#### МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

## федеральное государственное бюджетное учреждение «НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР АКУШЕРСТВА, ГИНЕКОЛОГИИ И ПЕРИНАТОЛОГИИ ИМЕНИ АКАДЕМИКА В.И. КУЛАКОВА»

На правах рукописи

#### АМИРХАНЯН

#### Армине Самвеловна

### ОСОБЕННОСТИ ДИАГНОСТИКИ И ТАКТИКИ ВЕДЕНИЯ ПАЦИЕНТОК С ХРОНИЧЕСКИМ ЦЕРВИЦИТОМ, АССОЦИИРОВАННЫМ С ПАПИЛЛОМАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ

14.01.01 – акушерство и гинекология

Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Научные руководители: доктор медицинских наук

Байрамова Г. Р.

доктор биологических наук

Бурменская О. В.

#### ОГЛАВЛЕНИЕ

введение	4
Глава 1. СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ ОБ ЭТИОПАТОГЕ	ЕНЕЗЕ,
РАННЕЙ ДИАГНОСТИКЕ И ПРОГНОЗИРОВАНИИ ХРОНИЧЕС	СКОГО
ЦЕРВИЦИТА, АССОЦИИРОВАННОГО С ВИРУСОМ ПАПИЛ.	ПОМЫ
ЧЕЛОВЕКА (обзор литературы)	15
1.1. Эпидемиология хронического цервицита, ассоциированного с ВПЧ	15
1.2 Роль вируса папилломы человека в развитии хронического цервици	ита16
1.3 Диагностика хронического цервицита, ассоциированного с ВПЧ	21
1.4 Роль исследования представленности мРНК генов и метилировани	ия гена
WIF1 в диагностике и прогнозировании ВПЧ-ассоциированного хронич	іеского
цервицита	28
Глава 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	36
2.1 Материал исследования	36
2.2 Методы исследования	39
2.2.1 Общеклинические исследования	40
2.2.2 Цитологическое исследование	41
2.2.3 Морфологическое исследование	44
2.2.4 Молекулярно-генетические метод исследования	45
2.2.4.1 ВПЧ-тестирование	45
2.2.4.2 Комплексное исследование ИППП	47
2.2.4.3 Исследование микробиоценоза влагалища	47
2.2.4.4 Исследование транскрипционного профиля генов	49
2.2.4.5 Бисульфитное секвенирование гена WIF1	61
2.2.5 Расширенная кольпоскопия	62
2.2.6 Микроскопическое исследование вагинальных мазков	66
2.3 Методы статистической обработки результатов	68
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	72

3.1 Клинико-анамнестическая характеристика обследуемых женщин	72
3.2 Результаты цитологического метода исследования	93
3.3 Результаты ВПЧ-тестирования	95
3.4 Результаты расширенной кольпоскопии	98
3.5 Результаты морфологического исследования	103
3.6 Результаты микроскопического исследования вагинальных мазков	105
3.7 Результаты комплексного исследования микробиоценоза влагалища.	108
3.8 Результаты исследования представленности мРНК генов человека	114
3.8.1 Анализ корреляционных связей уровня экспрессии мРНК	118
3.8.2 Модель оценки воспалительного процесса	122
3.9 Результаты исследования метилирования гена WIF1	125
3.10 Результаты обследования пациенток в динамике	127
Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ	131
ВЫВОДЫ	.144
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.	146
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	147
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	150
ПРИЛОЖЕНИЕ.	175

#### **ВВЕДЕНИЕ**

#### Актуальность темы исследования

В настоящее время пристальное внимание исследователей привлечено к проблеме цервицитов, которые занимают лидирующие позиции в структуре патологии шейки матки среди женщин репродуктивного возраста [24, 59, 167]. В 50% случаев отмечается затяжное рецидивирующее их течение с развитием хронических цервицитов (ХЦ) [70]. Вместе с тем, по данным ряда авторов, шейки среди патологии матки цервициты, ассоциированные папилломавирусной инфекцией (ПВИ) встречаются в 15-40% случаев [31, 77, 158]. Низкая иммуногенность ПВИ, не вызывающая развития воспалительной реакции, привлекает интерес исследователей во всем мире [59, 157]. Вирус папилломы человека (ВПЧ) высокого онкогенного риска - основной этиологический фактор развития предрака и рака шейки матки (РШМ), является самой распространенной инфекцией среди молодых сексуально активных женщин [102, 142, 178, 196]. За последние десять лет в Российской Федерации количество новых диагностированных случаев рака шейки матки возросло на 24,6% [33, 35]. В России среди женщин в возрасте от 15 до 44 лет 2-й наиболее частой формой рака согласно данным ВОЗ (2016) является РШМ [199, 200]. настоящее время отмечается тенденция увеличения заболеваемости РШМ среди женщин моложе 30 лет [47, 90]. Факторы, способствующие персистенции ВПЧ и запуску патологического процесса на шейке матки, недостаточно изучены. По результатам многочисленных публикаций выявлено, что для женщин молодого возраста характерна транзиторная инфекция с самостоятельной элиминацией вируса в 90% случаев, в то время как у женщин старше 30 лет – чаще наблюдается персистенция ВПЧ в течение 2 лет и более, что является одним из факторов риска развития предрака и РШМ [170, 177, 183].

Применяемые в современной практике клинико-лабораторные методы исследования - цитологический, ДНК-тестирование ВПЧ, расширенная кольпоскопия, морфологическое исследование и исследование микробиоты влагалища выявляют уже существующие поражения шейки матки [3, 34, 83, 85]. Диагностика цервицита, ассоциированного с ПВИ, затруднена вследствие отсутствия ярко выраженных клинических проявлений заболевания [9]. Помимо этого, нередки случаи расхождения результатов клинического, цитологического, кольпоскопического методов исследования ВПЧтестирования [10, 156]. Внедрение в клиническую практику ВПЧгенотипирования (HPVквант-21) методом ПЦР-РВ позволяет установить тип вируса, определить его количественную нагрузку как фактора риска последующего развития дисплазии и рака шейки матки [44, 63, 75]. Цитологическое исследование несмотря на высокую специфичность, обладает низкой чувствительностью, а результат зачастую зависит от квалификации и опыта цитолога [43, 109, 177]. В ряде случаев цитологу трудно провести дифференциальную диагностику между ВПЧ-ассоциированным хроническим цервицитом и цервикальной интраэпителиальной неоплазией I степени (CIN I), так как воспаление в ряде случаев может симулировать картину CIN [15, 90]. Согласно результатам многочисленных исследований показано, что хроническое воспаление может приводить к нарушению дифференцировки клеток и пролиферации эпителия шейки матки [7, 40, 104]. На сегодняшний день нет эффективного метода диагностики и прогнозирования течения дисплазии шейки матки, что нередко приводит к необоснованным, зачастую агрессивным хирургическим воздействиям на шейку матки у молодых женщин репродуктивного возраста [37, 76].

Как показано в работах ряда авторов, воспаление нижнего отдела половых путей женщины сопровождается изменениями иммунологических показателей [26, 72, 98]. Ключевую роль в диагностике вульвовагинитов играет применение интегрального критерия оценки транскрипционного профиля генов иммунной системы: *IL18, CD45, TGFB1, IL12A, TNF, TLR4*,

*GATA3, IL8, IL1B, IL10* [53]. Данные об изменении транскрипционной активности генов иммунной системы при ВПЧ-ассоциированных хронических цервицитах немногочисленные [1, 38, 97].

Дальнейшее изучение представленности мРНК генов иммунной системы в качестве маркеров воспаления и определение уровня метилирования промоторного участка гена *WIF1* позволит совершенствовать диагностику и прогнозировать развитие хронического цервицита, ассоциированного с ВПЧ, а комплексное применение современных клинико-лабораторных методов исследования определит возможность оптимизации и дифференцированного подхода к тактике ведения пациенток с хроническим цервицитом, ассоциированным с ВПЧ [52, 62, 96].

#### Степень разработанности темы исследования

В работах ряда авторов показано, что хроническое воспаление приводит к пролиферации и нарушению дифференцировки клеток многослойного плоского эпителия и сопровождается изменениями иммунологических показателей (профиля про-И противовоспалительных цитокинов), определение уровня которых позволит диагностировать воспалительный процесс и прогнозировать дальнейшее течение заболевания (Ашрафян Л.А., 2008; Киселев В.И., 2011; Bekos C. et al., 2018; Blatt A.J., 2015; Castellsague X., 2014). Известно, что ключевую роль в диагностике вульвовагинитов играет определение транскрипционного профиля генов иммунной системы, в то время как имеются немногочисленные данные о представленности мРНК генов иммунной системы при ВПЧ-ассоциированном хроническом цервиците (Bourmenskaya O.V. et al., 2014).

Применяемые в современной практике клинико-лабораторные методы исследования - цитологический, ДНК-тестирование ВПЧ, расширенная кольпоскопия, морфологическое исследование выявляют уже существующие поражения шейки матки (Каприн А.Д. и соавт., 2015). Отсутствие

эффективных методов диагностики и прогнозирования течения патологии шейки матки нередко приводит к необоснованным и зачастую агрессивным хирургическим воздействиям (Asciutto K.C. et al., 2015; Bekos C. et al., 2018). Изучение экспрессии мРНК генов иммунной системы в качестве маркеров воспаления и определение уровня метилирования промоторного участка гена WIF1 качестве новых высокоэффективных неинвазивных методов диагностики наряду современными традиционными клиниколабораторными методами исследования позволяет совершенствовать диагностику, прогнозировать развитие заболевания, определяет возможность оптимизации и дифференцированного подхода к тактике ведения пациенток с хроническим цервицитом, ассоциированным с ВПЧ.

#### Цель исследования

Усовершенствовать тактику ведения пациенток с хроническим цервицитом, ассоциированным с папилломавирусной инфекцией у женщин репродуктивного возраста на основании анализа результатов клинических, кольпоскопических, морфологических и молекулярно-генетических методов исследования.

#### Задачи исследования

- 1. Изучить частоту выявления хронического цервицита, ассоциированного с папилломавирусной инфекцией у женщин репродуктивного возраста (по обращаемости).
- 2. Изучить распространенность различных типов вируса папилломы человека и роль вирусной нагрузки как маркера патологии шейки матки при хронических цервицитах.
- 3. Определить качественный и количественный состав микробиоценоза влагалища у женщин с хроническим цервицитом.

- 4. Оценить кольпоскопические и клинико-морфологические особенности хронического цервицита, ассоциированного с папилломавирусной инфекцией.
- 5. Определить особенности транскрипционного (мРНК) профиля генов человека, регулирующих пролиферацию и клеточный цикл (*KI67*, *CCND1*, *CDKN2A/P16*), апоптоз (*BCL2*), рецепторный аппарат клеток (*PGR*, *EGFR*), генов иммунной системы (*IFNAR1*, *TNFα*, *IL1b*, *TLR4*, *CD68*, *CXCL5*, *CXCL10*, *CXCL13*), матриксных металлопротеиназ (*MMP8*, *MMP9*) и иммунорегуляторов (*TGFB1*, *IL1RN*, *IL10*, *IL18*, *GATA3*) при хроническом цервиците, ассоциированном с ВПЧ.
- 6. Определить статус метилирования промоторного участка гена *WIF1* при ВПЧ-ассоциированном хроническом цервиците.
- 7. На основании полученных результатов оптимизировать тактику ведения пациенток с хроническим цервицитом, ассоциированным с папилломавирусной инфекцией.

#### Научная новизна

Изучена частота выявления ВПЧ-ассоциированного хронического цервицита, определены наиболее часто встречающиеся типы ВПЧ и оценена роль вирусной нагрузки в развитии заболевания у женщин репродуктивного возраста.

Определены кольпоскопические, клинико-морфологические и молекулярно-генетические особенности ВПЧ – ассоциированного хронического цервицита.

Впервые изучена экспрессия 21 гена человека регулирующих пролиферацию и клеточный цикл (*KI67, CCND1, CDKN2A/P16*), апоптоз (*BCL2*), рецепторный аппарат клеток (*PGR, EGFR*), генов врожденного иммунитета (*IFNAR1, IL1RN, IL1b, IL10, IL18, TNFa, GATA3, TLR4, TGFB1*, *CD68, CXCL5, CXCL10, CXCL13*), матриксных металлопротеиназ (*MMP8*,

*ММР9*) у пациенток с хроническим цервицитом, ассоциированным с вирусом папилломы человека.

Определена роль иммунорегуляторных молекул IL10, IL1RN и TGFB1 в контроле за воспалительной реакцией, а также рецепторов прогестерона (PGR) и эпидермального фактора роста (EGFR) определяющих процессы пролиферации и регенерации эпителия шейки матки.

Впервые в России исследован статус метилирования промоторного участка гена *WIF1* у пациенток с ВПЧ-ассоциированным хроническим цервицитом.

#### Практическая значимость

На основании полученных данных усовершенствована диагностика и тактика ведения пациенток cВПЧ-ассоциированным хроническим цервицитом с учетом результатов современных методов диагностики (жидкостной цитологии, ВПЧ-генотипирования, расширенной кольпоскопии, исследования транскрипционного профиля генов CDKN2A/p16, IL10,  $IL1\beta$ ,  $TNF\alpha$ , CD68 и бисульфитного секвенирования гена WIF1), позволяющих определить объем и сроки проведения диагностических и лечебных мероприятий, персонализировать подход К ведению пациенток ситуациях избежать необоснованные неоднозначных клинических И воздействия на шейку матки, особенно у не реализовавших репродуктивную функцию молодых женщин.

Определен статус метилирования гена *WIF1* в качестве неинвазивного маркера в диагностике ВПЧ-ассоциированного хронического цервицита, позволяющий прогнозировать развитие предрака и рака шейки матки.

Разработан алгоритм ведения пациенток с хроническим цервицитом, ассоциированным с ВПЧ на основании комплексного обследования с применением клинико-лабораторных методов исследования с акцентом на молекулярно-генетические маркеры воспалительного процесса шейки матки.

#### Методология и методы исследования

Диссертационная работа выполнена на базе ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России (директор – академик РАН Г.Т. Сухих). Клиническая часть работы проводилась в научно-поликлиническом отделении  $(H\Pi O)$ ФГБУ «НМИЦАГП В.И. Кулакова» Министерства ИМ. здравоохранения Российской Федерации (заведующий – д.м.н., профессор B.H. Цитологическое Прилепская). (жидкостная цитология) 1 морфологическое исследование проводилось лаборатории патологоанатомического отделения ФБГУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России (заведующий - д.м.н., профессор А.И. Щеголев). В лаборатории молекулярно-генетических методов отдела клинической и молекулярной генетики ФБГУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава (HPVквант-21), России проводилось ВПЧ-тестирование исследование транскрипционного профиля генов, комплексное исследование микробиоценоза влагалища и ИППП (заведующий - д.б.н., профессор РАН Д.Ю. Трофимов). Изучение состояния биоценоза влагалища на основании микроскопии мазков вагинального отделяемого проводилось в лаборатории микробиологии (заведующий - д.м.н. Т.В. Припутневич). На базе Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН в Центре коллективного пользования «ГЕНОМ» проведено определение уровня метилирования промоторного участка гена WIF1.

В период с 2016 по 2019 г. в НПО ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России проведено продольное проспективное исследование, предусматривающее наблюдение естественного развития заболевания в динамике с повторным клинико-лабораторным обследованием пациенток на последующем визите через 12 месяцев.

Обследованы 202 женщины, обратившиеся на амбулаторнополиклинический прием с целью диагностики и лечения патологии шейки матки. Все пациентки, включенные в исследование, соответствовали критериям включения/исключения и подписали добровольное информированное согласие. Экспертная комиссия ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России по вопросам этики биомедицинских исследований рассмотрела материалы и согласно протоколу № 10 от 20 октября 2016 года одобрила проведение научного исследования.

В рамках диссертационной работы использованы клинические, инструментальные, лабораторные методы исследования, аналитические и статистические методики. В ходе выполнения работы наряду с традиционными методами, проведены специальные методы исследования: определение представленности 21 мРНК гена человека и бисульфитное секвенирование гена *WIF1*.

#### Положения, выносимые на защиту

- 1. В структуре патологии шейки матки ВПЧ-ассоциированный хронический цервицит выявляется у каждой четвертой пациентки (25,7%) (по обращаемости). Доминирующими в структуре канцерогенных генотипов при хроническом цервиците являются ВПЧ 16, 33 и 35 типов. Более чем в половине случаев выявляется один тип ВПЧ, у каждой пятой пациентки два и более типов ВПЧ при средней вирусной нагрузке 4,9 log копий ДНК вируса. У каждой второй пациентки (50%) ВПЧ-ассоциированный хронический цервицит сочетается с нарушениями микробиоценоза влагалища.
- 2. Хронический цервицит, ассоциированный с ВПЧ, характеризуется воспалительными изменениями нижнего отдела гениталий, подтвержденными (73,3%)большинства пациенток результатами цитологического исследования и у каждой четвертой (26,7%) - гистологическим методом исследования. Кольпоскопические признаки ВПЧ-ассоциированного хронического цервицита являются не специфичными: у 34,6% женщин слабовыраженные изменениями эпителия шейки выявляются характерные для плоскоклеточных интраэпителиальных поражений низкой

степени тяжести (LSIL), не подтвержденные результатами цитологического и морфологического методов исследования.

3. ВПЧ-ассоциированный хронический цервицит характеризуется повышением экспрессии мРНК гена CDKN2A/p16 - белка-супрессора опухолевого роста. Каскадная активация факторов иммунитета (TNFα, IL1β, TLR4, CD68, IFNAR1, IL10, IL1RN, TGFB1) и провоспалительных маркеров ММР8 и ММР9 на фоне выявленных обратных корреляционных связей с экспрессией мРНК генов EGFR и PGR приводит к подавлению нормальной регенерации эпителия шейки матки. Повышение экспрессии мРНК генов CDKN2A/p16 и IL10 при папилломавирусной инфекции определяет подавление местного иммунитета и способствует нарушению микробиоценоза влагалища. Отсутствие гиперметилирования промоторной области гена WIF1 является благоприятным прогностическим признаком течения ВПЧ-ассоциированной патологии шейки матки.

#### Личный вклад автора

Автор принимал непосредственное участие в определении темы диссертационной работы, подготовке аналитического обзора, постановке задач, определении критериев включения и исключения пациентов, формировании дизайна исследования, участвовал в сборе биологического материала, оформлении и анализе медицинской документации, систематизировании, статистической обработке и обобщении полученных результатов, формулировании выводов, определении научной новизны и практической значимости проведенного исследования.

#### 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.

#### Степень достоверности полученных результатов

Обследование достаточного количества пациенток (n=202), включенных в исследование, с применением современных методов диагностики, соответствующих цели и задачам исследования, подтверждает достоверность результатов исследования. Анализ полученных результатов проведен с применением современных адекватных статистических методов обработки. Выводы и практические рекомендации, вытекающие из результатов исследования, подтверждают положения, выносимые на защиту.

#### Апробация результатов исследования

Диссертационная работа обсуждена на межклинической конференции научно-поликлинического отделения (НПО) 21.06.2019 и представлена на заседании апробационной комиссии ФБГУ «НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова» Минздрава России (02.09.2019 г., протокол №9).

Материалы диссертации, основные положения и результаты работы были доложены на XVIII всероссийском научно-образовательном форуме «Мать и дитя» (Москва, 27-29 сентября 2017 г.), XXIV Всероссийском конгрессе с международным участием и специализированной выставочной экспозицией «Амбулаторно-поликлиническая помощь: проблемы, достижения, перспективы» (Москва, 4-6 апреля 2018 г.), XIX всероссийском научно-образовательном форуме «Мать и дитя» (Москва, 26-28 сентября 2018 г.), XII региональном научно-образовательном форуме «Мать и дитя» (Сочи, 27-28 июня 2019 г.), XX всероссийском научно-образовательном форуме «Мать и дитя» (Москва, 25-27 сентября 2019 г.).

#### Внедрение результатов исследования в практику

Разработанный на основании полученных результатов исследования алгоритм ведения пациенток с хроническим цервицитом, ассоциированным с ВПЧ, используется в практической деятельности врачей акушеровгинекологов научно-поликлинического отделения ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России. Материалы диссертационной работы используются в лекционных материалах семинаров и форумов.

По теме диссертации опубликовано 9 научных работ, из них 6 – в рецензируемых научных изданиях ВАК Министерства образования РФ и индексируемых в SCOPUS.

#### Структура и объем диссертации

Диссертационная работа состоит из введения, 4 глав, включающих обзор литературы, материалы и методы, результаты собственных исследований и их обсуждение, а также выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Работа изложена на 175 страницах, проиллюстрирована 28 рисунками, включает 31 таблицу. Библиографический указатель содержит 208 литературных источников, из них - 82 отечественных и 126 зарубежных авторов.

# ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ ОБ ЭТИОПАТОГЕНЕЗЕ, РАННЕЙ ДИАГНОСТИКЕ И ПРОГНОЗИРОВАНИИ ХРОНИЧЕСКОГО ЦЕРВИЦИТА, АССОЦИИРОВАННОГО С ВИРУСОМ ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА (обзор литературы)

#### 1.1. Эпидемиология хронического цервицита, ассоциированного с ВПЧ

Проблеме хронических цервицитов, ассоциированных с ВПЧ, в последние годы во всем мире уделяется особое внимание ввиду не только высокой частоты встречаемости среди женщин репродуктивного возраста, но и в связи с доказанной значимой ролью цервицитов в возникновении и развитии предрака и рака шейки матки [51, 131, 175]. Согласно данным Серова В.Н. и соавт. (2016) цервициты диагностируются у каждой третьей (34,9%) пациентки с патологией шейки матки [70]. Развитие цервицитов в большинстве случаев обусловлено ассоциацией условно патогенных аэробных и анаэробных бактерий, грибов рода Candida spp., возбудителей инфекций, передаваемые половым путем (ИППП) [22, 106, 107, 124, 151, 181, 198]. Вовлечение в патологический процесс нескольких инфекционных агентов и многообразие этиологических факторов зачастую приводит к хроническому рецидивирующему течению заболевания [2, 19, 39, 48, 135]. Так, по Jayakumar N.K. (2015), при проведении результатам исследования морфологического исследования биоптатов шейки матки 613 женщин, неспецифический хронический цервицит верифицирован у 547 (89,2%) [145]. В работе Байрамовой Г.Р. (2013), показано, что на фоне длительного воспаления, индуцированного рецидивирующим течением вульвовагинального кандидоза, у каждой второй пациентки (50,6%) согласно результатам морфологического исследования, развиваются дистрофические изменения эпителия шейки матки, диагностируемые как ХЦ [8, 13].

Длительное воздействие физических и химических факторов, вызывающих раздражение (использование тампонов, шейных колпачков, пессариев, спермицидов) и травматизацию шейки матки (роды, аборты, диагностические выскабливания цервикального канала) способствуют изменение локальных иммунных реакций и, как следствие, развитию цервицитов [14, 49, 64].

### 1.2 Роль вируса папилломы человека в развитии хронического цервицита

Вирус папилломы человека является одним из наиболее значимых факторов, способных инициировать и поддерживать хроническое воспаление шейки матки [20, 23, 28, 77]. По данным исследования Мальцевой Л.И. и соавт. (2012), около 86% случаев хронического цервицита ассоциировано с ВПЧ [51]. В работе Mirzaie-Kashani Е. и соавт. (2014), направленной на определение частоты встречаемости ВПЧ при хроническом цервиците, предраке и РШМ, показано, что среди 122 обследованных пациенток ХЦ гистологически подтверждается у 79 (64,7%) женщин, при этом у 74,5% - выявлена ассоциация с ПВИ [160].

Папилломавирусная инфекция занимает лидирующее место среди инфекций, передаваемых половым путем, и большинство людей сталкиваются с ВПЧ вскоре после начала половой жизни, что объясняет и то, что пик инфицирования вирусом приходится на 16–25 летний возраст пациенток, в то время как к 35 годам частота выявления вируса уменьшается уже в 2 раза [133, 137, 141, 171, 199, 200]. Риск заражения ВПЧ сексуально-активных женщин в течение жизни составляет 20-60% [46, 89]. По данным Вгипі L. (2019) в течение 2-3 лет после начала половой жизни подвержены инфицированию около 50-80% женщин [98].

На сегодняшний день в мире насчитывается более 200 генотипов ВПЧ (I-IDSOG-Europe) [64]. Слизистые оболочки органов репродуктивной системы женщин поражают более 40 типов [119, 129, 206]. Современная классификация, дифференцирующая ВПЧ на высокоонкогенные (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 и др.) и низкоонкогенные (6, 11, 42, 43, 44 и др.) типы, позволяет прогнозировать развитие ПВИ и определять дальнейшую тактику ведения пациента индивидуально в каждом конкретном случае. [27, 98, 100, 120]. По мнению ряда авторов, более 80% случаев развития рака шейки матки вызвано пятью наиболее онкогенными типами ВПЧ (16, 18, 31, 33, 45) [16, 64, 86, 104, 146, 195].

Согласно данным современных исследований, факторами, инициирующими передачу ПВИ, являются:

- Раннее начало половой жизни (14-18 лет), в связи с незрелостью и высокой чувствительностью к повреждающим факторам эпителия шейки матки [46, 128].
- Большое количество половых партнеров (4 и более) в течение жизни [70]. Так, по данным Cubie H.A. (2013) число половых партнеров прямо пропорционально частоте инфицирования ВПЧ: при наличии одного полового партнера ВПЧ выявляется у 17-21% женщин, в то время как при наличии более 5 партнеров ВПЧ выявляется у 69-83% женщин [117].
- Половые контакты с ВПЧ-позитивными партнерами, имеющими клинические проявления ПВИ [50, 68].
- Иммунодефицитные и иммуносупрессивные состояния (ВИЧ, трансплантация органов) [96, 123, 197].
- Сопутствующие инфекции, вызванные хламидиями, микоплазмами, генитальным герпесом, цитомегаловирусом и др. [55, 80, 150, 151, 152, 153, 201, 203]. Согласно результатам исследования Шипулиной О.Ю. и соавт. (2012), среди женщин с инфекциями передаваемыми половым путем в 2 раза чаще выявляли ВПЧ по сравнению с женщинами, не имеющими генитальных инфекций [82].

- Особенности физиологического состояниям (эктопия и эктропион шейки матки) и заболевания шейки матки (истинная эрозия, лейкоплакия и эндометриоз шейки матки, полипы цервикального канала) [67, 111, 138].
- Травмы во время родов и абортов, введение внутриматочной спирали с нарушением рецепции и трофики тканей шейки матки [55, 68].
- Табакокурение вследствие влияния на слизистую шейки матки продуктов сгорания, подавляющих местный иммунитет [25, 132, 138].

На сегодняшний день, показано что длительная персистенция вируса в организме хозяина определена низкой иммуногенностью ВПЧ. Выработка антител недостаточна, не формируется длительная и надежная иммунная защита, но между тем, ПВИ определяет развитие хронического цервицита путем активации противовирусного адаптивного ВПЧ-специфического и врожденного иммунитета. Как показывают исследования, самоэлиминация вируса и регрессия имеющихся ВПЧ-ассоциированных поражений шейки матки в 80 – 90% случаев происходят у молодых женщин, в то время как среди женшин старшей возрастной группы чаще наблюдается длительная персистенция вируса [57, 66, 84, 108, 117]. Элиминации вируса в среднем происходит в течение 8 месяцев у подростков, в то время как у молодых женщин 18 - 25 лет для этого требуется от 1,5 до 2 лет [37]. Наиболее опасным фактором прогрессии патологии шейки матки, ассоциированной с ВПЧ, является персистенция ВПЧ ВКР более 2 лет. Сопутствующее воспаление во многом может быть определяющим фактором персистенции вируса. Только ВПЧ не достаточное условие ДЛЯ развития наличие клеточной трансформации и ХЦ. Дополнительными ко-факторами являются развитие выраженной воспалительной реакции вследствие длительного воздействие физических повреждающего химических И агентов, гормональными и иммунологическими изменениями, присоединением ИППП. Риск заражения ВПЧ в 4,7 раза выше у женщин, инфицированных *Ureaplasma* urealyticum [92, 138, 152].

Развитие заболеваний, ассоциированных c папилломавирусной инфекцией, начиная от ВПЧ-ассоциированного цервицита до развития рака шейки матки, согласно многочисленным исследованиям, связано внедрением ВПЧ в базальные слои эпителия шейки матки и поражением полипотентных стволовых и делящихся клеток под цилиндрическим эпителием в переходной зоне – зоне трансформации, в цервикальном канале и эндоцервикальных криптах [116, 126, 172]. Возможно латентное течение папилломавирусной инфекции с последующей спонтанной самоэлиминацией вируса. В то время как длительная персистенция вируса приводит к повышению риска развития ВПЧ ассоциированного хронического цервицита, прогрессированию CIN и снижению вероятности обратного развития заболевания. Длительная трансформирующая персистенция ВПЧ ВКР и интеграций вируса в геном клетки играет ключевую роль в развитии последующей дисплазии и рака шейки матки [113, 127, 172].

В строение ДНК-содержащего ВПЧ, входят ранние функциональные (Е 1–7) и поздние структурные (L1 и L2) гены, участвующие в процессе клеточной трансформации [207, 208]. Ранние гены Е1, Е2, Е3, Е4, Е5, Е6, Е7, составляющие геном ВПЧ, участвуют в регуляции вегетативной и пролиферативной фаз жизненного цикла вируса, поздние гены L1, L2, кодирующие белки капсида, а также некодирующая длинная контрольная область LCR, участвуют в регуляции транскрипции и репликации ВПЧ [17, 30]. Белок Е2 ВПЧ служит транскрипционным супрессором генов Е6 и Е7 в инфицированных эпителиальных клетках человека. По мере созревания и достижения терминального дифференцированного слоя эпителия базальных клеток, происходит экспрессия капсидных белков L1 и L2, накопление вирусных частиц, удаляемых вместе со слущиваемым плоским эпителием, что обеспечивает непрерывную передачу и инфицирование ВПЧ [190, 191].

Ранним событием в прогрессии ВПЧ-ассоциированных поражений шейки матки, является нарушение в геноме ВПЧ, приводящее к потере фрагмента ДНК и экспрессии гена E2, в результате интеграции высокоонкогенных типов

ВПЧ в геном клетки-хозяина. Это приводит к нерегулируемой транскрипции и гиперэкспрессии ранних вирусных белков Е5, Е6 и Е7, воздействующих на гены и инактивирующих белок-онкосупрессор р53 и регуляторный белок ретинобластомы (pRb) клеточного цикла. Инактивация pRb с последующей утратой контроля клеточного цикла и репарации ДНК ведет к сверхэкспрессии белка и рефлекторной активации р16. В конечном итоге это ведет к накоплению мутаций и повышению риска малигнизации [45, 74]. В низких концентрациях возможна экспрессия р16 в здоровых клетках, в то время как шейки тяжелых дисплазиях И при раке матки наблюдается сверхэкспрессия белка p16, что является надежным индикатором персистенции высокоонкогенных типов ВПЧ. Таким образом, уровень экспрессии онкобелков Е6 и Е7 коррелирует со степень тяжести неоплазии шейки матки. Росту уровня циклооксигеназы способствуют белки Е5, которые ведут к активации выброса простагландинов и формированию признаков воспаления, в то время как сам процесс воспаления способствует активации ферментов эпигенетических модификаций генома, искажению генетической программы клеток и как следствие - запуску канцерогенеза [5, 105].

В исследовании Fernandes J.V. и соавт. (2015) показано, что ВПЧ приводит к генетическим перестройкам, нестабильности генома и к активации онкогенов, т.е. к изменениям, которые в конечном итоге могут стать причиной запуска и развития канцерогенеза [131]. Посредством индукции сигнальных механизмов вследствие активации онкобелков развивается воспаление с включение в патологический процесс азота и активных форм кислорода, стимулирующих выработку хемокинов и провоспалительных цитокинов, факторов роста, ферментов, включая циклооксигеназу и металлопротеиназы, простогландины и различные микроРНК, регулирующих пролиферацию, ангиогенез, старение и гибель клеток, индуцируя соматические мутации, метилирование ДНК, и как следствие развитие ВПЧ-ассоциированной патологии шейки матки [130].

#### 1.3 Диагностика хронического цервицита, ассоциированного с ВПЧ

Длительное воспаление, как показано в исследовании Бебневой Т.Н. и соавт. (2018),В конечном итоге ведет развитию характерных морфологических признаков хронического цервицита с дистрофическими изменениями многослойного плоского И ферментативными эпителия нарушениями, приводящими к снижению или исчезновению гликогена в тканях шейки матки [18]. Поражение стромы шейки матки является следствием инфильтрации и утолщения соединительной ткани слизистой шейки матки. Гипертрофия шейки матки - результат пролиферации фиброзной ткани, определяющий замедление и нарушение процесса регенерации тканей нормальной структуры. При осмотре шейка матки при воспалении отечна, вследствие расширения и полнокровности сосудов с очаговой или диффузной гиперемии. Распространение воспаления на железы шейки матки и в результате закупорки выводимых протоков желез формируются (наботовы) фиброзной ретенционные кисты cплотной капсулой, перерастянутым выраженным расширенным сосудистым рисунком на их поверхности и с мутным, густым и гноевидным содержимым, которые, в свою очередь, также приводят к гипертрофии шейки матки [4, 6, 42].

Рядом авторов отмечено, что в 25 - 48% случаев ХЦ протекает бессимптомно: жалоб женщины не предъявляют, выделения из половых путей незначительные, гиперемии шейки матки нет [61, 67, 68]. Вместе с тем, шейка матки и влагалище - единая морфофункциональная система, и зачастую, клинические проявления цервицита сочетаются с признаками вульвовагинита. На протяжении нескольких месяцев и даже лет женщин беспокоят обильные выделения из половых путей, зуд и жжение в области вульвы, дизурия. изъязвления шейки матки, кровянистые выделения, в том числе и посткоитальные. Длительно протекающее воспаление влияет на качество жизни пациентки и ведет к развитию ряда осложнений: ВЗОМТ, спаечного процесса и хронической тазовой боли, запуску канцерогенеза, развитию

полипов эндометрия и цервикального канала, развитию эндометритов [12, 20]. Кроме того, хроническое воспаление может приводить к нарушению репродуктивной функции женщин, невынашиванию или бесплодию, внематочным беременностям, развитию аномалий родовой деятельности, послеродовому эндометриту [18, 51].

Отсутствие ярко выраженных характерных клинических проявлений ВПЧ-ассоциированного хронического цервицита затрудняет диагностику, прогнозирование развития заболевания и определение тактики ведения пациенток. Диагностика ВПЧ-ассоциированного хронического цервицита, по мнению ряда авторов, должна быть комплексной с проведением ВПЧтестирования, цитологического исследования (традиционной определения онкобелков Е6 и Е7, оценки жидкостной). экспрессии молекулярно-генетических маркеров пролиферации p16 И Ki67 иммуноцитохимическим (ИЦХ), иммуногистохимическим (ИГХ) методом, микробиологического исследования отделяемого, определения урогенитальных инфекций и оценки биоценоза влагалища, расширенной кольпоскопии [10, 20, 85]. В ряде случаев, расхождении результатов ВПЧтестирования, цитологического исследования и расширенной кольпоскопии, показано выполнение прицельной биопсии шейки матки с последующей гистологической верификацией диагноза [88, 90].

Качественное определение ДНК ВПЧ высокочувствительный информативный методом, не позволяющий прогнозировать течение инфекции и возможность последующей самоэлиминации вируса [141]. В настоящее время рядом авторов отмечено, что основным диагностическим методом, ВПЧпозволяющим определить тактику ведения пациенток ассоциированным хроническим цервицитом, обладающим максимальной прогностической значимостью, является типирование ВПЧ методом ПЦР-РВ с определением количества геномных эквивалентов вируса (Digene-тест, Cobas HPV Test и др.) [96, 112]. Метод позволяет прогнозировать самоэлиминацию или прогрессирование инфекции до развития дисплазии и рака шейки матки. В Российской Федерации широко внедрен метод ПЦР-РВ (HPVквант-21) для определения наиболее распространенных типов ВПЧ высокого и низкого онкогенного риска. Тест (НРУквант-21) позволяет выполнить типирование и определить вирусную нагрузку ВПЧ 21 типа (16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 44, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82, 6, 11) [43, 63]. BITHтесты Амплисенс позволяют провести скрининг и количественную оценку 1-14 типов ВПЧ первой группы (классификации IARC), с дифференцировкой типов 16, 18 и Важное клиническое значение в этих тестах отводится количественной оценке вирусной нагрузки. Выявление ВПЧ в количестве до 5  $\log \lg (>5 \log копий ДНК ВПЧ на <math>10^5$  клеток) определяет минимальный риск развития дисплазии и рака шейки матки, в то время как количество ВПЧ от 5  $\log$  до 7  $\log$  (<5  $\log$  копий ДНК ВПЧ на  $10^5$  клеток) клинически значимо и зачастую является маркером персистенции ВПЧ, а более 7 log (<5 log копий ДНК ВПЧ на 10<sup>5</sup> клеток) – определяется как порог прогрессии, когда риск развития дисплазии и рака шейки матки высок. Количество геномных эквивалентов вируса более 5  $\log$  (<5  $\log$  копий ДНК ВПЧ на  $10^5$  клеток) персистирующая более 1 года обозначается как нагрузка, ассоциированная с высоким риском развития предрака и рака шейки матки. Необходимо отметить, что при хроническом цервиците чаще выявляется клинически незначимый уровень вирусной нагрузки ВПЧ (<5 log копий ДНК ВПЧ на  $10^5$  клеток), в то время как при развитии дисплазии шейки матки уровень вирусной нагрузки ВПЧ чаще всего высокий (>5 log копий ДНК ВПЧ на  $10^5$  клеток) [43, 63].

В исследовании Кодап Е.А. и соавт. (2013), изучающем функциональное значение и клеточный состав поверхностного эпителия шейки матки 223 пациенток репродуктивного возраста с хроническим ВПЧ-ассоциированным цервицитом с применением цитологического и гистологического исследований биоптатов шейки матки, ВПЧ-типирования методом ПЦР-РВ, а также ИЦХ и ИГХ анализа р16 и Кі67, показало, что длительная персистенция вируса приводит к хронизации воспаления и определяет возможность его

патологического перерождения [149]. По данным Кодап Е.А. и соавт. ВПЧ 16 и 18 типов не выявляется у пациенток с ВПЧ-ассоциированным хроническим цервицитом в отличие от других обнаруживаемых высокоонкогенных типов: 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 и 68. В то же время ВПЧ 16 и 18 типов определялись у женщин с цервицитом в сочетании с дисплазией шейки матки [149]. Согласно данным ИГХ исследования биоптатов шейки матки обнаружены единичные пролиферирующие Кі67-положительные клетки плоского и железистого эпителия и экспрессирующие р16 единичные стареющие клетки. Гистологическое исследование биоптатов шейки матки пациенток с хроническим цервицитом, ассоциированным с ПВИ, выявило комплекс специфических морфологических признаков воспаления в эпителии шейки матки, таких как лимфатическая инфильтрация, акантоз и койлоцитоз [148, 149].

Основным методом диагностики заболеваний шейки матки исторически является традиционное цитологическое исследование материала с окраской по Папаниколау (ПАП-тест) [93, 110]. Помимо традиционной цитологии, в современную клиническую практику в качестве альтернативы активно внедряется современная жидкостная цитология (ЖЦ), например, (ThinPrep Pap тест) с использованием системы CytoScreen, которая при идентичной специфичности является более чувствительным методом диагностики. Терминологическая система Бетесда (The Bethesda System – TBS, 1988 г.) для цитологической интерпретации состояния шейки матки большинстве стран мира [139, 196]. На принадлежность дисплазии шейки матки к низкой или высокой степени (LSIL/HSIL) и предположения о воспалительных изменениях шейки матки указывает морфолог, оценивая результаты жидкостной цитологии. Цитограмма характерная для цервицита содержит возможные реактивные изменения клеток плоского эпителия, которые зачастую расцениваются цитологами как ложная картина ASCUS или CIN I. Такая интерпретация цитологических мазков в ряде случаев требует проведения противовоспалительной терапии [163].

Метод жидкостной цитологии позволяет проводить автоматизированное приготовление, окрашивание и оценку клеточного состава цитологического материала, оптимизируя рабочее временя цитолога при просмотре препаратов. Жидкостный метод при одинаковой чувствительности с традиционным цитологическим исследованием, обеспечивающим высокую информативность исследования за счет практически десятикратного уменьшения числа неинформативных препаратов [180]. Помимо этого, метод жидкостной цитологии позволяет сохранить все забранные клетки и определить ВПЧ высокого онкогенного риска. В последующем, в случае, необходимой дополнительной дифференциальной диагностики LSIL и HSIL в том же образце материала иммуноцитохимическим методом возможно определение онкомаркеров р16/Кі67, коэкспрессия которых коррелируют с тяжестью цервикальных поражений и свидетельствует о нестабильности и скорой прогрессии заболевания [91, 180]. Интенсивность воспалительной реакции и квалификация цитолога в значительной степени влияют на результаты цитологического исследования, так как наличие воспаления в ряде случаев может выдавать картину SIL шейки матки [144]. Согласно данным 1-ой патологоанатомической лаборатории «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова», ложноотрицательный результат цитологического исследования (26,9%), когда истинный дискариоз клетки (крупные гиперхромные ядра разнообразной формы и величины с узким цитоплазматическим ободком) расценивается как клетки с псевдодискариозом связан с рядом факторов: нарушением правил забора (недостаточный для проведения исследования клеточный материал), наличием воспаления на момент исследования и ошибками цитолога. При хроническом цервиците заключение цитолога может варьировать зависимости OT интенсивности воспаления, В TO время при как слабовыраженном воспалении цитологическая картина может не отличаться от таковой при норме. Характерными цитологическими признаками ХЦ являются выраженные дистрофические изменения клеток многослойного плоского эпителия, нарушение ядерно-цитоплазматического соотношения в сторону ядра с признаками псевдодискариоза или с двумя ядрами. Ядро клетки воспалении крупное, с нечеткими, размытыми гипохромное, с признаками псевдодискариоза. В цитограмме определяются значительном количество нейтрофильных лейкоцитов лимфоцитов, плазматических клеток в виде очаговых скоплений, макро- и гистиоцитов. Зачастую многослойный плоский эпителий утолщен с акантозом пролиферацией парабазального клеток слоя, очаговой лимфоидной инфильтрацией в подэпителиальном соединительной ткани [24, 43].

Одним из основных методов диагностики патологии шейки матки является расширенная кольпоскопия, которая проводится при положительном ВПЧ-тесте и/или получении аномального цитологического мазка [61, 178, 193]. Наличие воспаления зачастую симулирует картину цервикальной патологии и рака шейки матки, либо маскирует истинные предраковые поражения шейки матки, затрудняя кольпоскопическую оценку состояния эпителия и сосудов шейки матки. Выявить признаки воспаления, не видимые невооруженным глазом и определить показания и места для проведения прицельной биопсии шейки матки для последующей гистологической верификации диагноза, позволяет проведение расширенной кольпоскопии с проведением проб с уксусной кислотой и раствором Люголя [166, 173]. Морфологической основой формирования ацетобелого эпителия различной плотности, нежной или грубой мозаики и пунктуации является «точечно» определяемая в верхушках сосочков или расположенная горизонтально сосудистая сеть, окружающая незрелые клетки. Появление по всей поверхности отечного и гиперемированного экзоцервикса беспорядочно расположенных красных точек (пунктации) - характерный кольпоскопический признак хронического цервицита. Красная пунктация, характерная для хронического цервицита при проведении пробы с 3% раствором уксусной кислоты, становится ацетобелой, а при нанесении раствора Люголя на пробы Шиллера, эти же участки на общем йод-позитивном фоне - окрашиваются в виде диффузных йод-негативных крапинок или участков с неровными, нечёткими контурами [60, 184].

Макро- и микроскопические объемные сосочки на поверхности экзоцервикса, отдельно расположенные кондиломатозные сгруппированные кондиломатозные бляшки с блестящей поверхностью и проявлениями, ВПЧ-ассоциированных четкими контурами являются поражений шейки матки. Вследствие гиперакантоза многослойного плоского эпителия шейки матки, индуцированного ВПЧ, на пробе с уксусной кислотой - определяется ацетофильная реакция кондилом. Выраженный сосудистый рисунок, «посев» мелких красных точек, по краю поражения или по всему экзоцервиксу, длинных и винтообразных полос, радиальных сосудов в форме петель или колец, вокруг наружного отверстия цервикального канала, являются проявлением воспаления стромы шейки матки индуцированное ПВИ. При проведении расширенной кольпоскопии нередки диагностические ошибки, когда выраженный сосудистый рисунок и нормальные сосуды на фоне воспаления ошибочно принимается как атипические (извитые в виде шпилек и запятых) [114, 115, 173, 184].

Локальная дистрофия многослойного плоского эпителия с очаговыми и диффузными изменениями, очаги пара- или гиперкератоза, реактивного акантоза, проявление АБЭ, нежной мозаики и пунктации, йод-негативных участков с нечеткими контурами являются возможным проявлением аномальной кольпоскопической картины характерной хроническому цервициту, ассоциированному с ВПЧ [60, 184].

В сложных клинических случаях, когда имеются расхождения результатов цитологического исследования, ВПЧ-тестирования и данных расширенной кольпоскопии показано проведение прицельной биопсии шейки матки и выскабливание цервикального канала (по показаниям) с последующей гистологической верификацией диагноза [125, 163, 204]. Гистологическое исследование является «золотым стандартом» в диагностике патологии шейки матки, так как чувствительность патоморфологического исследования шейки

матки составляет 86,7%, при его специфичности в 90,4%. Прицельная биопсия шейки матки с последующей окончательной морфологической верификацией диагноза, оправдана при длительно протекающем не поддающемся терапии хроническом цервиците [11, 54]. Так, по данным Унанян А.Л. и соавт. (2012), наличие кольпоскопических признаков поражения шейки матки среди пациенток старше 35 лет, в отсутствии данных подтверждающих дисплазию шейки матки по результатам жидкостной цитологии без положительной динамики в течение 18–24 месяцев, является показанием к проведению прицельной биопсии и гистологическому исследованию биоптата шейки матки [76]. В тоже время при неадекватной кольпоскопии, отсутствии полной визуализации стыка многослойного плоского и цилиндрического эпителия, выскабливание цервикального показано канала последующим морфологическим исследованием соскоба. Для получения правильного биоптат шейки гистологического заключения, матки взятый ДЛЯ последующего исследования должен иметь размеры не менее 3-5 мм, включать поверхностный эпителий и строму, и не иметь признаков термокоагуляции [11, 76, 134, 182].

## 1.4 Роль исследования представленности мРНК генов и метилирования гена WIF1 в диагностике и прогнозировании ВПЧ- ассоциированного хронического цервицита

Уже существующие патологические изменения шейки матки диагностируются методом цитологического и/или гистологического исследования и расширенной кольпоскопии, в то время как выявление ряда маркеров, определяющих развитие воспаления, и сопровождающих изменения иммунного статуса позволяет прогнозировать развитие и дальнейшее течение заболевания еще до появления морфологических проявлений [156, 160].

Определение экспрессии маркеров пролиферации *KI67* и *CDKN2A/P16* посредством ИГХ исследования является одним из современных методов

диагностики, позволяющим определить степень нарушений клеточной регуляции провести окончательную верификацию диагноза при результатах цитологического исследования ВПЧнеоднозначных тестирования [94, 136, 143, 169]. Белок *p16* (*INK4A*), являясь продуктом гена CDKN2A, подавляет активность циклин-зависимых киназ (4 6) регулирующих G1-фазу клеточного цикла. В норме эспрессия p16 (INK4A) в клетках ограничена, в то время как онкобелок Е7 ВПЧ связываясь с белкомсупрессором опухоли, приводит к его деградации и последующей сверхэкспрессии *CDKN2A/P16* [103, 143]. На индуцированное нарушение клеточного цикла указывает одновременная сверхэкспрессия в атипических клетках плоского эпителия *CDKN2A/P16* и *KI67*. Это позволяет с большей точностью диагностировать плоскоклеточное интраэпителиальное поражение высокой степени (high-grade SIL, HSIL) [121, 180].

Системный и локальный иммунный гомеостаз, который необходим для защиты репродуктивных органов женщины от колонизации условнопатогенной и патогенной флорой, а также для защиты от инфекций, в том числе вирусной природы, обеспечивается в первую очередь механизмами врожденного иммунитета, который формирует первую линию иммунной защиты и осуществляет все стадии неспецифического воспаления. Макрофаги, дендритные клетки, натуральные киллеры, нейтрофилы составными клетками врожденного иммунитета [79].

Путем поглощения и ферментативного распада макрофаги и дендритные клетки осуществляют фагоцитоз и уничтожение микроорганизмов. Фагоцитоз – процесс, сопровождающийся синтезом ряда провоспалительных цитокинов  $(TNF\alpha, IL1B \text{ и др.})$ , сигнализирующих о внедрении чужеродных микроорганизмов и обеспечивающих вовлечение в очаг воспаления из крови других иммунокомпетентных клеток: нейтрофилов, натуральных киллеров, моноцитов, дендритных клеток.

Дендритные клетки, эндотелиальных слоев и в стромы слизистой шейки матки и влагалища, продуцируют растворимые медиаторы, влияющие на

фенотип дендритных клеток с пониженной экспрессией костимулирующих молекул *CD68*, и слабым ответом на стимуляцию *TLR4* [168].

*IL10* и *IL8* продуцируемые натуральными киллерами поддерживают воспалительную реакцию, активируя макрофаги и цитотоксические Тлимфоциты [189].

В нижних отделах половых путей зависимое от синтеза *IL8* количество нейтрофилов постепенно повышается. Экспрессируя *TLR4* и продуцируя цитокины нейтрофилы посредством фагоцитоза, синтеза антимикробных пептидов и окислительных соединений уничтожают чужеродные микроорганизмы.

Клетки врожденного иммунитета распознают патоген – ассоциированные молекулярные паттерны микроорганизмов посредством паттерн распознающих рецепторов. Структурные компоненты клеточной стенки вирусов, бактерий и грибов одинаковые у многих патогенов, являются патоген-ассоциированными молекулярными паттерами воспринимаемые иммунной системой как «чужеродное». Так толл-подобные рецепторы (TLR) относятся к паттерн-распознающим рецепторам. Известно, что их у человека десять, девять из которых присутствуют на клетках половых путей женщин. TLR4 экспрессируется в основном на поверхности эпителиальных клеток влагалища и шейки матки и опознает компоненты жгутиковых простейших и клеточных стенок бактерий грибов, путем взаимодействия липополисахаридами клеточных стенок грамм-отрицательных бактерий. Экспрессия *TLR4* на поверхности эпителиальных клеток влагалища и шейки матки низкая. TLR4 находясь в мембране клеток в неактивном состоянии в виде мономеров, при активации передают внутрь клетки через сигнальные молекулы импульсы, активирующие синтез определенных цитокинов в зависимости от разновидности сигнального пути. Первый сигнальный путь инициирует синтез провоспалительных цитокинов ( $TNF\alpha$  и др.). Второй путем активации интерферон-регулирующего фактора 3 (IRF3), инициирует активацию интерферон-регулируемых генов [71].

Механизм адаптивного (приобретенного) иммунитета, основан на специфической идентификации антигена, уничтожении чужеродных микроорганизмов и обеспечении иммунологической памяти. Адаптивный иммунитет осуществляется при взаимодействии комплекса наивных Т- и Влимфоцитов и молекул HLA, с антигенпрезентирующими клетками (макрофагами, дендритными Лангерганса, клетками, клетками эпителиальными клетками шейки матки). Дифференцирование наивных Тлимфоцитов (Th0) происходит в 4 направлениях:

- ✓ Th1-лимфоциты участвующие в клеточно-опосредованном иммунитете и синтезирующие ряд цитокинов: *IFN-у, IL-2, TNF-а, TNF-β*;
- ✓ Th2-лимфоциты (фактор дифференцировки GATA-3) участвующие в формировании гуморального иммунитета синтез антител, защита от паразитарных инфекций, развитие аллергических реакций и выброс цитокинов: *ILA*, *IL5*, *IL6*, *IL9*, *IL13*, *IL10*;
- ✓ Treg-клетки вырабатывающие транскрипционный фактор (Foxp3) и участвующий в подавлении иммунного ответа регуляторные клетки;
- ✓ Th17-клетки участвующие в воспалительных реакциях факторы дифференцировки RORC.

Цитокины — это низкомолекулярные белки, регуляторы нормальных физиологических функций формирующие и регулирующие защитные реакции организма в ответ на внедрение патогенов и нарушение целостности тканей. Продукция цитокинов осуществляется клетками врожденного и приобретенного иммунитета, такими как лимфоциты, макрофаги, гранулоциты, ретикулярные фибробласты, эндотелиальные клетки [26].

Цитокины способны оказывать воздействие в минимальных концентрациях, один и тот же цитокин может обладать различными биологическими эффектами, при этом эффекты двух цитокинов намного выше, чем сложенные эффекты отдельных цитокинов, в тоже время одни цитокины могут подавлять эффекты других. Действие цитокина на клеткумишень приводит к продукции этой клеткой другого цитокина, который,

воздействуя на вторую клетку, вызывает выработку новых цитокинов. Многие цитокины обладают свойствами гормонов и факторов роста [71].

Цитокины классифицируются на: интерфероны, факторы, стимулирующие хемокины, ростовые факторы, факторы некроза опухолей и интерлейкины.

Система цитокинов обеспечивает согласованное действие иммунной, эндокринной и нервной системы в развитии воспалительной реакции. Функции основных цитокинов, медиаторов иммунного ответа и локального воспаления:

- •*CD68* макросиалин трансмембранный белок, регулятор и маркер фагоцитарной активности макрофагови лизосомального метаболизма, экспрессируемый также дендритными клетками;
- *GATA3* транскрипционный фактор, ключевой фактор регуляции дифференцировки и пролиферациии Т-хелперов II типа;
- •*IL1B* многофункциональный провоспалительный цитокин широкого спектра действия, один из основных медиаторов воспаления, активатор лимфоцитов и макрофагов, усиливающий клеточную адгезию. *IL1B* является одним из медиаторов реакции острой фазы воспаления. Также *IL1B* влияет на обмен веществ соединительной ткани: стимуляция пролиферации фибробластов, повышение синтеза простогландинов, ростовых факторов, ряда циклинов, активация синтеза коллагена и металлопротеиназ. *IL1B* играет важную роль в стимуляции процесса перестройки соединительной ткани при регенерации и восстановления их целостности после повреждения;
- •*IL10* противовоспалительный иммунорегулирующий цитокин, с иммуносупрессорной активностью в отношении Т-хелперов I типа и антигенпрезентующих клеток. *IL10* подавляет выработку провоспалительных цитокинов, но в тоже время костимулирует пролиферацию, дифференцировку и функциональную активность В-лимфоцитов;
- •IL18 провоспалительный цитокин, индукторов синтеза Т-лимфоцитами и натуральными киллерами IFN- $\gamma$ . Провоспалительный эффект IL18

формируется за счет активации различных типов лейкоцитов, натуральных киллеров, макрофагов и индукции синтеза циклооксигеназы, синтетазы, провоспалительных цитокинов и хемокинов;

- *TGFB1* многофункциональный белок иммуносупрессивного действия, обладающий основными биологическими регуляторными свойствами: изменения пролиферации, роста, дифференцировки и апоптоза клеток (в большинстве подавление), усиления формирования внеклеточного матрикса;
- •*TLR4* распознает консервативные структуры (липополисахариды) клеточных стенок грам-отрицательных бактерий и активируют клеточный иммунитет.
- $TNF\alpha$  провоспалительный цитокин с выраженной противовирусной активностью, один из основных медиаторов воспаления и активации лейкоцитов, активирующий экспрессию молекул адгезии и хемокинов, стимулирующий продукцию IL1, IL6, IL8, IFN- $\gamma$ .  $TNF\alpha$  одним из важнейших факторов защиты от вирусов и внутриклеточных паразитов, индуцирующий апоптоз клеток-мишеней [71].

В исследовании Bergeron C. et al. (2015), обследованы 27 349 пациенток от 18 до 65 лет. Проведено цитологическое исследование, ВПЧ-тестирование, определение экспрессии *CDKN2A/P16* и *KI67* ИГХ методом, кольпоскопия и прицельная биопсия шейки матки (по показаниям) [91]. При окрашивании цитологических мазков двойным ИЦХ методом определение положительной экспрессии CDKN2A/P16 и KI67 показала большую чувствительность по сравнению с окраской мазка гематоксилин-эозином — 86,0% и 68,5% соответственно (p<0,001), при одинаковой специфичности — 95,2% и 95,4%. Результаты исследования позволяют авторам утверждать о высокой специфичности ИЦХ метода исследования, случаях требующих индивидуализированного подхода к ведению пациенток и проведения деструктивного лечения шейки матки [91].

Как показано в работе Bourmenskaya O. et al. (2014) определение маркеров - *IL-18, CD-45, ТФР-1β, IL-12α, ФНО-α, TLR-4, GATA-3, IL-8, IL-1β, IL-10*, в

качестве интегрального критерия оценки транскрипционного профиля генов иммунной системы, является ключевым исследованием в диагностике бактериального вагиноза и аэробного вагинита [97]. Данное исследование показало возможность проведения исследования экспрессии генов иммунной системы совершенствовании В диагностики, И оптимизации индивидуализированной ведения тактики пациенток хроническим цервицитом [97].

Фактор WIF-1 находящийся в неактивном состоянии в злокачественных новообразованиях является эпигенетическим маркером прогнозирования неопластических процессов шейки матки [174, 192]. К опухолевой супрессии, снижению инвазивного и метастатического потенциала злокачественной опухоли на фоне понижения экспрессии маркеров опухолевых стволовых клеток ведет восстановление экспрессии гена WIF1 в опухолевых клетках [73, 202]. WIF-1 -Фактором инактивации является ДНК-метилирование участка промоторного гена WIF-1 И эпигенетическое выключение кодирующего его гена на ранних этапах онкогенеза, в то время как гиперметилирование гена WIF1 за счет снижения уровня экспрессии гена WIF1 и синтеза белка с последующей неконтролируемой активацией WNTсигнального пути приводит к активации процесса канцерогенеза [122]. метилирования промоторного участка гена WIF1 результатам исследований Масюковой С.А. и соавт. (2017) достоверно коррелирует со степенью поражения шейки матки ассоциированных с ВПЧ. Таким образом, в качестве диагностического и прогностического маркера ВПЧ-ассоциированных поражений шейки матки может рассматриваться определение уровня метилирования гена WIF1. Комплексная клиническая оценка патологических процессов шейки матки в сочетании с определением статуса метилирования промоутера гена *WIF1* позволит облегчить раннюю диагностику и прогнозирование динамики развития заболевания [52].

С учетом данных современных высокоинформативных методов обследования ведение пациенток требует дифференцированного подхода с

применением зачастую длительной комплексной, поэтапной терапии консервативными (антибактериальными, противовирусными, антимикотическими) лекарственными средствами, сочетании системных и локальных форм препаратов иммунотерапии учитывая возможность микст-инфекции или деструктивными методами лечения. Во многом успех терапии хронического цервицита зависит от правильного понимания влияния на развитие болезни совокупности предрасполагающих факторов и правильного выбора способов их устранения.

Определение тактики ведения пациенток с ВПЧ-ассоциированным хроническим цервицитом должно быть дифференцированно в зависимости от анамнеза пациентки, результатов цитологического и/или морфологического исследования, генотипа, длительности персистенции и количественной нагрузки ВПЧ и расширенной кольпоскопии.

#### ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

#### 2.1. Материал исследования

Исследование проводилось на базе научно-поликлинического отделения (заведующий - д.м.н., профессор Прилепская В.Н.), отдела клинической и молекулярной генетики (заведующий - д.б.н., профессор Трофимов Д.Ю.), 1 патологоанатомического отделения (заведующий - д.м.н., профессор Щеголев А.И.), лаборатории микробиологии (заведующий - д.м.н. Припутневич Т.В.) ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России, на базе Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН в Центре коллективного пользования «ГЕНОМ». В период с октября 2016 г. по сентябрь 2019 г. были обследованы 202 женщины репродуктивного возраста, обратившихся на прием в НПО ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России, с целью диагностики и лечения патологии шейки матки.

В рамках исследования, согласно критериям включения и исключения, отобраны 202 пациентки 25-49 летнего возраста, средний возраст которых составил 31,8 ± 5,8 лет и сформированы 2 группы, которые разделены на 2 подгруппы в зависимости от результатов ВПЧ-генотипирования и результатов цитологического и/или гистологического методов исследования. 1 группу пациентов составили 108 женщин с хроническим цервицитом, из которых 1а подгруппа — 52 женщины с ВПЧ-позитивным тестом, 16 подгруппа — 56 женщин с ВПЧ-негативным тестом; 2 группа пациентов - 94 женщины без признаков хронического цервицита, из которых 2а подгруппу составили 44 женщины с ВПЧ-позитивным тестом, 26 подгруппу — 50 женщин с ВПЧ-негативным тестом (контрольная подгруппа) (рис.1). Динамический контроль с повторным обследованием через 12 месяцев после первичного визита проведен у 72 женщин 1а, 16 и 2а подгрупп. Из них: 40 (55,55%) пациенток 1а подгруппы, 22 (30,55%) - 16 подгруппы, 10 (13,9%) - 2а подгруппы.



Рисунок 1. Распределение пациенток по подгруппам.

### Критерии включения:

- 1. возраст от 25 до 49 лет
- 2. пациентки с подтвержденным цитологическим заключением хронический цервицит, при ВПЧ позитивном (ВПЧ+) и ВПЧ негативном (ВПЧ-) тесте
- 3. пациентки с отсутствием цитологических признаков хронического цервицита при ВПЧ+ и ВПЧ- тесте
- 4. способность соблюдать требования протокола
- 5. информированное согласие на участие в исследовании

### Критерии исключения:

- 1. беременность, послеродовый период и период лактации
- 2. плоскоклеточные интраэпителиальные поражения и рак шейки матки
- 3. иммунодефицитные состояния, включая ВИЧ-инфекцию
- 4. психоневрологические заболевания
- 5. отсутствие возможности следовать протоколу

Всеми пациентками было подписано добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

Комиссия по этике биомедицинских исследований Центра рассмотрела материалы и согласно протоколу № 10 от 20 октября 2016 года одобрила проведение научного исследования. Для оценки выявляемости хронического цервицита, различных типов ВПЧ и определения кольпоскопических и клинико-морфологических особенностей хронического цервицита ВПЧ среди женщин, обратившихся ассоциированного научнополиклиническое отделение ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России с различной гинекологической патологией и практически здоровые в период с октябрь 2016 г. по сентябрь 2018 г., проводилось ВПЧ цитологическое исследование, тестирование расширенная И кольпоскопия (n=202).

Диагноз хронического цервицита был установлен на основании анализа анамнестических данных (длительное, рецидивирующее течение цервицита), результатов клинического обследования (патологические выделения из половых путей, зуд, жжение во влагалище, боли внизу живота, дизурические явления), расширенной кольпоскопии (выраженный сосудистый рисунок, гиперемия, отек, гипертрофия и деформация шейки матки, множественные наботовы кисты, участки изъязвления эпителия шейки матки с образованием истинной эрозии, неравномерное окрашивание шейки матки при проведении пробы Шиллера), жидкостной цитологии (выявление клеток многослойного плоского эпителия поверхностного и промежуточного типа, с выраженными дистрофическими изменениями, нарушением ядерно-цитоплазматического соотношения в сторону ядра - крупных, с размытым контуром, гипохромных, с псевдодискариозом и двуядерных клеток, значительного количества нейтрофильных лейкоцитов, лимфоцитов, макрофагов, гистиоцитов, очаговых плазматических клеток) и/или морфологического скоплений метода исследования.

Для определения качественного и количественного состава микробиоценоза влагалища всем включенным в исследование пациенткам

(n=202) проведена микроскопия вагинальных мазков и исследование микробиоценоза влагалища методом ПЦР в режиме реального времени.

Исследование локального иммунитета с определением уровня представленности мРНК генов цитокинов IL1Bb, IL10, IL18, IL1RN,  $TNF\alpha$ , TGFB1, CXCL5, CXCL10, CXCL13, транскрипционного фактора GATA3, Toll-подобного рецептора (TLR4), рецептора интерферона альфа IFNAR1 и CD68, регуляции клеточного цикла KI67, CCND1, CDKN2A и апоптоза BCL2, матриксных металлопротеиназ MMP8, MMP9, рецепторов прогестерона (PGR) и эпидермального ростового фактора (EGFR) мтодом OT-ПЦР проводили всем включенным в исследование пациенткам (n=202).

Для изучения уровня метилирования промоторного участка гена *WIF1* в развитии хронического цервицита, ассоциированного с ВПЧ и сопоставления их с результатами остальных исследуемых групп, проведено бисульфитное секвенирование гена *WIF1* всех пациенток (n=202).

С целью оптимизации тактики ведения пациенток с хроническим цервицитом, ассоциированным с ПВИ и динамического наблюдения за пациентками, проведено продольное проспективное исследование и наблюдение естественного развития заболевания в динамике через 12 месяцев.

### 2.2 Методы исследования

Проведено комплексное клинико-лабораторное обследование: сбор жалоб, данных анамнеза и репродуктивной функции, проведение общего и гинекологического осмотра; цитологическое исследование (жидкостная цитология) и прицельная биопсия шейки матки с последующим морфологическим исследованием (по показаниям); ВПЧ - исследование (НРVквант-21) методом ПЦР–РВ; исследование на ИППП (Chlamydia trachomatis, Neisseria gonorrhoeae, Trichomonas vaginalis) (для дальнейшего исключения из исследования при подтверждении ИППП); комплексное

исследование микробиоценоза влагалища с учетом ОБМ, количества Lactobacillus spp. и 14 основных групп микроорганизмов, представляющих условно-патогенную флору; расширенная кольпоскопия; микроскопия вагинальных мазков; исследование транскрипционного профиля *KI67*, *CDKN2A*, *BCL2*, *PGR*, *IFNAR1*, *IL1RN*, *CCND1*, *EGFR*, *IL1B*, *IL10*, *IL18*, *TNFA*, *GATA3*, *TLR4*, *CD68*, *TGFB1*, *CXCL5*, *CXCL10 CXCL13*, *MMP8*, *MMP9*; бисульфитное секвенирование гена *WIF1*.

### 2.2.1 Общеклинические исследования

Согласно разработанной нами индивидуальной регистрационной карте анкетирование и сбор клинико-анамнестических данных пациента с указанием Ф.И.О., даты рождения, возраста, контактных данных, места и условий проживания, образования, профессиональной деятельности, наличия вредных привычек, семейного положения, аллергоанамнеза. Особое внимание уделяли вопросам, отражающим факторы риска развития ВПЧ. Изучался соматический (перенесенные в прошлом заболевания крови, легких, сердечно-сосудистой системы, желудочномолочных желез, эндокринных аутоиммунных заболеваний) кишечного тракта, И гинекологический анамнез, сведения о наследственности, регистрировали сведения о травмах и оперативных вмешательствах. Особый интерес представляли сопутствующие инфекции, передающиеся половым путем в анамнезе, ранее выявленные типы ВПЧ, онкологические заболевания органов репродуктивной системы, в том числе предрак и рак шейки матки. Отмечали особенности репродуктивного анамнеза (возраста начала регулярной половой жизни, числе половых партнёров, учитывали применяемые методы и средства контрацепции), беременностей количество исходы (роды, И самопроизвольные и искусственные аборты, эктопические беременности) и менструальной функции (начало менархе, регулярности, продолжительности и характера менструаций),

Проведен анализ жалоб пациенток, указывающих на наличие клинических проявлений заболеваний, характер течения (наличие и продолжительность рецидивов) и длительность заболевания.

Объективное обследование пациенток включало в себя измерение роста, веса, общий осмотр пациенток. В последующем по формуле Brey определены индекса массы тела (ИМТ) обследуемых: ИМТ = Масса тела (кг)/ рост (м2).

Значение ИМТ равное 20-26 кг/м<sup>2</sup> считается нормальным для женщин репродуктивного возраста.

При проведении гинекологического обследования, включающего осмотр наружных половых органов, обращали внимание на особенности развития женских половых органов, состояние слизистых и наличие патологических процессов в области вульвы и преддверья влагалища. При исследовании влагалища и шейки матки в зеркалах оценивалось состояние, цвет слизистой оболочки влагалища и шейки матки, величину и форму шейки матки, состояние наружного зева цервикального канала, а также характер выделений из половых путей. При бимануальном исследовании нами учитывалось положение, величина, форма, консистенция, подвижность тела матки и состояние придатков матки.

### 2.2.2 Цитологическое исследование

Цитологическое исследование (жидкостная цитология) шейки матки проводилось в лаборатории 1 патологоанатомического отделения ФБГУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России. Материал для последующего цитологического исследования забирался посредством специальной щетки со съемной головкой «Cervix-Brush» с экзо- и эндоцервикса. Предварительно, до забора материала поверхность шейки матки ватным тампоном тщательно очищалась от слизи, которая искажает и затрудняет интерпретацию результатов цитологического исследования. Не соприкасаясь К стенкам влагалища, конус цитощетки вводился В

цервикальный канал, а остальная часть его щетинок плотно прижималась к влагалищной поверхности шейки матки и производилось три вращательных движений по часовой стрелке и два – против. Цитощетку с собранными материалом многослойного плоского и цилиндрического эпителия поверхности экзо- и эндоцервикса полностью погружали в контейнер с специальной жидкой транспортной средой и тщательно ее ополаскивали в ней. Материал направлялся в лабораторию для приготовления – микропрепарата SurePath. Жидкую суспензию группы окрашенных клеток шейки матки наносили тонким равномерным слоем на предметное стекло. Такая подготовка цитологического мазка к исследованию обеспечивает высокое качество препарата, уменьшение количества неадекватных мазков, артефактов, которые позволяют избежать загрязнению проб воспалительным эксудатом и эритроцитами. На специальной роботизированной диагностической станции FocalPoint готовые микропрепараты SurePath подвергались компьютерному анализу. В случае выявления в микропрепарате участков с атипичными клетками в автоматическом режиме компьютер выявлял и запоминал их расположение на предметном стекле. В последующем мазок исследовался цитологом с помощью микроскопа с компьютерным управлением, которое концентрирует внимания врача на участки с атипией, предварительно выявленные компьютером.

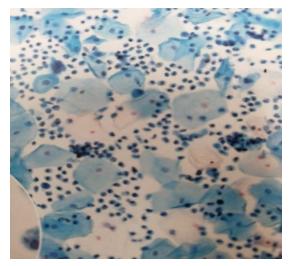


Рисунок 2. Цитологическое исследование. Воспалительный процесс может приводить к появлению в препарате большого количества нейтрофильных гранулоцитов.

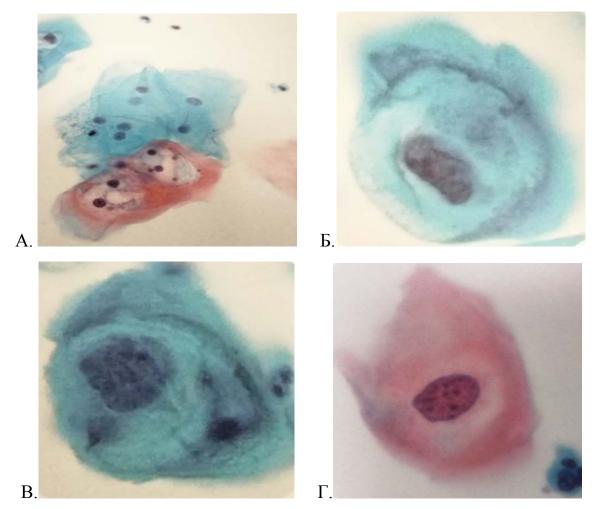


Рисунок 3. Койлоциты в цитологическом мазке.

- А. Присутствие койлоцитов типично для ВПЧ-инфекции. Плоские клетки демонстрируют крупное, хорошо определяемое перинуклеарное просветление и толстый цитоплазматический ободок. Ядра обычно нежнозернистые или пикнотические. Часто присутствует двуядерность.
- Б. и В. Койлоциты с крупным, хорошо определяемым перинукелеарным просветлением и утолщенным ободком цитоплазмы. Ядра койлоцитов увеличенные и мелкозернистые, часто встречается гиперхромный хроматин. Ядерная мембрана может быть неровной.
- Г. Присутствие не явных койлоцитов при ВПЧ-инфекции с не четким цитоплазматическим ободком и увеличеным, гиперхромным ядром.

Результаты цитологического исследования интерпретировались согласно общепринятой оценки — терминологической системой Бетесда (TBS-Terminology Bethesda System) последнего пересмотра (2014г.). Основными цито- и морфологическими признаками ВПЧ являются койлоцитоз и дискератоз, лимфоцитарная инфильтрация, базальноклеточная гиперплазия, а в ряде случаев отмечается наличие только второстепенных признаков ВПЧ —

пара- и гиперкератоз. Единичные койлоциты в мазке жидкостной цитологии свидетельствуют о дистрофических изменениях плоского многослойного эпителия при ВПЧ отрицательном тесте, характерных хроническому цервициту. Выявление дискератоцитов в цитологическом мазке в отсутствии койлоцитов и наличие воспалительной инфильтрации (скоплении нейтрофилов, плазмоцитов, лимфоцитов и гистеоцитов) соответствует цитологическому заключению ВПЧ ассоциированный хронический цервицит.

## 2.2.3 Морфологическое исследование

Гистологическое исследование биоптатов шейки матки проводилось в лаборатории 1 патологоанатомического отделения ФБГУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России после получения результатов ВПЧ-тестирования цитологического исследования, И расширенной кольпоскопии. Морфологический метод исследования является «золотым стандартом» для окончательной верификации диагноза. Всем пациенткам с результатом цитологического, и/или аномальным определяемого кольпоскопически атипического эпителия на экзоцервиксе, проводили прицельную биопсию шейки матки радиохирургическим методом петлевым электродом прибора «Surgitron» («Ellman Int.» США) под кольпоскопическим контролем с наиболее измененных участков шейки матки. По показаниям выскабливание производили цервикального канала. После клиниколабораторного обследования пациенток по общепринятой в гинекологической практике схеме проведена прицельная биопсия шейки матки. Все пациентки, направленные на исследование, подписывали письменное информированное согласие на проведение прицельной биопсии шейки матки с разъяснением возможных сопутствующих реакций и осложнений в ходе проведения Биоптаты размерами около 0,5см х 0,5 см наряду с плоским процедуры. эпителием содержали подлежащую соединительную ткань шейки матки (строму). После фиксации биоптата 10% раствором формалина, материал был промаркирован и отправлен в лабораторию для дальнейшего гистологического исследования. Биоптат в лаборатории заливался парафином или замораживался в термостате. В последующем материал в срезах толщиной 5 микрон окрашивали гематоксилин — эозином и помещали на предметные стекла, для дальнейшего исследования при помощи светового микроскопа. Гистологическое исследование оценивалось согласно классификации ВОЗ (2014).

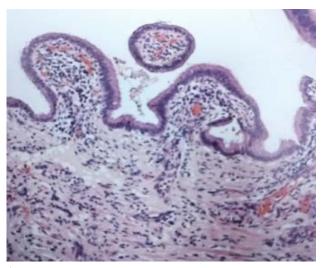


Рисунок 4. Морфологическая картина хронического цервицита. На гистологическом срезе эндоцервикальный эпителий со стромальными лимфоцитами, характерными для цервицита.

## 2.2.4 Молекулярно-генетические методы исследования

# 2.2.4.1 ВПЧ-тестирование

В лаборатории молекулярно–генетических методов отдела клинической и молекулярной генетики ФБГУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России проводилось выявление, типирование и определение вирусной нагрузки 21 типа ВПЧ (6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 44(55), 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82). Перед взятием материала всем пациенткам ватным тампоном убирали цервикальную слизь. Специальным зондом проводилось взятие материала из зоны переходного эпителия, и примыкающих зон экзо- и

эндоцервикса. Биологический материал сразу помещали в эппендорф объемом 1,5мл, с 0,9% раствором натрия хлорида (500мкл). Пробирку маркировали, и хранили при температуре от 2°C до 8°C с последующей доставкой в лабораторию в течение 24 часов.

Клетки осаждали путем центрифугирования со скоростью 13000 об/мин при комнатной температуре в течение 10 мин, удаляли надосадочную жидкость, оставляя осадки в объеме 50-100 мкл. Хранили осадки при температуре от -22°C до -18°C до 30 дней. Из которых в последующем выделяли ДНК с помощью наборов «Проба ГС» («ДНК-Технология», Россия). при выделении достигался благодаря клеток использованию хаотропного агента, поэтапно проводилась сорбция нуклеиновых кислот на твердом носителе, отмывка и элюирование ДНК с сорбента в объеме 100 мкл. При помощи комплекта реагентов для обнаружения, генотипирования и определения вирусной нагрузки ВПЧ методом ПЦР (HPVквант-21) проводили амплификацию типоспецифических фрагментов ДНК ВПЧ и человеческой ДНК (контроль адекватности материала). На приборе «ДТ-964» («ДНК-Технология», Россия) в режиме ПЦР-РВ осуществлялась амплификация, на каждом цикле которого по каналам FAM, HEX, ROX и Cy5 определяли уровень флуоресценции. В последующем при помощи программного обеспечения приборам результаты исследования автоматически обрабатывались.

Выявляемое количество ВПЧ менее 3 lg (менее  $10^3$  копий ДНК ВПЧ на  $10^5$  клеток) определяется как клинически малозначимая вирусная нагрузка, встречаемая при транзиторном течении ПВИ, которая практически не встречается при предраке и раке шейки матки, и ассоциирована с минимальным риском их развития. Количество ВПЧ от 3 lg до 5 lg (более  $10^3$  копий ДНК ВПЧ на  $10^5$  клеток) является клинически значимым диапозоном персистенции ПВИ с высоким риском развития дисплазии и рака шейки матки, а более 5 lg (более  $10^5$  копий ДНК ВПЧ на  $10^5$  клеток) при установленном факте персистенции инфекции более 1 года — клинически

высокозначимой вирусной нагрузкой, ассоциированной с высоким риском развития предрака и рака шейки матки. Десятикратное снижение вирусной нагрузки ВПЧ в течении 6 месяцев может говорить о транзиторной инфекции, а повышение вирусной нагрузки в аналогичный период и более месяцев после лечения зачастую обозначает возможность рецидива.

### 2.2.4.2 Комплексное исследование ИППП

Для выявления инфекций, передаваемых половым путем: Chlamydia trachomatis, Neisseria gonorrhoeae, Trichomonas vaginalis также использовали ПЦР-РВ без количественной оценки нагрузки патогенов с помощью комплекта реагентов TNC КОМПЛЕКС. Всем пациенткам перед взятием материала для дальнейшего исследования с поверхности шейки матки ватным тампоном убирали цервикальную слизь. Образцы для исследования - соскобы из зоны переходного эпителия, и примыкающих зон экзо- и эндоцервикса забирали с помощью специального зонда и сразу помещали в эппендорф объемом 1,5мл, с 0,9% раствором натрия хлорида (500мкл). Пробирку маркировали, и хранили при температуре от 2°С до 8°С, а в последующем, в течение 24 часов доставляли в лабораторию. Выявление инфекции проводилось с помощью праймеров, обладающих специфичностью фрагментам генома Chlamydia trachomatis, Neisseria gonorrhoeae uTrichomonas vaginalis.

# 2.2.4.3 Исследование микробиоценоза влагалища

Тест-система «Фемофлор 16» (Россия), применяемая в нашем исследовании, позволила провести количественную оценку микробиоценоза влагалища, с учетом ОБМ, количества Lactobacillus spp. и 14 основных групп микроорганизмов условно-патогенной флоры, включая факультативно анаэробные и облигатно-патогенные микроорганизмы, а также *Candida spp.*,

Ureaplasma spp., Mycoplasma hominis, Mycoplasma genitalium. Исследование с помощью данной тест-системы позволило сократить время исследования до 4-6 часов и оценить состав и относительное количество микроорганизмов в образце, включая микроорганизмы трудно поддающиеся идентификации Тест культуральным методом. высокочувствительным является И специфичным методом, определяющим 2 до 10 копий OT амплификационной пробирке.



Рисунок 5. Алгоритм автоматической трактовки результатов для женщин репродуктивного возраста (материал: соскоб из влагалища).

Для оценки видового состава условно-патогенной флоры и лактобактерий анализировалось не только их выявление, но и количественное соотношение к ОБМ. Со стенок влагалища забирали образцы материала для исследования с помощью специального зонда и помещали в эппендорф объемом 1,5 мл, с 0,9% раствором натрия хлорида (500 мкл). Пробирку маркировали, и хранили при температуре от 2°С до 8°С с последующей доставкой в лабораторию в течение

24 часов. Результаты ПЦР исследования интерпретированы согласно рекомендациям, разработанным НЦАГ и П им. В.И. Кулакова и НИИАиГ им. Д.О. Отта «Применение метода полимеразной цепной реакции в реальном времени для оценки микробиоценоза урогенитального тракта у женщин (тест Фемофлор)» [78].

За абсолютный нормоценоз был принят вариант биоценоза, в котором доля Lactobacillus spp. составляла более 80%, а количество Ureaplasma spp. и Mycoplasma hominis менее  $10^4\Gamma$ Э/мл. В то время как биоценоз, с нормофлорой составляющей более 80% в ОБМ, а количество Ureaplasma spp. и Mycoplasma hominis более  $10^4\Gamma$ Э/мл. отнесен к условному нормоценозу. Дисбаланс микробиоценоза влагалища при котором более 20% по отношению к ОБМ составляли один или несколько условно патогенных микроорганизмов, а доля Lactobacillus spp. - менее 80%, был отнесен к анаэробному и аэробному дисбиозу. К смешанному дисбиозу относят дисбаланс, обусловленный сочетанием бактериальной микробиоты и Candida spp. на фоне снижения общего количества Lactobacillus spp.

# 2.2.4.4 Исследование транскрипционного профиля генов

В рамках исследования в лаборатории молекулярно-генетических методов отдела клинической и молекулярной генетики ФБГУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России проведено исследование представленности мРНК генов человека, регулирующих пролиферацию и клеточный цикл (КІ67, CCND1, CDKN2A/P16), апоптоз (BCL2), рецепторный аппарат клеток (PGR, EGFR), генов иммунной системы (IFNAR1, IL1RN, IL1b, IL10, IL18, TNFα, GATA3, TLR4, TGFB1, CD68, CXCL5, CXCL10 CXCL13), матриксных металлопротеиназ (ММР8, ММР9) в соскобах цервикального канала методом количественной ПЦР-РВ с предварительной обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) в соответствии с инструкциями и рекомендациями производителя

(реактивы и детектирующие амплификаторы производства ООО «НПО ДНК-Технология», Россия).

Специальным зондом проводилось взятие материала из зоны переходного эпителия, и примыкающих зон экзо- и эндоцервикса. Зонд помещали в пробирку с транспортной средой для стабилизации РНК в биопробах (Набор реагентов Сторэкс), тщательно ополаскивали и, отжав о стенки пробирки, утилизировали. Маркированные пробирки доставлены и хранятся при температуре минус 65-70°С в Биобанке Центра.

С помощью наборов «Проба НК» посредством лизиса клеток в присутствии хаотропных агентов, спиртового осаждения И ОТМЫВОК нуклеиновые кислоты. Используемые в реакции флуоресцентно-меченные пробы и праймеры, специфичные к мРНК, не отжигались на матрице геномной ДНК. Это позволило не проводить обработку образцов ДНК-азой. Синтез кДНК из полученной РНК (реакция обратной транскрипции) проведен в объеме 40 мкл с использованием в качестве праймеров разработанных специфических олигонуклеотидов и обратной транскриптазы M-MuLV. Реакция проведена в течение 30 минут при температуре 40°C, с дальнейшей инактивация обратной транскриптазы в течение 5 минут при температуре 95°C. Реакция амплификации проведена cопределением флуоресценции по каналу FAM на каждом цикле в режиме реального времени при температуре отжига праймеров в двух повторах для каждой точки. Для проведения ПЦР-РВ применили Тад-полимеразу с АТ, которая позволяет реализовать «горячий старт» за счет запуска фермента при температуре 94°C в течение 5 минут (Taq-AT).

Уровень представленности мРНК рассчитан в относительных единицах методом сравнения индикаторных циклов ( $\Delta$ Cq) с нормировкой по трем референсным генам: *B2M*, *GUSB*, *TBP*.

Таблица 1 Маркеры пролиферации и регуляции клеточного цикла

	Альтернативные символы	Полное название	Описание
	Ma	аркеры пролиферации и регуляц	ии клеточного цикла
<i>MKI67</i>	MKI67	Marker of proliferation Ki-67	Белок, кодируемый геном <i>МКІ67</i> , является
	также известный	(маркер пролиферации <i>Ki-67</i> )	ядерным и необходим для клеточной
	как:		пролиферации.
	KIA, MIB-, MIB-		
	1, PPP1R105		
CCND1	CCND1	Cyclin D1	Белок, кодируемый геном <i>CCND1</i> , семейства
	также известный	(циклин D1)	циклинов, координирующих смену фаз клеточного
	как:		цикла и функционирующих как регуляторы
	BCL1, PRAD1,		циклин-зависимых киназ (CDK). Циклин D
	U21B31,		образует комплекс с регуляторной субъединицей
	D11S287E		CDK4 или CDK6, активность которой необходима
			для перехода G1-фазы в S-фазу клеточного цикла.
			Показаны взаимодействие <i>CCND1</i> с геном-
			супрессором опухоли Rb (tumor suppressor protein
			Rb). Основной механизм канцерогенеза при ВПЧ
			реализуется за счет гиперэкспрессии вирусных
			белков Е6 и Е7 через инактивацию двух белков р53
			и ретинобластомы (pRb). Вирусный Е7-белок,

			блокируя pRb, вызывает высвобождение E2F и
			других факторов, включая <i>CCND1</i> , которые служат
			сигналами запуска деления клеток.
CDKN2A/	CDKN2A	Cyclin dependent kinase	Ген <i>CDKN2A</i> является геном-супрессором
p16	также известный	inhibitor 2A	опухолевого роста. Белок р16 действует путем
	как:	(ингибитор циклинзависимой	подавления регуляторов клеточного цикла, и
	ARF, CDK4I,	киназы 2А)	контроля деления и пролиферации клеток.
	CDKN2, CMM2,		Нарушение взаимодействия киназ с циклином D,
	INK4, INK4A,		обусловлено связыванием p16 с киназами cdk4/6.
	MLM, MTS-1,		Подавление функции циклин-зависимых киназ
	MTS1, P14,		ведет к гипофосфорилированию белка pRB,
	P14ARF,		снижению экспрессии Е2Г-зависимых генов и
	P16-INK4A,		блокировке перехода клетки из фазы G1 в фазу S.
	P16INK4,		При ВПЧ-ассоциированных заболеваниях
	P16INK4A, P19,		экспрессия данного гена повышена.
	P19ARF, TP16		
Маркер апопто	3a		
BCL2	BCL2	BCL2 apoptosis regulator	Белок, кодируемый геном <i>BCL</i> 2, является
	также известный	(регулятор апоптоза BCL2)	интегральным белком мембраны митохондрий,
	как:		блокирующим апоптоз. <i>BCL2</i> контролирует
	Bcl-2, PPP1R50		проницаемость митохондриальной мембраны,
			ингибирует капсазы за счёт предотвращения

			выхода цитохрома С из митохондрий и связывания
_			фактора, активирующего апоптоз APAF1.
Рецепторный	аппарат клеток		
EGFR	EGFR	Epidermal growth factor	Белок, кодируемый геном <i>EGFR</i> , является
	также известный	receptor	трансмембранным гликопротеином семейства
	как:	(рецептор эпидермального	протеинкиназ, рецептором эпидермального
	ERBB, ERBB1,	фактора роста)	фактора роста (EGF). Связывание EGF с
	HER1, NISBD2,		рецептором индуцирует димеризацию рецептора и
	PIG61, mENA		аутофосфорилирование тирозина, приводящего к
			пролиферации клеток. Деление клеток в
			присутствии EGF происходит быстрее, чем деление
			клеток без эпидермального фактора роста.
PGR	PGR	Progesterone receptor	Белок, кодируемый геном <i>PGR</i> , относится к
	также известный	(рецептор прогестерона)	стероидным рецепторам, агонистом которого
	как:		является прогестерон. <i>PGR</i> определяет
	PR, NR3C3		физиологические эффекты прогестерона, вляющего
			на менструальный цикл, беременность и
			эмбриональное развитие. PGR воздействует на
			эпителий влагалища и цервикальную слизь, делая
			её плотной, непроницаемой для спермы.
l			
Провоспалите	льные маркеры		

TNFα	TNF	Tumor necrosis factor	Цитокин семейства фактора некроза опухоли
	также известный	(фактор некроза опухолей)	альфа – провоспалительного действия и регуляции
	как:		апоптоза. TNF в основном выделяется макрофагами
	DIF, TNFSF2,		и участвует в регуляции широкого спектра
	TNLG1F,		биологических процессов, включая пролиферацию,
	TNF-alpha		дифференцировку, апоптоз, липидный обмен и
			коагуляцию клеток. $TNF\alpha$ один из существенных
			медиаторов воспаления, активации лейкоцитов и
			продукции <i>IL1</i> , <i>IL6</i> , <i>IL8</i> , <i>IFN-</i> $\gamma$ . <i>TNF</i> $\alpha$ индуцирует
			представленность молекул адгезии и хемокинов.
IFNAR1	IFNAR1	Interferon alpha and beta	Белок, кодируемый геном <i>IFNAR1</i> , является
	также известный	receptor subunit 1	мембранным белком I типа, образующим одну из
	как:	(интерферон альфа- и бета-	двух цепочек для рецептора интерферонов альфа и
	AVP, IFRC,	субъединицы рецептора 1)	бета. При взаимодействии с ннтерферонами
	IFNAR, IFNBR,		действует как противовирусный фактор.
	IFN-alpha-REC		
IL1b	IL1b	Interleukin 1 beta	<i>IL1b</i> – провоспалительный цитокин
	также известный	(интерлейкин 1 бета)	суперсемейства интерлейкина-1 фактора роста
	как:		фибробластов, один из важнейших медиаторов
	IL-1, IL1-BETA,		воспаления, участвующий в активации
	IL1F2		специфического иммунитета и влияющий на
			процесс пролиферации, дифференцировки и
			апоптоза клеток. Продуцируемый макрофагами

			<i>IL1b</i> , активирует лимфоциты усиливая клеточную
			адгезию. <i>IL1b</i> - один из медиаторов реакций
			развития острой фазы воспаления, повышающий
			температуру тела на системном уровне и изменение
			синтеза в печени острофазовых белков. <i>IL1b</i> влияет
			на обмен соединительной ткани: стимулируя
			пролиферацию фибробластов, повышая продукцию
			ими простагландинов, ростовых факторов и
			циклинов. Под действием <i>IL1b</i> усиливается синтез
			коллагена и металлопротеиназ в клетках
			соединительной ткани. При повреждении тканей
			IL1b активирует общий процесс перестройки
			соединительной ткани, необходимый для процесса
			регенерации и восстановления целостности тканей.
TLR4	TLR4	Toll like receptor 4	Трансмембранный протеин <i>TLR4</i> играет
	также известный	(толл подобный рецептор 4)	основную роль детекции патогенов и активации
	как:		врожденного иммунитета: определении патоген-
	TOLL, CD284,		связанных молекул (липополисахарид клеточной
	TLR-4, ARMD10		стенки бактерий) на поверхности инфекционных
			агентов и выработку цитокинов необходимых для
			развития эффективного иммунного ответа. TLR4
			функционально близок к рецептору интерлейкина-

			1 и является одним из древнейших в системе
			антибактериальной защиты организма.
CD68	CD68	CD68 molecule	Макросиалин – трансмембранный белок,
	также известный	(молекулы CD68)	экспрессируемый моноцитами, тканевыми
	как:		макрофагами и дендритными клетками. Ген СD68
	GP110, LAMP4,		относится к семейству рецепторов мусорщиков,
	SCARD1		приемные устройства которого необходимы для
			освобождения от клетчатых твердых частиц,
			повышении фагоцитоза и активации макрофагов.
CXCL13	CXCL13	C-X-C motif chemokine	Белок, кодируемый геном <i>CXCL13</i> , семейства
	также известный	ligand 13	СХС хемокинов, контролирующих клеточную
	как:	(С-Х-С тип хемокин	миграцию. Хемокины классифицируются по
	ANGIE, ANGIE2,	лиганд 13)	функции (воспалительные или гомеостатические) и
	BCA-1, BCA1,		по структуре. CXCL13 способствуют миграции В-
	BLC, BLR1L,		лимфоцитов, Т-клеток и макрофагов.
	SCYB13		
CXCL5	CXCL5	C-X-C motif chemokine	CXCL5 - малый цитокин, семейства СХС
	также известный	ligand 5	хемокинов, участвующий в накоплении и
	как:	(С-Х-С тип хемокин	активации (регуляции) хемотаксиса лейкоцитов.
	ENA-78, SCYB5	лиганд 5)	Синтез <i>CXCL5</i> происходит после стимуляции
			клеток воспалительными цитокинами IL1 и
			фактором некроза опухоли-альфа. CXCL5
			привлекает в очаг воспаления нейтрофилы,

			активирует ангиогенез и участвует в реконструкции соединительной ткань. <i>CXCL5</i> участвует в
			пролиферации, миграции и инвазии онкоклеток.
CXCL10	CXCL10	C-X-C motif chemokine	CXCL10, также известный как интерферон
	также известный	ligand 10	гамма-индуцированный белок 10 (IP-10), - хемокин
	как:	(С-Х-С тип хемокин	семейства СХС - лиганд рецептора <i>СХСR3</i> .
	C7, IFI10, INP10,	лиганд 10)	Связывание этого белка с <i>CXCR3</i> приводит к
	<i>IP-10, SCYB10,</i>		стимуляции моноцитов, миграции НК и Т-клеток, а
	crg-2, gIP-10,		также модуляции экспрессии молекул адгезии.
	mob-1		
MMP8	MMP8	Matrix metallopeptidase 8	ММР8 из семейства матриксных
	также известный	(матричная	металлопротеиназ (ММП), участвующих в распаде
	как: CLG1, HNC,	металлопептидаза 8)	внеклеточного матрикса при физиологических
	<i>MMP-8</i> ,		(эмбриональное развитие, размножение,
	PMNL-CL		ремоделирование тканей) и патологических
			процессах (артрит, метастазирование). Белок,
			кодируемый геном ММР8, участвует в деградации
			коллагенов I, II и III типов. Экспрессия гена ММР8
			повышается при воспалительных процессах
MMP9	MMP9	Matrix metallopeptidase 9	Белок, кодируемый геном ММР9, участвует в
	также известный	(матричная	деградации коллагенов IV и V типов. ММР9
	как:	металлопептидаза 9)	секретируются как неактивный пропротеин,
	GELB, CLG4B,		активируемый при расщеплении внеклеточными

	<i>MMP-9</i> ,		протеиназами. Экспрессия гена ММР9 повышается
	MANDP2		при воспалительных процессах
Иммунорегуля	чторные молекулы		
TGFB1	TGFB1	transforming growth factor	TGFB1 - многофункциональный белок,
	также известный	beta 1	обладающий биологическими функциями:
	как: <i>CED</i> , <i>DPD1</i> ,	(трансформирующий фактор	изменение пролиферации клетки; угнетение в том
	IBDIMDE, LAP,	роста бета 1)	числе и пролиферативной, функциональной
	TGFB, TGFbeta		активности Т-лимфоцитов натуральных киллеров;
			активация формирования внеклеточного матрикса;
			иммуносупрессия. <i>TGFB1</i> связывает TGF-бета-
			рецепторы и приводит к активации
			транскрипционных факторов регулирующих
			экспрессию генов. <i>TGFB1</i> регулирует
			пролиферацию, дифференцировку и рост клеток и
			модулирует экспрессию и активацию других
			факторов роста, включая интерферон гамма и
			фактор некроза опухоли альфа. Влияние <i>TGFB1</i> на
			макрофаги и моноциты в большинстве случаев
			супрессивно, так как он может заблокировать
			пролиферацию этих клеток. <i>TGFB1</i> часто
			активируется в клетках опухоли.
IL1RN	IL1RN	Interleukin 1 receptor	Ген, кодирующий антагонист рецептора
		antagonist	интерлейкина-1 (IL-1RN) семейства цитокинов -

	также известный	(антагонист рецептора	интерлейкина 1. <i>IL1RN</i> ингибирует активность
	как:	интерлейкина 1)	интерлейкина 1 - альфа (IL1A) и интерлейкина 1 -
	DIRA, IRAP,		бета (IL1B) и модулирует различные связанные с
	IL1F3, IL1RA,		ними иммунные и воспалительные реакции.
	MVCD4,		
	IL-1RN, IL-1ra,		
	IL-1ra3,		
	ICIL-1RA		
IL10	IL10	interleukin 10	IL10 – противовоспалительный цитокин, с
	также известный	(интерлейкин 10)	иммуносупрессорной активностью в отношении Т-
	как:		хелперов I типа и антигенпрезентующих клеток.
	CSIF, GVHDS,		IL10 угнетает выброс провоспалительных
	IL-10A, TGIF,		цитокинов ( <i>IFN-ү, IL2, IL3, TNFa</i> ) макрофагами. В
	IL10		тоже время <i>IL-10</i> костимулирует пролиферацию,
			дифференцировку и функциональную активность
			В-лимфоцитов. Продуцируется моноцитами и в
			меньшей степени лимфоцитами.
IL18	IL18	Interleukin 18	<i>IL18</i> – провоспалительный цитокин
	также известный	(интерлейкин 18)	суперсемейства интерлейкина-1 фактора роста
	как:		фибробластов, также известный как ингибитор
	IGIF, IL-18,		синтеза цитокинов человека (CSIF), является одним
	IL-1g, IL1F4		из основных активаторов синтеза IFN-ү T-
			лимфоцитами и натуральными киллерами.

			Провоспалительные свойства IL18 проявляются за
			счет активации лейкоцитов и натуральных
			киллеров, индукции синтеза циклооксигеназы,
			провоспалительных цитокинов и хемокинов в
			макрофагах.
GATA3	GATA3	GATA binding protein 3	<i>GATA3</i> - ключевой фактор дифференцировки Т-
	также известный	(гата связывающий белок 3)	хелперов II типа, регулятор развития Т-клеток,
	как:		участвующих в биологии эндотелиальных клеток.
	HDR, HDRS		Фактор транскрипции <i>GATA3</i> регулирует
			экспрессию генов, участвующих в развитии тканей
			и генов, участвующих в физиологических и
			патологических гуморальных воспалительных и
			аллергических реакциях.

# 2.2.4.5 Бисульфитное секвенирование гена WIF1

Определение уровня метилирования промоторного участка гена *WIF1* у пациенток с ВПЧ -ассоциированным хроническим цервицитом, проводили в Центре пользования «ГЕНОМ» Института коллективного на базе молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН. Материал для исследования забирали из цервикального канала с помощью зонда, помещали эппендорф с буфером PBS (натрий-фосфатный буфер) (Cell Signalling Technologies, США), этанолом (Sigma-Aldrich, США). Перед отправкой образцы исследуемого материала трижды промывались буфером PBS и замораживались при температуре -20°C. Образцы с клеточным материалом, содержащим эпителий цервикального канала добавлением матрикса D в гомогенизаторе FastPrep®-24 (MP Biomedicals, CIIIA) обрабатывали. Согласно протоколу, посредством применения набора ReliaPrep<sup>TM</sup> gDNA Tissue Miniprep System (Promega, США) из гомогенизированных D образцов клеток шейки матки выделяли ДНК с последующим флуориметрическим определением его концентрации при помощи стандартного набора Qubit dsDNA HS Assay Kit на флуориметре Qubit 2.0 (Life Technologies, США). С использованием набора innuCONVERT Bisulfite Basic Kit (Analytik Jena, Германия) 150 нг выделенного ДНК подвергали бисульфитной конверсии и фотометрическому определению количества конвертированной ДНК при помощи мультидетектора CLARIOstar (BMG Labtech, Германия). С целью проведения «тачдаун» ПЦР-амплификации с применением полимеразной смеси GoTaq® Hot Start Green Master Mix (Promega, США) и праймеров, позволяющих увеличить число копий участок промотора гена WIF1 от -554 до -140 нуклеотидов до старт-кодона и содержащих комплементарную и универсальную последовательность M13 на 5'-конце: WIF1-M13F и WIF1-М13R выделили 20 нг бисульфит-конвертированной ДНК. В 2,5% агарозном геле с маркерами молекулярного веса 100 bp Molecular Ruler (Bio-Rad, США) посредством электрофореза определяли наличие и длину ПЦР-продуктов.

Дальнейшее секвенирование с использованием универсальных праймеров M13: M13F и M13R и анализ продуктов реакции на автоматическом секвенаторе Applied Biosystems 3730 DNA Analyzer (США) проводилось в центре коллективного пользования «ГЕНОМ» на базе Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН.

# 2.2.5 Расширенная кольпоскопия

Для осмотра и оценки состояния эпителия шейки матки, выявления заболеваний, определения характера патологического процесса и точной локализации поражений шейки матки применяли метод расширенной кольпоскопии. Расширенная кольпоскопия проведена всем пациенткам, включенным в исследование по общепринятой методике. Осмотр слизистой влагалища, вульвы и эпителия шейки матки производился с помощью видеокольпоскопа «SCANER Colposcope MK 200» с применением 8-20 кратного увеличения как без предварительной обработки, так и с последующим поэтапным нанесением 3% раствора уксусной кислоты и 2% водного раствора Люголя (проба Шиллера). При проведении расширенной кольпоскопии оценивалось состояние эпителия шейки матки, сосудов, кольпоскопические признаки, такие как гипертрофия, наличие деформации, множественных наботовых кист, выраженность сосудистого рисунка, наличие или отсутствие ацетобелого эпителия на пробе с 3% раствором уксусной кислоты, неравномерное йодпозитивное и йоднегативное окрашивание шейки матки на пробе Шиллера. При выявлении аномальной кольпоскопической картины под контролем кольпоскопа после нанесения 3% раствора уксусной кислоты были выбраны наиболее измененные участки шейки матки, требующие проведения прицельной биопсии последующим c морфологическим исследованием биоптата шейки матки для окончательной верификации диагноза. Оценка результатов расширенной кольпоскопии проводилась в соответствии с рекомендациями по кольпоскопической терминологии представленной на 16-ом Всемирном Конгрессе Международной Федерации по цервикальной патологии и кольпоскопии (IFCPC) (Орландо, 2017 г.). Классификация структурирована, удобна для практического применения и отражает патологические изменения эпителия шейки в соответствии с современными знаниями.

Кольпоскопическая картина документирована у всех пациенток в виде графического изображения в соответствии с условным циферблатом.

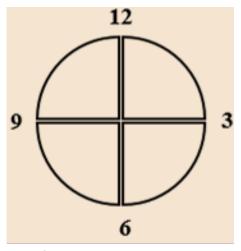


Рисунок 6. Схематическое изображение локализации поражения по условному циферблату.

В описании кольпоскопической картины рассмотрены следующие параметры:

- 1. Цвет
- 2. Состояние сосудистого рисунка
- 3. Поверхность и уровень многослойного плоского эпителия
- 4. Стык многослойного плоского и циллиндрического эпителиев (характер и локализация)
- 5. Наличие и форма желез
- 6. Реакция на 3% раствор уксусной кислоты
- 7. Реакция на раствор Люголя
- 8. Граница образований

Общие	е положения	<ul> <li>Кольпоскопическая картина: адекватная/неадекватная</li> <li>(с указанием причин затруднения кольпоскопии: объективная оценка состояния экзоцервикса затруднена вследствие воспаления, кровотечения, рубцовых изменений или деформации шейки матки т.д.)</li> <li>Визуализация границы между многослойным плоским и цилиндрическим эпителием: полная/не полная</li> </ul>
кол	Нормальная пьпоскопическая картина	Многослойный плоский эпителий:
Аномальная кольпоскопическая картина	Общие принципы оценки Степень I (слабо	<ul> <li>Локализация поражения:</li> <li>В пределах или вне зоны трансформации (стыка многослойного плоского и циллиндрического эпителия)</li> <li>Соответствие условному циферблату</li> <li>Размеры области поражения:</li> <li>В процентном соотношении с экзоцервиксом</li> <li>Тонкий ацетобелый эпителий с неровными нечеткими краями</li> <li>Медленное проявление</li> </ul>
Аном	выраженные поражения)	ацетобелого эпителия  • Нежная мозаика  • Нежная пунктация

Аномальная кольпоскопическая картина	Степень II (выраженные поражения)	<ul> <li>Плотный ацетобелый эпителий с четкими контурами</li> <li>Быстрое проявление ацетобелого эпителия</li> <li>Плотный ацетобелый ободок вокруг открытых желез (крипт)</li> <li>Грубая мозаика</li> <li>Грубая пунктация</li> <li>Признак поражение в поражении (контуры более плотного ацетобелого участка)</li> <li>Признак гребня (бугристости)</li> </ul>
г кольпос	Неспецифические признаки	<ul><li>Лейкоплакия</li><li>(кератоз, гиперкератоз)</li><li>Эрозия</li></ul>
Аномальная	Подозрение на инвазивную карциному	<ul> <li>Атипические сосуды</li> <li>Дополнительные признаки:</li> <li>«Ломкие» сосуды</li> <li>Неоднородная поверхность</li> <li>Экзофитные поражения</li> <li>Некроз</li> <li>Изъязвление</li> <li>Опухолевидное крупное новообразование</li> </ul>
Другие кольпоскопические картины		<ul> <li>Врожденная зона трансформации</li> <li>Гипертрофия</li> <li>Деформация</li> <li>Кондиломы</li> <li>Последствия ранее проведенного лечения</li> <li>Стеноз</li> <li>Врожденные аномалии</li> <li>Воспаление</li> <li>Полипы (экзо-/эндоцервикальный)</li> <li>Эндометриоз</li> </ul>

Рисунок 7. Международная классификация кольпоскопических терминов, согласно рекомендациям, представленным на 16-ом Всемирном Конгрессе Международной Федерации по цервикальной патологии и кольпоскопии (IFCPC) (Орландо, 2017).

### 2.2.6 Микроскопическое исследование вагинальных мазков

Изучение состояния биоценоза влагалища на основании микроскопии мазков вагинального отделяемого, является основным рутинным методом в скрининге и диагностике инфекционно-воспалительных заболеваний женских половых путей, позволяющим оценить наличие и степень воспалительного процесса, состояние эпителия и состав микрофлоры влагалища. Обнажив шейку матки в зеркалах, с помощью зонда из заднего и бокового сводов влагалища для исследования забирался биоматериал и наносился на два предметных стекла. Вагинальные мазки после фиксации были исследовали под микроскопом с иммерсией. При этом оценивались следующие критерии: состояние эпителия влагалища (принадлежность К поверхностному, промежуточному, парабазальному слоям); наличие ключевых клеток (эпителиальных абсорбированными клеток cних бактериями на морфологически схожими cгарднереллами, бактероидами, или вибрионоподобными формами - ассоциированными с бактериальным вагинозом); лейкоцитарной реакции; вагинальной наличие состав микрофлоры (качественная и количественная характеристика морфотипов бактерий и клеток дрожжевых грибов). Количество лейкоцитов при воспалении повышено и для небеременных женщин репродуктивного возраста составляет более 10 в поле зрения. Эпителий влагалища в норме представлен клетками поверхностного и промежуточного слоев, в то время как при выраженном воспалении в мазке также присутствуют клетки парабазального слоя. Микроскопическое исследование позволяет идентифицировать основные типы условно-патогенных бактерий со схожим морфотипом, но патогенностью значительно отличающимися И чувствительностью антибактериальным препаратам. В тоже время микроскопия вагинальных мазков не позволяет идентифицировать ряд этиологически значимых условнопатогенных бактерий.

# Тип мазка (состояние микробиоты влагалища)

• Нормоценоз

• Промежуточный тип микробиоценоза влагалиша

• Дисбиоз влагалища

- Преобладание лактобактерий, отсутствие грамотрицательной флоры, псевдомицелия, бластоспор и лейкоцитов; Определяются единичные эпителиальные клетки, соответствующиефазе менструального цикла
- Лактобактерии в умеренном или незначительном количестве; присутствуют грамположительные кокки, грамотрицательные палочки; определяются лейкоциты, моноциты, макрофаги, эпителиальные клетки.

Описание признаков

 Лактобактерии в незначительном количестве или полное их отсутствие; флора обильная полиморфная грамположительная и грамотрицательные палочковая и кокковая; определяются ключевые клетки; количество лейкоцитов вариабельное, отсутствие или незавершенный фагоцитоз; полимикробная картина мазка.

 Картина типичного состояния нормального микробиоценоза влагалиша

 Пограничныый тип мазка, наблюдаемый у здоровых женщин, редко сопровождаемый жалобами и клиническими проявлениями

 Картина мазка соответствует бактериальному вагинозу

Клиническая форма

- Воспалительный тип мазка (вагинит)
- Лейкоциты в большом количестве, макрофаги, эпителиальные клетки. выраженный фагоцитоз; полимикробная картина мазка, с клинической картиной воспаления, характерной неспецифическому (аэробному) вагиниту, вызванному большим количеством условнопатогенной флоры; возможно определение гонококков, хламидий, M. genitatalium, трихомонад, псевдомицелия и бластоспор
- Неспецифический (аэробный) вагинит, обусловленный большим количеством аэробных условнопатогенных микроорганизмов. При выявлении гонококков, трихомонад, мицелия, псевдогифов, спор диагноз: хламидийная инфекция. микоплазменная инфекция, трихомоноз, вульвовагинальный кандидоз.

Рисунок 8. Оценка микробиоценоза влагалища согласно микроскопической характеристике (по Кира Е.Ф. с дополнением Гомберга М.А. 2019).

Для правильной интерпретации вагинальных мазков и определения состояния микрофлоры влагалища использовалась оригинальная классификация микроскопических характеристик микробиоценоза влагалища по Кира Е.Ф. с дополнением Гомберга М.А. (2019). Согласно данной классификации, определяется 4 типа биоценоза влагалища, соответствующие микроскопической характеристике: нормоценоз, промежуточный тип биоценоза влагалища, дисбиоз влагалища и вагинит (воспалительный тип мазка) [59, 69].

# 2.3 Методы статистической обработки результатов

Результаты, полученные в ходе проведенного исследования, вносились при помощи таблиц «Microsoft Excel» в разработанную компьютерную базу данных на персональном компьютере. С помощью пакета прикладных программ SPSS for Windows v.22. IBM, USA проведены анализ и

статистическая обработка полученных данных, определялись параметры описательной статистики [29].

Количественные показатели были проверены на соответствие нормальному распределению с помощью критерия Колмогорова-Смирнова. Для количественных данных, имеющих нормальное распределение, были рассчитаны среднее арифметическое (М) и стандартное отклонение (SD), которые представлены в формате М (SD); при описании показателей, отличающихся от нормального распределения, в формате Ме (Q1; Q3) применялись медианы (Ме), также нижний Q1 (25%) и верхний Q3 (75%) квартили в качестве интервальной оценки. Качественные показатели исследования представлены в абсолютных и в относительных величинах (%) [32].

Для нахождения различий между нормально распределенными использовался t-критерий показателями Стьюдента, ПО критерию Бонферрони определялась достоверность средних различий при множественных сравнениях.

Формула t -критерий Стьюдента:

$$t = \frac{M_1 - M_2}{m_1^2 + m_2^2}$$

где  $M_1$ - средняя арифметическая 1-ой сравниваемой подгруппы,

 $M_2$ - средняя арифметическая 2-ой сравниваемой подгруппы,

m1 - средняя ошибка первой средней арифметической,

m2 - средняя ошибка второй средней арифметической.

Статистическая обработка результатов исследования в подгруппах проводилась с помощью критерия Краскела-Уоллиса для определения значимости межгрупповых различий количественных показателей, а после с помощью непараметрического U-критерия Манна-Уитни с поправкой Бонферрони для множественных сравнений осуществлялось попарное сравнение количественных показателей.

Формула U-критерия Манна – Уитни:

$$U = n_1 \cdot n_2 + \frac{n_x \cdot (n_x + 1)}{2} - T_x$$

где  $n_1$ - количество элементов в 1-ой выборке,

 $n_2$ - количество элементов во 2-ой выборке,

Тх - большая из 2х ранговых сумм,

nx - соответствующая выборка.

Для анализа качественных показателей использовался критерий Хиквадрат с поправкой Йетса (в случаях абсолютных чисел менее 10), при невозможности его использования применялся Z-критерий для долей с поправкой для концевых точек.

Для определения зависимостей между нормально распределенными количественными признаками проведен корреляционный анализ по критерию Пирсона (r). Также рассчитывался коэффициент корреляции с помощью метода ранговой корреляции Спирмена (R). Сила предполагаемой взаимосвязи между величинами определялась по значению коэффициента корреляции (более 0,7 – сильная, от 0,4 до 0,7 – умеренная, от 0,3-0,4 – слабая) и уровню достоверности корреляции согласно шкале Чеддока (таблица 2), благодаря которой численное (количественное) значение переводилось в качественную характеристику.

Таблица 2 Шкала Чеддока

Коэфицент	0,1 - 0,3	0,3-0,5	0.5 - 0.7	0.7 - 0.9	0,9 – 0,99
корреляции	0,1 0,5	0,5 - 0,5	0,3-0,7	0,7 - 0,7	0,7 - 0,77
Сила связи	слабая	умеренная	заметная	высокая	весьма
					высокая

При этом знак при линейном коэффициенте парной корреляции указывает направление связи между фактором и результативным показателем. Так если  $r_{xy}>0$  - связь прямая и с увеличением значения фактора (x) возрастает и значение результативного показателя (y), в то время как при  $r_{xy}<0$  - связь

обратная и с увеличением значения фактора (x) снижается значение результативного показателя.

Статистическая обработка уровней представленности функциональных генов обследуемых женщин проводилась с методом непараметрического анализа.

ROC-анализ (Receiver Operating Characteristic) проведен с целью определения оптимального значения величины порога отсечения (точки cut off). Основой данного анализа явилось построение ROC-кривой, показывающей верно классифицированных зависимость количества положительных от количества не верно классифицированных отрицательных примеров. Критерием выбора точки cut off является требование максимальной чувствительности, либо специфичности, а также требование максимальной суммарной чувствительности и специфичности метода.

# ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

# 3.1 Клинико-анамнестическая характеристика обследуемых женщин

В рамках диссертационной работы на первом этапе для формирования групп пациенток проведено цитологическое исследование (ЖЦ) и ВПЧ-тестирование, по результатам которых в исследование включено 202 пациентки в возрасте 25 - 49 лет, обратившиеся в научно - поликлиническое отделение Центра, соответствующие критериям включения/исключения и подписавшие добровольное информированное согласие на дальнейшее участие в исследовании. Результаты исследования показали, что в структуре патологии шейки матки ВПЧ-ассоциированный ХЦ выявлялся у 25,7% женщин (по обращаемости). Продольное проспективное исследование, проводимое в период с 2016 по 2019 г., предусматривало наблюдение естественного развития заболевания в динамике с повторным клиниколабораторным обследованием пациенток на последующем визите через 12 месяцев.

Проведен анализ клинико-анамнестических данных всех пациенток. Внимание уделено следующим факторам: возраст, рост, вес и ИМТ, наследственность, вредные привычки, аллергоанамнез, возраст начала регулярной половой жизни, заболевания шейки матки, ассоциированные с ВПЧ в анамнезе и методы их лечения, перенесенные гинекологические инфекционные, воспалительные заболевания и оперативные вмешательства, акушерский анамнез (беременности, роды и аборты), сопутствующие соматические заболевания.

С учетом результатов цитологического исследования в зависимости от наличия или отсутствия хронического цервицита были сформированы 2 группы, каждая из которых, согласно данным ВПЧ-типирования, была разделена на две подгруппы (ВПЧ-позитивную и ВПЧ-негативную). Так, 1 группу составили 108 женщин с хроническим цервицитом (1а подгруппа – 52

(25,7%) женщин с ВПЧ-позитивным тестом и 16 подгруппа – 56 (27,7%) женщин с ВПЧ-негативным тестом), а 2 группу – 94 женщины без признаков хронического цервицита (2а подгруппа – 44 (21,8%) женщины с ВПЧ-позитивным тестом и контрольная 26 подгруппа - 50 (24,8%) здоровых женщин - без признаков хронического цервицита и ВПЧ-негативным тестом.



Рисунок 9. Распределение пациенток по подгруппам согласно результатам жидкостной цитологии и ВПЧ-тестирования.

В исследование включены женщины репродуктивного возраста (25 - 49 лет). Более половины пациенток (52,5%) были в возрасте от 30 до 39 лет.

Таблица 3 Возрастная структура обследуемых женщин

Возраст (лет)	Абсолютное число	%
25-29	73	36,1
30-39	106	52,5
40-45	23	11,4
Итого	202	100

Средний возраст наблюдаемых женщин в подгруппах составил 31,8±5,8 лет.

Таблица 4 Результаты сравнения исследуемых подгрупп по возрасту

	1а подгруппа (n=52)	1б подгруппа (n=56)	2а подгруппа (n=44)	2б (контрольная подгруппа) (n=50)	p
Возраст (лет)	31,0±6,4	32,7±5,8	31,3±5,9	32,2±5,1	>0,05

Данные представлены как среднее арифметическое значение  $\pm$  стандартное отклонение, тест ANOVA

р – уровень значимости различий между подгруппами

Более половины пациенток (72,3%) были работающими, каждая 6-я – безработная, включая домохозяек, каждая 12-я – учащаяся, в том числе студентки ВУЗа.

Таблица 5 Распределение обследуемых пациенток по социальным группам

Социальная группа	Абсолютное число	%
Работающие	146	72,3
Учащиеся	17	8,4
Безработные, в том числе домохозяйки	36	17,8
Инвалиды	3	1,5
Итого	202	100

По данным анкетирования более половины пациенток (53,5%) имели высшее образование, более трети – среднее специальное, каждая 9-я – имела среднее образование, в том числе неполное.

Таблица 6 Распределение обследуемых пациенток по уровню образования

Образование	Абсолютное число	%
Среднее, в том числе неполное	23	11,4
Среднее специальное	71	35,1
Высшее	108	53,5
Итого	202	100

При анализе усредненных данных антропометрических показателей пациенток, таких, как: рост -167,2 $\pm$ 5,7 см, вес - 60,2 $\pm$ 10 кг, индекс массы тела (ИМТ) - 21,6 $\pm$ 3,6 кг/м² статистически значимых различий между подгруппами не было выявлено (p>0,05).

Таблица 7 Результаты сравнения исследуемых подгрупп по антропометрическим показателям

Клинико- анамнестически е данные	1а подгруппа (n=52)	1б подгруппа (n=56)	2а подгруппа (n=44)	2б (контрольная подгруппа) (n=50)	p
Рост, см	167,2±5,4	167,2±6,3	167,9±5,9	166,4±5,4	0,712**
Вес, кг	60,3±7,3	60,2±10,0	58,3±13,3	62,1±9,5	0,412**
ИМТ	21,6±2,7	21,6±3,8	20,6±4,1	22,5±3,7	0,148**
ИМТ менее 18,5	5 (9,6%)	7 (12,5%)	7 (16,7%)	9 (18%)	
ИМТ норма	40 (76,9%)	41 (73,2%)	29 (69%)	30 (60%)	>0,05*
ИМТ более 25	7 (13,5%)	8 (14,3%)	6 (14,3%)	11 (22%)	

<sup>\*</sup> Данные представлены как абсолютные значения и %,  $\chi$ 2-тест

<sup>\*\*</sup> Данные представлены как среднее арифметическое значение ± стандартное отклонение, тест ANOVA

р – уровень значимости различий между подгруппами

Среди исследуемых пациенток первой группы с хроническим цервицитом большинство - 75 (69,4%) жалоб не предъявляли. Анализ жалоб 33 (30,6%) пациенток свидетельствовал о том, что они не являются патогномичными для хронического цервицита и обусловлены сопутствующими воспалительными заболеваниями влагалища. Обильные выделения и неприятный запах из половых путей беспокоили 28 (28,6%) и 26 (24,1%) женщин соответственно, в области вульвы и влагалища 20 (20,4%) пациенток отметили зуд и жжение, контактные кровотечения - 5 (5,1%), диспареуния - 4 (3,7%) и дизурические расстройства - 3 (2,8%) пациенток 1 группы.

## Особенности менструальной функции

При изучении особенности менструальной функции исследуемых женщин, уделялось внимание следующим параметрам: возраст установления менархе, регулярность, характер, продолжительность менструального цикла и тип его нарушений.

Средний возраст наступления менархе составил: в 1а подгруппе -  $13,3\pm1,4$  года,  $16 - 13,1\pm1,3$  года; во 2а подгруппе -  $13,4\pm1,3$  года,  $26 - 13,6\pm1,3$  года. При анализе среднего возраста наступления менархе статистически значимые различия между группами не были выявлены (р>0,05).

Продолжительность менструации в среднем составила  $5,2\pm0,9$  дней: в 1а подгруппе -  $5,0\pm0,8$  дня, 16 -  $5,3\pm1,3$  дня; во 2а подгруппе -  $5,4\pm0,9$  дня, 26 -  $5,2\pm0,8$  дня. Длительность менструального цикла исследуемых женщин в среднем составила  $28,4\pm2,7$  дней: в 1а подгруппе -  $28,9\pm3,4$  дня, 16 -  $28,9\pm3,7$  дня; во 2а подгруппе -  $28,3\pm1,6$  дня, 26 -  $27,8\pm2,2$  дня. Статистически значимых различий между подгруппами при оценке менструальной функции не выявлено (р>0,05).

При описании интенсивности менструального кровотечения большинство пациенток (72,3%) отметили умеренный, каждая 5-ая обильный и 29-ая – скудный их характер. По данным анкетирования у большинства

женщин (71,8%) менструации были безболезненные, в то время как каждая 4-ая пациентка квалифицировала их как болезненные.

Таблица 8 Характер менструации исследуемых женщин

Характер менструации	Абсолютное число	%
Скудный	7	3,5
Умеренный	146	72,3
Обильный	49	24,2
Итого	202	100
Безболезненные	145	71,8
Болезненные	57	28,2
Итого	202	100

Менструальный цикл был регулярный у большинства пациенток (87,1%), в 12,9% случаев отмечалось нарушение менструального цикла по типу олигоменореи и вторичной аменореи.

Таблица 9 Характер менструального цикла исследуемых женщин

Характер менструального цикла	Абсолютное число	%
Регулярный менструальный цикл	176	87,1
Олигоменорея	23	11,4
Вторичная аменорея	3	1,5
Итого	202	100

Сравнительный анализ менструальной функции исследуемых пациенток не выявил статистически значимых различий между группами. В тоже время он показал, что менархе у большинства женщин было своевременным, менструальный цикл регулярным, а его продолжительность и длительность менструации не превышала аналогичные показатели в контрольной группе.

# Сексуальная активность

Регулярную половую жизнь к периоду обследования вели 197 (97,5%) обследуемые женщины. Как представлено в таблице 13, более половины

пациенток состояли в браке, каждая 3-я — не была замужем, каждая 10-я — в разводе. Статистически значимых различий между группами не выявлено (p>0,05)

Таблица 10 Распределение обследуемых пациенток по семейному положению

Семейное положение	Абсолютное число	%
В браке	104	51,5
Не замужем	72	35,6
Разведена	21	10,4
Вдова	5	2,5
Итого	202	100

Таблица 11 Результаты сравнения исследуемых подгрупп пациенток по семейному положению

Семейное положение	1а подгруппа (n=52)	1б подгруппа (n=56)	2а подгруппа (n=44)	2б (контрольная подгруппа) (n=50)	p
В браке	39 (75%)	44 (78,6%)	32 (76,2%)	39 (78%)	>0,05

Данные представлены как абсолютные значения и %,  $\chi 2$ -тест p – уровень значимости различий между подгруппами

Согласно клинико-анамнестическим данным средний возраст начала регулярной половой жизни составил в подгруппе 1a - 17,9±2,5 лет, 1б - 18,7±2,5 лет, 2a - 18,3±2,2 года, в 2б группе - 19,5±2,1 года. Анализ среднего возраста начала половой жизни выявил статистически значимые различия между 1a и 2б (контрольной) подгруппами (p<0,05). Раннее начало половой жизни (до 18 лет) отмечено у 57 (28,2%) исследуемых женщин.

Для оценки сексуальной активности исследуемых женщин проведен анализ особенности половой жизни и количества половых партнеров. В 1а подгруппе среднее количество половых партнеров составило  $-3,2\pm1,5$ , в 16 подгруппе  $-2,9\pm1,6$ , во 2а подгруппе  $-2,7\pm1,3$ , а во 26 контрольной подгруппе

2,4±1,2. Показаны статистически значимые различия в числе половых партнеров 1а подгруппы по сравнению с контрольной группой (p<0,05).

Таблица 12 Сексуальное поведение женщин в исследуемых подгруппах

	1а подгруппа (n=52)	1б подгруппа (n=56)	2а подгруппа (n=44)	2б (контрольная подгруппа) (n=50)	р
Начало половой жизни (лет)	17,9±2,5*	18,7±2,5	18,3±2,2	19,5±2,1*	0,008*
Количество половых партнеров	3,2±1,5*	2,9±1,6	2,7±1,3	2,4±1,2*	0,003*
Орогени- тальные контакты	23 (44,2%)	24 (42,8%)	19 (43,1%)	11 (22%)	0,06
Анальный секс	11 (21,1%)	11 (19,6%)	9 (20,4%)	11 (22%)	0,89

<sup>\*</sup>Данные представлены как среднее арифметическое значение ± стандартное отклонение, тест ANOVA.

Данные представлены как абсолютные значения и %, χ2-тест p<0,05 статистически значимые различия между 1а и 26 подгруппами

Анализ особенностей половой жизни исследуемых показал, что орогенитальные контакты в анамнезе в 1а подгруппе были у 23 (44,2%), 16 - 24 (42,8%), 2a – 19 (43,1%), а анальный секс у 11 (21,1%), 11 (19,6%) и 9 (20,4%) женщин соответственно. В контрольной группе орогенитальные контакты и анальный секс среди обследованных пациенток практиковались среди 11 (22%) и 4 (8%) исследуемых пациенток соответственно. Статистически значимых различий между подгруппами не выявлено (р>0,05).

## Контрацептивный анамнез

Контрацепцию в течение одного и более лет применяли большинство пациенток (59,4%), каждая 3-я пациентка репродуктивного возраста не прибегала к контрацепции в связи с планируемой беременностью.

Таблица 13 Результаты сравнения исследуемых подгрупп пациенток по применению контрацепции

	1а подгруппа (n=52)	1б подгруппа (n=56)	2а подгруппа (n=44)	2б (контрольная подгруппа) (n=50)	p
Применение контрацепци и	34 (65,4%)	27 (48,2%)	24 (54,5%)	35 (70%)	>0,05
Итого	120 (59,4%)				

Данные представлены как абсолютные значения и %,  $\chi$ 2-тест р – уровень значимости различий между подгруппами

В таблице 14 представлены данные о регулярно применяемых в течение последнего года основных методах контрацепции.

Таблица 14 Частота применяемых методов контрацепции

Метод контрацепции	Абсолютное число	%
Гормональная контрацепция:		
КОК	18	8,9
Вагинальное кольцо НоваРинг	5	2,5
BMC	9	4,4
Барьерные методы контрацепции:		
Презерватив	59	29,3
Физиологические методы:		
Прерванный половой акт	35	17,3
Не использовали контрацепцию	76	37,6
Итого	202	100

# Генеративная функция

Согласно анамнестическим данным общее число беременностей в подгруппе 1а составило - 20 (38,5%), 16 - 30 (53,6%), 2a - 21 (47,7%), 26 - 27 (54%). Общее число самопроизвольных родов в подгруппе 1а составило 18 (34,6%), 16 - 24 (42,9%), 2a - 19 (43,2%), 26 (группа контроля) – 25 (50%). Общее число абортов составило в подгруппе 1a - 13 (25%), 16 - 11 (19,6%), 2a - 10 (22,7%), 26 - 11 (22%). Статистически значимых различий между группами не выявлено (p>0,05).

Таблица 15 Результаты сравнения исследуемых подгрупп по исходам беременности

Исходы беременности	1а подгруппа (n=52)	1б подгруппа (n=56)	2а подгруппа (n=44)	2б (контрольная подгруппа) (n=50)	p
Беременности	20 (38,5%)	30 (53,6%)	21 (47,7%)	27 (54%)	>0,05
Роды в анамнезе	18 (36%)	24 (42,9%)	19 (43,2%)	25 (50%)	>0,05
Аборты	13 (25%)	11 (19,6%)	10 (22,7%)	11 (22%)	>0,05
Внематочные беременности	1 (1,9%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	>0,05*
Неразвивающиеся беременности	3 (5,8%)	8 (14,3%)	0 (0%)	7 (14%)	>0,05*
Выкидыши	2 (3,8%)	4 (7,1%)	0 (0%)	1 (2%)	>0,05*

Данные представлены как абсолютные значения и %,  $\chi 2$ -тест, \*-Z-критерий p – уровень значимости различий между подгруппами

#### Анамнез

Согласно анализу семейного анамнеза, наследственность была отягощена у 73 (36,1%) женщин, из них сердечно-сосудистыми заболеваниями (инфаркт миокарда, инсульт, гипертоническая болезнь) страдали 20 (27,4%), эндокринными (сахарный диабет, гипо- и гипертиреоз) - 13 (17,8%), злокачественными новообразованиями матки, яичников, молочных желез, желудка и легких - 40 (54,8%) семей. При изучении семейного анамнеза

обращает внимание выявление рака шейки матки у ближайших родственников - 3 (4,1%) пациенток. Анализ семейного анамнеза статистически значимых различий между группами не выявил (p>0,05).

Таблица 16 Описание структуры отягощенного семейного анамнеза исследуемых подгрупп женщин

Семейный анамнез	1а подгруппа (n=52)	1б подгруп (n=56)		2а подгруппа (n=44)	под	2б грольная группа) n=50)	p
Отягощен	20 (38,5%)	15 (26,8%	6)	18 (42,9%)	20 (4	0%)	>0,05
Итого				73 (36,1%)			
	Структура о	тягощенн	ого	семейного а	намне	3a	
3a(	болевания		A	бсолютное ч	исло	%	
Заболевания С	CCC		20		27,4%		
Заболевания э	ндокринной с	системы	13		17,8%		
Рак желудочно	о-кишечного	тракта	12			16,4%	
Рак легкого			7		9,6%		
Рак молочной	железы		6			8,2%	
Рак мочевого п	пузыря и про	статы	5			6,8	%
Рак головы и і	шеи		3		4,1%		
Рак шейки матки			3		4,1%		
Рак тела матки		2		2,8	%		
Рак крови			2		2,8%		
	Итого			73		100%	

Данные представлены как абсолютные значения и %,  $\chi$ 2-тест р – уровень значимости различий между подгруппами

Анализ анамнеза пациенток показал, что детские инфекционные заболевания, такие как ветряная оспа, корь, краснуха, скарлатина, эпидемический паротит, Болезнь Боткина, а также ОРВИ, ангины, грипп перенесены в течение жизни всеми 202 (100%) пациентками. Статистически значимых различий между группами не выявлено (р>0,05).

Таблица 17 Инфекционные заболевания, перенесенные в детском и юношеском возрасте

	1a	16	2a	26	
Инфекционные	подгруппа	подгруппа	подгруппа	(контрольная	p
заболевания	(n=52)	(n=56)	(n=44)	подгруппа)	Р
заоолевания	(11–32)	(11–30)	(11—44)	(n=50)	
Ветряная оспа	17 (32,7%)	18 (32,1%)	14 (31,2%)	12 (24%)	>0,05
Корь	5 (9,6%)	10,7 (7,1%)	4 (9,1%)	7 (14%)	>0,05
Краснуха	11 (21,2%)	13 (23,2%)	8 (0%)	9 (4%)	>0,05
Эпидемический	2 (3,8%)	1 (1,8%)	0 (0%)	1 (2%)	>0,05
паротит	2 (3,670)	1 (1,070)	0 (070)	1 (270)	70,03
Скарлатина	3 (5,8%)	4 (7,1%)	2 (4,5%)	2 (4%)	>0,05
Болезнь	5 (9,6%)	6 (10,7%)	2 (4,5%)	4 (8%)	>0,05
Боткина	3 (3,0%)	0 (10,7%)	2 (4,3%)	4 (870)	>0,03
ОРВИ	19 (36,5%)	21 (37,5%)	17 (38,6%)	20 (40%)	>0,05
Ангина	12 (23%)	11 (19,6%)	9 (20,4%)	7 (14%)	>0,05
Грипп	15 (28,8%)	11 (19,6%)	10 (27,7%)	9 (18%)	>0,05

Данные представлены как абсолютные значения и %,  $\chi 2$ -тест p – уровень значимости различий между подгруппами

Более половины пациенток — 113 (55,9%) ранее перенесли различные экстрагенитальные заболевания, которые к моменту обследования были в стадии ремиссии, не требовали проведения профильного лечения и не являлись критерием исключения пациенток из исследования.

У обследованных пациенток наиболее часто встречались заболевания желудочно-кишечного тракта и билиарной системы. Так, у 34 (16,8%) отмечались хронический гастрит, гастродуоденит, желчекаменная болезнь, хронический холецистит, хронический панкреатит.

Аллергическая реакция имелась у 32 (15,8%) из всех 202 пациенток, из них: у 9 (28,1%) женщин отмечалась аллергическая реакция на лекарственные препараты - антибиотики из группы пенициллинов, сульфаниламидов и левомицетина, нестероидные противовоспалительные средства - индометацин, ибупрофен, а также витамин С; у 8 (25%) - пищевая аллергия; у

6 (18,7%) – поллиноз; у 6 (18,7%) аллергия на пыль и шерсть животных; у 3 (9,4%) – контактный дерматит на бытовую химию.

Таблица 18 Соматические заболевания исследуемых подгрупп женщин

Заболевания	1а подгруппа (n=52)	1б подгруппа (n=56)	2а подгруппа (n=44)	2б (контрольная подгруппа) (n=50)	p
Молочных желез	5 (9,6%)	8 (14,3%)	2 (4,8%)	2 (4%)	>0,05
Дыхательной системы	0 (0%)	4 (7,1%)	0 (0%)	4 (8%)	>0,05*
Сердечно-сосудистой системы	0 (0%)	1 (1,8%)	0 (0%)	2 (4%)	>0,05*
Желудочно- кишечного тракта	11 (21,2%)	10 (17,9%)	6 (14,3%)	7 (14%)	>0,05
Мочевыделительной системы	6 (11,5%)	8 (14,3%)	8 (18,2%)	10 (18%)	>0,05
Эндокринной системы	5 (9,6%)	2 (3,6%)	0 (0%)	6 (12%)	>0,05*
Аутоиммунные	2 (3,8%)	2 (3,6%)	0 (0%)	2 (4%)	>0,05*
Аллергические	9 (17,3%)	9 (16,1%)	6 (14,3%)	8 (16%)	>0,05
Перенесенные операции в анамнезе	13 (25%)	8 (14,3%)	6 (14,3%)	5 (10%)	>0,05

Данные представлены как абсолютные значения и %,  $\chi$ 2-тест, \*-Z-критерий р – уровень значимости различий между подгруппами

Заболевания мочевыделительной системы - хронический пиелонефрит, цистит, мочекаменная болезнь и нефроптоз отметили 26 (15,8%) пациенток. Аутоиммунные заболевания (аутоиммунный тиреоидит с гипофункцией щитовидной железы) наблюдались у 6 (18,7%) и болезни эндокринной системы (узловой зоб) у 19 (9,4%) пациенток. Патология молочных желез – фиброаденома и фиброзно-кистозная мастопатия встречалась у 17 (8,4%) женщин. Заболеваниями органов дыхания - пневмония, хронический бронхит, фарингит и бронхиальная астма страдали 8 (4%) женщин. Из заболеваний

органов сердечно — сосудистой системы у 3 (1,5%) пациенток были артериальная гипертензия и вегетососудистая дистония. Данные о патологии молочных желез, органов дыхания, сердечно-сосудистой системы, желудочно-кишечного и мочевыделительного тракта, кожи, нервной и эндокринной системы, а также аутоиммунных и аллергических заболеваний среди исследуемых групп статистически значимо не отличались (p>0,05).



Рисунок 10. Структура соматической заболеваемости исследуемых подгрупп.

# р>0,05 статистически значимых различий не выявлено

В анамнезе пациенток у 30 (14,8%) пациенток были экстрагенитальные оперативные вмешательства лапароскопическим и лапаротомическим доступами, такие как аппендэктомия, герниопластика паховой и пупочной грыжи, аденоидэктомия, маммопластика и ринопластика, удаление полипов прямой кишки и резекция прямой кишки по поводу инфильтративного эндометриоза кишечника, лазерная коррекция зрения. Статистически значимых различий по экстрагенитальным оперативным вмешательствам между подгруппами не выявлено (р>0,05).

### Гинекологические заболевания

Гинекологические заболевания в анамнезе отмечены в 1а подгруппе у 37 (71,2%), в 16 – у 33 (58,9%), во 2а – у 30 (71,4%), во 26 контрольной подгруппе - у 30 (60%) женщин. Структура гинекологических заболеваний в анамнезе исследуемых пациенток включала в себя перенесенные и ранее пролеченные заболевания, такие как: эндометриоз в 19,8%, миома матки в 13,4%, хронический сальпингоофорит в 8,4%, хронический эндометрит в 7,4%, уреаплазменная инфекция в 14,8%, вульвовагинальный кандидоз в 14,8%, бактериальный вагиноз в 6,9%, хламидийная инфекция в 5,4% случаев.

Таблица 19 Структура гинекологических заболеваний в анамнезе исследуемых женщин

Гинекологический анамнез	1а подгруппа (n=52)	1б подгруппа (n=56)	2а подгруппа (n=44)	2б (контрольная подгруппа) (n=50)	p		
Гинекологические заболевания в анамнезе	37 (71,2%)	33 (58,9%)	30 (71,4 %)	30 (60%)	>0,05		
Патологии не выявлено	15 (28,8%)	23 (41,1%)	14 (28,6%)	20 (40%)	>0,05		
Структура перенесенных гинекологических заболеваний по группам							

Хронический сальпингоофорит	4 (7,7%)	3 (5,4%)	3 (7%)	7 (14%)	>0,05
Хронический эндометрит	2 (3,8%)	3 (3,4%)	3 (7%)	7 (14%)	>0,05
Миома матки	8 (15,4%)	10 (17,9%)	3 (7%)	6 (12%)	>0,05
Эндометриоз	10 (19,2%)	11(19,6%)	8 (18,2%)	11 (22%)	>0,05
Бактериальный вагиноз*	10 (19,2%)*	2 (3,6%)	0 (4,6%)	2 (4%)	0,03*
Уреаплазменная инфекция*	12 (23,1%)*	5 (8,9%)	10 (22,3%)*	3 (6%)	0,03*
Вульвовагинальный кандидоз*	11 (21,1%)*	7 (12,5%)	10 (18,2%)*	2 (4%)	0,02*
Хламидийная инфекция	4 (7,7%)	1 (1,8%)	2 (4,5%)	4 (8%)	>0,05

Данные представлены как абсолютные значения и %,  $\chi 2$ -тест

При анализе структуры гинекологической патологии исследуемых пациенток обращает на себя внимание статистически значимые различия по сравнению с контрольной группой рецидивирующее течение ВВК, бактериального вагиноза, уреаплазменной инфекции в анамнезе (p<0,05).

Лапароскопические и лапаротомические оперативные вмешательства на органах малого таза в анамнезе, такие как миомэктомия, резекция яичников, иссечение деструкция очагов эндометриоза, гистероскопия, спаек И полипэктомия и РДВ отмечены в 1а подгруппе у 10(19,2%), в 16 - y 12(21,4%), во 2а – у 13 (29,5%), во 26 контрольной подгруппе - у 17 (34%) женщин. При анализе структуры оперативных вмешательств на органах малого таза в анамнезе статистически значимых различий среди исследуемых подгрупп не было обнаружено (р>0,05). Так, ранее были проведены консервативная миомэктомия без вскрытия полости матки в 4,4%, полипэктомия и раздельное диагностическое выскабливание в 8,4%, резекция яичников в 6,9%, рассечение спаек коагуляция эндометриоза, лапароскопическим И очагов

<sup>\*</sup>p<0,05 статистически значимые различия по сравнению с контрольной подгруппой

р – уровень значимости различий между подгруппами

лапаротомическим доступами в 5,9%. Статистически значимые различия между подгруппами выявлены не были (p<0,05).



Рисунок 11. Структура гинекологических заболеваний в анамнезе обследуемых женщин.

При изучении структуры гинекологической патологии в анамнезе проведен анализ патологии шейки матки, вульвы и влагалища, в том числе и ВПЧ-ассоциированных. У каждой третьей (33,7%) пациентки, включенной в исследование в анамнезе, ранее была обнаружена ПВИ: 1а подгруппа - 27 (51,9%); 16 группа - 10 (17,8%); 2а подгруппа - 23 (52,3%), 2б контрольная подгруппа - 8 (16%) женщин. Установлены статистически значимые различия

<sup>\*</sup>р<0,05 статистически значимые различия по сравнению с контрольной подгруппой

по выявлению ВПЧ в анамнезе женщин 1а и 2а подгрупп по сравнению с контрольной 2б подгруппой соответственно (p=0,01).

Таблица 20 Структура оперативных вмешательств на органах малого таза в анамнезе обследуемых женщин

Гинекологический анамнез	1а подгруппа (n=52)	1б подгруппа (n=56)	2а подгруппа (n=44)	2б (контрольная подгруппа) (n=50)	p
Гинекологические операции в анамнезе	10 (19,2%)	12 (21,4%)	13 (29,5%)	17 (34%)	>0,05
Миомэктомия	2 (3,8%)	1 (1,8%)	4 (9,1%)	2 (4%)	>0,05
Резекция яичников	2 (3,8%)	5 (8,9%)	3 (6,8 %)	4 (8%)	>0,05
Рассечение спаек и коагуляция очагов эндометриоза	3 (5,8%)	3 (5,4%)	1 (2,3%)	5 (10%)	>0,05
ГС, полипэктомия и РДВ	3 (5,8%)	3 (5,4%)	5 (11,4%)	6 (12%)	>0,05

Данные представлены как абсолютные значения и %, χ2-тест р – уровень значимости различий между подгруппами

У каждой третьей пациентки (43,1%), включенной в исследование в анамнезе выявлены заболевания шейки матки, среди которых лидирует хронический цервицит, остроконечные кондиломы вульвы и влагалища, интраэпителиальные В 1a плоскоклеточные неоплазии. подгруппе заболевания шейки матки, вульвы и влагалища отмечены у 29 (55,8%), в 16 -29 (51,8%), во 2а - 12 (27,3%) и во 2б - 17 (34%) женщин. Деструктивное и эксцизионное лечение шейки матки по показаниям в анамнезе было в 1а подгруппе у 16 (30,8%), 16 - 20 (35,7%), во 2а - 10 (22,7 %), во 2б контрольной подгруппе у 15 (30%) пациенток. Статистически значимые различия по выявлению патологии шейки матки и лечению шейки матки, вульвы и влагалища в анамнезе между подгруппами выявлены не были (p<0,05).

Таблица 21 ПВИ в анамнезе обследуемых женщин

Гинекологический анамнез	1а подгруппа (n=52)	1б подгруппа (n=56)	2а подгруппа (n=44)	2б (контрольная подгруппа) (n=50)	p
ВПЧ в анамнезе	27 (51,9%)*	10 (17,9%)	23 (52,3%)*	8 (16%)*	0,01*

Данные представлены как абсолютные значения и %, χ2-тест \*p<0,05 статистически значимые различия 26 с 1а и 2а подгруппами

Среди заболеваний шейки матки особый интерес представляли данные о перенесенном хроническом цервиците в анамнезе исследуемых женщин. Так, хронический цервицит в анамнезе встречался в 1а подгруппе у 8 (15,4%), в 16 подгруппе у 8 (14,3%), во 2а подгрупп не встречался, в контрольной 26 подгруппе - 3 (6%) женщин. При этом выявлены статистически значимые различия по хроническому цервициту в анамнезе пациенток 1а и 16 подгрупп по сравнению со 2а подгруппой соответственно (р=0,01). Остроконечные кондиломы вульвы, влагалища и шейки матки в анамнезе достоверно чаще отмечали пациентки 2а - 4 (9,1%) по сравнению с 16 подгруппой, в которой они не встречались (р=0,02). Лейкоплакия шейки матки так же встречалась в 1а группе у 1 (1,9%), 16 - 3 (5,4%), а во 26 - 2 (4%) случаях, в то время как, во 2а подгруппе она не встречалась. Статистически значимые различия встречаемости в анамнезе исследуемых пациенток множественные наботовых кист и эндометриоза шейки матки между подгруппами выявлены не были (р<0,05).

Цервикальная интраэпителиальная неоплазия I степени (CIN I) была в анамнезе у 5 (9,6%) женщин 1а, 2 (3,6%) - 16, 2 (4,5%) - 2а, 3 (6%) - 26 подгруппы, и соответственно, статистически значимых различий между группами не выявлено. В то же время цервикальная интраэпителиальная неоплазия II и III степени (CIN II-III) была диагностирована и пролечена в прошлом в 1а подгруппе у 4 (7,7%), в 16 - у 2 (3,6%), 2а – у 3 (6,8%) женщин.

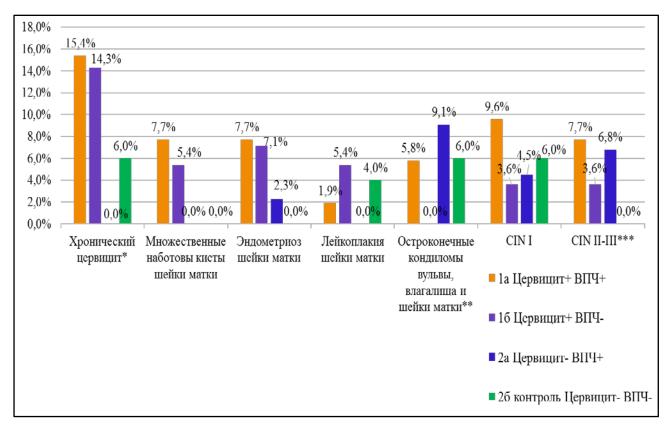


Рисунок 12. Структура патологии шейки матки в анамнезе обследуемых женщин.

Имеются статистически значимые различия по встречаемости CIN II-III в анамнезе пациенток 1а подгруппы по сравнению с контрольной 26 подгруппой, где дисплазия умеренной и тяжелой степени не встречалось (p=0,04).

Таблица 22 ВПЧ-ассоциированные заболевания в анамнезе у женщин обследуемых подгрупп

Гинекологический анамнез	1а подгруппа (n=52)	1б подгруппа (n=56)	2а подгруппа (n=44)	2б (контрольная подгруппа) (n=50)	p
Заболевания шейки матки в анамнезе	29 (55,8%)	29 (51,2%)	12 (28,6%)	17 (34%)	>0,05
Лечение шейки матки в анамнезе	16 (30,8%)	20 (35,7%)	10 (23,8 %)	15 (30%)	>0,05

<sup>\*</sup>p<0,05 статистически значимые различия между 1а и 1б с 2а подгруппами \*\*p<0,05 статистически значимые различия между 1б и 2а подгруппами \*\*\* p<0,05 статистически значимые различия между 1а и 2б подгруппами

Структура пере	Структура перенесенных заболеваний шейки матки, вульвы и влагалища							
Хронический	8 (15,4%)*	8 (14,3%)*	0 (0%)*	3 (6%)	0,01*#			
цервицит	0 (15,170)	0 (11,370)	0 (0,0)	3 (070)	0,01 "			
Множественные								
наботовы кисты	4 (7,7%)	3 (5,4%)	0 (0%)	0 (0%)	>0,05#			
шейки матки								
Эндометриоз шейки	4 (7,7%)	4 (7,1%)	1 (2,3%)	0 (0%)	>0,05#			
матки	4 (7,7%)	4 (7,170)	1 (2,370)	0 (070)	/0,05π			
Лейкоплакия шейки	1 (1,9%)	3 (5,4%)	0 (0%)	2 (4%)	>0,05#			
матки	1 (1,9%)	3 (3,4%)	0 (070)	2 (470)	/U,UJ#			
Остроконечные								
кондиломы вульвы,	2 (5 90/)	0 (0%)*	4 (0.10/)*	2 ((0))	0.02*#			
влагалища и шейки	3 (5,8%)	0 (0%).	4 (9,1%)*	3 (6%)	0,02*#			
матки								
CIN I	5 (9,6%)	2 (3,6%)	2 (4,5%)	3 (6%)	>0,05			
CIN II-III	4 (7,7%)*	2 (3,6%)	3 (6,8%)	0 (0%)*	0,04*#			

Данные представлены как абсолютные значения и %,  $\chi$ 2-тест, #Z-критерий \*p<0,05 статистически значимые различия между подгруппами

#### Заключение

Большинство женщин, включенных в исследование, были репродуктивного возраста (средний возраст 31,8±5,8 лет) и соматически не отягощены. Анализ клинико-анамнестических данных обследуемых женщин не выявил статистически значимых отличий между подгруппами по возрасту, антропометрическим показателям, особенностям менструальной функции, акушерскому анамнезу и соматической заболеваемости.

Анализ сексуальной активности исследуемых женщин показал, что пациентки 1а подгруппы с ВПЧ-ассоциированным ХЦ раньше вступали в интимные отношения по сравнению с контрольной подгруппой, при этом среднее число половых партнеров в анамнезе данной подгруппы было также статистически значимо выше (3 и более), чем в подгруппе контроля.

В анамнезе обследуемых женщин с ХЦ статистически значимо чаще выявлено рецидивирующее течение вульвовагинального кандидоза (ВВК),

бактериального вагиноза (БВ), уреаплазменной инфекции по сравнению с контрольной подгруппой.

Статистически значимые различия были выявлены в отношении ПВИ в анамнезе и перенесенной ранее различной ВПЧ-ассоциированной патологии шейки матки, вульвы и влагалища 1a, 1б и 2a подгрупп по сравнению с контрольной группой.

## 3.2 Результаты цитологического метода исследования

Цитологическое исследование проведено всем 202 пациенткам. В структуре патологии шейки матки у женщин репродуктивного возраста ВПЧ-ассоциированный хронический цервицит выявлен в 25,7% случаев.

Анализ результатов жидкостной цитологии исследуемых пациенток показал, что цитологическое заключение — «хронический цервицит» установлено в 73,1% (n=38) случаях у ВПЧ-позитивных женщин 1а подгруппы и в 69,6 % (n=39) случаях среди ВПЧ-негативных женщин 16 подгруппы. У пациенток 2а (n=44) и 26 контрольной подгруппы (n=50) во всех 100% случаях получено цитологическое заключение NILM.

При хроническом цервиците в цитологических мазках содержались форменные элементы воспаления: многоядерные клетки воспаления, сегментоядерные нейтрофилы, лимфоциты, гистиоциты, плазматические клетки в большом количестве.

ВПЧ-ассоциированного Цитологическая картина хронического цервицита характеризуется определением дискератоцитов, признаков воспалительной инфильтрации, таких как, скопление нейтрофилов, плазмоцитов, лимфоцитов и гистиоцитов, а также характерных для ВПЧинфекции единичных койлоцитов и единичных двуядерных клеток.

Выявление единичных койлоцитов в цитограмме 2 (3,6%) пациенток 16 подгруппы свидетельствует о дистрофических изменениях многослойного

плоского эпителия при ВПЧ отрицательном тесте и расценивается цитологами как не истинный LSIL.

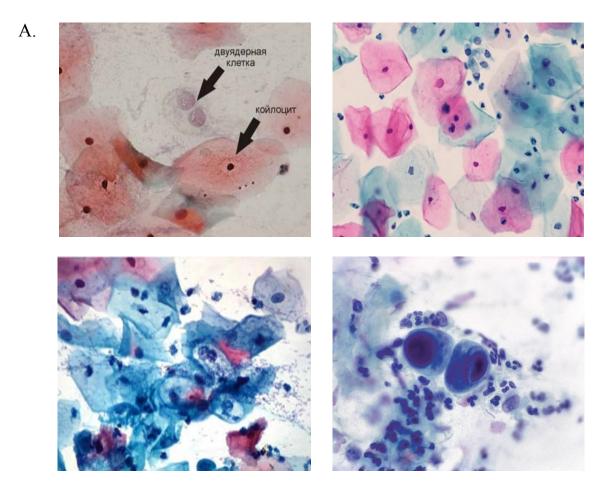


Рисунок 13. Цитологическая картина ВПЧ-ассоциированного хронического цервицита.

А. Единичные койлоциты и двуядерные клетки, воспалительная инфильтрация (скопление нейтрофилов, плазмоцитов, лимфоцитов и гистиоцитов) и дискератоциты.

#### Заключение

В структуре патологии шейки матки хронический цервицит, ассоциированный с ПВИ, выявлен у 52 (25,7%) женщин репродуктивного возраста. Характерным цитологическим признаком ВПЧ-ассоциированного хронического цервицита является определение характерных для ВПЧ-инфекции единичных койлоцитов и единичных двуядерных клеток в

цитологическом мазке среди клеток, определяющих воспалительную инфильтрацию.

## 3.3 Результаты ВПЧ-тестирования

Определение ВПЧ методом ПЦР (тест «НРVквант-21») с оценкой вирусной нагрузки проведено всем пациенткам, включенным в исследование (n=202). В ходе исследования проведено сравнение распространенности различных генотипов и определена средняя вирусная нагрузка ВПЧ среди пациенток исследуемых групп.

В 1а подгруппе пациенток с ВПЧ-ассоциированным хроническим цервицитом наиболее часто выявлены ВПЧ 16, 33, 35, 66, 18, 31, 52, 68, 53, 45 39, 44 (55) и 58 типа. ВПЧ 16 типа выявлен у 15 женщин (28,8%), 33 и 35 – у 7 (13,5%), 66 - у 6 (11,5%), 18, 31, 68 и 52 – у 5 (9,6%), 51, 53 и 45 – у 4 (7,7%) и 39, 44 (55) и 58 – у 3 (5,8%). Остальные генотипы ВПЧ - 11, 56, 6, и 73 встречаются менее чем в 5,0% случаев. В 1а подгруппе доминирующим в структуре канцерогенных генотипов ВПЧ является 16 тип. В 1а подгруппе в 37 случаях (71,2 %) выявлен один тип ВПЧ, в 11 (21,1 %) - два типа ВПЧ, в 3 (5,8%) – три типа ВПЧ ив 1 случае (1,9%) – пять типов ВПЧ одновременно.

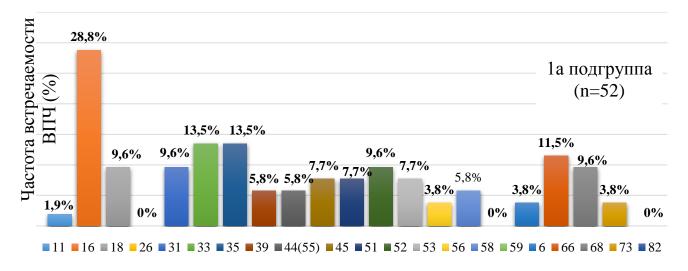


Рисунок 14. Выявляемость различных типов ВПЧ в 1а подгруппе.

Во 2а подгруппе ВПЧ позитивных женщин без признаков хронического цервицита наиболее часто выявлены ВПЧ 16, 31, 52, 51, 53, 68, 18, 66, 33, 44 (55), 45, 56, 59 и 73 типов. ВПЧ 16 типа выявлен у 16 женщин (36,4%), 31 и 52 - у 8 (18,2%), 51, 53 и 68 - у 6 (13,6%), 18 и 66 - у 4 (9,1%). Остальные генотипы ВПЧ - 33, 44 (55), 45, 56, 59 и 73 определены менее чем в 5,0% случаев.

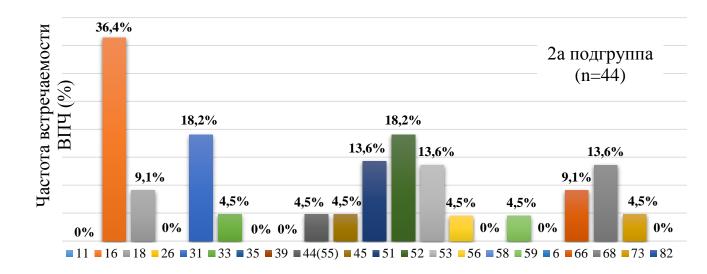


Рисунок 15. Выявляемость различных типов ВПЧ во 2а подгруппе.

Доминирующим в структуре высокоонкогенных ВПЧ в 2а подгруппе является 16 генотип. Во 2а подгруппе в 28 случаях (63,6%) выявлен один тип ВПЧ, в 10 (22,7%) - два типа ВПЧ, в 2 (4,6%) - три типа ВПЧ и в 2 случаях (9,1%) - четыре типа ВПЧ одновременно.

Таблица 23 Результаты ВПЧ исследования (21 тип) в исследуемых 1a и 2a подгруппах

Тип ВПЧ	1а подгруппа (n=52)	2а подгруппа (n=44)	p
11	1 (1,9%)	0 (0%)	0,83*
16	15 (28,8%)	16 (36,4%)	0,43
18	5 (9,6%)	4 (9,1%)	0,93
26	0 (0%)	0 (0%)	-
31	5 (9,6%)	8 (18,2%)	0,22
33	7 (13,5%)	2 (4,5%)	0,12

35	7 (13,5%)	0 (0%)	0,17
39	3 (5,8%)	0 (0%)	0,53*
44 (55)	3 (5,8%)	2 (4,5%)	0,79
45	4 (7,7%)	2 (4,5%)	0,52
51	4 (7,7%)	6 (13,6%)	0,39
52	5 (9,6%)	8 (18,2%)	0,2
53	4 (7,7%)	6 (13,6%)	0,34
56	2 (3,8%)	2 (4,5%)	0,86*
58	3 (5,8%)	0 (0%)	0,54*
59	0 (0%)	2 (4,5%)	0,53*
6	2 (3,8%)	0 (0%)	0,67*
66	6 (11,5%)	4 (9,1%)	0,70
68	5 (9,6%)	6 (13,6%)	0,54
73	2 (3,8%)	2 (4,5%)	0,86*
82	0 (0%)	0 (0%)	-

Данные представлены как абсолютные значения и %,  $\chi$ 2-тест, \*Z-критерий р – уровень значимости различий между 1а и 2а подгруппами

В исследуемых подгруппах статистически значимого преобладания различных типов ВПЧ среди женщин 1а и 2а подгрупп не выявлено (р>0,05).

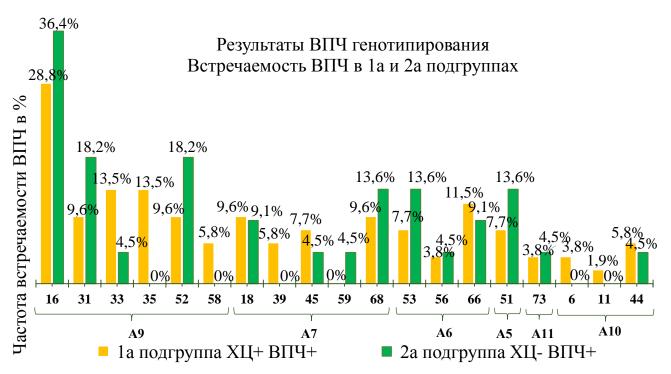


Рисунок 16. Результаты ВПЧ генотипирования в 1а и 2а подгруппах.

Средняя вирусная нагрузка в 1а подгруппе с ХЦ на момент взятия в исследование составила 4,9 lg копий ДНК вируса в образце (межквартильный размах 3,6 - 6,6 lg), а во 2а подгруппе без признаков ХЦ на момент взятия в исследование составила 4,5 lg копий ДНК вируса в образце (межквартильный размах 4,2 - 8,8 lg). Величины вирусных нагрузок в исследуемых подгруппах статистически значимо не отличались (p>0,05).

#### Заключение

Наиболее часто в 1а подгруппе выявлены ВПЧ: 16 (28,8%), 33 и 35 (13,5%), 66 (11,5%) типов. Во 2а подгруппе наиболее часто выявлены 16 (36,4%), 31 и 52 (19,1%), 51, 53 и 68 (13,5%) типы ВПЧ (рис.2). ВПЧ 33, 35, 66, 18, 31, 68 и 52 встречались менее чем в 10% случаев. В 1а и 2а подгруппах доминирующим в структуре канцерогенных типов явился ВПЧ 16, выявляемый у каждой третьей пациентки.

У большинства пациенток выявлен один тип ВПЧ, два и более - у каждой четвертой пациентки. Средняя вирусная нагрузка в 1а подгруппе составила 4,9 lg копий ДНК вируса в образце (межквартильный размах 3,6 - 6,6 lg), во 2а - 4,5 lg копий ДНК вируса в образце (межквартильный размах 4,2 - 8,8 lg).

Распространенность генотипов и вирусная нагрузка у пациенток 1а и 2а подгрупп статистически значимо не различалась, а полученные данные не противоречат результатам исследований, проведенных ранее в популяции Российских женшин

# 3.4 Результаты расширенной кольпоскопии

Расширенная кольпоскопия была проведена всем исследуемым пациенткам (n=202). Кольпоскопическое исследование позволило визуально оценить состояние шейки матки, локализацию и распространенность поражений, степень выраженности кольпоскопических признаков (наличие и характер ацетобелого эпителия, и/или наличие мозаики пунктации, интенсивность окрашивания раствором Люголя и наличие или отсутствие йод-191 участков). (94.6%)пациентки наблюдалась негативных удовлетворительная кольпоскопическая картина с полной визуализацией стыка многослойного плоского и циллиндрического эпителия, у 11 (5,6%) неудовлетворительная кольпоскопическая картина с неполной визуализацией зоны трансформации. С целью окончательной верификации диагноза и исключения патологии в цервикальном канале пациенткам ВПЧнеудовлетворительной положительным тестом И кольпоскопической картиной проведено выскабливание цервикального канала.

кольпоскопическом исследовании наблюдались: выраженный сосудистый рисунок у 95 (47%), множественные наботовы кисты с перерастянутым сосудистым рисунком у 70 (34,6%), гипертрофия у 65 (32,2%) и деформация шейки матки у 63 (31,2%), эктопия и эктропион шейки матки (варианты нормальной кольпоскопической картины) у 14 (6,9%) и 24 (11,9%) женщин соответственно. При расширенной кольпоскопии у 47 (23,3%) пациенток признаки хронического цервицита сопровождались аномальными шейки Слабовыраженные кольпоскопическими изменениями матки. изменения (тонкий АБЭ, нежная пунктация и мозаика, йоднегатив с нечеткими контурами) выявлены у 40 (19,8%) и выраженные изменения (плотный АБЭ, грубая пунктация и мозаика и йоднегативные участки с четкими контурами) у 7 (3,5%) женщин.



Рисунок 17. Результаты кольпоскопического исследования исследуемых женщин.

В ВПЧ подгруппе женщин с хроническим цервицитом положительным тестом у 35 (67,3%) пациенток выявлен выраженный сосудистый рисунок, у 31 (59,6%) - множественные наботовы кисты с перерастянутым сосудистым рисунком, у 28 (53,8%) женщин - гипертрофия, у 28 (53,8%) - деформация шейки матки, эктопия и эктропион шейки матки (варианты нормальной кольпоскопической картины) - у 8 (15,4%) и 5 (9,6%) соответственно. Среди пациенток хроническим ВПЧженщин c ассоциированным цервицитом у 18 (34,6%) выявлены слабо выраженные, у 2 (3,8%) - выраженные изменения.

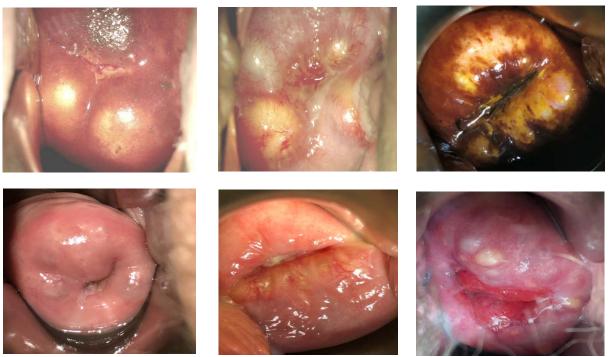


Рисунок 18. Кольпоскопическая картина женщин с хроническим цервицитом.

В 16 подгруппе женщин с хроническим цервицитом и ВПЧ отрицательным тестом у 43 (76,8%) пациенток выявлен выраженный сосудистый рисунок, у 26 (46,4%) - множественные закрытые железы шейки матки с перерастянутым сосудистым рисунком, у 21 (37,5%) женщины - гипертрофия и деформация шейки матки, эктопия - у 2 (3,6%) и эктропион - у 6 (10,7%) женщин. Признаки слабовыраженных изменений выявлены у 15 (26,8%), выраженных изменений у 1 (1,8%) женщины.

Во 2а подгруппе женщин без хронического цервицита и ВПЧ положительным тестом у 15 (34,1%) пациенток выявлен выраженный сосудистый рисунок, у 11 (25%) - множественные наботовы кисты с перерастянутым сосудистым рисунком, у 14 (31,8%) женщин - гипертрофия и деформация шейки матки, эктопия (вариант нормы) у 1 (2,3%) и эктропион шейки матки у 6 (13,6%) женщин. У 7 (15,9%) выявлены слабовыраженные изменения, у 4 (9,1%) женщин - выраженные изменения.

Во 2б подгруппе контроля у 2 (4%) пациенток выявлен выраженный сосудистый рисунок, у 2 (4%) - множественные закрытые железы шейки матки с перерастянутым сосудистым рисунком, у 2 (4%) - женщин гипертрофия и у 1 (2%) – деформация шейки матки, у 1 (2%) - эктопия, у 7 (14%) женщин - эктропион шейки матки.

Таблица 24 Результаты кольпоскопического исследования

Кольпоскопический признак	1а подгруппа (n=52)	1б подгруппа (n=56)	2а подгруппа (n=44)	2б (контрольная подгруппа) (n=50)	p
Выраженный	35	43	15	2	*<0,001
сосудистый рисунок	(67,3%)*	(76,8%)	(34,1%)**	(4%)*	**<0,001
Множественные	31	26	11	2	*0,003
наботовы кисты	(59,6%)*	(46,4%)	(25%)**	(4%)*	**<0,001
Гипертрофия и деформация шейки матки	28 (53,8%)*	21 (37,5%)	14 (31,8%)**	2 (4%)*	*0,004 **<0,001
Эктопия (вариант нормы)	8 (15,4%)	2 (3,6%)	1 (2,3%)	1 (2%)	0,097#
Эктропион шейки матки	5 (9,6%)	6 (10,7%)	6 (13,6%)	7 (14%)	0,88
Слабовыраженные	18	15	7	0	*<0,001
изменения	(34,6%)*	(26,8%)	(15,9%)**	(0%)*	**<0,001
Выраженные	$\frac{2}{(3.896)}$	1 (1.8%)	(0.1%)	0	0,83#
изменения	(3,8%)	(1,8%)	(9,1%)	(0%)	

Данные представлены как абсолютные значения и %, χ2-тест, #Z-критерий \*p<0,05 статистически значимые различия между 1а и 2б подгруппами

<sup>\*\*</sup>р<0,05 статистически значимые различия между 1а и 2а подгруппами

По сравнению с контрольной подгруппой, среди исследуемых пациенток 1а и 1б подгрупп статистически значимо чаще отмечены тонкий АБЭ, нежная мозаика, нежная пунктация в 34,6% и 26,8% случаев соответственно. Всем ВПЧ положительным женщинам 1а и 2а подгрупп со слабовыраженными кольпоскопическими изменениями такими как, наличие ацетобелого эпителия с нежной мозайкой у 23 (23,9%) и пунктацией у 24 (25%) и выраженными изменениями, такими как, плотный ацетобелый эпителий и грубая мозайка у 5 (5,2%) женщин, проведена прицельная биопсия шейки матки.

#### Заключение

По результатам кольпоскопического исследования между 1а и 2а подгруппами выявлены статистически значимые различия по следующим кольпоскопическим признакам: выраженный сосудистый рисунок, множественные наботовы кисты, гипертрофия и деформация шейки матки (p>0.05). Слабовыраженные кольпоскопические изменения также статистически значимо чаще выявляются в 1a подгруппе с ВПЧассоциированным хроническим цервицитом, по сравнению со 2а подгруппой ВПЧ-положительных женщин без хронического цервицита (p<0,001).

При хроническом цервиците наиболее частыми кольпоскопическими изменениями явились: у 72,2% женщин - выраженный сосудистый рисунок, у 52,8% пациенток - множественные наботовы кисты, у 45,4% – деформация и гипертрофия шейки матки. Анализ данных расширенной кольпоскопии 1 группы пациенток с ХЦ показал, что выявляемые признаки являются не специфическими, при этом, у каждой третьей пациентки (33,3%) определяются аномальные кольпоскопические изменения шейки матки, характерные для LSIL и потребовавшие в последующем проведения прицельной биопсии шейки матки.

В 1а подгруппе (38,5%) с ВПЧ-ассоциированным хроническим цервицитом и 2а подгруппе (25%) ВПЧ позитивных женщин с цитологически не подтвержденным хронический цервицит – в 32,3% случае выявлены

аномальные кольпоскопические изменениям шейки матки. Данным пациенткам для окончательной гистологической верификации диагноза проведена прицельная биопсия шейки матки.

Выявленные 34,6% случаев в 1а подгруппе и 15,9% - во 2а подгруппе слабовыраженные изменения и в 3,8% в 1а и 9,1% во 2а подгруппах выраженные кольпоскопические изменения эпителия шейки матки, позволяют рассматривать данный метод, как один из основных в диагностике заболеваний шейки матки. При этом слабовыраженные изменения статистически значимо чаще выявлялись в 1а подгруппе, по сравнению со 2а (p<0,001).

## 3.5 Результаты морфологического исследования

Пациенткам, включенным в исследование, строго по показаниям (наличие ВПЧ высокого онкогенного риска и выявление при расширенной кольпоскопии слабовыраженных и выраженных изменений эпителия шейки матки) проведена прицельная биопсия шейки матки с последующей гистологической верификацией диагноза.

Так, прицельная биопсия шейки матки проведена 47 (23,3%) пациенткам, включенным в исследование. Данную когорту женщин составили: 31 (15,3%) женщина 1а и 2а подгруппы с ВПЧ-положительным тестом со слабовыраженными (ацетобелым эпителием в 26%, нежной мозайкой в 23,9% и пунктацией в 25% случаев) и выраженными кольпоскопическими изменениями (плотным ацетобелым эпителием в 6,2% и в 5,2% случаях грубой мозайкой и грубой пунктацией), а также 16 (7,9%) женщин с ВПЧ-отрицательным тестом 16 подгруппы со слабовыраженными (ацетобелым эпителия в 26,8%, нежной мозайкой и пунктацией в 23,2%) и выраженными (плотным ацетобелым эпителием, грубой мозайкой и грубой пунктацией в 1,8% случаев) кольпоскопическими изменениями шейки матки.

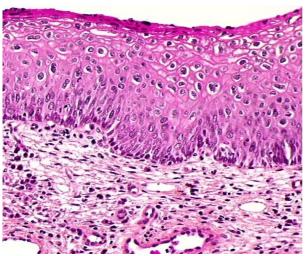


Рисунок 19. Гистологическая картина хронического цервицита.

По результатам гистологического исследования в 44 случаях (93,6%) был подтвержден диагноз хронический цервицит. В морфологическом отношении в биоптатах шейки матки с хроническим цервицитом под истонченным покровным эпителием определяются: выраженная инфильтрация лимфоцитами, гистиоциты, отдельные плазмоциты и многочисленные тонкостенные кровеносные сосуды.

Результаты морфологического исследования биоптатов шейки матки 47 обследованных женщин 1a, 1б и 2a подгрупп подтвердили диагноз XЦ в 93,6% случаев, в 4,2% - LSIL и в 2,1% случаев - HSIL.

#### Заключение

Результаты морфологического исследования биоптатов шейки матки 47 обследованных женщин 1a, 1б и 2a подгрупп подтвердили диагноз XЦ в 93,6% случаев, в 4,2% - LSIL и в 2,1% случаев - HSIL. Женщины с гистологически подтвержденным диагнозом LSIL и HSIL согласно критериям исключения, не вошли в исследуемые группы и были отстранены от дальнейшего участия в исследовании.

Исследуемым женщинам с гистологически верифицированными плоскоклеточными интраэпителиальными поражениями низкой степени тяжести, учитывая возраст, реализованность репродуктивной функции и размеры поражения, предложено динамическое наблюдение за состоянием

шейки матки с цитологическим контролем и ВПЧ-тестированием в течение 6-12 месяцев. В случае отсутствия положительной динамики рекомендовано лечение шейки матки методом петлевой электроэксцизии, или СО2-лазерной вапоризации шейки матки.

Пациентка с гистологически подтвержденным диагнозом HSIL направлена на консультацию и дальнейшее оперативное лечение к онкогинекологу.

## 3.6 Результаты микроскопического исследования вагинальных мазков

Изучение состояния биоценоза влагалища на основании микроскопии мазков вагинального отделяемого, окрашенных по Граму, проведено всем исследуемым пациенткам. При этом оценивались состояние эпителия влагалища, наличие ключевых клеток, лейкоцитарной реакции и состава вагинальной микрофлоры. Согласно классификации микроскопических характеристик микробиоценоза влагалища по Кира Е.Ф. с дополнением Гомберга М.А. (2019), среди всех исследуемых женщин определялись 4 типа биоценоза влагалища, соответствующие микроскопической характеристике: нормоценоз в 102 (50,5%), промежуточный тип биоценоза влагалища в 59 (29,2%), дисбиоз влагалища в 23 (11,4%) и вагинит (воспалительный тип мазка) в 17 (8,4%) случаев.

По результатам микроскопии вагинальных мазков женщины с отсутствием жалоб и признаков воспаления (n=102) на момент исследования в мазке в составе микробиоты влагалища доминировали лактобактерии, а число лейкоцитов не превышало 10 в поле зрения.

В мазке исследуемых пациенток с промежуточным типом биоценоза влагалища без жалоб (n=59) и периодическими умеренными выделениями из половых определялись лейкоциты в количестве, превышающем 10 в поле зрения, лактобактерии в умеренном или незначительном количестве, а также грамположительные кокки и грамотрицательных палочки.

Таблица 25 Результаты микроскопии вагинальных мазков обследуемых женщин

Микроскопия вагинальных мазков	1а подгруппа (n=52)	1б подгруппа (n=56)	2а подгруппа (n=44)	2б (контрольная подгруппа) (n=50)	p
Нормоценоз	25 (48,1%)	21 (37,5%)*	26 (59,1%)*	31 (62%)*	0,0495*
Промежуточный тип биоценоза влагалища	12 (23,1%)	16 (28,6%)	14 (31,8%)	19 (38%)	>0,05
Дисбиоз влагалища	12 (23,1%)**	11 (19,6%)**	0**	0**	0,006**#
Вагинит (воспалительный тип мазка)	3 (5,7%)	8 (14,3%)***	4 (9,1%)	0***	0,003***

Данные представлены как абсолютные значения и %,  $\chi$ 2-тест, # Z-критерий \*p<0,05 статистически значимые различия между 16 от 2а и 26 подгруппами \*\*p<0,05 статистически значимые различия 1а от 2а подгруппами, а также между 16 и 26

Среди всех пациенток с хроническим цервицитом, только у 33 (30,6%) женщин на момент исследования были жалобы на обильные выделения (28,6%) и неприятных запах из половых путей (24,1%), зуд и жжение в области вульвы и влагалища (20,4%). По результатам микроскопии мазков у 23 (21,3%) пациенток выявлен бактериальный вагиноз, и вульвовагинальный кандидоз. Дисбиоз влагалища был установлен при определении в вагинальном мазке вариабельного количества лейкоцитов на фоне малого количества или отсутствия лактобактерий, кокковой и обильной грамотрицательной и грамположительной полиморфной палочковой микрофлоры, ключевых клеток и гарднерелл. При аэробных вагинитах в мазке определялись лейкоциты в большом количестве (более 20 в поле зрения) с полимикробной ассоциацией микроорганизмов, эпителиальных клеток и выраженного фагоцитоза. Определение псевдомицелия И бластоспор грибов рода Candida соответствовала вульвовагинальному кандидозу - у 15 (13,9%). Более чем

<sup>\*\*\*</sup>р<0,05 статистически значимые различия 1б и 2б

73,3% (n=12) случаев выявленных вагинитов отмечена микст инфекция - сочетание аэробного вагинита и вульвовагинального кандидоза.

#### Заключение

Большинство женщин (69,4%), жалоб не предъявляли. В 30,6% случаев пациентки предъявляли жалобы, не патогномоничные для ХЦ и обусловленые признаками вульвовагинита: обильные выделения и неприятный запах из половых путей у женщин 1а подгруппы в 28,6%; зуд и жжение в области вульвы и влагалища - в 20,4%; контактные кровотечения - в 5,1%; диспареуния, дизурические расстройства - менее 5% случаев.

Микроскопия вагинальных мазков показала наличие у 24 (11,9%) пациенток - кокковой микрофлоры, у 16 (7,9%) – гарднерелл, у 15 (7,4%) – дрожжеподобных грибов рода Candida (спор и фрагментов псевдомицелия), у 3 (1,5%) – энтерококков.

Статистически значимо чаще выявляется бактериальный вагиноз в 1а подгруппе с ВПЧ-ассоциированным хроническим цервицитом, по сравнению со 2а подгруппой ВПЧ положительных женщин без хронического цервицита (p=0,0277) и 2б контрольной подгруппой (p=0,0001). Также бактериальный вагиноз чаще выявляется в 1б подгруппе по сравнению со 2б контрольной подгруппой (p=0,052).

По результатам исследования вульвовагинальный кандидоз статистически значимо чаще выявляется в 16 подгруппе по сравнению со 26 подгруппой (p=0,003).

Всем пациенткам с бактериальным вагинозом, вульвовагинальным кандидозом проведено лечение согласно клиническим рекомендациям [59]. Проведение контрольного микроскопического исследования вагинальных мазков после этиотропной терапии выявило отсутствие лейкоцитов, а в составе микробиоценоза влагалища доминировали лактобактерии.

# 3.7 Результаты комплексного исследования микробиоценоза влагалища методом ПЦР

Комплексное исследование микробиоценоза влагалища с определением условно-патогенной флоры с помощью тест-системы «Фемофлор 16» проведено всем пациенткам, включенным в исследование (n=202).

На основании данных комплексного исследования микробиоценоза влагалища проведена количественная и качественная оценка микробиоты влагалища, с учетом ОБМ, количества *Lactobacillus spp*. и 14 основных групп микроорганизмов условно-патогенной флоры, включая факультативно анаэробные и облигатно-патогенные микроорганизмы, а также *Candida spp.*, *Ureaplasma spp.*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*. Значимой считали концентрацию микроорганизмов более  $10^4 \Gamma$ Э/мл для *Ureaplasma spp.*,  $10^3 \Gamma$ Э/мл для *Candida spp.*, и 1% от ОБМ для остальных микроорганизмов. Для выявления инфекций, передаваемых половым путем одновременно осуществлено ПЦР-РВ без количественной оценки нагрузки патогенов - *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis*.

По результатам исследования *Chlamydia trachomatis* и *Neisseria gonorrhoeae* – не выявлены. *Trichomonas vaginalis* выявлена только в 1 случае. Согласно критериям исключения, данная пациентка не вошла в исследование.

При вагинитах спектр выявляемых микроорганизмов был представлен грибами аэробами, анаэробами, сочетанными формами возбудителей. При бактериальном вагинозе в основном отмечены полимикробные ассоциации облигатно-анаэробных микроорганизмов.

У каждой второй женщины 1а подгруппы с ВПЧ-ассоциированным хроническим цервицитом на момент обследования установлен абсолютный нормоценоз. В тоже время у кажлой четвертой пациентки 1а подгруппы выявлен условный нормоценоз: в 38,5% случаев определена *Ureaplasma spp*. в количестве более  $10^4 \, \Gamma$ Э/мл, а в 15,4% - *Candida spp*. более  $10^3 \, \Gamma$ Э/мл на фоне сохраненной нормофлоры (кандидоносительство) и в 46,1% - *Ureaplasma spp*.

в количестве более  $10^4$  ГЭ/мл и *Candida spp*. более  $10^3$  ГЭ/мл одновременно. Среди женщин 1а подгруппы в 21,15% случае обнаружен умеренный и в 3,8% - выраженный дисбиоз. Умеренный дисбиоз в 1а подгруппе в 72,7% случаев был обусловлен облигатно-анаэробными и в 27,3% аэробно-анаэробными микроорганизмами (смешанный дисбиоз). Выраженный дисбиоз во всех случаях определялся аэробно-анаэробными микроорганизмами (табл. 26).

В 1 б подгрупппе абсолютный нормоценоз обнаружен в 67,8%. Условный нормоценоз выявлен в 12,5% случаев и был обусловлен в каждом втором случае *Ureaplasma spp.*, в каждом четвертом - *Candida spp.* на фоне сохраненной нормофлоры (кандидоносительство) и в каждом седьмом - *Ureaplasma spp.* и *Candida spp.* обновременно. Умеренный дисбиоз среди женщин 1б подгруппы установлен в 16,1%, выраженный – в 3,6% случаев. Аналогично 1а подгруппе среди обследуемых пациенток 1б подгруппы умеренный дисбиоз в 77,8% случаев был обусловлен облигатно-анаэробными и в 22,2% аэробно-анаэробными микроорганизмами (смешанный дисбиоз).

Среди обследуемых пациенток 2а подгруппы абсолютный нормоценоз показан в 65,9%. У каждой пятой женщины данной подгруппы был установлен условный нормоценоз, обусловленной у каждой второй *Ureaplasma spp.* и у каждой четвертой - *Candida spp.* и смешанной флорой - *Ureaplasma spp. и Candida spp.* обновременно. В 15,9% случаев среди пацинток 2а подгруппы выявлен умеренный дисбиоз, обусловленный облигатно-анаэробной (57,1%) и аэробно-анаэробной (42,9%) (смешанный дисбиоз) флорой.

В контрольной 2б подгруппе во всех случаях выявлен абсолютный нормоценоз.

Более подробный анализ спектра микрорганизмов в обследуемых подгруппах представлен на рисунке 20.

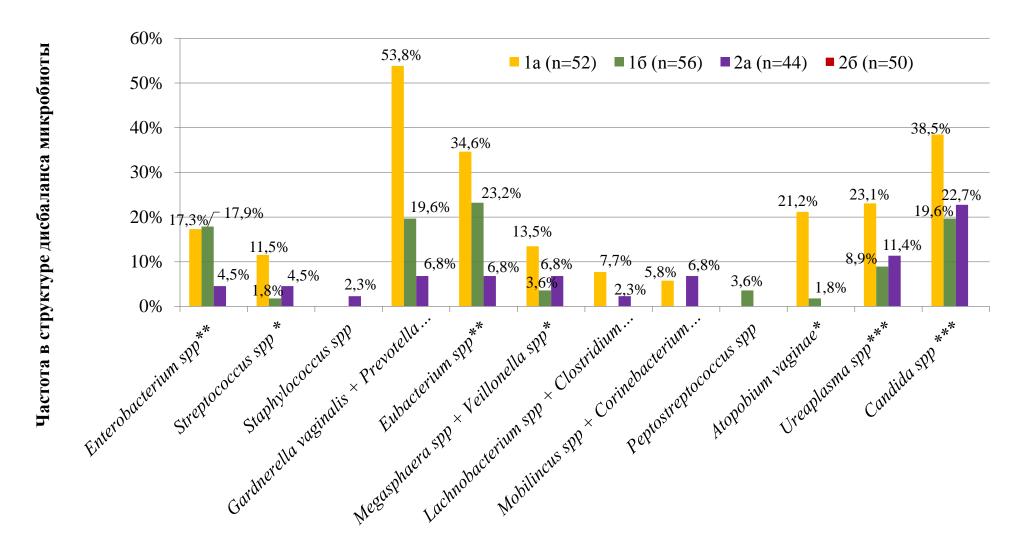


Рисунок 20. Доля групп микроорганизмов, участвующих в нарушении структуры микробиоты влагалища обследуемых женщин.

Таблица 26 Результаты комплексного исследования микробиоценоза влагалища обследуемых женщин

				26		p	
	1а подгруппа (n=52)	16 подгруппа (n=56)	2а подгруппа (n=44)	(контрольн ая подгруппа) (n=50)	1а-2б	1б-2б	2а-2б
Абсолютный нормоценоз	26 (50%)	38 (67,8%)	29 (65,9%)	50 (100%)	0,001*	0,001*	0,001
Условный нормоценоз	13 (25%)	7 (12,5%)	8 (18,2%)	0	0,0105*	0,153	0,058
			из і	них:			
Candida spp. > 4 lg	2 (15,4%)	2 (28,6%)	2 (25%)	0	0,227	0,131	0,148
Ureaplasma spp. > 4 lg	5 (38,5%)	4 (57,1%)	4 (50%)	0	0,015*	0,006*	0,012
Mycoplasma hominis > 4 lg	0	0	0	0	-	-	-
Candida spp. u Ureaplasma spp. > 4lg	6 (46,1%)	1 (14,3%)	2 (25%)	0	0,005*	0,351	0,148
Умеренный	11 (21,15%)	9 (16,1%)	7 (15,9%)	0	0,026*	0,075	0,090
			из і	них:			
Аэробный	0	0	0	0	-	-	-
Анаэробный	8 (72,7%)	7 (77,8%)	4 (57,1%)	0	0,001*	0,001	0,006
Смешанный	3 (27,3%)	2 (22,2%)	3 (42,9%)	0	0,081	0,163	0,038

			26	p		
1a	16	2a	(контрольн			
подгруппа	подгруппа	подгруппа	ая	1a-26	16-26	2a-26
(n=52)	(n=56)	(n=44)	подгруппа)	1a-20	10-20	2a-20
			(n=50)			

**Абсолютный нормоценоз:** Lactobacillus spp. > 80% относительно OБM; Candida spp., Ureaplasma spp., Mycoplasma hominis < 4 lg

**Условный нормоценоз:** Lactobacillus spp. > 80% относительно OБM; Candida spp., Ureaplasma spp., Mycoplasma hominis > 4 lg

**Умеренный дисбиоз:** *Lactobacillus spp.* < 80%, но > 20% относительно ОБМ

Данные представлены как абсолютные значения и %,  $\chi$ 2-тест, #Z-критерий

р – значение уровня значимости при сравнении между исследуемыми группами

\*р<0,05 - статистически значимые различия между подгруппам

Выраженный дисбиоз	2 (3,8%)	2 (3,6%)	0	0	0,193	0,651	-
			ИЗ Н	их:			
Аэробный	0	1 (50%)	0	0	-	0,172	
Анаэробный	0	0	0	0	-	-	-
Смешанный	2 (100%)	1 (50%)	0	0	0,317	0,172	-

Выраженный дисбиоз: Lactobacillus spp. < 20% относительно ОБМ

Данные представлены как абсолютные значения и %,  $\chi$ 2-тест, #Z-критерий

р – значение уровня значимости при сравнении между исследуемыми группами

<sup>\*</sup>p<0,05 - статистически значимые различия между подгруппам

Результаты исследования микробиоценоза влагалища обследуемых женщин сопоставимы с жалобами пациенток (неприятный запах из половых путей, зуд и жжение в области вульвы и влагалища, контактные кровотечения, диспареунияи дизурические растройства) и клиническими проявлениями бактериального вагиноза, аэробного вагинита и вульвовагинального кандидоза.

Из общего числа обследованных у 31 женщины (15,3%) был выявлен дисбиоз влагалища

## Заключение

ВПЧ-ассоциированный хронический цервицит приводит к значительным изменениям структуры микробиоты влагалища. Изучение структуры микробиоценоза влагалища пациенток с ВПЧ-ассоциированным хроническим цервицитом выявило изменения в структуре микробиоты влагалища, обусловленные повышением доли микроорганизмов, ассоциированных с бактериальным вагинозом (Gardnerella vag., Eubacterium spp., Megashaera spp., Lachnobacterium spp., Atopobium vag.), Ureaplasma и Candida species.

В 1а подгруппе у каждой второй женщины установлен абсолютный нормоценоз, в 38,5% случаев определена Ureaplasma spp. в количестве более  $104~\Gamma$ Э/мл, в 15,4% - Candida spp. более  $103~\Gamma$ Э/мл, сочетание Ureaplasma spp. и Candida spp. – выявлена в 46,1% случаев на фоне сохраненной лактофлоры; у 11~(21,1~%) пациенток выявлено умеренное снижение количества лактобактерий (< 80%, но >20%) и у 2 (3,8%) - выраженное снижение количества лактобактерий (<20%) на фоне увеличения количества облигатно-анаэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов относительно ОБМ.

Всем пациенткам с БВ, ВВК и уреаплазменной инфекцией проведено лечение согласно клиническим рекомендациям РОАГ (2013), CDC (2015) и IUSTI (2016).

# 3.8 Результаты исследования представленности мРНК генов

Для анализа развития, течения ВПЧ-ассоциированного цервицита и влияния вируса на клиническую картину заболевания в эпителии цервикального канала пациенток исследуемых групп проведено изучение представленности мРНК генов, регулирующих пролиферацию и клеточный цикл (КІ67, CCND1, CDKN2A/P16), апоптоз (BCL2), рецепторный аппарат клеток (PGR, EGFR), генов иммунной системы (IFNAR1, IL1RN, IL1b, IL10, IL18, TNFa, GATA3, TLR4, TGFB1, CD68, CXCL5, CXCL10 CXCL13), матриксных металлопротеиназ (ММР8, ММР9) на первом визите, и в последующем, на втором визите через 12 месяцев.

Таблица 27 Спектр и функции исследованных генов

Ген	Функция
KI67	Регуляция пролиферативной активности
CCND1	Регуляция перехода G1/S-фазы клеточного цикла
CDKN2A/P16	Регуляция клеточного цикла (ингибирование процессов
CDRIVZIVI 10	деления клетки)
BCL2	Регуляция апоптоза
PGR	Рецептор прогестерона
EGFR	Рецептор эпидермального фактора роста
IFNAR1	Альфа цепь для рецептора 1 Интерферонов-альфа/бета
TNFα	Провоспалительный цитокин с выраженной
ΠΝΓα	противовирусной активностью
IL1b	Многофункциональный провоспалительный цитокин с
ILIU	широким спектром действия
	Toll-like рецептор, распознает консервативные структуры
TLR4	микроорганизмов и активируют клеточный иммунный
	ответ
CD68	Регуляция фагоцитарной активности макрофагов и
	лизосомального метаболизма
CXCL5	Провоспалительный хемокин. Регуляция гомеостаза
CACLS	нейтрофиллов

CXCL10	Провоспалительный хемокин
CXCL13	Гомеостатический хемокин. Иммунный гомеостаз мукозо-
	ассоциированной лимфоидной ткани
TGFB1	Иммунорегуляция. Регуляция роста, дифференцировки и
101 11	апоптоза
IL1RN	Кодирует белок-антагонист рецептора IL1. Ингибирует
	эффекты IL1
<i>IL10</i>	Противовоспалительный цитокин. Иммунорегуляция
IL18	Провоспалительный цитокин
GATA3	Транскрипционный фактор. Регуляция дифференцировки и
OATAS	пролиферации клеток
MMP8 u	Ферменты. Ремоделирование внеклеточного матрикса
MMP9	Ферменты. Темоделирование внеклеточного матрикса

Выбор генов, включенных в представленную панель, обусловлен регуляторной ролью белков, кодируемых этими генами, в процессах ремоделирования ткани, пролиферации, клеточного цикла и иммунного ответа, в том числе противовирусного.

Результаты исследования экспрессии мРНК генов исследуемых пациенток на первом визите представлены в таблице 28.

Таблица 28 Уровень экспрессии мРНК генов исследуемых

	1а 1б		2a		p		
	подгруппа (n=52)	подгруппа (n=56)	подгруппа (n=44)	(контрольная подгруппа) (n=50)	1а-2б	16-26	2а-2б
KI67	0,004 (0,00-0,01)	0,004 (0,00-0,01)	0,005 (0,00-0,02)	0,005 (0,00-0,01)	0,84	0,71	0,92
p16	0,09 (0,05-0,23)	0,06 (0,04-0,14)	0,09 (0,03-0,46)	0,05 (0,02-0,08)	0,01*	0,05*	0,03*
BCL2	0,03 (0,02-0,04)	0,03 (0,02-0,04)	0,02 (0,02-0,03)	0,03 (0,01-0,04)	0,75	0,39	0,81
PGR	0,25 (0,17-0,91)	0,17 (0,08-0,52)	0,34 (0,09-0,63)	0,35 (0,09-1,05)	0,46	0,07	0,57

IFNARI   (0,25-0,42)   (0,31-0,48)   (0,28-0,58)   (0,22-0,39)   0,24   0,01*   0,17   0,04   0,16   0,25   0,06   0,09   0,71   0,04   0,01   0,006   0,09   0,000		0,35	0,38	0,33	0,33				
	IFNAR1			·		0,24	0,01*	0,17	
CCND1	W 100	0,36	0,29	0,71	0,24	0.16	0.25	0.06	
CCND1         (0,30-0,64)         (0,29-0,59)         (0,22-0,66)         (0,34-0,52)         0,89         0,43         0,34           EGFR         0,49         0,43         0,38         0,43         0,43         0,49         0,96         0,93           IL1b         1,11         2         2,44         1,25         0,68         0,13         0,16           IL10         0,01         0,01         0,01         0,01         0,006         0,70         0,15         0,08         0,90         0,85         0,23           IL18         0,06         0,07         0,15         0,08         0,90         0,85         0,23           TNFa         0,03         0,05         0,04         0,02         0,35         0,02*         0,18           GATA3         0,03         0,05         0,04         0,02         0,35         0,02*         0,18           GATA3         0,03         0,05         0,04         0,02         0,35         0,02*         0,18           GATA3         0,03         0,03         0,05         0,04         0,02         0,64         0,13         0,06           TLR4         0,02         0,02         0,02         0,02	ILIRN	(0,12-0,73)	(0,09-1,19)	(0,08-2,22)	(0,05-0,48)	0,16	0,25	0,06	
EGFR         (0,30-0,64)         (0,29-0,59)         (0,22-0,66)         (0,34-0,52)         N         9,96         0,93           IL1b         1,11         2         2,44         1,25         0,68         0,13         0,16           IL1b         1,11         2         2,44         1,25         0,68         0,13         0,16           IL10         0,01         0,01         0,01         0,01         0,01         0,006         0,07         0,18         0,02*         0,01*           IL18         0,06         0,07         0,15         0,08         0,09         0,85         0,23           TNFa         0,06         0,07         0,15         0,08         0,90         0,85         0,23           TNFa         0,03         0,05         0,04         0,02         0,35         0,02*         0,18           GATA3         0,03         0,05         0,04         0,02         0,35         0,02*         0,18           GATA3         0,02         0,02         0,02         0,02         0,02         0,02         0,02         0,02         0,02         0,02         0,02         0,02         0,02         0,02         0,02         0,02         <	CCND1	0,44	0,37	0,38	0,42	0.00	0.42	0.24	
EGFR         (0,30-0,60)         (0,31-0,57)         (0,27-0,71)         (0,33-0,56)         0,49         0,96         0,93           IL1b         1,11         2         2,44         1,25         0,68         0,13         0,16           IL10         0,01         0,01         (0,62-11,6)         (0,65-11,5)         (0,34-3,1)         0,68         0,13         0,16           IL10         0,01         0,01         0,00         0,006         0,07         0,15         0,08         0,90         0,85         0,23           IL18         0,06         0,07         0,15         0,08         0,90         0,85         0,23           TNFa         0,03         0,05         0,04         0,02         0,35         0,02*         0,18           GATA3         0,03         0,05         0,04         0,02         0,35         0,02*         0,18           GATA3         0,03         0,05         0,04         0,02         0,35         0,02*         0,18           GATA3         0,03         0,03         0,05         0,04         0,02         0,02*         0,18           TLR4         0,02         0,02         0,02         0,02         0,01	CCNDI	(0,30-0,64)	(0,29-0,59)	(0,22-0,66)	(0,34-0,52)	0,89	0,43	0,34	
	ECED	0,49	0,43	0,38	0,43	0.40	0.06	0.02	
IL16	EGFK	(0,30-0,60)	(0,31-0,57)	(0,27-0,71)	(0,33-0,56)	0,49	0,90	0,93	
$IL10 \qquad \begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	17 11.	1,11	2	2,44	1,25	0.60	0.12	0.16	
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	ILIb	(0,34-8,77)	(0,62-11,6)	(0,65-11,5)	(0,34-3,1)	0,68	0,13	0,16	
IL18	11.10	0,01	0,01	0,01	0,006	0.10	0.02*	0.01*	
$ \begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	ILIU	(0,00-0,02)	(0,00-0,03)	(0,00-0,04)	(0,00-0,01)	0,18	0,02	0,01	
$TNFa = \begin{pmatrix} 0,04-0,12 \\ 0,03 \\ (0,01-0,07) \\ (0,02-0,10) \\ (0,02-0,01) \\ (0,02-0,07) \\ (0,02-0,07) \\ (0,03 \\ (0,02-0,01) \\ (0,01-0,06) \\ (0,01-0,06) \\ (0,01-0,06) \\ (0,01-0,06) \\ (0,01-0,06) \\ (0,01-0,04) \\ (0,01-0,06) \\ (0,01-0,06) \\ (0,01-0,06) \\ (0,01-0,04) \\ (0,01-0,06) \\ (0,01-0,06) \\ (0,01-0,06) \\ (0,01-0,06) \\ (0,01-0,06) \\ (0,01-0,06) \\ (0,01-0,07) \\ (0,001$	11 10	0,06	0,07	0,15	0,08	0.00	0.95	0.22	
$ \begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	ILIO	(0,04-0,12)	(0,04-0,15)	(0,05-0,4)	(0,02-0,17)	0,90	0,83	0,23	
$GATA3 = \begin{pmatrix} 0,01-0,07 \\ 0,02 \\ 0,01 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 0,03 \\ 0,02-0,01 \\ 0,02-0,07 \\ 0,02 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 0,02 \\ 0,02 \\ 0,01-0,04 \\ 0,34-1,01 \\ 0,28-0,64 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 0,02 \\ 0,02-0,73 \\ 0,02 \\ 0,02 \\ 0,01 \\ 0,002 \\ 0,01 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 0,02 \\ 0,01 \\ 0,01 \\ 0,02 \\ 0,01 \\ 0,01 \\ 0,02 \\ 0,01 \\ 0,001 \\ 0,001 \\ 0,01 \\ $	TNE	0,03	0,05	0,04	0,02	0.25	0.02*	<u>Λ 1</u> Ω	
$ \begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	INFA	(0,01-0,07)	(0,02-0,10)	(0,01-0,09)	(0,01-0,06)	0,55	0,02	0,18	
$TLR4 = \begin{pmatrix} 0,02 & 0,02 & 0,02 & 0,01 \\ 0,01 - 0,04) & (0,01 - 0,06) & (0,01 - 0,07) & (0,00 - 0,04) \\ 0,067 & 0,62 & 0,58 & 0,41 \\ 0,34 - 1,01) & (0,38 - 1,76) & (0,49 - 1,49) & (0,18 - 1,23) \\ 0,07 & 0,69 & 0,77 & 0,78 & 0,69 \\ 0,019 - 2) & (0,27 - 2) & (0,26 - 1,36) & (0,28 - 2,07) \\ 0,001 & 0,001 & 0,0007 & 0,01 & 0,006 \\ 0,000 - 0,02) & (0,001 - 0,07) & (0,001 - 0,08) & (0,000 - 0,02) \\ 0,001 & 0,002 & 0,003 & 0,001 \\ 0,000 - 0,007 & 0,01 & 0,006 & 0,69 \\ 0,001 & 0,002 & 0,003 & 0,001 \\ 0,000 - 0,000) & (0,001 - 0,07) & (0,01 - 0,08) & (0,000 - 0,05) \\ 0,001 & 0,002 & 0,003 & 0,001 \\ 0,000 & 0,001 & 0,002 & 0,003 & 0,001 \\ 0,0000 & 0,001 & $	CATA 2	0,03	0,03	0,05	0,02	0.64	0.13	0.06	
$ \begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	GATAS	(0,02-0,01)	(0,02-0,07)	(0,05-0,15)	(0,01-0,06)	0,04	0,13	0,00	
$CD68 \begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	TI DA	0,02	0,02	0,02	0,01	0.12	0.02*	0.06	
$ \begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	1LR4	(0,01-0,04)	(0,01-0,06)	(0,01-0,07)	(0,00-0,04)	0,12	0,02*	0,06	
$TGFB1 = \begin{pmatrix} 0,34-1,01 \\ 0,38 \\ (0,28-0,64) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 0,48 \\ (0,26-0,73) \\ (0,27-2) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 0,78 \\ (0,26-1,36) \\ (0,00-0,02) \\ (0,001-0,07) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 0,01 \\ (0,001-0,07) \\ (0,001-0,07) \\ (0,001-0,07) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 0,01 \\ (0,001-0,07) \\ (0,001-0,07) \\ (0,001-0,07) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 0,01 \\ (0,001-0,08) \\ (0,001-0,08) \\ (0,001-0,08) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 0,01 \\ (0,001-0,08) \\ (0,001-0,08) \\ (0,001-0,08) \\ (0,001-0,08) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 0,01 \\ (0,001-0,08) \\ (0,001-0,08) \\ (0,001-0,08) \\ (0,001-0,08) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 0,01 \\ (0,001-0,08) \\ (0,001-0,08) \\ (0,001-0,08) \\ (0,001-0,08) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 0,01 \\ 0,01 \\ (0,001-0,08) \\ (0,001-0,08) \\ (0,001-0,08) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 0,01 \\ 0,01 \\ 0,01 \\ (0,001-0,08) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 0,01 \\ 0,01 \\ 0,01 \\ (0,001-0,08) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 0,01 \\ 0,01 \\ 0,01 \\ (0,001-0,08) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 0,01 \\ 0,01 \\ 0,01 \\ (0,001-0,08) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 0,01 \\ 0,01 \\ 0,01 \\ (0,001-0,08) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 0,01 \\ 0,01 \\ 0,01 \\ 0,01 \\ 0,01 \\ 0,01 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 0,01 \\ 0,01 \\ 0,01 \\ 0,01 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 0,01 \\ 0,01 \\ 0,01 \\ 0,01 \\ 0,01 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 0,01 \\ 0,01 \\ 0,01 \\ 0,01 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 0,01 \\ 0,01 \\ 0,01 \\ 0,01 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 0,01 \\ 0,01 \\ 0,01 \\ 0,01 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 0,01 \\ 0,01 \\ 0,01 \\ 0,01 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 0,01 \\ 0,01 \\ 0,01 \\ 0,01 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 0,01 \\ 0,01 \\ 0,01 \\ 0,01 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 0,01 \\ 0,01 \\ 0,01 \\ 0,01 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 0,01 \\ 0,01 \\ 0,01 \\ 0,01 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 0,01 \\ 0,01 \\ 0,01 \\ 0,01 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 0,01 \\ 0,01 \\ 0,01 \\ 0,01 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 0,01 \\ 0,01 \\ 0,01 \\ 0,01 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 0,01 \\ 0,01 \\ 0,01 \\ 0,01 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 0,01 \\ 0,01 \\ 0,01 \\ 0,01 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 0,01 \\ 0,01 \\ 0,01 \\ 0,01 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 0,01 \\ 0,01 \\ 0,01 \\ 0,01 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 0,01 \\ 0,01 \\ 0,01 \\ 0,01 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 0,01 \\ 0,01 \\ 0,01 \\ 0,01 \\ 0,01 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 0,01 \\ 0,01 \\ 0,01 \\ 0,01 \\ 0,01 \\ 0,01 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 0,01 \\ 0,01 $	CD69	0,67	0,62	0,58	0,41	0.17	0.04*	0.17	
$ \begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	CD00	(0,34-1,01)	(0,38-1,76)	(0,49-1,49)	(0,18-1,23)	0,17	0,04	0,17	
$CXCL5 = \begin{pmatrix} 0,28-0,64 \\ 0,69 \\ (0,19-2) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 0,26-0,73 \\ (0,27-2) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 0,78 \\ (0,26-1,36) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 0,69 \\ (0,28-2,07) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 0,79 \\ 0,66 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 0,98 \\ 0,000 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 0,007 \\ (0,00-0,02) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 0,007 \\ (0,00-0,02) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 0,001 \\ (0,00-0,02) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 0,000 \\ (0,00-0,03) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 0,000 \\ (0,00-0,05) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 0,001 \\ (0,00-0,00) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 0,001 \\ (0-0,00) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 0,002 \\ (0-0,01) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 0,001 \\ $	TCED1	0,38	0,48	0,44	0,32	0.08	0.05*	0.07	
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	IGFBI	(0,28-0,64)	(0,26-0,73)	(0,33-0,82)	(0,2-0,59)	0,08	0,05*	0,07	
$CXCL10 = \begin{pmatrix} 0,19-2 \\ 0,01 \\ (0,00-0,02) \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 0,27-2 \\ (0,00-0,01) \\ (0,00-0,02) \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 0,01 \\ (0,00-0,02) \\ (0,01-0,08) \\ (0,00-0,05) \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 0,01 \\ (0,00-0,05) \\ (0,00) \\ (0-0,00) \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 0,002 \\ (0-0,01) \\ (0-0,01) \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 0,001 \\ (0-0,01) \\ (0-0,01) \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 0,01 \\ (0-0,01) \\ (0-0,01) \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 0,01 \\ (0-0,01) \\ (0-0,01) \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 0,01 \\ (0-0,01) \\ (0-0,01) \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 0,28 \\ 0.04* \\ 0.21 \end{pmatrix}$	CYCI 5	0,69	0,77	0,78	0,69	0.70	0.08	0.66	
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	CACLS	(0,19-2)	(0,27-2)	(0,26-1,36)	(0,28-2,07)	0,79	0,98	0,00	
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	CYCL 10	0,01	0,007	0,01	0,006	0.61	0.56	0.70	
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	CACLIO	(0,00-0,02)	(0,00-0,01)	(0,00-0,02)	(0,00-0,02)	0,01	0,50	0,70	
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	CVCI 12	0,03	0,03	0,04	0,03	0.60	0.22	0.12	
MMP8         (0-0,00)         (0-0,01)         (0-0,01)         (0-0)         0,61         0,38         0,20           MMP9         0,26         0,42         0,44         0,14         0,28         0,04*         0,21	CACLIS	(0,00-0,07)	(0,01-0,07)	(0,01-0,08)	(0,00-0,05)	0,09	0,22	0,13	
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	МΜРΩ	0,001	0,002	0,003	0,001	0.61	0.38	0.20	
MMP9	IVIIVIF O	(0-0,00)	(0-0,01)	(0-0,01)	(0-0)	0,01	0,30	0,20	
$ \left  \begin{array}{c c} (0,08-0,74) & (0,11-1,08) & (0,11-1,16) & (0,01-0,69) & 0,28 & 0,21 \\ \end{array} \right  $	MMPO	0,26	0,42	0,44	0,14	0.28	0.04*	0.21	
	IVIIVIT 9	(0,08-0,74)	(0,11-1,08)	(0,11-1,16)	(0,01-0,69)	0,20	U,U4 ·	U, ∠1	

Данные представлены как медианы с интерквартильным размахом, тест Манна-Уитни

Согласно результатам исследования транскрипционного профиля генов, связанных с ВПЧ-инфекцией и воспалительным процессом выявлены особенности изменения экспрессии ряда мРНК генов иммунитета и неопластической трансформации, характерные для ВПЧ-ассоциированного хронического цервицита. При ВПЧ-ассоциированном хроническом цервиците показано, что в 1,8 раза повышается уровень экспрессии мРНК гена СDKN2A/p16 (p=0,02) в соскобах из цервикального канала (табл. 29). Полученные результаты свидетельствуют также о том, что ВПЧ может оказывать иммуносупрессорное действие, опосредованное противовоспалительным *IL10*, уровень которого во 2а подгруппе ВПЧ-положительных женщин выше в 2,4 раза (p=0,01) по сравнению с контрольной.

Таблица 29 Изменение уровня экспрессии мРНК профиля генов в исследуемых группах по сравнению с контрольной группой.

	1а подгруп	ma (n=52)	1б подгруг	ппа (n=56)	2а подгруг	ппа (n=44)	
Ген	Цервицит+ ВПЧ+		Цервици	т+ ВПЧ-	Цервицит- ВПЧ+		
	изменени	значени	изменени	значение	изменение	значение	
	e	e p	e	p		p	
CDKN2A/p16	↑1,8 pa3	0,02*	-	0.15	↑1,7 pa3	0,03*	
IL10	-	0,57	↑1,9 pa3	0,02*	↑2,4 раза	0,01*	
IFNAR1	-	0,45	↑1,3 раза	0,01*	-	0.27	
IL1B	-	0,64	↑2,2 раза	0,05*	_	0.17	
TNFA	-	0,39	↑2,2 раза	0,02*	-	0,15	
TLR4	-	0,35	↑2,1 pa3	0,02*	_	0,16	
CD68	-	0,58	↑1,5 раза	0,04*	-	0,23	
TGFB1	-	0,72	↑1,6 pa3	0,03*	-	0,24	
MMP9	-	0,33	↑2,9 pa3	0,03*	-	0,12	

<sup>\*</sup>р<0,05 статистически значимые изменения

<sup>\*</sup>р<0,05 статистически значимые различия между подгруппами

Особенностью ВПЧ-ассоциированного хронического цервицита является отсутствие повышенной экспрессии мРНК генов иммуннного ответа выявленной при хроническом цервиците, что, по-видимому, связано с иммуносупрессорным действием *IL10*. Так, хронический цервицит в отсутствии ВПЧ в 16 подгруппе сопровождается повышением уровня экспрессии мРНК генов иммунитета *IFNAR1*, *IL1B*, *IL10*, *TNFA*, *TLR4*, *CD68*, *TGFB1* и провоспалительной матриксной металлопротеиназы 9 (*MMP9*) от 1,5 до 2,9 раз (p=0,03). В данной подгруппе уровень экспрессии *IL10* также повышен.

## Заключение

Результаты исследования транскрипционного профиля генов 1а подгруппы выявили повышение уровня экспрессии мРНК гена неопластической трансформации *CDKN2A/p16* в 1,8 раза (p=0,02).

Исследование 16 подгруппы, показало повышение экспрессии мРНК генов *IL10* оказывающего иммуносупрессорное действие на синтез провоспалительных цитокинов в 1,9 раз (p=0,03) и *IFNAR1*, *IL1* $\beta$ , *IL10*, *TNF* $\alpha$ , *TLR4*, *CD68*, *TGFB1* и *MMP9* от 1,3 до 2,9 раз (p<0,05).

Результаты 2а подгруппы свидетельствуют о том, что ВПЧ по-видимому может оказывать иммуносупрессорное действие, опосредованное противовоспалительным IL10, уровень которого в 2,4 раза выше по сравнению с контрольной подгруппой (p=0,01).

# 3.8.1 Анализ корреляционных связей уровня экспрессии мРНК

Для выявления патогенетических связей между экспрессией мРНК исследуемых генов был проведен корреляционный анализ с использованием метода ранговой корреляции Спирмена (rS) с оценкой по шкале Чеддока. По значению коэффициента корреляции определялась сила предполагаемой взаимосвязи между величинами. При оценке силы связи коэффициентов

корреляции использовали шкалу Чеддока и учитывали слабые (от 0,3 до 0,5), средние (от 0,5 до 0,7), высокие (от 0,7 до 0,9) и очень высокие (более 0,9) положительные корреляционные связи, учитывались только статистически значимые корреляции (p<0,05). При отрицательной корреляции значения силы связи между переменными соответственно меняли на противоположные.

Значения коэффициентов корреляции рассчитывались отдельно для каждой группы. В случае определения аналогичных зависимостей между уровнями экспрессии мРНК в группах, значения коэффициентов корреляции представлены для всей выборки (рис. 21).

При хроническом цервиците отмечены средние (rS от 0,5 до 0,7, p<0,001), и высокие (rS от 0,7 до 0,9, p<0,001) корреляционные связи экспрессии иммунных маркеров воспаления:  $TNF\alpha$ , IL1B, TLR4, CD68 и IFNAR1, как следствие каскадной активации иммунокомпетентных клеток, а также матриксных металлопротеиназ MMP8 и MMP9 (p<0,001).

При высоком уровне провоспалительных маркеров, по-видимому, компенсаторно повышается экспрессия иммунорегуляторных молекул *IL10*, IL1RN и TGFB1 (установлены средние и высокие корреляционные связи, р<0,001), что обеспечивает контроль за воспалительной реакцией и предохраняет систему от гиперактивации. Прямые корреляционные связи GATA3 иммунорегуляторных маркеров IL1RN, *IL18*, избирательны. *IL1RN* является антагонистом рецепторов IL1, ингибирует активность *IL1A* и *IL1B* и модулирует различные связанные с ними иммунные и воспалительные реакции. В ходе исследования установлены прямые средние корреляционные связи *IL1RN* с такими иммуномодуляторами, как *IL18*, GATA3, TGFB1, IL10, а также одной из ключевых молекул папилломавирусной инфекции - CDKN2A/p16.

Слабую корреляционную связь с  $TNF\alpha$  имеет только один из хемокинов - CXCL13, являющийся хемоатрактантом для В-лимфоцитов, Т-клеток и макрофагов.

		TNFa	IL1b	TLR4	CD68	CXCL13	MMP8	MMP9	IFNAR1	<i>IL1RN</i>	IL10	TGFB1	IL18	GATA3	p16	PGR	EGFR
TNFa	rS		0,783	0,663	0,683	0,433	00,605	0,661	0,672	0,581	0,668	0,704				-0,605	-0,371
	p-level		2,E-30	3,E-19	1,E-20	8,E-08	2,E-15	5,E-19	7,E-20	4,E-14	2,E-19	2,E-22				2,E-15	6,E-06
IL1b	rS	0,783		0,689	0,571		0,550	0,566	0,568	0,647	0,569	0,683				-0,499	-0,354
	p-level	2,E-30		3,E-21	1,E-13		2,E-12	3,E-13	2,E-13	4,E-18	2,E-13	1,E-20				3,E-10	2,E-05
TLR4	rS	0,663	0,689		0,673		0,614	0,709	0,601	0,557	0,511	0,756				-0,470	-0,415
	p-level	3,E-19	3,E-21		6,E-20		6,E-16	8,E-23	3,E-15	8,E-13	1,E-10	2,E-27				4,E-09	3,E-07
CD68	rS	0,683	0,571	0,673			0,662	0,846	0,507	0,653	0,681	0,786	0,544		,430	-0,673	-0,418
	p-level	1,E-20	1,E-13	6,E-20			4,E-19	1,E-39	1,E-10	2,E-18	1,E-20	7,E-31	3,E-12		1,E-07	6,E-20	2,E-07
CXCL13	rS	0,433															
	p-level	8,E-08															
MMP8	rS	0,605	0,550	0,614	0,662			0,753				0,652					
	p-level	2,E-15	2,E-12	6,E-16	4,E-19			5,E-27				2,E-18					
MMP9	rS	0,661	0,566	0,709	0,846		0,753		0,532	0,530	0,598	0,739				-0,616	
	p-level	5,E-19	3,E-13	8,E-23	1,E-39		5,E-27		1,E-11	1,E-11	5,E-15	1,E-25				4,E-16	
IFNAR1	rS	0,672	0,568	0,601	0,507			0,532		0,500	0,538	0,582				-0,531	-0,334
	p-level	7,E-20	2,E-13	3,E-15	1,E-10			1,E-11		3,E-10	6,E-12	4,E-14				1,E-11	5,E-05
IL1RN	rS	0,581	0,647	0,557	0,653			0,53*	0,500		0,542	0,710	0,747	0,624	0,622	-0,572	
	p-level	4,E-14	4,E-18	8,E-13	2,E-18			1,E-11	3,E-10		4,E-12	6,E-23	2,E-26	1,E-16	2,E-16	1,E-13	
IL10	rS	0,668	0,569	0,511	0,681**			0,598	0,538	0,542		0,566				-0,564	
	p-level	2,E-19	2,E-13	1,E-10	1,E-20			5,E-15	6,E-12	4,E-12		3,E-13				3,E-13	
TGFB1	rS	0,704	0,683	0,756	0,786		0,652	0,739	0,582	0,710	0,566					-0,590	
	p-level	2,E-22	1,E-20	2,E-27	7,E-31		2,E-18	1,E-25	4,E-14	6,E-23	3,E-13					1,E-14	
IL18	rS				0,544					0,747							
	p-level				3,E-12					2,E-26							
GATA3	rS									0,624					0,525		
	p-level									1,E-16					2,E-11		
p16	rS				0,430					0,622				0,525			
	p-level				1,E-07					2,E-16				2,E-11			
PGR	rS	-0,605	-,499	-0,470	-0,673			-0,616	-0,531	-0,572	-0,564	-0,590					
	p-level	2,E-15	3,E-10	4,E-09	6,E-20			4,E-16	1,E-11	1,E-13	3,E-13	1,E-14					
EGFR	rS	-0,371	-0,354	-0,415	-0,418				-0,334								
	p-level	6,E-06	2,E-05	3,E-07	2,E-07				5,E-05								

Рисунок 21. Матрица корреляционных связей экспрессии мРНК исследованных маркеров

Установлены слабые (rS от - 0,3 до - 0,5, p<0,001) и средние (rS от - 0,5 до - 0,7, p<0.001) корреляционные связи маркеров воспаления с *PGR* и *EGFR*. Хроническое воспаление вследствие активации провоспалительных цитокинов приводит к снижению уровня экспрессии прогестероновых рецепторов и рецептора эпидермального ростового фактора. Снижение уровня экспрессии прогестеронового рецептора, определяет снижение чувствительности к прогестерону, которое может приводить к дисрегуляции функции репродуктивной системы в целом.

Следствием изменения экспрессии *EGFR* может стать снижение чувствительности к эпидермальному ростовому фактору (EGF) – одному из ключевых факторов, определяющих процессы пролиферации эпителия и подавления регенерации эпителия, что приводит, по-видимому, к подавлению нормальной регенерации эпителия.

мРНК vs мРНК	1а подгруппа Церв+ВПЧ+ rS	1б подгруппа Церв+ВПЧ- rS	2а подгруппа Церв-ВПЧ+ rS	2б подгруппа Церв-ВПЧ- rS
TNFa vs CDKN2/p16	отсутствует	0,279	0,544	отсутствует
IFNAR1 vs CDKN2/p16	отсутствует	0,349	0,554	0,447
IL1b vs CDKN2/p16	отсутствует	отсутствует	0,634	0,484
TLR4 vs CDKN2/p16	отсутствует	0,289	0,637	0,434
CD68 vs <b>CDKN2/p16</b>	отсутствует	0,376	0,628	0,594
MMP9 vs CDKN2/p16	отсутствует	0,361	0,627	0,599
IL10 vs CDKN2/p16	отсутствует	0,483	0,586	0,549
TGFB1 vs CDKN2/p16	отсутствует	отсутствует	0,683	0,598
GATA3 vs CDKN2/p16	0,4	0,457	0,618	0,712
CXCL5 vs CDKN2/p16	0,489	отсутствует	0,463	отсутствует
IL18 vs CDKN2/p16	0,573	0,428	0,639	0,447
IL1RN vs CDKN2/p16	0,622	0,466	0,838	0,723

0,7-0,9	Высокие положительные
0,5-0,7	Средние положительные
0,3-0,5	Слабые положительные
-0,3-0,5	Слабые отрицательные

Рисунок 22. Отдельные корреляционные связи гена *CDKN2/p16* в исследуемых подгруппах.

Представлены значимые корреляционные связи (р<0,05).

В качестве одного из основных маркеров, принимаемых в рассмотрение при анализе корреляционных связей, был выбран ген CDKN2/p16, экспрессия которого повышается при хроническом цервиците, ассоциированном с ВПЧ. Установлено, что при ВПЧ-ассоциированном хроническом цервиците в большинстве случаев, отсутствуют корреляционные связи между уровнями экспрессии мРНК гена CDKN2/p16 и мРНК генов, регулирующих иммунный ответ и ремоделирование ткани. В ряде случаев выявлены прямые корреляционные связи между экспрессией мРНК гена CDKN2/p16 и мРНК генов GATA3 (rS = 0,4; p<0,05), CXCL5 (rS = 0,5; p<0,05), IL18 (rS = 0,6; p<0,05), и IL1b (rS = 0,6; p<0,05).

# 3.8.2 Модель оценки воспалительного процесса

Для практического применения экспрессионного профиля генов с целью оценки степени выраженности воспалительного процесса в эпителии шейки матки разработана модель, учитывающая уровень экспрессии четырех маркеров воспаления: IL1b, фактора некроза опухолей  $(TNF\alpha)$ , молекулы CD68 и IL10.

Индекс воспаления (ИВ) может быть рассчитан по формуле 1:

ИВ = 
$$\frac{1}{1+e^{-z}}$$
 \* 100% (формула 1),

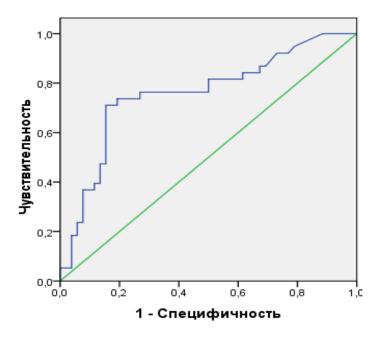
где z – значение граничной функции, которое может быть рассчитано по формуле 2:

$$Z=1,95*ln\frac{IL1B}{B2M}+0,96*ln\frac{TNF}{B2M}-0,21*ln\frac{CD68}{B2M}+0,25*ln\frac{IL10}{B2M}+10,3$$
 (формула 2), где,  $\frac{IL1B}{B2M},\frac{TNF}{B2M},\frac{CD68}{B2M},\frac{IL10}{B2M}$  - нормированные значения уровня экспрессии цитокинов относительно референсного гена  $B2M$ .

## ROC-анализ

Оптимальное значение величины порога отсечения (точки cut off) определено с помощью ROC-анализа. Площадь под ROC-кривой составила:

 $AUC=75,7\pm5,3$  (p=3,3x10<sup>-5</sup>), т.е. 75,7% (рис. 23). Пороговое значение Индекса Воспаления (ИВ) составило 59 баллов. При значении ИВ более 59 баллов в мазках эпителия шейки матки иммунный ответ рассматривается как выраженный провоспалительный.



Диагональные сегменты формируются совпадениями. Рисунок 23. ROC-кривая.

Чувствительность и специфичность предложенного метода оценки воспалительного процесса в области порогового значения составила 62% и 84%, соответственно.

Согласно полученным данным и в соответствии с предложенной моделью выраженный провоспалительный профиль в клетках эпителия шейки матки при хроническом цервиците при наличии вульвовагинита был в 62% случаев, при наличии нарушений в составе микробиоты влагалища - в 26% и в 45% случаев соответственно в 1а и 1б подгруппах. Результаты оценки воспалительной реакции представлены в таблице 30.

Таблица 30 Классификация мазков по наличию воспаления в подгруппах женщин с дисбиозами и в норме

		ИВ>59	ИВ<59
1a	вагинит	8/13 ( <b>62%</b> )	5/13 (38,5%)
подгруппа (n=52)	дисбиоз	7/27 ( <b>26%</b> )	20/27 (74,1%)
	нормоценоз	0/12	12/12 (100%)
16	вагинит	8/13 ( <b>62%</b> )	5/13 (38,5%)
подгруппа (n=56)	дисбиоз	9/20 ( <b>45%</b> )	11/20 (55%)
	нормоценоз	3/23 (13%)	20/23 (87%)
2б (контрольная подгруппа) (n=50)	нормоценоз	8/50 (16%)	42/50 ( <b>84%</b> )

# Использование модели для прогноза хронического течения воспалительного процесса

При ВПЧ-ассоциированном хроническом цервиците использование модели позволяет прогнозировать течение воспалительного процесса. Через 12 месяцев после первичного визита проведено повторное клиниколабораторное обследование 40 женщин с хроническим цервицитом, ассоциированным с ВПЧ, которые в период наблюдения не подвергалась деструктивным и эксцизионным методам лечения. В 12 из 13 случаев (92,3%) в динамике сохранился хронический воспалительный процесс при выраженном провоспалительном ответе в соответствии с предложенной моделью (ИВ>59 баллов) при первичном визите в сравнении с 14 из 27 случаев (51,9%) при ИВ≤59 (табл.31).

Таблица 31 Результаты пациентов через 12 месяцев динамического наблюдения в зависимости от значения ИВ на первом визите

Признаки хронического цервицита 2 визит	Значение ИВ>59, 1 визит	Значение ИВ≤59
XЦ (n=26)	12*	14
без признаков ХЦ (n=14)	1*	13

<sup>\*</sup>Относительный риск хронического течения воспалительного процесса

Согласно полученным результатам исследования относительный риск хронического течения воспалительного процесса при ВПЧ-ассоциированном цервиците увеличивается в 1,8 раза при значении ИВ>59 баллов (RR=1,8 (95% ДИ: 1,2-2,6, p=0,031).

#### Заключение

В качестве маркеров хронического цервицита могут рассматриваться мРНК гены *IFNAR1*, *IL1B*, *IL10*, *TNFA*, *TLR4*, *CD68*, *TGFB1* и *MMP9*. Повышение уровня экспрессии мРНК генов *CDKN2A/p16* в 1,8 раз при хроническом ВПЧ-ассоциированном цервиците, а также повышение уровня экспресии *CDKN2A/p16* и иммуносупрессорного *IL10* в 1,7 раз и 2,4 раза соотвественно при персистенции ПВИ может приводить к неадекватному иммунному ответу, дисбалансу нормальной и условно-патогенной флоры и способствовать длительной персистенции вируса, развитию дисплазии и рака шейки матки.

# 3.9 Результаты исследования метилирования гена WIF1

Оценка диагностической значимости метилирования промоторного участка гена *WIF1* в диагностике и развитии ВПЧ-ассоциированного хронического цервицита являлась следующей задачей нашего исследования.

Определение и оценка уровня гиперметилирования промоторного участка гена *WIF1* является диагностическим и прогностическим маркером раннего выявления и лечения ВПЧ-ассоциированных заболеваний шейки матки.

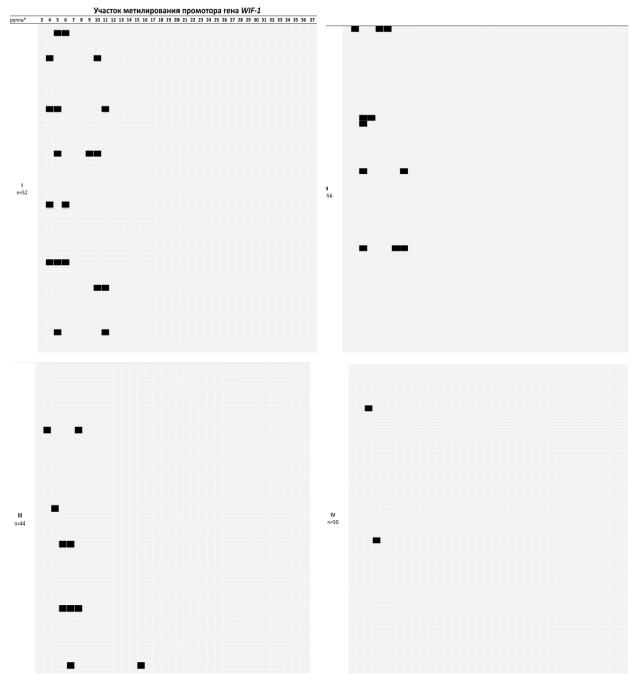


Рисунок 24. Результаты исследования метилирования WIF1.

О начальных этапах формирования дисплазии эпителия шейки матки может свидетельствовать появление сайтов гиперметилирования гена *WIF1* у пациентов с цитологическим заключением хронический цервицит.

По результатам нашего исследования, метилирование промоторной области гена *WIF1* при ВПЧ-ассоциированном хроническом цервиците не наблюдалось или было выражено слабо.

Уровень метилирования промоторной области гена *WIF1* между исследуемыми группами статистически значимо не отличался. Результаты секвенирования полученных образцов ДНК представлены на рисунке 24. Отсутствие гиперметилирования следует рассматривать как прогностический благоприятный признак течения заболевания.

## Заключение

Уровень метилирования промоторной области гена WIF1 исследуемых подгрупп статистически значимо не отличался (p>0,05).

# 3.10 Результаты обследования в динамике

С целью изучения естественного развития заболевания и оптимизации тактики ведения пациенток с ВПЧ-ассоциированным хроническим цервицитом проведено повторное клинико-лабораторное обследование 72 женщин 1a, 1б и 2a подгрупп через 12 месяцев после первичного визита. Из них: 40 (55,5%) пациенток 1a подгруппы, 22 (30,5%) - 1б подгруппы, 10 (13,9%) - 2a подгруппы. Исследуемые женщины в период наблюдения не подвергалась деструктивным и эксцизионным методам лечения.

Особый интерес представляют женщины 1a подгруппы с ВПЧассоциированным XЦ (n=40).

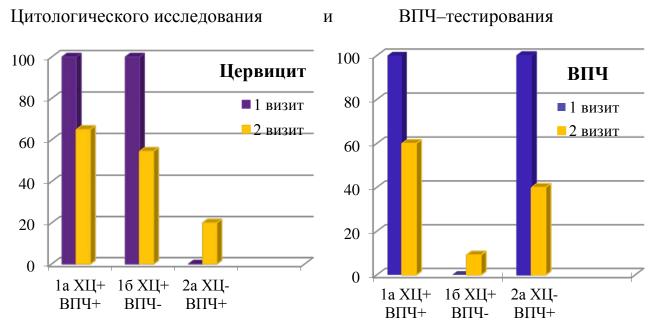


Рисунок 25. Сравнение 1а, 1б и 2а подгрупп на первом и повторном визите по результатам цитологического исследования и ВПЧ-тестирования.

По результатам обследования 40 женщин 1а подгруппы в динамике у 26 пациенток (65%) по результатам цитологического исследования верифицирован хронический цервицит, из них в 14 случаях (30%) – ассоциированный с ВПЧ (рис. 5). Средняя вирусная нагрузка в 1а подгруппе на втором визите составила 4,2 lg копий ДНК вируса в образце (межквартильный размах 2,7 - 6,4 lg). Самоэлиминация ВПЧ произошла в 16 случаях (40%), при этом у 8 пациенток (20%) были выявлены другие генотипы ВПЧ, что свидетельствует о реинфекции. В 2 случаях (5%) наблюдалось клиническо-лабораторное выздоровление и полная элиминация вируса.

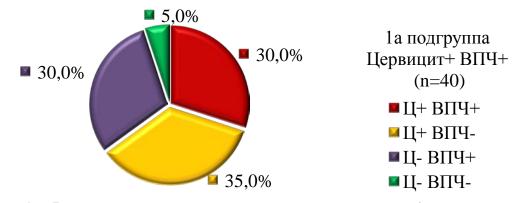


Рисунок 26. Результат повторного исследования женщин 1а подгруппы.

Обследование 22 (30,55%) пациенток 16 подгруппы через 12 месяцев показало, что в 54,5% (n=12) случаев диагноз хронический цервицит подтвердился повторно. В то время как в 45,5% (n=10) процентах случаев через год динамического наблюдения цитологических признаков хронического цервицита не выявлено. На повторном визите согласно результатам ВПЧ-тестирования на фоне хронического цервицита в 9,1% (n=2) случаев присоединилась ПВИ и впервые диагностирован хронический ВПЧ-ассоциированный цервицит.

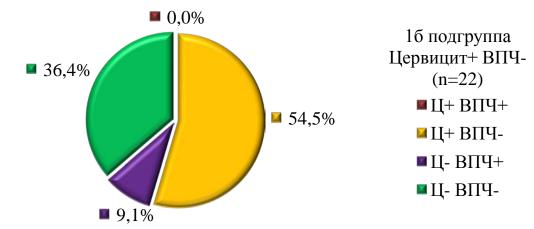


Рисунок 27. Результат повторного исследования женщин 16 подгруппы.

Среди 10 (13,9%) пациенток 2а подгруппы через 12 месяцев у 40% (n=4) женщин повторно определятся ВПЧ, в то время как у 60% (n=6) – произошла самоэлиминация вируса. В 20% (n=6) случаев после самоэлиминации ВПЧ появились цитологические признаки хронического цервицита.

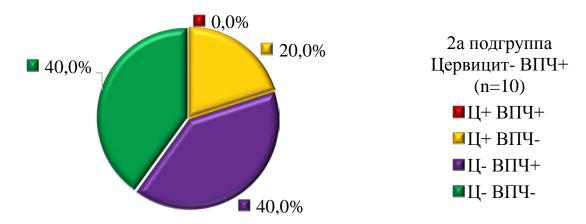


Рисунок 28. Результат повторного исследования женщин 2а подгруппы.

По результатам повторного исследования метилирования промоторной области гена WIF1 при ВПЧ-ассоциированном хроническом цевиците через 12 месяцев наблюдения 72 исследуемым женщин 1a, 1б и 2a подгрупп, не наблюдалось или было выражено слабо.

## Заключение

Результаты обследования пациенток 16 подгруппы, через 12 месяцев наблюдения показало, что на фоне хронического цервицита в 9,1% случаев присоединилась ПВИ.

По результатам повторного обследования женщин 2а подгруппы в 20% случаев после самоэлиминации ВПЧ появились цитологические признаки хронического цервицита.

Согласно результатам повторного обследования отмечено, что за 12 месячный период наблюдения прогрессии ВПЧ-ассоциированного хронического цервицита и развития дисплазии шейки матки не выявлено.

# ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

В последние годы во всем мире уделяется особое внимание ВПЧассоциированным заболеваниям шейки матки в связи с высоким риском Доказанная ВПЧ малигнизации поражений. значимая роль ВКР возникновении и развитии предрака и рака шейки матки определяет важность данной проблемы в медицинском и демографическом аспекте [24, 51, 131]. До настоящего времени остается достаточно высоким частота встречаемости хронических цервицитов как в России, так и за рубежом [70, 146, 182, 199]. Согласно утверждению, одного из ведущих экспертов в области исследований ВПЧ, профессора X. Bosch (Испания, Барселона, Каталонский институт онкологии) «ВПЧ патоген, отлично адаптированный к инфицированию эпителия, настолько распространен, что его можно рассматривать как практически неизбежный. Это агент, провоцирующий заболевание и являющийся социальной проблемой». Учитывая важность обозначенной проблемы, цель нашего исследования состояла в усовершенствовании тактики пациенток с хроническим цервицитом, ассоциированным папилломавирусной инфекцией у женщин репродуктивного возраста на основании анализа клинических, кольпоскопических, морфологических и молекулярно-генетических результатов обследования пациенток.

Высокий процент выявления ВПЧ-ВКР среди женщин с хроническим цервицитом, вызывает особый интерес исследователей, так как присутствие вируса является угрозой генетической стабильности и, согласно результатам ряда исследований, увеличивает вероятность возникновения трансформированных клеток [31, 77, 159, 176]. Этот факт послужил основанием для формулирования первой задачи нашего исследования – выявляемость хронического цервицита, ассоциированного изучить папилломавирусной инфекцией, у женщин репродуктивного возраста. По результатам исследования в структуре патологии шейки матки у каждой четвертой (25,7%) пациентки выявлен ВПЧ-ассоциированный цервицит. Ряд авторов продемонстрировали аналогичные результаты выявления ВПЧ-ассоциированного хронического цервицита в 15-40% случаев [31, 77, 159]. Так, согласно анализу цитологических мазков, представленному в исследовании Jahic M. (2016), ВПЧ-ассоциированный хронический цервицит диагностируется в 22% случаев [145].

Исследования многих авторов показали, что в преобладающем большинстве за развитие хронического цервицита ответственны ВПЧ высокого канцерогенного риска: 16, 33, 18, 31, 52, 53, 45 39, и 58 типы, наиболее распространенные в общей популяции [102, 129, 142, 178, 196]. Согласно результатам нашего исследования, наиболее часто в подгруппе женщин с ВПЧ-ассоциированным хроническим цервицитом были выявлены 16, 33, 35, 66, 18, 31, 68, 52, 51, 53, 45, 39, 44 и 58 типы. Остальные типы ВПЧ встречались менее чем в 5% случаев. При этом распространение генотипов ВПЧ при хронических цервицитах в нашем исследовании существенно не отличалось.

Полученные результаты совпадают с данными Zhao J. (2017), согласно которым наиболее часто при ВПЧ-ассоциированном хроническом цервиците выявляются ВПЧ 16, 58 и 52 типа [207]. По данным многочисленных публикаций наиболее распространенным генотипом среди женщин с ВПЧ-ассоциированным хроническим цервицитом и с нормальной цитологической картиной является ВПЧ 16 типа [98, 99, 100, 129, 207]. Согласно полученным нами результатам - ВПЧ 16 типа выявлялся у каждой третьей пациентки (28,8%).

В работе оценена роль вирусной нагрузки на развитие и исход хронического цервицита, проведен анализ встречаемости моно- и мультиинфицирования ВПЧ. По результатам отечественных и зарубежных исследований вирусная нагрузка и наличие нескольких типов ВПЧ играют существенную роль в развитии и прогрессировании патологии шейки матки, так как большое число копий генома вируса увеличивает вероятность интеграции вирусной ДНК в геном хозяина и определяют последующее

развитие патологии шейки матки [129, 139, 207]. Согласно результатам исследования Feng Y.K. (2015) наличие нескольких типов ВПЧ выявлялось среди женщин с ВПЧ-ассоциированным хроническим цервицитом в 23,1% случаев [129]. Как утверждают Hesselink A.T. et al. (2009) - вирусная нагрузка чувствительный, но не специфичный маркер [139]. Как полагают Snijders P. et al. (2003) вирусная нагрузка более 5,0 log является клинически значимой и определяет «порог» значения, ниже которого нет ассоцииации с прогрессией ВПЧ-инфекции [185]. Проведенный нами анализ показал, что у большинства пациенток с хроническим цервицитом выявлен один тип ВПЧ, в то время как у каждой пятой пациентки - два и более типа ВПЧ. Средняя вирусная нагрузка при ВПЧ-ассоциированном хроническом цервиците составила 4,9 log копий ДНК вируса. При этом по распространенности генотипов, вирусной нагрузке и показателю мультиинфицирования группа пациенток с хроническим цервицитом статистически значимо не отличалась от женщин с ВПЧ, но без признаков хронического воспаления. Полученные результаты соответствуют имеющимся данным, характерным для популяции Российских женщин. Соответственно, данные показатели ВПЧ-тестирования не могут быть использованы в качестве единственного маркера прогрессирования патологии шейки матки, ассоциированной с ПВИ. Результаты ВПЧ-тестирования должны рассматриваться в комплексе с данными других методов диагностики патологии шейки матки, таких как цитологическое исследование и расширенная кольпоскопия.

Согласно 3-й задаче исследования - определить качественный и количественный состав микробиоценоза влагалища у женщин с хроническим цервицитом, проанализированы результаты микроскопического исследования вагинальных мазков и комплексного исследования микробиоценоза влагалища с помощью тест-системы «Фемофлор 16». Слизистая оболочка шейки матки - естественный барьер на пути проникновения патогенных микроорганизмов и повреждающих агентов. Вместе с тем, в условиях хронического воспаления утрачивается функциональная целостность и

защитные свойства слизистой влагалища и шейки матки [151, 152]. Так, в работе Mirzaie-Kashani E. и соавт. (2014) показано, что частота инфицирования ВПЧ на фоне хронического цервицита составляет 98,7% [161]. Нами показано, что ВПЧ-ассоциированный хронический цервицит характеризуется воспалительными изменениями нижнего отдела гениталий, подтвержденными у большинства пациенток (73,3%) данными жидкостной цитологии и у каждой четвертой (26,7%) гистологическим методом исследования. Изменения процесса обмена веществ в тканях, повышение проницаемости и нарушение адекватного расположения рецепторов клеточных мембран формирует предпосылки к нарушению работы систем, регулирующих постоянство клеточного генома. Нарушения механизмов созревания, регуляции апоптоза клеток является проявлением генетической размножения и нестабильности - начального этапа онкогенеза. Связь между ВПЧ, развитием бактериального вагиноза и цервицита описана в исследовании Caixeta R.C. et al. (2015). Согласно данным авторов в ходе исследования 251 женщины – ВПЧ, бактериальный вагиноз и цервициты выявлены в 44,2%, 41% и 83,2% соответственно. Во всех случаях бактериальный вагиноз и цервицит были ассоциированы ВПЧ ВКР [102].

В связи с тем, что развитие хронических цервицитов зачастую обусловлено сложными взаимоотношениями микрофлоры влагалища и шейки матки (условно-патогенными аэробными и анаэробными микроорганизмам) с возбудителями ИППП (Chlamydia trachomatis, **Trichomonas** Mycoplasma genitalium) и грибами рода Candida spp., определение состава микробиоценоза методом ПЦР – PB («Фемофлор 16») имело ряд преимуществ и дополнило микробиологическое исследование. Исследование «Фемофлор 16» позволило идентифицировать и провести количественную оценку широкого спектра микроорганизмов, в том числе аэробов, часть которых трудно культивируема. Количественная оценка особенно важна обусловленном условно-патогенной микрофлорой, воспалении, когда заболевание индуцировано не столько присутствием возбудителя, сколько его количеством по отношению к общей бактериальной массе.

В работе рассмотрена роль биоценоза влагалища и шейки матки, и выполнена оценка состояния микробиоты урогенитального тракта от состояния абсолютного нормоценоза до выраженного дисбиоза - как фактора, оказывающего влияние на возникновение хронического цервицита. Умеренный выраженный или дисбиоз влагалища характеризуется нарушением разной степени соотношения нормо- и условно-патогенной общей бактериальной относительно массы. По результатам исследования состояние нормоценоза отмечено в 100 % случаев в контрольной группе, в то время как в 1а ВПЧ-позитивной и 1б ВПЧ-негативной подгруппах с хроническим цервицитом дисбиозы составляют 12% и 11% соответственно. У каждой второй (55,8%) пациентки хронический цервицит, ассоциированный с ВПЧ, сочетается с нарушениями микробиоценоза влагалища: бактериальным вагинозом, вульвовагинальным кандидозом, аэробным вагинитом И уреаплазменной инфекций. Полученные данные совпадают c представленными ранее данными Weijiao G. et al. (2013), согласно которым бактериальный вагиноз является благоприятным фактором присоединении и персистенции ВПЧ [194]. Также авторы утверждают, что микрофлора влагалища ВПЧ-позитивных женщин имеет более сложные ассоциации биологическое разнообразие, в отличие от микробиоценоза ВПЧ-негативных женщин (p<0,001). Подавление лактофлоры, нарушение соотношения аэробных анаэробных микроорганизмов приводит изменению функциональной активности эпителиоцитов и, как следствие, неадекватной реакции местного иммунного ответа, а продукция протеолитических ферментов патогенными И условно-патогенными микроорганизмами способствует дезинтеграции клеток и формированию благоприятных условий инфицирования эпителиальных клеток ВПЧ. Длительное повреждающее воздействие ВПЧ поддерживает хронический воспалительный процесс шейки матки. Представленными ранее данными совпадают с данные полученными нами, согласно которым бактериальный вагиноз статистически значимо чаще выявляется при ВПЧ-ассоциированном хроническом цервиците, по сравнению с подгруппой ВПЧ-положительных женщин без хронического цервицита (p=0,0277) и 26 контрольной подгруппой (p=0,0001).

ВПЧ-ассоциированный хронический цервицит приводит к значительным изменениям структуры микробиоты влагалища. Изучение структуры микробиоценоза влагалища пациенток с ВПЧ-ассоциированным хроническим обусловленные цервицитом выявило изменения, повышением микроорганизмов, ассоциированных с бактериальным вагинозом (Gardnerella vag., Eubacterium spp., Megashaera spp., Lachnobacterium spp., Atopobium vag.), аэробным вагинитом (Enterobacterium spp., Streptococcus spp.), Ureaplasma и Candida species. Дисбиоз влагалища может рассматриваться в качестве кофактора, инициирующего передачу ПВИ. ВПЧ-ассоциированный хронический цервицит наиболее часто сочетается с бактериальным вагинозом, вульвовагинальным кандидозом, аэробным вагинитом (46,1%, 30,8%, 13,5% соответственно). Полученные данные сопоставимы c полученными результатами Weijiao G. et al. (2013), согласно которым Gardnerella vag. выявлялась значительно чаще у ВПЧ-позитивных женщин [194]. По результатам микроскопии вагинальных мазков женщин, включенных исследование: в 11,9% случаев - выявлена кокковая микрофлора, в 7,9% гарднерела, в 7,4% – дрожжеподобные грибы рода *Candida* (спор и фрагментов псевдомицелия) и 1,5% случаев – энтерококки. Аналогичные результаты описаны в исследовании Gillet E. et al. (2012) [135].

Таким образом, дальнейшее изучение взаимосвязи микробиоты влагалища и ВПЧ, может пролить свет на биологическую восприимчивость к ВПЧ, а также состояние местного иммунитета, определяющего развитие ВПЧ-ассоциированной патологии шейки матки.

С целью определения факторов риска развития хронического цервицита, ассоциированного с ВПЧ, проведен клинико-анамнестический анализ полученных данных обследованных женщин, который показал, что

большинство исследуемых женщин - репродуктивного возраста (средний возраст 31,8±5,8 лет) и соматически не отягощены. Аналогичные результаты представлены в работе Nwachokor F.N. et al. (2013) [164].

Среди обследованных с хроническим цервицитом большинство пациенток (69,4%), включенных в исследование, жалоб не предъявляли. Анализ жалоб 30,6% пациенток свидетельствовал о том, что они не являются патогномичными обусловлены для хронического цервицита И сопутствующими признаками вульвовагинита, такими как обильные выделения и неприятный запах из половых путей беспокоившие женщин 1а и 16 подгрупп в 28,6% и 24,1% соответственно, зуд и жжение в области вульвы и влагалища в 20,4%, контактные кровотечения – 5,1%, диспареуния, дизурические расстройства – менее 5% случаев среди пациенток с хроническим цервицитом. Согласно результатам других авторов, хронический цервицит 25 - 48% случаев протекает бессимптомно, пациентки не предъявляют каких-либо жалоб, выделения из половых путей незначительные, гиперемия отсутствует [61, 67, 68].

Анализ сексуальной активности обследованных женщин - показал, что пациентки с ВПЧ-ассоциированным хроническим цервицитом раньше вступали в интимные отношения по сравнению с контрольной группой, при этом среднее число половых партнеров в анамнезе данной подгруппы было выше (3 и более раз), чем в группе контроля. Эти результаты согласуются с мнением ряда исследователей изучающих значимую роль в развитии ВПЧ-ассоциированных заболеваний шейки матки сопутствующих факторов риска [46, 70, 117, 128]. Так, аналогичные результаты исследования описаны в работе Cubie H.A. (2013), согласно которым число половых партнеров прямо пропорционально частоте инфицирования ВПЧ, так при присутствии одного полового партнера в жизни женщины ВПЧ выявляется в 17-21%, в то время как при наличии более 5 партнеров - в 69-83% случаев [117].

Анализ кольпоскопической картины хронического цервицита показал, что кольпоскопические признаки не специфические, но при этом, у каждой

третьей пациентки (33,3%) выявляются аномальные кольпоскопические изменения шейки матки, характерные для LSIL. Так, слабовыраженные шейки матки выявлены у 34,6%, выраженные эпителия изменения кольпоскопические изменения у 3,8% случаев с ВПЧ-ассоциированным хроническим цервицитом. При этом слабовыраженные кольпоскопические изменения статистически значимо чаще выявлялись в 1а подгруппе с ВПЧ ассоциированным хроническим цервицитом, по сравнению со 2а подгруппой ВПЧ-положительных женщин без хронического цервицита (p<0,001). Полученные результаты совпадают с результатами исследования Ryu K.J. et al. (2016) и мета-анализа, проведенного Olaniyan O.B. (2002), которые рассматривают расширенную кольпоскопию, как один из основных, высокоинформативных ВПЧ-ассоциированной методов диагностики патологии шейки матки [117, 166].

Результат морфологического исследования биоптатов шейки матки 47 обследованных пациенток: 15,3% женщины 1а и 2а подгруппы с ВПЧ-положительным тестом и 7,9% женщин с ВПЧ-отрицательным тестом 16 подгруппы, в 93,6% случаев подтвердил диагноз хронический цервицит, в 4,2% - LSIL и в 2,1% случаев - HSIL. Наши данные пересекаются с данными ряда авторов, исследования которых подтверждают необходимость проведения прицельной многофокусной биопсии шейки матки под контролем расширенной кольпоскопии при выявлении ВПЧ ВКР для своевременной диагностики патологии эпителия шейки матки ассоциированных с ПВИ [114, 115, 125, 137, 204].

Интересным в научном плане представляется изучение особенности транскрипционного профиля мРНК генов человека, регулирующих пролиферацию и клеточный цикл, апоптоз, рецепторный аппарат клеток, генов иммунной системы, матриксных металлопротеиназ и иммунитет при хроническом цервиците, ассоциированном с ВПЧ. Определение экспрессии мРНК генов иммунной системы в качестве маркеров воспаления, в комплексном клинико-лабораторного исследовании, позволит оценить риск

развития ВПЧ-ассоциированной патологии шейки матки и прогнозировать её течение. Клиническая определения экспрессии мРНК значимость функциональных заключается генов человека В возможности совершенствования диагностики и определения индивидуальной тактики ведения пациенток с хроническим цервицитом индивидуально в каждом конкретном случае.

Согласно результатам исследования транскрипционного профиля мРНК генов, связанных с ВПЧ и воспалительным процессом (генов регуляции клеточного цикла, апоптоза, иммунитета, матриксных металлопротеиназ) нам выявлены особенности экспрессии ряда мРНК генов иммунитета и неопластической трансформации, характерные для ВПЧ-ассоциированного хронического цервицита. По результатам исследования показано, что под влиянием ВПЧ повышается уровень экспрессии мРНК гена *CDKN2A/p16* (р=0,02) в соскобах из цервикального канала в 1,8 раза. Что согласуется с данными Bleutu C. et al. (2009) и Bergeron C. et al. (2015), показавших в своей работе, что уровень экспрессии *p16INK4a* коррелировал с цитологической степенью поражения шейки матки [91, 94].

Полученные результаты свидетельствуют также о том, что ВПЧ может оказывать иммуносупрессорное действие, опосредованное противовоспалительным *IL10*, уровень которого во 2а подгруппе ВПЧ-положительных женщин выше в 2,4 раза (p=0,01) по сравнению с контрольной. Иммунносупрессорное действие ВПЧ может формировать неадекватный провоспалительный иммунный ответ и способствовать развитию дисбиоза влагалищной микрофлоры, что в конечном итоге, является фактором риска длительной персистенции вируса и последующего развития дисплазии эпителия шейки матки. Возможно, что в 1а подгруппе пациенток с ВПЧ-ассоциированным хроническим цервицитом выраженные провоспалительные изменения не отмечены из-за подавления индукции иммунного ответа, как одного из механизмов «ускользания» вирусов от иммунного надзора. Ряд

исследований Kyrgiou M. et al. (2017) также показали аналогичные результаты изменения иммунных параметров влагалища включая цитокины/хемокины, популяции иммунных клеток, определяющих стойкое повышение уровней IL-8 и IL- $2\beta$ , IL- $1\alpha$  и развитие бактериального вагиноза на фоне ПВИ. Воспаление и дисбиоз, как утверждают авторы, являются благоприятным фактором развития патологии шейки матки, и позволяют отнести хронические предшествующим заболеваниям, цервициты интраэпителиальному поражению шейки матки [151, 152]. Аналогичные результаты получены в Bourmenskaya O. et al. (2014) посвященной исследованию транскрипционного профиля генов иммунной системы, таких как *IL-18*, *CD-* $T\Phi P-1\beta$ ,  $IL-12\alpha$ ,  $\Phi HO-\alpha$ , TLR-4, GATA-3, IL-8,  $IL-1\beta$ , IL-10, критерия интегрального оценки экспрессии использованию диагностике бактериального вагиноза и аэробного вагинита [97].

Отсутствие повышенной экспрессии мРНК генов иммунного ответа, выявленных при хроническом цервиците, вероятно, является особенностью ВПЧ-ассоциированного хронического цервицита. Так, хронический цервицит в отсутствии ВПЧ в 16 подгруппе сопровождается повышением уровня экспрессии мРНК генов иммунитета IFNAR1, IL1B, IL10, TNFA, TLR4, CD68, TGFB1 и провоспалительной матриксной металлопротеиназы 9 (MMP9) от 1,5 до 2,9 раз (p=0,03). В данной подгруппе уровень экспрессии IL10 также повышен, что связано с формированием компенсаторных механизмов регуляции чрезмерного провоспалительного ответа.

По нашему мнению, выявленный в результате исследования дисбаланс экспрессии мРНК генов, регулирующих иммунный ответ и воспалительное ремоделирование ткани, а также каскадная активация факторов иммунитета, свидетельствует об изменении ключевых фаз воспалительной реакции, способствующих хронизации процесса. Таким образом, повышение уровня экспрессии мРНК генов *IFNAR1*, *IL1B*, *IL10*, *TNFA*, *TLR4*, *CD68*, *TGFB1* и

*ММР9* практически в три раза может рассматриваться в качестве фактора, сопровождающего воспалительный процесс.

Проанализировав результаты исследования выявлены различия уровня экспрессии мРНК функциональных генов человека в эпителии шейки матки женщин 1а подгруппы с хроническим цервицитом, ассоциированным с ВПЧ и 2б контрольной подгруппой здоровых женщин. C точки зрения прогнозирования течения ВПЧ-ассоциированной патологии шейки матки для нас также представляли интерес ВПЧ-позитивные пациентки 2а подгруппы без признаков хронического цервицита. Учитывая это пациенток 1а и 2а подгрупп, мы обследовали в динамике через 12 месяцев. Согласно результатам повторного исследования установлено, что за 12 месячный период наблюдения прогрессии ВПЧ-ассоциированного хронического цервицита и развития дисплазии и рака шейки матки не выявлено. В тоже время за период наблюдения на фоне ВПЧ среди пациенток 2а подгруппы отмечено развитие хронического цервицита. Из этого следует, что ВПЧ – фактор, влияющий на развитие хронического цервицита. И наоборот, согласно результатам повторного обследования женщин 16 подгруппы - через 12 месяцев наблюдения на фоне хронического цервицита в 9,1% случаев присоединилась ПВИ. Данные результаты позволяют утверждать, что наличие хронического является благоприятным фактором инфицирования Аналогичные результаты обследования пациенток через 6 месяцев описаны в исследовании Jahic M. et al. (2012). Согласно данным повторного обследования женщин с ВПЧ и хроническим цервицитом через 6 месяцев 85,7% наблюдения случаев получены нормальные результаты цитологического исследования [144].

Механизм метилирования генов в последние годы активно изучается при злокачественных новообразованиях различной локализации. Определение статуса метилирования генов может использоваться в качестве ранней доклинической диагностики и прогнозирования развития рака и мониторинга эффективности лечения. Это послужило основанием при определении

следующей задачи нашего исследования - определить статус метилирования промоторного участка гена *WIF1* при ВПЧ-ассоциированном хроническом цервиците. Нами впервые в России изучен статус метилирования гена промоторного участка гена *WIF1* пациенток с ВПЧ-ассоциированным хроническим цервицитом.

Согласно результатам исследования - гиперметилирования промоторной области гена *WIF1* у пациенток с ВПЧ-ассоциированным ХЦ не наблюдается. Отсутствие или слабое проявление аномального гиперметилирования расцениваться, как благоприятный прогностический признак в отношении прогрессии заболевания шейки матки и канцерогенеза, в то время как появления сайтов гиперметилирования в промоторной части гена *WIF1* у ВПЧ-позитивных женщин с нормальной цитологической картиной свидетельствует о начале формирования неоплазии эпителия шейки матки. Наши результаты не противоречат данным других исследователей (Van Der Meide et al., 2011; Ramachandran I. et al., 2012) показывающих статистически значимую корреляцию между гиперметилирование гена WIF1 и развитием дисплазии и рака шейки матки (р<0,05) [174, 192].

Полученные результаты свидетельствуют о необходимости внедрения в клиническую практику определения уровня метилирования гена *WIF1* в качестве неинвазивного маркера при ВПЧ-ассоциированном хроническом цервиците, при расхождении результатов, полученных другими методами исследования, позволяющего прогнозировать развитие предрака и рака шейки матки.

Таким образом, базируясь литературы, диагностика на данных комплексной хронического цервицита должна быть (цитологическое исследование, ВПЧ-тестирование, расширенная кольпоскопия, исследование микробиоценоза влагалища) и направлена на выявление этиологии воспаления для предупреждения развития рецидивов и осложнений заболевания. С этой целью и в качестве контроля лечения показано в динамике раз в 12 месяцев проведение цитологического исследования, ВПЧ-тестирования, комплексного исследования микробиоценоза влагалища и расширенной кольпоскопии. Подобная тактика ведения позволит уменьшить частоту неадекватных травмирующих шейку матки вмешательств и обосновать возможность применения щадящих воздействий в отношении пациенток репродуктивного возраста с ВПЧ ассоциированным хроническим цервицитом.

## **ВЫВОДЫ**

- 1. ВПЧ-ассоциированный хронический цервицит в структуре патологии шейки матки выявлен у 52 (25,7%) женщин репродуктивного возраста (по обращаемости). У большинства пациенток (73,1%) диагноз хронический цервицит подтвержден данными жидкостной цитологии; у каждой четвертой пациентки (26,9%) верифицирован морфологическим методом исследования.
- 2. При ВПЧ-ассоциированном хроническом цервиците доминирующими являются 16 (28,8%), 33 (13,5%) и 35 (13,5%) типы ВПЧ. Один тип ВПЧ выявлен у большинства женщин (71,2%), два и более у каждой пятой пациентки (21,1%). Средняя вирусная нагрузка в 1а и 2а подгруппах статистически не отличается и составляет 4,9 log копий ДНК вируса (р>0,05).
- 3. У ВПЧ-ассоциированным каждой второй пациентки хроническим цервицитом выявляются нарушения микробиоценоза влагалища: (30,8%),уреаплазменная бактериальный вагиноз инфекция (19,2%),вульвовагинальный кандидоз (7,7%), микст-инфекция (42,3%). Последняя представлена сочетанием кандидозной и уреаплазменной инфекцией, а также облигатно-анаэробных и факультативно-анаэробных микрооргнизмов.
- 4. У каждой третьей пациентки хронический цервицит сопровождается кольпоскопическими изменениями шейки матки: множественные наботовы кисты (59,2%), гипертрофия (57,4%), деформация шейки матки (53,7%), признаки воспаления (26,9%). Кольпоскопические признаки ВПЧ – ассоциированного хронического цервицита являются не специфичными, не подтверждаются результатами цитологического морфологического методов исследования и не могут быть использованы в качестве определяющего метода диагностики патологии шейки матки.
- 5. ВПЧ-ассоциированный хронический цервицит характеризуется повышением уровней экспрессии мРНК гена *CDKN2A/p16* в 1,8 раз (p=0,02). Повышение уровня экспрессии мРНК генов *CDKN2A/p16* в 1,7 раз (p=0,03) и

иммунорегуляторного цитокина IL10 в 2,4 раза (p=0,01). Папилломавирусная инфекция определяет подавление местного иммунитета и способствует нарушению микробиоценоза влагалища. Повышение уровня экспрессии мРНК генов IFNAR1, IL10,  $IL1\beta$ ,  $TNF\alpha$ , TLR4, CD68, TGFB1 и MMP9 (p<0,05) может расцениваться в качестве маркеров хронического цервицита.

- 6. Установлены прямые корреляционные связи экспрессии матриксных металлопротеиназ (*MMP8*, *MMP9*) и иммунных маркеров воспаления (*TNFα*, *IL1β*, *TLR4*, *CD68*, *IFNAR1*, *IL10*, *IL1RN*, *TGFB1*), как следствие каскадной активации иммунокомпетентных клеток, на фоне снижения чувствительности ткани к действию прогестерона и EGF.
- 7. У пациенток с ВПЧ-ассоциированным хроническим цервицитом отмечается отсутствие или слабое проявление аномального гиперметилирования промоторной области гена *WIF1*, что свидетельствует об отсутствии риска прогрессирования заболевания.
- 8. Разработана диагностическая модель расчета ИВ для определения локального воспалительного процесса шейки матки, учитывающая уровень экспрессии 4 маркеров: *IL10, IL1β, TNFα* и *CD68*. При ВПЧ-ассоциированном хроническом цервиците использование модели позволяет прогнозировать течение воспалительного процесса. Риск хронического течения воспалительного процесса увеличивается в 1,8 раз при значении ИВ>59 баллов.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

- 1. При ВПЧ-ассоциированном хроническом цервиците целесообразно проведение комплексного исследования микробиоценоза влагалища методом ПЦР-РВ и микроскопического исследования вагинального мазка для выявления сопутствующих генитальных инфекций. Необходимо проведение этиотропной терапии в зависимости от выявленных возбудителей согласно клиническим рекомендациям.
- 2. Пациенткам с ВПЧ-ассоциированным хроническом цервиците следует проводить расширенную кольпоскопию. При выявлении аномальных кольпоскопических изменений целесообразно определение неинвазивным методом экспрессии мРНК генов (*IL10*, *IL1β*, *TNFα и CD68*) и метилирования гена *WIF1*. Отсутствие или слабое метилирование промоторного участка гена *WIF1* и низкий уровень представленности мРНК генов *IL10*, *IL1β*, *TNFα* и *CD68* (ИВ<59 баллов) позволяет выбрать тактику динамического наблюдения за женщинами в течение 12 месяцев.
- 3. сайтов При выявлении аномальных гиперметилирования промоторного участка гена WIF1 и/или повышение уровня представленности мРНК генов *IL10*, *IL1\beta*, *TNF\alpha* и *CD68* (ИВ>59 баллов) необходимо проведение прицельной биопсии шейки матки и выскабливания цервикального канала (по с последующей гистологической верификацией диагноза. показаниям) Дальнейшая тактика ведения пациентки зависит OT результатов гистологического согласно метода исследования клиническим рекомендациям.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АБЭ – ацетобелый эпителий

БШМ – биопсия шейки матки

ВАК – высшая аттестационная комиссия

ВОЗ - Всемирная организация здравоохранения

ВИЧ – вирус иммунодефицита человека

ВПЧ – вирус папилломы человека

ВПЧ ВКР - вирус папилломы человека высокого канцерогенного риска

ДИ – доверительный интервал

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ЖЦ – жидкостная цитология

3Т – зона трансформации

ИГХ – иммуногистохимический метод

ИМТ – индекс массы тела

ИППП – инфекции, передаваемые половым путем

ИЦХ – иммуноцитохимический метод

мРНК – микро рибонуклеиновая кислота

НМИЦ АГП - Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии

НПО - научно-поликлиническое отделение

ОБМ – общая бактериальная масса

ОТ-ПЦР – обратная транскрипционная и полимеразная цепная реакция

Пап-тест – цитологический тест по Папаниколау

ПВИ – папилломавирусная инфекция

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПЦР – РВ – полимеразная цепная реакция в режиме реального времени

РАН - Российская академия наук

РДВ - раздельное диагностическое выскабливание

РКС – расширенная кольпоскопия

РФ – Российская Федерация

РШМ – рак шейки матки

США – Соединенные Штаты Америки

ФГБУ – Федеральное государственное бюджетное учреждение

ХЦ – хронический цервицит

CIN – Cervical Intraepithelial Neoplasia (цервикальная интраэпителиальная неоплазия)

CMV - Cytomegalovirus (ЦМВИ - цитомегаловирусная инфекция)

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

LEEP - loop electrosurgical excision procedure (процедура петлевой электрохирургической эксцизии)

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

NILM – negative for intraepithelial lesion or malignancy

ROC - Receiver Operator Characteristic (операционная характеристика надежности)

SIL – squamous intraepithelial lesions (плоскоклеточные интраэпителиальные поражения)

TBS – Terminology Bethesda System (терминологическая цитологическая классификация состояния эпителия шейки матки Бетесда)

WIF1 – Wnt-Inhibitory Factor-1 (Wnt-ингибиторный фактор 1)

## Маркеры

KI67 - Marker of proliferation Ki-67 - маркер пролиферации Ki-67

CCND1 - Cyclin D1 - циклин D1

CDKN2A (P16) - Cyclin dependent kinase inhibitor 2A — ингибитор циклинзависимой киназы 2A

BCL2 - BCL2 apoptosis regulator - регулятор апоптоза BCL2

PGR – Progesterone receptor - рецептор прогестерона

*CD68 – CD68 molecule -* молекулы *CD68* 

IFNAR1 - Interferon alpha and beta receptor subunit 1 - интерферон альфа- и бета-субъединицы рецептора 1

EGFR - Epidermal growth factor receptor - рецептор эпидермального фактора роста

IL1B – Interleukin 1 beta - интерлейкин 1 бета

IL1RN - Interleukin 1 receptor antagonist -антагонист рецептора интерлейкина 1

*IL10* - interleukin 10 - интерлейкин 10

*IL18* - Interleukin 18 - интерлейкин 18

TNFA – Tumor necrosis factor - фактор некроза опухолей

GATA3 - GATA binding protein 3 - гата связывающий белок 3

TLR4 - Toll like receptor 4 - толл подобный рецептор 4

TGFB1 - transforming growth factor beta 1 - трансформирующий фактор роста бета 1

CXCL5 - C-X-C motif chemokine ligand 13 - C-X-C тип хемокин лиганд 5

*CXCL10* - C-X-C motif chemokine ligand 13 - C-X-C тип хемокин лиганд 10

*CXCL13* - C-X-C motif chemokine ligand 13 - C-X-C тип хемокин лиганд 13

MMP8 - Matrix metallopeptidase 8 - матричная металлопептидаза 8

MMP9 - Matrix metallopeptidase 8 - матричная металлопептидаза 9

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Абрамовских О.С. Функциональная активность нейтрофилов и уровень цитокинов цервикальной слизи при ВПЧ-ассоциированной патологии шейки матки / О.С. Абрамовских // Иммунология. 2011.– №3.– С.143.
- 2. Абрамовских О.С. Микробный пейзаж репродуктивного тракта женщин с папилломавирусной инфекцией / О.С. Абрамовских, К.А. Алехина, А.Ю. Савочкина // Вестн. Челябинского государственного университета. 2013.- 7.- С.46-7.
- 3. Амирханян А.С. Хронический цервицит, ассоциированный с вирусом папилломы человека и маркеры воспаления у женщин репродуктивного возраста / А.С. Амирханян, Г.Р. Байрамова, В.И. Киселев, В.Н. Прилепская, А.А. Полозников, О.В. Бурменская, И.О. Бабкина, А.В. Асатурова // Акушерство и гинекология. 2019.- 4.- С.49-57.
- 4. Амирханян А.С. Хронический цервицит: современные возможности диагностики и лечения / А.С. Амирханян, В.Н. Прилепская, Г.Р. Байрамова, О.В. Бурменская, М.Н. Костава, А.В. Асатурова // Акушерство и гинекология. 2018.- 4.- С.22-7.
- 5. Антонов В.Г. Патогенез онкологических заболеваний. Цитоплазматические и молекулярно-генетические механизмы иммунной резистентности малигнизированных клеток / В.Г. Антонов, В.К. Козлов // Цитокины и воспаление, 2004. – Т. 3. – С.23-33.
- 6. Апгар Б.С. Клиническая кольпоскопия / Б.С. Апгар, Г.Л. Броцман, М. Шпицер // Пер. с англ. М.: Практическая медицина; 2012. 106с.
- 7. Ашрафян Л.А. Опухоли репродуктивных органов (этиология и патогенез) / Л.А. Ашрафян, В.И. Киселев // М.: Издательство «Димитрейд График Групп».- 2008.— С.216.
- Байрамова Г.Р. Рецидивирующий вульвовагинальный кандидоз: клиника, диагностика, лечение / Г.Р. Байрамова // Автореф. дис. ... докт. мед. наук. М.- 2013.- С.46.

- Байрамова Г.Р. Современные возможности ранней диагностики плоскоклеточных интраэпителиальных неоплазий шейки матки / Г.Р. Байрамова, А.С. Амирханян // Opinion Leader. Гинекология.- 2018.- №1(2).- С.28-32.
- Байрамова Г.Р. Хронический цервицит, ассоциированный с папилломавирусной инфекцией: диагностика и тактика ведения пациенток / Г.Р. Байрамова, А.С. Амирханян, И.И. Баранов, О.В. Бурменская, Е.А. Калинина, Т.В. Припутневич, М.Ю. Бобров, Е.С. Буняева // Доктор.Ру. 2017.- № 3 (132).- С.66–72.
- 11. Байрамова Г.Р. Заболевания нижних отделов гениталий, ассоциированные с папилломавирусной инфекцией: радикальное лечение или иммунотерапия / Г.Р. Байрамова, А.С. Амирханян, И.И. Баранов, К.Н. Арсланян, В.Ф. Чернова // Вестник ферона. 2018.- №1.- С.12-17.
- 12. Байрамова Г.Р. ВПЧ, ко-инфекция и плоскоклеточные интраэпителиальные поражения шейки матки: поиски взаимосвязи / Г.Р. Байрамова, А.С. Амирханян, М.Н. Костава, О.В. Бурменская // Медицинский аппонент. 2019.- №1.- С.59-64.
- Байрамова Г.Р. Вульвовагинальный кандидоз: патогенез, диагностика и тактика лечения / Г.Р. Байрамова, А.С. Амирханян, В.Ф. Чернова // Доктор.Ру. 2018.- № 10(154).- С.32–36.
- 14. Байрамова Г.Р. Заболевания нижних отделов гениталий, ассоциированные с папилломавирусной инфекцией: радикальное лечение или иммунотерапия? / Г.Р. Байрамова, И.И. Баранов, К.Н. Арсланян, А.С. Амирханян, В.Ф. Чернова // Акушерство и гинекология.— 2017.- №4.- С.13-19.
- 15. Байрамова Г.Р. Плоскоклеточные интраэпителиальные поражения шейки матки: возможности ранней диагностики и тактики ведения / Г.Р. Байрамова, И.И. Баранов, Л.С. Ежова, Д.Ю. Трофимов, Т.В. Припутневич, А.С. Амирханян, А.М. Старинская // Доктор.Ру. -2019.-№ 9(132).-С.66-72.

- 16. Байрамова Г.Р. Скрининг рака шейки матки: что нового в мировой практике / Г.Р. Байрамова, Л.З. Файзуллин, А.И. Королькова, А.А. Полозников, В.И. Киселев // Акушерство и гинекология.- 2016.-7.- 17–21.
- 17. Бебнева Т.Н. Патогенетическое лечение неопластических процессов шейки матки: новые подходы / Т.Н. Бебнева, Е.Л. Муйжнек, С.И. Роговская, В.И. Киселёв, Л.А. Ашрафян//Доктор.Ру.-2016.-3(120).-С.9-14.
- 18. Бебнева Т.Н. Цервициты нерешенная проблема гинекологии / Т.Н. Бебнева, М.Р. Оразов, И.Н. Костин // Доктор.Ру. 2018.- 6 (150).- С.34–39.
- Берлев И.В. Значение оценки нарушений микробиоценоза влагалища в аспекте диагностики и лечения преинвазивных неоплазий шейки матки / И.В. Берлев, Е.В. Бахидзе, П.А. Архангельская // Журнал акушерства и женских болезней. 2015.- Том 64.- №5.- С.16–21.
- Бойко И.В. Клинические особенности хронического цервицита, ассоциированного с ВПЧ-инфекцией / И.В. Бойко, О.С. Абрамовская, А.Н. Ахматова // Акушерство. Гинекология. - 2008. - №2(42). - С.20-23.
- 21. Бокач О.М. Особенности микробных ассоциаций влагалища у женщин с хроническим цервицитом, инфицированных вирусом папилломы человека / О.М. Бокач, П.А.Савинов, Л.Х. Джемлиханова // Институт инновационных технологий. 2017.03.25.- С.8-11.
- 22. Ворошилина Е.С. Биоценоз влагалища с точки зрения количественной ПЦР: что есть норма? / Е.С. Ворошилина, Л.В. Тумбинская, А.Е. Донников и др. // Акушерство и гинекология. 2011.- 1.- С.57-65.
- 23. Воспалительные заболевания нижних отделов генитального тракта: диалог гинеколога и микробиолога. XVII Всероссийский научнообразовательный форум «Мать и дитя» / Эффективная фармакотерапия. 2017.- 13.- C.26-33.
- 24. Гинекология: национальное руководство / под ред. Г.М. Савельевой, Г.Т. Сухих, И.Б. Манухина, В.Е. Радзинского // 2-е изд., перераб. и доп. М.-ГЭОТАР-Медиа. 2017.- 1048с.

- 25. Грибова С.Н. Состояние локальной иммунной системы шейки матки при хроническом неспецифическом цервиците у женщин репродуктивного возраста / С.Н. Грибова, Н.Б. Захарова, Н.Ф. Хворостухина, Ю.В. Михеева // Современные проблемы науки и образования. 2015. № 4.- С.362.
- 26. Долгушин И.И. Содержание цитокинов в цервикальной слизи женщин с хроническим цервицитом, ассоциированным с папилломавирусной инфекцией, в зависимости от вирусной нагрузки / И.И. Долгушин, В.Ф. Долгушина, Л.Ф. Терешева, О.С. Абрамовских, М.А. Зотова, А.Н. Ахматова // Цитокины и воспаление. 2010.- Т.9.- №4.- С.20–22.
- 27. Долгушина В.Ф. Распространенность различных генотипов вируса папилломы человека при патологии шейки матки / И.И. Долгушин, В.Ф. Долгушина, Л.Ф. Терешева, О.С. Абрамовских, М.А. Зотова, А.Н. Ахматова // Акушерство и гинекология. 2011.– № 4.– С.69-74.
- 28. Долгушина В.Ф. Персистенция папилломавирусной инфекции у женщин с хроническим цервицитом / В.Ф. Долгушина, А.Н. Ахматова, О.С. Абрамовских // Уральский медицинский журнал. 2010.- 3(68).- С.91-4.
- 29. Евдокимов В.И. Подготовка медицинской научной работы / В.И. Евдокимов // Методическое пособие. СПб. СпецЛит. 2005.- С.190.
- 30. Ершов В.А. Механизм развития неоплазии при поражении эпителия шейки матки вирусом папилломы человека высокого канцерогенного риска / В.А. Ершов // Инфекция и иммунитет. -2014.-Т.4.-№ 2.-С.167–172.
- 31. Заболевания шейки матки и генитальные инфекции / под ред. В.Н. Прилепской // М.: ГЭОТАР-Медиа, 2016. 384c.
- 32. Зайцев В.М. Прикладная медицинская статистика / В.М. Зайцев, В.Г. Лифляндский, В.И. Маринкин // СПб. ООО «Издательство ФОЛИАНТ».- 2003.- С.432.
- 33. Злокачественные новообразования в России в 2017 году (заболеваемость и смертность) / под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой

- // М.: МНИОИ им. П.А. Герцена филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России. 2018.
- 34. Каприн А.Д. Скрининг рака шейки матки нерешенные проблемы / А.Д. Каприн, Е.Г. Новикова, О.И. Трушина, О.П. Грецова // Исследования и практика в медицине. 2015.- т.2.- №1.- С.36-41.
- 35. Каприн А.Д. Состояние онкологической помощи населению России в 2018 году / А.Д. Каприн, В.В. Старинский, Г.В. Петрова // М.: МНИОИ им. П.А. Герцена филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России. 2019.- илл.- 236с.
- 36. Качалина О.В. Выбор рациональной тактики ведения пациенток при ВПЧ-ассоциированном цервиците в репродуктивном возрасте / О.В. Качалина // Медицинский альманах. 2012. №5. С.81-85.
- 37. Качалина Т.С. Хронический цервицит и ВПЧ-инфекция в репродуктивном возрасте. Пути снижения диагностической и лечебной агрессии / Т.С. Качалина, Н.М. Шахова, О.В. Качалина, Д.Д. Елисеева // Акушерство, гинекология и репродукция. 2012.- 4.- С.6–12.
- 38. Кетлинский С.А. Цитокины / С.А. Кетлинский, А.С. Симбирцев // СПб. OOO «Издательство ФОЛИАНТ».- 2008.– 550с.
- 39. Кира Е.Ф. Оптимизация скрининга инфекций влагалища, ассоциированных с вирусами папилломы человека / Е.Ф. Кира, К.Е. Семенова, М.В. Боброва, А.А. Белякова, Н.А. Гасилова // Акушерство и гинекология. 2018.- 8.- С.167-73.
- 40. Киселев В.И. Молекулярные механизмы развития дисплазии шейки матки / В.И. Киселев, Е.Л. Муйжнек // Вестник «Лаборатории ДНК-диагностики». 2011.- №4(13).– С.1-16.
- 41. Климов Е.А. Интеграция вирусов папилломы человека в геном клетки хозяина и патогенез рака шейки матки / Е.А. Климов // Успехи современной биологии. 20.- Т.130. -№4.- С.381-389.

- 42. Клиническая кольпоскопия: практическое руководство / Б.С. Апгар, Г.Л. Броцман, М. Шпицер; пер. с англ. под ред. В.Н. Прилепской, Т.Н. Бебневой М. // Практическая медицина. 2014.- 384с.
- 43. Клинические рекомендации. Акушерство и гинекология (спецвыпуск) / под ред. Л.В. Адамян, В.Н. Серова, Г.Т. Сухих, О.С. Филиппова // Проблемы репродукции. Т.23.- №6.- М.- МЕДИА-СФЕРА.- 2017.- 700 с..- С.273-700.
- 44. Клинышкова Т.В. Результаты генотипирования при ВПЧассоциированном цервиците / Т.В. Клинышкова, М.С. Буян // Гинекология. – 2016.- 18(3).- С.16–19.
- 45. Корита П.В. Молекулярные основы онкогенеза, индуцированного вирусами папилломы человека / П.В. Корита, О.Е. Троценко, А.Ю. Анненкова, В.В. Филимонов // Вопросы онкологии. 2012.- Т.58.- №5.- С.598-605.
- 46. Костин А.А. Анализ статистических данных о злокачественных новообразованиях, ассоциированных с вирусом папилломы человека / А.А. Костин, В.В. Старинский, Ю.В. Самсонов, А.Т. Асратов // Исследования и практика в медицине. 2016. Том 3.№1. С.66–78.
- 47. Краснопольский В.И. Цервикальные интраэпителиальные неоплазии (диагностика, лечение, профилактика) / В.И. Краснопольский, Л.С. Логутова, Н.В. Зароченцева, Л.К. Джаджихия // Учебное пособие. М.: Политехника-Сервис. 2015.- 71с.
- 48. Летяева О.И. Оппортунистические инфекции гениталий и папилломавирусная инфекция: новые возможности иммуномодулирующей терапии / О.И. Летяева, О.С. Абрамовских, О.А. Гизингер // Акушерство и гинекология. 2011.– № 6.– С.108-112.
- 49. Любасовская Л.А. Опыт применения женских гигиенических средств, содержащих пробиотический штамм Lactobacillus acidophilus, у женщин репродуктивного возраста и в постменопаузе для профилактики оппортунистических инфекций влагалища / Л.А. Любасовская, А.Р.

- Мелкумян, Д.В. Дубоделов, Ю.В. Родченко, В.В. Муравьева, А.П. Кондрахин, Г.Б. Майкова, А.С. Амирханян, Н.В. Николаева, Г.Р. Байрамова, Т.В. Припутневич // Акушерство и гинекология. 2018.- 9.- С.126-31.
- 50. Мальцева Л.И. Генитальные кондиломы у женщин: факты и противоречия / Л.И. Мальцева, Л.Н. Фаррахова // Рос. вестн. акушерагинеколога. 2012.- 2.- С.78–80.
- 51. Мальцева Л.И. Оценка ВПЧ-ассоциированного хронического цервицита как фактора риска развития рака шейки матки / Л.И. Мальцева, Л.Н. Фаррахова, А.В. Ахметзянова, Н.А. Нигматуллина // Практ. медицина. 2012.- 9(65).- С.73–6.
- 52. Масюкова С.А. Изучение статуса метилирования гена WIF1 при ВПЧ-ассоциированных доброкачественных образованиях кожи и слизистых оболочек / С.А. Масюкова, В.И. Киселев, Н.Н. Потекаев, Н.М. Назарова, А.А. Полозников, И.О. Бабкина, С.Н. Ахтямов, Э.Н. Тарасенко // Клиническая дерматология и венерология. 2017.- 16(4).- С.38-43.
- 53. Меджидова М.К. Оценка локальной воспалительной реакции во влагалище по профилю экспрессии МРНК генов цитокинов у беременных накануне родов / М.К. Меджидова, О.В. Бурменская, А.Е. Донников, О.С. Нешпа, Д.Ю. Трофимов, Н.М. Касабулатов, В.Л. Тютюнник, Г.Т. Сухих // Акушерство и гинекология. 2012.- 3.- С.26–32.
- 54. Мингалёва Н.В. Сравнительный анализ характеристик хронического цервицита шейки матки у женщин репродуктивного возраста / Н.В. Мингалёва, Ю.Г. Абрамашвили, Н.С. Метелёва // Кубанский научный медицинский вестник. 2015.- 6.- С.82-89.
- 55. Национальное руководство по гинекологии / под ред. Г.М. Савельевой, Г.Т. Сухих, В.Н. Серова, В.Е. Радзинского и др. // М.: ГЭОТАР-Медиа. 2017.- 989с.

- 56. Нарвская О.В. Вирус папилломы человека. Эпидемиология, лабораторная диагностика и профилактика папилломавирусной инфекции. Инфекция и иммунитет. 2011 Т.1, № 1. С.15-22.
- 57. Орехова Е.К. Современные возможности папилломавирусной инфекции: обзор мировых исследований / Е.К. Орехова, А.Р. Хачатурян // Журн. акуш. и женских бол. 2014.- Т.LXII.- вып.3.- С.82–88.
- 58. Пестрикова Т.Ю. Чувствительность патогенной микрофлоры цервикального канала к антибактериальным препаратам у пациенток с хроническим цервицитом и вирусом папилломы человека / Т.Ю. Пестрикова, Ю.О. Панфилова // Гинекология. 2015.- 17(1).- С.18–21.
- 59. Прилепская В.Н. Клинические рекомендации по диагностике и лечению заболеваний, сопровождающихся патологическими выделениями из половых путей женщин / под ред. В.Н. Прилепская, Е.Ф. Кира и др. // Издание 2-е, исправленное и дополненное. Российское общество акушеров-гинекологов. -2019.- 56с.
  - 60. Прилепская В.Н. Современные возможности кольпоскопии в комплексной диагностике плоскоклеточных интраэпителиальных поражений шейки матки / В.Н. Прилепская, Г.Р. Байрамова, Н.В. Зароченцева, З.Н. Эфендиева, А.С. Амирханян // Акушерство и гинекология. 2018.- 3.- С.146-1499.
  - 61. Прилепская В.Н. Новые возможности ранней диагностики и профилактики ВПЧ-ассоциированных поражений шейки матки / В.Н. Прилепская, Г.Р. Байрамова, Е.А. Коган // Мед. совет.— 2015.-20.-С.72—76.
  - 62. Прилепская В.Н. Иммунологические и молекулярно-биологические маркеры, ассоциированные с хроническим цервицитом (обзор литературы) / В.Н. Прилепская, М.Н. Назарова, Е.П. Новикова, Д.Ю. Трофимов, О.В. Бурменская, О.С. Безнощенко // Гинекология. 2013.- № 3.– С.46-51.

- 63. ПЦР «в реальном времени» / под ред. Д.В. Ребриков, Г.А. Саматов, Д.Ю. Трофимов и др. предисл. Л.А. Остермана и Е.Д. Свердлова // М.: БИНОМ.
   Лаборатория знаний. 2009. 223с.
- 64. Рекомендации по диагностике и лечению папилломавирусных инфекций женского генитального тракта / Официальная публикация Европейского Общества по инфекционным заболеваниям в акушерстве и гинекологии // Eur J Inr Immunol Diseases Obstet Gynaecol. 2001.- 4, 5 (Suppl. 21).
  - 65. Роговская С.И. Микробиоценоз влагалища и цервикальная патология / С.И. Роговская // Consilium Medicum. 2014.- 16(6).- 51–55.
  - 66. Роговская С.И. Цервикальная папилломавирусная инфекция. Возможности комбинированной терапии / С.И. Роговская // Акуш. и гин. 2016.- № 10.- С.26–32.
  - 67. Роговская С.И. Доброкачественные заболевания шейки матки / С.И. Роговская, Т.Н. Бебнева // Шейка матки, влагалище, вульва. Руководство для практикующих врачей. М.- 2016.- С.460–515.
  - 68. Савельева Г.М. Гинекология. Национальное руководство / под ред. Г.Мёсё- Савельева, Г.Т. Сухих, И.Б. Манухин, В.Е. Радзинский // 2-е изд. М.: ГЭОТАР-Медиа.- 2017.- 1048с.
  - 69. Савичева А.М. Краткое руководство по микроскопической диагностике инфекций, передаваемых половым путем / А.М. Савичева, Е.В. Соколовский, М. Домейка // СПб. ООО «Издательство Фолиант». 2004.- С.128.
  - 70. Серов В.Н. Руководство по амбулаторно-поликлинической помощи в акушерстве и гинекологии / В.Н. Серов, Г.Т. Сухих, В.Н. Прилепская, В.Е. Радзинский // М.: ГЭОТАР-Медиа. 2016.- 1136с.
  - 71. Симбирцев А.С. Цитокины: классификация и биологические функции // Симбирцев А.С. // Цитокины и воспаление. 2004. Т.3. №2. С.16-23.
  - 72. Сухих Г.Т. Показатели иммунитета у больных с папилломавирусной инфекцией гениталий / Г.Т. Сухих, Н.К. Матвеева, И.А. Аполихина и др. // Акушерство и гинекология. 2002.– № 2.– С.20-25.

- 73. Сухих Г.Т. Метилирования гена WIF 1 при цервикальных плоскоклеточных интраэпителиальных поражениях / Г.Т. Сухих, Л.А. Ашрафян, Г.Р. Байрамова, И.О. Бабкина, В.Ф. Чернова, А.И. Осипьянц, А.И. Королькова, А.А. Полозников, Г.Р. Асфарова, С.М. Муллабаева, Е.А. Коган, Е.Л. Муйжнек, В.М. Друх, В.И. Киселев // Акушерство и гинекология. 2017.- 5.- С.114-23.
- 74. Сухих Г.Т. Профилактика рака шейки матки: Руководство для врачей / Г.Т. Сухих, В.Н. Прилепская // М.: МЕДпресс-информ. 2012.- 192c.
- 75. Трушина О.И. Вирусная нагрузка ВПЧ прогностический фактор злокачественной прогрессии ПВИ / О.И. Трушина, Е.Г. Новикова // Материалы Первого Международного Форума онкологии и радиологии. Москва. 23–28 сентября 2018 г.
- 76. Унанян А.Л. Хронический цервицит: особенности этиологии, патогенеза, диагностики и лечения / А.Л. Унанян, Ю.М. Коссович // Рос. вестн. акушера-гинеколога. 2012.- 6.- С.40–45.
- 77. Фаррахова Л.Н. Клинико-патогенетические критерии дифференциальной диагностики и лечения хронических экзо- и эндоцервицитов у женщин с папилломавирусной инфекцией / Л.Н. Фаррахова автореф. дисс. ... канд. мед. наук. Казань. 2012.
- 78. Фемофлор. Исследование биоценоза урогенитального тракта у женщин методом ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени: Методическое пособие для лаборантов / Сост. М.Н. Болдырева, А.Е. Донников, Л.В. Тумбинская // М. 2008.— 42с.
- 79. Хаитов Р.М. Руководство по клинической иммунологии. Диагностика заболеваний иммунной системы: руководство для врачей / Р.М. Хаитов, Б.В. Пинегин, А.А. Ярилин // М.: Издательская группа «ГЭОТАР-Медиа». 2009.– 352с.
- 80. Цыганова О.Ю. Инфекции органов мочеполовой системы и ВПЧассоциированная патология шейки матки. Клиническая дерматология и венерология. – 2009. – №6. – С.50

- 81. Шахтахтинская Ф.Ч. Вирус папилломы человека. Профилактика ВПЧ-ассоциированных заболеваний / Ф.Ч. Шахтахтинская, Л.С. Намазова-Баранова, В.К. Таточенко // Педиатрическая фармакология. 2015.- 12 (1).- С.74–78.
- 82. Шейка матки, влагалища, вульва. Физиология, патология, кольпоскопия, эстетическая коррекция: руководство для практикующих врачей / под ред. Роговской С.И., Липовой Е.В. // М.: Издательство журнала StatusPraesens. 2014.- 832c.
- 83. Abnormal Cervical Cancer Screening Results // The American College of Obstetricians and Gynecologists / January 2016.- https://www.acog.org-media-For-Patients-faq187.pdf.dmc.1&ts.20190 822T2244488293.
- 84. Aleman L. Time trends of human papillomavirus types in invasive cervical cancer, from 1940 to 2007 / L. Aleman, S. de Sanjose, S. Tous et al. // International J Cancer. 2014.- Vol.135.- №1.- P.88-95.
- 85. American Cancer Society, American Society for Colposcopy and Cervical Pathology, and American Society for Clinical Pathology screening guidelines for the prevention and early detection of cervical cancer / D. Saslow et al.// CA: A Cancer Journal for Clinicians.- 2012.-Vol.62.№3.- P.147-172.
- 86. Arbyn M. Are 20 human papillomavirus types causing cervical cancer? / M. Arbyn, M. Tommasino, C. Depuydt, J. Dillner // J. Pathol. 2014.- 234(4).- P.431-5.
- 87. Arrossi S. Primary Prevention of Cervical Cancer: American Society of Clinical Oncology Resource-Stratified Guideline / S. Arrossi, S. Temin, S. Garland, L.O. Eckert, N. Bhatla, X. Castellsagué et al. // J. Glob Oncol. 2017 Mar 17.- 3(5).- P.611-634.- doi: 10.1200/JGO.2016.008151.
- 88. Asciutto K.C. Follow up with HPV test and cytology as test of cure, 6 months after conization, is reliable / K.C. Asciutto, E. Henic, L. Darlin // Acta Obstet Gynecol. Scand. 2016 Nov.- 95(11).- P.1251–1257.
- 89. Baseman J.G. The epidemiology of human papillomavirus infections / J.G. Baseman, L.A. Koutsky // J. Clin. Virol. 2005.- Vol.32.- №1.- P.16–24.

- 90. Bekos C. Influence of age on histologic outcome of cervical intraepithelial neoplasia during observational management: results from large cohort, systematic review, metaanalysis / C. Bekos, R. Schwameis, G. Heinze, M. Gärner, C. Grimm, E. Joura et al. // Sci Rep.- 2018.- 8(1).- 6383.- doi: 10.1038/s41598-018-24882-2.
- 91. Bergeron C. Prospective evaluation of p16/Ki-67 dual-stained cytology for managing women with abnormal Papanicolaou cytology: PALMS study results / C. Bergeron, H. Ikenberg, M. Sideri, K. Denton, J. Bogers, D. Schmidt et al. // Cancer Cytopathol. 2015.- 123(6).- P.373–81.
- 92. Biernat-Sudolska M. Concomitant infections with human papillomavirus and various mycoplasma and ureaplasma species in women with abnormal cervical cytology / Biernat-Sudolska M., Szostek S., Rojek-Zakrzewska D., Klimek M., Kosz-Vnenchak M. Concomitant // Adv. Med. Sci. 2011.- 56(2).- P.299-303.
- 93. Blatt A.J. Comparison of cervical cancer screening results among 256,648 women in multiple clinical practices / A.J. Blatt, R. Kennedy, R.D. Luff Cancer Cytopathol. 2015 May.- 123(5).- P.282–288.
- 94. Bleutu C. P16ink4a a possible marker in HPV persistence screening / C. Bleutu, A. Botezatu, C.D. Goia et al. // Roum Arch. Microbiol Immunol. 2009.- 68(3).- P.183–9.
- 95. Bornstein J. Colposcopic terminology of the International Federation for Cervical Pathology and Colposcopy 2011 / J. Bornstein, J. Bentley, P. Bösze, F. Girardi, H. Haefner, M. Menton et al. // Obstet Gynecol.- 2012.- 120(1).- P.166-72.
- 96. Boulet G.A. Human Papillomavirus in cervical cancer screening: important role as biomarker / G.A. Boulet, C.A. Horvath, S. Berghmans et al. // Cancer Epidemiol Biomarkers Prep.- 2008.- 17.- P.810–817.
- 97. Bourmenskaya O. Vaginal smear TNF-alpha, IL18, and GATA3 mRNA levels correlate with local inflammation / O. Bourmenskaya, G. Bayramova, O. Nepsha, D. Rebrikov, D. Trofimov, V. Muravieva et al. // Int. J. BioMed. 2014.- 4(4).- P.204–8.

- 98. Bruni L. ICO/IARC Information Centre on HPV and Cancer (HPV Information Centre). Human Papillomavirus and Related Diseases in the WORLD / L. Bruni, G. Albero, B. Serrano, M. Mena, D. Gómez, J. Muñoz et al. // Summary Report. 17 June 2019.- https://pycentre.net.statistics.reports.XWX.pdf.
- 99. Bruni L. Global estimates of human papillomavirus vaccination coverage by region and income level: a pooled analysis / L. Bruni, M. Diaz, L. Barrionuevo-Rosas, R. Herrero, F. Bray, F.X. Bosch, S. de Sanjosé, X. Castellsagué // Lancet Glob Health. 2016.- Jul.- 4(7).- P.453-63.
- 100. Bruni L. Cervical human papillomavirus prevalence in 5 continents: metaanalysis of 1 million women with normal cytological findings / L. Bruni,
  M. Diaz, X. Castellsagué, E. Ferrer et al. // J. Infect. Dis. 2010.- Vol.202.- №12.- P.1789–1799.
- 101. Burd E.M. Human papillomavirus laboratory testing: the changing paradigm / E.M. Burd // Clin. Microbiol. Rev. 2016.- 29(2).- P.291-319.
- 102. Caixeta R.C. Association between the human papillomavirus, bacterial vaginosis and cervicitis and the detection of abnormalities in cervical smears from teenage girls and young women / R.C. Caixeta, A.A. Ribeiro, K.D. Segatti, V.A. Saddi, R. Figueiredo, R. Alves, M.A. dos Santos Carneiro et al. // Diagn. Cytopathol. 2015.- 43(10).- P.780-5.
- 103. Calil L.N. P16INK4a and Ki67 expression in normal, dysplastic and neoplastic uterine cervical epithelium and human papillomavirus (HPV) infection / L.N Calil., M.I. Edelweiss, L. Meurer et al. // Pathology Res Practice. 2014.- Vol.210.- Issue 8.- P.482-487.
- 104. Cancer Statistics. Surveillance Epidemiology and End Results, National Cancer Institute. Available at: http://www.cancer.org.acs.groups.content. @epidemiology.surveilance.documents.document.acspc036845.pdf.-Retrieved October 22.- 2013.
- 105. Castellsague X. Prospective seroepidemiologic study on the role of Human Papillomavirus and other infections in cervical carcinogenesis: evidence from

- the EPIC cohort / X. Castellsague, M. Pawlita, E. Roura et al. // International J Cancer. 2014.- Vol.135.- P.440-452.
- 106. Centers for Disease Control and Prevention. Incidence, prevalence, and cost of sexually transmitted infections in the United States / February 2013.
- 107. Chaturvedi A. Human Papillomavirus Infection with Multiple Types: Pattern of Coinfection and Risk of Cervical Disease / A.K. Chaturvedi, H.A. Katki, A. Hildesheim // Infect. Dis. 2011. Vol. 203. №7. P.910-920.
- 108. Clifford G.M. Worldwide distribution of human papillomavirus types in cytologically normal women in the International Agency for Research on Cancer HPV prevalence surveys: a pooled analysis / G.M. Clifford et al. // Lancet. 2005.– 366(9490).– P.991–998.
- 109. Clinical management guidelines for obstetrician-gynecologists. Cervical Cancer Screening and Prevention. The American College of Obstetricians and Gynecologists / Obstetrics&Ginecology vol. − 127.- №1.- January 2016.
- 110. Cobucci R. Paptest accuracy and severity of squamous intraepithelial lesion /
  R. Cobucci, M. Maisonnette, E. Macêdo, F.C. Santos Filho, P. Rodovalho,
  M.M. Nóbrega et al. // Indian J. Cancer. 2016.- 53(1).- P.74–76.
- 111. Cohort Roura E. The Influence of Hormonal Factors on the Risk of Developing Cervical Cancer and Pre-Cancer: Results from the EPIC / E. Cohort Roura, N. Travier, T. Waterboer et al. // PLOS One. 2016.- January25.- P.1 17.
- 112. Constandinou-Williams C. Is human papillomavirus viral load a clinically useful. Predictive marker? A longitudinal study / C. Constandinou-Williams, S.I. Collins, S. Roberts et al. // Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 2010.-Vol.19.- P.832-837.
- 113. Cooper D.B. Cervical Dysplasia. / D.B. Cooper, C.E. Mc Cathran // In: StatPearls Internet. Treasure Island (FL).- StatPearls Publishing.- 2019.- Jan.
- 114. Coronado P.J. Colposcopy combined with dynamic spectral imaging. A prospective clinical study / P.J. Coronado, M. Fasero // Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. 2016.- 196.- P.11-6.

- 115. Coronado P.J. Correlating the accuracy of colposcopy with practitioner experience when diagnosing cervical pathology using the Dynamic Spectral Imaging System (DySIS) / P.J. Coronado, M. Fasero // Gynecol. Obstet. Invest. 2014.- 78(4).- P.224-9.
- 116. Crosbie E.J. Human papillomavirus and cervical cancer / E.J. Crosbie, M.H. Einstein, S. Franceschi, H.C. Kitchener // The Lancet.и- 2013.- 382(9895).- P.889–899.
- 117. Cubie H.A. Diseases associated with human papillomavirus infection / H.A. Cubie // Virology. 2013.– 445.– P.21–34.
- 118. de Sanjosé S. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta–analysis/ S. de Sanjosé et al. // Lancet Infect Dis. 2007.– 7(7).– P.453–9.
- 119. de Sanjosé S. The natural history of human papillomavirus infection / S. de Sanjosé, M. Brotons, M.A. Pavón // Best Practical Res Clinical Obstetrics Gynecology. 2017.- Sep..- 6.- pii: S1521 6934(17)30133 30135.
- 120. de Villiers E.M. Cross-roads in the classification of papillomaviruses / E.M. de Villiers // Virology. 2013.- 445(1-2)- P.2-10.
- 121. del. Pino M. Value of p16 (INK4a) as a marker of progression/regression in cervical intraepithelial neoplasia grade 1 / M. del. Pino, S. Garcia, V. Fusté et al. // Am. J. Obstetrics Gynecology. 2009.- Vol.201.№5.- P.488.- e.l-7.
- 122. Delmas A.L. et al. WIF1 is a frequent target for epigenetic silencing in squamous cell carcinoma of the cervix / A.L. Delmas et al. // Carcinogenesis. 2011.- Vol.32.- №11.- P.1625-1633.
- 123. Denny L.A. Human papillomavirus, human immunodeficiency virus and immunosuppression / L.A. Denny, S. Franceschi, S. de Sanjose, I. Heard, A.B. Moscicki, J. Palefsky // Vaccine. 2012.- 30(5).- P.168-74.
- 124. Di Paola M. Characterization of cervico-vaginal microbiota in women developing persistent high-risk Human Papillomavirus infection / M. Di Paola,
  C. Sani, A.M. Clemente et.al. // Sci Rep. 2017.Aug.31.- 7(1).- 10200.

- 125. Ding Z. Punch biopsy guided by both colposcopy and HR-HPV status is more efficient for identification of immediate high-grade squamous intraepithelial lesion pr worse among HPV-infected women with atypical squamous cells of undetermined significance / Z. Ding, Y. Li, A. Chen, M. Song, Y. Zhang // Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. 2016.- 207.- P.32-6.
- 126. Doorbar J. Human papillomavirus molecular biology and disease association / J. Doorbar, N. Egawa, H. Griffin, C. Kranjec, I. Murakami // British Journal of Dermatology. 2016.– 25.– P.2–23.
- 127. Doorbar J. The biology and life—cycle of human papillomaviruses / J. Doorbar, W. Quint, L. Banks et al. // Vaccine. 2012.– 30(Suppl 5).– P.55–70.
- 128. Elfgen K. Management of women with human papillomavirus persistence: long-term follow-up to a randomized clinical tria / K. Elfgen, K.M. Eifstrom, P. Naucler et al. // American American journal of obstetrics and gynecology. Volume 216.- Issue 3.- March 2017.- P.206–207.
- 129. Feng Y.K. Relationship of human papillomavirus subtypes and multiple infection with different cervical precancerous diseases in Sichuan Province / Y.K. Feng, Y. Peng, L. Zhu, X.Y. Niu // Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban. 2015.- 46(3).- P.422–5.- 462.
- 130. Fernandes J.V. Human papillomavirus: biology and pathogenesis. In: Van den Broeck D., ed. Human papillomavirus and related diseases from bench to bedside a clinical perspective / J.V. Fernandes, T.A. de Medeiros Fernandes http:www.intechopen.com/books/human.papillomavirus.and. related.diseases.frombench.to.bedside.a.clinical.perspective.human.papilloma virus.biology andpathogenesis.
- 131. Fernandes J.V. Link between chronic inflammation and human papillomavirus-induced carcinogenesis (review) / J.V. Fernandes, de T.A. Medeiros Fernandes, J.C. de Azevedo, R.N. Cobucci, M.G. de Carvalho, V.S. Andrade et al. // Oncol. Lett. 2015.- 9(3).- P.1015–26.
- 132. Gadducci A. Smoking habit, immune suppression, oral contraceptive use, and hormone replacement therapy use and cervical carcinogenesis: a review of the

- literature / A. Gadducci, C. Barsotti, S. Cosio et al. // Gynecology Endocrinology. 2011.- Vol.27.- P.597-604.
- 133. Giannella L. Age-related changes in the diagnostic assessment of women with severe cervical lesions / L. Giannella, C. Fodero, F. Boselli, K. Mfuta et al. // Climacteric. 2015.- Vol.20.- P.1–18.
- 134. Giannella L. High-grade CIN on cervical biopsy and predictors of the subsequent cone histology results in women undergoing immediate conization / L. Giannella, K. Mfuta, G. Gardini, T. Rubino, C. Fodero, S. Prandi // Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.- 2015.- 186.- P.68–74.
- 135. Gillet E. Association between bacterial vaginosis and cervical intraepithelial neoplasia: systematic review and meta-analysis / E. Gillet, J.F. Meys, H. Verstraelen, R. Verhelst, P. De Sutter, M. Temmerman, D. Vanden Broeck // PLoS One. 2012.- 7(10).- e45201.
- 136. Gustinucci D. Use of Cytology, E6/E7 mRNA, and p16INK4a-Ki-67 to Define the Management of Human Papillomavirus (HPV)-Positive Women in Cervical Cancer Screening / D. Gustinucci, P. Giorgi Rossi, E. Cesarini et al. // Am J. Clinical Pathology. 2016.- Vol.145.- №1.- P.35 45.
- 137. He Y. Clinical analysis of cervical intraepithelial neoplasia with vaginal intraepithelial neoplasia / Y. He, Q. Zhao et al. // Medicine. 2017.- 96.- P.17
  - 138. Hellberg D. The biological role of smoking, oral contraceptive use and endogenous sexual steroid hormones in invasive squamous epithelial cervical cancer (49 refs) / D. Hellberg, U. Stendahl //Anticancer Res. 2005.- Vol.25.- P.3041-3046.
  - 139. Hesselink A.T. High-risk human papillomavirus DNA load in a population-based cervical screening cohort in relation to the detection of high-grade cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer / A.T. Hesselink, J. Berkhof, D.A. Heideman et al. // Int J Cancer, 2009;124:381.HPV Information Centre. Available at: http://www.hpvcentre.net.index. Php

- 140. Huh W.K. Use of primary high-risk human papillomavirus testing for cervical cancer screening: interim clinical guidance / W.K. Huh, K.A. Ault, D. Chelmow et al. // Gynecol Oncol. 2015.- 136.- P.178–182.
- 141. Hwang L.Y. Factors that influence the rate of epithelial maturation in the cervix in healthy young women / L.Y. Hwang et al. // J. Adolesc. Health. 2009.- Vol.44.- №2.- P.103-110.
- 142. Ikenberg H. Screening for cervical cancer precursors with p16/Ki-67 dual-stained cytology: results of the PALMS study / H. Ikenberg, C. Bergeron, D. Schmidt et al. // J. of National Cancer Institute. 2013.— October.16.- №105 (20).- P.1550-1557.
- 143. Ikenberg H. P16/Ki67 dual-stained cytology in primary screening for cervical cancer and as triage tool in PRP negative/HPV positive cases / H. Ikenberg, W. Petry, C. Angeloni et al. // Eurogin: Lisbon. 2011.- P.120
- 144. Jahic M. The diagnostic approach to patients with atypical squamous cells of undetermined significance Pap on the cervix / M. Jahic, E. Jahic // Med. Arh. 2016.- 70(4).- P.296–8.
- 145. Jayakumar N.K. Cervicitis: how often is it non-specific! / N.K. Jayakumar // J. Clin. Diagn. Res. 2015.- 9(3).- P.11–2.
- 146. Jentschke M. Importance of HPV genotyping for the screening, therapy and management of cervical neoplasias / M. Jentschke, P. Soergel, P. Hillemanns // Geburtsh Frauenheilk. 2012.- 72.- P.507–512.
- 147. Khan M.J. 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 et al. // J Natl Cancer Inst. 2005.– 97.– P.1072–9.
- 148. Kanthiya K. Expression of the p16 and Ki67 in Cervical Squamous Intraepithelial Lesions and Cancer / K. Kanthiya, J. Khunnarong, S. Tangjitgamol et al. // Asian Pac J Cancer Prev. 2016.- Vol.17.- №7.- P.3201 3206.

- 149. Kogan E.A. Reparative spheroids in HPV-associated chronic cervicitis / E.A. Kogan, N.M. Fayzullina, T.A. Demura, G.T. Sukhikh // Int. J. Biomed.- 2013.- 3(3).- P.192–6.
- 150. Kwasniewski W. Microbiota dysbiosis is associated with HPV-induced cervical carcinogenesis / W. Kwasniewski, M. Wolun-Cholewa, J. Kotarski, W. Warchol, D. Kuzma, A. Kwasniewska, A. Gozdzicka-Jozefiak // Oncol Lett. 2018.- Dec.- 16(6).- P.7035–7047.
- 151. Kyrgiou M. Imperial College London. Vaginal microbiome: its effect on cervical precancer and treatment / M. Kyrgiou // http:dx.doi.org10.1016.j.trsl. 2016.07.004.
- 152. Kyrgiou M. Does the vaginal microbiota play a role in the development of cervical cancer? / M. Kyrgiou, A. Mitra, A.B. Moscicki // Transl Res. 2017.-179-. P.168–82.
- 153. Lamont R.F. The vaginal microbiome: new information about genital tract flora using molecular based techniques / R.F. Lamont, J.D. Sobel, R.A. Akins, S.S. Hassan, T. Chaiworapongsa, J.P. Kusanovic, R.Br. Romero // J. Obstet. Gynaecol. 2011.- 118(5).- P.533–49.
- 154. Liu M. Influence of Human Papillomavirus Infection on the Natural History of Cervical Intraepithelial Neoplasia 1: A Meta-Analysis / M. Liu, X. Yan, M. Zhang, X. Li, S. Li, M. Jing // Biomed Res Int. 2017.- 8971059. doi: 10.1155 2017 8971059.
- 155. Louwers J.A. Digital colposcopy: ready for use? An overview of literature / J.A.Louwers, M. Kocken, W.A. Ter Harmsel, R.H. Verheijen // BJOG. 2009.- 116(2).- P.220-9.
- 156. Luttmer R. Management of high-risk HPV-positive women for detection of cervical (pre)cancer / R. Luttmer, M. Lise, A. De Strooper, R.D. Steenbergen, J. Berkhof // Expert Rev. Mol. Diagn.t 2016.- Jul.- 26.- 11.
- 157. Mangino G. Inflammatory microenvironment and human papillomavirus-induced carcinogenesis / G. Mangino, M.V. Chiantore, M. Iuliano et al. // Cytokine Growth Factor Rev. 2016.- Vol.18.- S.1359 6101.

- 158. Marketta J.A. Prevention and Treatment of Human Papillomavirus Infections / J.A. Marketta, T.Z. Jodlowski // US Pharm. 2010.- 35(9).- P.32-40.
- 159. Mikeska T. DNA Methylation Biomarkers: Cancer and Beyond Genes / T. Mikeska, J. Craig // Basel. 2014.- Vol.5.- № 3.- P.821-864.
- 160. Mirzaie-Kashani E. Detection of human papilloma virus in chronic cervicitis, cervical adenocarcinoma, intraepithelial neoplasia and squamos cell carcinoma / E. Mirzaie-Kashani, M. Bouzari, B. Talebi, F. Arbabzadeh-Zavareh // Jundishapur J. Microbiol.- 2014.- 7(5).- e9930.
- 161. Mittal S. Risk of high-grade precancerous lesions and invasive cancers in high-risk HPV-positive women with normal cervix or CIN 1 at baseline-A population-based cohort study / S. Mittal, P. Basu, R. Muwonge et al. // International J. Cancer. 2017.- Apr 15.- Vol.140.- №8.- P.1850-1859.
- 162. Mustafa R.A. Systematic reviews and meta-analyses of the accuracy of HPV tests, visual inspection with acetic acid, cytology, and colposcopy / R.A. Mustafa, N. Santesso, R. Khatib, A.A. Mustafa, W. Wiercioch, R. Kehar et al. // Int. J. Gynaecol. Obstet. 2016.- 132(3).- P.259-65.
- 163. Nayar R. The Pap Test and Bethesda 2014 / R. Nayar, D.C. Wilbur // Acta Cytol. 2015.- Vol.59.- P.121-132.
- 164. Nwachokor F.N. Morphological spectrum of non-neoplastic lesions of the uterine cervix in Warri, South-South, Nigeria / F.N. Nwachokor, G.C.Forae // Niger J. Clin. Pract. 2013.- Oct-Dec.- 16(4).- P.429-32. 1,
- 165. Ochiel D.O. Innate Immunity in the Female Reproductive Tract: Role of Sex Hormones in Regulating Uterine Epithelial Cell Protection Against Pathogens / D.O. Ochiel, J.V. Fahey, M. Ghosh, S.N. Haddad, C.R. Wira // Curr Womens Health Rev. 2008.- 4.- P.102-117.
- 166. Olaniyan O.B. Validity of colposcopy in the diagnosis of early cervical neoplasia: a review / O.B. Olaniyan // Afr. J. Reprod. Health. – 2002.– Vol.6(3).– P.59–69
- 167. Ollendorff A.T. Cervicitis / A.T. Ollendorff // Updated.- Feb.09.2017.

- 168. Ordi J. P16INK4aimmunostaining ide3ntifiles occult CIN lesions in HPV-positive women / J. Ordi, S. Garcia, Marta del Pino et al. // International Journal of Gynecological Pathology. 2009.– Vol.28.- №1.– P.90-97.
- 169. Pereira T. Quantitative Evaluation of Macrophage Expression Using CD68 in Oral Submucous Fibrosis: An Immunohistochemical Study / T. Pereira, S. Naik, A. Tamgadge // Ann Med. Health Sci. Res. – 2015.Nov-Dec.- 5(6).-P.435-41.
- 170. Pirtea L. Age and HPV type as risk factors for HPV persistence after loop excision in patients with high grade cervical lesions: an observational study / L. Pirtea et al. // BMC Surg. − 2016.− Vol.16 №1.− P.70.
- 171. Plummer M. A 2-year prospective study of human papillomavirus persistence among women with a cytological diagnosis of atypical squamous cells of undetermined significance or low-grade squamous intraepithelial lesion / M. Plummer et al. // J. Infect. Dis. 2007.– Vol.195(11).– P.1582–1589.
- 172. Prati B. Human papillomavirus and genome instability: from productive infection to cancer Clinics (Sao Paulo) / B. Prati, B. Marangoni, E. Boccardo // 2018.- 73(Suppl 1).
- 173. Quaas J. Explanation and use of the colposcopy terminology of the IFCPC (International Federation for Cervical Pathology and Colposcopy) Rio 2011/ J. Quaas, O. Reich, Frey B. Tirri, V. Küppers //Geburtshilfe Frauenheilkd.- 2013.-73(9).-904.-7.
- 174. Ramachandran I. Wnt inhibitory factor 1 induces apoptosis and inhibits cervical cancer growth, invasion and angiogenesis in vivo / I. Ramachandran, E. Thavathiru, S. Ramalingam et al. // Oncogene. 2012.- Vol.31. -P.2725-2737.
- 175. Richart R.M. From Human papillomavirus to cervical cancer / R.M. Richart, M. Shiffman, N. Wentzensen // Obstetrics Gynecology. - 2010.- Vol.116.- №1.-P.177-185.
- 176. Rocha S., Schaefer G., EdelweissI. A. Cervical cytological screening. Diagn Cytopathol. 2015 Oct. 43(10):802–809.

- 177. Ryu K.J. Management of atypical squamous cells of undetermined significance or lowgrade squamous intraepithelial lesions of the uterine cervix with human papilloma virus infection among young women aged less than 25 years / K.J. Ryu, S. Lee, K.J. Min, J.H. Hong, J.Y. Song, J.K. Lee, N.W. Lee // Diagn Cytopathol. 2016.- Dec.- 44(12).- P.959-963.
- 178. Saslow D. American Cancer Society, American Society for Colposcopy and Cervical Pathology, and American Society for Clinical Pathology screening guidelines for the prevention and early detection of cervical cancer / D. Saslow et al. CA Cancer J. Clin. 2012.- Vol.62.- №3.- P.147–172.
- 179. Savone D. Management of HPV-related cervical disease: role of p16INK4a immunochemistry / D. Savone, A. Carrone, L. Riganelli // Tumori. 2016.Oct.13.- 102(5).- P.450- 458.
- 180. Schmidt D. P16/Ki-67 dualstain cytology in the triage of ASCUS and LSIL Papanicolau cytology: results from the European equivocal or mildli abnormal Papanicolau cytology study / D. Schmidt, C. Bergeron, K.J. Denton et al. // Cancer Cytopathology. 2011.- Vol.119.- №3.- P.158-166.
- 181. Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines 2015 / MMWR. June.5.2015.- Vol.64 №3.
- 182. Shafi M. European quality standards for the treatment of cervical intraepithelial neoplasia (CIN). European Federation of Colposcopy / M. Shafi // Accessed.- July.1.2014.
- 183. Shipitsyna E. Prevalence of high-risk squamous intraepithelial lesion in women over 30 years of age in St. Peterburg / E. Shipitsyna, E. Zolotoverkhaya, D. Kuevda et al. // Russia. Cancer Epidemiology. 2011.- Vol.35.- P.160-164.
- 184. Shiraz A. Colposcopy and cervical intraepithelial neoplasia / A. Shiraz, T. Majmudar // Obstet. Gynaecol. Reprod. Med. 2017.- 27(6).- P.177-83.
- 185. Snijders P. The clinical relevance of human papillomavirus testing: relationship between analytical and clinical sensitivity. / P. Snijders, A. van den Brule, C. Meijer // J. Pathology. 2003.- Vol.201: P.1-6.

- 186. Szostek S. Differences in the expression of human papillomavirus type 16 (HPV-16) E6 oncogene mRNA in SiHa cell line inoculated with CMV, HSV or ureaplasmas / S. Szostek, B. Zawilińska, M. Biernat-Sudolska, J. Kopeć, E. Kłeszcz, M. Koprynia, D. Rojek-Zakrzewska, M. Kosz-Vnenchak // Folia Biol (Krakow). 2014.- 62(1).- P.73–8.
- 187. Tanabodee J. Comparison of Efficacy in Abnormal Cervical Cell Detection between Liquid-based Cytology and Conventional Cytology / J. Tanabodee, K. Thepsuwan, A. Karalak et al. // Asian Pac J Cancer Prev. 2015.- Vol.16.- №16.- P.7381-7384.
- 188. Thomas C. Primary cervical cancer screening with human papillomavirus: End of study results from the ATHENA study using HPV as the first-line screening test / C. Thomas, H. Wright, M. Stoler, M.C. Behrens et al. // 2015.- Vol.- 136.- Issue2.- P.189-197.
- 189. Torres-Poveda K. Role of IL-10 and TGF-β1 in local immunosuppression in HPV-associated cervical neoplasia / K. Torres-Poveda, M. Bahena-Roman, C. Madrid-Gonzales, A.I. Burguete-Garcia, V.H. Bermudez-Morales, O. Peralt Zaragoza, V. Madrid-Marina // World J. Clin. Oncol. 2014.October10.- 5(4).- P.753-763.
- 190. Trottier H. The epidemiology of genital human papillomavirus infection / H. Trottier, E.L. Franco // Vaccine. 2006.- Vol.24.- №1.- P.l-15.
- 191. Tummers B. High-risk human papillomavirus targets crossroads in immune signaling /B. Tummers, S.H. Van der Burg//Viruses. –2015.-7(5).-P.2485–506.
- 192. Van Der Meide, Promoter methylation analysis of WNT/β-catenin signaling pathway regulators to detect adenocarcinoma or its precursor lesion of the cervix / Van Der Meide, S. Snellenberg, Meijer, A.Baalbergen, Helmerhorst, Van Der Sluis et al. // Gynecol Oncol. 2011.- 123.- P.116–22.
- 193. Wade R. Adjunctive colposcopy technologies for examination of the uterine cervix DySIS, LuViva, Advanced Cervical Scan and Niris Imaging System: a systematic review and economic evaluation / R. Wade, E. Spackman, M.

- Corbett, S. Wailer, K. Light, R. Nair et al. // Health Technol. Assess. 2013.-17(8).-1.-240.
- 194. Weijiao G. Comparison of the vaginal microbiota diversity of women with and without human papillomavirus infection: a cross-sectional study / G.Weijiao,
  J. Weng, Y. Gao, X. Chen // BMC Infectious Diseases.- 2013.- volume 13.- Article number: 271
- 195. WHO/ICO Information Centre on HPV and Cancer / Russian Federation: Human Papillomavirus and Related Cancers, Fact Sheet 2016.12.15. http://www.hpvcentre.net.
- 196. Wilbur D.C. Bethesda 2014: improving on a paradigm shift / D.C. Wilbur, R. Nayar // Cytopathology. 2015.Dec.- 26(6).- P.339–42.
- 197. Winer R.L. Genital human papillomavirus infection: incidence and risk factors in a cohort of female university students / R.L. Winer et al. // Am. J Epidemiology. 2003.- Vol.157.- №3.- P.218 226.
- 198. Wohlmeister D. Association of human papillomavirus and Chlamydia trachomatis with intraepithelial alterations in cervix samples / D. Wohlmeister et al. // Mem. Inst. Oswaldo Cruz. Feb.2016.- vol.111.- №2.-P.106–113.
- 199. World Health Organization. Comprehensive cervical cancer control. A guide to essential practice 2nd ed. Geneva // WHO. 2014.- http.www.who.int.repro ductivehealth.publications.cancers.cervical-cancer-guide.en.
- 200. World Health Organization. WHO/ICO information centre on human papilloma virus (HPV) and cervical cancer / Available at. 2012.- Vol.28.
- 201. Ye H. Association between genital mycoplasmas infection and human papillomavirus infection, abnormal cervical cytopathology, and cervical cancer: a systematic review and meta-analysis / H. Ye, T. Song, X. Zeng, L. Li, M. Hou, M. Xi // Arch Gynecol Obstet. 2018.Mar.8.- DOI: 10.1007/s00404–018–4733–5.
- 202. Yee D.S. The Wnt inhibitory factor 1 restoration in prostate cancer cells was associated with reduced tumor growth, decreased capacity of cell migration and

- invasion and a reversal of epithelial to mesenchymal transition / D.S. Yee, Y. Tang, X. Li et al. // Molecular Cancer. 2010.- Vol.9.- P.162-165.
- 203. Yong Il Ji. Co-infections with human papillomavirus and mycoplasma/ureaplasma spp. in women with abnormal cervical cytology / Yong Il Ji. // Research and Reports in Gynecology and Obstetrics. -2017.- Volume1.- Issue 1.
- 204. Zaal A. Agreement between colposcopic impression and histological diagnosis among human papillomavirus type 16-positive women: a clinical trial using dynamic spectral imaging colposcopy / A. Zaal, J.A. Louwers, J. Berkhof, M. Kocken, W.A. Ter Harmsel, G.C. Graziosi et al. // BJOG. 2012.- 119(5).- P.537-44.
- Zaravinos A. Molecular detection methods of human papillomavirus (HPV) /
   A. Zaravinos, I.N. Mammas, G. Sourvinos, D.A. Spandidos // Int. J. Biol.
   Markers n.d. 24.- P.215–22.
- 206. Zhao J. Human papillomavirus genotypes associate with cervical precancerous lesions and cancer in the higest area of cervical cancer mortality, Longnan, China / J. Zhao, G. Zhong et al. // 2017.- 12.- 8.
- 207. zur Hausen H. The search for infectious causes of human cancers: Where and why / zur Hausen H. // Virology. 2009. 392. P.1–10.
- 208. Zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application / H. zur Hausen //Nat. Rev. Cancer. -2002.-Vol.2.- №5.- P.342-350.

ПРИЛОЖЕНИЕ А. Алгоритм ведения пациенток с хроническим цервицитом, ассоциированным с ВПЧ.

