

DOI: <https://doi.org/10.30841/2708-8731.4.2021.238162>

Лікування за допомогою інтравагінального гелю з діоксидом кремнію, селенітом і лимонною кислотою з метою сприяння регресії ASC-US, LSIL, ASC-H, HSIL, покращенню статусу щодо p16/Ki67 і кліренсу ВПЛ з високим ризиком у матеріалі з шийки матки

A. Mueller, M. Sailer, P.A. Regidor

Journal: International Journal of Medical Device and Adjuvant Treatments 2020; 3: e249

Title: Treatment with an intravaginal gel containing siliceous dioxide, selenite, and citric acid to promote regression of ASC-US, LSIL, ASC-H, HSIL, p16/Ki67 status and improve clearance of hr-HPV in cervical specimens

Link: <https://www.ijmdat.com/wp-content/uploads/sites/3/2020/06/e249-Treatment-with-an-intravaginal-gel-containing-siliceous-dioxide-selenite-and-citric-acid.pdf>

Exeltis Germany GmbH, Ismaning, Germany

Мета: визначення здатності інтравагінального гелю, який містить сильно диспергований діоксид кремнію (SiO_2) та антиоксидантну суміш з лимонної кислоти і селеніту натрію, викликати регресію цитопатологічних змін і впливати на статус інфікованості ВПЛ з високим ризиком та наявність пухлинних маркерів p16/Ki67 (тест «CINtec® PLUS»).

Пацієнти та методи. У контрольованому дослідженні брали участь жінки ($n=100$), у яких було встановлено підозрілі зміни у мазках з шийки матки (ASC-US, LSIL, ASC-H або HSIL). Гель наносили протягом 3×28 днів. Через три місяці учасницям робили ПаП-тест, визначали наявність штамів ВПЛ з високим ризиком, а також експресію пухлинних маркерів p16/Ki67. Ще через три місяці ПаП-тест і аналіз на наявність p17/Ki67 проводили повторно. Отримані результати порівнювали з даними 106 жінок, які відповідали тим самим критеріям включення, однак не отримували жодного лікування.

Результати. Через шість місяців цитологічні результати ПаП-тесту покращилися у 80,9% учасниць дослідження з тестової групи, зникнення ознак інфікування ВПЛ з високим ризиком спостерігалось у 53% випадків. Через шість місяців тільки у 5,3% були наявні онкомаркери p16/Ki67 порівняно з 75,0%, визначеними на початку дослідження. У групі порівняння покращення за результатами ПаП-тесту спостерігалися у 37,1% випадків, за результатами тесту «CinTec» – у 18,6%, однак кліренсу ВПЛ з високим ризиком у жодному випадку не було зареєстровано. Покращення значним чином були пов'язані з лікуванням.

Заключення. Вагінальний гель, який містить SiO_2 , селеніт натрію та лимонну кислоту, може сприяти регресії підозрілих цитологічних змін і кліренсу ВПЛ з високим ризиком.

Ключові слова: вагінальний гель, ПаП-тест, кліренс ВПЛ, діоксид кремнію.

Treatment with an intravaginal gel containing siliceous dioxide, selenite, and citric acid to promote regression of ASC-US, LSIL, ASC-H, HSIL, p16/Ki67 status and improve clearance of hr-HPV in cervical specimens

A. Mueller, M. Sailer, P. A. Regidor

Objective: An intravaginal gel containing highly dispersed silicon dioxide (SiO_2) and an anti-oxidative combination of citric acid and sodium selenite was tested for its ability to promote regression of abnormal cytological findings and its influence on hr-HPV status and tumor markers p16/Ki67 (CINtec® PLUS test).

Patients and methods: A control study was performed, including women ($n=100$) diagnosed with conspicuous cervical smears (ASC-US, LSIL, ASC-H, or HSIL). The gel was applied for 3×28 days. After three months, participants were analyzed for Pap status, hr-HPV strains, and expression of tumor markers p16/Ki67. Three months later, Pap testing and p16/Ki67 analysis were repeated. The results were compared to those of 106 women who met the same inclusion criteria but did not obtain any treatment.

Results: After six months, cytological Pap findings were improved in 80.9% of the participants in the treated group, and the clearing of hr-HPV was observed in 53% of cases. Only 5.3% were tested p16/Ki67 positive after six months in comparison to 75.0% at baseline. In the comparison group, 37.1% of the Pap smears and 18.6% of the CinTec results were improved, but no hr-HPV clearance was observed. The improvements were highly significant for the treatment.

Conclusions: The vaginal gel containing SiO_2 sodium selenite, and citric acid may support the healing of conspicuous cytological findings and clearance of hr-HPV.

Keywords: Vaginal gel, Pap testing, HPV clearance, Silicon dioxide.

Лечение с помощью интравагинального геля с диоксидом кремния, селенитом и лимонной кислотой с целью содействия регрессии ASC-US, LSIL, ASC-H, HSIL, улучшению статуса по p16/Ki67 и клиренса ВПЧ с высоким риском в материале из шейки матки
A. Meuller, M. Sailer, P.A. Regidor

Цель: определение способности интравагинального геля, содержащего сильно диспергированный диоксид кремния (SiO_2) и антиоксидантную смесь из лимонной кислоты и селенита натрия, вызывать регрессию цитопатологических изменений и влиять на статус инфицированности ВПЧ с высоким риском и наличием опухолевых маркеров p16/Ki67 (тест «CINtec® PLUS»).

Пацієнти і методи. В контроліруемому дослідженні брали участь жінки ($n=100$), у яких були установлені підозрітливі зміни в мазках із шийки матки (ASC-US, LSIL, ASC-H або HSIL). Гель наносили в течение 3×28 днів. Через три місяця учасницям робили ПАП-тест, визначали наявність штамів ВПЧ з високим ризиком, а також експресію онкологічних маркерів p16/Ki67. Ще через три місяця ПАП-тест і аналіз на наявність p17/Ki67 проводили повторно. Отримані результати порівнювали з даними 106 жінок, які відповідали тим же критеріям включення, однак не отримали жодного лікування.

Результати. Через шість місяців цитологічні результати ПАП-тесту покращилися у 80,9% учасників дослідження із тестової групи, зникнення ознак зараження ВПЧ з високим ризиком спостерігалося в 53% випадків. Через шість місяців тільки у 5,3% були виявлені онкомаркери p16/Ki67 порівняно з 75,0%, визначеними на початку дослідження. У групі порівняння покращення за результатами ПАП-тесту спостерігалося в 37,1% випадків, за результатами тесту «CinTec» – в 18,6%, однак кліренс ВПЧ з високим ризиком ні в одному випадку не було зареєстровано. Улучшения значительного образом были связаны с лечением.

Заключення. Вагінальний гель, що містить SiO_2 , селенит натрію та лимонну кислоту, може сприяти регресії підозрітливих цитологічних змін і кліренсу ВПЧ з високим ризиком.

Ключові слова: вагінальний гель, ПАП-тест, кліренс ВПЧ, диоксид кремния.

Згідно з даними ВООЗ, 311 000 жінок з усього світу померли від раку шийки матки у 2018 році [1]. Важливою передумовою розвитку цього захворювання є тривале інфікування штамом вірусу папіломи людини (ВПЛ) з високим ризиком. Ці віруси належать до патогенів, що передаються статевим шляхом і уражують базальні епітеліальні клітини шийки матки.

У ядрі уражених клітин геном вірусу може існувати у стані стабільної епісоми, а реплікація відбувається у невеликих кількостях паралельно до клітинного циклу. Ця так звана латентна фаза життєвого циклу вірусу може тривати десятиріччями, однак вона також може переходити у вегетативну реплікацію вірусної ДНК. Завдяки впливу вірусних білків відбувається пригнічення механізмів апоптозу та зупинки циклу. Отже, вірусна ДНК і білки продукуються у великій кількості у клітинах, що знаходяться у верхньому шарі плоского епітелію, на кінцевій стадії диференціації, і звідси віріони виділяються під час нормального процесу розпаду клітин. Унаслідок значного пошкодження клітинних механізмів контролю може відбутися неопластична трансформація тканини [2, 3]. Однак кліренс ВПЛ-інфекції може відбутися спонтанно завдяки нормальній імунній відповіді, і передракові зміни на будь-якій стадії здатні зникати самостійно. Додаткові фактори ризику, зокрема паління тютюну та наявність інших інфекцій, що передаються статевим шляхом, відіграють важливу роль у посиленні неопластичних змін [4].

Загалом розвиток карциноми шийки матки – це тривалий процес, який характеризується наявністю значно виражених диспластичних передракових змін. Відповідно до цього було розроблено стратегії скринінгу, які включають дослідження мазків з шийки матки (ПАП-тест). Цитологічні зміни класифікують згідно з номенклатурною системою Бетесда, яка розрізняє доброякісні та злоякісні зміни у різних типах клітин, що дозволяє оцінювати ризик прогресії і завдяки цьому підбирати належні тактики лікування [5].

Зміни низького ступеня злоякісності, такі, як ASC-US (атипові клітини плоского епітелію нез'ясованого генезу) і LSIL (слабовиражене плоскоклітинне інтраепітеліальне ураження), досить часто можуть спонтанно регресувати до нормального стану протягом 1–2 років, однак в інших випадках відбувається прогресування до більш тяжких станів, що характеризують як цервікальну інтраепітеліальну неоплазію 2-го і 3-го типів (ЦІН 2/3) [4, 5]. Шлях розвитку таких змін залежить від додаткових факторів, наприклад, віку, наявності штамів ВПЛ з високим ризиком, а також інших чинників ризику [6–10].

Саме для того, щоб уникнути надмірного лікування змін низького ступеня злоякісності, стратегії скринінгу зазвичай включають тестування на ВПЛ з високим ризиком [11, 12]. Це допомагає оцінити ризик прихованого чи потенційного прогресування до високого ступеня злоякісності. Подальший інструмент діагностики для оцінювання змін низького рівня з зіставною чи навіть вищою специфічністю і чутливістю – це подвійне визначення білків-онкомаркерів p16 і Ki67 за допомогою комерційно доступної тест-системи «CinTec» [13, 14].

Проводилися дослідження ефективності різних терапевтичних підходів щодо сприяння регресії змін низького ступеня злоякісності чи профілактики їхнього прогресування. До таких методик належить використання 5-фторурацилу, куркуміну, імківіоду, інтерферону, вітаміну D та інших речовин [15–17]. Також вивчалася ефективність пробіотиків [18]. Однак сьогодні все ще відсутні переконливі стратегії запровадження таких лікувальних підходів.

Нещодавно було розроблено вагінальний гель на основі суміші лимонної кислоти та селеніту натрію, які володіють антиоксидантними властивостями. Оксидантний стрес, тобто наявність активних форм кисню, потенційно може призводити до пошкодження ДНК і сам по собі є канцерогенним кофактором. Крім того, результати декількох досліджень демонструють ймо-

вірний зв'язок між окисидантним стресом і наслідками ВПЛ-інфекції: вища концентрація активних форм кисню, скоріш за все, пов'язана з більш високим ризиком вірусної персистенції чи прогресії, а збирання вірусних частинок може залежати від місцевого окисно-відновного градієнта [19]. Окисно-відновний потенціал селеніту у кислих розчинах відносно низький, тому відповідні високі антиоксидантні властивості можуть бути корисними у різних фармацевтичних умовах [20]. Також вагінальний гель містить частинки сильно диспергованого діоксиду кремнію (SiO_2), які можуть зв'язувати білкові молекули. Результати попереднього дослідження тривалістю 16 тижнів свідчать про те, що внутрішньовагінальне уведення гелю покращує цитологічний стан у жінок з патологічними результатами мазка з шийки матки порівняно з контрольною групою [21]. У цьому дослідженні ми намагалися визначити подальші характеристики дії гелю.

ПАЦІЄНТИ ТА МЕТОДИ

Дизайн дослідження

Це контрольоване дослідження було проведено з метою оцінити вплив інтравагінального гелю, який містить сильно диспергований діоксид кремнію (SiO_2) та антиоксидантну суміш з лимонної кислоти та селеніту натрію, на підозрілі результати цитологічного дослідження мазка з шийки матки.

У дослідженні взяли участь 206 жінок, з яких 100 було зараховано до лікувальної групи, а 106 – до групи контролю. Вік учасниць становив від 25 до 60 років. У них у всіх було встановлено цитологічний діагноз ASC-US (атипові клітини плоского епітелію нез'ясованого генезу), LSIL (слабовиражене плоскоклітинне інтраепітеліальне ураження), ASC-H (атипові клітини плоского епітелію нез'ясованого генезу, які не дозволяють виключити HSIL) або HSIL (сильно виражене плоскоклітинне інтраепітеліальне ураження) згідно з системою класифікації Бетесда. Учасниці підписали інформовану згоду, мали негативні результати тесту на вагітність, а також використовували належні методи контрацепції протягом усього періоду проведення дослідження.

Жінки з онкологічною карциною, імунологічними захворюваннями, хронічними вірусними інфекціями (у тому числі й гепатитом), які отримують імуносупресивне лікування, вагітні, мають алергію до будь-якого компонента гелю, а також у яких за результатами кольпоскопії виникла підозра на інвазивну карциному, були виключені з дослідження.

Пацієнткам було проведено цитологічні тести, визначено наявність онкомаркерів p16/Ki65 і статус інфікування ВПЛ з високим ризиком на початку проведення дослідження (див. нижче). Після цього жінки з лікувальної групи повинні були наносити 5 мл інтравагінального гелю («DeflaGyn®», Exeltis Germany GmbH, Ismaning, Germany) протягом 3×28 днів за допомогою одноразового аплікатора. Під час менструації було рекомендовано припинити використання на час кровотечі (3–5 днів протягом циклу).

Через три місяці так само, як і до цього, повторювали визначення цитологічного статусу, експресії

білків-онкомаркерів p16/Ki67 та інфікованості ВПЛ з високим ризиком. Крім того, ще через три місяці («шість місяців») – періоду, протягом якого учасниці не отримували жодного лікування, було проведено цитологічний аналіз мазків з шийки матки та визначено експресію p16/Ki67.

Кінцева точка дослідження полягала в успішному лікуванні, яке визначали за регресією у цитологічних змінах до таких, що є менш вираженими, або за повною ремісією до NILM (злякисність неможливо визначити) та кліренсом ВПЛ з високим ризиком. Також проводився тест на експресію p16/Ki67. Безпечність використання вагінального гелю «DeflaGyn®» оцінювали шляхом реєстрації побічних ефектів і визначення системної абсорбції селену.

Дослідний матеріал

Вагінальний гель «DeflaGyn®» (Exeltis Germany GmbH, Ismaning) створено на основі водного розчину, сильно диспергованого SiO_2 (2 мг/мл), який може абсорбувати патогени та інші частинки, а також натрію селеніту пентагідрату з антиоксидантними властивостями (0,166 мг/мл, що еквівалентно 250 мкг селену у щоденній дозі, яка становить 5 мл); а кислотність посилено за допомогою лимонної кислоти (4,96 мг/мл) таким чином, щоб рівень рН становив 3,0. Іншими компонентами, які виконують роль консервантів і гелетвірних речовин, є гідроксетилцелюлоза, сорбат калію і бензоат натрію відповідно.

Забір зразків і методи аналізу

На початку дослідження, через три і шість місяців пацієнткам робили мазок з шийки матки, який після цього фарбували за Папаніколау та оцінювали згідно з системою класифікації Бетесда. Крім того, у зразках визначали експресію білків-онкомаркерів p16 і Ki67 за допомогою тесту «CINtec® PLUS» (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). Відповідно до цього тесту подвійне зафарбовування свідчить про онкогенну трансформацію клітин.

Визначення ВПЛ виконували за допомогою тесту «cobas® 4800» (Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, NJ, USA) – тест-системи на основі ПЛР, яка визначає ДНК ВПЛ з високим ризиком, до яких належать 16-й і 18-й штами, а також ще 12 типів, пов'язаних з високим ризиком. Оцінювання абсорбції селену проводили шляхом визначення його концентрації у сироватці крові на початку дослідження та через три місяці.

Для оцінювання описових даних використовували програму «Microsoft Office Excel». Статистичний аналіз проводили за допомогою програмного забезпечення «Quickcalcs» (<http://www.graphpad.com/quickcalcs/>; GraphPad Software, San Diego, CA 92108). Двосторонній точний тест Фішера і р-величину використовували для вирахування статистичної значущості взаємозв'язку між лікуванням вагінальним гелем «DeflaGyn®» і цитологічними покращанням, кліренсом ВПЛ і результатами тесту «CINtec® PLUS».

Схвалення етичної комісії

Схвалення етичної комісії було отримано від Мультицентрового етичного комітету (Медична палата

Результати цитологічного дослідження мазків з шийки матки жінок, які отримували лікування вагінальним гелем

Дані 1		3 місяці					Дані 2	6 місяців				
		NILM	ASC-US	LSIL	ASC-H	HSIL		NILM	ASC-US	LSIL	ASC-H	HSIL
0	NILM	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
22	ASC-US	17	4	0	1	0	21	16	4	1	0	0
58	LSIL	34	7	12	4	1	58	36	10	9	2	1
9	ASC-H	4	4	0	1	0	6	4	2	0	0	0
11	HSIL	1	3	4	1	2	9	2	2	1	3	1
100		56	18	16	7	3	94	58	18	11	5	2

Примітка. Затінення комірок відображає різні цитологічні зміни: чорний – прогресія до вищого ступеня уражень, сірий – персистенція, світло-сірий – регресія до нижчого ступеня уражень, білий – зміни, що не викликають підозри (ремісія). Через 6 місяців були використані інші вихідні значення («дані 2»), оскільки декілька пацієнток припинили участь у дослідженні.

Республіки Чехія, лютий 2017 р.) і Локального етичного комітету (Брно/Всетін, Оломоуц, Прага, жовтень 2017 р.). Це дослідження було зареєстровано у реєстрі ISRCTN під номером ID ISRCTN11009040 (<http://doi.org/10.1186/ISRCTN11009040>).

РЕЗУЛЬТАТИ

Цитологічні результати

У дослідженні взяли участь сто жінок з патологічними змінами у мазку з шийки матки. Вони отримали лікування вагінальним гелем, що містить SiO₂, селеніт і лимонну кислоту. У цій групі у 22% випадків було встановлено діагноз ASC-US, у 58% – LSIL, у 9% – ASC-H, а в 11% – HSIL (рисунок 1; ліва половина графіку, чорні стовпчики). У групі, з якою порівнювали результати експериментального ліку-

вання (група, яка не отримувала терапії), початкові дані були зіставними: зі 106 жінок у 23,6% було встановлено ASC-US, у 55,7% – LSIL, у 16% – ASC-H, а у 4,7% – HSIL (рисунок 1; права половина графіку, чорні стовпчики).

Протягом перших 3 місяців дослідження жодна учасниця не припинила своєї участі. Однак шість жінок з лікувальної групи та одна жінка з групи контролю вибули з дослідження протягом тримісячного періоду спостережень.

Після лікування вагінальним гелем протягом трьох місяців у 75% пацієнток покращилися цитологічні результати (тобто відбулося повне зникнення патологічних змін або їхній перехід на нижчий ступінь). Через 6 місяців покращання спостерігалось у 80,9% учасниць. Як наведено у таблиці 1, у 56% мазків з шийки матки

Розподіл за цитологічним статусом

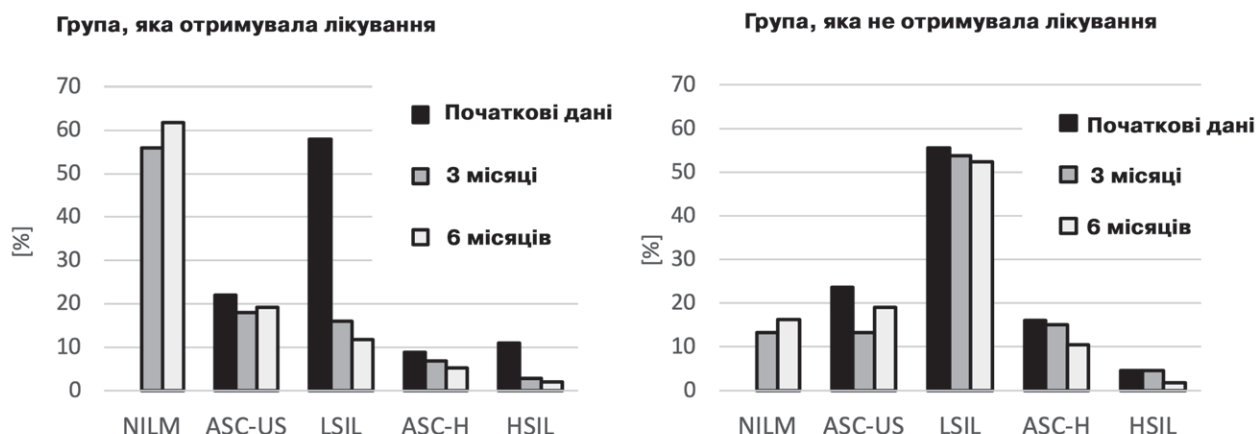


Рисунок 1. Результати цитологічного дослідження мазків з шийки матки. Наведено відсотковий розподіл. Мазки було взято на початку дослідження (чорні стовпчики), через 3 місяці (сірі стовпчики) і через 6 місяців (білі стовпчики). Одна група жінок отримувала лікування вагінальним гелем, який містить селеніт і SiO₂, протягом 3 місяців (ліва половина графіку; n=100 на початку дослідження і n=94 через 6 місяців); група порівняння не отримувала жодного лікування (права половина графіку; n=106 на початку дослідження і через 3 місяці, n=105 через 6 місяців). Протягом тримісячного періоду спостереження пацієнтки не отримували жодного лікування

Ремісія, регресія, персистенція та прогресія цитологічних змін

		3 місяці				6 місяців			
		Ремісія [%]	Регресія [%]	Персистенція [%]	Прогресія [%]	Ремісія [%]	Регресія [%]	Персистенція [%]	Прогресія [%]
Група, яка отримувала лікування	ASC-US	77.3	0.0	1.0	4.5	76.2	0.0	19.0	4.8
	LSIL	58.6	12.1	20.7	8.6	62.1	17.2	15.5	5.2
	ASC-H	44.4	44.4	11.1	0.0	66.7	33.3	0.0	0.0
	HSIL	9.1	72.7	18.2	0.0	22.2	66.7	11.1	0.0
Група, яка не отримувала лікування	ASC-US	16.0	0.0	32.0	0.6	25.0	0.0	29.2	45.8
	LSIL	10.2	8.5	76.3	5.1	10.2	13.6	67.8	8.5
	ASC-H	17.6	41.2	35.3	5.9	23.5	58.8	11.8	5.9
	HSIL	20.0	20.0	60.0	0.0	20.0	80.0	0.0	0.0

Примітка. У відсотках наведено питому вагу ASC-US, LSIL, ASC-H і HSIL через 3 і 6 місяців. Ремісія: повне зникнення, регресія: зміна до нижчого ступеня; персистенція: відсутність змін у результатах; прогресія: зміна до вищого ступеня.

було встановлено відсутність внутрішньоепітеліального ураження чи злоякісних змін (NILM), у 34% випадків – низький ступінь змін (ASC-US і LSIL), у 7% випадків було діагностовано ASC-H, а 3% через три місяці було віднесено до категорії HSIL з подальшим покращанням через шість місяців. Більш детально (таблиця 2) – 79,3% початкових випадків з LSIL і 76,2% випадків з ASC-US покращились, тоді як у 4,8% і 5,2% з них відбулося прогресування до вищого ступеня через шість місяців. У 100% змін, початково класифікованих як ASC-H, і 88,9% HSIL спостерігалось покращання через шість місяців.

У групі, яка не отримувала жодного лікування, спостерігалися менш виражені зміни (рисунок 1 і таблиця 3). Після закінчення дослідження (6 місяців) у 37,1% учасниць покращилися результати ПАП-тесту. Більш детально – у 16,2% не було знайдено підозрілих змін, тоді як у 71,4% випадків було встановлено ураження нижчого ступеня (ASC-US або LSIL), а у 12,4% випадків – ураження вищого ступеня (ASC-H або HSIL). У тих пацієток, яким початково було діагностовано

ураження низького ступеня (ASC-US і LSIL), покращання спостерігалось у 25% і 23,7% випадків відповідно. Покращання також відбулося в усіх учасниць з початково встановленим HSIL і у 82,4% – з ASC-US. Однак в одному випадку ASC-H відбулася прогресія до HSIL (таблиця 2).

Згідно зі статистичним аналізом, виконаним за допомогою точного тесту Фішера, використаного для порівняння незалежних вибірок, взаємозв'язок між лікуванням вагінальним гелем і загальним покращанням результатів цитологічного дослідження був значущим, якщо порівнювати з групою, яка не отримувала лікування ($p < 0,0001$).

Визначення ВПЛ з високим ризиком і p16/Ki67

Кліренс ВПЛ з високим ризиком оцінювали для визначення ефективності вагінального гелю. У 87,0% пацієток, віднесених до групи лікування, на початку дослідження було встановлено позитивний статус щодо інфікування ВПЛ з високим ризиком. Цей показник знизився до рівня 41% позитивних резуль-

Таблиця 3

Зміни у результатах цитологічного дослідження мазків з шийки матки жінок, які не отримували лікування

Дані 1		3 місяці					Дані 2	6 місяців				
		NILM	ASC-US	LSIL	ASC-H	HSIL		NILM	ASC-US	LSIL	ASC-H	HSIL
0	NILM	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
25	ASC-US	4	6	7	8	0	24	6	7	7	4	0
59	LSIL	6	5	45	2	1	59	6	8	40	4	1
17	ASC-H	3	3	4	6	1	17	4	4	6	2	1
5	HSIL	1	0	1	0	3	5	1	1	2	1	0
106		14	14	57	16	5	105	17	20	55	11	2

Примітка. Затінення комірок відображає різні цитологічні зміни: чорний – прогресія до вищого ступеня уражень, сірий – персистенція, світло-сірий – регресія до нижчого ступеня уражень, білий – зміни, що не викликають підозри (ремісія).

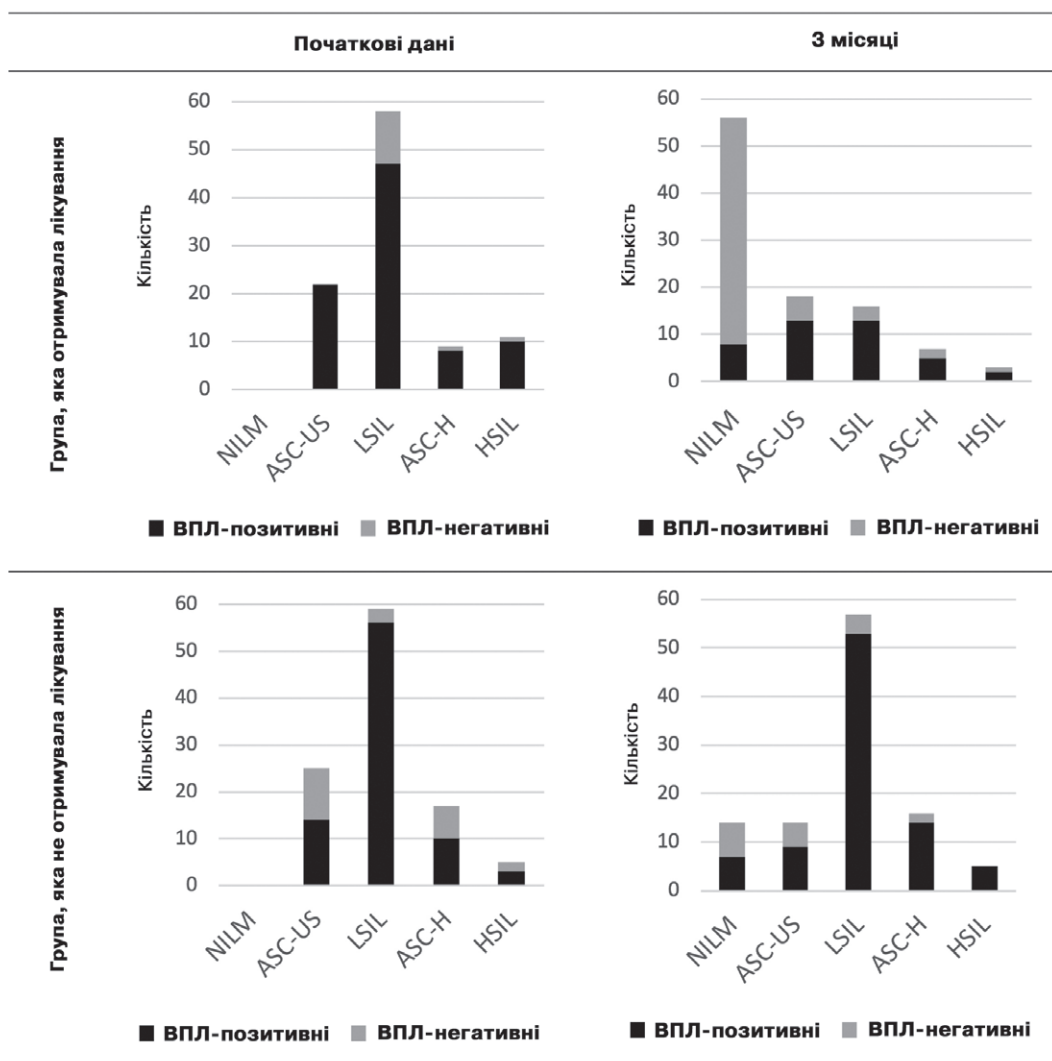


Рисунок 2. ВПЛ-статус жінок, віднесених до різних цитологічних груп. Наведено результати пацієнток з експериментальної групи (верхній ряд) і з групи контролю (нижній ряд) на початку дослідження (ліва половина) і через 3 місяці (права половина)

татів через три місяці, що відповідало 53% кліренсу (таблиця 4).

На рисунку 2 зображено розподіл позитивних тестів на ВПЛ з високим ризиком і його кліренс для кожної цитологічної групи. З нього видно, що більшість уражень, які регресували до NILM або регресували до ASC-US, також стали ВПЛ-негативними через три місяці (рисунок 3). У більшості жінок, які мали ураження високого ступеня, залишилася інфекція ВПЛ з високим ризиком.

У групі порівняння кліренс ВПЛ не спостерігався. Навпаки, відсоток інфікованих ВПЛ пацієнток зріс на 6 відсотків за три місяці (83,0% на противагу 78,3% на початку дослідження; таблиця 4). Ці результати відповідають даним щодо цитологічних результатів, згідно з якими загальне покращання було менш значимим. Крім того, 50% непідозрілих мазків (NILM) і 64,3% ASC-US були позитивними за ВПЛ-інфекцією з високим ризиком (на противагу 14,3% і 27,8% відповідно у групі, яка отримувала лікування).

Таблиця 4

Взаємозв'язок між позитивним статусом щодо ВПЛ і результатами цитологічного дослідження

		Початок дослідження	3 місяці
		[%]	[%]
Група, яка отримувала лікування	NILM	0.0	14.3
	ASC-US	100.0	72.2
	LSIL	81.0	81.3
	ASC-H	88.9	71.4
	HSIL	90.9	66.7
	Усі групи	87.0	41.0
Група, яка не отримувала лікування	NILM	0.0	50.0
	ASC-US	56.0	64.3
	LSIL	94.9	93.0
	ASC-H	58.8	87.5
	HSIL	60.0	100.0
	Усі групи	78.3	83.0

Примітка. У таблиці наведено відсоткові значення інфікованості ВПЛ з високим ризиком для кожної цитологічної групи окремо та для загальної кількості пацієнток.

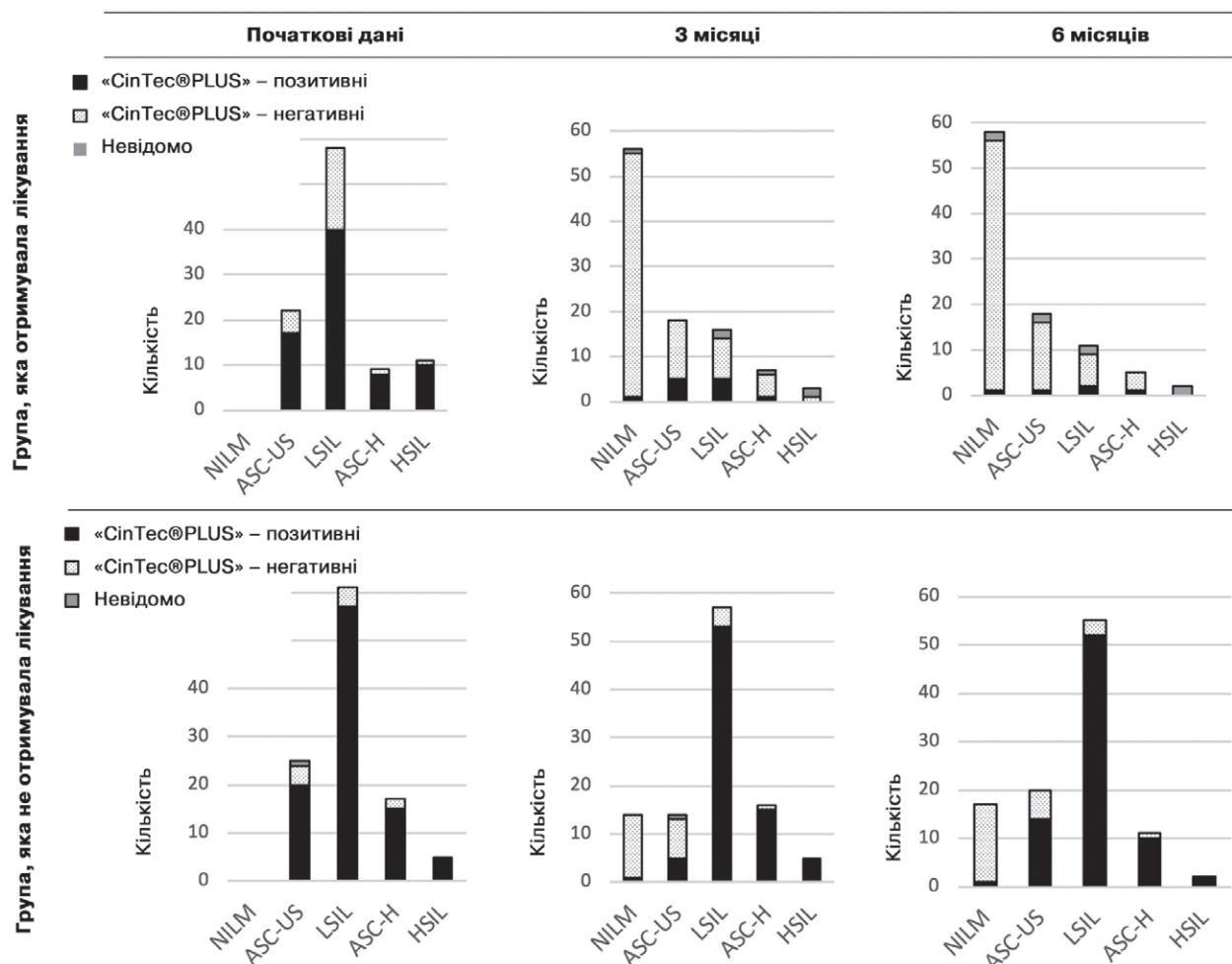


Рисунок 3. Наявність експресії онкомаркерів p16/Ki67 (за результатами тесту «CinTec® PLUS») у жінок з різних цитологічних груп. Наведено результати пацієнок з експериментальної групи (верхній ряд) і з групи контролю (нижній ряд) на початку дослідження, через 3 і 6 місяців

Вплив лікування вагінальним гелем на загальний рівень кліренсу ВПЛ був статистично значущим згідно з точним тестом Фішера ($p < 0,0001$).

Окрім того, кількість позитивних результатів тесту «CinTec® PLUS» зменшилася у групі, яка отримувала лікування гелем. На рисунку 3 наведено дані, отримані на початку дослідження, а також через три і шість місяців. На початку 75% усіх жінок, віднесених до експериментальної групи, мали позитивні результати тесту «CinTec® PLUS»; 90% пацієнок з ураженнями високого ступеня (ASC-H і HSIL) також були позитивними, а в осіб з ураженнями низького ступеня, цей тест був позитивний у 69,0% випадків з LSIL і у 77,3% випадків з ASC-US. Через три місяці тільки 12,0% учасниць дослідження мали позитивні результати тесту «CinTec® PLUS», надалі цей показник зменшився до 5,3% через шість місяців. Такі зміни спостерігалися в усіх цитологічних групах.

Група порівняння мала більшу кількість позитивних результатів тесту «CinTec® PLUS» на початку дослідження (91,5%), а через шість місяців цей показник зменшився до 75,2% загалом. У цій групі зникнення експресії онкомаркерів спостерігалось тільки у пацієнок з цитологічними змінами низького ступеня – ASC-US і LSIL (таблиця 5).

Загальний вплив лікування вагінальним гелем на результати тесту «CinTec® PLUS» був статистично значущим через 3 і 6 місяців ($p < 0,0001$), якщо порівнювати ці показники з контрольною групою. Загалом кількість позитивних тестів «CinTec® PLUS» була незвично великою у пацієнок з цієї групи, навіть у тих, які мали ураження низького ступеня. Тому на отримані результати могли вплинути якісь інші чинники.

Безпечність вагінального гелю

Учасниці, віднесені до групи, яка отримувала лікування, повідомили про 42 несприятливих випадки. З них 12 випадків виникли у чотирьох пацієнок і, найімовірніше, не були пов'язані з використанням засобу, або такий зв'язок невідомий. Більшість побічних реакцій мали легкий або помірний ступінь тяжкості; серед них свербіж чи відчуття печіння у піхві, кров'янисті виділення, посилення вагінальної кровотечі, вагінальний мікоз або герпес, а також незначні спазми у животі. Це не вимагало припинення лікування. При цьому

не було повідомлено при жоден тяжкий несприятливий випадок, який міг би бути пов'язаний з використанням засобу.

Концентрацію селену вимірювали у пацієнок з групи лікування через три місяці від початку терапії. Зважаючи на те, що ріст концентрації селену не спостерігався, було підтверджено відсутність його системної абсорбції.

ОБГОВОРЕННЯ

У 3/4 жінок з LSIL і ASC-US, які отримували лікування, було відзначено покращення результатів цитологічного дослідження, яке виражалося у регресії до уражень нижчого ступеня чи повному зникненні підозрілих змін через шість місяців. У групі порівняння покращення спостерігалось у приблизно 1/4 пацієнок з LSIL і ASC-US. Щодо уражень високого ступеня, то в обох групах вдалося отримати майже однакові результати (90–100%), але кількість таких випадків була відносно невеликою. Загалом ураження низького ступеня демонструють хорошу тенденцію до спонтанної регресії, яка виникає у 70–90% випадків залежно від дизайну дослідження та тривалості періоду спостереження [10, 20, 22, 23].

У літературі можна знайти дані, які свідчать про те, що за шість місяців регресує 50% ASC-US і LSIL, однак цей процес може тривати до 26 місяців [10]. При цьому прогресія до ЦІН 2+ спостерігається у 10–29% випадків [7, 20, 24]. Персистенція ASC-US або LSIL свідчить про значне зростання ризику розвитку диспластичних перетворень у майбутньому [7, 8, 22]. Через це корисним є сприяння регресії таких змін. Декілька факторів впливають на прогресування уражень до вищого ступеня [25–27], однак найголовнішим фактором ризику є персистенція штамів ВПЛ з високим ризиком [9, 10, 24, 26–28].

У поточному дослідженні кліренс ВПЛ відбувся у 53% випадків через три місяці від початку лікування вагінальним гелем. Більшість негативних результатів була отримана у пацієнок з NILM і ASC-US. Кліренс ВПЛ-інфекції залежить від дії кількох кофакторів, до яких належать, наприклад, вік, використання презервативів, наявність супутніх інфекцій піхви, а також відмінності між різними штамми ВПЛ з високим ризиком [24, 29]. Через це частота кліренсу у жінок з нормальними результатами цитологічного дослідження становить 43% протягом чотирьох місяців або з середньою тривалістю 224 дні, і близько 90% ВПЛ-інфекцій зникає протягом двох років [24, 29–31].

За наявності патологічних змін у мазку з шийки матки кліренс ВПЛ зазвичай є нижчим [24], а рівень дворічної кумулятивної регресії, за опублікованими даними, коливається у межах 35–53% [32]. Зважаючи на це, можна вважати, що лікування вагінальним гелем сприяє кліренсу ВПЛ з високим ризиком. Цю точку зору підтверджують результати, отримані у контрольній групі, у якій не було зареєстровано жодного випадку зникнення ВПЛ-інфекції з високим ризиком за тримісячний період (таблиця 4). Тому лікування вагінальним гелем, що містить SiO₂, може сприяти кліренсу ВПЛ.

Зважаючи на загальну велику поширеність ВПЛ-інфекції високого ризику у пацієнок з ASC-US, яка не обов'язково свідчить про наявність чи розвиток гістологічних змін вищого ступеня [33], інші діагностичні інструменти, такі, як, наприклад, подвійне визначення білків-онкомаркерів p16 і Ki67, починають усе частіше використовувати для оцінювання ASC-US і LSIL з метою диференціації характеру цих уражень: чи вони є (пост-)запальними чи справді передраковими змінами, тобто ЦІН 2/3 [34–30]. Вище зазначений тест «CinTec» також використовували у поточному дослідженні. Він продемонстрував неочікувано велику кількість позитивних результатів на початку дослідження (таблиця 4).

Згідно з даними, які можна знайти у літературі, близько 25–30% ASC-US і 25–52% LSIL є p16/Ki67-позитивними, що свідчить про можливість наявності уражень вищого ступеня [23, 35, 39]. На початку цього дослідження у 80% жінок з ASC-US і 96% з LSIL було виявлено експресію зазначених онкомаркерів. Крім того, 7,1% учасниць зі змінами, які не викликають підозри, теж мали позитивні результати тесту на виявлення p16/Ki67 через 3 і 6 місяців. Загалом ці показники були вищими у групі, яка не отримувала жодного лікування. Висока частота наявності онкомаркерів p16/Ki67 корелює з незвично великою кількістю ВПЛ-позитивних результатів у пацієнок з цитологічними змінами низького ступеня: ASC-US і LSIL (таблиця 5). У групі, яка отримувала лікування вагінальним гелем, було зареєстроване значне зменшення кількості p16/Ki67-позитивних випадків, у той час як ці показники залишалися високими у групі порівняння.

Хоча отримані дані підтверджують результати скринінгу на ВПЛ з високим ризиком і ПАП-тесту, кореляція між результатами тесту «CinTec» і ПАП-тесту виглядає неправильно. Загально прийнято вважати, що ПАП-тест є доволі суб'єктивним. Це призводить до варіабельності результатів у різних дослідників [40–42]. Тому у нашому випадку могла спостерігатися

Таблиця 5

Взаємозв'язок між наявністю експресії онкомаркерів p16/Ki67 і результатами цитологічного дослідження

		Початок дослідження [%]	3 місяці [%]	6 місяців [%]
Група, яка отримувала лікування	NILM	0.0	1.8	1.7
	ASC-US	77.3	27.8	5.6
	LSIL	69.0	31.3	18.2
	ASC-H	88.9	14.3	20.0
	HSIL	90.9	0.0	0.0
	Усі групи	75	12.0	5.3
Група, яка не отримувала лікування	NILM	0.0	7.1	5.9
	ASC-US	80.0	35.7	70.0
	LSIL	96.6	93.0	94.5
	ASC-H	88.2	93.8	90.9
	HSIL	100.0	100.0	100.0
	Усі групи	91.5	74.5	75.2

Примітка. У таблиці наведено відсоткові значення позитивних результатів тесту «CinTec® PLUS» для кожної цитологічної групи окремо та для загальної кількості пацієнок.

недостатня діагностика мазків з шийки матки, зафарбованих за Папаніколау. Незважаючи на це, і тестування на ВПЛ з високим ризиком, і результати «СінТес» продемонстрували чітку тенденцію до покращання після лікування гелем. Гіпотетичний принцип дії ґрунтується як на абсорбуючих властивостях SiO₂, так і на антиоксидантному впливі селеніту.

Абсорбція вірусів на поверхню різних частинок – це процес, який залежить від багатьох біохімічних і біофізичних параметрів і який є предметом досліджень протягом багатьох років [43]. Абсорбцію вірусів також вивчали в контексті її можливого застосування у медицині [44, 45]. Щодо ВПЛ, то на сьогодні ще не було описано точного механізму адгезії до диспергованого SiO₂ у середовищі піхви, однак вдалося продемонструвати адгезію білкових частинок. Антиоксидантна дія кислого селеніту, який також входить до складу засобу, може впливати на створення сприятливого піхвового середовища, яке допомагає запобігати інфікуванню епітеліальних клітин но-

вими патогенами, зменшувати оксидантний стрес і, отже, покращувати ендогенну імунну відповідь [19]. Саме тому використання вагінального гелю з SiO₂, селенітом і лимонною кислотою може запобігати прогресії цервікальних уражень, сприяти кліренсу ВПЛ з високим ризиком і ремісії патологічних змін у мазках з шийки матки.

ВИСНОВКИ

Інтравагінальний гель, який містить сильно диспергований SiO₂ та антиоксидантну суміш з лимонної кислоти і селеніту натрію, продемонстрував через шість місяців цитологічне покращання за результатами ПАП-тесту у 80,9% пацієнок, а кліренс ВПЛ з високим ризиком було зареєстровано у 53% випадків. Тільки у 5,3% жінок спостерігалася експресія онкомаркерів p16/Ki67 через шість місяців.

Отже, досліджуваний вагінальний гель може сприяти зникненню підозрілих цитологічних змін і кліренсу ВПЛ-інфекції з високим ризиком.

Схвалення етичної комісії та інформована згода на участь

Схвалення етичної комісії було отримано від Мультицентрового етичного комітету (Медична палата Республіки Чехія, лютий 2017 року) і Локального етичного комітету (Брно/Всетін, Оломоуц, Прага, жовтень 2017 року).

Доступність даних і матеріалів:

Реєстр клінічних досліджень: ISRCTN: IDISRCTN11009040 (<http://doi.org/10.1186/ISRCTN11009040>).

Фінансування:

Це дослідження було профінансовано «DEFLAMED International s.r.o.», м. Прага, Чеська Республіка.

Внесок авторів:

Pedro-Antonia Regidor і Manuela Sailer відповідали за практичну реалізацію дослідження. Anna Müller відповідала за написання та координацію дослідних центрів.

Конфлікт інтересів:

Pedro-Antonia Regidor, Manuela Sailer і Anna Müller є співробітниками «Exeltis Healthcare».

ПОСИЛАННЯ

- World Health Organization. Fact Sheets. Human Papillomavirus (HPV) and cervical cancer. Retrieved from: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/human-papillomavirus-\(hpv\)-and-cervical-cancer](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/human-papillomavirus-(hpv)-and-cervical-cancer); accessed on February 19, 2020.
- Harden ME, Munger K. Human papillomavirus molecular biology. *Mutat Res* 2017; 772: 3-12.
- Doorbar J, Quint W, Banks L, Bravo IG, Stoler M, Broker TR, Stanley MA. The Biology and Life-Cycle of Human Papillomaviruses. *Vaccine* 2012; 30: F55-F70.
- Castellsague X, Bosch FX, Muñoz N. Environmental co-factors in HPV carcinogenesis. *Virus Res* 2002; 89: 191-199.
- Chatterjee T, Gill SS, Rai R. Standardization of cervical/vaginal cytopathology reporting: the Bethesda System (TBS) for reporting cervical/vaginal cytologic diagnoses. *Med J Armed Forces India* 2000; 56: 45-49.
- Lellé R J, Küppers V. Kolposkopie in der Praxis. Kap.3: Anomale Befunde der Zervix; 2. Auflage 2014.
- Marquardt K, Ziemke P, Neumann K, et al. Risikobewertung von Zytologiebefunden im Zervixkarzinom-Screening. *Gynäkologie* 2019; 52: 937-944.
- dos Santos AV, dos Santos GT, Brackmann RL, Prola JC, Bica CG. Follow-up of women with cervical cytological abnormalities: progression and regression events. *Asian Pac J Cancer Prev* 2019; 20: 1019-1024.
- Londesborough P, Ho L, Terry G, Guzick J, Wheeler C, Singer A. Human papillomavirus genotype as a predictor of persistence and development of high-grade lesions in women with minor cervical abnormalities. *Int J Cancer* 1996; 69: 364-368.
- Schlecht NF, Platt RW, Duarte-Franco E, Costa MC, Sobrinho JP, Prado JC, Ferenczy A, Rohan TE, Villa LL, Franco EL. Human Papillomavirus Infection and Time to Progression and Regression of Cervical Intraepithelial Neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95: 1336-1343.
- Tota J, Mahmud SM, Ferenczy A, Coutlée F, Franco EL. Promising strategies for cervical cancer screening in the post-human papillomavirus vaccination era. *Sex Health* 2010; 7: 376-382.
- Wentzensen N, Schiffman M, Palmer T, Arbyn M. Triage of HPV positive women in cervical cancer screening. *J Clin Virol* 2016; 76: S49-S55.
- Petry KU, Schmidt D, Scherbring S, Luyten A, Reinecke-Lütthge A, Bergeron C, Kommos F, Löning T, Ordi J, Regauer S, Ridder R. Triage of Pap cytology negative, HPV positive cervical cancer screening results with p16/Ki-67 Dual-stained cytology. *Gynecol Oncol* 2011; 121: 505-509.
- Possati-Resende JC, Fregnani JH, Kerr LM, Mauad EC, Longatto-Filho A, Scapulatempo-Neto C. The Accuracy of p16/Ki-67 and HPV Test in the Detection of CIN2/3 in Women Diagnosed with ASC-US or LSIL. *PLoS One* 2015; 10: e0134445.
- Mutombo AB, Simoens C, Tozin R, Bogers J, Van Geertruyden JP, Jacquemyn Y. Efficacy of commercially available biological agents for the topical treatment of cervical intraepithelial neoplasia: a systematic review. *Syst Rev* 2019; 8: 132-142.
- Schulte-Uebbing C, Schlett S, Craiut I, Antal L, Olah H. Chronic cervical infections and dysplasia (CIN I, CIN II): Vaginal vitamin D (high dose) treatment: A new effective method? *Dermatoendocrinol* 2014; 6: e27791.
- Ferrante JM, Mayhew DY, Goldberg S, Woodard L, Selbeck C, Roetzheim RG. Empiric treatment of minimally abnormal papanicolaou smears with 0.75% metronidazole vaginal gel. *J Am Board Fam Pract* 2002; 15: 347-354.
- Ou YC, Fu HC, Tseng CW, Wu CH, Tsai CC, Lin H. The use of probiotics on genital high-risk human papilloma virus clearance and quality of cervical smear: a randomized placebo-controlled trial. *BMC Womens Health* 2019; 19: 103-109.
- De Marco F. Oxidative stress and HPV carcinogenesis. *Viruses* 2013; 5: 708-731.
- Kuklinski B, Schiefer R. Use of aqueous selenite solutions for the manufacture of a medicament for the treatment of viral diseases and pigmented spots. *European Patent Office. European Patent No. WO 2001/093910*.
- Huber J, Pötsch B, Gantschacher M, Templ M. Routine Treatment of Cervical Cytological Cell Changes: Diagnostic Standard, Prevention and Routine Treatment of Cervical Cytological Cell Changes - An Assessment of Primary and Secondary Prevention and Routine Treatment Data in the Context of an Anonymous Data Collection from Practicing Gynaecologists; an Academic, Non-Interventional Study. *Geburtshilfe Frauenheilkd* 2016; 76: 1086-1091
- Scheungraber C, Kleekamp N, Schneider A. Management of low-grade squamous intraepithelial lesions of the

- uterine cervix. *Br J Cancer* 2004; 90: 975-978.
23. White C, Bakhiet S, Bates M, Keegan H, Pilkington L, Ruttile C, Sharp L, O' Toole S, Fitzpatrick M, Flannelly G, O' Leary JJ, Martin CM. Triage of LSIL/ASC-US with p16/Ki-67 dual staining and human papillomavirus testing: a 2-year prospective study. *Cytopathology* 2016; 27: 269-276.
24. Dalstein V, Riethmuller D, Prétet JL, Le Bail Carval K, Sautière JL, Carbillet JP, Kantelip B, Schaal JP, Mouglin C. Persistence and load of high-risk HPV are predictors for development of high-grade cervical lesions: a longitudinal French cohort study. *Int J Cancer* 2003; 106: 396-403.
25. Moscicki AB, Hills N, Shiboski S, Powell K, Jay N, Hanson E, Miller S, Clayton L, Farhat S, Broering J, Darragh T, Palefsky J. Risks for incident human papillomavirus infection and low-grade squamous intraepithelial lesion development in young females. *JAMA* 2001; 285: 2995-3002.
26. Trimble CL, Piantadosi S, Gravitt P, Ronnett B, Pizer E, Elko A, Wilgus B, Yutzky W, Daniel R, Shah K, Peng S, Hung C, Roden R, Wu TC, Pardoll D. Spontaneous regression of high-grade cervical dysplasia: effects of human papillomavirus type and HLA phenotype. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 4717-4723.
27. Chan JK, Monk BJ, Brewer C, Keefe KA, Osann K, McMeekin S, Rose GS, Youssef M, Wilczynski SP, Meyskens FL, Berman ML. HPV infection and number of lifetime sexual partners are strong predictors for 'natural' regression of CIN 2 and 3. *Br J Cancer* 2003; 89: 1062-1066.
28. Bosch FX, Lorincz A, Muñoz N, Meijer CJ, Shah KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol* 2002; 55: 244-265.
29. Bulkmands NW, Berkhof J, Bulk S, Bleeker MC, van Kemenade FJ, Rozendaal L, Snijders PJ, Meijer CJ, POBASCAM Study Group. High-risk HPV type-specific clearance rates in cervical screening. *Br J Cancer* 2007; 96: 1419-1424.
30. Goodman MT, Shvetsov YB, McDuffe K, Wilkens LR, Zhu X, Thompson PJ, Ning L, Killeen J, Kamemoto L, Hernandez BY. Prevalence, acquisition, and clearance of cervical human papillomavirus infection among women with normal cytology: Hawaii Human Papillomavirus Cohort Study. *Cancer Res* 2008; 68: 8813-8824.
31. Gravitt PE. The known unknowns of HPV natural history. *J Clin Invest* 2011; 121: 4593-4599.
32. Ault KA. Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections in the female genital tract. *Infect Dis Obstet Gynecol* 2006; 40470: 1-5.
33. The Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance/Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesions Triage Study (ALTS) Group. Human papillomavirus testing for triage of women with cytologic evidence of low-grade squamous intraepithelial lesions: baseline data from a randomized trial. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 397-402.
34. Schmidt D, Bergeron C, Denton KJ, Ridder R, European CINtec Cytology Study Group. p16/ki-67 dual-stain cytology in the triage of ASCUS and LSIL papanicolaou cytology. Results from the European equivocal or mildly abnormal Papanicolaou cytology study. *Cancer Cytopathol* 2011; 119: 158-166.
35. Bergeron C, Ikenberg H, Sideri M, Denton K, Bogers J, Schmidt D, Alameda F, Keller T, Rehm S, Ridder R, PALMS Study Group. Prospective evaluation of p16/Ki-67 dual-stained cytology for managing women with abnormal Papanicolaou cytology: PALMS study results. *Cancer Cytopathol* 2015; 123: 373-381.
36. Yu L, Fei L, Liu X, Pi X, Wang L, Chen S. Application of p16/Ki-67 dual-staining cytology in cervical cancers. *J Cancer* 2019; 10: 2654-2660.
37. Peeters E, Wentzensen N, Bergeron C, Arbyn M. Meta-analysis of the accuracy of p16 or p16/Ki-67 immunocytochemistry versus HPV testing for the detection of CIN2+/CIN3+ in triage of women with minor abnormal cytology. *Cancer Cytopathol* 2019; 127: 169-180.
38. Luttmer R, Dijkstra MG, Snijders PJ, Berkhof J, van Kemenade FJ, Rozendaal L, Helmerhorst TJ, Verheijen RH, Ter Haimseel WA, van Baal WM, Graziosi PG, Quint WG, Spruijt JW, van Dijken DK, Heideman DA, Meijer CJ. p16/Ki-67 dual-stained cytology for detecting cervical (pre) cancer in a HPV-positive gynecologic outpatient population. *Mod Pathol* 2016; 29: 870-878.
39. Possati-Resende JC, Fregnani JH, Kerr LM, Mauad EC, Longatto-Filho A, Scapulatempo-Neto C. The Accuracy of p16/Ki-67 and HPV Test in the Detection of CIN2/3 in Women Diagnosed with ASC-US or LSIL. *PLoS One* 2015; 10: e0134445-e0134455.
40. Petry KU, Schmidt D, Scherbring S, Luyten A, Reinecke-Lüthge A, Bergeron C, Kommos F, Löning T, Ordi J, Regauer S, Ridder R. Triage of Pap cytology negative, HPV positive cervical cancer screening results with p16/Ki-67 Dual-stained cytology. *Gynecol Oncol* 2011; 121: 505-509.
41. Stoler MH, Schiffman M; Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance-Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesion Triage Study (ALTS) Group. Interobserver reproducibility of cervical cytologic and histologic interpretations: realistic estimates from the ASCUS-LSIL Triage Study. *JAMA* 2001; 285: 1500-1505.
42. Sørbye SW, Suhrke P, Revå BW, Berland J, Maurseth RJ, Al-Shibli K. Accuracy of cervical cytology: comparison of diagnoses of 100 Pap smears read by four pathologists at three hospitals in Norway. *BMC Clin Pathol* 2017: 18-23.
43. Kendall K, Kendall M, Rehfeld F. Adhesion of Cells, Viruses and Nanoparticles. Springer Science and Business Media 2011. ISBN 978-90-481-2584-5.
44. de Souza E Silva JM, Hanchuk TD, Santos MI, Kobarg J, Bajgelman MC, Cardoso MB. Viral Inhibition Mechanism Mediated by Surface-Modified Silica Nanoparticles. *ACS Appl Mater Interfaces* 2016; 8: 16564-16572.
45. Agnihotram SS, Vermudez SA, Mullis L, Townsend TA, Manjanatha MG, Azevedo MP. Silicon Dioxide Impedes Anti-viral Response and Causes Genotoxic Insult During Calcivirus Replication. *J Nanosci Nanotechnol* 2016; 16: 7720-7730.