

На правах рукописи

**Некрасова
Мария Евгеньевна**

**РАННЯЯ ДИАГНОСТИКА И ПРОГНОЗИРОВАНИЕ ТЕЧЕНИЯ
ПРЕДРАКОВЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ШЕЙКИ МАТКИ,
АССОЦИИРОВАННЫХ С ПАПИЛЛОМАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ,
МЕТОДАМИ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО И ЛИПИДОМНОГО
АНАЛИЗА**

14.01.01 – акушерство и гинекология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва – 2019

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

Научные руководители:

доктор медицинских наук Назарова Нисо Мирзоевна
кандидат биологических наук Стародубцева Наталия Леонидовна

Официальные оппоненты:

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

Качалина Ольга Владимировна, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Приволжский исследовательский медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра акушерства и гинекологии ФДПО, доцент

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

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

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

Автореферат разослан «____» _____ 2019 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор медицинских наук, доцент

Калинина Елена Анатольевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Несмотря на внушительные достижения в области молекулярной биологии, которые позволили раскрыть основные механизмы и этапы канцерогенеза и в значительной степени усовершенствовать возможности инструментальной диагностики, с каждым годом в мире прослеживается неутешительная тенденция к увеличению числа больных онкологическими заболеваниями.

Так, в структуре онкологической заболеваемости женского населения России за 2017 г. рак шейки матки (РШМ) занимает 5-е место, его удельный вес составил 5,3% (17587 случаев), в то время как в возрастных группах 25-29 лет и 30-34 лет он занимает 1-е место - 19,82% и 23,31%, соответственно (Каприн А.Д., 2018). В России в 2017 году от РШМ умерло 6480 женщин, при этом в структуре смертности женского населения от онкологических новообразований в возрастной категории 30-39 лет РШМ с его удельным весом 23% занимает 1-е место (Каприн А.Д., 2018).

Несмотря на широкое применение в клинической практике различных деструктивных и эксцизионных методов лечения цервикальных интраэпителиальных неоплазий (CIN) и carcinoma in situ, у ряда пациенток в последующем в процессе наблюдения выявляется персистенция вируса папилломы человека (ВПЧ) высокого канцерогенного риска, что способствует рецидивированию заболевания и неоднократным хирургическим воздействиям на шейку матки (Ашрафян Л.А., 2019; L. Jing, 2018; L. Liu, 2017; Pirtea L., 2016).

С целью точной дифференциальной диагностики степени тяжести CIN, оценки прогноза течения поражений шейки матки легкой степени (CIN 1), для выбора наиболее оптимальной тактики ведения пациенток требуется поиск эффективных биомаркеров, обладающих высокой диагностической и прогностической значимостью.

Большой интерес представляют появившиеся в последние годы постгеномные исследования, в первую очередь, липидомика. Имеющиеся на сегодняшний день исследования уже продемонстрировали потенциальную

перспективу липидомики во многих областях медицины (Czerska M., 2016; Vauzour D., 2015; Coffey M.J., 2015), в том числе и в онкологии. Так, в зарубежной литературе имеются описания ряда исследований липидного профиля тканей с помощью метода масс-спектрометрии при раке легких, щитовидной железы, молочной железы, желудка, поджелудочной железы, колоректальном раке, а также раке печени, почек, предстательной железы, яичников, эндометрия, ВПЧ-ассоциированных раках головы и шеи (Zhao X., 2018; Sans M., 2017; Altadill T., 2017; Токарева А.О., 2017; Jiang S., 2015; Kwon S.Y., 2015; Marien E., 2015; Goto T., 2015).

Доказано, что при неопластической трансформации эпителия шейки матки выявляются количественные и качественные изменения показателей уровня синтеза не только белков, но и различных низкомолекулярных соединений, включая липиды, в пораженных клетках.

Степень разработанности темы исследования

На сегодняшний день данные по исследованию липидного состава тканей шейки матки при ВПЧ-ассоциированных поражениях различной степени тяжести, включая РШМ методом масс-спектрометрии, в мировой литературе отсутствуют. В этой связи чрезвычайно актуальным является изучение и оценка диагностического потенциала липидома тканей шейки матки при поражениях, ассоциированных с папилломавирусной инфекцией, методом масс-спектрометрии, и создание панели липидов-маркеров для дифференциальной диагностики степени тяжести и прогнозирования течения неопластической трансформации эпителия шейки матки и риска развития РШМ.

Цель исследования

Разработать дифференцированные подходы к ведению пациенток с цервикальными интраэпителиальными неоплазиями различной степени тяжести на основании изучения клинических, молекулярно-генетических, морфологических методов и липидного анализа тканей шейки матки методом масс-спектрометрии.

Задачи исследования

1. Провести ретроспективный анализ отдаленных результатов деструктивного и эксцизионного лечения пациенток с предраковыми заболеваниями и раком шейки матки с последующим одномоментным ВПЧ-генотипированием.

2. Изучить особенности липидного профиля тканей шейки матки при цервикальных интраэпителиальных поражениях различной степени тяжести в сравнительном аспекте.

3. Выявить корреляцию гистологического диагноза и липидома пораженных тканей при ВПЧ-ассоциированных заболеваниях шейки матки в зависимости от тяжести поражения (LSIL, HSIL, P16M).

4. Выявить корреляцию уровня экспрессии мРНК генов (CDKN2A/p16, MKi67, PGR, BCL2) и липидного профиля тканей при ВПЧ-ассоциированных поражениях шейки матки (LSIL, HSIL) для оценки риска прогрессирования неопластического процесса.

5. Оценить эффективность и преимущества метода масс-спектрометрии в диагностике цервикальных интраэпителиальных неоплазий различной степени тяжести и с помощью методов многофакторного анализа разработать математические модели для дифференциальной диагностики степени тяжести поражения.

6. Усовершенствовать алгоритм ведения пациенток репродуктивного возраста с ВПЧ-ассоциированными заболеваниями шейки матки с учетом панели липидов, разработанной методом масс-спектрометрии.

Научная новизна

Впервые проведено изучение липидного профиля тканей шейки матки при ВПЧ-ассоциированных заболеваниях у женщин репродуктивного возраста методом масс-спектрометрии. Выявлены достоверные различия липидного профиля тканей шейки матки при доброкачественных, предраковых и злокачественных заболеваниях. Определена диагностическая панель липидов, представленная фосфатидилхолинами, фосфатидилэтаноламинами и

плазмалогенами, ассоциированными с неопластическим процессом и канцерогенезом. Впервые установлена положительная корреляционная связь масс-спектрометрических показателей и гистологического диагноза в дифференциальной диагностике степени тяжести поражения (LSIL, HSIL, РШМ). Доказано прогностическое значение масс-спектрометрических показателей и уровня экспрессии мРНК генов p16, Ki67, BCL2 и PGR для определения группы с высоким риском развития HSIL и РШМ. Впервые продемонстрирована высокая чувствительность и специфичность метода масс-спектрометрии в ранней, дифференциальной и быстрой диагностике ВПЧ-ассоциированных заболеваний шейки матки.

Практическая значимость

Разработан малоинвазивный подход для ранней и дифференциальной диагностики HSIL и РШМ с учетом определения липидома пораженной ткани шейки матки методом масс-спектрометрии. Разработана панель липидных маркеров и доказана целесообразность ее применения у пациенток репродуктивного возраста с гистологическим диагнозом CIN1-2 / CIN2-3 / CIN3-РШМ в качестве дополнительного исследования для точной диагностики степени тяжести поражения. Усовершенствована тактика ведения пациенток с “малыми” формами поражения шейки матки с учетом клинических, молекулярно-генетических методов и данных масс-спектрометрии, позволяющих воздержаться от неоправданных хирургических вмешательств, особенно у женщин, не реализовавших репродуктивную функцию.

Методология и методы исследования

Работа основана на использовании современных методов диагностики ВПЧ-ассоциированных заболеваний шейки матки: клинический осмотр (жалобы, анамнез, гинекологический статус), цитологическое исследование, молекулярно-биологические методы (ВПЧ-генотипирование (21 тип) с определением вирусной нагрузки и изучение уровня экспрессии мРНК генов (p16, Ki67, PGR, BCL2) с помощью ПЦР в режиме реального времени), расширенная кольпоскопия,

биопсия шейки матки (по показаниям) с гистологическим исследованием биопсийного материала.

Липидомный анализ тканей шейки матки осуществлялся с помощью метода масс-спектрометрии с электрораспылительной ионизацией в отделе системной биологии в репродукции ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России (зав. – к.ф.-м.н. Франкевич В.Е.). Экстракты липидов получали в соответствии с модифицированным методом Фолча. Биоптат гомогенизировали в керамической ступке с добавлением жидкого азота и к полученному гомогенату добавляли 4 мл смеси хлороформ-метанол. После инкубирования и фильтрации добавляли 800 мкл водного раствора 1М NaCl и центрифугировали. Органический нижний слой, содержащий липиды, перерастворяли в смеси ацетонитрил-изопропанол.

Определение молекулярного состава образцов проводили с помощью метода тандемной масс-спектрометрии с электрораспылительной ионизацией в положительной моде (m/z 400-1000).

Масс-спектрометрические данные анализировали с помощью многофакторного анализа OPLS-DA с построением классификационной модели. Липиды, соответствующие m/z с максимальным вкладом в проекцию (наибольшие VIP значения модели), являются наиболее значимыми для дифференциации степени тяжести поражения. Идентификация выявленных липидов проводилась по точной массе с использованием баз данных Lipid Maps и Human Metabolome Database в программе R.

Для определения чувствительности и специфичности математической модели было проведено 10 процедур кросс-валидации с последующим усреднением результатов.

Для определения взаимосвязи между исследуемыми параметрами был произведен расчет линейного коэффициента корреляции Спирмена.

Положения, выносимые на защиту

1. Высокая частота рецидивов HSIL и РШМ у женщин, перенесших ранее деструктивное и хирургическое лечение шейки матки по поводу ВПЧ-

ассоциированных заболеваний различной степени тяжести, обусловлена персистенцией или реинфекцией ВПЧ высокого канцерогенного риска. ВПЧ-генотипирование наряду с ежегодным цитологическим исследованием у пациенток после вмешательств на шейке матки позволяет выявлять группу риска по рецидивированию заболевания.

2. Определены наиболее значимые липиды в качестве потенциальных биомаркеров для ранней и дифференциальной диагностики степени тяжести поражений шейки матки - фосфатидилхолины, фосфатидилэтаноламина и плазмалогены. У пациенток с ВПЧ-ассоциированными заболеваниями шейки матки панель выявленных липидов позволяет проводить раннюю диагностику HSIL и РШМ.

3. Положительные корреляционные связи уровней липидов и гистологического диагноза отражают степень неопластического поражения эпителия шейки матки и показывают высокую эффективность масс-спектрометрии в диагностике ВПЧ-ассоциированных заболеваний шейки матки. Данный метод может быть рекомендован к применению в клинической практике в качестве дополнения к морфологическим методам.

Личный вклад автора

Автор принимал непосредственное участие в выборе направления и определении темы научной работы, формировании ее дизайна, формулировке цели и постановке задач исследования. Диссертантом лично были проведены анализ и систематизация литературных данных по теме исследования, по результатам которого был подготовлен обзор литературы. Автор участвовал в клинико-лабораторном обследовании и лечении пациенток. Самостоятельно осуществлял сбор биологического материала, проводил анализ медицинской документации, научное обобщение, статистическую обработку и интерпретацию полученных результатов.

Соответствие диссертации паспорту полученной специальности

Научные положения диссертации соответствуют специальности 14.01.01 – «акушерство и гинекология», полученные результаты соответствуют области

исследования по специальности, пунктам 3, 4, 5 паспорта акушерства и гинекологии.

Апробация диссертации

Диссертационная работа обсуждена на межклинической конференции 24.08.2018 г. и на заседании апробационной комиссии ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России (24.09.2018 г., протокол № 10).

Основные положения диссертации и результаты работы представлены и доложены на международных и российских конференциях: XIX Всероссийском научно-образовательном форуме «Мать и Дитя – 2018», 26-28 сентября 2018 года, Москва; Научно-практическом семинаре «Актуальные проблемы акушерства и гинекологии», 20 сентября 2018 г., Москва; The 5th Annual European Congress of The Association for Mass Spectrometry: Applications to the Clinical Lab (MSACL 2018 EU 5rd Annual Congress), Salzburg, Austria September 11-13, 2018; 66th Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics (ASMS Conference) June 3-7, 2018 San Diego, CA; 3-й научно-практической конференции Северо-Кавказского Федерального округа «Актуальные проблемы акушерства и гинекологии», посвященной 80-летию Ставропольского государственного медицинского университета 2 июня 2018 года, г. Ессентуки; XXIV Всероссийском конгрессе с международным участием «Амбулаторно-поликлиническая помощь в эпицентре женского здоровья» 3-5 апреля 2018 года, Москва; Научно-практическом семинаре «Актуальные проблемы акушерства и гинекологии», 12 апреля 2018 г., Москва; II Национальном научно-образовательном конгрессе «Онкологические проблемы от менархе до постменопаузы» 14-16 февраля 2018 года, Москва; Международном медицинском форуме «Вузовская наука. Инновации» 27-28 февраля 2018 г., Москва; XII Международном конгрессе по репродуктивной медицине, Москва, 16–19 января 2018 года; XI международном конгрессе по репродуктивной медицине, Москва, 17–20 января 2017 года; XXX юбилейном международном конгрессе «Новые технологии в диагностике и лечении гинекологических заболеваний» с курсом эндоскопии, Москва, 6–9 июня 2017 года; XIII съезде ВМСО «Масс-спектрометрия и ее прикладные проблемы»,

Москва, 2017 год; International Congress of Analytical Science (ICAS), 2017, Хайнань, Китай; XVIII Всероссийском научно-образовательном форуме «Мать и Дитя – 2017», Москва, 27–29 сентября 2017 года; The 3th Annual European Congress of The Association for Mass Spectrometry: Applications to the Clinical Lab (MSACL 2017 EU 3rd Annual Congress) Salzburg, Austria September 10-14, 2017; 65th Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics (ASMS Conference), June 4-8, 2017, Indianapolis, Indiana; XXIII Всероссийском конгрессе с международным участием «Амбулаторно-поликлиническая помощь в эпицентре женского здоровья», Москва, 4-6 апреля 2017 года; I Национальном научно-образовательном конгрессе «Онкологические проблемы от менархе до постменопаузы», Москва, 13-15 февраля 2017 года; XI Международном конгрессе по репродуктивной медицине 17–20 января 2017 года; The 2th Annual European Congress of The Association for Mass Spectrometry: Applications to the Clinical Lab (MSACL 2016 EU 2rd Annual Congress) Salzburg, Austria September 12-15, 2016; Asilomar 2016: Novel Instrumentation – 14-18.10.2016- Pacific Grove, CA, USA; V Молодёжной Конференции по молекулярной и клеточной биологии Института цитологии РАН, Санкт-Петербург, 18-21 сентября 2016 года; 21st International Charles Heidelberger Symposium on Cancer Research, Moscow, 24-28 May 2016; 12th European Fourier Transform Mass Spectrometry Workshop, Matera, Italy, April 5-8, 2016; 64th Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics (ASMS Conference), June 5-9, 2016 San Antonio, Texas.

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 26 научных работ, из них 5 – в рецензируемых научных изданиях.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, 4 глав, выводов, практических рекомендаций, списка литературы. Работа изложена на 130 страницах, содержит 13 таблиц, 41 рисунок, 5 приложений. Библиографический указатель содержит 98 источников, из них 7 отечественных и 91 зарубежный.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал исследования

Согласно критериям включения и исключения, в одномоментное проспективное когортное исследование было включено 110 пациенток (средний возраст $33,4 \pm 7,0$ лет), обратившихся в научно-поликлиническое отделение ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России (зав. отделением – д.м.н., проф. Прилепская В.Н.). В зависимости от результатов гистологического исследования биоптатов шейки матки было сформировано 4 группы: I группа - хронический цервицит в сочетании с ВПЧ-инфекцией – 30 человек (27%), II группа - LSIL – 30 человек (27%), III группа - HSIL – 30 человек (27%) и IV группа - РШМ – 20 человек (19%).

Также был проведен ретроспективный анализ отдаленных результатов деструктивного и хирургического лечения 347 пациенток с ВПЧ-ассоциированными заболеваниями шейки матки (LSIL, HSIL, C-r in situ) за период 2007-2017 гг. с последующим одномоментным ВПЧ-генотипированием и цитологическим исследованием.

Критерии включения для одномоментного проспективного исследования: возраст от 21 до 45 лет; ВПЧ ВР; интраэпителиальные поражения шейки матки низкой и высокой степени тяжести, подтвержденные гистологическим методом исследования; регулярный менструальный цикл; способность выполнять требования протокола; предоставление письменного информированного согласия на участие в исследовании.

Критерии включения для ретроспективного исследования: возраст от 25 до 45 лет; деструктивное/хирургическое лечение шейки матки по поводу CIN1/CIN2/CIN3/c-r in situ в анамнезе.

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

Все пациентки подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

Результаты собственных исследований и их обсуждение

Ретроспективный анализ отдаленных результатов хирургического лечения 347 пациенток с ВПЧ-ассоциированными заболеваниями шейки матки (LSIL, HSIL, c-r in situ) за период 2007-2017 гг. выявил, что наиболее распространенными показаниями были HSIL (63%), LSIL (21%) и c-r in situ (16%). При этом CO₂-лазерная вапоризация проводилась в 31% случаев, ножевая конизация – в 22%, ДЭК - 22%, радиоволновой метод -14%, криодеструкция -7%, медикаментозная коагуляция - 4%. 68% деструктивных вмешательств на шейке матки были проведены за пределами НМИЦАГиП имени В.И. Кулакова. Осложнения в виде рубцовой деформация шейки матки встречались в 20% случаев, эндометриоза - в 12%, частичного стеноза наружного зева – 4%, при этом, ИЦН во время беременности была диагностирована у 30% пациенток.

Результаты одномоментного тестирования на 21 тип ВПЧ и цитологического исследования у 347 пациенток, имевших в анамнезе хирургическое лечение шейки матки, показали высокую частоту выявления ВПЧ - 48% случаев, из них ВПЧ ВР составили 96%. Аномальная цитология была выявлена у 27% женщин (ASCUS – у 5%, LSIL – у 10%, HSIL – у 10%, РСИМ – у 2%). Полученные результаты демонстрируют целесообразность применения ВПЧ-

генотипирования наряду с ежегодным цитологическим исследованием у данной группы пациенток с целью прогнозирования риска рецидива заболевания при персистенции ВПЧ. Полученные нами данные совпадают с результатами исследования, в котором также рассматривается целесообразность применения ВПЧ-генотипирования у женщин после хирургического лечения HSIL и РШМ (Garutti P., 2017).

При анализе клинико-anamnestических данных не было выявлено статистически значимых отличий между группами по возрасту, антропометрическим данным, менструальной функции, акушерскому анамнезу и соматической заболеваемости.

При изучении структуры гинекологических заболеваний в анамнезе не было выявлено статистически значимых различий среди исследуемых групп ($p > 0,05$), за исключением нозологии “вульвовагинальный кандидоз”, который достоверно чаще встречался у пациенток с HSIL по сравнению с пациентками с LSIL ($p = 0,03$; OR = 2,9 (1,0-8,5)). В группе пациенток с HSIL достоверно чаще встречалась ВПЧ-инфекция в анамнезе по сравнению с группой I (хронический цервицит) ($p = 0,03$; OR = 3,1 (1,1-8,9)).

При сравнительном анализе встречаемости различных типов ВПЧ по группам было выявлено, что достоверно чаще встречались ВПЧ группы A9 (60%) ($p < 0,001$), а доминирующим типом ВПЧ во всех группах был 16 тип (42%), который выявлялся в 25,7% случаев в группе LSIL, в 43% HSIL и в 39,3% РШМ. Полученные результаты совпадают с данными G. Krashias (2017) и F. Fusco (2018). Однако следует отметить наличие других высокоонкогенных типов ВПЧ – 56, 18, 31, 35, 33, 58, 52, 45, 39, 59, а также ВПЧ 68 типа, относящегося к группе 2A – вероятного канцерогенного риска, и ВПЧ 53, 66, 82 типов, которые относятся к группе 2B – возможного канцерогенного риска (рис.1).

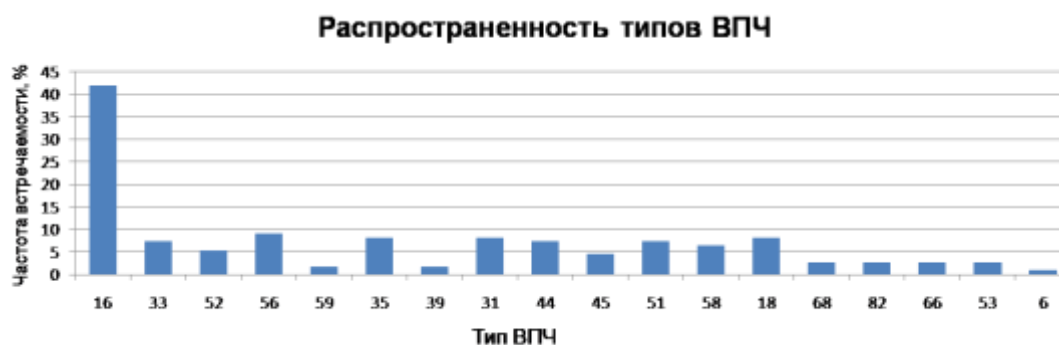


Рисунок 1. Распространенность типов ВПЧ у пациенток исследуемых групп

В большинстве случаев LSIL (80%), HSIL (86%) и РШМ (89,3%) были также выявлены ВПЧ высокого канцерогенного риска. Полученные результаты согласуются с данными М. Li (2018), согласно которым преобладающее большинство случаев LSIL, HSIL и РШМ ассоциированы с ВПЧ ВР.

При сравнительной оценке вирусной нагрузки по группам было выявлено ее достоверное повышение в группах HSIL и РШМ по сравнению с группами хронический цервицит и LSIL (средняя вирусная нагрузка составила 5,6 (5,2-6,2 log). ($p < 0,05$). Полученные результаты согласуются с данными исследований Z. Wu (2018), T. Li (2018), и W. Long (2018), в которых представлена положительная корреляция высокой вирусной нагрузки со степенью тяжести неопластического процесса шейки матки.

Слабовыраженные изменения эпителия шейки матки при расширенной кольпоскопии достоверно чаще встречались у пациенток из I и II групп (хронический цервицит - 80%, LSIL - 67%), в то время как выраженные изменения чаще выявлялись в III и IV группах (HSIL - 87%, РШМ - 70%) ($p < 0,05$). Аналогичные данные получены J. Slama (2013), G. Vercellino (2013) и D. Atanassova (2014), которые рассматривают высокую эффективность метода в диагностике ВПЧ-ассоциированных заболеваний шейки матки.

Результаты липидомного анализа тканей шейки матки

Всем пациенткам, включенным в исследование (n=110), был проведен липидомный анализ пораженных тканей шейки матки методом масс-спектрометрии.

Так, при LSIL значимыми для дифференцирования являлись 33 липида: 13 фосфатидилхолинов (PC), 5 фосфатидилэтаноламинов (PE), 5 плазмалогенов (PCO, PEO), 5 сфингомиелинов (SM), 4 лизофосфатидилхолина (LPC) и 1 лизофосфатидилэтаноламин (LPE). Липидом ткани шейки матки пациенток с LSIL характеризовался повышением уровней всех значимых липидов, наиболее выраженное повышение уровней наблюдалось у PC (рис.3).

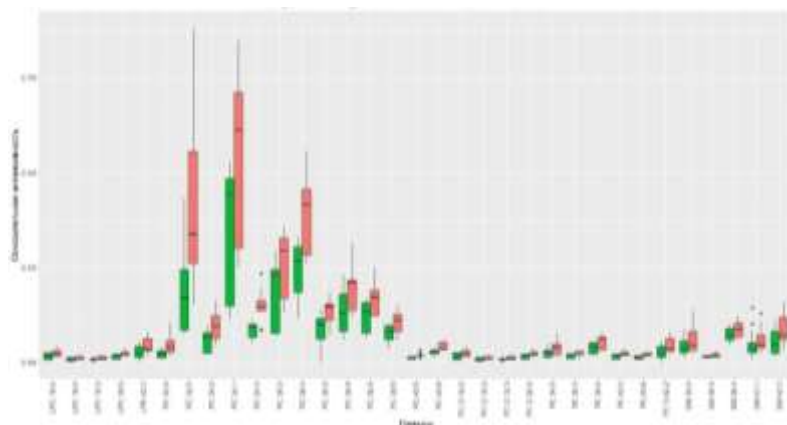


Рисунок 3. Липиды, ответственные за дифференцирование пораженных тканей от окружающих у пациенток с LSIL. Зеленым цветом отмечены окружающие ткани, красным – пораженные

При HSIL значимыми для дифференцирования являлись 32 липида: 12 плазмалогенов, 9 LPE, 7 SM, 3 LPC и 1 PE. Липидом при HSIL характеризовался отсутствием PC, преобладанием LPE, PEO, SM и выраженным снижением их уровней (рис.4).

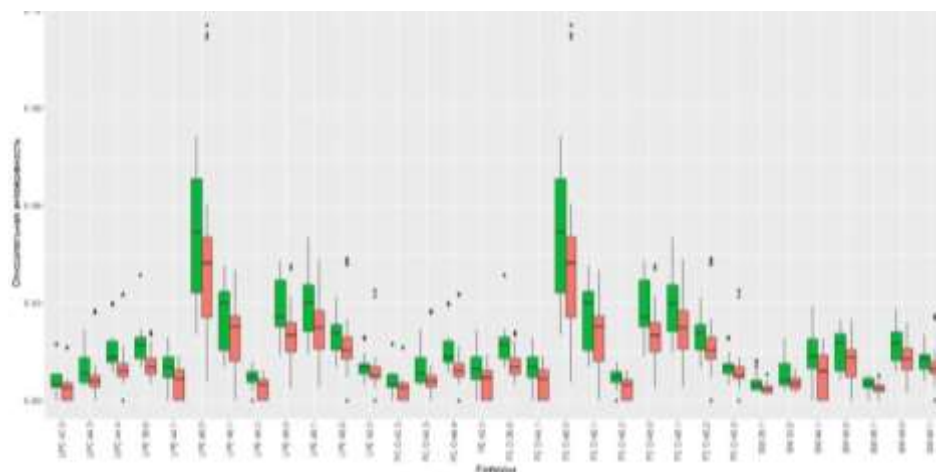


Рисунок 4. Липиды, ответственные за дифференцирование пораженных тканей от окружающих у пациенток с HSIL. Зеленым цветом отмечены окружающие ткани, красным – пораженные

При РШМ значимыми для дифференцирования являлись 37 липидов: 12 плазмалогенов, 11 LPC, 6 PC, 4 SM, 3 PE и 1 LPE. Липидом при РШМ характеризовался значительным преобладанием таких классов липидов, как LPE и PEO, уровни которых в пораженных раком тканях были снижены относительно окружающих тканей. Кроме того, в тканях шейки матки, пораженных раком, были выявлены повышенные уровни PC (рис.5).

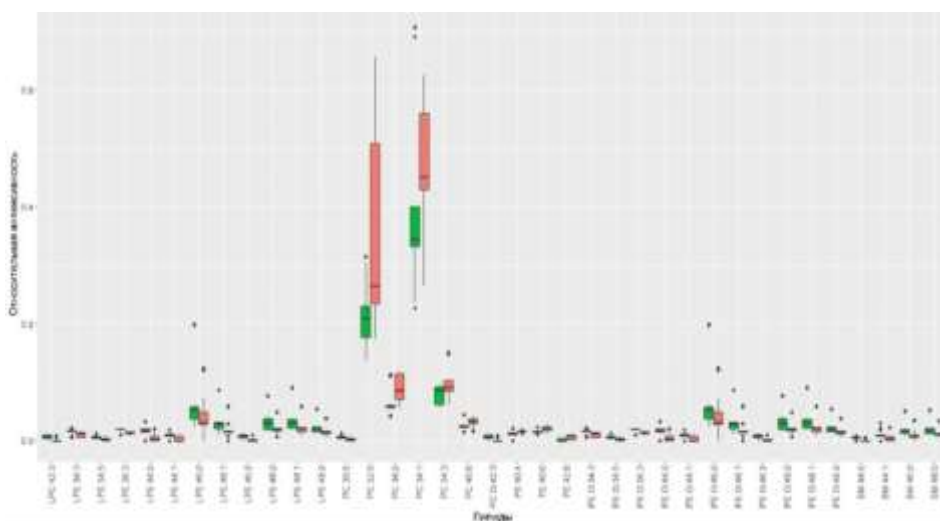


Рисунок 5. Липиды, ответственные за дифференцирование пораженных тканей от окружающих у пациенток с РШМ. Зеленым цветом отмечены окружающие ткани, красным – пораженные

На следующем этапе исследования была изучена и доказана возможность масс-спектрометрии в дифференцировании между собой доброкачественных (воспалительных), предраковых и раковых тканей шейки матки по их липидному профилю.

По результатам PLS-DA анализа были выявлены липиды, классифицирующие группы между собой и относящиеся к глицерофосфолипидам – фосфатидилхолинам (PC 32:0, PC 34:1, PC 36:2, PC 36:4, PC 38:4, LPC 16:0), этаноламинам (PE 38:4, PE 38:5, PE 38:6, PE 40:5, LPE 22:0) и плазмалогенам (PC O-16:0, PC O-16:3, PC O-38:5, PE O-22:0), в тканях, подвергшихся неопластической трансформации вследствие воздействия вируса папилломы человека (рис.6). Данные классы липидов связаны с подавлением апоптоза,

нарушением метаболизма клеток, стимуляцией пролиферативных процессов, что позволяет рассматривать их в качестве потенциальных биомаркеров для ранней и дифференциальной диагностики степени тяжести поражения эпителия (Sans M., 2017; Токарева А.О., 2017; Zhao X., 2018; Altadill T., 2017).

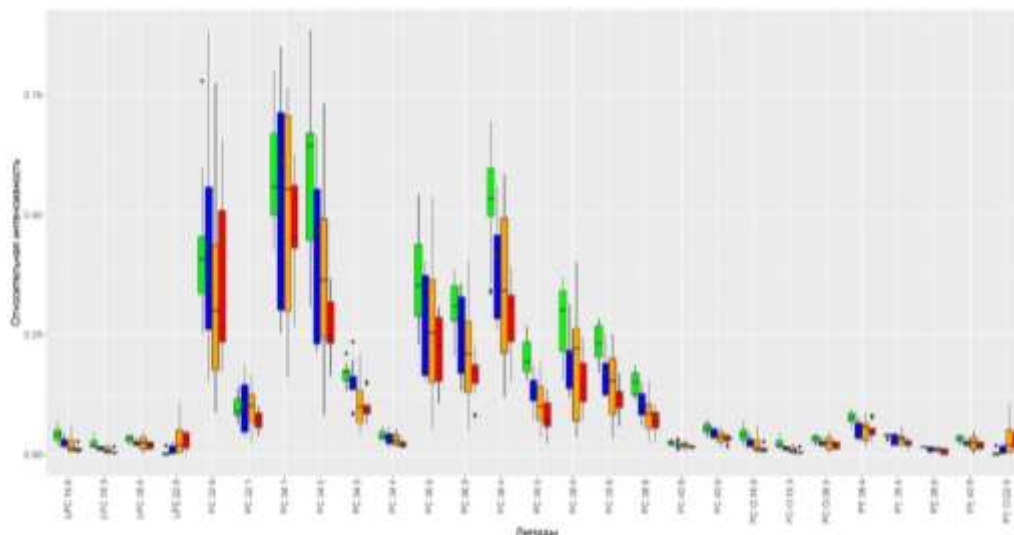


Рисунок 6. Липиды, ответственные за дифференцирование доброкачественных, предраковых и раковых тканей шейки матки. Зеленый цвет соответствуют хр. цервициту, синий – LSIL, желтый – HSIIL, красный – PSHM

С целью оценки диагностической значимости липидома был проведен корреляционный анализ масс-спектрометрических показателей и гистологического диагноза (рис.7). Была выявлена положительная корреляция ($rS = 0,4$; $p = 5,2 \times 10^{-5}$), с высокой достоверностью свидетельствующая о том, что выявленные липиды являются маркерами, отражающими степень поражения эпителия шейки матки.

В этой связи, данный метод может использоваться для ранней, быстрой дифференциальной диагностики степени тяжести неопластических процессов шейки матки в качестве дополнения к гистологическому методу исследования (время выполнения анализа составляет 25 мин).

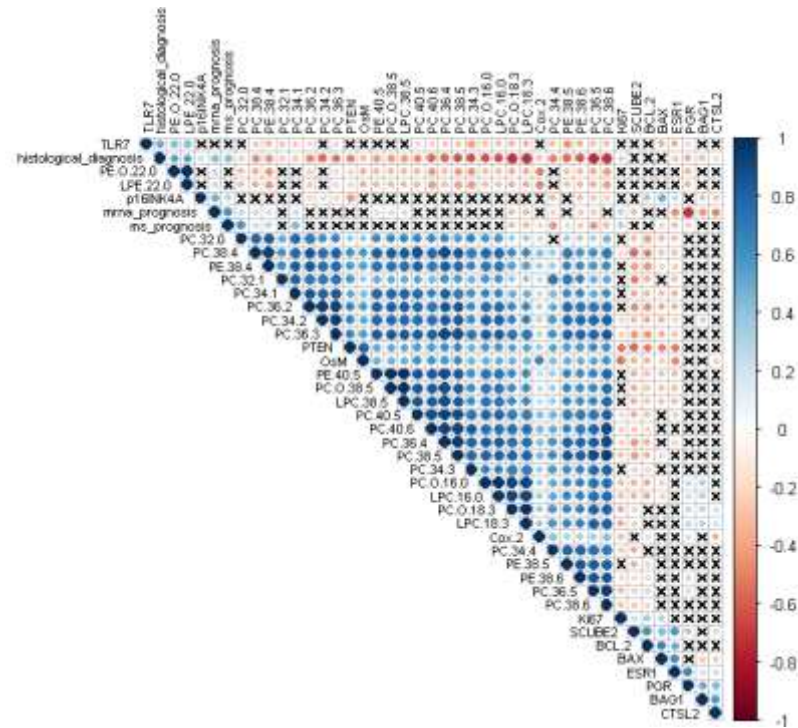


Рисунок 7. Корреляционный анализ Спирмена липидного профиля тканей шейки матки при CIN и РШМ, гистологического диагноза и уровней экспрессии мРНК генов при уровне достоверности 0,05. Синим цветом выделена положительная корреляция, красным цветом – отрицательная корреляция. Степень корреляции выделена цветом – чем сильнее корреляция, тем темнее цвет. “х” – статистически недостоверные данные. Histological_diagnosis – диагноз, поставленный на основании гистологического исследования. mRNA_prognosis (мРНК-прогноз) – прогноз, сделанный на основании анализа мРНК генов. MS_prognosis (МС-прогноз) – прогноз, сделанный на основании масс-спектрометрических данных с использованием результатов прогноза мРНК.

Прогностическое значение липидома (МС-прогноз) оценивалось на основании ранее разработанной модели уровней экспрессии мРНК генов (мРНК-прогноз). Для расчета МС-прогноза строилась OPLS-модель с делением образцов по результатам мРНК-прогноза (значение > 57 берется за 1, < 57 берется за 0).

При корреляционном анализе МС-прогноза и мРНК-прогноза между ними была выявлена положительная корреляция ($r_s = 0,6$; $p = 6,7 \times 10^{-10}$), с высокой достоверностью свидетельствующая о том, что чем выше значения оценочных величин МС-прогноза и данных мРНК-прогноза, тем выше риск прогрессирования CIN и развития РШМ (рис.7).

Глицерофосфолипиды, выявленные при липидном анализе с помощью метода масс-спектрометрии, были ответственны за дифференцирование предрака

и РШМ у пациенток с ВПЧ-ассоциированными заболеваниями. Идентификация полученных липидов проводилась по точной массе с использованием баз данных Lipid Maps и Human Metabolome Database (Sud M., 2007). Полученные нами данные согласуются с результатами ряда исследований, в которых липиды, относящиеся к данному классу, рассматриваются в качестве потенциальных онкомаркеров, в том числе при ВПЧ-ассоциированных раках (Sans M., 2017; Токарева А.О., 2017; Zhao X., 2018; Altadill T., 2017; Jiang S., 2015; Kwon S.Y., 2015; Marien E., 2015; Goto T., 2015).

На основании полученных масс-спектрометрических данных липидных профилей тканей шейки матки были разработаны математические модели для ранней и дифференциальной диагностики ВПЧ-ассоциированных заболеваний (рис.8).

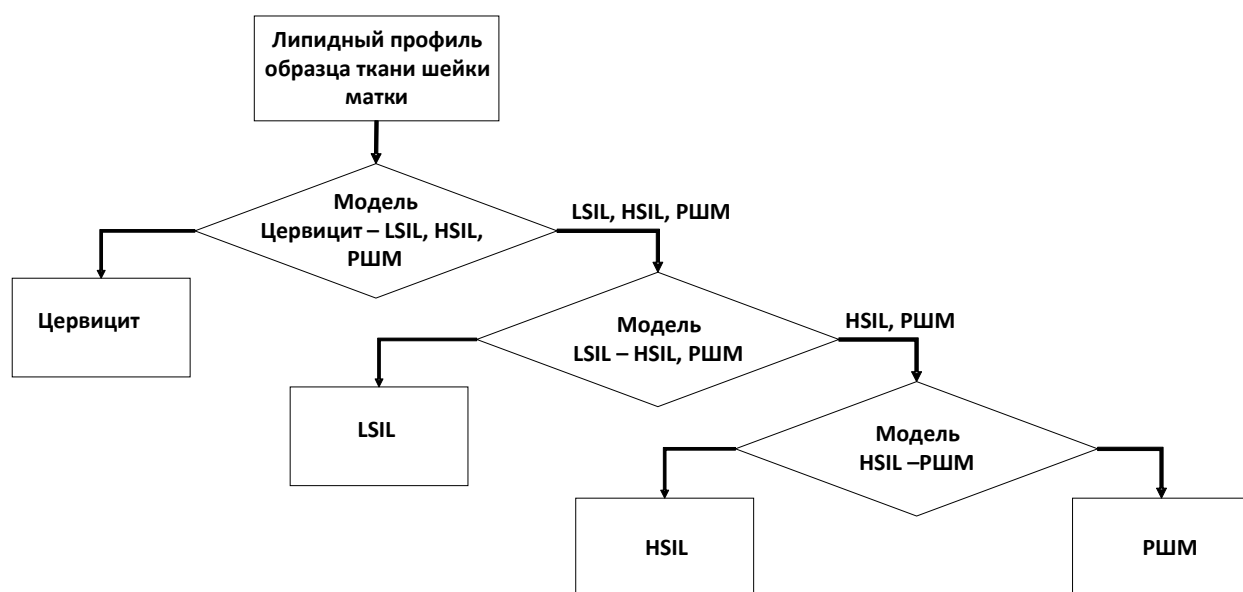


Рисунок 8. Математические модели для ранней и дифференциальной диагностики ВПЧ-ассоциированных заболеваний шейки матки

На первом этапе согласно липидному профилю определялось наличие доброкачественного (хр. цервицит) или неопластического процесса (LSIL, HSIL, РШМ). Чувствительность и специфичность данной модели составили 97 и 87%, соответственно (рис.9).

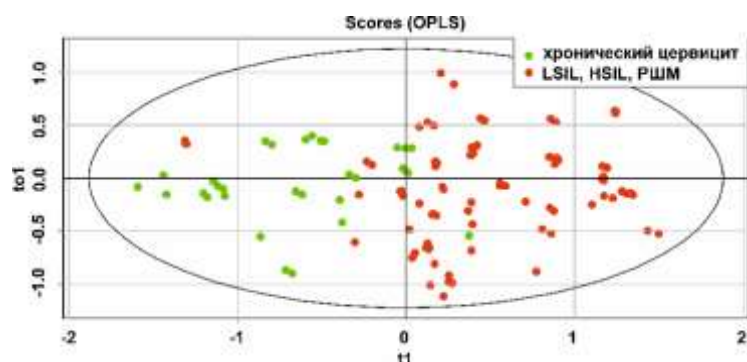


Рисунок 9. Математическая модель для ранней и дифференциальной диагностики доброкачественного и неопластического процесса

На втором этапе применялась соответствующая модель для классификации поражения шейки матки легкой (LSIL) от тяжелой (HSIL) степени тяжести и РШМ. Чувствительность и специфичность данной модели составили 88% и 71% (рис.10).

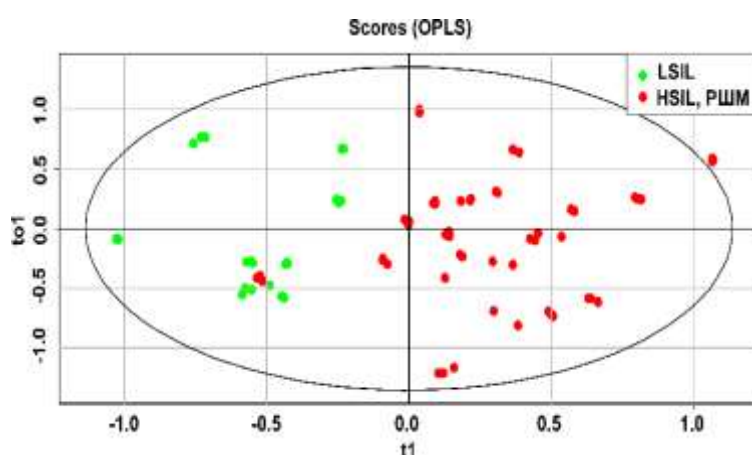


Рисунок 10. Математическая модель для ранней и дифференциальной диагностики поражения шейки матки легкой (LSIL) от тяжелой (HSIL) степени тяжести и РШМ

На третьем этапе проводилось дифференцирование тяжелой степени предракового поражения (HSIL) от злокачественного процесса (РШМ) согласно липидному профилю образца. Чувствительность и специфичность данной модели составили 90 и 92%, соответственно (рис.11).

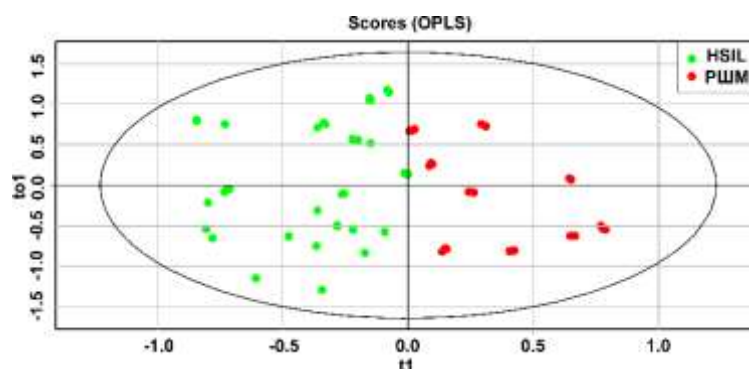


Рисунок 11. Математическая модель для ранней и дифференциальной диагностики HSIL и PШМ

Разработанные модели позволяют классифицировать степень поражения шейки матки по липидному профилю по аналогии с гистологической классификацией CIN. Данные модели могут использоваться для предварительной постановки диагноза, что позволит в дальнейшем рассматривать метод масс-спектрометрии как оптимальный в ранней и быстрой дифференциальной диагностике доброкачественных, неопластических процессов и рака шейки матки.

По результатам проведенного исследования усовершенствован алгоритм ведения пациенток с ВПЧ-ассоциированными заболеваниями шейки матки с учетом панели липидов, разработанной методом масс-спектрометрии.

В настоящее время для оптимизации тактики ведения пациенток с ВПЧ-ассоциированными заболеваниями шейки матки использование липидного анализа пораженной ткани шейки матки методом масс-спектрометрии наряду с молекулярно-биологическими и морфологическими методами исследования имеет важное практическое значение для ранней, дифференциальной, точной и быстрой диагностики степени тяжести поражения эпителия шейки матки. Результаты работы будут способствовать раннему выявлению HSIL и PШМ, более точной постановке диагноза (LSIL/HSIL/PШМ), а также предотвращать неоправданное использование деструктивных методов лечения у женщин фертильного возраста.

ВЫВОДЫ

1. У пациенток, ранее перенесших деструктивные и хирургические вмешательства на шейке матки по поводу ВПЧ-ассоциированных заболеваний

(LSIL, HSIL, carcinoma in situ), установлена высокая частота встречаемости ВПЧ ВР (48%) и аномальной цитологии (27%).

2. При масс-спектрометрическом исследовании липидома тканей шейки матки у пациенток с ВПЧ-ассоциированными заболеваниями (LSIL, HSIL, РШМ) выявлены статистически значимые отличия уровней липидов, относящихся к фосфатидилхолинам (РС 32:0, РС 34:1, РС 36:2, РС 36:4, РС 38:4, LPC 16:0), фосфатидилэтаноламинам (РЕ 38:4, РЕ 38:5, РЕ 38:6, РЕ 40:5, LPE 22:0) и плазмалогенам (РС О-16:0, РС О-16:3, РС О-38:5, РЕ О-22:0).

3. Анализ липидного профиля пораженной ткани шейки матки позволяет определять различия воспаления от предракового и злокачественного процессов, а также дифференцировать степень тяжести поражения эпителия (LSIL, HSIL, РШМ).

4. Диагностическая панель липидома тканей шейки матки у пациенток с HSIL характеризуется отсутствием РС, преобладанием LPE, РЕО (LPE 46:0, РЕ О-48:0, LPE 48:0, РЕ О-46:1), SM (34:0), SM (42:2) и выраженным снижением их уровней; при РШМ – значительным преобладанием LPE и РЕО (LPE 46:0, РЕ О-48:0, LPE 48:0, РЕ О-46:1) и выраженным снижением их уровней, а также повышением уровней РС (34:1) и РС (32:0).

5. Выявлена положительная корреляционная связь масс-спектрометрических показателей и гистологического диагноза, которая отражает степень тяжести поражения эпителия шейки матки и показывает высокую эффективность масс-спектрометрической диагностики. Установлена положительная корреляционная связь уровней экспрессии мРНК генов p16, Ki67, BCL2, PGR и масс-спектрометрических показателей, позволяющая выявлять пациенток с высоким риском развития HSIL и РШМ и определять дальнейший прогноз течения заболевания.

6. Оценка тканей шейки матки с помощью метода масс-спектрометрии является оптимальным, быстрым, малоинвазивным методом ранней и дифференциальной диагностики LSIL, HSIL и РШМ.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. ВПЧ-тестирование целесообразно использовать в дополнение к ежегодному цитологическому скринингу у пациенток, перенесших хирургическое лечение шейки матки, для выявления групп риска по развитию рецидивов HSIL и РШМ.
2. Пациенткам с гистологическим диагнозом CIN1-2 и наличием ВПЧ высокого канцерогенного риска с целью точной дифференциации степени тяжести поражения целесообразно дополнительное исследование липидома тканей шейки матки методом масс-спектрометрии для определения дальнейшей тактики ведения.
3. У пациенток с наличием LSIL (CIN1) и ВПЧ высокого канцерогенного риска, не реализовавших репродуктивную функцию, исследование липидома тканей шейки матки методом масс-спектрометрии позволит воздержаться от неоправданных деструктивных вмешательств.
4. Пациенткам с хроническим цервицитом, персистенцией ВПЧ высокого канцерогенного риска и слабовыраженными изменениями при кольпоскопии целесообразно проводить липидомный анализ ткани шейки матки методом масс-спектрометрии для дифференциальной диагностики между воспалительным процессом и развившимся неопластическим.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Вакцинация против ВПЧ-ассоциированных заболеваний и рака шейки матки: теоретические и практические аспекты / Прилепская В.Н., Зардиашвили М.Д., Хлебкова Ю.С., **Некрасова М.Е.** // **Медицинский совет.** - 2016. - №12. – С. 120-125.
2. Липидомика: новые перспективы поиска маркеров неоплазий / **Некрасова М.Е.**, Назарова Н.М., Стародубцева Н.Л., Чаговец В.В., Кононихин А.С., Франкевич В.Е., Прилепская В.Н. // **Акушерство и гинекология.** – 2017. - №3. - С. 34-40.

3. Липидные маркеры неопластической трансформации эпителия шейки матки при заболеваниях, ассоциированных с вирусом папилломы человека / **Некрасова М.Е.**, Чаговец В.В., Стародубцева Н.Л., Кононихин А.С., Салимова Д.Ф., Токарева А.О., Лагутин В.В., Наумов В.А., Назарова Н.М., Франкевич В.Е., Сухих Г.Т. // **Акушерство и гинекология.** - 2018. - №4. - С. 64-70

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

5. Аногенитальные кондиломы, ассоциированные с ВПЧ: клинико-морфологические аспекты и принципы терапии / Назарова Н.М., **Некрасова М.Е.**, Прилепская В.Н., Гусаков К.И., Трофимов Д.Ю. // **Медицинский совет.** - 2018. - №13 . – С. 10 – 15.

6. Молекулярно-генетические маркеры повышенного риска неопластической трансформации при ВПЧ-ассоциированных заболеваниях шейки матки / Прилепская В.Н., Назарова Н.М., Зардиашвили М.Д., **Некрасова М.Е.**, Трофимов Д.Ю., Бурменская О.В. // **Материалы X Юбилейного международного конгресса по репродуктивной медицине - Москва, 19–22 января 2016.**

7. Роль ВПЧ 52 и 58 типов в развитии цервикальных эпителиальных неоплазий / Назарова Н.М., Прилепская В.Н., Бестаева Н.В., Зардиашвили М.Д., **Некрасова М.Е.**, Довлетханова Э.Р., Бурменская О.В., Трофимов Д.Ю. // **Материалы XXIX Международного конгресса с курсом эндоскопии “Новые технологии в диагностике и лечении гинекологических заболеваний” - Москва, 7–10 июня 2016.**

8. ВПЧ-ассоциированные поражения шейки матки и качество жизни / Сычева Е.Г., Назарова Н.М., **Некрасова М.Е.**, Бурменская О.В. // **Материалы XXIX Международного конгресса с курсом эндоскопии “Новые технологии в диагностике и лечении гинекологических заболеваний” - Москва, 7–10 июня 2016.**

9. Creating of a noninvasive method for the diagnosis of cervical neoplasia degree using CVF proteomic analysis / N. Starodubtseva; V. Frankevich; V. Chagovets; **M. Nekrasova**; M. Zardiashvili; A. Kononikhin; N. Nazarova; G. Sukhikh // Materials of The 30th Anniversary Symposium of the protein Society - USA, Boston, 16-19 July 2016.

10. Changes in lipid constituent of cervical tissue during neoplasia processes / N. Starodubtseva; V. Frankevich; V. Chagovets; **M. Nekrasova**; M. Zardiashvili; A. Kononikhin; N. Nazarova; G. Sukhikh // MSACL 2016 EU 3rd Annual Congress - Salzburg, Austria, September 12-15, 2016 - Travel Award Winner.

11. Протеомный анализ состава цервиковагинальной жидкости при неопластической трансформации эпителия шейки матки, ассоциированной с папилломовирусной инфекцией / Стародубцева Н.Л., Зардиашвили М.Д., Назарова Н.М., **Некрасова М.Е.**, Бугрова А.Е., Чаговец В.В., Кононихин А.С., Франкевич В.Е. // Материалы XI Международного конгресса по репродуктивной медицине - Москва, 17–20 января 2017.

12. Неинвазивная диагностика неоплазий шейки матки методами масс-спектрометрии / Чаговец В.В., Стародубцева Н.Л., Кононихин А.С., Бугрова А.Е., Зардиашвили М.Д., **Некрасова М.Е.**, Назарова Н.М. // Материалы XI Международного конгресса по репродуктивной медицине – Москва, 17–20 января 2017.

13. Встречаемость различных типов ВПЧ у пациенток с предраковыми заболеваниями и раком шейки матки / **Некрасова М.Е.**, Назарова Н.М., Прилепская В.Н., Сычева Е.Г., Зардиашвили М.Д., Бурменская О.В., Довлетханова Э.Р., Шешко П.Л., Трофимов Д.Ю. // Материалы XI Международного конгресса по репродуктивной медицине – Москва, 17–20 января 2017.

14. Молекулярно-генетические маркеры повышенного риска неопластической трансформации при ассоциированных с вирусом папилломы заболеваниях шейки матки / Бурменская О.В., Назарова Н.М., Сычева Е.Г., **Некрасова М.Е.**, Бестаева Н.В., Зардиашвили М.Д., Оводенко Д.Л., Трофимов

Д.Ю. // Материалы XI Международного конгресса по репродуктивной медицине – Москва, 17–20 января 2017.

15. Молекулярно-генетические маркеры повышенного риска неопластической трансформации эпителия шейки матки / Бурменская О.В., Назарова Н.М., Сычева Е.Г., **Некрасова М.Е.**, Бестаева Н.В., Зардиашвили М.Д., Оводенко Д.Л., Трофимов Д.Ю. // Материалы XXIII Всероссийского конгресса с международным участием «Амбулаторно-поликлиническая помощь в эпицентре женского здоровья» - Москва, 4–6 апреля 2017.

16. Протеомный скрининг цервикагинальной жидкости при ВПЧ-ассоциированных интраэпителиальных неоплазиях шейки матки / Зардиашвили М.Д., Назарова Н.М., Стародубцева Н.Л., **Некрасова М.Е.**, Бурменская О.В., Бугрова А.Е., Чаговец В.В., Кононихин А.С., Франкевич В.Е. // Материалы XXIII Всероссийского конгресса с международным участием «Амбулаторно-поликлиническая помощь в эпицентре женского здоровья» - Москва, 4–6 апреля 2017.

17. Результаты ВПЧ-генотипирования у пациенток с предраковыми заболеваниями и раком шейки матки / Назарова Н.М., **Некрасова М.Е.**, Сычева Е.Г., Бурменская О.В., Прилепская В.Н., Мзарелуа Г.М., Довлетханова Э.Р., Шешко П.Л., Трофимов Д.Ю. // Материалы XXIII Всероссийского конгресса с международным участием «Амбулаторно-поликлиническая помощь в эпицентре женского здоровья» - Москва, 4–6 апреля 2017.

18. Оценка качества жизни при «малых» формах поражения шейки матки, ассоциированных с ВПЧ-инфекцией / Сычева Е.Г., Назарова Н.М., Бурменская О.В., **Некрасова М.Е.** // Материалы XXIII Всероссийского конгресса с международным участием «Амбулаторно-поликлиническая помощь в эпицентре женского здоровья» - Москва, 4–6 апреля 2017.

19. Протеомный анализ цервикагинальной жидкости методом масс-спектрометрии при поражениях шейки матки, ассоциированных с ВПЧ-инфекцией / Зардиашвили М.Д., Назарова Н.М., Франкевич В.Е., **Некрасова М.Е.**, Бугрова А.Е., Кононихин А.С., Бржозовский А.Г., Стародубцева Н.Л.,

Асатулова А.В., Прилепская В.Н. // Материалы XXX Юбилейного международного конгресса с курсом эндоскопии “Новые технологии в диагностике и лечении гинекологических заболеваний” - Москва, 6-9 июня 2017.

20. Результаты ВПЧ-генотипирования и анальной цитологии у пациенток с цервикальными интраэпителиальными неоплазиями / Назарова Н.М., Прилепская В.Н., Бурменская О.В., Трофимов Д.Ю., Асатулова А.В., **Некрасова М.Е.**, Суламанидзе Л.А // Материалы XXX Юбилейного международного конгресса с курсом эндоскопии “Новые технологии в диагностике и лечении гинекологических заболеваний” - Москва, 6-9 июня 2017.

21. Lipidomic analysis of cervical tissues with neoplasia processes / V. Frankevich, V. Chagovets, **M. Nekrasova**, N. Nazarova, M. Zardiashvili, A. Kononikhin, N. Starodubtseva, V. Prilepskaya, G. Sukhikh // Materials of Mass Spectrometry: Applications to the Clinical Lab (MSACL) - Salzburg, Austria, September 10 - 14, 2017.

22. Характеристика протеомного состава цервиковагинальной жидкости при заболеваниях шейки матки, ассоциированных с папилломавирусной инфекцией / Зардиашвили М.Д., Назарова Н.М., Франкевич В.Е., **Некрасова М.Е.**, Бугрова А.Е., Кононихин А.С., Бржозовский А. Г., Стародубцева Н.Л., Асатулова А.В. // Материалы XVIII Всероссийского научно-образовательного форума “Мать и дитя” – Москва, 27-29 сентября 2017.

23. Proteomic composition of cervicovaginal fluid in hpv-associated cervical lesions / V. Frankevich, N. Nazarova, M. Zardiashvili, **M. Nekrasova**, A. Bugrova, A. Kononikhin, A. Brzhozovsky, N. Starodubtseva, V. Prilepskaya, G. Sukhikh // Eurogin – Amsterdam, October 8-11, 2017.

24. Shotgun lipidomics study of cervical tissue alterations caused by HPV infection / Tokareva A.O., Chagovets V.V., Starodubtseva N.L., Kononikhin A.S., Zardiashvili M.D., **Nekrasova M.E.**, Nazarova N.M., Frankevich V.E. // Materials of The Annual Scientific Meeting “Clinical proteomics. Postgenome medicine” – Moscow, 30 oct - 1 nov 2017.

25. Анализ липидного состава ткани методом масс-спектрометрии при ВПЧ-ассоциированных заболеваниях шейки матки / **Некрасова М.Е.**, Назарова Н.М., Чаговец В.В., Стародубцева Н.Л., Кононихин А.С., Гусаков К.И., Бурменская О.В., Франкевич В.Е. // Материалы XXIV Всероссийского Конгресса с международным участием “Амбулаторно-поликлиническая помощь в эпицентре женского здоровья” - Москва, 3-5 апреля 2018.

26. Характеристика липидного состава тканей шейки матки при заболеваниях, ассоциированных с ВПЧ высокоонкогенного риска / **Некрасова М.Е.**, Назарова Н.М., Чаговец В.В., Стародубцева Н.Л., Кононихин А.С., Бурменская О.В., Франкевич В.Е. Материалы XXXI Международного конгресса с курсом эндоскопии "Новые технологии в диагностике и лечении гинекологических заболеваний" - Москва, 5-8 июня 2018.

Алгоритм ведения пациенток с ВПЧ-ассоциированными заболеваниями шейки матки с учетом панели липидов, разработанной методом масс-спектрометрии

