

На правах рукописи

СОКОЛОВА

Анастасия Владимировна

ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДОВ ДИАГНОСТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ
ПАЦИЕНТОК СО СКЛЕРОАТРОФИЧЕСКИМ ЛИХЕНОМ ВУЛЬВЫ

14.01.01 – акушерство и гинекология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва – 2021

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор

Аполихина Инна Анатольевна

Официальные оппоненты:

Зароченцева Нина Викторовна – доктор медицинских наук, профессор РАН, заместитель директора по научной работе ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии».

Хашукоева Асият Зульчифовна – доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры акушерства и гинекологии лечебного факультета ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Ведущая организация:

федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет).

Защита состоится «22» июня 2021 года в 13 часов 00 минут на заседании диссертационного совета Д 208.125.01 на базе федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 117997, г. Москва, ул. Академика Опарина д. 4

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации <https://science.ncagp.ru/upfiles/pdf/Sokolova%20A.V.-disser.pdf>

Автореферат разослан «__» _____ 2021 года

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук, профессор

Калинина Елена Анатольевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

В структуре заболеваний наружных половых органов (НПО) лидирующую позицию занимает склероатрофический лихен вульвы (СЛВ) (Роговская С.И и соавт., 2014; Simpson R.S. et al., 2019). Так, за последние десять лет (2003-2012) уровень заболеваемости СЛВ вырос с 14 до 22 на 100 000 женщин-лет (Halonen P. et al., 2020). Однако фактическая распространенность СЛВ вероятно выше, так как 1,8-30% женщин не имеют симптомов СЛВ (Goldstein A.T. et al., 2005; Virgili A. et al., 2014). В то же время известно, что частота прогрессирования СЛВ до плоскоклеточного рака вульвы составляет от 2,1% до 7% (Bleeker M.C. et al., 2016; Halonen P. et al., 2017; Чулкова О.В., Новикова Е.Г., 2017). Результаты исследований Davick и соавт. (2017) показали, что одному из трёх случаев плоскоклеточного рака вульвы предшествует СЛВ. В то время как Leibowitch и соавт. (1990) считают, что развитие плоскоклеточного рака вульвы на фоне склероатрофического лихена (СЛ) встречается в 61% случаев. СЛВ может сопровождаться такими осложнениями, как формирование синехий и эрозий, рубцевание тканей, вплоть до структурных анатомических изменений НПО, что приводит к снижению качества жизни женщин, нарушению акта мочеиспускания и даже апареунии (Van de Nieuwenhof H., et al., 2010; Haefner H.K. et al., 2014).

В основе СЛВ лежат дистрофические и атрофические процессы в базальном слое эпидермиса и сосочковом слое дермы (Regauer S. et al., 2005). Несмотря на обилие гипотез, по-прежнему остаются неясными механизмы развития СЛВ и наиболее эффективные терапевтические стратегии, позволяющие достичь длительной ремиссии заболевания, что определяет актуальность данного исследования.

Степень разработанности темы исследования

Существуют единичные исследования, описывающие молекулярно-генетические причины развития СЛВ. Большинство из их числа посвящены

изучению метилирования генов (Aide S. et al., 2012; Guerrero-Setas D. et al., 2013;), регуляции экспрессии генов микроРНК -155-5p (Ren L. et al., 2018), онкотрансформации СЛ в рак вульвы (Carlson J. A. et al., 1998; Gambichler T. et al., 2011; Rotondo J.C. et al., 2018). Результаты исследований последних лет свидетельствуют о значимом вкладе аутоиммунных нарушений в патогенез СЛВ (Tran D.A. et al., 2019). Terlou A. и соавт. (2012) исследовали аутоиммунный фенотип СЛВ и показали участие в патогенезе заболевания клеточного иммунного ответа, регулируемого Т-хелперами типа 1 с участием цитокина IFN- γ . В ряде исследований показана роль видового состава микроорганизмов, колонизирующих кожу и кишечник, в возникновении различных дерматологических заболеваний (Totte J. et al., 2016; Chattopadhyay S. et al., 2021). Однако исследований по изучению видового состава микробиоты вульвы у женщин со СЛВ не проводилось.

Для понимания молекулярного патогенеза СЛВ и вклада действующих факторов была выбрана технология NanoString. Уникальность данного метода заключается в одномоментном исследовании до 800 генов. Технология NanoString в настоящее время используется в диагностике рака молочной железы, матки и яичников, эндометриоза (Voorwerk L. et al., 2019; Croce S. et al., 2020; Millstein J. et al., 2020; Vallve-Juanico J. et al., 2020).

Традиционно для лечения СЛВ применяются локальные глюкокортикостероиды (ГКС) совместно с увлажняющими средствами (эмолентами). Тем не менее, даже после использования ГКС требуется длительная поддерживающая терапия, направленная на купирование остаточных симптомов и предотвращение рецидивов (Pergialiotis V. et al., 2020, Borghi A. et al., 2021). В последние годы внедряются новые инновационные методы лечения СЛВ: лазерное воздействие, введение плазмы, обогащённой тромбоцитами (PRP), клеточные и иные технологии. Так, результаты исследования Pagano T. и соавт. (2020) продемонстрировали эффективность и безопасность фракционного микроаблятивного CO₂

лазерного воздействия у пациенток, резистентных к локальным ГКС. В то же время Tedesco M. и соавт. (2019) отметили клиническое улучшение у 62% пациенток со СЛВ после введения PRP.

Цель исследования

Повышение эффективности диагностики и лечения женщин со склероатрофическим лишеном вульвы с учетом клинических, микробиологических, гистологических и молекулярно-генетических особенностей заболевания.

Задачи исследования

1. Определить частоту выявления по обращаемости и факторы риска СЛВ у женщин.
2. Оценить клинико - анамнестические данные пациенток со СЛВ.
3. Провести оценку гистологических признаков в биоптатах вульвы у пациенток со СЛВ.
4. Изучить состояние микробиоценоза вульвы у женщин со СЛВ.
5. Выявить особенности экспрессии генов, ассоциированных с работой иммунной системы, в биоптате вульвы у пациенток со СЛВ.
6. Разработать и оптимизировать методы дифференцированного подхода к лечению женщин со СЛВ.

Научная новизна исследования

На основании проведенного исследования представлены и научно обоснованы новые данные о клинических, микробиологических и молекулярно-генетических особенностях СЛВ.

Впервые у пациенток со СЛВ с помощью технологии NanoString выявлены дифференциально экспрессирующиеся гены в тканях вульвы, отвечающие за развитие воспалительного ответа к антигенам УПМ (гены *CIQA*, *C2*, *CTLA4*, *CTSS*, *TNF*), и регулирующие ответ на собственные антигены (гены *C4A/B*, *CCL13*, *CCL19*, *CD163*, *CD 53*, *CXCL1*, *CXCL2*, *CYBB*, *DEFB103B*, *DEFB4A*, *ID01*, *S100A8*, *S100A9*, *B2M*).

Впервые при изучении микробиоты вульвы у пациенток со СЛВ отмечена высокая степень общей микробной обсемененности (≥ 5 lg КОЕ/мл). Среди УПМ чаще отмечается рост факультативно-анаэробных видов, таких как *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* и *Klebsiella pneumoniae*. Показан активный рост лактобацилл преимущественно в титре $\geq 10^5$ КОЕ/мл, среди которых статистически значимо чаще определяется вид *L. gasseri*.

Расширено теоретическое представление о патогенезе СЛВ и предположена роль микробиоты вульвы как пускового механизма возникновения локального иммунного ответа у пациенток со СЛВ.

Практическая значимость полученных результатов

Выявлены клиничко-анамнестические факторы риска развития СЛВ.

На основании изучения клиничко-морфологических данных предложены критерии оценки форм СЛВ, и рассчитаны временные интервалы ранней и поздней стадий заболевания, имеющие значение для прогноза и выбора терапии.

Усовершенствован алгоритм ведения пациенток со СЛВ, и разработан персонифицированный подход в зависимости от клинических проявлений заболевания у женщин репродуктивного и менопаузального возраста. Доказана эффективность медикаментозных и малоинвазивных методов лечения СЛВ: локальных глюкокортикостероидов, фракционного CO₂ лазерного воздействия и PRP-терапии.

Положения, выносимые на защиту

1. Симптомы склероатрофического лишена вульвы не зависят от стадии заболевания и возраста пациенток, чаще отмечается зуд в ночное время и перед менструацией. Длительность заболевания более 5 лет является критерием поздней стадии (чувствительность 67,9% и специфичность 93%). Факторами риска склероатрофического лишена вульвы являются механическая травматизация вульвы и аутоиммунные заболевания.

2. Показана роль дисбаланса микробиоты вульвы как пускового механизма локального иммунного ответа у пациенток со склероатрофическим лихеном вульвы, проявляющегося в повышении экспрессии генов, участвующих в активации антимикробного ответа (гены *CIQA*, *C2*, *CTLA4*, *CTSS*, *TNF*) и развитии аутоиммунных реакций (гены *C4A/B*, *CCL13*, *CCL19*, *CD163*, *CD 53*, *CXCL1*, *CXCL2*, *C4BB*, *DEFB103B*, *B4A*, *ID01*, *S100A8*, *S1009*, *B2M*).
3. Фракционное CO₂ лазерное воздействие в сочетании с плазмой, обогащённой тромбоцитами, является наиболее эффективным способом лечения пациенток со СЛВ, особенно с диспареунией и сухостью. Локальные глюкокортикостероиды являются терапией первой линии преимущественно при зуде в области вульвы.

Апробация результатов

Диссертационная работа обсуждена на межклинической конференции 29 июля 2020 и на заседании апробационной комиссии ФГБУ «НМИЦ АГП им. акад. В.И. Кулакова» Минздрава России 24 декабря 2020 г., протокол №37.

Основные положения диссертации и результаты работы представлены и доложены на XIII Международном конгрессе по репродуктивной медицине (Москва, 24 января 2019), XXV Юбилейном Всероссийском конгрессе с международным участием «Амбулаторно-поликлиническая помощь» (Москва, 4 апреля 2019), Международном саммите NANOSTRING 2019 (Москва, 24 октября 2019), Международном конгрессе AIME 2020 (Париж, 5 июля 2020г.).

Внедрение результатов исследования в практику

Результаты исследования используются в практической деятельности отделения эстетической гинекологии и реабилитации, разработанный алгоритм лечения внедрён в клинические рекомендации лечения пациенток со склероатрофическим лихеном вульвы. Материалы работы включены в

лекции циклов тематического усовершенствования врачей в ФГБУ «НМИЦ АГП им. акад. В.И. Кулакова» Минздрава России.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 7 научных трудов, в том числе 6 – в научных рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки России, и 1 учебно-методическое пособие, подано заявление о выдаче патента на изобретение «Способ лечения склероатрофического лишена вульвы у женщин» (регистрационный номер: 2021108115 от 26.03.21).

Личный вклад автора

Автор принимал непосредственное участие в выборе темы исследования и определении ее методологической структуры, разработке цели и задач, сборе биологического материала и этапах молекулярно-генетического исследования, оформлении медицинской документации, лечении пациенток со СЛВ. Полученные результаты исследования были систематизированы, статистически обработаны и проанализированы диссертантом.

Степень достоверности полученных результатов

Достоверность данных исследования подтверждается объемом выборки пациенток, включенных в исследование (215), а также использованием современных методов диагностики, соответствующих цели и задачам исследования. Анализ результатов проведен с применением современных адекватных статистических методов обработки данных.

Соответствие диссертации паспорту научной специализации

Научные положения диссертации соответствуют специальности 14.01.01 – «Акушерство и гинекология», полученные результаты соответствуют области исследования по специальности, пунктам 3, 4, 5 паспорта акушерства и гинекологии.

Структура и объём диссертации

Диссертационная работа состоит из введения, 4 глав, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений, списка литературы и 6

приложений. Работа изложена на 141 страницах, проиллюстрирована 57 рисунками, включает 22 таблицы. Библиографический указатель содержит 163 литературных источников, из них - 26 отечественных и 137 зарубежных авторов.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Исследование получило одобрение комиссии по этике биомедицинских исследований (протокол №12, заседание от 21.12.2017). В период с 2017 по 2020 гг. обследованы 215 женщин, обратившиеся в отделение эстетической гинекологии и реабилитации ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России (директор – академик РАН Г.Т. Сухих; заведующий отделением – д.м.н., проф. И.А. Аполихина), которые были разделены на 2 группы: ***I, основная группа***, включала 102 пациентки (21 - 78 лет) с диагнозом склероатрофический лихен вульвы; ***II, контрольная группа***, состояла из 113 женщин (18 - 70 лет) без признаков СЛВ.

После подписания дополнительного добровольного согласия на лечение 63 пациентки I группы были разделены на 3 подгруппы:

Подгруппа 1 получала локальные ГКС (0,05% клобетазола пропионат) (n=17);

Подгруппа 2 – воздействие на очаги СЛВ фракционным CO₂ лазером (n=25);

Подгруппа 3 – комбинированную терапию: воздействие фракционным CO₂ лазером и введение аутологичной PRP (n=21).

Все пациентки завершили лечение, однако пять женщин во 2 подгруппе выбыли из исследования с третьего месяца наблюдения, т.к. связь с ними была потеряна.

Критериями включения в основную группу являлись: возраст пациенток от 18 до 80 лет; наличие склероатрофического лихена вульвы; подписанное информированное согласие на участие в исследовании.

Критерии включения в подгруппы основной группы: гистологическое подтверждение СЛВ; способность следовать требованиям протокола.

Критерии включения в контрольную группу: возраст пациенток от 18 до 80 лет; отсутствие СЛВ; подписанное информированное согласие на участие в исследовании.

Критериями исключения для всех групп являлись: вирусные и инфекционные заболевания: острые и хронические в стадии обострения; экстрагенитальные заболевания в декомпенсированной стадии; онкологические заболевания в настоящее время и в течение 12 месяцев после специализированного лечения; психические нарушения; беременность и период лактации; отсутствие возможности следования протоколу.

Пациенткам I и II групп проводились методы исследования:

1. Клиническое обследование: сбор анамнеза, общий и гинекологический осмотр, заполнение валидированных опросников (ВАШ, ИЖСФ, ИВЗ).
2. Расширенная вульвоскопия, I группа: n= 102.
3. Морфологическое исследование биоптатов вульвы, I группа: n=67.
4. Бактериологическое исследование отделяемого вульвы для определения качественного и количественного состава микробиоценоза; I группа: n = 32, II группа: n = 22.
5. ВПЧ-тестирование соскоба из переходной зоны эпителия шейки матки методом качественной ПЦР в режиме реального времени; I группа: n= 70, II группа: n= 62.
6. Молекулярно-генетическое исследование образцов ткани вульвы с целью определения уровня экспрессии мРНК 579 генов, ассоциированных с работой иммунной системы с помощью технологии NanoString; I группа: n=9, II группа: n=13.
7. Статистическая обработка данных проводилась с использованием статистического пакета Statistica 10, R 3.6.2 и R v.3.5. Для качественных признаков определяли частоту и процент встречаемости, для количественных – среднее, стандартное отклонение, а также медианы (Median), минимум, максимум и межквартильный интервал (IQR). Для оценки статистической значимости различий долей применялся тест хи-квадрат Пирсона либо, при

малом количестве наблюдений – точный тест Фишера. Сравнение количественных признаков между I и II группой проводилось с помощью критерия Манна-Уитни и t-критерия Стьюдента, в случае нормального распределения определялось с помощью критерия Шапиро-Уилка. При сравнении большего числа групп применялся тест Краскела-Уоллиса. Связь встречаемости отдельных симптомов с возрастом и длительностью менопаузы выявляли с помощью ранговой корреляции Спирмена. Для множественных сравнений в ситуациях, когда одновременно сравнивали несколько однотипных признаков, применялась поправка Бонферрони. Сравнение экспрессии генов по данным двух групп (пациентки со склероатрофическим лихеном вульвы и контрольной группы) проводилось с использованием программы nSolver™ с помощью t-критерия Стьюдента. Статистически значимыми считались результаты с $p < 0,05$.

Результаты исследований и их обсуждение

При анализе клинико-anamnestических данных выявлено, что среди пациенток со СЛВ преобладали женщины менопаузального возраста (58%, $p < 0,001$), пациентки с избыточной массой тела и ожирением 1 степени (59%, $p < 0,001$, размер различия Hedges' $g = 0.07$). Отягощенная наследственность по СЛВ определялась у 4,96%. По результатам клинико-anamnestических данных установлено, что значимым фактором риска СЛВ является нарушение целостности кожных покровов НПО. Следует отметить, что у каждой второй женщины (46,9%) I группы в родах имелись разрывы промежности различной степени ($p = 0,001$, ОШ 2,48; 95% ДИ 1,22-5,12). Полученные данные свидетельствуют о роли механического повреждения как фактора риска развития заболевания. Установлены существенные различия при анализе генеративной функции. Так, у пациенток со СЛВ общее число беременностей ($3,27 \pm 2,38$), родов ($1,54 \pm 1,00$) и абортов ($1,52 \pm 1,73$) было статистически значимо выше, по сравнению с контрольной группой ($p < 0,001$).

В структуре соматической патологии у пациенток со СЛВ наиболее значимыми оказались аутоиммунные (53,5%, $p < 0,001$, ОШ 4,23; 95% ДИ 2,26 - 8,12) и эндокринные заболевания (52,9%, $p < 0,001$, ОШ 2,48; 95% ДИ 1,22-5,12), а именно аутоиммунный тиреоидит (30,95%); заболевания кожи (13,9%, $p = 0,04$, ОШ 2,86; 95% ДИ 1,02-9,46), такие как витилиго (3,9%), каплевидный псориаз, атопический дерматит, системная склеродермия - по 2,0%; заболевания мочевыделительной системы (53,5%, $p = 0,01$, ОШ 2,09; 95% ДИ 1,17-3,77) – стрессовый (18,6%) и смешанный (7,8%) типы недержания мочи. Следует отметить, что 28,6% пациенток со СЛВ ($p = 0,02$, ОШ 2,25; 95% ДИ 1,08-4,80) имели фиброзно-кистозную мастопатию. По результатам исследования Li X. et al. (2021) у пациенток со СЛВ наблюдалась более высокая частота выявления рака груди, что требует обязательного обследования молочных желёз у данной когорты женщин. Среди гинекологических заболеваний у пациенток со СЛВ чаще диагностировались хронические воспалительные заболевания придатков (17,4%, $p = 0,02$).

Анализ клинических проявлений СЛВ показал, что зуд являлся наиболее распространённым симптомом заболевания и встречался у 78,43% ($p < 0,001$), рецидивировал в ночное время у каждой второй пациентки (56,45%, $p < 0,001$) и перед менструацией у каждой пятой пациентки (20,7%, $p < 0,001$). У 68,6% женщин I группы отмечалось от двух до шести симптомов, у 14,7% от семи до двенадцати ($p < 0,001$). Статистически значимыми симптомами также были: сухость (54,90%, $p < 0,001$), жжение (47,06%, $p < 0,001$), диспареуния (42,9%, $p = 0,02$), боль (23,76%, $p < 0,001$) и трещины в области вульвы (13,7%, $p < 0,01$). Статистически значимыми были только ассоциации таких симптомов, как жжение с болью ($p < 0,001$) и сухость с болью ($p = 0,048$). Не выявлено значимых различий в симптомах СЛВ в зависимости от стадии заболевания, возраста пациенток и по мере увеличения продолжительности менопаузы. В 10,8% (11/102) случаев СЛВ протекал бессимптомно.

Полученные нами данные показали, что у женщин со СЛВ статистически значимо чаще встречаются жалобы на недержание мочи: стрессового - 42%, и ургентного типа - 23% ($p < 0,001$). Раздражение мочой изменённой кожи вульвы отягощает течение заболевания. Исследования Berger M.V. et al. (2012), Swenson C.W. et al. (2015) также определили высокую распространённость недержания мочи у пациенток со СЛВ.

Исследования последних лет всё больше фокусируют внимание на разделении СЛВ на раннюю (неосложнённую) и позднюю (осложнённую) стадии (Regaer S. et al., 2005; Кузьменко-Москвина Ю.А., 2017; Latini A. et al., 2018). Однако временная граница между стадиями не определена. Полученные нами данные показали, что средняя продолжительность ранней стадии составила $2,21 \pm 1,3$ лет (максимально 5 лет), поздней стадии - $8,73 \pm 7,9$ лет (максимально 28 лет), $p < 0,001$. Для оценки диагностической значимости временной границы между стадиями проводился ROC-анализ, AUC (площадь под кривой) составила 0,79 (95% ДИ 0,65 - 0,92; $p = 0,0003$), график представлен на рис. 1. Длительность заболевания более 5 лет с чувствительностью 67,9% и специфичностью 93% наиболее вероятно соответствует поздней (необратимой) стадии СЛВ. Мы полагаем, что деление на стадии крайне важно, так как эффективность лечения на ранней стадии значительно выше, вплоть до полного излечения.

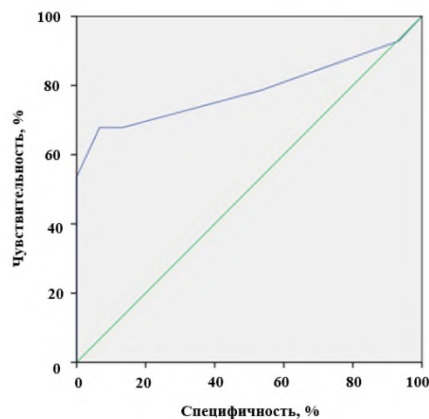


Рис.1. Диагностическая значимость временной границы между ранней и поздней стадиями склероатрофического лихена вульвы, ROC-анализ.

В нашем исследовании у 52% женщин СЛВ был диагностирован через $6 \pm 6,1$ лет, когда уже наблюдались стойкие структурные изменения,

характерные для поздней стадии: сращение малых и больших половых губ (71%, $p < 0,001$), сужение входа во влагалище (16%, $p = 0,03$) и эрозии (14%, $p = 0,03$). На ранней стадии СЛВ у 29% отмечалась отёчность вульвы ($p < 0,001$). Следует отметить трудности диагностики СЛВ на ранней стадии, однако с помощью гистологического исследования биоптатов вульвы у 30% женщин СЛВ был верифицирован в течение двух лет. По данным Virgili A. и соавт. (2016) диагноз СЛВ устанавливается через $3,7 \pm 6,9$ лет, что делает необходимым повышение информированности врачей о методах диагностики и лечения СЛВ, особенно у женщин детородного возраста.

Вместе с тем на ранней и поздней стадиях прослеживается выраженное разнообразие клинических проявлений СЛВ, статистически значимые различия получены в признаках ($p < 0,001$): отёк, гиперкератоз (лейкоплакия), гипопигментные пятна, атрофия. Выявленные изменения в области НПО позволяют считать целесообразным выделение клинических вариантов течения СЛВ в зависимости от ведущего признака: 1) Отёчная; 2) Гиперкератическая; 3) Склероатрофическая; 4) Атрофическая (рис.2). По результатам нашего исследования наиболее распространёнными были склероатрофическая (31,4%) и атрофическая (30,4%) формы, гиперкератическая определялась в 19,6%, отёчная - 18,6%.

Отёчная	Гиперкератическая форма	Склероатрофическая Форма	Атрофическая форма
			
Пациентка 51 г. Длительность заболевания-8 лет	Пациентка 51 г. Длительность заболевания -28 лет	Пациентка 37 л. Длительность заболевания -7 лет	Пациентка 45 л. Длительность заболевания - 6 лет

Рис. 2. Клинические формы склероатрофического лишена вульвы у женщин.

При гистологическом исследовании предложенных форм СЛВ, кроме воспалительной инфильтрации и гомогенизации коллагена в сосочковом слое дермы, отмечались некоторые различия на морфологическом уровне (рис. 3).

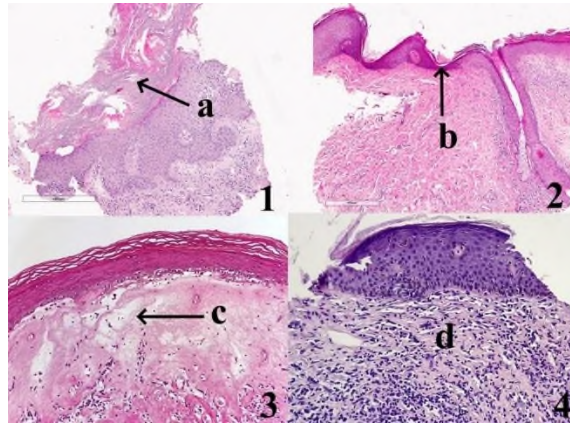


Рис.3. Фрагменты кожи вульвы с воспалительной инфильтрацией и гомогенизацией коллагена в сосочковом слое дермы и признаками, характерными для предложенных форм склероатрофического лишая вульвы: 1 – Гиперкератическая форма: а – гиперкератоз эпидермиса. 2 – Атрофическая форма: b – атрофия эпидермиса. 3 – Отёчная форма: с – выраженный отек и расширенные капилляры в сосочковом слое дермы. 4 – Склероатрофическая форма: d - наиболее выражены фиброз и воспалительная инфильтрация в сосочковом слое дермы. Окраска гематоксилином и эозином. Объектив 20х. Окуляр 10х

Так, отёчная форма морфологически выражалась в полнокровных расширенных капиллярах и отёком стромы в сосочковом слое дермы. Гиперкератические формы сопровождались утолщением эпидермиса преимущественно за счёт рогового слоя на фоне активного воспаления. Склероатрофические формы обусловлены преимущественно выраженным фиброзом дермы, атрофическая – истончением эпидермиса. Однако ввиду небольшой выборки пациенток ($n=67$), статистически значимых различий не получено.

Нами установлено, что микрофлора вульвы у пациенток со СЛВ и соматически здоровых женщин была весьма разнообразной, прежде всего выделялись факультативные и облигатные анаэробы, микроаэрофилы и дрожжевые грибы. Различия между группами получены при анализе степени обсеменённости отделяемого вульвы. Так, у 78,1% пациенток со СЛВ УПМ

выделялись в большом количестве ($\geq 5 \lg$ КОЕ/мл), тогда как в контрольной группе, напротив, 61,9% штаммов микроорганизмов определялись в концентрации менее $5 \lg$ КОЕ/мл ($p=0,005$; ОШ=5,58, 95% ДИ=1,48—23,42). У пациенток со СЛВ в репродуктивном возрасте отмечался обильный рост таких УПМ, как *Escherichia coli* (45%), а в периоде менопаузы - *Klebsiella pneumoniae* (33%). Кожа вульвы у пациенток обеих возрастных групп колонизировалась в 19% случаев *Staphylococcus aureus*, по сравнению с 4,5% у соматически здоровых женщин. У пациенток со СЛВ в 2 раза реже выделялся *Staphylococcus epidermidis* (34,0%), $p < 0,001$. В исследовании Naik S. et al. (2015) показано, что стафилококки-комменсалы, такие как *S. epidermidis*, играют важную роль в поддержании гомеостаза кожи, повышают её защитную функцию и подавляют воспалительный ответ. Видовой состав лактобактерий был разнообразным и представлен в основном тремя видами: *L. crispatus*, *L. gasseri* и *L. jensenii*. Среди лактобактерий доминировал вид *L. gasseri*, который определялся в 5 раз чаще (44%, $p=0,03$) у пациенток со СЛВ, в основном у женщин репродуктивного возраста. В настоящее время роль *L. gasseri* в поддержании микробиоценоза влагалища неоднозначна и является предметом исследований, так как вместе с *L. iners* она часто определяется при дисбиозах влагалища (Будиловская О.В. и соавт., 2017). Роль лактобактерий в этиопатогенезе заболеваний вульвы ещё не определена и требует дальнейшего изучения. У пациенток со СЛВ в периоде менопаузы не выявлено выраженных атрофических изменений слизистой влагалища клинически и по данным микроскопии отделяемого влагалища, окрашенного по Граму, что обусловлено использованием локальной менопаузальной гормонотерапии у 83,3% женщин. Это позволило нам объединить результаты культурального исследования МВ женщин различных возрастных групп в виде графического изображения. На рис. 4. представлен видовой спектр наиболее часто обнаруживаемых микроорганизмов у пациенток со СЛВ (суммарно в репродуктивном и менопаузальном возрасте) по сравнению с соматически здоровыми женщинами.

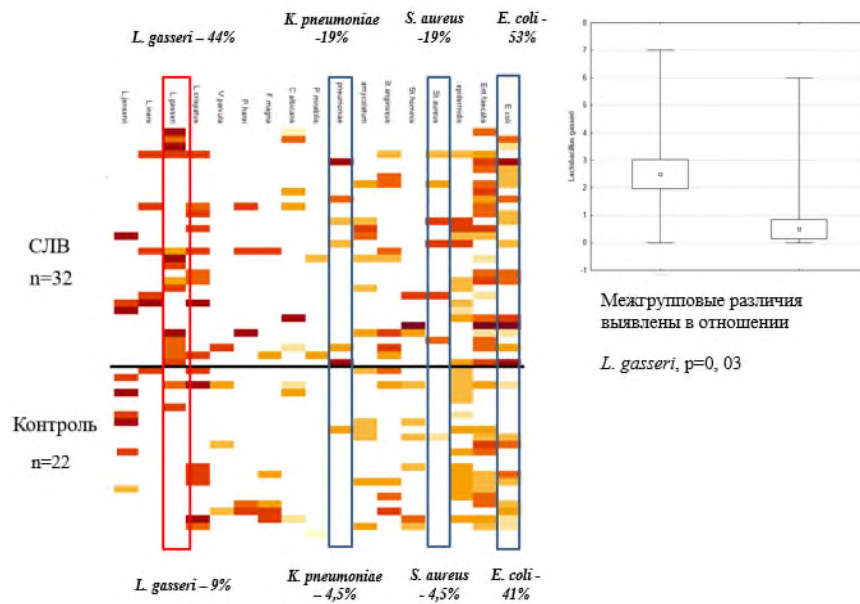


Рис. 4. Тепловая карта представителей микробиоты вульвы у пациенток со склероатрофическим лихеном вульвы и здоровых женщин. По горизонтальной оси представлен состав микробиоты вульвы 54 женщин. По вертикальной оси расположены микроорганизмы, представляющие наибольший интерес. Доля каждого микроорганизма в Ig КОЕ/мл отображается при помощи цвета: коричневым и красным цветом показан максимальный титр.

Следующим этапом работы было проведение молекулярно-генетического исследования. В настоящее время обсуждается роль ВПЧ в качестве этиологического фактора СЛВ. По результатам ВПЧ-тестирования не выявлена ассоциация между наличием ВПЧ и развитием СЛВ, так как у 81,4% женщин ВПЧ не определялся.

В настоящее время молекулярные триггерные механизмы развития СЛВ остаются неизвестными. Для изучения локального ответа иммунной системы в тканях вульвы пациенток со СЛВ, была проанализирована экспрессия 579 генов, ассоциированных с работой иммунной системы (врожденный, адаптивный и антимикробный иммунитет, воспаление и активация Т клеток) с использованием технологии NanoString. Статистически значимая экспрессия генов ($p < 0,05$) у пациенток со СЛВ ($n=9$) получена более чем для 100 генов, по сравнению с группой контроля ($n=13$), среди которых были гены, кодирующие транскрипционные факторы, а также гены, участвующие в отдельных молекулярных ответах работы иммунной системы.

На рис. 5 данные экспрессии исследуемых 579 генов представлены в виде тепловой карты.

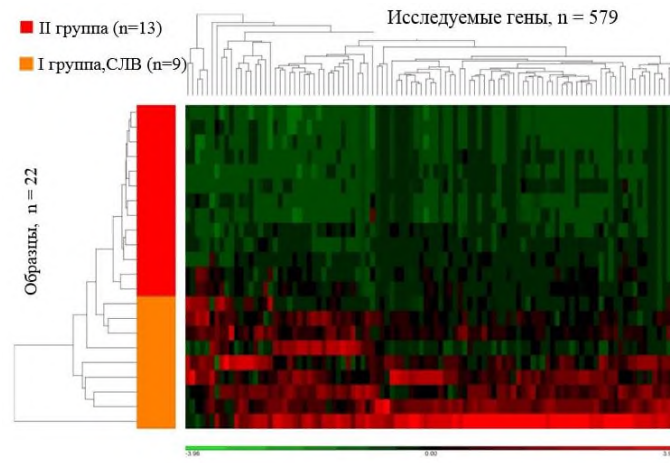


Рис. 5. Данные экспрессии 579 генов представленные в виде тепловой карты с помощью программы Partek® Genomics Suite®. Красным цветом показана повышенная экспрессия генов, зеленым - пониженная.

Анализ методом главных компонент показал, что пациентки из группы контроля обладали сходным профилем экспрессии генов и образовали компактное «облако» при проекции наблюдений в трехмерное пространство (гиперплоскость) (рис. 6). В то же время для профилей экспрессии образцов от пациенток со СЛВ наблюдался достаточно большой разброс, что отражает различия в их молекулярных характеристиках, что возможно связано с исследованием образцов пациенток на ранней и поздней стадиях или различными клиническими формами СЛВ.

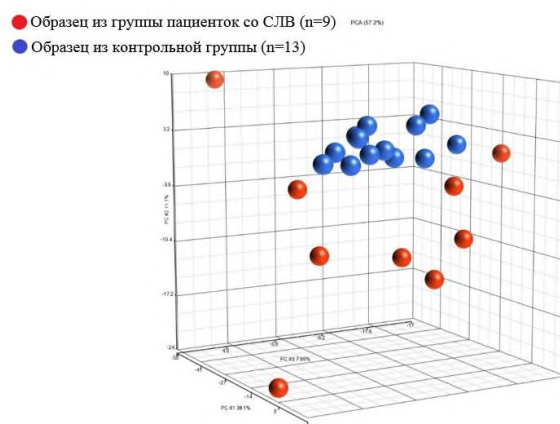


Рис. 6. Данные многокомпонентного анализа профиля экспрессии генов для всех исследованных образцов, представленные с помощью Partek® Genomics Suite®. Синим цветом обозначены образцы женщин контрольной группы, красным – образцы пациенток со склероатрофическим лихеном вульвы.

В табл. 1 представлены гены, которые могут быть информативны для понимания одного из звеньев молекулярного патогенеза СЛВ с участием иммунной системы.

Таблица 1. Список генов, ассоциированных с возможным патогенезом СЛВ.

	Процесс	Гены	Соответствие с данными исследований, проведенными в рамках данной работы
1	Антимикробный ответ	<i>CIQA, C2, CTLA4, CTSS, TNF</i>	Высокий титр условно-патогенных микроорганизмов ≥ 5 lg КОЕ/г, выявленный при культуральном исследовании
2	Аутоиммунный ответ	<i>C4A/B, CCL13, CCL19, CD163, CD 53, CXCL1, CXCL2, CYBB, DEFB103B, DEFB4A, ID01, S100A8, S100A9, B2M</i>	Высокая частота аутоиммунных заболеваний у пациенток со СЛВ по данным клинико-анамнестического исследования

Для всех генов была характерна положительная регуляция провоспалительного цитокина - TNF, хемокинов семейства CC и CXC, антимикробных пептидов (АМП) – белков S100 и особенно дефензинов β . Установлено, что уровень мРНК дефензина $\beta 103$ и дефензина $\beta 4$ у пациенток со СЛВ был повышен в 7 и 11 раз, соответственно, по сравнению с группой здоровых женщин ($p=0,001$, $p=0,003$). Дефензины являются первой линией защиты генитального тракта и секретируются в ответ на проникновение микроорганизмов. Однако в литературе не описаны особенности экспрессии АМП у пациенток со СЛВ. В исследовании Li J. et al. (2004) показано увеличение продукции АМП в ответ на повреждение и участие их в регенерации тканей. Кроме того, Ochiel D. O. et al. (2008) показали усиление синтеза АМП при увеличении степени бактериальной обсеменённости, что согласуется с данными нашего исследования: травматизация вульвы вследствие хронического зуда и расчёсов кожи вульвы, послеродовые рубцовые деформации, увеличение частоты выделения и уровня популяции факультативно-анаэробных УПМ позволяют предположить роль микробиоты в качестве пускового механизма развития локального иммунного ответа у пациенток со СЛВ. Современные технологии молекулярно-генетического анализа также показали, что микробиота может запустить иммунный ответ (Langan D. et al., 2020).

В соответствии с поставленными целями и задачами фракционное CO₂ лазерное воздействие в режиме монотерапии и в сочетании с PRP сравнивалось с традиционной терапией СЛВ - локальными ГКС. Представленные способы статистически значимо снижали интенсивность основных симптомов заболевания (зуд, жжение и диспареуния), однако только в ходе комбинированного лечения отмечено купирование боли в области вульвы ($p < 0,001$). Клиническая эффективность локальных ГКС составила 64%, фракционного CO₂ лазерного воздействия - 74%, и комбинированной терапии - 80% (рис. 7). Преимущество комбинированной терапии также заключалось в стабилизации состояния пациенток в течение 6 месяцев периода наблюдения, по сравнению с группами пациенток, получавших лазерное воздействие и ГКС, в которых лечебный эффект постепенно снижался.

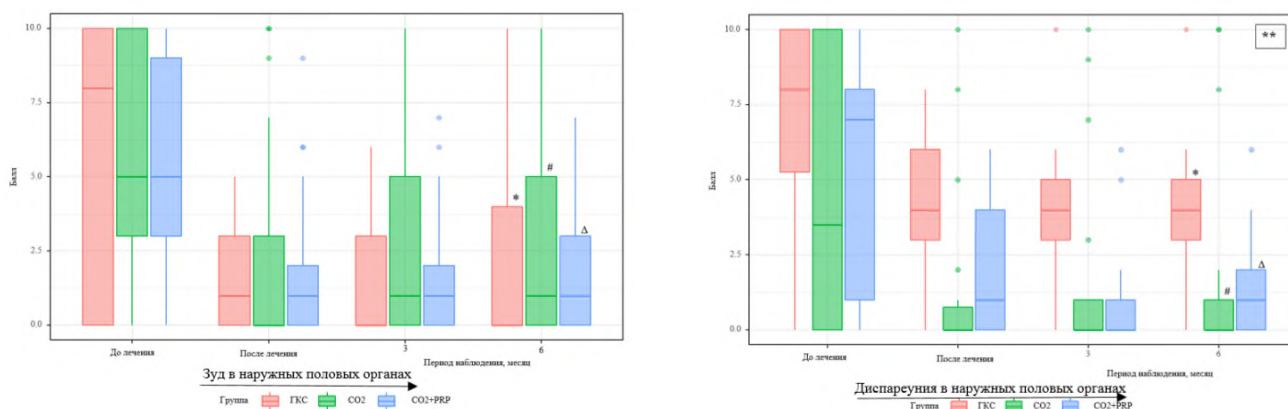


Рис.7. Показатели зуда (1) и диспареунии (2) у пациенток со склероатрофическим лихеном вульвы до и после лечения. Статистически значимые отличия от исходного уровня *(1 подгруппа), # (2 подгруппа), Δ (3 подгруппа). Статистически значимая разница между тремя методами лечения **

В ходе фракционного CO₂ лазерного воздействия в режиме монотерапии и в сочетании с PRP, достигнуто улучшение показателей женской сексуальной функции: снижение боли, повышение увлажнения, сексуального желания и оргазма, по сравнению с медикаментозной терапией $p=0,03$. Тем не менее, следует отметить более выраженную динамику снижения зуда в группе пациенток, наносивших локальные ГКС.

Таким образом, нами выявлены маркеры (дифференциально экспрессирующиеся гены) в тканях вульвы с помощью технологии NanoString, отвечающие за развитие воспалительного ответа к антигенам УПМ (гены *CIQA*, *C2*, *CTLA4*, *CTSS*, *TNF*), и регулирующие ответ на собственные антигены (гены *C4A/B*, *CCL13*, *CCL19*, *CD163*, *CD 53*, *CXCL1*, *CXCL2*, *CYBB*, *DEFB103B*, *DEFB4A*, *ID01*, *S100A8*, *S100A9*, *B2M*). Впервые в когорте российских женщин был исследован состав микрофлоры вульвы и отмечено увеличение частоты выделения и уровня популяции факультативно-анаэробных УПМ. Показана эффективность малоинвазивных способов лечения СЛВ: фракционного CO₂ лазерного воздействия и PRP-терапии, по сравнению с локальными ГКС. На основании полученных результатов разработана тактика ведения пациенток со СЛВ с учётом клинических проявлений у женщин репродуктивного и менопаузального возраста (рис. 8).



Рис. 8. Алгоритм ведения пациенток со склероатрофическим лихеном вульвы

ВЫВОДЫ

1. Частота выявления СЛВ в структуре невоспалительных заболеваний наружных половых органов у женщин составляет 62,8% (по обращаемости). Факторами риска СЛВ являются рубцовые деформации промежности и аутоиммунные заболевания.
2. Отличительный симптом СЛВ – зуд, рецидивирующий в ночное время (56,5%) и перед менструацией (21%). Другие симптомы представлены: сухостью (54,90%), жжением (47,1%), диспареунией (42,9%) и болью в области вульвы (23,8%), их частота не зависит от возраста пациентки, стадии заболевания и продолжительности периода менопаузы. Бессимптомное течение наблюдается в 11%.
3. По клиническому течению СЛВ разделяют на раннюю и позднюю стадии с временной границей длительности заболевания более 5 лет (чувствительность 67,9% и специфичность 93%).
4. Клинические симптомы имеют наибольшее значение в определении форм СЛВ, по сравнению с гистологическим исследованием, которые подразделяются на: склероатрофическую (31,4%) атрофическую (30,4%), гиперкератическую (19,6%) и отёчную (18,6%).
5. При СЛВ в составе микробиоты вульвы отмечено увеличение частоты выделения и уровня популяции факультативно-анаэробных условно-патогенных микроорганизмов: *Staphylococcus aureus* у женщин репродуктивного возраста и периода менопаузы, а также энтеробактерий - в репродуктивном возрасте *Escherichia coli*, в менопаузальном - *Klebsiella pneumoniae*. Видовой состав нормофлоры характеризовался статистически значимым доминированием лактобацилл вида *L. gasseri*, с которым часто связывают риск дисбиотических нарушений.
6. Определены гены, участвующие в антимикробном ответе (гены *CIQA*, *C2*, *CTLA4*, *CTSS*, *TNF*) и аутоиммунном ответе (гены *C4A/B*, *CCL13*, *CCL19*, *CD163*, *CD 53*, *CXCL1*, *CXCL2*, *CYBB*, *DEFB103B*, *DEFB4A*, *ID01*, *S100A8*, *S100A9*, *B2M*) при СЛВ, и показана роль дисбаланса

микробиоты вульвы в качестве этиопатогенетического фактора развития СЛВ.

7. Клиническая эффективность 0,05% клобетазола пропионата, фракционного CO₂ лазерного воздействия в режиме монотерапии и в сочетании с плазмой, обогащённой тромбоцитами, составляет 64%, 74% и 80%, соответственно. Фракционное CO₂ лазерное воздействие и плазма, обогащённая тромбоцитами, наиболее эффективны у пациенток с диспареунией и сухостью, локальные глюкокортикостероиды – при зуде в области вульвы.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. При обращении пациенток с заболеваниями вульвы необходимо проводить дифференциальную диагностику со СЛВ, включающую сбор клиничко-анамнестических данных (зуд в ночное время и перед менструацией, отягощённый семейный анамнез по СЛВ), выявление факторов риска (рубцовая деформация промежности), оценку соматического и гинекологического статуса (наличие сопутствующих аутоиммунных заболеваний и признаков СЛВ: гипопигментные пятна, гиперкератоз, атрофия и отёк кожи вульвы).
2. На ранних стадиях СЛВ рекомендуется проводить гистологическое исследование биоптатов вульвы с целью ранней верификации заболевания, что влияет на эффективность лечения и прогноз заболевания.
3. Пациенткам со СЛВ целесообразно проводить микробиологическое исследование отделяемого вульвы для оценки видового состава и уровня общей микробной обсеменённости и проведения санации урогенитального тракта по показаниям.
4. Локальные глюкокортикостероиды (0,05% клобетазола пропионат) являются препаратами первого выбора в лечении зуда у пациенток со СЛВ. В случае отсутствия ответа на проводимую терапию

глюкокортикостероидами или её недостаточной эффективности рекомендуется проводить фракционное CO₂ лазерное воздействие и PRP-терапию.

5. Фракционное CO₂ лазерное воздействие и введение плазмы, обогащённой тромбоцитами, показаны пациенткам с диспареунией и сухостью в области вульвы с интервалом четыре недели в количестве четырёх манипуляций.
6. Динамическое наблюдение за пациентками со СЛВ после лечения следует осуществлять с интервалом 6 месяцев.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Аполихина И.А./ **Соколова А.В.**, Гумова З.Д. Склероатрофический лишай наружных половых органов – ведущие причины, клиника, диагностика и лечение» // Медицинский оппонент. – 2018. - № 2. - с. 77-82.
2. **Соколова А.В.**/ Аполихина И.А. Лечение склерозирующего лишена наружных половых органов у женщин: от стандартов к инновациям // **Акушерство и гинекология.** - 2020 г. - № 7. - с. 37-46.
3. Аполихина И.А./ **Соколова А.В.**, Балашов И.С., Чернуха Л.В., Ермакова Е.И. Лечение склерозирующего лишена вульвы фракционным CO₂-лазером: проспективное клиническое исследование // **Акушерство и гинекология: новости, мнения, обучение.** - 2020. - № 2. - Т. 8. - с. 48-58.
4. Аполихина И.А./ **Соколова А.В.**, Мусаева А.К., Зайцев Н.В. Малоинвазивная диагностика заболеваний вульвы с использованием панч биопсии // **Акушерство и гинекология.** – 2020. - № 8. - с. 141-148
5. **Соколова А.В.**/ Аполихина И.А., Зайцев Н.В., Чернуха Л.В. Клинико-морфологические стадии склерозирующего лишена вульвы у женщин // **Гинекология.** - 2020. - № 4, Т. 22. - с. 22-27.

6. Аполихина И.А./ Плахова К.И., **Соколова А.В.**, Чернуха Л.В. Склерозирующий лишай вульвы (алгоритмы диагностики и лечения) // **Акушерство и гинекология.** – 2020, - № 9, - с. 8-13.
7. Логинов В.В./ Вартанов А.В., Фейгин С.А., **Соколова А.В.**, Аполихина И.А. Биоэлектрическая активность мозга у женщин со склерозирующим лишаем вульвы // **Гинекология.** – 2020. -№ 6. Т. 22. – с. 68-73.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВАШ - визуальная аналоговая шкала

ГКС – глюкокортикостероиды

ИВЗ – индекс вагинального здоровья

ИЖСФ – индекс женской сексуальной функции

МВ – микробиота вульвы

НПО - наружные половые органы

СЛ - склероатрофический лишай

СЛВ – склероатрофический лишай вульвы

PRP – плазма, обогащённая тромбоцитами

УПМ – условно-патогенные микроорганизмы