

*А.А. Манькин<sup>1</sup>, В.В. Ежов<sup>2</sup>, С.В. Белов<sup>4</sup>, Ю.К. Данилейко<sup>3</sup>, В.А. Салюк<sup>3</sup>, В.П. Дымковец<sup>2</sup>, Е.А. Гущина<sup>1</sup>,  
Ф.В. Лисицын<sup>1</sup>*

## **Исследование ультраструктуры эпителия шейки матки пациенток, инфицированных вирусами папилломы человека типов 16 и 18, до и после лечения методом контрастной термолазерной терапии**

<sup>1</sup>ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского» Минздрава России, 123098, Москва; <sup>2</sup>Городская клиническая больница № 52, 123182, Москва; <sup>3</sup>Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН, 119991, Москва; <sup>4</sup>ООО «ТехноМикрон», 119571, Москва

Представлены результаты исследования ультраструктуры эпителия шейки матки пациенток, инфицированных вирусом папилломы человека (ВПЧ) типов 16 и 18, до и после лечения методом контрастной термолазерной терапии (КТЛТ). Показано, что после лечения, спустя 1,5 и 6 мес, в биоптате и мазке из цервикального канала не определяется ДНК ВПЧ методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). В ультратонких срезах структура эпителиальных клеток из биоптата после лечения соответствует норме. Метод лечения КТЛТ шейки матки показывает высокую эффективность в элиминации ВПЧ типов 16 и 18.

Ключевые слова: *вирус папилломы человека; метод контрастной термолазерной терапии; эпителий шейки матки; электронная микроскопия*

### **An ultrastructural study of the cervix epithelium infected with the human papillomavirus types 16 and 18 before and after treatment with contrasting thermo-laser therapy**

*A. A. Manykin<sup>1</sup>, V. V. Yezhov<sup>2</sup>, S. V. Belov<sup>4</sup>, Yu. K. Danileiko<sup>3</sup>, V. A. Saljuk<sup>3</sup>, V. P. Dimkovetz<sup>2</sup>, E. A. Gushchina<sup>1</sup>, F. V. Lisitsin<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> D.I. Ivanovsky Institute of Virology, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia; <sup>2</sup> Moscow City Hospital No. 052, Moscow, Russia; <sup>3</sup> Prokhorov General Physics Institute, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia; <sup>4</sup> Technomicron Ltd., Moscow, Russia

The results of the ultrastructural study of the epithelium of the patient cervix infected by the human papillomavirus (HPV) types 16 and 18 before and after treatment by contrasting thermo-laser therapy (CTLT) are presented. It was shown in this work that 1.5 and 6 months after treatment HPV DNA was not detected in the biopsy and the smear of the cervix using the polymerase chain reaction (PCR).

In the ultrathin sections, the structure of the epithelial cells from the biopsy after treatment corresponded to norm. There was effective elimination of HPV types 16 and 18 as induces by CTLT method.

Key words: *human papillomavirus; method of contrasting thermo-laser therapy; cervical epithelium; electron microscopy*

**Введение.** Рак шейки матки остается одной из самых актуальных проблем гинекологии. Заболеваемость раком этой локализации неуклонно растет и составляет приблизительно 30% от всех гинекологических заболеваний. В настоящее время доказана связь возникновения рака шейки матки с наличием у больных папилломавирусной инфекции высокого онкогенного риска. Существующие методы лечения патологии шейки матки имеют свои преимущества и недостатки. Ранее нами был предложен принципиально новый метод деструктивного воздействия на очаги поражения с одновременной стимуляцией противовирусного иммунного отклика на это воздействие, что позволяет целенаправленно, а значит более успешно лечить больных с папилломавирусной инфекцией высокого онкогенного риска и проводить целенаправленную профилактику рака шейки матки [1]. Для лечения инфицированной вирусом папилломы человека (ВПЧ) поверхности шейки матки нами была проведена модификация вышеупомянутого метода, который получил название контрастной термолазерной терапии (КТЛТ) [2]. Новизна метода заключается в воздействии на инфицированную вирусом слизистую

оболочку шейки матки кратковременного взрывного теплового воздействия. Существенным и принципиальным отличием метода от известных и используемых в гинекологии является применение лазерного излучения с параметрами (длина волны и мощность), исключающими повреждения биотканей при их непосредственном облучении. При этом лечебный эффект достигается за счет облучения биоткани, на которую предварительно нанесен тонкий слой красителя, поглощающего энергию лазерного излучения. При облучении красителя лазерным излучением в результате термохимической реакции в зоне облучения происходит выделение тепловой и механической энергии. При этом краситель выгорает и тепловое воздействие прекращается, так как непосредственно биоткань не поглощает лазерное излучение. При таком воздействии глубина деструкции биоткани не превышает 0,3 мм. При проведении лечения эпителия, пораженного ВПЧ, возникает вопрос: как быстро и насколько качественно восстанавливаются клетки эпителия. Поэтому целью настоящего исследования явилось проведение ультраструктурных исследований эпителия шейки матки пациенток, инфицированных ВПЧ типов

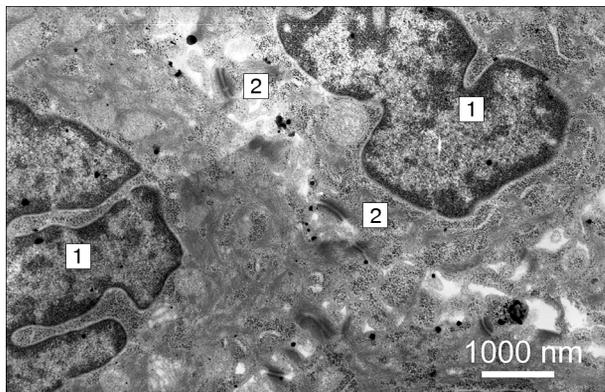


Рис. 1. Ультратонкий срез биоптата больной до лечения.  
1 – ядра эпителиальных клеток; 2 – десмосомы. Рис. 1–5 получены методом ТЭМ, контрастирование уранилацетатом.

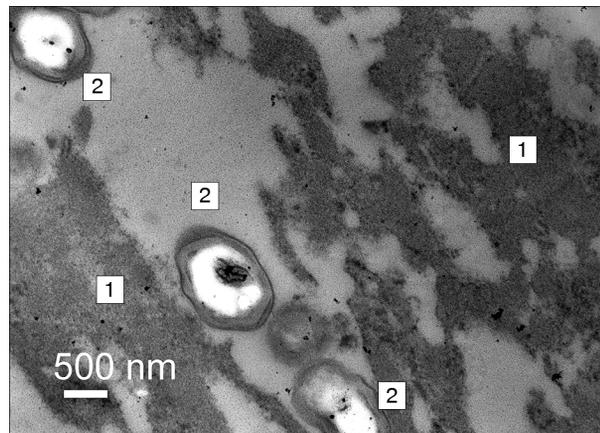


Рис. 4. Ультратонкий срез струпа после лечения.  
1 – фрагменты клеток; 2 – бактерии.

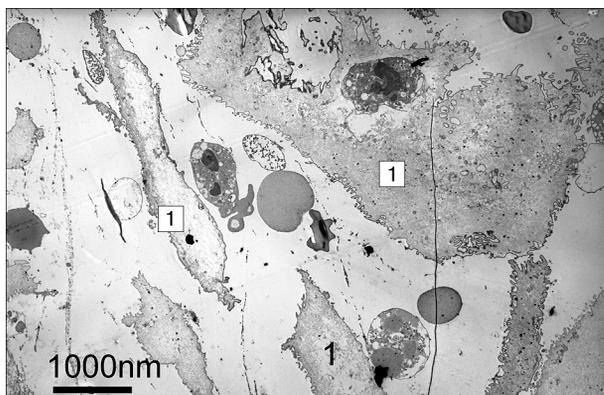


Рис. 2. Ультратонкий срез осадка мазка, взятого с поверхности эпителия шейки матки. 1 – слущивающиеся клетки эпителия, в промежутках видны клетки крови.

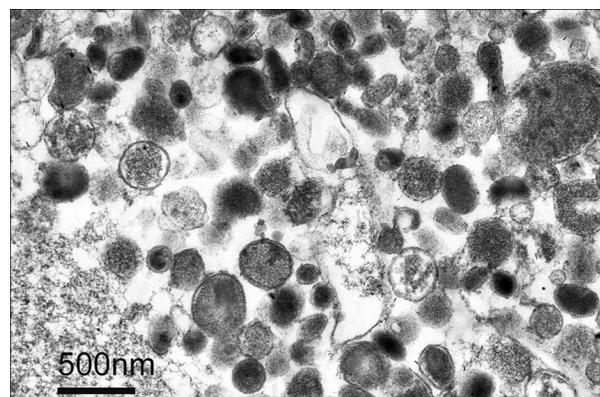


Рис. 5. Ультратонкий срез осадка мазка из цервикального канала больной до проведения лечения.

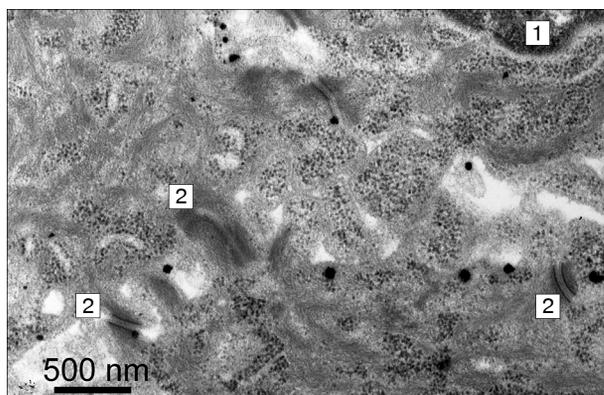


Рис. 3. Ультратонкий срез биоптата больной после лечения и восстановления эпителия.  
1 – ядра эпителиальных клеток; 2 – десмосомы.

16 и 18, до и после лечения, а также струпа эпителия, удаляемого сразу после облучения.

**Материалы и методы.** Ранее были пролечены 144 пациентки с ВПЧ-патологией шейки матки и было показано, что эффективность элиминации ВПЧ типа 16 составляет 94%, а ВПЧ типа 18 – 88%. При этом рецидивов ВПЧ-инфекций не было в течение 12 мес наблюдения. Для анализа результатов ультраструктурных исследований эпителия шейки матки из числа успешно пролеченных отобрали четырех пациенток, у которых были взяты

биоптаты и мазки из цервикального канала для анализа методом ПЦР, цитологических и гистологических исследований, а также электронной микроскопии.

**Результаты и обсуждение.** Ультраструктура материала биоптатов больных до лечения представлена на рис. 1. На микрофотографии, полученной методом трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ), четко выявляются ядра эпителиальных клеток, хорошо виден контакт клеток друг с другом через десмосомы, которые расположены по клеточной мембране. Этот срез биоптата показывает, что эти клетки расположены не в верхнем слое, а ближе к среднему слою эпителия, так как поверхностные клетки эпителия, полученные путем взятия мазка, представляют собой, как видно на рис. 2, уже сильно измененную ультраструктуру. Для них характерны разрушенные ядра, потери клеточных органелл и общее нарушение структуры морфологии клетки, так как это отмирающие, слущивающиеся клетки эпителия. Интересно, что после проведения лечения, в отдаленном периоде (6 мес) ультраструктура клеток эпителия из биоптата практически совпадает с нормой (рис. 3) – также наблюдаются типичные десмосомы. ПЦР, проведенная на этом материале, т.е. из биоптатов и мазков пролеченных пациенток, показала отсутствие ДНК папилломавируса. Особый интерес представлял анализ облученного эпителия, т.е. та часть эпителия, которая после воздействия излучения удалялась с поверхности (струп). Этот материал был также проанализирован на сохранение ультраструктуры клеток. При этом выяснилось, что типичная ультраструктура нормальных клеток

полностью изменена; невозможно выявить ни ядерный материал, ни цитоплазматический, ни мембраны, ни оргanelлы, ни контактные структуры (десмосомы; рис. 4). Клетки струпа сильно разрушены, визуально определяются отдельные клеточные фрагменты.

Интересно сопоставить этот материал по измененной ультраструктуре сопутствующих бактерий, которые присутствуют в материале мазка: действительно, в мазке, взятом у больной до проведения лечения, четко выявляется как внутренняя структура, так и оболочка бактерии, а также структура сопутствующей флоры эпителия шейки матки (рис. 5). Важно отметить, что ДНК бактерии на рис. 4, в струпе, имеет очень плотный характер, что типично для денатурированной ДНК, в то время как на рис. 5 в аналогичных структурах ДНК представляет собой хорошо разрешимые структуры. В облученном материале методом ПЦР ДНК папилломавирусов не обнаружена.

**Заключение.** Полученные данные об ультраструктуре материала эпителия шейки матки до и после лечения пациенток методом КТЛТ подтверждают отсутствие ДНК папилломавирусов у пролеченных женщин и сохранение нормальной ультраструктуры клеток восстановленного после проведенного лечения эпителия. Вкупе с ранее проведенными исследованиями [2, 3] метод лечения КТЛТ шейки матки показывает высокую эффективность в элиминации ВПЧ типов 16 и 18 и, кроме того, позволяет констатировать быстрое и эффективное восстановление эпителия после проведенного лечения.

*Метод был отмечен золотой медалью в салоне "Инновационные технологии в медицине" (Женева) в 2011 г. [4].*

*Работа выполнена в рамках Государственного контракта № 14.527.12.0011 от 13 ноября 2011 г. при финансовой поддержке Минобрнауки РФ.*

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Ежов В.В., Торчинов А.М., Фириченко В.И., Варев Г.А., Дуванский Р.А., Салиев А.А.* Способ хирургического лечения фоновых и предраковых заболеваний шейки матки. Патент на изобретение № 2330630 от 10.08.2008.
2. *Ежов В.В., Торчинов А.М., Манькин А.А., Дымковец В.П., Антохин В.М.* Элиминация вируса папилломы человека с поверхности шейки матки после контактной ИК-лазерной терапии. Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. 2009; 8(1): 42–4.
3. *Дымковец В.П., Ежов В.В., Манькин А.А., Белов С.В., Данилейко Ю.К., Осико В.В., Салюк В.А.* Оценка эффективности элиминации вируса папилломы человека с шейки матки с использованием инфракрасного лазерного излучения. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2011; 8: 188–90.
4. *Belov S., Danileiko Y., Ezov V., Manykin A., Osiko V., Saljuk V.* Therapie thermo-laser avec methode de contraste dans le traitement de pathologies cervicales. DIPLOME, Salon international des inventions. Geneva, 08.04.2011.

## REFERENCES

1. *Yezhov V.V., Torchinov A.M., Firichenko V.I., Varev G.A., Duvancky R.A., Saliev A.A.* Treatment method of background and precancerous cervical disease. Patent RF № 2330630; 2008 (in Russian).
2. *Yezhov V.V., Torchinov A.M., Manykin A.A., Dimkovetz V.P., Antochin V.M.* Human papillomavirus elimination from the surface of the cervix by contact infrared laser therapy. Voprosy gynecologii acusherstva i perinatologii, 2009; 8(1): 42–4 (in Russian).
3. *Dymkovets V.P., Yezhov V.V., Manykin A.A., Belov S.V., Danileiko Yu.K., Osiko V.V., Saliuk V.A.* Efficiency estimation of the human papilloma virus elimination from the cervix by infrared laser. Bulletin experimentalnoy biologii i mediciny 2011; 8: 188–90 (in Russian).
4. *Belov S., Danileiko Yu., Ezov V., Manykin A., Osiko V., Saljuk V.* Therapie thermo-laser avec methode de contraste dans le traitement de pathologies cervicales. In: Salon international des inventions. Geneva. 08.04.2011. DIPLOME.

Поступила 24.01.13

Журнал "Вопросы вирусологии" входит в Перечень ведущих научных журналов и изданий ВАК, в которых должны быть опубликованы значимые результаты диссертаций на соискание ученой степени доктора и кандидата наук