

На правах рукописи

АМИРХАНЯН

Армине Самволовна

**ОСОБЕННОСТИ ДИАГНОСТИКИ И ТАКТИКИ ВЕДЕНИЯ ПАЦИЕНТОК
С ХРОНИЧЕСКИМ ЩЕРВИЦИТОМ, АССОЦИИРОВАННЫМ С
ПАПИЛЛОМАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ**

14.01.01 – акушерство и гинекология

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук**

Москва 2019

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

Научные руководители:

доктор медицинских наук

доктор биологических наук

Байрамова Гюльдана Рауфовна

Бурменская Ольга Владимировна

Официальные оппоненты:

Манухин Игорь Борисович, доктор медицинских наук, профессор, ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Минздрава России, кафедра акушерства и гинекологии, заведующий

Мингалева Наталия Вячеславовна, доктор медицинских наук, профессор, ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Минздрава России, кафедра акушерства, гинекологии и перинатологии ФПК и ППС, профессор

Ведущая организация:

ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России

Защита диссертации состоится «17» марта 2020 г. в 13:00 часов 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» 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 имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации <http://science.ncagp.ru/upfiles/pdf/Amirkhanyan A.S.-disser.pdf>

Автореферат разослан «___» 2020 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета,

доктор медицинских наук, профессор

Калинина Елена Анатольевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Проблеме хронических цервицитов (ХЦ), ассоциированных с вирусом папилломы человека (ВПЧ) в последние годы уделяется пристальное внимание ввиду высокой частоты встречаемости заболевания среди женщин репродуктивного возраста и доказанной значимой ролью цервицитов в развитии предрака и рака шейки матки (РШМ) (Прилепская В.Н. и соавт., 2015; Fernandes J.V. et al., 2015). Исследования ряда авторов показали, что цервициты диагностируются у каждой третьей пациентки с патологией шейки матки (Серова В.Н. и соавт., 2016; Долгушина В.Ф. и соавт., 2011). Основной этиологический фактор канцерогенеза – ВПЧ, способный инициировать и поддерживать хроническое воспаление (Kogan E.A. et al., 2013; Mirzaie-Kashani E. et al., 2014). По данным Bruni L. (2019) около 50-80% женщин подвержены инфицированию ВПЧ в течение 2-3 лет после начала половой жизни. Присутствие вируса - угроза генетической стабильности и повышение вероятности развития трансформации клеток (Mikeska T., 2014; Prati B. et al., 2018). Накоплен достаточный опыт ведения пациенток с ХЦ, но не до конца изучено влияние папилломавирусной инфекции (ПВИ) в развитии и поддержании ХЦ и неоднозначна тактика ведения женщин с ВПЧ-ассоциированным ХЦ. В настоящее время представляется актуальным поиск эффективных методов диагностики и прогнозирования течения заболевания путем определения молекулярно-генетических маркеров ВПЧ-ассоциированного ХЦ.

Степень разработанности темы исследования

В работах ряда авторов показано, что хроническое воспаление приводит к пролиферации и нарушению дифференцировки клеток многослойного плоского эпителия и сопровождается изменениями иммунологических показателей (профиля про- и противовоспалительных цитокинов), определение уровня которых позволит диагностировать воспалительный процесс и прогнозировать течение заболевания (Ашрафян Л.А., 2008; Киселев

В.И., 2011; Bekos C. et al., 2018). Известно, что ключевую роль в диагностике вульвовагинитов играет определение транскрипционного профиля генов иммунной системы, в то время как имеются немногочисленные данные о представленности мРНК генов иммунной системы при ВПЧ-ассоциированном ХЦ (Bourmenskaya O.V. et al., 2014).

Современные методы исследования (цитологический, ВПЧ-тестирование, расширенная кольпоскопия, морфологическое исследование) выявляют уже существующие поражения шейки матки (Каприн А.Д. и соавт., 2015). Отсутствие эффективных методов диагностики и прогнозирования течения патологии шейки приводит к необоснованным и зачастую агрессивным хирургическим воздействиям (Asciutto K.C. et al., 2015; Bekos C. et al., 2018). Изучение экспрессии мРНК генов иммунной системы в качестве маркеров воспаления и определение уровня метилирования промоторного участка гена *WIF1* в качестве новых высокоэффективных неинвазивных методов диагностики наряду с традиционными методами, позволит совершенствовать диагностику, прогнозировать развитие заболевания, определяет возможность оптимизации и дифференцированного подхода к ведению пациенток с ХЦ, ассоциированным с ВПЧ.

Цель исследования

Усовершенствовать тактику ведения пациенток с хроническим цервицитом, ассоциированным с папилломавирусной инфекцией у женщин репродуктивного возраста на основании анализа результатов клинических, кольпоскопических, морфологических и молекулярно-генетических методов исследования.

Задачи исследования

1. Изучить частоту выявления хронического цервицита, ассоциированного с папилломавирусной инфекцией у женщин репродуктивного возраста (по обращаемости).
2. Изучить распространенность различных типов вируса папилломы человека и роль вирусной нагрузки как маркера патологии шейки матки при

хронических цервицитах.

3. Определить качественный и количественный состав микробиоценоза влагалища у женщин с хроническим цервицитом.

4. Оценить кольпоскопические и клинико-морфологические особенности хронического цервицита, ассоцииированного с папилломавирусной инфекцией.

5. Определить особенности транскрипционного (мРНК) профиля генов человека, регулирующих пролиферацию и клеточный цикл (*KI67*, *CCND1*, *CDKN2A/P16*), апоптоз (*BCL2*), рецепторный аппарат клеток (*PGR*, *EGFR*), генов иммунной системы (*IFNAR1*, *TNF α* , *IL1b*, *TLR4*, *CD68*, *CXCL5*, *CXCL10*, *CXCL13*), матриксных металлопротеиназ (*MMP8*, *MMP9*) и иммунорегуляторов (*TGFB1*, *IL1RN*, *IL10*, *IL18*, *GATA3*) при хроническом цервиците, ассоцииированном с ВПЧ.

6. Определить статус метилирования промоторного участка гена *WIF1* при ВПЧ-ассоцииированном хроническом цервиците.

7. На основании полученных результатов оптимизировать тактику ведения пациенток с хроническим цервицитом, ассоциированным с папилломавирусной инфекцией.

Научная новизна

Изучена частота выявления ВПЧ-ассоциированного хронического цервицита, определены наиболее часто встречающиеся типы ВПЧ и оценена роль вирусной нагрузки в развитии заболевания у женщин репродуктивного возраста.

Определены кольпоскопические, клинико-морфологические и молекулярно-генетические особенности ВПЧ - ассоциированного хронического цервицита.

Впервые изучена экспрессия 21 гена человека регулирующих пролиферацию и клеточный цикл (*KI67*, *CCND1*, *CDKN2A/P16*), апоптоз (*BCL2*), рецепторный аппарат клеток (*PGR*, *EGFR*), генов врожденного иммунитета (*IFNAR1*, *IL1RN*, *IL1b*, *IL10*, *IL18*, *TNF α* , *GATA3*, *TLR4*, *TGFB1*,

CD68, CXCL5, CXCL10, CXCL13), матриксных металлопротеиназ (MMP8, MMP9) у пациенток с хроническим цервицитом, ассоциированным с вирусом папилломы человека.

Определена роль иммунорегуляторных молекул *IL10, IL1RN* и *TGFB1* в контроле за воспалительной реакцией, а также рецепторов прогестерона (*PGR*) и эпидерmalного фактора роста (*EGFR*) определяющих процессы пролиферации и регенерации эпителия шейки матки.

Впервые в России исследован статус метилирования промоторного участка гена *WIF1* у пациенток с ВПЧ-ассоциированным хроническим цервицитом.

Практическая значимость

На основании полученных данных усовершенствована диагностика и тактика ведения пациенток с ВПЧ-ассоциированным хроническим цервицитом с учетом результатов современных методов диагностики (жидкостной цитологии, ВПЧ-генотипирования, расширенной кольпоскопии, исследования транскрипционного профиля генов *CDKN2A/p16, IL10, IL1β, TNFα, CD68* и бисульфитного секвенирования гена *WIF1*), позволяющих определить объем и сроки проведения диагностических и лечебных мероприятий, персонализировать подход к ведению пациенток в неоднозначных клинических ситуациях и избежать необоснованные воздействия на шейку матки, особенно у не реализовавших репродуктивную функцию молодых женщин.

Определен статус метилирования гена *WIF1* в качестве неинвазивного маркера в диагностике ВПЧ-ассоциированного хронического цервицита, позволяющий прогнозировать развитие предрака и рака шейки матки.

Разработан алгоритм ведения пациенток с хроническим цервицитом, ассоциированным с ВПЧ на основании комплексного обследования с применением клинико-лабораторных методов исследования с акцентом на молекулярно-генетические маркеры воспалительного процесса шейки матки.

Методология и методы исследования

Диссертационная работа выполнена на базе ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России (директор – академик РАН Г.Т. Сухих). Клиническая часть работы проводилась в научно-поликлиническом отделении (НПО) ФГБУ «НМИЦАГП им. В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (заведующий – д.м.н., профессор В.Н. Прилепская). Цитологическое (жидкостная цитология) и морфологическое исследование проводилось в лаборатории 1 патологоанатомического отделения ФБГУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России (заведующий - д.м.н., профессор А.И. Щеголев). В лаборатории молекулярно-генетических методов отдела клинической и молекулярной генетики ФБГУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России проводилось ВПЧ-тестирование (HPVквант-21), исследование транскрипционного профиля генов, комплексное исследование микробиоценоза влагалища и ИППП (заведующий - д.б.н., профессор РАН Д.Ю. Трофимов). Изучение состояния биоценоза влагалища на основании микроскопии мазков вагинального отделяемого проводилось в лаборатории микробиологии (заведующий - д.м.н. Т.В. Припутневич). На базе Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН в Центре коллективного пользования «ГЕНОМ» проведено определение уровня метилирования промоторного участка гена *WIF1*.

В период с 2016 по 2019 г. в НПО ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России проведено продольное проспективное исследование, предусматривающее наблюдение естественного развития заболевания в динамике с повторным клинико-лабораторным обследованием пациенток на последующем визите через 12 месяцев.

Обследованы 202 женщины, обратившиеся на амбулаторно-поликлинический прием с целью диагностики и лечения патологии шейки матки. Все пациентки, включенные в исследование, соответствовали критериям включения/исключения и подписали добровольное

информированное согласие. Экспертная комиссия ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России по вопросам этики биомедицинских исследований рассмотрела материалы и согласно протоколу № 10 от 20 октября 2016 года одобрила проведение научного исследования.

В рамках диссертационной работы использованы клинические, инструментальные, лабораторные методы исследования, аналитические и статистические методики. В ходе выполнения работы наряду с традиционными методами, проведены специальные методы исследования: определение представленности 21 мРНК гена человека и бисульфитное секвенирование гена *WIF1*.

Положения, выносимые на защиту

1. В структуре патологии шейки матки ВПЧ-ассоциированный хронический цервицит выявляется у каждой четвертой пациентки (25,7%) (по обращаемости). Доминирующими в структуре канцерогенных генотипов при хроническом цервиците являются ВПЧ 16, 33 и 35 типов. Более чем в половине случаев выявляется один тип ВПЧ, у каждой пятой пациентки - два и более типов ВПЧ при средней вирусной нагрузке $4,9 \log$ копий ДНК вируса. У каждой второй пациентки (50%) ВПЧ-ассоциированный хронический цервицит сочетается с нарушениями микробиоценоза влагалища.

2. Хронический цервицит, ассоциированный с ВПЧ, характеризуется воспалительными изменениями нижнего отдела гениталий, подтвержденными у большинства пациенток (73,3%) результатами цитологического исследования и у каждой четвертой (26,7%) - гистологическим методом исследования. Колпоскопические признаки ВПЧ-ассоциированного хронического цервицита являются не специфичными: у 34,6% женщин выявляются слабо выраженные изменениями эпителия шейки матки, характерные для плоскоклеточных интраэпителиальных поражений низкой степени тяжести (LSIL), не подтвержденные результатами цитологического и морфологического методов исследования.

3. ВПЧ-ассоциированный хронический цервицит характеризуется повышением экспрессии мРНК гена *CDKN2A/p16* - белка-супрессора опухолевого роста. Каскадная активация факторов иммунитета (*TNF α* , *IL1 β* , *TLR4*, *CD68*, *IFNAR1*, *IL10*, *IL1RN*, *TGFB1*) и провоспалительных маркеров *MMP8* и *MMP9* на фоне выявленных обратных корреляционных связей с экспрессией мРНК генов *EGFR* и *PGR* приводит к подавлению нормальной регенерации эпителия шейки матки. Повышение экспрессии мРНК генов *CDKN2A/p16* и *IL10* при папилломавирусной инфекции определяет подавление местного иммунитета и способствует нарушению микробиоценоза влагалища. Отсутствие гиперметилирования промоторной области гена *WIF1* является благоприятным прогностическим признаком течения ВПЧ-ассоциированной патологии шейки матки.

Личный вклад автора

Автор принимал участие в определении темы диссертационной работы, подготовке аналитического обзора, постановке задач, определении критериев включения и исключения пациентов, формировании дизайна исследования, в сборе биологического материала, оформлении и анализе медицинской документации, статистической обработке и обобщении полученных результатов, формулировании выводов, определении научной новизны и практической значимости проведенного исследования.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

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.

Степень достоверности полученных результатов

Обследование достаточного количества пациенток (n=202), включенных в исследование, с применением современных методов диагностики, соответствующих цели и задачам исследования, подтверждает достоверность результатов исследования. Анализ полученных результатов проведен с

применением статистических методов обработки. Выводы и практические рекомендации, вытекающие из результатов исследования, подтверждают положения, выносимые на защиту.

Апробация результатов исследования

Диссертационная работа обсуждена на межклинической конференции НПО 21.06.2019 и представлена на заседании аprobационной комиссии ФБГУ «НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова» Минздрава России (02.09.2019 г., протокол №9).

Материалы диссертации, основные положения и результаты работы доложены на XVIII всероссийском научно-образовательном форуме «Мать и дитя» (Москва, 27-29 сентября 2017 г.), XXIV Всероссийском конгрессе с международным участием и специализированной выставочной экспозицией «Амбулаторно-поликлиническая помощь: проблемы, достижения, перспективы» (Москва, 4-6 апреля 2018 г.), XIX всероссийском научно-образовательном форуме «Мать и дитя» (Москва, 26-28 сентября 2018 г.), XII региональном научно-образовательном форуме «Мать и дитя» (Сочи, 27-28 июня 2019 г.), XX всероссийском научно-образовательном форуме «Мать и дитя» (Москва, 25-27 сентября 2019 г.).

Внедрение результатов исследования в практику

Разработанный на основании полученных результатов исследования алгоритм ведения пациенток с ХЦ, ассоциированным с ВПЧ, используется в практической деятельности врачей акушеров-гинекологов НПО ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России. Материалы диссертационной работы используются в лекционных материалах семинаров и форумов.

По теме диссертации опубликовано 9 научных работ, из них 6 – в рецензируемых научных изданиях ВАК Министерства образования РФ и индексируемых в SCOPUS.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа состоит из введения, 4 глав, включающих обзор

литературы, материалы и методы, результаты собственных исследований и их обсуждение, а также выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Работа изложена на 175 страницах, проиллюстрирована 28 рисунками, включает 31 таблицу. Библиографический указатель содержит 208 литературных источников, из них - 82 отечественных и 126 зарубежных авторов.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Согласно поставленным цели и задачам исследования в период с 2016 по 2019 гг. обследованы 202 пациентки, обратившиеся в НПО ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России (директор – д.м.н., профессор, академик РАН Г.Т. Сухих).

Сформированы 2 группы женщин, которые разделены на 2 подгруппы в зависимости от результатов цитологического и/или гистологического методов исследования и ВПЧ-генотипирования. 1 группу составили 108 пациенток с ХЦ: 1а подгруппа – 52 женщины с ВПЧ-позитивным тестом, 1б – 56 пациенток с ВПЧ-негативным тестом; 2 группа – 94 пациентки без признаков ХЦ: 2а подгруппу составили 44 женщины с ВПЧ-позитивным тестом, 2б – 50 пациенток с ВПЧ-негативным тестом (контрольная подгруппа) (рис.1).



Рисунок 1. Дизайн клинического этапа исследования.

Критерии включения в исследование: возраст от 25 до 49 лет, пациентки с подтвержденным цитологическим заключением ХЦ, при ВПЧ позитивном

(ВПЧ+) и ВПЧ негативном (ВПЧ-) тесте, пациентки с отсутствием цитологических признаков ХЦ при ВПЧ+ и ВПЧ– тесте, способность соблюдать требования протокола, информированное согласие на участие в исследовании.

Критерии исключения из исследования: беременность, послеродовый период и период лактации, плоскоклеточные интраэпителиальные поражения и РШМ, иммунодефицитные состояния, включая ВИЧ-инфекцию, психоневрологические заболевания, отсутствие возможности следовать протоколу.

Диагноз ХЦ был установлен на основании анализа анамнестических данных, результатов клинического обследования, расширенной кольпоскопии, ЖЦ и/или морфологического метода исследования.

В ходе выполнения диссертационной работы использованы следующие методы исследования:

I. Клинико-анамнестическое обследование: сбор жалоб, данных анамнеза и репродуктивной функции, проведение общего и гинекологического осмотра.

II. Специальные методы исследования: ЖЦ и гистологическое исследование биоптатов шейки матки; ВПЧ-тестирование (HPVквант-21) методом ПЦР-РВ; комплексное исследование микробиоценоза влагалища - тест-система «Фемофлор 16» (Россия) и ИППП методом ПЦР-РВ; расширенная кольпоскопия; микроскопия вагинальных мазков; исследование транскрипционного профиля мРНК 21 генов человека в соскобах цервикального канала методом количественной ПЦР-РВ с предварительной обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР); определение уровня метилирования промоторного участка гена *WIF1* методом бисульфитного секвенирования гена.

III. Статистическая обработка и анализ полученных данных проведены с помощью таблиц «Microsoft Excel» и пакета статистических прикладных программ SPSS for Windows v.22. IBM, USA.

Результаты исследования и их обсуждение

На первом этапе для формирования групп пациенток проведено цитологическое исследование (ЖЦ) и ВПЧ-тестирование, по результатам которых в исследование включено 202 пациентки средний возраст которых составил $31,8 \pm 5,8$ лет. Результаты исследования показали, что в структуре патологии шейки матки ВПЧ-ассоциированный ХЦ выявлялся у 25,7% женщин (по обращаемости).

Анализ клинико-анамнестических данных обследуемых женщин не выявил статистически значимых отличий между подгруппами по возрасту, антропометрическим показателям, особенностям менструальной функции, акушерскому анамнезу и соматической заболеваемости.

Пациентки 1а подгруппы с ВПЧ-ассоциированным ХЦ раньше вступали в интимные отношения по сравнению с контрольной подгруппой, при этом среднее число половых партнеров в анамнезе данной подгруппы было также статистически значимо выше (3 и более), чем в подгруппе контроля (табл.1). Аналогичные результаты исследования описаны в работе Cubie H.A. (2013), согласно которым число половых партнеров прямо пропорционально частоте инфицирования ВПЧ: при наличии одного полового партнера - ВПЧ выявлялся в 17-21%, в то время как при 5 и более партнеров - в 69-83% случаев.

Таблица 1

Сексуальное поведение женщин в исследуемых подгруппах

	1а подгруппа (n=52)	1б подгруппа (n=56)	2а подгруппа (n=44)	2б (контрольная подгруппа) (n=50)	p
Начало половой жизни (лет)	$17,9 \pm 2,5^*$	$18,7 \pm 2,5$	$18,3 \pm 2,2$	$19,5 \pm 2,1^*$	0,008*
Количество половых партнеров	$3,2 \pm 1,5^*$	$2,9 \pm 1,6$	$2,7 \pm 1,3$	$2,4 \pm 1,2^*$	0,003*

*Данные представлены как среднее арифметическое значение \pm стандартное отклонение, тест ANOVA.

Данные представлены как абсолютные значения и %, χ^2 -тест
 $p < 0,05$ статистически значимые различия между 1а и 2б подгруппами

В анамнезе обследуемых женщин с ХЦ статистически значимо чаще выявлено рецидивирующее течение вульвовагинального кандидоза (ВВК), бактериального вагиноза (БВ), уреаплазменной инфекции по сравнению с контрольной подгруппой (табл.2).

Таблица 2
ВПЧ-ассоциированные заболевания в анамнезе у женщин
исследуемых подгрупп

Гинекологический анамнез	1а подгруппа (n=52)	1б подгруппа (n=56)	2а подгруппа (n=44)	2б (контрольная подгруппа) (n=50)	p
ВПЧ в анамнезе	27 (51,9%)*	10 (17,9%)	23 (52,3%)*	8 (16%)*	0,01*
ХЦ	8 (15,4%)*	8 (14,3%)*	0 (0%)*	3 (6%)	0,01*#
Остроконечные кондиломы вульвы, влагалища и шейки матки	3 (5,8%)	0 (0%)*	4 (9,1%)*	3 (6%)	0,02*#
CIN I	5 (9,6%)	2 (3,6%)	2 (4,5%)	3 (6%)	>0,05
CIN II-III	4 (7,7%)*	2 (3,6%)	3 (6,8%)	0 (0%)*	0,04*#

Данные представлены как абсолютные значения и %, χ^2 -тест, #Z-критерий

* $p<0,05$ статистически значимые различия между подгруппами

Статистически значимые различия были выявлены в отношении ПВИ, ХЦ в анамнезе и перенесенной ранее ВПЧ-ассоциированной патологии шейки матки, вульвы и влагалища 1а, 1б и 2а подгрупп по сравнению с контрольной подгруппой.

Большинство женщин (69,4%), жалоб не предъявляли. В 30,6% случаев пациентки предъявляли жалобы, не патогномоничные для ХЦ и обусловленные признаками вульвовагинита: обильные выделения и неприятный запах из половых путей у женщин 1а подгруппы в 28,6%; зуд и жжение в области вульвы и влагалища - в 20,4%; контактные кровотечения - в 5,1%; диспареуния, дизурические расстройства - менее 5% случаев.

Наиболее часто в 1а подгруппе выявлены ВПЧ: 16 (28,8%), 33 и 35 (13,5%), 66 (11,5%) типов. Во 2а подгруппе наиболее часто выявлены 16 (36,4%), 31 и 52 (19,1%), 51, 53 и 68 (13,5%) типы ВПЧ (рис.2). ВПЧ 33, 35, 66, 18, 31, 68 и 52 встречались менее чем в 10% случаев. В 1а и 2а подгруппах доминирующим в структуре канцерогенных типов явился ВПЧ 16,

выявляемый у каждой третьей пациентки. Наши результаты совпадают с данными Zhao J. (2017), согласно которым наиболее часто при ВПЧ-ассоциированном ХЦ выявляются ВПЧ 16, 58 и 52 типы.

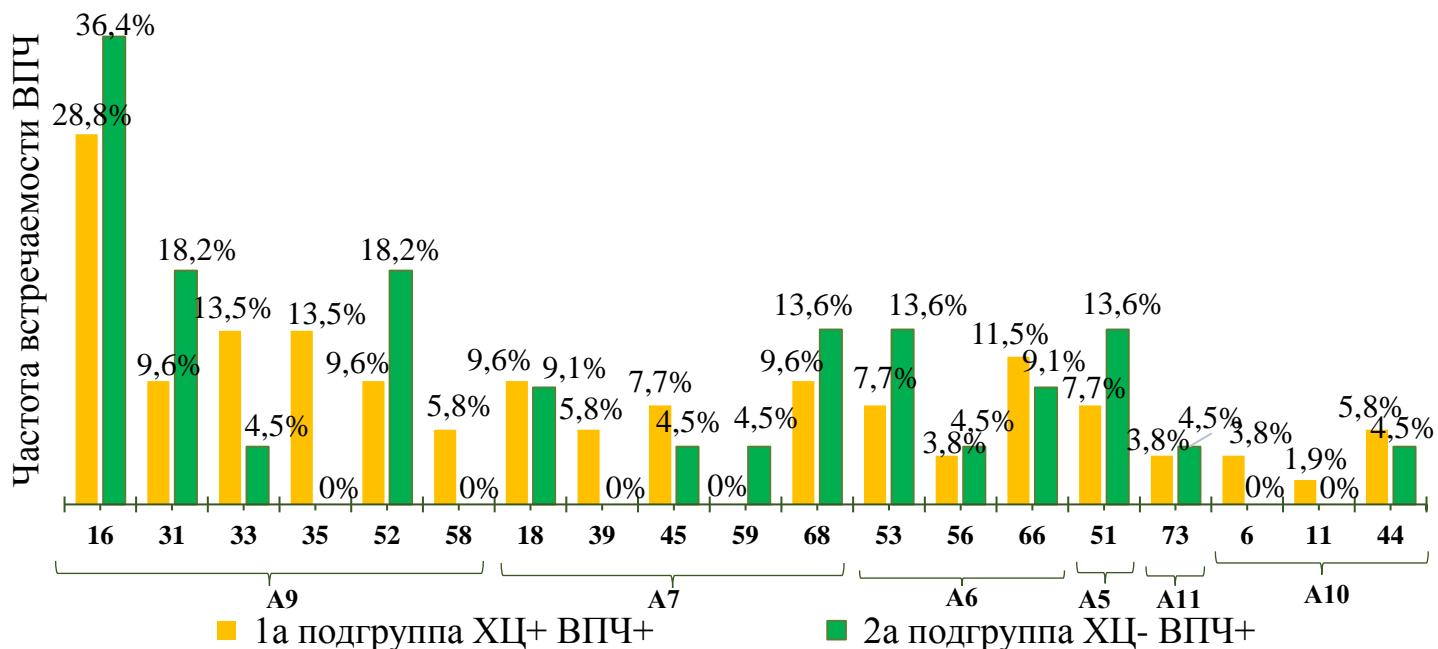


Рисунок 2. Результаты ВПЧ генотипирования в 1а и 2а подгруппах.

У большинства пациенток выявлен один тип ВПЧ, два и более - у каждой четвертой пациентки. Средняя вирусная нагрузка в 1а подгруппе составила 4,9 lg копий ДНК вируса в образце (межквартильный размах 3,6 - 6,6 lg), во 2а - 4,5 lg копий ДНК вируса в образце (межквартильный размах 4,2 - 8,8 lg). Распространенность генотипов и вирусная нагрузка у пациенток 1а и 2а подгрупп статистически значимо не различалась, а полученные данные не противоречат результатам исследований, проведенных ранее в популяции Российской женщин (Долгушина В.Ф. и соавт., 2011; Трушина О.И., 2018).

В 1 группе пациенток с ХЦ, наиболее частыми кольпоскопическими изменениями явились: у 72,2% женщин - выраженный сосудистый рисунок, у 52,8% - множественные набитовы кисты, у 45,4% – деформация и гипертрофия шейки матки (табл.3).

Анализ данных расширенной кольпоскопии 1 группы пациенток с ХЦ показал, что выявляемые признаки являются не специфическими, при этом, у каждой третьей пациентки (33,3%) определяются аномальные

кольпоскопические изменения шейки матки, характерные для LSIL и потребовавшие в последующем проведения прицельной биопсии шейки матки.

Слабовыраженные изменения эпителия шейки матки выявлены у 34,6%, выраженные - у 3,8% женщин 1а подгруппы. При этом слабовыраженные изменения статистически значимо чаще выявлялись в 1а подгруппе, по сравнению со 2а ($p<0,001$).

Таблица 3
Результаты кольпоскопического исследования обследуемых женщин

Кольпоскопический признак	1а подгруппа (n=52)	1б подгруппа (n=56)	2а подгруппа (n=44)	2б (контрольная подгруппа) (n=50)	p
Выраженный сосудистый рисунок	35 (67,3%)*	43 (76,8%)	15 (34,1%)**	2 (4%)*	*<0,001 **<0,001
Множественные наботовые кисты	31 (59,6%)*	26 (46,4%)	11 (25%)**	2 (4%)*	*0,003 **<0,001
Гипертрофия и деформация	28 (53,8%)*	21 (37,5%)	14 (31,8%)**	2 (4%)*	*0,004 **<0,001
Слабовыраженные изменения	18 (34,6%)*	15 (26,8%)	7 (15,9%)**	0 (0%)*	*<0,001 **<0,001
Выраженные изменения	2 (3,8%)	1 (1,8%)	4 (9,1%)	0 (0%)	0,83#

Данные представлены как абсолютные значения и %, χ^2 -тест, #Z-критерий

* $p<0,05$ статистически значимые различия между подгруппами

** $p<0,05$ статистически значимые различия между 1а и 2а подгруппами

Полученные результаты согласуются с результатами исследования Ryu K.J. et al. (2016) и мета-анализа Olaniyan O.B. (2002), рассматривающих расширенную кольпоскопию, как один из основных, высокоинформативных методов диагностики ВПЧ-ассоциированной патологии шейки матки.

Результаты морфологического исследования биоптатов шейки матки 47 обследованных женщин 1а, 1б и 2а подгрупп подтвердили диагноз ХЦ в 93,6% случаев, в 4,2% - LSIL и в 2,1% случаев - HSIL. Наши данные согласуются с результатами Coronado P.J. (2014) и Ding Z. (2016), подтверждающих необходимость проведения прицельной биопсии шейки матки в диагностике ВПЧ-ассоциированной патологии шейки матки.

Микроскопия вагинальных мазков показала наличие кокковой микрофлоры в 11,9%, гарднерелл - в 7,9% и дрожжеподобных грибов рода *Candida* - в 7,4 % случаев. У каждой 5 пациентки 1а подгруппы выявлялись признаки характерные для БВ (табл.4). Статистически значимо чаще выявлялся БВ у женщин 1а и 1б подгрупп по сравнению со 2а и контрольной подгруппой ($p<0,05$). Аналогичные результаты описаны в исследовании Gillet E. et al. (2012).

Таблица 4

Результаты микроскопии вагинальных мазков в исследуемых подгруппах

Микроскопия вагинальных мазков	1а подгруппа (n=52)	1б подгруппа (n=56)	2а подгруппа (n=44)	2б (контрольная подгруппа) (n=50)	p
Дисбиоз влагалища	12 (23,1%)*	11 (19,6%)*	0*	0*	0,006*#
Вагинит (воспалительный тип мазка)	3 (5,7%)	8 (14,3%)*	4 (9,1%)	0*	0,003*#

Данные представлены как абсолютные значения и %, χ^2 -тест, #Z-критерий

* $p<0,05$ статистически значимые различия подгруппами

Результаты комплексного исследования микробиоценоза влагалища показали, что ВПЧ-ассоциированный ХЦ характеризуется изменениями микробиоты влагалища: повышением доли микроорганизмов, ассоциированных с БВ (*Gardnerella vag.*, *Eubacterium spp.*, *Megashaera spp.*, *Lachnobacterium spp.*, *Atopobium vag.*), *Ureaplasma* и *Candida spp.* (рис. 3).

В 1а подгруппе у каждой второй женщины установлен абсолютный нормоценоз, в 38,5% случаев определена *Ureaplasma spp.* в количестве более 104 ГЭ/мл, в 15,4% - *Candida spp.* более 103 ГЭ/мл, сочетание *Ureaplasma spp.* и *Candida spp.* – выявлена в 46,1% случаев на фоне сохраненной лактофлоры; у 11 (21,1 %) пациенток выявлено умеренное снижение количества лактобактерий (< 80%, но >20%) и у 2 (3,8%) - выраженное снижение количества лактобактерий (<20%) на фоне увеличения количества облигатно-анаэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов относительно ОБМ. Наши результаты согласуются с данными Weijiao G. et al. (2013),

согласно которым бактериальный вагиноз наиболее частое заболевание, сопутствующее ПВИ и благоприятный фактор персистенции ВПЧ.

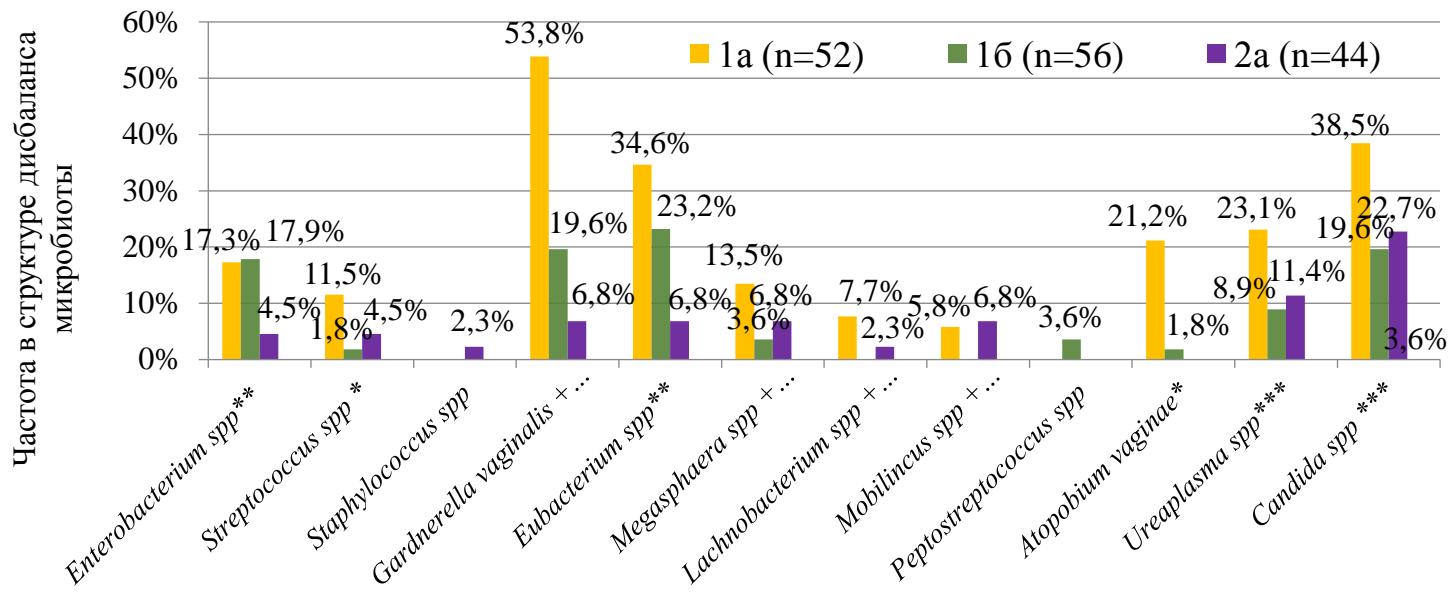


Рисунок 3. Видовой состав биоценоза влагалища обследованных пациентов.

Всем пациенткам с БВ, ВВК и уреаплазменной инфекцией проведено лечение согласно клиническим рекомендациям РОАГ (2013), CDC (2015) и IUSTI (2016).

Результаты исследования транскрипционного профиля генов 1а подгруппы выявили повышение уровня экспрессии мРНК гена неопластической трансформации *CDKN2A/p16* в 1,8 раза ($p=0,02$).

Таблица 5
Изменение уровня экспрессии мРНК профиля генов исследуемых женщин по сравнению с контрольной подгруппой

Ген	1а подгруппа (n=52)		1б подгруппа (n=56)		2а подгруппа (n=44)	
	изменение	p	изменение	p	изменение	p
<i>CDKN2A/p16</i>	↑1,8 раз	0,02*	-	0,15	↑1,7 раз	0,03*
<i>IL10</i>	-	0,57	↑1,9 раз	0,02*	↑2,4 раза	0,01*
<i>IFNAR1</i>	-	0,45	↑1,3 раза	0,01*	-	0,27
<i>IL1β</i>	-	0,64	↑2,2 раза	0,05*	-	0,17
<i>TNFα</i>	-	0,39	↑2,2 раза	0,02*	-	0,15
<i>TLR4</i>	-	0,35	↑2,1 раз	0,02*	-	0,16
<i>CD68</i>	-	0,58	↑1,5 раза	0,04*	-	0,23
<i>TGFB1</i>	-	0,72	↑1,6 раз	0,03*	-	0,24
<i>MMP9</i>	-	0,33	↑2,9 раз	0,03*	-	0,12

* $p<0,05$ статистически значимые изменения по сравнению с контрольной группой, критерий Манна-Уитни

Исследование 1б подгруппы, показало повышение экспрессии мРНК генов *IL10* оказывающего иммуносупрессорное действие на синтез провоспалительных цитокинов в 1,9 раз ($p=0,03$) и *IFNAR1*, *IL1 β* , *IL10*, *TNF α* , *TLR4*, *CD68*, *TGFB1* и *MMP9* от 1,3 до 2,9 раз ($p<0,05$).

Результаты 2а подгруппы свидетельствуют о том, что ВПЧ по-видимому может оказывать иммуносупрессорное действие, опосредованное противовоспалительным *IL10*, уровень которого в 2,4 раза выше по сравнению с контрольной подгруппой ($p=0,01$) (табл.5).

Для выявления патогенетических связей между экспрессией мРНК исследуемых генов проведен корреляционный анализ методом ранговой корреляции Спирмена (rS) с оценкой по шкале Чеддока. При анализе корреляционных связей в качестве одного из основных маркеров был выбран ген *CDKN2/p16*, экспрессия которого повышается 1а подгруппе. Выявлены прямые корреляционные связи между экспрессией мРНК гена *CDKN2/p16* и мРНК генов *GATA3* ($p<0,05$), *CXCL5* ($p<0,05$), *IL18* ($p<0,05$), и *IL1 β* ($p<0,05$).

При ХЦ отмечены средние и высокие корреляционные связи экспрессии иммунных маркеров воспаления ($p<0,001$): *TNF α* , *IL1 β* , *TLR4*, *CD68* и *IFNAR1*, в следствие каскадной активации иммунокомpetентных клеток и *MMP8*, *MMP9*. При высоком уровне провоспалительных маркеров, по-видимому, компенсаторно повышается экспрессия иммунорегуляторных молекул *IL10*, *IL1RN* и *TGFB1* (средние и высокие корреляционные связи, $p<0,001$), что обеспечивает контроль за воспалительной реакцией и предохранение системы от гиперактивации. Установлены отрицательные слабые и средние ($p<0,001$) корреляционные связи маркеров воспаления с *PGR* и *EGFR*. Хроническое воспаление вследствие активации провоспалительных цитокинов приводит к снижению уровня экспрессии *PGR* и *EGFR*, определяющих снижение чувствительности к прогестерону, которое может приводить к дисрегуляции функции репродуктивной системы в целом и снижение чувствительности к эпидермальному ростовому фактору (*EGF*) – одному из ключевых факторов,

определяющих процессы пролиферации эпителия, и подавление нормальной регенерации эпителия.

Для практического применения экспрессионного профиля генов с целью оценки степени выраженности воспалительного процесса в эпителии шейки матки разработана модель, учитывающая уровень экспрессии четырех маркеров воспаления: *IL1β*, *TNFα*, *CD68* и *IL10*.

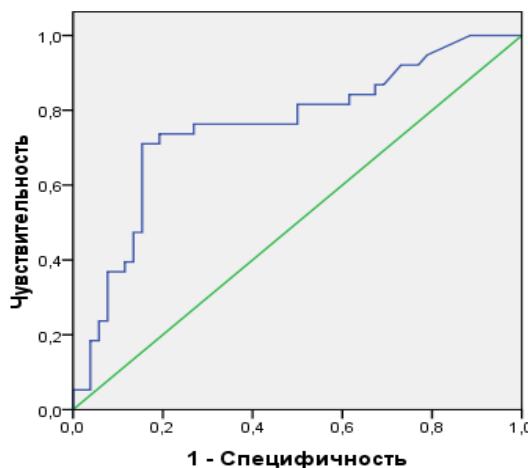
Индекс воспаления (ИВ) рассчитан по формуле 1:

$$\text{ИВ} = \frac{1}{1+e^{-z}} * 100\% \text{ (формула 1),}$$

где z – значение граничной функции, которое может быть рассчитано по формуле 2:

$$Z = 1,95 * \ln \frac{IL1B}{B2M} + 0,96 * \ln \frac{TNF}{B2M} - 0,21 * \ln \frac{CD68}{B2M} + 0,25 * \ln \frac{IL10}{B2M} + 10,3 \text{ (формула 2),}$$

где, $\frac{IL1B}{B2M}, \frac{TNF}{B2M}, \frac{CD68}{B2M}, \frac{IL10}{B2M}$ – нормированные значения уровня экспрессии цитокинов относительно референсного гена *B2M*.



Диагональные сегменты формируются совпадениями.

Рисунок 4. ROC-кривая.

Оптимальное значение величины порога отсечения (точки cut off) определено с помощью ROC-анализа. Площадь под ROC-кривой составила: AUC=75,7±5,3 ($p=3,3 \times 10^{-5}$) (рис. 4). Пороговое значение ИВ составило 59 баллов. При значении ИВ>59 баллов в мазках эпителия шейки матки иммунный ответ рассматривается как выраженный провоспалительный.

Чувствительность и специфичность предложенного метода оценки

воспалительного процесса в области порогового значения составила 62% и 84% соответственно.

При ВПЧ-ассоциированном ХЦ использование модели позволяет прогнозировать течение воспалительного процесса. В 12 из 13 случаев (92,3%) в динамике сохранился хронический воспалительный процесс при выраженному провоспалительному ответе в соответствии с предложенной моделью (ИВ>59 баллов) при первичном визите в сравнении с 14 из 27 случаев (51,9%) при ИВ≤59 (табл.6).

По результатам исследования относительный риск хронического течения воспалительного процесса при ВПЧ-ассоциированном цервиците увеличивается в 1,8 раза при значении ИВ>59 баллов ($RR=1,8$ (95% ДИ: 1,2-2,6, $p=0,031$).

Таблица 6

Результаты пациентов через 12 месяцев динамического наблюдения в зависимости от значения ИВ на первом визите

2 визит	ИВ>59, 1 визит	ИВ≤59 1 визит
признаки ХЦ (n=26)	12*	14
без признаков ХЦ (n=14)	1*	13

*Относительный риск хронического течения воспалительного процесса

О начальных этапах формирования дисплазии эпителия шейки матки может свидетельствовать появление сайтов гиперметилирования гена *WIF1* у пациентов с цитологическим заключением ХЦ. По результатам нашего исследования, метилирование промоторной области гена *WIF1* при ВПЧ-ассоциированном ХЦ не наблюдалось или было выражено слабо. Уровень метилирования промоторной области гена *WIF1* между исследуемыми подгруппами статистически значимо не отличался ($p>0,05$). Отсутствие гиперметилирования следует рассматривать как прогностический благоприятный признак течения заболевания.

Повторное клинико-лабораторное обследование проведено через 12 месяцев у 72 женщин 1а, 1б и 2а подгрупп. Особый интерес представляют женщины 1а подгруппы с ВПЧ-ассоциированным ХЦ (n=40).

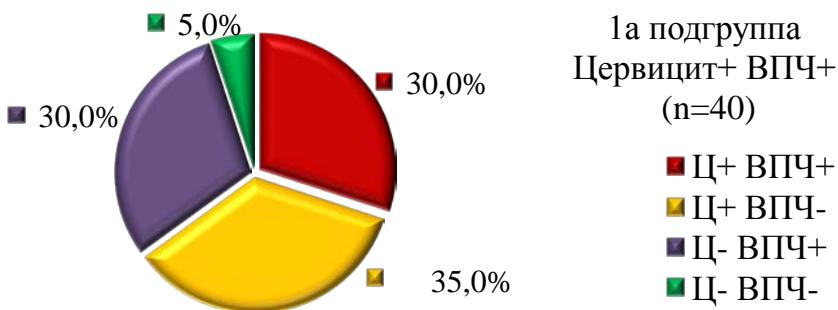


Рисунок 5. Результат повторного исследования женщин 1а подгруппы.

По результатам обследования 40 женщин 1а подгруппы в динамике у 26 пациенток (65%) по результатам цитологического исследования верифицирован ХЦ, из них в 14 случаях (30%) – ассоциированный с ВПЧ (рис. 5). Средняя вирусная нагрузка в 1а подгруппе на втором визите составила 4,2 lg копий ДНК вируса в образце (межквартильный размах 2,7 - 6,4 lg). Самоэлиминация ВПЧ произошла в 16 случаях (40%), при этом у 8 пациенток (20%) были выявлены другие генотипы ВПЧ, что свидетельствует о реинфекции. В 2 случаях (5%) наблюдалось клиническо-лабораторное выздоровление и полная элиминация вируса.

ВЫВОДЫ

1. ВПЧ-ассоциированный хронический цервицит в структуре патологии шейки матки выявлен у 52 (25,7%) женщин репродуктивного возраста (по обращаемости). У большинства пациенток (73,1%) диагноз хронический цервицит подтвержден данными жидкостной цитологии; у каждой четвертой пациентки (26,9%) - верифицирован морфологическим методом исследования.

2. При ВПЧ-ассоциированном хроническом цервиците доминирующими являются 16 (28,8%), 33 (13,5%) и 35 (13,5%) типы ВПЧ. Один тип ВПЧ выявлен у большинства женщин (71,2%), два и более - у каждой пятой пациентки (21,1%). Средняя вирусная нагрузка в 1а и 2а подгруппах статистически не отличается и составляет $4,9 \log$ копий ДНК вируса ($p>0,05$).

3. У каждой второй пациентки с ВПЧ-ассоциированным хроническим цервицитом выявляются нарушения микробиоценоза влагалища: бактериальный вагиноз (30,8%), уреаплазменная инфекция (19,2%),

вульвовагинальный кандидоз (7,7%), микст-инфекция (42,3%). Последняя представлена сочетанием кандидозной и уреаплазменной инфекцией, а также облигатно-анаэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов.

4. У каждой третьей пациентки хронический цервицит сопровождается кольпоскопическими изменениями шейки матки: множественные набитые кисты (59,2%), гипертрофия (57,4%), деформация шейки матки (53,7%), признаки воспаления (26,9%). Кольпоскопические признаки ВПЧ – ассоциированного хронического цервицита являются не специфичными, не подтверждаются результатами цитологического и морфологического методов исследования и не могут быть использованы в качестве определяющего метода диагностики патологии шейки матки.

5. ВПЧ-ассоциированный хронический цервицит характеризуется повышением уровней экспрессии мРНК гена *CDKN2A/p16* в 1,8 раз ($p=0,02$). Повышение уровня экспрессии мРНК генов *CDKN2A/p16* в 1,7 раз ($p=0,03$) и иммунорегуляторного цитокина *IL10* в 2,4 раза ($p=0,01$). Папилломавирусная инфекция определяет подавление местного иммунитета и способствует нарушению микробиоценоза влагалища. Повышение уровня экспрессии мРНК генов *IFNAR1*, *IL10*, *IL1β*, *TNFα*, *TLR4*, *CD68*, *TGFB1* и *MMP9* ($p<0,05$) может расцениваться в качестве маркеров хронического цервицита.

6. Установлены прямые корреляционные связи экспрессии матриксных металлопротеиназ (*MMP8*, *MMP9*) и иммунных маркеров воспаления (*TNFα*, *IL1β*, *TLR4*, *CD68*, *IFNAR1*, *IL10*, *ILRN*, *TGFB1*), как следствие каскадной активации иммунокомpetентных клеток, на фоне снижения чувствительности ткани к действию прогестерона и EGF.

7. У пациенток с ВПЧ-ассоциированным хроническим цервицитом отмечается отсутствие или слабое проявление аномального гиперметилирования промоторной области гена *WIF1*, что свидетельствует об отсутствии риска прогрессирования заболевания.

8. Разработана диагностическая модель расчета ИВ для определения локального воспалительного процесса шейки матки, учитывающая уровень экспрессии 4 маркеров: *IL10*, *IL1β*, *TNFα* и *CD68*. При ВПЧ-ассоциированном хроническом цервиците использование модели позволяет прогнозировать

течение воспалительного процесса. Риск хронического течения воспалительного процесса увеличивается в 1,8 раз при значении ИВ>59 баллов.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. При ВПЧ-ассоциированном хроническом цервиците целесообразно проведение комплексного исследования микробиоценоза влагалища методом ПЦР-РВ и микроскопического исследования вагинального мазка для выявления сопутствующих генитальных инфекций. Необходимо проведение этиотропной терапии в зависимости от выявленных возбудителей согласно клиническим рекомендациям.

2. Пациенткам с ВПЧ-ассоциированным хроническим цервиците следует проводить расширенную кольпоскопию. При выявлении аномальных кольпоскопических изменений целесообразно определение неинвазивным методом экспрессии мРНК генов (*IL10, IL1β, TNFα* и *CD68*) и метилирования гена *WIF1*. Отсутствие или слабое метилирование промоторного участка гена *WIF1* и низкий уровень представленности мРНК генов *IL10, IL1β, TNFα* и *CD68* (ИВ<59 баллов) позволяет выбрать тактику динамического наблюдения за женщинами в течение 12 месяцев.

3. При выявлении аномальных сайтов гиперметилирования промоторного участка гена *WIF1* и/или повышение уровня представленности мРНК генов *IL10, IL1β, TNFα* и *CD68* (ИВ>59 баллов) необходимо проведение прицельной биопсии шейки матки и выскабливания цервикального канала (по показаниям) с последующей гистологической верификацией диагноза. Дальнейшая тактика ведения пациентки зависит от результатов гистологического метода исследования согласно клиническим рекомендациям.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Хронический цервицит: современные возможности диагностики и лечения / А.С. Амирханян, В.Н. Прилепская, Г.Р. Байрамова, О.В. Бурменская, М.Н. Костава, А.В. Асатурова // **Акушерство и гинекология.** – 2018. – № 4. – С. 22-27.

2. Хронический цервицит, ассоциированный с папилломавирусной

инфекцией: диагностика и тактика ведения пациенток / Г.Р. Байрамова, **А.С. Амирханян**, И.И. Баранов, О.В. Бурменская, Е.А. Калинина, Т.В. Припутневич, М.Ю. Бобров, Е.С. Буняева // **Доктор.Ру.** – 2017. – № 3. – С. 66–72.

3. Хронический цервицит, ассоциированный с вирусом папилломы человека и маркеры воспаления у женщин репродуктивного возраста / **А.С. Амирханян**, Г.Р. Байрамова, В.И. Киселев, В.Н. Прилепская, А.А. Полозников, О.В. Бурменская, И.О. Бабкина, А.В. Асатурова // **Акушерство и гинекология.** – 2019. – № 4. – С. 49–57.

4. Современные возможности кольпоскопии в комплексной диагностике плоскоклеточных интраэпителиальных поражений шейки матки / В.Н. Прилепская, Г.Р. Байрамова, Н.В. Зароченцева, З.Н. Эфендиева, **А.С. Амирханян** // **Акушерство и гинекология.** – 2018. – №3. – С. 146–149.

5. Плоскоклеточные интраэпителиальные поражения шейки матки: возможности ранней диагностики и тактики ведения / Г.Р. Байрамова, И.И. Баранов, Л.С. Ежова, Д.Ю. Трофимов, Т.В. Припутневич, **А.С. Амирханян**, А.М. Старинская // **Доктор.Ру.** – 2019. – №9. – С. 66–72.

6. Заболевания нижних отделов гениталий, ассоциированные с папилломавирусной инфекцией: радикальное лечение или иммунотерапия? / Байрамова Г.Р., Баранов И.И., Арсланян К.Н., Амирханян А.С., Чернова В.Ф. // **Акушерство и гинекология.** – 2017. – №4. – С. 13–19.

7. ВПЧ, ко-инфекция и плоскоклеточные интраэпителиальные поражения шейки матки: поиски взаимосвязи / Г.Р. Байрамова, **А.С. Амирханян**, М.Н. Костава, О.В. Бурменская // **Медицинский апонент.** - 2019. - №1. - С.59-64.

8. Современные возможности ранней диагностики плоскоклеточных интраэпителиальных неоплазий шейки матки / Г.Р. Байрамова, **А.С. Амирханян** // **Opinion Leader. Гинекология.** - 2018. - №1(2). - С. 28-32.

9. Заболевания нижних отделов гениталий, ассоциированные с папилломавирусной инфекцией: радикальное лечение или иммунотерапия / Г.Р. Байрамова, **А.С. Амирханян**, И.И. Баранов, К.Н. Арсланян, В.Ф. Чернова // **Вестник ферона.** - 2018. - №1. - С. 12-17.

ПРИЛОЖЕНИЕ А. Алгоритм ведения пациенток с хроническим цервицитом, ассоциированным с ВПЧ



