

*Д.І. ЗАБОЛОТНИЙ¹, Т.Д. САВЧЕНКО¹, Є.І КЛОЧКОВ¹,
О.В. КОВАЛЮК², Г.П. АРТЕМЧУК²*

КЛІНІКО-ВІРУСОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ У ХВОРИХ НА ПАПІЛОМАТОЗ ГОРТАНІ

*ДУ «Інститут отоларингології ім. проф. О.С. Коломійченка НАМН України»¹;
Національна медична академія післядипломної освіти ім. П.Л. Шупика,
МОЗ України²*

Роль вірусних агентів в інфекційній патології у людини невпинно зростає. Серед збудників вірусної етіології за останнє десятиріччя провідне місце займає вірус папіломи людини (ВПЛ), відповідальність якого за розвиток множинних злоякісних та доброякісних новоутворень не викликає сумніву. ВПЛ – епітеліотропний вірус: кожному типу ВПЛ притаманна відповідна «улюблена» локалізація на шкірі чи слизових оболонці. Поряд з цим, ВПЛ розподіляються на групи відповідно до їх канцерогенного потенціалу. Особливої уваги заслуговує група ВПЛ, що здатна запускати процеси неопластичної трансформації в інфікованих клітинах та призводити до їх малігнізації. Це ВПЛ високого канцерогенного ризику (ВКР), до яких сьогодні віднесені 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82 типи. Три типи ВПЛ (26, 53 та 66) включено до категорії припустимо високого ризику. До типів низького канцерогенного ризику (НКР) входять ВПЛ 6, 11, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81. Клінічними проявами при інфікуванні низькоонкогенними типами є доброякісні зміни в слизовій оболонці уrogenітального та аеродигестивного тракту.

В оториноларингологічній практиці найбільш актуальним є спричинене ВПЛ захворювання – рецидивуючий папіломатоз гортані (РПГ). За даними літератури, клінічні прояви папіломатозу гортані відомі лікарям більше трьох століть. Завдяки розвитку молекулярно-генетичних методів дослідження у 80-х роках минулого століття визначена вірусна етіологія цього захворювання шляхом виділення ДНК ВПЛ 6/11 в

папіломах гортані у осіб з рецидивуючим папіломатозом гортані. Серед типів, з якими асоціюється більшість (95%) випадків рецидивуючого папіломатозу гортані, лівова доля припадає на 6-й та 11-й типи. В Україні такі дослідження вкрай обмежені. В той же час такі дані представляють науковий інтерес та мають велике практичне значення у зв'язку зі збільшенням кількості випадків РПГ у осіб різних вікових груп.

Віруси папіломи людини за своєю структурою відносяться до ДНК-вміщуючих безоболонкових (простих) вірусів, що мають сферичну форму та розміри 55 нм. Вірусна частинка складається з ДНК та білкової оболонки (капсиду). Капсид, сформований двома структурними білками, має ікосаедричний тип симетрії та складається із 72 капсомерів, організованих у 12 пента- і 6 гексамерів.

Унікальний геном ВПЛ представлений однією молекулою кільцевої суперспіралізованої дволанцюгової ДНК, що містить біля 8 тисяч пар нуклеотидів та здатна до інтеграції в геном клітини-господаря. Геном ВПЛ має 8 ранніх (E1-E8) та 2 пізніх гени (L1 та L2), які кодують 8-10 білків в залежності від типу вірусу. Проста будова ВПЛ обумовлює його стійкість до дії фізико-хімічних факторів: вони не чутливі до дії розчинників ліпідів (ефіру, ацетону та ін.), стійкі до дії багатьох дезінфектантів та кислого середовища (не руйнуються при рН 3,0), добре зберігаються при низьких температурах. ВПЛ інактивуються при +50°C протягом 60 хв.

В інфікованих клітинах на початкових стадіях геном ВПЛ персистує в епісомаль-

ній (кільцевій) формі в цитоплазмі і клітина здатна продукувати вірусні частки. Проте геном ВПЛ може існувати не тільки в епісомальній формі, але й у вигляді лінійної молекули ДНК, інтегрованої в геном клітини, при цьому здатність вірусу до репродукції втрачається, але зберігається транскрипція вірусних генів, насамперед онкогенів E6 та E7, які можуть взаємодіяти з білками, що регулюють ділення клітини. Зокрема, продукт гену E6 здатен взаємодіяти з білком гену p53, а E7 – з Rb105, утворюючи комплекси, що призводить до нездатності білків виконувати свою функцію і, відповідно, до зниження протипухлинного захисту. В багатьох дослідженнях було показано, що саме з накопиченням продуктів генів E6 та E7 у надмірній кількості пов'язаний розвиток процесів трансформації клітини. Важливо враховувати, що продукти генів E6 та E7 кожний окремо виявляють онкогенні властивості та при кооперації вони здатні значно посилювати онкогенний потенціал один одного в процесі трансформації клітин.

В діагностичних підходах та тактиці лікування при рецидивуючому респіраторному папіломатозі сьогодні залишається ряд невирішених та малодосліджених питань, які унеможливають досягнення позитивних результатів лікування, збільшення тривалості міжрецидивного періоду та ін. Можливо на ці результати впливають особливості збудника, їх приналежність до високо- чи низькоонкогенних типів ВПЛ, спектр і частота виявлення різних типів при моно- та мікст-інфекції.

Метою дослідження було визначення спектру ВПЛ та вивчення зв'язку типів ВПЛ у хворих на папіломатоз гортані з тяжкістю перебігу захворювання.

Матеріали і методи дослідження

У дослідженні приймали участь 55 хворих з клінічним діагнозом папіломатозу гортані (ПГ). Всі пацієнти були госпіталізовані для проведення хірургічного втручання та консервативного лікування до ДУ «Інститут отоларингології ім. проф. О.С. Коломійченка НАМН України» в період з січня 2012 р. по жовтень 2013 р. Серед хворих переважно більшість складають чоловіки та

жінки молодого і середнього віку. Суттєвих відмінностей у розподілі хворих за статтю нами виявлено не було.

Перед початком лікування хворі проходили комплексне обстеження, яке включало: загальноклінічне обстеження (загальний аналіз крові, група, резус крові, цукор крові, коагулограма, флюорографія органів грудної порожнини, ЕКГ), ретельний аналіз скарг пацієнта та збір анамнезу (кількість рецидивів, їх зв'язок з ендо- та екзогенними патогенними факторами, тривалість ремісії, визначення попереднього лікування та його успішність), визначення фаху та стажу роботи хворих, умов життя, праці і відпочинку, наявності шкідливих звичок, спадковості даного захворювання у близьких родичів та існування папіломатозу у близьких людей. Після цього здійснювалось обстеження ЛОР-органів, яке включало передню риноскопію, орофарингоскопію, отоскопію, непряму ларингоскопію (при необхідності – непряму мікроларингоскопію).

Збір анамнезу включав визначення давності захворювання на РПГ, з чим пов'язує пацієнт його виникнення, проведення попереднього лікування, його ефективність, кількість рецидивів. Оцінка тяжкості перебігу захворювання виконувалась відповідно до запропонованої Д.Г. Черешкіним у 1971 р. клінічної класифікації ПГ: за характером клінічного перебігу (рецидив – 1 раз на рік, 1-3 рази на рік, безперервно рецидивуючий перебіг).

При дослідженні папіломатозних розростань слизової оболонки гортані використовувались гістологічні та молекулярно-генетичні методи лабораторної діагностики. Гістологічні препарати готувались з операційного матеріалу від осіб з передраковими захворюваннями ВДШ. Видалені тканини фіксувались в 10% розчині нейтрального формаліну, зневоднювались в етиловому спирті зростаючої концентрації, заливались в целоїдин. Серійні зрізи фарбувались гематоксилином та еозином, досліджувались в світлооптичному мікроскопі. Гістопатологічне дослідження проводилось у лабораторії патоморфології ДУ «Інститут отоларингології ім. проф. О.С. Коломійченка НАМН України». Видалені патологічно змінені тканини направлялися до патогістологічної

лабораторії, де після їх дослідження отримувалася патогістологічний висновок. При визначенні ступеня дисплазії плоскоклітинного епітелію ми використовували класифікацію Bethesda System (1988, 1991), запропоновану спеціалістами Національного Інституту рака США: SIL high grade (squamous intraepithelial lesions high grade) – плоскоклітинні інтраепітеліальні ураження високого ступеня. Молекулярно-генетичні дослідження проводились у ПЛР-лабораторії кафедри вірусології НМАПО ім. Шупика.

Метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) використовувався для визначення ВПЛ високого канцерогенного ризику (ВКР) та низького канцерогенного ризику (НКР) в клінічному матеріалі. Клінічний матеріал – шматочки видалених папілом з уражених локусів гортані, який доставлявся до лабораторії з дотриманням умов «холодового ланцюга».

Для виявлення ДНК ВПЛ ВКР (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 52, 58, 59, 67) використовувалась комерційна ПЛР-тест-система «АмплиСенс® ВПЧ ВКР скрин-FL» (Росія). Для виявлення в клінічному матеріалі та диференціації ДНК ВПЛ 6, 11 генотипів використовувалась тест-система «АмплиСенс® ВПЧ 6/11-FL» (Росія).

Результати дослідження

Виникнення захворювання пацієнти найчастіше пов'язували з перенесенням ГРВІ, хірургічними втручаннями, психоемоційними перенавантаженнями, перенесеними у недавньому минулому вагітністю та пологами у жінок, з палінням або взагалі не могли визначити зв'язок із захворюванням. Зв'язок з професійною шкідливістю у даного контингенту хворих не виявлений.

У 15 обстежуваних ПГ виник в ранньому дитинстві. Шкідливі звички (паління) на період звертання або у недавньому минулому відмічали 27 (49,1%) пацієнтів.

Скарги хворих на ПГ в залежності від локалізації патологічного процесу та його розповсюдженості полягали у порушенні голосової функції від легкої охриплості до афонії та у дихальній дисфункції різного ступеня, дискомфорту у горлі при ковтанні.

Отже, скарги мали симптоматичний характер без специфічних ознак.

При визначенні ЛОР-статусу та проведенні непрямой ларингоскопії у таких хворих спостерігається наявність типового новоутворення гортані у вигляді поодиноких або дифузних екзофітних розростань яскраво-червоного кольору на тлі світло-рожевої слизової оболонки, найчастіше у середньому відділі гортані, зі збереженою рухомістю голосових складок. Найчастіша локалізація папіломатозу гортані – передня комісура. Проте в деяких випадках (особливо при рецидивуючих процесах після численних втручань) візуально важко визначити природу процесу. Тому важливо уважно проводити диференціальну діагностику з іншими продуктивними доброякісними та злоякісними захворюваннями гортані. І, як відомо, заключний діагноз визначається тільки після патогістологічного дослідження видаленої патологічної тканини. Серед хворих на папіломатоз гортані плоскоклітинні папіломи (ПП) з дисплазією першого ступеня (ДІ), (легка дисплазія – ураження 1/3 епітеліального шару, здатність клітин до диференціації не порушена) визначені у 19; ПП з дисплазією II ступеня (ДІІ) (помірна дисплазія – ураження до 2/3 епітеліального шару, здатність клітин до диференціації порушена у значному ступені спостерігались у 28 осіб; ПП з ДІІІ (тяжка дисплазія – уражений весь епітеліальний шар і тільки незначна його частина зберігає здатність визрівати до рівня клітин проміжного шару) – у 3 пацієнтів. Преінвазивний інтраепітеліальний рак (CIS), коли атипія клітин збільшується, функція епітелію втрачається повністю, його стратифікація відсутня, базальна мембрана не порушена, діагностований у 5 обстежених.

При використанні ПЛР в клінічному матеріалі у всіх хворих на папіломатоз гортані була виявлена ДНК ВПЛ.

Результати визначення різних типів ВПЛ у видалених патологічно змінених тканинах методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) (табл. 1) свідчать про досить високу частоту виявлення асоціацій 6 та 11 типів вірусів або їх поєднання з ВПЛ ВКР.

Таблиця 1

Частота визначення різних типів ВПЛ у хворих на папіломатоз гортані

Хворі на ПГ	ВПЛ, типи			6 або 11 + ВПЛ ВКР	6+11 + ВПЛ ВКР
	6-й	11-й	6 + 11-й		
Кількість хворих, n=55 (100%)	19 (34,5%)	12 (21,8%)	10 (18,2%)	9 (16,4%)	5 (9,1%)

Таблиця 2

Розподіл хворих на папіломатоз гортані за кількістю рецидивів

Групи	Характеристика захворювання	Кількість хворих
1-а	Рецидивуючий папіломатоз гортані з кількістю рецидивів не більше 1 разу на рік	24
2-а	Рецидивуючий папіломатоз гортані з кількістю рецидивів 1-3 рази на рік	21
3-я	Безперервно рецидивуючий папіломатоз гортані	10

З 55 хворих на папіломатоз гортані у 21 кількість рецидивів захворювання становила 1-3 рази на рік, у 24 – не більше 1 разу на рік. У 10 осіб захворювання мало безперервно рецидивуючий характер (табл. 2). За цим показником ми розподілили обстежуваних з ПГ на 3 групи.

Серед хворих з кількістю рецидивів 1 раз на рік (1-а група) у патологічно змінених тканинах гортані виявлений ВПЛ 6-го

типу – у 11, 11-го типу – у 8, 6+11 – у 4, 6+ВПЛ ВКР – у 1. Патогістологічний висновок: ПП (плоскоклітинна папілома) з ДІІ – у 3 хворих, Д І-ІІ – у 21.

Серед 21 хворого, у котрих кількість рецидивів ПГ становила 1-3 рази на рік (2-а група), у 5 визначено 6-й тип ВПЛ, у 6 – 11-й тип вірусу, у 4 – 6+11 тип ВПЛ, у 4 – 6-й або 11-й тип ВПЛ поєднувався з ВПЛ ВКР, а у 2 – 6+11 типи – з ВПЛ ВКР.

Таблиця 3

Розподіл хворих на ПГ за ступенем дисплазії та типом ВПЛ

Патогістологічний висновок	Типи ВПЛ та їх асоціація											
	6			11			6+11			6/11+ВКР		
	число хворих											
ПП + ДІ	6	2		4	3	2		2				
ПП + ДІІ	5	1	1	3	3	2	4	3	3	1	2	
ПП + ДІІІ		2		1								
CIS			1					1			2	1
Всього	11	5	2	8	6	4	4	6	3	1		1

Примітка: 1-а – перша група; 2-а – друга група; 3-я – третя група; ПП – папілярна папілома; легка дисплазія (ДІ) - ураження 1/3 епітеліального шару, здатність клітин до диференціації не порушена; помірна дисплазія (ДІІ) – ураження до 2/3 епітеліального шару, здатність клітин до диференціації порушена у значному ступені; тяжка дисплазія (ДІІІ) – уражений весь епітеліальний шар і тільки незначна його частина зберігає здатність визрівати до рівня клітин проміжного шару; преінвазивний інтраепітеліальний рак (CIS) – атипія клітин збільшується, функція епітелію втрачається повністю, його стратифікація відсутня, базальна мембрана не порушена.

У 2 пацієнтів з наявністю декількох типів ВПЛ в комбінації з ВПЛ ВКР після видалення патологічного процесу патогістологічний висновок був «cancer in situ»; у 3 патогістологічно констатована плоскоклітинна папілома з інтраепітеліальною дисплазією ступеню ДШ; у 10 патогістологічно визначена плоскоклітинна папілома з дисплазією I та II ступеня.

З 10 хворих 3-ї групи ВПЛ 6-го типу відмічено у 2, 11-го типу – у 4, ВПЛ 6 + ВПЛ ВКР – у 1, ВПЛ 6+11 – у 3. Гістологічно серед пацієнтів цієї групи ПП з ДІ-ІІ спостерігалось у 4, ПП з ДШ – у 3 осіб, CIS – у 3.

Таким чином, серед хворих на РП з частотою рецидивів не більше 1 разу на рік (1-а група) у 4 (20,8 %) зустрічається поєднання 6-го та 11-го типів ВПЛ або 6 та ВПЛ ВКР у 1. В 2-й групі (кількість рецидивів 1-3 рази на рік) у 28,6 % випадків зустрічається поєднання ВПЛ 6 та 11-го типів з ВПЛ ВКР. В 3-й групі (безперервно рецидивуючий перебіг) у 40 % випадків спостерігається поєднання ВПЛ низького канцерогенного ризику (НКР) з ВПЛ ВКР. Статистична обробка результатів проведена з використанням критерію χ^2 методом кутового перетворення

Фішера (1978). За цими даними при порівнянні 1-ї та 3-ї груп відмічається статистично достовірна відмінність ($p \leq 0,01$) частоти поєднання ВПЛ низького та високого канцерогенного ризику. Отже, виходячи з цього, можна зробити висновок, що поєднання ВПЛ НКР та ВКР призводить до більш тяжкого перебігу захворювання з високою частотою розвитку рецидивів.

Висновки

1. Визначено, що в епітеліальних клітинах у всіх пацієнтів з ПП методом ПЛР виявлена ДНК ВПЛ.

2. Показано, що у 30% хворих має місце асоціація ВПЛ як 6+11 типів, так і ВПЛ НКР та ВПЛ ВКР.

3. Асоціація низько- та високоонкогенних типів ВПЛ достовірно частіше зустрічається у хворих з безперервно рецидивуючим перебігом РПГ.

4. За нашими дослідженнями, преінвазивний інтраепітеліальний рак (CIS) найчастіше зустрічається серед пацієнтів, у яких є поєднання ВПЛ НКР та ВКР, що потребує проведення ретельного моніторингу у цих хворих з метою запобігання трансформації процесу у злоякісну пухлину.

1. Дмитриев Г.А., Биткина О.А. Папилломавирусная инфекция. – М.: Медицинская книга. – 2006. – 76 с.
2. Shah KV, Stern WF, Shah FK, et al. Risk factors for juvenile onset recurrent respiratory papillomatosis. *Pediatr Infect Dis J.* May 1998; 17(5): 372-6.
3. Kashima HK, Mounts P, Shah K. Recurrent respiratory papillomatosis // *Obstet Gynecol Clin North Am.* Sep 1996; 23(3):699-706.
4. Pou A.M., Rimell F.L., Jordan J.A. et al. Adult respiratory papillomatosis: human papillomavirus type and viral coinfections as predictors of prognosis // *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* – Oct. 1995; 04(10 Pt 1): 758-62.
5. Дзюблик І.В., Ковалюк О.В. Папіломавірусна інфекція: погляд на проблему лікаря-вірусолога // *Укр. хімотерапевтичний журн.* – 2012. – №1-2 (25) – С. 98-106.
6. Dillner J., Arbyn M., Unger E. and Dillner L. Monitoring of human papillomavirus vaccination // *Clin. Exp. Immunol.* – 2011 January; 163(1): 17-25.
7. Солдатский Ю.Л., Онуфриева Е.К., Погосова И.Е. и соавт. Инфицированность вирусом папилломы человека верхних дыхательных путей у детей без клинических признаков респираторного папилломатоза // *Вестн. оториноларингологии.* – 2009. – № 1. – С. 16-19.
8. Сафронникова Н.Р., Мерабишвили В.М. Профилактика вирусзависимых онкологических заболеваний. Диагностика и лечение папилломавирусной инфекции. Пособие для врачей. – СПб., 2005. – 34 с.
9. Human papillomavirus type s 6 and 11 DNA sequences in genital and laryngeal papillomas and in some cervical cancer // *Medical Sciences Vol.* 80 pp. 560-563, January 1983.

10. Gissmann L., Diehl V., Schultz-Coulon H. J., zur Hausen H. J Virol 1982; 44: 1: 393-400.
11. Гублер Е.В. Вычислительные методы анализа и распознавания патологического процесса. – Л.-М., 1978. – 296 стр.
12. Романова Ж.Г., Малец Е.Л. Эпидемиологические аспекты папилломатоза гортани у взрослых // Вестн. оториноларингологии. – 2013. – №1. – С. 22-25.

Надійшла до редакції 28.05.14.

© Д.І. Заболотний, Т.Д. Савченко, Є.І Клочков, О.В. Ковалюк, Г.П. Артемчук, 2014

КЛИНИКО-ВИРУСОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ У БОЛЬНЫХ ПАПИЛЛОМАТОЗОМ ГОРТАНИ

*Заболотний Д.І., Савченко Т.Д., Клочков Е.І.,
Ковалюк О.В., Артемчук Г.П. (Киев)*

Резюме

Приведены результаты собственных клинико-лабораторных исследований, свидетельствующих о наличии ДНК ВПЧ в папилломах у всех больных папилломатозом гортани, о высокой частоте выявления ассоциаций разных типов ВПЧ как низкоонкогенных, так и высокоонкогенных. У пациентов с часто рецидивирующим течением заболевания чаще встречается высокая степень дисплазии эпителия.

Ключевые слова: вирус папилломы человека, папилломатоз гортани, полимеразная цепная реакция.

CLINICAL AND VIROLOGICAL FEATURES OF PATIENTS WITH LARYNGEAL PAPILLOMATOSIS

*Zabolotnyi D.I., Savchenko T.D., Klochkov E.I.,
Kovaliuk O.V., Artemchuk H.P. (Kiev)*

Summary

The article presents the results of own clinical and laboratory studies that indicate the presence of HPV DNA in papilloma of all patients with laryngeal papillomatosis, high frequency of association of different types of HPV, both low oncogenic and high oncogenic. In patients with frequent recurrent disease course, high degree of epithelium dysplasia is more common.

Key words: human papilloma virus (HPV), laryngeal papillomatosis, polymerase chain reaction.