

*На правах рукописи*

**ЧЕРНОВА**  
**Виктория Федоровна**

**КЛИНИКО-МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ И МОЛЕКУЛЯРНЫЕ КРИТЕРИИ  
ВПЧ-АССОЦИИРОВАННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ШЕЙКИ МАТКИ  
У ЖЕНЩИН РАЗЛИЧНОГО ВОЗРАСТА**

14.01.01 – Акушерство и гинекология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Москва – 2018

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 Байрамова Гюльдана Рауфовна  
доктор медицинских наук, профессор Коган Евгения Алтаровна

Официальные оппоненты:

Минкина Галина Николаевна, доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра акушерства и гинекологии, профессор

Зароченцева Нина Викторовна, доктор медицинских наук, профессор, государственное бюджетное учреждение здравоохранения Московской области "Московский областной научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии", ведущий научный сотрудник отделения гинекологической эндокринологии

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита состоится «\_\_» \_\_\_\_ 2018 года в 13 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 ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Минздрава России и на сайте [http://science.ncagp.ru/upfiles/pdf/ChernovaVF\\_diss.pdf](http://science.ncagp.ru/upfiles/pdf/ChernovaVF_diss.pdf)

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2018 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
доктор медицинских наук, доцент

Калинина Елена Анатольевна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы исследования

Плоскоклеточные интраэпителиальные поражения (SIL) шейки матки занимают лидирующие позиции в структуре гинекологической патологии среди женщин репродуктивного возраста (Прилепская В.Н., 2016; SathianB., 2017). Основная роль в развитии SIL шейки матки отводится вирусу папилломы человека (ВПЧ). По данным литературы пик инфицированности ВПЧ приходится на возраст от 15 до 30 лет и составляет 18,6%, после 30 лет инфицированность вирусом папилломы человека снижается (9,9 %), в то время как частота выявления SIL и рака шейки матки увеличивается (Kologinczak T.L., 2017; Hyun J.Y., 2017; Боева М.И., 2014). В нашей стране за последнее десятилетие количество выявленных новых случаев рака шейки матки увеличилось на 23,9%, что является серьезной угрозой для репродуктивного здоровья женского населения.

### Степень разработанности темы исследования

Результаты многочисленных публикаций свидетельствуют о том, что для женщин до 30 лет характерна транзиторная папилломавирусная инфекция (ПВИ), при этом самоэлиминация вируса папилломы человека достигает 90%, для женщин старше 30 лет - персистирующее течение инфекции (Caixeta R.C., 2015; de Sanjosé S., 2017). Известно, что длительная персистенция ПВИ в течение 2 лет и более является одним из факторов риска развития рака шейки матки. Вместе с тем, на сегодняшний день нет ни одного эффективного персонифицированного метода диагностики, способного прогнозировать течение SIL у конкретной пациентки с четким указанием времени и длительности процесса (Роговская С.И., 2011; Kontostathi G., 2016). Рациональность использования существующих методов диагностики неоднозначна, в связи с их разной диагностической чувствительностью и специфичностью.

Отсутствие универсально доступных и высокоэффективных методов диагностики и прогнозирования SIL шейки матки часто повышает необоснованные, нередко повторные агрессивные хирургические воздействия на шейку матки и связанные с ними осложнения (Camargo M.J., 2014).

С позиций клинициста необходимость своевременной диагностики и прогнозирования тяжести течения SIL шейки матки является не только медицинской, но и социально-демографической проблемой современности.

Открытие в последние годы сложных взаимодействий между геномом ВПЧ и клеткой хозяина, включая эпигенетические перестройки, предоставляет новые возможности в области молекулярной диагностики предрака и рака шейки матки (Gravitt P.E., 2017). Поиск новых неинвазивных маркеров, позволяющих на современном молекулярно-эпигенетическом уровне подойти к диагностике и прогнозированию SIL шейки матки у женщин различных возрастных групп, в настоящее время остается весьма актуальным.

Цель исследования: совершенствование ранней диагностики плоскоклеточных интраэпителиальных поражений шейки матки на основе комплексного изучения клинико-морфологических, иммуноцитохимических, молекулярно-генетических и эпигенетических маркеров.

Задачи исследования:

1. Изучить распространенность генотипов ВПЧ при плоскоклеточных интраэпителиальных поражениях (SIL) шейки матки у женщин в возрасте 21 – 29 лет и 30 – 49 лет.

2. Оценить связь между выявленными генотипами ВПЧ и SIL шейки матки различной степени тяжести по данным цитологического и кольпоскопического методов исследования у женщин в возрасте 21 – 29 лет и 30 – 49 лет.

3. Изучить чувствительность и специфичность диагностического комплекса (жидкостная цитология, ВПЧ – генотипирование ПЦР - РВ, ИЦХ с двойной окраской - p16ink4 $\alpha$ /Ki67) у женщин с SIL шейки матки.

4. Изучить статус метилирования гена WIF1 и экспрессию молекулярно-генетических маркеров – микроРНК (miR-92a, miR-22, miR-25) у женщин с SIL шейки матки.

5. На основании полученных результатов разработать алгоритм ранней диагностики плоскоклеточных интраэпителиальных поражений шейки матки.

## Научная новизна

Показано отсутствие достоверных различий по генотипам ВПЧ у женщин до 30 лет и старше с плоскоклеточными интраэпителиальными поражениями (SIL) шейки матки. Установлено, что вирусная нагрузка и частота выявления ВПЧ 16, 33, 31 и 18 генотипов коррелируют со степенью тяжести цервикальных поражений вне зависимости от возраста пациентки.

Впервые в России исследован статус метилирования гена WIF1 у пациенток с SIL и плоскоклеточным раком шейки матки (SCC). Определен уровень аномального метилирования гена WIF1 для ранней диагностики пациенток с плоскоклеточными интраэпителиальными поражениями низкой степени (LSIL), плоскоклеточными интраэпителиальными поражениями высокой степени (HSIL) и SCC. Установлена корреляционная связь между уровнем аномального метилирования гена WIF1 и степенью тяжести SIL и SCC.

Исследован уровень экспрессии микроРНК (miR-92a, miR-22, miR-25) у пациенток с SIL и плоскоклеточным раком шейки матки. Выявлены изменения в профилях экспрессии микроРНК (miR-92a, miR-22), позволяющие с высокой точностью дифференцировать SIL и рак шейки матки.

## Теоретическая и практическая значимость работы

Обоснована и определена эффективность и целесообразность использования комплекса современных неинвазивных методов (жидкостная цитология, ВПЧ – генотипирование методом ПЦР – РВ, ИЦХ с двойной окраской – p16ink4 $\alpha$ /Ki67) ранней диагностики поражений шейки матки ассоциированных с вирусом папилломы человека, позволяющих определить объем и сроки проведения как диагностических, так и лечебных мероприятий.

С целью ранней диагностики и прогнозирования SIL шейки матки и SCC предложен в качестве неинвазивного маркера показатель аномального метилирования гена WIF1, дополнительных диагностических маркеров – уровень экспрессии miR-22 и miR-92a.

Усовершенствован алгоритм комплексной ранней диагностики плоскоклеточных интраэпителиальных поражений шейки матки, с использованием предложенных новых высокоинформативных неинвазивных маркеров.

#### Методология и методы исследования

В работе использованы следующие методы диагностики SIL шейки матки: клинический осмотр (жалобы, анамнез, гинекологический статус), жидкостная цитология, расширенная кольпоскопия, ВПЧ - генотипирование (21 тип) с определением вирусной нагрузки методом полимеразно-цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени (РВ), гистологическое исследование биоптата шейки матки и соскоба цервикального канала (по показаниям). Специальные методы: изучение экспрессии онкобелков p16ink4 $\alpha$ /Ki67 иммуноцитохимическим методом (ИЦХ), статуса метилирования гена WIF1 методом бисульфитного секвенирования, определение уровня экспрессии микроРНК (miR-92a, 22, 25) методом ПЦР. Исследование проводили на базе ФБГУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России в научно – поликлиническом отделении (заведующий – д.м.н., проф. Прилепская В.Н.); в лаборатории молекулярно–генетических методов (заведующий – д.б.н. Трофимов Д.Ю.); определение статуса метилирования гена WIF1 – в центре коллективного пользования “ГЕНОМ” на базе Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН; количественную экспрессию микроРНК – экспрессию онкобелков p16ink4 $\alpha$ /Ki67 – на кафедре патологической анатомии им. академика А.И. Струкова ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (заведующий – д.м.н., проф. Коган Е.А.).

Статистическая обработка выполнена с помощью специализированного программного обеспечения SPSS 22.0 («IBM», США). Соответствие данных нормальному распределению подтверждено критерием Колмогорова – Смирнова. Достоверность различий средних рассчитывалась с использованием t-критерия Стьюдента, а при множественных сравнениях – критерия Ньюмена-Кейлса и Даннета. Среди непараметрических методов использовали U-критерия Манна – Уитни. Для нахождения зависимостей между нормально распределенными

количественными признаками - корреляционный анализ по методу Пирсона. Оценку качества моделей проводили с помощью ROC-анализа.

#### Положения, выносимые на защиту

1. В структуре плоскоклеточных интраэпителиальных поражений (SIL) шейки матки преобладают 16, 33, 31, 18 генотипы ВПЧ вне зависимости от возраста женщины. Частота выявления высокоонкогенных генотипов ВПЧ (среди которых доминирует 16 генотип) и показатель вирусной нагрузки возрастают со степенью тяжести плоскоклеточных интраэпителиальных поражений шейки матки.

2. Использование комплекса методов диагностики - жидкостная цитология, метод двойного иммуноокрашивания p16ink4 $\alpha$ /Ki67, ВПЧ – тестирование повышает эффективность ранней диагностики поражений шейки матки и позволяет дифференцировать SIL и SCC.

3. Гиперметилирование промоторного участка гена WIF1 выявляется у всех женщин с SIL и плоскоклеточным раком шейки матки, достоверно увеличиваясь в зависимости от степени тяжести SIL ( $p < 0,001$ ). Высокая чувствительность (100%) и специфичность (84,3%) показателя аномального метилирования гена WIF1 позволяет использовать его в качестве неинвазивного маркера ранней диагностики и прогнозирования тяжести SIL и рака шейки матки.

4. Для плоскоклеточных интраэпителиальных поражений шейки матки (LSIL/HSIL) и SCC характерно снижение уровня экспрессии miR-22 в 2 раза.

При HSIL и SCC отмечается повышение уровня экспрессии miR-92a в 3 и более раз. Изменение экспрессии микроРНК (miR-92a, miR-22) и аномальное метилирование гена WIF1 является общим молекулярным механизмом канцерогенеза шейки матки.

#### Апробация результатов

Диссертационная работа обсуждена на межклинической конференции 06.09.2017 и на заседании апробационной комиссии ФБГУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России (25.09.2017, протокол №11).

Основные положения диссертации и результаты работы представлены и доложены на IX Региональном научном форуме «Мать и Дитя» (Сочи, 28-30 июня 2016), XVII Всероссийском научно-образовательном форуме «Мать и Дитя» (Москва, 27–30 сентября 2016), I Национальном научно-образовательном конгрессе «Онкологические проблемы от менархе до постменопаузы» (Москва, 13-15 февраля 2017), XXIII Всероссийском конгрессе с международным участием «Амбулаторно-поликлиническая помощь в эпицентре женского здоровья» (Москва, 04 - 06 апреля 2017), XXX Юбилейном Международном конгрессе с курсом эндоскопии «Новые технологии в диагностике и лечении гинекологических заболеваний» (Москва, 06–09 июня 2017), X Юбилейном региональном научно-образовательном форуме и Пленуме Правления Российского общества акушеров-гинекологов «Мать и Дитя» (Геленджик 28-30 июня 2017), XVIII Всероссийском научно-образовательном форуме «Мать и Дитя» (Москва, 27 – 29 сентября 2017), Eurogin «International Multidisciplinary HPV Congress» (Нидерланды, Амстердам 8-11 октября 2017 ), XXIV Всероссийском Конгрессе с международным участием и специализированной выставочной экспозицией «Амбулаторно-поликлиническая помощь: проблемы, достижения, перспективы» (Москва, 4–6 апреля 2018).

#### Внедрение результатов исследования в практику

Разработанный алгоритм диагностики плоскоклеточных интраэпителиальных поражений шейки матки используется в практической деятельности научно-поликлинического отделения ФБГУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России.

#### Публикации

По теме диссертации опубликовано 12 научных трудов, в том числе 7 – в рецензируемых научных изданиях.

#### Структура и объем диссертации

Работа изложена на 145 страницах и состоит из введения, 4 глав, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Список литературы состоит из

227 источников, в т.ч. 62 российских и 165 зарубежных авторов. Диссертация включает 40 таблиц, проиллюстрирована 26 рисунками.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Материал исследования

В период с января 2014 г. по май 2016 г. обследованы 220 женщин, обратившихся в научно–поликлиническое отделение ФБГУ «НЦАГиП им. В.И. Кулакова» Минздрава России для лечения ВПЧ – ассоциированной патологии шейки матки.

Основными критериями отбора пациенток явилось наличие SIL шейки матки и возраст женщин (21 – 49 лет).

1 этап – исследовательский, заключался в проведении одномоментного исследования в параллельных группах. Первичная верификация диагноза основывалась на результатах жидкостной цитологии. В исследование были включены 220 пациенток.

Основные группы составили:

1 группа – 75 женщин в возрасте 21 – 29 лет (средний возраст  $25,7 \pm 2,2$  лет) с цитологическим заключением LSIL/HSIL (37 с LSIL и 38 с HSIL);

2 группа – 75 женщин в возрасте 30 – 49 лет (средний возраст  $39,2 \pm 7,8$  лет) с цитологическим заключением LSIL/HSIL (37 с LSIL и 38 с HSIL).

В группу сравнения были включены 70 женщин с цитологическим результатом – NILM: 35 женщин в возрасте 21 – 29 лет (средний возраст  $25,7 \pm 2,6$  лет) и 35 в возрасте 30 – 49 лет (средний возраст  $35,9 \pm 5,0$  лет).

2 этап – молекулярно – генетический. Для выполнения данного этапа была сформирована дополнительная группа, состоящая из женщин с плоскоклеточным раком шейки матки.

В исследование были включены 101 пациентка: 1 группа – 31 пациентка с LSIL, 2 группа – 26 пациенток с HSIL, 3 группа – 12 пациенток с SCC, 4 группа – 32 пациентки с NILM. Средний возраст пациенток составил  $32,7 \pm 0,5$  лет. Окончательный диагноз верифицировался гистологическим методом.

Критерии включения в основные группы: возраст 21 – 49 лет, SIL шейки матки, подтвержденные данными цитологического исследования, способность выполнять требования протокола, подписанное информированное согласие на участие в исследовании.

Критерии исключения: беременность, послеродовой период и лактация, психические нарушения, глубокая инвалидизация, отсутствие возможности следования протоколу.

Критерии включения в группу сравнения: возраст 21 – 49 лет, отсутствие SIL шейки матки, подписанное информированное согласие на участие в исследовании.

Критерии исключения: беременность, период лактации, отсутствие возможности следования протоколу.

#### Результаты исследований и их обсуждение

Анализ клинико – анамнестических данных пациенток всех групп не выявил достоверных различий по возрасту, менструальной функции, акушерскому анамнезу и соматической заболеваемости. Однако при изучении структуры гинекологической патологии в анамнезе у пациенток с SIL шейки матки достоверно чаще выявлялись ВПЧ – ассоциированные заболевания гениталий представленных в основном в виде остроконечных кондилом вульвы и влагалища ( $p < 0,05$ ).

С целью изучения распространенности генотипов ВПЧ у пациенток различного возраста с SIL шейки матки и их связи с развитием цервикальных поражений всем пациенткам ( $n=220$ ) проводилось ВПЧ – генотипирование и определение вирусной нагрузки.

По результатам исследования распространенность ВПЧ в 1 группе пациенток  $< 30$  лет составила: при LSIL – 59,5%, при HSIL – 86,8% ( $p < 0,05$ ); у пациенток 2 группы  $\geq 30$  лет при LSIL – 56,7%, при HSIL – 81,6% ( $p < 0,05$ ).

Полученные результаты свидетельствуют о корреляции между распространенностью ВПЧ и тяжестью SIL шейки матки вне зависимости от возраста пациенток ( $p < 0,05$ ) (рис.1.) и сопоставимы с данными, полученными другими авторами (Zhang R., Qingqing B. et al., 2017).

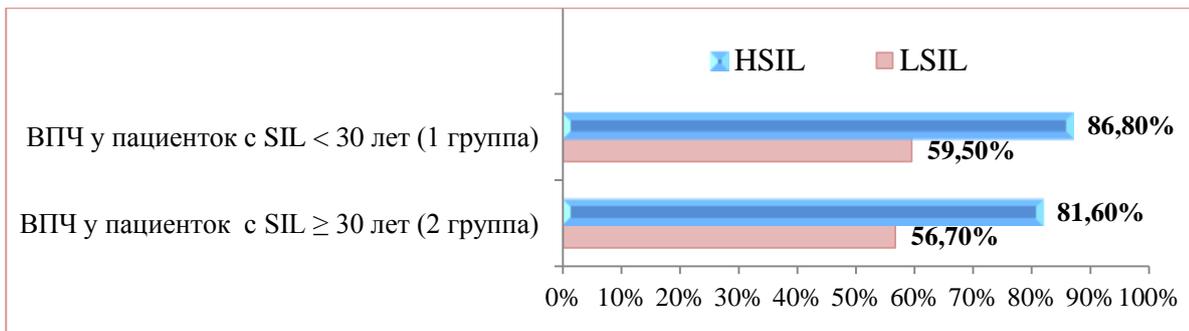


Рисунок 1. Распространение ВПЧ у пациенток с SIL шейки матки

Наиболее часто встречаемые ВПЧ у пациенток с SIL (n=150) являлись 16, 33, 31 и 18 генотипы (6,7 – 38,7%), обладающие высокоонкогенным потенциалом. Остальные генотипы ВПЧ встречались менее 5,0%.

У пациенток 1 группы с SIL (<30 лет) ВПЧ 16 генотипа выявлялся – 38,7%, 33 (18,7%), 31 (13,3%), 18 (10,7%). В контрольной группе (<30 лет) выявляемость различных генотипов составила: ВПЧ 16 (25,7%), 33 (0,0%), 31 (2,9%), 18 (2,9%) (рис. 2.).

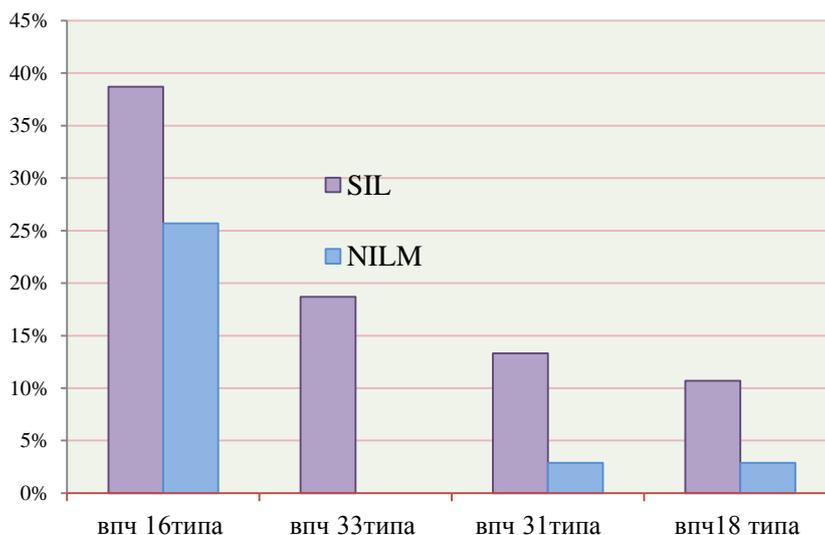


Рисунок 2. Распределение генотипов ВПЧ у пациенток с SIL/NILM <30 лет

У пациенток 2 группы с SIL (≥30 лет) ВПЧ 16 генотипа выявлялся – 37,3%, 33 (12,0%), 31 (9,3%), 18 (2,6%). В контрольной группе (≥30 лет) выявляемость различных генотипов составила: ВПЧ 16 (10,5%), 33 (5,3%), 31 (2,6%), 18 (2,6%) (рис.3.).

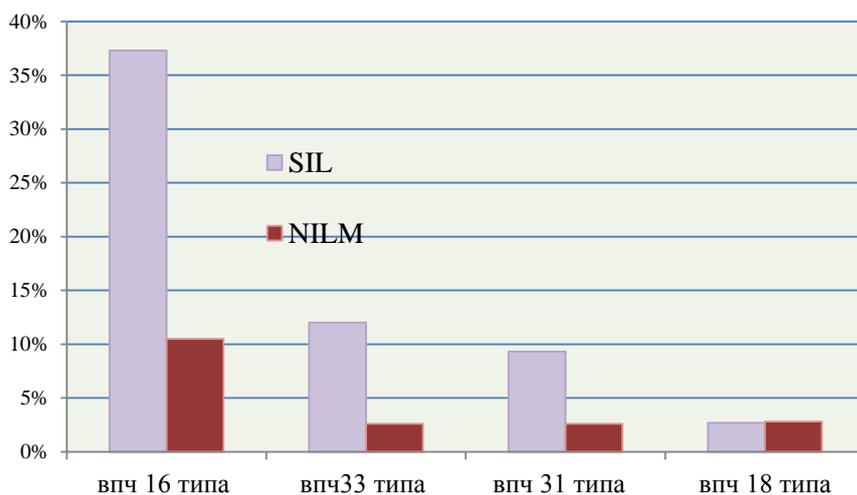


Рисунок 3. Распределение генотипов ВПЧ у пациенток с SIL/NILM $\geq$ 30 лет

Сравнительный анализ частоты выявляемости высокоонкогенных генотипов ВПЧ (16, 18, 31, 33) при LSIL/HSIL и NILM во всех исследуемых группах показал, что частота их выявления не имела достоверных различий среди пациенток с цитологическим заключением NILM и пациентками с LSIL ( $p>0,05$ ). Однако частота выявляемости значительно возрастала у пациенток с HSIL при этом достоверно чаще, выявлялся ВПЧ 16 генотипа – у 70 (31,8%) обследованных пациенток ( $p<0,05$ ). У пациенток с LSIL ВПЧ 16 генотипа определялся в 1,4 раза чаще (25,7%) по сравнению с пациентками с NILM (18,5%) ( $p>0,05$ ) и в 2,7 раза (50,0%) при HSIL ( $p<0,05$ ). Полученные данные свидетельствуют о том, что частота выявления ДНК ВПЧ и их онкогенный потенциал коррелирует с тяжестью SIL шейки матки независимо от возраста женщины.

Анализ показателей средней вирусной нагрузки ВПЧ у пациенток в возрасте до 30 лет и старше, свидетельствуют о достоверно более высоких ее значений у пациенток с HSIL по сравнению с пациентками с LSIL, вне зависимости от возраста ( $p<0,05$ ) (табл.3).

Таблица 3. Показатели вирусной нагрузки у пациенток с SIL (lg копий ДНК ВПЧ на 100 тысяч клеток).

Цитологическое заключение	Пациентки < 30 лет	Пациентки ≥30 лет
LSIL	4,55±1,57	4,51±1,51
HSIL	5,59±1,63	5,93±0,83
NILM	4,35±1,72	4,08±1,75

Полученные результаты свидетельствуют о том, что вирусная нагрузка коррелирует с цитологическими изменениями эпителия шейки матки и была достоверно выше у пациенток с HSIL. Мы полагаем, что вирусную нагрузку в сочетании с ВПЧ – генотипированием можно рассматривать как маркер тяжести SIL вне зависимости от возраста пациенток.

Расширенная кольпоскопия. Проведенный анализ кольпоскопической картины в зависимости от степени тяжести SIL шейки матки выявил, что вне зависимости от возраста, слабовыраженные изменения эпителия шейки матки (тонкий ацетобелый эпителий (АБЭ)) достоверно чаще выявлялся у пациенток с LSIL, выраженные изменения (плотный АБЭ, грубая мозаика/пунктация) у пациенток с HSIL ( $p < 0,05$ ). При сравнении других показателей достоверных различий выявлено не было ( $p > 0,05$ ). Таким образом, в результате исследования было установлено, что выраженность кольпоскопических изменений эпителия шейки матки (АБЭ, мозаика, пунктация) вне зависимости от возраста достоверно коррелирует с цитологическими изменениями LSIL и HSIL ( $p < 0,05$ ).

#### Результаты экспрессии онкобелка p16ink4α и маркера пролиферации Ki67

На втором этапе исследования в рамках проведенной работы была изучена экспрессия онкобелка p16ink4α и маркера пролиферации Ki67 у пациенток с SIL и плоскоклеточным раком шейки матки (SCC) - ИЦХ методом. Степень экспрессии определяли в процентах окрашенных клеток к общему числу клеток в поле зрения. Результаты исследования представлены в таблице 4 и на рис.1.

Таблица 4. Результаты экспрессии онкобелка p16ink4α и маркера пролиферации Ki67 у пациенток с SIL и SCC

Гистологическое заключение	Показатель экспрессии	
	p16ink4α (%)	Ki67(%)
LSIL	27,2	11,6
HSIL	58,9	30,7
SCC	90,0	78,3
NILM	0,72	8,2

Полученные результаты сопоставимы с результатами исследования Kanthiya K и соавт. (2016), которые рассматривают экспрессию p16ink4α и Ki67 в качестве маркера дифференциальной диагностики степени тяжести цервикальных поражений ассоциированных с ВПЧ.

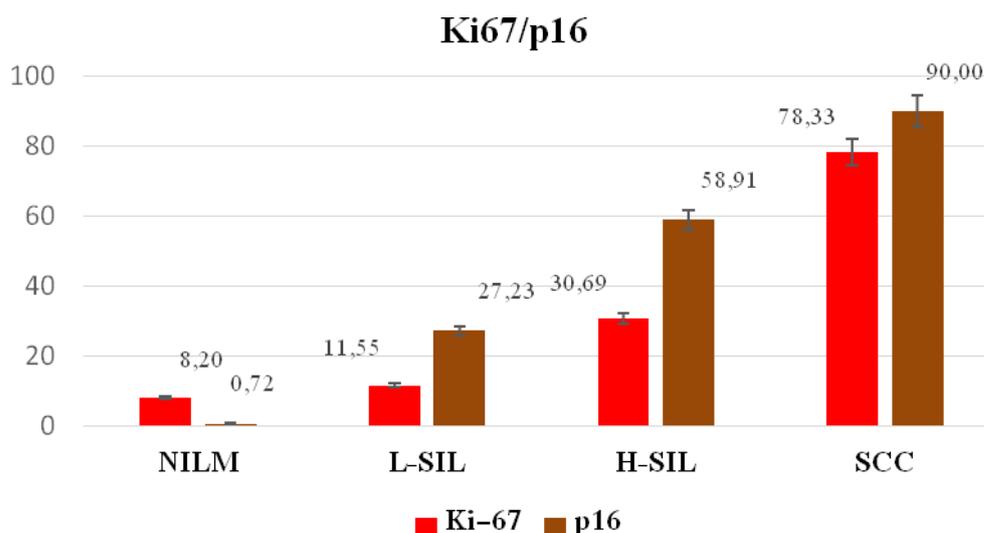


Рисунок 4. Экспрессия p16ink4α/Ki67 в эпителии слизистой шейки матки у пациенток с SIL и SCC.

Проведенный ROC - анализ позволил определить диагностическую чувствительность и специфичность p16ink4α и Ki67 для диагностики SIL и рака шейки матки. Так, для p16ink4α чувствительность составила 97,4%, специфичность 76,8%. Для маркера пролиферации Ki67 чувствительность – 100%, специфичность 92,8% (рис.5).

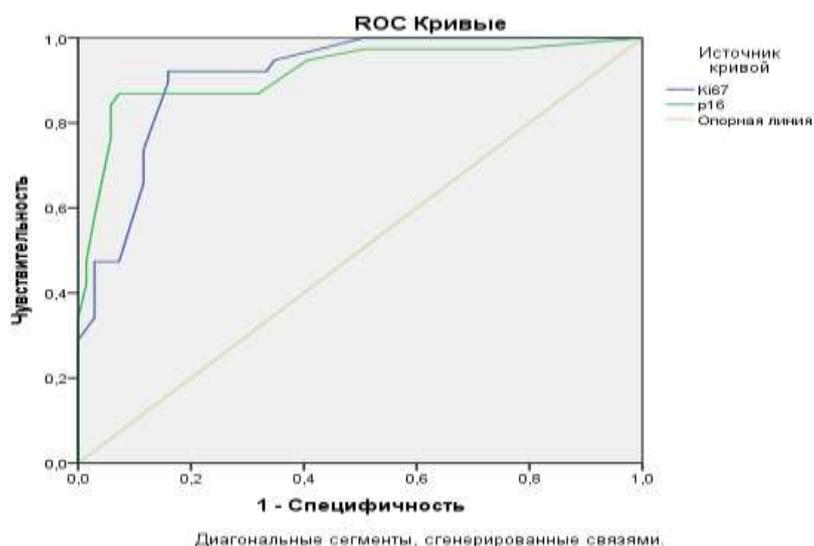


Рисунок 5. ROC кривые для метода двойного иммуноокрашивания цитологических препаратов (ИЦХ) с использованием антител p16ink4 $\alpha$  и Ki67

На следующем этапе работы определяли чувствительность и специфичность жидкостной цитологии, коэкспрессии p16ink4 $\alpha$ /Ki67 и ВПЧ – тестирования Cobas 4800(табл.5).

Таблица 5. Чувствительность и специфичность методов: жидкостной цитологии, двойного окрашивания p16ink4 $\alpha$ /Ki67, ВПЧ-теста Cobas 4800 при SIL и раке шейки матки

Метод исследования	Чувствительность метода(%)	Специфичность метода(%)
Жидкостная цитология	83,4	96,4
p16ink4 $\alpha$ /Ki67(ИЦХ)	98,5	100
ВПЧ-тест Cobas 4800	94,2	78,1

Установлено, что двойное окрашивание p16ink4 $\alpha$ /Ki67 является наиболее эффективным методом для выявления SIL и рака шейки матки, в виду его высокой диагностической чувствительности и специфичности по сравнению с жидкостной цитологией и ВПЧ – тестом. Преимуществом двойного окрашивания p16ink4 $\alpha$ /Ki67 является возможность определения не только присутствия вируса, но и изменений, произошедших в клетках эпителия шейки матки под его воздействием.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что детекция онкобелков p16ink4 $\alpha$ /Ki67 при ВПЧ – ассоциированных заболеваниях шейки матки зависит от степени тяжести SIL. Выявление коэкспрессии p16ink4 $\alpha$ /Ki67 в эпителии шейки матки, даже в незначительных количествах, свидетельствуют об инициации канцерогенеза, что позволяет использовать данный критерий в качестве прогностического маркера SIL и SCC.

Молекулярно – генетический этап исследования был ориентирован на исследованиях ведущих отечественных и зарубежных ученых.

Для исследования были отобраны микроРНК (табл.6) и ген метилирования WIF1, изменения экспрессии которых, могут быть ответственны за возникновение как предраковых поражений, так и рака шейки матки. Кроме того, показатель экспрессии, возможно, использовать в качестве неинвазивного предиктора диагностики и прогнозирования заболевания.

#### Результаты экспрессии микроРНК у пациенток с SIL и SCC

Таблица 6. Описание микроРНК исследуемых в работе

МикроРНК	Сокращенное название	ID	Нуклеотидная последовательность
has-mir-22-3p	miR-22	000398	5'-aagcugccaguugaagaacugu-3'
has-mir-25-3p	miR-25	000403	5'-cauugcacuugucucggucuga-3'
has-mir-92a-5p	miR-92a	2137	5'-agguugggaucgguugcaaugcu-3'

По результатам молекулярно-генетического исследования выявлено, снижение уровня экспрессии miR-22 более чем в 2 раза у пациенток с LSIL/HSIL и SCC ( $p < 0,05$ ), однако достоверной зависимости от степени тяжести процесса установлено не было ( $p > 0,05$ ). Уровень экспрессии miR-92a при HSIL и SCC по сравнению с контрольной группой был повышен в 3 и более раза ( $p < 0,05$ ), в то время как при LSIL экспрессия miR-92a в шеечном эпителии практически не отличалась от экспрессии при норме ( $p > 0,05$ ). Также выявлена тенденция к повышению экспрессии miR-25 при SIL, однако достоверных статистических различий по сравнению с нормой выявлено не было ( $p > 0,05$ ) (табл.7).

Таблица 7. Уровень экспрессии микроРНК в эпителии шейки матки в норме, при SIL и SCC

МикроРНК	Группы	Изменение экспрессии МикроРНК по отношению к NILM	p <sub>1</sub>	p <sub>2</sub>
mir-22	NILM			
	LSIL	-2,5	<0,001	
	HSIL	-2,3	<0,001	
	SCC	-2,3	0,04	>0,05
mir-25	NILM			
	LSIL	+1,1	>0,05	
	HSIL	+1,4	>0,05	
	SCC	+1,3	>0,05	>0,05
mir-92a	NILM			
	LSIL	+1,3	>0,05	
	HSIL	+3,0	<0,001	
	SCC	+3,3	0,002	>0,05

Примечание: p<sub>1</sub> – достоверность по отношению к NILM; p<sub>2</sub> – достоверность по отношению к HSIL.

Оценивалась возможность применения изменений профиля экспрессии микроРНК в клетках шеечного эпителия для диагностики SIL и SCC при помощи ROC - анализа (табл. 8). Результаты анализа показали, что диагностическая чувствительность miR-22 для диагностики SIL и SCC составила 81,3%, специфичность 65,1% (отношение шансов – 8 p<0,001), для miR-92a – 54,8% и 71,4% соответственно (отношение шансов – 7,08 p<0,001).

Таблица 8. Данные логистического регрессионного анализа ROC-кривой; сравнения уровней экспрессии в норме и неоплазии шейки матки (H+L+C)

МикроРНК	Площадь под кривой	Уровень отсечки (у.е.)	Чувств-сть (%)	Спец-сть (%)	Диагности-ческая точность (%)	Отношение шансов (доверительный интервал)	P
mir-22	0,755	2,55	81,3	65,1	73,2	8,0 (2,66-27,1)	<0.001
mir-92a	0,718	0,018	58,4	84,4	71,4	7,08 (2,43-28,35)	<0.001

По результатам ROC - анализа точность диагностики SCC была одинаково высокой как при оценке показателя уровня экспрессии miR-22 (82,3%), так и miR-

92a (85,4%). При уровне экспрессии miR-22 выше 2,55 у.е. чувствительность составила 81,3%, специфичность – 83,35% (отношение шансов – 21,67 p=0,005). Несколько большая точность диагностики SCC выявилась при оценке уровня экспрессии miR-92a, при уровне экспрессии выше 0,018 у.е. чувствительность составила 83,3%, специфичность – 87,5% (табл.9).

Таблица 9. Данные логистического регрессионного анализа ROC-кривой сравнения уровней экспрессии микроРНК в норме и SCC

МикроРНК	Площадь под кривой	Уровень отсечки (у.е.)	Чувств-сть (%)	Спец-сть (%)	Диагности-ческая точность (%)	Отношение шансов (доверительный интервал)	p
mir-22	0,766	2,55	81,3	83,3	82,3	21,67 (1,75-1062,2)	0,005
mir-92a	0,833	0,018	83,3	87,5	85,4	27,0 (2,08-1321,6)	0,0026

Проведение логистического регрессионного анализа ROC – кривой показало также возможность дифференцировать SCC от HSIL (табл. 9). При уровне экспрессии miR-22 ниже 2,07 у.е. диагноз SCC может быть поставлен с чувствительностью 87,5% и специфичностью 53,8% (отношение шансов – 8,17 p=0,001). При уровне экспрессии miR-92a выше 0,02 у.е. отношение шанса правильной дифференциальной диагностики между SCC и HSIL составил 19,0 (p<0,001), чувствительность и специфичность диагностики 73,1% и 87,5% соответственно.

Таблица 9. Данные логистического регрессионного анализа ROC-кривой, сравнения уровней экспрессии микроРНК при HSIL и SCC

МикроРНК	Площадь под кривой	Уровень отсечки (у.е.)	Чувств-сть (%)	Спец-сть (%)	Диагности-ческая точность (%)	Отношение шансов (доверительный интервал)	P
mir-22	0,692	2,07	87,5	53,8	70,6	8,17 (1,95-39,72)	<0,001
mir-92a	0,805	0,02	73,1	87,5	80,3	19,0 (4,21-96,28)	<0,001

Результаты исследования показали, что изменения профилей экспрессии микроРНК (miR-22 и miR-92a) позволяют с высокой точностью дифференцировать SIL и SCC.

#### Результаты аномального метилирования гена WIF1 при SIL и SCC

После отбора образцов клеток цервикального канала был выделен 101 образец ДНК, которые в дальнейшем были подвергнуты бисульфитной конверсии.

В образцах ДНК тканей пациенток с LSIL, HSIL и SCC аномальное метилирование промоторного участка гена WIF1 было обнаружено у всех пациенток. У женщин с диагнозом LSIL количество аномально метилированных сайтов промоторного участка гена WIF1 составило 32,9%, с HSIL 54,1%, с SCC 75,2%, при NILM 2,2% (рис. 6).

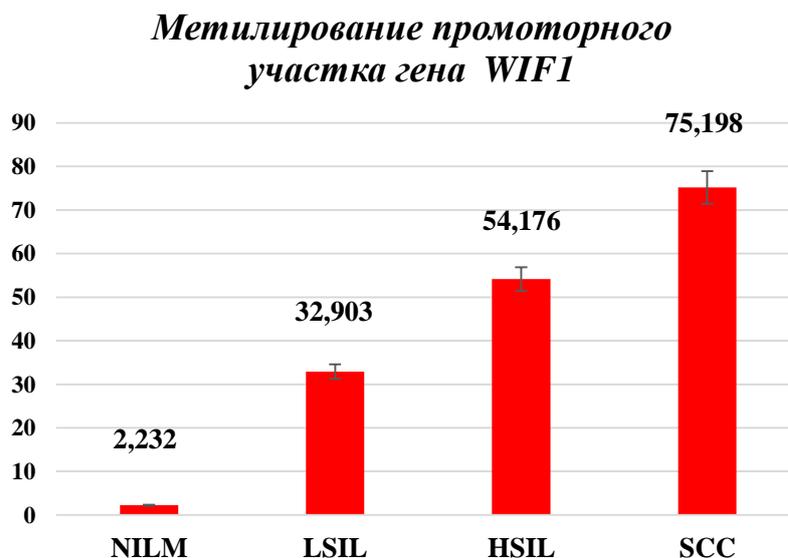


Рисунок 6. Уровень метилирования промоторного участка гена WIF1(%).

Для сравнения уровня аномального метилирования в группах NILM, LSIL, HSIL и SCC была построена диаграмма размаха (рис. 7). Достоверность различий определяли с помощью U-критерия Манна-Уитни с поправкой Бонферрони для множественных сравнений.

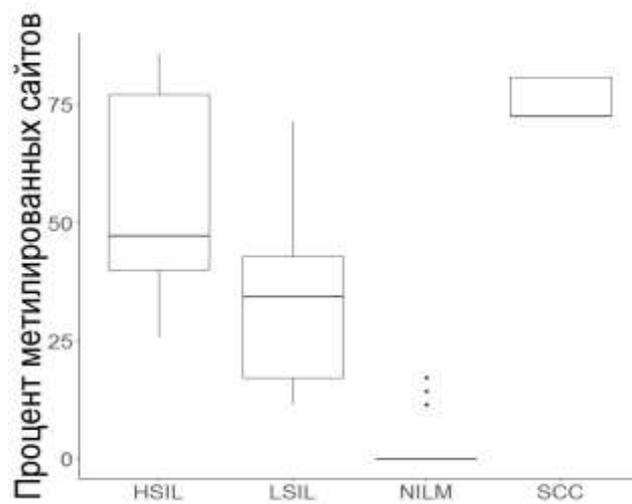


Рисунок 7. Диаграмма размаха уровня метилирования в различных группах пациентов

Во всех группах уровень метилирования промоторной области гена WIF1 статистически значимо отличался ( $p < 0,001$ ). Так, для NILM и LSIL  $p = 1,11 \times 10^{-11}$ , для NILM и HSIL  $p = 1,5 \times 10^{-12}$ , для NILM и SCC  $p = 4,7 \times 10^{-8}$ , для LSIL и HSIL  $p = 4,39 \times 10^{-7}$ , для HSIL и SCC  $p = 0,008$ . Выявленные закономерности позволяют с высокой точностью дифференцировать степень тяжести цервикальных поражений ассоциированных с ВПЧ.

Следует отметить, что распределение пациентов по количеству сайтов метилирования во всех группах существенно отличалось от нормального (рис.8). При этом распределения были бимодальными, что по нашему мнению может свидетельствовать о наличии нескольких подгрупп (с разной степенью риска прогрессии заболевания) в каждой группе. Однако, для подтверждения данной гипотезы необходимо проведение дополнительных ретроспективных исследований.

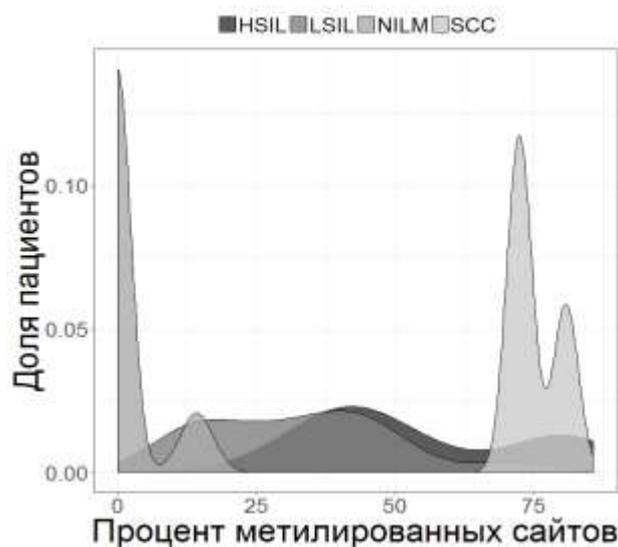


Рисунок 8. Диаграмма распределения уровня метилирования в различных группах пациенток

С целью изучения возможности применения уровня метилирования промоторной области гена WIF1 для диагностики SIL, в том числе и рака, был проведен ROC – анализ. Результаты анализа показали, что диагностическая чувствительность составила 100 %, а специфичность 84,3%.  $AUC = 0,923$   $p = 0,0001$  (рис. 9).

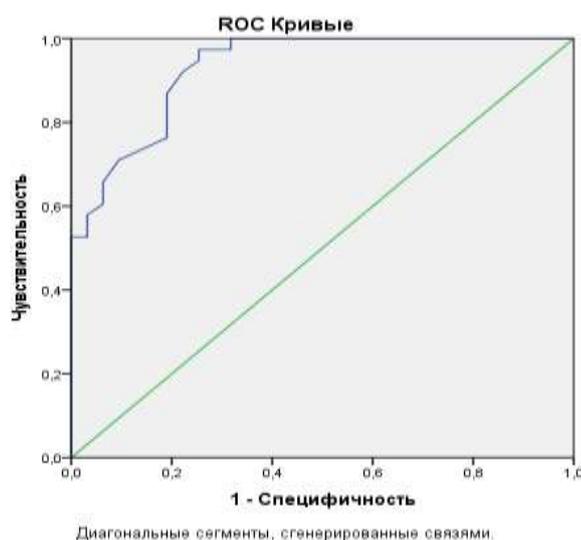


Рисунок 9. ROC- кривая для метода метилирования промотора гена WIF1

Мы полагаем, что внедрение в клиническую практику современного, высокоэффективного неинвазивного метода «определения статуса метилирования гена WIF1» является обоснованным в качестве дополнительного инструмента для

объективизации морфологической картины, точного определения степени поражений шейки матки, дифференциальной диагностике между предраком и раком шейки матки с последующим выбором адекватной тактики ведения пациенток.

Корреляционный анализ проводили с целью выявления взаимосвязи между результатами вышепредставленных методов диагностики SIL и SCC с гистологическим результатом (методом Пирсона).

Корреляционный анализ выявил прямую взаимосвязь между результатами экспрессии p16ink4 $\alpha$  и Ki67 с гистологическим результатом (для p16ink4 $\alpha$  r-Пирсона = + 0,83;  $p=1,8\times 10^{-29}$ , для Ki67r- Пирсона = + 0,7;  $p=4,75\times 10^{-17}$ ). Также установлена, достоверная корреляционная связь между p16ink4 $\alpha$  и Ki67 (r-Пирсона = + 0,72;  $p=1,55\times 10^{-18}$ ), что подтверждает возможность использования их для диагностики SIL и рака шейки матки. Кроме этого была выявлена прямая корреляционная связь между уровнем аномального метилирования гена WIF1 и гистологическим результатом (r- Пирсона = + 0,8;  $p=7,0\times 10^{-33}$ ) (рис. 10), что позволяет использовать метод в комплексе диагностики предрака и рака шейки матки.

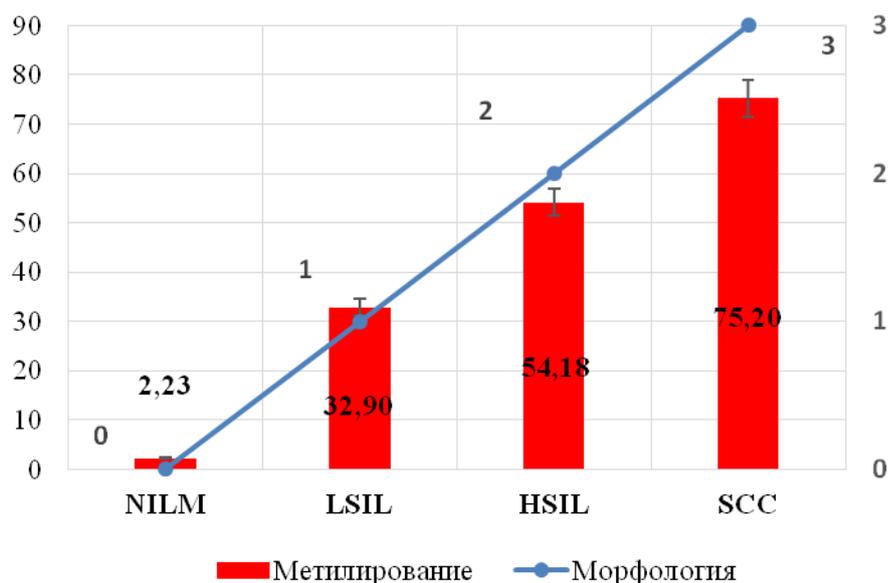


Рисунок 10. Корреляция результатов метилирования гена WIF 1 и гистологического исследования у пациенток с SIL и SCC

Корреляционный анализ результатов экспрессии уровня микроРНК (miR-22, miR-25, miR-92a) и результатом гистологического исследования выявил достоверную корреляционную связь, только между miR-92a ( $r$ -Пирсона = + 0,27;  $p=0,007$ ), между miR-22 и miR-25 достоверной корреляционной зависимости установлено не было ( $p>0,05$ ). Полученные данные свидетельствуют о возможности использования miR-92a в комплексе диагностики предрака и рака шейки матки.

Проведенный корреляционный анализ между показателями экспрессии онкобелка p16ink4a и маркером пролиферации Ki67, уровнем аномального метилирования гена WIF1 и экспрессией микроРНК не установил достоверных корреляционных значений ( $p>0,05$ ).

Отсутствие достоверной корреляционной зависимости между результатами данных методов исследований можно объяснить тем, что они отражают совокупность разных сторон биологических процессов, происходящих в клетке под воздействием вируса папилломы человека.

#### ВЫВОДЫ:

1. У женщин с SIL в возрасте до 30 лет и старше отсутствуют достоверные различия по выявленным генотипам ВПЧ, наиболее часто выявлялись 16, 33, 31 и 18 генотипы. Частота выделения ДНК ВПЧ достоверно коррелирует со степенью тяжести SIL: LSIL 58,1%, HSIL 84,2%. При этом вирусная нагрузка возрастает пропорционально степени тяжести SIL и может рассматриваться в качестве диагностического маркера вне зависимости от возраста пациенток.

2. Кольпоскопические изменения эпителия шейки матки в виде плотного ацетобелого эпителия, грубой мозаики и/или грубой пунктации коррелируют с результатами жидкостной цитологии и ВПЧ – тестирования у пациенток с SIL и раком шейки матки. Выраженные кольпоскопические изменения шейки матки, достоверно чаще встречались у пациенток с тяжелыми плоскоклеточными интраэпителиальными поражениями (HSIL), при этом достоверно чаще выявлялись высокоонкогенные генотипы ВПЧ.

3. Комплексное использование жидкостной цитологии, метода двойного окрашивания p16ink4α/Ki67 и ВПЧ – тестирования качественно повышают эффективность ранней диагностики SIL и SCC и в совокупности обладают высокой диагностической чувствительностью – 93,0% и специфичностью – 91,5%. Наиболее информативным методом для выявления SIL и SCC является коэкспрессия p16ink4α/Ki67: диагностическая чувствительность – 98,5%, специфичность – 100% по сравнению с жидкостной цитологией и ВПЧ – тестом.

4. Уровень метилирования промоторного участка гена WIF1 коррелирует со степенью тяжести SIL и SCC, составляя у пациенток с LSIL 32,9%, HSIL 54,1%, SCC 75,2%, NILM 2,2%. Показатель аномального метилирования гена WIF1 позволяет с высокой точностью дифференцировать различную тяжесть поражения шейки матки, повышая эффективность ранней диагностики SIL шейки матки и лечения. Оценка статуса метилирования гена WIF1 может рассматриваться как потенциальный диагностический и прогностический маркер канцерогенеза шейки матки.

5. У пациенток с SIL и SCC изменяются уровни экспрессии микроРНК, проявляющиеся в достоверном снижении экспрессии miR-22 при LSIL/HSIL и SCC и в повышении экспрессии miR-92a при HSIL и SCC, что является основанием для использования их в качестве дополнительных диагностических маркеров SIL и рака шейки матки

### ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для выбора тактики ведения пациенток с цитологическим результатом SIL шейки матки вне зависимости от возраста необходимо проводить генотипирование вируса папилломы человека и определение вирусной нагрузки.

2. Для дифференциальной диагностики доброкачественных заболеваний шейки матки (гиперпластических, метапластических процессов) и SIL рекомендован иммуноцитохимический метод с определением коэкспрессии онкобелков p16ink4α и Ki67.

3. Для улучшения ранней диагностики SIL шейки матки разной степени тяжести эффективным является комплексное использование современных неинвазивных методов диагностики (жидкостная цитология, ВПЧ – генотипирование с определением вирусной нагрузки, определение экспрессии онкобелков p16ink4a и Ki67, расширенная кольпоскопия).
4. Для дифференциальной диагностики степени тяжести плоскоклеточных интраэпителиальных поражений шейки матки (LSIL, HSIL) и SCC (при неясной картине цитологического исследования) целесообразно определение уровня аномального метилирования гена WIF1.
5. С целью выявления плоскоклеточных интраэпителиальных поражений с высоким злокачественным потенциалом (HSIL) и плоскоклеточного рака шейки матки, в качестве дополнительных диагностических маркеров рекомендуется определение уровня экспрессии miR-92a и miR-22.
6. Диагностику SIL и SCC целесообразно проводить в соответствии с разработанным и представленным ниже алгоритмом (рис. 11).

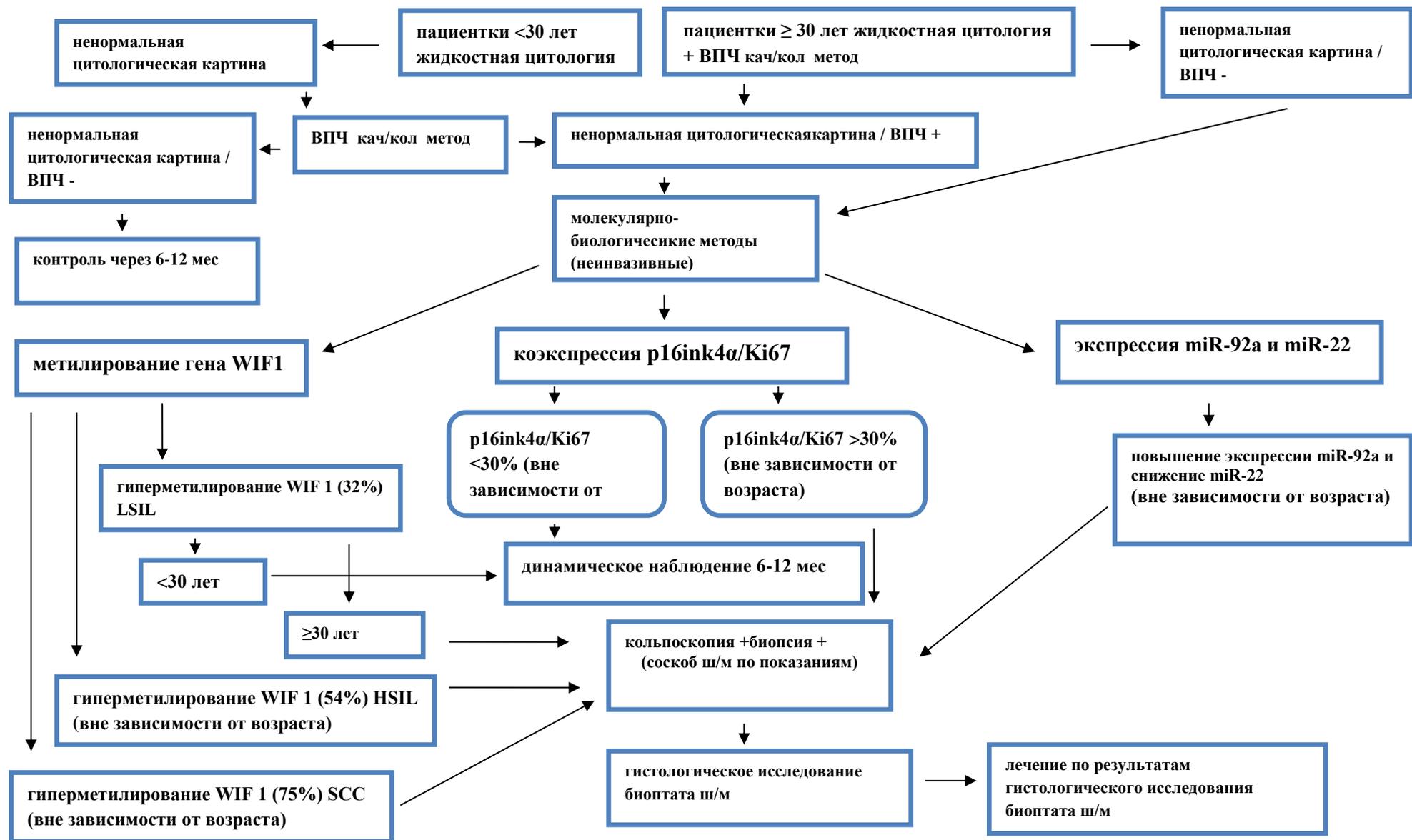


Рисунок 11. Алгоритм ранней диагностики SIL и SCC с использованием неинвазивных биомаркеров

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Ранняя диагностика ВПЧ - ассоциированной патологии шейки матки у женщин до 30 лет и старше / Е.А. Коган, Н.М. Файзуллина, Ц. Ли, Т.А. Демура, Г.Р. Байрамова, **В.Ф. Чернова** // **Акушерство и гинекология.** – 2015. – №9. – С. 62 - 67.
2. Новые возможности ранней диагностики и профилактики ВПЧ - ассоциированных поражений шейки матки / В.Н. Прилепская, Г.Р. Байрамова, Е.А. Коган, **В.Ф.Чернова** // **Медицинский совет** – 2015.– С. 72-76.
- 3.Экспрессия Микро-РНК при цервикальной интраэпителиальной неоплазии и раке шейки матки / Файзуллин Л.З., Карнаухов В.Н., Мзарелуа Г.М., **Чернова В.Ф** // **Акушерство и гинекология.** – 2015.– № 9.– С. 27-32.
4. Перспективы ранней диагностики и профилактики заболеваний, ассоциированных с папилломавирусной инфекции / Г.Р.Байрамова, Е.А. Коган, **В.Ф. Чернова** // **Заболевания шейки матки и генитальные инфекции /** Под ред. В.Н. Прилепской. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2016. – С. 109-116.
5. Экспрессия miR-29b в эпителии шейки при цервикальных интраэпителиальных неоплазиях / Файзуллин Л.З., Карнаухов В.Н., Байрамова Г.Р., **Чернова В.Ф.**, Мзарелуа Г.М., Чаусов А.А., Назарова Н.М., Трофимов Д.Ю.// **Акушерство и гинекология.** – 2016.– № 2. – С. 87-90.
6. Метилирования гена WIF 1 при цервикальных плоскоклеточных интраэпителиальных поражениях / Г.Т. Сухих, Л.А. Ашрафян, Г.Р. Байрамова, И.О. Бабкина, **В.Ф. Чернова**, А.И. Осипьянц, А.И. Королькова, А.А. Полозников., Г.Р. Асфарова, С.М. Муллабаева, Е.А. Коган., Е.Л. Муйжнек, В.М. Друх, В.И. Киселев // **Акушерство и гинекология.** – 2017.– №5.– С. 114-123.
7. Диагностика плоскоклеточных интраэпителиальных поражений и рака шейки матки на основании количественной оценки экспрессии микроРНК / **Чернова В.Ф.**, Карнаухов В.Н., Файзуллин Л.З., Байрамова Г.Р.,

Коган Е.А., Мзарелуа Г.М., Назарова Н.М., Трофимов Д.Ю., Прилепская В.Н., Сухих Г.Т. // **Акушерство и гинекология.** – 2017.– №9. – С. 78-84.

8. Экспрессия микроРНК в ранней диагностике плоскоклеточных интраэпителиальных поражений шейки матки / **Чернова В.Ф.**, Прилепская В.Н., Байрамова Г.Р., Файзуллин Л.З., Коган Е.А. // **Мать и дитя: Материалы XVIII Всероссийского научно-образовательного форума.** – М., 2017.– С. 161-162.

9. Экспрессия МикроРНК при цервикальной неоплазии и раке шейки матки / **Чернова В.Ф.**, Карнаухов В.Н., Файзуллин Л.З., Прилепская В.Н., Байрамова Г.Р. // **Амбулаторно-поликлиническая помощь в эпицентре женского здоровья: материалы XXIII Всероссийского конгресса с международным участием.** – М., 2017. – С. 78-79.

10. Заболевания нижних отделов гениталий, ассоциированных с папилломавирусной инфекцией: радикальное лечение или иммунотерапия? / Байрамова Г.Р., Баранов И.И., Арсланян А.С., Амирханян А.С., **Чернова В.Ф.** // **Акушерство и гинекология: новости, мнения, обучение.** – 2017. – №4. - С. 13– 18.

11. Результаты ВПЧ-генотипирования у пациенток с цервикальными поражениями шейки матки в возрасте до 30 лет и старше / Байрамова Г.Р., **Чернова В.Ф.**, Амирханян А.С., Прилепская В.Н. // **Амбулаторно-поликлиническая помощь: проблемы, достижения, перспективы: материалы XXIV Всероссийского конгресса с международным участием.** – М., 2018.– С.– 8– 9.

12. WIF 1 gene methylation and microRNA expression in diagnosis of HPV-associated squamous cervical cancer / G.T. Sukhikh, V.I. Kiselev, L.A. Ashrafyan, V.N. Prilepskaya, G.R. Bayramova, E.A. Kogan, L.Z. Fayzullin, A.A. Poloznikov, L.S. Ezhova, **V.F. Chernova** // Eurogin «International Multidisciplinary HPV Congress» (Amsterdam, October 2017).