

МЗАРЕЛУА

Гуранда Мерабовна

ЦЕРВИКАЛЬНЫЕ ИНТРАЭПИТЕЛИАЛЬНЫЕ НЕОПЛАЗИИ:
ЗНАЧЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ
В ИХ ДИАГНОСТИКЕ И ПРОГНОЗИРОВАНИИ

14.01.01 - акушерство и гинекология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата медицинских наук

Москва -2019

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

Научные руководители:

доктор медицинских наук

доктор биологических наук, профессор РАН

Назарова Нисо Мирзоевна

Трофимов Дмитрий Юрьевич

Официальные оппоненты:

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

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

Ведущая организация: ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Минздрава России

Защита состоится «___» _____ 2019 г. в 13.00 час. на заседании диссертационного совета Д 208.125.01 на базе федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу 117997, г. Москва, ул. Академика Опарина, д. 4.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации и на сайте http://science.ncagp.ru/upfiles/pdf/MzareluaGM_diss.pdf

Автореферат разослан «___» _____ 2019 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета,

доктор медицинских наук, профессор

Калинина Елена Анатольевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Заболееваемость папилломавирусной инфекцией (ПВИ) значительно увеличилась в последние 35 лет (Г.Т. Сухих, В.Н. Прилепская, 2012). Значительное место в структуре заболеваний шейки матки (ШМ), ассоциированных с вирусом папилломы человека (ВПЧ), занимают цервикальные интраэпителиальные неоплазии (CIN), которые нередко приводят к развитию рака шейки матки (РШМ). После инфицирования ВПЧ CIN II-III развивается уже через 3 года у 27% женщин и в структуре патологии шейки матки составляет 17-20% (Ашрафян Л.А., 2019; Knoff J. et al, 2014; Galamb Á. et al., 2015). На этих стадиях цервикального канцерогенеза возможно не осложненное органосохраняющее лечение в объеме конизации шейки матки с сохранением фертильности. Однако результаты исследования A.D. Mistro, M. Matteucci, D. Minucci (2015) показали что, после проведенного лечения CIN 2/3 рецидивы отмечаются в 9% случаев.

Рядом авторов отмечена опасная недооценка степени тяжести поражения шейки матки в цитологических мазках при наличии у больных более тяжелых поражений. Так, среди больных с LSIL в 26% случаев выявлено CIN2 и в 5% - CIN3, учитывая различную тактику ведения пациентов, в частности, выжидательную при LSIL (Короленкова Л.В., 2018).

Для ранней диагностики, прогнозирования течения неопластических процессов изучаются различные молекулярно-генетические маркёры, в их числе ВПЧ-генотипирование, определение экспрессии миРНК (miRNA) и мРНК функциональных генов человека. Проведённые исследования показали, что miRNA функционирует в качестве важного компонента естественной защиты клетки от вирусной инфекции (Liu L. et al, 2012). В исследованиях Nambaru L. et al. (2009) были обнаружены гены miRNA в местах интеграции ДНК ВПЧ, и выявлена их корреляция с РШМ. Известно, что miRNA принимают участие в процессах дифференцировки, клеточной пролиферации,

апоптозе, морфогенезе, противовирусной защите и онкогенезе, в связи с чем предполагается специфическая роль самих miRNA в патогенезе РШМ (Lee D.Y. et al., 2007). При CIN и РШМ происходит изменение уровня экспрессии мРНК генов регулирующих пролиферацию и клеточный цикл, апоптоз, инвазию, рецепторный аппарат клеток, опухолевую супрессию, сигнальный пептид в эпителии шейки матки, что является актуальным для диагностики степени тяжести поражения и оценки прогрессирования CIN.

Степень разработанности темы исследования

В настоящее время известны физиологические функции и гены-мишени miRNA, однако, его роль в прогнозировании течения неопластических процессов и рака шейки матки ещё не изучена и представляет большой интерес с научной и практической точки зрения. В этой связи чрезвычайно актуальным является изучение распространённости ВПЧ высокого, вероятно и возможно канцерогенного риска, а также определение экспрессии miRNA и мРНК генов при неопластических процессах и раке шейки матки, что позволит усовершенствовать алгоритмы обследования и ведения пациенток с ВПЧ-ассоциированными заболеваниями шейки матки.

Цель исследования:

Разработка тактики введения и мониторинга пациенток с цервикальными интраэпителиальными неоплазиями различной степени тяжести с учётом изучения роли различных молекулярно-генетических маркеров, для дифференциальной диагностики степени тяжести и прогнозирования прогрессии процесса.

Задачи исследования

1. Провести ретроспективный анализ частоты встречаемости доброкачественных и предраковых заболеваний шейки матки ассоциированных с ВПЧ верифицированных морфологическими методами (по обращаемости).

2. Определить наиболее значимые факторы риска развития цервикальных интраэпителиальных неоплазий с учетом клинико-анамнестических данных.
3. Изучить частоту встречаемости ВПЧ канцерогенного риска у пациенток с цервикальными неоплазиями различной степени тяжести в сравнительном аспекте.
4. Изучить особенности экспрессии мРНК генов человека при различных состояниях эпителия шейки матки в сравнительном аспекте.
5. Оценить уровень экспрессии миРНК у пациенток с CIN различной степени тяжести определить его диагностическую ценность.
6. Разработать методы прогноза течения неопластического процесса у ВПЧ-положительных женщин на основании молекулярно-генетических маркеров.
7. Разработать тактику ведения пациенток репродуктивного возраста с предраковыми и доброкачественными процессами шейки матки с учетом комплекса молекулярно-генетических маркеров.

Научная новизна

Проведён сравнительный анализ встречаемости ВПЧ высокого, вероятного и возможного канцерогенного риска у пациенток с морфологически верифицированным диагнозом CIN различной степени тяжести и раком шейки матки. Впервые изучена экспрессия молекулярных маркеров миРНК (miR-143, -145, -199), их связь с риском развития CIN и РШМ. На основании изучения уровня экспрессии мРНК 18 генов определены 4 маркера (Ki67, BCL-2, ESR1, PGR), обладающие наибольшей прогностической ценностью, с высокой достоверностью дифференцирующие доброкачественные и злокачественные поражения шейки матки и позволяющие выявлять пациенток с риском развития CIN и РШМ. Разработан алгоритм ведения пациенток с доброкачественными заболеваниями шейки матки, плоскоклеточным интраэпителиальным

поражением низкой степени и наличием и/или персистенцией ВПЧ высокого, вероятного канцерогенного риска.

Практическая значимость

У пациенток с плоскоклеточными интраэпителиальными поражениями низкой степени и персистенцией ВПЧ высокого и вероятного канцерогенного риска, разработан неинвазивный подход для раннего выявления групп высокого риска по развитию HSIL путем определения уровня экспрессии противоонкогенных miR-143, -145.

Определена значимость уровня экспрессии четырех мРНК генов (Ki67, BCL-2, ESR1, PGR) в эпителии шейки матки, и доказана целесообразность их применения для точной дифференциации доброкачественных, предраковых и злокачественных процессов шейки матки в качестве дополнительного исследования неинвазивным способом. Для раннего выявления пациенток с неоплазиями тяжелой степени (HSIL) и РШМ в качестве параметра дифференциальной диагностики степени тяжести процесса следует рассматривать наличие ВПЧ высокого и вероятного канцерогенного риска и уровни экспрессии мРНК генов Ki67, BCL-2, ESR1 и PGR и их включение в комплексное обследование пациенток с персистенцией ВПЧ и LSIL.

Методология и методы исследования

Работа основана на использовании современных методов диагностики ВПЧ-ассоциированных заболеваний шейки матки: клинический осмотр, жалобы, анамнез, гинекологический статус, цитологическое исследование, молекулярно-биологические методы, ВПЧ-генотипирование (21 тип) с определением вирусной нагрузки, изучение уровня экспрессии микроРНК (143,145,199 и 122) и мРНК генов (Ki67, BCL2, ESR1 и PGR) с помощью ПЦР в режиме реального времени), расширенная кольпоскопия, биопсия шейки матки(по показаниям), гистологическое исследование биопсийного материала. Измерение уровня экспрессии микроРНК проводили методом количественной ПЦР в реальном времени с использованием коммерческих примеров TaqMan

miRNA Assay (LifeTechnologies, GrandIsland, NY), набора реагентов TaqMan Universal PCRMasterMix (LifeTechnologies, GrandIsland, NY) и детектирующего амплификатора ДТ-96 (компания ДНК-Технология, Россия). Количественную измерение миРНК проводили в условных единицах путём оценки $\Delta\Delta C_t$ отношению к количеству ДНК, измеренному в том же объёме (5 мкл). Измерение уровней экспрессии мРНК генов (P16 Ki67, BCL2, BAX, ESR1, PGR) проводилось коммерческими реактивами (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) методом количественной полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме реального времени с предварительной стадией обратной транскрипции (ОТ-ПЦР) согласно инструкции производителя в лаборатории молекулярно-генетических методов (рук. - д.б.н. Д.Ю. Трофимов).

Статистическую обработку полученных результатов производили с помощью статистических пакетов Biostat, SPSS21, Statistics 10.0. Подготовка данных осуществлялась с помощью Microsoft Excel 7 для Windows 98.

Положения, выносимые на защиту

1. ВПЧ-ассоциированные доброкачественные и предраковые заболевания шейки матки у женщин репродуктивного возраста встречаются почти в равных соотношениях с заболеваниями, не ассоциированными с вирусом, и составляют 44%.
2. ВПЧ высокого канцерогенного риска (группа 1) явился основным фактором развития HSIL и РШМ, достоверно чаще встречался ВПЧ группы А9 с тенденцией к повышению встречаемости групп А7, А6, А5.
3. Снижение экспрессии противоонкогенных miR-143 и -145 наиболее выражено у пациенток с HSIL и раком шейки матки. Данные маркеры могут быть рекомендованы для клинической практики в качестве неинвазивных дополнительных методов обследования при LSIL и ВПЧ ВР, для выявления пациенток с высоким риском развития рака шейки матки. При выявлении риска рекомендуется проведение биопсии шейки матки.

4. Молекулярно-биологическое исследование, включающее определение уровня экспрессии мРНК генов Ki67, BCL-2, ESR1, PGR, позволяет с высокой достоверностью дифференцировать доброкачественные, предраковые и злокачественные изменения. В качестве параметров дифференциальной диагностики рассматривается наличие ВПЧ высокого канцерогенного и вероятного канцерогенного риска в количестве более трех логарифмов копий вируса в образце 3 (log) и относительные уровни экспрессии мРНК генов Ki67, BCL-2, ESR1 и PGR для выявления пациенток с неоплазиями тяжелой степени и РШМ.

Апробация результатов

Диссертационная работа обсуждена на межклинической конференции 20.12.2017 г. и заседании апробационной комиссии ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России (18.06.2018 г., протокол №22)

Основные положения диссертации и результаты работы представлены и доложены на VIII Международном конгрессе по репродуктивной медицине (Москва, 20-23 января 2014), XX Юбилейном Всероссийском конгрессе с международным участием «Амбулаторно-поликлиническая помощь в эпицентре женского здоровья» (Москва, 18-21 марта 2014), Eurogin 2015 (Испания, 4-7 февраля 2015), XXI Всероссийском конгрессе с международным участием «Амбулаторно-поликлиническая помощь: от менархе до менопаузы» (Москва, 3-6 марта 2015), «Exploring new worlds in research HPV 2015 30th International Papillomavirus Conference & Clinical and Public Health» (Португалия, 17-21 сентября 2015), XXVIII Международном конгрессе с курсом эндоскопии «Новые технологии в диагностике и лечении гинекологических заболеваний» (Москва, 9-12 июня 2015).

Личный вклад автора

Автор участвовал в выборе направления исследования, постановке задач, клинико-лабораторном обследовании, сборе биологического материала и

лечении пациенток, а также в проведении анализа медицинской документации, статистической обработке и научном обобщении полученных результатов.

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.

Внедрение результатов исследования в практику

Алгоритм ведения пациенток с ВПЧ-ассоциированными заболеваниями шейки матки внедрён в практическую деятельность научно-поликлинического отделения ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России.

По теме диссертации опубликовано 14 научных работ, из них 8 - в рецензируемых научных журналах.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, 4 глав, выводов, практических рекомендаций, списка литературы. Работа изложена на 113 страницах, содержит 27 таблиц, 17 рисунков. Библиографический указатель содержит 112 литературных источников, из них 23 отечественных и 89 зарубежных.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал и методы исследования

В период с 2013 по 2015 гг. было обследовано 429 женщин, обратившихся в научно-поликлиническое отделение центра по поводу наличия ВПЧ- ассоциированной заболевании шейки матки. В соответствии с заданными критериями включения и исключения, были отобраны 167 пациентки (средний возраст $(32,4 \pm 6,1)$ лет), которые были разделены на 5 групп: 1 группа - 54 пациентки с цитологическим заключением NILM (ВПЧ-негативные), 2 группа - (ВПЧ-позитивные) 31 пациентки с гистологическим диагнозом хр.цервицит, 3 группа-31 пациентки с гистологическим диагнозом L-SIL, 4 группа-37

пациентки с гистологическим диагнозом HSIL и 5 группа-14 пациентки с раком шейки матки.

Критерии включения: возраст 18-49 лет, ВПЧ-инфекция, гистологический верифицированные CIN различной степени тяжести, регулярный менструальный цикл, способность соблюдать требования протокола, представление письменного информированного согласия, возможность поддерживать контакт с пациентом.

Критерии исключения: беременность, послеродовый период и лактация, прием гормональной терапии, наличие острых воспалительных заболеваний (специфической и неспецифической этиологии), нарушение функции почек печени, легких в стадии декомпенсации, наличие психоневрологических заболеваний (отсутствие возможности следовать протоколу).

Результаты собственных исследований и их обсуждение

Проведен ретроспективный анализ результатов гистологического диагноза у 521 пациенток репродуктивного возраста с подозрением на ВПЧ-ассоциированные заболевания (аномальная цитология, наличие ВПЧ ВР, слабовыраженные и выраженные изменения при кольпоскопии) которым была проведена биопсия шейки матки. По результатам гистологического диагноза ВПЧ-ассоциированные заболевания шейки матки встречались в 44 % случаев.

При анализе клинико-anamнестических данных у 167 пациенток не было выявлено статистически значимых отличий между группами по возрасту, антропометрическим данным, менструальной функции, акушерскому и гинекологическому анамнезу и соматической патологии.

Анализ клинико-anamнестических данных показал, что в группе HSIL-статистически значимо чаще встречался вульвовагинальный кандидоз по сравнению с другими заболеваниями.

По распространённости ВПЧ-инфекции в анамнезе, достоверно чаще встречалась в группах LSIL – 29 (93,5%) и HSIL - 26(70,3%). В группе пациенток с РШМ ВПЧ в анамнезе встречалась в 57,1% случаев.

При сравнительном анализе встречаемости ВПЧ по группам было выявлено, что ВПЧ высокого канцерогенного риска (1 группа) в целом встречались в 99 (88,4%) случаев, вероятно канцерогенный тип (группа 2 А) - 4,5%, возможно канцерогенного риска (группа 2 В) -7,1%. При этом наиболее часто определялись ВПЧ группы А9 (66,1%), далее А7(11,6%), А6(4,5%), А5(6,3%). Наиболее часто ВПЧ 1группы встречались при HSIL (42,4%) и LSIL - 32,3% случаев.

Таблица 1 - Сравнительный анализ распределения типов ВПЧ в исследуемых группах (с учетом классификации IARC).

		Хр. цервицит	LSIL (CIN I)	HSIL (CINII, III)	РШМ	Хр.церв.+ LSIL (CIN I)	HSIL + РШМ	Итого	Доля, %
Группа 1		15	32	42	10	47	52	99	88,4
A9	16,52, 33,58, 31,35	11	23	31	9	34	40	74	66,1
A7	39,45, 18	1	5	6	1	6	7	13	11,6
A6	56	2	1	2	0	3	2	5	4,5
A5	51	1	3	3	0	4	3	7	6,3
Группа 2А		0	1	3	1	1	4	5	4,5
A7	68	0	1	3	1	1	4	5	4,5
Группа 2В		3	4	1	0	7	1	8	7,1
A6	53, 66	2	2	1	0	4	1	5	4,5
A5	82	0	1	0		1	0	1	0,9
A11	73	1	1	0	0	2	0	2	1,8
всего вирусов 100%		36	74	92	22	110	114	112	100,0

Группа 2А встречалась в 5 (4,5%) случаях и была представлена единственным 68 типом ВПЧ, в 4 случаях данный тип ВПЧ встречался при HSIL и РШМ, в 1 случае – при LSIL.

Группа 2В встречалась в 8(7,1%) случаях, причем в 7 случаях в группах LSIL и хроническом цервиците, в 2 случаях при HSIL и РШМ. В основном встречались филогенетические группы А11, А6, А5 - 11,8%, 4,5% и 0,9%, соответственно.

Полученные нами данные отличаются от результатов исследования группы LinaWang (2016). где наиболее часто встречаемыми типами ВПЧ явились: ВПЧ 16 (44%, 73/166), 53 (28,9%, 48/166), 52 тип (25,3%, 42/166), 58 тип (22,3%, 37/166), 35 тип (17,5%, 29/166). У женщин с хроническим цервицитом достоверно чаще выявлялись ВПЧ 16, 53, 58 и 52 типов. Результаты генотипирования показали, что, у женщин с CIN I (LSIL) наиболее часто встречался ВПЧ 16, 53, 52 и 58 типы, при CIN II, III (HSIL) наиболее распространённым оказались ВПЧ 33 и 53 типы, при РШМ преобладали 16, 52, и 58 типы.

По данным исследования Piroozmand A. с соавт., у 117 женщин с РШМ наиболее часто встречался ВПЧ 18 и 16 типов. Реже всего у данных пациенток выявлялись 51 и 31 типы ВПЧ. По данным ВОЗ, наиболее распространённые типы ВПЧ ВР у пациенток с РШМ – это 16, 18, 33, 45 и 31 типы (Global Cancer Statistics, 2011).

Как и в вышеуказанных исследованиях, по результатам нашего исследования так же наиболее часто встречались ВПЧ 16 типа. В нашей работе мы провели анализ встречаемости типов ВПЧ с учетом классификации, предложенной Международным агентством по изучению рака в 2015 году.

Целью исследования было определение значения типов ВПЧ в развитии дисплазии шейки матки и канцерогенезе. В результате было установлено, что редкие типы ВПЧ так же могут вносить значимый вклад в развитие РШМ и дисплазии, особенно это касалось 68, 70 и 53 типов.

Нами проведен анализ встречаемости отдельных типов ВПЧ среди исследуемых групп пациенток и выявлено, что наиболее часто среди всех встречался 16 тип ВПЧ.

Несмотря на лидирующую позицию ВПЧ группы А9 в развитии CIN, обращает на себя внимание высокая частота типы ВПЧ группы А7, А5, А6.

Группа 2А, представленная ВПЧ 68 типа, встречалась в основном в группах HSIL и РШМ, что подчеркивает ключевую роль данного типа ВПЧ в развитии тяжелых поражений шейки матки.

Группа 2В в большинстве случаев встречалась в группах с малыми поражениями эпителия шейки матки - LSIL и хроническом цервиците. При сравнительной оценке вирусной нагрузки по группам выявлено ее достоверное повышение в группе HSIL (5,35 (4,7-5,8 log)).

На следующем этапе нашей работы был проведён анализ результатов экспрессии четырёх противоонкогенных miRNA - mir-143, mir-145, mir-199 и mir-122, в эпителии шейки матки по группам.

Полученные результаты показали выраженное снижение экспрессии miRNA-143 в соскобе эпителии по мере утяжеления степени неопластического поражения. Наибольшее снижение отмечено при РШМ – в 11,6 раз ($p=0,0001$), в 3,8 раз при H-SIL и 2,2 раза при L-SIL. При этом, экспрессия mir-143 при РШМ в 3,1 раза ниже, чем при H-SIL ($p=0,03$) и в 5,3 раза ниже, чем при L-SIL ($p=0,008$) по сравнению с группой I.

Снижение экспрессии mir-145 по сравнению с нормой в 3,8 раз при РШМ ($p=0,0006$), в 1,7 раз при H-SIL ($p=0,04$) и в 2 раза при L-SIL ($p=0,002$).

Экспрессия mir-199 была снижена у пациенток как с H-SIL и L-SIL и РШМ, однако зависимости от тяжести поражения не выявилось.

В отношении экспрессии mir-122 не было выявлено достоверных различий между исследуемыми группами.

С целью оценки возможности применения экспрессии miRNA для дифференциальной диагностики степени неопластического поражения был применён ROC-анализ. Результаты представлены в таблице ниже.

Таблица 2 - Данные логистического регрессионного анализа ROC-кривой сравнения уровней экспрессии miRNA в норме и неоплазии шейки матки (Н+L+C).

Микро РНК	Площадь под кривой	Уровень отсечки (у.е.)	Чувствительность (%)	Специфичность (%)	Диагностическая точность (%)	Отношение шансов (95% д.и.)	P
mir-143	0,78	0,32	73,3	77,8	75,6	9,63 (3,2-30,8)	<0,001
mir-145	0,70	0,0093	70,0	70,4	70,2	9,52 (3,13-31,96)	<0,001
mir-199	0,724	0,0066	73,3	67,6	70,5	5,74 (2,04-17,0)	<0,001

В отношении РШМ при уровне экспрессии mir-143 ниже 0,31 у.е. чувствительность диагноза составила 73,3%, специфичность 84,6% .

Был проведен многофакторный дискриминантный анализ с пошаговым исключением переменных для построения дискриминантной модели принадлежности к классу в соответствии с результатами исследования. В ходе анализа было установлено, что наилучшими дифференцирующими свойствами, обладает mir-143. Уровень данной микроРНК являлся единственной независимой переменной, ассоциированной со степенью тяжести цервикальной неоплазии. Лямбда Уилкса для mir-143 составила 0,83 (p=0,004). Все остальные анализируемые микро РНК были исключены из модели.

Вероятность (OD) наличия РШМ у женщин с уровнем экспрессии mir-143 ниже 0,31 у.е. повышен в 15,3 раз (p<0,001). Применение ROC-анализа позволяет также дифференцировать РШМ от Н-SIL - при уровне отсечки 0,05

у.е. чувствительность дифференциации составляет 80,8%, специфичность – 61,5%, отношение шансов составляет 6,72 ($p=0,012$;

Таблица 3 - Данные логистического регрессионного анализа ROC-кривой сравнения уровней экспрессии микроРНК при Н-SIL и раке шейки матки.

МикроРНК	Площадь под кривой	Уровень отсечки (у.е.)	Чувствительность (%)	Специфичность (%)	Диагн. точность (%)	Отношение шансов (доверительный интервал)	P
mir-143	0,704	0,05	80,8	61,5	71,1	6,72 (1,23-38,3)	0,012

Проведение логистического регрессионного анализа позволило также выявить критерии дифференциации диагноза между Н-SIL и РШМ.

При неопластических поражениях эпителия шейки матки в эпителии шейки значительно снижается синтез противоонкогенных микроРНК - mir-143, mir-145 и mir-199. При этом уровень экспрессии имеет выраженную корреляцию и снижается пропорционально степени тяжести поражения – минимальный уровень экспрессии этих молекул отмечен при РШМ. Полученные нами результаты согласуются с данными исследования, которые установили, что экспрессия mir-143, mir-145 и mir-199 в тканях шейки матки снижена (Pekow J et al, 2016).

Результаты исследования показывают значительное снижение экспрессии mir-143, mir-145 и mir-199 при доброкачественной, так и при злокачественной неоплазии, что согласуется с данными других исследователей (Liu L. et al 2012).

С целью прогнозирования и развития неопластической трансформации шейки матки, были изучены 110 пациенток, из них 37 (33,6%) с хроническим цервицитом, 31 (28,1%) с LSIL(CINI), 33 (30%) с HSIL, 9 (8,1%) с РШМ.

Всем пациенткам проводилось определение уровня экспрессии мРНК генов человека KI67, P16, CCNB1, BIRC5, CDKN2A, BCL2, BAG1, BAX, NDRG1, PTEN, ESR1, PGR, TLR7, OSM, CD68, PTGS2/COX, SCUBE2,

CTSL2. Полученные результаты исследования демонстрируют применение экспрессии мРНК генов (KI67, BCL2, ESR1, PGR) что позволяет рассматривать их в качестве диагностических и прогностических маркеров: по тяжелой степени поражения отмечается достоверное повышение уровня экспрессии маркеров пролиферации (KI67), апоптоза (BCL2) и рецепторного аппарата (ESR1, PGR) (рис. 1, 2, 3).

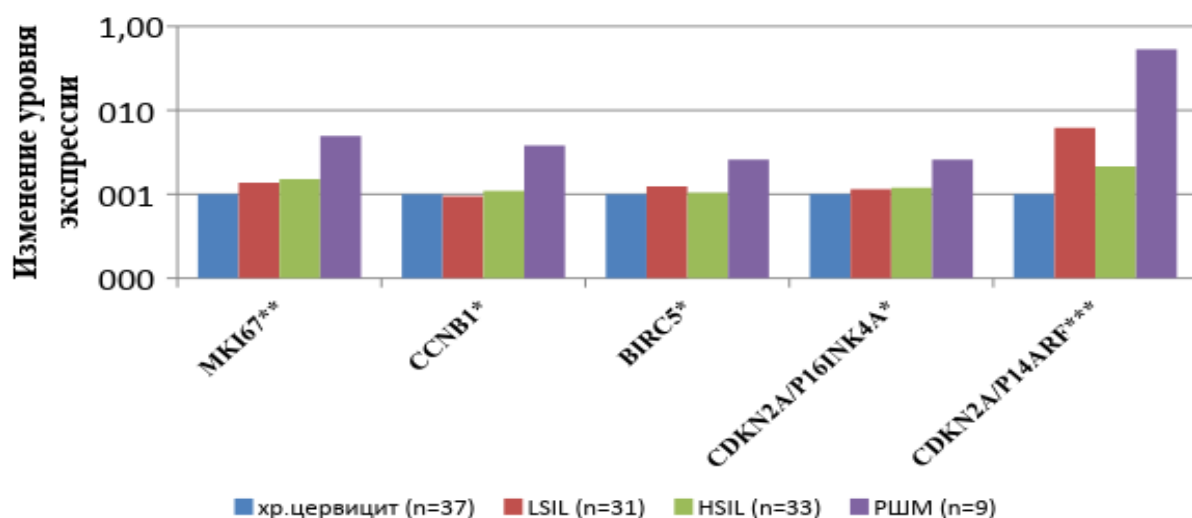


Рисунок 1. Изменение уровня экспрессии маркеров пролиферации

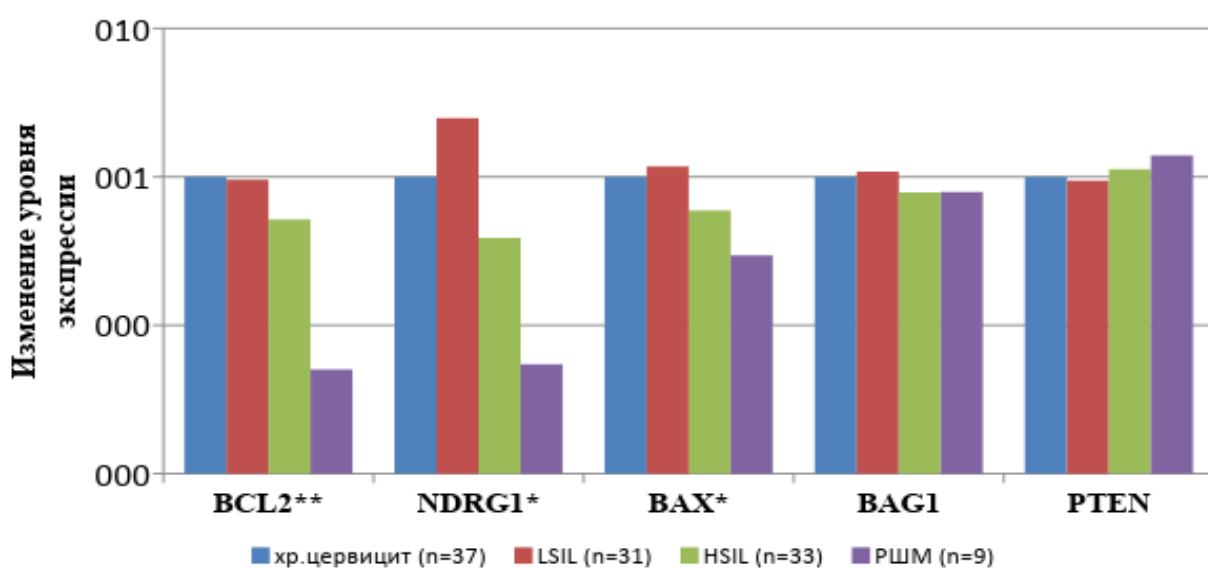


Рисунок 2. Изменения уровня экспрессии генов апоптоза

Средняя экспрессия мРНК гена ESR1 в группе с хроническим цервицитом-1,41, в группе LSIL – 1,21, в группе HSIL 0,48 и в группе РШМ 0,05. Была выявлена достоверное снижение экспрессии мрнк гена ESR1 в группах с LSIL, HSIL, РШМ ($p < 0,05$). При РШМ экспрессия мРНК гена ESR1 была в 28 раз ниже, чем при хроническом цервиците.

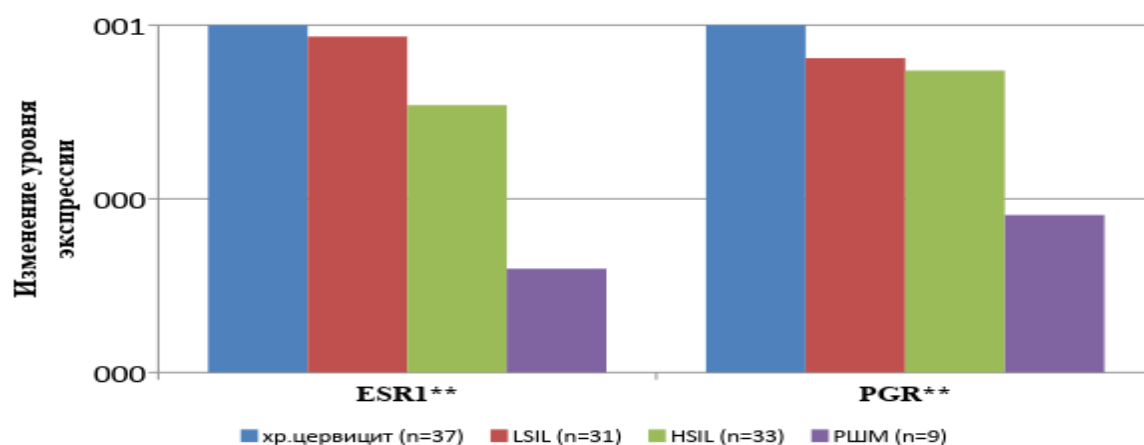


Рисунок 3. Изменение уровня экспрессии рецепторов гормонов

Средняя экспрессия маркера PGR в группе с хроническим цервицитом составила 0,24 в группе с LSIL 0,15, HSIL 0,13 и в группе с РШМ – 0,019. Достоверное снижение была выявлено в группе HSIL ($0,001$), РШМ ($p = 2,1 \times 10^{-5}$) по хроническим цервицитом. Так же при РШМ экспрессия данного маркера достоверно ниже по сравнению со 2 группой ($p = 1,1 \times 10^{-4}$) и с группой 3 ($p = 3,6 \times 10^{-4}$). Таким образом, экспрессия данного маркера снижается по мере увеличении степени тяжести поражения эпителий шейки матки. (Рис.3)

Сниженную экспрессию прогестероновых и эстрогеновых рецепторов PGR и ESR1 можно использовать в качестве диагностического маркёра при цервикальной интраэпителиальной неоплазии высокой степени тяжести, так как с нарастанием тяжести дисплазии шейки матки, происходит утрата чувствительности клеток гормона в результате исчезновения их предикторов.

Полученные различия позволили приложить к практическому применению модель интегральной(комплексной)оценки степени поражения

шейки матки, учитывающую уровень экспрессии Ki67, BCL2, ESR1, PGR а также наличие ВПЧ высокого онкогенного риска в количестве более $\times 10^3$ копии вирусов в образце.

Следующей задачей нашего исследования была возможность оценки дифференциальной диагностики ВПЧ ассоциированных поражений шейки матки с использованием измерений уровня экспрессии мРНК с использованием дискриминантного анализа. В качестве параметра дифференциальной диагностики рассматривалось наличие ВПЧ высокого онкогенного риска. В результате анализа было установлено, что наличие ВПЧ высокого онкогенного риска в количестве более 10^3 копий вируса в образце ($3 \lg$) и относительные уровни экспрессии мРНК генов MKi67, BCL2, ESR1, PGR являются наиболее информативными параметрами дифференциальной диагностики ВПЧ ассоциированных поражений шейки матки. Три канонические линейные дискриминантные функции, коэффициенты которых представлены в таблице 4, позволяют классифицировать четыре патологических состояния шейки матки:

- хронический цервицит;
- Цервикальная интраэпителиальная неоплазия лёгкой степени;
- Цервикальная интраэпителиальная неоплазия тяжелой степени;
- РШМ

Таблица 4 - Коэффициенты канонических линейных дискриминантных функций, классифицирующих патологические состояния шейки матки

маркёр	Коэффициенты канонических линейных дискриминантных функций		
	Функция 1	Функция 2	Функция 3
hr HPV >3 lg	0,047	2,291	0,125
ln MKI67	-0,318	-0,086	0,019
ln BCL2	-0,122	-0,315	0,098
ln ESR1	0,672	0,336	0,752
ln PGR	0,411	-0,266	-0,921
(Константа)	-0,423	-3,440	-1,107

В соответствии с предложенной моделью 8 из 9 пациенток с РШМ были классифицированы, как РШМ; 1 – как HSIL. Чувствительность предлагаемой модели для РШМ составила 88,9%. 1 функция наилучшим образом дискриминировала группы хр.цервицит и РШМ (рис. 4).

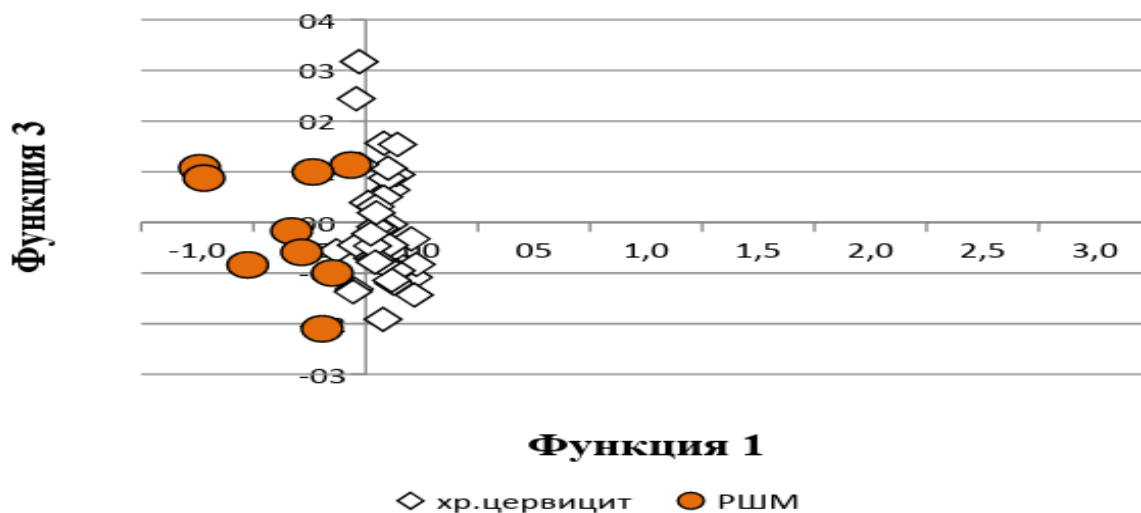


Рисунок 4. Распределение значений КЛДФ в группах хронический цервицит и РШМ.

Из 32 пациенток с HSIL 23 были классифицированы, как HSIL, 3 – как РШМ; В 5 случаях – LSIL, в 4 – хронический цервицит. Чувствительность предлагаемой модели для HSIL составила 69,7%.

27 из 37 пациенток с цервицитами были правильно определены в свою группу. Таким образом, чувствительность предлагаемой модели для хр.цервицитов составила 73%.

Вместе с тем только 11 из 31 пациентки группы LSIL были классифицированы в свою группу. При этом часть образцов (29%) классифицировались, как более тяжёлые поражения шейки матки. В то же время для 35,5% пациенток с LSIL прогноз может быть более благоприятным, связанным с регрессией патологического процесса. Чувствительность модели для LSIL составила 35,5%.

Включение в полученную модель уровня экспрессии miR-143 не привело к повышению диагностической ценности и было признано избыточным.

Таким образом, оценка уровня экспрессии мРНК генов Ki67, BCL2, ESR1, PGR может помочь в постановке более точного диагноза и дифференцировать лёгкую (LSIL) и более тяжёлую (HSIL и РШМ) степень поражения эпителия шейки матки; а также воспалительные процессы(хр.цервицит) и ВПЧ-ассоциированные заболеваний.

К практическому применению предложена модель дифференциальной диагностики четырёх патологических состояний шейки матки: хронический цервицит; цервикальная интраэпителиальная неоплазия лёгкой степени; цервикальная интраэпителиальная неоплазия тяжелой степени и РШМ, учитывающая относительные уровни экспрессии мРНК генов Ki67, BCL2, ESR1, PGR и наличие ВПЧ высокого онкогенного риска в количестве более 10^3 копий вируса в образце (3 lg).

На основании полученных результатов разработан алгоритм ведения пациенток с ВПЧ-ассоциированными заболеваниями шейки матки с учетом комплекса молекулярно-генетических предикторов(приложение). Таким образом, для оптимизации тактики ведения пациенток с ПВИ используется современные молекулярно-генетические методы (ВПЧ-генотипирование определение экспрессии мРНК и микроРНК) имеющие важное практическое значение для ранней диагностики HSIL и РШМ, а также дифференциации доброкачественного от неопластического процесса шейки матки.

Результаты работы будут способствовать определению групп повышенного риска развития CIN, профилактике рака шейки матки.

ВЫВОДЫ

1. У пациенток репродуктивного возраста, обратившихся НПО Центра, установлена высокая частота встречаемости предраковых и

доброкачественных заболеваний шейки матки ассоциированных с ВПЧ (44%).

2. Наиболее значимым фактором риска поражения эпителия шейки матки является большое число половых партнеров. Риск возникновения РШМ в 7,1 раза выше у женщин, имевших 4 половых партнера и более (OR = 7,07, 95% ДИ 1,62–30,85).

3. ВПЧ высокого канцерогенного риска (1-я группа) встречался в 88,4% случаев ВПЧ-носительства. Наиболее часто (66,1%) встречался ВПЧ группы А9.

4. Установлено значительное снижение уровня экспрессии противоонкогенных мРНК – miR-143, -145 в эпителии шейки матки у пациенток с неопластическими поражениями различной степени тяжести, при этом уровень экспрессии коррелирует друг с другом и снижается пропорционально степени тяжести поражения.

5. Наибольшей диагностической ценностью для оценки степени неопластических поражений обладает уровень экспрессии miR-143 (чувствительность – 73,3%, специфичность – 77,85%). При снижении менее порогового уровня экспрессии (0,32 у.е.) риск неопластического поражения повышается в 9,63 раза.

6. Разработана модель для дифференциальной диагностики четырех патологических состояний шейки матки: воспалительный процесс; интраэпителиальная неоплазия легкой и тяжелой степени, РШМ, – учитывающая относительные уровни экспрессии мРНК генов MKi67, BCL-2, ESR1, PGR и наличие ВПЧ высокого онкогенного риска в количестве $>10^3$ копий вируса в образце (3 lg). Чувствительность предлагаемой модели для РШМ составила 88,9%.

7. Включение в полученную модель уровня экспрессии miR-143 не привело к повышению диагностической ценности и было признано избыточным.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Генотипирование с определением типов ВПЧ высокого, вероятного и возможного канцерогенного риска целесообразно использовать в скрининге патологии шейки матки у женщин репродуктивного возраста для выявления пациенток группы высокого риска по развитию HSIL и РШМ.

2. При наличии ВПЧ высокого, вероятного канцерогенного риска и нормальных результатов цитологического исследования (NILM) целесообразно проводить оценку экспрессии противоонкогенных miR-143 с целью своевременного определения неопластического процесса и определения дальнейшей тактики.

3. Определение miR-143 и -145 при цитологическом заключении LSIL и гистологическом диагнозе LSIL (CIN I) можно рассматривать в качестве прогностического маркера, риска прогрессии неопластического процесса.

4. При наличии LSIL и ВПЧ высокого, вероятного канцерогенного риска следует определять уровень экспрессии мРНК генов Ki67, BCL-2, ESR1, PGR и рассчитывать риск развития неопластической трансформации эпителия. При выявлении риска рекомендуется сокращение сроков скрининга или проведение кольпоскопии и биопсии шейки матки (по показаниям).

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Папилломавирусная инфекция: распространенность, диагностика и лечение / Назарова Н.М., Прилепская В.Н., Суламанидзе Л.А., **Мзарелуа Г.М.**, Н.В. Бестаева // **Лечащий врач.** – 2013. – № 11. – С. 15-18.

2. Папилломавирусная инфекция. Возможности лечения и профилактики с применением инозин пранобекса / Прилепская В.Н., Новикова Е.П., Суламанидзе Л.А., **Мзарелуа Г.М.** // **Акушерство и гинекология.** – 2013. – № 10. – С. 99-103.

3. Распространенность и роль ВПЧ 52 и 58 типов в развитии CIN / Назарова Н.М., Трофимов Д.Ю., Бестаева Н.В., Бурменская О.В., Коган Е.А.,

Суламанидзе Л.А., **Мзарелуа Г.М.** // Материалы VIII Международного конгресса по репродуктивной медицине. – Москва, 2014. – С. 109.

4. Роль ВПЧ 52 и 58 типов в развитии генитальной неоплазии / Н.М. Назарова, Д.Ю. Трофимов, Н.В. Бестаева, О.В. Бурменская, Е.А. Коган, Л.А. Суламанидзе, **Мзарелуа Г.М.** // Материалы VIII Международного конгресса по репродуктивной медицине. – Москва, 2014. – С.260-261.

5. Прогнозирование риска развития и прогрессирования цервикальных интраэпителиальных неоплазии, ассоциированных папилломавирусной инфекцией/ Бурменская О.В., Назарова Н.М., Прилепская В.Н., **Мзарелуа Г.М.**, Бестаева Н.В., Трофимов Д.Ю., Сухих Г.Т.// **Акушерство и гинекология.** - 2016.-№2.-С.92-98.

6. Папилломавирусная инфекция: распространенность, диагностика и лечение/ Назарова Н.М., Прилепская В.Н., Суламанидзе Л.А., **Мзарелуа Г.М.**, Бестаева Н.В.// **Лечащий врач.** - 2013.- №11. – С.15.

7. Современные возможности диагностики и прогнозирования ВПЧ-ассоциированных заболеваний шейки матки / Назарова Н.М., Бурменская О.В., **Мзарелуа Г.М.** // Человек и лекарство: матер. XXII рос. нац. конгресса. – Москва, 2016.

8. Экспрессия миРНК-29 в эпителий шейки матки при цервикальных интраэпителиальных неоплазиях / Файзуллин Л.З., Карнаухов В.Н., Байрамова Г.Р., Чернова В.Ф., **Мзарелуа Г.М.**, Назарова Н.М., Трофимов Д.Ю., // **Акушерство и гинекология.**-2016.-№2.-С. 87-90.

9. ВПЧ-ассоциированные заболевания шейки матки-новое в диагностике / Прилепская В.Н., Назарова Н.М., **Мзарелуа Г.М.**, Файзуллин Л.З., Трофимов Д.Ю.// **Акушерство и гинекология.**-2015.-№9.-С.

10. Экспрессия миРНК при цервикальных интраэпителиальной неоплазии и раке шейки матки/ Файзуллин Л.З., Карнаухов В.Н., **Мзарелуа Г.М.**, Чернова В.Ф.// **Акушерство и гинекология.**-2015.-№9.-С. 27-32.

11. Распространённость типов ВПЧ у пациенток с цервикальными интраэпителиальными неоплазиями различной степени тяжести / **Мзарелуа Г.М.**, Назарова Н.М., Некрасова М.Е., Сычева Е.Г., Бурменская О.В., Стародубцева Н.Л., Асатурова А.В., Хабас Г.Н., Павлович С.В.// **Акушерство и гинекология.** - 2018.-№4.-С. 94-100.

12. Дифференциальная диагностика цервикальных интраэпителиальных неоплазии различной степени тяжести на основании количественной оценки экспрессии противоонкогенных микрорнк/Карнаухов В.Н., Файзуллин Л.З., Назарова Н.М., Мзарелуа Г.М., Байрамова Г.Р., Чернова В.Ф., Файзуллин А.Л., Казаченко А.В., Трофимов Д.Ю., Прилепская В.Н., Сухих Г.Т. // **Акушерство и гинекология.**-2017.-№3.-С. 82-88.

13. Диагностика плоскоклеточных интраэпителиальных поражении и рака шейки матки на основании количественной оценки экспрессии микрорнк/ Чернова В.Ф., Карнаухов В.Н., Байрамова Г.Р., Коган Е.А., Мзарелуа Г.М., Казаченко А.В., Трофимов Д.Ю., Прилепская В.Н., Сухих Г.Т.// **Акушерство и гинекология.**-2017. - №9.-С. 78-84.

14. mRNA expression of genes KI67, p16, PGR and BCL2 as markers of increased risk of neoplastic transformation with HPV-associated cervical disease/ Prilepskaya V.N., Nazarova N.M., Trofimov D.Y., Bourmenskaya O.V., **Mzarelua G.M.**, Sukhikh G.T., Sulamanidze L.A.// Eurogin 2015. – Spain, Sevilla, 2015. – P. 193.