное течение – 35 женщин и рецидивное течение – 66 пациентов.

Определив генотипические частоты полиморфных генов TNF- α (rs1800629), IL-10 (rs1800896), TLR - 9 (rs5743836) и Trp-53 (rs1042522), мы провели анализ на соответствие распределения их наблюдаемых (H_0) и ожидаемых (H_e) частот их каноническому распределению по равновесию Харди-Вайнберга (PXB, $p > 0.05$).

В основной группе пациенток с остроконечными кондиломами сопоставляя распределение, H_0 (G/G - 0.86; G/A – 0.14; A/A – 0.00) и H_e (G/G - 0.87; G/A – 0.13; A/A – 0.00) генотипических частот по полиморфизму гена TNF- α (rs1800629) установлено их соответствие по PXB ($\chi^2=0.56$; $P=0.436$; $df=1$) (смотрите Таблицу 4.1).

Таблица 4.1

Соответствие по PXB H_0 и H_e частот генотипов TNF- α (rs1800629) полиморфного гена в основной группе женщин с остроконечными кондиломами

Аллели	Аллельная частота				
G	0.93				
A	0.07				
Генотипы	Генотипическая частота		χ^2	p	df
	H_0	H_e			
G/G	0.86	0.87	0.00	0.436	1
G/A	0.14	0.13	0.07		
A/A	0.00	0.00	0.49		
Всего	1.00	1.00	0.56		

Аналогично, в здоровой контрольной группе в распределении H_0 (G/G - 0.88; G/A – 0.12; A/A – 0.00) и H_e (G/G - 0.89; G/A – 0.11; A/A – 0.00) частот генотипов по полиморфизму гена TNF- α (rs1800629) также обнаружено соответствие их распределения по PXB ($p > 0.05$), о чём показали отличия не достигавшие статистического уровня значимости ($\chi^2=0.36$; $P=0.526$; $df=1$) (смотрите Таблицу 4.2).

Таблица 4.2

Соответствия по РХВ H_o и H_e частот генотипов TNF- α (rs1800629) полиморфного гена в группе здорового контроля

Аллели	Частота аллелей				
G	0.94				
A	0.06				
Генотипы	Частота генотипов		χ^2	P	df
	H_o	H_e			
G /G	0.88	0.89	0.00	0.526	1
G/A	0.12	0.11	0.04		
A /A	0.00	0.00	0.32		
Всего	1.00	1.00	0.36		

Анализируя в основной группе пациенток с остроконечными кондиломами уровень различий между H_o и H_e частотами показателя гетерозиготности обнаружено максимальное значение H_o гетерозиготности (0.14) по сравнению с ее H_e (0.13) уровнем, что свидетельствовало об избытке гетерозигот ($D=0,07$) (смотрите Таблицу 4.3).

Таблица 4.3

Различие между H_o и H_e частотами гетерозиготности в полиморфном гене TNF- α (rs1800629) в основной и контрольной группах

Группы	H_o	H_e	D *
Основная	0.14	0.13	0.07
Контрольная	0.12	0.11	0.06

Примечание: $D=(H_o -H_e)/H_e$

Таким образом, вышеприведенные результаты доказывают соответствие каноническому распределению по РХВ H_o и H_e генотипических частот (G/G, G/A и A/A) полиморфного TNF- α (rs1800629) гена ($p>0.05$).

В отношении полиморфного гена IL10 (rs1800896) в основной группе пациенток с остроконечными кондиломами также обнаружено распределение H_o (G/G - 0.72; A/G – 0.12; A/A – 0.11) и H_e (G/G - 0.65; G/A – 0.31; A/A – 0.04) генотипических частот не отклонявшееся от канонического их распределения по РХВ ($\chi^2=21.35$; $P=0.121$; $df=1$) (смотрите Таблицу 4.4).

Таблица 4.4

Соответствие по РХВ H_0 и H_e частот генотипов полиморфизма гена IL10 (rs1800896) в основной группе женщин с остроконечными кондиломами

Аллели	Аллельная частота				
G	0.81				
A	0.19				
Генотипы	Генотипическая частота		χ^2	p	df
	H_0	H_e			
G/G	0.72	0.65	0.8	0.121	1
G/A	0.17	0.31	6.65		
A/A	0.11	0.04	13.9		
Всего	1	1	21.35		

Одновременно, в группе здорового контроля анализ изучения различий между распределением H_0 и H_e частот генотипов G/G (0.79 и 0.77), G/A (0.18 и 0.21) и A/A (0.03 и 0.01) по полиморфному гену IL10 (rs1800896) не обнаружил отклонений по РХВ ($\chi^2=2.67$; $P=0.098$; $df=1$) (смотрите Таблицу 4.5).

Таблица 4.5

Соответствие по РХВ H_0 и H_e частот генотипов полиморфизма гена IL10 (rs1800896) в группе здорового контроля

Аллели	Аллельная частота				
G	0.88				
A	0.12				
Генотипы	Генотипическая частота		χ^2	P	df
	H_0	H_e			
G /G	0.79	0.77	0.04	0.122	1
G /A	0.18	0.21	0.51		
A /A	0.03	0.02	1.86		
Всего	1.00	1.00	2.4		

Анализируя по H_0 и H_e частотам уровень гетерозиготности (D) нами определен их дефицит в обеих исследованных группах (-0.46 и -0.16)

максимально выраженный в основной группе пациенток с остроконечными кондиломами (смотрите Таблицу 4.6).

Таблица 4.6

Различие между H_o и H_e частотами гетерозиготности в полиморфном гене IL10 (rs1800896) в основной и контрольной группах

Группы	H_o	H_e	D *
Основная	0.17	0.31	-0.46
Контрольная	0.18	0.21	-0.16

Примечание: $D=(H_o - H_e)/H_e$

В основной группе пациенток с остроконечными кондиломами по полиморфному гену TLR9 (rs5743836) в распределении H_o и H_e частот генотипов T/T (0.79 и 0.80), T/C (0.21 и 0.19) и C/C (0.00 и 0.01) не обнаружено отклонений от канонического их распределения по РХВ ($\chi^2=1.36$; $P=0.237$; $df=1$) (смотрите Таблицу 4.7).

Таблица 4.7

Анализ соответствия H_o и H_e частот генотипов полиморфизма гена TLR9 (rs5743836) по РХВ в основной группе женщин с остроконечными кондиломами

Аллели	Частота аллелей				
	T	0.9			
C	0.1				
Генотипы	Частота генотипов		χ^2	p	df
	H_o	H_e			
T/T	0.79	0.80	0.01	0.237	1
T/C	0.21	0.19	0.25		
C/C	0.00	0.01	1.09		
Всего	1.00	1.00	1.36		

В группе здорового контроля распределение H_o и H_e частот генотипов T/T (0.86 и 0.87), T/C (0.14 и 0.13) и C/C (0.00 и 0.00) также соответствовало по РХВ ($\chi^2=0.51$; $P=0.453$; $df=1$) (смотрите Таблицу 4.7 и 4.8).

Таблица 4.8

Анализ соответствия H_0 и H_e частот генотипов полиморфизма гена TLR9 (rs5743836) по РХВ в группе здорового контроля

Аллели	Частота аллелей				
T	0.93				
C	0.07				
Генотипы	Частота генотипов		χ^2	P	df
	H_0	H_e			
T /T	0.86	0.87	0	0.453	1
T /C	0.14	0.13	0.07		
C /C	0.00	0.00	0.44		
Всего	1.00	1.00	0.51		

Вместе с тем, изучая уровень гетерозиготности (D) в обеих исследованных группах по H_0 и H_e частотам обнаружен избыток наблюдаемой гетерозиготности (0.12 и 0.07) по генетическому полиморфизму TLR9 (rs5743836) максимально выраженный в основной группе (0.21 против 0.19) (смотрите Таблицу 4.9).

Таблица 4.9

Различие между H_0 и H_e частотами гетерозиготности в полиморфном гене TLR9 (rs5743836) в основной и контрольной группах

Группы	H_0	H_e	D^*
Основная	0.21	0.19	0.12
Контрольная	0.14	0.13	0.07

Примечание: $D=(H_0 -H_e)/H_e$

Анализ соответствия различий H_0 и H_e частот генотипов Pro/Pro (0.51 и 0.50), Pro/Arg (0.39 и 0.41) и Arg/Arg (0.10 и 0.09) полиморфизма гена TP - 53 (rs1042522) по РХВ в основной группе женщин с остроконечными

кондиломами обнаружил соответствие их по PХВ ($\chi^2=0.44$; P=0.481; df=1) (смотрите Таблицу 4.10).

Таблица 4.10

Анализ соответствия H_0 и H_e частот генотипов полиморфизма гена TP - 53 (rs1042522) по PХВ в основной группе женщин с остроконечными кондиломами

Аллели	Частота аллелей				
Pro	0.71				
Arg	0.29				
Генотипы	Частота генотипов		χ^2	P	df
	H_0	H_e			
Pro/Pro	0.51	0.50	0.04	0.481	1
Pro/Arg	0.39	0.41	0.18		
Arg/Arg	0.10	0.09	0.22		
Всего	1.00	1.00	0.44		

В группе здорового контроля в распределении H_0 и H_e частот генотипов Pro/Pro (0.61 и 0.62), Pro/Arg (0.36 и 0.33) и Arg/Arg (0.03 и 0.04) по полиморфному гену TP - 53 (rs1042522) также обнаружено соответствие по PХВ ($\chi^2=0.56$; P=0.436; df=1) (смотрите Таблицу 4.11).

Таблица 4.11

Анализ соответствия H_0 и H_e частот генотипов полиморфизма гена TP - 53 (rs1042522) по PХВ в группе здорового контроля

Аллели	Частота аллелей				
Pro	0.79				
Arg	0.21				
Генотипы	Частота генотипов		χ^2	P	df
	H_0	H_e			
Pro /Pro	0.61	0.62	0.02	0.436	1
Pro /Arg	0.36	0.33	0.19		
Arg /Arg	0.03	0.04	0.35		
Всего	1.00	1.00	0.56		

При этом, оценка уровня гетерозиготности (D) по генетическому полиморфизму TP - 53 (rs1042522) в группе пациенток с остроконечными

кондиломами показало дефицит гетерозигот (0.39 против 0.41, при $D = -0.07$), а в группе здорового контроля их избыток (0.36 против 0.33, при $D = 0.08$) (смотрите Таблицу 4.12).

Таблица 4.12

Различие между H_o и H_e частотами гетерозиготности в полиморфном гене TP - 53 (rs1042522) в основной и контрольной группах

Группы	H_o	H_e	D^*
Основная	0.39	0.41	-0.07
Контрольная	0.36	0.33	0.08

Примечание: $D=(H_o - H_e)/H_e$

Таким образом, анализ различий в распределении H_o и H_e частот генотипических вариантов по исследованным полиморфным генам TNF - α (rs1800629), IL-10 (rs1800896), TLR - 9 (rs5743836) и TP-53 (rs1042522) позволил обнаружить соответствие их по РХВ ($p>0.05$) в исследованных группах пациенток с остроконечными кондиломами и здорового контроля.

§4.1. Анализ распределения аллельного полиморфного гена цитокина фактора некроза опухоли – α (TNF - α rs1800629) в группах пациенток с остроконечными кондиломами и здорового контроля с оценкой его ассоциативных связей в повышении риска развития остроконечных кондилом

Анализ распределения аллельного полиморфного гена цитокина фактора некроза опухоли – α (TNF - α rs1800629) позволил изучить характер распределения аллельных и генотипических его частот в группах здорового контроля и пациенток с остроконечными кондиломами. В группе здорового контроля частоты основного (G) и минорного аллелей (A) обнаруживались в 94.2%/179 и 5.8%/11 случаях. Наряду с этим среди этой группы обнаруживались лишь два варианта генотипа: основной G/G в 88.4%/84 и гетерозиготный G/A в 11.6%/11 случаях.

В основной группе пациенток с ОК частоты исследованных аллелей и генотипом мало отличались от таковых в группе здорового контроля. Так, если основной G и минорный A аллели обнаруживались в 93.1%/188 и 6.9%/14 случаях, то генотипические частоты G/G и G/A были обнаружены в 86,1% и 13,9% случаев соответственно. У пациенток с ОК в основной группе, как и среди здорового контингента, не наблюдались случаи с мутантной генотипической (A/A) (смотрите Таблицу 4.13)

Таблица 4.13

Частотный анализ аллелей и генотипов полиморфного TNF- α (rs1800629) гена среди пациенток с ОК и в контрольной группе

№	Группа	Аллели				Генотипы					
		G		A		G/G		G/A		A/A	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
1	Основная группа пациенток с ОК, (n=101)	188	93.1	14	6.9	87	86.1	14	13.9	0	0.0
2	Группа пациенток с ОК без рецидива, (n=35)	66	94.3	4	5.7	31	88.6	4	11.4	0	0.0
3	Группа пациенток с ОК с рецидивом, (n=66)	122	92.4	10	7.6	56	84.8	10	15.2	0	0.0
4	Контрольная группа, (n=95)	179	94.2	11	5.8	84	88.4	11	11.6	0	0.0

Аналогичная динамика в носительстве аллельных и генотипических частот обнаружена и в группах пациентов с ОК без и с рецидивом заболевания. В частности, среди пациенток без рецидива ОК доли аллельных вариантов G и A составили 94.3%/66 и 5.7%/4, при носительстве генотипических вариантов G/G и G/A в 88.6%/31 и 11.4%/4 случая.

Одновременно с таким распределением в вышеприведенных группах частоты аллелей G и A составили 92.4%/122 и 7.6%/10, а доли генотипов G/G и G/A – 84.8%/56 и 15.2%/10 (смотрите Таблицу 4.13).

Таким образом, почти одинаковы частоты аллельных и генотипических вариантов полиморфизма гена фактора некроза опухолей – α (TNF - α rs1800629) в исследованных группах пациентов с ОК и здоровых скорее всего показывают отсутствие их участия в инициативных механизмах ОК.

Между тем, для подтверждения этих предположений проведен статистический анализ различий между носительством аллельных и генотипических вариантов генетического полиморфизма TNF - α (rs1800629) с оценкой степени их участия в механизмах инициации ОК.

Проведенный сравнительный анализ различий между частотами аллелей и генотипов по генетическому полиморфизму TNF - α (rs1800629) в основной группе пациенток с ОК по сравнению со здоровым контролем позволил выявить отсутствие статически достоверных различий между частотами аллельных (для аллеля G: 93.1% против 94.2%; $\chi^2=0.2$; P=0.7; OR=0.8; 95%CI: 0.37-1.86 и для аллеля A: 6.9% против 5.8%; $\chi^2=0.2$; P=0.7; OR=1.2; 95%CI: 0.54-2.74) и генотипических вариантов (для C/C: 86.1% против 88.4%; $\chi^2=0.2$; P=0.7; OR=0.8; 95%CI: 0.35-1.89 и для C/T: 13.9% против 11.6%; $\chi^2=0.2$; P=0.7; OR=1.2; 95%CI: 0.53-2.86) изученного гена (смотрите Таблицу 4.14).

Таблица 4.14

Различия в распределении вариантов аллелей и генотипов полиморфизма TNF - α (rs1800629) в основной группе пациенток с ОК и в группе здорового контроля

Аллели и генотипы	Группы				χ^2	p	OR	95%CI
	Основная		Контрольная					
	n	%	n	%				
G	188	93.1	179	94.2	0.2	0.7	0.8	0.37 - 1.86
A	14	6.9	11	5.8	0.2	0.7	1.2	0.54 - 2.74
G/G	87	86.1	84	88.4	0.2	0.7	0.8	0.35 - 1.89
G/A	14	13.9	11	11.6	0.2	0.7	1.2	0.53 - 2.86

Таким образом, полученные данные доказывают отсутствие участия полиморфного гена TNF - α (rs1800629) в патогенетических механизмах инициации ОК. Следовательно, изученный генетический полиморфизм

нельзя рассматривать в качестве самостоятельного генетического маркера повышающего риск развития ОК в Узбекистане.

Оценивая различия между частотами аллелей и генотипов генетического полиморфизма TNF - α (rs1800629) по сравнению со здоровым контролем в группе с ОК без рецидивов вновь обнаружено отсутствие статистически достоверных различий. К примеру, в связи с тем, что в группах пациенток с ОК без рецидива заболевания и здорового контроля частоты аллелей G (94.3% против 94.2%; $\chi^2 < 3.84$; P=0.99; OR=1.0; 95%CI: 0.31 - 3.3) и A (5.7% против 5.8%; $\chi^2 < 3.84$; P=0.99; OR=1.0; 95%CI: 0.3 - 3.21) имели почти одинаковые значения статистически значимых различий не обнаружено. Аналогично этим результатам в частотах основного G/G (88.6% против 88.4%; $\chi^2 < 3.84$; P=0.99; OR=1.0; 95%CI: 0.3-3.42) и гетерозиготного G/A (11.4% против 11.6%; $\chi^2 < 3.84$; P=0.2; OR=1.6; 95%CI: 0.29-3.33) генотипах значимого уровня в различиях не было обнаружено (смотрите Таблицу 4.15).

Таблица 4.15

Различия в частотах аллелей и генотипов полиморфизма TNF - α (rs1800629) гена в группах пациенток с ОК без рецидива и здорового контроля

Аллели и генотипы	Группы				χ^2	P	OR	95%CI
	ОК без рецидива		Контрольная					
	n	%	n	%				
G	66	94.3	179	94.2	0.0	0.99	1.0	0.31 - 3.3
A	4	5.7	11	5.8	0.0	0.99	1.0	0.3 - 3.21
G/G	31	88.6	84	88.4	0.0	0.99	1.0	0.3 - 3.42
G/A	4	11.4	11	11.6	0.0	0.99	1.0	0.29 - 3.33

Таким образом, результаты проведенного сравнительного анализа показывают отсутствие ассоциативных связей между полиморфизмом гена

TNF - α (rs1800629) и повышенным риском развития не рецидивирующей формы.

Сравнительный анализ различий в частотах аллелей и генотипов по полиморфному гену TNF - α (rs1800629) в группе пациенток с рецидивирующим течением ОК по сравнению со здоровым контролем показал отсутствие статистически достоверных различий в носительстве аллельных (для аллеля G: 92.4% против 94.2%; $\chi^2=0.4$; P=0.6; OR=0.7; 95%CI: 0.31-1.82 и для аллеля A: 7.6% против 5.8%; $\chi^2=0.4$; P=0.6; OR=1.3; 95%CI: 0.55-3.23) и генотипических вариантов (для C/C: 84.8% против 88.4%; $\chi^2=0.4$; P=0.6; OR=0.7; 95%CI: 0.29-1.84 и для C/T: 15.2% против 11.6%; $\chi^2=0.4$; P=0.6; OR=1.4; 95%CI: 0.54-3.42) (смотрите Таблицу 4.16).

Таблица 4.16

Различия в частотах аллелей и генотипов полиморфизма TNF - α (rs1800629) гена в группах пациенток с ОК с рецидивом и здорового контроля

Аллели и генотипы	Группы				χ^2	P	OR	95%CI
	ОК с рецидивом		Контрольная					
	n	%	n	%				
G	122	92.4	179	94.2	0.4	0.6	0.7	0.31 - 1.82
A	10	7.6	11	5.8	0.4	0.6	1.3	0.55 - 3.23
G/G	56	84.8	84	88.4	0.4	0.6	0.7	0.29 - 1.84
G/A	10	15.2	11	11.6	0.4	0.6	1.4	0.54 - 3.42

Таким образом, по результатам сравнительной оценки различий между распределением аллельных и генотипических частот по генетическому полиморфному гену TNF - α (rs1800629) в группе пациенток с рецидивирующим течением ОК по сравнению со здоровым контролем не обнаружено статистической значимости, что в свою очередь, свидетельствует об отсутствии участия изученного полиморфного гена в механизмах, которые приводят к рецидивирующему течению заболевания.

Помимо сравнительного анализа различий в распределении частот аллелей и генотипов полиморфизма гена TNF - α (rs1800629) между группами пациенток и здоровых, нами проведена сравнительная их оценка и в зависимости от наличия и отсутствия рецидивов заболевания. Однако, проведенный анализ также выявил отсутствие статистически значимых различий между исследованными частотами аллелей ($\chi^2 < 3.84$; $P > 0.05$) и генотипов ($\chi^2 < 3.84$; $P > 0.05$) полиморфизма гена TNF - α (rs1800629) (смотрите Таблицу 4.17).

Таблица 4.17

Различия в частотах аллелей и генотипов полиморфизма TNF - α (rs1800629) гена в группах пациенток с ОК без и с рецидивирующим течением

Аллели и генотипы	Группы				χ^2	P	OR	95%CI
	ОК с рецидивом		ОК без рецидива					
	n	%	n	%				
G	122	92.4	66	94.3	0.2	0.7	1.4	0.41 - 4.46
A	10	7.6	4	5.7	0.2	0.7	0.7	0.22 - 2.44
G/G	56	84.8	31	88.6	0.3	0.7	1.4	0.4 - 4.76
G/A	10	15.2	4	11.4	0.3	0.7	0.7	0.21 - 2.49

Таким образом, результаты проведенного статистического анализа распределения аллельных и генотипических частот полиморфизма гена фактора некроза опухоли - α (TNF - α rs1800629) между группами пациенток с ОК и здорового контроля на основании рассчитанных коэффициентов, показали отсутствие статистически достоверных различий, что доказывает отсутствие ассоциаций между повышенным риском развития ОК в целом ($\chi^2 < 3.84$; $P > 0.05$), а также их без рецидивного ($\chi^2 < 3.84$; $P > 0.05$) и рецидивирующего течения ($\chi^2 < 3.84$; $P > 0.05$) с полиморфным геном TNF - α rs1800629 в условиях Узбекистана.

§4.2. Анализ распределения аллельного полиморфного гена цитокина интерлейкина – 10 (IL-10 rs1800896) в группах пациенток с остроконечными кондиломами и здорового контроля с оценкой его ассоциативных связей в повышении риска развития остроконечных кондилом

Немало важным генетическим маркером, имеющим возможную роль в механизмах развития ОК, по данным результатов ряда зарубежных исследований является полиморфный цитокиновый ген IL-10 (rs1800896) [87, 89; с.124].

В группах здоровых и пациенток с ОК при исследовании долей аллелей и генотипов гена IL-10 (rs1800896) наблюдался ряд особенностей:

- среди здоровых частоты основного (G) и минорного аллелей (A) обнаруживались в 87.9%/167 и 12.1%/23 случаях, а частоты генотипических вариантов (G/G, G/A и A/A), составили - 78.9%/75; 17.9%/17 и 3.2%/3 случая соответственно;

- среди основной группы пациенток с ОК выявлено снижение частоты основного аллеля G до 80.7%/163 и повышение частоты минорного аллеля A до 19.3%/39. Более того, частоты основного G/G и гетерозиготного G/A варианта генотипов по сравнению со здоровым контролем снижались до 72.3%/73 и 16.8%/17, тогда как доля носительства мутантным генотипом заметно повышалась до 10.9%/11 (смотрите Таблицу 4.18).

Таблица 4.18
Частоты аллелей и генотипов полиморфизма гена IL-10 (rs1800896) среди пациентов с ОК и в контрольной группе

№	Группа	Частота аллелей				Частота генотипов					
		G		A		G/G		G/A		A/A	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
1	Основная группа пациенток с ОК, (n=101)	163	80.7	39	19.3	73	72.3	17	16.8	11	10.9
2	Группа пациенток с	54	77.1	16	22.9	23	65.7	8	22.9	4	11.4

	ОК без рецидива, (n=35)										
3	Группа пациенток с ОК с рецидивом, (n=66)	109	82.6	23	17.4	50	75.8	9	13.6	7	10.6
4	Контрольная группа, (n=95)	167	87.9	23	12.1	75	78.9	17	17.9	3	3.2

Анализируя частоту встречаемости аллельных и генотипических частот полиморфного гена IL-10 (rs1800896) по сравнению со здоровыми в группах пациентов с ОК без и с рецидивом, заболевания обнаружено снижение частоты основного аллеля G до 77.1/54 и 82.6%/109 соответственно при повышении частоты минорного аллеля A до 22.9%/16 и 17.4%/23.

Более того, закономерная динамика обнаружена и в распределении частот генотипов, которые соответственно группам пациенток без и с рецидивирующим течением ОК по сравнению со здоровым контролем отличались снижением частоты основного генотипа G/G до 65.7%/23 и 75.8%/50 соответственно.

Наряду с вышеприведенными особенностями частота гетерозиготного генотипа G/A в группе пациенток без рецидивирующего течения ОК по сравнению со здоровыми повышалась до 22.9%/8 при ее снижении в группе пациенток с рецидивирующим течением ОК до 13.6%/9 случая.

Между тем в обеих группах пациенток не зависимо от характера течения ОК по сравнению с контрольными значениями наблюдалось заметное повышение частоты мутантного генотипа A/A до 11.4%/4 и 10.6%/7 соответственно (смотрите Таблицу 4.18).

Таким образом, обнаруженные особенности в распределении частот аллельных и генотипических вариантов полиморфизма гена цитокина IL-10 rs1800896 в исследованных группах пациентов с ОК по сравнению со здоровыми, характеризовавшиеся увеличением доли носительства неблагоприятными минорными аллелем (A) и генотипом (A/A) среди пациенток всех групп возможно показывают наличие их участия в механизмах развития ОК.

С целью выявления ассоциативных связей между полиморфным геном цитокина IL-10 (rs1800896) и повышением риска развития ОК мы провели сравнительный анализ аллельных и генотипических различий между группами пациенток с ОК по сравнению со здоровым контролем.

В основной группе с ОК по отношению к здоровой группе обнаружена явно выраженная тенденция к повышению частоты минорного аллеля А в 1.7 раза (19.3% против 12.1%; $\chi^2=3.8$; P=0.1; OR=1.7; 95%CI: 1.0 - 3.02). Между тем в распределение частот основного G/G (72.3% против 78.9%; $\chi^2=1.2$; P=0.3; OR=0.7; 95%CI: 0.36-1.34) и гетерозиготного G/A (16.8% против 17.9%; $\chi^2<3.84$; P=0.9; OR=0.9; 95%CI: 0.44-1.95) вариантов статистически достоверных различий не обнаружено. Однако, между распределением мутантного генотипа выявлено повышение его частоты в основной группе пациенток статистически достоверно в 3.7 раза (10.9% против 3.2%; $\chi^2=4.4$; P=0.05; OR=3.7; 95%CI: 1.09-12.86) (смотрите Таблицу 4.19).

Таким образом, обнаруженная тенденция в повышении частоты минорного аллеля А ($\chi^2=3.8$; P=0.1) и статистически достоверное повышение доли носительства минорным мутантным генотипом А/А ($\chi^2=4.4$; P=0.05) в группе пациенток с ОК по сравнению с контрольными их значениями доказывают участие полиморфного гена IL-10 (rs1800896) в патогенетических механизмах повышающих риск развития ОК в 1.7 и 3.7 раза соответственно.

Таблица 4.19
Различия среди аллелей и генотипов полиморфизма IL-10 (rs1800896) в основной группе пациенток с ОК и в группе здорового контроля

Аллели и генотипы	Группы				χ^2	P	OR	95%CI
	Основная		Контрольная					
	n	%	n	%				
G	163	80.7	167	87.9	3.8	0.1	0.6	0.33 - 1
A	39	19.3	23	12.1	3.8	0.1	1.7	1 - 3.02
G/G	73	72.3	75	78.9	1.2	0.3	0.7	0.36 - 1.34

G/A	17	16.8	17	17.9	0.0	0.9	0.9	0.44 - 1.95
A/A	11	10.9	3	3.2	4.4	0.05	3.7	1.09 - 12.86

Далее сравнивая степень различий между частотами аллелей и генотипов генетического полиморфизма IL-10 (rs1800896) в группе без рецидивного течения ОК по сравнению со здоровым контролем обнаружено статистически достоверное повышение частоты минорного А аллеля в 2.2 раза (22.9% против 12.1%; $\chi^2=4.6$; P=0.05; OR=2.2; 95%CI: 1.07 – 4.32).

Тем не менее в частотах основного G/G (65.7% против 78.9%; $\chi^2=2.4$; P=0.2; OR=0.5; 95%CI: 0.22-1.19) и гетерозиготного G/A (22.9% против 17.9%; $\chi^2=0.4$; P=0.6; OR=1.4; 95%CI: 0.53-3.5) генотипов статистически значимых различий не выявлено.

Однако, в отношении мутантного генотипа А/А прослежена явная тенденция к повышению его частоты встречаемости в группе пациенток без рецидивного течения ОК в 4.0 раза (11.4% против 3.2%; $\chi^2=3.4$; P=0.1; OR=4.0; 95%CI: 0.92-6.95) (смотрите Таблицу 4.20).

Таблица 4.20

Различия среди аллелей и генотипов полиморфизма IL-10 (rs1800896) в группах пациенток с ОК без рецидива и здорового контроля

Аллели и генотипы	Группы				χ^2	P	OR	95%CI
	ОК без рецидива		Контрольная					
	n	%	n	%				
G	54	77.1	167	87.9	4.6	0.05	0.5	0.23 - 0.93
A	16	22.9	23	12.1	4.6	0.05	2.2	1.07 - 4.32
G/G	23	65.7	75	78.9	2.4	0.2	0.5	0.22 - 1.19
G/A	8	22.9	17	17.9	0.4	0.6	1.4	0.53 - 3.5
A/A	4	11.4	3	3.2	3.4	0.1	4.0	0.92 - 6.95

Следовательно, полученные результаты по сравнительной оценки различий в частотах аллелей и генотипов по полиморфному гену IL-10

(rs1800896) показывают повышение риска развития не рецидивирующей формы ОК среди носителей минорных А аллеля и А/А генотипа в 2.2 ($\chi^2=4.6$; $P=0.05$) и 4.0 ($\chi^2=3.4$; $P=0.1$) раза.

Параллельно проводимый сравнительный анализ различий в частотах аллелей и генотипов по полиморфному гену IL-10 (rs1800896) в группе пациенток с рецидивирующим течением ОК по сравнению со здоровым контролем позволил выявить отсутствие статистически достоверных различий в носительстве аллельных вариантов G (82.6% против 87.9%; $\chi^2=1.8$; $P=0.2$; OR=0.7; 95%CI: 0.35-1.22) и A (17.4% против 12.1%; $\chi^2=1.8$; $P=0.2$; OR=1.5; 95%CI: 0.82-2.86), а также генотипических вариантов C/C (75.8% против 78.9%; $\chi^2=0.2$; $P=0.7$; OR=0.8; 95%CI: 0.39-1.76) и C/T (13.6% против 17.9%; $\chi^2=0.5$; $P=0.5$; OR=0.7; 95%CI: 0.3-1.74).

Между тем, в частоте минорного мутантного генотипа А/А среди пациенток этой группы прослежена явная тенденция к его увеличению по сравнению с контролем в 3.6 раз (10.6% против 3.2%; $\chi^2=3.7$; $P=0.1$; OR=3.6; 95%CI: 0.98-13.55) (смотрите Таблицу 4.21).

Таблица 4.21

Различия в распределении частот аллелей и генотипов полиморфизма IL-10 (rs1800896) в группах пациенток с ОК с рецидивом и здорового контроля

Аллели и генотипы	Группы				χ^2	P	OR	95%CI
	ОК с рецидивом		Контрольная					
	n	%	n	%				
G	109	82.6	167	87.9	1.8	0.2	0.7	0.35 - 1.22
A	23	17.4	23	12.1	1.8	0.2	1.5	0.82 - 2.86
G/G	50	75.8	75	78.9	0.2	0.7	0.8	0.39 - 1.76
G/A	9	13.6	17	17.9	0.5	0.5	0.7	0.3 - 1.74
A/A	7	10.6	3	3.2	3.7	0.1	3.6	0.98-13.55

Таким образом, вышеприведенные результаты сравнительного анализа различий в распределении аллельных и генотипических частот по

генетическому полиморфизму IL-10 (rs1800896) по сравнению со здоровым контролем в группе пациенток с рецидивирующим течением ОК позволили выявить наличие явной тенденции к повышению частоты мутантного генотипа A/A ($\chi^2=3.7$; P=0.1), что способствует увеличению риска рецидивирующего течения ОК в 3.6 раз. В свою очередь результаты доказывают возможное участие мутантного генотипа генетического полиморфизма IL-10 (rs1800896) в патогенетических механизмах развития рецидивирующего течения ОК.

Сравнивая степень различий в носительстве аллелей и генотипов полиморфизма гена IL-10 (rs1800896) между группами пациенток в зависимости от наличия и отсутствия рецидивов заболевания выявлено отсутствие статистически значимых различий между исследованными частотами аллелей ($\chi^2<3.84$; P>0.05) и генотипов ($\chi^2<3.84$; P>0.05) полиморфизма гена IL-10 (rs1800896) (смотрите Таблицу 4.22).

Таблица 4.22

Различия среди аллелей и генотипов полиморфизма IL-10 (rs1800896) в группах пациенток с ОК без и с рецидивирующим течением

Аллели и генотипы	Группы				χ^2	P	OR	95%CI
	ОК с рецидивом		ОК без рецидива					
	n	%	n	%				
G	109	82.6	54	77.1	0.9	0.4	0.7	0.35 - 1.46
A	23	17.4	16	22.9	0.9	0.4	1.4	0.69 - 2.87
G/G	50	75.8	23	65.7	1.2	0.3	0.6	0.25 - 1.5
G/A	9	13.6	8	22.9	1.4	0.3	1.9	0.66 - 5.34
A/A	7	10.6	4	11.4	0.0	0.9	1.1	0.3 - 4

Таким образом, результаты проведенного статистического анализа распределения аллельных и генотипических частот полиморфного гена цитокина IL-10 (rs1800896) между группами пациенток с ОК по сравнению со здоровыми лицами свидетельствуют о свидетельствуют об участии

минорного аллеля А и генотипа А/А в механизмах развития ОК в условиях Узбекистана. В частности, минорные аллель А и генотип А/А повышают риск развития в целом ОК в 1.7 ($\chi^2=3.8$; P=0.1) и 3.7 ($\chi^2=4.4$; P=0.05) раза соответственно.

Более того, минорный аллель А статистически достоверно ассоциируется с повышенным риском развития не рецидивирующей формы ОК в 2.0 раза ($\chi^2=4.6$; P=0.05), а среди носителей генотипа А/А риск развития этой формы ОК повышается в 4.0 раза ($\chi^2=3.4$; P=0.1).

Помимо этого, мутантный генотип А/А способствует повышению риска развития рецидивирующей формы ОК в 3.6 раз ($\chi^2=3.7$; P=0.1).

Следовательно, минорные аллель А и генотип А/А принимают участие в механизмах формирования ОК, что позволяет рассматривать их в качестве генетических маркеров, повышающих риск развития ОК в условиях Узбекистана.

§4.3. Анализ распределения аллельного полиморфного гена Толл подобного рецептора – 9 (TLR - 9 rs5743836) в группах пациенток с остроконечными кондиломами и здорового контроля с оценкой его ассоциативных связей в повышении риска развития остроконечных кондилом

Наличие противоречивых мнений в отношении вклада генетического полиморфизма TLR - 9 (rs5743836) в патогенетические механизмы формирования ОК [15.18.25ю144], послужило основой для изучения его ассоциации с повышенным риском развития этой патологии.

Изучая характер распределения вариантов аллелей и генотипов полиморфного гена TLR - 9 (rs5743836) у здоровых, отмечено носительство диким основным (Т) и минорными аллелями (С) в 93.2%/177 и 6.8%/13 соответственно. Основным Т/Т и гетерозиготный Т/С генотипы определялись в 86.3%/82 и 13.7%/13 соответственно.

В основной группе пациенток с ОК регистрировались несущественные снижение частоты основного Т аллеля (89.6%/181) и повышение частоты минорного С аллеля (10.4%/21). В закономерности, с которыми наблюдалось снижение частоты основного генотипа Т/Т до 79.2%/80 и повышение доли гетерозиготного Т/С генотипа до 20.8%/21 (смотрите Таблицу 4.23).

Важно указать, что в исследованных группах здорового контроля и пациенток с ОК мутантный вариант генотипа по полиморфизму гена TLR - 9 (rs5743836) практически не определялся ни в одном случае, что возможно связано с его постепенной элиминацией.

Таблица 4.23

**Частоты аллелей и генотипов полиморфизма гена
TLR - 9 (rs5743836) среди пациентов с ОК и в контрольной группе**

№	Группа	Частота аллелей				Частота генотипов					
		Т		С		Т/Т		Т/С		С/С	
		п	%	п	%	п	%	п	%	п	%
1	Основная группа пациенток с ОК, (n=101)	181	89.6	21	10.4	80	79.2	21	20.8	0	0.0
2	Группа пациенток с ОК без рецидива, (n=35)	62	88.6	8	11.4	27	77.1	8	22.9	0	0.0
3	Группа пациенток с ОК с рецидивом, (n=66)	119	90.2	13	9.8	53	80.3	13	19.7	0	0.0
4	Контрольная группа, (n=95)	177	93.2	13	6.8	82	86.3	13	13.7	0	0.0

В отношении частот аллелей и генотипов по гену TLR - 9 (rs5743836) в группах женщин без и с рецидивирующим течением ОК по сравнению с таковыми в контрольной группе обнаружено снижение частоты основного аллеля Т до 88.6%/62 и 90.2%/119 соответственно сопровождавшееся

увеличением доли носительства минорным аллелем С до 11.4%/8 и 9.8%/13 соответственно исследованным группам пациенток с ОК.

Одновременно по сравнению со здоровым контролем среди этих групп пациенток с ОК наблюдалось снижение доли носительства основным генотипом Т/Т до 77.1%/27 и 80.3%/53 при повышении частот гетерозиготного генотипа Т/С до 22.9%/8 и 19.7%/13 (смотрите Таблицу 4.23).

Таким образом, изучая характер распределения частот аллельных и генотипических вариантов полиморфизма гена Толл - подобного рецептора TLR - 9 (rs5743836) в группах пациенток с ОК и здорового контроля выявлено несколько меньшая частота основного аллеля (Т) и генотипа (Т/Т) при относительном повышении частот минорного аллеля С и генотипа Т/С в группах пациенток с ОК по отношению к аналогичным в контрольной группе.

Для изучения возможных ассоциаций между полиморфным геном TLR - 9 (rs5743836) и повышенным риском развития заболевания проведены дальнейшие сравнительные анализы с определением уровня значимости обнаруженных различий между носительством аллелей и генотипов изученного полиморфизма гена по сравнению с контролем.

Так, анализируя степень различий между частотами аллельных вариантов полиморфного гена TLR - 9 (rs5743836) в основной группе с ОК по отношению к здоровой группе обнаружено повышение частоты минорного аллеля С в 1.6 раза (10.4% против 6.8%; $\chi^2=1.6$; P=0.3; OR=1.6; 95%CI: 0.77 - 3.24), но при этом оно не достигало статистической достоверности.

Анализируя степень различий в распределении частот дикого Т/Т (79.2% против 86.3%; $\chi^2=1.7$; P=0.2; OR=0.6; 95%CI: 0.28-1.128) и гетерозиготного Т/С (20.8% против 13.7%; $\chi^2=1.7$; P=0.2; OR=1.7; 95%CI: 0.78-3.51) генотипов обнаружены статистически недостоверные различия (смотрите Таблицу 4.24).

Таблица 4.24

**Различия в распределении вариантов аллелей и генотипов
полиморфизма TLR - 9 (rs5743836) в основной группе пациенток с ОК и
в группе здорового контроля**

Аллели и генотипы	Группы				χ^2	P	OR	95%CI
	Основная		Контрольная					
	n	%	n	%				
T	181	89.6	177	93.2	1.6	0.3	0.6	0.31 - 1.3
C	21	10.4	13	6.8	1.6	0.3	1.6	0.77 - 3.24
T/T	80	79.2	82	86.3	1.7	0.2	0.6	0.28 - 1.28
T/C	21	20.8	13	13.7	1.7	0.2	1.7	0.78 - 3.51

Таким образом, не установленная статистически достоверная разница в долях аллельных и генотипических частот гена TLR - 9 (rs5743836) у женщин с ОК по отношению к здоровым доказывает отсутствие их значимости в повышении риска развития ОК.

В то же время, оценивая степень различий между частотами аллелей и генотипов генетического полиморфизма TLR - 9 (rs5743836) в группе пациенток с ОК без рецидивов заболевания по сравнению с аналогичными в здоровой группе обнаружено повышение частоты минорного C аллеля в 1.8 раз (11.4% против 6.8%; $\chi^2=1.4$; P=0.3; OR=1.8; 95%CI: 0.7-4.4) и гетерозиготного генотипа T/C в 1.9 раз (22.9% против 13.7%; $\chi^2=1.6$; P=0.3; OR=1.9; 95%CI: 0.71-4.94). Однако, выявленные различия в обоих случаях не достигали статистически существенного характера (смотрите Таблицу 4.25).

Таблица 4.25

**Различия в частотах аллелей и генотипов полиморфизма
TLR - 9 (rs5743836) в группах пациенток с ОК без рецидива и здорового
контроля**

Аллели и генотипы	Группы				χ^2	P	OR	95%CI
	ОК без рецидива		Контрольная					
	n	%	N	%				

T	62	88.6	177	93.2	1.4	0.3	0.6	0.23 - 1.42
C	8	11.4	13	6.8	1.4	0.3	1.8	0.7 - 4.4
T/T	27	77.1	82	86.3	1.6	0.3	0.5	0.2 - 1.41
T/C	8	22.9	13	13.7	1.6	0.3	1.9	0.71 - 4.94

Более того, отсутствие статистически достоверных различий зарегистрировано и между распределением частоты основного аллеля T (88.6% против 93.2%; $\chi^2=1.4$; P=0.3; OR=0.6; 95%CI: 0.23-1.42) и генотипа T/T (77.1% против 86.3%; $\chi^2=1.6$; P=0.3; OR=0.5; 95%CI: 0.2-1.41)

Таким образом, сравнительный анализ различий в частотах аллелей и генотипов по полиморфному гену TLR - 9 (rs5743836) позволивший выявить отсутствие статистически достоверного характера доказывает отсутствие их ассоциации с повышенным риском развития не рецидивирующей формы ОК ($\chi^2<3.84$; P>0.05). Следовательно, полиморфный ген TLR - 9 (rs5743836) самостоятельно не принимает участие в механизмах формирования изученной формы ОК.

При сравнительном анализе частот аллелей и генотипов полиморфного гена TLR-9 (rs5743836) у пациенток с рецидивирующим течением ОК и здоровым контролем также не было обнаружено статистически значимых различий в носительстве аллельных вариантов T (90.2% против 93.2%; $\chi^2=0.9$; P=0.4; OR=0.7; 95%CI: 0.3-1.49) и C (9.8% против 6.8%; $\chi^2=0.9$; P=0.4; OR=1.5; 95%CI: 0.67-3.31). Более того, различия в генотипических вариантах T/T (80.3% против 86.3%; $\chi^2=1.0$; P=0.4; OR=0.6; 95%CI: 0.28-1.5) и T/C (19.7% против 13.7%; $\chi^2=1.0$; P=0.4; OR=1.5; 95%CI: 0.67-3.58) также не достигали статистически достоверных значений (смотрите Таблицу 4.26).

Таблица 4.26

Различия в частотах аллелей и генотипов полиморфизма TLR - 9 (rs5743836) в группах пациенток с ОК с рецидивом и здорового контроля

Ал- ли и гено- тип	Группы		χ^2	P	OR	95%CI
	ОК с рецидивом	Контрольная				

	n	%	n	%				
T	119	90.2	177	93.2	0.9	0.4	0.7	0.3 - 1.49
C	13	9.8	13	6.8	0.9	0.4	1.5	0.67 - 3.31
T/T	53	80.3	82	86.3	1.0	0.4	0.6	0.28 - 1.5
T/C	13	19.7	13	13.7	1.0	0.4	1.5	0.67 - 3.58

Следовательно, итоги сравнительного изучения отличий в частотах аллелей и генотипов полиморфного гена TLR - 9 (rs5743836) между группами пациенток с рецидивирующим течением ОК и здоровых показали отсутствие статистически достоверной значимости ($\chi^2 < 3.84$; $P > 0.05$). Следовательно, генетический полиморфизм TLR - 9 (rs5743836) не ассоциируется самостоятельно с риском повышения формирования рецидивирующего характера ОК.

Различия в распределении частот аллелей и генотипов полиморфного гена TLR - 9 (rs5743836) между группами пациенток в зависимости от наличия и отсутствия рецидивов ОК не отличались своей достоверностью. К примеру, у пациенток с рецидивирующим течением ОК по сравнению с без рецидивным течением основной аллельный вариант T снижался менее чем в единицу (88.6% против 90.2%; $\chi^2 = 0.1$; $P = 0.8$; OR=0.8; 95%CI: 0.33-2.15), тогда как минорный C аллельный вариант напротив оказался выше в 1.2 раза (11.4% против 9.8%; $\chi^2 = 0.1$; $P = 0.8$; OR=1.2; 95%CI: 0.47-3.0).

Аналогично, различия в генотипических вариантах T/T (77.1% против 80.3%; $\chi^2 = 0.1$; $P = 0.8$; OR=0.8; 95%CI: 0.31-2.24) и T/C (22.9% против 19.7%; $\chi^2 = 0.1$; $P = 0.8$; OR=1.2; 95%CI: 0.45-3.27) также не достигали статистически достоверных значений (смотрите Таблицу 4.27).

Таблица 4.27

Различия в частотах аллелей и генотипов полиморфизма TLR - 9 (rs5743836) в группах пациенток с ОК без и с рецидивирующим течением

АЛЛ ГЕНО ТИП	Группы		χ^2	P	OR	95%CI
	ОК с	ОК без				
T	119	177	0.9	0.4	0.7	0.3 - 1.49
C	13	13	0.9	0.4	1.5	0.67 - 3.31
T/T	53	82	1.0	0.4	0.6	0.28 - 1.5
T/C	13	13	1.0	0.4	1.5	0.67 - 3.58

	рецидивом		рецидива					
	n	%	n	%				
T	119	90.2	62	88.6	0.1	0.8	0.8	0.33 - 2.15
C	13	9.8	8	11.4	0.1	0.8	1.2	0.47 – 3.0
T/T	53	80.3	27	77.1	0.1	0.8	0.8	0.31 - 2.24
T/C	13	19.7	8	22.9	0.1	0.8	1.2	0.45 - 3.27

Таким образом, результаты проведенного статистического анализа распределения аллельных и генотипических частот полиморфного гена Толл-подобного рецептора – 9 TLR - 9 (rs5743836) как между группами пациенток с ОК, так и по сравнению со здоровым контролем показывают отсутствие самостоятельной роли изученных аллельных и генотипических вариантов полиморфного гена TLR - 9 (rs5743836) в механизмах развития ОК в условиях Узбекистана.

§4.4. Анализ распределения аллельного полиморфного гена супрессора опухоли (Tr-53 rs1042522) в группах пациенток с остроконечными кондиломами и здорового контроля с оценкой его ассоциативных связей в повышении риска развития остроконечных кондилом

Изучая характер распределения полиморфных локусов гена супрессора опухоли Tr-53 (rs1042522) у женщин здоровых и с ОК в основной группе носительство основным аллелем Pro и минорным аллелем Arg обнаружено в 78.9%/150 и 70.8%/143, а также в 21.1%/40 и 29.2%/59 соответственно. Кроме того, в группе здорового контроля, как определялись все три возможные варианты генотипов Pro/Pro (61.1%/58), Pro/Arg (35.8%/34) и Arg/Arg (3.2%/3). Между тем, определяя частоту аналогичных вариантов генотипов в основной группе пациенток с ОК по сравнению со здоровыми обнаружено снижение частоты основного генотипа Pro/Pro до 51.5%/52, при том, что частоты гетерозиготного варианта Pro/Arg и гомозиготного варианта по

минорному аллелю Arg/Arg генотипов повышались до 38.65/39 и 9.9%/10 соответственно (смотрите Таблицу 4.28).

Таблица 4.28

**Анализ частот аллелей и генотипов полиморфизма гена
Tr-53 (rs1042522) среди пациентов с ОК и в контрольной группе**

№	Группа	Частота аллелей				Частота генотипов					
		Pro		Arg		Pro/Pro		Pro/Arg		Arg/Arg	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
1	Основная группа пациенток с ОК, (n=101)	143	70.8	59	29.2	52	51.5	39	38.6	10	9.9
2	Группа пациенток с ОК без рецидива, (n=35)	50	71.4	20	28.6	18	51.4	14	40.0	3	8.6
3	Группа пациенток с ОК с рецидивом, (n=66)	93	70.5	39	29.5	34	51.5	25	37.9	7	10.6
4	Контрольная группа, (n=95)	150	78.9	40	21.1	58	61.1	34	35.8	3	3.2

Частоты основных аллеля (Pro) и генотипа (Pro/Pro) полиморфизма гена Tr-53 (rs1042522) в основной группе пациенток с ОК по сравнению со здоровыми снижались, что сочеталось с заметным повышением функционально неблагоприятных аллеля (Arg) и генотипов (Pro/Arg и Arg/Arg). Установленные различительные особенности возможно связаны с их вкладом в механизмы формирования ОК у женщин в условиях Узбекистана.

С целью выявления причин повышения частот функционально неблагоприятных аллеля и генотипов в основной группе пациенток одновременно нами проведен характер и распределения в группах пациенток с ОК без рецидивного и с рецидивирующим течением.

В группах пациенток без рецидивов ОК и с рецидивами заболевания по сравнению со здоровым контролем частоты минорного аллеля Arg повышались до 28.6%/20 и 29.5%/39 соответственно. Более того, закономерная динамика наблюдалась и в отношении частот гетерозиготного

Pro/Arg и гомозиготного Arg/Arg генотипов, которые в соответствии с исследуемыми группами пациенток увеличивались по сравнению с их контрольными значениями до 40.0%/14 и 37.9%/25 соответственно, а также до 8.6%/3 и 10.6%/7 соответственно (смотрите Таблицу 4.28).

Таким образом, оценивая особенности распределения частот аллелей (Pro и Arg) и генотипов (Pro/Pro, Pro/Arg и Arg/Arg) полиморфизма гена Trp-53 (rs1042522) в группах пациенток с ОК по сравнению со здоровыми обнаружены факты заметного повышения долей носителей мутантным аллелем (Arg), гетерозиготным (Pro/Arg) и гомозиготным мутантным генотипом (Arg/Arg). Следовательно, возможно это связано с их вкладом в механизмы, инициирующие развитие различных вариантов ОК среди женщин, проживающих в условиях Узбекистана.

Между тем, для установления достоверности этого предположения нами проведены сравнительные статистические исследования с уточнением степени достоверности обнаруженных различий в долях распределения аллелей и генотипов по полиморфному варианту гена супрессора опухоли Trp-53 (rs1042522) в группах пациенток и здоровых.

Оценивая значения коэффициента отношения шансов (OR) в основной группе пациенток с ОК по сравнению со здоровыми выявлен факт явной тенденции в повышении риска развития ОК в 1.5 раза (29.2% против 21.1%; $\chi^2=3.4$; $P=0.1$; OR=1.5; 95%CI: 0.98-2.45) среди носителей мутантного варианта Arg.

В то же время, по сравнению со здоровыми, в основной группе пациенток с ОК различия между частотами гетерозиготного генотипа Pro/Arg имели статистически недостоверный характер (38.6% против 35.8%; $\chi^2=0.2$; $P=0.7$; OR=1.1; 95%CI: 0.63-2.02). Однако, в основной группе пациенток с ОК наблюдалась выраженная тенденция к увеличению риска развития заболевания в 3.4 раза (9.9% против 3.2%; $\chi^2=3.6$; $P=0.1$; OR=3.4; 95%CI: 0.96-11.83) среди носителей мутантным генотипом Arg/Arg (смотрите Таблицу 4.29).

Таблица 4.29

**Различия в распределении вариантов аллелей и генотипов
полиморфизма Tr-53 (rs1042522) в основной группе пациенток с ОК и в
группе здорового контроля**

Аллели и генотипы	Группы				χ^2	P	OR	95%CI
	Основная		Контрольная					
	n	%	n	%				
Pro	143	70.8	150	78.9	3.4	0.1	0.6	0.41 - 1.02
Arg	59	29.2	40	21.1	3.4	0.1	1.5	0.98 - 2.45
Pro /Pro	52	51.5	58	61.1	1.8	0.2	0.7	0.38 - 1.19
Pro /Arg	39	38.6	34	35.8	0.2	0.7	1.1	0.63 - 2.02
Arg /Arg	10	9.9	3	3.2	3.6	0.1	3.4	0.96 - 11.83

Таким образом, обнаруженные различия в носительстве неблагоприятных минорных аллеля (Arg) и генотипа (Arg /Arg) в основной группе пациенток с ОК по сравнению с аналогичными в здоровой группе характеризовались наличием тенденции к повышению риска развития заболевания 1.5 ($\chi^2=3.4$; P=0.1) и 3.4 раза ($\chi^2=3.6$; P=0.1) соответственно.

Следовательно, полученные результаты доказывают участие минорных аллеля (Arg) и генотипа (Arg/Arg) полиморфизма гена супрессора опухоли Tr-53 (rs1042522) в патогенетических механизмах развития ОК.

Сравнивая различия в частотах аллелей и генотипов полиморфизма гена Tr-53 (rs1042522) у пациенток с ОК без рецидивов по сравнению со здоровыми выявлено отсутствие статистически значимого уровня в повышении частоты мутантного аллеля Arg в 1.5 раза (28.6% против 21.1%; $\chi^2=1.6$; P=0.3; OR=1.5; 95%CI: 0.8-2.8).

Помимо этого, в этой группе пациенток по сравнению с контролем доля носительства гетерозиготным генотипом Pro/Arg статистически не достоверно увеличивалась в 1.2 раза (40.0% против 35.8%; $\chi^2=0.2$; P=0.7; OR=1.2; 95%CI: 0.54-2.65) при статистически недостоверном повышении

доли носительства мутантным генотипом Arg/Arg в 2.9 раза (8.6% против 3.2%; $\chi^2=1.7$; P=0.2; OR=2.9; 95%CI: 0.59-14.05) (смотрите Таблицу 4.30).

Таблица 4.30

**Различия в частотах аллелей и генотипов полиморфизма
Tp-53 (rs1042522) в группах пациенток с ОК без рецидива и здорового
контроля**

Аллели и генотипы	Группы				χ^2	P	OR	95%CI
	ОК без рецидива		Контрольная					
	n	%	n	%				
Pro	50	71.4	150	78.9	1.6	0.3	0.7	0.36 - 1.24
Arg	20	28.6	40	21.1	1.6	0.3	1.5	0.8 - 2.8
Pro/Pro	18	51.4	58	61.1	1.0	0.4	0.7	0.31 - 1.47
Pro/Arg	14	40.0	34	35.8	0.2	0.7	1.2	0.54 - 2.65
Arg/Arg	3	8.6	3	3.2	1.7	0.2	2.9	0.59 - 14.05

Таким образом, отсутствие статистически достоверных различий в частотах неблагоприятных аллеля (Arg) и генотипа (Arg/Arg) по полиморфному гену супрессора опухоли Tp-53 (rs1042522) в группе пациенток с ОК без рецидивов по сравнению со здоровыми, доказывает отсутствие их самостоятельного участия в механизмах развития данной формы ОК.

Проведенный далее сравнительный анализ в группе пациенток с рецидивами ОК по сравнению со здоровыми позволил выявить тенденцию к повышению риска развития данной формы заболевания среди носителей мутантными аллелем Arg в 1.6 раз (29.5% против 21.1%; $\chi^2=3.0$; P=0.1; OR=1.6; 95%CI: 0.94-2.62) и генотипом Arg/Arg в 3.6 раз (10.6% против 3.2%; $\chi^2=3.7$; P=0.1; OR=3.6; 95%CI: 0.98-13.55).

Тем не менее различие в частоте гетерозиготного генотипа Pro/Arg (37.9% против 35.8%; $\chi^2=0.1$; P=0.8; OR=1.1; 95%CI: 0.57-2.1) между

исследованными группами не достигало значимого уровня (смотрите Таблицу 4.31).

Таблица 4.31

**Различия в частотах аллелей и генотипов полиморфизма
Тр-53 (rs1042522) в группах пациенток с ОК с рецидивом и здорового
контроля**

Аллели и генотипы	Группы				χ^2	P	OR	95%CI
	ОК с рецидивом		Контрольная					
	n	%	n	%				
Pro	93	70.5	150	78.9	3.0	0.1	0.6	0.38 - 1.06
Arg	39	29.5	40	21.1	3.0	0.1	1.6	0.94 - 2.62
Pro/Pro	34	51.5	58	61.1	1.4	0.3	0.7	0.36 - 1.28
Pro/Arg	25	37.9	34	35.8	0.1	0.8	1.1	0.57 - 2.1
Arg/Arg	7	10.6	3	3.2	3.7	0.1	3.6	0.98-13.55

Таким образом, наличие тенденции к увеличению частот мутантных аллеля Arg ($\chi^2=3.0$; P=0.1) и генотипа Arg/Arg ($\chi^2=3.7$; P=0.1; OR=3.6) по полиморфному гену Тр-53 (rs1042522) среди пациенток с рецидивами ОК способствует увеличению риска развития данной формы ОК в 1.6 и 3.6 раза соответственно, что доказывает их роль в механизмах формирования рецидивирующей формы ОК.

В частотах аллелей и генотипов полиморфизма гена Тр-53 (rs1042522) между группами пациенток без рецидивов и с рецидивом ОК выявлено отсутствие статистически значимых различий в носительстве как аллельных (Arg – 29.5% против 28.6%; $\chi^2<3.84$; P=0.9; OR=1.0; 95%CI: 0.5-1.81), так и генотипических вариантов (Pro/Arg – 37.9% против 40.0%; $\chi^2<3.84$; P=0.9; OR=1.1; 95%CI: 0.47-2.53 и Arg/Arg – 10.6% против 8.6%; $\chi^2=0.1$; P=0.8; OR=0.8; 95%CI: 0.19-3.26) (смотрите Таблицу 4.32).

Таблица 4.32

**Различия в частотах аллелей и генотипов полиморфизма
Тр-53 (rs1042522) в группах пациенток с ОК без и с рецидивирующим
течением**

Аллели и генотипы	Группы				χ^2	P	OR	95%CI
	ОК с рецидивом		ОК без рецидива					
	n	%	n	%				
Pro	93	70.5	50	71.4	0.0	0.9	1.0	0.55 - 1.99
Arg	39	29.5	20	28.6	0.0	0.9	1.0	0.5 - 1.81
Pro/Pro	34	51.5	18	51.4	0.0	0.99	1.0	0.44 - 2.26
Pro/Arg	25	37.9	14	40.0	0.0	0.9	1.1	0.47 - 2.53
Arg/Arg	7	10.6	3	8.6	0.1	0.8	0.8	0.19 - 3.26

Таким образом, результаты в исследованных группах пациенток с ОК показали возможное участие неблагоприятных минорных аллеля и генотипа полиморфного гена Тр-53 (rs1042522) лишь среди пациенток с рецидивирующим течением ОК, что позволяет рассматривать их в качестве генетических предикторов повышающих риск развития рецидивирующих форм остроконечных кондилом у женщин в Узбекистане.

Анализируя результаты исследования характера распределения и участия полиморфных генов цитокинов (TNF- α rs1800629, IL-10 rs1800896), Толл-подобного рецептора - 9 (TLR - 9 rs5743836) и супрессора опухоли (Тр-53 rs1042522) у женщин с остроконечными кондиломами можно обобщить, что в патогенетических механизмах развития ОК особое участие имеют полиморфные варианты генов цитокина IL-10 (rs1800896) и супрессора опухоли Тр-53 (rs1042522).

В частности, результаты анализа распределения аллельных и генотипических частот полиморфизма гена фактора некроза опухоли - α (TNF - α rs1800629) между группами пациенток с ОК и здорового позволили выявить отсутствие ассоциаций между повышенным риском развития ОК как целом ($\chi^2 < 3.84$; $P > 0.05$), так и без рецидивного ($\chi^2 < 3.84$; $P > 0.05$) и рецидивирующих форм остроконечных кондилом ($\chi^2 < 3.84$; $P > 0.05$).

Однако, в отношении полиморфного гена цитокина IL-10 (rs1800896) обнаружен вклад его минорных аллеля А и генотипа А/А в повышение риска развития ОК в 1.7 ($\chi^2=3.8$; P=0.1) и 3.7 ($\chi^2=4.4$; P=0.05) раза в основной группе пациенток, в группах с не рецидивирующей формы ОК в 2.0 раза ($\chi^2=4.6$; P=0.05) и в 4.0 раза ($\chi^2=3.4$; P=0.1) и рецидивирующей формы ОК в 3.6 раз ($\chi^2=3.7$; P=0.1).

В то же время, результаты анализа распределения аллельных и генотипических частот полиморфного гена Толл-подобного рецептора – 9 TLR - 9 (rs5743836) как между группами пациенток с ОК, так и по сравнению со здоровым контролем не выявили их самостоятельной роли в механизмах развития ОК в условиях Узбекистана.

Тем не менее результаты в исследованных группах пациенток с ОК показали возможное участие неблагоприятных минорных аллеля и генотипа полиморфного гена Tr-53 (rs1042522) лишь среди пациенток с рецидивирующим течением ОК.

Следовательно, минорные мутантные аллели и генотипы полиморфных генов IL-10 (rs1800896) и Tr-53 (rs1042522) принимают участие в механизмах формирования ОК, что позволяет рассматривать их в качестве генетических маркеров, повышающих риск развития ОК у женщин, проживающих в условиях Узбекистана.

ГЛАВА V. ТЕРАПИЯ БОЛЬНЫХ С ОСТРОКОНЕЧНЫМИ КОНДИЛОМАМИ

Данная глава посвящена усовершенствованию терапии больных остроконечными кондиломами и изучению частоты рецидива в период лечения пациентов.

§5.1. Методы терапии пациентов с остроконечными кондиломами

Одним из основных преимуществ физических деструктивных методов лечения папилломавирусной инфекции является их способность быстро и мгновенно разрушать пораженные участки. В отличие от других методов, которые могут потребовать несколько часов или недель для ликвидации очагов, физические методы, такие как электрохирургические методы, крио- и лазеродеструкция, а также хирургическое иссечение, позволяют быстро и эффективно устранять поражения. Сегодня лазерное иссечение является самым доступным и эффективным методом лечения остроконечных кондилом. Для изучения эффективности совершенствованного метода терапии, как было сказано выше в наше исследование вошли 200 пациентов с ОК с наличием рецидивов в анамнезе. Пациенты были разделены на 2 группы, где первая группа больных (группа сравнения) состояла из 75 женщин (в том числе 22 пациенток, которым были проведены иммуногенетические исследования), которым мы применили метод лазерного удаления остроконечных кондилом с помощью CO₂ лазера Lutronic. Данная методика способствует удалению поражения послойно, наряду с глубоко подлежащей стромой, в отличии от хирургического иссечения. Мы использовали высокоинтенсивный лазерный хирургический аппарат "Lutronic" для проведения CO₂-лазерной вапоризации кондилом вульвы. Лазер работал в режиме непрерывного излучения с мощностью 16-20 Вт и глубиной деструкции 0,3-0,7 см.

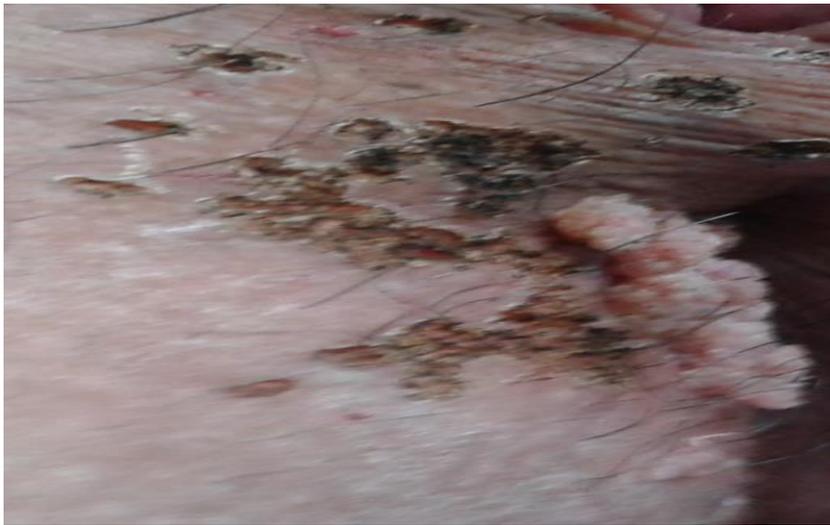


Рис. 5.1. Пациентка Л., 18 лет. Состояние на момент частичного иссечения CO₂-лазером кондилом вульвы (увеличение x15)

После проведения CO₂-лазерной вапоризации кондилом вульвы начиная с первых суток, пациенткам обеих групп проводилось обработка раны раствором Бетадина 4-6 раз до появления корочки в течении 14 дней.

Вторая группа больных состояла из 125 женщин (в том числе 44 пациенток, которым были проведены иммуногенетические исследования), которым после одномоментного удаления остроконечных кондилом лазерным способом проводилась комбинированная терапия 5% местным кремом «Имиквимод». Начиная с 14 дня после деструкции пациенткам основной группы через день на 12 часов в течении 4-12 недель местно применяли 5% крем «Имиквимод» на пораженную область, близлежащие ткани и вокруг анального отверстия в количестве однократного применения в размере 3гр на использование. Пациентки наблюдались нами на 1, 3 и 6 месяц после проведения деструкции, где подтверждалось отсутствие/наличие рецидива, а также инфицирование поверхности. На основании клинических данных и отсутствия новый остроконечных кондилом мы констатировали клиническое выздоровление.

«Имиквимод» местный иммуностимулирующий препарат имидазохинолинов и действует путем стимуляции толл-подобных рецепторы (TLR-7), тем самым стимулируя врожденный иммунитет, подавая сигнал опасности клеткам, которые затем запускают продукцию провоспалительных

цитокинов, таких как IFN- β , TNF- α , Ил-1,6,8 и 12 [31; с.112]. Многими исследованиями было показано, что в ответ на применение Имиквимода клетки отвечали мощным выбросом ИФН α , а учитывая агонистические взаимоотношения имихимода и TLR7, предполагается, что индукция выработки ИФН 1-го типа является важным фактором противовирусного действия имиквимода [37; с.25, 38; с.96]. Имиквимод стимулирует ранний синтез цитокинов путем индукции интерферонов, что приводит к опосредованному воздействию на вирус и изменению течения и исхода инфекционного процесса [40; с.51, 61; с.52]. Кроме того, имиквимод приводит к увеличению количества клеток Лангерганса в коже, которые активируются и мигрируют в регионарные лимфоузлы, где могут стимулировать презентацию антигена Т-клеткам [63; с.54, 64; с.87].

В нашем исследовании лазерная абляция была проведена 200 пациенткам. Оценка эффективности проводимой нами терапии проводилась, учитывая наличие рецидивов остроконечных кондилом (1 и более) в течение 6 месяцев наблюдения за пациентками и наличия местных реакции, а также и степени заживления в очаге поражения.

Для оценки значимости различий между группами в частоте рецидивов остроконечных кондилом использовались критерий χ^2 и точный критерий Фишера.

Обе группы больных были сопоставимы по полу, возрасту и тяжести патологического процесса. Таблица 5.1 отображает распределение больных с ОК в зависимости от их клинических форм.

Из таблицы можно заметить, что среди пациентов первой группы с классическим видом остроконечных кондилом было 68 (91%), во второй группе 101 (80,8%). Аногенитальных бородавок в виде папул было больше во второй группе 18 (14.4%), в первой 5 (6.7%). Поражений в виде пятен в первой группе было 2 (2.7%) и во второй группе 6 (4.8%). Статистически значимых различий между данными в обеих группах не было обнаружено ($p>0,05$).

Таблица 5.1

**Распределение больных с ОК в зависимости от клинической формы
остроконечных кондилом**

Виды кондилом	I группа n-75		II группа n-125	
	абс.	%	абс.	%
остроконечные кондиломы	68	91%	101	80,8%
бородавки в виде папул	5	6,7%	18	14,4%
поражения в виде пятен;	2	2,7%	6	4,8%

Примечание: * - различия относительно данных группы сравнения значимы (P<0,05);

После применения лазерной вапоризации нами оценивались местные реакции и степень заживления в очаге поражения, которые представлены в таблице 5.2.

Таблица 5.2

Местные реакции и время заживления в очаге после лазерного удаления

Виды местных реакций	I группа n=75			II группа n=125		
	5день	10день	14день	5день	10день	14день
Эрозия	63	10	2	98	22	5
Отек	72	3	-	100	7	-
Гиперемия	12	3	-	20	-	-
Мокнутие	-	3	-	-	7	-
Вторичное инфицирование	-	3	-	-	7	-
Рубцевание	-	-	-	-	-	-

Примечание: * - различия относительно данных группы сравнения значимы (P<0,05);

У большинства пациентов 161 (80,5%) эрозия сохранялась до 5 дней после лазерного воздействия. У остальных 39 (19.5%) пациентов эрозия эпителизовалась в период от 10-14 дней. Вторым по признаку постлазерного воздействия после эрозии стоит отек, который наблюдался у 171 (85.5%) пациента в течении первых 5 дней. Гиперемия держалась до 5 дней у 32 (16%) пациентов. С признаками вторичного инфицирования и мокнутия обратились 10 (5%) пациентов. Рубцевание после лазерной вапоризации не было отмечено ни у одного пациента. Данные по приведенным местным реакциям в обеих группах достоверно не отличались ($p>0,05$).

§5.2. Оценка клинической эффективности лечения остроконечных кондилом

Как было указано выше оценку клинической эффективности лечения остроконечных кондилом мы проводили на 1, 3 и 6 месяцев после проведенной терапии. Сравнительная оценка клинической эффективности лечения в изучаемых группах по частоте рецидива приведена в таблице 5.3.

При сравнительном анализе эффективности лечения наружных остроконечных кондилом аногенитальной области за 6 месяцев было установлено следующее: наилучший клинический эффект наблюдался через 1 месяц при использовании комплексного метода лечения. Только у 6 (4,8%) пациенток были обнаружены новые остроконечные кондиломы при осмотре и вульвоскопии, что в 3,3 раза меньше, чем в группе пациентов, получавших только CO₂ вапоризацию 12 (16%), соответственно $P<0,05$.

Таблица 5.3

**Сравнительная оценка клинической эффективности лечения.
(частота рецидива)**

Период наблюдения	I группа n-75		II группа n-125		p
	абс.	%	абс.	%	
1 месяц	12	16	6	4.8	$p<0,01$

3 месяц	14	18,6	3	2.4	p<0,01
6 месяц	11	14,7	0	0	p<0,001

Примечание: - различия относительно данных группы сравнения значимы (p<0,05; p<0,01; p<0,001);

В течение 1-3 месяцев наблюдения нашего исследования было обнаружено, что в I группе число рецидивов наблюдалось у 14 пациенток (18,6%), что характеризовалось обострением заболевания в виде появления новых патологических очагов, при таком же сроке наблюдения частота рецидива II группы была достоверно ниже и составила – 3 (2,4%), соответственно p<0,01.

По окончании периода наблюдения (6 месяцев) в срок 3- 6 месяцев число рецидивов остроконечных кондилом составило 11 случаев (14,7%) I группы, во II группе рецидивов заболевания мы не диагностировали, соответственно p<0,001, что доказывает эффективность комплексного метода лечения при остроконечных кондиломах.

Следует также отметить, что рецидивы у пациенток группы сравнения наблюдались в течении всего периода наблюдений (6 месяцев), причем наибольшее число рецидивов мы наблюдали в период 1-3 месяца.

Исследование демонстрирует, что использование комплексного метода лечения является достаточно эффективным при лечении наружных остроконечных кондилом аногенитальной области. По сравнительной оценке клинической эффективности лечения у 37 (49,3%) пациенток первой группы были выявлены рецидивы в течение всего наблюдательного периода (таблица 5.4.).

Таблица 5.4
Общее количество рецидивов в период наблюдения

	I группа n-75		II группа n-125		p
	абс.	%	абс.	%	
Общее количество	37	49,3	9	7,2	

рецидивов					p<0,001
Отсутствие рецидива	38	50,7	116	92,8	

У пациентов II группы частота рецидива в течении 6 месяцев составила всего лишь 9 (7,2%) и клиническое выздоровление с отсутствием рецидива составило 116 (92,8%), что является статистически достоверным (p<0,001) снижением частоты рецидива при комплексном методе терапии.

Также следует отметить, что из 44 пациентов, прошедших иммуногенетические исследования, вошедшие в группу пациентов, получивших комбинированную терапию наличие рецидивов за весь период наблюдений, мы наблюдали лишь у 1 пациентки. А из 22 пациенток, вошедших в группу сравнения, рецидивы наблюдались у 6 пациенток. Данной группе пациентов CO₂ вапоризация проводилась повторно, что может быть косвенным доказательством эффективности данного метода терапии. Однако, учитывая наличие тенденции к увеличению частот мутантных аллеля Arg и генотипа Arg/Arg по полиморфному гену Trp-53 (rs1042522) среди пациенток с рецидивами ОК всем пациентам данной категории необходимо проводить комбинированную терапию, что в свою очередь снизит риск возникновения рецидивов.

Демонстрация фотографий пациентов до и после лечения по усовершенствованному методу терапии.



Больная 22 года, остроконечные кондиломы перианальной области: А-перед процедурой лазерной вапоризации, Б-сразу после процедуры, В-после 1 месяца применения 5% крема «Имиквимод»

Авторами также оценивались местные реакции после применения местного 5% крема «Имиквимод» в зависимости от длительности применения и от субъективных ощущений пациента. Оценку производили в период 1-4, 4-8 и 8-12 недель использования препарата (таблица 5.5.). Как видно из таблицы, побочные эффекты в виде гиперемии, отека, зуда и жжения наблюдались намного чаще и возникали в первую неделю применения данного препарата. В период от 1-3 недель признаки гиперемии, отека и зуда встречались у 48 (38.4%), 12 (9.6%) и у 78 (62.4%) соответственно. Боль, эрозирование места нанесения препарата и наблюдалось у 16 (12,8%) и у 3 (2.4%) пациентов соответственно. Яркая картина побочных эффектов проявляется из-за иммуномодулирующего действия данного препарата.

Таблица 5.5

Местные реакции при применении 5% крема «Имиквимод»

Местные реакции у пациентов II группы (n-125)	Длительность лечения					
	1-3 нед		4-8 нед		9-12 нед	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%
Гиперемия	48	38,4	3	2,4	-	
Отёк	12	9,6	2	1,6	-	
Зуд/жжение	78	62,4	8	6,4	-	
Боль	16	12,8	-	-	-	
Эрозии	3	2.4	-	-	-	

Проявления побочных эффектов купировалось приостановлением препарата на несколько дней до заживления эпителия наружных половых органов. По истечению времени острота картины побочных эффектов стихала.

На период от 4-8 недель побочные эффекты в виде гиперемии отека и зуда встречались у 3 (2,4%), 2 (1,6%), 8 (6,4%) больных соответственно. При

применении препарата в течении 9-12 недель ни у одной женщины побочные явления не наблюдались.

Оценку побочных эффектов препарата Имиквимод производили по балльной шкале от 0 до 3, где 0 баллов - ничего не беспокоит, 1 балл - легкие беспокойства, 2 балла - средние и 3 балла - сильные ощущения в период до 8 недель применения препарата, учитывая, что после 8 недель терапии побочных эффектов не наблюдалось. Исходя из субъективной оценки самих пациентов по 0-3 балльной шкале показатели представлены в таблице 5.6.

Таблица 5.6
Оценка побочных эффектов 5% крема Имиквимод

Местные реакции у пациентов II группы (n=125)	Длительность лечения				
	Степень тяжести процесса 0-3. 0-ничего не беспокоит, 1-легкие беспокойства, 2-средние и 3-сильные ощущения.	1-3 нед		4-8 нед	
		абс.	%	абс.	%
Гиперемия	Легкое	28	22,4	3	2,4
	Среднее	15	12	-	-
	Сильное	5	4	-	-
Отёк	Легкое	8	6,4	2	1,6
	Среднее	2	1,6	-	-
	Сильное	2	1,6	-	-
Зуд/жжение	Легкое	50	40	8	6,4
	Среднее	15	12	-	-
	Сильное	16	12,8	-	-
Боль	Легкое	16	12,8	-	-
	Среднее	-	-	-	-
	Сильное	-	-	-	-
Эрозии	Легкое	3	2,4	-	-
	Среднее	-	-	-	-

	Сильное	-	-	-	-
--	---------	---	---	---	---

Из вышепредставленной таблицы следует отметить, что по субъективным жалобам пациентов основной является зуд/жжение легкого течения 50 (40%), среднее и сильное чувство зуда пациенты чувствовали в 15 (12%) и 16 (12,8%) соответственно. Вторым по частоте субъективных жалоб в период наблюдения 4-8 недель была эритема, которая у большинства пациенток протекала в легкой форме гиперемии у 28 (22,4%). Среднее и сильное течения гиперемии наблюдалось у 15 (12%) и у 5 (4%) соответственно.

Подводя итог данной главе хотелось бы отметить, что при сравнительной оценке эффективности лечения наружных остроконечных кондилом аногенитальной области в течении 6 месяцев нами установлено, что у 37 (49,3%) пациенток 1-й группы, выявлены рецидивы в течении всего наблюдательного периода. У пациентов II группы частота рецидива в течении 6 месяцев составила всего лишь 9 (7,2%) и клиническое выздоровление с отсутствием рецидива составило 116 (92,8%).

Побочные эффекты в виде гиперемии, отека, зуда и жжения наблюдались намного чаще и возникали в первую неделю применения данного препарата. По истечению времени острота картины побочных эффектов стихала. На период от 4-8 недель побочные эффекты в виде гиперемии отека и зуда встречались у 3 (2,4%), 2 (1,6%), 8 (6,4%) больных соответственно. При применении препарата в течении 9-12 недель ни у одной женщины побочные явления не наблюдались.

Таким образом применение комбинированного метода при остроконечных кондиломах является усовершенствованным методом терапии, при котором лазерная вапоризация дает возможность и создает условия для большего проникновения местного 5% крема Имиквимод для внедрения в глубокие слои кожи, где и проявляется иммуномодулирующее свойство данного препарата. В свою очередь, данный крем воздействует как

на клинические, так и на субклинические формы ВПЧ на месте очага поражения, которое не под силу вылечить лазерным воздействием. Данный вывод говорит о том, что эти два метода работают в синергии, что приводит к уменьшению частоты рецидива.



СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Агзамходжаева С.С. Факторы социальной экологии и репродуктивное здоровье / Агзамходжаева С.С., Джуманиязов О., Шахиев Г.Ю., Ваисов И.А. // «Doctor Axborotnomasi» 2009, №3, часть 2, Стр. 360- 363 Самарканд.
2. Абдуллаев М.А. Показатели встречаемости ВПЧ высокоонкогенных типов у больных с остроконечными кондиломами : Тезисы научных работ Международной научно-практической конференции "Актуальные проблемы дерматовенерологии и эстетической медицины (Ташкент, 20-21 ноября 2015 г.) / М. А. Абдуллаев, Т. А. Набиев, Х. Р. Халидова, Б. Ш. Фаттахов // Дерматовенерология и эстетическая медицина. - Ташкент, 2015. - Том 27 №3. - С. 63
3. Алиева Д. А. Спектр заболеваний, передающихся половым путем, у пациенток с интраэпителиальными дисплазиями шейки матки : научное издание / Д. А. Алиева, Г. Д. Атаниязова, Ш. Х. Икрамова, Г. Р. Салиходжаева // Новости дерматовенерологии и репродуктивного здоровья. - Ташкент, 2012. - №4. - С. 30-31
4. Арипджанова Д. С. Лечение папилломавирусной инфекции у женщин : научное издание / Д. С. Арипджанова // Журнал теоретической и клинической медицины. - Ташкент, 2005. - №4. - С. 71
5. Атаниязова Г. Д. Кольпоскопические проявления папилломавирусной инфекции при предраковых состояниях шейки матки : научное издание / Г. Д. Атаниязова // Новости дерматовенерологии и репродуктивного здоровья. - Ташкент, 2012. - №4. - С. 31-32
6. Ваисов А.Ш., Ваисов И.А., Агзамходжаева С.С. Роль акушер - гинеколога в первичной и вторичной профилактике ИППП // Новости дерматовенерологии и репродуктивного здоровья. - 2007, № 3, Стр. 6-8, Ташкент

7. Ваисов И.А. Генитальный герпес и бесплодный брак //Новости дерматовенерологии и репродуктивного здоровья. - 2008, № 4, Стр. 22-24 Ташкент

8. Ваисов А.Ш., Аллаева М.Д., Бекмуратова Э.Э., Ваисов И.А., Агзамходжаева С.С., Муратханова Д.А., Мусаева Н.Ш. Факторы среды и их влияние на рост заболеваемости ИППП. //Новости дерматовенерологии и репродуктивного здоровья.- 2009, № 1, Стр. 33-36 Ташкент

9. Ваисов А.Ш., Ваисов И.А., Хамидов Ф.Ш., Акбарова С. Папилломавирус человека: эпидемиология, диагностика и лечение //Новости дерматовенерологии и репродуктивного здоровья. - 2009, № 1, Стр. 71-76 Ташкент

10. Ваисов И.А., Каримова М.К., Мусаева Н.Ш., Аллаева М.Д. Вирус папиллома человека (ВПЧ) //Новости дерматовенерологии и репродуктивного здоровья. - 2009, № 3, Стр. 43-44 Ташкент

11. Ваисов И.А., Мадаминова Л.М. Характеристика поражений репродуктивных органов супругов в бесплодном браке инфекционного генеза // «Doctor Ahborotnomasi» 2009, №3, часть 2, Стр. 359- 360 Самарканд.

12. Глухова, Т.Н. Значение нарушений цитокинового статуса в патогенезе рака эндометрия / Т.Н. Глухова, И.А. Салов, Т.И. Турлупова // Материалы IV Регионального научного форума «Мать и дитя» М., 2010.- С.76-77.

13. Дубенский, В.В. Интерфероны в комплексном лечении остроконечных кондилом / В.В. Дубенский // ЗППП.- 1996.- №10.- С. 28

14. Евстигнеева, Н.П. Папилломавирусная инфекция урогенитального тракта женщин: эпидемиология, факторы персистенции, оптимизация ранней диагностики и профилактики онкогенеза / Н.П. Евстигнеева // Автореф. Дис. докт. мед. наук. - Москва, 2007. – 192с.

15. Летяева, О.И. Клинико-иммунологические, микробиологические особенности течения и терапии урогенитальных микст-инфекций у женщин

репродуктивного возраста: автореф. дисс. канд. мед наук. - Челябинск, 2014. – 45с.

16. Прилепская, В.Н. Папилломавирусная инфекция – от ранней диагностики к рациональной терапии [Текст] / В.Н. Прилепская, Э.Р.Довлетханова // Акушерство и гинекология. – 2013. – № 2. – С. 101–107.

17. Роговская С.И. Шейка матки, влагалище, вульва. Физиология, патология, кольпоскопия, эстетическая коррекция: руководство для практикующих врачей / под редакцией С.И. Роговской, Е.В. Липовой // Москва: Издательство журнала Status Praesens.- 2014.- С.832.

18. Чукаева, Л.М. Клиническая эффективность и тактика применения генферона и йодантипирина при папилломавирусной инфекции гениталий: автореф. дис. ... канд. мед. наук. - Томск, 2009; - 24с.

19. Чирский В. С. и др. Степень повреждения цервикального эпителия и статус дезоксирибонуклеиновой кислоты вируса папилломы человека 16 генотипа // Вестник российской военно-медицинской академии. — 2013. — № 3 (43). — С. 96–98.

20. Чирский В. С. и др. Цервикальная неоплазия и вирусная нагрузка ВПЧ 16 генотипа // Инфекция и иммунитет. — 2014. — Т. 4. — № 2. — С. 192–196.

21. Чистяков М.А. Патоморфология папилломавирусной инфекции в системе «мать-плацента-плод»:дис.— Москва, 2008. — 111 с.

22. Чуруксаева О.Н. Гормональные факторы вирус-ассоциированного рака шейки матки // Опухоли женской репродуктивной системы. — 2010. — № 4. — С. 54–57.

23. Чиссов В.И. Состояние онкологической помощи населению России в 2011 году. / В.И. Чиссов, В.В. Старинский, Г.В. Петрова. – М.: ФГУ «МНИОИ им. П.А. Герцена» Минздрава России. – 2012. – 240 с.

24. Шаханина, И.Л. Экономический анализ применения вакцины против вируса папилломы человека в Москве / И.Л. Шаханина, Л.С.

Намазова–Баранова, В.И. Краснопольский и др. // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2010. – № 5 (54). – С. 69–74.

25. Шахтинская Ф.Ч. Вирус папилломы человека. / Шахтинская Ф.Ч., Намазова-Баранова Л.С., Таточенко В.К., Новикова Д.А., Ткаченко Н.Е. // Профилактика ВПЧ-ассоциированных заболеваний. Педиатрическая фармакология, 2015, 12(1): 74-78.

26. Шипулина, О.Ю. Клиническая валидация нового ВПЧ–теста Амплисенс для скрининга онкологической патологии шейки матки в сравнении с клинически валидированным ВПЧ–тестом DIGENE HPV TEST (HC2) / О.Ю. Шипулина, Т.Н. Романюк, Л.И. Короленкова и др. // МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА – 2014. Сборник трудов VIII Всероссийской научно–практической конференции с международным участием. – 2014. – С. 232–234.

27. Agrawal S., Gupta S. TLR1/2, TLR7, and TLR9 signals directly activate human peripheral blood naive and memory B cell subsets to produce cytokines, chemokines, and hematopoietic growth factors. J. clin. Immunol. 2011; 31 (1): 89–98.

28. Ahn C. S. Imiquimod in the treatment of cutaneous warts: an evidence-based review. / Ahn C. S., Huang W. W. // Amer. J. clin. Dermatol. 2014; 15 (5): 387–399.

29. Ajibade A. A., Wang H. Y., Wang R. F. Celltype-specific function of TAK1 in innate immune signaling. Trends Immunol. 2013; 34: 307–316.

30. Akcali S., Goker A., Ecemis T. et al. Human papilloma virus frequency and genotype distribution in a Turkish population. Asian Pac. J. Cancer Prev. 2013; 14 (1): 503–506.

31. Akhavizadegan H. Electrocautery resection, shaving with a scalpel, and podophyllin: a combination therapy for giant condyloma acuminatum. Wld J. Mens Hlth. 2015; 33 (1): 39–41.

32. Akira S., Uematsu S., Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. Cell. 2006; 124: 783–801.

33. Al-Awadhi R, Al-Mutairi N, Albatineh AN, Chehadeh W. Association of HPV genotypes with external anogenital warts: a cross sectional study. *BMC Infect Dis.* 2019;19:375–82.
34. Alessi S. S., Sanches J. A., Oliveira W. R. et al. Treatment of cutaneous tumors with topical 5% imiquimod cream. *Clinics (Sao Paulo).* 2009; 64 (10): 961–966.
35. Almomen A., Jarboe E. A., Dodson M. K. et al. Imiquimod Induces Apoptosis in Human Endometrial Cancer Cells In vitro and Prevents Tumor Progression In vivo. *Pharm. Res.* 2016; 33 (9): 2209–2217.
36. Alomar A., Bichel J., McRae S. Vehicle-controlled, randomized, double-blind study to assess safety and efficacy of imiquimod 5% cream applied once daily days per week in one or two courses of treatment of actinic keratoses on the head. *Brit. J. Dermatol.* 2007; 157: 133–141.
37. Ambach A., Bonnekoh B., Nguyen M. et al. Imiquimod, a tolllike receptor-7 agonist, induces perforin in cytotoxic T lymphocytes in vitro. *Molec. Immunol.* 2004; 40: 1307–1314
38. Anne M., Kuwabara B. A., Barbara M. et al. Children with warts: a retrospective study in an outpatient setting. *Pediatric Dermatology.* 2015; 32 (5): 679–683, anogenital warts. *J. Europ. Acad. Dermatol. Venereol.* 2013; 27:e263–e270.
39. Aranda-Flores C. E. Infección por el virus del papiloma humano en varones. *Ginec. Obstet. Mex.* 2015; 83 (11): 697–706
40. Arbyn M, Weiderpass E, Bruni L, et al. Estimates of incidence and mortality of cervical cancer in 2018: a worldwide analysis. *The Lancet Global Health.* 2020;8(2):e191-203. DOI: [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(19\)30482-6](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(19)30482-6)
41. Arista A, Murtiastutik D, Setyaningrum T, Mastutik G. Genotyping of Human Papilloma Virus (HPV) in female condyloma acuminata patient in Dr Soetomo Hospital, Surabaya. *Dermatol Rep.* 2019;11:122–3.

42. Bordignon V, Di Domenico EG, Trento E, D'Agosto G, Cavallo I, Pontone M, et al. How Human Papillomavirus Replication and Immune Evasion Strategies Take Advantage of the Host DNA Damage Repair Machinery. *Viruses*. 2017;9(12):390.
43. Bechtel M. A., Trout W. Sexually Transmitted Diseases. *Clin. Obstet. Gynecol.* 2015; 58 (1): 172–184.
44. Bahrami A, Hasanzadeh M, Shahidsales S, Farazestanian M, Hassanian SM, Moetamani Ahmadi M, et al. Genetic susceptibility in cervical cancer: From bench to bedside. *Journal of Cellular Physiology*. 2018;233(3):1929-39
45. Behan J. W., Sutton A., Wysong A. Management of Skin Cancer in the High-Risk Patient. *Curr. Treat. Options Oncol.* 2016; 17 (12): 60.
46. Benevolo M., Donb M. G., Ravenda P. S., Chiocca S. Anal human papillomavirus infection: prevalence, diagnosis and treatment of related lesions. *Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.* 2016; 14 (5): 465–477.
47. Bruni L, Albero G, Serrano B, et al. ICO/IARC Information Centre on HPV and Cancer (HPV Information Centre). Human Papillomavirus and Related Diseases in the World. Summary Report 17 June 2019 [Internet]. 2019 [cited 2021 Jan 21];22. Available from: <https://www.hpvcentre.net/statistics/reports/XWX.pdf>.
48. Braaten KP, Laufer MR. Human Papillomavirus (HPV), HPV-Related Disease, and the HPV Vaccine. *Rev Obstet Gynecol.* 2008;1:2–10.
49. Burger EA, Kim JJ, Sy S, et al. Age of Acquiring Causal Human Papillomavirus (HPV) Infections: Leveraging Simulation Models to Explore the Natural History of HPV-induced Cervical Cancer. *Clinical Infectious Diseases*. 2017;65(6):893-9. DOI: <https://doi.org/10.1093/cid/cix475>
50. Chagas BS, de Lima RCP, Júnior SSLP, et al. Significant association between IL10-1082/- 819 and TNF-308 haplotypes and the susceptibility to cervical carcinogenesis in women infected by Human papillomavirus. *Cytokine*. 2019;113:99-104. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2018.06.014>

51. Chan CK, Aimagambetova G, Ukybassova T, et al. Human Papillomavirus Infection and Cervical Cancer: Epidemiology, Screening, and Vaccination – Review of Current Perspectives. *Journal of Oncology*. 2019;2019:3257939. DOI: <https://doi.org/10.1155/2019/3257939>
52. Chen X, Wang S, Liu L, Chen Z, Qiang F, Kan Y, Shen Y, Wu J, Shen H, Hu Z (2012) A genetic variant in the promoter region of toll-like receptor 9 and cervical cancer susceptibility. *DNA Cell Biol* 31(5):766–771
53. Chondros K, Graikos K, Klambatsas A, Dimasis N. Extensive anogenital warts: a multidisciplinary surgical management. *Pan Afr Med J*. 2018;30:227. Published 2018 Jul 26. doi:10.11604/pamj.2018.30.227.16448
54. Chrysagi A., Kaparos G., Vrekoussis T. et al. Prevalence of HPV genotypes in cervical adenocarcinoma: a study in Greek women. *J. BUON*. 2016; 21 (3): 666–672.
55. Chu Q. D., Vezeridis M. P., Libbey P. N., Wanebo H. J. Giant condyloma acuminatum (Buschke-Lowenstein tumor) of the anorectal and perianal regions. *Diseases of the Colon & Rectum*. 1994;37(9):950–957. doi: 10.1007/BF02052606
56. Claesson U., Lassus A., Happonen H. et al. Topical treatment of venereal warts: a comparative open study of podophyllotoxin cream versus solution. *Int. J. STD AIDS*. 1996; 7: 429–434.
57. Cui T., Huang J., Lv B., Yao Q. Giant condyloma acuminatum in pregnancy: a case report. *Dermatologic Therapy*. 2019;32(4, article e12972) doi: 10.1111/dth.12972.
58. Dahl M. V. Imiquimod: an immune response modifier. *J. Amer. Acad. Dermatol*. 2000; 43: S1–S5.
59. Daniilidis A, Koutsos J, Oikonomou Z, et al. Cytokines of Cervical Mucosa and Human Papilloma Virus Infection of the Cervix: A Descriptive Study. *Acta Cytologica*. 2016;60:58- 64. DOI: <https://doi.org/10.1159/000445161>

60. Das G., Tan B., Nicholls K. Safety and efficacy of a novel short occlusive regimen of imiquimod for selected non-melanotic skin lesions in renal transplant patients. *Int. med. J.* 2016; 46 (3): 352–355.

61. David C. V., Nguyen H., Goldenberg G. Imiquimod: a review of off-label clinical applications. *J. Drugs Dermatol.* 2011; 10 (11): 1300–1306.

62. Daugherty M, Byler T. Genital Wart and Human Papillomavirus Prevalence in Women in the United States From Penile Swabs: Results From National Health and Nutrition Examination Surveys. *Sex Transm Dis.* 2018;45:412–6.

63. De Villiers E. M. Cross-roads in the classification of papillomaviruses. *Virology.* 2013; 445 (1–2): 2–10.

64. De Villiers E.-M., Fauquet C., Broker T. R. et al. Classification of papillomaviruses. *Virology.* 2004; 324: 17–27.

65. Del Río-Ospina L, Soto-De León SC, Camargo M, et al. The DNA load of six high-risk human papillomavirus types and its association with cervical lesions. *BMC Cancer.* 2015;15:100. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12885-015-1126-z>

66. Doorbar J, Egawa N, Griffin H, et al. Human papillomavirus molecular biology and disease association. *Reviews in Medical Virology.* 2015;25(51):2-23. DOI: <https://doi.org/10.1002/rmv.1822>

67. Farzaneh F, Roberts SA, Mandal D, et al. The IL-10 –1082G polymorphism is associated with clearance of HPV infection. *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology.* 2006;113(8):961-4. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.2006.00956.x>

68. Fernandes JV, De Medeiros Fernandes TAA, De Azevedo JCV, et al. Link between chronic inflammation and human papillomavirus-induced carcinogenesis (Review). *Oncology Letters.* 2015;9(3):1015-26. DOI: <https://doi.org/10.3892/ol.2015.2884>

69. Flores R, Abalos AT, Nielson CM, Abrahamsen M, Harris RB, Giuliano AR. Reliability of sample collection and laboratory testing for HPV detection in men. *J Virol Methods*. 2008;149(1):136-143.
70. Ghittoni R., Accardi R., Chiocca S., Tommasino M. Role of human papillomaviruses in carcinogenesis. *E. Cancer Med. Sci*. 2015; 9: 526.
71. Giardino G., Cirillo E., Gallo V. et al. B cells from nuclear factor kB essential modulator deficient patients fail to differentiate to antibody secreting cells in response to TLR9 ligand. *Clin. Immunol*. 2015; 161 (2): 131–135.
72. Gu J, Li YQ, Xu F, et al. Analysis of HPV infection status in patients with cervical cancer in Liangshan Prefecture. *Jiangsu Med J*. 2016;(3):340-341.
73. Giuliano AR, Lee JH, Fulp W, et al. Incidence and clearance of genital human papillomavirus infection in men (HIM): a cohort study. *Lancet*. 2011;377(9769):932-940.
74. Giuliano AR, Lazcano-Ponce E, Villa LL, et al. The human papillomavirus infection in men study: human papillomavirus prevalence and type distribution among men residing in Brazil, Mexico, and the United States. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2008;17(8):2036-2043.
75. Gonzalez PA, Hildesheim A, Rodriguez AC, et al. Behavioral/lifestyle and immunological factors associated with HPV infection among women older than 45 years of age. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2010;19(12):3044-3054.
76. Grennan D. Genital Warts. *JAMA*. 2019; 321(5):520
77. Gupta SM, Mania-Pramanik J. Retraction Note: Molecular mechanisms in progression of HPV-associated cervical carcinogenesis. *Journal of Biomedical Science*. 2019;26:28. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12929-019-0520-2>
78. Gupta G, Glueck R, Patel PR. HPV vaccines: Global perspectives. *Hum Vaccin Immunother*. 2017;13:1421–24.
79. Gutiérrez-Hoya A, Soto-Cruz I. Role of the JAK/STAT Pathway in Cervical Cancer: Its Relationship with HPV E6/E7 Oncoproteins. *Cells*. 2020;9(10):2297. DOI: <https://doi.org/10.3390/cells9102297>

80. Gutiérrez-Xicoténcatl L, Plett-Torres T, Madrid-González CL, Madrid-Marina V. Molecular diagnosis of human papillomavirus in the development of cervical cancer. *Salud Publica Mex.* 2009;51:S479–88.

81. Hasanzadeh M, Rejali M, Mehramiz M, et al. The interaction of high and low-risk human papillomavirus genotypes increases the risk of developing genital warts: A population-based cohort study. *J Cell Biochem.* 2019;120:12870–4.

82. Hemmi H., Kaisho T., Takeuchi O. et al. Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat. Immunol.* 2002; 3: 196–200.

83. Hu X, Zhang Z, Ma D, Huettner P, Massad LS, Nguyen L, et al. TP53, MDM2, NQO1 and susceptibility to Cervical Cancer. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology.* 2010;19(3):755-61.

84. Hemper E., Wittau M., Lemke J. et al. Management of a giant perineal condylomata acuminata. *GMS Interdiscip. Plast. Reconstr. Surg. DGPW.* 2016; 5: Doc07.

85. Hong S, Laimonis A. Laimins. Manipulation of the innate immune response by human papillomaviruses. *Shiyuan Virus Res* 2017; 231: 34–40. DOI: 10.1016/j.virusres.2016.11.004

86. Iuliano M, Mangino G, Chiantore MV, Zangrillo MS, Accardi R, Tommasino M, et al. Human Papillomavirus E6 and E7 oncoproteins affect the cell microenvironment by classical secretion and extracellular vesicles delivery of inflammatory mediators. *Cytokine.* 2017.

87. Jorgaqi E., Jafferany M. Giant condyloma acuminatum (Buschke-Lowenstein tumor): combined treatment with surgery and chemotherapy. *Dermatologic Therapy.* 2020;33(1, article e13193) doi: 10.1111/dth.13193. [

88. Knoblich R., Failing J. F. Giant Condyloma Acuminatum (Buschke-Löwenstein tumor) of the rectum. *American journal of clinical pathology.* 1967;48(4):389–395. doi: 10.1093/ajcp/48.4.389.

89. Kwok C. S., Gibbs S., Bennett C. et al. Topical treatments for cutaneous warts. *Cochrane Database of Syst. Rev.* 2012; 9. Art. No. CD001781.

90. Lacey C. J., Woodhall S. C., Wikstrom A., Ross J. 2012 European guideline for the management of anogenital warts. *J. Europ. Acad. Dermatol. Venereol.* 2013; 27(3): e263–270.

91. Lai Z., Ni-Zhang, Pan X., Song L. Toll-like receptor 9 (TLR9) gene polymorphisms associated with increased susceptibility of human papillomavirus-16 infection in patients with cervical cancer *Journal of International Medical Research.* 2013. Vol. 41, no4. P. 1027-1036.

92. Leeman A, Jenkins D, Marra E, et al. Grading immunohistochemical markers p16INK4a and HPV E4 identifies productive and transforming lesions caused by low- and high-risk HPV within high-grade anal squamous intraepithelial lesions. *Br J Dermatol.* 2019;182:1026–33.

93. Léonard B, Kridelka F, Delbecque K, et al. A clinical and pathological overview of vulvar condyloma acuminatum, intraepithelial neoplasia, and squamous cell carcinoma. *Biomed Res Int.* 2014;2014:1–11.

94. Liu M, He Z, Zhang C, et al. Transmission of genital human papillomavirus infection in couples: a population-based cohort study in rural China. *Sci Rep.* 2015;5:10986.

95. Li B, Zhang L, Zhao J, et al. The value of cytokine levels in triage and risk prediction for women with persistent high-risk human papilloma virus infection of the cervix. *Infectious Agents and Cancer.* 2019;14:16. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13027-019-0231-z>

96. Lu LH, Yu J, Zhang YH, Wu XF, Liu XY. HPV Infection and Distribution of HPV Genotypes on Patients with Condyloma Acuminatum. *J Reproduct Contraception.* 2014;25:26–31

97. Martnez-Nava GA, Fernandez-Nico JA, Madrid-Marina V, Torres-Poveda K. Cervical Cancer Genetic Susceptibility: A Systematic Review and Meta-Analyses of Recent Evidence. *PloS one.* 2016;11(7):e0157344.

98. Mastutik G, Alia R, Rahniayu A, et al. Genotyping of human papillomavirus in cervical precancerous lesion and squamous cell carcinoma at Dr Soetomo Hospital, Surabaya, Indonesia. *Afr J Infect Dis*. 2018;12:7–12.
99. Mastutik G, Rahniayu A, Kurniasari N, Rahaju AS, Alia R. Correlation between the expression of E6 HPV with P53 and P16INK4A at cervical adenocarcinoma and cervical normal. *Indian J Forensic Med Toxicol*. 2021;15:1827–34.
100. McBride K.R., Singh S. Predictors of adults' knowledge and awareness of HPV, HPV-associated cancers, and the HPV vaccine: implications for health education. *Health Educ. Behav*. 2018;45:68–76.
101. McKay J, Tenet V, Franceschi S, Chabrier A, Gheit T, Gaborieau V, et al. Immuno-related polymorphisms and cervical cancer risk: The IARC multicentric case-control study. *PloS one*. 2017;12(5):e0177775.
102. Mehta AM, Spaans VM, Mahendra NB, Osse EM, Vet JN, Purwoto G, et al. Differences in genetic variation in antigen-processing machinery components and association with cervical carcinoma risk in two Indonesian populations. *Immunogenetics*. 2015;67(56):267-275.
103. Morgan EL, Macdonald A. Manipulation of JAK/STAT Signalling by High-Risk HPVs: Potential Therapeutic Targets for HPV-Associated Malignancies. *Viruses*. 2020;12(9):977. DOI: <https://doi.org/10.3390/v12090977>
104. Morgan EL, Macdonald A. Autocrine STAT3 activation in HPV positive cervical cancer through a virus-driven Rac1—NFκB—IL-6 signalling axis. *PLoS Pathogens*. 2019;15(6):e1007835. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007835>
105. Mucoz N, Franceschi S, Bosetti C, et al. Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: the IARC multicentric case-control study. *Lancet*. 2002;359:1093(9312)-11101.
106. Munger K, Gwin TK, McLaughlin-Drubin ME. p16 in HPV-associated cancers. *Oncotarget*. 2020;4:1864–5.

107. Murtiastutik D, Mastutik G, Rahniayu A, Arista A, Setyaningrum T. The Genotype of Human Papilloma Virus of Male Patients with Anogenital Warts. *Folia Med Indonesiana*. 2019;55:100–6.
108. Nejo YT, Olaleye DO, Odaibo GN. Prevalence and risk factors for genital human papillomavirus infections among women in Southwest Nigeria. *Arch Basic Appl Med*. 2018;6(1):105-112.
109. Nkili-Meyong AA, Moussavou-Boundzanga P, Labouba I, et al. Genome-wide profiling of human papillomavirus DNA integration in liquid-based cytology specimens from a Gabonese female population using HPV capture technology. *Sci Rep*. 2019;9:1504–14.
110. Obeid DA, Almatrouk SA, Khayat HH, et al. Human papillomavirus type 16 and 18 viral loads as predictors associated with abnormal cervical cytology among women in Saudi Arabia. *Heliyon*. 2020;6(2):e03473. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03473>
111. Oleszkiewicz-Śpiółek J, Adamska P, Marvaso G, Jereczek-Fossa BA, Wychowański P, Starzyńska A. Assessment of awareness of human papillomavirus infection impact on oral cavity among patients. *Postepy Dermatol Alergol*. 2021;38(6):985-993. doi:10.5114/ada.2020.97396
112. O'Mahony C, Gomberg M, Skerlev M, Alraddadi A, de LH-A, ME, Majewski S, Nicolaidou E, Serdaroğlu S, Kutlubay Z, Tawara M, Stary A, Al Hammadi A, Cusini M. Position statement for the diagnosis and management of anogenital warts. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV*. 2019; 33(6):1006-1019
113. Orozco-Colun A, Carrillo-Garcna A, Munde-Tenorio A, et al. Geographical variation in human papillomavirus prevalence in Mexican women with normal cytology. *Int J Infect Dis*. 2010;14(12):e1082-e1087.
114. Ozaydin-Yavuz G, Bilgili SG, Guducuoglu H, et al. Determinants of high-risk human papillomavirus infection in anogenital warts. *Postepy Dermatol Alergol*. 2019;36:76–81.

115. Pal A, Kundu R. Human Papillomavirus E6 and E7: The Cervical Cancer Hallmarks and Targets for Therapy. *Front Microbiol.* 2020;10:1–15.
116. Pandey S, Mittal B, Srivastava M, Singh S, Srivastava K, Lal P, Mittal RD (2011) Evaluation of toll-like receptors 3 (c.1377C/T) and 9 (G2848A) gene polymorphisms in cervical cancer susceptibility. *Mol Biol Rep* 38(7):4715–4721
117. Patel H, Wagner M, Singhal P, Kothari S. Systematic review of the incidence and prevalence of genital warts. *BMC Infect Dis.* 2013;13:39–52.
118. Rivera-Alvarez F, Kwon B, Ganti L. Buske-Lowenstein Tumor: A Rare Cause of Genital Warts. *Cureus.* 2022;14(3):e23477. Published 2022 Mar 25. doi:10.7759/cureus.23477
119. Rojas JM, Avia M, Martín V, et al. IL- 10: a multifunctional cytokine in viral infections. *Journal of Immunology Research.* 2017; 2017:6104054. DOI: <https://doi.org/10.1155/2017/6104054>
120. Roszak A, Lianeri M, Sowińska A, Jagodziński PP (2012) Involvement of toll-like receptor 9 polymorphism in cervical cancer development. *Mol Biol Rep* 39(8):842–843
121. Rydzewska-Rosołowska A., Kakareko K., Kowalik M., Zaręba K., Zbroch E., Hryszko T. An unexpected giant problem -- Giant condyloma (Buschke-Lowenstein tumor) *International Journal of Infectious disease.* 2021;103:280–281. doi: 10.1016/j.ijid.2020.11.200.
122. Santegoets LA, van Baars R, Terlouw A, et al. Different DNA damage and cell cycle checkpoint control in low- and high-risk human papillomavirus infections of the vulva. *Int J Cancer.* 2012;130:2874–85.
123. Sarma UP, Mahanta J, Borkakoty BJ, Talukdar KL, Gogoi R, Yadav K. Demographic characteristic of HPV infection in women-a hospital based study from Guwahati, India. *Natl J Med Res.* 2013;3(1):1-4.
124. Shanmugasundaram S, You J. Targeting Persistent Human Papillomavirus Infection. *Viruses.* 2017;9(8):229. DOI: <https://doi.org/10.3390/v9080229>

125. Shen YY, Du H, Liu ZH, et al. The relationship between the human papillomavirus viral load and the degree of pathology in the cervical intraepithelial neoplasia. *Chinese Journal of Clinical Obstetrics and Gynecology*. 2017;18(4):313-316.
126. Shin HR, Franceschi S, Vaccarella S, et al. Prevalence and determinants of genital infection with papillomavirus, in female and male university students in Busan, South Korea. *J Infect Dis*. 2004; 190(3):468-476.
127. Sonnenberg P, Tanton C, Mesher D, et al. Epidemiology of genital warts in the British population: implications for HPV vaccination programmes. *Sex Transm Infect*. 2019;95:386–90.
128. Sudenga SL, Wiener HW, King CC, Rompalo AM, Cu-Uvin S, Klein RS, et al. Dense genotyping of immune-related loci identifies variants associated with clearance of HPV among HIV-positive women in the HIV epidemiology research study (HERS). *PloS one*. 2014;9(6):99-109.
129. Suligoï B, Vittori G, Salfa MC, et al. Prevalence and incidence of external genital warts in a sample of Italian general female population. *BMC Infect Dis*. 2017;17:126–33.
130. Takahashi S, Shimizu T, Takeyama K. Detection of human papillomavirus DNA on the external genitalia of healthy men and male patients with urethritis. *Sex Transm Dis*. 2003;30(8):629-633.
131. Takahashi S, Takeyama K, Miyamoto S, et al. Incidence of sexually transmitted infections in asymptomatic healthy young Japanese men. *J Infect Chemother*. 2005;11(6):270-273.
132. Tamandani DMK, Shekari M, Suri V. Interleukin-12 Gene Polymorphism and Cervical Cancer Risk. *American Journal of Clinical Oncology*. 2009;32(5):524-8. DOI: <https://doi.org/10.1097/COC.0b013e318192519a>
133. Thomas JO, Herrero R, Omigbodun AA, et al. Prevalence of papillomavirus infection in women in Ibadan. *Br J Cancer*. 2004;90:638-645.

134. Trombetta L. J., Place R. J. Giant condyloma acuminatum of the anorectum: trends in epidemiology and management. *Diseases of the Colon & Rectum*. 2001;44(12):1878–1886. doi: 10.1007/BF02234473.
135. Veasey JV, Campaner AB, Lellis RF. Aspects of Langerhans cells and TNF- α in the cutaneous immunity of anogenital warts. *An Bras Dermatol*. 2020;95(2):144-149. doi:10.1016/j.abd.2019.06.007
136. Wang SS, Bratti MC, Rodriguez AC, Herrero R, Burk RD, Porras C, et al. Common variants in immune and DNA repair genes and risk for human papillomavirus persistence and progression to cervical cancer. *The Journal of infectious diseases*. 2009;199(1):20-30
137. Wang J, Li S, Li J, Li Z, Wang Q, Peng X, Shi M, Che Q, Liu H, Jiang L, Zeng K. Evaluation of human papillomavirus DNA detection-guided aminolaevulinic acid-mediated photodynamic therapy for the treatment of condyloma acuminata. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*. 2019; 28:114-119.
138. Wesselmann P, Schwarze-Zander C, Boesecke C, et al. HPV-associated anal lesions in HIV+ patients: long-term results regarding quality of life. *Int J Colorectal Dis*. 2020;35(6):1103-1110. doi:10.1007/s00384-020-03567-1
139. Westrich JA, Warren CJ, Pyeon D. Evasion of host immune defenses by human papillomavirus. *Virus research*. 2017; 231:21-33.
140. Wiraguna AAGP, Andriani PI, Adiguna MS. Comparison of Plasma Zinc Levels Among HIV+ and HIV- Subjects Infected with Condyloma Acuminata. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2019;20(3):943-949. Published 2019 Mar 26. doi:10.31557/APJCP.2019.20.3.943
141. Wojcinski M. 14 Jahre HPV-Impfung: was haben wir erreicht? [14 years of HPV vaccination: what has been achieved?]. *Gynakologe*. 2021;54(11):801-809. doi:10.1007/s00129-021-04869-3
142. Woodby B, Scott M, Bodily J. The Interaction Between Human Papillomaviruses and the Stromal Microenvironment. *Progress in Molecular*

Biology and Translational Science. 2016;144:169-238. DOI: <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2016.09.003>

143. Xiao Yang, Yanxiang Cheng, Chunsheng Li. The role of TLRs in cervical cancer with HPV infection: a review. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2017; 2: e17055. DOI: 10.1038/sigtrans.2017.55

144. Xu H, Shen Q, Fan B, Xi C, a combination therapy of traditional Chinese medicine and CO laser treatment for condyloma acuminatum. *Journal of medical virology*. 2020. Online ahead of print.

145. Yuan H, Krawczyk E, Blancato J, Albanese C, Zhou D, Wang N, et al. HPV positive neuroendocrine cervical cancer cells are dependent on Myc but not E6/E7 viral oncogenes. *Scientific Reports*. 2017;7:45617.

146. Walline H. M. et al. High-risk human papillomavirus detection in oropharyngeal, nasopharyngeal, and oral cavity cancers: comparison of multiple methods // *JAMA Otolaryngol. Head Neck Surg.* — 2013. — Vol. 1 № 12. — P. 1320–1327

147. Winer RL., Hughes JP., Feng Q., et al. Condom use and the risk of genital human papillomavirus infection in young women // *N Engl J Med* 2006; 354:2645-54.

148. Wright TC. Jr., Cox JT., Massad LS., Twiggs LB., Wilkinson EJ. 2001 Consensus Guidelines for the Management of Women with Cervical Cytological Abnormalities. *J Low Genit Tract Dis*. 2002 Apr;6(2):127-43

149. Wright TC Jr., Schiffman M., Solomon D., Cox JT., Garcia F., Goldie S., et al. American Society of Colposcopy and cervical Pathology (ASCCP). Interim guidance for the use of human papillomavirus DNA testing as an adjunct to cervical cytology for screening. *Obstet Gynecol*. 2004 Feb;103(2):304-9.

150. Zeng YY, Chen XY, Tian KG, et al. The correlation of interleukin-10 gene polymorphism and HPV infection and cervical lesions in Dongguan region. *Journal of Clinical and Experimental Medicine*. 2015; 14:636-639.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1

Выявление ДНК ВПЧ 12 высокоонкогенных типов

Метод основан на одновременной амплификации участков ДНК ВПЧ и участка ДНК β -глобинового гена, который использовали как эндогенный внутренний контроль, с гибридизационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке» (формат FEP).

В качестве материала для ПЦР-диагностики использовали соскобное отделяемое цервикального канала.

ПЦР – анализ состоит из следующих этапов:

- экстракция (извлечение) ДНК из биологического образца;
- амплификация искомого участка ДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке» (формат FEP);
- анализ и интерпретация результатов.

Анализ результатов проводили с помощью флуориметра АЛА – 1/4 (BIOSAN, Латвия) регистрируя интенсивность флуоресцентного сигнала образцов по трем каналам:

- по каналу FAM регистрируется сигнал о накоплении продукта амплификации ДНК ВПЧ 16 генотипа;
- по каналу HEX регистрируется сигнал о накоплении продукта амплификации ДНК ВПЧ 18 генотипа;
- по каналу ROX регистрируется сигнал о накоплении продукта амплификации ДНК ВКО.

Полученные результаты интерпретируются на основании данных об уровне флуоресцентного сигнала относительно фона по соответствующим каналам для контрольных образцов и проб ДНК, выделенных из клинических образцов. Интерпретация производится автоматически с помощью программного обеспечения АЛА – 1.

Оборудование

Для проведения молекулярно-генетических исследований использован комплекс специального лабораторного оборудования: амплификатор детектирующий (GeneAmp PCR-system 2720 «AppliedBiosystems», США) ламинарный бокс для ПЦР (Германия), спектрофотометр с рабочими длинами волн 260, 280 нм (NanoDrop 2000 «ThermoScientific», USA); холодильник бытовой электрический, с температурой морозильной камеры минус 20°C; микроцентрифуги под пробирки вместимостью 1,5 мл, скорость вращения не менее 13000 об/мин (Eppendorf, Hittich, Германия), аппарат для встряхивания «В ортекс» со скоростью вращения до 3000 об/мин (Eppendorf, Германия), термостат под одноразовые конические пробирки с крышкой вместимостью 0,5 и 1,5 мл, с температурой в диапазоне 15°C-120°C, точность поддержания температуры - 0,2°C, разность температур между соседними ячейками - не более 0,5°C, прибор для горизонтального электрофореза, весы лабораторные, дозаторы механические с переменным объёмом дозирования, штативы для микропробирок объёмом 0,5 мл и 1,5 мл, УФ-транслюминатор с встроенной цифровой камерой, автоматические пипетки (Sartorius, Финляндия), источник питания (ДНК-Технология, Россия).

В процессе молекулярно-генетических исследований использованы следующие материалы: 1. расходные материалы (пробирки одноразовые конические полипропиленовые микроцентрифужные вместимостью 0,2; 0,5; 1,5 мл, наконечники одноразовые с фильтром для дозаторов с переменным объёмом дозирования до: 10; 20; 200; 1000 мкл, перчатки медицинские одноразовые); 2. ферменты (термостабильная ДНК-полимераза («Сибэнзим», Новосибирск, Россия; «Invitrogen», США), эндонуклеазы MnlI, Hind III и HinfI (НПО «Сибэнзим», г. Новосибирск), протеиназа K, термостабильная ДНК-полимераза *Thermusaquaticus* (НПО «Биотекс»); 3. реактивы (акриламид, бис-акриламид, 5% раствор глицерина, (фирма «Sigma» США), ТЕМЕД, додецилсульфат натрия, трис-HCl (фирма «Serva», ФРГ), 2-меркаптоэтанол (фирма «Ferax», ФРГ), SDS («Serva», ФРГ), дезоксинуклеотидтрифосфаты, дидезоксинуклеотидтрифосфаты, трипон X 100, хлорид магния, хлорид натрия, сульфат аммония, персульфат аммония, олигонуклеотидные праймеры (НПО «Сибэнзим», г. Новосибирск), тест-системы фирмы ООО НПФ Литех (г. Москва), бромфенол, бычий сывороточный альбумин, додецилсульфат натрия, ксилоцианол, ТЕМЕД, фикол, крезол, 10-кратный буфер BlueJuice™ («Invitrogen», США), этидиум бромид («Sigma», США); агароза («Invitrogen», США) борная кислота, персульфат аммония, сульфат аммония, трис-HCl, ЭДТА («Serva», Германия), хлороформ, этанол, фенол («Вектон», Санкт-Петербург, Россия).

Этапы молекулярно-генетического исследования

I этап – забор биологического материала

Производится забор крови из локтевой вены в сухие пластиковые пробирки объемом 5 мл с 0,5 мл 0,5 М ЭДТА (pH=7,8).

II этап - выделение ДНК

Выделение из ядер лимфоцитов ДНК проводили по усовершенствованному нами методу, которое заключалось в следующем:

1. К 500,0 мкл крови добавляли лизирующий буфер, содержащий 0,32 М сахарозы, 10 мМ Трис-НСl («Sigma», USA), pH 7,5; 5 мМ MgCl₂; 1% Тритон X-100 («Sigma X100»);

2. Центрифугирование полученной смеси (12000 об/мин) и отбор надосадочной жидкости, в которую добавляли лизирующий раствор содержащий 1 М Трис-НСl, pH 7,5; 0,5 мМ ЭДТА pH 8,0 («Sigma», USA); 0,5% SDS («Sigma», USA) и 100 мкг/мл протеиназы К;

3. Смесь инкубировали в течение 1 часа при 56⁰С, с последующим добавлением 100,0 мкл 6 М NaCl и интенсивным встряхивали в течение 15-20 сек и центрифугированием (12000 об/мин) в течение 5 мин.

4. Надосадочную жидкость содержащую ДНК переносили в другую стерильную пробирку и добавляли 40,0 мкл 3М ацетата Na и 800,0 мкл охлажденного 96% этанола, с последующим перемешиванием и центрифугированием в течение 15 мин (14000 об/мин).

5. Промывали образовавшийся преципитат 1,0 мл 70% этанола и центрифугировали, полученный осадок ДНК высушивали и растворяли в 50-150,0 мкл буфера TE или деионизованной воды.

6. Концентрация и чистота выделенной ДНК оценивались по стандартной методике с измерением оптической плотности ДНК-содержащих растворов на спектрофотометре NanoDrop 2000 (США) при длине волны 260 и 280 нм. Отношение OD₂₆₀/OD₂₈₀ должно быть равным 1,8. ДНК хранили в буфере TE при +4⁰С.

III этап – полимеразная цепная реакция (ПЦР) синтеза ДНК

К 50-200 нг исследуемого образца геномной ДНК добавляли в 25,0 мкл смеси, которая включала 0,67 мМ трис-НСl, рН 8,8 при 250С; 16,6 мМ (NH₄)₂SO₄; от 1 до 6,7 мМ MgCl₂; 6,7 мкМ ЭДТА; 10 мМ 2-меркапт этанола, 170,0 мкг БСА, смесь четырех основных дезоксирибонуклеотидтрифосфатов в концентрации 0,8 мМ каждого, ДНК-полимеразу (термоустойчивую) в объеме 0,2 ед/мкл («Сибэнзим», Новосибирск), олигопраймеры до конечной концентрации. Специфичность амплификации после окончания ПЦР, а также количество полученного амплификата проверяли электрофоретическим методом. При необходимости проведен гидролиз амплифицированных фрагментов ДНК согласно рекомендациям фирм-изготовителей («Сибэнзим», Новосибирск).

Адаптация систем праймеров для стандартного ПЦР анализа проведена при помощи ПЦР-анализаторов «Applied Biosystems 2720» (США) и «Rotor-Gene 6000» (Corbett Австралия). Температурно-временные параметры изменяли в зависимости от пар олигопраймеров. Оптимизацию реакции ПЦР проводили при следующих оригинальных условиях:

Детекция полиморфизмов изучаемых генов осуществлялась в следующей последовательности:

1 этап - предварительная денатурация (1 цикл) в течение 1 мин при температуре 94⁰С;

2 этап - 35 циклов амплификации, что включало в себя денатурацию в течение 10 сек при температуре 93⁰С; отжиг праймеров в течение 10 сек при температуре 64⁰С; элонгацию в течение 20 сек при температуре 72⁰С (20 сек) и заключительный синтез в течение 1 мин при температуре 72⁰С;

3 этап – хранение (10 мин) Амплификационная смесь (10,0 мкл) содержала 70 мМ Трис-НСl (рН 9.0), 20 мМ (NH₄)₂ SO₄; 1,0 мМ MgCl₂; 0,025% Твин-20; 0,025% NP-40; по 5 пмоль каждого праймера; 0,2 мМ dNTP; 0,5 ед. Taq-полимеразы и 100–200 нг ДНК, минеральное масло.

IV этап - Электрофорез и визуализация результатов

Специфичность и количество амплифицированных фрагментов проверяли методом электрофореза в агарозном геле. Для этого продукты амплификации и рестрикции разделяли в 6,0-10,0% в 2,0-3,0% агарозном или полиакриламидном гелях, приготовленных на трис-боратном буфере (ТБЕ), в аппарате для вертикального или горизонтального электрофореза, соответственно. Гель окрашивали водным раствором бромистого этидия (0,5 мкг/мл). Для детекции продуктов амплификации в агарозном геле использовали камеры для горизонтального электрофореза «Хеликон» и источник питания «Эльф-4» («ДНК-Технология»), просматривали в ультрафиолетовом свете на трансиллюминаторе с видеосистемой и цифровой камерой для регистрации результатов и передачи изображения.

При сравнительном анализе 73 образцов контрольной ДНК отмечена положительная корреляционная связь между полученными нами результатами и с данными стандартизованной тест-системой компании ПФ «Литех» (г. Москва). Гетеро- и гомозиготные генотипы были выявлены у тех же образцов ДНК, отрицательный результат был подтвержден обоими методами, что свидетельствует о высоком соответствии результатов. При этом необходимо отметить, что в ходе были выявлены незначительные статистически незначимые различия ($P > 0.05$).

Таким образом, усовершенствованная методика детекции полиморфных вариантов генов Trp-53 (rs1042522), TNF α (rs 1800629), IL-10 (rs 1800896), TLR - 9 (rs 5743836) имеет свои преимущества:

1. Предоставляет возможность в кратчайшие, приемлемые для практической медицины, сроки выявлять текущее состояние исследуемых образцов в ходе диагностики;
2. Высокая чувствительность диагностики;
3. Легкость освоения технологии средним медперсоналом.