

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

На правах рукописи

МЗАРЕЛУА

Гуранда Мерабовна

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

14.01.01 – акушерство и гинекология

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

**Научные руководители:
доктор медицинских наук
Назарова Н.М.
доктор биологических наук,
профессор РАН
Трофимов Д.Ю.**

Москва – 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	3
Глава 1. Прогностические маркеры предраковых заболеваний шейки матки (обзор литературы)	10
Глава 2. Материал и методы исследования	24
Глава 3. Результаты собственных исследований	40
3.1. Клиническая характеристика обследуемых женщин	40
3.2. Результаты ВПЧ-типирования	52
3.3. Результаты экспрессии миРНК	59
3.4. Результаты экспрессии мРНК	72
Глава 4. Обсуждение результатов исследования	90
Выводы	96
Практические рекомендации	98
Список сокращений	100
Список литературы	101

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Заболевания, ассоциированные с вирусом папилломы человека (ВПЧ), являются важной проблемой здравоохранения. Их распространенность среди населения достигает 80%. Заболеваемость папилломавирусной инфекцией (ПВИ) значительно увеличилась за последние 35 лет [13]. Важное место в структуре заболеваний шейки матки, ассоциированных с ВПЧ, занимают цервикальные интраэпителиальные неоплазии (CIN), которые нередко приводят к развитию РШМ. Несмотря на современные методы лечения предраковых заболеваний, ассоциированных с ВПЧ, риск развития рака шейки матки (РШМ) остается высоким. Ежегодно в мире диагностируется 569 847 новых случаев рака шейки матки, который является вторым наиболее распространенным раком у женщин в возрасте от 15 до 44 лет [49].

Согласно данным литературы, после инфицирования ВПЧ HSIL (CIN II/III) развивается уже через 3 года у 27% женщин [36]. Частота CIN в структуре патологии шейки матки у женщин репродуктивного возраста составляет 17–20% [25]. На этих стадиях цервикального канцерогенеза возможно неосложненное органосохраняющее лечение в объеме конизации шейки матки с сохранением фертильности. Однако результаты исследования A. Del Mistro, M. Matteucci и D. Minucci (2015) показали, что после проведенного лечения CIN II/III рецидивы отмечаются в 9% случаев.

Рядом авторов указано на опасность недооценки степени тяжести поражения шейки матки в цитологических мазках при наличии более тяжелых поражений у больных. Так, среди пациенток с LSIL в 26% случаев выявлена CIN II и в 5% – CIN III, учитывая различную тактику ведения, в частности выжидательную при LSIL [11].

В настоящее время наиболее изучены типы ВПЧ, связанные с развитием CIN и РШМ, главным образом ВПЧ 16-го и 18-го типов [4]. В связи с этим большой научный интерес представляет изучение частоты встречаемости ВПЧ высокого, а также вероятного и возможного канцерогенного риска у пациенток с CIN различной степени тяжести и раком шейки матки.

Для ранней диагностики, прогнозирования течения неопластических процессов изучаются различные молекулярно-генетических маркеров, в их числе ВПЧ-генотипирование, определение экспрессии малых декодирующих молекул рибонуклеиновой кислоты (миРНК, miR) и матричной РНК (мРНК) генов человека [54]. Проведенные исследования показали, что миРНК функционирует в качестве важного компонента естественной защиты клетки от вирусной инфекции [52, 65, 68]. В настоящее время известны физиологические функции и гены-мишени миРНК [66], однако их роль в прогнозировании течения неопластических процессов и рака шейки матки еще не изучена и представляет большой интерес с научной и практической точки зрения. Известно, что миРНК принимают участие в процессах дифференцировки, клеточной пролиферации, апоптозе, морфогенезе, противовирусной защите и онкогенезе, в связи с чем предполагается специфическая роль самих миРНК в патогенезе РШМ [4, 73]. 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 процесса [64].

Степень разработанности темы исследования

В настоящее время данные по исследованию комплекса молекулярно-генетических маркеров при ВПЧ-ассоциированных заболеваниях шейки матки для точной дифференциальной диагностики степени тяжести поражения и раннего выявления рака шейки матки отсутствуют. В этой связи чрезвычайно актуальным является изучение и оценка различий уровня экспрессии миРНК и мРНК генов при неопластических поражениях различной степени тяжести и

раке шейки матки, ассоциированных с вирусом папилломы человека и создание панели молекулярных предикторов для точной дифференциальной диагностики степени тяжести поражения, а также выявления группы риска развития РШМ, что позволит усовершенствовать алгоритмы обследования и ведения пациенток с ВПЧ-ассоциированными заболеваниями шейки матки.

Цель исследования

Разработка тактики введения и мониторинга пациенток с интраэпителиальными неоплазиями различной степени тяжести с учетом 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

Проведен 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.

Теоретическая и практическая значимость работы

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

В соответствии с заданными критериями включения и исключения в одномоментное проспективное исследование были включены 167 пациенток. В зависимости от результатов гистологического исследования биоптатов шейки матки было сформировано 4 группы: хронический цервицит в сочетании с ВПЧ (n=31), LSIL (CIN1) (n=31), HSIL (n=37) и РШМ (n=14), группа сравнения - цитологическое заключение NILM (n=54). В работе применяли общеклинические и специальные методы исследования. К специальным методам относились молекулярно-генетические методы – определение уровня экспрессии четырех противоонкогенных миРНК (miR-143, -145, -199 и -122) и мРНК 18 генов в соскобах эпителия шейки матки при неоплазии низкой, и высокой степени (LSIL, HSIL) и РШМ.

Также был проведен ретроспективный анализ гистологического диагноза проведенных биопсий шейки матки (по показаниям) у 429 пациенток с аномальными результатами цитологии, наличием ВПЧ ВР и слабовыраженными и выраженными изменениями при кольпоскопии за период 2015 год. Оценивалась частота встречаемости предраковых и доброкачественных заболеваний шейки матки ассоциированных и не ассоциированных с ВПЧ.

Все пациентки подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании. Исследование было одобрено экспертной комиссией ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И.Кулакова» Минздрава России по вопросам медицинской этики.

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.

Личный вклад автора

Автор участвовал в выборе направления исследования, формировании ее дизайна, цели, постановке задач исследования, клинико-лабораторном обследовании, сборе биологического материала и лечении пациенток, а также в проведении анализа медицинской документации, статистической обработке и научном обобщении и интерпретации 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 специальности «акушерство и гинекология».

Степень достоверности полученных результатов

Достоверность полученных результатов достигнута за счет математической обработки материала параметрическими (t-критерий Стьюдента, применяемый при нормальном виде распределения данных для оценки межгрупповых различий) и непараметрическими методами (U-критерий Манна-Уитни для двух групп). Для оценки достоверности межгрупповых различий качественных показателей использовался критерий Хи-квадрат с поправкой на непрерывность. Статистически значимыми считались различия при $p < 0,05$ (95%-й уровень значимости).

Апробация диссертации

Основные положения диссертации и результаты работы представлены на VIII Международном конгрессе по репродуктивной медицине (Москва, 20–23 января 2014 г.), XX Юбилейном Всероссийском конгрессе с международным участием «Амбулаторно-поликлиническая помощь в эпицентре женского здоровья» (Москва, 18–21 марта 2014 г.), Eurogin 2015 (Испания, 4–7 февраля 2015 г.), XXI Всероссийском конгрессе с международным участием

«Амбулаторно-поликлиническая помощь: от менархе до менопаузы» (Москва, 3–6 марта 2015 г.), «Exploring new worlds in research HPV 2015 30th International Papillomavirus Conference & Clinical and Public Health» (Португалия, 17–21 сентября 2015 г.), XXVIII Международном конгрессе с курсом эндоскопии «Новые технологии в диагностике и лечении гинекологических заболеваний» (Москва, 9–12 июня 2015 г.).

Диссертационная работа обсуждалась на межклинической конференции научно-поликлинического отделения (20.12.2017) и заседании апробационной комиссии ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России (18.06.2018).

Внедрение результатов исследования в практику

Результаты исследования внедрены и используются в практической деятельности научно-поликлинического отделения ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России. Материалы и результаты исследования применяются в учебном процессе в качестве лекций и практических занятий для клинических ординаторов и аспирантов, а также используются в виде лекционного материала на научных форумах, симпозиумах, конференциях, семинарах.

По теме диссертации опубликовано 14 научных работ, 8 из них – в рецензируемых научных журналах, рекомендованных высшей аттестационной комиссией (ВАК).

Структура и объем диссертации

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

ГЛАВА 1. ПРОГНОСТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ПРЕДРАКОВЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ШЕЙКИ МАТКИ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

По результатам исследования Центров по контролю и профилактике заболеваний США (*англ.* Centers for Disease Control and Prevention, CDC, 2004–2008 гг.), каждый год регистрируется примерно 33 300 случаев ВПЧ-ассоциированного рака [4, 26, 28, 41]. Ежегодно диагностируется 21 300 случаев ВПЧ-ассоциированного рака среди женщин, и около 12 100 – среди мужчин. Рак шейки матки является наиболее распространенной формой ВПЧ-ассоциированного рака у женщин. В мире ежегодно регистрируются 470 000 новых случаев РШМ, 233 000 из которых заканчиваются смертельным исходом [26, 28, 41]. Так, в США в 2012 г. зарегистрировано 12 340 новых случаев РШМ, в мире – 528 000, а в России – 15 051 случай [28]. РШМ является четвертой наиболее распространенной формой рака у женщин и седьмой в целом. В 2013 г. в США зарегистрировано 12 340 новых случаев РШМ и около 4030 женщин умерло от него [25, 28]. Заболеваемость РШМ в странах Европы различна, так, в странах восточной Европы она в 2–5 раз выше, чем в первоначальных 15 государствах Европейского Союза [37]. Эти различия в значительной степени обусловлены наличием или отсутствием программ профилактики РШМ в стране. Также отсутствие эффективных моделей прогнозирования исхода РШМ делает затруднительным определение индивидуальных протоколов лечения пациенток.

Активное внедрение новых скрининговых программ с целью профилактики РШМ не оказало существенного влияния на снижение частоты встречаемости данного заболевания, которое продолжает занимать третье место среди злокачественных опухолей репродуктивной системы у женщин. По данным Кроме того, в последнее время обозначилась тенденция роста заболеваемости РШМ у женщин в возрастной группе до 30 лет [17].

Значительная вариабельность заболеваемости и смертности от РШМ отмечается не только в различных странах мира, но и в различных регионах одной и той же страны [44].

Большой интерес представляет изучение частоты встречаемости типов ВПЧ у пациенток с цервикальной интраэпителиальной неоплазией различной степени тяжести и РШМ в сравнительном аспекте.

Патогенез предраковых заболеваний и рака шейки матки

Известно более 100 типов вируса папилломы человека, из них более 60 поражают генитальную область [17, 34]. На основании фенотипической связи с развитием предраковых поражений и рака среди них выделяют типы высокого (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 и 82) и низкого (6, 11, 40, 42, 43, 44, 53, 54, 61, 70, 72, 81 и 89) риска [10, 17]. ВПЧ 26-го и 66-го типа рассматриваются как возможно высокого риска.

В последние годы предприняты попытки построения классификации на базе полногеномных сиквенсов (табл. 1) с учетом структуры 6 генов: E6, E7, E1, E2, L2 и L1 [13, 87]. Согласно этим данным, выделяют 3 филогенетических группы: 1) низкого онкогенного риска 1 ($\alpha 1$, $\alpha 8$, $\alpha 10$ и $\alpha 13$); 2) низкого онкогенного риска 2 ($\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$ и $\alpha 15$); 3) высокого онкогенного риска ($\alpha 5$, $\alpha 6$, $\alpha 7$, $\alpha 9$ и $\alpha 11$).

Таблица 1. Классификация вирусов папилломы человека на базе полногеномных сиквенсов

α-группа	Тип
α1	32, 42
α2	28, 3, 10, 94, 78, 29, 77
α3	61, 72, 81, 83, 102, 89, 84, 86, 87, 62
α4	57, 2, 27
α5	26, 69, 51, 82
α6	30, 53, 56, 66
α7	59, 18, 45, 97, 85, 70, 39, 68
α8	91, 43, 7, 40
α9	52, 67, 33, 58, 16, 35, 31
α10	6, 11, 13, 74, 44
α11	34, 73
α13	54
α15	71, 90, 106

В настоящее время наиболее изучены типы ВПЧ, связанные с развитием CIN и РШМ, главным образом ВПЧ 16-го и 18-го типов. Согласно данным литературы, ВПЧ 16-го типа обнаруживается примерно у 50% пациенток с CIN [2, 5, 9].

ВПЧ-инфицирование начинается с внедрения вирусных частиц в недифференцированные базальные эпителиальные клетки через ссадины или раны. Амплификация в нехромосомной вирусной ДНК и экспрессия капсидных белков происходят последовательно в средних и верхних шиповатых и поверхностных клетках. Стойкое активное заражение ВПЧ высокого риска (ВПЧ ВР) может привести к аномальному увеличению глубины пролиферативной активности в многослойном плоском эпителии шейки матки, т.е. к CIN I, II или III степени тяжести [7, 14].

Гистологически зона аномально пролиферирующих клеток при CIN I ограничена по глубине 1/3 эпителия. CIN II и III отличаются проникновением в более глубокие слои эпителия: на 2/3 его глубины (CIN II) и глубже (CIN III). CIN III может проникать на всю глубину эпителия и определяться как РШМ *in situ*. CIN II и III развиваются у 10–20% женщин с CIN I. Когда неоплазия проникает в подлежащую строму, CIN III превращается в инвазивный РШМ [40, 59].

С 1988 г. для интерпретации результатов цитологического исследования используется классификация Бетесда (TBS – Terminology Bethesda System). На основе консенсуса 2013 г. ASCCP (*англ.* American Society for Colposcopy and Cervical Pathology – Американское общество кольпоскопии и патологии шейки матки) рассматривает вопрос об изменении в классификации CIN с трех- на двухступенчатую (LSIL/HSIL) [7].

Патогенетической основой вирусиндуцированного онкогенеза является интеграция вирусной ДНК в хромосому инфицированных клеток с активным синтезом онкобелков E6 и E7, которые нарушают нормальный процесс дифференцировки клеток [25]. Два вирусных онкобелка – E6 и E7, – продуцируемые ВПЧ ВР, дестабилизируют, соответственно, два основных клеточных белка-супрессора опухолей: p53 и белок ретинобластомы (Rb). Установлено, что ген E6 вызывает деградацию белков-супрессоров генов p53 и ВАХ, предотвращение апоптоза, нарушение механизмов поврежденной ДНК, предотвращение деградации тирозинкиназы, активацию теломеразы и подавление выработки интерферона. E7 взаимодействует с продуктами гена-супрессора Rb105 и способствует высвобождению транскрипционного фактора E2F, стимуляции клеточной пролиферации, синтезу p16INK4a. Оба вирусных белка функционируют в продуктивную фазу инфекции в постмитотических дифференцированных шиповатых клетках, однако вторичное повышение экспрессии E6 и E7 в недифференцированных базальных или стволовых клетках нарушает регуляцию клеточного цикла, подавляет клеточную дифференцировку, вызывает повреждения хромосом и предотвращает апоптоз, в результате чего

клетки иммортализируются и преобразуются в клетки РШМ [27]. Итак, экспрессия ВПЧ высокого риска онкобелков Е6 и Е7 последовательно приводит к РШМ [83].

Диагностика предраковых заболеваний и рака шейки матки

Введение в практику мазка с шейки матки на онкоцитологию по Папаниколау (Пап-тест), разработанного Джорджем Папаниколау в 20-х годах XX в., значительно снизило уровень заболеваемости РШМ [3, 15]. Однако ограничения, связанные с точностью метода и выявлением особенностей каждого отдельного случая, привели к необходимости поиска особых биомаркеров дисплазии клеток плоского и железистого эпителия шейки матки. Ученые надеются, что эти биомаркеры можно будет использовать вместе с обычными массовыми обследованиями женщин с целью профилактики злокачественных заболеваний шейки матки, обусловленных ВПЧ-инфекцией.

Принцип скрининга РШМ базируется также на обнаружении персистенции ВПЧ, что впервые было описано С.J.Meijer и соавт. в 1992 г. [43]. Распространенность ВПЧ коррелирует с увеличением частоты CIN. Результаты исследований показали, что неопластические процессы шейки матки всегда связаны с длительной персистенцией ВПЧ ВР, в связи с чем был предложен скрининг РШМ, основанный на обнаружении ВПЧ [34, 40, 41]. Убедительные доказательства прогностической ценности определения ВПЧ были представлены в результатах 10-летнего исследования с участием 20 810 женщин. По результатам исследования CIN III+ выявлены у 17,2% женщин с наличием ВПЧ 16-го типа, у 13,6% с ВПЧ 18-го типа (отрицательных на ВПЧ типа 16) и только у 0,8% ВПЧ-отрицательных обследуемых [34].

N.Murphy и соавт. в 2005 г. исследовали 3 потенциальных биомаркера CIN: p16 (INK4A), CDC6 и MCM5 [82]. Самым надежным из них оказался p16 (INK4A), уровни экспрессии которого изменялись при всех видах плоскоклеточных и железистых поражений шейки матки и были тесно связаны с высоким риском ВПЧ-инфекции. Однако неспособность p16 (INK4A) к избирательному выявлению CIN III и данные о его гиперэкспрессии в

доброкачественных железистых образованиях, таких как метаплазия эндометрия, могут снизить его возможности в качестве дифференциального маркера прогнозирования и развития дисплазии шейки матки и РШМ.

Результаты исследования p16 (INK4A) R. Klaes и соавт. показали, что использование данного биомаркера для диагностики CIN может значительно снизить количество сомнительных цитологических мазков при скрининге и помочь в постановке диагноза и оценке прогноза течения ВПЧ-инфекции [80]. Вместе с тем в отечественной литературе существуют только единичные работы по изучению особенности маркера в клетках РШМ и совсем нет работ, отражающих его уровень при разных стадиях CIN в комплексе с другими молекулярными маркерами, что могло бы явиться основой для возможного применения его в качестве предиктора малигнизации.

Для диагностики и прогнозирования течения ВПЧ-инфекции и неопластических процессов изучаются различные молекулярно-генетические маркеры, в том числе и миРНК, которые могут иметь важное клиническое значение. Проведенные исследования показали, что миРНК функционирует в качестве важного компонента естественной защиты клетки от вирусной инфекции. В настоящее время известны физиологические функции и гены-мишени миРНК, однако их роль в прогнозировании течения неопластических процессов шейки матки и РШМ изучена не до конца и представляет большой интерес с научной и практической точки зрения.

МиРНК (miR)

МиРНК была впервые открыта в 1993 г. у нематоды *Caenorhabditis elegans* и охарактеризована как малая некодирующая РНК-молекула, регулирующая белковую экспрессию гена *lin-14* [47, 51, 92]. А несколько лет спустя в *C. elegans* была обнаружена вторая миРНК (*let-7*) [51, 65, 92].

Эти два открытия миРНК побудили ученых продолжать исследования по открытию новых миРНК, и вскоре появился большой класс малых некодирующих РНК с разнообразным спектром биологических функций, таких

как периодическая регуляция развития, пролиферация и гибель клеток, гематопоз и канцерогенез [55].

МиРНК представляют собой 22–25-нуклеотидные некодирующие РНК, контролирующие экспрессию генов у многоклеточных животных, растений, вирусов и бактерий, как правило на транскрипционном и посттранскрипционном уровне. До настоящего времени были обнаружены и изучены более 700 миРНК. Анализ данных литературы показал, что миРНК регулируют процесс канцерогенеза. Предполагается, что они играют важную роль в биологии стволовых клеток, ангиогенезе, эпителиально-мезенхимальной трансформации и метастазировании. МиРНК продемонстрировали свой потенциал в качестве диагностических опухолевых маркеров достаточно давно, когда было показано, что их профили коррелируют с опухолями эмбрионального происхождения [64].

В различных моделях профили экспрессии миРНК авторы связывали с клиническим исходом за счет их способности модулировать такие процессы, как прогрессирование опухоли и ее метастазирование. Методы количественного определения миРНК, такие как гибридизация *in situ* или ПЦР в режиме реального времени, могут позволить использовать миРНК в качестве диагностических и прогностических маркеров онкологических заболеваний [56].

МиРНК в патогенезе и диагностике рака

Развитие рака связано с комбинированным действием опухолевых супрессоров и индукторов. МиРНК может рассматриваться в качестве нового класса онкогенов и генов-супрессоров опухолей. При повышенной экспрессии в опухолях миРНК, как полагают, функционируют как онкогены и называются онко-миРНК. Эти миРНК подавляют гены-супрессоры опухолевого роста, которые контролируют дифференцировку клеток или апоптоз и тем самым способствуют развитию опухоли. Другие миРНК проявляют сниженную экспрессию в раковых клетках и рассматриваются как гены-супрессоры опухолей [58, 69].

Выявление миРНК, уровни экспрессии которых различаются в опухолевых и нормальных тканях, может помочь идентифицировать те миРНК, которые

вовлечены в онкогенез у человека, и далее определить миРНК, способные играть роль диагностических биомаркеров рака. Например, при раке молочной железы уровни экспрессии некоторых миРНК, таких как miR-125b, -145, -21 и -155, были значительно снижены в опухолевых тканях молочной железы по сравнению с нормальными тканями [45, 54]. При раке молочной железы нарушения регуляции miR-145 и -121 были связаны с прогрессированием опухолевого процесса, в то время как экспрессия let-7 была связана с повышением риска метастазирования в лимфатические узлы и указывала на потенциальную роль этой миРНК в качестве диагностического биомаркера. miR-155 и -21 также были предложены в качестве биомаркеров для диагностики немелкоклеточного рака легких [46, 47, 51]. Колоректальная неоплазия (рак толстой кишки) также связана с изменением экспрессии миРНК. Около 28 различных миРНК были обнаружены при аденокарциноме толстого кишечника и в нормальной слизистой оболочке. Значимым явилось последовательное снижение экспрессии двух миРНК (miR-143 и -145), что наблюдалось на аденоматозной и раковой стадиях колоректальной неоплазии [45, 50, 52, 80]. Профили экспрессии миРНК значительно отличаются при различных типах опухолей, что указывает на их диагностический и прогностический потенциал [51].

Изначально миРНК связывали с онкогенезом из-за их очевидной близости к точечным разрывам в хромосоме и неуправляемыми уровнями их выделения при многих злокачественных опухолях [46, 48]. Таким образом, открытие новых миРНК сможет изменить картину генетики рака. Различные миРНК могут быть связаны с различными видами опухолей, служить фенотипическими признаками различных стадий рака и применяться в его диагностике и лечении, при прогнозировании рака и предраковых процессов.

Методы анализа миРНК

Основные методы, в настоящее время используемые для анализа миРНК, – это секвенирование, микроматричный анализ и подход, основанный на ПЦР в режиме реального времени. Материал, используемый для этих исследований, представляет собой свежемороженые образцы, требующие особых условий

хранения, а также фиксированные в формалине и залитые парафином (ФФЗП) образцы. Благодаря указанным методам сохранения опухолевой ткани эти образцы стали доступны для изучения. Как правило, ткани состоят из клеток разных типов, каждый из которых обладает определенным профилем генной экспрессии. Для чистоты эксперимента при профилировании гетерогенных образцов опухоли следует рассортировать клеточные линии опухоли и отдельные клеточные типы, которые могут присутствовать в образце опухоли, или определять клеточную локализацию миРНК методом гибридизации *in situ*.

Роль миРНК в прогнозировании неопластических процессов шейки матки

Несмотря на то что характеристика экспрессии миРНК использовалась для прогнозирования исходов нескольких видов рака, таких как рак легких и молочной железы, на сегодняшний день зарегистрировано небольшое число исследований применения миРНК в прогнозе предрака и РШМ. Специфическим препятствием при исследовании биомаркеров РШМ является отсутствие большого объема опухолевых тканей, так как большинство цервикальных биоптатов имеют малый размер. Кроме того, большинство препаратов РШМ хранятся в виде ФФЗП, что приводит к серьезной деградации РНК в опухолевых клетках. Эти моменты представляют собой важную проблему для анализа профилирования экспрессии миРНК. Для ее решения разработан новый метод анализа профилирования экспрессии миРНК на основе ПЦР, который, как было показано, превосходит по чувствительности и специфичности традиционные методы профилирования [55]. Этот новый метод также успешно применяется для профилирования незначительного количества клинических образцов РНК очень низкого качества [55]. В проведенном исследовании данный метод был применен для профилирования миРНК ФФЗП-образцов РШМ с целью идентификации свойств миРНК, пригодных для прогнозирования выживаемости при РШМ. Кроме того, прогностическая ценность миРНК при РШМ была подтверждена при исследовании контрольных ФФЗП и быстрозамороженных образцов. Интересно, что новый метод прогнозирования на основе миРНК был

полностью подтвержден, несмотря на разницу в методе хранения ткани (ФФЗП и быстрозамороженные образцы). Это указывает на то, что миРНК являются прогностическими биомаркерами РШМ. Данный метод представляется новой стратегией выявления пациенток с высоким риском неблагоприятного исхода РШМ и открывает путь к индивидуальному подходу в их лечении.

Проведенные исследования показали, что miR-200a, вероятно, выступает в качестве ведущего регулятора нескольких онкогенов, что имеет решающее значение для борьбы с РШМ [67]. Это предположение подтверждают также результаты недавних исследований, согласно которым миРНК семейства miR-200 могут препятствовать эпителиально-мезенхимальному переходу (рассматриваемому в качестве важного шага, инициирующего метастазирование опухоли), непосредственно воздействуя на E-кадгерин-транскрипционные репрессоры ZEB1 и ZEB2 [56, 64, 67]. Интересно, что и ZEB1, и ZEB2 были выявлены как гены, подавляемые miR-200a. Кроме ZEB1 и ZEB2 были определены и другие гены-мишени miR-200a, которые участвуют в процессе метастазирования РШМ. Для примера, трансформирующий фактор роста $\beta 2$ продемонстрировал поддержку метастазирования разнообразных видов рака; EХОС5 (компонент 5 экзоцистового комплекса) участвует в системе ремоделирования актинового цитоскелета и играет важную роль в биогенезе полярности поверхности эпителиальной клетки [60, 67, 106]. Данное исследование также показало, что miR-200a может одновременно влиять на разнообразные гены-мишени, которые обуславливают метастатический потенциал клеток РШМ. Таким образом, miR-200a может потенциально выступать в качестве базового супрессора метастазирования РШМ. Так, при гиперэкспрессии miR-200a подвижность клеток РШМ была значительно снижена. Таким образом, одной из потенциальных стратегий противоопухолевого лечения могут быть манипуляции с экспрессией miR-200a. С учетом результатов данного исследования разумно ожидать, что введение miR-200a может быть новой перспективной стратегией лечения РШМ. Аналогичные исследования, проведенные ранее, показали, что введение с

терапевтической целью miR-26a и -31 может подавлять опухолевый процесс при раке печени и раке молочной железы соответственно [46].

В.Н. Li и соавт. исследовали роль miR-100 в цервикальном канцерогенезе [91]. Авторы определяли экспрессию miR-100 и белка PLK1 в 125 образцах тканей шейки матки у пациенток с CIN и РШМ. Результаты исследования показали, что miR-100 участвует в цервикальном канцерогенезе, по крайней мере частично, за счет снижения торможения в гене-мишени белка PLK1. Экспрессия белка PLK1 отрицательно коррелировала с экспрессией miR-100 у пациенток с CIN III, в то время как вирусные онкобелки E6/E7 не оказывали прямого влияния на регуляцию и экспрессию миРНК. Таким образом, экспрессия miR-100 влияет на клеточную пролиферацию, апоптоз и уровень белка PLK1 у пациенток с CIN [82, 84].

В ряде исследований были получены противоречивые результаты: оба вирусных онкобелка (E6 и E7) изменяли экспрессию miR-92, но для сверхэкспрессии miR-25 достаточно одного онкобелка E7 [84, 87]. Анализ проведенных исследований показал, что miR-25, -27, -92a и -378 являются онкогенными, а miR-16, -22, -29, -100 – подавляющими опухолевый процесс, так как изменение их экспрессии происходит под влиянием белков p53, E2F и c-Мус [32].

В медицинском центре по исследованию рака ученые, используя анализ последовательности хромосом (array analysis), провели сравнительную оценку профилей миРНК кератиноцитов влагалища у пациенток с ВПЧ-инфекцией [77]. При наличии ВПЧ высокоонкогенных типов отмечалось изменение профилей экспрессии ряда миРНК. Путем использования нозерн-блоттинга авторы подтвердили нарушение экспрессии miR-16, -25, -22 и -29 в кератиноцитах влагалища у пациенток с ВПЧ ВР. Пороговое значение на уровне 1,5 miR-25, -22, -92a и -29a позволило рассматривать их в качестве диагностического маркера CIN различной степени тяжести и РШМ [77].

миРНК могут выступать как в качестве онкогена, так и онкоподавителя и могут рассматриваться как биомаркеры для ранней диагностики предраковых

заболеваний и рака [56, 64]. Ряд исследователей предполагают, что miR-9, -127, -145, -146a, -199a, -200a и -886-5p дизрегулируются при ВПЧ-ассоциированных заболеваниях шейки матки (CIN, РШМ) [78, 98, 106, 108]. Кроме того, у 171 пациентки с CIN было выявлено снижение экспрессии miR-218 по сравнению с контрольной группой (отсутствие ВПЧ). Повышенная экспрессия miR-375 способствовала подавлению пролиферативной активности клеток и последующему переходу опухоли в стадию *in situ* [64]. J.H. Li и соавт. пришли к выводу, что повышенная экспрессия miR-5p связана со снижением экспрессии белка VAX, апоптозом и усиленной пролиферацией атипических клеток у пациенток с персистенцией ВПЧ 16-го типа [62]. Подавление экспрессии miR-886-5 связано с повышением экспрессии VAX и усилением апоптоза. Повышение экспрессии miR-127 у 31 пациентки с РШМ на ранней стадии связывали с метастазированием в лимфатические узлы ($p = 0,006$) [54, 71].

X. Hu и J.K. Schwarz проанализировали 102 случая РШМ и пришли к выводу, что miR-200a и -9 связаны с выздоровлением [27]. Эти миРНК были использованы для построения модели логистической регрессии для предсказания исхода лечения. Лабораторные исследования показали, что трансфекция miR-200a в клетки HELA способствовала регуляции некоторых генов, связанных с метастазированием, таких как E-кадгерин-транскрипционные репрессоры ZEB1 и ZEB2 [21, 108]. Эти данные подкрепляются результатами других исследований, согласно которым миРНК семейства miR-200 могут блокировать перемещение и миграцию раковых клеток и распространение метастазов опухоли [98, 106].

Для определения роли нарушения экспрессии миРНК в патогенезе РШМ был проведен микроматричный анализ 924 тестовых образцов миРНК из биоптатов РШМ и прилежащих здоровых тканей у 13 пациенток [84]. В ходе SAM-анализа было выявлено достоверное повышение экспрессии miR-18 и значительное снижение экспрессии miR-19 (FDR (*англ.* false discovery rate – ожидаемая доля ложных отклонений) = 0,0159). Результаты исследования продемонстрировали, что экспрессия этих миРНК не связана с метастазированием в лимфатические

узлы (FDR = 0,529), инвазией сосудов (FDR = 0,371) и гистологической дифференцировкой опухоли (FDR = 0,163).

Таким образом, анализ данных литературы позволил нам выделить следующие миРНК, которые дизрегулируются при ВПЧ-ассоциированных заболеваниях шейки матки (CIN, РШМ): miR-22, -27a, -29a, -100, -25, -92a, -378, -16, -141, -143, -145, -122, -199a, -504. Однако для определения роли нарушения экспрессии миРНК в патогенезе ВПЧ-ассоциированных заболеваний шейки матки необходимы дальнейшие исследования с увеличением статистической выборки, которые помогут идентифицировать миРНК, непосредственно ассоциированные с неопластическими процессами и РШМ, и приведут к разработке новых подходов к ранней диагностике, прогнозированию течения процесса и ведения больных.

Таким образом, в настоящее время за миРНК прочно закрепилась репутация мощных посттранскрипционных регуляторов экспрессии генов, способных одновременно модулировать ряд генов-мишеней. С тех пор как при исследованиях *C. elegans* были открыты первая миРНК *lin-4* и явление интерференции РНК, наши знания о механизме и патогенетической роли миРНК-опосредованной регуляции генов растут в геометрической прогрессии [84, 92]. Несмотря на то что мы все еще далеки от четкого понимания точных ролей различных миРНК в модуляции специфических клеточных процессов, ясно однако, что биологические роли миРНК в развитии заболеваний, а также механизм их действия могут изменяться в различных биологических условиях. Новейшие исследования показали, что существуют различные профили экспрессии миРНК в тканях при неопластических процессах и вирусных поражениях. Появились убедительные данные о связи дизрегуляции миРНК с возникновением и развитием рака, возможно, за счет модуляции апоптоза, метастазирования, трофики злокачественных клеток, а также предложена потенциальная роль миРНК в диагностике, прогнозировании и лечении рака [51].

Прогностическая важность биологических тканевых факторов активно исследуется. Недостаток определенных выводов по биологическим индикаторам обусловлен недостаточностью исследований, их часто противоречивыми результатами и потенциальными ловушками, присутствующими в ретроспективных работах и обусловленными характеристиками пациенток и методами лабораторных исследований. Фактически данные исследований показывают значительную неоднородность в зависимости от стадии и гистологического типа опухоли, статуса лимфатических узлов, нюансов лечения, методов исследования, применяемых для профилирования экспрессии миРНК в тканевых образцах.

Нарушение регуляции миРНК может играть важную роль в развитии предрака и РШМ. Потому исследования миРНК с целью как прогноза, так и терапии РШМ, остаются чрезвычайно актуальными. Не менее актуальным является изучение профилей экспрессии миРНК в качестве онкомаркера для прогнозирования течения неопластического процесса шейки матки и выявления корреляции между степенью тяжести CIN, ВПЧ-нагрузкой и уровнем указанных маркеров в динамике наблюдения.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Нами были ретроспективно проанализированы результаты гистологического диагноза 429 пациенток, ранее обратившихся в научно-поликлиническое отделение ФГБУ «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, за период 2015 г. Во всех случаях по показаниям была проведена биопсия шейки матки. Морфологически верифицированы доброкачественные заболевания шейки матки (хронический цервицит, лейкоплакия шейки матки, кондиломы шейки матки) – у 240 (56 %); CIN различной степени тяжести у 189 пациенток (44,0%), из них CIN I (LSIL) – у 110 (58,2%), CIN II–III (HSIL) – у 79 (41,7%).

Критерии включения:

1. Возраст от 18 до 49 лет.
2. Интраэпителиальные поражения шейки матки высокой и низкой степени выраженности, подтвержденные морфологическими методами исследования.
3. ВПЧ-инфекция.
4. Регулярный менструальный цикл.
5. Способность выполнять требования протокола.
6. Предоставление письменного информированного согласия.
7. Возможность поддерживать контакт с пациентом.

Критерии исключения:

1. Беременность.
2. Послеродовой период и лактация.
3. Нарушение функции почек, печени, легких в стадии декомпенсации.
4. Наличие психоневрологических заболеваний.
5. Отсутствие возможности следовать протоколу.

Проводимые методы исследования:

1. Клинический осмотр (жалобы, анамнез, данные гинекологического исследования).
2. Кольпоскопический метод исследования.

3. Цитологический метод исследования.
4. Гистологический (биопсия шейки матки).
5. Исследование уровня экспрессии miR-143, -145, -122 и -199a.
6. Исследования уровня экспрессии мРНК (MKI67, P16, CCNB1, BIRC5, CDKN2A, BCL-2, BAG1, BAX, NDRG1, PTEN, ESR1, PGR, TLR7, OSM, CD68, PTGS2/COX, SCUBE2, CTSL2) методом ПЦР в режиме реального времени.
7. Типирование ВПЧ (тип 21) и определение вирусной нагрузки методом ПЦР в режиме реального времени.

Клинический осмотр

Информация о клинико-anamnestических данных включала заполнение анкеты с указанием Ф.И.О. пациента, даты рождения, контактных данных, места проживания, сведений о профессиональной деятельности, наследственного и аллергического анамнеза, наличия у пациенток вредных привычек, данных о перенесенных заболеваниях и операциях, возрасте полового дебюта, числе половых партнеров за жизнь, методов контрацепции. Также указывались другие характеристики анамнеза пациентки, такие как возраст менархе, особенности гинекологического и акушерского анамнеза.

При объективном обследовании обращали внимание на рост, характер телосложения, состояние сердечно-сосудистой системы, органов дыхания, желудочно-кишечного тракта, функцию мочевыводящих путей, состояние костного скелета и состояние молочных желез. Индекс массы тела (ИМТ) определяется по формуле Brey.

Формула 1. Индекс массы тела:

$$\text{ИМТ} = \frac{\text{Масса тела (кг)}}{\text{рост (м}^2\text{)}}.$$

В норме для женщин репродуктивного возраста ИМТ составляет 20–25 кг/м².

При гинекологическом осмотре оценивали состояние наружных половых органов, учитывали степень и характер оволосения, развития малых и больших половых губ, наличие патологических процессов вульвы и промежности.

При исследовании с помощью зеркал определяли окраску слизистой оболочки влагалища и шейки матки, характер, консистенцию, цвет влагалищных выделений, форму и величину шейки матки, наличие патологических процессов на шейке матки и во влагалище. При влагалищном исследовании нами оценивались форма и величина тела матки, ее положение, наличие воспалительных заболеваний внутренних половых органов и спаечного процесса в малом тазу.

Расширенная кольпоскопия

Метод расширенной кольпоскопии (РКС) позволяет провести осмотр и оценку состояния эпителия шейки матки, влагалища и вульвы при увеличении микроскопа в 7–30 раз и более. Данный метод позволяет выявить и конкретизировать изменения эпителиального покрова шейки матки, влагалища и области вульвы, трактовка которых при визуальном наблюдении затруднена либо совсем невозможна.

Основными задачами кольпоскопии являются:

- оценка состояния эпителия шейки матки и влагалища;
- определение характера и локализации патологического процесса на шейке матки;
- обоснование необходимости дополнительных морфологических исследований.

Для исследования нами использовался кольпоскоп Leisegang (Германия), обеспечивающий 7–15–30-кратное увеличение. РКС проводили по общепринятой методике. Слизистую оболочку шейки матки исследовали как без обработки, так и с последующим нанесением 3% раствора уксусной кислоты, и затем 2% водного раствора Люголя (проба Шиллера). При выполнении РКС намечались места для прицельного взятия соскобов и биопсии с пораженных участков шейки матки для последующего цитологического и гистологического исследования.

Для интерпретации кольпоскопической картины оценивали следующие параметры:

- цвет;
- состояние сосудистого рисунка;
- поверхность и уровень многослойного плоского эпителия;
- стык эпителиев (характер и локализация);
- наличие и форма желез;
- реакция на 3% раствор уксусной кислоты;
- реакция на раствор Люголя;
- границы образований;
- тип эпителия.

При оценке кольпоскопической картины использовали единую Международную кольпоскопическую классификацию, одобренную на 14-м Всемирном конгрессе IFCPC в Рио-де-Жанейро (2011) (табл. 2, 3).

Классификация отражает патологические изменения эпителия шейки матки в соответствии с современными знаниями, структурирована и удобна для практического применения. Среди критериев информативности кольпоскопического исследования – возможность визуализации зоны стыка эпителиев (удовлетворительная/неудовлетворительная кольпоскопическая картина). Аномальная кольпоскопическая картина включает ряд признаков, подозрительных в отношении интраэпителиальных неоплазий. Наиболее важным является ацетобелый эпителий (АБЭ) (интенсивность побеления обычно коррелирует со степенью тяжести процесса). Пунктация и мозаика указывают на наличие атипической васкуляризации слизистой оболочки эпителия.

Документацию кольпоскопических картин осуществляли у всех пациенток графически в соответствии с условным циферблатом.

Таблица 2. Кольпоскопическая терминология для шейки матки

Общее исследование	Адекватно, неадекватно по причине наличия кровотечения, воспаления, рубца и т.д., зона трансформации			
Нормальная кольпоскопическая картина	Многослойный плоский эпителий: зрелый, атрофичный			
	Основные признаки	Основные признаки	Верхняя/нижняя треть Передний/задний/боковые своды влагалища	
	Слабовыраженные изменения	Слабовыраженные изменения	Тонкий АБЭ	Нежная мозаика Нежная пунктация
Ненормальная кольпоскопическая картина	Выраженные изменения	Выраженные изменения	Плотный АБЭ	Грубая мозаика Грубая пунктация
	Подозрение на инвазию	Подозрение на инвазию	Атипические сосуды Дополнительные признаки: хрупкие сосуды, неоднородная поверхность, экзофитное образование Некротизация Язва (некротическая) Опухоль/грубая опухоль	
	Неспецифические изменения	Неспецифические изменения	Цилиндрический эпителий (аденоз) Проба Шиллера: йоднегативные, йодпозитивные участки Лейкоплакия	
Разное	Эрозия (травма), кондилома Полип	Эрозия (травма), кондилома	Киста, эндометриоз, воспаление, вагинальный стеноз Врожденная зона трансформации	

Таблица 3. Кольпоскопическая терминология для влагалища

Общее исследование	Адекватно, неадекватно по причине наличия кровотечения, воспаления, рубца и т.д., зона трансформации			
Нормальная кольпоскопическая картина	Многослойный плоский эпителий: зрелый, атрофичный			
	Основные признаки	Основные признаки	Верхняя/нижняя треть Передний/задний/боковые своды влагалища	
	Слабовыраженные изменения	Слабовыраженные изменения	Тонкий АБЭ	Нежная мозаика Нежная пунктация
Ненормальная кольпоскопическая картина	Выраженные изменения	Выраженные изменения	Плотный АБЭ	Грубая мозаика Грубая пунктация
	Подозрение на инвазию	Подозрение на инвазию	Атипические сосуды Дополнительные признаки: хрупкие сосуды, неоднородная поверхность Экзофитное образование Некроз Язва (некротическая) Опухоль/грубая опухоль	
	Неспецифические изменения	Неспецифические изменения	Цилиндрический эпителий (аденоз) Проба Шиллера: йоднегативные, йодпозитивные участки Лейкоплакия	
Разное	Эрозия (травма), кондилома Полип	Эрозия (травма), кондилома	Киста, эндометриоз, воспаление, вагинальный стеноз Врожденная зона трансформации	

Использовалась цитологическая система оценки теста Папаниколау – система Бетесда [96]. Гистологические образцы классифицировали следующим образом: легкая дисплазия (CIN I), умеренная дисплазия (CIN II), тяжелая дисплазия (CIN III) и РСМ.

Молекулярно-биологические методы (ПЦР в реальном времени).

Генотипирование ВПЧ с определением вирусной нагрузки

Взятие биологического материала (соскоб эпителиальных клеток из зоны трансформации) осуществляли в пробирки с физиологическим раствором. Осаждение клеток проводили путем центрифугирования при 13 000 g в течение

10 мин. Полученные клетки ресуспендировали в 100 мкл физиологического раствора.

С целью выделения ДНК использовали наборы «ПРОБА-ГС» (ООО «ДНК-Технология», Россия). Метод основан на использовании для лизиса клеток сильного хаотропного агента с последующей сорбцией нуклеиновых кислот на твердом носителе, последующих отмывках сорбента и элюции ДНК с сорбента. Объем образцов после выделения составил 100 мкл.

Аmplификацию типоспецифических фрагментов ДНК вируса папилломы человека и человеческой ДНК (контроль адекватности взятия биоматериала) проводили с помощью комплекта реагентов для выявления, типирования и количественного определения вируса папилломы человека методом ПЦР ВПЧ «Квант-21» (ООО «ДНК-Технология», Россия).

Аmplификацию проводили в режиме реального времени на приборе ДТ-964 (ООО «ДНК-Технология», Россия). Измерение уровня флуоресценции определяли при каждом цикле амплификации по каналам FAM, HEX, ROX и Cy5. Результаты обрабатывались автоматически с помощью программного обеспечения к приборам.

Определение экспрессии мРНК функциональных генов человека эпителия шейки матки

Измерение уровней экспрессии мРНК генов (P16, Ki67, BCL-2, BAX, ESR1, PGR) проводилось при помощи коммерческих реагентов (ООО «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 (руководитель – д.б.н. Д.Ю. Трофимов). Праймеры и зонды для ПЦР были подобраны с учетом структуры генов таким образом, чтобы исключить отжиг на матрице геномной ДНК исследуемых и референсных генов. Это позволило не использовать дополнительный этап обработки нуклеиновых кислот ДНКазой.

Реакции амплификации целевых и референсных генов ставили в двух повторах. Для повышения чувствительности и специфичности ПЦР был использован метод «горячего старта» с применением парафина.

Взятие биоматериала осуществлялось аспирационной кюреткой Пайпель де Корнье перед проведением гистероскопии и отдельного диагностического выскабливания. Во избежание деградации сразу после взятия материал помещали в пластиковую пробирку объемом 1,5 мл, в которую предварительно внесено 500 мкл транспортной среды для стабилизации РНК (лизирующий раствор из комплекта реагентов для выделения нуклеиновых кислот «ПРОБА–НК» (ООО «ДНК-Технология», Россия)).

Выделение нуклеиновых кислот для определения экспрессии мРНК проводили с использованием комплекта реагентов «ПРОБА–НК» (ООО «ДНК-Технология», Россия). Метод основывается на лизисе клеток с последующей депротенинизацией и осаждением нуклеиновых кислот. Объем образцов после выделения составил 100 мкл.

Реакцию обратной транскрипции ставили в объеме 40 мкл (для реакции брали 33 мкл образца РНК) в течение 30 мин при температуре 40°C с последующей инактивацией обратной транскриптазы при 95°C в течение 5 мин. Для увеличения объема образца после ОТ и с целью предотвращения деградации ДНК копии (кДНК) разводили в 5 раз в ТЕ-буфере.

Регистрация и учет результатов амплификации проводятся с помощью детектирующего амплификатора ДТ-96 НК (ООО «ДНК-Технология», Россия). Регистрация сигнала флуоресценции проводится по каналу FAM, осуществляется прибором автоматически во время амплификации. Для вычисления уровня экспрессии использовались значения пороговых циклов (C_p).

Исследование уровня экспрессии miR-143, -145, -122, -199a.

Методы анализа миРНК

Соскобы эпителия шейки матки брали с помощью урогенитальных зондов, собранный материал переносили в пробирки с физиологическим раствором и

немедленно центрифугировали при 1600 g в течение 10 мин. Надосадов удаляли, осадок растворяли в 100 мкл физиологического раствора. Суммарную РНК выделяли с использованием набора реагентов miRNeasy Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Германия) в соответствии с инструкцией к нему. Реакцию обратной транскрипции проводили, используя коммерческие миРНК-специфические затравки и набор реактивов TaqMan[®] microRNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies, Grand Island, NY). Измерение уровня экспрессии миРНК проводили методом количественной ПЦР в реальном времени с использованием коммерческих примеров TaqMan miRNA Assay (Life Technologies, Grand Island, NY), набора реагентов TaqMan Universal PCR Master Mix (Life Technologies, Grand Island, NY) и детектирующего амплификатора ДТ-96 (ООО «ДНК-Технология», Россия). Количественное измерение миРНК проводили в условных единицах путем оценки $\Delta\Delta C_t$ отношения к количеству ДНК, измеренному в том же объеме (5 мкл) (табл. 4).

Таблица 4. Исследованные миРНК

МиРНК	Сокращенное название	ID	Нуклеотидная последовательность
has-mir-143*-3p	miR-143	000466	ggugcagugcugcaucucuggu
has-mir-145*-3p	miR-145	002149	ggauuuccuggaaauacuguucu
has-mir-199a-5p	miR-199	000498	cccaguguucagacuaccuguuc
has-mir-122-5p	miR-122	002245	Uggagugugacaauugguguuug

Статистическую обработку результатов исследования экспрессии миРНК проводили методом непараметрического анализа с использованием программы Statistica 10, IBM SPSS Statistics v22. Для сопоставления двух групп по количественным признакам применяли U-критерий Манна–Уитни. Различия между группами полагали статистически значимыми при $p < 0,05$. Для выявления точки отсечки положительных результатов диагностического теста и

определения его диагностической точности использовались бинарная логистическая регрессия и ROC-кривая.

Цитологическое исследование эпителия шейки матки

Одной из наиболее эффективных профилактических мер, которые может предпринять женщина для снижения риска смерти от РШМ, является регулярное скрининговое обследование. CDC не вносит особых рекомендаций относительно скрининга РШМ, однако на эту тему опубликовано руководство профессиональных организаций, таких как Американская коллегия акушеров и гинекологов (ACOG), Американское химическое общество (ACS), Американская рабочая группа по профилактическим мероприятиям (USPSTF). Большинство специалистов сходятся во мнении, что скрининговые мазки по Папаниколау (Пап-тест) следует начать регулярно исследовать приблизительно через 3 года после начала половой жизни, но не позже чем с 21 года. Повторный скрининг следует проводить каждые 2–3 года. В возрасте 65–70 лет женщины с нормальными результатами всех предшествовавших тестов могут отказаться от дальнейшего скрининга.

Забор материала для цитологического исследования по Папаниколау с поверхности экзоцервикса и из цервикального канала производят стерильной щеткой – эндобрашем типа Cytobrush с обязательным прицельным захватом клеток со всех подозрительных участков, включая стык цилиндрического и плоского эпителия. Для получения оптимальных результатов цитологического исследования необходимо забирать образцы отдельно с экзоцервикса и эндоцервикса. Материал наносится одним касательным движением щетки, которой производилось взятие мазка, по предметному стеклу в одном направлении и фиксируется спреем Bio-Fix. Подсушенный мазок маркируют.

Для эффективного цитологического исследования необходимо учитывать следующее:

- взятие материала осуществляют до проведения бимануального исследования;

- осмотрев шейку матки при помощи зеркал без предварительной обработки, слегка соскабливают поверхность патологически измененного участка или поверхность эктоцервикса вокруг наружного зева, взятие материала из цервикального канала проводят после удаления слизистой пробки;

- недопустимо использование тампонов, ватно-марлевых и ватных шариков, при которых взятый материал не может быть полностью перенесен на предметное стекло;

- нельзя брать материал для исследования во время менструации;

- желательно воздержание от половых контактов в течение 1–2 дней до исследования;

- в течение 1 сут. перед исследованием не следует проводить спринцевание и применять вагинальные препараты;

- нельзя брать материал в период лечения генитальной инфекции;

- во время беременности возможны неправильные результаты, потому это не лучшее время для скрининга;

- материал должен брать врач-гинеколог или хорошо обученная медицинская сестра (акушерка).

В 1988 г. Национальным институтом по изучению рака США предложена новая цитологическая система оценки теста Папаниколау – система Бетесда (TBS – Terminology Bethesda System). Цитологическая классификация Бетесда основана на введении термина SIL (*англ.* Squamous Intraepithelial Lesion – плоскоклеточное интраэпителиальное поражение). Клиническое значение имеют три вида препаратов: 1) нормальные мазки, без цитологических изменений; 2) «непонятные» мазки, не позволяющие исследователю точно ответить на вопрос о характере поражения, но в тоже время не являющиеся нормой – ASC-US (*англ.* Atypical squamous cells of undetermined significance – плоскоклеточная атипия неопределенной значимости); 3) предрак (SIL) низкой (*англ.* Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesions – LSIL) и высокой (*англ.* High-Grade Squamous Intraepithelial Lesions – HSIL) степени выраженности (табл. 5).

Таблица 5. Терминологическая система Бетесда

Атипичные железистые клетки	Atypical glandular cells	AGC
Атипичные железистые клетки, похожие на неопластичные	Atypical glandular cells, favor neoplastic	AGC, favor neoplastic
Атипичные клетки плоского эпителия	Atypical squamous cells	ASC
Атипичные клетки плоского эпителия неясного значения	Atypical squamous cells undertermined significance	ASC-US
Атипичные клетки плоского эпителия, не позволяющие исключить HSIL	Atypical squamous cells cannot exclude HSIL	ASC-H
Цервикальная интраэпителиальная неоплазия I, II или III степени	Cervical intraepithelial neoplasia grade I, II or III	CIN I, II, III
Карцинома <i>in situ</i>	Carcinoma <i>in situ</i>	CIS
Высокая степень плоскоклеточного интраэпителиального поражения	High grade squamous intraepithelial lesion	HSIL
Низкая степень плоскоклеточного интраэпителиального поражения	Low grade squamous intraepithelial lesion	LSIL
Не определенные иначе	Not otherwise specified	NOS
Плоскоклеточное интраэпителиальное поражение	Squamous intraepithelial lesion	SIL

Цитологический метод высокодостоверен – показатель ранней цитологической диагностики предрака и ранних стадий РШМ равен приблизительно 80%. Однако ошибки метода, составляющие от 5 до 40%, и отрицательные цитологические данные не исключают наличия рака шейки матки.

Факторы, влияющие на результат:

- несоблюдение техники забора материала;
- технические погрешности, связанные с приготовлением препарата;
- квалификация патоморфолога.

Поэтому каждой больной при локализации патологического очага на влагалищной части шейки матки необходимо выполнить прицельную биопсию и выскабливание слизистой оболочки цервикального канала.

Наиболее качественные препараты с использованием цитологического материала можно получить при применении жидкостной цитологии. Жидкостная цитология признана многими мировыми организациями (FDA, Американское противоопухолевое общество и др.), рекомендована международными консенсусами для эффективного скрининга РШМ. Для забора материала используют щетки со съемной головкой типа Cervix Brush. Конус щеточки

осторожно направляется в цервикальный канал. После введения конуса оставшая часть щеточки прижимается к поверхности эктоцервикса и производится 5 полных круговых вращений: три по часовой стрелке и два – против. Перед проведением данных манипуляций необходимо тщательно очистить шейку матки от слизи. Это чрезвычайно важно, так как слизь в дальнейшем затрудняет интерпретацию результатов иммуноцитохимического окрашивания. Щеточку с материалом необходимо опустить в контейнер с жидкой транспортной средой и тщательно ополоснуть ее там. При этом нужно стараться, чтобы «щетинки» Cervix Brush полностью погружались в раствор. В лаборатории тонкий слой суспензии помещается на стекло для изучения. При применении методики жидкостной цитологии уменьшилось число ложноотрицательных результатов по сравнению с Пап-тестом и повысилась выявляемость РШМ.

Морфологические методы исследования (гистологическое исследование биопсийного материала)

Исследование проведено согласно методике, описанной в национальном руководстве по гинекологии [12]. После анализа цитологического заключения, определения наличия ВПЧ и кольпоскопии по показаниям производится прицельная биопсия шейки матки (БШМ) – взятие небольшого объема ткани влагалищной части шейки матки для гистологического исследования с диагностической целью. Уточнение морфологических критериев поражения эпителия шейки матки и полноценное гистологическое заключение играет решающую роль в ведении, лечении и определении прогноза заболевания.

Показания для проведения БШМ:

- аномальные кольпоскопические признаки;
- слабовыраженные и выраженные кольпоскопические изменения, обусловленные ПВИ в сочетании с высокоонкогенными типами ВПЧ;
- цитограмма, соответствующая Пап-мазку класса 3.

Перед проведением биопсии всем пациенткам выполнялось комплексное клиничко-лабораторное обследование по общепринятой в гинекологической

практике схеме. Все исследуемые давали письменное согласие (с указанием возможных осложнений). В течение 12 ч до планируемой анестезии пациентка не должна принимать пищу, лекарственные препараты и жидкость. Согласно современным требованиям, принятым в онкогинекологии, биопсия во всех случаях должна быть прицельной (кольпоскопически ориентированной).

БШМ проводят с применением внутривенной анестезии (в условиях стационара) или местной анестезии (амбулаторно) в условиях асептики и антисептики. Шейку матки обнажают при помощи зеркал, обрабатывают раствором антисептика. Биоптат следует брать из наиболее подозрительного участка шейки матки (под контролем кольпоскопа). При наличии множественных измененных очагов рекомендуется брать несколько образцов ткани. Прицельную БШМ производят радиоволновым петлевым электродом, биопсийными щипцами (конхотом) либо хирургическим скальпелем. Участок ткани должен включать поверхностный эпителий и подлежащую строму, желателно захватить и визуально здоровую ткань. Расположение участков биопсии должно быть задокументировано. Биоптат отправляют на гистологическое исследование. В лаборатории его фиксируют, запечатывают в парафин или замораживают в термостате. Затем парафиновый блок или замороженный препарат режут и помещают срезы на стекла, которые окрашивают с помощью специальных красителей и исследуют под микроскопом.

При подозрении на неопластический процесс в эндоцервиксе проводится выскабливание цервикального канала.

Методы статистической обработки

Статистическую обработку полученных результатов производили при помощи статистических пакетов Biostat, SPSS21, Statistics 10.0, подготовку данных – при помощи Microsoft Excel 7 для Windows 98.

Описательная статистика представлена в виде медианы и интерквартильного интервала, так как большая часть данных не подчинялась закону нормального

распределения. Качественные данные представлены в виде абсолютных и относительных частот.

Сравнение количественных показателей в разных группах осуществлялось при помощи критерия Краскела–Уоллиса (для 3 групп и более) или критерия Манна–Уитни (для 2 групп). Различия между сравниваемыми величинами признавали статистически значимыми при $p < 0,05$ (95% доверительный интервал (ДИ)). Для изучения связи между количественными показателями применяли метод корреляции Пирсона с определением коэффициента корреляции (r^2) и оценкой его значимости по критерию t с 95% ДИ ($p < 0,05$). При значении модуля коэффициента корреляции $< 0,3$ взаимосвязь считали слабой, при r^2 от 0,3 до 0,6 – умеренной, а при $r^2 > 0,6$ – сильной.

Для количественной оценки уровня экспрессии мРНК генов использовался метод пороговых циклов $\Delta\Delta C_p$ на основании определения индикаторного цикла амплификации (C_p), автоматически рассчитанного детектирующим амплификатором, с нормировкой по 3 референсным генам: TBP, B2M и GUSB.

Нормировка производилась через вычисление нормировочного фактора (NF) как среднего арифметического значений C_p референсных генов.

Формула 2 – нормировочный фактор:

$$NF = \frac{1}{4}(C_{p(tbp)} + C_{p(b2m)} + C_{p(gus)} + C_{p(hprt)}).$$

Относительное значение экспрессии гена x вычислялось по формуле.

Формула 3 – экспрессия гена:

$$\text{Expression}(x) = 2^{-(C_{p(x)} - NF)}.$$

Для создания математической модели прогнозирования вероятности риска развития неопластической трансформации был использован метод регрессионного анализа (бинарная логистическая регрессия) как частный случай многомерного анализа (*англ.* multivariate/multivariable analysis), разработанный для оценки одновременного влияния более чем одного фактора на результат (исход).

Метод бинарной логистической регрессии позволяет исследовать и построить модель прогноза вероятности события в зависимости от значения предикторов. В

этом случае вместо предсказания бинарной переменной мы предсказываем непрерывную переменную со значениями на отрезке $[0,1]$ при любых значениях независимых переменных.

Это достигается применением следующего регрессионного уравнения (так называемое логит-преобразование):

$$p = 1/(1 + e^{-z}),$$

где p – вероятность принадлежности наблюдения к определенному классу при полученном значении функции z ;

e – основание натуральных логарифмов;

z – классифицирующая дискриминантная функция вида $y = a + b1 \times X1 + b2 \times X2 + \dots + bn \times Xn$;

a – некоторая константа;

$X1$ – независимые переменные (предикторы);

$b1$ – коэффициенты, расчет которых является задачей бинарной логистической регрессии.

Исходя из того, что значением функции является вероятность принадлежности данного исходного значения к определенному классу, можно сделать вывод: если значение $p < 0,5$, то событие, скорее всего, не наступит; в противном случае предполагается наступление события.

Для расчета оптимального значения величины порога отсечения p (точки cut-off) использовали ROC-анализ (*англ.* Receiver Operator Characteristic). ROC-анализ применяется для определения оптимального значения величины порога отсечения (точки cut-off). Основой данного анализа является построение ROC-кривой, которая показывает зависимость количества верно классифицированных положительных примеров от количества неверно классифицированных отрицательных примеров. Для установления значения cut-off проводился пересмотр значений классификационной функции от максимального до минимального значения. Для каждого значения проводилось разделение групп с определением чувствительности и специфичности. Критерием выбора точки cut-off было требование максимальной суммарной чувствительности и специфичности теста.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Клиническая характеристика обследуемых женщин

В исследование было включено 167 пациенток, обратившихся в научно-поликлиническое отделение Центра, в возрасте от 18 до 49 лет, средний возраст которых составил $32,4 \pm 6,1$ года. Был произведен тщательный анализ клинико-анамнестических данных, при сборе которых учитывались возраст, масса тела, рост, особенности менструальной функции, возраст дебюта половой жизни, количество беременностей, наличие ВПЧ-ассоциированных заболеваний генитальной области в анамнезе и методы их лечения, указание на операции внутренних половых органов в анамнезе, перенесенные воспалительные и инфекционные заболевания половых органов, прием комбинированных оральных контрацептивов (КОК), наличие аутоиммунной патологии, курение.

После детального обследования (цитология, ВПЧ-тестирование, кольпоскопия, биопсия шейки матки) пациентки были разделены на 5 групп:

- 1-я группа (группа сравнения) – 54 (32,3%) пациентки с цитологическим заключением NILM;
- 2-я группа – 31 (18,6%) пациентка с гистологическим диагнозом хронического цервицита;
- 3-я группа – 31 (18,6%) пациентка с гистологическим диагнозом LSIL;
- 4-я группа – 37 (22,2%) пациенток с гистологическим диагнозом HSIL;
- 5-я группа – 14 (8,4%) пациенток с раком шейки матки (РШМ) (рис. 1).



Рис. 1. Распределение пациенток по группам

Средний возраст пациенток групп 1–5 значимо не отличался ($p = 0,2443$) и составил $32,1 \pm 6,3$; $31,3 \pm 7,1$; $30,3 \pm 6,1$; $31,3 \pm 7,1$; $31,2 \pm 7,3$ года соответственно. Сравнительный анализ антропометрических данных также не выявил значимых различий между группами (табл. 6).

Таблица 6. Антропометрические показатели пациенток, включенных в исследование, $M \pm \delta$

Показатель	Группа 1 NILM, n = 54 (32,3%)	Группа 2 – хронический цервицит, n = 31 (18,6%)	Группа 3 – LSIL, n = 31 (18,6%)	Группа 4 – HSIL, n = 37 (22,2%)	Группа 5 – РШМ, n = 14 (8,4%)	p
Средний рост (см)	$167,0 \pm 3,4$	$167,0 \pm 3,2$	$166,3 \pm 4,1$	$167,0 \pm 3,7$	$166,1 \pm 3,1$	$p_1 = 0,780$ $p_2 = 0,665$ $p_3 = 0,833$ $p_4 = 0,751$
Средняя масса тела (кг)	$59,65 \pm 6,5$	$61,68 \pm 7,0$	$59,59 \pm 6,9$	$58,35 \pm 7,1$	$61,57 \pm 7,0$	$p_1 = 0,420$ $p_2 = 0,778$ $p_3 = 0,639$ $p^4 = 0,527$
ИМТ	$21,41 \pm 1,7$	$22,11 \pm 2,0$	$21,54 \pm 2,1$	$21,82 \pm 1,9$	$22,33 \pm 2,0$	$p_1 = 0,420$ $p_2 = 0,812$ $p_3 = 0,773$ $p_4 = 0,604$

Примечание. Здесь и в табл.: 7–11: данные представлены как среднее (M) \pm стандартное отклонение (δ).

p – уровень значимости различий по отношению к группе сравнения; t-критерий Стьюдента (p_1 – группа 2 vs группа 1; p_2 – группа 3 vs группа 1; p_3 – группа 4 vs группа 1; p_4 – группа 5 vs группа 1).

Анализ менструальной и репродуктивной функции пациенток показал, что средний возраст наступления менархе – $12,9 \pm 1,3$ года. Средняя длительность менструального цикла составила $28,8 \pm 1,2$ дня. У 153 (91,6%) пациенток менструальный цикл был регулярным и только у 14 (8,4%) – выявлены различные нарушения менструального цикла. Особенности менструального цикла среди всех групп пациенток представлены в таблице 7.

Таблица 7. Особенности менструального цикла пациенток, включенных в исследование, $M \pm \delta$

Показатель	Группа 1 – NILM, n = 54 (32,3%)	Группа 2 – хронически й цервицит, n = 31 (18,6%)	Группа 3 – LSIL, n = 31 (18,6%)	Группа 4 – HSIL, n = 37 (22,2%)	Группа 5 – РШМ, n = 14 (8,4%)	p
Длительность менструальног о цикла	27,6 ± 1,2	28,2 ± 1,1	28,6 ± 1,4	31,8 ± 1,1	27,7 ± 1,2	p ₁ = 0,29 6 p ₂ = 0,22 1 p ₃ = 0,17 3 p ₄ = 0,65 1
Количество дней	4,9 ± 2,2	4,2 ± 2,1	5,1 ± 1,6	5,0 ± 1,7	5,1 ± 1,4	p ₁ = 0,63 3 p ₂ = 0,53 6 p ₃ = 0,88 5 p ₄ = 0,70 6

Оценка менструальной функции (возраст менархе, длительность менструального цикла, продолжительность менструального кровотечения) также не выявила статистически значимых различий между группами ($p > 0,05$).

Анализ особенностей половой жизни обследуемых пациенток показал, что средний возраст начала половой жизни в группах не различался ($p = 0,738$) и в целом составил $18,5 \pm 2,3$ года. Количество половых партнеров в течение жизни колебалось от 1 до 8 и в среднем составило $2,06 \pm 2,5$. 62 (37,1%) женщины начали половую жизнь до 18 лет. В 1-й группе раннее начало половой жизни (до 18 лет) наблюдалось у 16 (29,6%) пациенток, во 2-й группе – у 9 (29,0%), в 3-й группе – у 11 (35,5%), в 4-й группе – у 19 (51,4%), в 5-й группе – у 7 (50,0%) ($p = 0,0934$).

Оценка акушерского анамнеза показала, что среди исследуемых пациенток общее число беременностей составило 105, общее число самопроизвольных родов – 32, что составляет 30,4% от общего числа беременностей. Количество

случаев кесарева сечения составило 9 (8,6%) от общего числа беременностей. Число аборт и выкидышей равно 25 (23,8%) и 39 (37,1%) соответственно. При оценке акушерского анамнеза по группам различия выявлены по количеству беременностей (табл. 8).

Подробно особенности акушерского анамнеза исследуемых пациенток по группам описаны в таблице 8.

Таблица 8. Акушерский анамнез пациенток, включенных в исследование, n (%)

Показатель	Группа 1 NILM, n = 54 (32,3%)	Группа 2 – хронический цервицит, n = 31 (18,6%)	Группа 3 – LSIL, n = 31 (18,6%)	Группа 4 – HSIL, n = 37 (22,2%)	Группа 5 – РШМ, n = 14 (8,4%)	ОШ (95% ДИ)	p
Общее число беременностей (n = 105)	40 (38,1)	23 (21,9)	14 (13,3)	19 (18,1)	9 (8,6)	1,01 (0,4–2,7) ¹ 0,3 (0,11–0,73) ² 0,37 (0,15–0,9) ³ 0,63 (0,18–2,2) ⁴	p ₁ = 0,99 0 p ₂ = 0,00 7 p ₃ = 0,02 6 p ₄ = 0,46 7
Самопроизвольные роды (n = 32)	14 (43,7)	8 (25)	2 (6,2)	5 (15,6)	3 (9,4)	0,9 (0,3–2,7) ¹ 0,2 (0,04–0,93) ² 0,4 (0,15–1,37) ³ 0,8 (0,3–5,3) ⁴	p ₁ = 0,99 3 p ₂ = 0,02 7 p ₃ = 0,15 2 p ₄ = 0,72 9
Кесарево сечение (n = 9)	5 (55,5)	1 (11,1)	1 (11,1)	2 (22,2)	0	0,33 (0,1–27,4) ¹ 0,33 (3–27,4) ² 0,33 (0,07–1,6) ³ – ⁴	p ₁ = 0,29 5 p ₂ = 0,29 5 p ₃ = 0,49 8 p ₄ –

Аборты (n = 25)	8 (32)	6 (24)	4 (16)	3 (12)	4 (16)	1,4 (0,4–4,4) ¹ 0,9 (0,2–3,1) ² 0,51 (0,13–2,1) ³ 2,3 (0,6–9,16) ⁴	p ₁ = 0,62 0 p ₂ = 0,81 7 p ₃ = 0,32 3 p ₄ = 0,22 9
Выкидыши (n = 39)	13 (33,3)	8 (20,5)	7 (17,9)	9 (23)	2 (5,1)	1 (0,4–3) ¹ 1 (0,3–2,6) ² 1 (0,38–2,69) ³ 0,53 (0,1–2,7) ⁴	p ₁ = 0,85 8 p ₂ = 0,97 8 p ₃ = 0,99 5 p ₄ = 0,43 1

Примечание. Здесь и в табл. 9–11: отношение шансов (ОШ) с 95% доверительным интервалом (ДИ): ¹ – группа 2 vs группа 1; ² – группа 3 vs группа 1; ³ – группа 4 vs группа 1; ⁴ – группа 5 vs группа 1.

Наибольшее количество беременностей отмечалось в 1-й группе (NILM) – 40, что составило 43,7% от общего числа беременностей. Наибольшее число самопроизвольных родов также было зарегистрировано в 1-й группе пациенток с NILM и составило 14 (43,7%) случаев. Во 2-й группе с хроническим цервицитом отмечалось 25% от общего числа самопроизвольных родов, в 3–5-й группах – 6,2; 15,6 и 9,4% соответственно. При оценке количества операций кесарева сечения по группам отмечено, что в 1-й группе роды путем кесарева сечения в анамнезе проводились 55,5% пациенток, во 2–4-й группах – 11,1; 11,1; 22,2% от общего числа случаев кесарева сечения соответственно. Количество искусственных абортов распределилось по группам следующим образом: в 1-й группе – 32%, во 2-й группе – 24%, в 3–5-й группах – 16, 12 и 16% соответственно. Наибольшее число выкидышей отмечалось также в 1-й группе и составило 33,3% (от общего количества выкидышей) и 4-й группе – 23%.

На следующем этапе был проведен анализ анамнестических данных о перенесенных заболеваниях, включая детские инфекции, аллергические заболевания, патологию ЖКТ, заболевания сердечно-сосудистой системы, ЛОР-патологию и др. Особенности соматической заболеваемости отображены в

таблице 9. Заболевания органов дыхания включали перенесенную пневмонию, бронхиальную астму и хронический бронхит. Наиболее частым заболеванием среди патологии дыхательной системы была пневмония – 5 (2,9%) случаев. Наиболее часто встречающимися заболеваниями сердечно-сосудистой системы являлись: ишемическая болезнь сердца, инсульты и артериальная гипертензия. Среди перенесенных заболеваний мочевыделительной системы отмечались хронический цистит и хронический пиелонефрит. Патология желудочно-кишечного тракта проявлялась хроническим гастритом и язвенной болезнью желудка в стадии ремиссии. Из заболеваний эндокринной системы наблюдались аутоиммунный тиреоидит, сахарный диабет (табл. 9).

Таблица 9. Особенности соматической заболеваемости у пациенток, включенных в исследование, n (%)

Показатель	Группа 1 NILM, n = 54 (32,3%)	Группа 2 – хронический цервицит, n = 31 (18,6%)	Группа 3 – LSIL, n = 31 (18,6%)	Группа 4 – HSIL, n = 37 (22,2%)	Группа 5 – РШМ, n = 14 (8,4%)	ОШ (95% ДИ)	p
Аллергические заболевания (атопический дерматит, пищевая аллергия)	5 (9,2)	1 (3,2)	0	2 (5,4)	0	3 (0,3–2,93) ¹ – ² 0,56 (0,1–3,05) ³ – ⁴	p ₁ = 0,237 p ₂ = 0,4609 p ₃ = 0,479 p ₄ = 0,716
Детские инфекционные заболевания (краснуха, корь, ветряная оспа, скарлатина)	46 (85,2)	28 (90,3)	16 (51,6)	32 (86,5)	8 (57,1)	1,6 (0,4–6,6) ¹ 0,19 (0,07–0,52) ² 1,1 (0,31–3,7) ³ 0,23 (0,06–0,85) ⁴	p ₁ = 0,476 p ₂ = 0,0015 p ₃ = 0,861 p ₄ = 0,0506
Заболевания сердечно-сосудистой системы	10 (18,5)	7 (21,2)	4 (12,9)	7 (18,9)	5 (35,7)	1,28 (0,4–3,5) ¹ 0,7 (0,2–2,2) ² 1,03 (0,3–3) ³ 2,4 (0,7–8,9) ⁴	p ₁ = 0,659 p ₂ = 0,485 p ₃ = 0,96 p ₄ = 0,219
Заболевания ЖКТ (гастриты, язвенная болезнь желудка)	5 (9,3)	6 (19,4)	6 (19,46)	8 (21,6)	4 (28,6)	2,3 (0,6–8,5) ¹ 2,3 (0,6–8,5) ² 2,7 (0,8–9) ³ 3,9 (0,9–17,2) ⁴	p ₁ = 0,217 p ₂ = 0,217 p ₃ = 0,118 p ₄ = 0,057
Заболевания мочевыводящей системы (пиелонефрит,	5 (9,3)	7 (22,6)	6 (19,46)	8 (21,6)	4 (28,6)	2,4 (0,8–7,0) ¹ 2,3 (0,68,5) ² 2,7 (0,8–9) ³ 3,9 (0,9–17,2) ⁴	p ₁ = 0,120 p ₂ = 0,217 p ₃ = 0,118 p ₄ = 0,057

циститы и др.)							
Заболевания щитовидной железы (узловой зоб, токсический зоб)	3 (5,6)	2 (6,5)	0	1 (2,7)	0	1 (0,2–7,4) ¹ – ² 0,5 (0,04–4,7) ³ – ⁴	p ₁ = 0,868 p ₂ = 0,652 p ₃ = 0,488 p ₄ = 0,826
Онкологические заболевания	0,0	4 (12,0)	3 (9,7)	1 (2,7)	2 (4,8)	6,92 (0,8–59,6) ¹ 5,7 (0,5–48,1) ² 1,5 (0,1–22,6) ³ 7,7 (0,7–79,1) ⁴	p ₁ = 0,164 p ₂ = 0,271 p ₃ = 0,717 p ₄ = 0,224
Заболевания ЛОР-органов	30 (55,6)	24 (77,4)	14 (45,1)	32 (86,5)	7 (50,0)	2,7 (1–7,4) ¹ 0,6 (0,2–1,6) ² 5,1 (1,7–15) ³ 0,8 (0,2–2,6) ⁴	p ₁ = 0,033 p ₂ = 0,356 p ₃ = 0,001 p ₄ = 0,712
Заболевания органов дыхания (пневмония, бронхиальная астма, бронхиты)	6 (11,1)	2 (6,5)	1 (3,2)	3 (8,1)	3 (21,4)	0,5 (0,1–3) ¹ 0,2 (0,03–2,3) ² 0,7 (0,1–3) ³ 2,1 (0,5–10,1) ⁴	p ₁ = 0,450 p ₂ = 0,145 p ₃ = 0,629 p ₄ = 0,384
Аутоиммунная патология	5 (9,3)	5 (16,1)	5 (16,1)	4 (10,8)	2 (14,2)	1,9 (0,5–7,1) ¹ 1,9 (0,5–7,1) ² 1,8 (0,3–4,7) ³ 1,6 (0,3–9,5) ⁴	p ₁ = 0,375 p ₂ = 0,375 p ₃ = 0,810 p ₄ = 0,622
Патология молочной железы	1 (1,9)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (5,4)	2 (14,2)	0,1 (0–115) ¹ 0,1 (0–115) ² 3 (0,2–34,6) ³ 8,8 (0,7–105,5) ⁴	p ₁ = 0,877 p ₂ = 0,877 p ₃ = 0,396 p ₄ = 0,196

Следует отметить, что онкологические заболевания в анамнезе чаще встречались у пациенток с хроническим цервицитом, LSIL и РШМ ($p > 0,05$).

При изучении семейного анамнеза было выявлено, что 30 (17,9%) пациенток отмечали наличие наследственных патологий в семье: заболевания сердечно-сосудистой системы – у 23 (13,8%), сахарный диабет 1–2-го типов – у 22 (13,1%), онкологические заболевания органов малого таза – у 10 (6,0%).

Анализ данных частоты операций на органах малого таза (тубэктомия, лапароскопия, миомэктомия, полипэктомия) не выявил статистически значимых различий в группах ($p > 0,05$) (табл. 10).

Таблица 10. Оперативные вмешательства на органах малого таза, n (%)

Вид операции	Группа 1 NILM, n = 54 (32,3%)	Группа 2 – хронический цервицит, n = 31 (18,6%)	Группа 3 – LSIL, n = 31 (18,6%)	Группа 4 – HSIL, n = 37 (22,2%)	Группа 5 – РШМ, n = 14 (8,4%)	ОШ (95% ДИ)	p
Лапароскопия	4 (7,4)	3 (9,7)	0	1 (2,7)	0	1,3 (0,3–6,4) ¹ 0 (0–21) ² 0,3 (0–3,2) ³ 0,1 (0–49) ⁴	p ₁ = 0,237 p ₂ = 0,551 p ₃ = 0,293 p ₄ = 0,770
Тубэктомия	2 (3,7)	0	0	0	1 (7,1)	0,1 (0–49) ¹ 0 (0–49) ² 0,1 (0–3,2) ³ 0,1 (0–49) ⁴	p ₁ = 0,761 p ₂ = 0,761 p ₃ = 0,721 p ₄ = 0,641
Миомэктомия	4 (1,72)	0	1 (0,35)	2 (0,94)	0	0 (0–22) ¹ 0 (0–4) ² 1 (0,1–4) ³ 0,9 (0–49) ⁴	p ₁ = 0,553 p ₂ = 0,383 p ₃ = 0,698 p ₄ = 0,770
Полипэктомия	1 (1,9)	2 (6,5)	0	1 (2,7)	0	3,6 (0,3–42) ¹ 0,1 (0–115) ² 1,4 (0,01–24) ³ 0,4 (0–260) ⁴	p ₁ = 0,339 p ₂ = 0,878 p ₃ = 0,793 p ₄ = 0,941

Среди перенесенных гинекологических заболеваний отмечались воспалительные и инфекционные заболевания органов малого таза, и их частота была сопоставима между группами (табл. 11).

Таблица 11. Структура гинекологической патологии у пациенток, включенных в исследование, n (%)

Заболевание	Группа 1 NILM, n = 54 (32,3%)	Группа 2 – хронический цервицит, n = 31 (18,6%)	Группа 3 – LSIL, n = 31 (18,6%)	Группа 4 – HSIL, n = 37 (22,2%)	Группа 5 – РШМ, n = 14 (8,4%)	ОШ (95% ДИ)	p
Остроконечные кондиломы влагалища	2 (3,7)	0 (0,0)	1 (3,2)	4 (10,8)	0 (0,0)	0,1 (0–49) ¹ 1 (0,1–10) ² 3 (0,5–18) ³ 0,1 (0–110) ⁴	p ₁ = 0,761 p ₂ = 0,079 p ₃ = 0,217 p ₄ = 0,279
Остроконечные кондиломы вульвы	1 (1,9)	0 (0,0)	0 (0,0)	4 (10,8)	0 (0,0)	0,1 (0–115) ¹ 0,1 (0–115) ² 6,4 (0,7–60) ³ 0,3 (0–260) ⁴	p ₁ = 0,878 p ₂ = 0,878 p ₃ = 0,102 p ₄ = 0,941
Эктропион шейки матки	2 (3,7)	2 (6,4)	1 (3,2)	1 (2,7)	0 (0,0)	1,8 (0,2–13) ¹ 1 (0,1–10) ² 0,7 (0,1–8,2) ³ 0,2 (0–110) ⁴	p ₁ = 0,591 p ₂ = 0,907 p ₃ = 0,787 p ₄ = 0,883
Полип цервикального канала	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (3,2)	1 (2,7)	1 (7,1)	3 (0–26) ³ 7 (0,06–83) ⁴	p ₂ = 0,673 p ₃ = 0,717 p ₄ = 0,467
Урогенитальный хламидиоз	2 (3,7)	2 (6,4)	0	3 (8,1)	0	1,8 (0,2–13,4) ¹ 1 (0–48,9) ² 2,3 (0,4–14,4) ³ 0,2 (0–110) ⁴	p ₁ = 0,591 p ₂ = 0,761 p ₃ = 0,397 p ₄ = 0,883
Трихомониаз	0,0	0,0	0,0	2 (5,4)	0,0	30,8 (0–179) ³	p ₃ = 0,493
Кандидозный вульвовагинит	15 (27,8)	6 (19,4)	3 (9,7)	7 (18,9)	1 (7,1)	0,6 (0,2–1,8) ¹ 0,2 (0,1–1) ² 0,6 (0,2–1,7) ³ 0,2 (0,02–1,6) ⁴	p ₁ = 0,370 p ₂ = 0,004 p ₃ = 0,320 p ₄ = 0,027
Генитальный герпес	2 (3,7)	1 (3,2)	1 (3,2)	0 (0,0)	0(0,0)	1 (0,1–9,9) ¹	p ₁ = 0,907 p ₂ = 0,907

						1 (0,1–9,9) ² 0,07 (0–31) ³ 0,2 (0–110) ⁴	p ₃ = 0,720 p ₄ = 0,883
ВПЧ-инфекция в анамнезе	21 (38,9)	15 (48,4)	29 (93,5)	26 (70,3)	8 (57,1)	1,5 (0,6–3,6) ¹ 22 (4,9–105) ² 3,7 (1,5–9) ³ 2 (0,6–6,9) ⁴	p ₁ = 0,397 p ₂ = 0,001 p ₃ = 0,003 p ₄ = 0,222

В целом встречаемость ИППП среди исследуемых пациенток составила: урогенитальный хламидиоз – 7 (4,2%) случаев, трихомониаз – 2 (1,2%), кандидозный вульвовагинит – 32 (19,2%). Все пациентки были пролечены антибактериальными и противогрибковыми препаратами. Вирус простого герпеса был выявлен у 4 (2,4%) пациенток.

Что касается распространенности ВПЧ-инфекции в анамнезе, достоверно чаще вирус встречался в группах LSIL – 29 (93,5%) случаев и HSIL – 26 (70,3%). В группах NILM и хронического цервицита – в 38,9 и 48,4% случаев соответственно. В группе пациенток с РСМ ВПЧ в анамнезе встречался в 57,1% случаев.

Остроконечные кондиломы вульвы, влагалища и шейки матки в целом были выявлены у 12 (7,2 %) пациенток.

Полип цервикального канала выявлялся у 3 (1,7%) пациенток. Во всех случаях в качестве лечения ранее были проведены гистероскопия, полипэктомия и отдельное диагностическое выскабливание полости матки и цервикального канала.

Заключение. Таким образом, анализ клинико-анамнестических данных показал, что в группе LSIL достоверно чаще встречался вульвовагинальный кандидоз по сравнению с другими группами. Наличие ВПЧ-инфекции в анамнезе достоверно чаще встречалось в группах LSIL – 29 (93,5%) и HSIL – 26 (70,3%) случаев.

По остальным параметрам достоверных различий выявлено не было.

3.2. Оценка факторов риска развития цервикальной интраэпителиальной неоплазии различной степени тяжести

Нами была проведена оценка факторов риска развития CIN различной степени тяжести. Учитывался риск развития HSIL (CIN II/III) у пациенток с малыми формами поражения, которые, согласно данным литературы, составляют 19%. В связи с этим нами были оценены факторы риска развития цервикальной интраэпителиальной неоплазии различной степени тяжести в целом и при РШМ.

Мы оценивали такие факторы риска, как возраст, начало половой жизни, количество половых партнеров, наличие ИППП, ВПЧ-инфекция в анамнезе, использование КОК, наличие вредных привычек (курение).

Для оценки факторов развития CIN различной степени тяжести было отобрано 136 пациенток, из них 54 – с NILM, 31 – с LSIL, 37 – с HSIL и 14 пациенток с РШМ. Все они были разделены на 2 группы: 1-я группа – пациентки с гистологически верифицированным диагнозом CIN различной степени тяжести (LSIL/HSIL) и РШМ (n = 82); 2-я группа – группа сравнения, пациентки с нормальной цитологической картиной – NILM (n = 54) (рис. 2).

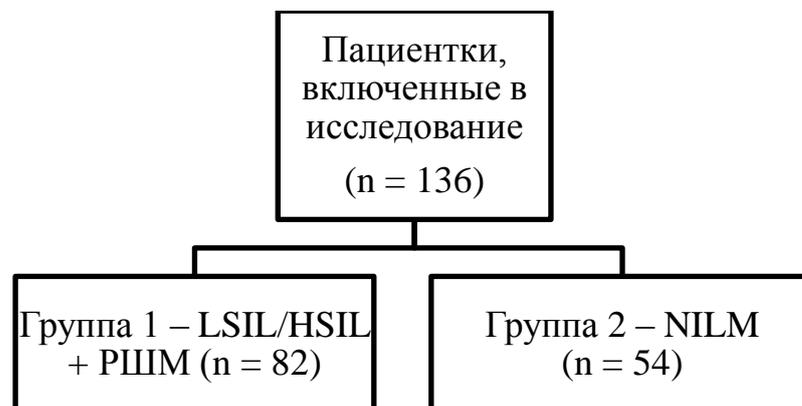


Рис. 2. Дизайн исследования

Анализ факторов риска развития неоплазий в 2 группах пациенток представлен в таблице 12.

Таблица 12. Факторы риска развития CIN (LSIL/HSIL) и РШМ, n (%)

Факторы риска	Группа 1 – LSIL/HSIL + РШМ, n = 82 (60,2%)	Группа 2 – NILM, n = 54 (39,7%)	ОШ (95% ДИ)	p*
Средний возраст, лет	31,3 ± 7,1	32,1 ± 6,3		>0,05
Раннее начало половой жизни	37 (45,1)	16 (29,6)	1,9 (0,94–4,04)	0,06
Большое кол-во половых партнеров (>4)	24 (29,3)	8 (14,8)	2,38 (0,98–5,79)	0,04
ИППП в анамнезе	14 (17,1)	17 (31,5)	2,2 (0,98–5,03)	0,05
ВПЧ в анамнезе	63 (76,8)	21 (38,8)	5,2 (2,4–11,03)	8×10⁻⁷
Курение	40 (48,8)	31 (57,4)	0,71 (0,35–1,41)	0,323
Использование КОК	49 (59,8)	40 (74,1)	0,52 (0,25–1,1)	0,09

* p – уровень значимости различий встречаемости между 1-й и 2-й группами.

Полученные нами результаты показали, что наиболее значимым фактором риска развития CIN различной степени тяжести и РШМ явились: большое количество половых партнеров ($p = 0,04$), ИППП в анамнезе ($p = 0,05$), ВПЧ в анамнезе ($p = 8 \times 10^{-7}$). Подобная тенденция также отмечается для раннего начала половой жизни ($p = 0,06$).

Нами была оценена корреляционная связь между наиболее важными факторами риска развития CIN различной степени тяжести и РШМ (табл. 13).

Таблица 13. Коэффициент корреляции Спирмена среди основных факторов риска

	ВПЧ в анамнезе	ИППП в анамнезе	Большое количество половых партнеров
ВПЧ в анамнезе	–		
ИППП в анамнезе	0,856*	–	
Большое количество половых партнеров	0,899*	0,877*	–

* p – уровень значимости <0,05.

Учитывая достоверную значимость коэффициентов Спирмена между основными факторами риска развития CIN, выявлена положительная корреляция между всеми тремя факторами (табл. 14). Высокая корреляционная связь ($>0,899$) выявлена между большим количеством половых партнеров и наличием ВПЧ в анамнезе. Также прямая корреляционная связь прослеживалась между наличием всех трех наиболее значимых факторов риска и CIN различной степени тяжести (табл. 14). Следовательно, пациентки с наличием одного из этих факторов относятся к группе риска по развитию CIN.

Таблица 14. Коэффициент корреляции Спирмена для основных факторов риска и наличия CIN различной степени тяжести

Фактор риска	Коэффициент корреляции Спирмена	p
ВПЧ в анамнезе/CIN различной степени тяжести	0,756	<0,05
ИППП в анамнезе/CIN различной степени тяжести	0,601	<0,05
Большое количество половых партнеров/CIN различной степени тяжести	0,732	<0,05

Также нами проведена оценка относительного риска развития CIN различной степени тяжести и РШМ в зависимости от наличия факторов риска.

На следующем этапе был оценен относительный риск (ОР) развития LSIL, HSIL и РШМ в зависимости от наличия того или иного фактора. Так, относительный риск возникновения РШМ у женщин с ранним началом половой жизни составил 1,18 (95% ДИ 0,55–2,51). Наличие ИППП повышает риск поражения эпителия шейки матки. Нами получены данные о статистически значимом повышении риска ИППП в группах пациенток с хроническим цервицитом, LSIL (CIN I), HSIL (CIN II/III) (ОР = 2,64; 3,21; 3,41 соответственно), однако значимого риска в группе РШМ выявить не удалось, что связано с небольшой выборкой пациенток с РШМ.

Нами был рассчитан относительный риск по сравнению с группой здоровых женщин и соответствующий 95% доверительный интервал (табл. 15).

Таблица 15. Оценка факторов риска развития CIN по группам, ОР (95% ДИ)

Факторы риска	Группа 2	Группа 3	Группа 4	Группа 5
	Хронический цервицит (n = 31)	LSIL (CIN I) (n = 31)	HSIL (CIN II, III) (n = 37)	РШМ (n = 14)
Раннее начало половой жизни	1,1 (0,3–4,02)	1,78 (0,59–5,38)	2,93 (1,04–8,23)	3,54 (1,18–10,62)
Число половых партнеров >4	2,2 (0,43–11,16)	2,23 (0,46–10,73)	3,19 (0,7–14,65)	7,07 (1,62–30,85)
ИППП в анамнезе	2,64 (1,05–6,62)	3,21 (1,34–7,68)	3,41 (1,42–8,18)	1,89 (0,59–6)
Вредные привычки	1,65 (0,3–9,21)	1,78 (0,35–9,12)	2,66 (0,56–12,73)	5,89 (1,29–26,84)
Использование КОК	0,55 (0,11–2,79)	1,11 (0,33–3,81)	1,33 (0,39–4,51)	2,36 (0,68–8,12)

Анализ результатов исследования показал, что наиболее значимыми факторами риска поражения эпителия шейки матки являются: большое число половых партнеров (>4); ИППП в анамнезе; ВПЧ-инфекция в анамнезе. Относительный риск развития РШМ значительно выше у пациенток с большим количеством половых партнеров. Риск возникновения РШМ в 7,1 раза выше у женщин, имевших 4 половых партнера и более (ОР = 7,07, 95% ДИ 1,62–30,85).

Результаты расширенной кольпоскопии

Следующим этапом нашего исследования явилось проведение расширенной кольпоскопии всем пациенткам, включенным в исследование; оценка, систематизация полученных результатов и сравнение с результатами морфологических методов исследования.

При анализе результатов учитывались такие кольпоскопические критерии, как наличие АБЭ и степень его выраженности, наличие мозаики/пунктации, степень окрашивания раствором Люголя, наличие йоднегативных участков, а также наличие остроконечных кондилом.

Расширенная кольпоскопия была проведена всем исследуемым ($n = 167$), при этом нормальная кольпоскопическая картина наблюдалась у 101 (60,5%) пациентки, неудовлетворительная – у 66 (45,2%).

Варианты неудовлетворительной кольпоскопической картины включали слабовыраженные и выраженные изменения, наиболее важным из которых явилось наличие АБЭ, интенсивность его изменения коррелировала со степенью тяжести процесса. Слабовыраженные изменения эпителия шейки матки выявлялись у 58 (39,7%) пациенток, выраженные изменения – у 55 (37,7%). Был проведен подробный анализ кольпоскопической картины по группам (табл. 16).

Таблица 16. Результаты расширенной кольпоскопии в исследуемых группах

Картина кольпоскопии	NILM (n = 54) ; без ВПЧ типа 33	Хронический цервицит (n = 31)	LSIL (n = 31)	HSIL (n = 37)	РШМ (n = 14)
Мозаика нежная	0	2 (6,5%) $p_{2-5} = 0,009$ ОШ 14 (2,3–82,7)	11 (35,5%) $p_{3-2} = 0,006$ ОШ 7,7 (1,5–38,6)	14 (37,8%) $p_{4-2} = 0,003$ ОШ 8,5 (1,7–41,4)	7 (50%)
Мозаика грубая	0	0	3 (9,7%) $p_{5-3} = 0,002$ ОШ 9 (1,9–45,6)	6 (16,2%)	7 (50%) $p_{5-4} = 0,01$ ОШ 5,1 (1,3–20,2)
Пунктация нежная	0	6 (19,3%)	20 (64,5%) $p_{3-2} = 0,0003$ ОШ 7,5 (2,4–24)	10 (27,0%) $p_{2-4} = 0,002$ ОШ 5 (1,7–13,8)	5 (35,7%)
Пунктация грубая	0	0	2 (6,5%) $p_{5-3} = 0,04$ ОШ 5,8 (1–36,6)	8 (21,6%)	4 (28,6%)
АБЭ нежный	0	11 (35,5%)	25 (80,6%) $p_{3-5} = 0,01$ ОШ 5,5 (1,4–22)	16 (43,2%)	6 (42,9%) $p_{3-2} = 0,0003$ ОШ 7,6 (2,4–24)
АБЭ грубый	0	0	5 (16,1%)	8 (21,6%)	8 (57,1%) $p_{5-4} = 0,01$ ОШ 4,8 (1,3–18)
Атипические сосуды	0	3 (9,7%)	7 (22,6%)	16 (43,2%) $p_{4-2} = 0,002$ ОШ 7 (1,8–27)	11 (78,6%) $p_{5-4} = 0,02$ ОШ 0,2 (0,05–0,9)
Открытые железы	0	1 (3,2%)	2 (6,5%)	2 (5,4%)	2 (14,3%)
Выраженный сосудистый рисунок	0	11 (35,5%)	10 (32,3%)	9 (24,3%)	10 (71,4%)
Ретенционные кисты	0	1 (3,2%)	2 (6,5%)	2 (5,4%)	3 (21,4%)
Йоднегативная зона	0	10 (32,3%)	20 (64,5%)	21 (56,8%)	8 (57,1%)

Примечание. p – уровень значимости различий встречаемости между 1-й и 2-й группами.

Как видно из данных таблицы 16, изменения эпителия при кольпоскопии достоверно чаще встречались среди пациенток 4-й и 5-й групп (рис. 3, 4).

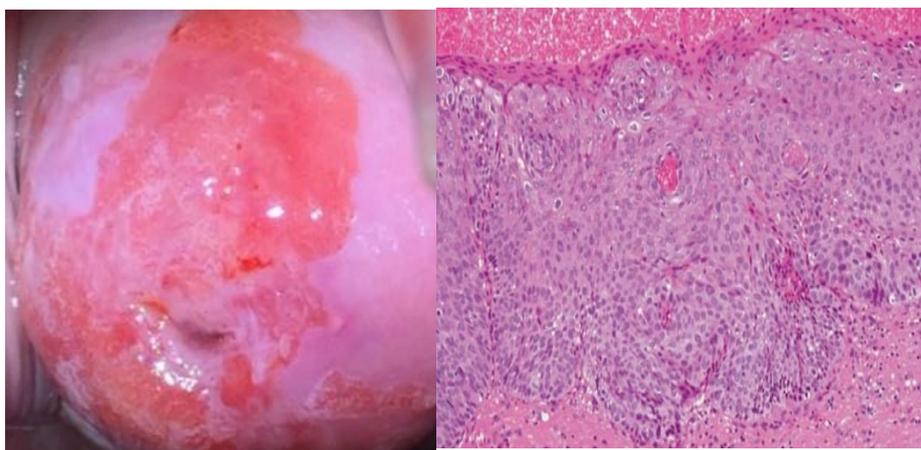


Рис. 3. Результаты кольпоскопии при гистологически подтвержденном диагнозе HSIL

Плотный АБЭ встречался достоверно чаще при РШМ по сравнению с группой LSIL ($p = 0,01$; ОШ 4,8, 95% ДИ 1,3–18). Атипичические сосуды выявлялись достоверно чаще при РШМ по сравнению с 4-й группой (HSIL) ($p = 0,02$; ОШ 0,2, ДИ 0,05–0,9) и 2-й группой (хронический цервицит) ($p = 0,002$; ОШ 7,1, 95% ДИ 1,8–27,6). Нежная мозаика достоверно чаще встречалась при HSIL и LSIL (3-я и 4-я группы) по сравнению с пациентками группы хронического цервицита (2-я группа).

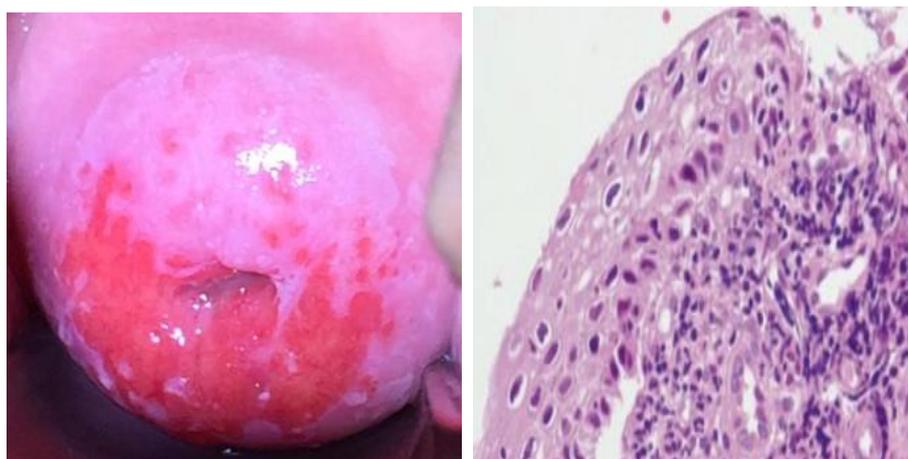


Рис. 4. Результаты кольпоскопии у пациенток с гистологическим диагнозом LSIL

Таким образом, изменения эпителия при кольпоскопии достоверно чаще встречались среди пациенток 4-й и 5-й групп – АБЭ и АБЭ с мозаикой и/или пунктацией в 5 раз чаще выявлялся у пациенток с CIN различной степени тяжести. Также в данных группах чаще встречались открытые железы и атипические сосуды.

3.3. Результаты ВПЧ-типирования

Следующей задачей нашего исследования было выявить распространенность ВПЧ-инфекции среди исследуемых пациенток, провести ВПЧ-генотипирование и оценить вирусную нагрузку по группам (рис. 5).

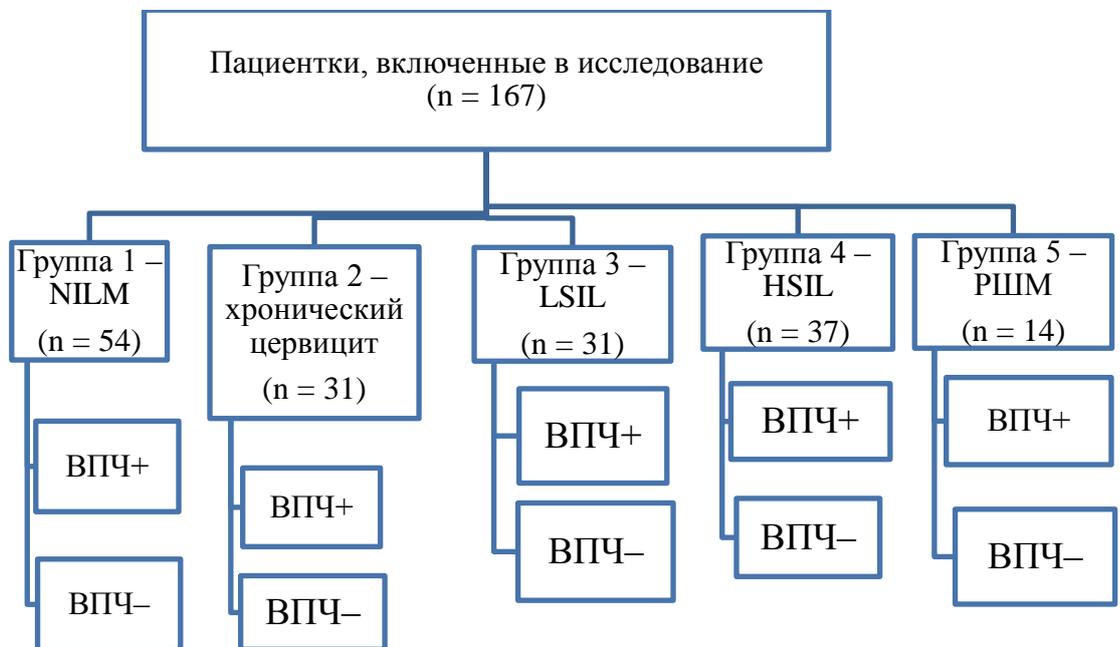


Рис. 5. Дизайн исследования

Всем пациенткам ($n = 167$) было проведено обследование с целью выявления ВПЧ методом мультиплексной ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени для количественного определения и типирования ВПЧ типа 21. В целом во всех группах пациенток ВПЧ выявлен у 99 (59,2%) пациенток. Для решения поставленной задачи были отобраны пациентки 2–5-й групп ($n = 113$). В группе 2 (хронический цервицит) ВПЧ встречался у 15 (48,4%) пациенток, в группе 3 – у 26 (83,9%), в группе 4 – у 27 (72,9%), в группе 5 – у 8 (57,1%) (рис. 6).

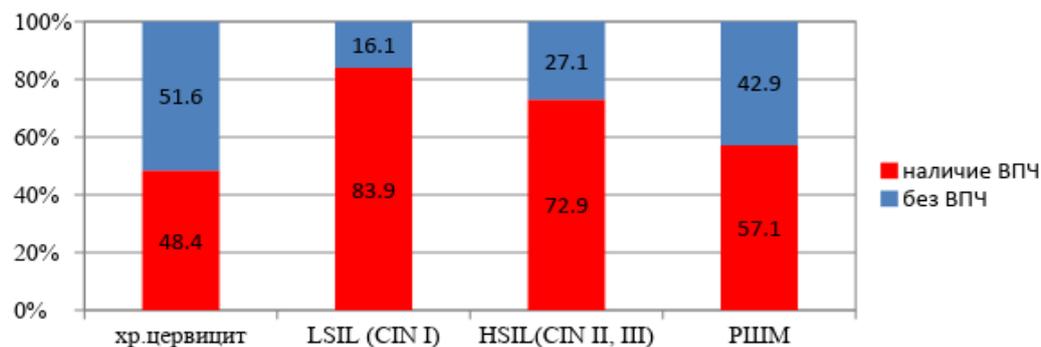


Рис. 6. Наличие ВПЧ в разных группах

В 2012 г. Международное агентство по изучению рака (IARC) выделило 3 группы ВПЧ высокого риска:

- группа 1 – высокого канцерогенного риска (типы 16, 52, 33, 58, 31, 35, 45, 18, 39, 56, 51);
- группа 2А – вероятного канцерогенного риска (тип 68);
- группа 2В – возможного канцерогенного риска (типы 53, 66, 82, 73).

Нами был произведен анализ типов ВПЧ с учетом представленной классификации среди отобранных пациенток (табл. 17).

Таблица 17. Сравнительный анализ распределения типов ВПЧ по группам (с учетом классификации IARC) в исследуемых группах пациенток

		Хронический цервицит	LSIL (CIN I)	HSIL (CIN II, III)	РШМ	Хронический цервицит + 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

Среди выявленных типов ВПЧ высокого канцерогенного риска (1-я группа) в целом встречался в 99 (88,4%) случаях, при этом наиболее часто определялись группы А9 (66,1%), А7 (11,6%), А6 (4,5%), А5 (6,3%). При оценке встречаемости ВПЧ по группам выявлено, что наиболее часто ВПЧ 1-й группы встречается среди пациенток с HSIL (42,4%), в группе пациенток с хроническим цервицитом – в 15,1% случаев, LSIL – 32,3%, РШМ – 10,1%.

Среди ВПЧ 1-й группы наиболее часто встречались А9 – в 74 (66,1%) случаях, А7 – в 13 (11,6%), А5 – в 7 (6,3%), А6 – в 5 (4,5%) случаях.

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

ВПЧ группы 2В встречался в 8 (7,1%) случаях, причем в 7 случаях в группах LSIL и хронического цервицита, в 2 случаях – при HSIL и РШМ. В основном встречались филогенетические группы А11, А6, А5 – 11,8; 4,5 и 0,9% соответственно.

На следующем этапе нами проведена детальная оценка распределения типов ВПЧ по группам. Следует отметить, что во всех группах пациенток наиболее часто встречался ВПЧ группы 1.

Нами был отдельно рассмотрен ВПЧ группы 1 и оценена его встречаемость в соответствии с филогенетическими группами ВПЧ (табл. 19). Во 2-й группе пациенток (хронический цервицит) типы ВПЧ были распределены следующим образом: наиболее часто, как и в остальных группах, встречался ВПЧ группы А9 – 73,3%, А6 – 13,3%, А7 и А5 – 6,7%.

В группе LSIL также наиболее часто встречался ВПЧ группы А9 (71,9%), следующей по частоте стала группа А7, ее доля составила 15,6%, а группы А5 и А6 составляли в 9,4 и 3,1% соответственно.

В группе пациенток с HSIL и РШМ ВПЧ группы А9 встречался в 73,8 и 90% случаев соответственно. Группа А7 – в 14,3% случаев среди пациенток с HSIL и 10% – с РШМ. Группы А6 и А5 встречались в 4,8 и 7,1% случаев среди пациенток с HSIL и не определялись в группе РШМ.

Таблица 18. Встречаемость филогенетических групп ВПЧ в исследуемых группах, %

		Хронический цервицит	LSIL (CIN I)	HSIL (CIN II, III)	РШМ	Хронический цервицит + LSIL (CIN I)	HSIL (CIN II, III) + РШМ
Группа 1		100%	100%	100%	100%	100%	100%
А9	16, 52, 33, 58, 31, 35	73,3	71,9	73,8	90,0	72,3	76,9
А7	39, 45, 18	6,7	15,6	14,3	10,0	12,8	13,5

A6	56	13,3	3,1	4,8	0,0	6,4	3,8
A5	51	6,7	9,4	7,1	0,0	8,5	5,8

ВПЧ группы 2А (вероятного канцерогенного риска) в целом встречался в 4,5% случаев. Данная группа ВПЧ, согласно классификации IARC, представлена одним-единственным типом ВПЧ – 68, относящимся к группе А7.

ВПЧ типа 68 встречался при HSIL (CIN II/III) в 8,1% случаев, при РШМ – в 7,1%, при LSIL (CIN I) – в 3,2%, в группе пациенток с хроническим цервицитом не определялся.

В ряде международных исследований, в частности Международного агентства по исследованию рака (IARC) и Всемирной организации здравоохранения (WHO), был изучен канцерогенный потенциал ВПЧ типа 68 в совокупности с другими типами ВПЧ. Результаты этих исследований показывают, что ВПЧ данного типа имеет высокий канцерогенный потенциал и играет ключевую роль в развитии РШМ в 3,5 раза чаще, чем другие редко встречающиеся типы ВПЧ группы А7.

ВПЧ типа 68 относится к группе 2А (вероятно канцерогенного риска), что и было показано полученными результатами нашего исследования. Выявлена тесная связь с ВПЧ типов 39, 45, 18, 70, 59. Результаты исследования показывают, что ВПЧ типа 68 имеет высокий канцерогенный потенциал и, следовательно, играет ключевую роль в процессе канцерогенеза. Несмотря на лидирующую позицию ВПЧ группы А9 в развитии CIN, обращает на себя внимание высокая частота встречаемости ВПЧ групп А7, А5, А6.

По результатам анализа встречаемости ВПЧ возможного канцерогенного типа группа 2В в целом составила 7,1% случаев. Группа 2В представлена ВПЧ групп А6 (53, 56), А5 (82), А11 (73). Из всех типов возможного канцерогенного риска (группа 2В), представленных в классификации среди пациенток HSIL, нами обнаружен только ВПЧ типа 53 у 1 пациентки, при РШМ ВПЧ группы 2В не выявлялся. В группе пациенток с хроническим цервицитом ВПЧ группы А6 (53, 66) составил 6,5% случаев, а А11 – 3,2%. В группе с LSIL ВПЧ группы А6 встречался в 6,5% случаев, а А5 и А11 – в 3,2% случаев.

Исходя из результатов настоящего исследования, мы выделили в отдельную группу другие типы ВПЧ, которые достаточно часто встречались у пациенток исследуемых групп и ассоциировались в основном с поражениями эпителия шейки матки легкой степени. Так, например, ВПЧ типов 44/55 встречался в 13,5% случаев, типа 51 – в 9,6%, типов 11 и 66 – в 6,4%, типа 6 – в 3,2% в группе пациенток с LSIL.

Таким образом, редко встречаемые типы ВПЧ групп 2А и 2В могут являться этиологическим фактором развития LSIL, а персистенция данных типов ВПЧ при хроническом цервиците может способствовать развитию SIL.

На рисунках 7, 8 схематически представлено распределение групп ВПЧ среди исследуемых пациенток с наглядным превалированием ВПЧ высокого канцерогенного риска (группа 1), а также ВПЧ группы А9.

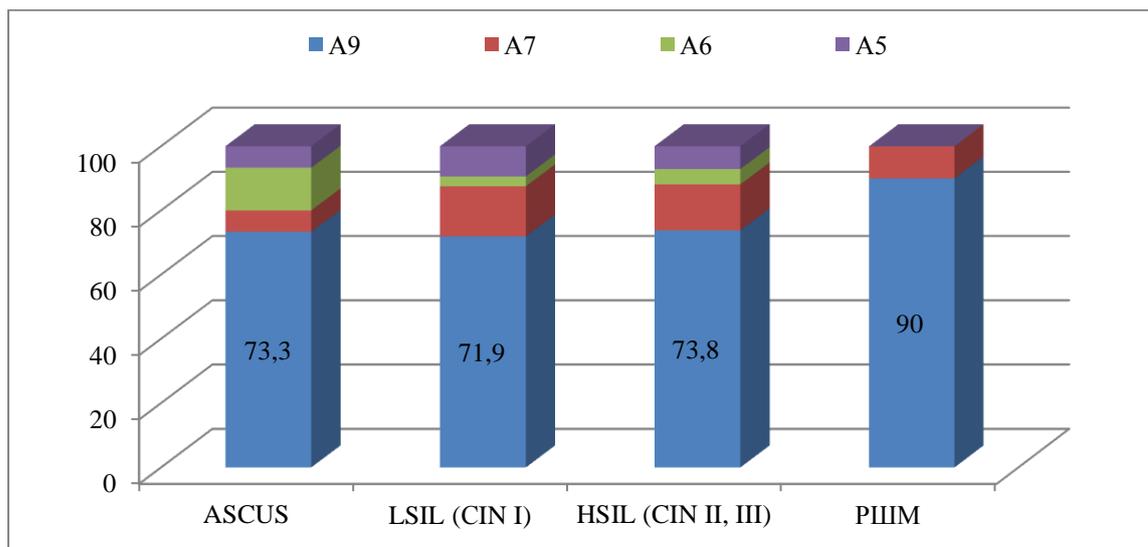


Рис. 7. Встречаемость групп ВПЧ высокого канцерогенного риска (группа 1) у пациенток с LSIL, HSIL и P16M, %

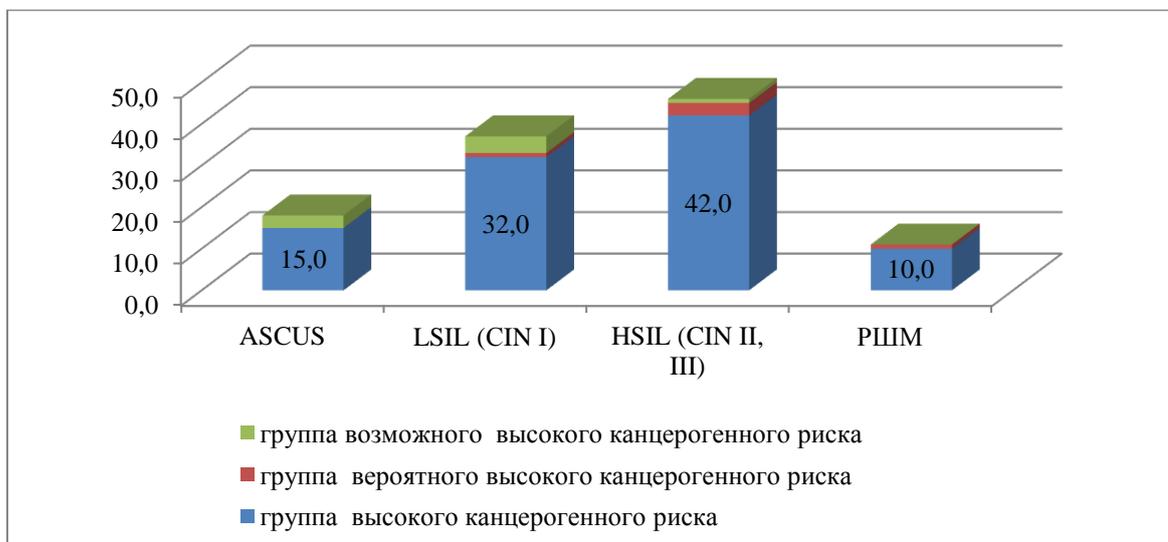


Рис. 8. Встречаемость ВПЧ групп 1, 2А, 2В среди пациенток с CIN и PSM, %

На следующем этапе нами была произведена оценка вирусной нагрузки среди пациенток исследуемых групп (рис. 9).

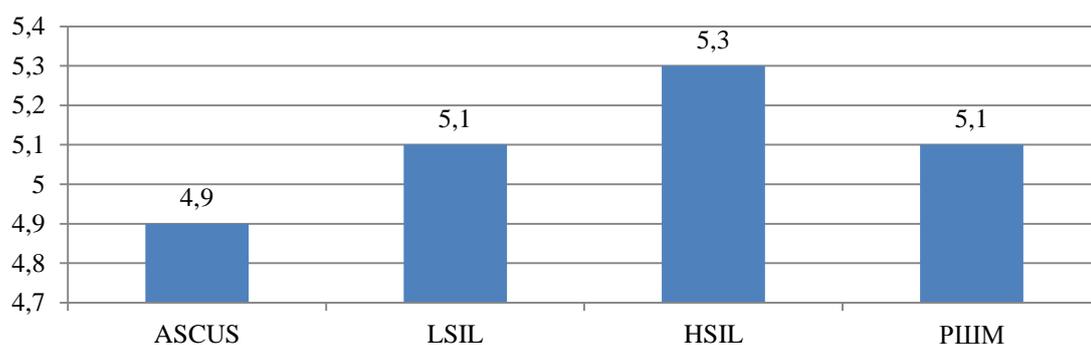
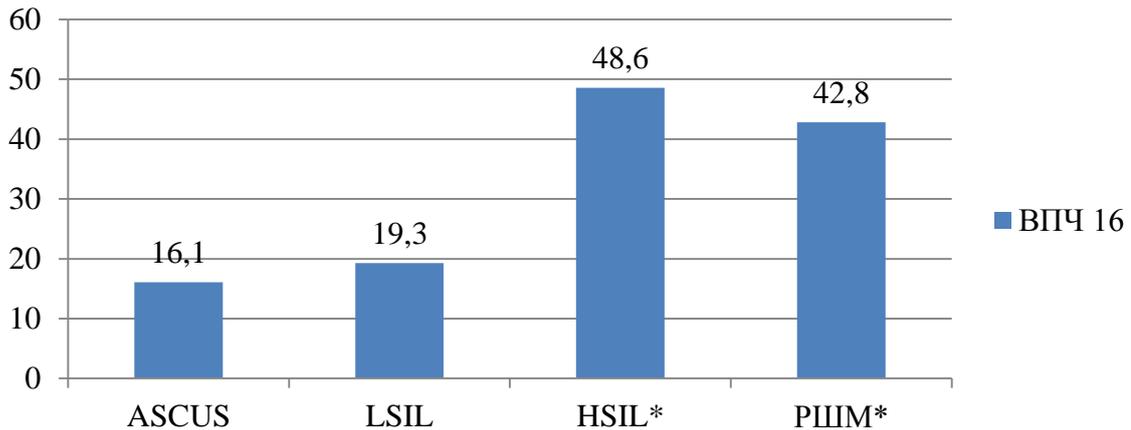


Рис. 9. Значение вирусной нагрузки по группам

Вирусная нагрузка в группе пациенток с хроническим цервицитом (ASC-US) составила 4,9 (4,41–5,3) log копий вируса в образце; в группе 3 (LSIL) – 5,1 (4,75–5,6) log копий вируса в образце; в группе 4 (HSIL) – 5,35 (4,7–5,8) log копий вируса в образце; в группе 5 (PSM) – 5,1 (5–5,2) log копий вируса в образце. Величина вирусной нагрузки ассоциировалась со степенью поражения CIN и была выше в группе HSIL. В группе PSM выявлена тенденция к увеличению показателя p (0,0693), что, возможно, связано с небольшой выборкой.

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

Нами была проанализирована взаимосвязь часто встречающихся типов ВПЧ при CIN различной степени тяжести и РШМ (рис. 10).



* $p = 0,001$.

Рис. 10. Встречаемость ВПЧ типа 16

Достоверно чаще встречался ВПЧ типа 16 при HSIL и РШМ ($p = 0,001$). Следует также отметить высокую частоту встречаемости ВПЧ типов 31, 33, 52, 58 у пациенток с CIN и РШМ по сравнению с другими типами ВПЧ, что подтверждает высокоонкогенный потенциал данных типов ВПЧ.

Заключение

По результатам анализа встречаемости ВПЧ группы 1 обнаружен у пациенток с HSIL пациенток с HSIL в 42,4% случаев, в группе хронического цервицита – в 15,1%, LSIL – в 32,3%, РШМ – в 10,1%.

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

ВПЧ группы 2А (тип 68) встречался в основном в группах пациенток с HSIL и РШМ, что подчеркивает ключевую роль ВПЧ данного типа в развитии тяжелых поражений шейки матки.

ВПЧ группы 2В в большинстве случаев встречался в группах с малыми поражениями эпителия шейки матки – при LSIL и хроническом цервиците.

3.3. Результаты экспрессии миРНК

На следующем этапе нашей работы был проведен анализ результатов экспрессии миРНК у пациенток, включенных в исследование. Исследовали экспрессию четырех противоонкогенных миРНК – miR-143, -145, -199 и -122 в соскобах из шейки матки при неоплазии низкой и высокой степени (LSIL, HSIL) и РШМ.

В таблице 19 приведено описание миРНК, исследуемых в данной работе.

На рисунке 11 приведены результаты оценки уровня экспрессии миРНК в соскобе эпителия из шейки матки при неоплазии различной степени тяжести.

Таблица 19. Уровень экспрессии миРНК в эпителии шейки матки в норме, при цервикальной интраэпителиальной неоплазии и раке шейки матки

МиРНК	Группы	Кол-во	Медиана	Квартили 1–3	Снижение относительно нормы, раз	p ₁	p ₂
miR-143	Норма	30	0,42	0,28–0,85			
	ASC-US	21	0,23	0,12–0,5	1,8	>0,05	
	LSIL	32	0,19	0,07–0,38	2,2	0,006	
	HSIL	26	0,11	0,007–0,29	3,8	0,0002	
	PIIM	13	0,036	0,02–0,25	11,6	0,001	0,03
miR-145	Норма	30	0,013	0,008–0,03			
	ASC-US	21	0,009	0,006–0,03	1,4	>0,05	
	LSIL	32	0,0066	0,002–0,014	2,0	0,002	
	HSIL	26	0,0078	0,005–0,015	1,7	0,04	
	PIIM	13	0,0034	0,001–0,006	3,8	0,006	0,03
miR-199	Норма	30	0,0055	0,002–0,011			
	ASC-US	21	0,003	0,0007–0,014	1,8	>0,05	
	LSIL	32	0,001	0,0001–0,0064	5,5	0,016	
	HSIL	26	0,0004	0,00003–0,004	13,7	0,001	
	PIIM	13	0,0013	0,0007–0,0016	2,6	0,004	>0,05
miR-122	Норма	30	0,0005	0,0002–0,006			
	ASC-US	21	0,00007	0,00001–0,001	7,0	>0,05	
	LSIL	32	0,0014	0,0001–0,05		>0,05	
	HSIL	26	0,0004	0,00004–0,003	1,3	>0,05	
	PIIM	13	0,00005	0,00001–0,008	10,0	>0,05	

Примечание. p₁ – статистически значимые различия по сравнению с нормой; p₂ – статистически значимые различия по сравнению с HSIL.

У женщин с диагнозом хронического цервицита (ASC-US) (2-я группа) не выявлено статистически значимых отличий экспрессии ни одной из исследованных миРНК.

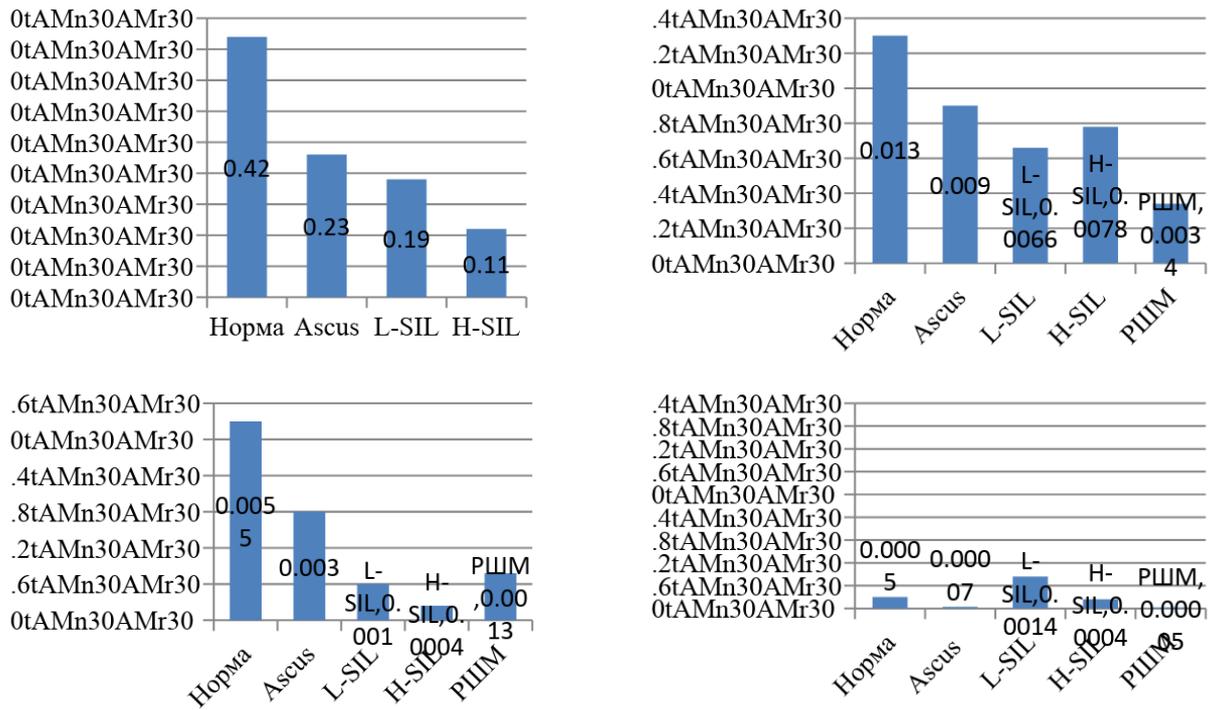


Рис. 11. Уровень экспрессии миРНК в эпителии шейки матки в норме, при цервикальной интраэпителиальной неоплазии и раке шейки матки

Данные, полученные в ходе работы, показали выраженное снижение экспрессии miR-143 в соскобе из шейки матки по мере утяжеления степени неопластического поражения (рис. 11). Наибольшее снижение по сравнению с нормой отмечено при РШМ – в 11,6 раза ($p = 0,0001$), в 3,8 раза при HSIL и 2,2 раза при LSIL. При этом экспрессия miR-143 при РШМ в 3,1 раза ниже, чем при HSIL ($p = 0,03$), и в 5,3 раза ниже, чем при LSIL ($p = 0,008$). Уровень экспрессии miR-143 у женщин с HSIL был снижен и по сравнению с LSIL, хотя это различие было недостоверным.

Аналогичный характер изменения экспрессии (но в меньшей степени) выявлен для miR-145: снижение по сравнению с нормой в 3,8 раза при РШМ ($p = 0,0006$), в 1,7 раза при HSIL ($p = 0,04$) и в 2 раза при LSIL ($p = 0,002$). У женщин с HSIL и LSIL уровень экспрессии miR-145 был практически одинаковым. У женщин с РШМ экспрессия данной миРНК была в 1,9 раза ниже, чем с HSIL ($p = 0,03$), и в 2,3 раза – чем с LSIL ($p = 0,02$).

Экспрессия miR-199 в соскобах из шейки матки также была снижена у пациенток с HSIL, LSIL и РШМ, однако зависимости от тяжести поражения не выявлялось.

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

С целью оценки возможности применения значений уровня экспрессии миРНК в соскобах из шейки матки для дифференциальной диагностики степени неопластического поражения был применен ROC-анализ. Результаты представлены в таблицах 20.

Таблица 20. Данные логистического регрессионного анализа ROC-кривой сравнения уровней экспрессии миРНК в норме и неоплазии шейки матки (Н+L+C)

МиРНК	Площадь под кривой	Уровень отсечки (у.е.)	Чувствительность (%)	Специфичность (%)	Диагностическая точность (%)	ОШ (95% ДИ)
miR-143	0,78	0,32	73,3	77,8	75,6	9,63 (3,2–30,8)
miR-145	0,70	0,0093	70,0	70,4	70,2	9,52 (3,13–31,96)
miR-199	0,724	0,0066	73,3	67,6	70,5	5,74 (2,04–17,0)

Примечание. p – уровень значимости <0,001.

Наибольшая диагностическая точность (75,6%) выявления неопластических поражений достигалась по результатам оценки уровня экспрессии miR-143 (табл. 20). При значениях уровня экспрессии ниже 0,32 у.е. (уровень отсечки) чувствительность диагностики цервикальной неоплазии (LSIL, HSIL) или РШМ составила 73,3%, специфичность – 77,8% (табл.20). При таком уровне экспрессии риск неопластического поражения для группы LSIL повышен в 9,63 раза (p <0,001). В отношении РШМ при уровне экспрессии miR-143 ниже 0,31 у.е. чувствительность 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 цитологической картиной. В ходе анализа было установлено, что наилучшими классифицирующими свойствами обладает miR-143. Уровень данной миРНК являлся единственной независимой переменной, ассоциированной со степенью тяжести цервикальной неоплазии. Лямбда Уилкса для miR-143 составила 0,83 ($p = 0,004$). Все остальные анализируемые миРНК были исключены из модели. Полученные результаты объяснялись выраженной корреляцией уровней экспрессии данных миРНК.

Таблица 21. Корреляционный анализ уровня экспрессии миРНК

		miR-122	miR-143	miR-145	miR-199
miR-122	Корреляция Пирсона	1	-,111	-,107	-,210*
	Знч.(2-сторон)		,272	,292	,037
	N	99	99	99	99
miR-143	Корреляция Пирсона	-,111	1	,344**	,805**
	Знч.(2-сторон)	,272		,000	,000
	N	99	99	99	99
miR-145	Корреляция Пирсона	-,107	,344**	1	,381**
	Знч.(2-сторон)	,292	,000		,000
	N	99	99	99	99
miR-199	Корреляция Пирсона	-,210*	,805**	,381**	1
	Знч.(2-сторон)	,037	,000	,000	
	N	99	99	99	99

* Корреляция значима при уровне 0,05 (2-сторон.).

** Корреляция значима при уровне 0,01 (2-сторон.).

Вероятность наличия РШМ у женщин с уровнем экспрессии miR-143 ниже 0,31 у.е. повышена в 15,3 раза ($p < 0,001$). Применение ROC-анализа позволяет также дифференцировать РШМ от HSIL – при уровне отсечки 0,05 у.е. чувствительность дифференциации составляет 80,8%, специфичность – 61,5%, отношение шансов – 6,72 ($p = 0,012$;) (табл. 22).

Таблица 22. Данные логистического регрессионного анализа ROC-кривой сравнения уровней экспрессии миРНК при HSIL и РШМ

МиРНК	Площадь под кривой	Уровень отсечки (у.е.)	Чувствительность (%)	Специфичность (%)	Диагностическая точность (%)	ОШ (95% ДИ)	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 дифференциальной диагностики между HSIL и РШМ. Это практически с одинаковой диагностической точностью (71,1%) позволяет дифференцировать показатели экспрессии miR-141 и -145.

Таким образом, проведенные в настоящей работе исследования показали, что при неопластических поражениях шейки матки в эпителии значительно снижается синтез противоонкогенных miR-143, -145 и -199. При этом уровень экспрессии имеет выраженную корреляцию и снижается пропорционально степени тяжести поражения – минимальный уровень экспрессии этих молекул отмечен при РШМ.

3.4. Результаты экспрессии мРНК по группам

Следующим этапом нашего исследования было изучение экспрессии мРНК функциональных генов человека при различной степени поражения эпителия шейки матки и сравнение ее с экспрессией мРНК в здоровом эпителии. Для решения данной задачи было отобрано 110 пациенток, из них 37 (33,6%) – с хроническим цервицитом, 31 (28,1%) – с LSIL (CIN I), 33 (30%) – с HSIL, 9 (8,1%) – с РШМ (рис. 12).

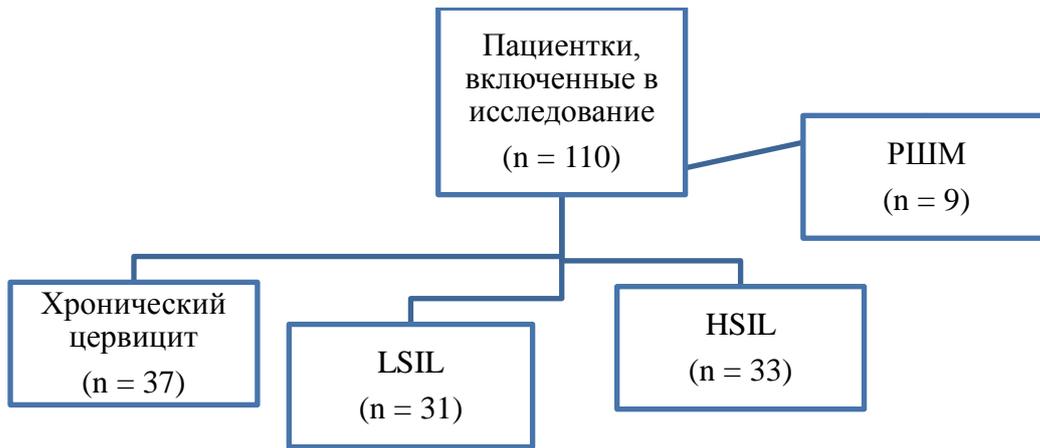


Рис. 12. Распределение пациенток по группам

Всем пациенткам проводилось определение уровня экспрессии мРНК генов человека *MKI67*, *P16*, *CCNB1*, *BIRC5*, *CDKN2A*, *BCL-2*, *BAG1*, *BAX*, *NDRG1*, *PTEN*, *ESR1*, *PGR*, *TLR7*, *OSM*, *CD68*, *PTGS2/COX*, *SCUBE2*, *CTSL2*. В качестве маркеров были выбраны гены, регулирующие пролиферацию и клеточный цикл (*P16*, *Ki67*, *CCNB1*, *BIRC5*, *CDKN2A* (изоформы *p14* и *p16*)). Маркер *P16* является белком-подавителем опухоли, а также циклинзависимым ингибитором киназы, удерживающим промежуточные звенья *cdk4* и *cdk6* между *PRb* (белок ретинобластомы) фосфорилированием для приостановки *E2F*-зависимой транскрипции и прогрессирования клеточного цикла. *Ki67* – универсальный маркер всех пролиферативных процессов, впервые выявленный с помощью моноклональных антител *KI-67*. Механизм до конца не изучен, но он экспрессируется в пролиферативной фазе клеточного цикла (*G1*, *S*, *G2*, *M*) и отсутствует в фазе *G0*. *CCNB1*, или циклин *B1*, является активатором циклинзависимых протеинкиназ – ключевых ферментов, участвующих в регуляции клеточного цикла. *BIRC5* регулирует не только апоптоз, но и митоз. Помимо этого, *BIRC5* блокирует апоптоз посредством прямого связывания с молекулами каспазы. Они являются универсальными маркерами всех пролиферативных процессов.

Маркеры апоптоза (BCL-2, BAG1, BAX, NDRG1, PTEN)

BCL-2 – антиапоптотический белок, взаимодействуя с *BAX*, препятствует митохондриальному пути апоптоза. Однако снижение экспрессии *BCL-2*

приводит к p53-опосредованному апоптозу. Снижение экспрессии при опухолях и дисплазиях ассоциировано с более неблагоприятным прогнозом заболевания.

BAH – проапоптотический ген. Димеры *BAH-BAH*, стабилизируя поры в мембране митохондрии, способствуют выходу цитохрома *C*, усиливают митохондриальный апоптоз. Снижение экспрессии при опухолях и дисплазиях ассоциировано с более неблагоприятным прогнозом заболевания.

NDRG1 – ген, играющий важную роль в процессах роста и дифференцировки клеток, также является одним из факторов p53-опосредованной активации апоптоза. Снижение экспрессии *NDRG1* коррелирует с прогрессией опухоли, неблагоприятным прогнозом при некоторых видах рака и метастазированием.

Ген *PTEN* является противоопухолевым супрессором, функционирует как фосфатаза, регулируя процессы пролиферации и апоптоза. Полагают, что соматические мутации в гене *PTEN*, обнаруживаемые во многих новообразованиях, приводят к снижению экспрессии и развитию опухолей.

Простагландин-синтетаза (*PTGS2/COX-2*) – ключевой фермент синтеза простагландинов – вырабатывается в ответ на воздействие факторов воспаления в тканях с предраковыми изменениями, сверхэкспрессируется в клетках многих разновидностей рака, приводя к подавлению апоптоза.

ESR1, *PGR* – рецепторы гормонов, взаимодействие с которыми приводит к стимуляции роста опухоли. Нарастание диспластических процессов связано с постепенной утратой чувствительности клеток к гормонам в результате исчезновения их рецепторов на клеточной мембране.

TLR7, *OSM*, *CD68* – гены иммунного ответа. *TLR7* – мембранный белок, входящий в группу толл-подобных рецепторов, обеспечивает функционирование врожденного иммунитета. Рецептор локализуется в эндосомах и распознает одноцепочечные молекулы РНК, являясь, наряду с *TLR3* и *TLR9*, компонентом антивирусной системы защиты организма. Открыт в 2000 г.

CD68 – гликопротеин семейства *LAMP*. Экспрессируется на поверхности моноцитов и макрофагов и используется в качестве маркера макрофагов.

SCUBE2 – сигнальный пептид, функция его до конца не изучена, однако при опухолях различной локализации его экспрессия значительно снижается, что позволяет использовать данный пептид в качестве высокоинформативного маркера.

Маркер инвазии *CTSL2* – ген, кодирующий протеолитический фермент из группы эндопептидаз, локализованный в лизосомах и осуществляющий внутриклеточное переваривание белков. Показана избыточная экспрессия катепсина L2 в некоторых злокачественных опухолях (табл. 23).

Таблица 23. Типы мРНК

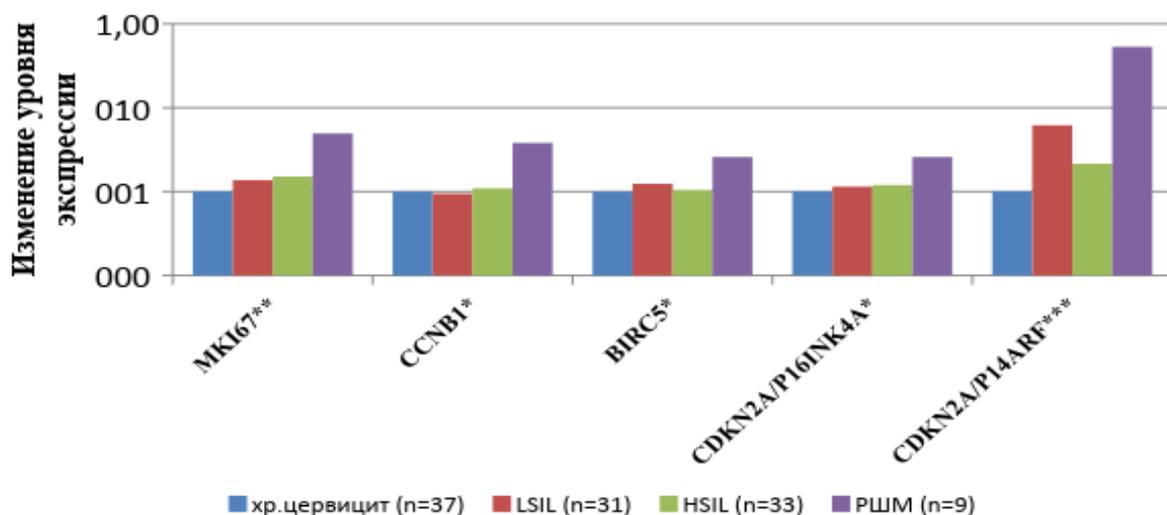
	Название гена	Функция
Пролиферация и регуляция	MKI-67 (Ki67)	Маркер клеточной пролиферации. Экспрессируется в фазы G1, S, G2, M
	CDNK2A (P16)	Ингибитор циклинзависимой киназы 2A. Играет важную роль в регуляции клеточного цикла фаз G1 и S
	P14ARF	
	CCNB1 (циклин B1)	Кодирует белок циклин B1 семейства циклинов, контролирующей смену фаз клеточного цикла. Активация комплекса циклин B–Cdk2 необходима для перехода фаз G2/M
	BIRC5	Кодирует белок семейства ингибиторов апоптоза, непосредственно ингибирующий каспазы, – ингибитор апоптоза
	BCL-2	Кодируемый белок обладает антиапоптотической активностью. Образуя комплекс с белком BAG, блокирует выделение цитохрома C из мембранного пространства митохондрии
	BAX	Белок этого гена регулирует высвобождение цитохрома C и является антагонистом BCL-2 и BAG
	BAG1	Коактиватор BCL-2, обладающий антиапоптотическими свойствами
Апоптоз	NDRG1	Кодирует белок, необходимый для p53-опосредованной активации каспаз (проапоптотические свойства)
	PTEN	Кодирует белок с фосфатазной активностью, фосфорилирующий молекулярные мишени пролиферативного каскада Akt/PKB, чем и объясняются его антипролиферативные свойства как опухолевого супрессора
Маркеры рецепторов гормонов	ESR1	Ген кодирует ER-а
	PGR	Ген кодирует PGR-A
Гены иммунного ответа	TLR7	Толл-подобный рецептор 7, обеспечивает развитие реакций врожденного иммунитета. Рецептор локализуется в эндосомах и распознает одноцепочечные молекулы РНК, являясь компонентом антивирусной системы защиты организма
	OSM	Онкостатин M является членом семейства интерлейкина-6, играет ключевую роль в целом ряде физиологических и патофизиологических процессов, включая воспаление, тканевую реконструкцию, развитие и рост клеток
	CD68	CD68 (кластер дифференцировки 68) используется в качестве маркера макрофагов. CD68 играет важную роль во внутриклеточном метаболизме и во внеклеточных взаимодействиях
Сигнальный пептид	PTGS2 (COX-2)	COX-2 кодируется геном PTGS-2. Участвует в превращении арахидоновой кислоты в простагландины H2
	SCUBE2	Сигнальный пептид с неизвестной функцией

Нами был проведен анализ уровня экспрессии отдельных молекулярных маркеров в пораженной ткани шейки матки (табл. 24). Так, экспрессия маркера Ki67 в группе пациенток с хроническим цервицитом составляла в среднем 0,065 и была достоверно ниже по сравнению с РШМ – 0,32 ($p = 1,1 \times 10^{-5}$). Также достоверные значения были выявлены в экспрессии данного гена среди пациенток с хроническим цервицитом (0,65) и HSIL (0,10) ($p = 0,027$). В группе пациенток с LSIL и HSIL экспрессия Ki67 была также достоверно ниже по сравнению с РШМ ($p = 2,7 \times 10^{-5}$, $p = 3,0 \times 10^{-4}$ соответственно) (табл. 24). Из этого можно сделать следующий вывод: экспрессия маркера Ki67 связана со степенью тяжести процесса и выше при тяжелой степени CIN и РШМ (рис. 13).

Таблица 24. Значения экспрессии мРНК при CIN различной степени тяжести в пораженной ткани (Me (Q13))

Больной участок	Хронический цервицит (n = 37)	LSIL (n = 31)	HSIL (n = 33)	РШМ (n = 9)
Ki67	0,065 (0,042–0,086) $p_{1-2} = 0,027$ $p_{1-4} = 1,1 \times 10^{-5}$ $p_{2-3} = 2,7 \times 10^{-5}$ $p_{3-4} = 3,0 \times 10^{-4}$	0,088 (0,059–0,14) $p_{2-4} = 2,7 \times 10^{-5}$	0,10 (0,058–0,21) 0,1 (0,06–0,22) $p_{1-3} = 0,027$ $p_{3-4} = 3,0 \times 10^{-4}$	0,32 (0,24–0,57) $p_{1-4} = 1,1 \times 10^{-5}$ $p_{2-4} = 2,7 \times 10^{-5}$ $p_{3-4} = 3,0 \times 10^{-4}$
p16INK4A	0,058 (0,025–0,090) $p_{1-4} = 0,024$	0,066 (0,020–0,176)	0,056 (0,010–0,353)	0,151 (0,073–0,488) $p_{1-4} = 0,024$
p14ARF (p19Arf)	0,001 (0–0,002) $p_{1-2} = 0,001$ $p_{1-4} = 4,7 \times 10^{-4}$	0,006 (0,002–0,042) $p_{1-2} = 0,001$	0,002 (0,0004–0,015) $p_{1-3} = 0,025$	0,053 (0,016–0,121) $p_{1-4} = 4,7 \times 10^{-4}$
CCNB1	0,091 (0,54–0,123) $p_{1-4} = 1,9 \times 10^{-4}$	0,085 (0,54–0,143) $p_{2-4} = 0,004$	0,100 (0,050–0,163) $p_{3-4} = 0,002$	0,349 (0,237–0,658) $p_{1-4} = 1,9 \times 10^{-4}$ $p_{2-4} = 0,004$ $p_{3-4} = 0,002$
BIRC5/surviving	0,159 (0,105–0,269) $p_{1-4} = 0,001$	0,198 (0,123–0,380) $p_{2-4} = 0,021$	0,166 (0,076–0,425)	0,413 (0,319–0,585) $p_{1-4} = 0,001$ $p_{2-4} = 0,021$
BCL-2	0,016 (0,003–0,046) $p_{1-3} = 0,015$ $p_{1-4} = 8,9 \times 10^{-5}$	0,015 (0,005–0,026) $p_{2-3} = 0,039$ $p_{2-4} = 1,1 \times 10^{-4}$	0,008 (0,002–0,017) $p_{1-3} = 0,015$ $p_{2-3} = 0,039$ $p_{4-3} = 0,001$	0,0008 (0,0005–0,0017) $p_{1-4} = 8,9 \times 10^{-5}$ $p_{2-4} = 1,1 \times 10^{-4}$ $p_{3-4} = 0,001$
BAG1	0,615 (0,425–0,812)	0,667 (0,581–	0,482 (0,406–	0,486 (0,423–

		0,809) $p_{2-3} = 4,1 \times 10^{-4}$	0,630) $p_{2-3} = 4,1 \times 10^{-4}$	0,955)
BAX	0,023 (0,010–0,040) $p_{1-4} = 0,005$	0,027 (0,008–0,070) $p_{2-4} = 0,012$	0,013 (0,005–0,034)	0,006 (0,003–0,009) $p_{1-4} = 0,005$ $p_{2-4} = 0,012$
NDRG1	0,061 (0,010–0,287) $p_{1-4} = 0,005$	0,152 (0,051 – 0,417) $p_{2-3} = 0,001$ $p_{2-4} = 0,000$	0,023 (0,009–0,145) $p_{2-3} = 0,001$	0,03 (0,0006–0,013) $p_{1-4} = 0,005$ $p_{2-4} = 0,000$
ESR1	1,414 (0,890–2,549) $p_{1-3} = 2,14,1 \times 10^{-4}$ $p_{1-4} = 1,1, \times 10^{-5}$	1,217 (0,785–1,659) $p_{2-3} = 0,004$ $p_{2-4} = 2,7 \times 10^{-5}$	0,488 (0,255–1,148) $p_{1-3} = 2,14,1 \times 10^{-4}$ $p_{2-3} = 0,004$ $p_{4-3} = 2,5 \times 10^{-4}$	0,056 (0,013–0,126) $p_{1-4} = 1,1,1 \times 10^{-5}$ $p_{2-4} = 2,7 \times 10^{-5}$
PGR	0,247 (0,163–0,482) $p_{1-3} = 0,001$ $p_{1-4} = 2,1 \times 10^{-5}$	0,159 (0,094–0,225) $p_{2-4} = 1,1 \times 10^{-4}$	0,135 (0,063–0,211) $p_{3-4} = 3,6 \times 10^{-4}$	0,019 (0,005–0,07) $p_{1-4} = 2,1 \times 10^{-5}$ $p_{2-4} = 1,1 \times 10^{-4}$ $p_{3-4} = 3,6 \times 10^{-4}$
OSM	0,003 (0,001–0,007) $p_{1-4} = 0,009$	0,004 (0,001–0,009)	0,003 (0,001–0,007)	0,022 (0,006–0,04) $p_{1-4} = 0,009$
CD68	0,965 (0,374 –1,65) $p_{1-4} = 0,023$	0,934 (0,500–1,74) $p_{2-3} = 0,024$ $p_{2-4} = 0,017$	0,594 (0,383–0,954) $p_{2-3} = 0,024$	0,490 (0,195–0,612) $p_{1-4} = 0,023$ $p_{2-4} = 0,017$
COX-2	0,020 (0,007–0,155) $p_{1-4} = 0,043$	0,039 (0,005–0,235) $p_{2-4} = 0,040$	0,022 (0,004–0,080)	0,009 (0,003–0,017)
SCUBE2	0,023 (0,008–0,032) $p_{1-2} = 0,038$	0,012 (0,004–0,020) $p_{2-4} = 9,5 \times 10^{-5}$	0,007 (0,003–0,022) $p_{1-3} = 0,015$ $p_{3-4} = 1,2 \times 10^{-4}$	0,0005 (0,0003–0,001) $p_{1-3} = 0,015$ $p_{1-4} = 1,1 \times 10^{-5}$ $p_{2-4} = 09,5 \times 10^{-5}$



* Различия достоверны при PШМ.

** Различия достоверны при PШМ и HSIL.

*** Различия достоверны при PШМ, HSIL и LSIL.

Рис. 13. Изменение уровня экспрессии маркеров пролиферации

Средние значения экспрессии маркера P16 в группе с хроническим цервицитом составили 0,058, в группе LSIL – 0,066, в группе HSIL – 0,056 и в группе пациенток с PШМ – 0,151. При PШМ экспрессия данного гена достоверно выше по сравнению с 1-й группой ($p = 0,024$), это свидетельствует о том, что повышение экспрессии маркера P16 связано с увеличением тяжести неопластического процесса. Нами рассмотрен указанный маркер с помощью молекулярно-генетического метода, в частности ПЦР в режиме реального времени, при различной степени поражения эпителия шейки матки (рис. 13).

Средняя экспрессия маркера p14ARF в группе пациенток с хроническим цервицитом – 0,001, в группе LSIL – 0,006, HSIL – 0,002 и в группе PШМ – 0,053. Отмечается достоверное повышение по сравнению с 1-й группой в группе LSIL ($p = 0,001$), HSIL ($p = 0,025$) и PШМ ($p = 4,7 \times 10^{-4}$). Вывод: экспрессия маркера p14ARF повышается по мере возрастания патологического процесса (рис. 13). Полученные нами результаты показывают наибольшую значимость экспрессии маркера p14ARF по сравнению с P16 во 2–4-й группах.

Средняя экспрессия маркера CCNB1 в группе пациенток с хроническим цервицитом – 0,091, в группе LSIL – 0,085, HSIL – 0,100 и в группе PШМ –

0,349. Наблюдается достоверное повышение экспрессии данного маркера в группе РШМ по сравнению с группой хронического цервицита ($p = 1,9 \times 10^{-4}$), LSIL ($p = 0,004$), а также HSIL ($p = 0,002$). Повышенная экспрессия данного маркера может свидетельствовать об увеличении тяжести предракового и ракового процесса, и он может быть использован как маркер дифференциальной диагностики и РШМ (рис. 13).

Средняя экспрессия маркера BIRC5 в группе пациенток с хроническим цервицитом – 0,159, в группе LSIL – 0,198, HSIL – 0,166 и в группе РШМ – 0,413. Наблюдается достоверное повышение экспрессии маркера BIRC5 в группе РШМ ($p = 0,001$) по сравнению с 1-й группой, а также в группе РШМ по сравнению с группой пациенток с LSIL ($p = 0,021$). Повышение экспрессии данного маркера указывает на тяжесть предракового и ракового процесса (рис. 13).

Средние уровни экспрессии маркера BCL-2 отличались между группами и составили: в группе пациенток с хроническим цервицитом – 0,016, в группе CIN I – 0,056, CIN II/III – 0,084 и в группе РШМ – 0,0008. Следует отметить, что экспрессия маркера BCL-2 достоверно снижается по мере роста тяжести неопластического процесса ($p < 0,05$). Следовательно, снижение экспрессии BCL-2 свидетельствует о неблагоприятном прогнозе заболевания (рис. 14).

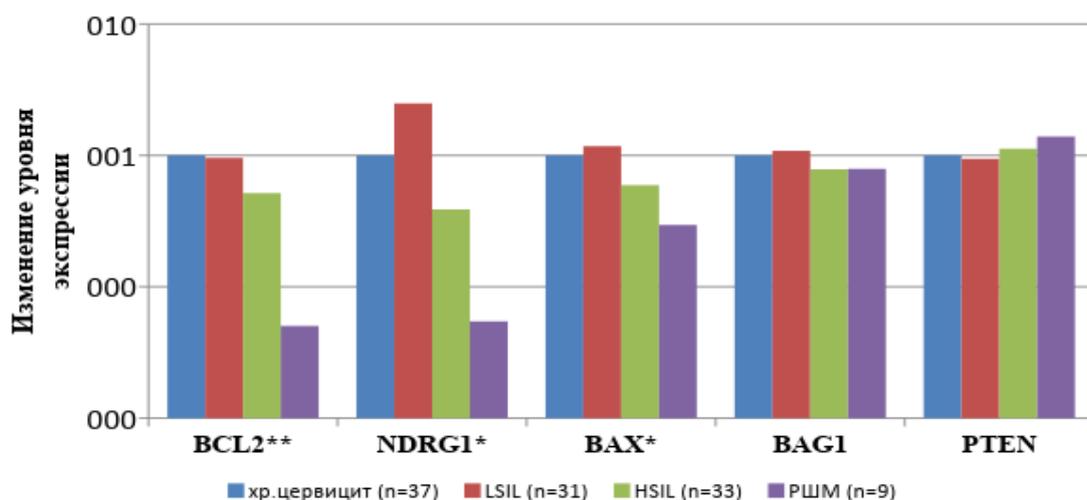


Рис. 14. Изменение уровня экспрессии генов апоптоза

Значения уровня экспрессии маркера BAG1 в группе пациенток с хроническим цервицитом составили в среднем 0,61, в группе LSIL – 0,66, HSIL –

0,48 и в группе РШМ – 0,48. Были выявлены достоверные отличия экспрессии маркера BAG1 между 2-й и 3-й группами. Отмечалось увеличение экспрессии при LSIL ($p = 4,1 \times 10^{-4}$) (рис. 14).

Средняя экспрессия маркера BAX составила в группе пациенток с хроническим цервицитом – 0,023, в группе LSIL – 0,027, HSIL – 0,013 и в группе РШМ – 0,006. Выявлено достоверное снижение экспрессии маркера в группе РШМ ($p = 0,005$) по сравнению с 1-й группой и группой LSIL ($p = 0,012$). Таким образом, достоверное снижение маркера апоптоза выявлено в 4-й группе, что позволяет нам рассматривать его в качестве маркера дифференциальной диагностики степени тяжести неоплазии и рака шейки матки (рис. 14).

Средняя экспрессия маркера NDRG1 в группе пациенток с хроническим цервицитом – 0,061, в группе LSIL – 0,152, HSIL – 0,023 и в группе РШМ – 0,003. Отмечается достоверное отличие в группе РШМ ($p = 0,005$) по сравнению с 1-й группой. Также отмечается достоверное отличие в группах LSIL и HSIL ($p = 0,001$) и между LSIL и РШМ ($p = 0,0000$). Пониженная экспрессия маркера NDRG1 в группах HSIL и РШМ дает нам право использовать данный маркер в диагностике CIN высокой степени тяжести, а также как предиктор малигнизации (рис. 14).

Средняя экспрессия мРНК гена ESR1 в группе пациенток с хроническим цервицитом – 1,41, в группе LSIL – 1,21, в группе HSIL – 0,48 и в группе РШМ – 0,05. Было выявлено достоверное снижение экспрессии мРНК гена ESR1 в группах LSIL, HSIL, РШМ ($p < 0,05$). При РШМ экспрессия мРНК гена ESR1 была в 28 раз ниже, чем при хроническом цервиците. Вывод: экспрессия данного гена снижается по мере увеличения тяжести процесса. Данный молекулярный ген может быть использован как диагностический маркер при цервикальной интраэпителиальной неоплазии высокой степени тяжести (рис. 15).

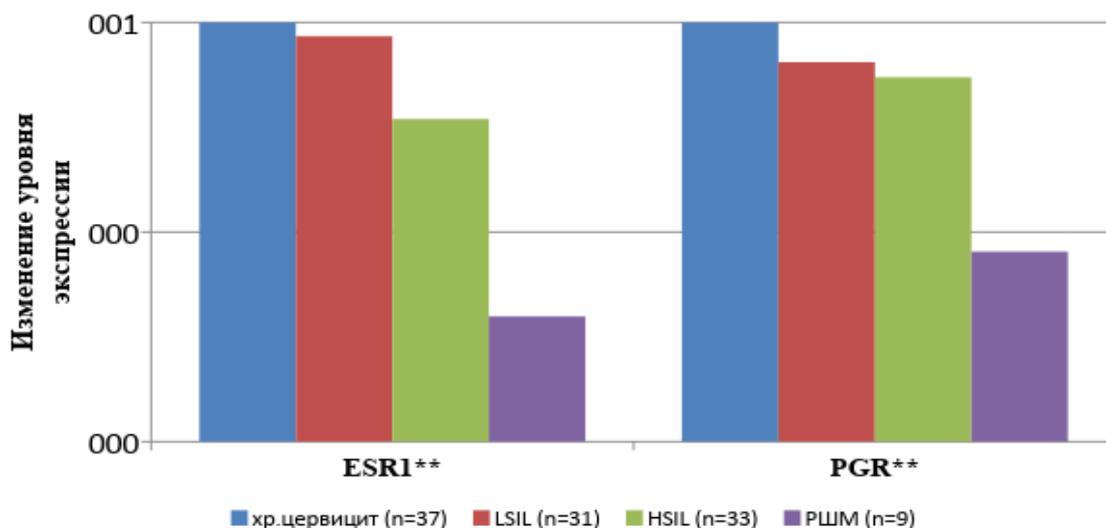


Рис. 15. Изменение уровня экспрессии рецепторов гормонов

Средняя экспрессия маркера PGR в группе пациенток с хроническим цервицитом составила 0,24, в группе LSIL – 0,15, HSIL – 0,13 и в группе П16 – 0,019. Достоверное снижение было выявлено в группе HSIL ($0,001$) и П16 ($p = 2,1 \times 10^{-5}$) по сравнению с группой хронического цервицита. Также при П16 экспрессия данного маркера достоверно ниже по сравнению с группой 2 ($p = 1,1 \times 10^{-4}$) и группой 3 ($p = 3,6 \times 10^{-4}$). Таким образом, экспрессия данного маркера снижается по мере увеличения степени тяжести поражения эпителия шейки матки (рис. 15).

Сниженную экспрессию прогестероновых и эстрогеновых рецепторов (PGR и ESR1) можно использовать как диагностический маркер 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.

Средняя экспрессия маркера OSM в группе пациенток с хроническим цервицитом составила 0,003, в группе LSIL – 0,004, HSIL – 0,003 и в группе П16 – 0,022. Было выявлено достоверное повышение экспрессии данного маркера в группе П16 ($p = 0,009$) по сравнению с 1-й группой (рис. 16).

Средняя экспрессия маркера CD68 в группе пациенток с хроническим цервицитом составила 0,965, в группе LSIL – 0,934, HSIL – 0,594 и в группе

РШМ – 0,490. Отмечено достоверное снижение показателя при РШМ по сравнению с группой хронического цервицита ($p = 0,023$) и по сравнению с LSIL ($p = 0,017$), при HSIL по сравнению с LSIL ($p = 0,024$) (рис. 16).

Средняя экспрессия маркера COX-2 в группе пациенток с хроническим цервицитом составила 0,020, в группе LSIL – 0,039, HSIL – 0,022 и РШМ – 0,009. Достоверные отличия выявлены между группами 1 и 4 ($p = 0,043$), а также между группами 2 и 4 ($p = 0,04$). Повышенная экспрессия этого маркера считается индикатором инвазии и связана с неблагоприятным прогнозом.

Средняя экспрессия маркера SCUBE2 в группе пациенток с хроническим цервицитом составила 0,023, в группе LSIL – 0,012, HSIL – 0,007 и РШМ – 0,0005. Отмечается достоверное снижение экспрессии SCUBE2 в группе LSIL по сравнению с группой хронического цервицита (0,038), в группе с HSIL по сравнению с группой хронического цервицита (0,015), в группе РШМ ($p = 1,1 \times 10^{-5}$) по сравнению с группой 1 и LSIL ($p = 9,5 \times 10^{-5}$), а также достоверное снижение уровня маркера в группе HSIL по сравнению с LSIL ($p = 1,2 \times 10^{-5}$). Вывод: по мере нарастания тяжести процесса происходит снижение экспрессии молекулярного маркера SCUBE2. Данный маркер может быть использован в качестве диагностического (рис. 16).

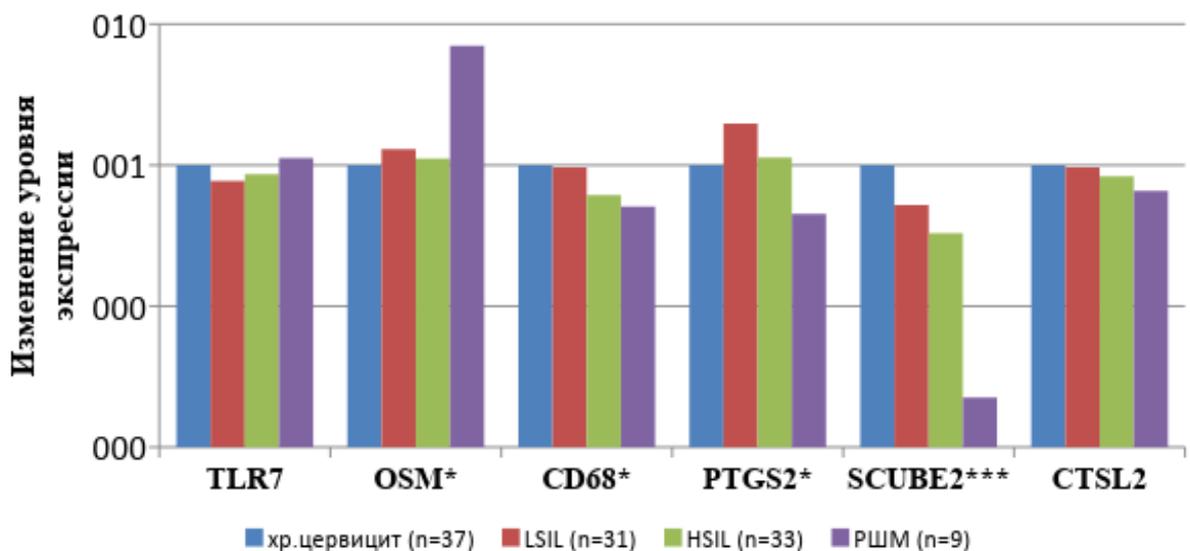


Рис. 16. Изменение уровня экспрессии

Средняя экспрессия маркера STK15 в группе пациенток с хроническим цервицитом составила 0,013, LSIL – 0,024, HSIL – 0,014 и в группе РШМ – 0,007. Выявлены достоверные значения экспрессии маркера STK15 в группах LSIL по сравнению с 1-й группой ($p = 0,001$), по сравнению с 3-й группой и HSIL ($p = 0,021$), а также достоверное снижение маркера в группе РШМ по сравнению с LSIL ($p = 0,030$).

Средняя экспрессия маркера MYBL2 в группе пациенток с хроническим цервицитом – 0,005, в группе LSIL – 0,0015, HSIL – 0,0002 и РШМ – 0,0004. Отмечается достоверное отличие по уровню экспрессии данного маркера в группе LSIL ($p = 0,005$) по сравнению с группой 1. Также было выявлено достоверное отличие уровня экспрессии маркера MYBL2 в группе LSIL и HSIL ($p = 0,012$) и между группами LSIL и РШМ ($p = 0,053$).

Средняя экспрессия маркера GSTM1 в группе пациенток с хроническим цервицитом составила 0,071, в группе LSIL – 0,099, HSIL – 0,238 и в группе РШМ – 0,029. Отмечается достоверное повышение показателя в группе HSIL по сравнению с 1-й группой ($p = 0,011$) и LSIL ($p = 0,019$). А также достоверное увеличение при HSIL по сравнению с LSIL ($p = 0,050$). Таким образом, по мере нарастания степени тяжести дисплазии шейки матки повышается уровень экспрессии маркеров пролиферации (P16, Ki67, CCNB1, BIRC5, CDKN2A (изоформы p14 и p16)) и регуляции клеточного цикла. Снижается уровень экспрессии маркеров апоптоза (BCL-2, BAG1, BAX, NDRG1, PTEN), эстрогеновых и прогестероновых рецепторов (ESR1, PGR). Снижается экспрессия маркеров сигнального пептида (SCUBE2). Полученные различия позволили применить на практике модель интегральной (комплексной) оценки степени поражения шейки матки, учитывающую уровень экспрессии Ki67, BCL-2, ESR1, PGR, а также наличие ВПЧ высокого онкогенного риска в количестве $>10^3$ копий вирусов в образце.

Таблица 25. Экспрессия отдельных молекулярных маркеров в разных группах

Маркер	Хронический цервицит	LSIL	HSIL	РШМ
KI67				↑
P16				↑
BCL-2	↑	↓	↓	↓
BAG1	↑	↑		↓
BAX				↓
ESR1	↑	↓	↓	↓
PGR	↑		↓	↓
COX		↑		↓
SCUBE2	↑			↓
PTEN				↑
OSM			↑	↑
CCNB1	↓			↑
BIRC5	↓			↑
NDRG1		↑	↓	↓
P14ARF	↓			↑
CD68		↑	↓	↓
STK15	↓	↑		↓
MYBL2		↑		↓

Разработка дискриминантной функции

Для оценки возможности дифференциальной диагностики ВПЧ-ассоциированных поражений шейки матки с использованием измерений уровня экспрессии мРНК функциональных генов человека был использован дискриминантный анализ. Помимо этого, в качестве параметра дифференциальной диагностики рассматривалось наличие ВПЧ высокого онкогенного риска. В результате анализа было установлено, что наличие ВПЧ высокого онкогенного риска в количестве $>10^3$ копий вируса в образце (3 lg) и относительные уровни экспрессии мРНК генов Mki67, BCL-2, ESR1, PGR являются наиболее информативными параметрами дифференциальной диагностики ВПЧ-ассоциированных поражений шейки матки. Три канонические линейные дискриминантные функции, коэффициенты которых представлены в таблице 27, позволили классифицировать четыре патологических состояния шейки матки:

- хронический цервицит;
- интраэпителиальная неоплазия легкой степени;
- интраэпителиальная неоплазия тяжелой степени;

- РШМ.

Таблица 26. Коэффициенты канонических линейных дискриминантных функций, классифицирующих патологические состояния шейки матки

Маркер	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 BCL-2	-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

Результаты классификации рассматриваемых групп представлены в таблице 27.

Таблица 27. Результаты классификации исследованных групп

		Группа	Предсказанная принадлежность к группе				Итого
			легкая степень поражения		тяжелая степень поражения		
			Хронический цервицит	LSIL	HSIL	РШМ	
Исходные	Частота	Хронический цервицит	27	6	4	0	37
		LSIL	11	11	9	0	31
		HSIL	4	5	23	1	33
		РШМ	0	0	1	8	9
	%	Хронический цервицит	73,0	16,2	10,8	0,0	
		LSIL	35,5	35,5	29,0	0,0	100
		HSIL	12,1	15,2	69,7	3,0	100
		РШМ	0,0	0,0	11,1	88,9	100

В соответствии с предложенной моделью, 8 из 9 случаев РШМ были классифицированы как РШМ, 1 – как HSIL. Чувствительность предлагаемой модели для РШМ составила 88,9%. Функция 1 наилучшим образом дискриминировала группы хронического цервицита и РШМ (рис. 17).

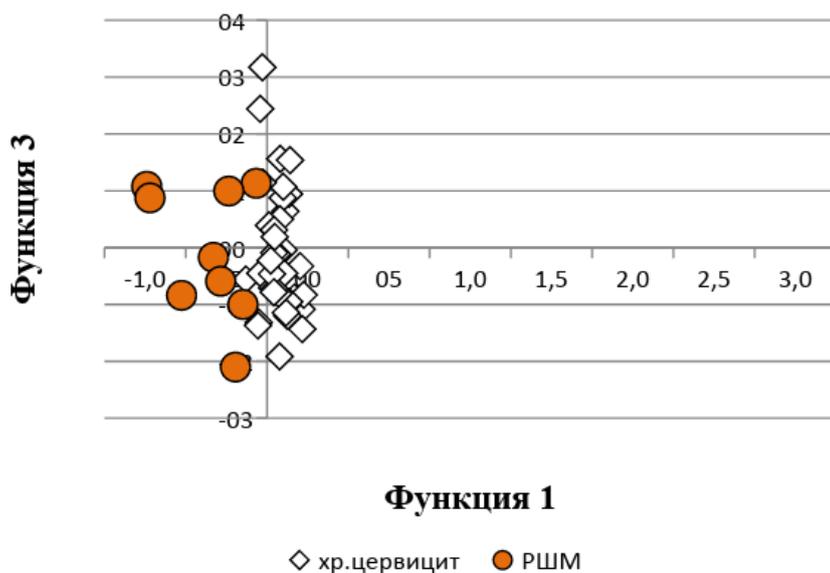


Рис. 17. Распределение значений коэффициентов линейных дискриминантных функций в группах хронического цервицита и РШМ

Из 32 случаев HSIL 23 были классифицированы как HSIL, 3 – как РШМ; 9 случаев – как более легкие поражения: в 5 случаях – LSIL, в 4 – хронический цервицит. Чувствительность предлагаемой модели для HSIL составила 69,7%.

27 из 37 пациенток с цервицитом были правильно определены в свою группу. Таким образом, чувствительность предлагаемой модели для хронического цервицита составила 73%.

Вместе с тем только 11 пациенток из 31 с интраэпителиальной неоплазией легкой степени были классифицированы в свою группу. Чувствительность модели для LSIL составила 35,5%. При этом часть образцов (29%) классифицировались как более тяжелые поражения шейки матки. Предположительно данная когорта пациенток входит в группу риска прогрессии CIN. В то же время для 35,5% пациенток с LSIL прогноз может быть более благоприятным, связанным с регрессией патологического процесса.

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

Исходя из полученных результатов, мы предполагаем, что оценка уровня экспрессии мРНК генов Ki67, BCL-2, ESR1, PGR может помочь в постановке более точного диагноза и дифференцировать легкую (хронический цервицит,

LSIL) и более тяжелую (HSIL и РШМ) степени поражения эпителия шейки матки; а также воспалительные процессы и дисплазии различной степени тяжести.

Вывод. К практическому применению предложена модель дифференциальной диагностики четырех патологических состояний шейки матки – хронический цервицит, интраэпителиальная неоплазия легкой степени, интраэпителиальная неоплазия тяжелой степени и 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).

Результаты лечения пациенток с CIN

Помимо общепринятых рекомендаций по ведению и лечению CIN, очень важен индивидуальный подход в каждом отдельном случае.

12 (38,7%) пациенткам с CIN I (из 31) произвели CO₂-лазерную абляцию шейки матки, так как диагноз изменился на более неблагоприятный и наблюдалось ухудшение кольпоскопической картины. Ввиду отсутствия положительной динамики в течение 24 мес. наблюдения CO₂-лазерная абляция шейки матки была произведена 14 (45,1%) пациенткам. При динамическом наблюдении у 5 (16,1%) пациенток цитологический диагноз изменился на NILM, через 12 мес. полная элиминация ВПЧ наблюдалась у всех исследуемых, ухудшения при расширенной кольпоскопии не отмечено. В нашем исследовании мы не выявили рецидива заболевания у пролеченных пациенток в период наблюдения.

Пациентки с CIN II/III были разделены на 2 группы: 1-я группа – 14 пациенток, которым проводили радиоволновую конизацию шейки матки с последующим гистологическим исследованием иссеченного конуса, 2-я группа – 23 пациентки с высоким риском наличия РШМ (распределенные в группу HSIL согласно дискриминантной функции с учетом оценки экспрессии мРНК 4 генов и наличия ВПЧ ВР в количестве >3 lg), которым была проведена ножевая конизация шейки матки с последующим гистологическим исследованием

иссеченного конуса. По показаниям выскабливание цервикального канала произведено всем пациенткам. РШМ при гистологическом исследовании иссеченного конуса был диагностирован у 1 пациентки, у остальных был верифицирован диагноз CIN III (HSIL). Пациенток приглашали на осмотр через 1 мес. после хирургического лечения, через 3 мес. – на цитологическое исследование, через 6 мес. – на цитологическое исследование, ВПЧ-генотипирование и расширенную кольпоскопию. Рецидива заболевания также не выявлено, цитологический диагноз – NILM, полная элиминация ВПЧ наблюдалась у всех пациенток, изменений при расширенной кольпоскопии не наблюдалось.

Таким образом, при CIN I для выявления групп высокого риска мы считаем целесообразным определение уровня экспрессии мРНК 4 генов при наличии ВПЧ ВР в количестве >3 Ig. При отсутствии риска мы рекомендуем наблюдение в течение 24 мес., а при наличии риска следует проводить CO₂-лазерную аблацию шейки матки.

Лечение и наблюдение пациенток с CIN различной степени тяжести нами проводилось по общепринятым стандартам (Приказ Министерства РФ №599н от 07.11.2012, зарегистрированный в Минюсте РФ за №27605 11.03.2013).

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

В связи с имеющимися данными о распространенности РШМ среди женского населения репродуктивного возраста актуальным является изучение значения молекулярных маркеров в диагностике цервикальных интраэпителиальных неоплазий и их прогнозировании. Молекулярно-генетические изменения, характерные для канцерогенеза, могут стать основой тестовых систем для скрининга РШМ, а также выступать в качестве диагностических маркеров прогрессии CIN в РШМ.

На сегодняшний день основным скрининговым методом является цитологический. ВПЧ-тестирование помогает повысить чувствительность цитологического исследования для выявления группы риска по развитию РШМ.

По данным исследования А. Piroozmand и соавт., у 117 женщин с РШМ наиболее часто встречался ВПЧ 18-го и 16-го типов. Реже всего у данных пациенток выявлялся ВПЧ типов 51 и 31 [97]. По данным ВОЗ, наиболее распространенные типы ВПЧ ВР у пациенток с РШМ – это 16, 18, 33, 45 и 31-й [37].

Полученные нами данные отличаются от результатов исследования группы L. Wang (2016) [88]. Так, из отобранных 428 образцов цитологии ВПЧ был обнаружен у 166 пациенток. Из них у 107 пациенток диагностирован хронический цервицит, у 19 – CIN I, у 9 – CIN II/III, у 31 – РШМ. Наиболее часто встречались ВПЧ типа 16 у 73 (44%) пациенток, типа 53 – у 48 (28,9%), типа 52 – у 42 (25,3%), типа 58 – у 37 (22,3%), типа 35 – у 29 (17,5%). У женщин с хроническим цервицитом достоверно чаще выявлялся ВПЧ типов 16, 53, 58 и 52. У женщин с CIN I наиболее часто встречался ВПЧ типов 16, 53, 52 и 58. При CIN II, III наиболее распространенным оказался ВПЧ типов 33 и 53, при РШМ превалировал ВПЧ типов 16, 52, и 58 [103].

Как и в упомянутых работах, по результатам нашего исследования также наиболее часто встречаемым был ВПЧ 16-го типа. Однако мы провели анализ встречаемости типов ВПЧ с учетом классификации, предложенной Международным агентством по изучению рака (2015). Согласно этой

классификации, выделяют 3 группы ВПЧ: группа 1 – высокого канцерогенного риска, группа 2А – вероятного канцерогенного типа, группа 2В – возможного канцерогенного типа. ВПЧ высокого канцерогенного риска встречался в целом в 80,5%, при этом наиболее часто определялась группа А9 (60,2%). ВПЧ группы 2А в целом встречался в 4% случаях. Встречаемость ВПЧ группы 2В составила 6,5%. Эта же классификация была применена в одном из исследований, в котором проводился корреляционный анализ между наличием CIN и РШМ и редко встречаемых типов ВПЧ [22]. Целью исследования было определение значения типов ВПЧ в развитии дисплазии шейки матки и канцерогенезе. В результате было установлено, что редкие типы ВПЧ также могут вносить значимый вклад в развитие РШМ и дисплазии, особенно это касалось типов 68, 70 и 53.

По результатам нашего исследования, ВПЧ высокого канцерогенного риска (1-я группа) в целом встречался в 80,5% случаев, при этом наиболее часто определялись группы А9 (60,2%), А7 (10,6%), А6 (4,0%), А5 (5,6%). Несмотря на лидирующую позицию ВПЧ группы А9 в развитии CIN, обращает на себя внимание высокая частота ВПЧ групп А7, А5, А6. По результатам анализа встречаемости возможно канцерогенных типов ВПЧ группа 2В в целом составила 6,5% случаев. Данная группа представлена ВПЧ А6 (53, 56), А5 (82), А11 (73). Из всех возможно канцерогенных типов (группа 2В), представленных в классификации, в группе пациенток с HSIL нами обнаружен ВПЧ типа 53 только у 1 женщины, при РШМ ВПЧ группы 2В не выявлялся. Таким образом, редко встречаемые типы ВПЧ группы 2А и 2В могут считаться этиологическим фактором предрака и РШМ. На основании результатов исследования мы выделили в отдельную группу ВПЧ других типов, которые достаточно часто встречались среди исследуемых пациенток и ассоциировались с поражениями легкой степени. Так, например, ВПЧ типов 44 и 55 встречался в 13,5% случаев, типа 51 – в 9,6%, типов 11 и 66 – в 6,4%, типа 6 – в 3,2% в группе пациенток с LSIL.

Однако от момента инфицирования ВПЧ до развития поражения эпителия может проходить несколько лет. Это ограничивает область применения ВПЧ-тестирования только этапом формирования группы риска. Для диагностики необходимо использовать другие методы лабораторной диагностики, позволяющие оценить непосредственно наличие поражения эпителия. В нашем исследовании в качестве такого метода диагностики был применен анализ экспрессии ключевых мРНК и миРНК, связанных с онкологической трансформацией клеток эпителия по данным литературы.

В настоящей работе мы исследовали экспрессию четырех противоонкогенных miR-143, -145, -199 и -122 в соскобах из шейки матки при доброкачественной (LSIL, HSIL) и злокачественной неоплазии (РШМ). По данным литературы известно, что экспрессия miR-143, -145 и -199 в гиперплазированных тканях шейки матки снижена [50, 68, 93]. Экспрессия miR-122 в тканях шейки матки не исследовалась, однако было показано значительное снижение ее синтеза в пораженных тканях при гепатоцеллюлярной карциноме и раке молочной железы [89]. В настоящей работе предполагалось оценить возможность дифференциации разной степени поражения шейки матки в зависимости от уровня экспрессии выбранных для исследования миРНК.

Генетические локусы для miR-143 и -145 сформированы в бицистронный кластер и синтезируются в виде единого транскрипта [93]. По нашим данным, коэффициент корреляции Спирмена значений экспрессии между обеими миРНК в исследуемой в настоящей работе группе пациенток составил 0,73 ($p = 1,7 \times 10^{-13}$). Уровень экспрессии обеих миРНК значительно снижен при многих видах злокачественных опухолей [21]. Противоопухолевый механизм действия miR-143 и -145 осуществляется путем ингибирования функции генов API-5 (apoptosis inhibitor 5), KRAS (Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog), RREB-1 (Ras-responsive element-binding protein) и IRS-1 (insulin receptor substrate 1), участвующих в регуляции апоптоза, делении клеток и ангиогенезе [11].

Кроме того, miR-145 тормозит клеточный рост, подавляя функцию генов Мус (v-mycavianmyelocytomatosis viral oncogene homolog) и IRS-1 (insulin receptor

substrate 1), и препятствует инвазии и метастазированию опухолевых клеток, ингибируя функцию гена MUC-1 (mucin 1) [93].

Результаты исследования показывают значительное снижение экспрессии miR-143, -145 и -199 в соскобах из шейки матки как при доброкачественной, так и при злокачественной неоплазии, что согласуется и с публикациями других исследователей [63, 68]. Более того, отмечено выраженное прогрессивное снижение экспрессии miR-143 и -145 в зависимости от тяжести поражения. Экспрессия miR-143 и -145 в эпителиальных соскобах шейки матки также достоверно различается при РШМ и HSIL. В отношении экспрессии miR-199 не было выявлено достоверных различий между РШМ и HSIL или LSIL.

Применение ROC-анализа позволило оценить диагностическую значимость результатов экспрессии миРНК для дифференциации неоплазии. Хорошую эффективность диагностики цервикальной неоплазии без дифференциации по степени тяжести показывают данные экспрессии miR-143, -145 и -199. Использование методов многомерной статистики позволило оптимизировать диагностическую панель. miR-145 была исключена вследствие высокой корреляции с miR-143, а включение в математическую модель miR-199 существенно не повышало ее диагностическую ценность. Показатели экспрессии miR-143 в соскобах из шейки матки могут быть использованы и для дифференциации женщин с гиперплазией или раком шейки матки.

Экспрессия miR-122 была практически одинаковой во всех исследуемых группах, что, по-видимому, обусловлено тем, что она синтезируется преимущественно в тканях печени, и лишь минимальное ее количество выявляется в других тканях [53]. В нашей работе экспрессия miR-122 была на три порядка ниже, чем экспрессия miR-143, и на два порядка ниже, чем miR-145. В то же время Х. Ну и соавт. в своем исследовании проанализировали 102 случая РШМ и пришли к выводу, что miR-200a и -9 связаны с успехом лечения [27]. Эти миРНК были использованы для построения модели логистической регрессии для предсказания исхода лечения. Лабораторные исследования показали, что трансфекция miR-200a в клетки HELA способствовала регуляции некоторых

генов, связанных с метастазированием, таких как E-кадгерин-транскрипционные репрессоры ZEB1 и ZEB2 [21]. Эти данные подкрепляются результатами других исследований, говорящих о том, что миРНК семейства miR-200 могут блокировать перемещение и миграцию раковых клеток и препятствовать распространению метастазов опухоли [108]. Таким образом, можно сделать вывод, что miR-200 играет важную роль только на стадии рака, тогда как на предраковых стадиях трансформации эпителия ее значение невелико.

Следующим этапом нашего исследования было изучение экспрессии мРНК функциональных генов человека при различной степени поражения эпителия шейки матки и сравнение ее с экспрессией мРНК в здоровом эпителии. Проводилось определение уровня экспрессии мРНК генов человека MKI67, P16, CCNB1, BIRC5, CDKN2A, BCL-2, BAG1, BAX, NDRG1, PTEN, ESR1, PGR, TLR7, OSM, CD68, PTGS-2/COX, SCUBE2, CTSL2. В качестве маркеров были выбраны гены, регулирующие пролиферацию и клеточный цикл (P16, Ki67, CCNB1, BIRC5, CDKN2A (изоформы p14 и p16)). Согласно результатам нашего исследования, к практическому применению предложена модель дифференциальной диагностики четырех патологических состояний шейки матки: хронический цервицит; интраэпителиальная неоплазия легкой степени; интраэпителиальная неоплазия тяжелой степени и 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). Так, N.Murphy и соавт. в 2005 г. исследовали 3 потенциальных биомаркера CIN: p16 (INK4A), CDC6 и MCM5 [82]. Самым надежным из них оказался p16 (INK4A), уровни экспрессии которого изменялись при всех видах плоскоклеточных и железистых поражений шейки матки и были тесно связаны с высоким риском ВПЧ-инфекции. Однако неспособность p16 (INK4A) к избирательному выявлению CIN III и сообщения о его гиперэкспрессии в доброкачественных железистых образованиях, таких как метаплазия эндометрия, могут снизить его шансы на самостоятельное применение для прогноза развития РШМ из дисплазии шейки матки.

Имеются данные о связи CIN и экспрессии уровня протеина P16, который представляет собой маркер цервикального дискарриоза со стороны состояния клетки – определяется при раке шейки матки, при этом он повышается только в пораженных клетках [110]. Результаты исследований R. Klaes и соавт. показали, что использование данного биомаркера для диагностики CIN может значительно снизить количество неясных цитологических мазков при скрининге и помочь в постановке диагноза и оценке прогноза течения инфекции [80]. Вместе с тем в отечественной литературе существуют единичные работы по изучению особенности маркера в клетках P16, и совсем нет работ, отражающих его уровень при разных стадиях CIN в комплексе с другими молекулярными маркерами, что могло бы явиться основой для возможного применения его в качестве предиктора малигнизации.

С помощью методов многомерной статистики разработана модель для дифференциальной диагностики четырех патологических состояний шейки матки: хронический цервицит; интраэпителиальная неоплазия легкой степени; интраэпителиальная неоплазия тяжелой степени и P16, – 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 Ig). Включение в модель miR-143, продемонстрировавшей наилучшие диагностические характеристики на предыдущем этапе нашего исследования, не привело к существенному улучшению диагностических характеристик и было признано избыточным.

Итогом проведенного нами исследования стало выявление маркеров мРНК и миРНК, позволяющих дифференцировать доброкачественные и злокачественные изменения в эпителии шейки матки, ключевой роли в развитии дисплазии ВПЧ высокого и вероятного канцерогенного типа и предоставление практических рекомендаций. Результаты нашей работы будут способствовать своевременному выявлению пациенток группы риска и предотвращению развития дисплазии и 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 (ОР = 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 миРНК – 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

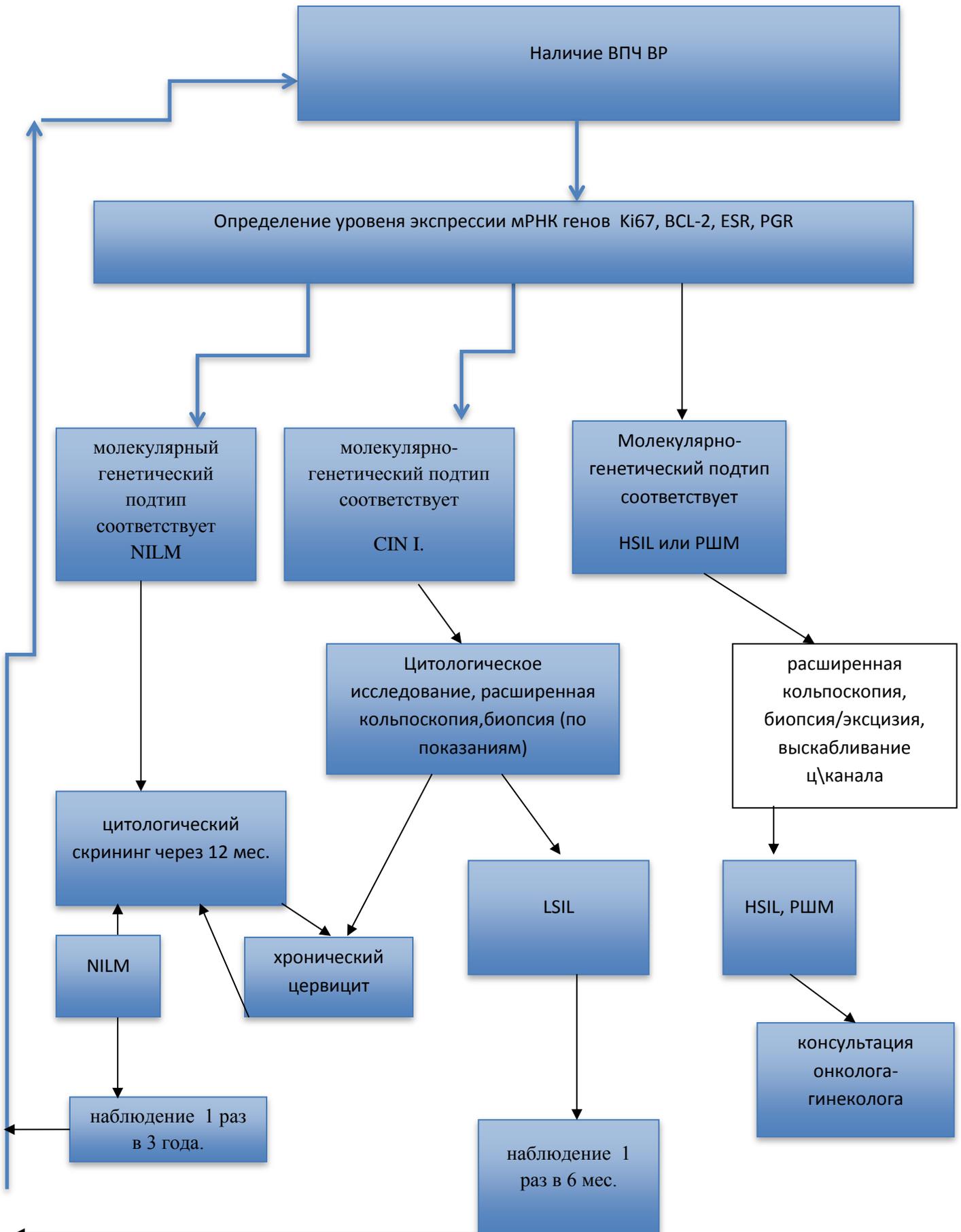
1. Генотипирование с определением типов ВПЧ высокого, вероятного и возможного канцерогенного риска целесообразно использовать в скрининге патологии шейки матки у женщин репродуктивного возраста для выявления пациенток группы высокого риска по развитию HSIL и РШМ.

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).

Алгоритм ведения пациенток с ВПЧ-ассоцированными заболеваниями шейки матки с учетом комплекса молекулярно-генетических маркеров.



СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АБЭ – ацетобелый эпителий

БШМ – биопсия шейки матки

ВПЧ – вирус папилломы человека

ДИ – доверительный интервал

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИМТ – индекс массы тела

ИППП – инфекции, передаваемые половым путем

КС – кольпоскопия

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота

миРНК – малые декодирующие молекулы рибонуклеиновой кислоты

Пап-тест – тест по Папаниколау

ПВИ – папилломавирусная инфекция

ПЦР – полимеразно-цепная реакция

РШМ – рак шейки матки

ASC-US – atypical squamous cells of undetermined significance

CDC – centers for disease control and prevention

CIN – cervical intraepithelial neoplasia

FDA – food and drug administration

HG-AIN – high-grade anal intraepithelial neoplasia

HPV – human papilloma virus

HSIL – high-grade squamous intraepithelial lesions

LSIL – low-grade squamous intraepithelial lesions

NILM – negative for intraepithelial lesion or malignancy

SIL – squamous intraepithelial lesions

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бестаева Н.В. Оптимизация тактики введения пациенток с папилломавирусной инфекцией гениталий с учетом комплекса молекулярно-генетических предикторов: Дис. ... канд. мед. наук. – М., 2018.
2. Вирусы папилломы человека в развитии рака шейки матки / В.И. Киселев, О.И. Киселев. – М.: Роза мира, 2003. – 90 с.
3. Возможности терапии папилломавирусной инфекции / М.Н. Костава, В.Н. Прилепская // Рус. мед. журнал. – 2009. – № 17 (1). – С. 9–16.
4. ВПЧ-ассоциированные заболевания шейки матки: Новое в диагностике / В.Н. Прилепская, Н.М. Назарова, Г.М. Мзарелуа [и др.] // Акушерство и гинекология. – 2015. – №9. – С. 20–27.
5. Заболевания аногенитальной области, ассоциированные с папилломавирусной инфекцией / В.Н. Прилепская, Н.М. Назарова, Л.А. Суламанидзе [и др.] // Гинекология. – 2015. – №1.
6. Заболевания шейки матки, влагалища, вульвы / В.Н. Прилепская. – М.: МЕД пресс-информ, 2005. – С. 432.
7. Зардиашвили М.Д. Клинико-диагностическое и прогностическое значение маркеров в цервикагинальной жидкости при ВПЧ-ассоциированных заболеваниях шейки матки у женщин репродуктивного возраста: Дис. ... канд. мед. наук. – М., 2018
8. Диагностика остаточных/рецидивных предраковых заболеваний шейки матки после электроэксцизии / Г.Н. Минкина [и др.] // Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. – 2009. – Т. 8, №5. – С. 23–27.
9. Клиническое значение молекулярных маркеров при папилломавирусной инфекции / С.И. Роговская [и др.] // Акушерство и гинекология. – 2011. – №4. – С. 4–10.
10. Комплексное лечение дисплазии эпителия шейки матки умеренной и тяжелой степени на фоне ВПЧ-инфекции / Ю.Э. Доброхотова [и др.] // Гинекология. – 2015. – Т. 17, №1. – С. 8–12.

11. Методические рекомендации по профилактике рака шейки матки / Л.И. Короленкова. – М., 2018.
12. Национальное руководство по гинекологии / Под ред. В.И. Кулакова [и др.]. – М., 2009.
13. Новое в кольпоскопии / С.И. Роговская [и др.] // Гинекология. – 2011 – №13(5). – С. 62–66.
14. Опухоли репродуктивных органов (этиология и патогенез) / Л.А. Ашрафян, В.И. Киселев. – М.: Дмитрийд График Групп, 2008. – 216 с.
15. Папилломавирусная инфекция гениталий: актуальная проблема современной гинекологии и пути ее решения / И.А. Аполихина, В.И. Кулаков. – М., 2006. – С. 70–75.
16. Папилломавирусная инфекция: диагностика, лечение и профилактика / В.Н. Прилепская [и др.]. – М.: МЕДпресс-информ, 2007. – С. 32.
17. 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. – №2. – С. 92–98.
18. Профилактика рака шейки матки: руководство для врачей / Г.Т. Сухих, В.Н. Прилепская. – 3-е изд. – М.: МЕДпресс-информ, 2012. – 192 с.
19. Роль ВПЧ-тестирования и генотипирования в диагностике цервикальных интраэпителиальных неоплазий / Е.В. Комарова [и др.] // Медицина критических состояний. – 2010. – №1. – С. 26–29.
20. Роль профилактических осмотров и первичного приема врача в женской консультации в выявлении субклинических и латентных форм папилломавирусной инфекции шейки матки и их мониторинг / Г.А. Кедрова [и др.] // Гинекология. – 2012. – №1 – С. 75–81.
21. Современные требования к диагностике генитальной папилломавирусной инфекции: количественный подход / Д.А. Куевда [и др.] // Материалы 2-го Всероссийского конгресса дерматовенерологов. – СПб., 2007.

22. Статистика злокачественных новообразований в России и странах СНГ в 2012 г. / Под ред. М.И. Давыдова и Е.М. Аксель. – М., 2014. – 47 с.
23. Суламанидзе Л.А. Совершенствование методов диагностики и лечения предраковых заболеваний аногенитальной области, обусловленных ВПЧ-инфекцией: Дис. ... канд. мед. наук. – М., 2017.
24. Aberrant expression of oncogenic and tumor-suppressive microRNAs in cervical cancer is required for cancer cell growth / X. Wang, S. Tang, S.Y. Le [et al.] // *PLoS One*. – 2008. – Vol. 3 (7). – P. e2557.
25. Aberrant microRNA expression in human cervical carcinomas / Q. Rao, Q. Shen, H. Zhou [et al.] // *Med. Oncol.* – 2012. – Vol. 68. – P. 1235–1242.
26. Agents classified by IARC monographs. Vol. 1–121 [Electronic resource] // Mode of access: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification>.
27. A microRNA expression signature for cervical cancer prognosis / X. Hu, J.K. Schwarz, J.S. Lewis Jr [et al.] // *Cancer Research*. – 2010. – Vol. 70. – P. 1441–1448.
28. Altered miRNA expression in sputum for diagnosis of non-small cell lung cancer / Y. Xie, N.W. Todd, Z. Liu [et al.] // *Lung Cancer*. – 2010. – Vol. 67. – P. 170–176.
29. Altered MicroRNA expression in cervical carcinomas / J.W. Lee, C.H. Choi, J.J. Choi [et al.] // *Clin. Cancer Res.* – 2008. – Vol. 14. – P. 2535–2542.
30. A PCR-based platform for microRNA expression profiling studies / X. Wang // *RNA*. – 2009 – Vol. 15. – P. 716–723.
31. A pleiotropically acting microERNESTRNA, miR-31, inhibits breast cancer metastasis / S. Valastyan, F. Reinhardt, N. Benaich [et al.] // *Cell*. – 2009. – Vol. 137. – P. 1032–1046.
32. A specific miRNA signature correlates with complete pathological response to neoadjuvant chemoradiotherapy in locally advanced rectal cancer / V. IDella, G. Scarpati, F. Falcetta [et al.] // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* – 2012. – Vol. 15, №83(4). – P. 1113–1119.
33. ASCCP Consensus Guidelines Conference (2013) 2012 updated consensus guidelines for the management of abnormal cervical cancer screening tests and cancer precursors

- / L.S. Massad, M.H. Einstein, W.K. Huh [et al.] // *Obstet. Gynecol.* – 2012. – Vol. 121(4). – P. 829–846.
34. Association between miR-200c and the survival of patients with stage I epithelial ovarian cancer: a retrospective study of two independent tumour tissue collections / S. Marchini, D. Cavalieri, R. Fruscio [et al.] // *Lancet Oncol.* – 2011. – Vol. 12. – P. 273–285.
35. Cells against human papillomavirus-18 E7 in patients with high-grade cervical lesions associate with the absence of the virus in the cervix / S. Seresini [et al.] // *Immunology.* – 2010. – Vol. 131. – P. 89–98.
36. c-mic-regulated microRNAs modulate E2F1 expression / K.A. O'Donnell, E.A. Wentzel, K.I. Zeller [et al.] // *Nature.* – 2005. – Vol. 435 (7043). – P. 839–843.
37. Centers for Disease Control and Prevention. Basic Information about HPV-Associated Cancers. 2013 [Electronic resource] // Mode of access: http://www.cdc.gov/cancer/hpv/basic_info/.
38. Centers for Disease Control and Prevention. Incidence, Prevalence, and Cost of Sexually Transmitted Infections in the United States, February 2013. [Electronic resource] // Mode of access: <http://www.cdc.gov/std/stats/sti-estimates-fact-sheet-feb-2013.pdf>.
39. Cervical adenocarcinoma: moving towards better prevention / M. Seoud, W.A. Tjalma, V. Ronsse // *Vaccine.* – 2011. – Vol. 29. – P. 9148–9158.
40. Cervical Cancer: Development of Targeted Therapies Beyond Molecular Pathogenesis / J. Knoff, B. Yang, C.F. Hung, T.C. Wu // *Curr. Obstet. Gynecol. Rep.* – 2014. – Vol. 3. – P. 18–32.
41. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA / A.E. Pasquinelli, B.J. Reinhart, F. Slack [et al.] // *Nature.* – 2000. – Vol. 408. – P. 86–89.
42. Deregulation of the miRNAs expression in cervical cancer: Human papillomavirus implications [Electronic resource] / Y. Gómez-Gómez, J. Organista-Nava, P. Gariglio // *Biomed. Res. Int.* – 2013. – 407052.

43. Detection of human papillomavirus in cervical scrapes by the polymerase chain reaction in relation to cytology: possible implications for cervical cancer screening / C.J. Meijer, A.J. van den Brule, P.J. Snijders // *IARC Sci. Publ.* – 1992. – Vol. (119). – P. 271–281.
44. Dysregulation of microRNA Expression in Human Cervical Preneoplastic and Neoplastic Lesions / Á. Galamb, M. Benczik, B. Zinner [et al.] // *Pathol. Oncol. Res.* – 2015, Jan 20.
45. Exocyst is involved in cystogenesis and tubulogenesis and acts by modulating synthesis and delivery of basolateral plasma membrane and secretory proteins / J.H. Lipschutz, W. Guo, L.E. O'Brien [et al.] // *Mol. Biol. Cell.* – 2000. – Vol. 11. – P. 4259–4275.
46. From Human papillomavirus to cervical cancer / M. Shiffman, N. Wentzensen // *Obstet. Gynecol.* – 2010. – Vol. 116 (1). – P. 177–185.
47. Functional integration of microRNAs into oncogenic and tumor suppressor pathways / C.D. Lotterman, O.A. Kent, J.T. Mendell // *Cell Cycle.* – 2008. – Vol. 7. – P. 2493–2499.
48. Global cancer statistics / A. Jemal, F. Bray, M.M. Center [et al.] // *Cancer J. Clin.* – 2011. – Vol. 61. – P. 69–90.
49. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality world wide for 36 cancers in 185 countries / F. Bray, J. Ferley, I. Soerjomataram [et al.] // *Cancer J. Clin.* – 2018. – Vol. 68. – P. 394–424.
50. High-risk human papillomavirus reduces the expression of microRNA-218 in women with cervical intraepithelial neoplasia / Y. Li, J. Liu, C. Yuan [et al.] // *J. Int. Med. Res.* – 2010. – Vol. 38. – P. 1730–1736.
51. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers / G.A. Calin, C. Sevignani, C.D. Dumitru [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2004. – Vol. 101. – P. 2999–3004.
52. Human papillomavirus-associated cancers. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). – United States, 2004–2008 // *MMWR.* – 2010. – Vol. 61 (15). – P. 258–261.

53. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs / M. Lagos-Quintana, R. Rauhut, W. Lendeckel [et al.] // *Science*. – 2001. – Vol. 294. – P. 853–858.
54. Improved prediction of RNA secondary structure by integrating the free energy model with restraints derived from experimental probing data / Y. Wu, B. Shi, X. Ding [et al.] // *Nucleic Acids Res.* – 2015. – Vol. 43(15). – P. 7247–7259.
55. Lessons from miR-143/145: the importance of cell-type localisation of miRNAs / O.A. Kent, M.N. McCall [et al.] // *Nucleic Acids Res.* – 2014. – Vol. 42(12). – P. 7528–7538.
56. MicroRNA-145 suppresses cell invasion and metastasis by directly targeting mucin 1 / M. Sachdeva, Y.-Y. Mo // *Cancer Res.* – 2010. – Vol. 70(1). – P. 378–387.
57. MicroRNA-378 promotes cell survival, tumor growth, and angiogenesis by targeting SuFu and Fus-1 expression / D.Y. Lee, Z. Deng, C.H. Wang, B.B. Yang // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2007. – Vol. 104 (51). – P. 20350–20355.
58. MicroRNA expression profiles classify human cancers / J. Lu, G. Getz, E.A. Miska [et al.] // *Nature*. – 2005. – Vol. 435. – P. 834–838.
59. MicroRNA Expression Variability in Human Cervical Tissues / P.M. Pereira, J.P.C. Marques, A.R. Soares [et al.] // *PloS One*. – 2010. – Vol. 57.
60. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer / M.V. Iorio, M. Ferracin, C.G. Liu [et al.] // *Cancer Res.* – 2005. – Vol. 65. – P. 7065–7070.
61. MicroRNA in carcinogenesis & cancer diagnostics: A new paradigm / J. Ahmad, S.E. Hasnain, M.A. Siddiqui [et al.] // *Indian. J. Med. Res.* – 2013. – Vol. 137. – P. 680–694.
62. MicroRNA miR-886-5p inhibits apoptosis by down-regulating Bax expression in human cervical carcinoma cells / J.H. Li, X. Xiao, Y.N. Zhang [et al.] // *Gynecol. Oncol.* – 2011. – Vol. 120. – P. 145–151.
63. MicroRNA signatures in human cancers / G.A. Calin, C.M. Croce // *Nat. Rev. Cancer*. – 2006. – Vol. 6. – P. 857–866.
64. MicroRNAs 143 and 145 are possible common onco-microRNAs in human cancers / Y. Akao, Y. Nakagawa, T. Naoe // *Oncol. Rep.* – 2006. – Vol. 16. – P. 845–850.

65. MicroRNAs and the cancer phenotype: profiling, signatures and clinical implications / C. Stahlhut, F.J. Slack // *Genome Med.* – 2013. – Vol. 5. – P. 111.
66. microRNAs are biomarkers of oncogenic human papillomavirus infections / X. Wang, H.-K. Wang, Y. Li // *PNAS.* – 2014. – Vol. 111, №11. – P. 4262–4267.
67. MicroRNAs in cancer: Biomarkers, functions and therapy / J. Hayes, P.P. Peruzzi, S. Lawler // *Trends Mol. Med.* – 2014. – Vol. 20. – P. 460–469.
68. MicroRNAs in cervical cancer: evidences for a miRNA profile deregulated by HPV and its impact on radio-resistance / A. Pedroza-Torres, E. Lopez-Urrutia, V. Garcia-Castillo [et al.] // *Molecules.* – 2014. – Vol. 19. – P. 6263–6281.
69. MicroRNAs: tools for cancer diagnostics / T. Paranjape, F.J. Slack, J.B. Weidhaas // *Gut. Nov.* – 2009. – Vol. 58 (11). – P. 1546–1554.
70. miR Connect 2.0: Identification of oncogenic, antagonistic miRNA families in three human cancers / Y. Hua, N. Larsen, S. Kalyana-Sundaram [et al.] // *BMC Genomics.* – 2013. – Vol. 14. – P. 179.
71. miR-20a promotes migration and Biographies invasion by regulating TNKS2 in human cervical cancer cells / H.W. Kang, F. Wang, Q. Wei [et al.] // *FEBS Letters.* – 2012. – Vol. 586. – P. 897–904.
72. MiR-100 regulates cell differentiation and survival by targeting RBSP3, a phosphatase-like tumor suppressor in acute myeloid leukemia / Y.S. Zheng, H. Zhang, X.J. Zhang [et al.] // *Oncogene.* – 2012. – Vol. 31 (1). – P. 80–92.
73. miR-122 regulates tumorigenesis in hepatocellular carcinoma by targeting AKT3 / R. Nassirpour, P.P. Mehta, M.J. Yin // *PLoS One.* – 2013. – Vol. 8. – P. e79655.
74. miR-143 is down regulated in cervical cancer and promotes apoptosis and inhibits tumor formation by targeting Bcl-2 / L. Liu, X. Yu, X. Guo [et al.] // *Mol. Med. Rep.* – 2012. – Vol. 5. – P. 753–760.
75. miR-375 is down-regulated in squamous cervical cancer and inhibits cell migration and invasion via targeting transcription factor SP1 / F. Wang, Y. Li, J. Zhou [et al.] // *Am. J. Pathol.* – 2011. – Vol. 179. – P. 2580–2588.

76. Negative regulatory sequences in the lin-14 3'-untranslated region are necessary to generate a temporal switch during *Caenorhabditis elegans* development / B. Wightman, T.R. Burglin, J. Gatto [et al.] // *Genes Dev.* – 1991. – Vol. 5. – 1813–1824.
77. Oncogenic MicroRNAs: Key Players in Malignant Transformation. / T. Frixia, S. Donzelli, G. Blandino // *Cancers (Basel)*. – 2015. – Vol. 7(4). – P. 2466–2485.
78. Open source Epidemiologic statistics for public Health (version 3.0) / A.G. Dean, K.M. Sullivan, M.M. Soe // [Electronic resource]. Mode of access: <http://www.openepi.com>.
79. Overexpression of p16 as an indicator for human papillomavirus oncogenic activity in cervical squamous neoplasia / M. Ishikawa, T. Fujii, M. Saito // *Int. J. Gin. Cancer.* – 2006. – Vol. 16. – P. 347–353.
80. 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.] // *Int. J. Cancer.* – 2001. – Vol. 92 (2). – P. 276–284.
81. Overview of MicroRNA Biology / A.M. Mohr, J.L. Mott // *Semin. Liver. Dis.* – 2015. – Vol. 35. – P. 3–11.
82. p16INK4A, CDC6, and MCM5: predictive biomarkers in cervical preinvasive neoplasia and cervical cancer / N. Murphy, M. Ring, C.C. Heffron [et al.] // *J. Clin. Pathol.* – 2005. – Vol. 58 (5). – P. 525–534.
83. p53-Repressed miRNAs are involved with E2F in a feed-forward loop promoting proliferation / R. Brosh, R. Shalgi, A. Liran [et al.] // *Mol. Syst. Biol.* – 2008. – Vol. 4. – P. 229.
84. Patterns of known and novel small RNAs in human cervical cancer / W.O. Lui, N. Pourmand, B.K. Patterson, A. Fire // *Cancer Res.* – 2007. – Vol. 67. – P. 6031–6043.
85. Persistent human papilloma infections and cervical neoplasia / A. Ferenzly, E. Franco // *Lancet Oncol.* – 2002. – Vol. 3. – P. 11–16
86. Polymorphism of the pre-miR-146a is associated with risk of cervical cancer in a Chinese population / C. Yue, M. Wang, B. Ding [et al.] // *Gynecol. Oncol.* – 2011. – Vol. 122. – P. 33–37.

87. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans* / B. Wightman, I. Ha, G. Ruvkun // *Cell*. – 1993. – Vol. 75. – P. 855–862.
88. Prevalence of High-Risk Human Papillomavirus (HR-HPV) Genotypes and Multiple Infections in Cervical Abnormalities from Northern Xinjiang, China / L. Wang, P. Wang, Y. Ren [et al.] // *PLoS One*. – 2016. – Vol. 11 (8). – P. 160–169.
89. Prognostic Significance of HPV Physical Status and Integration Sites in Cervical Cancer / L. Nambaru, B. Meenakumari, R. Swaminathan, T. Rajkumar // *Asian Pac. J. Cancer P.* – 2009. – Vol. 10.
90. Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia / M.Z. Michael, S.M. O'Connor, H.N.G. Pellekaan [et al.] // *Mol. Cancer Res.* – 2003. – Vol. 1. – P. 882–891.
91. Reduction of microRNA-100 expression in cervical cancer and its precursors, and carcinogenic effects through targeting protein PLC1 / B.H. Li, X.D. Cheng, R.G. Lu, X. Xie // *Eur. J. Cancer*. – 2011. – Vol. 47(14).
92. Regulation of cellular miRNA expression by human papillomaviruses / Z.M. Zheng, X. Wang // *Biochim. Biophys Acta*. – 2011. – Vol. 1809 (11–12). – P. 668–677.
93. Robust production and passaging of infectious HPV in squamous epithelium of primary human keratinocytes / H.K. Wang, A.A. Duffy, T.R. Broker [et al.] // *Genes Dev.* – 2009. – Vol. 23(2). – P. 181–194.
94. TGF- β switches from tumor suppressor to prometastatic factor in a model of breast cancer progression / B. Tang, M. Vu, T. Booker [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 2003. – Vol. 112. – P. 1116–1124.
95. The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans* / B.J. Reinhart, F.J. Slack, M. Basson [et al.] // *Nature*. – 2000. – Vol. 403. – P. 901–906.
96. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology / D. Solomon [et al.] // *J. Am. Med. Assoc.* – 2002. – Vol. 287. – P. 2114.
97. The Association of High Risk Human Papillomaviruses in Patients With Cervical Cancer: An Evidence Based Study on Patients With Squamous Cell Dysplasia or

- Carcinoma for Evaluation of 23 Human Papilloma Virus Genotypes / A. Piroozmand, S.M. Mostafavi Zadeh, A. Madani [et al.] // *J. Microbiol.* – 2016. – Vol. 9(4). – P. 30–45.
98. The association of the expression of miR-122-5p and its target ADAM10 with human breast cancer / S. Ergun, M. Ulasli, Y.Z. Igci [et al.] // *Mol. Biol. Rep.* – 2015. – Vol. 42. – P. 497–505.
99. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14* / R.C. Lee, R.L. Feinbaum, V. Ambros // *Cell.* – 1993. – Vol. 75. – P. 843–854.
100. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53 / M. Scheffner, B.A. Werness, J.M. Huibregtse [et al.] // *Cell.* – 1990. – Vol. 63 (6). – P. 1129–1136.
101. The elevated 10-year risk of cervical precancer and cancer in women with human papillomavirus (HPV) type 16 or 18 and the possible utility of type-specific HPV testing in clinical practice / M.J. Khan, P.E. Castle, A.T. Lorincz [et al.] // *J. Natl. Cancer. Inst.* – 2005. – Vol. 97. – P. 1072–1079.
102. The liver-specific microRNA miR-122: biology and therapeutic potential / W. Filipowicz, H. Grosshans // *Prog. Drug Res.* – 2011. – Vol. 67. – P. 221–238.
103. The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1 / P.A. Gregory, A.G. Bert, E.L. Paterson [et al.] // *Nat. Cell Biol.* – 2008. – Vol. 10. – P. 593–601.
104. The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2 / S.M. Park, A.B. Gaur, E. Lengyel, M.E. Peter // *Genes Dev.* – 2008. – Vol. 22. – P. 894–907.
105. The miR-200 family inhibits epithelial-mesenchymal transition and cancer cell migration by direct targeting of E-cadherin transcriptional repressors ZEB1 and ZEB2 / M. Korpala, E.S. Lee, G. Hu, Y. Kang // *J. Biol. Chem.* – 2008. – Vol. 283. – P. 14910–14914.
106. The papillomavirus E7 proteins / A. Roman, K. Munger // *Virology.* – 2013. – Vol. 445(1–2). – P. 138–168.

107. The role of miRNAs in human papilloma virus (HPV)-associated cancers: bridging between HPV-related head and neck cancer and cervical cancer / C.B. Lajer, E. Garnæs, L. Friis-Hansen et al. // *Br. J. Cancer.* – 2012. – Vol. 106. – P. 1526–1534.
108. The roles and clinical significance of microRNAs in cervical cancer / F. Wang, B. Li, X. Xie // *Histol. Histopathol.* – 2016. – Vol. 31 (2). – P. 131–139.
109. Therapeutic microRNA delivery suppresses tumorigenesis in a murine liver cancer model / J. Kota, R.R. Chivukula, K.A. O'Donnell [et al.] // *Cell.* – 2009. – 137. – P. 1005–1017.
110. Transforming growth factor- β 1, transforming growth factor- β 2, and transforming growth factor- β 3 enhance ovarian cancer metastatic potential by inducing a Smad3-dependent epithelial-to-mesenchymal transition / T.V. Do, L.A. Kubba, H. Du [et al.] // *Mol. Cancer Res.* – 2008. – Vol. 6. – P. 695–705.
111. Tumor-suppressive microRNA-22 inhibits the transcription of E-box-containing c-Myc target genes by silencing c-Myc binding protein / J. Xiong, Q. Du, Z. Liang // *Oncogene.* – 2010. – Vol. 29 (35). – P. 4980–4988.
112. Tumor suppressors miRNA-143 and miR-145 and predicted target proteins API5, ERK5, KRAS, and IRS-1 are differentially expressed in proximal and distal colon / J. Pekow, K. Meckel, U. Dougherty [et al.] // *Am. J. Physiol.* – 2015. – Vol. 308. – P. G179–G187.