**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**
**Федеральное государственное бюджетное учреждение
"НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
АКУШЕРСТВА, ГИНЕКОЛОГИИ И ПЕРИНАТОЛОГИИ ИМЕНИ
АКАДЕМИКА В.И. КУЛАКОВА"**

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

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

**Научные руководители:
доктор медицинских наук
Байрамова Г.Р.
доктор медицинских наук, профессор
Коган Е.А.**

Москва -2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ …… 4

ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ РАННЕЙ ДИАГНОСТИКИ ВПЧ - АССОЦИИРОВАННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ШЕЙКИ МАТКИ (обзор литературы)…….. 11

1.1. Исторические аспекты…….. 11

1.2. Роль вируса папилломы человека в генезе плоскоклеточных интраэпителиальных поражений и рака шейки матки..... 13

1.3. Эпидемиология плоскоклеточных интраэпителиальных поражений и рака шейки матки в России и в мире…… 17

1.4. Факторы риска инфицирования ПВИ и развития ассоциированных с ней плоскоклеточных интраэпителиальных поражений шейки матки…….…….. 19

1.5. Диагностика плоскоклеточных интраэпителиальных поражений и рака шейки матки……..... 21

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ……..…. 33

2.1. Материал исследования……. .. 33

2.2 Методы исследования…… 36

2.2. Методы статистической обработки результатов……..……... 45

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ…… 47

3.1. Клиническая характеристика обследуемых женщин…….. 47

3.2. Результаты ВПЧ - генотипирования пациенток с SIL шейки матки в возрасте до 30 лет старше …… 60

3.3. Результаты расширенной кольпоскопии у пациенток 1, 2 и 3 групп……70

3.4. Результаты экспрессии онкобелка p16ink4α и маркера пролиферации Ki67 у пациенток с SIL и раком шейки матки….....…….…… 76

3.5. Результаты экспрессии МикроРНК при плоскоклеточных интраэпителиальных поражениях и раке шейки матки (количественная оценка)……. 88

3.6. Результаты аномального метилирования гена WIF1 при плоскоклеточных интраэпителиальных поражениях при раке шейки матки…… 93
3.7. Сравнительный анализ результатов диагностических методов при патологии шейки матки, ассоциированной с вирусом папилломы человека (корреляционный анализ)…….. 99
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ……..…. . 105
ВЫВОДЫ……..…….. 116
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ……..…….. 118
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ……..…….. 120
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ……..…… 122

ВВЕДЕНИЕ

Актуальностьтемы исследования

Плоскоклеточные интраэпителиальные поражения (SIL) шейки матки занимают лидирующие позиции в структуре гинекологической патологии среди женщин репродуктивного возраста [40]. 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 выявление SIL и рака шейки матки увеличивается [49, 70, 71, 93, 167, 195].

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 [14, 54, 223].

Степень разработанности темы исследования

Результаты многочисленных публикаций свидетельствуют о том, что для женщин до 30 лет характерна транзиторная инфекция, при этом самоэлиминация вируса папилломы человека достигает 90%, для женщин старше 30 лет – персистирующее течение инфекции [71, 93]. Известно, что длительная персистенция папилломавирусной инфекции (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 шейки матки у конкретной пациентки с четким указанием времени и длительности процесса [45]. Рациональность использования существующих на сегодняшний день 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 [3, 27, 61, 80, 94].

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 (микроРНК, метилирование генов, ацетилирование гистонов), предоставляет новые возможности в области молекулярной диагностики предрака и рака шейки матки [118]. 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 - p16ink4α/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 исследования

Впервые 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 плоскоклеточными интраэпителиальными поражениями и плоскоклеточным раком шейки матки (SCC). Определен уровень аномального метилирования гена WIF1 для ранней диагностики пациенток с LSIL, 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 плоскоклеточными интраэпителиальными поражениями 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.

Практическая значимость

На основании проведенного анализа обоснована и определена эффективность и целесообразность использования комплекса современных неинвазивных методов (жидкостная цитология, ВПЧ – генотипирование методом ПЦР – РВ, ИЦХ с двойной окраской – p16ink4α/Ki67) ранней диагностики поражений шейки матки ассоциированных с вирусом папилломы человека, позволяющих определить обьем и сроки проведения как диагностических, так и лечебных мероприятий.

С целью ранней диагностики и прогнозирования SIL и плоскоклеточного рака шейки матки 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, гистологическое исследование биоптата шейки матки и соскоба цервикального канала (по показаниям). Специальные методы: изучение экспрессии онкобелков p16ink4α/Ki67 иммуноцитохимическим методом (ИЦХ), статуса метилирования гена WIF1 методом бисульфитного секвенирования, определение уровня экспрессии микроРНК (miR-92a, miR-22, miR-25) методом ПЦР. Исследование проводилось в ФБГУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России на базе научно – поликлинического отделения (руководитель – д.м.н., профессор – Прилепская В.Н.); определение статуса метилирования гена WIF1 – в центре коллективного пользования “ГЕНОМ” на базе Института

молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН; количественная экспрессия микроРНК – в лаборатории молекулярно – генетических методов (заведующий – д.б.н., профессор Трофимов Д.Ю.); экспрессия онкобелков p16ink4α/Ki67 – в лаборатории 1-го патологоанатомического отделенияи на кафедре патологической анатомии имени академика А. И. Струкова ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (заведующий – д. м. н., профессор Коган Е. А.).

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 p16ink4α/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.

Личный вклад автора

Автором проведен анализ медицинских ресурсов по теме исследования, по результатам которого был подготовлен аналитический обзор, определены критерии включения и исключения пациентов в исследование, дизайн исследования. Автор участвовал в клинико-лабораторном исследовании пациенток и сборе материала. Результаты полученных исследований были систематизированы, проанализированы и статистически обработаны. Сформулированы выводы, установлены научная новизна и практическая значимость проведенных исследований.

Соответствие диссертации паспорту полученной 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.

Апробация диссертации

Основные положения диссертации и результаты работы были представлены и доложены на IX Региональном научном форуме «Мать и Дитя» (Сочи, 28-30 июня 2016 г), XVII Всероссийском научно - образовательном форуме «Мать и Дитя» (Москва, 27-30 сентября 2016 г.), I Национальном научно - образовательном конгрессе «Онкологические проблемы от менархе до постменопаузы» (Москва, 13-15 февраля 2017 г.), XXIII Всероссийском конгрессе с международным участием «Амбулаторно-поликлиническая помощь в эпицентре женского здоровья» (Москва, 04-06 апреля 2017 г.), XXX Юбилейном Международном конгрессе с курсом эндоскопии «Новые технологии в диагностике и лечении гинекологических заболеваний» (Москва, 06 - 09 июня 2017 г.), X Юбилейном региональном научно-образовательном форуме и Пленуме Правления Российского общества акушеров-гинекологов «Мать и Дитя» (Геленджик 28-30 июня 2017 г.), XVIII Всероссийский научно-образовательный форум «Мать и Дитя» (Москва, 27–29 сентября 2017 г.), Eurogin «International

Multidisciplinary HPV Congress» (Нидерланды, Амстердам 8-11 октября 2017 г.), XXIV Всероссийском конгрессе с международным участием и специализированной выставочной экспозицией «Амбулаторно-поликлиническая помощь: проблемы, достижения, перспективы» (Москва, 4 – 6 апреля 2018 г.).

Диссертационная работа обсуждена на межклинической конференции 06.09.2017 и на заседании апробационной комиссии ФБГУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России (25 сентября 2017 г., протокол №11).

Внедрение результатов исследования в практику

Разработанный алгоритм диагностики пациенток с плоскоклеточными интраэпителиальными поражениями шейки матки, основанный на результатах исследования, используется в практической деятельности научно – поликлинического отделения ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Материалы диссертации используются в лекционных материалах на семинарах, симпозиумах, форумах.

Публикации результатов работы

По теме диссертации опубликовано 14 научных работ, в том числе 6 статей в журналах, рецензированных ВАК и индексируемых в SCOPUS.

Структура и объем диссертации

Работа изложена на 145 страницах компьютерного текста и состоит из введения, 4 глав, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Список литературы состоит из 227 источников, из которых 62 источника принадлежит российским авторам и 165 зарубежным авторам. Диссертация включает 40 таблиц, проиллюстрирована 26 рисунками.

ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ РАННЕЙ ДИАГНОСТИКИ ВПЧ - АССОЦИИРОВАННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ШЕЙКИ МАТКИ (обзор литературы)

1.1. Исторические аспекты

Известно, что в 1842 г исследователь Rigoni-Stern впервые в мире выдвинул гипотезу «об инфекционном генезе» рака шейки матки, основанной на результатах изучения регистра смертей за 70 лет в городе Вероне. Ученым было отмечено, что рак шейки матки встречался только среди замужних и вдовствующих женщин и не выявлялся у девственниц и монахинь.

В 1950 г исследователь F. Gagnon изучил 13000 историй болезни монахинь Монреаля и Квебека и отметил, что рак не был обнаружен ни у одной из них. Он связывал подобные результаты с низкой частотой воспалительных заболеваний шейки матки у монахинь.

Следует отметить, что в 1946 году советский исследователь Лев Зильбер формулирует концепцию происхождения опухолей. Теория Зильбера была вирусогенетической и, таким образом, впервые предельно ясно были сформулированы принципиальные положения теории онкогенеза: опухоли могут вызываться вирусами, которые изменяют наследственный аппарат клетки и служат лишь инициирующим фактором в превращении нормальной клетки в трансформированную, сами при этом, не участвуя непосредственно в возникновении опухоли. Теории, касающиеся взаимодействия вируса и генетического аппарата клетки, были настолько новыми и оригинальными, что более десяти лет эту концепцию невозможно было проверить экспериментально из-за отсутствия адекватных методических способов.

Позже Зильбер приходит к мысли об использовании иммунологических маркеров для идентификации онковирусов и его белковых продуктов в опухолях человека. Фактически он и его сотрудники были пионерами в новой области иммунологии - обнаружении специфических опухолевых антигенов[19].

В конце 60 г. XIX века И. Мельник и А. Д. Тимофеевский обнаружили постоянное присутствие вирусоподобных телец в папилломахс помощью электронной микроскопии. Одновременно в 1954 г. Barrett устанавливает факт передачи генитальных кондилом при гетеросексуальных половых сношениях.

В 1956 г. учеными Koss и Durfee введентермин «койлоцитотическая атипия» (крупные клетки с относительно небольшим гиперхромным ядром, окруженным прозрачной четкой зоной светлой цитоплазмы), также впервые была отмечена связь между койлоцитотической атипией (баллоникрованием клеток), дисплазией и раком шейки матки. Позже, в 1968году, Dunn и Ogilvie выделили вирусные частицы из генитальных бородавок.

В середине 70-ых годов XX века немецкий вирусолог Harald zur Hausen серьезно подошел к изучению ассоциации вируса папилломы человека (ВПЧ) и рака шейки матки. В те годы существовала теория, что рак шейки матки вызывается вирусом простого герпеса (ВПГ) [46], но Hausen, не обнаружив ДНК ВПГ, предположил взаимосвязь именно с вирусом папилломы человека, и в 1983 году он определил ДНК ВПЧ в биопсийном материале женщин с раком шейки матки.

В 1984 году впервые Harald zur Hausen и его научная группа клонировала ДНК 16 и 18 генотипов ВПЧ и впоследствии доказала, что большинство случаев рака шейки матки (99,8%) вызваны вирусом папилломы человека, при этом в 95% случаев связаны с одним из двух генотипов ВПЧ – 16 и 18 [56]. Исследование длилось более 34 лет, за свои научные заслуги Harald zur Hausen стал лауреатом Нобелевской премии 2008 года в области медицины и физиологии.

1.2. Роль вируса папилломы человека в генезе плоскоклеточных интраэпителиальных поражений и рака шейки матки

В настоящее время этиологическим фактором плоскоклеточных интраэпителиальных поражений (SIL) и рака шейки матки признан вирус папилломы человека [36, 99, 118, 132, 179]. На сегодняшний день это единственная группа вирусов, индуцирующая роль которых доказана в образовании опухолей у человека в естественных условиях [6, 96, 131, 134, 148, 166, 197, 215].

Папилломавирусы представляют собой небольшие безоболочечные икосаэдрические по форме ДНК - содержащие вирусы диаметром около 55 – 60 нм, относящиеся к семейству Papillomaviridae [8, 46, 93]. Капсид кубической симметрии содержит два белка L1 и L2 (от англ. late, поздний). L1 является главным капсидным белком и составляет более 80% капсидного материала, L2 – является минорным белком и не участвует в образовании капсида, но участвует в его стабилизации и стыковке с геномом [204].

Вирусный геном представлен циркулярной двухспиральной ДНК, состоит примерно из 8000 пар оснований и кодирует примерно около 10 белков. Известно, что транскрипции подвергается только одна из цепей ДНК, так как она содержит информацию о структуре вирусных белков. Геном вириона можно разделить на три функциональных участка: 1 – ый некодирующий фрагмент, состоящий из 400-1000 пар оснований (длинный контролирующий участок –LCR, от англ. – long control region) принимает участие в экспрессии вирусных генов, связывая вирусные и клеточные регуляторы транскрипциина котором находится область вирусного промотора, с которого начинается репликация вирусного ДНК; 2 – ой фрагмент представлен генами, кодирующие ранние неструктурные белки, то есть не входящие в состав вириона: E1, E2, E4, E5, E6 и E7 (от англ. early-ранний); 3 – й фрагмент представлен генами, кодирующие структурные белки L1 и L2 (от англ.late-поздний). Известно, что онкобелки E1 и E2 ответственны за репликацию вируса, онкобелок E4 способствует дезинтеграции цитоскелета эпителиальных

клеток, онкобелки E5, E6, E7 имеют высокий онкотрансформирующий потенциал, белок E3 является псевдогеном и не экспрессируется [44, 147, 180].

ДНК вируса папилломы человека в опухолевых клетках может существовать в эписомальной и в интегрированной форме [16]. На ранних стадиях трансформации, в частности при CIN 1, вирусная ДНК выявляется в эписомальной форме, в то время как при раке шейки матки – чаще в интегрированной. Однако данный факт не является абсолютным, так как достоверно установлено, что при раковых опухолях, наряду с интегрированной формой вируса, может идентифицироваться и его эписомальная форма, а также их сочетание [15, 17]. Видимо, интеграция вирусного генома не является главным фактором в онкогенезе рака шейки матки. Известно, что ДНК ВПЧ интегрируется практически во все клеточные хромосомы [59].

Основным фактором онкотрансформации инфицированных клеток является длительная экспрессия двух ранних генов E6 и E7, способных инактивировать белок p53 и белок ретинобластомы (pRB), которые являются регуляторами пролиферативной активности клеток [18, 63, 128, 206].

Согласно современным представлениям, онкобелок E6 взаимодействует с супрессором опухолевого роста клеточным белком p53, вызывая его протеолитическую деградацию, и как следствие ведёт к нарушению механизмов, обеспечивающих репарацию ДНК и апоптоза клетки, что в дальнейшем приводит к дестабилизации генома [20]. Белок p53 является ингибитором Wnt-сигнального пути, активация которого по некоторым данным необходима для преобразования ВПЧ - инфицированных клеток шейки матки в опухолевые клетки [66]. Кроме того, известно, что E6 подавляет синтез интерферона, индуцирует теломеразу и предотвращает ингибирование тирозинкиназ (семейства SRC), способствуя, таким образом, усилению пролиферативной активности клеток [76].

Известно, что онкобелок E7 формирует стабильный комплекс с белком pRb, в результате которого высвобождается транскрипционный фактор E2F, стимулирующий транскрипцию множества клеточных генов, участвующих в регуляции пролиферации клеток [5]. Высокая активность транскрипционного

фактора E2F способствует активации синтеза ингибитора циклинзависимых киназ p16ink4α, в результате которого инфицированные вирусом папилломы человека клетки, экспрессирующие онкобелок E7, подвергаются апоптозу [207].

Механизм защиты, препятствующий онкотрансформации инфицированных вирусом папилломы человека клеток, осуществляется путем супрессии функций вирусных онкобелков, посредством ингибирования ингибиторов циклинзависимых киназ, а именно p16ink4α. Онкобелок E7 также влияет на активность регуляторов клеточного цикла: циклиныA и E, ингибиторы циклинзависимых киназ p21WAF1/CIP1 и p27KIP1 [53].

Идентифицировано более 200 генотипов вирусов папилломы человека, из них более 40 генотипов могут инфицировать слизистые урогенитального тракта [64, 105, 43]. Вирусы папилломы человека в зависимости от онкогенного потенциала подразделяются на высокоонкогенные (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 46, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82) и низкоокогенные (6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81) генотипы [38, 78, 198]. К наиболее онкогенным вирусам относят 5 генотипов ВПЧ (16, 18, 31, 33, 45), которые по данным различных авторов вызывают до 82% рака шейки матки. [106]. По данным Wheeler C. M. и соавт. (2006) у каждой четвертой женщины (27%) после инфицирования вирусом папилломы человека через 3 года развивается CIN 2-3 [133]. Персистенция более двух лет, генотип вируса и вирусная нагрузка являются основными факторами прогрессии от предраковых поражений к инвазивному раку шейки матки [24, 67, 93, 103].

До настоящего времени остаются недостаточно изученными факторы, способствующие персистенции ВПЧ и инициации патологического процесса в шейке матки [52]. Так, некоторыми зарубежными исследователями было установлено, что ВПЧ вызывает генетические перестройки, хромосомные инверсии, транслокации, что впоследствии приводит к активации различных онкогенов и нестабильности генома. Данные изменения становятся причиной высокого риска малигнизации и развития рака шейки матки [149]. Установлено, что риск развития CIN при персистенции 16 генотипа ВПЧ составляет 40 – 50%;

при персистенции 31, 58, 82 генотипов 20 – 30%; при персистенции 18, 33, 35, 51, 52 генотипов риск составляет 10 – 20% [24].

Риск инфицирования вирусом папилломы человека в течение жизни у сексуально – активных лиц уже спустя 2-3 года после сексуального дебюта составляет по данным ряда авторов 50-80% [34, 114, 169, 205].

Рандомизированное исследование, проведенное в США учеными Ralph P. Insinga и соавт. выявили, что среди женщин в возрасте от 16 до 23 лет средняя продолжительность инфицированности ВПЧ 16 генотипа составляет в среднем – 18,2 месяца, для ВПЧ 18 генотипа – 16,4 месяца, для низкоонкогенных генотипов ВПЧ 6 и 11 генотипа – 9,3 и 8,4 месяца соответственно [184].

По данным ВОЗ (2012), самоэлиминация ВПЧ уженщин моложе 30 лет наступает в течение 12 месяцев после инфицирования. Элиминация происходит самостоятельно без лечения и без клинических симптомов, и только в 10% случаев развиваются заболевания шейки матки, ассоциированные с ВПЧ, вплоть до рака шейки матки [222]. Согласно эпидемиологическим исследованиям, пик распространенности папилломавирусной инфекции приходится на возраст 18-24 лет. Следует отметить, что у пациенток в возрасте до 24 лет частота выявления ПВИ в 2 раза выше по сравнению с женщинами старше 35 лет [58]. По другим данным, после 30 лет частота инфицированности папилломавирусом снижается и варьирует в пределах 8,6 до 9,9%, однако количество выявленных поражений шейки матки резко возрастает [41, 129]. Вместе с тем процесс самоэлиминации ВПЧ и регресс ВПЧ – ассоциированных заболеваний шейки матки у девочек – подростков и молодых женщин, отмечается в 80 – 90% случаев в отличие от женщин старшей возрастной группы. Так, среднее время самоэлиминации ВПЧ у подростков составило 8 месяцев, а у женщин 18-25 лет – 1,5-2 года. Во многом данный процесс тесно связан с наличием сопутствующих воспалительных процессов нижнего отдела гениталий и успешностью их лечения [71].

1.3. Эпидемиология плоскоклеточных интраэпителиальных поражений и рака шейки матки в России и в мире

По данным мировой литературы, к концу XX-го столетия было выявлено более 30 миллионов женщин с поражениями шейки матки низкого риска и более 10 миллионов высокого риска [75, 174].

Так, в США распространенность предрака шейки матки в возрастной группе 25-29 лет составляет около 800 случаев на 100 000 женщин. Из них CIN 2-3 составляет около 150 случаев на 100 000 женщин. Ненормальные цитологические мазки для женщин всех возрастов встречаются на порядок выше и составляют 7800 случаев на 100 000 женщин [81, 223].

По данным отечественных исследователей в России плоскоклеточные интраэпителиальные поражения шейки матки в структуре гинекологической заболеваемости у женщин репродуктивного возраста варьируют от 10,7% до 38,8% [2, 12]. Учитывая факт возможной онкотрансформации плоскоклеточных интраэпителиальных поражений шейки матки, распространенность рака шейки матки является важным показателем организации первичного звена здравоохранения [13, 159].

Учёными Zheng B. и соавт. (2017) были исследованы 2 206 588 женщин в возрасте от 15 до 88 лет (средний возраст - 38,4 лет), из них у 37 895 был установлен цитологический результат LSIL. По результатам проведенного исследования установлено, что LSIL выявлялся у женщин <30 лет достоверно чаще по сравнению с женщинами >30 лет (2,1% и 1,7% соответственно), то есть с увеличением возраста женщин, количество выявленных LSIL значительно уменьшается. В 75,8% случаях женщины с LSIL были ВПЧ позитивны, однако их число с увеличением возраста пациенток достоверно уменьшалось, за исключением женщин старше 60 лет [127].

В 2008 году McCredie опубликовал единственное известное на сегодняшний день клиническое исследование, проведенное в Новой Зеландии, в котором 92 женщинам с гистологически верифицированным диагнозом CIN 3 не проводилось

лечение, а лишь динамическое наблюдение. По результатам данного исследования рак шейки матки через 10 лет развился у 31% женщин, спустя 30 лет - у 50% наблюдаемых женщин [158]. По данным ряда других авторов CIN 2-3 регрессирует до 30%, CIN 3 прогрессирует в инвазивную карциному шейки матки от 0,2 до 0,4% в течение 12 месяцев [51, 87].

По данным Bruni L и соавт. (2015), риск цервикального рака в мире среди женщин старше 15 лет ежегодно составляет 2645,080 млн. случаев. Из них более 527 000 заболевают раком шейки матки [138]. Несмотря на достижения современной медицины, смертность от рака шейки матки остается достаточно высокой. Так, средний показатель ежегодной заболеваемости раком шейки матки в странах Евросоюза составляет 13,2 случая на 100 тыс. женщин, а смертность 5,9 случая на 100 тыс. женщин в год.

Наиболее низкая заболеваемость отмечается в странах Северной Европы, в Финляндии составляет 3,6 случая, а в Швеции регистрируется 8,0 случая на 100 тыс. женского населения [39].

В Российской Федерации в 2015 году число новых случаев рака шейки матки составило 16 710, смертность - 5,39 случая на 100 тыс. женщин в год. В возрастной группе 15-39 лет число новых случаев составило - 3890, в группе 40 - 44 года – 2128 случаев [14]. Один из самых высоких показателей заболеваемости раком шейки матки наблюдается в развивающихся странах: в Гаити составляет 93,8 случая, в Зимбабве – 67,2, в Танзании – 61,4 случая на 100 тысяч женского населения [39].

С 1980 по 2010 год Forouzanfar и соавт. (2011) ежегодно изучали возраст женщин с раком шейки матки в 187 странах. В результате исследования установили, что заболеваемость раком шейки матки в глобальном масштабе увеличилась с 378 000 случаев в год в 1980 году до 454 000 случаев в год в 2010 году (ежегодный прирост составил 0,6%). Смертность от рака шейки матки снижается, но в 2010 году заболеваемость по-прежнему составляла 200 000 смертей. В развивающихся странах 46 000 из этих женщин были в возрасте 15 - 49 лет, а 109 000 - в возрасте 50 лет и старше [77].

1.4.Факторы риска инфицирования ПВИ и развития ассоциированных с ней плоскоклеточных интраэпителиальных поражений шейки матки

По мнению отечественных и зарубежных исследователей, риск возникновения цервикальных поражений шейки матки, ассоциированных с папилломавирусной инфекцией, и рака шейки маткизависит от социально - экономических условий в стране, уровня образования общества, этнических особенностей, а также уровня развития здравоохранения и скрининговых программ [29, 72, 74, 109, 113, 116, 121].

Среди факторов риска инфицирования и развития рака шейки матки рассматривается сексуальный дебют и сексуальное поведение женщин [79, 62], длительное использование гормональных контрацептивов [199, 193], роды в юном возрасте (раннее 16 лет) и высокий паритет, инфекции передаваемые половым путем (ИППП), иммунодефицитные состояния [124, 224], наличие вредных привычек (табакокурение, наркомания) и гомосексуализм [69, 107, 113, 171, 192]. В последние годы активно изучается иммунный ответ и генетическая предрасположенность к данному заболеванию [117, 126, 200].

Остается недостаточно изученным риск развития CIN и рака шейки матки при длительном использовании оральных и инъекционных форм контрацептивов. Так, в проспективном исследовании, проведенном в Европейском союзе учеными Roura E., Travier N., Waterboer T. (2016), был установлен повышенный риск развития CIN 3 у женщин, принимавших контрацептивы ≥15 лет [199].

В последние годы изучается роль папилломавирусной инфекции в сочетании с ВИЧ – инфекцией в развитии ВПЧ – ассоциированных заболеваний шейки матки. Так, в исследовании, проведенном в Санкт – Петербурге было показано, что среди женщин с ВИЧ – инфекцией частота ВПЧ – ассоциированной патологии шейки матки в 2 раза выше, чем у ВИЧ негативных женщин и составила 20,4% и 11,1% соответственно ($p<0,05$). Частота выявления CIN 2, CIN 3 и инвазивного рака шейки матки в исследуемых группах составила 14,5% и 6,7% соответственно ($p<0,05$). При этом частота выявления CIN 1существенно не

отличалась и составила 5,9% у ВИЧ – позитивных пациенток с наличием ВПЧ и 4,4% – у ВИЧ отрицательных с ВПЧ положительным тестом [25, 26].

Активно изучается взаимосвязь между вирусно-бактериальной инфекцией гениталий, дисбиотическими процессами во влагалище и плоскоклеточными интраэпителиальными поражениями шейки матики [1, 4, 28, 33, 48, 211]. По мнению ряда авторов, вирус простого герпеса 2 типа (ВПГ 2) способен вызвать эндотелиальную дисфункцию и иммунные нарушения, а в сочетании с вирусом папилломы человека создает условия для повышенного риска развития цервикальных поражений и рака шейки матки [4, 62, 224]. Так, исследование, проведенное с участием 572 женщин с гистологически верифицированным диагнозом рака шейки матки, ассоциированным с ВПЧ выявило сочетание с вирусом простого герпеса 2 типа и хламидийной инфекций в 28% и 26% случаев соотвественно [175]. По данным других зарубежных ученых, цервикальные поражения наиболее часто сочетаются с анаэробными микроорганизмами, среди которых лидирует Gardnerella vaginalis [85, 119].

Персистирующая бактериально – вирусная цервикальная инфекция и нарушение биоциноза влагалища приводят к развитию хронического воспаления, способствуют снижению герметизации покровного эпителия, высвобождению свободных радикалов, способных воздействовать на ДНК эпителиоцитов и стромальных клеток шейки матки, вызывая мутации, снижение количества гликогена в эпителиоцитах, нарушение процессов пролиферации и апоптоза клетки [95, 142]. Вместе с этим нарушается клеточный и гуморальный иммунитет: снижается уровень интерферонов, подавляется функциональная активность лейкоцитов (нейтрофилов), угнетается функция естественных киллеров. Изменение функционального состояния нейтрофилов приводит к повышенной продукции в очаге воспаления активных форм кислорода, которые имеют огромный канцерогенный потенциал [32, 35, 150].

В настоящее время доказана роль влияния табакокурения в возникновении злокачественных новообразований, в том числе и рака шейки матки [9, 182]. По данным исследований, в слизистой оболочке шейки матки были обнаружены

никотин и его производные, а также было установлено их повреждающее действие на ДНК цервикального эпителия. По результатам эпидемиологических и экспериментальных исследований Международного агенства по изучению рака (International Agency for Research on Cancer (IARC)) признано, что табакокурение является потенциальным канцерогенным фактором для человека и способствует возникновению онкологических заболеваний любой локализации [55].

В последние годы установлена связь ВПЧ не только в развитии плоскоклеточных цервикальных поражений и рака шейки матки, но также установлена взаимосвязь ВПЧ с онкологической патологией вульвы, влагалища и анального рака, при этом достаточно часто наблюдается их сочетание [185].

1.5. Диагностика плоскоклеточных интраэпителиальных поражений и рака шейки матки

В качестве терминологического обозначения предопухолевых изменений шейки матки в 1953г J.W. Reagan предложил термин «дисплазия». В зависимости от выраженности изменений в эпителиальных клетках и степени атипии дисплазия была разделена на 3 степени: легкую дисплазию (I степень), умеренную дисплазию (II степень), тяжелую дисплазию (III степень) и внутриэпителиальный рак (рак insitu).

Позже, в 1968 г. R. M. Richart предложил термин «cervical intraepithelial neoplasia – CIN» (цервикальная интраэпителиальная неоплазия). Данная классификация основывается на морфологических изменениях ядра клетки, происходящих в ВПЧ – инфицированной клетке.

Выделяют 3 степени CIN: CIN 1 – базальные клетки с атипией – занимают 1/3 эпителиального пласта (соответствует дисплазии I); CIN 2 – базальные клетки с атипией - занимаютот 1/3 до 2/3 эпителиального пласта (соответствует дисплазии II); CIN 3 – базальные клетки с атипией – занимают более 2/3 толщины эпителиального пласта (дисплазии III и CIS) [187].

В 1988 году для описания цервикальных мазков была внедрена новая классификация «Bethesda» с использованием понятия “Squamous Intraepithelial Lesions” (SIL); последний пересмотр 2014 г. (таблица 1) [4, 57].

Таблица 1

Терминологическая классификация «TerminologyBethesda System»

Аббре-виатура	Английский термин	Перевод на русский
ASC	Atypicals squamous cells	атипичные клетки плоского эпителия
ASC-H	Atypicals squamous cells cannot exclude HSIL (high grade squamous intraepithelial lesion)	атипичные клетки плоского эпителия, не позволяющие исключить поражение эпителия тяжелой степени
ASCUS	atypical squamous cells of undetermined significance	клеточные элементы трудно поддаются классификации и именуются как атипические клетки плоского эпителия неопределенного значения;
LSIL	low-grade squamosus intraepithelial lesion	низкая степень плоскоклеточного интраэпителиального поражения; легкая дисплазия / CIN 1
HSIL	high-grade squamosus intraepithelial lesion	высокая степень плоскоклеточного интраэпителиального поражения; умеренно выраженнаядисплазия / CIN2, резко выраженная дисплазия / CIN3
NILM	Negative for intraepithelial lesion or malignancy	Негативные в отношении интраэпителиального поражения или злокачественности

Учитывая высокую распространенность рака шейки матки, ранняя диагностика плоскоклеточных интраэпителиальных поражений на сегодняшний день является значимой и актуальной проблемой [30, 31, 82, 152, 181, 189].

Диагностика заболеваний шейки матки, ассоциированных с ВПЧ сложна и основывается на использовании множества методов исследований,

включаяразличные тест системы для выявления ДНК ВПЧ, цитологическое исследование (традиционным (test – Papanicolau) или жидкостным методом); определение онкобелков Е6 и Е7; оценка экспрессии p16ink4α/Ki67 иммуноцитохимическим (ИЦХ), иммуногистохимическим (ИГХ) методами; расширенная кольпоскопия; гистологическое исследование биоптата шейки матки по показаниям. Рациональность использования вышеперечисленных методов неоднозначна в связи с их разной диагностической чувствительностью испецифичностью [122].

Во многих странах для выявления ВПЧ используется система «Digene-test», которая определяет наличие и концентрацию вируса папилломы человека, позволяя клиницистам определить прогноз и выработать тактику ведения пациента. Другим международным референтным тестом является тест-система Cobas. Данная система обеспечивает качественную детекцию 14 высокоонкогенных генотипов ВПЧ: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68, и отдельно 16 и 18 генотипов [90].

Сравнительный анализ двух тест систем Cobas и Digene для определения вируса папилломы человека, проведенного S. Phillips и соавт. (2015) у 407 женщин с гистологически подтвержденным диагнозом CIN различной степени тяжести, установил достоверную корреляцию между степенью тяжести цервикальных поражений и наличием ВПЧ высокоонкогенного риска. Диагностическая чувствительность тест – системы Cobas составила 90,6%, Digene – теста – 86,1%, специфичность – 92,9% и 91,8 соответственно [90].

В последние годы в Российской Федерации успешно используется тест система (HPV КВАНТ-21), позволяющая определить 21 генотип ВПЧ 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 44, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82, 6, 11 методом ПЦР в режиме реального времени с определением вирусной нагрузки [22].

Наряду с традиционной цитологией, Pap – тест (test – Papanicolau), в последние годы активно внедряется наиболее высокоспецифичный метод – жидкостная цитология (ЖЦ). Одним из преимуществ данного метода является факт возможного использования образца материала не только для диагностики

SIL, но и для детекции вируса папилломы человека и онкобелков p16ink4α/Ki67 [42, 65, 104, 130].

По данным J. Tanabodee (2015) чувствительность метода жидкостной цитологии при обнаружении ASCUS – атипических клеток неясного значения составляет 81,4%, специфичность 75% [91]. В другом исследовании установлено, что результаты традиционного цитологического метода исследования коррелируют с гистологическими результатами не более чем в 60% случаев, при использовании метода ЖЦ - около 99% случаев. Из этого можно сделать вывод, что ЖЦ является более надежным лабораторным тестом по сравнению с традиционным цитологическим исследованием [50].

Доказано, что цитологический метод исследования является наиболее специфичным методом для выявления ВПЧ – негативных раков шейки матки. Так, в ряде исследований установлено, что при 1-й стадии РШМ количество ВПЧ негативных пациенток составляет 7,1%, 2-й стадии – 42,3%, 3-й стадии – 57%. Следует отметить, что ВПЧ негативный рак шейки матки в большинстве случаев регистрируется у женщин старшей возрастной группы - 69,2% пациенток в возрасте 40 - 62 лет [10, 21, 42, 65].

Другим методом диагностики SIL является определение экспрессии онкобелков E6 и E7. По данным Karlsen F. (2009), их диагностическая специфичность для установления LSIL составляет 80% [92, 96]. В исследованиях, проведенных Wang H.Y. и соавт. (2015) сравнивались два теста: E6/E7 мРНК вируса папилломы человека высокого онкогенного риска и тест ДНК ВПЧ с целью оценки их диагностической значимости при цервикальных поражениях шейки матки. По данным анализа специфичность для E6/E7 мРНК составила 88,6%, для ВПЧ теста - 48,1% соответственно. По мнению авторов E6/E7 мРНК является наиболее достоверным тестом для скрининга и диагностики рака шейки матки [97]. Доказано, что экспрессия онкобелка E7 коррелирует с тяжестью цервикальных поражений [7].

В последние годы перспективным направлением в диагностике поражений шейки матки, ассоциированных с папилломавирусной инфекцией, является

определение изменения экспрессии онкобелка p16ink4α и маркера пролиферации Ki67, позволяющее определить наличие онковирусных белков и установить степень нарушений клеточной регуляции, происходящих в ответ на персистенцию вируса в клетке.

Белок p16ink4α [112, 212] идентифицируется как супрессор опухолевого роста, синтез которого кодируется геном CDKN2A, ингибирует активность циклин - зависимых киназ 4 и 6 (cdk4/6), воздействуя, таким образом, на регуляцию клеточного цикла (переход клетки из G1-фазы в S-фазу). Известно, что в здоровых клетках экспрессия белка p16ink4α строго ограничена. В инфицированных ВПЧ клетках онкобелок E7 связывается с белком ретинобластомы (RB), являющимся супрессором опухолей, ингибируя его функциюпутем протеасомной деградации, результатом которого является избыточная экспрессия p16ink4α [160]. Установление в клетке одновременной экспрессии онкобелка p16ink4α и маркера пролиферации Ki67 указывает на индуцированное нарушение клеточного цикла, тем самым способствует более точной диагностике цервикальных поражений высокой степени.

Первые исследования по изучению экспрессии p16ink4α и Ki67 у пациенток с раком шейки матки показали высокую специфичность метода [168]. В исследование H. Ikenberg и соавт. (2013) были включены 27349 женщины из 196 медицинских центров в возрасте от 18 до 65 лет (средний возраст 39,9±11,4 лет). Всем пациенткам проводилось цитологическое исследование, ВПЧ – тест и определение экспрессии онкобелков p16ink4α и Ki67. Пациенткам с ненормальным цитологическим результатом и/или положительным ВПЧ – тестом, и/или положительной экспрессией p16ink4α и Ki67 выполнялась расширенная кольпоскопия (n=2301) и прицельная биопсия шейки матки (по показаниям). По результатам исследования CIN 2+ был установлен в 205 биоптатах шейки матки. Установлено, что метод двойного окрашивания цитологических препаратов обладает наибольшей чувствительностью (86%) по сравнению с окрашиванием гематоксилин – эозином (68,5%) ($p<0,001$); при этом специфичность метода была эквивалентна и составила 95,2 % и 95,4 % соответственно ($p = 0,15$) [190]. Ранее

данным автором было установлено, что детекция симультантной гиперэкспрессии p16ink4α и Ki67 является индикатором наличия CIN [163]. В ряде отечественных работ была изучена чувствительность и специфичность онкомаркеров p16ink4α и Ki67 для диагностики CIN. Так, чувствительность онкомаркеров p16ink4α и Ki67 для выявления CIN составила 55,5%, и 32,2%, специфичность 83% и 94% соответственно. Диагностическая чувствительность коэкспрессии p16ink4α/Ki67 составила 42,2%, специфичность 93,6%, прогностическая ценность положительного результата 92,1% [23].

В других исследованиях достоверно показано, что экспрессии онкобелка p16ink4α не наблюдается при отсутствии дисплазии шейки матки, однако выявляется в 16 % случаев при гистологическом диагнозе CIN 1, в 64% – при CIN 2, в 90% – при CIN 3 и в 100% случаях при плоскоклеточном раке шейки матки [37, 161].

По данным зарубежных авторов чувствительность цитологического метода, исследования на онкобелки E6/E7, p16ink4α и маркера пролиферации Ki67 для выявления ВПЧ положительных женщин составляет 77,6%, 80,8% и 87,6% соответственно [208]. Для обнаружения CIN 2-3 шейки матки чувствительность/специфичность ВПЧ теста составила 89,3% и 14,9%, для p16ink4α/Ki67 – 96,4% и 60,9% соответственно [140].

Поданным D. Schmidt и соавт. (2011), диагностическая чувствительность коэкспрессии онкомаркеров p16ink4α/Ki67 иммуноцитохимическим методом (ИЦХ) для выявления LSIL составила – 94,2%, специфичность – 68% [162].

Таким образом, определение экспрессии p16ink4α и Ki67 иммуноцитохимическим методом позволяет с большей вероятностью прогнозировать риск трансформации SIL в рак шейки матки и, как следствие, позволяет выбрать дальнейшую тактику ведения пациентов [60, 161].

По мнению зарубежных авторов, включение p16ink4α и Ki67к рутинному скринингу позволит усовершенствовать мониторинг женщин, перенесших органосохраняющие операции по поводу CIN 3+ и цервикального рака [201].

Одним из дополнительных методов обследования женщин с цервикальной патологией, ассоциированной с ВПЧ, является расширенная кольпоскопия (РКС). По рекомендациям ASCCP (2012), РКС проводится в случае получения ненормального цитологического заключения и/или положительного ВПЧ теста [68]. По данным С. И. Роговской, чувствительность РКС для выявления SIL и рака шейки матки составляет 80 – 90%, специфичность 30 – 60% [47]. Одним из недостатков метода является его дороговизна по сравнению с цитологическим методом и ВПЧ тестом, а также факт зависимости результата исследования от профессиональной подготовки специалиста. Преимуществом является возможность проведения прицельной биопсии шейки матки с наиболее измененных участков с последующей гистологической верификацией диагноза [146, 111, 61].

Несмотря на прорыв, произошедший в последние годы в диагностике ВПЧ - ассоциированной патологии шейки матки поиск универсального, высокоэффективного метода ранней диагностики остается актуальным до настоящего времени [89, 123, 177, 208].

В последние годы было доказано участие нетранслируемых низкомолекулярных РНК – микроРНК в развитии неопластической трансформации и злокачественных опухолей [154, 194]. Микро РНК – короткие одноцепочечные молекулы длиной 20-25 нуклеотидов, осуществляющие регуляцию экспрессии генов на постранскрипционном уровне путем ингибирования синтеза белка с мРНК. МикроРНК, участвуют в регуляции большинства фундаментальных процессов развития организма: делении клеток, смене фаз клеточного цикла, апоптозе, клеточной миграции и инвазии, ангиогенезе, формировании иммунного ответа [86, 115].

Накопленный опыт свидетельствует о том, что микроРНК играют ключевую роль в инициации канцерогенеза и прогрессии рака шейки матки через специфические сигнальные пути (E6-p53, E7-pRb, phosphoinositide-3 kinase (PI3K) -Akt, Notch, Wnt/β-catenin). Некоторые исследования показали, что микроРНК могут быть использованы в качестве биомаркеров для выявления цервикальных

поражений и рака шейки матки, а также не исключается возможность их использования в терапевтических целях. Полученные результаты дают новые представления о патогенезе рака шейки матки, индуцированного вирусными онкобелками [102, 216]. В настоящее время в мире успешно проводятся клинические испытания с использованием микроРНК in vivo на приматах, в терапии некоторых форм рака [183].

Многочисленные исследования показали, что повышение или снижение экспрессии определенных микроРНК ассоциируется с патологическими процессами в организме, в том числе и развитием доброкачественных и злокачественных трансформаций клеток и тканей [120, 157].

Bumrungthai S. и соавт. (2015) изучали экспрессию miR-21 у пациентов с SIL и SCC. По результатам исследования было установлено значительное снижение экспрессии miR-21 у пациенток с SIL и SCC по сравнению с пациентками без морфологических изменений шейки матки ($p<0,05$) [207]. В другом исследовании Chen G и соавт. (2017) установили достоверное снижение экспрессии miR-211 при раке шейки матки, при этом восстановление экспрессии miR-211 приводило к ингибированию пролиферации, миграции и инвазии атипических клеток [152].

Значительный прогресс произошел в области исследования микроРНК в последние годы. Новые знания способствуют лучшему пониманию механизма биогенеза микроРНК. Одним из успешных направлений является использование микроРНК как биомаркера для определения многих заболеваний, в том числе предрака и рака шейки матки. Представленные доказательства в отношении экспрессии микроРНК при раке шейки матки показывают, что характер экспрессии микроРНК в раковых и предраковых клетках шейки матки представляет ценную информацию о роли последних на разных стадиях канцерогенеза шейки матки. МикроРНК могут быть использованы как перспективные биомаркеры для выявления рака шейки матки, а также являться потенциальными терапевтическими мишенями в генной терапии [191].

Таким образом, микроРНК могут стать следующим поколением биохимических препаратов, поскольку они обладают высокой ген – специфичностью вследствие комплементарности нуклеотидных последовательностей и менее сложной фармакодинамикой, так как они являются биологической молекулой [210].

За рубежом проводилось ряд исследований, целью которых являлось обнаружение микроРНК в сыворотке крови у женщин с плоскоклеточным раком шейки матки до и после оперативного вмешательства, а также оценка потенциала микроРНК в качестве биомаркеров пост – терапевтического мониторинга женщин с раком шейки матки. По результатам исследования было установлено, что циркулирующие в сыворотке крови микроРНК: miR-646, miR-141 и miR-542-3p могут быть использованы в качестве неинвазивного биомаркера рака шейки матки. Уровень экспрессии вышеперечисленных микроРНК может быть использован для мониторинга прогрессирования заболевания [98].

Новым перспективным направлением ранней диагностики и прогнозирования цервикальных поражений является изучение эпигенетических нарушений различных генов, а именно их метилирование. Так, по мнению ряда авторов, эпигенетические нарушения способствуют инактивации генов супрессоров опухолевого роста, играющих важную роль в канцерогенезе [155].

Аномальные метилирования генов, в частности PAX1, участвующих в процессе канцерогенеза, являются ранними маркерами тяжести цервикальных поражений и часто выявляются при предраковых и раковых заболеваниях различной локализации [213].

В исследовании, проведенном Kim M. K. и соавт. (2016), была оценена диагностическая значимость четырех метилированных генов у корейских женщин таких, как ADCYAP1, PAX1, MAL и CADM1 для выявления рака шейки матки. По результатам исследования была установлена специфичность и чувствительность метода. Чувствительность метилированных генов ADCYAP1, PAX1, MAL, и CADM1 составила 79,2%, 75%, 70,8% и 52,1%, а специфичность 92%, 94%, 94,7% и 94% соответственно [100]. Проведенные исследования Wang

Z. M. и соавт. (2014) доказали важную роль гена PAX1 в диагностике и прогнозе CIN. По мнению исследователей, биомаркер PAX1 позволит значительно снизить количество неясных цитологических мазков и выделить группу пациенток с CIN2+, тем самым позволит снизить количество необоснованных посещений пациенток к врачу и проведение РКС [217]. По результатам ряда работ специфичность и чувствительность гена метилирования PAX1 для диагностики CIN 2+ составила 95,6% и 82,4% [213].

В нашей стране и зарубежом активно изучается роль Wnt-ингибиторного фактора 1 (Wnt Inhibitory Factor-1, WIF1) в генезе различных видов рака [136, 182, 219]. Известно, что Wnt-каскад играет важную роль в эмбриональном развитии человека и животных в поддержании плюрипотентности стволовых клеток, их детерминации и дифференцировки. Различают канонический и неканонический сигнальные пути. В ходе совокупности процессов, составляющих канонический Wnt-сигнальный путь, в клетке накапливается β-катенин, который проникает в клеточное ядро, связывается с Т-клеточными факторами и таким образом функционирует как транскрипционный фактор, регулирующий активность множества генов. В норме работа Wnt-каскада жестко регулируется и в отсутствии сигнала Wntβ-катенин деградирует в протеосоме. Однако в результате различных событий Wnt-каскад может быть запущен, что повлечет за собой накопление β-катенина. Показано, что нарушениями в работе канонического сигнального пути сопровождаются многие виды онкологических заболеваний, такие, как рак кожи, рак легких, рак груди, рак кишечника и прочие, в том числе рак шейки матки [66, 88, 170].

Существует множество причин несвоевременной активации Wnt-каскада, одним из факторов, влияющих на работу сигнального пути, является белок p53. Изначально была отмечена корреляция между активностью канонического Wnt-каскада (в частности количеством β-катенина) и низким содержанием p53 в клетке [139]. После чего были проведены исследования, показавшие, что количество p53 напрямую влияет на количество и транскрипционную активность β-катенина, однако точный молекулярный механизм взаимодействия пока не установлен.

Предполагается, что p53 осуществляет регуляцию Wnt-каскада посредством транскрипции молекул группы микроРНК-34, которые напрямую влияют на посттранскрипционную активность мРНК, кодирующих белки-участники Wnt сигнального пути [164]. Другим возможным механизмом запуска Wnt-каскада являются мутации в генах, кодирующие белки-участники сигнального пути [170, 178]. Однако зачастую в клетках с повышенным содержанием β-катенина не наблюдается никаких мутаций в генах, имеющих отношение к Wnt-каскаду. Одним из основных регуляторов Wnt-сигнального пути является белок WIF1 (Wnt Inhibitory factor 1). Данный белок связывается с Wnt и тем самым предотвращает инициирование каскада. Среди способов его регуляции следует отметить метилирование, как наиболее часто встречающееся при опухолевых заболеваниях. Метилирование является эпигенетической модификацией (изменение молекулы ДНК без изменения генома), при которой к 5 атому углерода в молекуле цитозина из CpG динуклеотида присоединяется метильная группа. Зачастую CpG динуклеотиды объединяются в так называемые CpG острова, расположенные преимущественно в промоторной области гена [151]. Метилирование относится к механизмам регуляции экспрессии генов и препятствует транскрипции ДНК, по этой причине данный вид эпигенетической модификации – объект пристального изучения. Логично предположить, что в случае аномального метилирования промоторов различных генов (гиперметилирование для генов-супрессоров опухолевого роста и гипометилирование для онкогенов) будет наблюдаться развитие заболевания. Данная гипотеза подтверждается другими исследованиями [101, 145].

Так, в ряде работ было установлено, что фактор WIF1 находится в неактивном состоянии в злокачественных опухолях различной локализации. И, наоборот, восстановление экспрессии данного гена способствует выраженной опухолевой супрессии, при этом основным механизмом инактивации фактора WIF1 является ДНК – метилирование, и как следствие эпигенетическое выключение кодирующего его гена, происходящее на ранних этапах онкогенеза [203, 221]. Так, инактивация гена WIF1 посредством аномального промоторного

метилирования является достаточно частым событием при раке груди и гепатоцеллюлярной карциноме [108, 141]. В работе Delmas A. L. и соавт. (2011), целью которой явилась оценка статуса метилирования гена WIF1 у женщин с плоскоклеточным раком шейки матки, был установлен высокий уровень метилирования промоторной области данного гена, в результате которого подавлялась его экспрессия в опухолевых тканях [218].

На сегодняшний день имеются убедительные данные о том, что статус метилирования гена WIF1, кодирующего фактор WIF1, может рассматриваться не только в качестве достоверного диагностического биомаркера, но также в качестве клинического и прогностического маркера в процессе комплексного лечения онкозаболеваний [220].

Имеющиеся на сегодняшний день доказательства изменения экспрессии генаWIF1 в злокачественных опухолях различных локализаций, в том числе и при раке шейки матки, обосновывают изучение статуса метилирования промоторной области гена WIF1 в предраковых поражениях шейки матки с целью возможного получения перспективного диагностического и прогностического маркера канцерогенеза шейки матки.

Таким образом, отсутствие четко разработанных критериев для ранней диагностики и прогнозирования интраэпителиальных цервикальных поражений шейки матки, ассоциированных с вирусом патологии человека, обуславливает актуальность и практическую значимость данного исследования.

ГЛАВА 2МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материал исследования

Исследование проводилось в ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В. И. Кулакова» Минздрава России на базе научно – поликлинического отделения (руководитель – доктор мед. наук, профессор – Прилепская В. Н.), лаборатории молекулярно – генетических методов (заведующий – доктор биол. наук, профессор Трофимов Д. Ю.), 1 – го патологоанатомического отделения Центра и на кафедре патологической анатомии имени академика А. И. Струкова ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (заведующий – доктор мед. наук, профессор Коган Е. А.), в Центре коллективного пользования “ГЕНОМ” на базе Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН.

В период с января 2014 г. по май 2016 г. были обследованы 220 женщин, обратившихся в научно – поликлиническое отделение ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В. И. Кулакова» Минздрава Россиии в ГБУЗ ГП 209 ДЗМ филиал 158 для лечения ВПЧ – ассоциированной патологии шейки матки (SIL).

Для клинического исследования были отобраны 220 пациенток в возрасте от 21 до 49 лет, у которых были верифицированы плоскоклеточные интраэпителиальные поражения шейки матки (SIL) и подписавшие добровольное информированное согласие на участие в исследовании. Исследование было одобрено Комиссией по этике биомедицинских исследований Центра (протокол № 8 от 15 августа 2014 г).

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 составил 25,7±2,2 лет) с цитологическим результатом LSIL/HSIL (из них 37пациенток с LSIL и 38 пациенток с HSIL);

2 группа – 75 женщинв в возрасте 30 – 49 лет (средний возраст составил 39,2±7,8 лет) с цитологическим заключением LSIL/HSIL (из них 37 пациенток с LSIL и 38 пациенток с HSIL); в 3 группу (группа сравнения) были включены 70 женщин с цитологическим заключением – NILM (35 женщин в возрасте 21 – 29 лет (средний возраст составил 25,7±2,6 лет) и 35 женщин в возрасте 30 – 49 лет (средний возраст составил 35,9±5,0 лет)) (рис.1.).

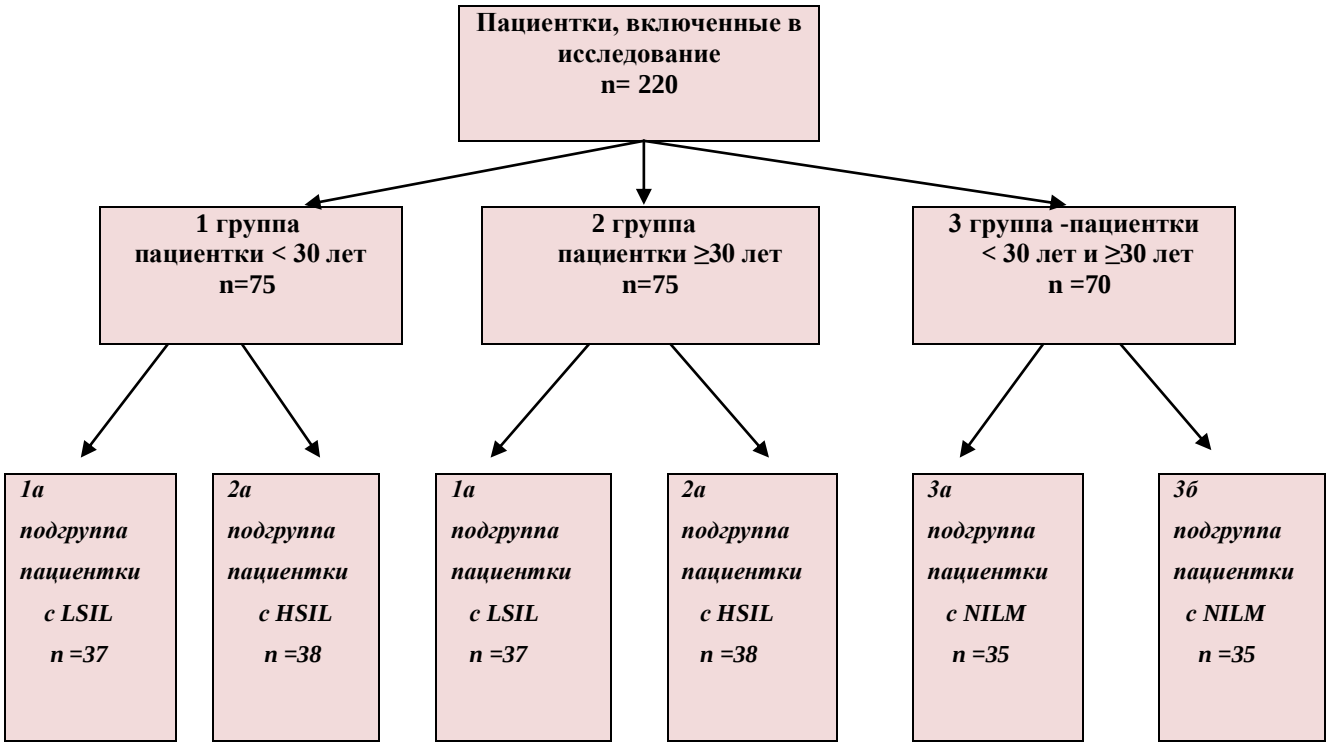


Рисунок 1. Распределение пациенток по группам

2 этап – изучение молекулярно – биологических особенностей SIL шейки матки с использованием иммуноцитохимического метода определения онкобелка p16ink4α и маркера пролиферации Ki67, бисульфитного секвенирования для определения метилирования гена WIF1, полимеразно-цепной реакции (ПЦР) – для изучения количественной экспрессии микроРНК (miR-92a, miR-22, miR-25). Окончательный диагноз верифицировался гистологическим методом.

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 раком шейки матки (SCC), 4 группа – 32 пациентки с NILM. Средний возраст пациенток составил – 32,7±0,5 лет (рис.2).

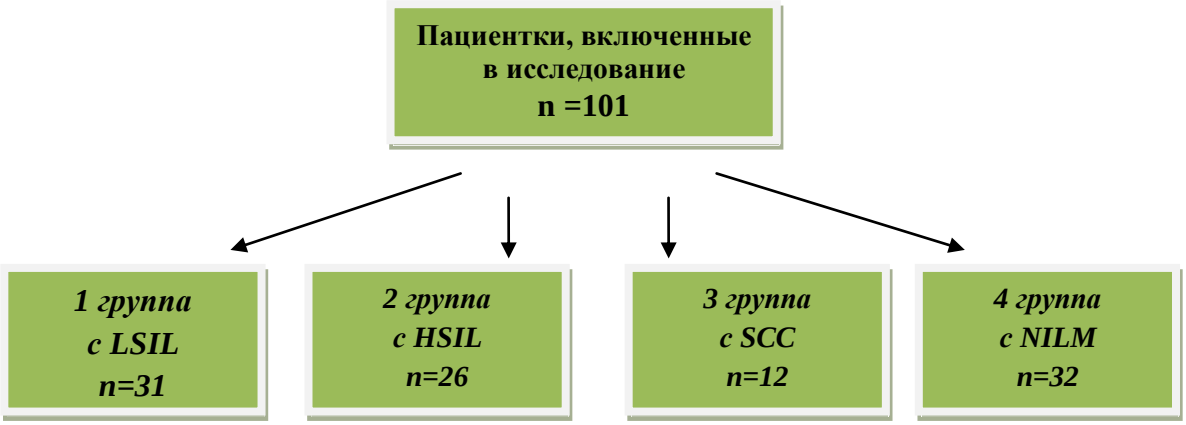


Рисунок 2. Распределение пациенток по группам

Основная группа

Критерии включения:

1. Женщины в возрасте 21- 49 лет.
2. Плоскоклеточные интраэпителиальные поражения шейки матки различной степени тяжести, подтвержденные данными цитологического и/или гистологического методами исследования.
3. Способность выполнять требования протокола.
4. Подписанное информированное согласие на участие в исследовании.

Критерии исключения:

1. Беременность.
2. Послеродовый период и лактация.
3. Психические нарушения.
4. Глубокая инвалидизация.
5. Отсутствие возможного следования протоколу.

Группа сравнения

Критерии включения:

1. Женщины в возрасте 21 - 49 лет.
2. Отсутствие плоскоклеточных интраэпителиальных поражений шейки матки.
3. Подписанное информированное согласие на участие в исследовании.

Критерии исключения:

1. Беременность.
2. Послеродовый период и лактация.
3. Отсутствие возможного следования протоколу.

2.2 Методы исследования

1. *Клинический метод* – (жалобы, анамнез, репродуктивная функция, общий и гинекологический осмотр).
2. *Расширенная кольпоскопия* проводилась всем отобранным пациенткам.
3. *Молекулярно-биологические методы* – проводился забор мазков из цервикального канала для проведения ВПЧ - генотипирования с помощью ПЦР - РВ, определение уровня экспрессии микроРНК методом ПЦР и статуса метилирования гена WIF1 методом бисульфитного секвенирования.
4. *Жидкостная цитология* – проводилось всем пациенткам.
5. *Морфологические методы исследования* – (гистологическое исследование биопсийного материала) – прицельная биопсия шейки матки проводилась всем пациенткам с ненормальной цитологией и кольпоскопической картиной для верификации окончательного диагноза.
6. *Иммуноцитохимический метод (Ki67, p16ink4α).*
7. *Консультация онколога по показаниям.*

Клинический осмотр

Сбор клинико-анамнестических данных включал в себя указание паспортных данных, сведений об их профессиональной деятельности, жалоб

пациенток, возраста наступления менархе и характера менструального цикла; сроков установления ритма менструаций, первый коитус, количество половых партнеров, паритет, данные о контрацепции, перенесенные гинекологические заболевания, ИППП, наличие вредных привычек, наследственность, онкологические заболевания органов репродуктивной системы в анамнезе, в том числе предраковые заболевания и рак шейки матки у близких родственников обследуемых. Гинекологическое обследование включало осмотр наружных половых органов, исследование влагалища и шейки матки с помощью зеркал, в ходе которого оценивали состояние слизистой оболочки влагалища, шейки матки, вульвы. В зеркалах оценивали размер и форму шейки матки, состояние наружного зева, распространенность патологического процесса. При бимануальном влагалищном исследовании оценивали величину матки, ее консистенцию, форму, состояние придатков матки.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Цитологическое исследование (жидкостная цитология) (технология BD SurePath с автоматизированной системой просмотра цитологических препаратов BD FocalPoint GS)

Цитологическое исследование проводили в 1-ом патологоанатомическом отделении ФБГУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава Россиии на кафедре патологической анатомии имени академика А. И. Струкова ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (заведующий – доктор мед. наук, профессор Коган Е.А). Забор материала проводился с поверхности шейки матки – экзоцервикса и из цервикального канала – эндоцервикса специальной щеткой со съемной головкой «Cervix–Brush». Конус щеточки направлялся в цервикальный канал, остальная часть щетки прижималась к поверхности экзоцервикса и производилось 5 полных круговых вращений – три по часовой стрелке и два – против часовой стрелки. Перед забором материала шейка матки тщательно очищалась от слизи ватным тампоном, так как слизь в дальнейшем затрудняет интерпретацию результатов. В дальнейшем щеточку с материалом

опускали в контейнер с жидкой транспортной средой и тщательно ее ополаскивали. Необходимым условием являлось полное погружение «щетинок» cervix–brush в транспортную среду. В особом контейнере с жидким консервантом материал направлялся в лабораторию для приготовления мазка – микропрепарата SurePath на специальном оборудовании. Жидкая суспензия клеток шейки матки превращалась в детально окрашенный равномерный тонкий слой клеток. Микропрепарат SurePath - это сохранная группа окрашенных клеток, сосредоточенных в небольшом круге в центре предметного стекла. Воздушные пузырьки, помехи, ухудшающие видимость, перекрытие клеток и инородные тела устранялись.

Каждый готовый микропрепарат SurePath подвергался компьютерному анализу на специальной роботизированной диагностической станции FocalPoint. Если микропрепарат содержал участки с атипичными клетками, компьютер в автоматическом режиме выявлял эти участки и запоминал их расположение на стекле. Далее мазок исследовался врачом цитологом с помощью особого микроскопа с компьютерным управлением. Система обеспечивает концентрацию внимания врача исключительно на участках с атипией, если они уже были предварительно обнаружены компьютером.

Интерпретация результатов цитологического исследования проводилась по классификации Бетесда (2014 г) [4, 57].

Иммуноцитохимическое исследование

Проводилось в 1-ом патологоанатомическом отделении ФБГУ «НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова» Минздрава России и на кафедре патологической анатомии имени академика А. И. Струкова ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (заведующий – доктор мед. наук, профессор Коган Е. А).

Иммуноцитохимическое определение экспрессии молекулярного онкомаркера – p16ink4α и маркера пролиферации Ki67 производили из образцов тканей, полученных методом жидкостной цитологии с использованием диагностического набора CINtec© при взаимодействии с крысиными антителами.

На первом этапе для получения гомогенной клеточной суспензии встряхивали контейнер (с помощью шейкера) в течение 20-30 минут. Клеточную суспензию прокручивали в цито – центрифуге «Cytopsin®4» «Thermoscientific», в результате чего под действием центробежной силы клетки осаждались на стекле на участке около 0,5 см в диаметре с формированием многослойного мазка. Жидкость, образующаяся в процессе центрифугирования, поглощалась одноразовым фильтром. Многослойный мазок обрабатывали антителами кр16ink4α (CINtec©). Далее оценивалась совместная ядерная и цитоплазматическая реакция. Положительной считалась реакция в тех случаях, когда даже одна атипическая клетка была положительна на белок. В зависимости от интенсивности окрашивания выделяли следующие типы ядерной реакции: отрицательная, слабая очаговая, умеренная и выраженная экспрессия онкобелка. Отсутствие экспрессии онкомаркеров при жидкостной цитологии относили к норме.

Молекулярно-биологические методы (ПЦР в реальном времени)

Генотипирование ВПЧ с определением вирусной нагрузки проводилось в лаборатории молекулярно – генетических методов (заведующий – доктор биологических наук, профессор Трофимов Д.Ю.).

Метод позволяет провести количественное определение 21 типа ВПЧ (HPV КВАНТ - 21) (16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 44, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82, 6, 11) и генотипирование вируса в режиме реального времени. Амплификацию осуществляли в режиме “реального времени” на приборе «ДТ –primer 5 M1» («ДНК-Технология», Россия). Измерение уровня флуоресценции проводили на каждом цикле амплификации по каналам FAM, HEX, ROX и Cy5. Обработка результатов проводилась автоматически с помощью программного обеспечения к приборам. Выявление генотипа ВПЧ <3 Lg (ВПЧ/105 клеток) – клинически малозначимая вирусная нагрузка, от 3 Lg до 5 Lg (ВПЧ/105 клеток) – клинически значимая вирусная нагрузка, более >5 Lg (ВПЧ/105 клеток)– клинически высокозначимая вирусная нагрузка.

Соскоб эпителиальных клеток из цервикального канала для исследования осуществляли с помощью зондов фирм «Medscand» (Швеция) и Abbott (США) в транспортный контейнер с физиологическим раствором. Далее полученный материал в течение 10 мин. подвергался центрифугированию при 13000G. Полученный осадок клеток ресуспендировался в 100 мкл физиологического раствора. ДНК из полученных клеток выделяли с помощью отечественных наборов «Проба ГС» («ДНК - Технология», Россия). Лизис клеток достигался благодаря использованию хаотропного агента (с последующей сорбцией нуклеиновых кислотна твердом носителе), отмывкой и вымыванием ДНК из сорбента. Объем образцов после выделения составил 100 мкл.

Cobas HPV – test (Roche Molecular Systems, USA) на базе платформы Cobas 4800. Cobas 4800 – полностью автоматизированная система, которая выделяет наличие ДНК ВПЧ по трем отдельным каналам: индивидуально ДНК ВПЧ 16 и ДНК ВПЧ 18 и общий пул ДНК других 12 высокоонкогенных генотипов ВПЧ (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 и 68).

Расширенная кольпоскопия

Расширенную кольпоскопию (РКС) проводили с помощью видеокольпоскопа «SCANER Colposcope MK 200» с использованием 8-20 кратного увеличения. РКС проводили по общепринятой методике. Вначале исследовали шейку матки без обработки, затем после обработки 3% раствором уксусной кислоты и 2% водным раствором Люголя (проба Шиллера). Оценивали состояние эпителия шейки матки, влагалища, вульвы и перианальной области. Для описания кольпоскопической картины использовалась международная кольпоскопическая терминология, одобренная Международной ассоциацией по патологии шейки матки и кольпоскопии (IFCPC) (Рио-де-Жанейро 2011 г.) [146].

<u>Общие положения:</u>

- Адекватная/неадекватная кольпоскопическая картина (с указанием причины, например, объективная оценка затруднена в виду воспаления, кровотечения, рубцовых изменений и т.д.).

- Граница между МПЭ и ЦЭ: визуализируется полностью; частично; не визуализируется.
- Зона трансформации тип I, II, III.

I. Нормальная кольпоскопическая картина

- Оригинальный многослойный плоский эпителий (зрелый, атрофичный).
- Цилиндрический эпителий (эктопия).
- Метапластическийэпителий (наботовы кисты, открытые железы).
- Децидуоз (при беременности).

II. Аномальная кольпоскопическая картина

- Общие принципы оценки:

  Локализация поражения: в зоне трансформации или вне зоны трансформации (локализация поражений по часам условного циферблата).

Оценка размеров поражения:

- Степень I (слабовыраженные поражения):

  Тонкий ацето-белый эпителий с неровными нечеткими краями.

  Нежная мозаика.

Нежная пунктация.

- Степень II (выраженное поражение):

  Плотный ацето-белый эпителий с четкими контурами.

  Быстрое появление ацето-белого эпителия.

  Ацето-белый плотный ободок вокруг открытых желез (крипт).

  Грубая мозаика.

Грубая пунктация.

Внутри поражения – контуры более плотного ацето-белого участка.

Признаки бугристости.

- Неспецифические признаки:

Лейкоплакия (кератоз, гиперкератоз).

Эрозия.

Окрашивание р-ром Люголя: йодпозитивное/йоднегативное.

- Подозрение на инвазивную:

Атипичные сосуды.

Дополнительные признаки: «ломкие» сосуды, неоднородная поверхность; экзофитные поражения, некроз,

изъязвление, опухолевидное/крупное новообразование.

III. Другие кольпоскопические картины

Врождённая зона трансформации.

Кондиломы.

Последствия ранее проведенного лечения.

Стеноз.

Врождённые аномалии.

Воспаление.

Полипы (эндоцервикальный/ экзоцервикальный).

Эндометриоз.

Количественная экспрессия микроРНК

(функциональных генов человека эпителия шейки матки)

Определение количественной экспрессии микроРНК проводилось в лаборатории молекулярно – генетических методов (заведующий – доктор биологических наук, профессор Трофимов Д. Ю.).

Для исследования экспрессии микроРНК соскобы эпителия шейки матки собирали с помощью урогенитальных зондов, собранный материал переносили в пробирки с физиологическим раствором и центрифугировали при 1600g в течение 10 минут. Осадок растворяли в 100 мкл физиологического раствора. Суммарную РНК выделяли с использованием набора реагентов miRNeasy Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) в соответствии с инструкцией к нему. Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием шпилечной затравки, предложенной Chen и соавт., (2005), к 3’ концу которой дошивались специфические для каждой

микроРНК 7-членные олигонуклеотиды. Коротко: к 5 мкл, выделенной из образца суммарной РНК, добавляли 7 мкл RT-смесь и олигонуклеотидной затравки (3 пМ). Реакция проводится 30 минут при 16°С, 30 минут при 42°С и 5 минут при 85°С. Полимеразная цепная реакция проходила в объеме 20 мкл (18,5 мкл PCR-смесь; 1,5 мкл к ДНК). Реакция проводилась 45 циклов в режиме 95°С – 15 сек, 50°С – 2 минуты и 62°С – 15 сек. Описание использованных в работе микроРНК приведено в таблице 2, затравок и праймеров - в таблице 3.

Таблица 2

Описание микроРНК, исследованных в данной 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’

Таблица 3

Описание затравок и праймеров приведено в таблице 2

микроРНК	Затравка для обратной транскрипции	Специфический праймер (левый)
miR-22	*5'- gtcgtatccagtgcagggtccgaggtattcgc actg gatacgac*acagttc	Gccgaagctgccagttgaag
miR -25	*5'- gtcgtatccagtgcagggtccgaggtattcgc actg gatacgac*tcagacc	cccccattgcacttgtctcg
miR-92a	*5'- gtcgtatccagtgcagggtccgaggtattcgc actg gatacgac*agcattgc	Ggcgtattgcacttgtcccg

Бисульфитное секвенирование гена WIF1

Определение статуса аномального метилирования гена WIF1 проводилось методом бисульфитного секвенирования в центре коллективного пользования “ГЕНОМ” на базе Института молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН.

Для выявления уровня метилирования гена WIF1 были взяты образцы из цервикального канала с помощью щетки «Cervix-Brush» и помещены в пробирку с

буфером PBS (натрий-фосфатный буфер) (Cell Signalling Technologies, США), этанол (Sigma-Aldrich, США). Полученные образцы были трижды промыты буфером PBS и заморожены при температуре -20ºС перед отправкой на исследование. Полученные образцы клеток с зоны трансформации шейки матки гомогенизировали в гомогенизаторе FastPrep®-24 (MP Biomedicals, США) с добавлением матрикса D. Из полученных образцов выделяли ДНК с использованием и по протоколу набора ReliaPrep™ gDNA Tissue Miniprep System (Promega, США). Концентрацию ДНК определяли флуориметрически с использованием стандартного набора Qubitds DNA HS Assay Kit на флуориметре Qubit 2.0 (Life Technologies, США). *Бисульфитная конверсия:* 150 нг, полученной ДНК, подвергали бисульфитной конверсии (переводу не метилированных остатков цитозина в тимин при сохранении метилированных остатков цитозина в неизмененном виде) с использованием набора innu CONVERT Bisulfite Basic Kit (Analytik Jena, Германия). Концентрацию конвертированной ДНК определяли фотометрически в планшете µ-drop (BMG Labtech, Германия) с использованием мультидетектора CLARIO star (BMG Labtech, Германия).

Проведение ПЦР- 20нг бисульфит-конвертированной ДНК отбирали для последующей «тачдаун» ПЦР-амплификации с использованием полимеразной смеси GoTaq® Hot Start Green Master Mix (Promega, США) и праймеров, позволяющих амплифицировать участок промотора гена WIF1 от 554 – до 140 нуклеотидов достарт кодона, содержащих, помимо комплементарной последовательности, универсальную последовательность M13 на 5’- конце:

WIF1-M13F 5’-gttttcccagtcacgacGAGTGATGTTTTAGGGGTTT -3’

WIF1-M13R 5’-ggaacagctatgaccatgCCTAAATACCAAAAAACCTAC -3’

Наличие и размер (длину) ПЦР – продуктов определяли посредством электрофореза в 2,5% агарозном геле с маркерами молекулярного веса 100 bp Molecular Ruler (Bio – Rad, США). Полученные ПЦР – продукты выделяли из геля с использованием набора innu PREP DOUBL Epure Ki (Analytik Jena, Германия).

Секвенирование проводилось по стандартному протоколу с использованием прямых праймеров и набора реактивов ABI PRISM® BigDye™ Terminatorv. 3.1.

Анализ продуктов реакции проводили на автоматическом секвенаторе Applied Biosystems 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems, США) с использованием универсальных праймеров M13:

M13F 5'-GTTTTCCCAGTCACGAC -3'

M13R 5'-GGAAACAGCTATGA

Морфологические методы исследования

(гистологическое исследование биоптатов шейки матки)

Морфологические исследования биоптатов шейки матки проводили в 1-ом патологоанатомическом отделении ФБГУ «НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова» Минздрава Россиии на кафедре патологической анатомии имени академика А. И. Струкова ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (заведующий – доктор мед. наук, профессор Коган Е.А).

Всем пациенткам с аномальной кольпоскопической картиной проводили прицельную биопсию шейки матки под контролем кольпоскопа с применением радиохирургии (аппарат Сургитрон). По показаниям проводили выскабливание цервикального канала. Биоптированную ткань фиксировали 10% раствором нейтрального формалина с последующей его заливкой в парафин. Депарафиновые срезы толщиной 5 микрон окрашивали гематоксилин - эозином. Препараты исследовали при помощи светового микроскопа «Leica».

2.3. Методы статистической обработки

Анализ и статистическая обработка полученных результатов выполнялись при помощи специализированного программного обеспечения для проведения статистических исследований SPSS 22.0 («IBM», США). Визуализация полученных результатов в виде графиков и гистограмм выполнялась с использованием Microsoft Excel 2016 («Microsoft Corporation», США).

Полученные в ходе проведенного исследования результаты вносились в разработанную компьютерную реляционную базу данных (на базе СУБД Microsoft Access 2016 и табличного процессора Microsoft Excel 2016). Далее выполнялась математико-статистическая обработка полученных данных.

При помощи вышеуказанных программных пакетов определялись параметры описательной статистики: средние арифметические значения, стандартные и среднеквадратичные отклонения, медиана и прочие. Соответствие данных нормальному распределению было подтверждено с использованием критерия Колмогорова – Смирнова.

Достоверность различий средних рассчитывалась с использованием t-критерия Стьюдента, а при множественных сравнениях – критерия Ньюмена-Кейлса и критерия Даннета. Среди непараметрических методов использовали вычисление U-критерия Манна – Уитни. Достоверными считались различия при $p \leq 0,05$.

Для нахождения связей (зависимостей) между нормально распределенными количественными признаками использовался корреляционный анализ по методу Пирсона. Сила предполагаемой взаимосвязи между величинами определялась по значению коэффициента корреляции и уровню достоверности корреляции. Различия между показателями считались статистически значимыми также при $p \leq 0,05$.

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1.Клиническая характеристика обследуемых женщин

В зависимости от возраста и результатов лабораторных методов исследования (жидкостная цитология, ВПЧ – генотипирование) пациентки были разделены на 3 группы: 2 основные группы и 1 группа сравнения.

1 группа (основная) – 75 (34,1%) пациенток в возрасте 21 – 29 лет (средний возраст составил 25,7±2,2 лет).

2 группа (основная) – 75 (34,1%) пациентокв в возрасте 30 – 49 лет (средний возраст составил 39,2±7,8 лет).

3 группа (сравнения) – 70 (31,8%) пациенток (средний возраст составил 31,5±6,6 лет).

В зависимости от выявленной патологии шейки матки пациентки 1 и 2 группы были разделены на подгруппы:

1 группа:

1а подгруппа – 37 женщин с LSIL

1б подгруппа – 38 женщин с HSIL

2 группа:

2а подгруппа – 37 женщин с LSIL

2б подгруппа – 38 женщин с HSIL

3 группа:

3а подгруппа – 35 женщин без SIL, в возрасте 21 – 29 лет.

3б подгруппа – 35 женщин без SIL, в возрасте 30 – 49 лет.

При анализе социального статуса пациенток, включенных в исследование, было установлено, что более половины лиц являлись служащими – 144 (65,4%), рабочими – 23 (10,4%), студентами – 13(5,9%), пенсионерами – 3 (1,4%). Неработающими являлись – 37 (16,8%) пациенток.

Сравнительный анализ социального статуса между 1, 2 и 3 - ей группами не выявил значимых различий (таблица 4).

Таблица 4

Социальный статус пациенток включенных в исследование

Социальный статус	1 группа <30 лет		2 группа ≥ 30лет		3 группа <30 лет		3 группа ≥30 лет	
	n=75		n= 75		n=35		n=35	
	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%
Служащие	47	62,7	53	70,6	20	57,1	24	68,6
Рабочие	7	9,3	9	12	3	8,6	4	11,4
Студенты	8	10,7	-	0	4	11,4	1	2,9
Пенсионеры	-	0,0	2	2,6	-	0,0	1	2,9
Инвалиды	-	0,0	-	0,0	-	0,0	-	0,0
Не работающие	13	17,3	11	14,6	6	17,1	7	20,0

p>0, 05 *статистически значимых различий между группами не выявлено*

При анализе семейного положения женщин, включенных в исследование видно, что более половины пациенток (58,6%) состояли в браке (таблица 5).

Таблица 5

Распределение обследуемых женщин по семейному положению

Семейное положение	1 группа < 30 лет		2 группа ≥ 30лет		3 группа <30 лет		3 группа ≥30 лет	
	n=75		n= 75		n=35		n=35	
	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%
В браке	41	54,6	45	60,0	21	60	22	62,8
Не замужем	30	40,0	22	29,3	10	28,5	7	20,0
Вдова	0	0	1	1,33	0	0	1	2,8
Разведена	3	4	5	6,6	3	8,6	4	11,4
Раздельное проживание	1	1,33	2	2,7	1	2,8	1	2,8
Итого	75	100	75	100	35	100	35	100

p>0, 05 *статистически значимых различий между группами не выявлено*

Более половины пациенток имели высшее образование, около трети – средне специальное (таблица 6).

Таблица 6

Распределение обследуемых женщин по уровню образования

Образование	1 группа <30 лет		2 группа ≥ 30лет		3 группа <30лет		3 группа ≥ 30лет	
	n=75		n= 75		n=35		n=35	
	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%
9-11 классов	2	2,7	2	2,7	1	2,8	1	2,8
Среднее специальное	25	33,3	24	32,0	12	34,2	10	28,5
Высшее	48	64,0	49	65,3	22	62,8	24	68,5
Итого:	75	100	75	100	35	100	35	100

Изучение менструальной функции исследуемых женщин (возраст менархе, продолжительность менструального цикла, регулярность и другие особенности) показало, что возраст наступления менархе в 1, 2 и 3 группах был сопоставим и составлял 13,2±1,2 лет, 13,1±1,2 и 13,1±1,1 лет соответственно. Средняя продолжительность менструального цикла в 1 и во 2 группах составила 29,8±5,4 и 28,6±4,5 дней, средняя длительность кровотечения 4,9±1,1 и 4,9±1,2 дней соответственно; в группе сравнения 28,8±3,2 дней и 4,9±1,0 дней. Таким образом, статистически значимых различий в группах выявлено не было ($p>0,05$).

У 208 обследуемых женщин (94,5%) менструации начались своевременно, в возрасте 11-14 лет. Позднее менархе (15-18 лет) наблюдалось у 12 женщин (5,4%) (таблица 7).

Таблица 7

Возраст менархе у обследованных женщин

Возраст менархе	1 группа <30 лет		2 группа ≥30 лет		3 группа <30 лет		3 группа ≥ 30лет	
	n=75		n=75		n=35		n=35	
	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%
11- 12 лет	23	30,7%	22	29,3%	13	37,1%	11	31,4%

13- 14 лет	48	64,0%	49	65,3%	19	54,3%	23	65,7%
15 лет и старше	4	5,3%	4	5,3%	3	8,6%	1	2,9%

p>0,05 статистически значимых различий между группами не выявлено

У 168 (76,4%) женщин менструации установились сразу, у 37 (16,8%) женщин через 6 месяцев – 1 год, у 15 (6,8%) менструальный цикл не установился и возникал с интервалом 1,5 – 4 месяцев.

В 1 и 2 группах у 125 (83,3%) больных менструальный цикл был регулярный, у каждой седьмой пациентки 21 (14%) отмечались нарушения менструального цикла по типу олигоменореи, у 1 (0,6%) пациентки была вторичная аменорея, 3(2,0%) пациентки находились в постменопаузе. Болезненные менструации в анамнезе или в период обследования отметили 28 (19,3%) женщин.

В 3-ей группе у 57 (81,4%) пациенток менструальный цикл был регулярный, у 11 (15,7%) отмечались нарушения менструального цикла по типу олигоменореи, 2 (2,8%) пациентки находились в постменопаузе. Сравнительный анализ достоверных различий между группами не выявил.

Таким образом, анализ менструальной функции исследуемых женщин показал, что у большинства женщин менархе было своевременным, менструальный цикл регулярным, продолжительность цикла и длительность менструального кровотечения не превышала аналогичные показатели в контрольной группе (таблица 8).

Таблица 8

Особенности менструальной функции у наблюдаемых пациенток

Характер менструации		1 группа < 30 лет		2 группа ≥ 30лет		3 группа < 30 лет		3 группа ≥30 лет	
		n= 75		n=75		n=35		n=35	
		Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%
Период становления	сразу	56	74,7	59	78,6	25	71,4	28	80,0
	Через 0,5-1год	13	17,3	12	16	7	20,0	5	14,3
	Не установился	6	8,0	4	5,3	3	8,6	2	5,7

Характер нарушений менструации	Олигоменорея	11	14,7	10	13,3	4	11,4	5	14,3
	Аменорея	0	0	1	1,3	0	0	1	2,9
	Аномальные маточные кровотечения	2	2,7	3	4	1	2,9	1	2,9

p>0,05 статистически значимых различий между группами не выявлено

Оценка половой жизни пациенток выявила, что все женщины, включенные в исследование, вели половую жизнь. Учитывая необходимость оценки различных аспектов поведения больных с SIL шейки матки, был проведен углубленный анализ особенностей полового поведения. Раннее начало половой жизни (до 18 лет) наблюдалось в 1 группе – у 25 (33,3%) пациенток, во 2 группе – у 29 (38,6%) в 3 – ей группе – у 19 (27,1 %) соответственно.

Средний возраст начала половой жизни в 1 и 2 группах составил 17,7±2,0*лет и 17,2±1,9*лет соответственно, в то время как в группе сравнения, средний возраст начала половой жизни был достоверно позже и составил 19,5±1,7 лет (*p<0,05) (таблица 9).

Таблица 9

Возраст начала половой жизни у наблюдаемых женщин

Возраст	1 группа <30 лет		2 группа ≥ 30лет		3 группа <30 лет		3 группа ≥ 30 лет	
	n=75		n=75		n=35		n=35	
	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%
12-15	5	6,7	4	5,3	1	2,9	1	2,9
16-19	54*	72,0*	60	80*	17	48,6	15	42,9
20-24	15*	20,0*	10	13,3*	16	45,7	17	48,6
25 и более	1	1,3	1	1,3	1	2,9	2	5,7
В среднем	17,7±2,0*		17,2±1,9*		19,3±1,6		19,7±1,8	

**p <0,05 значимые различия по сравнению с контрольной подгруппой*

Детальный анализ начала половой жизни среди групп исследуемых показал, что женщины контрольной группы достоверно позже вступали в половые отношения (20-24 года), чем женщины 1 группы (p<0,05) и 2группы (p<0,001).

С целью оценки сексуальной активности был проведен анализ половой жизни пациенток. В группах с SIL 140 (93,3%) женщин в течение жизни имели более двух половых партнеров, в контрольной группе данный показатель составил 55 (78,5%) пациенток (*p<0,05). Среднее количество половых партнеров в 1 группе составило – 2,9±1,0*, во 2 группе – 3,2±1,1*, в контрольных подгруппах 2,0±0,9 и 2,3±0,9 соответственно (*p<0,05). Более 4 – х половых партнеров в 1 группе отметили – 19 (25,3%) пациенток, во 2 группе – 26 (34,6%), что является достоверно больше, чем в контрольной группе – 4 (5,7%) (p<0,01) (таблица 10).

Таблица 10

Количество половых партнеров женщин, включенных в исследование

Количество половых партнеров	1 группа <30 лет		2 группа ≥ 30лет		3 группа <30 лет		3 группа ≥30 лет	
	n= 75		n=75		n=35		n= 35	
1	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%
	6	8,0*	4	5,3	9	25,7	6	17,1
2	20	26,7*	13	17,3*	19	54,3	17	48,6
3	30	40,0*	32	42,6	6	17,1	9	25,7
4 и более	19	25,3*	26	34,6*	1	2,9	3	8,6
В среднем	2,9±1,0*		3,2±1,1*		2,0±0,9		2,3±0,9	

**p <0,05 значимые различия по сравнению с контрольной подгруппой*

В группах с SIL 139 (92,6%) женщин вели регулярную половую жизнь. Анализ сексуальных предпочтений выявил, что орогенитальные контакты практиковали 68 (45,3%) пациенток, анальный секс 32 (21,3%) пациентки. В контрольной группе нетрадиционный секс практиковался значительно реже (p<0,05).

При изучении контрацептивного анамнеза было установлено, что до начала наблюдения 135 (90,0%) женщина с SIL применяли контрацепцию, не использовали – 15 (10,0%). Данные об основных видах контрацептивных методов представлены в таблице 11.

Таблица 11

Частота использования различных методов контрацепции пациентками клинических групп

Метод контрацепции	1 группа <30 лет		2 группа ≥ 30лет		3группа <30лет		≥ 30 лет	
	n= 75		n=75		n= 35		n=35	
	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%
Гормональная контрацепция:	28	37,3	22	29,3	12	34,3	8	22,9
КОК	18	24,0	19	25,3	8	22,9	7	20,0
Влагалищное кольцо ново- ринг	3	4,0	2	2,6	3	8,6	1	2,9
Пластырь Евра	7	9,3	1	1,3	1	2,9	0	0,0
Барьерные методы контрацепции:	23	30,6	17	22,6	15		17	48,6
Презервативы	18	24,0	14	18,6	18	51,4	15	42,9
Спермициды	5	6,7	3	4	1	2,9	3	8,6
Физиологические методы:	15	20,0	19	25,3	6	17,1	7	
Прерванный половой акт	12	16,0	15	20	5	14,3	6	
Ритмический метод	3	4,0	4	5,3	1	2,9	1	2,9
ВМС	2	2,7	9	12	1	2,9	3	8,6
Не использовали	7	9,3	8	10,6	0	0,0	1	2,9

p>0,05*статистически значимых различий между группами не выявлено*

Таким образом, раннее начало половой жизни, количество и частая смена половых партнеров, нетрадиционный секс может явиться фактором риска инфицирования ВПЧ и развития патологии шейки матки ассоциированные с ним.

Следует отметить, что в таблице 11 представлены методы контрацепции, которые применялись регулярно в течение 1 - го и более лет. При детальном

анализе исследуемых групп статистически значимых отличий между группами выявлено не было (p>0,05).

Однако следует отметить статистически значимые различия между группами (p<0,05) только в отношении барьерных методов контрацепции (использование презервативов), различия достоверно чаще встречались в 3 группе среди женщин старше 30 лет. Полученные данные о значимых отличиях в частоте использования барьерных методов контрацепции между пациентками с SIL и группой сравнения косвенно свидетельствуют о возможной протективной роли данного фактора в развитии заболевания.

При изучении генеративной функции пациенток общее число беременностей 1 группы составило 53 (70,6%), 2 группы 61 (81,3%) в 3 – ей группе данный показатель составил 55 (78,5%). Среднее количество родов в 1 и 2 группах составило 1,0±0,7 и 1,19±0,6* соответственно. В контрольных подгруппах среднее количество родов у женщин до 30 лет составило 1,0±0,8 у женщин старше 30 лет 1,4±0,9 (p>0,05). Данные представлены в таблице 12.

Таблица12

Паритет беременностей у исследуемых женщин

Показатель	1 группа <30 лет		2 группа ≥ 30лет		3 группа <30 лет		3 группа ≥30 лет		OR (95%,	p 1-3	OR (95%, CI) 2-3 гр	*p* 2-3
	n=75		n=75		n= 35		n=35					
	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%				
Число беременностей:	53	70,7	61	81,3	29	82,9	32	91,4	0,85 (0,69 - 1,05)	0,1429	0,89 (0,77 - 1,03)	0,1725
0	22	29,3	14	18,7	6	17,1	3	8,6	1,71 (0,76 - 3,84)	0,1429	2,18 (0,67 - 7,09)	0,1725
1	41	54,7	42	56	18	51,4	16	45,7	1,06 (0,73 - 1,56)	0,7519	1,23 (0,81 - 1,85)	0,3142
2	11	14,7	16	21,3	9	25,7	14	40,0	0,57 (0,26 - 1,25)	0,1934	0,53 (0,29 - 0,97)	**0,0406**
3 и более	1	1,3	3	4	1	2,9	2	5,7	0,47 (0,03 - 7,25)	0,6254	0,89 (0,77 - 1,03)	0,6877

*Среднее количество беременностей**	1,04±0,7		1,19±0,6*		1,0±0,8		1,4±0,9			>0.05		>0.05
Число самопризво-льных родов	44	58,7	49	65,3	22	62,9	23	65,7	0,93 (0,68 - 1,28)	0,6745	0,99 (0,74 - 1,33)	0,9688
1	33	44,0	34	45,3	13	37,1	11	31,4	1,18 (0,72 - 1,95)	0,4934	1,44 (0,83 - 2,5)	0,1558
2	10	13,3	12	16,0	8	22,9	10	28,6	0,58 (0,25 - 1,35)	0,2429	0,56 (0,27 - 1,17)	0,1528
3 и более	1	1,3	3	4,0	1	2,9	2	5,7	0,47 (0,03 - 7,25)	0,6254	0,7 (0,12 - 4)	0,7058
Среднее число самопроиз-вольных родов*	0,7±0,7		0,9±0,8*		0,8±0,8		1,1±0,9			>0.05		0.0417
Число кесарево сечения	4	5,7	7	9,3	2	5,7	3	8,6	0,93 (0,18 - 4,86)	0,9356	1,09 (0,3 - 3,96)	0,8958
1	3	4,3	5	6,7	1	2,9	2	5,7	1,4 (0,15 - 12,99)	0,7523	1,17 (0,24 - 5,72)	0,8452
2	1	1,4	2	2,7	-	-	1	2,9	0,47 (0,03 - 7,25)	0,9005	0,93 (0,09 - 9,95)	0,9551
Число искусствен ных абортов	3	4.0	3	4	3	8,6	4	11,4	0,47 (0,1 - 2,2)	0,3854	0,35 (0,08 - 1,48)	0,2057
1	3	4.0	2	2,7	2	5,7	2	5,7	0,7 (0,12 - 4)	0,7058	0,47 (0,07 - 3,18)	0,4843
2	-		1	1,3	1	2,9	2	5,7	0,47 (0,03 - 7,25)	0,6210	0,23 (0,02 - 2,49)	0,2924
3 и более	-		-		-		-		--	-	-	-
Число самопроиз-вольых выкидышей/ внематочных беременнос-тей	2	2.7	2	2,6	2	5,7	2	5,7	0,47 (0,07 - 3,18)	0,4843	0,47 (0,07 - 3,18)	0,4843
1	2	2,7	1	1,3	2	5,7	1	2,9	0,47 (0,07 - 3,18)	0,4843	0,47 (0,03 - 7,25)	0,6254
2	-		1	1,3	-	-	1	2,9	-	0,86 (0,17 - 4,43)	0,47 (0,03 - 7,25)	0,6254

3 и более	-		-		-				-			

**данные представлены как средние (M) ± стандартное отклонение (δ)*
*** Отношение шансов (OR) с 95% доверительным интервалом (CI)*
****p-уровень значимости различий 1 и 2 и 3 груп*

Число самопроизвольных родов в 1 и 2 группах составило 44 (58,7%) и 49 (65,3%), кесарево сечения 4 (5,7%) и 7 (9,3%), искусственное прерывание беременности – 3 (4%) и 3 (4%), число самопроизвольных выкидышей и внематочных беременностей 2 (2,7%) и 1 (1,3%)соответственно. В 3 - ей группе статистически значимых отличий выявлено не было. Число самопроизвольных родов составило у женщин до 30 лет 22 (62,9%), старше 30 лет 23 (65,7%), число кесарево сечения 2 (6,6%) и 3 (7,5%) соответственно, искусственное прерывание беременностей составило 3 (8,6%) и 4 (11,4%), число самопроизвольных выкидышей и внематочных беременностей 2 (5,7%) и 1 (2,9%) (таблица 11).

Изучение анамнеза экстрагенитальных заболеваний у пациенток с SIL и практически здоровых женщин не выявило значимых различий (таблица 13).

Таблица 13

Экстрагенитальные заболевание у исследуемых женщин

Заболевание	1 группа <30 лет	2 группа ≥ 30лет	3 группа <30 лет	3 группа ≥ 30 лет
	n= 75	n=75	n=35	n = 35
Заболевания органов сердечнососудистой системы	0 (0 %)	2 (2,7 %)	1 (2,9 %)	1 (2,9 %)
Заболевания желудочно-кишечного тракта	12 (16 %)	14 (18,7 %)	7 (20 %)	8 (22,9 %)
Заболевания ЛОР органов	11 (14,7 %)	12 (16 %)	4 (11,4 %)	6 (17,1 %)
Заболевания органов мочевыделения, в т.ч.:цистит, мочекаменная болезнь,пиелонефрит	6 (8 %)	5 (6,7 %)	2 (5,7 %)	2 (5,7 %)
Эндокринологические заболевания	0 (0 %)	1 (1,3 %)	1 (2,9 %)	2 (5,7 %)
Ветряная оспа	34 (45,3 %)	36 (48 %)	14 (40 %)	18 (51,4 %)
Корь	7 (9,3 %)	7 (9,3 %)	4 (11,4 %)	4 (11,4 %)

Краснуха	14 (18,7 %)	19 (25,3 %)	5 (14,3 %)	6 (17,1 %)
Эпидемический паротит	2 (2,7 %)	2 (2,7 %)	1 (2,9 %)	1 (2,9 %)
Болезнь Боткина	1 (1,3 %)	2 (2,7 %)	0 (0 %)	0 (0 %)

p>0, 05 статистически значимых различий между группами не выявлено

Заболевания органов сердечно – сосудистой системы включали в себя пролапс митрального клапана, синусовую тахикардию и артериальную гипертензию. Среди перенесенных заболеваний желудочно-кишечного тракта отмечались язвенная болезнь желудка и 12-перстной кишки, хронический гастрит и болезни билиарной системы (ЖКБ, холецистит). Патология ЛОР органов включала в себя хронический тонзиллит, хронический ринит, фарингит. Заболевания мочевыделительной системы были представлены хроническим пиелонефритом, циститом, мочекаменной болезнью. Следует отметить, что к периоду обследования все пациентки находились в стадии ремиссии и не требовали дополнительного специального лечения (p>0,05).

Структура гинекологических заболеваний среди исследуемых групп была представлена как воспалительными, так и инфекционными заболеваниями, по поводу которых все женщины ранее получали антибактериальную, противовоспалительную и иммунотропную терапию. Следует отметить, что частота встречаемости была сопоставима во всех группах. Данные представлены в таблице 14.

Таблица 14

Структура гинекологической патологии у наблюдаемых пациенток

заболевание	1 группа <30 лет	2группа ≥30лет	3 группа <30 лет	3 группа ≥ 30 лет
	n= 75	n=75	n =35	n= 35
Хронический сальпингоофорит	20 (26,7 %)	21 (28 %)	7 (20 %)	8 (22,9 %)
Миома матки	9 (12 %)	11 (14,7 %)	3 (8,6 %)	4 (11,4 %)
Эндометриоз	6 (8 %)	9 (12 %)	2 (5,7 %)	5 (14,3 %)
Хронический эндометрит	5 (6,7 %)	7 (9,3 %)	1 (2,9 %)	3 (8,6 %)

Полипы эндометрия	3 (4 %)	5 (6,7 %)	1 (2,9 %)	3 (8,6 %)
СПКЯ	4 (5,3 %)	2 (2,7 %)	1 (2,9 %)	2 (5,7 %)
Бесплодие	9 (12 %)	7 (9,3 %)	3 (8,6 %)	4 (11,4 %)
Уреаплазменная инфекция	18 (24 %)	19 (25,3 %)	6 (17,1 %)	7 (20 %)
Микоплазменная инфекция	20 (26,7 %)	17 (22,7 %)	4 (11,4 %)	5 (14,3 %)
Хламидиоз	9 (12 %)	6 (8 %)	1 (2,9 %)	2 (5,7 %)
Трихомониаз	6 (8 %)	2 (2,7 %)	1 (2,9 %)	1 (2,9 %)

p>0,05 статистически значимых различий между группами не выявлено

Оперативное лечение по поводу гинекологических заболеваний в 1 группе перенесли 8 (10,6%) женщин, во 2 группе 11 (14,6%)женщин; удаление доброкачественных кист яичников проведено 2 (2,6%) пациенткам 1 группы и 1 (1,3%) пациентке 2 группы, консервативная миомэктомия без вскрытия полости матки была выполнена 3 (4,0%) пациенткам 1 группы и 4 (5,3%) 2 группы, полипэктомия у 2 (2,6%) и 5 (6,6%) пациентам 1 и 2 группы соответственно. Удаление и пластика маточных труб была проведена 1 (1,3% и 1,3%) пациентке 1 и 2 группы. В группе сравнения оперативное лечение проводилось 9 (12,8%) пациенткам; удаление доброкачественных кист яичников проводилось 3 (4,2%) пациенткам, консервативная миомэктомия 2 (2,8%) и полипэктомия 4 (5,7%) пациенткам. Данные об оперативном вмешательстве на органах малого таза существенно не отличались среди пациенток всех исследуемых групп.

При изучении гинекологической патологии в анамнезе особенно тщательно был проведен анализ заболеваний шейки матки вульвы и влагалища (таблица 15).

Таблица 15

Структура патологии шейки матки вульвы и влагалища у наблюдаемых пациенток

Заболевание	1 группа <30 лет	2группа ≥30лет	3 группа <30 лет	3 группа ≥ 30 лет
	n =75	n=75	n = 35	n=35
Остроконечные кондиломы шейки матки	6 (8%)	5 (6,6%)	0	0
Остроконечные кондиломы влагалища	16 (21,3 %)	17(22,6%)	2 (5,7%)	1 (2,9%)
Остроконечные кондиломы вульвы	14 (18,7%)	14(18,6%)	2 (5,7%)	3 (8,6%)
Хронический цервицит	52 (69,3%)	54(72%)	13 (37,1%)	11 (31,4%)
Лейкоплакия шейки матки	20 (26,7%)	21(28%)	4 (11,4%)	4 (11,4%)
Полип ц/к	2 (2,7%)	4 (5,3%)	1 (2,8%)	2 (5,7%)
Эктропион ш/м	4 (5,3%)	7 (9,3%)	2 (5,7%)	2 (5,7%)
Эндометриоз ш/м	2 (2,7%)	4 (5,3%)	0	1 (2,8%)

***p - уровень значимости различий 1 ,2 и 3 групп*

В анамнезе достоверно чаще остроконечные кондиломы шейки матки, влагалища, вульвы встречались у пациентов 1 и 2 группы ($p<0,05$): остроконечные кондиломы шейки матки в 1 группе встречались у 8%, во 2 группе у 6% пациенток, влагалища в 1 группе 21,3%, во 2 группе 22,6% пациенток, вульвы 18,7% и 18,6% соответственно. Также было установлено, что лейкоплакия шейки матки и хронический цервицит достоверно чаще встречалась у пациенток 1 и 2 группы по сравнению с группой сравнения ($p<0,05$).

Заключение

Таким образом, большинство исследуемых женщин были репродуктивного возраста (средний возраст 32,1±5,5 лет), соматически неотягощенными. Детальный анализ клинико-анамнестических данных пациенток 1 и 2 групп выявил достоверно значимые различия в отношении перенесенных ранее различной патологии шейки матки по сравнению с 3 группой (группой сравнения). В 1 и 2 группах с SIL женщины достоверно раньше вступали в интимные отношения, а также среднее количество половых партнеров в данных группах достоверно было выше, чем в группе сравнения. По остальным показателям статистически значимых различий выявлено не было.

3.2. Результаты ВПЧ - генотипирования у пациенток с SIL шейки матки в возрасте до 30 лет и старше

Всем пациенткам, включенным в исследование (n=220), проведено ВПЧ – генотипирование с помощью полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Сравнивали распространенность генотипов ВПЧ у женщин с цитологическим заключением LSIL и HSIL в возрасте до 30 лет и старше. Также оценивали связь между выявленными генотипами ВПЧ с цитологическими результатами LSIL/HSIL, и был определен показатель средней вирусной нагрузки вируса папилломы человека.

По результатам исследования: в 1 группе ВПЧ выявлялся – у 55 (73,3%) пациенток, во 2 группе – у 52 (69,3%), в 3 группе – у 25 (35,7%) пациенток соответственно. Упациенток с SIL шейки матки чаще выявлялись 16 (38,0%), 33 (15,3%), 31 (11,3%), 18 (6,7%) и 52 (5,3%) генотипы ВПЧ. Остальные генотипы встречались в менее, чем 5,0% случаев.

Сравнительный анализ распространенности генотипов ВПЧ в каждой группе в зависимости от степени тяжести SIL установил:

в 1 группе пациенток с LSIL (1а подгруппа) ВПЧ выявлялся – у 22 (59,5%),с HSIL (1б подгруппа)– у 33 (86,8%) пациенток;

во 2 группе пациентокс LSIL (2а подгруппа) ВПЧ выявлялся – у 21 (56,7%), с HSIL (2б подгруппа) – у 31 (81,6%) пациенток (рис.3).

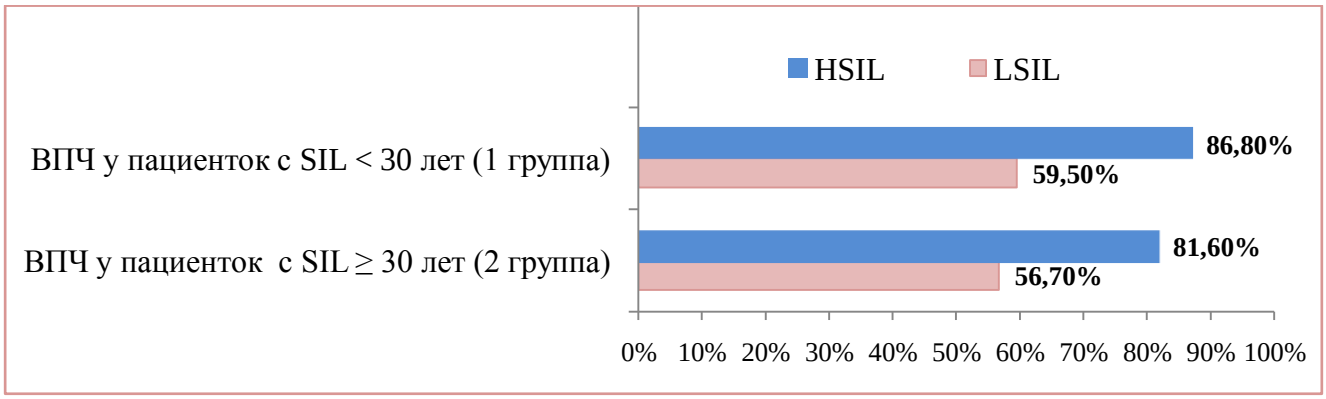


Рисунок 3. Распространение ВПЧ у пациенток с SIL шейки матки

Полученные результаты свидетельствуют о достоверной корреляции между распространенностью ВПЧ и тяжестью цервикальных поражений вне зависимости от возраста (p<0,05).

Сравнительный анализ показал, что у пациенток 1а подгруппы (LSIL) наиболее часто в цервикальном канале выявлялся ВПЧ 16 генотипа – у 10 (27%) пациенток, 58 генотипа – у 4 (10,8%), 33 генотипа – у 3 (8,1%) пациенток соответственно. Следует отметить, что у пациенток 1б подгруппы (HSIL) частота выявления ВПЧ значительно возрастала по сравнению с пациентками 1а подгруппы (LSIL) (p<0,05). Так, достоверно чаще при HSIL в цервикальном канале встречался ВПЧ 16 генотипа – у 19 (50,0%) пациенток (p=0,0387), ВПЧ 33 генотипа – у 11 (28,9%) (p=0,0181), ВПЧ 31 генотипа – у 8 (21,1%) (p=0,0427) пациенток соответственно в отличие от пациенток 1а подгруппы ВПЧ 18 генотипа 7 (18,4%) (p=0,0242). Также несколько чаще у пациенток с HSIL встречался ВПЧ 52 генотипа – 5 (13,2%), чем у пациенток с LSIL – 1 (2,7%), но не имел достоверных различий (p= 0,0906) (таблица 16.1) (рис.4).

Таблица 16.1

Результаты ВПЧ генотипирования у пациенток 1группы с LSIL/HSIL

Генотип ВПЧ	1а подгруппа (LSIL) n=37		1б подгруппа (HSIL) n=38		p
	Абс.	%	Абс.	%	
16	10	27,0	19	50,0	**0,0387***
18	1	2,7	7	18,4	**0,0242***
31	2	5,4	8	21,1	**0,0427***
33	3	8,1	11	28,9	**0,0181***
35	-	-	-	-	-
39	2	5,4	0	0,0	0,6060
44	2	5,4	0	0,0	0,6060
45	2	5,4	0	0,0	0,6060
51	1	2,7	0	0,0	0,7899
52	1	2,7	5	13,2	0,0906
53	0	0,0	1	2,6	0,7997
56	2	5,4	0	0,0	0,6060
58	4	10,8	1	2,6	0,1575
59	2	5,4	0	0,0	0,6060
66	0	0,0	1	2,6	0,7997
68	1	2,7	0	0,0	0,7899
73	1	2,7	0	0,0	0,7899
82	1	2,7	0	0,0	0,7899
26	0	0,0	0	0,0	1,0000
6	2	5,4	0	0,0	0,6060
11	-	-	-	-	-

p<0,05*

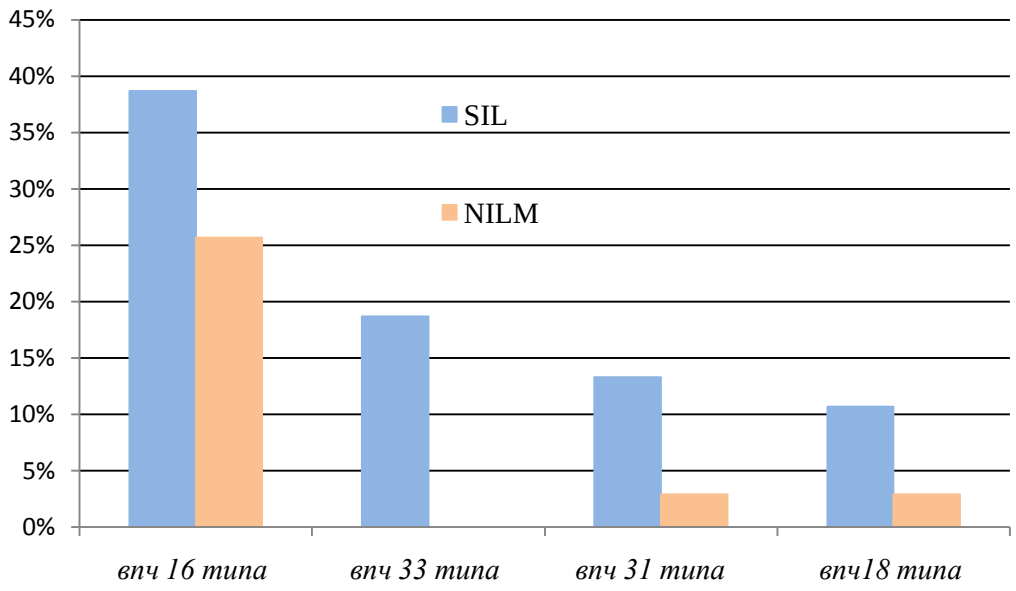


Рисунок 4. Распределение генотипов ВПЧ у пациенток с SIL шейки матки в возрасте <30 лет в сравнении с контрольной группой

При анализе пациенток 2 группы установлено, что у пациенток 2а подгруппы (LSIL) в цервикальном канале так же, как и у пациенток 1а подгруппы, чаще выявляли ВПЧ 16 генотипа – у 9 (23,3%), ВПЧ 33 генотипа – у 5 (13,5%) пациенток соответственно.

У пациенток 2б подгруппы (HSIL) также чаще встречались ВПЧ 16 генотипа – у 19 (50,0%) пациенток, ВПЧ 31 генотипа – у 6 (15,8%), ВПЧ 33 генотипа – у 4 (10,5%) пациенток соответственно. Однако статистически значимые различия между пациентками с LSIL и HSIL в данной группе были выявлены только в отношении к ВПЧ 16 (p=0,0195) и 31 (p=0,0474) генотипов (таблица 16.2) (ри.5).

Таблица 16.2

Результаты ВПЧ генотипирования у пациенток 2 группы с LSIL/HSIL

Генотип ВПЧ	2а подгруппа (LSIL) n=37		2б подгруппа (HSIL) n=38		p
	Абс.	%	Абс.	%	
16	9	24,3	19	50,0	0,0195*
18	1	2,7	1	2,6	0,9848
31	1	2,7	6	15,8	0,0474*

33	5	13,5	4	10,5	0,6919
35	0	0,0	1	2,6	0,7997
39	1	2,7	0	0,0	0,7899
44	1	2,7	1	2,6	0,9848
45	3	8,1	1	2,6	0,2943
51	0	0,0	1	2,6	0,7997
52	0	0,0	3	7,9	0,4720
53	2	5,4	0	0,0	0,6060
56	1	2,7	2	5,3	0,5709
58	0	0,0	0		
59	0	0,0	0		
66	2	5,4	0	0	
68		0,0			
73	1	2,7	0	0	
82	1	2,7	0	0	
26	0		0	0	
6	0		0	0	
11	0		0	0	

p<0,05*

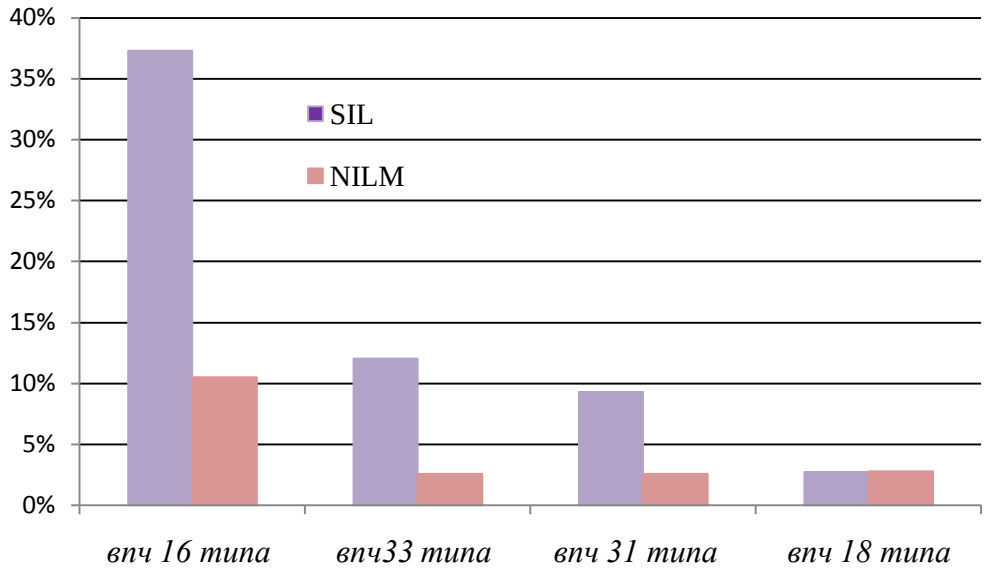


Рисунок 5. Распределение генотипов ВПЧ у пациенток с SIL шейки матки в возрасте ≥ 30 лет в сравнении с контрольной группой

Анализ генотипов ВПЧ пациенток 3 группы с цитологическим заключением NILM выявил, что у пациенток 3а подгруппы (<30 лет) также, как и у пациенток 3б подгруппы (>30 лет), наиболее часто встречался ВПЧ 16 генотипа – у 9 (25,7%) и – у 4 (10,5%) соответственно. Обращает на себя внимание, что у пациенток 3 группы (NILM) чаще выявлялись низкоонкогенные генотипы ВПЧ (51, 39, 56), чем у пациенток с HSIL ($p<0,05$). Однако между пациентками с NILM и LSIL достоверных различий не выявлено($p>0,05$).

Таблица 16.3

Результаты ВПЧ генотипирования у пациенток 3 группы с NILM

Генотип ВПЧ	3а подгруппа <30 лет n=35		3б подгруппа ≥30лет n=35		p
	Абс.	%	Абс.	%	
16	9	25,7	4	10,5	0,0926
18	1	2,9	1	2,6	0,9532
31	1	2,9	1	2,6	0,9532
33	0	0,0	2	5,3	0,6386
35		0,0		0,0	1,0000
39	3	8,6	0	0,0	0,4317

44	0	0,0	0	0,0	1,0000
45	0	0,0	0	0,0	1,0000
51	3	8,6	1	2,6	0,2748
52	1	2,9	2	5,3	0,6016
53	0	0,0	1	2,6	0,8094
56	2	5,7	1	2,6	0,5145
58	0	0,0	1	2,6	0,8094
59	1	2,9	0	0,0	0,7791
66	1	2,9	0	0,0	0,7791
68	0	0,0	2	5,3	0,6386
73	0	0,0	2	5,3	0,6386
82	0		0		
26	0		0		
6	0		0		
11	0		0		

p>0,05

Сравнительный анализ частоты встречаемости высокоонкогенных генотипов ВПЧ (16, 18, 31, 33) при LSIL/HSIL и NILM во всех исследуемых группах установил, что частота их выявления не имела достоверных отличий среди пациенток с цитологическим заключением NILM и пациентками с LSIL (p>0,05). Так, при цитологическом результате NILM ВПЧ 16 генотипа встречался в 13 (18,5%), 18 генотипа – 2 (2,8%), 31 генотипа – 2 (2,8%) и 33 генотипа – 2 (2,8%) случаях, при LSIL ВПЧ 16 генотипа в 19 (25,7%), 18 генотипа – 2 (2,7%), 31 генотипа – 3 (4,0%), 33 генотипа – 8 (10,8%) случаях. Однако частота выявляемости значительно возрастала у пациенток с плоскоклеточными интраэпителиальными поражениями шейки матки высокой степени. При HSIL ВПЧ 16 генотипа встречался в 38 (50,0%), 18 генотипа – 8 (10,5%), 31 генотипа – 14 (18,4%) и 33 генотипа – 15 (19,7%) случаях (p<0,05).

Изложенные выше данные свидетельствуюто преобладании ВПЧ 16 генотипа в структуре высокоонкогенных ВПЧ. Так, у пациенток с LSIL ВПЧ 16 генотипа выявлялся в 1,4 раза чаще (25,7%) по сравнению с пациентками с NILM (18,5%) (p>0,05) и доминировал при HSIL – 38 (50,0%) (p<0,05).

Таким образом, полученные данные указывают на то, что частота выявления ДНК ВПЧ высокоонкогенного риска коррелирует с увеличением степени тяжести SIL независимо от возраста женщины.

Нами была проанализирована взаимосвязь инфицирования одним и более генотипами ВПЧ высокоонкогенного риска у всех исследуемых пациенток с цитологическим результатом LSIL/HSIL/NILM в возрасте до 30 лет и старше.

Проведение сравнительного анализа по выявляемости одного, двух и более генотипов ВПЧ у пациенток 1а подгруппы (LSIL) установило, что инфицированность одним генотипом ВПЧ встречается достоверно чаще в данной подгруппе – 10 (27%), чем инфицирование двумя – 6 (16,2%) и более генотипами – 5 (13,5%) (p<0,05). Также достоверно чаще инфицирование одним генотипом ВПЧ встречалось у пациенток 1б подгруппы (HSIL) – 22 (57,8%) по сравнению с инфицированностью двумя – 8 (21%) и более – 2 (5,2%) генотипами (p<0,05) (таблица 16).

Сравнительный анализ выявления ДНК ВПЧ между подгруппами пациенток 1 группы в возрасте до 30 лет показал, что инфицированность одним генотипом ВПЧ достоверно чаще выявлялся у пациенток 1б подгруппы (HSIL) – 27 (57,8%), чем у пациенток 1а подгруппы (LSIL) – 10 (27%) и NILM– 10 (28,5%) (p<0,05). Инфицирование двумяи более генотипами ВПЧ среди пациенток с различной степенью тяжести SIL достоверных различий по выявляемости не установило (p>0,05)(таблица 17).

Таблица 17

Распределение генотипов ВПЧ у пациенток с SIL шейки матки в возрасте<30 лет

	ВПЧ+	1генотип	2 генотипа	3генотипа	4 и более
LSILn=37	22(59,5%)	10(27%)	6(16,2%)	5(13,5%)	1(2,7%)

HSIL n=38	33(86,8%)	22(57,8%)	8(21%)	2(5,2%)	0
NILM n=35	14(40%)	10(28,5%)	1(2,8%)	2(5,7)	1(2,8%)

p<0,05

Проведение сравнительного анализа пациенток 2 группы старше 30 лет установило, что у пациенток 2а подгруппы (LSIL) инфицированность одним генотипом ВПЧ встречается достоверно чаще – 14 (37,8%), чем инфицирование двумя – 6 (16,2%) и более генотипами – 1 (2,7%) (p<0,05). Также достоверно чаще инфицирование одним генотипом ВПЧ встречалось у пациенток во 2б подгруппе (HSIL) – 25 (65,7%) по сравнению с инфицированностью двумя – 6 (15,7%) и более – 1 (2,6%) генотипами (p<0,05) (таблица 19). Сравнительный анализ выявления ДНК ВПЧ между подгруппами пациенток 2 группы установило, что инфицированность одним генотипом ВПЧ достоверно чаще выявлялся у пациентокс HSIL – 25 (65,7%), чем у пациенток с LSIL – 14 (37,8%) и NILM – 6 (17,1%) (p<0,05). Инфицирование двумя и более генотипами ВПЧ среди пациенток 2 группы с различной степенью тяжести SIL также, как и пациенток 1 группы, достоверных различий по выявляемости не установило (p>0,05) (таблица 18).

Таблица 18

Распределение генотипов ВПЧ у пациенток с SIL шейки матки в возрасте ≥30 лет

	ВПЧ+	1генотип	2 генотипа	3генотипа	4 и более
LSIL n=37	21(56,7%)	14(37, 8%)	6(16,2%)	0	1(2,7%)
HSIL n=38	31 (81,5%)	25(65,7%)	6(15,7)	0	1(2,6%)
NILM n=35	11(31,4%)	6(17,1%)	4(11,4%)	0	1(2,8%)

p<0,05

Таким образом, в результате проведенного анализа было установлено, что инфицирование одним генотипом ВПЧ коррелирует со степенью тяжести SIL, в то время, как инфицирование двумя и более генотипами ВПЧ обратно пропорционально тяжести цервикального поражения.

Количественные показатели содержания вируса папилломы человека у пациенток с SIL шейки матки в возрасте до 30 лет и старше

Нами были проанализированы показатели средней вирусной нагрузки у пациенток с SIL в исследуемых группах. Анализ количественной средней вирусной нагрузки ВПЧ у пациенток в возрасте до 30 лет установил достоверно более высокие показатели средней вирусной нагрузки у пациенток 1б подгруппы (HSIL) 5,59±1,63 (lg копий ДНК ВПЧ на 100 тысяч клеток) по сравнению с средними показателями вирусной нагрузки пациенток 1а подгруппы (LSIL) 4,55±1,57 (lgкопий ДНК ВПЧ на 100 тысяч клеток) ($p<0,05$). Аналогичные результаты были установлены в отношении средней вирусной нагрузки у пациенток 2 группы старше 30 лет (таблица 19). Достоверных различий по средним показателям вирусной нагрузки среди пациенток в возрасте до 30 лет и старшес SIL различных степеней тяжести установлено не было ($p>0,05$).

Таблица 19

Результаты вирусной нагрузки у пациенток с SIL шейки матки (lg копий ДНК ВПЧ на 100 тысяч клеток).

Группы пациенток	1 группа <30 лет	2 группа ≥30 лет
LSIL n=37	4,55±1,57	4,51±1,51
HSIL n=38	5,59±1,63	5,93±0,83
NILM n=35	4,35±1,72	4,08±1,75

p<0,05

Таким образом, по результатам исследования была выявлена взаимосвязь между результатами цитологического исследования и количественными показателями средней вирусной нагрузки вируса папилломы человека.

Так, упациенток с HSIL были выявлены достоверно чаще более высокие количественные показатели средней вирусной нагрузки (5,76±1,23 lg копий ДНК ВПЧ на 100 тысяч клеток) по сравнению с LSIL (4,53±1,54 lg копий ДНК ВПЧ на 100 тысяч клеток) и NILM (4,21±1,73 lg копий ДНК ВПЧ на 100 тысяч клеток)

(p=0,006). Следует отметить, что показатель вирусной нагрузки у женщин с идентичной цитологической картиной, но разных возрастных групп, достоверно не отличался (p>0,05).

Заключение

Наиболее часто встречаемые генотипы ВПЧ у пациенток с SIL шейки матки являлись 16 (38,0%), 33 (15,3%), 31 (11,3%), 18 (6,7%) и 52 (5,3%). Остальные генотипы встречались менее 5,0%.

У пациенток 1а подгруппы чаще выявляли ДНК ВПЧ 16 генотипа – у 10 (27%), 58 генотипа – у 4 (10,8%) и 33 генотипа – у 3 (8,1%); у женщин 2а подгруппы ДНК ВПЧ 16 генотипа выявляли – у 9 (23,3%), 33 генотипа – у 5 (13,5%) (p>0,05). У женщин 1б подгруппы ДНК ВПЧ 16 генотипа выявлялся – у 19 (50,0%), 33 генотипа – у 11 (28,9%), 31 генотипа – у 8 (21,1%); у женщин 2б подгруппы ДНК ВПЧ 16 генотипа – у 19 (50,0%), 31 генотипа– у 6 (15,8%) и 33 генотипа – у 4 (10,5%) (p>0,05). Достоверно значимых различий выявленных генотипов ДНК ВПЧ между пациентками с идентичной цитологической патологией, но разных возрастных групп установлено не было (p>0,05). Доминирующим в структуре ВПЧ высокого онкогенного риска являлся ВПЧ 16 генотипа. Так, ДНК ВПЧ 16 генотипа выявлялся в 1,4 раза чаще 19 (25,7%) у пациенток с LSIL и в 2,7 раза у пациенток с HSIL 38 (50,0%) по сравнению с пациентами с цитологическим результатом NILM 13 (18,5%) (p<0,05). Также было установлено, что частота выявляемости ДНК ВПЧ высокоонкогенного риска коррелирует с увеличением степени тяжести SIL независимо от возраста женщины (p<0,05). Доказано, что инфицирование одним генотипом ВПЧ коррелирует со степенью тяжести SIL, в то время, как инфицирование двумя и более генотипами ВПЧ обратно пропорционально тяжести цервикального поражения. Вирусную нагрузку в сочетании с ВПЧ – генотипированием можно рассматривать как маркер тяжести плоскоклеточных интраэпителиальных поражений шейки матки вне зависимости от возраста.

3.3. Результаты расширенной кольпоскопии у пациенток 1,2 и 3 групп

Расширенная кольпоскопия была проведена всем пациенткам (n=220), нами оценивалась локализация и распространенность поражения, степень выраженности того или иного кольпоскопического признака (наличие ацетобелого эпителия и степень его выраженности, наличие мозаики и/или пунктации, степень окрашивания раствором Люголя и наличие йод-негативных участков). Удовлетворительная кольпоскопическая картина (зона трансформации 1, 2 типа) наблюдалась у 206 (93,6%) пациенток, неудовлетворительная (зона трансформации 3 типа) – у 14 (6,3%) соответственно. Всем пациенткам с неудовлетворительной кольпоскопической картиной проводилось выскабливание цервикального канала для верифицирования окончательного диагноза.

При проведении данного исследования в группах с SIL шейки матки – у 136 (90,6%) пациенток выявлялась аномальная кольпоскопическая картина той или иной степени выраженности. В группе сравнения аномальная кольпоскопическая картина выявляласьу 6 (8,5%) пациенток.

Подробный анализ кольпоскопической картины среди 3 групп пациентов представлен в таблице 20.

Таблица 20

Анализ кольпоскопической картины среди групп пациенток

Кольпоскопическая картина	1группа <30 лет	2 группа ≥30 лет	3 группа <30 лет	3 группа ≥30 лет
	n= 75	n=75	n=35	n=35
Ацето-белый эпителий тонкий	39(52,0%)	47 (62,7 %)	1(3,3%)	2 (5,7 %)
Ацето-белый эпителий плотный	33(47,1%)	39 (52 %)	0	1 (2,9 %)
Атипические сосуды	8(11,4%)	11 (14,7 %)	0	1 (2,9 %)
Мозаика нежная	26(34,7%)	25 (33,3 %)	0	1 (2,9 %)
Мозаика грубая	6(8,5%)	13 (17,3 %)	0	1 (2,9 %)

Пунктация нежная	19(25,3%)	14 (18,7 %)	0	1 (2,9 %)
Пунктация грубая	5(7,1%)	8 (10,7 %)	0	1 (2,9 %)
Открытые железы	17(24,2%)	20 (26,7 %)	2(6,6%)	4 (11,4 %)
Ретенционные кисты	10(14,2%)	13 (17,3 %)	1(3,3%)	3 (8,6 %)
Выраженный сосудистый рисунок	19(27,1%)	23 (30,7 %)	1(3,3%)	4 (11,4 %)
Эктопия	22(31,4%)	19 (25,3 %)	5(16,6%)	6 (17,1 %)
Эктропион	4(5,7%)	6 (8 %)	1(3,3%)	3 (8,6 %)
Остроконечные кондиломы вульвы	10 (13,3%)	8 (10,7 %)	(0%)	(0 %)
Остроконечные кондиломы влагалища	8 (10,7%)	5 (7,1% %)	(0 %)	(0 %)
Остроконечные кондиломы шейки матки	(0%)	(0 %)	(0 %)	(0 %)
Йод-негативная зона	24(34,2%)	29 (38,7 %)	(0%)	1 (2,9 %)
Четкие границы аномального эпителия	50(66,7%)	52 (69,3 %)	(0%)	1 (2,9 %)

p<0,05

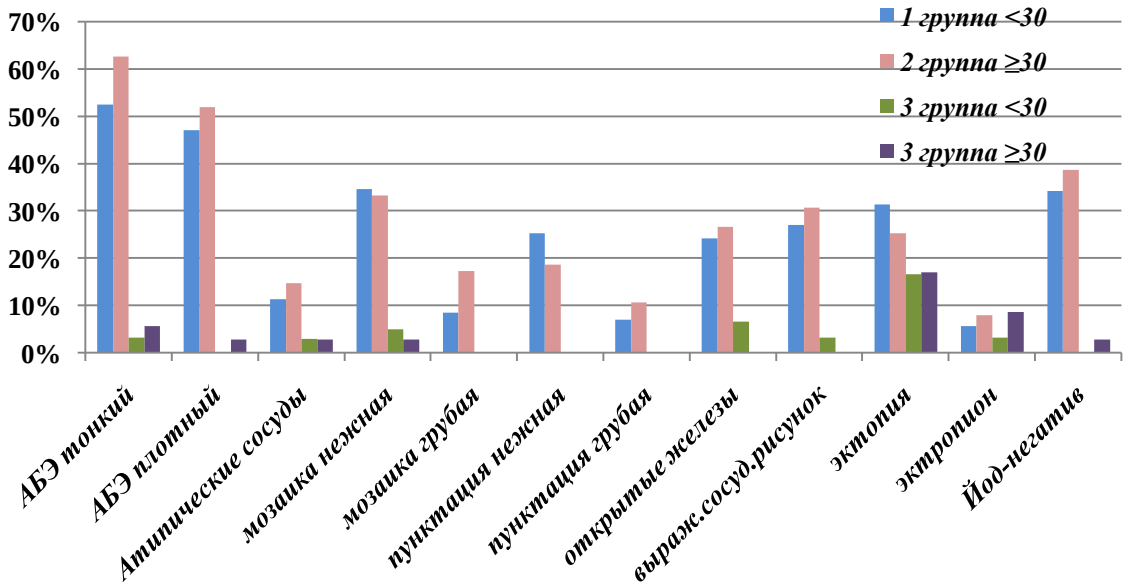


Рисунок 6. Результаты кольпоскопического исследования у исследуемых пациенток

При детальном анализе кольпоскопической картины (таблица 20) (рис.6) изменения эпителия шейки матки достоверно чаще встречались среди пациенток

1 и 2 группы (p<0,05). Так, тонкий АБЭ в 1 группе выявлялся у 39 (52,0%), во 2 группе у 47 (62,7%) пациенток соответственно. В группе сравнения в возрасте до 30 лет тонкий АБЭ выявлялся у 1 (3,3%) (p=0,00001) (OR 18,2 (2,6 – 127,16)) пациентки, в возрасте старше 30 у 2 (5,7%) (p=0,00001) (OR 10,97 (2,82 – 42,6)) пациенток соответственно. Также плотный АБЭ и АБЭ с мозаикой и/или пунктацией достоверно чаще выявлялись у пациенток 1 и 2 группы по сравнению с 3 – ей группой (p<0,05).

Следует отметить, что атипические сосуды, йод – негативные участки с четкими границами также чаще выявлялись среди пациенток 1 и 2 групп (p<0,05).

Нами также был проведен анализ кольпоскопической картины в зависимости от тяжести поражения шейки матки (LSIL/HSIL) у пациенток 1 и 2 группы. Так, слабовыраженные изменения эпителия шейки матки у пациенток 1 и 2 групп такие как тонкий АБЭ, достоверно чаще встречались среди пациенток с цитологически верифицированным заключением LSIL, в тоже время выраженные изменения эпителия – плотный АБЭ – и быстрое его проявление достоверно чаще выявлялись у пациенток с цитологическим заключением HSIL (p<0,05).

Такие признаки, как грубая мозаика/пунктация, также достоверно чаще встречались у пациенток с (HSIL) (p<0,05). При сравнении других показателей достоверных различий выявлено не было (p>0,05) (таблица 21).

Таблица 21

Результаты расширенной кольпоскопии у пациенток 1 и 2 группы

Кольпоскопические признаки	1 группа <30 лет			2 группа ≥30 лет		
	LSILn=37	HSILn=38	p-уровень	LSILn=37	HSILn=38	p-уровень
Ацето-белый эпителий тонкий	25 (67,6 %)	14 (36,8 %)	**0,0065**	27(72,9%)	20(52,6%)	0,0586
Ацето-белый эпителий плотный	12 (32,4 %)	21 (55,3 %)	**0,0442**	7(18,9%)	32(84,2%)	**0,00001**
Пунктация нежная	17 (45,9 %)	2 (5,3 %)	**0,00001**	10(27,0%)	4(10,5%)	0,0667
Пунктация грубая	0 (0 %)	5 (13,2 %)	0,2525	0 (0%)	8(21%)	0,0834

Мозаика нежная	21 (56,8 %)	5 (13,2 %)	**0,00001**	13(35,1%)	12(31,5%)	0,7439
Мозаика грубая	0 (0 %)	6 (15,8 %)	0,1785	1(2,7%)	12(31,5%)	**0,0010**
Тонкий АБЭ и мозаика	4 (10,8 %)	2 (5,3 %)	0,3784	9(24,3%)	4(10,5%)	0,1145
Тонкий АБЭ и пункация	3 (8,1 %)	6 (15,8 %)	0,3043	3(8,1%)	5(13,1%)	0,4788
Тонкий АБЭ мозаика+пунктация	6 (16,2 %)	3 (7,9 %)	0,2692	1(2,7%)	3(7,8%)	0,3171
Плотный АБЭ и мозаика	2 (5,4 %)	4 (10,5 %)	0,4125	0 (0%)	7(23,6%)	0,1233
Плотный АБЭ и пунктация	3 (8,1 %)	6 (15,8 %)	0,3043	0 (0%)	2(5,2%)	0,1572
Плотный АБЭ мозаика+пунктация	1 (2,7 %)	3 (7,9 %)	0,3142	0 (0%)	2(5,2%)	0,1572
Открытые железы	11 (29,7 %)	6 (15,8 %)	0,1492	9(24,3%)	11(28,9%)	0,6508
Ретенционные кисты	6 (16,2 %)	4 (10,5 %)	0,4705	7(18,9%)	6(15,7%)	0,7204
Выраженный сосудистый рисунок	12 (32,4 %)	7 (18,4 %)	0,1628	10(27%)	13(34,2%)	0,5000
Эктопия	14 (37,8 %)	8 (21,1 %)	0,1095	11(29,7%)	8(21%)	0,3877
Эктропион	3 (8,1 %)	1 (2,6 %)	0,2943	2(5,4%)	4(10,5%)	0,4138
Йод-негативная зона	7 (18,9 %)	11 (28,9 %)	0,3084	11(29,7%)	18(47,3%)	0,1168

p<0,05

Также нами были проанализированы наиболее часто встречаемые генотипы ВПЧ при различных кольпоскопических картинах у пациенток с SIL шейки матки и у группы сравнения. Анализ результатов кольпоскопической картины с результатами генотипирования ВПЧ показал, что наиболее часто при слабовыраженных и выраженных изменениях эпителия шейки матки выявляли ВПЧ 16 генотипа.

При тонком АБЭ, ВПЧ 16 генотипа выявлялся в 1 группе в 9 (26,4%) во 2 группе в 12 (25,5%) случаях соответственно. При выраженных изменениях (АБЭ с

мозайкой/пунктацией) ВПЧ 16 генотипа выявлялсяв 1 группе в 16 (42,1%) во 2 группе в 15 (41,6%) случаях соответственно.

При тонком АБЭ наиболее часто у пациенток 1 группы встречались ВПЧ 16 (26,4%), ВПЧ 33 и 52 (8,8%) генотипов, остальные менее 5%, у пациенток 2 группы ВПЧ 16 (25,5%), 33 (10,6%) и 52 (6,3%), остальные менее 4,2%.

При плотном АБЭ – у пациенток 1 группы ВПЧ 16 (33,3%), 18 (9%), 31 (12,1%), 33 (15,1%), остальные генотипы менее 6%, у пациенток 2 группы ВПЧ 16 (38,46%), 33 и 52 (10,25%), остальные генотипы менее 2,5%.

При АБЭ с мозаикой/пунктацией у пациенток 1 группы ВПЧ 16 (42,1%), 31 (10,5%), 33 и 52 (13,1%), 18 (7,8%), остальные генотипы менее 2,6%, у пациенток 2 группы ВПЧ 16 (41,6%), 52 (10,0%), 33 (6,6%), остальные генотипы менее 3,3%.

При выраженных и слабовыраженных изменениях эпителия шейки матки чаще встречались высокоонкогенные генотипы ВПЧ (16, 31, 33, 52) ($p<0,05$). Так, ВПЧ 16 генотипа достоверно чаще других генотипов встречался при плотном АБЭ и АБЭ с мозаикой/пунктацией ($p<0,05$).

Проведенный сравнительный анализ результатов кольпоскопии у пациенток 1 и 2 группы с пациентками группы сравнения показал, что грубые изменения эпителия шейки матки (АБЭ, мозайка, пунктация) достоверно чаще встречались у пациенток 1 и 2 группы ($p<0,05$). Следует отметить, что сравнительный анализ результатов кольпоскопии у пациенток 1 и 2 группы статистических различий не выявил ($p>0,05$).

Заключение

Таким образом, в результате исследования было установлено, что выраженность кольпоскопических изменений эпителия шейки матки (АБЭ, АБЭ с мозаикой/пунктацией) достоверно коррелирует с цитологическими изменениями LSIL и HSIL. Такие признаки, как грубая мозаика/пунктация, достоверно чаще встречались у пациенток с тяжелыми плоскоклеточными интраэпителиальными поражениями (HSIL) шейки матки ($p<0,05$). Также установлено, что при выраженных кольпоскопических изменениях достоверно чаще выявлялись высоконкогенные генотипы ВПЧ ($p<0,05$). При наличии кольпоскопических

признаков таких, как АБЭ и АБЭ с мозаикой/пункиацией доминировал ВПЧ 16 генотипа ($p<0,05$).

Основываясь на полученных результатах нашего исследования, можно сказать о важности проведения расширенной кольпоскопии, наряду с жидкостной цитологией и ВПЧ – тестированием для ранней диагностики SIL шейки матки.

3.4. Результаты экспрессии онкобелка p16ink4α и маркера пролиферации Ki67 у пациенток с SIL и раком шейки матки

Второй этап нашего исследования включал пациенток с гистологически верифицированным диагнозом LSIL (n=31) и HSIL (n=26) и дополнительно сформированную группус плоскоклеточным раком шейки матки (SCC) (n=12). В контрольную группу были включены женщины без морфологических изменений –NILM (n=32). Средний возраст пациенток составил 32,7±0,5 лет.

Всем пациенткам была проведена жидкостная цитология и иммуноцитохимическое исследование (ИЦХ) с определением экспрессии онкобелка p16ink4α и маркера пролиферации Ki67 и проведение теста на ВПЧ методом ПЦР– РВ на приборе Cobas 4800.

Обнаружение клеток плоского эпителия с легким дискариозом в сочетании с наличием сохранных зрелых клеток парабазального и поверхностного слоев в мазках жидкостной цитологии интерпретировалось как плоскоклеточное интраэпителиальное поражение низкой степени – LSIL (рис. 7).

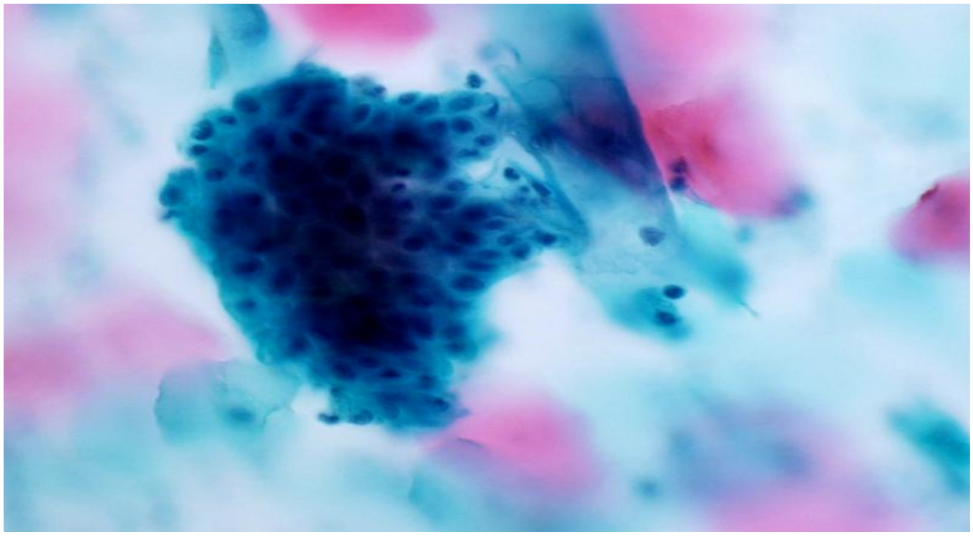


Рисунок 7. LSIL, жидкостной цитологический мазок, окраска по Папаниколау, ×400

Наличие крупных комплексов разрозненно лежащих атипичных клеток плоского эпителия полиморфного вида с резко выраженным дискариозом, а также фигурами митозов позволяло сделать заключение – плоскоклеточного интраэпителиального поражения высокой степени – HSIL (рис. 8).

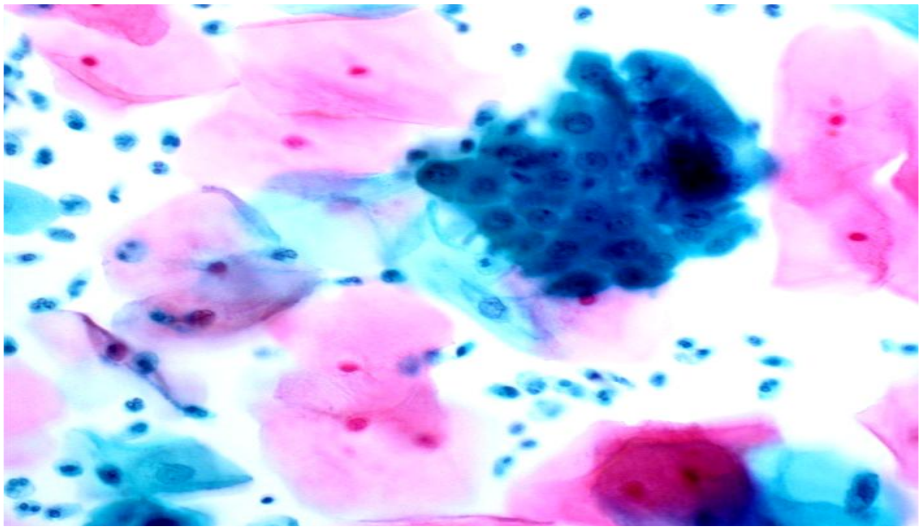


Рисунок 8. HSIL, жидкостной цитологический мазок, окраска по Папаниколау, ×400

Обнаружение атипичных клеток с выраженным клеточным и ядерным полиморфизмом, наличие ядер неправильной формы, гиперхромных ядер с грубо зернистым хроматином, а также ядрышек и патологических митозов свидетельствовало о наличии – плоскоклеточного рака шейки матки – SCC (рис.9).

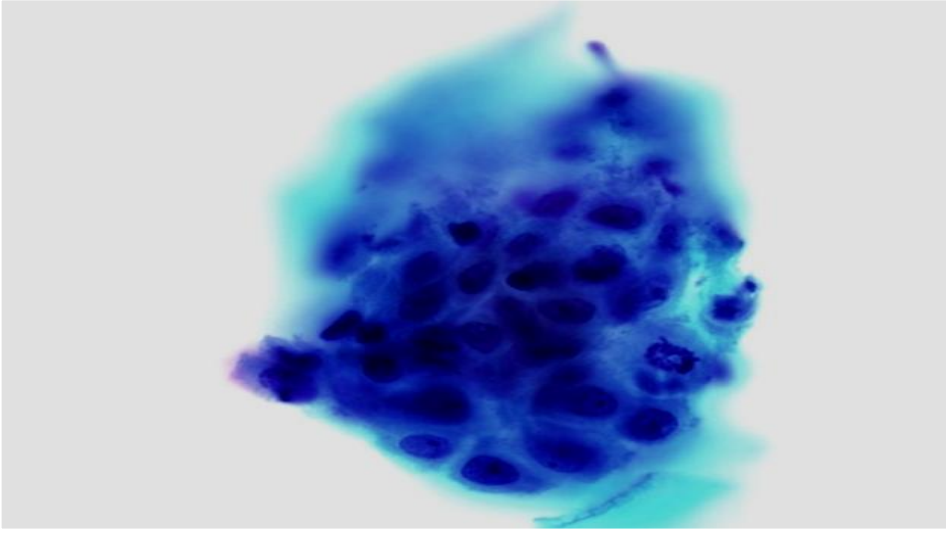


Рисунок 9. SCC, жидкостной цитологический мазок, окраска по Папаниколау, ×400

Цитологические мазки, содержащие лейкоциты, пласты плоского и цилиндрического эпителия с реактивными изменениями и явлениями лейкопедеза, без атипичных клеток, интерпретировались как негативные в отношении интраэпителиального поражения – NILM (рис.10).

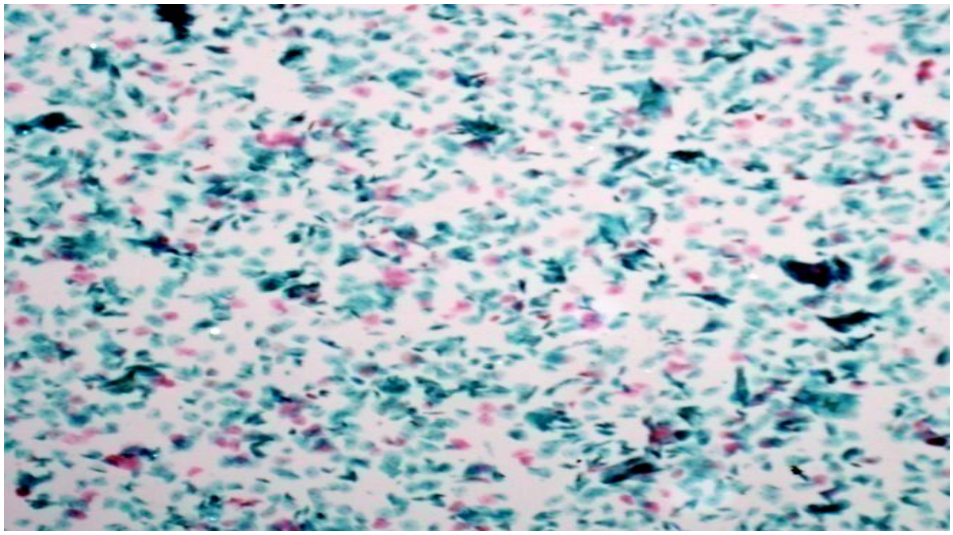


Рисунок 10. NILM, жидкостной цитологический мазок, окраска по Папаниколау, ×400

Проводилось двойное иммуноокрашивание цитологических препаратов с использованием двух антител p16ink4α и Ki67. Определяли экспрессию онкобелка p16ink4α и маркера пролиферации Ki67 как в отдельно лежащих атипичных клетках, так и в комплексах атипичных клеток плоского эпителия.

У пациенток с LSIL экспрессия онкобелка p16ink4α составила – 27,2% атипических клеток плоского эпителия в мазке, маркера пролиферации Ki67 – 11,6% (рис.11, 15) .

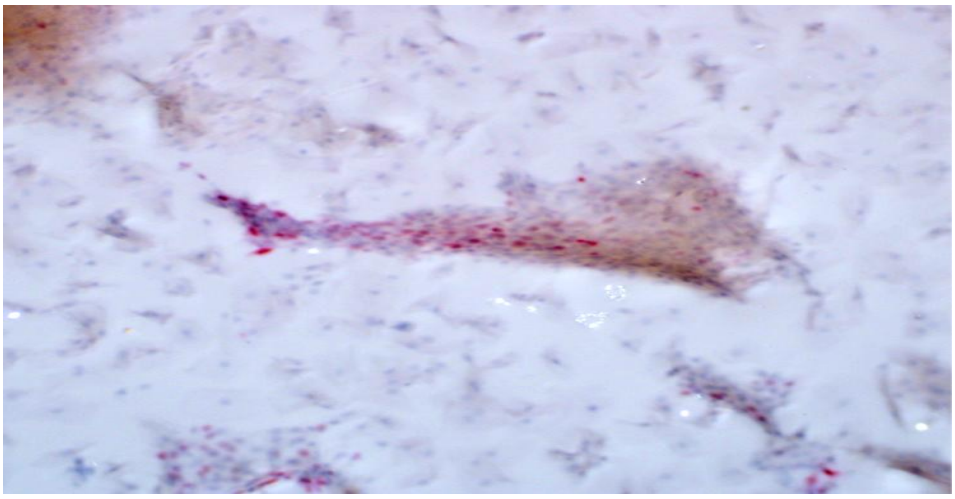


Рисунок 11. LSIL, ИЦХ с использованием двух антител p16ink4α и Ki67, ×400

У пациенток с HSIL экспрессия онкобелка p16ink4α составила – 58,9% атипических клеток плоского эпителия в мазке, маркера пролиферации Ki67 – 30,7 % (рис.12, 15)

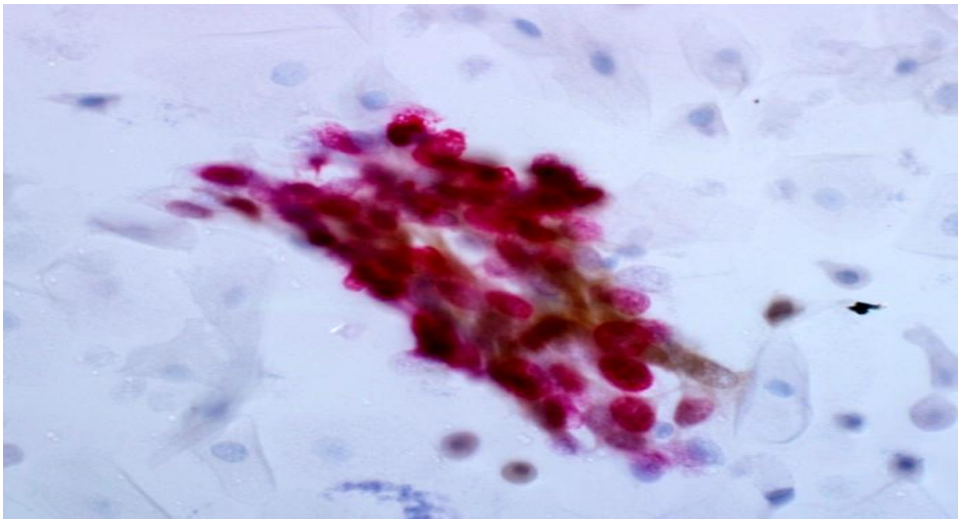


Рисунок 12. HSIL, ИЦХ с использованием двух антител p16ink4α и Ki67, ×400

У пациенток с SCC экспрессия онкобелка p16ink4α составила – 90,0% атипических клеток плоского эпителия в мазке, маркера пролиферации Ki67 – 78,3% (рис.13, 15)

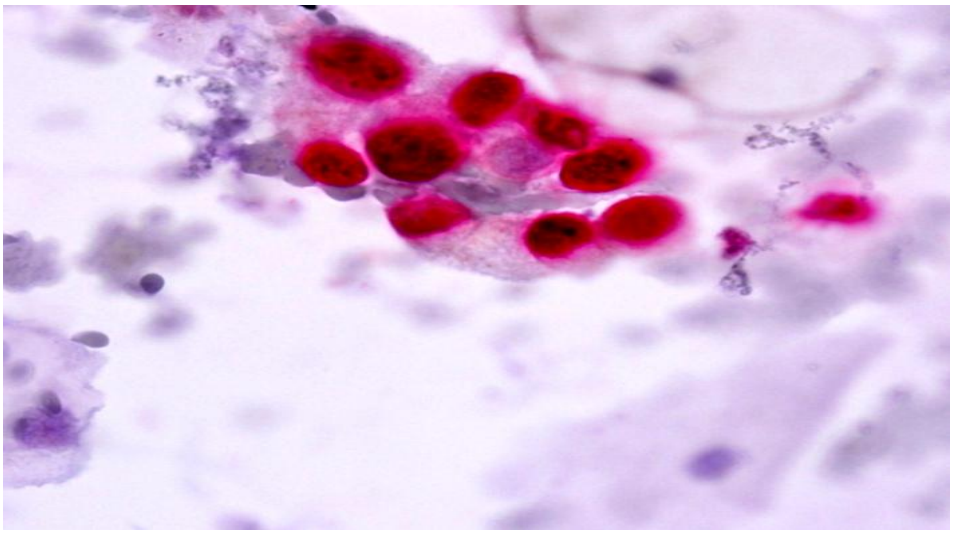


Рисунок 13. SCC, ИЦХ с использованием двух антител p16ink4α и Ki67, × 400

У пациенток с NILM экспрессия онкобелка p16ink4α составила – 0,72% атипических клеток плоского эпителия в мазке при отсутствии экспрессии маркера пролиферации Ki67, наличие атрофических и дистрофических изменений позволило отнести их в категорию «стареющих» клеток. Экспрессия маркера пролиферации Ki67 составила – 8,2%, при отсутствии экспрессии онкобелка p16ink4α (рис.14, 15).

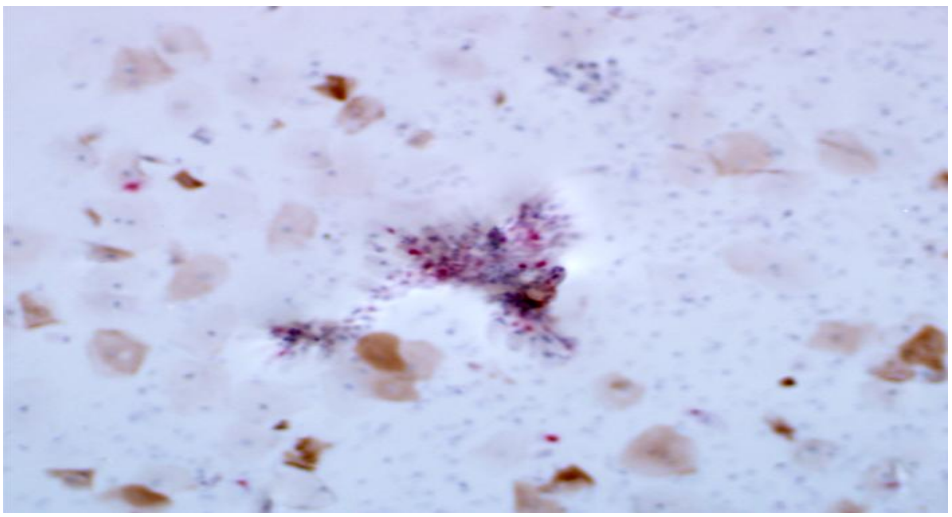


Рисунок 14. NILM, ИЦХ с использованием двух антител p16ink4α и Ki67, × 400

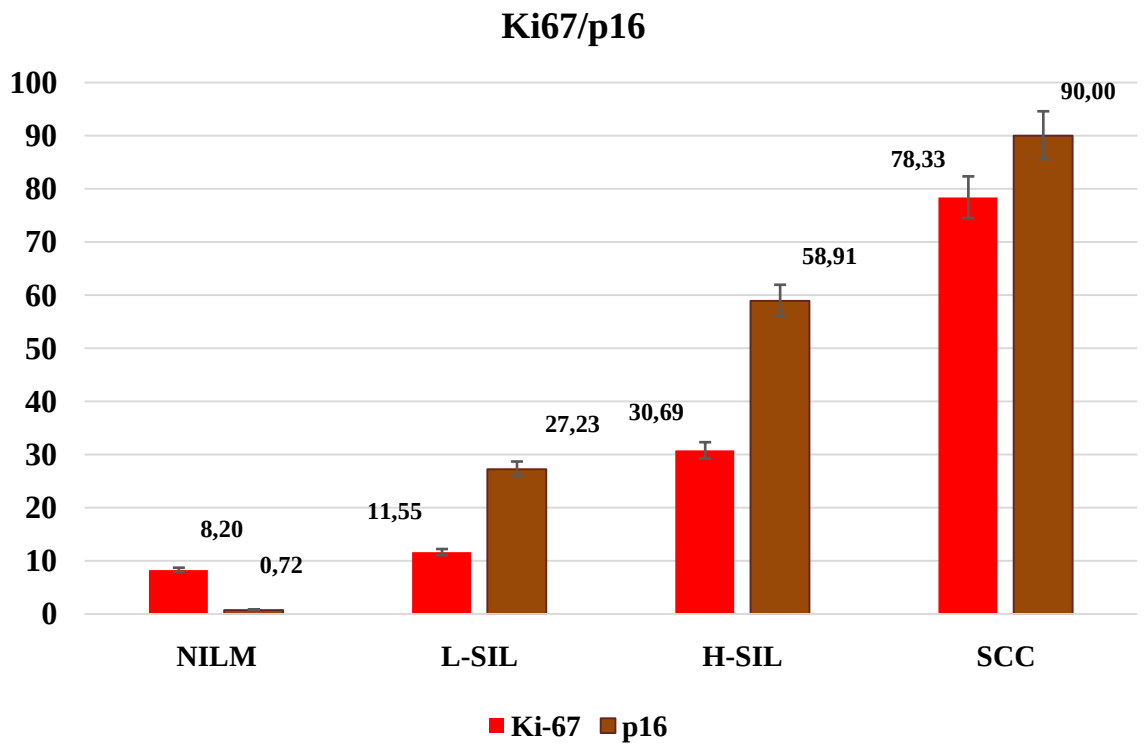


Рисунок 15. Экспрессия p16ink4α/Ki67 в эпителии слизистой шейки матки при SIL и SCC

Нами был проведен сравнительный анализ положительной реакции p16ink4α и Ki67 среди пациенток всех исследуемых групп. Так положительная реакция на p16ink4α достоверно выше встречалась у пациенток 1 группы (LSIL) ($p=3{,}02\times10^{-8}$) ($p<0{,}001$), 2 группы (HSIL) ($p=1{,}06\times10^{-10}$) ($p<0{,}001$) и 3 – ей группы (SCC) ($p=1{,}8\times10^{-6}$) ($p<0{,}001$) по сравнению с пациентками контрольной группы (NILM). Также было установлено, что положительная реакция на p16ink4α достоверно выше выявлялась у пациенток с HSIL и SCC по сравнению с пациентками с LSIL ($p=9{,}2\times10^{-7}$) ($p<0{,}001$); ($p=0{,}0005$) ($p<0{,}001$). Однако сравнительный анализ между пациентками с HSIL и SCC достоверных отличий выраженности экспрессии p16ink4α не выявил ($p>0{,}05$) (таблица 22).

Таблица 22

Сравнительная характеристика частоты выявления онкобелка p16ink4α, у пациентов с SIL и SCC

Онкомаркер	Группы	Кол-во	p 1	p2	p3	p4
p16ink4α	LSIL	31	p<0,001		p<0,001	p<0,001
	HSIL	26	p<0,001	p<0,001		p>0,05
	SCC	12	p<0,001	p<0,001	p>0,05	

Примечание:p1– достоверность по отношению к норме; p2– достоверность по отношению к LSIL; p3 – достоверность по отношению к HSIL; p4 – достоверность по отношению к SCC

При проведении сравнительного анализа экспрессии маркера пролиферации Ki67 было отмечено достоверное его увеличение у пациенток 2 группы (HSIL) ($p=2,7\times10^{-6}$) ($p<0,001$) и 3 группы (SCC) ($p=3,7\times10^{-4}$) ($p<0,001$) по сравнению с пациентками контрольной группы (NILM). Однако достоверных различий экспрессии Ki67 среди пациенток с LSIL и нормой выявлено не было ($p>0,05$). Следует отметить, что сравнительный анализ экспрессии Ki67 между пациентками с плоскоклеточными интраэпителиальными поражениями шейки матки различной степени тяжести также выявил достоверные различия среди пациенток с LSIL и HSIL ($p=6,79\times10^{-9}$) ($p<0,001$); LSIL и SCC ($p=1,2\times10^{-3}$) ($p<0,001$). Однако между пациентками с HSIL и SCC достоверных различий экспрессии данного маркера выявлено не было ($p>0,05$) (таблица 23).

Полученные результаты подтверждают данные литературы о более высокой экспрессии онкобелков p16ink4α и Ki67 у пациенток с SCC и HSIL по сравнению с пациентками с LSIL ($p<0,001$).

Таблица 23

Сравнительная характеристика частоты выявления белков Ki67, у пациентов с SIL с SCC

Онкомаркеры	Группы	Кол-во	p1	p2	p3	p4
Ki67	LSIL	31	p>0,05		p<0,001	p<0,001
	HSIL	26	p<0,001	p<0,001		p>0,05
	SCC	12	p<0,001	p<0,001	p>0,05	

Примечание:p1– достоверность по отношению к норме; p2– достоверность по отношению к LSIL; p3 – достоверность по отношению к HSIL; p4 – достоверность по отношению к SCC

ROC – анализ

Проведенный ROC – анализ позволил определить диагностическую чувствительность и специфичность p16ink4α и Ki67 для выявления предрака и рака шейки матки. Так, для p16ink4α диагностическая чувствительность составила – 97,4%, диагностическая специфичность – 76,8%. Для маркера пролиферации Ki67 диагностическая чувствительность составила – 100%, диагностическая специфичность – 92,8%. Данные представлены в таблице 24 и рис.16

Таблица 24

Чувствительность и специфичность метода ИЦХ

Метод	Чувствительность, %	Специфичность,%	Площадь под ROC-кривой
p16ink4α	97,4	76,8	0,918
Ki67	100,0	92,8	0,912

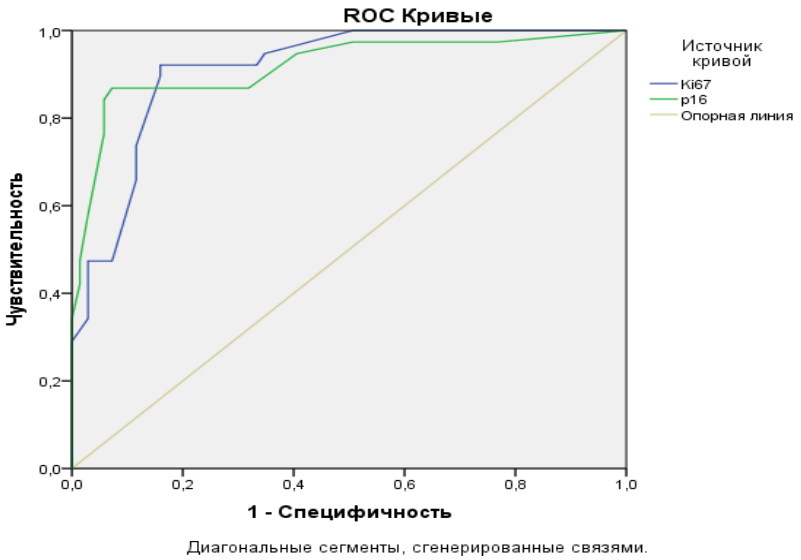


Рисунок 16. ROC – кривые для метода двойного иммуноокрашивания цитологических препаратов (ИЦХ) с использованием антител p16ink4α и Ki67

ВПЧ тестирование методом ПЦР-РВ на приборе Cobas 4800

ДНК ВПЧ определяли в цитологическом материале методом ПЦР-НВ на приборе Cobas 4800 и сравнивали полученные результаты с гистологическим заключением.

Так, в 1 группе – LSIL (n=31) ВПЧ тест был положительным в 27 случаях из 31 (87%), в 14 случаях был выявлен ВПЧ 16 генотипа (45,1%), в 5 случаях ВПЧ 18 генотипа (16,1%). При этом сочетание общего пула 12 генотипов высокоонкогенного ВПЧ (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 и 68) и ВПЧ 16 и 18 генотипов выявилось в 8 случаях (25,8%) (рис.17).

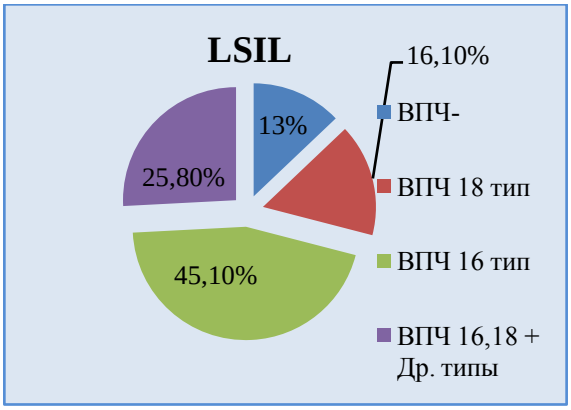


Рисунок 17. Результаты ВПЧ – тестирования у пациенток с LSIL

Во 2 группе – HSIL (n=26), ВПЧ тест был положительным в 25 случаях из 26 (96,1%).

Из них в 17 случаях выявлялся ВПЧ 16 генотипа (65,3%), в 2 случаях ВПЧ 18 генотипа (7,7%), а в 6 случаях сочетание общего пула 12 генотипов высокоонкогенного ВПЧ (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 и 68) и ВПЧ 16 и 18 генотипов (23%) (рис.18).

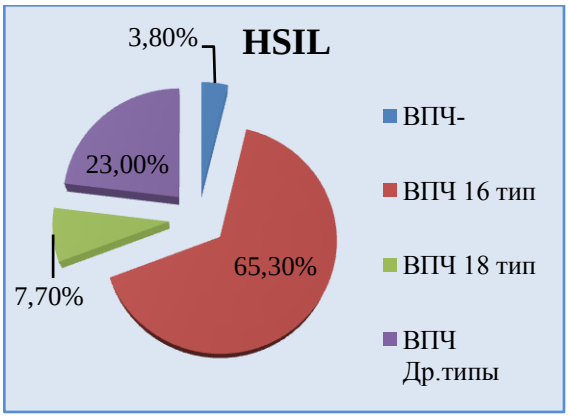


Рисунок 18. Результаты ВПЧ – тестирования у пациенток с HSIL

В 3 группе – SCC (n=12), ВПЧ тест был положительным у всех пациенток (100%). Из них у 9 из 12 случаев выявлялся ВПЧ 16 генотипа (75%), у 1 пациентке ВПЧ 18 генотипа (8,3%), сочетание ВПЧ16 генотипа + общий пул 12 типов высокоонкогенного ВПЧ (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 и 68) у 7 пациенток (58,3%) (рис.19).

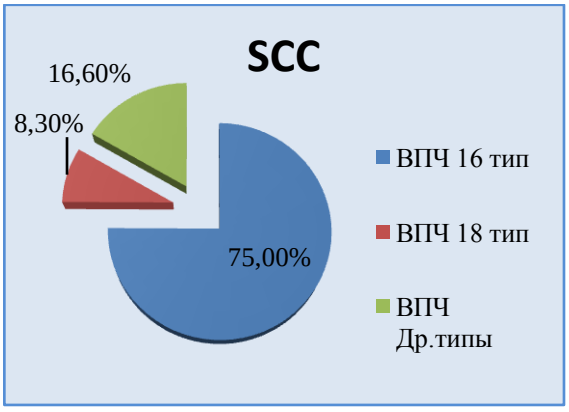


Рисунок 19. Результаты ВПЧ – тестирования у пациенток с SCC

В 4 группе - NILM (n=32), ВПЧ тест был положительным у 7 пациенток (21,8%), ВПЧ 16 генотипа был выявлен в 1 случае из 7 (3,1%), в остальных случаях 6 (18,7%) выявлялся общий пул из 12 генотипов (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 и 68) (рис. 20).

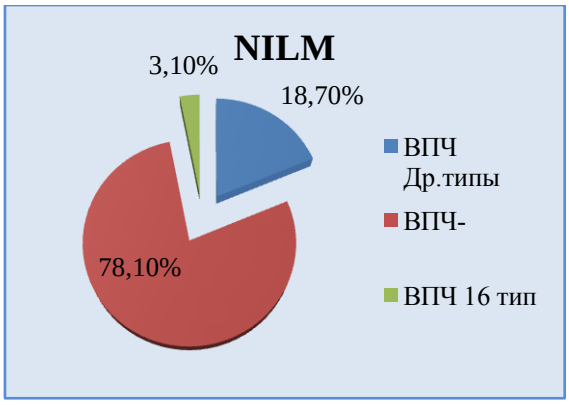


Рисунок 20. Результаты ВПЧ – тестирования у пациенток с NILM

Определение чувствительности и специфичности методов жидкостной цитологии, двойного окрашивания p16ink4α/Ki67и ВПЧ – тестирования

На следующем этапе нашей работы определяли чувствительность и специфичность жидкостной цитологии, двойного иммуннноокрашивания p16ink4α/Ki67 и ВПЧ – тестирования. Критерием достоверности являлось гистологическое заключение.

Диагностическая чувствительность цитологического исследования методом жидкостной цитологии для выявления SIL и рака шейки матки составила 83,4%, диагностическая специфичность 96,4% соответственно.

Диагностическая чувствительность коэкспрессии p16ink4α/Ki67 составила 98,5%, диагностическая специфичность 100%.

Длятеста на ВПЧ Cobas 4800 диагностическая чувствительность метода составила 94,2%, диагностическая специфичность 78,1% соответственно (таблица 25).

Таблица 25

Чувствительность и специфичность методов: жидкостной цитологии, двойного окрашивания p16ink4α/Ki67, ВПЧ-теста Cobas 4800 при SIL и раке шейки матки

Метод	Чувствительность, %	Специфичность, %
Жидкостная цитология	83,4	96,4
p16ink4α /Ki67(ИЦХ)	98,5	100
ВПЧ-теста Cobas 4800	94,2	78,1

По результатам нашего исследования было установлено, что двойное иммуноокрашивание p16ink4α/Ki67 является наиболее эффективным методом для выявления SIL различных степеней тяжести и рака шейки матки, так как данный метод обладает наиболее высокой диагностической чувствительностью и специфичностью по сравнению с жидкостной цитологией и ВПЧ – тестом. Выявленная нами высокая эффективность метода двойного окрашивания p16ink4α/Ki67 также подтверждается работами ряда других исследователей [110, 225].

Несмотря на то, что метод двойного окрашивания не требует подсчета положительных клеток, согласно инструкции производителя, в нашей работе была выявлена прямая взаимосвязь числа положительных клеток p16ink4α/Ki67 со степенью поражения шейки матки. Так, у пациенток с LSIL содержание положительных клеток p16ink4α/Ki67 в атипических клетках плоского эпителия шейки матки составляло около 30%, с HSIL – 60% и с SCC – 90 % и более ($p<0,005$). Наши данные не противоречат результатам, полученным другими авторами [165, 209].

Нами также было отмечено, что метод двойного окрашивания обладает более высокой специфичностью и чувствительностью по сравнению с ВПЧ – тестом, так как позволяет определить не только присутствие вируса, но и изменения, произошедшие в клетках эпителия шейки матки под его воздействием.

Заключение

Таким образом, резюмируя вышеизложенные результаты, установлено, что детекция онкомаркера p16ink4α и маркера пролиферации Ki67 при ВПЧ – ассоциированных заболеваниях шейки матки, зависит от степени тяжести плоскоклеточных интраэпителиальных поражений. Полученные результаты указывают на более высокую диагностическую чувствительность и специфичность при изучении коэкспрессии p16ink4α/Ki67 для выявления SIL и рака шейки матки по сравнению с ВПЧ – тестом и жидкостной цитологией. Данный факт свидетельствует о необходимости более широкого использования данного метода, что позволит усовершенствовать диагностику и тактику ведения пациенток с SIL и раком шейки матки.

Выявление коэкспрессии p16ink4α/Ki67 в эпителии шейки матки, даже в незначительных количествах, свидетельствует об инициации канцерогенеза, что позволяет использовать данный критерий в качестве прогностического маркера.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что комплексное использование таких методов, как жидкостная цитология, двойное окрашивание p16ink4α/Ki67 и ВПЧ – тестирование, значительно повышает эффективность ранней диагностики ВПЧ – ассоциированных заболеваний шейки матки.

3.5. Результаты экспрессии микроРНК при плоскоклеточных интраэпителиальных поражениях и раке шейки матки (количественная оценка)

Одной из задач исследования являлось изучение особенностей экспрессии микроРНК у пациенток с плоскоклеточными интраэпителиальными поражениями и плоскоклеточным раком шейки матки (SCC). Функции, исследованных микроРНК, представлены в таблице 26.

Таблица 26

Функции исследованных микроРНК

МикроРНК	Функция
has-mir-22-3p,	*онкосупрессор, ингибирует рост клеток и метастазирование*
has-mir-25-3p,	*проонкоген, активирующий инвазию и миграцию раковых клеток*
has-mir-92a-5p	*проонкоген, повышает жизнеспособность и инвазивность раковых клеток в шейке матк, путем ингибирования гена Dkk3 (Dikkopf-relatedprotein 3)*

Результаты исследования оценки экспрессии микроРНК в эпителии шейки матки при плоскоклеточных интраэпителиальных поражениях шейки матки различной степени тяжести по отношению к норме и раку шейки матки представлены в таблице 27. По сравнению с контрольной группой, у пациенток с LSIL, HSIL и SCC отмечалось снижение более, чем в 2 раза уровня экспрессии miR-22 ($p<0,05$). Однако при проведении сравнительного анализа между пациентками с LSIL, HSIL и SCC достоверных отличий экспрессии miR-22 выявлено не было ($p>0,05$). Изучение экспрессии miR-92a установило повышение в 3 и более раз уровня экспрессии при HSIL и раке шейки матки по сравнению с группой контроля ($p<0,05$). Важно отметить, что при LSIL экспрессия miR-92a практически не отличалась от нормы ($p>0,05$). Изучение экспрессии miR-25 выявило незначительное увеличение экспрессиипри SIL и SCC, однако достоверных статистических различий по сравнению с нормой выявлено не было ($p>0,05$).

Таблица 27

Уровень экспрессии микроРНК в эпителии шейки матки в норме, при цервикальной интраэпителиальной неоплазии и раке шейки матки

МикроРНК	Группы	Кол-во	Медиана	Квартили 1, 3	Изменение к норме	P_1	P_2
mir-22	NILM	32	4,3	3,2-7,1			
	LSIL	31	1,74	0,9-2,73	-2,5	<0,001	
	HSIL	26	1,87	0,88-4,2	-2,3	<0,001	
	SCC	12	1,87	1,1-2,3	-2,3	0,04	>0,05
mir-25	NILM	32	26,9	13,1-43,8			
	LSIL	31	29,9	12,6-76,5	+1,1	>0,05	
	HSIL	26	36,8	19,7-128	+1,4	>0,05	
	SCC	12	35,2	9,5-72,1	+1,3	>0,05	>0,05
mir-92a	NILM	32	0.012	0,009-0,017			
	LSIL	31	0,016	0,01-0,028	+1,3	>0,05	
	HSIL	26	0,036	0,017-0,095	+3,0	<0,001	
	SCC	12	0,04	0,02-0,07	+3,3	0,002	>0,05
mir-22+mir-25	NILM	32	2,2	1,1-3,9			
	LSIL	31	0,78	0,24-3,1	-2,8	0,02	
	HSIL	26	0,65	0,23-1,79	-3,4	0,006	
	SCC	12	0,81	0,59-1,2	-2,7	>0,05	>0,05
mir-22+mir-92a	NILM	32	2,46	1,36-4,84			
	LSIL	31	0,96	0,41-1,6	-2,6	<0,001	
	HSIL	26	0,37	0,18-1,2	-6,6	<0,001	
	SCC	12	0,41	0,1-0,95	-6,0	0,003	>0,05
mir-22+ mir-25+mir-92a	NILM	32	1,36	0,6-1,62			
	LSIL	31	0,43	0,14-0,87	-3,2	0,002	
	HSIL	26	0,22	0,09-0,56	-6,2	<0,001	
	SCC	12	0,25	0,1-0,42	-5,4	0,001	>0,05

Примечание: p_1– достоверность по отношению к норме; p_2 –достоверность по отношению к HSIL.

Оценка суммарного показателя уровня экспрессии как двух, так и трех микроРНК, показала более выраженное различие между исследуемыми группами.

Так, суммарная экспрессия miR-22+miR-25 была почти в 3 раза ниже у пациенток с LSIL/HSIL и SCC по сравнению с контрольной группой (p<0,001). Показатель суммарной экспрессии miR-22+miR-92a достоверно информативней по сравнению с показателями уровня экспрессии каждого микроРНК по отдельности. Так, снижение показателя суммарной экспрессии miR-22+miR-92a отмечался в 2,6 раз у пациенток с LSIL и в 6 и более раз у пациенток с HSIL и SCC(p<0,001) (таблица 27).

ROC – анализ

В нашей работе оценивалась возможность применения изменений профиля экспрессии микроРНК в клетках шеечного эпителия для проведения дифференциальной диагностики SIL при помощи ROC – анализа (таблица 28).

Таблица 28

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.)	Чувст-сть (%)	Спец-сть (%)	Диагностическая 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
mir-22 + mir-92a	0,815	1,1	84,4	65,1	74,7	10,06 (3,14-37,27)	<0.001

Результаты, представленные в таблице 28, показали, что наибольшая диагностическая точность для выявления SIL шейки матки, независимо от степени тяжести, достигалась при оценке показателя суммарной экспресии двух микроРНК (miR-22 и miR-92a) – 74,7%. Следует отметить, что при этом шанс правильной постановки диагноза повышался в 10 раз (p<0,001).

Проведенный нами ROC анализ показал, что точность диагностики SCC была одинаково высока как при оценке уровня экспрессии отдельно каждого микроРНК (miR-22 или miR-92a) (соответственно 82,3% и 85,4%), так и при оценке их суммарного показателя (miR-22+miR-92a) (83,6%) (таблица 29).

Таблица 29

Данные логистического регрессионного анализа ROC-кривой сравнения уровней экспрессии микроРНК в норме и раке шейки матки

МикроРНК	Площадь под кривой	Уровень отсечки (у.е.)	Чувст-сть (%)	Спец-сть (%)	Диагностическая 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
mir-22 + mir-92a	0,823	0,97	84,4	82,9	83,6	12,15 (2,97-53,51)	<0.001

При уровне экспрессии miR-22 выше 2,55 у.е. чувствительность и специфичность диагностики SCC составили 81,3% и 83,35% соответственно. Отношение шансов правильности диагноза составило 21,67 (p=0,005). Несколько большая точность для диагностики SCC выявилась при оценке экспрессии miR-92a. Так, при уровне экспрессии miR-92a выше 0,018 у.е. чувствительность метода составила 83,3%, специфичность 87,5%. Также нами была проведена оценка показателя суммарной экспрессии (miR-22+miR-92a) для диагностики SCC. Было установлено, что при значении показателя ниже 0,97 у.е. чувствительность составила 84,4%, специфичность 82,9%.

Проведение логистического регрессионного анализа ROC – кривой показало также возможность дифференцировать SCC от HSIL (таблица 30).

Таблица 30

Данные логистического регрессионного анализа ROC-кривой, сравнения уровней экспрессии микроРНК при HSIL и раке шейки матки

МикроРНК	Площадь под кривой	Уровень отсечки (у.е.)	Чувст-сть (%)	Спец-сть (%)	Диагностическая 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
mir-22+mir-92a	0,891	1,1	84,4	83,3	83,8	31,2 (2,56-1487.1)	<0,001

Установлено, что 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 при этом составило 8,17 и достоверность правильности диагноза 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. Максимальная диагностическая точность достигалась при анализе показателя суммарной экспрессии miR-22+miR-92a – при значении показателя ниже 1,1; чувствительность и специфичность дифференциальной диагностики SCC от HSIL составила 84,4% и 83,3%, соответственно. Отношение шансов при этом составило 31,2 (p=0,001).

Заключение

Таким образом, изменение профиля экспрессии микроРНК позволяет с высокой точностью дифференцировать ранние стадии плоскоклеточных интраэпителиальных поражений шейки матки от нормы и цервикальный рак от предраковых состояний. Так, снижение более, чем в 2 раза уровня экспрессии miR-22, достоверно чаще выявлялось у пациентокс LSIL и HSIL и SCC (p<0,05). Изучение экспрессии miR-92a при HSIL и раке шейки матки установило повышение уровня экспрессии данной микроРНК в 3 и более раз по сравнению с контрольной группой (p<0,05). Также было установлено, что показатель суммарной экспрессии как по двум, так и по трем микроРНК, позволяет более точно верифицировать тяжесть плоскоклеточных интраэпителиальных поражений и рака шейки матки по сравнению с показателем уровня экспрессии одного микроРНК. Так, снижение показателя суммарной экспрессии miR-22+miR-92a отмечался в 2,6 раз у пациенток с LSIL и в 6 и более раз у пациенток с HSIL и SCC (p<0,001). При анализе показателя суммарной экспрессии miR-22+miR-92a было установлено, что при значении показателя экспрессии ниже 1,1 у.е. данный метод позволяет дифференцировать SCC от HSIL с чувствительностью 84,4% и специфичностью 83,3% соответственно.

3.6. Результаты аномального метилирования гена WIF1 при плоскоклеточных интраэпителиальныхпоражениях и раке шейки матки

Одной из задач нашего исследования являлась оценка диагностической значимости степени метилирования промоторного участка гена WIF1 в диагностике и развитии плоскоклеточных интраэпителиальных поражений шейки матки.

После отбора образцов клеток цервикального канала было проведено выделение 101 образца ДНК, которые далее были подвергнуты бисульфитной конверсии.

По результатам исследования в образцах ДНК тканей пациенток 1, 2 и 3 групп аномальное метилирование промоторного участка гена WIF1 было обнаружено у всех пациенток. Так, у пациенток с LSIL количество метилированных сайтов промоторного участка гена WIF1 составило 32,9%, с HSIL 54,1%, с SCC 75,2%, при NILM 2,23% (рис. 21).

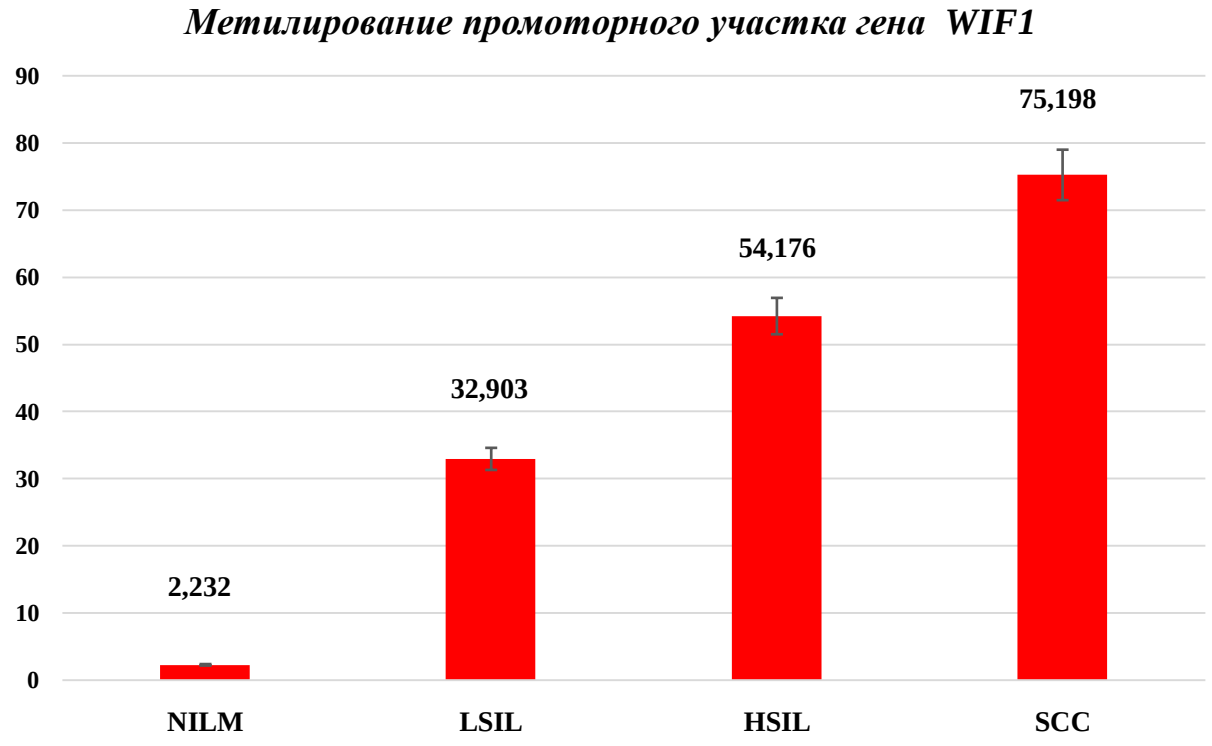


Рисунок 21. Уровень метилирования промоторного участка гена WIF1 (%).

Медиана уровня аномального метилирования промоторного участка гена WIF1 у пациенток 1 группы (LSIL) составила 34,2%, у 2 группы (HSIL) 47,1%, у пациенток 3 группы (SCC) 72,4%. В образцах ДНК тканей здоровых женщин медиана степени аномального метилирования промоторного участка гена WIF1 составила (0%) (таблица 31).

Таблица 31

Значение медианы уровня аномального метилирования промоторного участка гена WIF1

	NILM	LSIL	HSIL	SCC
Среднее	2,232	32,903	54,176	75,198
Стандартная ошибка	0,940	2,983	3,755	1,188
Медиана	0,000	34,286	47,143	72,413
Мода	0,000	42,857	40,000	72,413
Стандартное отклонение	5,320	16,609	19,149	4,114
Дисперсия выборки	28,300	275,848	366,681	16,927
Эксцесс	2,581	-0,055	-1,277	-1,650
Асимметричность	2,068	0,530	0,508	0,812
Интервал	17,143	60,000	60,000	8,356
Минимум	0,000	11,429	25,714	72,413
Максимум	17,143	71,429	85,714	80,769
Сумма	71,429	1020,000	1408,571	902,380
Кол-во пациентов	32	31	26	12
Уровень надежности (95,0%)	1,918	6,092	7,734	2,614

Результаты исследования уровня аномального метилирования сайтов промоторного участка гена WIF1 в эпителии шейки матки при плоскоклеточных интраэпителиальных поражениях шейки матки различной степени тяжести по отношению к норме и раку шейки матки представлены в таблице 32.

Таблица 32

Уровень аномального метилирования гена WIF1 у пациенток SIL и SCC

	Группы	Кол-во	Медиана	p 1	p2	p3	p4
Ген метилирования WIF 1	LSIL	31	34,2	p <0,001		0,0004	p <0,001
	HSIL	26	47,1	p <0,001			0,008
	SCC	12	72,4	p <0,001	p <0,001	0,008	

Примечание:p1– достоверность по отношению к норме; p2 – достоверность по отношению к LSIL; p3 - достоверность по отношению к HSIL; p4 - достоверность по отношению к SCC

Результаты исследования оценки уровня аномального метилирования промоторного участка гена WIF1 в исследуемых группах выявило статистически значимые различия между пациентками всех исследуемых групп (p<0,001).

Для сравнения уровня метилирования в группах NILM, LSIL и HSIL и SCC была построена диаграмма размаха (рис. 22). Достоверность различий определяли с помощью U-критерия Манна-Уитни с поправкой Бонферрони для множественных сравнений.

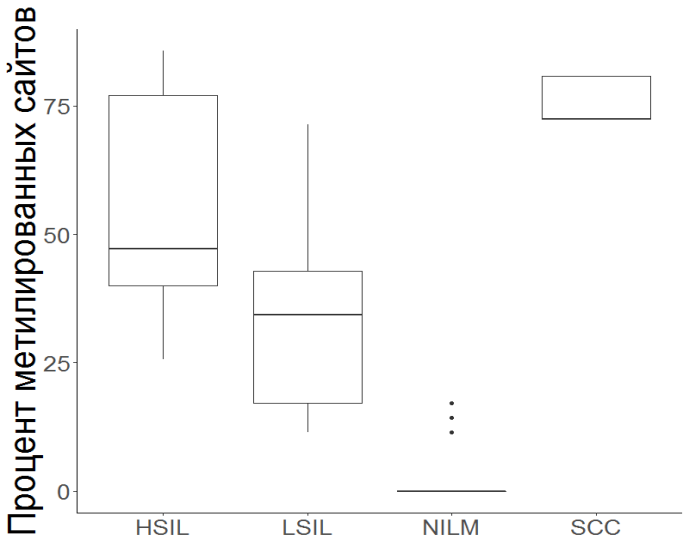


Рисунок 22. Диаграмма размаха уровня метилирования в различных группах пациентов

Для всех исследованных групп уровень метилирования промоторной области гена WIF1 статистически значимо отличался (p<0,001). Так, для NILM и LSIL $p=1{,}11\times10^{-11}$, для NILM и HSIL $p=1{,}5\times10^{-12}$, для NILM и SCC$p=4{,}7\times10^{-8}$, для LSIL и HSIL $p=4{,}39\times10^{-7}$, для HSIL и SCC p=0,008.

Следует отметить, что распределение пациентов по количеству сайтов метилирования во всех группах существенно отличалось от нормального (рис. 23). При этом распределения были бимодальными, что может свидетельствовать о наличие нескольких подгрупп (с разной степенью риска прогрессии заболевания) в каждой группе. Для подтверждения данной гипотезы необходимо проведение дополнительных ретроспективных исследований.

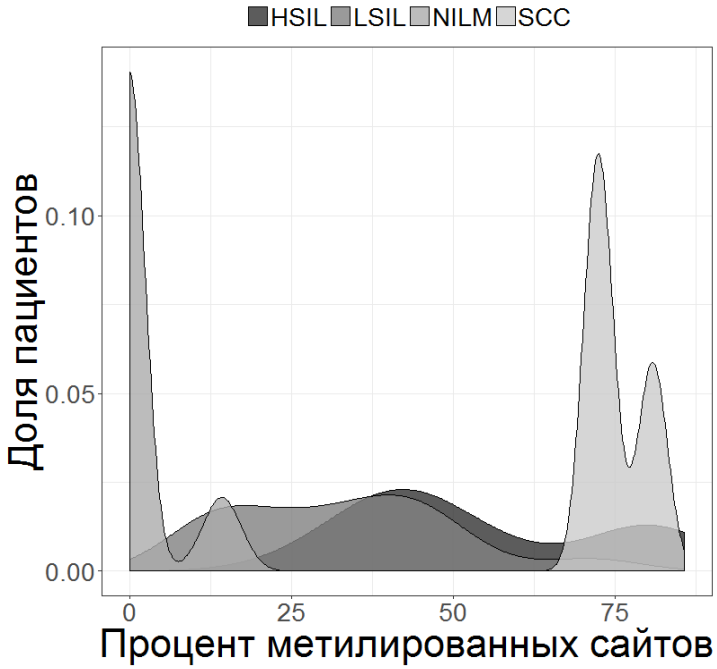


Рисунок 23. Диаграмма распределения уровня метилирования в различных группах пациентов (непрерывные распределения были получены при помощи аппроксимации экспериментальных данных функцией density языка программирования R)

Аналогичные результаты были получены ранее в исследованиях W.F.Van Der Meide, которые показали, что существует выраженная достоверная корреляция между уровнем метилирования промоторной области гена WIF1 и возникновением CIN (p<0,01) [178, 218].

ROC – анализ

По данным ROC – анализа было установлено, что данный метод исследования для выявления интраэпителиальных поражений шейки матки, в том числе и рак, имеет значение превышающие 0,5, что указывает его пригодность для поставленной задачи. Значение AUC метилирования промоторной области гена WIF1 составила 0,923. Диагностическая чувствительность метода составила 100 %, а диагностическая специфичность 84,3% соответственно (рис. 24).

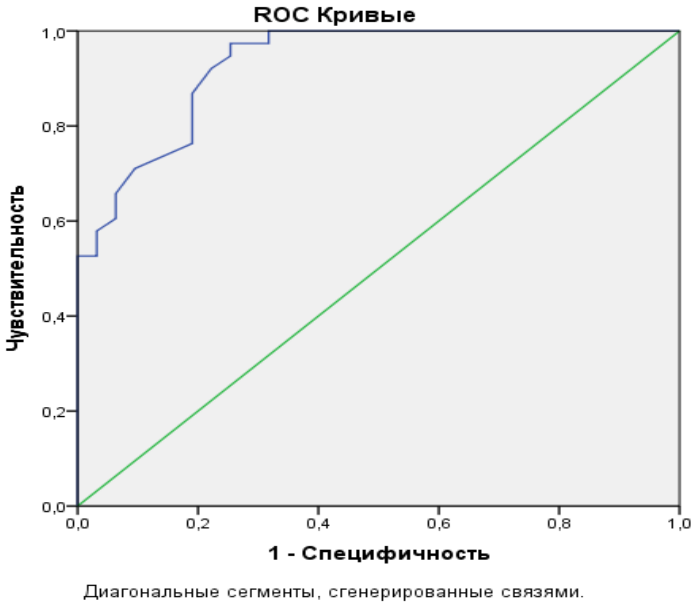


Рисунок 24. ROC – кривая для метода метилирования промотора гена WIF1

По результатам проведенных исследований можно предположить, что изменение экспрессии транскрипционных факторов, вовлеченных в процесс дифференцировки и регуляцию стволовых клеток, является одним из ключевых факторов развития злокачественных новообразований в гормон - зависимых тканях репродуктивной системы.

К числу таких белков – транскрипционных факторов, вовлеченных в регуляцию пролиферативных эмбриональных каскадов, относится и фактор WIF1. Есть все основания считать, что уровень метилирования кодирующего данный белок гена достоверно коррелирует со стадией прогрессии цервикальных неоплазий.

Однако надо отметить, что использованный в настоящей работе метод определения уровня метилирования (бисульфитное секвенирование), несмотря на свою высокую информативность, является многостадийным и дорогостоящим процессом. В связи с этим возникает необходимость в изучении и внедрении менее трудоемких и дорогостоящих методов для определения уровня метилирования генов (например, определение уровня экспрессии WIF1 методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией).

Заключение

По результатам исследования было установлено: в норме метилирование промоторной области гена WIF1 не наблюдается или выражено слабо. Появление сайтов метилирования данного гена у женщин с нормальной цитологической картиной может свидетельствовать о начальных стадиях формирования неопластического процесса в эпителии шейки матки.

У всех женщин с диагнозом LSIL, HSIL и SCC наблюдается аномальное метилирование промоторных участков гена WIF1. При этом уровень метилирования промоторного участка гена WIF1 статистически достоверно коррелирует со стадией заболевания ($p<0,05$).

Оценка статуса метилирования гена WIF1 может рассматриваться как потенциальный диагностический и прогностический маркер канцерогенеза шейки матки.

3.7. Сравнительный анализ результатов диагностических методов при патологии шейки матки, ассоциированной с вирусом папилломы человека (корреляционный анализ)

Для определения направления и силы связи между различными методами исследования нами был проведен корреляционный анализ между полученными результатами методом Пирсона.

Проведенный корреляционный анализ между полученными результатами экспрессии онкобелка p16ink4α и маркера пролиферации Ki67 и гистологическим

заключением у женщин с плоскоклеточными интраэпителиальными поражениями шейки матки и SCC установил прямую, сильную, достоверную двухстороннюю корреляционную связь. Для онкобелка p16ink4α r – Пирсона= + 0,83; p=1,8 $\times 10^{-29}$, для маркера пролиферации Ki67 r – Пирсона = + 0,7; p=4,75$\times 10^{-17}$ соответственно. Также была обнаружена сильная, прямая, достоверная корреляционная связь между онкобелком p16ink4α и маркером пролиферации Ki67 (r – Пирсона = + 0,72; p=1,55 $\times 10^{-18}$) (таблица 33), что подтверждает возможность использования их в качестве маркеров для диагностики SIL и рака шейки матки.

Таблица 33

Корреляционный анализ результатов ИГХ игистологического исследования

		Гистология	**Ki67**	**p16**
Гистология	R	**1**		
	P			
Ki67	R	**0,700****	**1**	
	P	**0,0001**		
p16	R	**0,839****	**0,723****	**1**
	P	**0,000**	**0,0001**	

*** Корреляция значима на уровне 0,01 (двухсторонняя)*

Проведение корреляционного анализа между результатами аномального метилирования гена WIF1 и гистологическим заключением также выявил прямую, сильную, достоверную двухстороннюю корреляционную связь (r – Пирсона = + 0,8; p=7,0 $\times 10^{-33}$) (таблица 34) (рис. 25), что означает возможность использования показателя аномального метилирования генаWIF1 в качестве диагностического маркера SIL и рака шейки матки.

Таблица 34

Корреляционный анализ результатов метилирования гена WIF 1 и гистологического исследования

		Гистология	Метилирование
Гистология	R	**1**	0,875**
	P		0,0001
Метилирование	R	0,875**	**1**
	P	**0,0001**	

*** Корреляция значима на уровне 0,01 (двухсторонняя)*

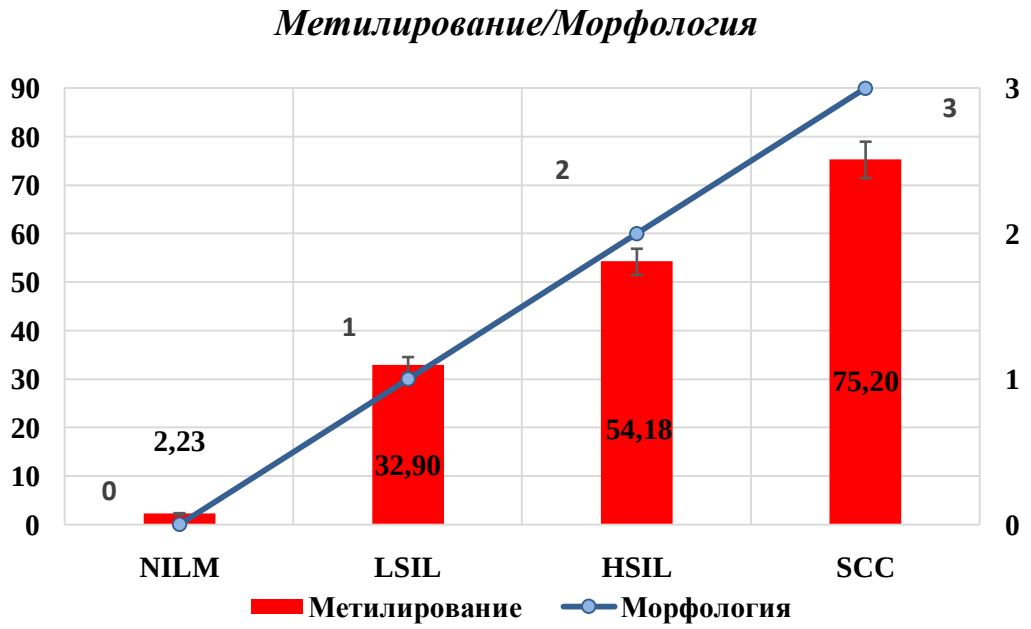


Рисунок 25. *Корреляциярезультатов метилирования гена WIF 1 и гистологического исследованияу пациенток с SIL и SCC*

Проведение корреляционного анализа между результатами экспрессии уровня микроРНК (miR-22, miR-25, miR-92a) и гистологическим заключением выявило прямую, достоверную, слабую корреляционную связь только между miR-92a (r - Пирсона = + 0,27; p=0,007), а между miR-22 и miR-25 и гистологией достоверной корреляционной зависимости установлено не было (p>0,05) (таблица 35).

Таблица 35

Корреляционный анализ результатов экспрессии микроРНК и гистологического исследования

		Гистология	miR 22	miR 25	miR 92a
Гистология	R	**1**			
	P				
miR 22	R	-0,064	**1**		
	P	0,539			
miR 25	R	0,189	-0,082	**1**	
	P	0,067	0,429		
miR 92a	R	**0,274****	-0,055	**0,895****	**1**
	P	**0,007**	0,597	**0,0001**	

*** Корреляция значима на уровне 0,01 (двухсторонняя)*

Следует отметить, что при проведении корреляционного анализа была установлена прямая, достоверная корреляционная связь между показателем суммарной экспрессии уровня miR-92a+miR-25 и гистологическим заключением (r – Пирсона = + 0,308; p=0,002) (таблица 36).

Таблица 36

Корреляционный анализ показателя суммарной экспрессии МикроРНК с результатом гистологического исследования

		Гистоло-гия	miR 22_ miR 25	miR 22_ miR 92a	miR 25_ miR 92a	miR 22_ miR 25_ miR 92a
Гистология	R	**1**				
	P					
miR 22_ miR 25	R	-0,131	**1**			
	P	0,206				
miR 22_ miR 92a	R	**-0,324****	**0,882****	**1**		
	P	**0,001**	**0,0001**			
miR 25_ miR 92a	R	**0,308****	-0,160	**-0,244***	**1**	
	P	**0,002**	0,120	**0,017**		
miR 22_ miR 25_ miR 92a	R	**-0,261***	**0,846****	**0,941****	**-0,264****	**1**
	P	**0,011**	**0,0001**	**0,0001**	**0,010**	

** Корреляция значима на уровне 0,05 (двухсторонняя)*
***Корреляция значима на уровне 0,01 (двухсторонняя)*

Полученные данные показывают возможность использования miR-92a в комплексе диагностики предрака и рака шейки матки.

Проведенный корреляционный анализ между показателями экспрессии онкобелка p16ink4α 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 (таблицы 37, 38, 39, 40).

Таблица 37

Параметрические корреляционные зависимости у пациенток с LSIL

		LSIL_Ki67	LSIL_p16	LSIL_Метилирование
LSIL_Ki67	R	**1**		
	P			
LSIL_p16	R	0,171	**1**	
	P	0,267		
LSIL_Метилирование	R	-0,187	-0,017	**1**
	P	0,315	0,928	
LSIL_miR22	R	-0,288	-0,246	-0,052
	P	0,116	0,183	0,782
LSIL_miR25	R	-0,212	0,005	0,320
	P	0,251	0,980	0,079
LSIL_miR92a	R	-0,226	0,015	0,249
	P	0,222	0,936	0,178

Таблица 38

Параметрические корреляционные зависимости у пациенток с HSIL

		HSIL_Ki67	HSIL_p16	HSIL_Метилирование
HSIL_Ki67	R	**1**		
	P			
HSIL_p16	R	**0,601****	**1**	
	P	**0,0001**		
HSIL_Метилирование	R	0,171	0,364	**1**
	P	0,405	0,067	
HSIL_miR22	R	-0,174	-0,159	0,223
	P	0,397	0,439	0,273
HSIL_miR25	R	-0,157	-0,007	-0,086

	P	0,443	0,971	0,676
HSIL_miR92a	R	-0,043	0,042	-0,119
	P	0,836	0,839	0,562

Таблица 39

Параметрические корреляционные зависимости у пациенток с SCC

		SCC_Ki67	SCC_p16	SCC_Метилирование
SCC_Ki67	R	**1**		
	P			
SCC_p16	R	-0,459	**1**	
	P	0,360		
SCC_Метилирование	R	0,524	-0,612	**1**
	P	0,286	0,196	
SCC_miR22	R	-0,444	0,499	-0,268
	P	0,378	0,313	0,608
SCC_miR25	R	0,445	0,414	-0,336
	P	0,377	0,414	0,515
SCC_miR92a	R	0,405	0,457	-0,320
	P	0,426	0,362	0,537

Таблица 40

Параметрические корреляционные зависимости у пациенток с NILM

		NILM_Ki67	NILM_p16	NILM - Метилирование
NILM_Ki67	R	**1**		
	P			
NILM_p16	R	**-0,514****	**1**	
	P	**0,009**		
NILM_Метилирование	R	-0,064	0,125	**1**
	P	0,760	0,552	
NILM_miR22	R	0,245	-0,345	0,241
	P	0,237	0,091	0,185
NILM_miR25	R	-0,089	0,241	-0,040
	P	0,671	0,245	0,827
NILM_miR92a	R	0,079	0,272	0,132
	P	0,708	0,188	0,472

ГЛАВА 4.ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Несмотря на многочисленные труды, посвященные проблеме плоскоклеточных интраэпителиальных поражений (SIL) шейки матки, достигнутые успехи в области диагностики и лечения, риск прогрессирования SIL в рак шейки матки остается достаточно высоким как в нашей стране, так и зарубежом.

По данным ежегодного отчета (2017) МНИОИ им. П.А. Герцена - филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России, в Российской Федерации в 2015 году зарегистрировано 16 710 новых случаев рака шейки матки, доля которого в структуре онкологической патологии среди женщин составила 5,8%, среднегодовой темп прироста 2,11% [14]. Значительный рост онкологической заболеваемости шейки матки и тенденция к омоложению заболевания являются весьма тревожным фактом, так как данный контингент женщин составляет репродуктивную часть населения, а также активную часть социального общества [11].

На сегодняшний день нет данных о распространенности генотипов ВПЧ среди пациенток с SIL шейки матки в возрасте до 30 лет и старше.

Этот факт послужил основанием для первой задачи нашего исследования – изучить распространенность генотипов ВПЧ при плоскоклеточных интраэпителиальных поражениях шейки маткиу женщин в возрасте 21 – 29 лет и в возрасте 30 – 49 лет. По результатам нашего исследования распространенность ВПЧ у пациенток <30лет с LSIL составила – 59,5%, с HSIL – 86,8%; у пациенток ≥30 лет с LSIL – 56,7%, с HSIL – 81,6%.

По данным научной литературы распространенность ВПЧ при CIN 1 составляет – 72,4%, при CIN 2 – 81,8%, CIN3 – 88,1%, что не противоречит нашим результатам [135]. Следует отметить, что в нашем исследовании достоверных различий по распространенности ВПЧ в зависимости от возраста установлено не было (p>0,05). Однако полученные результаты свидетельствуют о достоверной

корреляции между распространенностью ВПЧ и тяжестью цервикальных поражений вне зависимости от возраста (p<0,05).

На сегодняшний день существуют разноречивые данные относительно географической распространенности различных генотипов ВПЧ и их связи с развитием предраковых поражений шейки матки.

Lei Zhang (2017) установил, что наиболее распространенные генотипы ВПЧ среди китайских женщин с SIL являются 16, 52, 31, 33 и 58 [135]. В то время, как среди англоговорящих женщин старше 30 лет Карибского бассейна, широко распространены 52, 35, 51, 45 и 31 генотипы ВПЧ. [176]. По результатам исследования Sasagawa T (2016) наиболее распространенные генотипы ВПЧ среди японских женщин с аномальной цитологической картиной являлись 52, 16 и 58 генотипы, реже встречались 31 и 18 генотип и крайне редко 33, 35 и 45 генотипы [143]. По результатам нашего исследования наиболее распространенные генотипы ВПЧ у пациенток с SIL шейки матки являлись 16 (38,0%), 33 (15,3%), 31 (11,3%), 18 (6,7%) и 52 (5,3%). Остальные генотипы встречались в менее 5,0% случаев. По нашему мнению и мнению наших зарубежных коллег, сведения о распространенности различных генотипов ВПЧ имеют большое значение для будущей профилактики (скрининг, вакцинация) предраковых поражений и рака шейки матки.

По данным многочисленных публикаций, наиболее распространенным генотипом ВПЧ среди женщин с аномальной и нормальной цитологической картиной является – 16 генотип [129, 214, 173]. По результатам нашего исследования у пациенток <30лет с LSIL ВПЧ 16 генотипа выявлялся в 27,0% случаев, с HSIL – 50,0% (p=0,03); у пациенток ≥30 лет с LSIL – 24,9%, с HSIL – 50,0% (p=0,01); у пациенток с NILM<30 лет – 25,7%, ≥ 30 лет – 10,5% (p=0,09). Вышеизложенные результаты достоверно указывают на то, что у пациенток с LSIL ВПЧ 16 генотипа встречался в 1,4 раза чаще, у пациенток с HSIL в 2,7 раза чаще по сравнению с пациентками без морфологических изменений (p<0,05). Полученные результаты свидетельствуют о достоверной корреляции частоты выявляемости ВПЧ 16 генотипа с выраженностью патологического процесса в

шейке матки, вне зависимости от возраста, и совпадают с результатами ряда зарубежных исследователей [83, 135, 176]. ВПЧ 16 генотипа может рассматриваться как фактор риска возникновения SIL шейки матки [172].

Определенный интерес среди исследователей представляет связь между онкогенным потенциалом генотипов ВПЧ и развитием плоскоклеточных поражений шейки матки. По результатам проведенного исследования J. Peng (2017) в 94,9% случаев рака шейки матки выявляются высокоонкогенные генотипы ВПЧ и только в 2,7% случаев низкоонкогенные [83]. В нашей работе установлено, что у пациенток с нормальной цитологической картиной чаще выявлялись низкоонкогенные генотипы 51, 39, 56, 68, 73, а у пациенток с SIL высокоонкогенные 16, 18, 31, 33, 52 генотипы. Выявленные нами различия подтверждают взаимосвязь онкогенного потенциала ВПЧ со степенью тяжести плоскоклеточных интраэпителиальных поражений. Следует отметить, что достоверных различий в зависимости от возраста выявлено не было ($p>0,05$).

В исследовательской литературе имеются публикации о существенной роли вирусной нагрузки ВПЧ в развитии и прогрессировании SIL шейки матки.

Проведенный нами анализ средней вирусной нагрузки вируса папилломы человека у пациенток с SIL и без, в возрасте до 30 лет и старше, показал прямую взаимосвязь между показателями вирусной нагрузки и тяжестью поражения эпителия шейки матки, и был достоверно выше у пациенток с плоскоклеточными интраэпителиальными поражениями высокой степени ($p<0,05$). Так, средняя вирусная нагрузка в группе женщин моложе 30 лет с плоскоклеточными интраэпителиальными поражениями низкой степени (LSIL) составила 4,55±1,57 (медиана 4,76), с плоскоклеточными интраэпителиальными поражениями высокой степени (HSIL) – 5,59±1,63 (медиана 5,83), с нормальными результатами цитологического исследования (NILM) 4,08±1,75 (медиана 4,13) ($p<0,05$). В группе женщин старше 30 лет с плоскоклеточными интраэпителиальными поражениями низкой степени (LSIL) составила 4,51±1,51 (медиана 4,72), с плоскоклеточными интраэпителиальными поражениями высокой степени (HSIL) – 5,93±0,83 (медиана 6,16), с нормальными результатами цитологического

исследования (NILM) 4,08±1,75 (медиана 4,18) ($p<0,05$). Полученные нами данные не позволили установить достоверной зависимости между вирусной нагрузкой и возрастом пациенток ($p>0,05$). Однако они подтверждают данные исследований [125, 186], в которых отмечается взаимосвязь вирусной нагрузки с тяжестью плоскоклеточных поражений, и позволяют ее рассматривать как маркер тяжести поражения эпителия шейки матки в комплексе с ВПЧ тестированием, жидкостной цитологией и расширенной кольпоскопией.

Следующим этапом нашего исследования было проведение расширенной кольпоскопии у пациенток с SIL шейки матки в возрасте моложе 30 лет и старше.

Проведенный анализ кольпоскопической картины в зависимости от степени тяжести SIL шейки матки выявил, что вне зависимости от возраста, слабовыраженные изменения эпителия шейки матки (тонкий 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 ($p<0,05$). Полученные нами результаты согласуются с аналогичными исследованиями [202].

Также нами были проанализированы наиболее часто встречаемые генотипы ВПЧ при различных кольпоскопических картинах. Сравнительный анализ результатов кольпоскопической картины с результатами генотипирования ВПЧ установил, что наиболее часто как при слабовыраженных, так и выраженных кольпоскопических изменениях эпителия шейки матки выявляли ВПЧ 16 генотипа. Так, при наличии тонкого АБЭ, ВПЧ 16 генотипа выявлялся у пациенток с SIL <30лет в 26,4% случаев, ≥30 лет в 25,5% случаев соответственно. При выраженных изменениях (АБЭ с мозайкой/пунктацией) ВПЧ 16 генотипа выявлялся более 40% случаев.

Исходя из полученных нами результатов, было установлено, что при выраженных и слабовыраженных изменениях эпителия шейки матки чаще встречались высокоонкогенные генотипы ВПЧ – 16, 31, 33 и 52 ($p<0,05$). Основываясь на полученных результатах нашего исследования, можно сказать о важности проведения расширенной кольпоскопии, наряду с жидкостной цитологией и ВПЧ – тестированием для ранней диагностики SIL шейки матки.

Открытые в последние годы сложные взаимодействия между геномом соматической клетки и вирусом папилломы человека расширили наши представления о канцерогенезе шейки матки и способствовали разработке и внедрению в практику методов диагностики, основанных на молекулярно-генетических технологиях, способных не только выявить, но и прогнозировать цервикальные поражения, ассоциированные с ВПЧ.

Одним из таких перспективных методов диагностики SIL и рака шейки матки, по мнению ряда авторов, является определение онкобелка p16ink4α и маркера пролиферации Ki67 методом двойного окрашивания, позволяющее определить не только наличие онковирусных белков, но и установить степень нарушений клеточной регуляции [111, 146].

По данным нашего исследования, экспрессия онкобелка p16ink4α у пациенток с LSIL составила – 27,2% атипических клеток плоского эпителия в мазке, маркера пролиферации Ki67 – 11,6%. У пациенток с HSIL экспрессия онкобелка p16ink4α – 58,9% атипических клеток плоского эпителия в мазке, маркера пролиферации Ki67 – 30,7%. Среди пациенток с плоскоклеточным раком шейки матки экспрессия онкобелка p16ink4α составила – 90,0% атипических клеток плоского эпителия в мазке, маркера пролиферации – 78,3%.

Следует отметить, что у пациенток без клеточной атипии по данным цитологического исследования (NILM) мы также выявили отдельные p16ink4α - положительные клетки – 0,72%,в тоже время у них отсутствовала экспрессия маркера пролиферации Ki67, что позволило нам отнести их в категорию «стареющих» клеток. Также в нескольких случаях выявляли экспрессию маркера

пролиферации Ki67 – 8,2%, но отсутствовала экспрессия онкобелка p16ink4α, что свидетельствовало о доброкачественной пролиферации клетки.

Полученные нами данные сопоставимы с полученными результатами Kanthiya K (2016), согласно которым у женщин с CIN 1 экспрессия p16ink4α составляла – 10,4%, Ki67 – 22,6%, при CIN 2-3 экспрессия p16ink4α – 78,7%, Ki67 – 75,4%, при SCC экспрессия p16ink4α – 91,3%, Ki67 – 100%.

При этом диагностическая чувствительность p16ink4α для выявления CIN 2-3 составила – 84,5%, для Ki67 – 82,1%, специфичность p16ink4α – 90,5%, для Ki67 – 88,6% [110]. По результатам нашего исследования диагностическая чувствительность маркера p16ink4α была выше и составила – 97,4%, специфичность ниже – 76,8%. Для маркера пролиферации Ki67 диагностическая чувствительность составила – 100%, специфичность – 92,8%.

По результатам нашей работы были получены убедительные данные о том, что экспрессия онкобелка p16ink4α и маркера пролиферации Ki67 увеличивается со степенью тяжести цервикальных поражений ($p<0,001$). Данные зарубежных и отечественных коллег схожи с нашими данными и свидетельствуют о более высокой экспрессии онкобелков p16ink4α и Ki67 у пациенток с SCC и HSIL по сравнению с пациентками с LSIL ($p<0,001$), что позволяет использовать экспрессию p16ink4α и Ki67 в качестве маркера дифференциальной диагностики тяжести цервикальных поражений.

Полученные результаты свидетельствуют о необходимости более широкого внедрения в практику неинвазивных маркеров, особенно в случае получения неясных результатов, полученных другими методами исследования.

На следующем этапе нашей работы мы определяли чувствительность и специфичность жидкостной цитологии, коэкспрессии p16ink4α/Ki67 и ВПЧ – теста«Cobas 4800» для выявления SILи рака шейки матки.

По результатам нашего исследования чувствительность жидкостной цитологии для выявления SIL и рака шейки матки составила – 83,4%, специфичность – 96,4%. Чувствительность коэкспрессии p16ink4α/Ki67

составила – 98,5 %, специфичность– 100%. Для ВПЧ теста «Cobas 4800», чувствительность – 94,2%, специфичность – 78,1%.

Таким образом, по результатам нашего исследования было установлено, что коэкспрессия p16ink4α/Ki67 является наиболее эффективным методом для выявления SIL различной степени тяжести и рака шейки матки по сравнению с жидкостной цитологией и ВПЧ – тестом, так как данный метод обладает наиболее высокой диагностической чувствительностью и специфичностью. Он позволяет определить не только присутствие вируса, но и изменения, произошедшие в клетках эпителия шейки матки под его воздействием. Выявленная нами высокая эффективность метода двойного окрашивания p16ink4α/Ki67 также подтверждается работами ряда других исследователей [110, 146, 208, 225].

Несмотря на то, что метод двойного окрашивания не требует подсчета положительных клеток, согласно инструкции производителя, в нашей работе была выявлена прямая взаимосвязь числа положительных клеток p16ink4α/Ki67 со степенью поражения шейки матки. Так, у пациенток с LSIL содержание положительных клеток p16ink4α/Ki67 в атипических клетках плоского эпителия шейки матки составляло около 30%, с HSIL – 60% и с SCC – 90 % и более ($p<0,005$). Наши данные не противоречат результатам, полученным CalilL. N. и соавт. (2014), Yoshida T. и соавт. (2011) [165, 209].

Резюмируя выше изложенные результаты, можно предположить, что экспрессия p16ink4α и Ki67 при ВПЧ – ассоциированных заболеваниях шейки матки, зависит от степени тяжести цервикальных поражений.

В то же время выявление коэкспрессии p16ink4α/Ki67 в эпителии шейки матки, даже в незначительных количествах, свидетельствуют об инициации канцерогенеза, что позволяет использовать данный критерий в качестве прогностического маркера. Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что комплексное использование методов: жидкостной цитологии, двойного окрашивания p16ink4α/Ki67 и ВПЧ – тестирования значительно повышает

эффективность ранней диагностики ВПЧ – ассоциированных заболеваний шейки матки.

Активное изучение роли нетранслируемых низкомолекулярных РНК – микроРНК, регулирующих экспрессию генов на транскрипционноми постранскрипционном уровне, как в нашей стране, так и зарубежом, кардинально изменило современную концепцию канцерогенеза шейки матки [188]. Многочисленные исследования последних лет свидетельствуют о значительной роли микроРНК в развитии онкологических заболеваний, в том числе и рака шейки матки [137, 144].

На сегодняшний день установлено более50 микроРНК, уровень экспрессии которых меняется в пораженных тканях шейки матки в процессе перехода от нормык LSIL, далее к HSIL и цервикальному раку [73, 223]. Изменения уровня экспрессии микроРНК в клетках шеечного эпителия при плоскоклеточных интраэпителиальных поражениях и раке шейки матки дают возможность использовать их в качестве практически идеальных неинвазивных маркеров диагностики.

Так, в работе O. Tianc соавт. [153] было показано, что изменение уровняэкспрессии 4 микроРНК (miR-424, miR-375, miR-34a, miR-218) более эффективно, чем Pap-тест, дифференцирует плоскоклеточные интраэпителиальные поражения низкой степени от высокой, а предраковыесостояния – от рака шейки матки. В другой работе было показано, что уровень микроРНК Let-7c в соскобах шеечного эпителия снижается пропорционально тяжести интраэпителиального поражения [147]. В нашей работе было показано, что экспрессия микроРНК – miR-22 и miR-92a значительно менялась в клетках шеечного эпителия у пациенток с SIL и SCC по сравнению с пациентками без морфологических изменений. Так, экспрессия miR-22 снизилась более, чем в 2 раза при всех плоскоклеточных интраэпителиальных поражениях независимо от тяжестии и SCC ($p<0,05$). Снижение экспрессии данной микроРНК в пораженных тканях было показано ипри многих других формах рака [156]. Известно, что miR-22 стимулирует канцерогенез и метастазирование, являясь

прямой мишенью для противоопухолевых генов PTEN и TET [195]. Прямой мишенью для miR-92a также является ген PTEN, повышение экспрессии данной микроРНК было установлено при многих видах злокачественных заболеваний [227]. В нашем исследовании было установлено значительное повышение экспрессия miR-92a у пациентокс HSIL и раком шейки матки ($p<0,05$) и незначительное повышение отмечалось у пациенток с LSIL ($p>0,05$).

MiR-25 относится к кластеру miR-17-92a-1, синтезируется в составе единного транскрипта с miR-92a. Как и в отношении всех микроРНК данного кластера повышенную экспрессию miR-25 выявляли при многих типах опухолей человека [147]. MiR-25 участвует практически во всех процессах клеточного деления, подавляя апоптоз и активируя клеточную пролиферацию [84]. Однако в нашей работемы увидели лишь тенденцию к повышению экспрессии miR-25 в шеечных соскобах у пациенток с HSIL и раком шейки матки ($p>0,05$).

Выявленные нами изменения экспрессии микроРНК (miR-22 и miR-92a) в шеечных соскобах, коррелирующие с тяжестью SIL и SCC, дают возможность использовать их в качестве биомаркеров для неинвазивной диагностики заболеваний шейки матки ассоциированных с ВПЧ.

Установленные в работе пороги отсечки уровней экспрессии miR-22 и miR-92a позволяют с высокой точностью (более 80%) дифференцировать рак шейки матки как среди пациенток без патологий, так и с HSIL. Наибольшая эффективность диагностики SIL шейки матки достигалась при оценке показателя суммарной экспрессии двух или трех микроРНК.

Согласно современным концепциям, механизм эпигенетической инактивации генов, наряду с другими эпигенетическими механизмами (модификация гистонов хроматина, микроРНК), широко распространен и признан в мире как один из молекулярных механизмов раннего канцерогенеза [155]. На сегодняшний день доказано, что при спорадических раках более половины генов, контролирующих опухолевую супрессию, находится в инактивированном состоянии, являясь транскрипционно неактивными вследствие обратимых

эпигенетических модификаций, а не вследствие генетических нарушений, как считалось ранее [147, 156].

В последние годы данный механизм активно изучается при раках различных локализаций, в том числе и при раке шейки матки. По мнению ряда авторов, метилирование генов может быть использовано для создания новых высокоселективных методов молекулярно – генетической диагностики онкологических заболеваний и использоваться в качестве инструмента раннего (доклинического) выявления и прогнозирования онкозаболеваний, а также для мониторинга проведенного лечения. Данный факт и послужил основанием при определении следующей задачи нашего исследования – изучить статус метилирования промоторного участка гена WIF1 у пациенток с плоскоклеточными интраэпителиальными поражениями и раком шейки матки.

Нами впервые был изучен статус метилирования гена WIF1 у пациенток с SIL и раком шейки матки. Результаты наших исследований показали, что у всех пациенток с LSIL/HSIL и раком шейки матки было выявлено аномальное метилирование промоторного участка гена WIF1 без исключения. Так, у пациенток с диагнозом LSIL среднее количество метилированных сайтов промоторного участка гена WIF1 составил 32,9%, с HSIL 54,1%, с SCC 75,2%, NILM 2,23%.

Медиана уровня метилирования промоторного участка гена WIF1 у пациенток с LSIL составила – 34,2%, с HSIL – 47,1% и SCC – 72,4%. В образцах ДНК тканей здоровых женщин медиана степени аномального метилирования промоторного участка гена WIF1 составила – 0%.

Основываясь на полученных результатах, можно предположить, что появление аномально метилированных сайтов в промоторной части гена WIF1 у женщин с нормальной морфологической картиной свидетельствует о начальных стадиях формирования неопластического процесса в эпителии шейки матки.

Сравнительный анализ уровня аномального метилирования промоторного участка гена WIF1 между пациентками с SIL и SCC по сравнению со здоровыми пациентками (NILM) установил, что для всех исследованных групп уровень

метилирования промоторной области гена WIF1 статистически значимо отличался ($p<0,001$). Так, для NILM и LSIL $p=1,11\times10^{-11}$, для NILM и HSIL $p=1,5\times10^{-12}$, для NILM и SCC $p= 4,7\times 10^{-8}$, для LSIL и HSIL $p=4,39\times10^{-7}$, для HSIL и SCC $p=0,008$. Полученные результаты показывают, что уровень метилирования промоторной области гена WIF1 достоверно коррелируют с тяжестью цервикальных поражений шейки матки и может быть использован для дифференциальной диагностики SIL при спорных ситуациях. Наши данные не противоречат полученным результатам W.F. Van Der Meide и соавт. (2011), которые показали достоверную корреляцию между уровнем метилирования промоторной области гена WIF1 и возникновением цервикальных поражений ($p<0,05$) [178]. В ряде других работ было установлено, что использование уровня метилирования генов PAX 1 и SOX 1 в качестве диагностического биомаркера для диагностики CIN 2+ позволяет установить диагноз с чувствительностью 95,6%, специфичностью 82,4% [213].

В нашей работе диагностическая чувствительность метилирования промоторной области гена WIF1 в качестве биомаркера канцерогенеза составила 100%, а диагностическая специфичность 84,3%.

По результатам проведенных исследований, в том числе и нашего, можно предположить, что изменение экспрессии транскрипционных факторов, вовлеченных в процесс дифференцировки и регуляцию стволовых клеток, является одним из ключевых факторов развития злокачественных новообразований в гормон – зависимых тканях репродуктивной системы. Есть все основания считать, что уровень аномального метилирования, кодирующего данный белок гена, достоверно коррелирует со стадией прогрессии цервикальных неоплазий.

Учитывая полученные нами результаты, статус метилирования гена WIF1 может рассматриваться как потенциальный диагностический и прогностический маркер канцерогенеза шейки матки.

ВЫВОДЫ

1. У женщин с SIL шейки матки 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 аномального 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 и лечения. Оценка статуса метилирования гена WIF1 может

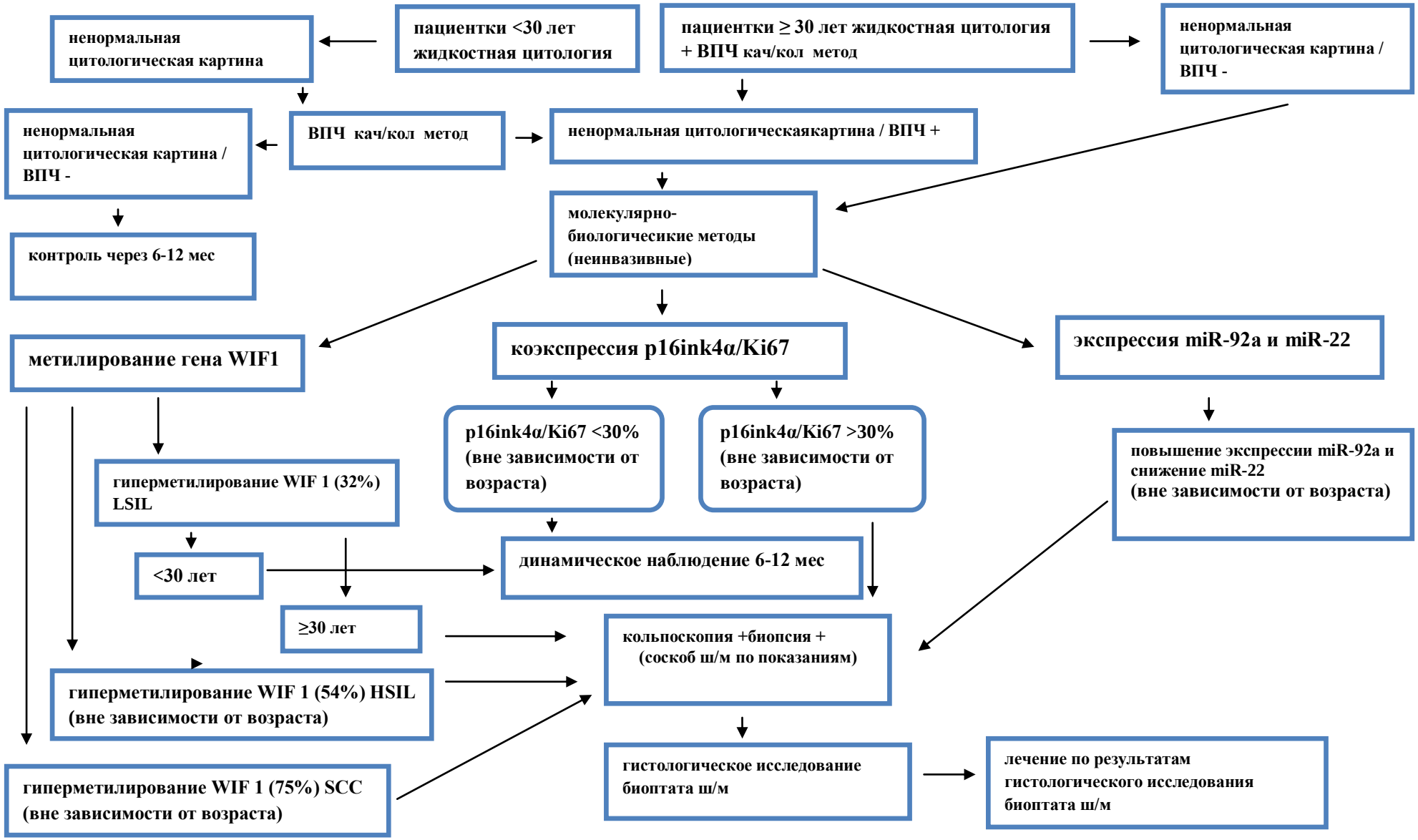
рассматриваться как потенциальный диагностический и прогностический маркер канцерогенеза шейки матки.

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 имуноцитохимический 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 p16ink4α 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. 26).

Рисунок 26. Алгоритм ранней диагностике SILu SCC с использованием неинвазивных биомаркеров



СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АБЭ – ацето-белый эпителий

ВАК – высшая аттестационная комиссия

ВИЧ – вирус иммунодефицита человека

ВПЧ – вирус папилломы человека

ВПГ – вирус простого герпеса

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ДИ – доверительный интервал

ЖЦ – жидкостная цитология

ЗТ – зона трансформации

ИППП – инфекции, передаваемые половым путем

ИЦХ – иммуноцитохимический метод

мРНК – микро рибонуклеиновая кислота

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПЦР - РВ–полимеразная цепная реакция в режиме реального времени

ИЦХ – иммуноцитохимия

ПВИ– папилломавирусная инфекция

Пап - тест – тест по Папаниколау

РШМ – рак шейки матки

РКС – расширеннаякольпоскопия

ASC - H – atypical squamous cells, cannot exclude high-grade squamous intraepithelial lesion (атипичные клетки плоского эпителия, не позволяющие исключить поражение эпителия тяжелой степени)

ASCUS – atypical squamous cells of undetermined significance **(**клеточные элементы трудно поддаются классификации и именуются как атипические клетки плоского эпителия неопределенного значения)

CIN – cervical intraepithelial neoplasia (цервикальная интраэпителиальная неоплазия)

HSIL– high grade squamous intraepithelial lesion (плоскоклеточные интраэпителиальные поражения высокой степени тяжести)

LSIL– low grade squamous intraepithelial lesion (плоскоклеточные интраэпителиальные поражения низкой степени тяжести)

MicroRNA - кроткие одноцепочечные молекулы длиной 20-25 нуклеотидов

P16 ink4α – маркер остановки деления

NILM – negative for intraepithelial lesion or malignancy

SIL - Squamous Intraepitelial Lesions (плоскоклеточные интраэпителиальные поражения)

SCC –Squamous cell carcinoma (плоскоклеточный рак шейки матки)

TBS – terminology Bethesda system (терминологическая классификация Бетесда)

Ki 67 - маркер деления

WIF1 - WntInhibitory Factor-1 (Wnt-ингибиторныйфактор 1)

СПИСОКЛИТЕРАТУРЫ

1. Андосова, Л. Д. Изменения вагинальной микробиоты у женщин с заболеваниями шейки матки // С. Ю. Куделькина [и др.] // Казанский медицинский журнал. - 2012. - N1 - С. 76 - 79.
2. Аксель, Е. М. Заболеваемость и смертность от злокачественных новообразований органов женской репродуктивной системы в России / Е. М. Аксель // Онкогинекология. - 2015. - N1. - С. 6 - 15.
3. Аполихина, И. А. Современные возможности организованного скрининга рака шейки матки / И. А. Аполихина, Е. В.Филиппенкова, Е. Г. Додова [и др.] // Акушерство и гинекология. - 2016. - N 9. - С. 22 - 26.
4. Ассоциации генитальных инфекций и вируса папилломы человека как конфаундинг - факторы цервикальной интраэпителиальной неоплазии / Т. Е. Белокриницкая, Н. И. Фролова, Д. А. Тарбаева [и др.] // Doctor. ru. - 2015. - № 2(12). - С. 14 - 17.
5. Ашафрян, Л. А. Патологическая профилактика рака репродуктивных органов // Л. А. Ашафрян, В. И. Киселев, Е. А. Муйжнек. - М., 2009. - С. 20-25.
6. Бебнева, Т. Н. Профилактика рака шейки матки: скрининг (обзор литературы) // Т. Н. Бебнева, В. Н. Прилепская // Доктор. ru. -2009. - N 6. - С.11 - 17.
7. Белоцерковцева, Л. Д. Роль экспрессии онкобелка Е 7 в ранней диагностике шейки матки / Л. Д. Белоцерковцева, Л. В. Коваленко, С. В. Лескова // Медицина и образование в Сибири. - 2013. - N 4. - С. 75 - 82.
8. Бохман, Я. В. Руководство по онкогинекологии. - СПБ: Фолиант, 2002. - С. 195 - 229.
9. Весна Кезик. Скрининг рака шейки матки // Практическая онкология. -2009. - Т. 10, N 2. - С. 59 - 61.
10. ВПЧ - отрицательный рак шейки матки и его прогноз / В. И. Киселева, Л. И. Крикунова, А. П. Шинкаркина [и др.] // Российский онкологический журнал. - 2008. - N3. - С. 23 - 26.

11. Возможности диагностики и лечения ВПЧ - ассоциированных преинвазивных цервикальных неоплазий у женщин репродуктивного возраста в современных условиях / Т. С. Качалина, Н. М. Шахова, О. В. Качалина [и др.] // Женская консультация. - 2014. - № 14.- С. 1024 - 1027.
12. Давыдов, М. И. Динамика заболеваемости и смертности от злокачественных новообразований в России // М. И. Давыдов, Д. И. Максимович, Д. Г. Заридзе // Вестник РОНЦ им. Н.Н.Блохина РАМН. - 2015. - Т.26. - С. 1 - 5.
13. Ельникова, О. В. Научное обоснование совершенствования организации онкологической помощи больным раком шейки матки (на примере Курской области): Дис…канд. мед. наук. - М.,2012. - 155 С.
14. Каприн, А. Д. Злокачественные новообразования в России в 2015 году (заболеваемость и смертность) / А. Д. Каприн, В. В. Старинский, Г. В. Петрова. - М.: МНИОИ им. П.А. Герцена - филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России, - 2017. - 250 С.
15. Киселев, Ф. Л. Генетические и эпигенетические факторы прогрессии опухолей шейки матки / Ф. Л. Киселев // Вестник Российской АМН. - 2007 . - N 11. - С. 25 - 32.
16. Киселев, Ф. Л. Канцерогенез / Ф. Л. Киселев, Н. Ф. Киселева. - М.: Научный мир. - 2001. - С. 93 - 106.
17. Киселев, Ф. Л. Статус ДНК вируса папиллом человека в опухолях шейки матки / Ф. Л. Киселев, Н. П. Киселева, В. К. Кобзева // Молекулярная биология клетки. – 2001. - Т. 35, № 3. - С. 470 - 476.
18. Киселев, Ф. Л. Вирус - ассоциированные опухоли человека: рак шейки матки и вирусы папиллом (обзор) / Ф. Л. Киселев // Биохимия. - 2000. - Т. 65, № 1. - С. 79 - 91.
19. Киселев, Л. Л. Лев Зильбер - создатель отечественной школы медицинских вирусологов // Л. Л. Киселев, Г. И. Абелев, Ф. Л. Киселев // Вестник Российской Академии наук. - 2003. –Т. 73, № 7. - С. 647 - 659.

20. Киселев, В. И. Молекулярные механизмы развития дисплазии шейки матки: новые знания - новые возможности / В. И.Киселев, Е. Л.Муйжнек. - М.: [б и.], 2011. - 124 С.
21. Кицак, В. Я. «ВПЧ - негативный» и ВПЧ - негативный рак шейки матки: триггерная роль ВПЧ высокого канцерогенного риска и альтернативных этиологических факторов / В. Я. Кицак // Вестник последипломного медицинского образования. - 2009. - N1. - С. 82 - 83.
22. Клиническая валидация количественного ВПЧ - теста «Амплисенс ВПЧ ВКР скрин - титр международными требованиями / Д. А. Куевда, О. Ю. Шипулина, Г. Н. Минкина [и др.]; Под ред. В. И. Покровского // Молекулярная диагностика. - 2010. - С. 380 - 383.
23. Клинышкова, Т. В. Результаты оценки белков Е ВПЧ, p16ink4α, Ki 67 при цервикальном предраке, ассоциированном с папилломавирусной инфекцией // Т. В. Клинышкова, И. Б. Самодурова // Российский вестник акушера - гинеколога. - 2012. - N 4. - С. 21 - 24.
24. Мальцева, Л. И. Генитальные кондиломы у женщин: факты и противоречия // Л. И. Мальцева, Л. Н. Фаррахова // Российский вестник акушера - гинеколога. -2012. - N 2. - С. 78 - 80.
25. Мартиросян, М. М. Заболевания шейки матки, ассоциированные с вирусом папилломы человека, у ВИЧ-инфицированных женщин в Санкт-Петербурге: Дис. ... канд. мед. наук. - СПБ, 2015. - 140 С.
26. Мартиросян, М. М. Заболевания шейки матки, ассоциированные с вирусом папилломы человека, у ВИЧ-инфицированных женщин в Санкт-Петербурге: Автореф. дис. …канд. мед.наук. - СПб, 2015. - 25 С.
27. Минкина, Г. Н. Диагностика остаточных рецидивных предраковых заболеваний шейки матки после электроэксцизии / Г. Н. Минкина // Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. - 2009. - Т. 8, N 5. - С. 23 - 27.
28. Новик, В. И. Скрининг рака шейки матки / В. И. Новик // Практическая онкология. - 2010. - Т.11, N 2. - С. 66 - 73.

29. Новик, В. И. Эпидемиология рака шейки матки, факторы риска, скрининг / В. И. Новик // Практическая онкология. - 2002. - N. 3, N3. - С. 156 - 165.
30. Новые возможности ранней диагностики и профилактики ВПЧ - ассоциированных поражений шейки матки/ В. Н. Прилепская, Г. Р. Байрамова, Е. А. Коган и др. // Медицинский совет. - 2015. - Т. XX. - С. 72 - 77.
31. Орехова, Е. К. Современные возможности папилломавирусной инфекции: обзор мировых исследований / Е. К. Орехова, А. Р. Хачатурян // Журнал акушерства и женских болезней. - 2014. - Т. LXII, № 3. - С. 82 - 88.
32. Особенности гранулоцитов при неопластических процессах // И. В. Нестерова, С. В. Ковалёва, Г. А. Чудилова [и др.] // Российский иммунологический журнал. - 2010. - Т.4, N 13. - С. 374 - 380.
33. Папилломавирусная инфекция: эффективность лечения инозином пранобексом / П. В. Буданов, А. А. Чурганова, К. Р. Бахтияров [и др.] // Гинекология. - 2015. - Т.17, N 6. - С. 56 - 59.
34. Папилломавирусная инфекция у девочек - подростков: Информационно-методическое письмо / В. И. Краснопольский, Л. С. Логутова, Н. В. Зароченцева [и др.]. - М., 2010. - 34 С.
35. Прилепская, В. Н. Вагинальная микоэкосистема влагалища в норме и при патологии / В. Н. Прилепская, Г. Р. Байрамова, А. С. Анкирская // Гинекология. - 2009. - N 3. - С. 11 - 15.
36. Прогнозирование риска развития и прогрессирования цервикальных интраэпителиальных неоплазий, ассоциированных с папилломавирусной инфекцией / О. В. Бурменская, Н. М. Назарова, В. Н. Прилепская [и др.] // Акушерство и гинекология. - 2016. - N 2. - С. 92 - 98.
37. Протасова, А. Э. Клиническая оценка и фармакоэкономический анализ диагностики и лечения основных злокачественных опухолей женских гениталий в амбулаторных условиях; Автореф. дис. …докт. мед. наук СПб,2011. - 25 С.
38. ПЦР и DIGENE тест в диагностике цервикальной неоплазии / С. И. Роговская, Т. Н. Бебнева, Е. С. Акопова [и др.] // Новые технологии в диагностике и лечении гинекологических заболеваний. - М., 2010. - С. 243.

39. Современные подходы к цитологическому скринингу рака шейки матки: обзор литературы / А. Э. Протасова, Т. И. Орлова [и др.] // Онкогинекология. - 2012. - N 4. - С. 35 - 39.
40. Радзинский, В. Е. Руководство по амбулаторно-поликлинической помощи в акушерстве и гинекологии / Под ред. В. Е. Радзинского. - М.: ГЭОТАР - Медиа. - 2016. - 1136 С.
41. Распространенность папилломавирусной инфекции в России / С. И. Роговская, И. В. Михеева, О. Ю. Шипулина [и др.] // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. - 2012. - N 1. - С. 25 - 33.
42. Репродукция вируса папилломы человека 16 генотипа и интеграция вирусной ДНК в измененном цервикальном эпителии / В. А. Ершов, А. А. Вязовая, Е. В. Ильинская [и др.] // Онкология. Журнал им. П. А. Герцена. - 2013. - N 1. - С. 21 - 26.
43. Роговская, С. И. Папилломавирусная инфекция у женщин и патология шейки матки: в помощь практикующему врачу. - М.: ГЭОТАР - Медиа, 2008. - 2- е изд. - 192 С.
44. Роговская, С. И. Папилломавирусная инфекция у женщин и патология шейки матки: в помощь практикующему врачу / С. И. Роговская. - М.: Издательская группа «ГЭОТАР - Медиа», 2008. - 188 С.
45. Роговская, С. И. Практическая кольпоскопия. - М.: «ГЭОТАР - Медиа», 2011. - 230 С.
46. Роговская, С. И. Папилломавирусная инфекция нижних отделов гениталий: клиника, диагностика, лечение: Дис. … докт. мед. наук. - М., 2003. - 279 С.
47. Роговская, С. И. Папилломавирусная инфекция у женщин и патология шейки. - М.: ГЭОТАР - Медиа,2008. - 144 С.
48. Рудакова, Е. Б. Папилломавирусная инфекция и влагалищный микробиоценоз / Е. Б. Рудакова // Лечащий врач. - 2012 - N 3. - С.1 - 4.
49. Скрининг рака шейки матки: что нового в мировой практике / Г. Р. Байрамова, Л. З. Файзуллин, А. И. Королькова [и др.] // Акушерство и гинекология. - 2016. - N 7. - С. 17 - 21.

50. Современные подходы к цитологическому скринингу рака шейки матки: Обзор литературы / А. Э. Протасова, Р. В. Орлова, Т. И. Дзюбий [и др.] // Онкогинекология. - 2012. - N 4. - С. 35 - 39.
51. Сухих, Г. Т. Профилактика рака шейки матки: Руководство для врачей // Г. Т. Сухих, В. Н. Прилепская В.Н. - М.: Медпресс - информ. - 3-е изд. - 2012. - 192 С.
52. Тактика ведения пациенток с заболеваниями шейки матки при персистирующей ВПЧ - инфекции: возможности комбинированного лечения / В. Е. Радзинский, И. М. Ордиянц, Н. В. Буянова [и др.] // Гинекология. - 2014. - Т.16, N 6. - С. 12- 15.
53. Уразова, Л. Н. Рак шейки матки и вирусы папилломы: этиопатогенетические аспекты / Л. Н. Уразова, И. Г. Видяева // Сибирский онкологический журнал. - 2009 . - N 1. - С. 64 - 71.
54. Чиссов, В. И. Злокачественные новообразования в России в 2010 году (заболеваемость и смертность) // В. Т. Чиссов, В. В. Старинский, В. М. Петрова. - 2012. - 260 С.
55. Чиссов, В. И. Онкология / В. И. Чиссов, М. И. Давыдов. - М.: ГЭОТАР - Медиа, 2013. - 576 С.
56. Шварц, Г. Я. Иммуномодулирующие средства в лечении ВПЧ - инфекции. «Изопринозин в лечении папиллома - вирусной инфекции в гинекологической практике» // Г. Я. Шварц, В. Н. Прилепская, О. А. Мынбаев. - М: Промоушн Микс, 2011. - 300 С.
57. Шейка матки, влагалище, вульва: физиология, патология, кольпоскопия, эстетическая коррекция: руководство для практикующих врачей /Под ред. С. И. Роговской, Е. В. Липовой. - М.: Status Praesens, 2014. - 832 С.
58. Эпидемиология ВПЧ - инфекции в России / С. И. Роговская, О. Ю. Шипулина, Г. Н. Минкина [и др.] // Профилактика рака шейки матки: руководство для врачей / Под ред. Г. Т. Сухих, В. Н. Прилепской. - М., Медпресс - информ, 2012. - С. 30 - 37.
59. Этиологическая роль вируса папилломы человека в развитии рака шейки матки: генетические и патогенетические механизмы, возможности терапии и

профилактики // В. И. Киселев, Л. А. Ашрафян, С. О. Бударина [и др.] // Гинекология. - 2004. -Т.6, N 4. - С. 174 - 180.

60. Эффективность диагностики цервикальной интраэпителиальной неоплазии шейки матки с использованием комплекса методов: жидкостной цитологии, двойного иммуноокрашивания p16/ Ki 67 и ВПЧ тестирования // Е. А. Коган, Н. М. Файзуллина, Ц. Ли [и др.] // Акушерство и гинекология. - 2014. - N 7. - С. 43 - 47.
61. Эффективность использования физиохирургических методов лечения у женщин с заболеваниями шейки матки / Л. Д. Белоцерковцева, Л. В. Коваленко, О. В. Абазьева [и др.] // Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. - 2015 . - Т.14, N. 3. - С. 9 - 16.
62. Эффективность терапии заболеваний гениталий при сочетании папилломавирусной и герпесвирусной инфекции // С. И. Роговская, Т. Н. Бебнева, П. А. Некрасов [и др.] // Акушерство и гинекология. - 2014 . - N 9. - С. 90 - 97.
63. A cross-sectional study of a prototype carcinogenic human papillomavirus E6/E7 messenger RNA assay for detection of cervical precancer and cancer / P. E. Castle, J. Dockter, C. Giachetti [et al.] // Clinical Cancer Res. - 2007. - Vol. 1. - N13 (9). - P. 2599 - 2605.
64. A national outcome for quadrivalent HPV vaccination: declining rates of genital warts in Australia / B. Donovan, N. Franklin, R. Guy [et al.] // Abstracts, 26 HPV conference. - Montreal, 2010.
65. Accuracy of human papillomavirus testing on self-collected versus clinician-collected samples: a meta-analysis // M. Arbyn, F. Verdoodt, P. J. Snijders [et al.] // Lancet Oncology. - 2014. - Vol. 15, N 2. - P. 172 - 183.
66. Activation of the canonical Wnt pathway during genital keratinocyte transformation: a model for cervical cancer progression // A. Uren A. [et al.] // Cancer Res. - 2005. - Vol. 65, № 14. - P. 6199 - 6206.
67. Age - related changes in the diagnostic assessment of women with severe cervical lesions // L. Giannella, C. Fodero, F. Boselli [et. al.] // Climacteric. – 2015. - Vol. 20. - P.1 - 18.

68. American Society for Colposcopy and Cervical Pathology ournal of Lower // Genital Tract Disease. - 2012. - Vol. 16, N 3. - P. 50 - 58.
69. Anal squamous intraepithelial lesions in HIV-positive and HIV negative homosexual and bisexual men: prevalence and risk factors / J. M. Palefsky [et al.] // J Acquir Immune Defic Syndr Human Retrovirol. - 1998. - Vol. 17. - P. 30 - 35.
70. Arafa, M. Detection of HPV induced cervical (pre) neoplastic tissues /M. Arafa, J. Boniver, P. Delvenne // Apple Immunohistochem Molecular Morphology. - 2008. - Vol. 16. - P. 422 - 432.
71. Association between the human papillomavirus, bacterial vaginosis and cervicitis and the detection of abnormalities in cervical smears from teenage girls and young women // R. C. Caixeta, A. A. Ribeiro, K. D. Segatti [et al.] // Diagnostic Cytopathology. - 2015. - Vol.43, N10. - P. 780 - 785.
72. Atypical squamous cells of undetermined significance and low-grade squamous intraepithelial lesion triage in Korean women: Revisiting the 2012 American Society of Colposcopy and Cervical Pathology screening guidelines / J. Y. Hyun , K. J. Min, S.Y. Yang [et. al.] // Obstetrics Gynecology Sci. - 2017. - Vol. 60, N4. - P. 357 - 361.
73. Baseman, J. G. The epidemiology of human papillomavirus infections / J. G. Baseman, L. A. Koutsky // Journal of Clinical Virology. - 2005. - Vol. 32, N 1. - P. 16 - 24.
74. Benchmarking CIN3+ risk as the basis for incorporating HPV and Pap cotesting into cervical screening and management guidelines // H. A. Katki, M. Schiffman, P. E. Castle [et al.] // J Low Genital Tract Dis. - 2013. - Vol. 17. - S. 28 - S. 35.
75. Bosch, F. X. Cancer Epidemiology and Registration Unit, IDIBELL, Institut Catala de Oncologia, Hospitalet del Llobregat, barselona, Spain / F. X. Bosch, X.Castellsague, S. de Santose // Brit. J Cancer. - 2008. - Vol. 98. - P. 15 - 21.
76. Braga E., Chernenko V., Bazov I. et al. // Cancer. 2002. Vol. 100. - P. 534 -551
77. Breast and cervical cancer in 187 countries between 1980 and 2010: a systematic analysis / M. H. Forouzanfar, K. J. Foreman, A. M. Delossantos [et al.] // *Lancet*. - 2011. - Vol. 22. 378(9801). - P. 1461 - 1484.
78. Brown, D. HPV type 6/11/16/18 vaccine: first analysis of cross-protection againstpersistent infection, cervical intraepithelial neoplasia (CIN), and adenocarcinoma

insitu (AIS) caused by oncogenic HPV types in addition to 16/18 / D. Brown // The47th Annual Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. - 2007. - Sep. - P. 17 - 20.

79. Caiyan, X. Prevalence and risk factors of lower genital tract infections among women in Beijing, China / X. Caiyan // Obstetrics Gynecology Res. - 2012. - Vol. 38, N 1. - P. 1447 - 1450.
80. Camargo, M. J. Post-treatment disease after electrosurgery in the cervical intraepithelial neoplasia: a retrospective cohort / M. J. Camargo // Abstracts 15 Wold Congress for Cervical Pathology and Colposcopy. - 2014. - P. 46 - 47.
81. Cervical Cancer / H. Cecelia, M. D. Boardman, Chief Editor, K. Warner Huh, MD // Drugs & Diseases Obstetrics & Gynecology/ Updated. - 2016. - N 2.
82. Cervical Cancer Rates Among Young Females in the United States // V.B. Benard, M. Watson, P. E. Castle [et al.] // Obstetrics Gynecology. - 2012. - Vol.120. - P. 1117 - 1123.
83. Cervical Cancers Manifest a High Rate of Infection by a High-Risk Human Papilloma Virus Subtype but a Very Low Rate of Infection by a Low-Risk Subtype in the Guiyang District of China / J. Peng, Y., Yuan, F. Shen [et al.] // J Cancer. - 2017. - May 11. - Vol. 8, N7. - P. 1263 - 1270.
84. Caiazza C, The roles of miR-25 and its targeted genes in development of human cancer /Caiazza C, Mallardo M //Microrna. – 2016. N 5 (2). – P. 113-119.
85. Characterization of cervico - vaginal microbiota in women developing persistent high-risk Human Papillomavirus infection / M. Di Paola, C. Sani, A. M. Clemente [et al.] // Sci Reproduction. - 2017. - Vol. 31, N 7(1). - P. 10200.
86. Chua, J. H. Micro RNAs: biogenesis, function and application / J. H. Chua, A. Armugam, K. Jeyaseelan // Current Opinion Molecular Therapy. - 2009. - Vol. 11. - Apr. - P. 188 - 189.
87. CIN III lesions and regression: retrospective analysis of 635 cases // M. Motamedi, G. Böhmer, H. H. Neumann [et al.] // BMC Infect Dis. - 2015. - Vol. 21, N15. - P. 541.
88. Clevers, H. Wnt/β-catenin signaling and disease // H. Clevers, R. Nusse // Cell. - 2012. - Vol.149, № 6. - P. 1192 - 1205.

89. Comparison of cervical cancer screening results among 256, 648 women in multiple clinical practices / A. J. Blatt, R. Kennedy, R. Luff [et al.] // Cancer Cytopathology. - 2015. - May. - P. 282 - 288.
90. Comparison of the Roche Cobas(®) 4800 HPV assay to Digene Hybrid Capture 2, Roche Linear Array and Roche Amplicor for Detection of High-Risk Human Papillomavirus Genotypes in Women undergoing treatment for cervical dysplasia / S. Phillips, S. M. Garland, J. H. Tan [et al.] // J Clinical Virology. - 2015. - Vol. 62. - P. 63 - 65.
91. Comparison of Efficacy in Abnormal Cervical Cell Detection between Liquid-based Cytology and Conventional Cytology / J. Tanabodee, K. Thepsuwan, A. Karalak [et al.] // Asian Pac J Cancer Prev. - 2015. - Vol.16, N 16. - P. 7381 - 7384.
92. Comparison of HPV detection technologies: Hybrid capture 2, Pre Test HPV-Proofer and analysis of HPV DNA viral load in HPV16, HPV18 and HPV33 E6/E7 mRNA positive specimens / F. Karlsen, H. Keegan, J. Mc Inerney [et al.] // J Virology Methods. - 2009. - V ol.155, N 1. - P. 61 - 66.
93. de Sanjosé, S. The natural history of human papillomavirus infection// S. de Sanjosé , M. Brotons, M. A. Pavón // Best Practical Res Clinical Obstetrics Gynecology. - 2017. - Sep 6. pii: S1521 - 6934(17)30133 - 30135.
94. Determination of malignant potential of cervical intraepithelial neoplasia / E. Kudela, V. Holubekova, A. Farkasova [et al.] // Tumour Biology. - 2016. - Vol. 37, N2. - P. 1521 - 1525.
95. Detection of human papilloma virus in chronic cervicitis, cervical adenocarcinoma, intraepithelial neoplasia and squamos cell carcinoma. / E. Mirzaie - Kashani, M. Bouzari, B. Talebi B. [et al.] //J Microbiology. - 2014. - Vol. 7, N 5. - e. 9930.
96. Detection of high-risk human papillomavirus E6 and E7 oncogene transcripts in cervical scrapes by nested RT-polymerase chain reaction / K. Sotlar, A. Stubner, D. Diemer [et al.] // J Medical Virology. - 2004. - Vol. 74, N 1. - P. 107 - 116.
97. Diagnostic Performance of HPV E6/E7 mRNA and HPV DNA Assays for the Detection and Screening of Oncogenic Human Papillomavirus Infection among Woman

with Cervical Lesions in China / H.Y. Wang , D. Lee, S. Park [et al.] // Asian Pac J Cancer Prev. - 2015. - Vol.16, N 17. - P. 7633 - 7640.

98. Differentially expressed micro RNAs in the serum of cervical squamous cell carcinoma patients before and after surgery/ W. T. Wang, Y. N. Zhao, J. X. Yan [et al.] // Journal of Hematology & Oncology. - 2014. - Vol. 7(1, article 6).
99. Distribution of human papillomavirus 58 and 52 E6/E7 variants in cervical neoplasia in Chinese women / T Ding, X Wang, F Ye [et al.] // Gynecology Oncology. - 2010. - Vol.119, №3. - P.436 - 443.
100. DNA methylation in human papillomavirus-infected cervical cells is elevated in high-grade squamous intraepithelial lesions and cancer / M. K. Kim, I. H. Lee, K. H. Lee [et al.] // J Gynecology Oncology. - 2016. - Vol. 27, N 2. - e. 14.
101. DNA methylation and cancer diagnosis / Y. Delpu [et al.] // Int. J. Molecular Sci. - 2013. - Vol. 14, № 7. - P. 15029 - 15058.
102. Dysregulation of micro RNA Expression in Human Cervical Preneoplastic and Neoplastic Lesions/ A. Galamb, M. Benczik, B. Zinner [et al.] // Pathology Oncology Research. - 2015. - Vol. 21. - Issue 3. - P. 503 - 508.
103. Edgren, G. Risk of anogenital cancer after diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia: a prospective populationbased study / G. Edgren, P. Sparén // Lancet Oncology. - 2007. - Vol. 8. - P. 311 - 316.
104. European CIN tec Cytology Study Group. The sensitivity and specificity of p16(INK4a) cytology vs HPV testing for detecting high-grade cervical disease in the triage of ASC-US and LSIL pap cytology results / K. J. Denton, C. Bergeron , P. Klement [et al.] // Am J Clinical Pathology. - 2010. - Vol. 134, N 1. - P. 12 - 21.
105. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer / N. Muñoz, F. X. Bosch, S. Sanjosé [et al.] // New Englich J Medicine. - 2003. - Vol.348, N 6. - P. 518 - 527.
106. Efficacy of human papillomavirus (HPV)-16/18 AS04 - adjuvanted vaccine against cervical infection and precancer caused by oncogenic HPV types (PATRICIA) : final analysis of a double-blind, randomised study in young women / J. Paavonen, P. Naud, J. Salmeron [et al.] // Lancet. - 2009. - Vol. 374. - P. 301 - 314.

107. Endogenous sex steroids and risk of cervical carcinoma: results from the EPIC study // S. Rinaldi, M. Plummer, C. Biessy [et al.] // Cancer Epidemiology Biomarkers Prev. - 2011. - Vol. 20. - P. 2532 - 2540.

108. Epigenetic silencing of WIF-1 in hepatocellular carcinomas/ Y. Deng [et al.] // J. Cancer Res. Clinical Oncology. - 2010. - Vol. 136, N 8. - P. 1161- 1167.

109. Ethnic Variations in Perception of Human Papillomavirus and its Vaccination among Young Women in Nepal / B. Sathian, M.G.R. Babu , E. R. van Teijlingen [et al.] // Nepal J Epidemiology. - 2017. - Vol. 31. - N 7 (1). - P. 647 - 658.

110. Expression of the p16 and Ki67 in Cervical Squamous Intraepithelial Lesions and Cancer / K. Kanthiya, J. Khunnarong, S. Tangjitgamol [et al.] // Asian Pac J Cancer Prev. - 2016. - Vol.17, N 7. - P. 3201 - 3216.

111. Expression of the p16 and Ki67 in Cervical Squamous Intraepithelial Lesions and Cancer / K. Kanthiya , J. Khunnarong,S. Tangjitgamol S [et al.] // Asian Pac J Cancer Prev. - 2016. - Vol.17, N 7. - P. 3201 - 3206.

112. European CIN tec Histology Study Group. Conjunctive p16 (INK4a) testing significantly increases accuracy in diagnosing high-grade cervical intraepithelial neoplasia / C. Bergeron, J. Ordi, D. Schmidt [et al.] // Am. J. Clinical Pathology. - 2010. - Vol. 133, N 3. - P. 395 - 406.

113. Factors that influence the rate of epithelial maturation in the cervix in healthy young women / L.Y. Hwang [et al.] // J Adolesc Health. - 2009. - Vol. 44, N 2. - P. 103 -110.

114. Forcier, M. An overview of human papillomavirus infection for the dermatologist: disease, diagnosis, management, and prevention / M. Forcier, N. Musacchio // Dermatology Therapy. - 2010. - Vol. 23, No. 5. - P. 458 - 476.

115. Frixa, T. DonzelliS, Blandino G. Oncogenic Micro RNA s: Key Playersin Malignant Transformation // Cancers (Basel). - 2015. - Dec 18. - Vol.7, N 4. - P. 2466 - 2485.

116. Genital human papillomavirus infection: incidence and risk factors in a cohort of female university students / R. L. Winer [et al.] // Am. J Epidemiology. - 2003. - Vol. 157, N 3. - P. 218 - 226.

117. Genetic susceptibility in cervical cancer: From bench to bedside / A. Bahrami , M. Hasanzadeh, S. F. Shahidsales [et al.] // J Cell Physiol. - 2018. - Vol. 233, N 3. - P. 1929 - 1939.

118. Gravitt, P. E. Natural History of HPV Infection across the Lifespan: Role of Viral Latency // P. E. Gravitt, R. L. Winer // Viruses. - 2017. - Vol. 9, N 267. - P. 2 - 10.

119. Harwich, M. D. Drawing the line between commensal and pathogenic Gardnerella vaginalis through genome analysis andvirulance studies / M. D. Harwich // BMS Genomics. - 2010. - Vol. 11. - P. 375 - 386.

120. Hayes, J. Micro RNAs in cancer: biomarkers, functions and therapy / J. Hayes, P. P. Peruzzi, S. Lawler // Trends Molecular Medicine. - 2014. - Vol. 20, N 8. - P. 460 - 469.

121. Hellberg, D. The biological role of smoking, oral contraceptive use and endogenous sexual steroid hormones in invasive squamous epithelial cervical cancer (49 refs) / D. Hellberg, U. Stendahl // Anticancer Res. - 2005. - Vol. 25. - P. 3041 - 3046.

122. HERMES study group. Primary screening for cervical cancer based on high-risk human papillomavirus (HPV) detection and HPV 16 and HPV 18 genotyping, in comparison to cytology / T. Agorastos, K. Chatzistamatiou, T. Katsamagkas [et al.] // LOS One. - 2015. - Vol. 20. - N10 (3).

123. High-risk human papillomavirus testing in women with ASC-US cytology: results from the ATHENA HPV study / M.H. Stoler, T. C.Wright, A. Sharma [et al.] // Am J Clinical Pathology. - 2011. - Vol.135. - P. 468 - 475.

124. High prevalence of HPV multiple genotypes in women with persistent chlamydia trachomatis infection / S. Seraceni, F. De Seta, C. Colli [et al.] // Infection Agents and Cancer. - 2014. - Vol. 9, N 30. - P. 1 - 7.

125. High-throughput detection, genotyping and quantification of the human papillomavirus using real-time PCR / I. M. Micalessi, G. A. Boulet, J. J. Bogers [et al.] // Clinical Chemi Laborator Medicine. - 2011. - Dec 20. - Vol. 50, N 4. - P. 655 - 661.

126. HLA polymorphisms and cervical human Papillomavirus infection in a cohort of Montreal University students / S. M. Mahmud, K. Robinson, H. Richardson [et al.] // J Infection Dis. - 2007. - Vol.196, N 1. - P. 82 - 90.

127. HPV test results and histological follow-up results of patients with LSIL Cervical Cytology from the Largest CAP-certified laboratory in China/ B. Zheng , H. Yang, Z. Li [et al.] // J Cancer. - 2017. - Vol. 23, N 8 (13). - P. 2436 - 2441.

128. HPV-16 E6 oncoprotein impairs the fidelity of DNA endjoining via p53-dependent and –independent pathways / K - H. Shin, J. H. Ahn, M. K. Kang [et al.] // International J Oncology. - 2006. - Vol. 28. - P. 209 - 215.

129. Human papillomavirus genotypes distribution among Gabonese women with normal cytology and cervical abnormalities / S. Zoa Assoumou, A. Ndjoyi Mbiguino, B. Mabika Mabika [et al.] // Infection Agent Cancer. - 2016. - Jan. 15. - Vol. 11. - P. 2.

130. Human papillomavirus typing and DNA ploidy determination of squamous intraepithelial lesions in liquid-based cytologic samples J. // R. 0Bollmann, G. Méhes, R. Torka [et al.] // Cancer Cytopathology. - 2003. - Vol. 99. N1. - P. 57 - 62.

131. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide[J].// J. M. M. Walboomers, M. V. Jacobs, M. M. Manos [et al.] // The Journal of pathology. - 1999. - Vol. 189, N1. - P. 12 - 19.

132. Human Papillomavirus Vaccination Uptake in Canada: A Systematic Review and Meta-analysis / Y. Bird, O. Obidiya, R. Mahmood [et al.] // International J Preventive Medicine. - 2017. - Vol.14, N 8. - P. 71.

133. Human papillomavirus genotypes and the cumulative 2-years risk of cervical precancer / C. M. Wheeler, W. C. Hunt, M. Schiffman [et al.] // J. Infection Dis. - 2006. - Vol. 194. - P. 1291 - 1299.

134. Human papillomavirus infections in primary care / F. Ogunmodede, S. H.Yale, B. Krawisz [et al.] // Clinical Medicine Res. - 2007. - Vol. 5, N 4. - P. 210 - 217.

135. Human papillomavirus infections among women with cervical lesions and cervical cancer in Eastern China: genotype-specific prevalence and attribution / R. Zhang, Lei Zhang, B. Qingqing [et al.] // BMC Infectious Diseases. - 2017. - Vol. 17. - P. 107.

136. Hypermethylation of WIF1 and its inhibitory role in the tumor growth of endometrial adenocarcinoma/ X. Deng, C. Hou, H. Wang [et al.] // Molecular Medicine Reproduction. - 2017. - Sep. 20.

137. HPV-039 study group. Efficacy, immunogenicity and safety of the HPV-16/18 AS04-adjuvanted vaccine in healthy Chinese women aged 18-25 years: results from a randomized controlled trial // F. C. Zhu , W. Chen, Y. Y. M. Hu [et.al.] // International J Cancer. - 2014. - Vol.135, N 11. - P. 2612 - 2622.

138. ICO Information Centre on HPV and Cancer (HPV Information Centre) / Bruni L, Barrionuevo - Rosas L, Albero G. [at al.] // Human Papillomavirus and Related Diseases in the World. Summary Report. - 2015. - P. 4 - 8.

139. Impact of p53 loss on reversal and recurrence of conditional Wnt - induced tumorigenesis// E. J. Gunther [et al.] // Genes Dev. - 2003. - Vol. 17, № 4. - P. 488 - 501.

140. Improved abnormal Pap smear triage using cervical cancer biomarkers / J. L. Killeen, T. Dye, C. Grace [et al.] // J Low Genital Tract Dis. - 2014. - Vol. 18, N 1. - P. 1 - 7.

141. Inactivation of Wnt inhibitory factor-1 (WIF1) expression by epigenetic silencing is a common event in breast cancer / L. Ai [et al.] // Carcinogenesis. - 2006. - Vol. 27, № 7. - P. 1341 - 1348.

142. Inflammatory microenvironment and human papillomavirus-induced carcinogenesis / G. Mangino , M. V. Chiantore, M. Iuliano [et al.] // Cytokine Growth Factor Rev. - 2016. - Vol. 18. - S.1359 - 6101.

143. J-HERS Study Group. Populationbased study for human papillomavirus (HPV) infection in women in Japan: Amulticenter study by the Japanese human papillomavirus disease education research survey group (J-HERS) / T. Sasagawa, T. Maehama, K. Ideta [et al.] // J Medicine Virology. - 2016. - Vol. 88. - P. 324 - 325.

144. Jiménez - Wences, H. Human papillomavirus, DNA methylation and micro RNA expression in cervical cancer (Review) / H. Jiménez - Wences, O. Peralta - Zaragoza, G. Fernández - Tilapa // Oncology Reproduction. - 2014. - Vol. 31, N 6. - P. 2467 - 2476.

145. Jones, P. A.The epigenomics of cancer/ P. A. Jones, S. B. Baylin // Cell. - 2007. - Vol. 128, № 4. - P. 683 - 692.

146. Kisser, A. A systematic review of p16/Ki-67 immuno-testing for triage of low grade cervical cytology / A. Kisser, I. Zechmeister - Koss // BJOG. - 2015. - Vol.122, N 1. - P. 64 -70.

147. Let-7c is a Candidate Biomarker for Cervical Intraepithelial Lesions: A Pilot Study // Malta M., Ribeiro J., Monteiro P., Loureiro J [et al.] // Mol Diagn Ther. – 2015. – Vol. 9(3). – P. 191- 196.

148. Lie, A. K. Human papillomavirus as a risk factor in carcinogenesis// Tidsskrift for Den Norske Laegeforening. - 2000. - Vol. 30, N120 (23). - P. 2771 - 2776.

149. Link between chronicinflammation and human papillomavirus-induced carcinogenesis (review) / J. V.Fernandes, T. A. A. de Medeiros Fernandes, J. C. de Azevedo [et al.] // Oncology Letters. - 2015. - Vol. 9, N 3. - P. 1015 - 1026.

150. Martinon, F. The inflammasomes: guardians of the body / F. Martinon, A. Mayor, J. Tschopp // Annual Review Immunology. - 2009. - Vol. 27. - P. 229 - 265.

151. Mikeska, T., Craig J. DNA Methylation Biomarkers: Cancer and Beyond Genes (Basel). - 2014. - Vol. 5, № 3. - P. 821 - 864.

152. Micro RNA-211 suppresses the growth and metastasis of cervical cancer by directly targeting ZEB1 / G. Chen, P. Huang, J. Xie [et al.] // Molecular Medicine Reproduction. - 2018. - Vol.17, N 1. - P. 1275 - 1282.

153. Micro RNA Detection in Cervical Exfoliated Cells as a Triage for Human Papillomavirus–Positive Women // Tian Q., Li Y., Wang F., Li Y [et al.] // J Natl Cancer Inst. – 2014. – P. 106 -109.

154. Micro RNAs in cervical cancer: evidences for a mi RNA profile deregulated by HPV and its impact on radio-resistance / A. Pedroza -Torres, E. Lopez - Urrutia , V. Garcia-Castillo [et al.] // Molecules. - 2014. - May 16. - Vol. 19, N 5. - P. 6263 - 6281.

155. Mikeska, T., Craig J. DNA Methylation Biomarkers: Cancer and Beyond Genes (Basel). - 2014. - Vol. 5, № 3. - P. 821 - 864.

156. MiR-22 inhibits tumor growth and metastasis by targeting ATP citrate lyase: evidence in osteosarcoma, prostate cancer, cervical cancer and lung cancer // Xin M, Qiao Z, Li J, Liu J, Song S, [et al.] // Oncotarget.–2016. – N 1; 7(28). – P. 44252-44265.

157. Micro RNAs: potential biomarkers for disease diagnosis / L. Xu, X. Qi, S. Duan [et al.] // Biomed Mater Eng. - 2014. - Vol. 24, N 6. - P. 3917 - 3925.

158. Natural history of cervical neoplasia and risk of invasive cancer in women with cervical intraepithelial neoplasia 3: A retrospective cohort study // M. R. E. McCredie, K. J. Sharples, C. Paul [et al.] // Lancet Oncology. - 2008. - Vol. 9. - P. 425 - 434.

159. Organised screening for cervical cancer in France: a cost-effectiveness assessment // S. Barré , M. Massetti, H. Leleu [et al.] // BMJ Open. - 2017. - Vol. 7. - e.014626. - P. 1- 12.

160. Overexpression of p16 (INK4A) as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri / R. Klaes, T. Friedrich, D. Spitkovsky [et al.] // International J Cancer. - 2001. - Vol. 92, N 2. - P. 276 - 284.

161. P16 staining has limited value in predicting the outcome of histological low-grade squamous intraepithelial lesions of the cervix // A. Sagasta., P. Castillo, A. Saco [et al.] // Model Pathology. - 2016. - Vol.29, N 1. - P. 51 - 59.

162. P16/Ki-67 dualstain cytology in the triage of ASCUS and LSIL Papanicolau cytology: results from the European equivocal or mildli abnormal Papanicolau cytology study / D. Schmidt, C. Bergeron, K. J. Denton [et al.] // Cancer Cytopathology. - 2011. - Vol. 119, N 3. - P. 158 - 166.

163. P16/Ki67 dual-stained cytology in primary screening for cervical cancer and as triage tool in PRP negative/HPV positive cases / H. Ikenberg, W. Petry , C. Angeloni [et al.] // Eurogin: Lisbon. - 2011. - 120 P.

164. P53 and microRNA-34 are suppressors of canonical Wnt signaling / N. H. Kim [et al.] // Sci. Signal. - 2011. - N 1; 4 (197). - Pa.71.

165. P16INK4a and Ki67 expression in normal, dysplastic and neoplastic uterine cervical epithelium and human papillomavirus (HPV) infection/ L. N. Calil, M. I. Edelweiss, L. Meurer [et al.] // Pathology Res Practice. - 2014. - Vol. 210. - Issue 8. - P. 482 - 487.

166. Persistent genital human papillomavirus infection as a risk factor for persistent cervical dysplasia / G.Y.F. Ho, R.D. Burk,S. Klein [et al.] //Journal of the National Cancer Institute. - 1995. - Vol. 87, N18. - P. 1365 - 1371.

167. Persistent genital human papillomavirus infection as a risk factor for persistent cervical dysplasia // G. Y. Ho, R. D. Burk, S. Klein [et al.] // J. Natl. Cancer Inst. - 1995. - Vol. 87. - P. 1365 - 1371.

168. Performance of p16/Ki-67 immunostaining to detect cervical cancer precursors in a colposcopy referral population / N. Wentzensen, L. Schwartz, R. E. Zuna [et al.] // Clinical Cancer Res. - 2012. -Vol. 18, N 15. - P. 4154 - 4162.

169. Plummer, M. International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer Time since first sexual intercourse and the risk of cervical cancer / M. Plummer, M. J. Peto, S. Franceschi // International J Cancer. - 2012. - Vol.130, N 11. - P. 2638 - 2644.

170. Polakis, P. The many ways of Wnt in cancer / P. Polakis // Current Opinion Genetic Dev. - 2007. - Vol. 17, N 1. - P. 45 - 51.

171. Predictors of HPV incidence and clearance in a cohort of Brazilian HIV-infected women / A. G. Travassos , E. Netto, E. Xavier-Souza[et al.] // PLOS One. - 2017. - October 5. - P. 1 - 17.

172. Prevalence of high-grade cervical intraepithelial neoplasia in women with persistent high-risk HPV genotypes and negative cytology / M. Macdonald, J. Crossley, K. Ellis [et al.] // Cytopathology. - 2018. - Vol. 29, N 2. - P.133 - 142.

173. Prevalence and Genotype Distribution of HPV Types in Women at Risk for Cervical Neoplasia in Israel / E. Siegler, M. Shiner, Y. Segev [et al.] // Isr. Medicine Assoc J. - 2017. - Vol.19, N 10. - P. 635 - 639.

174. Prevalence of high-risk squamous intraepithelial lesion in women over 30 years of age in St. Peterburg, Russia / E. Shipitsyna, E. Zolotoverkhaya , D. Kuevda [et al.] // Cancer Epidemiology. - 2011. - Vol. 35. - P.160 - 164.

175. Prevalence of Chlamydia trachomatis and herpes simplex virus 2 in cervical carcinoma associated with human papillomavirus detected in paraffin-sectioned samples / A. Kwaśniewska, E. Korobowicz, M. Zdunek [et al.] // European J Gynecology Oncology. - 2009. - Vol. 30, N1. - P. 65 - 70.

176. Prevalence of high-risk human papillomavirus among women in two English-speaking Caribbean countries / G. Andall - Brereton, E. Brown , S. Slater [et al.] // Rev Panam Salud Publica. - 2017. –Jun. 8, N 41. - e. 41.

177. Primary cervical cancer screening with human papillomavirus: End of study results from the ATHENA study using HPV as the first-line screening test / C.Thomas, H.

Wright, Mark Stoler, M. Catherine Behrens [et al.]. - 2015. -Vol. 136, Issue 2. - P. 189 - 197.

178. Promoter methylation analysis of WNT/β-catenin signaling pathway regulators to detect adenocarcinoma or its precursor lesion of the cervix / W. F. Van Der Meide, S. Snellenberg, C. J. Meijer [et al.] // Gynecologic Oncology. - 2011. - Vol. 123, N 1. - P. 116 - 122.

179. Prospective seroepidemiologic study on the role of Human Papillomavirus and other infections in cervical carcinogenesis: evidence from the EPIC cohort // X. Castellsague, M. Pawlita, E. Roura [et al.] // International J Cancer. - 2014. - Vol. 135. - P. 440 - 452.

180. Protection of Rabbits against Challenge with Rabbit Papillomaviruses by Immunization with the N Terminus of Human Papillomavirus Type 16 Minor Capsid Antigen L2 / R. Gambhira, S. Jagu, Karanam B. [et al.] // Journal Virology. - 2007. - Vol. 81, N 21. - P. 11585 -11592.

181. Proteomics approaches in cervical cancer: focus on the discovery of biomarkers for diagnosis and drug treatment monitoring/ Kontostathi G, Zoidakis J, Anagnou NP[et al.] // Expert Rev Proteomics. - 2016 Aug. N 13(8). P.- 731-745

182. Putative biomarkers for cervical cancer: SNVs, methylation and expression profiles / M. F. S. Cardoso, C. H. M. Castelletti, J. L. Lima - Filho Teixeira [et al.] // Mutation Res. - 2017. - Vol. 773. - P. 161 - 173.

183. Quantification of therapeutic mi RNA mimics in whole blood from nonhuman primates / K. Kelnar, H.J. Peltier, N. Leatherbury [et al.] // Anal Chem. - 2014. - Feb 4. - Vol.86, N 3. - P. 1534 - 1542.

184. Reductions in human papillomavirus-disease resource use and costs with quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16, and 18) recombinant vaccination: the FUTURE Study Economic Evaluation / R. P. Insinga , E. J. Dasbach , S. E. Allen [et al.] // Value Health. - 2008. - Vol. 11, N 7. - P. 1022 -1032.

185. Risk of anal cancer in a cohort with human papillomavirus related gynecologic neoplasm / A. M. Saleem [et al.] // Obstetrics Gynecology. - 2011. - Vol. 117. - P. 643 - 649.

186. Risk of high-grade precancerous lesions and invasive cancers in high-risk HPV-positive women with normal cervix or CIN 1 at baseline-A population-based cohort study / S. Mittal, P. Basu, R. Muwonge [et al.] // International J Cancer. - 2017. - Apr 15. - Vol.140, N 8. - P. 1850 - 1859.

187. Richart, R. M. Cervical intraepithelial neoplasia / R. M. Richart // Pathology annual. - 1973. - Vol. 8. - P 301- 328.

188. Shiffman, M. From Human papillomavirus to cervical cancer / R. M. Richart, M. Shiffman, N. Wentzensen // Obstetrics Gynecology. - 2010. - Vol. 116, N 1. - P. 177 - 185.

189. Saville, A. M. Cervical cancer prevention in Australia: Planning for the future / A. M. Saville // Cancer Cytopathology. - 2015. - April. - P. 235 - 240.

190. Screening for cervical cancer precursors with p16/Ki-67 dual-stained cytology: results of the PALMS study / H. Ikenberg, C. Bergeron, D. Schmidt [et al.] // J of National Cancer Institute. - 2013. – October.16, N 105 (20). - P. 1550 - 1557.

191. Screening for characteristic micro RNAs between pre-invasive and invasive stages of cervical cancer / X. L. Zhu, S.Y. Wen, Ai ZH [et al.] // Molecular Medicine Reproduction. - 2015. - Vol.12, N 1. - P. 55 - 62.

192. Smoking as a major risk factor for cervical cancer and pre-cancer: results from the EPIC cohort / E. Roura, X. Castellsague, M. Pawlita [et al.] // International J Cancer. - 2014. - Vol.135. - P. 453 - 466.

193. Smoking habit, immune suppression, oral contraceptive use, and hormone replacement therapy use and cervical carcinogenesis: a review of the literature / A. Gadducci, C. Barsotti, S. Cosio [et al.] // Gynecology Endocrinology. - 2011. - Vol. 27. - P. 597 - 604.

194. Stahlhut, C. Micro RNN as and the canser phenotype: profiling, signatures and clinical implicasion / C. Stahlhut, F. J. Slack // Genome Medicine. - 2013. - Vol. 5. - P.111.

195. Song S.J. and Pandolfi P.P. MiR-22 in tumorigenesis. Cell Cycle 13:1, 11–12; doi: 10.4161/cc.27027.

196. Time trends of human papillomavirus types in invasive cervical cancer, from 1940 to 2007/ L. Aleman, S. de Sanjose, S. Tous [et al.] // International J Cancer. -2014. - Vol. 135, N 1. - P. 88 - 95.

197. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer // F. X. Bosch, A. Lorincz, N. Munoz, [et al.] // Journal of clinical pathology. - 2002. - Vol.55, N 4. - P. 244 - 265.

198. The Epidemiology of Cervical Cancer and Human Papillomavirus. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer (WHO), 1992 / N. Munoz [et al.] // IARC Scientific Publications. - 1992. - Vol. 119. - P. 111 - 119.

199. The Influence of Hormonal Factors on the Risk of Developing Cervical Cancer and Pre-Cancer: Results from the EPIC / E. Cohort Roura, N. Travier, T. Waterboer [et al.] // PLOS One. - 2016. - January25. - P. 1 - 17.

200. The immune function differences and high-risk human papillomavirus infection in the progress of cervical cancer / C. Li, C. Ma, W. Zhang [et al.] // European J Gynecology Oncology. - 2014. - Vol. 35, № 5. - P.557 - 561.

201. The clinical impact of using p16 (INK4a) immunochemistry in cervical histopathology and cytology: an update of recent developments / C. Bergeron, G. Ronco, M. Reuschenbach [et al.] // International J Cancer. - 2015. - Jun 15. - Vol.136, N 12. - P. 2741 - 2751.

202. The role of mRNA E6/E7 HPV high oncogenic risk expression in colposcopy of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) / B. Galarowicz, R. Jach, J. Kidzierska [et al.] // Przegl Lek. - 2012. - Vol. 69, N 9. - P. 651 - 657.

203. The Wnt inhibitory factor 1 restoration in prostate cancer cells was associated with reduced tumor growth, decreased capacity of cell migration and invasion and a reversal of epithelial to mesenchymal transition/ D. S. Yee, Y. Tang, X. Li [et al.] // Molecular Cancer. - 2010. - Vol. 9. - P. 162 - 165.

204. Topography of the human papillomavirus minor capsid protein L2 during vesicular trafficking of infectious entry // S. Di Giuseppe, T. R. Keiffer, M. Bienkowska - Haba [et al.] // Journal of Virology. - 2015. - Vol. 89, N 20. - P. 10442 - 10452.

205. Trottier, H. The epidemiology of genital human papillomavirus infection / H. Trottier, E. L. Franco // Vaccine. - 2006. - Vol. 24, N 1. - P. l - 15.

206. Tjiong M., Out T., Ter Schegget J. et al. // Int. Gynecol. Cancer. - 2001. - Vol. 11. - P. 9-17.

207. Up-Regulation of miR-21 Is Associated with Cervicitis and Human Papillomavirus Infection in Cervical Tissues / S. Bumrungthai, T. Ekalaksananan, M. F. Evans [et al.] // PLOS One. - 2015. - May 26. - P. 1 - 15.

208. Use of Cytology, E6/E7 mRNA, and p16INK4a-Ki-67 to Define the Management of Human Papillomavirus (HPV)-Positive Women in Cervical Cancer Screening / D. Gustinucci, P. Giorgi Rossi, E. Cesarini [et al.] // Am J Clinical Pathology. - 2016. - Vol. 145, N 1. - P. 35 - 45.

209. Usefulness of CINtec® PLUS p16/Ki-67 double-staining in cytological screening of cervical cancer / T. Yoshida, T. Sano, T. Kanuma [et al.] // Acta Cytology. - 2011. - Vol.55. - P. 413 - 420.

210. Utility of Micro RNAs and si RNAs in Cervical Carcinogenesis / Sacnite del Mar Díaz - González, Jessica Deas, Odelia Benítez - Boijseauneau [et al.] // Bio Med Research International. - 2015. -Vol. 22. - P. 1 - 12.

211. Vaginal and endocervical asymptomatic non - pregnant females: risk factors and rates of occurrence / C. Tibaldi, N. Cappello, M. A. Latino [et al.] // Clinical Microbiology Infection. - 2009. - Vol. 15, N 7. - P. 670 - 679.

212. Value of p16 (INK4a) as a marker of progression/regression in cervical intraepithelial neoplasia grade 1 / M. del. Pino, S. Garcia, V. Fusté [et al.] // Am. J. Obstetrics Gynecology. - 2009. - Vol. 201, N 5. - P. 488. - e. l - 7.

213. Value of PAX1 Methylation Analysis by MS-HRM in the Triage of Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance / S. R. Li, Z. M. Wang, Y. H. Wang [et al.] // Asian Pac J Cancer Prev. - 2015. - Vol.16, N 14. - P. 5843 - 5846.

214. Value of human papillomavirus (HPV) 16 and HPV18 viral loads for the detection of high-grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN2+) in a cohort of African women living with HIV / M. Segondy, J. Ngou, H. Kelly [et al.] // J Clinical Virology. - 2018. - Vol. 16. - P. 99 - 100, P.79 - 83.

215. Vargas - Hernández, V. M. Primary cervical cancer screening / V. M. Vargas - Hernández,V. M. Vargas - Aguilar, J. M. Tovar - Rodríguez // Cir Cir. - 2015. - Vol. 83, N 5. - P. 448 - 453.

216. Wang, F. The roles and clinical significance of micro RNAs in cervical cancer / F. Wang, B. Li1, X. Xie // Histology Histopathology. - 2016. - Vol. 31, N 2. - P. 131 - 139.

217. Wang, Z. M. PAX1 methylation analysis by MS-HRM is useful in triage of high-grade squamous intraepithelial lesions / Z. M. Wang // Asian Pac J Cancer Prev. - 2014. - Vol.15, N 2. - P. 891 - 894.

218. WIF1 is a frequent target for epigenetic silencing in squamous cell carcinoma of the cervix/ A. L Delmas [et al.] // Carcinogenesis. - 2011. - Vol. 32, № 11. - P. 1625 - 1633.

219. Wnt inhibitory factor 1 (WIF1) is a marker of osteoblastic differentiation stage and is not silenced by DNA methylation in osteosarcoma / E. K. Baker, S. Taylor, A. Gupte [et al.] // Bone. - 2015. - Vol. 73. - P. 223 - 232.

220. Wnt antagonist family genes as biomarkers for diagnosis, staging, and prognosis of renal cell carcinoma using tumor and serum DNA / S. Urakami, H. Shiina, H. Enokida [et al.] // Clinical Cancer Res. - 2006. - N 12. - P. 6989 - 6997.

221. Wnt inhibitory factor 1 induces apoptosis and inhibits cervical cancer growth, invasion and angiogenesis in vivo/ I. Ramachandran, E. Thavathiru, S. Ramalingam [et al.] // Oncogene. - 2012. - Vol. 31. - P. 2725 - 2737.

222. World Health Organization International Agency for research of Cancer GLOBOCAN 2012; Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012.Geneva:2012.

223. World Health Organization. WHO/ICO information centre on human papilloma virus (HPV) and cervical cancer. Available at. - 2012. - Vol. 28.

224. Zhao Y. Relationship between cervical disease and infection with human papillomavirus types 16 and 18, and herpes simplex virus 1 and 2 / Y. Zhao, X. Cao, Y. Zheng // J. Medicine Virology. - 2012. - Vol.4, N 12. - P.1920 - 1927.

225. Ziemke, P. Indications for p16/Ki-67 in cervical cytology / P. Ziemke, H. Griesser // Pathology. - 2017. - Vol. 38, N 1. - P. 38 - 44.

226. Zur Hausen, H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application / H. Zun Hausen // Nat. Rev. Cancer. - 2002. - Vol. 2 N 5. - P. 342 - 350.

227. Zhang H, MicroRNA-92a promotes metastasis of nasopharyngeal carcinoma by targeting the PTEN/AKT pathway // Zhang H, Cao H, Xu D, Zhu K // Onco Targets Ther. – 2016. 9: 3579-88. doi: 10.2147/OTT.S105470.