

На правах рукописи

АТТОНОВА

Джамиля Исмаиловна

ЛИПИДОМНЫЕ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ В
ДИАГНОСТИКЕ ПРЕДРАКОВЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ШЕЙКИ МАТКИ,
АССОЦИИРОВАННЫХ С ПАПИЛЛОМАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ

3.1.4. Акушерство и гинекология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва 2022

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

Научные руководители:

доктор медицинских наук
кандидат биологических наук

Назарова Нисо Мирзоевна
Стародубцева Наталия Леонидовна

Официальные оппоненты:

Минкина Галина Николаевна, доктор медицинских наук, профессор кафедры акушерства и гинекологии лечебного факультета ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» Минздрава России.

Серова Ольга Федоровна, доктор медицинских наук, профессор, главный врач ГБУЗ МО «Московский областной перинатальный центр», заведующая кафедрой акушерства, гинекологии и перинатологии Медико-биологического университета инноваций и непрерывного образования ГНЦ России ФГБУ «Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна» ФМБА России.

Ведущая организация: ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Минздрава России.

Защита состоится «__»_____2022 г. в 13.00 час. на заседании диссертационного совета 21.1.022.01. на базе федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 117997 г. Москва, ул. Академика Опарина, д. 4

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке на сайте ФГБУ «НМИЦ АГП им В.И. Кулакова» Минздрава России

https://science.ncagp.ru/upfiles/pdf/Attoeva%20DI-disser_2.pdf?50062935

Автореферат разослан «__»_____2022

Ученый секретарь,
диссертационного совета,
доктор медицинских наук, профессор

Калинина Елена Анатольевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

В течение последних десятилетий рак шейки матки (РШМ) продолжает занимать одно из лидирующих мест среди злокачественных опухолей репродуктивной системы у женщин. В ряде случаев РШМ является быстро прогрессирующим заболеванием, которое поражает женщин в различные периоды жизни, включая репродуктивный возраст. По данным Международного агентства по изучению рака, ежегодно в мире регистрируются более 570 000 новых случаев РШМ, более половины из которых заканчиваются смертельным исходом [World Cancer Report, 2016]. В Российской Федерации среди онкологических заболеваний репродуктивных органов РШМ занимает 3-е место среди женщин, уступая раку молочной железы и раку тела матки [Каприн А. Д., Старинский В.В., 2017]. Основным этиологическим фактором развития предраковых заболеваний и рака шейки матки являются высокоонкогенные типы вируса папилломы человека (ВПЧ ВР). Установлено, что интеграция генома ВПЧ ВР в хромосомный аппарат клетки хозяина является ключевым этапом в развитии канцерогенеза шейки матки [Pett, M., and Coleman N., 2007]. Одной из задач цитологического исследования является выявление предраковых заболеваний шейки матки для их своевременного лечения [Raab SS, Grzybicki DM., 2011]. Bergeron C., von Knebel Doeberitz M. показали, что ВПЧ-тестирование способствует более раннему выявлению плоскоклеточных интраэпителиальных поражений высокой степени (HSIL) [Bergeron C. et al., 2016]. Несмотря на то, что цервикальный скрининг позволяет снизить риск РШМ, решающее значение в постановке правильного диагноза принадлежит гистологическому исследованию, так как его результат определяет выбор метода лечения и дальнейшей тактики ведения пациенток [Sodhani P, Singh V., 2001].

Корреляция результатов морфологических методов исследования — цитологии и гистологии (cytology histology correlation - CHC) — является одним из важных критериев оценки качества скрининга РШМ. Так, анализ

ряда исследований показал, что 31% цитологических заключений не соответствует последующему гистологическому диагнозу [Alanbay I, Öztürk M, et al., 2017]. Кроме того, при сопоставлении цитологических и гистологических заключений выявлены несоответствия: значительные - 6,4% и незначительные - 20,4%. [Gupta R, Hariprasad R, et al., 2017].

Yung Take Ouh et. al. установлено, что несоответствия результатов морфологических методов исследования являются причиной неправильного ведения пациентов в ряде случаев с недооценкой степени тяжести поражения [Ouh YT, Park JJ, Kang M, 2021]. Вместе с тем большинство женщин с поражениями легкой степени подвержены необоснованным инвазивным манипуляциям на шейке матки.

Современная медицинская наука имеет большие возможности для поиска новых (экспресс) методов ранней диагностики предраковых заболеваний шейки матки, а также определения группы риска по развитию рецидива заболевания после хирургического лечения HSIL.

Особый интерес представляют исследования метаболизма липидов при неопластической трансформации и канцерогенезе. Как известно, повышенный синтез жирных кислот необходим для быстрой пролиферации опухолевых клеток [Bandu R, Mok HJ., 2016]. Также, установлено, что в атипических клетках нарушается холестеринный метаболизм [Chistiakov D.A., Bobryshev Y.V., 2016]. Холестериновые эфиры и холестерол накапливаются в макрофагах, которые отвечают за поглощение умерших клеток [Gebhard R.L., Clayman R.V., et al. 2014]. В этой связи чрезвычайно актуальным является изучение потенциала липидома пораженного эпителия шейки матки, ассоциированного с ВПЧ, методом хромато-масс-спектрометрии, создание панели липидов-маркеров для ранней и неинвазивной диагностики HSIL и РШМ.

Степень разработанности темы исследования

Исследования липидома эпителия шейки матки методом хромато-масс-спектрометрии при поражениях различной степени тяжести, включая рак шейки матки, ассоциированных с ВПЧ ВР, в мировой литературе практически отсутствуют. В этой связи чрезвычайно актуальным является изучение и оценка диагностического потенциала липидома эпителия шейки матки неинвазивным способом, а также создание панели липидов-маркеров для ранней и дифференциальной диагностики степени тяжести неопластической трансформации эпителия шейки матки, в том числе у пациенток с ВПЧ-ассоциированными поражениями шейки матки при несоответствии результатов клинических и морфологических методов исследования.

Цель исследования

Оптимизировать тактику ведения пациенток с ВПЧ-ассоциированными заболеваниями шейки матки на основании изучения клинико-морфологических, молекулярно-генетических методов и метаболомного анализа эпителия методом хромато-масс-спектрометрии.

Задачи исследования

1. Провести ретроспективный анализ данных сопоставления клинического, цитологического и гистологического методов исследований у женщин с патологией шейки матки, ассоциированных с ВПЧ ВР (по обращаемости в НПО).
2. Провести сравнительный анализ уровней липидов в соскобах эпителия шейки матки у пациенток с ВПЧ-ассоциированными заболеваниями (LSIL, HSIL, P1M) методом хромато-масс-спектрометрии.
3. Определить липидные панели и разработать математические модели, позволяющие проводить быструю дифференциальную диагностику степени тяжести поражения (LSIL, HSIL, P1M) методом хромато-масс-

спектрометрии и сопоставить с результатами клинических и морфологических методов исследования.

4. Провести корреляционный анализ уровня липидов, результатов клинических и морфологических методов исследований, экспрессии мРНК генов (p16, Ki67, PGR, BCL2) при ВПЧ-ассоциированных заболеваниях шейки матки (LSIL, HSIL, РШМ).
5. Разработать тактику ведения пациенток с ВПЧ-ассоциированными заболеваниями шейки матки с учетом клинических, морфологических, молекулярно-генетических и масс-спектрометрических данных.

Научная новизна

Впервые проведен липидомный анализ соскобов эпителия шейки матки у пациенток с ВПЧ-ассоциированными поражениями методом хромато-масс-спектрометрии. Выявлены статистически значимые отличия в уровнях липидов, относящихся к классам холестеринových эфиров (CE), фосфатидилхолинов (PC), церамидов (Cer) и сфингомиелинов (SM), позволяющие дифференцировать доброкачественные, предраковые процессы и рак шейки матки.

Впервые установлена положительная корреляционная связь масс-спектрометрических показателей, гистологического диагноза и уровня экспрессии мРНК генов в дифференциальной диагностике тяжелых поражений шейки матки (HSIL и РШМ).

Определена диагностическая панель липидов, позволяющая выявлять группу риска по рецидиву HSIL у пациенток, перенесших хирургическое лечение.

Впервые продемонстрирована высокая чувствительность и специфичность метода хромато-масс-спектрометрии в быстрой, неинвазивной и дифференциальной диагностике ВПЧ-ассоциированных поражений шейки матки.

Практическая значимость

Разработан неинвазивный подход для ранней диагностики HSIL и РШМ с учетом оценки липидома в соскобах эпителия шейки матки методом хромато-масс-спектрометрии.

Определена панель липидных маркеров и доказана целесообразность ее применения при несоответствиях результатов цитологического заключения и результатов клинических методов исследований у ВПЧ-позитивных женщин.

Усовершенствована тактика ведения пациенток с наличием LSIL (по гистологии) с учетом разработанной панели липидомных маркеров, позволяющая выявлять пациенток с наличием более тяжелого поражения (HSIL).

Усовершенствована тактика ведения пациенток после хирургического лечения HSIL, с учетом клинических, молекулярно-генетических методов и данных масс-спектрометрии, позволяющая определять пациенток с остаточным заболеванием и/или имеющих высокий риск рецидива HSIL.

Методология и методы исследования

Работа основана на использовании современных методов диагностики ВПЧ-ассоциированных заболеваний шейки матки: клинико-anamnestический анализ, цитологическое исследование, молекулярно-генетические (генотипирование ВПЧ (21 тип) и определение вирусной нагрузки, определение уровня экспрессии мРНК 4-х генов (CDKN2A/p16, MKi67, PGR, BCL2)) методом ПЦР в режиме реального времени, кольпоскопия, биопсия шейки матки (по показаниям), морфологические методы (гистологическое исследование биопсийного материала). Липидомный анализ соскобов эпителия шейки матки методом хромато-масс-спектрометрии с последующей идентификацией липидов проводился в отделе системной биологии в репродукции ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И.Кулакова» Минздрава России (зав. – д.ф-м.н. Франкевич В.Е.)

Статистический анализ проводился с использованием скриптов на языке R (3.3.3) в среде RStudio (1.383 GNU). Для липидов выбор липидов для построения логистической регрессии осуществлялся с использованием теста Манна-Уитни с порогом 0.05, а также с помощью информационного критерия Акаике и дискриминантного анализа проекций на скрытые структуры.

Итоговая классификационная модель для каждого режима ионов строилась на основе 10 логистических регрессий для дискриминации каждой пары по принципу «1 против 1». Тестирование итоговой модели производилась внутренней кросс-валидацией по отдельному объекту. Прогностическая ценность каждого диагноза оценивались как число верно поставленного диагноза/число поставленных соответствующих диагнозов.

Положения, выносимые на защиту

1. Сопоставление результатов цитологического и гистологического методов исследований у пациенток с патологией шейки матки, ассоциированной с ВПЧ высокого канцерогенного риска, показало, что имели место как случаи значительного, так и незначительного несоответствия диагноза, оказывающих влияние на необоснованный выбор дальнейшей тактики ведения пациенток.
2. Определены липиды, содержание которых в эпителии шейки матки значимо отличается между исследуемыми группами (хронический цервицит, LSIL, HSIL, РШМ): холестериновые эфиры (CE), фосфатидилхолины (PC), церамиды (Cer) и сфингомиелины (SM).
3. Разработана классификационная модель на основании липидного профиля эпителия шейки матки для дифференциации тяжелых поражений шейки матки, демонстрирующая высокую эффективность хромато-масс-спектрометрии в диагностике ВПЧ-ассоциированных заболеваний.

Апробация результатов

Диссертационная работа обсуждена на межклинической конференции 07.07.2021г. и на заседании апробационной комиссии ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России (18.10.2021 г., протокол №6).

Основные положения диссертации и результаты работы были представлены и доложены на XXV Всероссийском Конгрессе с международным участием «Амбулаторно-поликлиническая помощь в эпицентре женского здоровья от менархе до менопаузы», Москва, 2019; XII Региональном научно-образовательном форуме «Мать и Дитя – 2019» и Пленуме Правления Российского общества акушеров-гинекологов, Сочи, 2019; XXI Всероссийском научно-образовательном форуме «Мать и Дитя», Москва, 2020; XXVI Всероссийском Конгрессе с международным участием «Амбулаторно-поликлиническая помощь в эпицентре женского здоровья от менархе до менопаузы», Москва, 2020; XXI Всероссийском научно-образовательном форуме «Мать и Дитя», Москва, 2020; Научно-практическом семинаре «Актуальные вопросы организации скрининга и анней диагностики рака шейки матки в республике Саха», Республика Саха (Якутия), 2021; Научно-практической конференции «Актуальные вопросы скрининга и ранней диагностики рака шейки матки и Иркутской области», Иркутск, 2021; XIV Региональном научно-образовательном форуме «Мать и Дитя» и Пленуме Правления РОАГ, Москва, 2021; XXII Всероссийском научно-образовательном форуме «Мать и Дитя», Москва, 2021; Российском научно-практическом конгрессе «Гинекологическая эндокринология в возрастном аспекте: проблемы и решения», Москва, 2021; XXVII Всероссийском Конгрессе с международным участием «Амбулаторно-поликлиническая помощь в эпицентре женского здоровья от менархе до менопаузы», Москва, 2021.

Личный вклад автора

Автор принимал непосредственное участие в выборе темы исследования, формулировке задач, клинико-лабораторном обследовании, сборе биологического материала и ведении пациенток, а также в анализе медицинской документации, статистической обработке полученных результатов.

Соответствие диссертации паспорту полученной специальности

Научные положения диссертации соответствуют специальности 3.1.4. Акушерство и гинекология, полученные результаты соответствуют области исследования по специальности, пунктам 3,4,5 паспорта акушерства и гинекологии.

Внедрение результатов исследования в практику

Результаты проведенного исследования, а также алгоритм ведения пациенток с ВПЧ-ассоциированными заболеваниями шейки матки, внедрены и используются в практической деятельности научно-поликлинического отделения ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России.

Материалы диссертации используются в учебном процессе, в лекционных материалах на научных форумах, конференциях, симпозиумах и семинарах.

По теме диссертации опубликовано 8 научных работ, 7 из них в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных высшей аттестационной комиссией (ВАК).

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 124 страницах компьютерного текста и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, клинико-anamnestической характеристики обследованных групп, результатов собственных исследований и их обсуждения, выводов,

практических рекомендаций, списка литературы. Содержит 29 таблиц и 34 рисунка.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал и методы исследования

Согласно установленным критериям включения и исключения, в одномоментное проспективное исследование было набрано 116 пациенток (средний возраст 33,2 +/- 6,1), обратившихся в научно-поликлиническое отделение ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России. В зависимости от результатов гистологического исследования биоптатов шейки матки, было сформировано 4 группы: 1 - хронический цервицит/ВПЧ+ - 29 (25%), 2 – LSIL/ВПЧ+ - 32 (27,5%), 3 – HSIL/ВПЧ+ - 32 (27,5%), 4 – РШМ/ВПЧ+ – 23 (19,8%).

Также был проведен ретроспективный анализ сопоставления результатов морфологических методов (цитологии и гистологии) исследования в соответствие с классификацией «Комитета клинической практики Американского общества цитопатологии» (College of American Pathologists' Gynecologic Cytopathology Quality Consensus Conference Working Group 4 and the Clinical Practice Committee of American Society of Cytopathology, 2013) (ASC) у 415 пациенток с ВПЧ-ассоциированными поражениями шейки матки за период с 2018 по 2019 гг.

Критериями включения в одномоментное проспективное исследование явились: возраст от 21 до 45 лет; ВПЧ-инфекция; интраэпителиальные поражения шейки матки низкой и высокой степени тяжести, подтвержденные гистологическим методом исследования; регулярный менструальный цикл; способность выполнять требования протокола; предоставление письменного информированного согласия.

Критерии включения в ретроспективное исследование: репродуктивный возраст, наличие ВПЧ высокого канцерогенного риска, цитологическое заключение: NILM, хронический цервицит; ASCUS, LSIL;

HSIL; слабовыраженные и выраженные изменения эпителия шейки матки по кольпоскопии, явившиеся показанием для проведения биопсии, наличие результата гистологического исследования.

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

Все пациентки подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

Результаты собственных исследований и их обсуждение

Ретроспективный анализ сопоставления результатов цитологического и гистологического методов исследования с учетом критериев ASC у 415 пациенток с ВПЧ - ассоциированными заболеваниями шейки матки показал, что в группе с цитологическим заключением «NILM» соответствие (agree) диагноза было выявлено у 96 (23,13%); незначительное несоответствие (minor over) (NILM/LSIL) - 35 (8,43%); значительное несоответствие (major under) (NILM/HSIL) - 20 (4,8%).

В группе цитологического заключения «LSIL» определялось соответствие (agree) (LSIL/LSIL) у 59 (14,21%); незначительное несоответствие (minor over) (LSIL/NILM) – 86 (20,7%); незначительное несоответствие (minor under) (LSIL/CINII) – 62 (14,93%).

В группе с цитологическим заключением «HSIL» соответствие диагноза (agree) определялось (HSIL/HSIL) у 39 (9,39%); незначительное несоответствие (major over) (HSIL/LSIL) – 9 (2,1%); значительное несоответствие (minor over) (HSIL/хр.цервицит) – 9 (2,1%) (таблица 1).

Полученные нами данные совпадают с результатами исследования, в котором значительные несоответствия выявлены в 6,4% случаях, незначительные - в 20,4% [Gupta R, Hariprasad R, 20017]. Аналогичные

результаты были получены в исследовании J. Crasta и соавторов, где 7,1% составили случаи значительного несоответствия результатов морфологических исследований и N. Joste et al. - 11% случаев [Crasta JA. et al., 2009; N. Joste et al., 2000].

Полученные нами данные согласуются с результатами авторов Ouh YT, Park JJ. в которых несоответствия результатов морфологических методов исследования являются причиной неправильного ведения пациентов в ряде случаев с недооценкой степени тяжести поражения.

Таблица 1 - Сопоставление результатов цитологического и гистологического методов (ASC, 2017 г.) (n=415)

Цитологическое Заключение	Кол-во пациентов (n= 415)	Гистологическое заключение		
		Хр. цервицит	LSIL	HSIL
NILM, хр.цервицит	151	Соответствия (agree) 96 (23,3%)	Незначительные несоответствия (minor over) 35 (8,4%)	Значительные несоответствия (major under) 20 (4,8%)
LSIL	207	Незначительные несоответствия (minor over) 86 (20,8%)	Соответствия (agree) 59 (14,2%)	Незначительные несоответствия (minor under) 62 (14,9%)
HSIL	57	Значительные несоответствия (major over) 9 (2,1%)	Незначительные несоответствия (minor over) 9 (2,1%)	Соответствия (agree) 39 (9,4%)

При анализе клинико-anamнестических данных 116 пациенток, включенных в одномоментное проспективное исследование, не было выявлено статистически значимых отличий между группами по возрасту, антропометрическим данным, менструальной функции, акушерскому анамнезу и соматической заболеваемости. Анализ данных показал, что у пациенток с предраковыми и злокачественными заболеваниями шейки матки,

отмечается достоверно большее количество половых партнеров в анамнезе (3 и более). По полученным результатам, у пациенток 3 группы (HSIL) статистически значимо чаще встречалась ВПЧ-инфекция, вульвовагинальный кандидоз и ИППП в анамнезе по сравнению с 1 и 2 группами ($p=0,03$; $OR=2,7$ (1,1-7,5)).

При анализе различных типов ВПЧ по группам (IARC, Международное Агентство по изучению рака) было выявлено, что ВПЧ высокого канцерогенного риска (группы 1) определялся у большинства (86%) пациенток; вероятного канцерогенного риска (группы 2A) - 68 тип у 5,1%; возможного канцерогенного риска из (группы 2B) - 53, 66, 82 типы у 9,2%. Наиболее часто встречающимся типом ВПЧ во всех исследуемых группах явился ВПЧ 16: в 1 группе (хр.цервицит/ВПЧ+) – 13,8%; во 2 (LSIL/ВПЧ+) – 25%; в 3 (HSIL/ВПЧ+) – 53%; в 4 (РШМ/ВПЧ+) – 61%. Полученные нами данные совпадают с результатами работы Schiffman M. et al, [2015] в которой наибольшая частота заболевания HSIL и РШМ была обусловлена ВПЧ 16 типа – 16% и 23%, соответственно. В аналогичном исследовании Arbyn M. [2017] установил, что риск прогрессирования поражения до HSIL и РШМ у пациенток, инфицированных ВПЧ 16 типом, составил 17% и 19% соответственно.

При сравнительной оценке вирусной нагрузки по группам, были выявлены статистически значимые отличия в группах 3 и 4 (HSIL и РШМ) по сравнению с 1 и 2 (хр.цервицит/ВПЧ+ и LSIL) ($p<0,05$). Полученные нами результаты согласуются с данными Oyervides-Muñoz MA et al. [2020], где вирусная нагрузка была статистически значима при тяжелых поражениях шейки матки.

Результаты кольпоскопии показали, что у пациенток 3 и 4 групп (HSIL, РШМ) статистически значимо чаще наблюдались выраженные изменения. Выявленные изменения эпителия шейки матки коррелировали со степенью тяжести поражения, по сравнению с группой контроля ($p<0,05$), у большинства из них - 53% и 61%, был выявлен ВПЧ 16 типа. Высокая

чувствительность кольпоскопии в выявлении тяжелых поражений эпителия шейки матки, ассоциированных с ВПЧ ВР, показана в исследовании Mahira Jahic et. al. 2020.

Согласно второй задаче, всем пациенткам, включенным в исследование (n=116), был проведен липидомный анализ соскобов эпителия шейки матки с помощью метода хромато-масс-спектрометрии. Были выявлены следующие липиды: холестеринные эфиры (CE), фосфатидилхолины (PC), церамиды (Cer) и сфингомиелины (SM), содержание которых в эпителии шейки матки, значимо отличалось между исследуемыми группами. Липидом всех состояний значимо отличался от нормы. Так, в режиме положительных ионов уровень (Cer d) 16.0/16.0 статистически значимо понижен при легких поражениях (цервицит и LSIL) по сравнению с контролем, а (Cer) 16.0/18.0 – понижен при тяжелых поражениях (по сравнению с контролем) (рисунок 1).

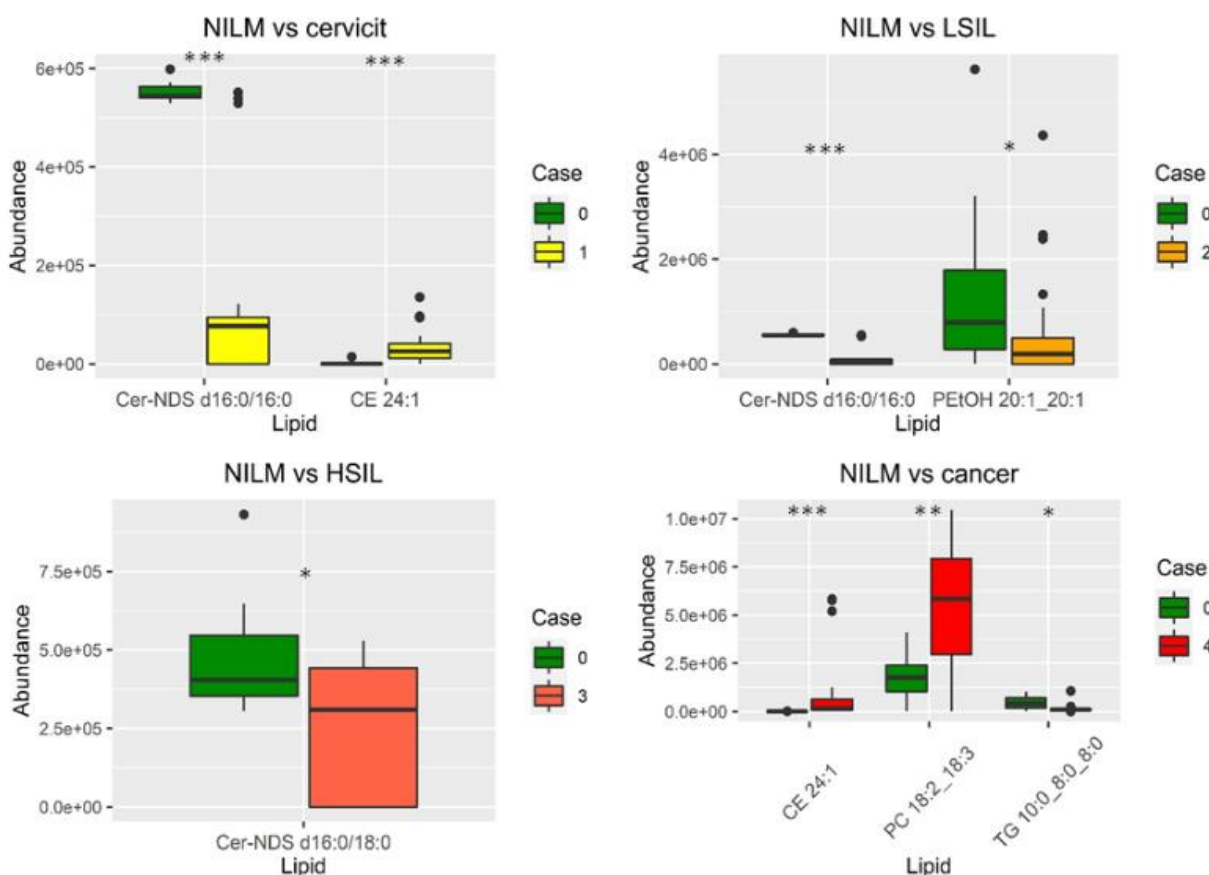


Рис.1. Липиды, определенные методом хромато-масс-спектрометрии в режиме положительных ионов.

Также в режиме отрицательных ионов статистически значимо повышен уровень фосфатидилхолинов (PC) 16.0_22.6 и (PC) 14.0_16.0 при тяжелых поражениях эпителия шейки (HSIL) матки по сравнению с легкими (LSIL) (рисунок 2).

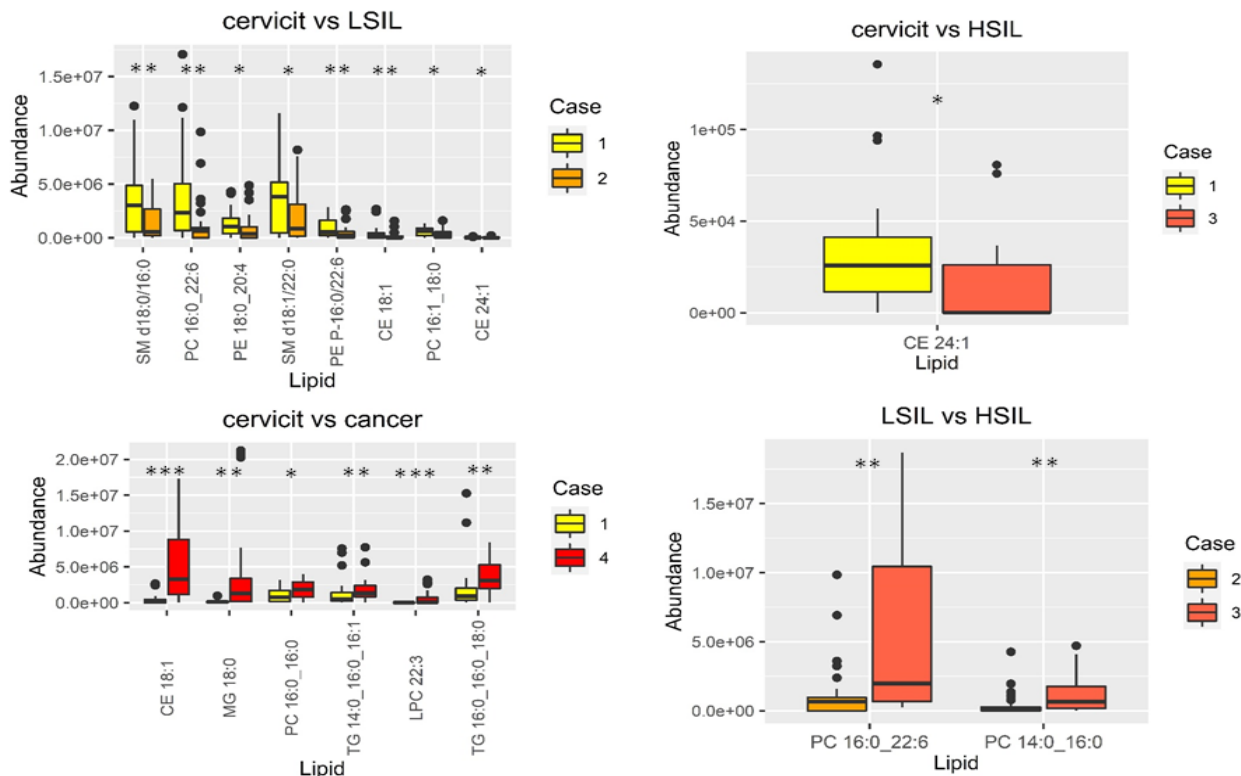


Рис. 2. Липиды, определенные методом хромото-масс-спектрометрии в режиме отрицательных ионов.

К липидным маркерам, характеризующим различия между HSIL и РШМ (в обеих модах), относятся преимущественно различные сфингомиелины (SM) и фосфатидилхолины (PC) (рисунок 3,4).

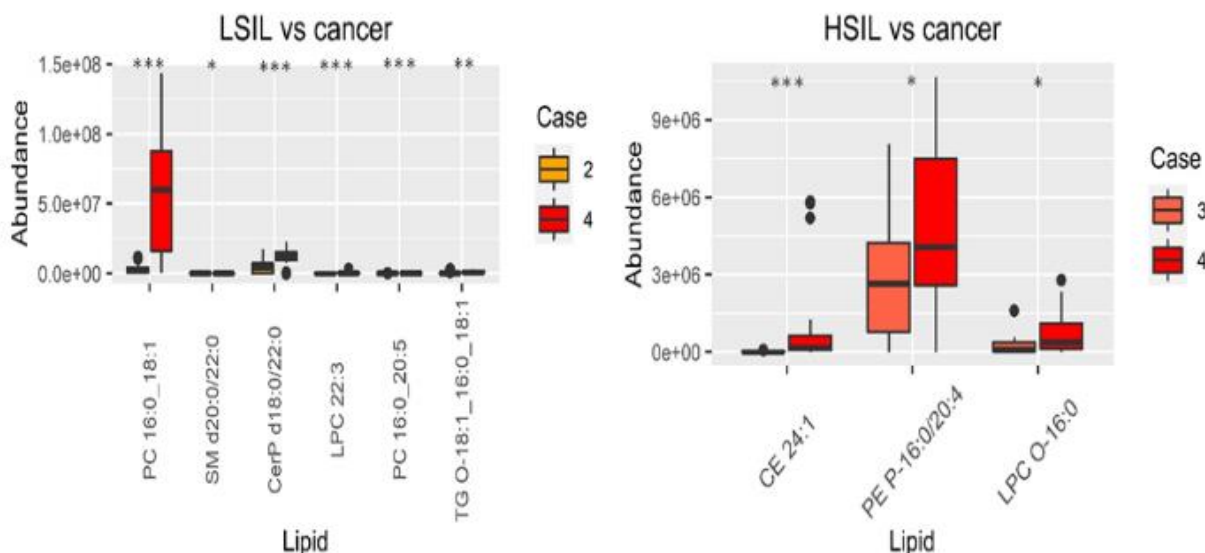


Рис. 3. Липиды, определенные методом хромато-масс-спектрометрии для тяжелых поражений шейки матки.

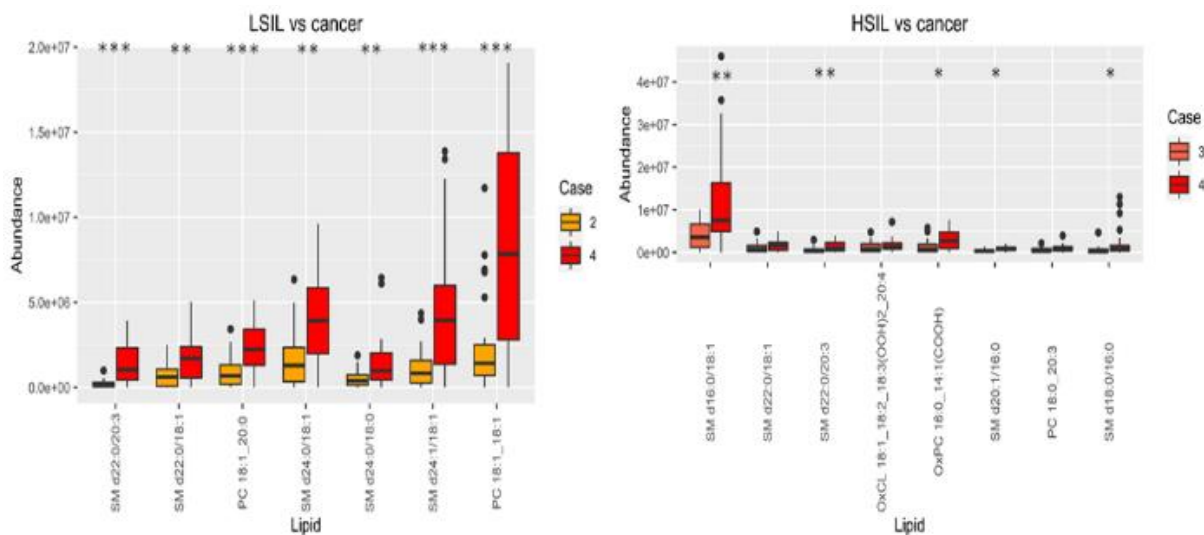


Рис. 4. Липиды, определенные методом хромато-масс-спектрометрии для тяжелых поражений шейки матки.

Мы предполагаем, что данные классы липидов определяются в пораженных клетках эпителия вследствие воздействия ВПЧ высокого канцерогенного риска и связаны с нарушением метаболизма клеток, подавлением апоптоза, стимуляцией процессов пролиферации, что позволяет рассматривать их в качестве биомаркеров диагностики предрака и рака шейки матки. В исследовании Gebhard R. et al. [1990] также было показано, что в раковых клетках нарушается метаболизм холестерина.

Согласно данным исследования Hannun Y. A., Obeid L., [2017] фосфатидилхолины ассоциированы с процессом канцерогенеза.

Как известно, основным метаболитом сфинголипидов является церамид. Gomez-Larrauri A. et al. [2020] продемонстрировали результаты работы, которые согласуются с данными нашего исследования. Авторами установлено, что CerK и SphK участвуют в воспалительных реакциях, некоторые из которых связаны с прогрессированием рака.

На следующем этапе исследования было установлено, что липиды, относящиеся к фосфатидилхолинам, сфингомиелинам, а также холестериновым эфирам, наиболее применимы для дифференциации тяжелых поражений шейки матки (HSIL и РШМ). Так, липидом при HSIL и РШМ относительно доброкачественных процессов, характеризуется ростом уровней фосфатидилхолинов (PC), сфингомиелинов (SM), а также снижением уровня холестериновых эфиров (CE): PC 16:0_18:1, PC 16:0_20:5, PC 16:0_22:6, SM d16:0/18:2, SM d20:0/14:0, SM d24:0/18:0, CE 18:1, CE 24:1. (таблица 2).

Таблица 2 - Идентифицированные липиды, ответственные за дифференцировку HSIL и РШМ.

Фосфатидилхолины (PC)	Сфингомиелины (SM)	Холестериновые эфиры (CE)
PC 16:0_18:1	SM d16:0/18:2	CE 18:1
PC 16:0_20:5	SM d 20:0/14:0	CE 24:1
PC 16:0_22:6	SM d 24:0/18:0	CE 18:1

На основании статистически значимых липидов, определенных на предыдущем этапе работы, были разработаны дискриминационные модели для попарного разделения исследуемых групп. Практически все модели характеризуются высоким значением площади под кривой (больше 0,7) (таблица 3).

Таблица 3 - Характеристики дискриминационных моделей на основе логистической регрессии, полученные в ходе кросс-валидации.

Режим ионов	Модель	AUC	Порог	Чув-ть	Спец-ть
положительные ионы	NILM /Хр.цервицит	0,89	0,97	1	0,67
	NILM/LSIL	0,93	0,96	1	0,57
	NILM/HSIL	0,68	0,81	1	0,44
	NILM/ПИМ	0,94	0,99	1	0,8
	Хр.цервицит/LSIL	0,81	0,13	0,74	0,95
	Хр.цервицит/HSIL	0,63	0,46	0,61	0,73
	Хр.цервицит/ПИМ	0,9	0,99	1	0,85
	LSIL/HSIL	0,68	0,37	0,67	0,75
	LSIL/ПИМ	0,89	0,01	0,91	0,88
	HSIL/ПИМ	0,95	0,99	1	0,86
Отрицательные ионы	NILM /Хр.цервицит	0,81	0,49	0,93	0,86
	NILM/LSIL	0,78	0,5	0,91	0,71
	NILM/HSIL	0,81	0,48	0,89	0,75
	NILM/ПИМ	0,75	0,99	0,87	0,63
	Хр.цервицит/LSIL	0,65	0,51	0,67	0,63
	Хр.цервицит/HSIL	0,82	0,15	0,64	0,87
	Хр.цервицит/ПИМ	0,94	0,01	0,92	0,96
	LSIL/HSIL	0,64	0,39	0,56	0,73
	LSIL/ПИМ	0,89	0,99	0,95	0,89
	HSIL/ПИМ	0,77	0,27	0,76	0,76

На основе дискриминационных моделей, были разработаны (итоговые) классификационные модели для дифференциальной диагностики поражений шейки матки (таблица 4). Таким образом, метод хромато-масс-спектрометрии целесообразно рассматривать для ранней диагностики цервикальных интраэпителиальных неоплазий и рака шейки матки в дополнении к клинико-морфологическим и молекулярно-генетическим методам исследования.

Таблица 4 - Классификационные модели для дифференциации тяжелых поражений (HSIL и PИИМ).

№ Модели	Диагноз	NILM	Хр. цервицит	LSIL	HSIL	PИИМ
1.Режим «+» ионов	NILM	7(0,37)	0	0	1	0
	Хр.цервицит	2	21(0,72)	4	2	0
	LSIL	4	2	24(0,80)	2	0
	HSIL	6	6	2	4(0,40)	1
	PИИМ	0	0	0	1	22(0,96)
2.Режим «->» ионов	NILM	7(0,88)	1	0	0	0
	Хр.цервицит	0	21(0,72)	3	5	0
	LSIL	0	7	17(0,65)	7	1
	HSIL	0	0	6	13(0,50)	0
	PИИМ	1	0	0	1	22(0,96)
3.Оба режима	NILM	8(0,89)	0	0	0	0
	Хр.цервицит	0	23(0,82)	2	4	0
	LSIL	0	5	23(0,74)	4	0
	HSIL	1	0	6	12(0,57)	0
	PИИМ	0	0	0	1	22(1,00)

С целью оценки диагностической значимости липидома был проведен корреляционный анализ хромато-масс-спектрометрических показателей с данными цитологических заключений, гистологических диагнозов и мРНК генов. При сравнении диагнозов, полученных по результатам цитологического исследования и гистологическом анализе от 116 пациенток, точность постановки диагноза по цитологии составила 55%. При этом точность диагностики тяжелых поражений шейки матки от поражений легкой степени по липидному профилю в режиме положительных ионов составила 70%, по липидному профилю в режиме отрицательных ионов - 71%, объединённая модель дала точность 79%. Была выявлена положительная корреляция уровней липидов с гистологическим диагнозом, свидетельствующая о том, что обнаруженные липиды могут быть

предложены в качестве маркеров диагностики тяжелых поражений шейки матки (HSIL и РШМ).

На следующем этапе работы, при проведении ROC-анализ, было установлено, что чувствительность определения тяжёлых неоплазий составила 83%, специфичность - 88%.

Результаты, полученные в нашем исследовании, согласуются с другими работами, в которых липиды также рассматриваются в качестве потенциальных биомаркеров, в том числе при ВПЧ-ассоциированных поражениях. Так, фосфатидилхолины связаны с процессом канцерогенеза [Zeisel S.H, Canty D.J.,1993]. A.M. Porcari et al. продемонстрировали разницу в уровнях церамидов и метаболитов сфингозина в нормальных тканях шейки матки и тканях с поражением HSIL+, а также потенциальную пригодность этих соединений для различения нормы и HSIL+ по анализу липидома тканей [Porcari A.M., et al.,2018]. Нейтральная сфингомиелиназа, обеспечивающая разложение сфингомиелинов на церамиды и фосфат холина, является опухолевым супрессором и участвует в активации сигналов, связанных с воспалительными процессами [Shamseddine A.A., Airola M.V.,2015; Hannun Y.A., Obeid L.M., 2018].

Таким образом, метод хромато-масс-спектрометрии целесообразно рассматривать для ранней диагностики предраковых заболеваний и рака шейки матки в дополнении к клиничко-морфологическим и молекулярно-генетическим методам исследования. По результатам проведенного исследования, нами оптимизирована тактика ведения пациенток с ВПЧ-ассоциированными заболеваниями шейки матки с учетом панели липидов, разработанной методом хромато-масс-спектрометрии неинвазивным способом.

ВЫВОДЫ

1. При сопоставлении морфологических методов исследования значительные несоответствия результатов цитологии с результатами гистологии были выявлены в 6,9% случаев, незначительные несоответствия составили 23,3%: в группе LSIL/HSIL -14,9%, NILM/LSIL – 8,4% соответственно, что явилось причиной гипо- и гипердиагностики.
2. У пациенток с ВПЧ-ассоциированными поражениями шейки матки при хромато-масс-спектрометрическом исследовании липидома, определены статистически значимые отличия в уровнях липидов, относящихся к классам холестериновых эфиров (CE), фосфатидилхолинов (PC), церамидов (Cer) и сфингомиелинов (SM).
3. Липидомный профиль эпителия шейки матки позволяет определять различия между нормой, воспалением, предраковыми поражениями и РШМ.
4. Разработана модель для диагностики тяжелых поражений шейки матки от поражений легкой степени по липидному профилю соскобов эпителия шейки матки, характеризующаяся точностью 79% (чувствительность - 83%, специфичность - 88%).
5. Установлена положительная корреляционная связь данных хромато-масс-спектрометрии и гистологического диагноза, свидетельствующая о высокой эффективности хромато-масс-спектрометрической диагностики тяжелых поражений шейки матки (HSIL и РШМ)
6. Оценка состояния эпителия шейки матки с помощью метода хромато-масс-спектрометрии является неинвазивным, быстрым методом ранней диагностики HSIL и РШМ, в том числе, дополнительным, оптимальным методом при несоответствии результатов клинико-морфологических методов исследования.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. При незначительных и значительных несоответствиях результатов цитологического и гистологического методов исследований целесообразно дополнительно проводить оценку состояния липидома шейки матки с целью точной дифференциации степени поражения и определения дальнейшей тактики ведения.
2. Оценка состояния липидома шейки матки целесообразно использовать у женщин с наличием ВПЧ ВР при нормальных результатах цитологии (NILM), у пациенток с ASCUS, LSIL\ВПЧ+ для выявления более тяжелых поражений.
3. У пациенток репродуктивного возраста с наличием LSIL(CINI) по результатам гистологии, исследование липидома позволит воздержаться от деструктивных методов лечения.
4. После хирургического лечения по поводу HSIL, исследование липидома эпителия шейки матки позволит определять пациенток с высоким риском рецидива заболевания.
5. У пациенток с хроническим цервицитом и длительной персистенции ВПЧ ВР, целесообразно проводить оценку липидома методом масс-спектрометрии для определения неопластического процесса и дальнейшей тактики ведения.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. ВПЧ-ассоциированные заболевания у женщин и мужчин: принципы диагностики, лечения, профилактики/ Назарова Н.М., Павлович С.В., **Аттоева Д.И.**// **Медицинский совет.** - 2019. - №7. - С.82-86.
2. Генитальные вирусные инфекции в клинической практике: эффективность комплексной терапии/ Назарова Н.М., **Аттоева Д.И.**, Довлетханова Э.Р., Прилепская В.Н.// **Медицинский совет.** - 2019. - № 13. - С. 166-171.
3. Липидомные маркеры и перспективы их использования при заболеваниях шейки матки, ассоциированных с вирусом папилломы человека/ **Аттоева**

- Д.И., Назарова Н.М., Стародубцева Н.Л., Чаговец В.В., Франкевич В.Е.//
Акушерство и гинекология. - 2019. - № 11. - С. 40-45.**
4. Клинические и молекулярно-генетические особенности заболеваний аногенитальной области, ассоциированных с вирусом папилломы человека/ Прилепская В.Н., Назарова Н.М., Трофимов Д.Ю., **Агтоева Д.И.// Акушерство и гинекология. - 2020. - № 2. - С. 45-49.**
 5. Сопоставление результатов клинических и морфологических методов исследований при ВПЧ-ассоциированных заболеваниях шейки матки (ретроспективное исследование)/ **Агтоева Д.И.**, Асатурова А.В., Назарова Н.М., Прилепская В.Н., Стародубцева Н.Л., Шешко П.Л, Уруймагова А.Т.// **Гинекология. - 2021. - Т. 23. - № 1. – С. 78-82.**
 6. Новая коронавирусная инфекция (COVID-19) как фактор риска реактивации генитального герпеса у женщин репродуктивного возраста/ Назарова Н.М., **Агтоева Д.И.**, Прилепская В.Н., Гусаков К.И., Довлетханова Э.Р., Абакарова П.Р.// **Медицинский оппонент. - 2021. - № 2 (14). - С. 22-28.**
 7. Поиск маркеров при ВПЧ-ассоциированных поражениях шейки матки методом хромато-масс-спектрометрии/ **Агтоева Д.И.**, Стародубцева Н.Л., Назарова Н.М., Токарева А.О., Чаговец В.В., Кукаев Е.Н., Франкевич В.Е., Сухих Г.Т.// **Доктор Ру. - 2021. - Т. 20. - № 8. - С. 48-58.**
 8. Дисбиотические нарушения и показатели врожденного иммунитета при бактериальном вагинозе/ Уруймагова А.Т., Прилепская В.Н., Межевитинова Е.А., Донников А.Е., **Агтоева Д.И.// Акушерство и гинекология. - 2021. - № 9. - С. 28-35.**