

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
АКУШЕРСТВА, ГИНЕКОЛОГИИ И ПЕРИНАТОЛОГИИ ИМЕНИ
АКАДЕМИКА В.И. КУЛАКОВА»

На правах рукописи

АТТООЕВА

Джамиля Исмаиловна

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

3.1.4 – акушерство и гинекология

Диссертация
на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Научные руководители:

доктор медицинских наук

НАЗАРОВА Нисо Мирзоевна

кандидат биологических наук

СТАРОДУБЦЕВА Наталия Леонидовна

Москва – 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ-----	3
Глава 1. ВПЧ-АССОЦИИРОВАННЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ: НОВЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ В ПОИСКЕ МАРКЕРОВ РАННЕЙ ДИАГНОСТИКИ И ПРОФИЛАКТИКИ РАКА ШЕЙКИ МАТКИ (обзор литературы)----- -----	12
1.1 Папилломавирусная инфекция: спектр генотипов вируса и патогенетические особенности течения инфекции-----	12
1.2 Анализ сопоставления результатов морфологических методов исследования у пациенток с ВПЧ-ассоциированными заболеваниями шейки матки-----	15
1.3 Метаболомика: возможности и перспективы масс-спектрометрии в диагностике ВПЧ-ассоциированных заболеваний шейки матки ----- -----	22
Глава 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ-----	29
2.1 Материал исследования-----	30
2.2 Методы исследования-----	31
2.3 Методы статистической обработки-----	40
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ-----	45
3.1 Результаты ретроспективного анализа-----	46
3.2 Результаты проспективного исследования-----	54
3.2.1 Клиническая характеристика обследуемых женщин-----	54
3.2.2 Результаты цитологического исследования-----	64
3.2.3 Результаты ВПЧ-типирования и экспрессии мРНК генов-----	65
3.2.4 Результаты кольпоскопии-----	74
3.2.5 Результаты липидомного анализа соскобов эпителия шейки матки-----	80
Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ-----	99
ВЫВОДЫ-----	108
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ-----	109
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ-----	110

ВВЕДЕНИЕ

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 [1]. В Российской Федерации по данным среди онкологических заболеваний репродуктивных органов РШМ занимает 3-е место среди женщин, уступая раку молочной железы и раку тела матки [2]. Основным этиологическим фактором развития цервикальной интраэпителиальной неоплазии и рака шейки матки являются высокоонкогенные типы вируса папилломы человека (ВПЧ ВР) - 16,18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 56, 52, 59, 68. [1,3]. Установлено, что интеграция генома ВПЧ в хромосомный аппарат человека является ключевым генетическим этапом в канцерогенезе шейки матки [4]. Ряд исследований показал, что длительная персистенция (более двух лет) ВПЧ ВР у 27% женщин способствует развитию тяжелой цервикальной неоплазии (HSIL) [4,5].

Одной из задач цитологического исследования является выявление предраковых заболеваний шейки матки для их своевременного лечения [16]. Несмотря на то, что цервикальный скрининг позволяет снизить риск РШМ благодаря цитологическому исследованию шейки матки, решающее значение в постановке правильного диагноза принадлежит гистологическому исследованию, так как его результат определяет выбор метода лечения [16,17].

Корреляция результатов морфологических методов исследования — цитологии и гистологии (cytology histology correlation - ЧНС) — является одним из важных критериев оценки качества скрининга РШМ [17,18,19]. Так, анализ ряда исследований показал, что 31% цитологических заключений не соответствует последующему гистологическому диагнозу [22]. Кроме того, авторы Gupta R. et al. при сопоставлении цитологических и гистологических заключений выявили значительные (6,4%) и незначительные (20,4%) несоответствия результатов [23,24].

Yung Take Ouh et. al. установили, что несоответствия между цитологическим и гистологическим исследованиями могут стать причиной неправильного ведения пациентов [20]. В ряде исследований при проведении биопсии шейки матки, помимо наличия ВПЧ ВР и результатов цитологии, особое внимание уделялось возрасту пациенток. Так, расхождение результатов морфологических методов исследований у пациенток старше 45 лет, авторы связывали с расположением области стыка эпителиев в эндоцервикс, и в ряде случаев с наличием сопутствующей атрофии эпителия [26]. Scheck SM, Liddle C подчеркивают, что в условиях несоответствия цитологии с результатами гистологии (ASC-H и HSIL по цитологии, отрицательная гистология), целесообразно проведение лечения или постоянного динамического наблюдения, в связи с высокой вероятностью развития тяжелой степени поражения шейки матки в течение пяти лет (48%) [29].

Raab SS, Grzybicki DM показали, что персонифицированный подход к ведению пациенток с патологией шейки матки, ассоциированной с ВПЧ, при несоответствии морфологических методов исследования, предусматривает разработку дополнительных неинвазивных методов диагностики степени тяжести поражения, позволяющих повысить качество постановки точного диагноза и обеспечивать уверенность специалиста в дальнейшем ведении пациента [19].

Современная медицинская наука имеет большие возможности для поиска новых (экспресс) методов ранней диагностики предраковых заболеваний шейки матки, а также определения группы риска по развитию рецидивирования заболевания после хирургического лечения HSIL. В настоящее время широко обсуждаются новые и интенсивно развивающиеся направления науки – метаболомика, липидомика, протеомика, геномика, транскриптомика, секретомика [82, 93].

Липидомный анализ неопластически измененных тканей шейки матки с помощью метода хромато-масс-спектрометрии рассматривается как высокоинформативный, высокоточный метод поиска биомаркеров ВПЧ-ассоциированных заболеваний шейки матки. Исследования липидного профиля показали, что при неопластической трансформации эпителия шейки матки определяются количественные и качественные изменения показателей уровня метаболитов, включая липиды в пораженных клетках.

Степень разработанности темы исследования

На сегодняшний день в мировой литературе крайне мало исследований, посвященных изучению липидома эпителия шейки матки при ВПЧ-ассоциированных заболеваниях методом хромато-масс-спектрометрии. Это обуславливает необходимость исследования диагностического потенциала липидного состава эпителия шейки матки при цервикальной интраэпителиальной неоплазии различной степени тяжести. Чрезвычайно важным и перспективным является создание панели липидов-маркеров для раннего выявления HSIL и рака шейки матки, в том числе у пациенток со значительными и незначительными несоответствиями результатов клинико-морфологических методов исследования.

Цель исследования

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

Задачи исследования

1. Провести ретроспективный анализ данных сопоставления клинического, цитологического и гистологического 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 (LSIL, HSIL, P11M) заболеваниями методом хромато-масс-спектрометрии.
3. Определить липидные панели и разработать математические модели, позволяющие проводить быструю дифференциальную диагностику степени тяжести поражения (LSIL, HSIL, P11M) 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 (LSIL, HSIL, P11M).
5. Разработать тактику ведения пациенток с ВПЧ-ассоциированными заболеваниями шейки матки с учетом клинических, морфологических, молекулярно-генетических и масс-спектрометрических данных.

Научная новизна исследования

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

Впервые продемонстрирована высокая чувствительность и специфичность неинвазивной диагностики ВПЧ-ассоциированных поражений методом масс-спектрометрии путем оценки липидома соскоба эпителия шейки матки.

Впервые установлена положительная корреляционная связь масс-спектрометрических показателей, гистологических данных и мРНК генов в дифференцировке HSIL и РШМ.

Определена диагностическая панель липидов, позволяющих определять группу риска по рецидивированию процесса после хирургического лечения HSIL.

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(CINI) по результатам гистологии с учетом разработанной панели липидомных маркеров, позволяющая неинвазивным способом, быстро выявлять

пациенток с наличием более тяжелого поражения (HSIL), а также избежать неоправданных деструктивных вмешательств на шейке матки.

Усовершенствована тактика ведения пациенток после хирургического лечения HSIL, с учетом клинических, молекулярно-генетических результатов и данных масс-спектрометрии, позволяющих определять пациенток с высоким риском рецидива заболевания.

Положения, выносимые на защиту

1. Сопоставление результатов цитологического и гистологического методов исследований у пациенток с патологией шейки матки, ассоциированной с ВПЧ высокого канцерогенного риска, показал, что имели место как случаи значительного, так и незначительного несоответствия диагноза, оказывающих влияние на необоснованный выбор дальнейшей тактики ведения
2. Определены липиды, содержание которых в эпителии шейки матки, значительно 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 липидома, позволяющая выявлять тяжелые поражения шейки матки и демонстрирующая высокую эффективность хромато-масс-спектрометрии в диагностике ВПЧ-ассоциированных заболеваний.

Методология и методы исследования

Согласно критериям включения и исключения, в одномоментное проспективное когортное исследование было набрано 116 пациенток. В зависимости от результатов гистологического исследования биоптатов шейки матки было сформировано 4 группы: 1 - хронический цервицит/ВПЧ+

(n=29), LSIL/ВПЧ+ (n=32), HSIL/ВПЧ+ (n=32) и РШМ/ВПЧ+ (n=23). Для обследования женщин использовались общеклинические и специальные методы. К специальным методам относились липидомный анализ соскобов эпителия шейки матки методом хромато-масс-спектрометрии с последующей идентификацией группы липидов, достоверно выделяющих группы с неопластическими процессами шейки матки; молекулярно-генетические методы – определение уровня экспрессии мРНК генов (p16, Ki67, PGR, BCL2). Также был проведен ретроспективный анализ сопоставления морфологических методов исследования (цитологического и гистологического) 415 пациенток с ВПЧ-ассоциированными заболеваниями шейки матки (хр.цервицит/ВПЧ+, LSIL, HSIL, РШМ) за период 2018-2019 гг. Все пациентки подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании. Исследование было одобрено экспертной комиссией ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России по вопросам медицинской этики.

Личный вклад автора

Автор участвовал в выборе темы научной работы, в формулировке цели, задач, а также создании дизайна исследования. Диссертантом проведен анализ литературных данных согласно теме исследования, а также систематизация полученных данных. Автор принимал непосредственное участие в клинико-лабораторном обследовании пациенток, а также лечении и дальнейшем ведении, осуществлял забор биологического материала, анализ медицинской документации, статистическую обработку и интерпретацию полученных результатов исследования.

Степень достоверности результатов исследования

Достоверность данных исследования подтверждается объемом выборки пациенток, включенных в исследование (n=116), а также результатами статистической обработки данных. Достоверность полученных результатов

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

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.

Апробация диссертации

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 (Якутия)», Республика Саха, 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.

Диссертационная работа обсуждена на межклинической конференции 07.07.2021г. и на заседании апробационной комиссии ФГБУ «НМИЦ АГиП им. В.И. Кулакова» Минздрава России 18.10.2021г. Протокол №6.

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 АГиП 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 125 страницах компьютерного текста и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, клинико-анамнестической характеристики обследованных групп, результатов собственных исследований и их обсуждения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы.

ГЛАВА 1. ВПЧ-АССОЦИИРОВАННЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ: НОВЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ В ПОИСКЕ МАРКЕРОВ РАННЕЙ ДИАГНОСТИКИ И ПРОФИЛАКТИКИ РАКА ШЕЙКИ МАТКИ

(обзор литературы)

1.1. Папилломавирусная инфекция: спектр генотипов вируса и патогенетические особенности течения инфекции

В настоящее время сформированы четкие понятия об этиологических факторах и патогенезе развития предраковых процессов и рака шейки матки (РШМ), а также внедрен в практику достаточно надежный диагностический контроль. Тем не менее, РШМ остается одной из самых острых и актуальных проблем в онкогинекологии и не имеет тенденции к снижению показателей заболеваемости и смертности. По оценкам Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ), число заболевших РШМ составляет более 500 000 в год на 3 млрд 560 млн женщин мира, и около 260 000 женщин каждый год умирают от рака шейки матки РШМ [1].

Главным этиологическим фактором развития РШМ являются высокоонкогенные типы вируса папилломы человека (ВПЧ ВР). Впервые взаимосвязь между развитием РШМ и наличием ВПЧ ВР была установлена Н. zur Hausen более тридцати лет назад [2].

ВПЧ представляет собой небольших размеров ДНК-содержащий вирус. Многочисленные работы по изучению различных типов ВПЧ позволяют предположить их общую родословную, которая со временем диверсифицировалась и включает в себя специфические типы, сохранившие склонность к заражению базальных эпителиальных клеток кожи или эпителия слизистых оболочек, преимущественно урогенитального тракта и ротоглотки [3]. Установлено, что интеграция генома ВПЧ в хромосомный аппарат человека является ключевым генетическим этапом в канцерогенезе шейки матки [4].

В 1970-х годах исследования гибридизации с использованием ДНК в пораженной коже и слизистой оболочке половых органов показали, что существуют различия в типах ВПЧ. Как известно, существует более 200 различных типов ВПЧ, классифицированных филогенетически в группы α , β , γ , δ и μ на основе различий в их нуклеотидных последовательностях. Типы ВПЧ рода α , поражая слизистую оболочку половых органов, вызывают примерно 95% инвазивных видов РШМ-это плоскоклеточный рак, в то время как μ менее 5% - аденокарциномы, и каждый из них связан с различными типами ВПЧ [5].

В настоящее время ВПЧ 16 и ВПЧ 18 являются наиболее распространенными типами и связаны с 50-70% и 20-30% инвазивных случаев РШМ, диагностированных во всем мире соответственно; еще 20% связаны с 31, 33, 35, 45, 52 и 58 типами [6]. Важно отметить, что ВПЧ ВР у 80-90% инфицированных спонтанно элиминируется в среднем в течение 18-36 месяцев без развития CIN. Риск развития предраковых изменений и РШМ имеют только женщины с персистенцией ВПЧ ВР [7].

Многочисленные клинические исследования показали, что неопластическая трансформация эпителиальных клеток связана с интеграцией вирусного генома и генетической нестабильностью эпителиальных клеток, которая возникает в течение длительного периода персистенции ВПЧ [8]. Персистенция ВПЧ – это обнаружение одного и того же типа ВПЧ ВР на протяжении длительного периода времени. Важную роль в канцерогенезе играют белки Е6 и Е7. Они инактивируют белки-супрессоры опухолевого роста p53 и pRb, нарушая нормальный жизненный цикл клетки, предотвращая ее апоптоз, что приводит к неоплазии [9].

ВПЧ-инфекция в норме контролируется клеточным и гуморальным звеньями иммунной системы. Регрессия индуцированных ВПЧ-инфекцией образований, происходит под действием цитотоксических Т-клеток и НК-клеток, в то время как защита от последующего инфицирования теми же

типами ВПЧ зависит от стимуляции адаптивного иммунного ответа и производства антител [10].

На сегодняшний день установлено, что метаболические изменения в клетке играют важную роль в развитии и прогрессировании неопластического процесса. Метаболизм злокачественных клеток перепрограммирован на поддержание их неконтролируемой пролиферации. Геном всех ВПЧ содержит три функциональные части: ранний (E) участок, кодирующий белки (E1 – E7), необходимые для репликации вируса; поздняя (L) область, которая кодирует структурные белки (L1 – L2), необходимые для сборки вириона; и длинная контрольная область, которая содержит цис-элементы, необходимые для репликации и транскрипции вирусной ДНК. Белки E1 и E2 инициируют репликацию вирусной ДНК, а также действуют как активаторы транскрипции [11]. Несмотря на то, что большинство типов ВПЧ элиминируются иммунной системой в течение нескольких месяцев, некоторые подтипы высокого риска (ВПЧ16 и ВПЧ18), сохраняются и экспрессируют вирусные онкогены E6 и E7, что приводит к повышенной геномной нестабильности, накоплению соматических мутаций и интеграции ВПЧ в геном хозяина, что способствует малигнизации [12,13].

Недавно было обнаружено, что белок, редактирующий мРНК аполипопротеина В, каталитический полипептид (АРОВЕС), играет важную роль в молекулярном патогенезе рака [14]. Было показано, что семейство АРОВЕС3 индуцирует опухолевые мутации за счет аберрантного механизма редактирования ДНК. В целом ферменты АРОВЕС3 играют ключевую роль в дезаминировании цитидина до уридина в ДНК и РНК, чтобы контролировать различные биологические процессы, такие как регуляция экспрессии белка, врожденный иммунитет и эмбриональное развитие. Врожденная противовирусная активность белков семейства АРОВЕС3 ограничивает ретровирусы, эндогенные ретроэлементы и ДНК-вирусы, включая ВПЧ, который является ведущим фактором риска развития рака шейки матки.

Многочисленные исследования последних лет показали, что спектр генотипов ВПЧ варьирует в различных регионах. Наибольшее число исследований по оценке распространённости ВПЧ-инфекции посвящено изучению ВПЧ из рода α , в основном поражающие слизистые оболочки аногенитальной области [11]. Установлено пять наиболее распространенных типов генитальной ВПЧ-инфекции, обнаруживаемых среди здоровых женщин: ВПЧ 16 (3,2%), ВПЧ 18 (1,4%), ВПЧ 52 (0,9%), ВПЧ 31 (0,8%) и ВПЧ 58 (0,7%) – все относятся к типам высокого онкогенного риска. По сравнению с другими типами, в Европе особенно часто встречается ВПЧ 31 (2,3%), а ВПЧ 52 – в Северной Америке (2,1%), Африке (2,4%) и Азии (0,7%). В Российской Федерации также проводились исследования по оценке распространённости генитальной ВПЧ-инфекции. В основной популяции по регионам России превалирует ВПЧ 16 типа, реже встречаются типы 31, 33, 56 и 18 [15].

1.2. Сопоставление результатов цитологического и гистологического методов исследования у пациенток с ВПЧ-ассоциированными заболеваниями шейки матки

Цервикальный скрининг позволяет снизить риск РШМ благодаря цитологическому исследованию шейки матки, однако решающее значение в постановке правильного диагноза принадлежит гистологическому исследованию, так как его результат определяет выбор метода лечения [16].

Корреляция цитологии и гистологии - важный показатель качества скрининга рака шейки матки [17]. Отсутствие четких критериев оценки цитологических и гистологических расхождений обуславливает сложности лабораторной диагностики в постановке точного диагноза. Для оптимизации сопоставления этих методов «Коллегия американских патологов и Комитет 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) (ASC)) сформулировали рекомендации, которые содержат ориентировочные критерии оценки несоответствий цитологических заключений и гистологического метода исследования [18]. Согласно рекомендациям ASC, лаборатории должны содержать критерии включения образцов, хронометраж ЧНС (ретроспективный или в режиме реального времени), определение корреляции, различные уровни расхождения цитологического и гистологического методов и наблюдение за некоррелирующими парами. Соответствие цитологического заключения с гистологическим диагнозом является важным методом оценки качества работы патологоанатомических лабораторий [19, 20].

Данные литературы показали широкие различия в методологии, используемой для оценки ЧНС [21]. Анализ результатов исследования I. Alanbay и соавторов показал 31% случая несоответствия цитологического заключения с последующим гистологическим диагнозом [22]. Gupta и соавторы при оценке совпадений цитологии с результатами гистологии выявили значительные несоответствия в 6,4% случаях, незначительные - в 20,4% [23]. Аналогичные результаты (7,1%) были получены в исследовании J. Crasta и соавторов [24]. Также, N. Joste и соавторы, установили 11% случаев расхождений при сопоставлении 1582 цитологических заключений с гистологическим диагнозом [25, 26].

Из недостатков цитологического метода следует отметить его недостаточно высокую чувствительность. Так, PL Martin-Hirsch, G Koliopoulos проанализировали результаты 12 исследований по оценке цитологического скрининга в некоторых группах населения [27]. В этих исследованиях продемонстрирована высокая специфичность цитологического исследования (85–100%), однако чувствительность метода была намного ниже и варьировала от 22 до 99%. Таким образом, авторы сделали вывод о том, что чувствительность цитологии для выявления поражений тяжелой степени (HSIL) не достигает 70%, в 20–30% случаях дает ложноотрицательные

результаты. Monsonego J. и соавторы установили, что в 1/3 случаев инвазивный рак обнаруживается у женщин, которые проходят регулярный скрининг, в виду низкой чувствительности цитологического метода [28].

Результаты исследования Scheck SM, Liddle C продемонстрировали 30-50% вероятность развития HSIL в течение пяти лет у пациенток с исходным цитологическим заключением ASC-H (46%) или HSIL (50%) при отрицательных результатах гистологии [29].

Результаты мета-анализа установили, что у женщин с цитологическим заключением ASCUS морфологически верифицирован HSIL так же, как и у пациенток с цитологическим заключением LSIL [30]. В 5% случаев онкологические заболевания наблюдались у женщин, которые подверглись неправильному лечению после получения аномальных результатов цитологического исследования.

Vofin AM. et. all показали, что специфичность цитологического исследования варьирует от 14% до 97%, со средним значением 69%, а чувствительность - между 11% и 99% со средним значением 58% [31].

Чувствительность цитологии для поражений HSIL (CIN2+) не достигает 65%, что дает до 20–30% ложноотрицательных результатов. В исследовании авторов Kudela E, Lausekova Z, Nachajova M, et al. было установлено, что у женщин с цитологическим заключением ASCUS выявлена высокая оценка Шведа с пороговым значением 8, что не исключает поражения высокой степени и дает возможность врачу в подобных случаях действовать по принципу «увидеть и лечить» [32].

Аналогичные выводы сделали и авторы Jung Y, Lee AR, Lee SJ, Lee YS, установившие, что пациенты с ASC-H, HSIL при наличии ВПЧ 16 типа могут подвергаться конизации без предварительной биопсии шейки матки. Логистический регрессионный анализ показал, что наличие атипичных клеток не исключает плоскоклеточное интраэпителиальное поражение высокой степени (ASC-H и HSIL). Авторами работы было установлено, что

коэффициент соответствия гистопатологии между пункционной биопсией и ЛЕЕР составила 43,3% [33]. Показатели выявления более тяжелых поражений при помощи ЛЕЕР, по сравнению с биопсией составили 23,1%. Частота менее выраженных поражений, обнаруженных с помощью ЛЕЕР, по сравнению с биопсией, составила 33,6%.

Рядом авторов отмечена опасная недооценка степени тяжести поражения шейки матки в цитологических мазках при наличии у больных более тяжелых поражений. Так, среди больных с LSIL в 26% случаев выявлен CIN2 и в 5% - CIN3. Результат ряда исследований свидетельствует о неполном совпадении цитологического заключения и гистологического диагноза с вероятностью недооценки тяжелых повреждений при LSIL в 31% случаев, учитывая различную тактику ведения пациентов, в частности, выжидательную при LSIL. Авторами Ince U, Aydin O, Peker по результатам исследования, было предложено рассматривать LSIL-H как отдельную диагностическую категорию, в связи с его промежуточным положением между LSIL и HSIL, а также определить для данного заключения конкретные цитоморфологические критерии. Результаты работы показывают, что диагностическая категория LSIL-H может помочь в более быстром обнаружении и лечении некоторых пациентов с CIN 2+ [34].

Расхождения результатов цитологического и гистологического исследований могут быть обусловлены тем, что пораженные вирусом папилломы человека клетки, не всегда попадают в мазок, что может быть причиной ложноотрицательных результатов цитологического анализа. По результатам метаанализа, проведенного в США, установлено, что у пациенток с цитологическим заключением LSIL гистологически верифицирован HSIL (CINII 17%, CINIII 12%) [35]. Несмотря на то, что лечение необходимо только при предраковых поражениях шейки матки, существуют разногласия - какой алгоритм действий необходим женщинами с «малыми» формами поражения, в частности цитологическим заключением

ASCUS, LSIL. Основная тактика ведения пациенток с диагнозом LSIL – выжидательная. Это связано с тем, что CIN I способен самостоятельно регрессировать в течение 1-2 лет. Так, по результатам ретроспективного когортного исследования женщин с гистологическим диагнозом LSIL, регресс CIN I наблюдался у 88,5%, в то время как прогрессирование в сторону HSIL шейки матки было зарегистрировано у 0,7% пациенток. У 10,8% женщин не было отмечено изменений ни в сторону регресса, ни в сторону прогрессирования поражения шейки матки [36].

Риск возникновения HSIL у пациенток с ВПЧ 16/18 типов значительно выше при цитологическом заключении LSIL (19%) по сравнению с пациентками – носителями других типов ВПЧ (5%) [37]. Неопластический процесс может и должен быть диагностирован на этапе предраковых поражений – CIN II-III, развивающихся в течение нескольких лет. На этих стадиях цервикального канцерогенеза возможно неосложненное органосохраняющее лечение в объеме конизации шейки матки с сохранением фертильности. Однако результаты исследования Annarosa Del Mistro, Mario Matteucci, что рецидивирование CIN 2/3 после проведенного лечения отмечается в 9% случаев [38].

По данным зарубежных исследований, частота развития рецидивов CIN и РШМ после хирургического лечения варьирует от 1,2% до 30%, при этом наиболее распространенным методом лечения CIN2+ в практике в настоящее время является петлевая электроэксцизия шейки матки (LEEP) [39]. По результатам исследования El-Nashar S.A., рецидивы CIN и РШМ достоверно чаще встречались у женщин, перенесших LEEP (15,6%), чем у женщин после ножевой конизации шейки матки (7,38) [40]. В то же время Jiang Y. делает вывод о том, что оба метода одинаково сопоставимы в отношении развития возможных рецидивов [41].

Большинство исследователей сходятся во мнении – процедура LEEP имеет ряд преимуществ перед ножевой конизацией шейки матки - по

времени выполнения она быстрее, комфортнее для пациентки, вызывает меньший объем интраоперационных кровотечений, пациентка тратит меньше времени на пребывание в лечебном учреждении. Кроме того, LEEP вызывает достоверно меньшее число гинекологических (рубцовая деформация, стеноз наружного зева шейки матки) и акушерских осложнений, по сравнению с ножевой конизацией шейки матки, в связи с чем LEEP может использоваться в качестве метода выбора в лечении CIN2+ у пациенток, еще не реализовавших репродуктивную функцию [40].

Результаты исследования Jiang Y. с коллегами показали, что позитивные края резекции были выявлены в 44% случаев после проведения LEEP и в 29% случаев после ножевой конизации шейки матки. Однако в исследовании Wang X.I. частота встречаемости позитивных краев резекции была одинаковой для обоих методов [42].

В результате проведенного мультивариантного логистического регрессионного анализа Wu J, Jia Y, и соавторы пришли к выводу, что наличие ВПЧ 16 типа до операции (ОР 8.208, 95% ДИ 1.514-44.489), позитивные края эксцизии (ОР 4.811, 95% ДИ 1.154-20.258), персистенция ВПЧ ВР (ОР 5.231, 95% ДИ 1.141-23.976) и ненормальные результаты жидкостной цитологии через 3 месяца после эксцизии (ОР 16.495, 95% ДИ 3.689-73.764) являются факторами риска развития рецидивов CIN 2+ у пациенток после хирургического лечения ВПЧ-ассоциированных заболеваний шейки матки [43].

По данным зарубежных исследований, частота обнаружения ВПЧ-инфекции у пациенток после хирургического лечения CIN и РШМ варьировала от 0% до 47%. Анализ данных исследования показал, что реже всего ВПЧ-инфекция возникала у молодых женщин, а также у пациенток, перенесших лазерную конизацию шейки матки [44].

Одним из наиболее распространенных осложнений хирургического лечения являются стеноз наружного зева, истмикоцервикальная недостаточность и, как следствие, увеличение частоты преждевременных родов [45]. Так, по данным проведенного исследования, стеноз наружного зева был выявлен у 4,4% и 5,4% пациенток, перенесших ножевую конизацию шейки матки. Авторы делают вывод о том, что возраст старше 46 лет, а также короткий промежуток времени между свершившимися родами и последующей ножевой конизацией шейки матки (12 месяцев и менее) являются факторами риска развития стеноза наружного зева [46].

Chen LM, Liu L установлено, что послеоперационное цитологическое исследование в сочетании с выявлением ВПЧ ВР имеет высокую чувствительность и высокую отрицательную предикторную ценность рецидива HSIL [47]. Аномальный результат жидкостной цитологии и положительный ВПЧ-тест после LEEP являются независимыми факторами, влияющими на рецидив HSIL у пациентов после LEEP ($P < 0,05$).

Современный цервикальный скрининг включает ВПЧ-генотипирование на разных этапах обследования. Это позволяет выявлять на 30-50% больше предраковых поражений по сравнению с только цитологическим скринингом. Однако данные методы имеют ряд недостатков: субъективность, невозможность прогноза развития процесса в сторону регресса или прогрессирования при предраковом поражении эпителия шейки матки легкой степени тяжести, трудности ранней диагностики CIN и РШМ в группах высокого риска, вопросы ведения пациенток группы риска по прогрессированию неопластического процесса, сложность дифференциальной диагностики CIN2.

Современная медицина имеет большие возможности для поиска новых (экспресс) методов ранней диагностики предраковых заболеваний шейки матки. В настоящее время широко обсуждаются новые и интенсивно

развивающиеся направления науки – метаболомика, липидомика, протеомика, геномика, транскриптомика, секретомика.

1.3. Метаболомика: возможности и перспективы масс-спектрометрии в диагностике ВПЧ-ассоциированных заболеваний шейки матки

Имеющиеся на сегодняшний день немногочисленные исследования липидомики уже продемонстрировали потенциальную перспективу этой области во многих направлениях медицины, в том числе и в онкологии. В последнее время значительный прогресс в комплексном анализе генома человека, эпигенома, транскриптома, протеома и метаболома привел к революционным изменениям в открытии биомаркеров рака [48].

Липидомный анализ неопластически измененных тканей шейки матки с помощью метода масс-спектрометрии рассматривается как высокоинформативный метод поиска биомаркеров ВПЧ-ассоциированных заболеваний шейки матки. Липидомика имеет большой потенциал с точки зрения поиска новых маркеров онкологических заболеваний. Опубликованы зарубежные работы с описанием исследований липидного профиля тканей при раке молочной железы, щитовидной железы, желудка, раке печени, колоректальном раке, а также при раке эндометрия и яичников с помощью метода масс-спектрометрии. Исследование липидома проводят как в пораженных тканях, так и в сыворотке и плазме [49].

В клинической практике с использованием протеомных методов были сформулированы панели для диагностики неопластической трансформации эпителия шейки матки. Данное исследование выявило статистически значимое изменение уровней липидов, относящихся к фосфатидилхолинам, этаноламинам и сфингомиелинам в тканях, подвергшихся неопластической трансформации вследствие воздействия ВПЧ [50,51].

На протяжении последнего десятилетия масс-спектрометрия регулярно использовалась для масштабной идентификации белков в сложных биологических средах. Различные геномные и протеомные инструменты были использованы для изучения метаболизма и метаболомики рака, чтобы понять, как раковые клетки выживают в окружающей среде [52].

Zhou W, Liotta LA продемонстрировали, что уровень экспрессии L-лактатдегидрогеназы-A (ЛДГ-A) в клетках рака поджелудочной железы существенно не изменяется по сравнению с нормальными клетками протоков, но L-лактатдегидрогеназы-B (ЛДГ-B) значительно повышается в раковых клетках [53]. Примечательно, что Hussien et al. также показали, что клеточная линия рака молочной железы MCF-7 экспрессирует в основном ЛДГ-B [54].

Липиды – это группа органических соединений, включающих жиры и жироподобные вещества. Основную массу липидов в организме составляют жиры – триацилглицериды, служащие формой депонирования энергии. Фосфолипиды – это большой класс липидов, формирующих бислойную структуру мембран, в которую погружены белки. Липиды выполняют основную функцию в накоплении энергии, структурную функцию, поддерживая клеточный каркас, участвуют в процессах молекулярного транспорта, а также различных ферментативных процессов.

В связи с малой изученностью фосфолипидов, липидомика представляет интерес как потенциальный «ключ» в поиске биомаркеров различных заболеваний, в частности предрака и рака шейки матки. Функции липидов многогранны: они запасают энергию, являются структурными компонентами клеточных мембран и сигнальными молекулами, которые участвуют в клеточном росте, воспалении и иммунном ответе. Повышение уровня биосинтеза липидов является характерной особенностью малигнизации. Кроме того, увеличенный синтез жирных кислот необходим для быстрой пролиферации опухолевых клеток для того, чтобы постоянно обеспечивать

их субстратом (в частности, фосфолипидами) для производства мембран. Кроме того, липидомный анализ тканей шейки матки с использованием масс-спектрометрии позволяет изучать молекулярные механизмы неопластической трансформации эпителия шейки матки, выявлять патологию на ранних этапах развития, а также с высокой точностью дифференцировать между собой доброкачественные ВПЧ-ассоциированные предраковые и злокачественные заболевания шейки матки [55].

В последние годы, в связи с возросшим интересом к метаболомике и липидомике, возникла потребность в использовании новых методов исследования. К таким методам относятся - ESI/MS (масс-спектрометрия с ионизацией электрораспылением), GC-EI-MS (ГХ-МС, газовая хроматография с масс-спектрометрией), HPLC-MS/MS (ВЭЖХ-МС/МС, жидкостная хроматография с тандемной масс-спектрометрией), а также прямая масс-спектрометрия без пробоподготовки [56].

Масс-спектрометрия (МС) – метод анализа вещества путем определения отношения массы к заряду (m/z) и относительного количества ионов, получаемых при ионизации и фрагментации исследуемого вещества. Это метод выбора для чувствительного обнаружения и количественного определения молекулярных частиц, в частности липидных.

На сегодняшний день масс-спектрометрию считают практически универсальным методом анализа, позволяющим идентифицировать и определять концентрацию как небольших органических молекул, так и пептидов, и белков. Одним из преимуществ масс-спектрометрии, по сравнению с другими методами, является использование малого количества исследуемого вещества. Материалом для исследования могут быть как различные биологические жидкости (кровь, слюна, моча, ЦВЖ и т.д.), так и ткани пораженного органа [57].

Lu H, Zhang H, Chingin K использовали систему рассеянной масс-спектрометрии с внутренней ионизацией электрораспылением (iEESI-MS), для распознавания рака легких путем анализа метаболитов и липидов в экстрактах тканей [58]. В другой работе был продемонстрирован потенциал ЖХ-МС / МС для определения возможных молекулярных маркеров. Были обнаружены повышенные уровни фосфатидилхолинов (PC) и фосфатидилэтаноламинов (PE) при раке молочной железы.

Dória M.L. и соавторы также изучали липидом тканей у пациенток с раком молочной железы. Результаты исследования продемонстрировали снижение уровня фосфатидилхолинов и повышение уровня лизофосфатидилхолинов в раковых клетках, при этом уровень фосфатидилсерина в опухолевых клетках не подвергался существенным изменениям [59].

Применение метода хромато-масс-спектрометрии в диагностике ВПЧ-ассоциированных заболеваний шейки матки (CIN II-III) является новым и перспективным направлением в гинекологии. Важным преимуществом масс-спектрометрического исследования является существенное сокращение времени, затрачиваемого на выполнение анализа пораженной ткани по сравнению с гистологическим методом. Такой экспресс-метод диагностики актуален как для женщин с рецидивом заболевания после хирургического лечения, так и для пациенток при несовпадении результатов цитологического заключения и гистологического диагноза, а также для женщин с наличием ВПЧ ВР и изменениями эпителия шейки матки при кольпоскопии.

Группой авторов из России было проведено исследование, основанное на сравнении прямой масс-спектрометрии ткани и липидного анализа экстракта ткани методом масс-спектрометрии с электрораспылением для дифференциации эутопической и эктопической ткани эндометрия [60]. В данной работе выявлены маркеры, которые относятся к трем липидным классам: фосфатидилхолины, фосфоэтаноламиды и сфингомиелины. Идентификация липидов подтверждена методом хромато-масс-

спектрометрии липидных экстрактов тканей. Результаты показывают, что информация, предоставляемая экспрессным методом прямой масс-спектрометрии, достаточна для дифференцировки тканей эндометрия по локализации с аналогичной надежностью, но более высокой скоростью, чем при традиционном подходе, основанном на предварительной экстракции липидов из ткани. Кроме того, проведено исследование, целью которого было изучение метода экспресс-оценки эндометриоидных тканей с помощью прямого метода масс-спектрометрии. Использование дискриминантного анализа PLS-DA на основе МС-данных показало, что липидом эндометриоидных тканей (перитонеальный эндометриоз и эндометриоз яичников) достоверно дифференцировал данные образцы от эндометрия эутопического [61]. Таким образом, прямая масс-спектрометрия может играть важную роль при идентификации эндометриоидных тканей. Такой подход имеет потенциальную значимость для определения и дифференцировки тканей при хирургическом лечении.

Группой исследователей под руководством профессора S.Kang было зафиксировано изменение уровня синтеза фосфатидилхолинов в тканях яичников, пораженных раком [62]. Также были предложены панели для диагностики рака молочной железы [63].

Кроме того, К.Мого, при проведении исследования обнаружил изменение уровней церамидов при раке молочной железы (РМЖ). Уровни церамида были повышены в тканях рака молочной железы по сравнению с нормальной и околоопухолевой тканью. Высокие уровни церамида при РМЖ были связаны с менее агрессивным видом рака. У пациентов с более высоким уровнем экспрессии генов ферментов по трем основным путям синтеза церамидов прогноз оказался значительно хуже. Это первое исследование, направленное на выявление клинической значимости метаболизма церамидов у больных раком молочной железы [64].

Porcari A.M. и соавторы опубликовали передовую работу, демонстрирующую потенциал масс-спектрометрии как новой технологии для клинического использования в скрининге рака шейки матки [65]. В представленном исследовании молекулярные сигнатуры цитологических образцов шейки матки, выявленные методом жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии (ЖХ-МС), были проверены на их способность обеспечить метаболомный скрининг РШМ. Эти молекулы проверяли, могут ли они клинически отличить незначительные инфекции ВПЧ от предраковых поражений. Для этого метаболиты, связанные с плоскоклеточными интраэпителиальными поражениями высокой степени (HSIL), сравнивали с метаболитами без поражений шейки матки (NILM) у 80 женщин с инфекцией ВПЧ и без нее. Для всех образцов были проведены жидкостная цитологическая диагностика, тест на ДНК-ВПЧ и анализ ЖХ-МС. Один и тот же образец использовался для трех используемых диагностических методов. Было обнаружено, что метаболомный профиль, полученный с помощью ЖХ-МС, выявил специфические маркеры, характерные для HSIL - двух церамидов и метаболита сфингозина. Эти молекулы существуют независимо от статуса ВПЧ у женщин и могут быть связаны с предопухолевым фенотипом. Статистические модели, основанные на таких результатах, могут правильно различать и выявлять женщин как с HSIL, так и с отсутствием поражения шейки матки (NILM). Результаты демонстрируют потенциал ЖХ-МС как новой технологии для клинического использования при скрининге РШМ, хотя по-прежнему необходима дальнейшая валидация с большим набором образцов.

Учеными из Китая было проведено исследование, целью которого явилось выявление потенциальных прогностических белковых биомаркеров в плазме крови, выявляющих пациенток с риском развития HSIL и РШМ с помощью метода масс-спектрометрии. В исследовании были обнаружены 5

новых биомаркеров - F9, CFI, AFM, HPR, ORM2 и показана их прогностическая значимость для оценки риска развития РШМ [66].

Таким образом, чрезвычайно актуальным является изучение и оценка диагностического потенциала липидома эпителия шейки матки неинвазивным способом при ВПЧ-ассоциированных поражениях, методом хромато-масс-спектрометрии, и создание панели биомаркеров для ранней диагностики HSIL и РШМ, а также у пациенток для дополнительной верификации диагноза при несовпадении результатов клинических и морфологических их методов исследования.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материал исследования

Исследование осуществлялось на базе научно-поликлинического отделения, лаборатории онкологической генетики, хромато-масс-спектрометрический анализ биологических образцов осуществлялся в лаборатории протеомики и метаболомики отдела системной биологии в репродукции человека ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России. Согласно критериям включения и исключения, в исследование было набрано 116 пациенток. В зависимости от результатов гистологического исследования биоптатов шейки матки, было сформировано 4 группы: 1 - хронический цервицит/ВПЧ+, 2 - LSIL/ВПЧ+, 3 - HSIL/ВПЧ+ и 4 - РШМ/ВПЧ+. Все пациентки, включенные в клиническое исследование, подписали добровольное информированное согласие.

Критерии включения:

- возраст от 21 до 45 лет
- ВПЧ-инфекция (персистенция в течение 1,5-3х лет)
- ВПЧ-ассоциированные заболевания шейки матки
- регулярный менструальный цикл
- способность выполнять требования протокола
- предоставление письменного информированного согласия на участие в исследовании

Критерии исключения:

- беременность
- период лактации
- гормональная терапия
- наличие острых воспалительных заболеваний (специфической и неспецифической этиологии)
- отсутствие ВПЧ, нормальная картина при кольпоскопии

-заболевания почек, печени, легких в стадии декомпенсации

-наличие психоневрологических заболеваний

2.2. Методы исследования

Обязательные методы исследования:

1. Клиническое исследование, включающее в себя сбор жалоб, изучение анамнеза, оценку репродуктивной функции и факторов риска развития ВПЧ-ассоциированных заболеваний шейки матки, проведение общего осмотра и гинекологического исследования, подсчет индекса массы тела (ИМТ), осмотр и пальпацию молочных желез.
2. Цитологический метод (жидкостная цитология).
3. Молекулярно-генетические методы (генотипирование 21 типа ВПЧ с определением вирусной нагрузки методом ПЦР в режиме реального времени).
4. Кольпоскопия.
5. Прицельная биопсия шейки матки с гистологическим исследованием биопсийного материала (при наличии показаний).

Специальные методы исследования:

1. Липидомный анализ соскобов эпителия шейки матки методом хромато-масс-спектрометрии с электрораспылительной ионизацией с последующей идентификацией группы липидов, достоверно выделяющих группы с неопластическими процессами шейки матки.
2. Молекулярно-генетические методы (определение мРНК генов: p16, Ki67, PGR, BCL2).

Клинический осмотр

Клиническое исследование пациенток включало: заполнение анкеты, с указанием Ф.И.О., даты рождения, адреса проживания и контактных данных.

При сборе анамнеза учитывались сведения об особенностях наследственного и аллергоанамнеза, наличия вредных привычек, соматических заболеваний и перенесенных операциях. Гинекологическое исследование включало: возраст начала половой жизни, количество половых партнеров, используемые методы контрацепции. Оценивалась репродуктивная функция женщины - возраст менархе, особенности менструального цикла, количество беременностей, родов, выкидышей и аборт в анамнезе. Был проведен тщательный сбор гинекологического анамнеза. Подробно уточнялись характер, длительность заболевания, оценивались продолжительность и эффективность ранее проведенной терапии.

Общий осмотр включал: конституциональный тип телосложения, измерение роста-весовых показателей (измерение ИМТ проводилось согласно формуле Brey: $ИМТ = \frac{\text{масса тела (кг)}}{\text{рост (м)}^2}$), оценку состояния молочных желез, функционирования сердечно-сосудистой системы, органов дыхания, желудочно-кишечного тракта, почек и мочевыводящих путей, состояние костного скелета.

Гинекологический осмотр включал оценку состояния наружных половых органов, степень и характер оволосения, развития малых и больших половых губ, наличие патологических образований вульвы, промежности и перианальной области. При исследовании генитального тракта в зеркалах оценивались цвет слизистой влагалища и шейки матки, характер, цвет и запах выделений, величина и форма шейки матки, наличие патологических образований на поверхности шейки матки и стенках влагалища.

При бимануальном влагалищном исследовании определяли форму, величину, подвижность и болезненность тела матки, оценивались положение матки и наличие воспалительных процессов внутренних половых органов, а также наличие объемных образований и спаечного процесса в малом тазу.

Цитологическое исследование шейки матки

Всем пациенткам было проведено цитологическое исследование. Материал для жидкостной цитологии собирался с помощью цервикальной щетки со съемной головкой типа Cervix-brush. Съемную часть щетки плотно прижимали к поверхности экзоцервикса и совершали пять полных круговых вращений по часовой стрелке. Далее, наконечник с собранным клеточным материалом погружали в специальный контейнер с жидкой транспортной средой (стабилизирующий раствор), направляли в лабораторию. Результаты цитологического исследования оценивались согласно терминологической системе Бетесда (Bethesda) (таблица 1) [67].

Таблица 1 - Классификация Бетесда (TBS – Terminology Bethesda System)

Аббревиатура	Английский термин	Обозначение на русском языке
AGC	Atypical glandular cells	Атипичные железистые клетки
AGC favor neoplastic	Atypical glandular cells favor neoplastic	Атипичные железистые клетки, похожие на неопластические
ASC	Atypical squamous cells	Атипичные клетки плоского эпителия
ASCUS	Atypical squamous cells undetermined significance	Атипичные клетки плоского эпителия неясного значения
ASCH	Atypical squamous cells cannot exclude HSIL	Атипичные клетки плоского эпителия, не позволяющие исключить HSIL
CIN I, II, III	Cervical intraepithelial neoplasia grade I, II or III	Цервикальная интраэпителиальная неоплазия I, II или III степени
AIS	Adenocarcinoma in situ	Аденокарцинома in situ
HSIL	High grade squamous intraepithelial lesion	Высокая степень плоскоклеточного интраэпителиального поражения
LSIL	Low grade squamous intraepithelial lesion	Низкая степень плоскоклеточного интраэпителиального поражения

NOS	Not otherwise specified	Не специфицированы
SIL	Squamous intraepithelial lesion	Плоскоклеточное интраэпителиальное поражение

Цитологическая классификация Бетесда осуществляется на основе термина SIL: плоскоклеточное интраэпителиальное поражение (Squamous Intraepithelial Lesion).

Выделяют три клинически значимые категории:

- ✓ NILM – отсутствие патологических изменений.
- ✓ ASCUS – клетки плоского эпителия неясного генеза (Atypical squamous cells of undertermined significance).
- ✓ LSIL и HSIL - плоскоклеточные интраэпителиальные поражения легкой степени (low grade SIL – LSIL); умеренной и тяжелой степени (high grade SIL – HSIL).

Молекулярно-генетические методы исследования

Всем пациенткам, включенным в исследование было проведено ВПЧ – генотипирование широкого спектра с определением 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 типы с определением вирусной нагрузки методом ПЦР в режиме «real time» (наборы ЗАО «НПФ ДНК-Технология», Россия).

Забор биологического материала производился с помощью цитощетки путем взятия соскоба клеток из переходной зоны эпителия шейки матки. Далее щетку помещали в эппендорф объемом 1,5 мл со стерильным 0,9% раствором натрия хлорида (500мкл) и вращали в нем в течение 15-20 секунд.

Эппендорф маркировался и направлялся в лабораторию, где он подвергался центрифугированию (скорость центрифугирования - 13000 об/мин, время центрифугирования - 10 мин, температура центрифугирования – комнатная). Осадок замораживался при температуре -70оС. Для последующего выделения ДНК с использованием хаотропного агента, применяли наборы «Проба ГС» («ДНК-Технология», Россия). Амплификация осуществлялась в режиме «real time» на приборе «ДТ-964». Для оценки вирусной нагрузки в качестве меры центральной тенденции определяли медиану, в качестве интервальной оценки – межквартильный размах. Достоверность межгрупповых различий оценивали с помощью критерия Манна-Уитни.

Описание методов статистического анализа

Количественные показатели оценивались на предмет соответствия нормальному распределению с помощью критерия Шапиро-Уилка (при числе исследуемых менее 50) или критерия Колмогорова-Смирнова (при числе исследуемых более 50). Количественные показатели, имеющие нормальное распределение, описывались с помощью средних арифметических величин (M) и стандартных отклонений (SD), границ 95% доверительного интервала (95% ДИ). В случае отсутствия нормального распределения количественные данные описывались с помощью медианы (Me) и нижнего и верхнего квартилей (Q1 – Q3). Сравнение двух групп по количественному показателю, имеющему нормальное распределение, при условии равенства дисперсий выполнялось с помощью t-критерия Стьюдента. Сравнение двух групп по количественному показателю, распределение которого отличалось от нормального, выполнялось с помощью U-критерия Манна-Уитни. Сравнение трех и более групп по количественному показателю, распределение которого отличалось от нормального, выполнялось с помощью критерия Краскела-Уоллиса, апостериорные сравнения – с помощью критерия Данна с поправкой Холма.

Кольпоскопия

Кольпоскопия – визуальный метод исследования состояния эпителия шейки матки с применением оптической системы с постановкой различных эпителиальных и сосудистых тестов, при которых оценивается реакция тканей на обработку химическими составами (3% уксусной кислоты и 2% водного Люголя). Цель кольпоскопического исследования - оценка состояния эпителия и сосудов шейки матки, определение размера, локализации и характера пораженного участка. На основании результатов кольпоскопии решается вопрос о целесообразности проведения дополнительных морфологических исследований.

Кольпоскопия проводилась всем пациенткам по стандартной методике. Тщательно осматривались шейка матки, слизистая вульвы и стенки влагалища, а также кожные покровы промежности и аногенитальной области. Эпителий шейки матки оценивали под увеличением вначале без проб. Далее проводилась обработка 3% раствором уксусной кислоты (уксусная проба), затем применяли пробу Шиллера с 3% раствором Люголя. При выполнении кольпоскопии намечались патологические участки для проведения прицельной биопсии шейки матки с последующим гистологическим исследованием.

При оценке кольпоскопической картины учитывались следующие показатели: цвет, поверхность, структура и уровень многослойного плоского эпителия, стык эпителиев, особенности сосудистого рисунка, наличие и форма желез, реакция на 3% раствор уксусной кислоты, реакция на пробу Шиллера, размер и границы образований, тип эпителия.

Кольпоскопические данные схематически изображались, согласно условному циферблату (рисунок 1).

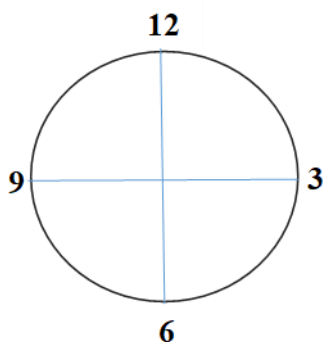


Рисунок 1. Схематическое изображение локализации поражения.

При оценке кольпоскопической картины использовали Единую Международную классификацию кольпоскопических терминов, одобренную на 14-м Всемирном конгрессе IFCPC в Рио-де-Жанейро, 2011 г. и дополненную в 2017 г. (таблица 2). Одним из основных критериев информативности кольпоскопического исследования, является визуализация зоны стыка многослойного плоского и цилиндрического эпителиев – зоны трансформации. На основании оценки данного критерия кольпоскопическая картина интерпретируется как удовлетворительная или неудовлетворительная. К основным признакам, свидетельствующим о развитии интраэпителиальных неоплазий, относятся ацетобелый эпителий, мозаика, пунктация. Наиболее важным является ацетобелый эпителий, плотность и быстрота проявления которого часто коррелируют со степенью тяжести неоплазий. Атипическая васкуляризация эпителия шейки матки проявляется в виде наличия пунктации и мозаики.

Таблица 2 - Международная классификация кольпоскопической терминологии, IFCPC, Рио-де-Жанейро, 2011 (дополненная в 2017г.)

Общие сведения	<ul style="list-style-type: none"> • Шейка матки полностью визуализируется, полностью не визуализируется. • Стыки между эпителиями – полностью видимые, полностью не видимые.
----------------	---

Нормальная кольпоскопическая Картина		<p>- Оригинальный многослойный плоский эпителий:</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Зрелый ▪ Атрофический <p>- Цилиндрический эпителий:</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Эктопия <p>- Метаплазированный эпителий:</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Наботовы кисты ▪ Открытые железы (крипты) <p>- Децидуоз (при беременности)</p>	
	Общие сведения	<p>Локализация поражения: внутри или вне зоны трансформации; в соответствии с циферблатом</p> <p>Размер поражения, по числу занимаемых квадрантов шейки матки. Размер поражения в процентном соотношении (с экзоцервиксом).</p>	
Не нормальная кольпоскопи- ческая картина	Слабовыраженные Изменения	<p>Тонкий ацетобелый эпителий с нечеткими контурами.</p> <p>Медленное проявление ацетобелости.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Нежная мозаика • Нежная пунктация
	Выраженные Изменения	<ul style="list-style-type: none"> • Плотный ацетобелый эпителий с четкими контурами • Быстрое проявление ацетобелости • Измененное устье открытой железы 	<ul style="list-style-type: none"> • Грубая мозаика • Грубая пунктация • Граница поражения четкая, внутренняя бровка • Признак бугристости (симптом «горного хребта»)
	Неспецифические Признаки	<ul style="list-style-type: none"> • Лейкоплакия (кератоз, гиперкератоз) • Эрозия 	

		• Окрашивание раствором Люголя (проба Шиллера): йодопозитивное/йоднегативное.
	Подозрение на Инвазию	Атипические сосуды Дополнительные признаки: хрупкие сосуды; неоднородная поверхность; экзофитное поражение; области некроза, некротическая язва, опухоль.
Другие кольпоскопические картины	<ul style="list-style-type: none"> • Врожденная зона трансформации • Кондиломы • Последствия раннее проведенного лечения 	<ul style="list-style-type: none"> • Стеноз • Врожденные аномалии • Полипы • Воспаление • Эндометриоз

Липидомный анализ соскобов эпителия шейки матки методом хромато-масс-спектрометрии

Для проведения исследования были использованы соскобы эпителия шейки матки. Взятие соскобов с эпителия проводилось с использованием цервикальной щётки. Экстракция липидов из собранного биоматериала осуществлялась следующим образом: щётка помещалась в эппендорф с 500 мкл смеси вода/метанол (1/1 о/о) и выдерживалась 5 минут в Vortex, а затем 5 минут в ультразвуковой ванне, после чего извлекалась из эппендорфа. В эппендорф добавлялся 1 мл хлороформа и выдерживали в Vortex на протяжении 10 минут, после чего выдерживали в центрифуге 5 минут при 15000 оборотах в минуту. В отдельную виалу отбирали нижний органический слой объёмом 950 мкл. После высушивания в потоке азота липидный осадок растворяли в 200 мкл изопропанол/ацетонитрил (1/1 о/о). Анализ липидного состава ткани проводили методом высокоэффективной

жидкостной хромато-масс-спектрометрии по разработанному ранее протоколу для определения липидного состава ткани с разделением на хроматографе Dionex UltiMate 3000 (Thermo Scientific, Германия) и детектированием на масс-спектрометре Maxis Impact qTOF (Bruker Daltonics, Германия) в режиме положительных и отрицательных ионов, образующихся в электроспрее. Для уточнения идентификации веществ дополнительно проводилась тандемная масс-спектрометрия с окном сканирования 5 Да. Предобработка данных и идентификация соединений осуществлялась по протоколу, разработанному Koelmel [68]. Номенклатура липидов соответствует LipidMaps [69].

Идентификация липидов и статистический анализ масс-спектрометрических данных

Статистический анализ проводился с использованием скриптов на языке R (3.3.3) в среде RStudio (1.383 GNU). Для липидов, измеренных в режиме положительных ионов, выбор липидов для построения логистической регрессии для дискриминации двух групп, осуществлялся из набора липидов, выбранных как статистически значимые с использованием теста Манна-Уитни с порогом 0.05, а также с помощью информационного критерия Акаике. Для липидов, измеренных в режиме отрицательных ионов, выбор липидов для построения логистической регрессии для дискриминации двух групп, осуществлялся из набора липидов, выбранных с использованием дискриминантного анализа проекций на скрытые структуры и значения проекции переменной $ПП > 1$ с использованием информационного критерия Акаике. В качестве независимых переменных использовались уровни липидов, в качестве переменных отклика – диагноз, где значение 0 присваивалось более лёгкому поражению, значение 1 – более тяжёлому. Для каждого липида, вошедшего в итоговую модель, был выполнен тест Манна-Уитни на отличие значений в выборках.

Количественные данные представляли в виде медианы (Me) и квартилей Q1 и Q3 в формате Me (Q1; Q3).

Итоговая классификационная модель для каждого режима ионов строилась на основе 10 логистических регрессий для дискриминации каждой пары по принципу «1 против 1», где в каждой бинарной модели вычислялся потенциальный диагноз и итоговый диагноз определялся по тому, какой из вариантов диагноза собрал наибольшее количество «голосов». Тестирование каждой промежуточной модели производилось кросс-валидацией по отдельному объекту на образцах, которые были определены как принадлежащие одной из двух категорий, которые дискриминировала данная модель. Чувствительность и специфичность промежуточных моделей оценивалась как число верно определённых более тяжёлых случаев/общее число более тяжёлых случаев и число верно определённых более лёгких случаев/общее число более лёгких случаев, соответственно. Порог, исходя из которого, определялась принадлежность к тому или иному исходу, выбирался исходя из максимизации суммы специфичность + чувствительность. Тестирование итоговой модели производилась внутренней кросс-валидацией по отдельному объекту. Прогностическая ценность каждого диагноза оценивались как число верно поставленного диагноза/число поставленных соответствующих диагнозов.

Определение уровня экспрессии мРНК генов

С помощью ПЦР проводилась оценка уровней экспрессии мРНК генов человека - p16, Ki67, PGR, BCL2. Взятие материала производилось цитощеткой из шейки матки, с захватом зоны трансформации, после чего щетку сразу погружали в пробирку со стерильной транспортной средой – Стор-ЭКС. Далее цитощетку вращали в пробирке в течение 10–15 секунд. Проводили маркировку и доставляли в лабораторию течение 2 часов при

температуре 2-8°C. Биоматериал не подвергался центрифугированию. Замораживали при температуре - 70°C. Хранились образцы в течение 2 лет.

Методы статистической обработки

Данные описательной статистики представлены в виде средних значений (M) и их стандартных отклонений (δ). В качестве меры центральной тенденции всех количественных показателей использовали медиану (Me), в качестве интервальной оценки – нижний $Q1$ (0,25) и верхний $Q3$ (0,75) квартили. Методы параметрической статистики (t -критерий Стьюдента) применялись при нормальном виде распределения данных для оценки межгрупповых различий. При отсутствии нормального распределения данных применялись методы непараметрической статистики – U -критерий Манна-Уитни для двух групп. Статистически значимыми считались различия при $p < 0,05$ (95%-й уровень значимости). Для качественных данных определяли показатели частоты (%). Для оценки достоверности межгрупповых различий качественных показателей использовался критерий Хи-квадрат с поправкой на непрерывность. Для количественной оценки уровня экспрессии мРНК генов использовался метод ΔCq с нормировкой по 3 референсным генам TBP, B2M и GUSB. Статистическая обработка результатов исследования уровней экспрессии функциональных генов проводилась с использованием методов непараметрического анализа. Исследованные количественные показатели представлены в виде Me (L-H), где Me – медиана, L – нижний квартиль, H – верхний квартиль. Статистическая обработка данных выполнена на персональном компьютере при помощи таблиц «Microsoft Excel» и пакетов прикладных программ «Statistica for Windows» v.7.0, StatSoft Inc. (США) и IBM SPSS v.22.0.

Дизайн исследования

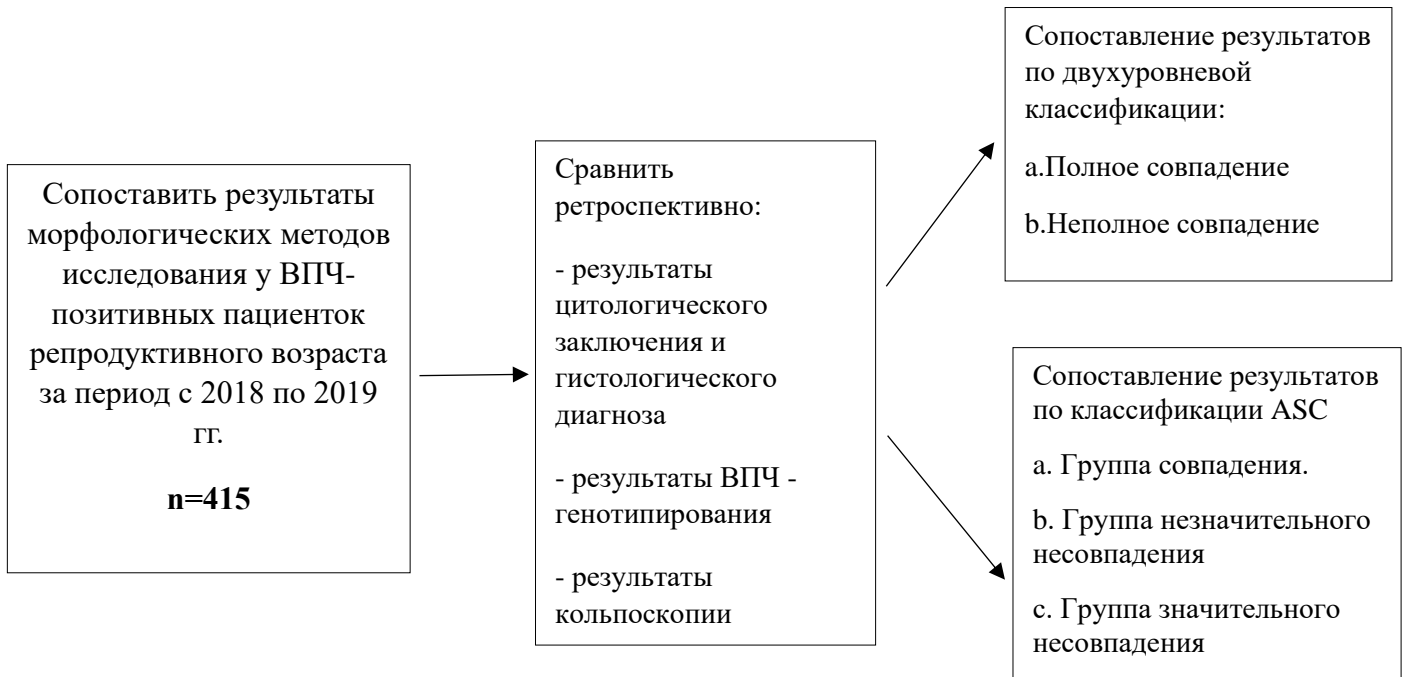


Рисунок 2. Дизайн исследования для задачи №1.

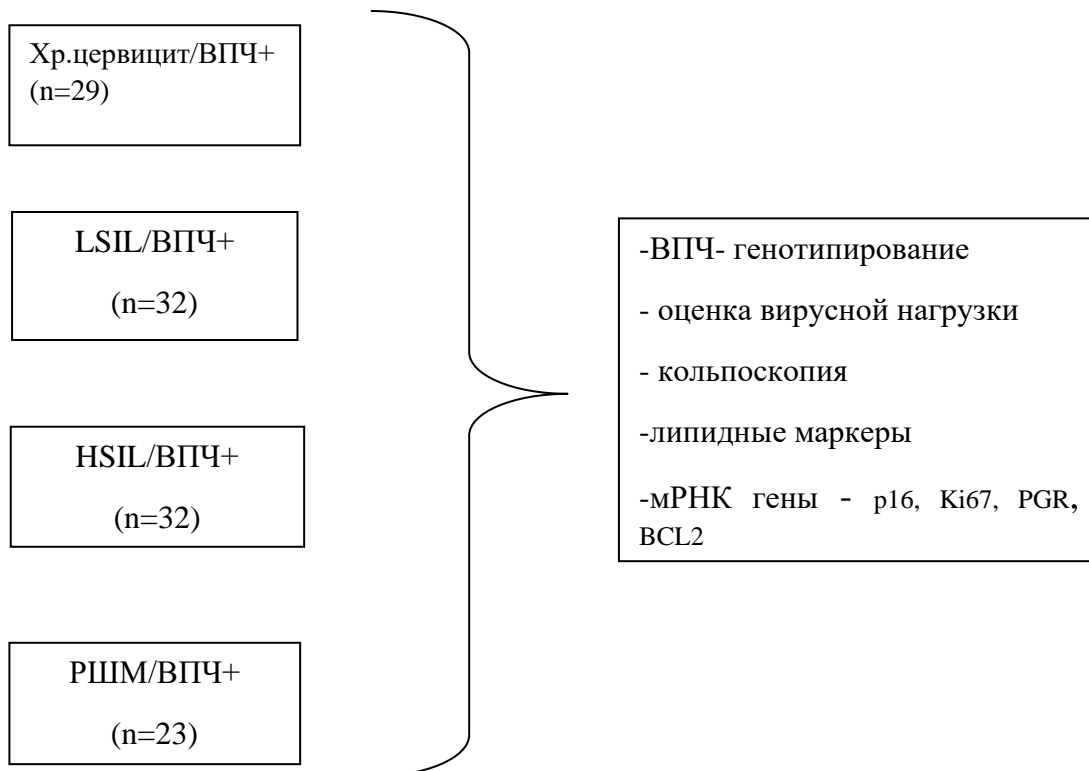


Рисунок 3. Дизайн исследования для задачи № 2,3,4

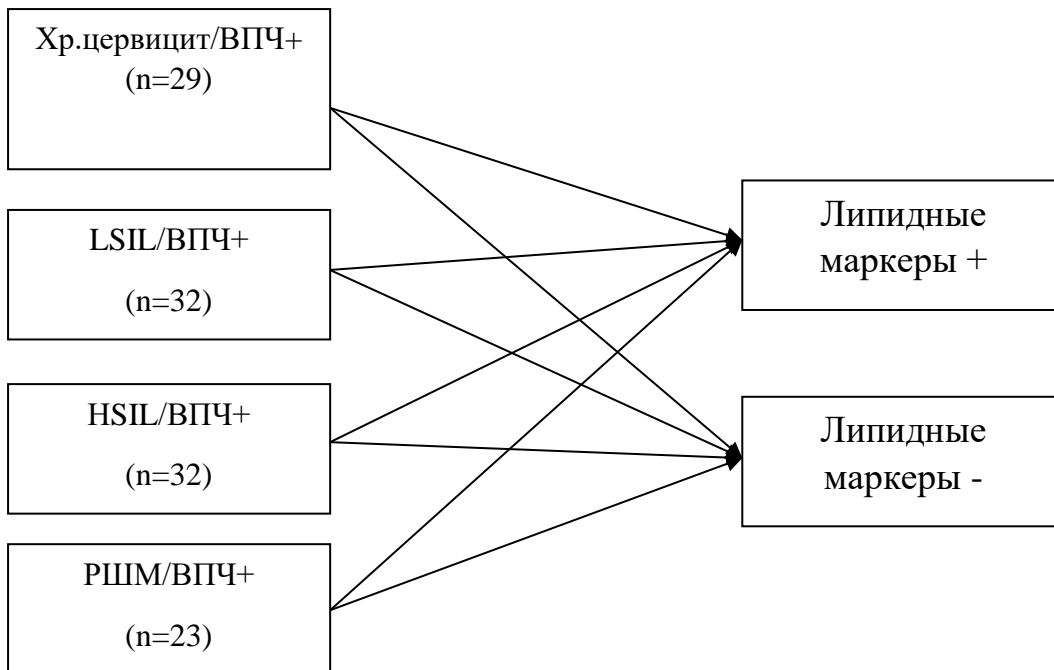


Рисунок 4. Дизайн исследования для задачи № 2.

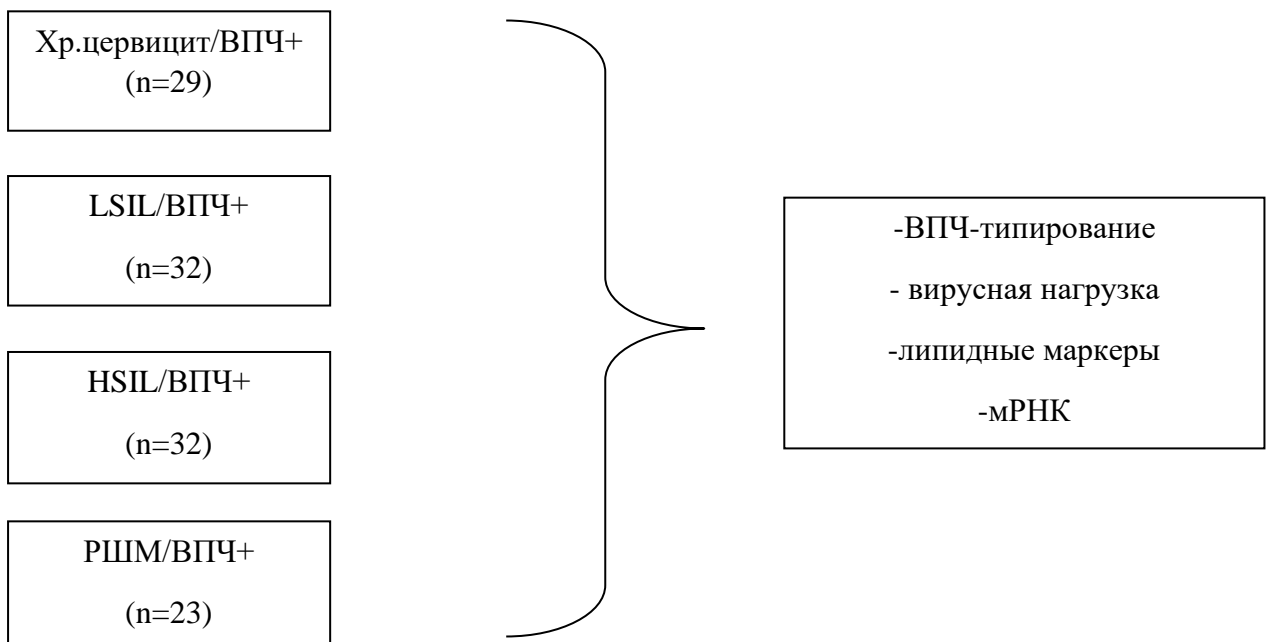


Рисунок 5. Дизайн исследования для задачи № 3.

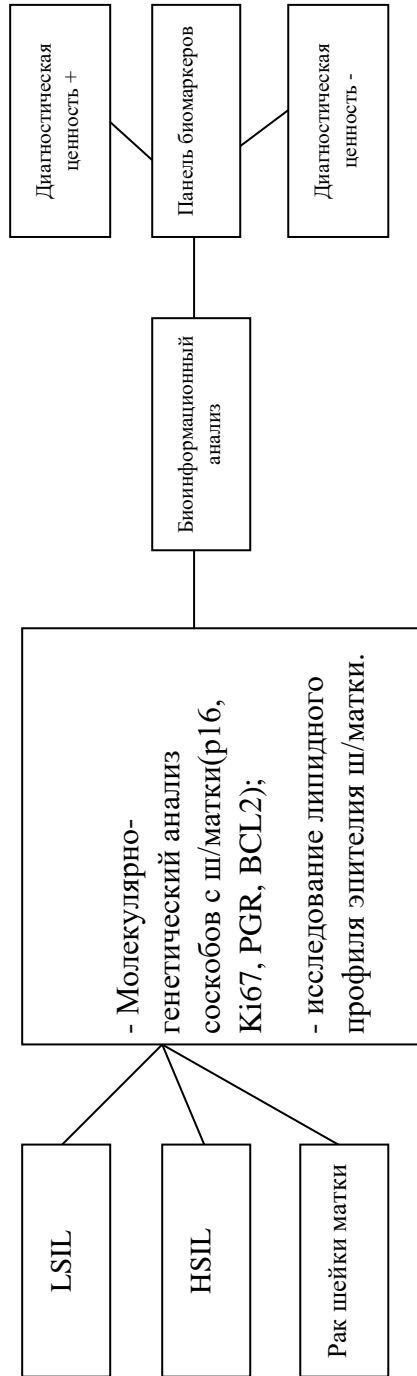


Рисунок 6. Дизайн исследования для задач № 4,5.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Результаты ретроспективного анализа

Согласно первой задаче исследования, нами были ретроспективно проанализированы и сопоставлены данные цитологических заключений с результатами гистологического исследования у 415 пациенток в возрасте от 19 до 45 лет (средний возраст 30 ± 11 лет) с ВПЧ-ассоциированными заболеваниями шейки матки, за период с 2018 по 2019 гг. Морфологическое исследование осуществлялось специалистами на базе 1-го патологоанатомического отделения ФГБУ "НМИЦ АГиП им.В.И. Кулакова" Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Критерии включения: 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.

По результатам сравнительного анализа цитологического заключения было сформировано 4 группы:

1-я группа - NILM, хронический цервицит/ВПЧ+; (n=151) - 34,8%.

2-я группа - ASCUS/ ВПЧ+ (n=20) - 4,6%.

3-я группа - LSIL/ ВПЧ+ (n=209) - 48%.

4-я группа - HSIL/ ВПЧ+ (n=55) - 12,6%.

Сопоставление результатов морфологических методов исследований осуществлялось по двухуровневой классификации (1 группа- полное совпадение; 2 группа - неполное совпадение) и в соответствии 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) (ASC) [18]. Следует

отметить, что из исследования были исключены случаи с интервалом от цитологического исследования до биопсии более 8-10 месяцев, а также биопсии шейки матки без предварительного цитологического исследования.

При сопоставлении результатов двух методов согласно двухуровневой классификации (полное/неполное совпадение), у пациенток в 1 группе (Хр. цервицит/ВПЧ+), процент совпадения с гистологическим результатом составил 63,5% (96). Однако в данной группе гистологически HSIL верифицирован у 13,2% (20); LSIL - 23% (35) (рисунок 7).

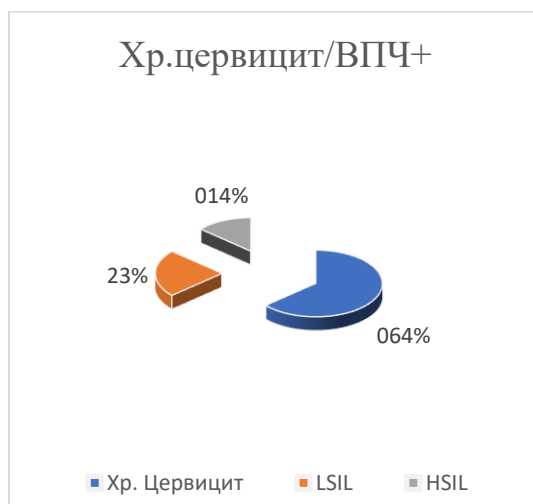


Рисунок 7. Результаты сопоставления морфологических методов исследования в 1 группе.

При распределении пациенток по результатам гистологического исследования во 2 (группе ASCUS/ВПЧ+), были получены следующие данные: 30% (6) – хронический цервицит; в 35% (7) выявлен LSIL; 35% (7) - HSIL. (рисунок 8)

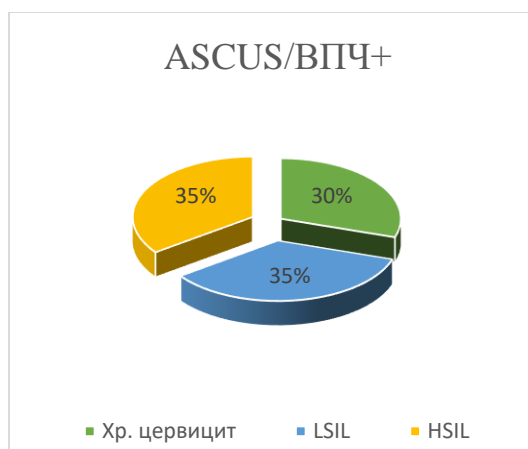


Рисунок 8. Результаты сопоставления морфологических методов исследования во 2 группе.

При сопоставлении гистологических и цитологических результатов в 3 группе (LSIL/ВПЧ+), процент совпадения составил 28,3% (59). Так, пациентки с гистологическим диагнозом хронический цервицит составили 41,1% (86). HSIL был верифицирован у 29,6% (62), CIS - у 1% (2) пациенток. (рисунок 9).

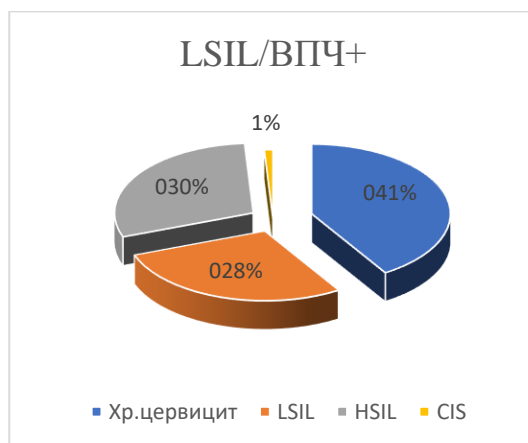


Рисунок 9. Результаты сопоставления морфологических методов исследования во 3 группе.

При сопоставлении цитологического и гистологического заключений в 4 группе (HSIL/ВПЧ+), процент совпадений оказался наибольшим - 61,9% (34). У 5,4% (3) женщин морфологически верифицирован CIS. Вместе с тем частота пациенток с гистологическими диагнозами LSIL и хронический цервицит составила 16,3% (9) и 16,3% (9) соответственно. (рисунок 10).

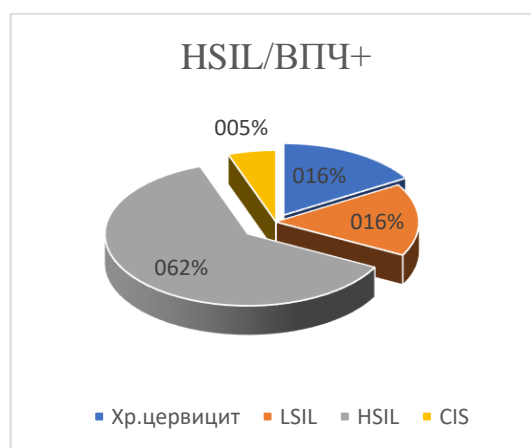


Рисунок 10. Результаты сопоставления морфологических методов исследования во 4 группе.

Далее, нами также было проведено сопоставление двух морфологических методов, согласно рекомендациям «Колледжа американских патологов и

Комитета клинической практики Американского общества цитопатологии» (ASC).

После сопоставления цитологического и гистологического методов с учетом оценочных критериев ASC, были сформированы 3 группы (таблицы 3,4):

1. Группа совпадения (agree) цитологического и гистологического заключений:

- a). Цитологическое заключение «NILM, хр.цервицит» и «NILM,хр.цервицит» по результатам гистологического исследования;
- b). Цитологическое заключение «LSIL» и «LSIL» по результатам гистологического исследования;
- c). Цитологическое заключение «HSIL» и «HSIL» по результатам гистологического заключения.

2. Группа незначительного несоответствия (minor under/ over) между цитологическим и гистологическим заключениями:

- a). Цитологическое заключение «NILM, хронический цервицит» и «LSIL» по биопсии.
- b). Цитологическое заключение «LSIL» и «NILM, хронический цервицит» по биопсии.

3. Значительное несоответствие (major under /over):

- a). Цитологическое заключение «NILM, хронический цервицит» и биопсия, соответствующая поражению «HSIL».
- b). Цитологическое заключение «HSIL» и биопсия «NILM, хронический цервицит».

Таблица 3 - Сопоставление результатов цитологического и гистологического методов (оценочные критерии ASC, 2017 г.)

А. Группа совпадения (agree)	В. Группа незначительного	С. Группа значительного
-------------------------------------	----------------------------------	--------------------------------

	несовпадения (minor under/ over)	несовпадения (major under /over)
а). Цитологическое заключение «NILM, хронический цервицит» / Гистологический диагноз -«Хронический цервицит»	а). Цитологическое заключение «NILM, хронический цервицит» / Гистологический диагноз «LSIL»	а). Цитологическое заключение «NILM, хронический цервицит» / Гистологический диагноз «HSIL»
б). Цитологическое заключение «LSIL» / Гистологический диагноз «LSIL»	б). Цитологическое заключение «LSIL» / Гистологический диагноз «Хронический цервицит»	б). Цитологическое заключение «HSIL» / Гистологический диагноз «Хронический цервицит»
с). Цитологическое заключение «HSIL» / Гистологический диагноз «HSIL»		

В группе сопоставления образцов с цитологическим заключением «NILM, хронический цервицит» и результатов гистологического исследования, получены следующие данные: соответствие (NILM, цервицит/NILM, цервицит) – 96 (23,13%); незначительное несоответствие (NILM, цервицит/LSIL) – 35 (8,43%); значительное несоответствие (NILM, цервицит/HSIL) – 20 (4,8%).

В группе сопоставления образцов с цитологическим заключением «LSIL» и результатов гистологического исследования получены следующие данные: соответствие (LSIL/LSIL) – 59(14,21%); незначительное несоответствие

(LSIL/NILM, хр.цервицит) – 86 (20,7%); незначительное несоответствие (LSIL/CINII-III) – 62 (14,93%).

В группе сопоставления образцов с цитологическим заключением «HSIL» и результатов гистологического исследования получены следующие данные: соответствие (HSIL/HSIL) - 39 (9,39%); незначительное несоответствие (HSIL/LSIL) – 9 (2,1%); значительное несоответствие (HSIL/хр.цервицит) – 9 (2,1%).

Таблица 4 - Сопоставление результатов цитологического и гистологического методов (оценочные критерии ASC, 2017 г.)

Цитологическое заключение	Абсолютное кол-во (n= 415)	Гистологическое заключение		
		Хронический цервицит	LSIL	HSIL
NILM, хр.цервицит	151	Agree 96 (23,3%)	Minor over 35 (8,4%)	Major under 20 (4,8%)
LSIL	207	Minor over 86 (20,8%)	Agree 59 (14,2%)	Minor under 62 (14,9%)
HSIL	57	Major over 9 (2,1%)	Minor over 9 (2,1%)	Agree 39 (9,4%)

Таким образом, цитологическое и гистологическое соответствие было достигнуто у 194 (46,74%) пациенток. Общее число незначительного несоответствия составило 192(46%) случая. Общее число значительного несоответствия цитологического и гистологического заключений составило 29 (6,9%): в 1 группе NILM, хр.цервицит/HSIL обнаружено 20 (4,8%) случаев и 9 (2,1%) случаев в группе HSIL/хр.цервицит по результатам гистологического исследования.

Заключение

Таким образом, согласно данным ретроспективного анализа 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% и в группе NILM/LSIL – 8,4%, что явилось причиной гипо- и гипердиагностики. Сопоставление результатов цитологического и гистологического методов исследований у пациенток с патологией шейки матки, ассоциированной с ВПЧ высокого канцерогенного риска, показал, что имели место как случаи значительного, так и незначительного несоответствия диагноза, оказывающих влияние на необоснованный выбор дальнейшей тактики ведения.

Для полной верификации диагноза целесообразным является поиск новых молекулярно-генетических, липидомных биомаркеров в качестве дополнения при несовпадении результатов морфологических методов исследования для дифференциальной диагностики степени тяжести предраковых заболеваний шейки матки, ассоциированных с ВПЧ.

3.2 Результаты проспективного исследования

3.2.1. Клиническая характеристика обследуемых женщин

В исследование было включено 116 пациенток, обратившихся в научно-поликлиническое отделение ФГБУ «НМИЦ АГИП им. В.И. Кулакова». Все пациентки ответили на вопросы анкеты, были проанализированы клиничко-anamнестические данные.

При оценке клиничко-anamнестических данных учитывались: возраст, индекс массы тела, возраст начала половой жизни, возраст менархе и характеристика менструального цикла, наличие отягощенного семейного

анамнеза и вредных привычек, число половых партнеров в течение жизни, применение контрацепции, в том числе гормональной. Кроме того, учитывались перенесенные детские инфекции, соматические заболевания в анамнезе, гинекологический и акушерский анамнезы. Особое внимание уделялось наличию в анамнезе заболеваний шейки матки, ассоциированных с ВПЧ и методами их лечения.

По результатам гистологического исследования биоптатов шейки матки было сформировано 4 группы: 1 – 29 (25%) хронический цервицит/ВПЧ+; 2 – 32 (27,5%) LSIL/ВПЧ+; 3 – 32 (27,5%) HSIL/ВПЧ+; 4 – 23 (19,8%) РШМ (рисунок 11).

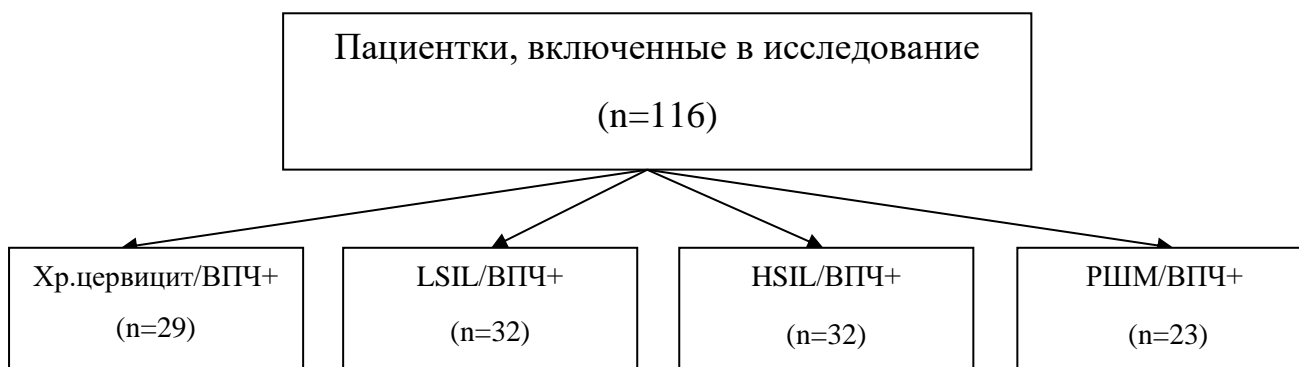


Рисунок 11. Распределение пациенток по группам.

Средний возраст пациенток статистически значимо не отличался и составил $35,4 \pm 6,0$ лет. Также, анализ антропометрических данных не выявил значимых различий между группами ($p > 0,05$) (таблица 5).

Таблица 5 - Антропометрические данные пациенток.

	Группа 1 (n=29) M ± δ*	Группа 2 (n=32) M ± δ*	Группа 3 (n=32) M ± δ*	Группа 4 (n=23) M ± δ*	p-уровень**
Средний рост (см)	170,6±3,3	168,2±2,8	166,4±3,7	168,4±4,8	>0,05

Средняя масса тела (кг)	61,4 ±6,0	58,8±10,7	62,6±11,8	65,6±10,4	>0,05
ИМТ	24,5 ±3,1	21,8±3,2	21,2±4,6	22,5±4,3	>0,05

*данные представлены как средние (М) ± стандартное отклонение (δ);

**р - уровень значимости различий между 1,2,3 и 4 группами.

Результаты оценки менструальной функции пациенток (возраст менархе, длительность менструального цикла, продолжительность менструаций) не выявили статистически значимых различий во всех группах (р>0,05) (таблица 6).

Таблица 6 - Характеристика менструальной функции пациенток.

	Группа 1 (n=29) М ± δ*	Группа 2 (n=32) М ± δ*	Группа 3 (n=32) М ± δ*	Группа 4 (n=23) М ± δ*	р-уровень **
Возраст менархе (лет)	13,4 ± 1,1	12,1 ± 1,2	11,8 ± 1,3	12,9 ± 1,1	>0,05
Длина цикла (дней)	27,6 ± 2,5	28,8 ± 1,2	29,3 ± 2,2	28,5 ± 2,1	>0,05
Длительность менструации (дней)	5,6 ± 0,4	5,5 ± 1,6	5,2 ± 0,9	5,3 ± 0,7	>0,05

*данные представлены как средние (М) ± стандартное отклонение (δ);

**р - уровень значимости различий между 1,2,3 и 4 группами.

При анализе особенностей половой жизни пациенток было выявлено, что у 41 (35,3%) начало половой жизни приходилось на возраст до 18 лет. Раннее начало половой жизни (до 18 лет) наблюдалось у 12 (41,3%) пациенток из 1 группы, у 5 (15%) пациенток из 2 группы, у 13 (40%) пациенток из 3 группы, у 11 (45%) пациенток из 4 группы. Среднее количество половых партнеров составило: в 1 группе – 2,8 ± 1,5, во 2 группе – 3,1 ± 1,2, в 3 группе - 3,6 ± 1,0, в 4 группе - 3,8 ± 1,0. Более 3-х половых партнеров в 1 группе отметили 11 (38%) пациенток, во 2 группе 14 (43%) пациенток, в 3 группе 27 (84%) пациенток, в 4 группе 18 (78%) пациенток.

Данные результаты показали, что у пациенток 3 (HSIL) и 4 (РШМ) групп, отмечается достоверно большее количество половых партнеров в анамнезе, по сравнению с женщинами 1 и 2 групп.

Анализ акушерского анамнеза пациенток статистически значимых различий в группах не выявил ($p>0,05$). Характеристика акушерского анамнеза представлена в таблице 7.

Таблица 7 - Характеристика акушерского анамнеза.

	Группа 1 (n=29)	Группа 2 (n=32)	Группа 3 (n=32)	Группа 4 (n=23)
Количество беременностей	34 (17%)	44 (19%)	51 (23%)	54 (31%)
<i>Среднее число беременностей (M±δ*)</i>	<i>1,4 ± 1,7</i>	<i>1,2 ± 1,8</i>	<i>1,5 ± 1,6</i>	<i>2,1 ± 1,9</i>
Количество самопроизвольных родов	26 (26%)	30 (30%)	47 (47%)	40 (40%)
<i>Среднее число самопроизвольных родов (M±δ*)</i>	<i>0,8 ± 0,9</i>	<i>0,7 ± 1,0</i>	<i>0,6 ± 1,0</i>	<i>1,3 ± 1,2</i>
Количество операций к/с	8 (23,5%)	14 (28%)	4 (12%)	14 (26%)
<i>Среднее число операций к/с (M±δ*)</i>	<i>0,1 ± 0,5</i>	<i>0,1 ± 0,2</i>	<i>0,1 ± 0,6</i>	<i>1,2 ± 0,4</i>
Количество искусственных аборт	4 (8%)	8 (10%)	5 (12%)	11 (12%)
<i>Среднее число искусственных аборт (M±δ*)</i>	<i>0,2 ± 0,4</i>	<i>0,3 ± 0,8</i>	<i>0,7 ± 1,6</i>	<i>1,4 ± 1,9</i>
Количество внемат. и неразвив. бер-тей, с/выкидышей	3 (14%)	5 (18%)	2 (6%)	7 (19%)
<i>Среднее число внемат. бер-тей (M±δ*)</i>	<i>0,1 ± 0,2</i>	<i>0,2 ± 0,4</i>	<i>0,1 ± 0,3</i>	<i>0,2 ± 0,1</i>

*данные представлены как средние (M) ± стандартное отклонение (δ)

Характеристика семейного анамнеза показала, что у 12 (33%) пациенток 1 группы, 21 (41%) пациенток 2 группы, 18 (39%) пациенток 3 группы и 15 (51%) пациенток 4 группы отмечались в семье у ближайших родственников случаи инсульта или инфаркта миокарда, а также сахарный диабет 2 типа, гипертоническая болезнь, онкологических заболеваний молочных желез, желудочно-кишечного тракта, легких, щитовидной железы, почек, мозга, кроме того, онкологических заболеваний органов малого таза (РШМ, рак эндометрия, рак яичников).

В структуре перенесенных гинекологических заболеваний наиболее часто определялись воспалительные заболевания нижнего отдела генитального тракта: вульвовагинальный кандидоз – 52%, уреоплазменная и микоплазменная инфекции, хламидиоз, генитальный герпес – 41%, бактериальный вагиноз – 23%. Воспалительные заболевания органов малого таза (ВЗОМТ) (хронический эндометрит, хронический сальпингоофорит) – 16%, бесплодие встречались у 10%, миома матки – 11%, СПКЯ – 7%, эндометриоз – 17%, кисты яичников - 12%, гиперпластические процессы эндометрия (полипы и гиперплазия эндометрия) – 15%, (таблица 8).

Таблица 8 - Структура гинекологических заболеваний.

Заболевание	Группа 1, n=29	Группа 2, n=32	Группа 3, n=32	Группа 4, n=23
Вульвовагинальный кандидоз	11 (37%)	13 (39%)	21 (65%)	14 (59%)
Бактериальный вагиноз	3 (10%)	8 (25%)	9 (28%)	8 (34%)
Уреоплазменная инфекция	5 (17%)	7 (21%)	10 (31%)	8 (34%)
Микоплазменная инфекция	0 (0%)	2 (6%)	3 (9%)	1 (4%)
Хламидийная инфекция	1 (3%)	2 (6%)	3 (9%)	3 (13%)
Генитальный	3 (10%)	2 (6%)	2 (6%)	1 (4%)

герпес				
Хронический сальпингоофорит	6 (17%)	5 (15%)	3 (9%)	5 (20%)
Хронический эндометрит	0 (0%)	2 (6%)	2 (6%)	2 (8%)
СПКЯ	1(3%)	3(9%)	3 (9%)	2 (8%)
Кисты яичников	4 (13%)	5 (15%)	2 (6%)	5 (21%)
Бесплодие I	2 (7%)	2 (6%)	3 (9%)	0 (0%)
Полип эндометрия	1 (3%)	2 (6%)	1 (3%)	2 (8%)
Гиперплазия эндометрия	2 (7%)	1(3%)	2 (6%)	0 (0%)
Эндометриоз	4 (11%)	8 (25%)	7 (22%)	7 (29%)
Миома матки	3 (10%)	2 (6%)	4 (12,5%)	3 (13%)
Оперативные вмешательства на органах малого таза	6 (20%)	5 (15%)	7 (22%)	5 (21%)

Анализ перенесенных гинекологических заболеваний и оперативных вмешательств на органах малого таза, не выявил статистически значимых различий в исследуемых группах ($p > 0,05$). Однако вульвовагинальный кандидоз статистически значимо чаще встречался у пациенток 3 группы (HSIL) по сравнению с пациентками 2 группы (LSIL) ($p = 0,03$; OR = 2,7 (1,1-7,5)).

При изучении перенесенных заболеваний шейки матки и поражений генитального тракта, ассоциированных с ВПЧ (таблица 9), было обнаружено, что более чем у половины (62%) пациенток, включенных в исследование, выявлялась ВПЧ-инфекция в анамнезе. ВПЧ-ассоциированные заболевания шейки матки в анамнезе были отмечены у 13% пациенток.

Таблица 9 - Структура ВПЧ-ассоциированных заболеваний.

Заболевание	Группа 1, n=29	Группа 2, n=32	Группа 3, n=32	Группа 4, n=23
ВПЧ-инфекция в анамнезе	11 (35%)	17 (53%)	21 (63%)	13 (56%)
Остроконечные кондиломы вульвы	3 (10%)	4 (12,5%)	5 (15%)	2 (8%)
Остроконечные кондиломы перианальной области	2 (7%)	3 (9%)	0 (0%)	1 (4%)
Остроконечные кондиломы влагалища	1 (3%)	1 (3%)	1 (3%)	2 (8%)
Остроконечные кондиломы ш/матки	2 (6%)	1 (3%)	1 (3%)	1 (4%)
LSIL (CIN I) в анамнезе	2 (6%)	3 (9%)	4 (12,5%)	2 (8%)

По результатам анализа структуры перенесенных заболеваний шейки матки, вульвы, влагалища, а также перенесенных деструктивных вмешательств на шейке матки, статистически значимых различий в исследуемых группах не было выявлено ($p > 0,05$). При этом, у пациенток 3 группы (HSIL) статистически значимо чаще встречалась ВПЧ-инфекция в анамнезе, по сравнению с 1 группой ($p = 0,03$; OR = 3,6 (1,2-7,9)).

Заключение

При анализе клинико-анамнестических данных не было выявлено статистически значимых отличий между группами по возрасту, антропометрическим данным, менструальной функции, акушерскому

анамнезу и соматической заболеваемости. Анализ данных показал, что у женщин с тяжелыми 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.

3.2.2 Результаты цитологического исследования

Всем 116 пациенткам, включенным в исследование, ранее было проведено цитологическое исследование шейки матки. Результаты цитологического исследования по группам представлены в таблице 10.

Таблица 10 - Результаты цитологического исследования в исследуемых группах до проведения биопсии шейки матки.

Цитограмма	Группа 1 хр.цервицит/ВПЧ+ (n=29)	Группа 2 LSIL/ВПЧ+ (n=32)	Группа3 HSIL/ВПЧ+ (n=32)	Группа 4 РШМ/ВПЧ+ (n=23)
NILM	6 (20,6%)	3 (9,3%)	2 (6,2%)	1 (4,3%)
Хр. Цервицит	11 (38%)	6 (18,7%)	2 (6,2%)	1 (4,3%)
ASCUS	7 (24%)	6 (18,7%)	2 (6,2%)	0 (0%)
LSIL	4 (13,7%)	12 (37,5%)	4 (12,5%)	3(13%)
HSIL	1 (3,4%)	5 (15,6%)	22 (68,7%)	11 (47%)
РШМ	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	7 (30%)

Были сопоставлены результаты цитологического заключения с гистологическим диагнозом у пациенток исследуемых групп. Так, в 1 группе (хр. цервицит/ВПЧ+) совпадение результатов морфологических методов отмечалось в 18 (62%) случаях, несовпадение – в 11 (38%), во 2 группе (LSIL) совпадение составило 20 (62,5%), несовпадение - 12 (37,5%), в 3

группе (HSIL) - 23 (71,8%) совпадения, в 9 (28,1%) - несовпадения и в 4 группе (PШМ) - 18 (78%) и 5 (21,7%) соответственно.

При сопоставлении результатов цитологического и гистологического методов исследований у пациенток исследуемых групп, было выявлено, что в 3 и 4 группе отмечалось наибольшее число случаев совпадения диагноза. Полученные результаты цитологии в последующем нами использованы для проведения корреляционного анализа с результатами гистологии, липидома и мРНК функциональных генов - CDKN2A/p16, MKi67, PGR, BCL2.

3.2.3 Результаты ВПЧ-генотипирования по группам

Всем пациенткам, включенным в исследование, проводилось ВПЧ-генотипирование (n=116) и анализ группы канцерогенного риска с учетом классификации IARC (2012 г.)

Согласно данной классификации, выделяют 3 группы онкогенных типов ВПЧ: группа 1 – высокого канцерогенного риска, группа 2А – вероятного канцерогенного риска, группа 2В – возможного канцерогенного риска (таблица 11).

Таблица 11- Группы канцерогенного риска в зависимости от типа ВПЧ

Группа канцерогенного риска	Типы ВПЧ
1	ВПЧ 16, ВПЧ 18, ВПЧ 31, ВПЧ 33, ВПЧ 35, ВПЧ 39, ВПЧ 45, ВПЧ 51, ВПЧ 52, ВПЧ 56, ВПЧ 58 и ВПЧ 59
2А	ВПЧ 68
2В	ВПЧ 26, ВПЧ 30, ВПЧ 34, ВПЧ 53, ВПЧ 66, ВПЧ 67, ВПЧ 69, ВПЧ 70, ВПЧ 73, ВПЧ 82, ВПЧ 85, ВПЧ 97

Важным является изучение частоты встречаемости ВПЧ высокого, а также вероятного и возможного канцерогенного риска у пациенток в исследуемых группах. Результаты анализа представлены в таблице 12.

Таблица 12 – Результаты ВПЧ-генотипирования в исследуемых группах (IARC).

Группа канц. риска (IARC)	Филогенетическая группа	Тип ВПЧ	Группа 1, n=29	Вирусная нагрузка (log) ВПЧ Me (Q1;Q3)	Группа 2, n=32	Вирусная нагрузка (log) ВПЧ Me (Q1;Q3)	Группа 3, n=32	Вирусная нагрузка (log) ВПЧ Me (Q1;Q3)	Группа 4, n=23	Вирусная нагрузка (log) ВПЧ Me (Q1;Q3)	p value
1	A9	16	4 (13,8%)	5(4;6)	8 (25%)	5(5;6)	17 (53,1%)	5(5;5)	14 (60,9%)	7(6;7)	0,032
		52	3 (10,3%)	4(2;6)	0 (0%)		0 (0%)		0 (0%)		
		33	4 (13,8%)	4(4;4)	6 (18,7%)	4(4;5)	8 (25%)	5(4;5)	2 (8,7%)	4(4;4)	0,014
		58	2 (6,9%)	3(3;4)	2 (6,3%)	4(4;4)	0 (0%)		0 (0%)		0,121
		31	4 (13,8%)	5(3;6)	4 (12,5%)	6(5;6)	2 (6,3%)	4(3;5)	4 (17,3%)	6(4;7)	0,727
		35	1 (3,4%)	3(3;3)	1 (3,1%)	5(5;5)	0 (0%)		0 (0%)		0,317
2A	A7	68	3 (10,3%)	5(3;6)	3 (9,4%)	3(0;6)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)		0,105
1	A7	45	3 (10,3%)	4(4;5)	4 (12,5%)	5(5;5)	2 (6,3%)	5(5;5)	0 (0%)		0,721
		18	1 (3,4%)	5(5;5)	3 (9,4%)	4(4;4)	4 (12,5%)	4(4;4)	8 (34,7%)	6(6;7)	0,007
		59	0 (0%)		1 (3,1%)	5(5;5)	1 (3,1%)	4(4;4)	0 (0%)		0,317
		39	3 (10,3%)	4(3;4)	4 (12,5%)	6(5;7)	1 (3,1%)	1(1;1)	0 (0%)		0,113
2B	A6	66	2 (6,8%)	6(5;6)	0 (0%)		0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)		
1		56	4 (13,8%)	5(3;7)	0 (0%)		0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)		
2B		53	3 (10,3%)	5(5;5)	2 (6,3%)	6(6;6)	1 (3,1%)	2(2;2)	0 (0%)		0,117
HP	A10	6	4 (13,8%)	6(5;7)	1 (3,1%)	6(6;6)	0 (0%)		3 (13%)	5(4;5)	0,275
HP		44 (55)	0 (0%)		0 (0%)		0 (0%)		0 (0%)		
2B	A5	82	1 (3,4%)	4(4;4)	0 (0%)		0 (0%)		0 (0%)		

1		51	2 (6,9%)	5(5;5)	2 (6,3%)	9(9;9)	1 (3,1%)	2(2;2)	0 (0%)		0,165
---	--	----	----------	--------	-------------	--------	-------------	--------	--------	--	-------

В преобладающем большинстве (78,6%) случаев выявлялись ВПЧ высокого канцерогенного риска (1 группа). ВПЧ группы 2А (68 тип) встречался в 5,1% случаев, ВПЧ группы 2В (53, 66, 82 типы) – в 8,6%. ВПЧ 6 и 44 (55) типов, относящиеся к низкоонкогенным, встречались также в 7,7%. Наиболее часто (71,5%) выявлялись ВПЧ филогенетической группы А9 (16, 31, 33, 35, 52, 58 типы), в 21,5% случаев выявлялись ВПЧ группы А7 (18, 39, 45, 59, 68 типы). ВПЧ групп А6 (53, 56, 66 типы) и А5 (51, 82 типы) встречались в 11,2% и 5,1% случаев, соответственно. ВПЧ филогенетической группы А10 (6, 44(55)) встречались в 10,3% случаев.

В 1 группе (хронический цервицит/ВПЧ+) наиболее распространенными типами ВПЧ были 16, 33, 31, 56 и 6 - они выявлялись у 13,8% пациенток соответственно. ВПЧ 52, 68, 45, 39, 53 типы встречались, также, с одинаковой частотой – по 10,3 %. ВПЧ 35, 18, 82 типов были выявлены в 3,4%. У 62% пациенток выявлялись ВПЧ группы А9 (16, 52, 33, 58, 31, 35 типы). ВПЧ группы А7 (68, 45, 18, 39 типы) были обнаружены в 34% случаев. В 28% случаях встречались ВПЧ группы А6 (66, 53, 56 типы). ВПЧ 51 и 82 типов, относящиеся к группе А5, встречались в 10,3% случаев. ВПЧ 6 типа филогенетической группы А10, выявился у 13%. У большинства (85%) пациенток 1 группы выявлялся ВПЧ из группы 1 (IARC). ВПЧ вероятного канцерогенного риска группы 2А (68 тип) встречался с частотой 10,3%. Типы ВПЧ возможного канцерогенного риска из группы 2В (53 тип) отмечались в 12% случаев.

Во 2 группе (LSIL) наиболее часто встречающимся типом ВПЧ оказался 16 тип (25%), 18,7% - ВПЧ 33 типа. ВПЧ 31, 45 и 39 типов встречались по 12,5% соответственно. В 6,3% случаев выявлялись 58, 53 и 51 типы ВПЧ, 68 и 18 типы ВПЧ обнаруживались в 9,4% случаев. Реже всего

отмечались 35, 59 и 6 типы – по 3,1%. Таким образом, более половины (72%) случаев LSIL было обусловлено наличием ВПЧ группы А9 (16, 31, 33, 35, 58 типы). ВПЧ из группы А7 (18, 59, 68, 45, 39 типы) встречались с частотой 24%. В 7% случаев встречались типы ВПЧ из группы А6 (53 тип); из группы А5 (51 тип) – 6,3%. Низкоонкогенные ВПЧ группы А10 (6 тип) были выявлены у 3,1% пациенток 2 группы. Преобладающее большинство (81%) случаев LSIL было вызвано ВПЧ (16, 18, 31, 33, 35, 52, 56, 58, 59 типы), относящимися к 1 группе – высокого канцерогенного риска. ВПЧ вероятного канцерогенного риска из группы 2А (68 тип) встречался в 9,4% случаев. Возможно, канцерогенный риск группы 2В - 53 тип ВПЧ, встречался в 6,3% случаев LSIL.

Наиболее распространенным типом ВПЧ у пациенток с HSIL был 16 тип (53%). Причиной HSIL также являлись ВПЧ 33 (25%) и 18 (12,5%) типов. 31, и 45 типы ВПЧ выявлялись с одинаковой частотой – 6,3%. ВПЧ 59, 39, 53, 51 типов встречались по 3,1% соответственно. Таким образом, более половины (80%) случаев HSIL было вызвано ВПЧ, которые относятся к филогенетической группе А9 (16, 31, 33, 35, 58 типы). ВПЧ из группы А7 (45, 18, 59, 39 типы) был выявлен в 24% случаев, из группы А6 (53 типы) – в 3,1%. ВПЧ из группы А5 (51 типы) встречался также в 3,1% случаев. Подавляющее большинство (86%) случаев HSIL было обусловлено ВПЧ 1 группы – высокого канцерогенного риска, (16, 31, 33, 35, 45, 51, 56, 58, 59 типы). При этом у 3,1% пациенток с HSIL был выявлен ВПЧ 53 типа, который по данной классификации относится к возможному канцерогенному риску.

У подавляющего большинства пациенток с РШМ обнаруживался ВПЧ 16 типа (61%). Причиной РШМ также являлись ВПЧ 18 (35%) и 31 (17,3%) типов. Реже встречался 33 тип – 8,7%. Более половины (86%) всех случаев РШМ было обусловлено ВПЧ из группы А9 (16, 31, 33 типы). ВПЧ группы А7 (18 тип) был выявлен в 34,7% случаев. У 13% пациенток с РШМ было обнаружено сочетание высокоонкогенных типов ВПЧ с низкоонкогенным

ВПЧ 6 типа. Таким образом, подавляющее большинство (87%) случаев РШМ было вызвано типами ВПЧ, относящимися к 1 группе – высокого канцерогенного риска (16, 18, 31, 33 типы).

Наличие одновременно нескольких типов ВПЧ (микст-инфекция) отмечалось у 28% пациенток. В 1 группе 2 типа ВПЧ было обнаружено у 9% пациенток, 3 типа – у 13%. Во 2 группе (LSIL) 2 типа ВПЧ встречалось у 25% пациенток, 3 типа – у 15,6%, 4 типа – у 3,8%. В 3 группе (HSIL) 2 типа ВПЧ было выявлено у 30% пациенток, 3 типа – у 12%, у 6% - было выявлено 4 типов ВПЧ. У пациенток 4 группы (РШМ) в 17% случаев отмечалось наличие 2-х типов ВПЧ, 3 типа ВПЧ встречались с частотой 9%.

При сравнении типов ВПЧ по группам было выявлено, что частота встречаемости ВПЧ 16 типа прямо пропорционально коррелировала со степенью тяжести ВПЧ-ассоциированного поражения шейки матки: ВПЧ 16 типа достоверно чаще встречался в группе LSIL по сравнению с группой хронический цервицит ($p=0,043$), в группе HSIL по сравнению с группой LSIL ($p=0,017$), в группе РШМ по сравнению с группой LSIL ($p=0,002$).

Известно, что уровень вирусной нагрузки ВПЧ прямо пропорционально коррелирует с риском развития РШМ. Так, вирусная нагрузка менее 3 Lg считается клинически малозначимой. Значения вирусной нагрузки от 3 до 5 Lg – умеренные, существует риск развития SIL. Уровень вирусной нагрузки выше 5 Lg считается высоким, а длительная персистенция ВПЧ в таком количестве значительно повышает риск развития РШМ.

Диапазоны вирусной нагрузки в исследуемых группах варьировали от 1,7–7,4 Lg., средний уровень вирусной нагрузки составил 5,6 Lg. У преобладающего большинства (89%) пациенток вирусная нагрузка была более 3 Lg, у 36% пациенток - от 3 до 5 Lg, у 49% - более 5 Lg. В 30% случаев LSIL, 59% случаев HSIL и 70% случаев РШМ были обусловлены длительной персистенцией ВПЧ ВР с высокой вирусной нагрузкой. Таким образом, при изучении и сравнении уровня вирусной нагрузки ВПЧ между исследуемыми

группами, было выявлено, что высокая вирусная нагрузка статистически значима была в группах HSIL и PШМ по сравнению с группами хронический цервицит и LSIL ($p < 0,05$).

Заключение

ВПЧ высокого канцерогенного риска группы 1 выявлялся у большинства (86%) пациенток. ВПЧ вероятного канцерогенного риска группы 2А (68 тип) встречались в 5,1% случаев, ВПЧ возможного канцерогенного риска из группы 2В (53, 66, 82 типы) – в 9,2%. ВПЧ 16 типа явился наиболее часто встречающимся типом во всех группах. Частота встречаемости ВПЧ 16 типа прямо пропорционально коррелировала со степенью тяжести ВПЧ-ассоциированного поражения шейки матки: ВПЧ 16 типа достоверно чаще встречался в группе LSIL по сравнению с группой хронический цервицит ($p=0,044$), в группе HSIL по сравнению с группой LSIL ($p=0,016$), в группе PШМ по сравнению с группой LSIL ($p=0,003$). Результаты исследования продемонстрировали, что в группах HSIL ($p=0,001$) и PШМ ($p=0,001$) достоверно чаще отмечалось наличие 2-х и более типов ВПЧ у одной пациентки по сравнению с группой I (хронический цервицит/ВПЧ+). Результаты анализа показали, что высокая вирусная нагрузка достоверно чаще встречался в группах HSIL и PШМ ($p < 0,05$).

3.2.4 Результаты кольпоскопии в исследуемых группах

Всем пациенткам, включенным в исследование ($n=116$), проводилась кольпоскопия. Область стыка многослойного плоского и цилиндрического эпителиев полностью визуализировалась у 67(58%) пациенток, полностью не визуализировалась – у 49 (42%). Ненормальная кольпоскопическая картина была обнаружена у большинства женщин – 96 (85%). (Рисунок 12).

Слабовыраженные изменения при кольпоскопии отмечались у 53 (46%) пациенток и включали в себя наличие тонкого АБЭ с нежной мозаикой и пунктацией, отмечалось медленное проявление ацетобелости (рисунки 13-

16). Слабовыраженные кольпоскопические изменения чаще всего встречались у пациенток в 1 группе (хр. цервицит/ВПЧ+) - у 21 (75%), во 2 группе (LSIL) – у 17 (59,7%). В 3 группе (HSIL) и 4 группе (РШМ), они встречались реже – у 4 (11%) и у 6 (21%), соответственно ($p < 0,05$).

Выраженные изменения при кольпоскопии были выявлены у 63(54%) пациенток и характеризовались быстрым проявлением плотного АБЭ с грубой мозаикой и пунктацией, наличием ободков плотного АБЭ вокруг открытых желез, атипических сосудов, повышенной контактной кровоточивостью. Выраженные изменения были выявлены у большинства пациенток с HSIL - 23 (81,6%) и РШМ - 19 (78%) (рисунки 17-19).

При этом во 2 группе (LSIL) выраженные изменения наблюдались у 6 (19,6%) пациенток и в 2 (7,3%) случаях - в 1 группе (хр. цервицит).

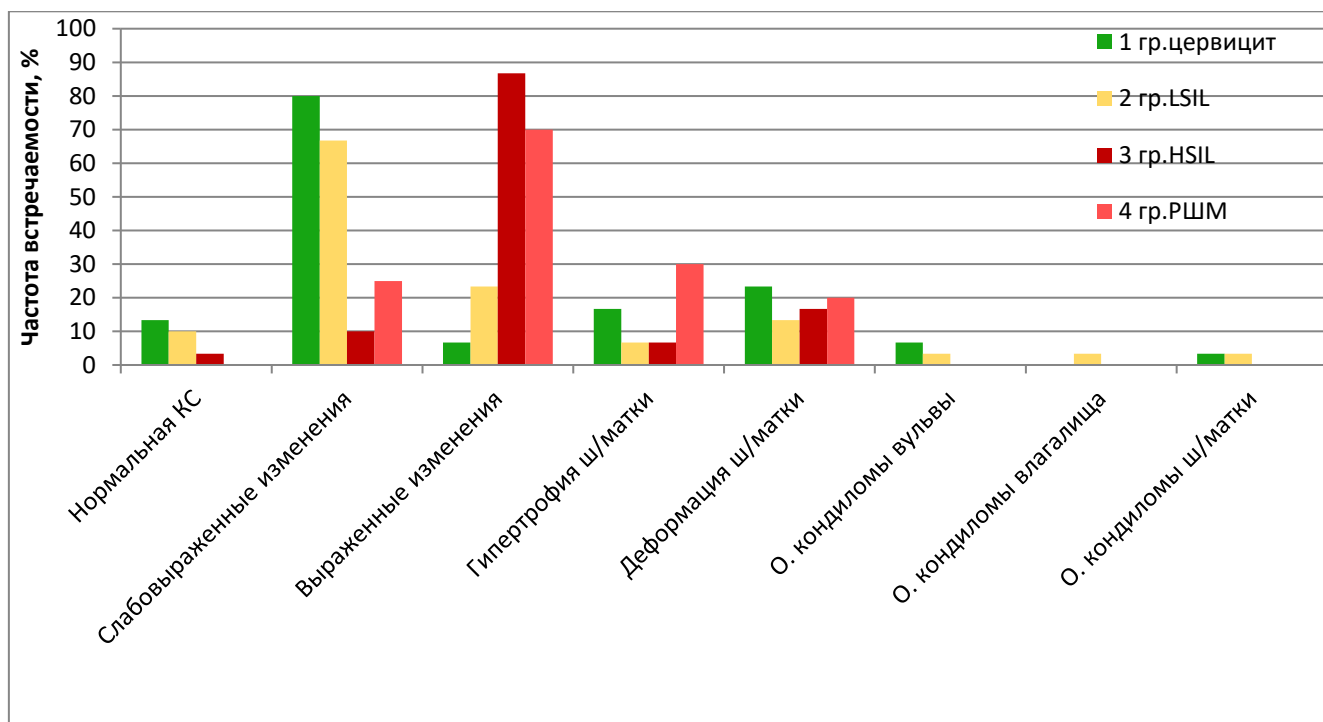
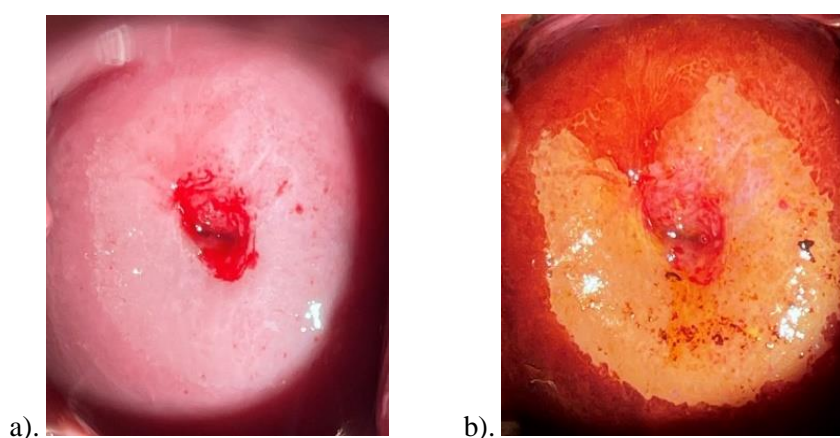


Рисунок 12. Результаты кольпоскопии в исследуемых группах.

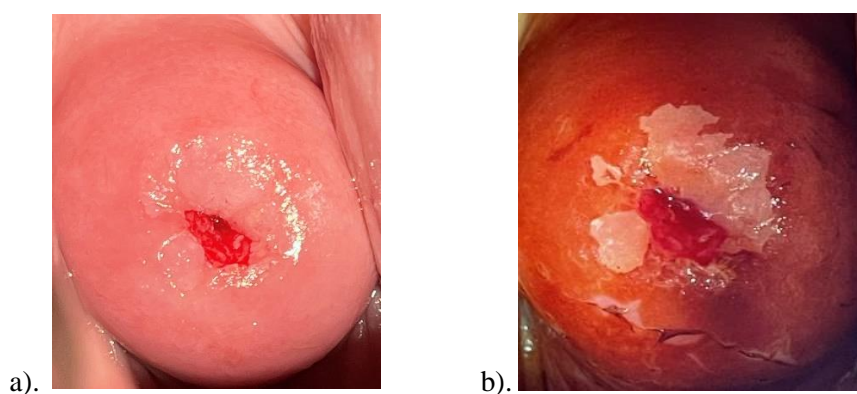
Нормальная кольпоскопическая картина наблюдалась у 5 (15,6%) пациенток 1 группы (хр. цервицит/ВПЧ+), у 4 (11%) 2 группы (LSIL) и у 2 (6,2%) 3 группы (HSIL). Гипертрофия шейки матки чаще всего встречалась у пациенток 4 группы (РШМ) – 6 (27%), в 1 группе, во 2 и в 3 группе она

встречалась реже – 4 (15,8%), 2 (6,5%) и в 5 (17,5%) случаях, соответственно. Деформация шейки матки была выявлена у 7 (25,7%) пациенток в 1 группе, у 5 (14,8%) во 2 группе (LSIL), у 6 (20,1%) в 3 группе (HSIL) и у 10 (35%) в 4 группе (РШМ).

Остроконечные кондиломы вульвы были выявлены у пациенток в 1 группе - 5 (17%), остроконечные кондиломы шейки матки - у 2 (4,5%). У пациенток 2 группы (LSIL) остроконечные кондиломы вульвы, влагалища и шейки матки встречались с частотой – 4,2%, 3,1%, 3,3% соответственно.



Рисунки 13-14. Слабовыраженные изменения при кольпоскопии у пациенток 2 группы. *a). проба с 3% раствором уксусной кислоты; b). проба с 1% раствором Люголя.*



Рисунки 15 -16. Слабовыраженные изменения при кольпоскопии у пациенток 2 группы. *a). проба с 3% раствором уксусной кислоты; b). проба с 1% раствором Люголя.*



a).



b).

Рисунки 17–18. Выраженные изменения при кольпоскопии у пациенток 3 группы. *a). проба с 3% раствором уксусной кислоты; b). проба с 1% раствором Люголя.*



a).

Рисунок 19. Выраженные изменения при кольпоскопии у пациенток 4 группы. *a). проба с 3% раствором уксусной кислоты.*

Заключение

Результаты кольпоскопии показали, что у пациенток 3 и 4 (HSIL, РШМ) групп 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.

3.2.5 Результаты липидного анализа соскобов эпителия шейки матки

Для оценки липидома эпителия шейки матки были выбраны потенциальные липиды-маркеры, характеризующие различия между тканями и пригодных для построения моделей. При этом можно сказать, что в режиме положительных ионов разница в липидных профилях между 1 группой (контроль) и HSIL - понижением уровня церамидов, между 1 группой (контроль) и 5 группой (РШМ) - повышением уровня фосфатидилхолинов, холестериновых эфиров и понижением уровня триацилглицеридов. Так же уровень холестериновых эфиров повышается по сравнению с 1 группой (контроль) нормой и 2 группой (воспалении шейки матки) (таблица 13), аналогично в режиме отрицательных ионов различия между NILM и РШМ наблюдаются в повышении уровня фосфатидилхолинов (PC) и сфингомиелинов (SM) при РШМ (таблица 14). Во 2 и 3 группах (хр.цервицит и LSIL) по сравнению с 1 группой (NILM) отмечается более высокий уровень лизофосфатидилхолины (таблица 14). Уровни холестериновых эфиров также понижаются при HSIL и LSIL, относительно воспаления, но повышаются при РШМ. Также при LSIL понижается уровень фосфатидилхолинов и сфингомиелинов относительно воспаления, а при РШМ наблюдается рост уровней фосфатидилхолинов и триглицеридов (таблица 13). Также в режиме отрицательных ионов чётко определяется рост уровней фосфатидилхолинов и сфингомиелинов при РШМ относительно воспаления (таблица 14). Рост уровня фосфатидилхолинов и сфингомиелинов относительно LSIL характерен и для HSIL, и для РШМ. К липидным маркерам, характеризующим различия между HSIL и РШМ, относятся липидные эфиры и сфингомиелины (таблица 13, 14).

Таблица 13 - Липиды-маркеры, использованные для построения заданной дискриминационной модели в режиме положительных ионов, направление изменения уровня при более тяжёлом заболевании из пары и вероятность отсутствия различий в уровнях согласно тесту Манна-Уитни.

Модель	Липиды	Тренд	P
NILM/ цервицит	Cer-NDS d16:0/16:0	↓	<0,001
	CE 24:1	↑	<0,001
NILM/ LSIL	Cer-NDS d16:0/16:0	↓	<0,001
	PEtOH 20:1_20:1	↓	0,04
NILM/ HSIL	Cer-NDS d16:0/18:0	↓	0,04
NILM/ PIIM	CE 24:1	↑	<0,001
	PC 18:2_18:3	↓	0,009
	TG 10:0_8:0_8:0	↓	0,03
Цервицит/ LSIL	SM d18:0/16:0	↓	0,004
	PC 16:0_22:6	↓	0,001
	PE 18:0_20:4	↑	0,02
	SM d18:1/22:0	↑	0,01
	PE P-16:0/22:6	↓	0,01
	CE 18:1	↑	0,008
	PC 16:1_18:0	↑	0,04
Цервицит/ HSIL	CE 24:1	↓	0,02
Цервицит/ PIIM	CE 18:1	↑	<0,001
	MG 18:0	↑	0,002
	PC 16:0_16:0	↓	0,02
	TG 14:0_16:0_16:1	↓	0,02
	LPC 22:3	↑	<0,001
	TG 16:0_16:0_18:0	↓	<0,001
LSIL/ HSIL	PC 16:0_22:6	↑	0,002
	PC 14:0_16:0	↓	0,002
LSIL/ PIIM	PC 16:0_18:1	↑	<0,001
	SM d20:0/22:0	↓	0,02
	CerP d18:0/22:0	↓	<0,001
	LPC 22:3	↓	<0,001
	PC 16:0_20:5	↑	<0,001
	TG O-18:1_16:0_18:1	↑	0,009
HSIL/ PIIM	CE 24:1	↑	0,006
	PE P-16:0/20:4	↓	0,04
	LPC O-16:0	↑	0,03

Таблица 14 - Липиды-маркеры, использованные для построения заданной дискриминационной модели в режиме отрицательных ионов, направление изменения уровня при более тяжёлом заболевании из пары и вероятность отсутствия различий в

уровнях согласно тесту Манна-Уитни. «n. s.» обозначены отсутствия статистически значимой разницы.

Модель	Переменная	Тренд	P
NILM/ цервицит	LPC 18:2	↑	0,03
	LPC 18:1	↓	n. s.
	PE P-16:0/22:6	↓	n. s.
NILM/ LSIL	LPC 18:2	↑	0,02
	LPC 18:1	↓	n. s.
	PC 16:0_18:2	↓	n. s.
	PC 16:0_18:1	↑	n. s.
NILM/ HSIL	PE P-16:0/16:1	↓	n. s.
	OxPC 18:1_16:1(OH)	↑	n. s.
	PC 18:2_18:2	↓	n. s.
	OxPC 16:0_14:1(COOH)	↑	n. s.
	PC 16:0_22:6	↓	n. s.
NILM/ PИИМ	PC O-16:0/16:0	↑	0,005
	CL 16:0_16:0_16:1_18:1	↓	n. s.
	SM d16:0/18:2	↑	0,002
	PC 16:0_22:6	↓	n. s.
	PC 16:0_18:2	↑	0,02
Цервицит/ LSIL	PE P-18:0/22:6	↑	n. s.
	Cer-NP t18:1/24:1	↑	n. s.
	Cer-NDS d20:0/26:0	↓	n. s.
	OxCL 16:0_16:0_16:1(OOH)_18:1	↑	n. s.
	SM d16:0/18:1	↓	n. s.
Цервицит/ HSIL	PC 16:0_18:2	↑	n. s.
	PC 18:1_20:0	↓	n. s.
	SM d24:0/18:1	↑	n. s.
	OxCL 22:6_22:6_22:6(OOH)_22:6(OOH)	↓	n. s.
	PE P-16:0/16:1	↓	n. s.
	PC 18:1_18:1	↑	n. s.
	OxPG 18:0_20:3(2O)	↓	n. s.
	OxPC 16:0_14:0(CHO)	↓	n. s.
	HexCer-AP t20:2/24:0	↓	n. s.
	SM d26:0/18:1	↑	n. s.
Цервицит/ PИИМ	SM d22:0/20:3	↑	<0,001
	OxCL 18:1_18:2_18:3(OOH2)_20:4	↓	0,03
	SM d24:1/18:1	↑	<0,001
	PC 18:1_18:2	↑	<0,001
	SM d22:1/20:0	↓	n. s.
	SM d20:0/14:0	↑	0,02

LSIL/ HSIL	OxCL 22:6_22:6_22:6(OOH)_22:6(OOH)	↑	n. s.
	HexCer-AP t20:2/24:0	↓	n. s.
LSIL/ PИИМ	SM d22:0/20:3	↑	<0,001
	SM d22:0/18:1	↓	0,004
	PC 18:1_20:0	↑	<0,001
	SM d24:0/18:1	↓	0,001
	SM d24:0/18:0	↓	0,003
	SM d24:1/18:1	↑	<0,001
	PC 18:1_18:1	↑	<0,001
HSIL/ PИИМ	SM d16:0/18:1	↓	0,009
	SM d22:0/18:1	↓	n. s.
	SM d22:0/20:3	↑	0,009
	OxCL 18:1_18:2_20:3_20:4(OOH)	↓	0,04
	OxPC 16:0_14:1(COOH)	↑	0,02
	SM d20:1/16:0	↑	0,005
	PC 18:0_20:3	↑	n. s.
	SM d18:0/16:0	↑	0,02

На основе построенных дискриминационных моделей чьи характеристики приведены в таблице 15, были построены классификационные модели в режиме положительных, в режиме отрицательных, и модель, для которой использовались дискриминационные модели в обоих режимах (таблица 16). Точность первой и второй модели составила 70% и 71% соответственно, точность третьей модели составила 79%. Метод характеризуется высокой прогностической ценностью для диагностики хронического цервицита, NILM (норма) и PИИМ.

Таблица 15 - Характеристики дискриминационных моделей на основе логистической регрессии, полученные в ходе кросс-валидации.

Режим ионов	Модель	AUC	Порог	Чув-ть	Спец-ть
положительные ионы	NILM /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/PИИМ	0,94	0,99	1	0,8
	цервицит/LSIL	0,81	0,13	0,74	0,95
	цервицит/HSIL	0,63	0,46	0,61	0,73
	цервицит/PИИМ	0,9	0,99	1	0,85

	LSIL/HSIL	0,68	0,37	0,67	0,75
	LSIL/PIIM	0,89	0,01	0,91	0,88
	HSIL/PIIM	0,95	0,99	1	0,86
Отрицательные ионы	NILM /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/PIIM	0,75	0,99	0,87	0,63
	цервицит/LSIL	0,65	0,51	0,67	0,63
	цервицит/HSIL	0,82	0,15	0,64	0,87
	цервицит/PIIM	0,94	0,01	0,92	0,96
	LSIL/HSIL	0,64	0,39	0,56	0,73
	LSIL/PIIM	0,89	0,99	0,95	0,89
	HSIL/PIIM	0,77	0,27	0,76	0,76

Таблица 16. Характеристика итоговых классификационных моделей, полученная в ходе кросс-валидации.

№ модели	Диагноз	Объём выборки	Верно отнесённые к диагнозу	Ошибочно отнесённые к диагнозу	Прогностическая ценность
1	NILM	8	7	12	0,37
	Цервицит	29	21	8	0,72
	LSIL	32	24	6	0,80
	HSIL	19	4	6	0,40
	PIIM	23	22	1	0,96
2	NILM	8	7	1	0,88
	Цервицит	29	21	8	0,72
	LSIL	32	17	9	0,65
	HSIL	19	13	13	0,50
	PIIM	23	21	1	0,95
3	NILM	8	8	1	0,89
	Цервицит	29	23	5	0,82
	LSIL	32	23	8	0,74
	HSIL	19	12	9	0,57
	PIIM	23	22	0	1,00

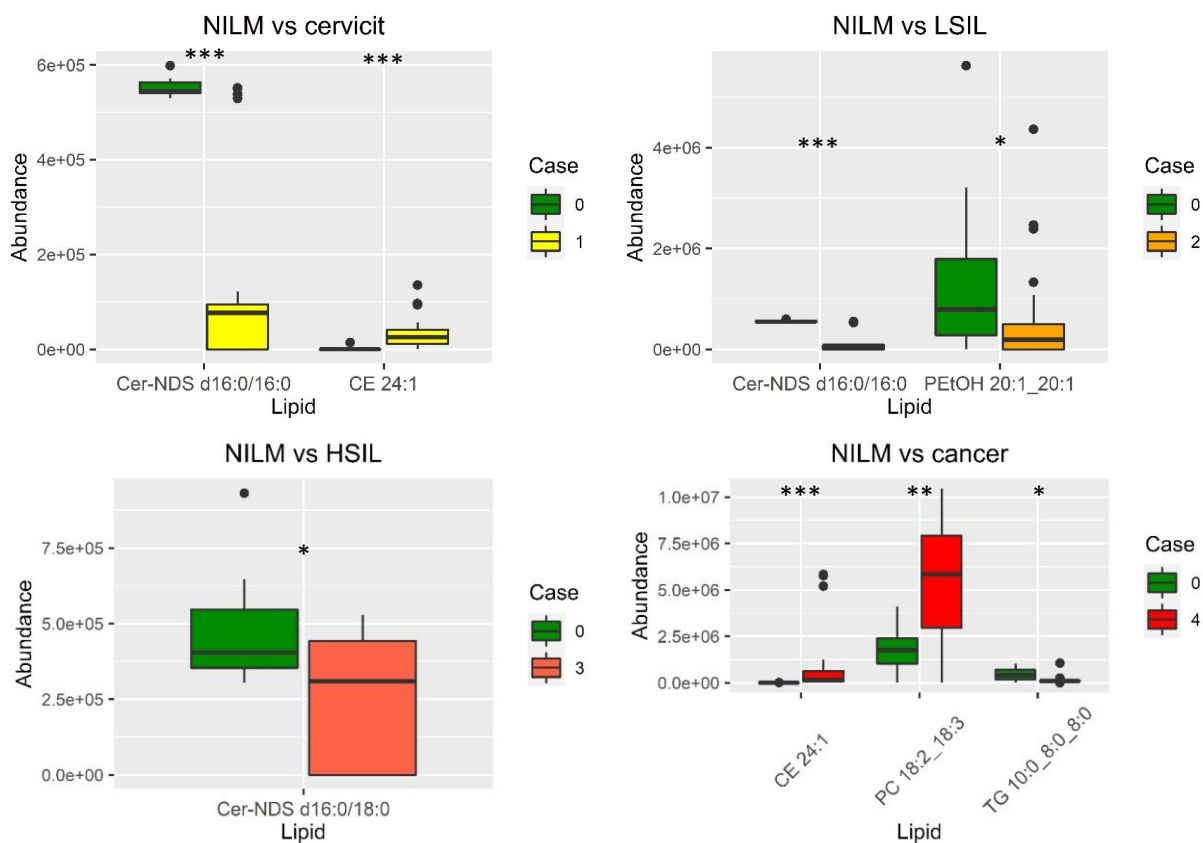


Рисунок 20. Липиды-маркеры в режиме положительных ионов. Зелёным цветом обозначены NILM, жёлтым – цервицит, оранжевым – LSIL, красно-оранжевым – HSIL, красным – РШМ. * обозначены липиды с $p < 0.05$, ** – с $p < 0.01$, *** – с $p < 0.001$

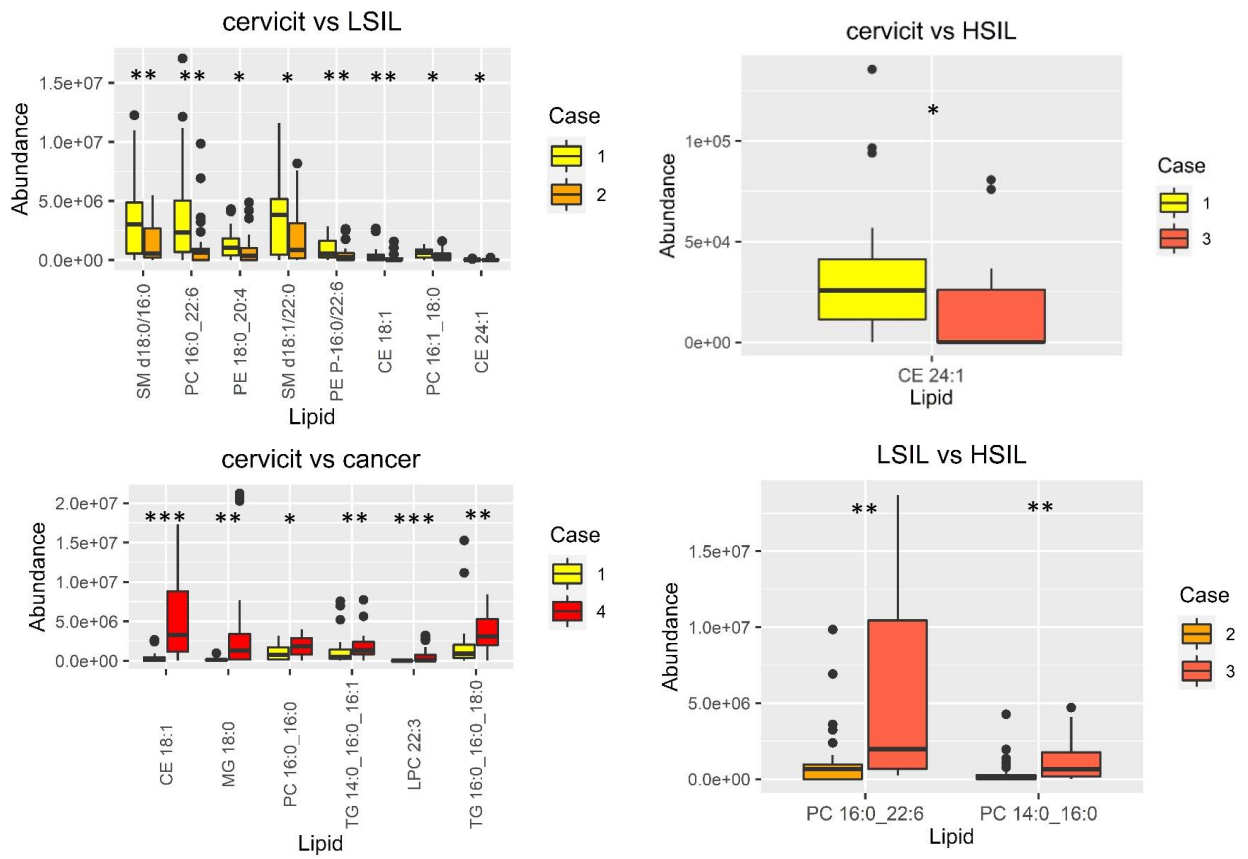


Рисунок 21. Липиды-маркеры в режиме положительных ионов. Жёлтым обозначены цервицит, оранжевым – LSIL, красно-оранжевым – HSIL, красным – РШМ. * обозначены липиды с $p < 0.05$, ** – с $p < 0.01$, *** – с $p < 0.001$

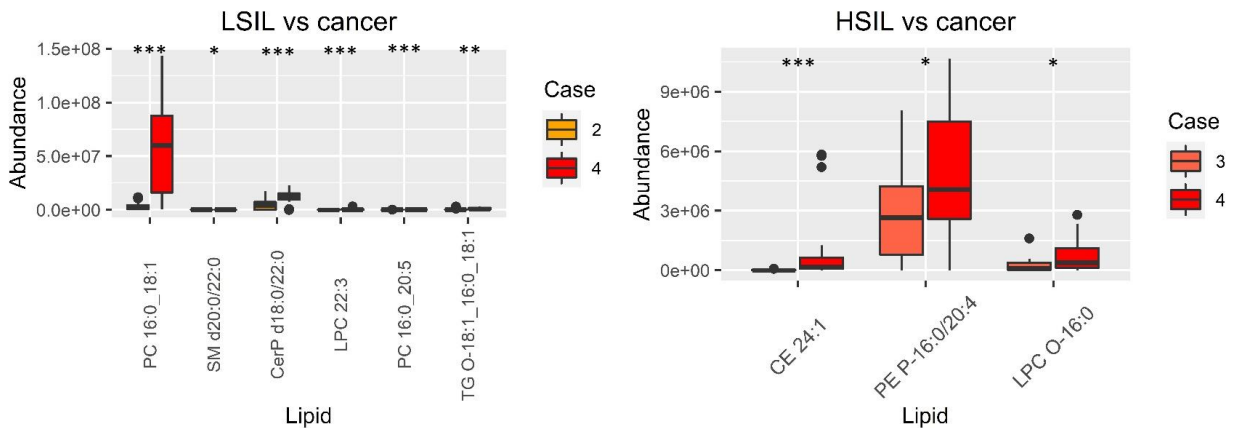


Рисунок 22. Липиды-маркеры в режиме положительных ионов. Оранжевым обозначены LSIL, красно-оранжевым – HSIL, красным – РШМ. * обозначены липиды с $p < 0.05$, ** – с $p < 0.01$, *** – с $p < 0.001$

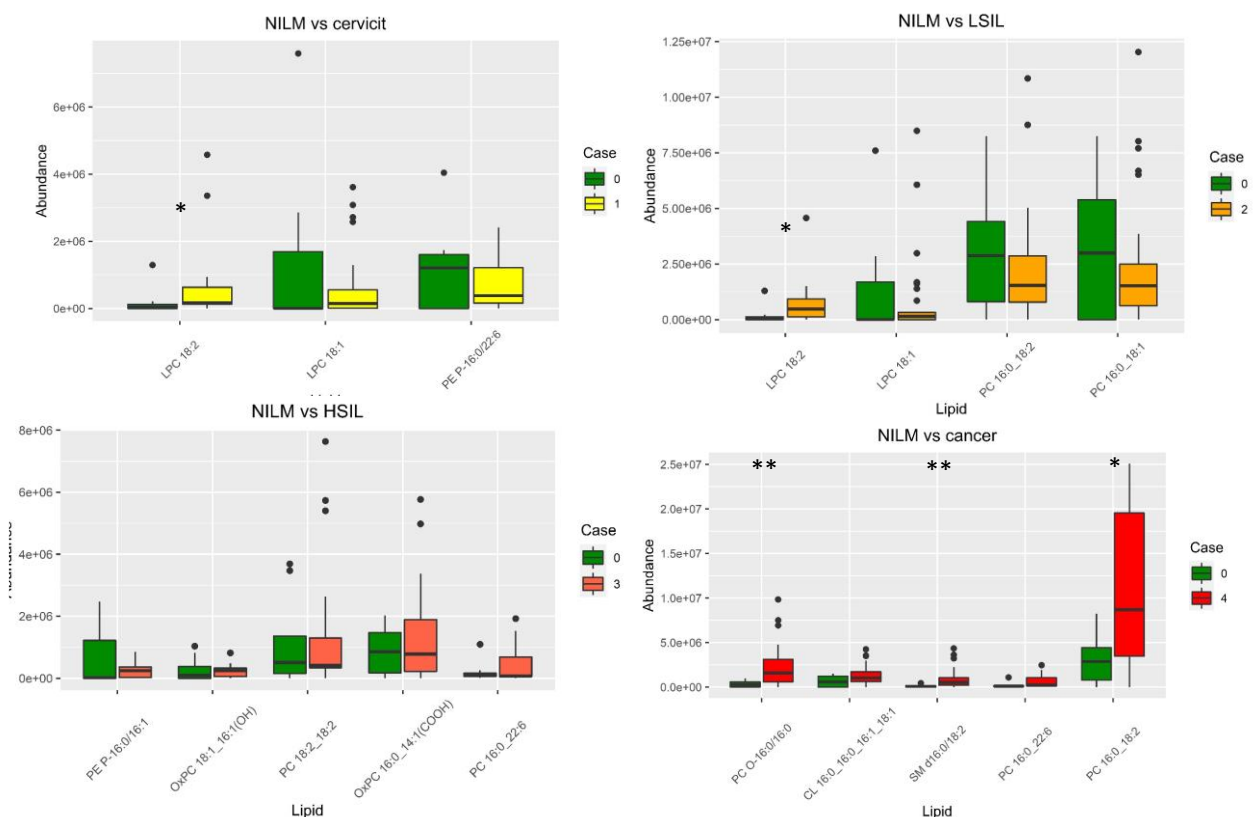


Рисунок 23. Липиды-маркеры в режиме отрицательных ионов. Зелёным цветом обозначены NILM, жёлтым – цервицит, оранжевым – LSIL, красно-оранжевым – HSIL, красным – РШМ. * обозначены липиды с $p < 0.05$.

Заключение

Идентифицированы липиды, относящиеся к классам холестерина эфиров (CE), фосфатидилхолинов (PC), церамидов (Cer) и сфингомиелинов (SM), которые делают потенциально возможным дифференциальную диагностику состояний норма/цервицит/LSIL/HSIL/РШМ. Модели, построенные для режимов положительных и отрицательных ионов, имели точность 70% и 71%. Итоговая модель имела точность 79% и высокую диагностическую способность для цервицита и РШМ и среднюю для LSIL относительно нормы.

Таким образом, метод хромато-масс-спектрометрии целесообразно рассматривать для ранней диагностики предрака и рака шейки матки в дополнении к клинико-морфологическим и молекулярно-генетическим методам исследования.

На следующем этапе работы при проведении ROC-анализа, было установлено, что чувствительность определения тяжёлых неоплазий составила 83%, специфичность - 88% (рисунок 24).

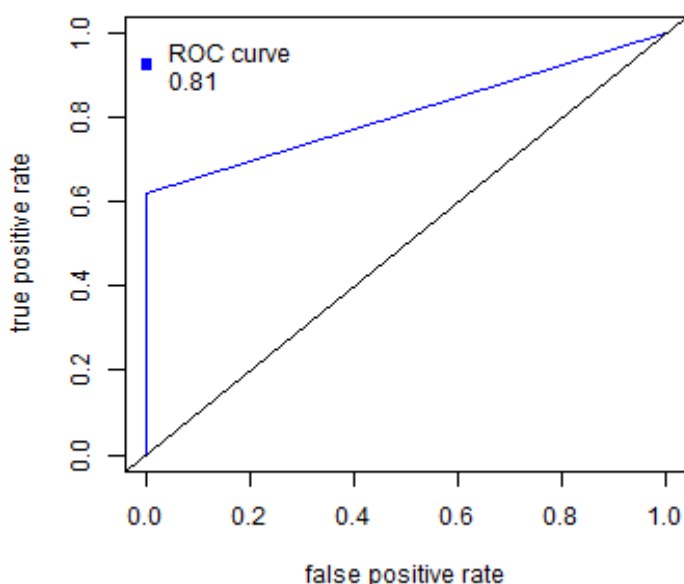


Рисунок 24 – Результаты ROC-анализа.

Из 342 идентифицированных соединений липидов у 129 (38%) была обнаружена статистически значимая корреляция с РНК.

Таблица 17 - Очки каждого диагноза для моделей в режиме положительных ионов.

Образцы	Гист. диагноз	NILM	цервицит	LSIL	HSIL	РШМ
П-ка К.	3	0	2	2	4	2
П-ка Б.	1	1	4	3	2	0
П-ка К.	2	0	3	4	2	1

П-ка Е.	3	1	4	2	2	1
П-ка К.	1	0	4	2	2	2
П -ка Г.	1	1	4	2	2	1
П -ка С.	3	2	1	1	2	4

Таблица 18 - Очки каждого диагноза для моделей в режиме отрицательных ионов.

Образцы	Гист. диагноз	NILM	цервицит	LSIL	HSIL	РШМ
П-ка К.	3	0	2	5	2	1
П-ка Б.	1	2	4	3	0	1
П-ка К.	2	0	2	4	3	1
П-ка Е.	3	0	1	1	5	3
П-ка К.	1	0	3	4	2	1
П-ка Г.	1	1	4	2	0	3
П-ка С.	3	1	2	0	5	2

Таблица 19 - Очки каждого диагноза для моделей в обоих режимах.

Образцы	Гист. диагноз	NILM	цервицит	LSIL	HSIL	РШМ
П-ка К.	3	0	4	7	6	3
П-ка Б.	1	3	8	6	2	1
П-ка К.	2	0	5	8	5	2
П-ка Е.	3	1	5	3	7	4
П-ка К.	1	0	7	6	4	3
П-ка Г.	1	2	8	4	2	4
П-ка С.	3	3	3	1	7	6

При добавлении моделей, выполняющих диагностику по мРНК функциональным генам, чувствительность и специфичность для моделей с положительными ионами, составила 38% и 99% (таблица 20), для моделей с отрицательными ионами 63% и 99% (таблица 21) и с использованием двух режимов 25% и 100% (таблица 22).

Таблица 20 - Таблица диагнозов при использовании липидов из режима положительных ионов.

Реальный диагноз/Поставленный диагноз	NILM	цервицит	LSIL	HSIL	РШМ
NILM	7	0	0	0	0
Цервицит	1	23	4	0	1
LSIL	4	4	23	0	0
HSIL	5	7	2	4	1
РШМ	0	1	0	0	4

Таблица 21 - Таблица диагнозов при использовании липидов из режима отрицательных ионов.

Реальный диагноз/Поставленный диагноз	NILM	цервицит	LSIL	HSIL	РШМ
NILM	6	1	0	0	0
Цервицит	1	19	8	1	0
LSIL	0	14	17	0	0
HSIL	0	2	6	11	0
РШМ	0	1	0	0	4

Таблица 22 - Таблица диагнозов при использовании липидов из обоих режимов.

Реальный диагноз/Поставленный диагноз	NILM	цервицит	LSIL	HSIL	РШМ
NILM	7	0	0	0	0
Цервицит	1	21	7	0	0
LSIL	2	1	28	0	0
HSIL	5	1	11	2	0
РШМ	0	0	1	0	4

Клинические случаи.

Клинический случай №1.

Пациентка К., 38 лет.

Исходно по результатам клинико-лабораторных исследований, цитологическое заключение соответствовало NILM, хронический цервицит. Определялся ВПЧ 18 типа. При кольпоскопии обнаружены слабовыраженные изменения эпителия (рисунок 25). Липидом соскоба эпителия шейки матки: РС 14:0_16:0; РС 16:0_22:6; РС 16:1_18:0; РЕ 18:0_20:4; РЕtОН 20:1_20:1; РЕ-Р 16:0/22:6. Проведена биопсия шейки матки. Гистологический диагноз соответствовал HSIL (CIN II). Пролечена согласно стандартам.

Согласно математической модели, построенной на основе липидома соскобов эпителия, (таблица 23), вероятность поражения тяжелой степени шейки матки (HSIL и РШМ) у представленной пациентки, равна 60%, а легкой степени 40%.

Таблица 23 - Математическая модель, построенная на основе липидома эпителия шейки матки.

	NILM	Цервицит	LSIL	HSIL	РШМ	Вероятность	Вероятность
--	------	----------	------	------	-----	-------------	-------------

						пораж. легкой степени, %	пор. тяжелой степени, %
П-ка К.	0	2	2	4	2	40	60
П-ка Б.	1	4	3	2	0	80	20
П-ка Е.	0	2	1	4	3	30	70
П-ка С.	1	2	0	4	3	30	70

Таким образом, липидомный анализ эпителия шейки матки методом хромато-масс-спектрометрии обладает высокой эффективностью в диагностике HSIL и совпадает с результатом гистологического диагноза по сравнению с цитологическим методом.



Рисунок 25. Результаты КС. Клинический случай №1. Проба с 3% раствором уксусной кислоты

Клинический случай №2.

Пациентка С., 41 год.

По результатам цитологического исследования обнаружен LSIL. Определялся ВПЧ 16 типа. При кольпоскопии выявлены слабовыраженные изменения эпителия шейки матки (рисунок 26). Липидом соскоба эпителия шейки матки соответствовал HSIL: ОхСL 22:6_22:6_22:6(ООН)_22:6(ОНН); ОхРС 16:0_14:1 (СНО); РС 16:0_18:1; РС 16:0_18:2; РС 18:1_18:1; РС 18:2_18:2; SM d26:0/18:1; SM d24:0/18:1. Проведена биопсия шейки матки. Гистологический диагноз выявил HSIL (CIN II-III). Лечение проведено согласно стандартам. Согласно вышеуказанной модели (таблица 23),

вероятность поражения тяжелой степени шейки матки (HSIL и РШМ) у данной пациентки, также оказалась выше, чем легкой – 70% и 30%, соответственно, что совпадает с гистологическим диагнозом.



Рисунок 26. Результаты КС. Клинический случай №2. Проба с 3% раствором уксусной кислоты.

Клинический случай №3.

Пациентка Б., 32 года.

Цитологическое заключение соответствовало – HSIL. Был выявлен ВПЧ 51 типа. При кольпоскопии обнаружены слабовыраженные изменения эпителия шейки матки (рисунок 27). Липидом соскоба эпителия указывал на отсутствие неоплазии и наличие воспаления: СЕ 18:1 РС 14:0_16:0; РС 16:0_22,6; РС 18,0_20,4; РЕtОН 20:1_20:1; РЕР 16:0/22:6 SM d18:0/16:0. Пациентке проведена биопсия шейки матки. Гистологический диагноз соответствовал хроническому цервициту. Данный клинический случай демонстрируют значительное несоответствие результатов цитологии и гистологии. При этом вероятность легкого поражения составила 80%, а тяжелого 20%, согласно математической модели, представленной в таблице (таблица 23).



Рисунок 27. Результаты КС. Клинический случай №3. Проба с 3% раствором уксусной кислоты.

Клинический случай №4.

Пациентка Е., 29 лет.

Исходно цитологическое заключение соответствовало - LSIL. Определялся ВПЧ 16 типа. При кольпоскопии обнаружены слабовыраженные изменения эпителия. (рисунок 28). Липидом соскоба эпителия шейки матки: HexCer-AP t20:2/24:0; LPC 18:1; OхCL 22:6_22:6_22:6(OOH)_22:6(OHH); OхPC 16:0_14:1 (CHO); PC 16:0_18:1; PC 16:0_18:2; PC 18:1_18:1; PC 18:2_18:2; SM d26:0/18, SM d16:0/18:1. Проведена биопсия шейки матки. Гистологический диагноз соответствовал HSIL (CIN II-III). Проведено лечение согласно стандартам. Результаты морфологических методов на примере представленного клинического случая, показали несовпадение, при этом вероятность тяжелого поражения, согласно модели (таблица 23), равна 70%, легкой – 30%.



Рисунок 28. Результаты КС. Клинический случай №4. Проба с 3% раствором уксусной кислоты.

Таким образом, 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.

Результаты оценки уровня экспрессии мРНК генов

С целью прогнозирования риска развития РШМ и оценки степени неопластической трансформации эпителия шейки матки, всем пациенткам, включенным в исследование (n=116), был проведен анализ экспрессии мРНК генов, участвующих в процессах пролиферации (MKI67 (KI67)), апоптоза (BCL2), регулирующих клеточный цикл (CDKN2A (P16)), а также влияющих на рецепторный аппарат клеток (PGR).

Уровень экспрессии мРНК исследованных генов (Me) представлен на рисунке 29. Статистически значимые изменения отмечены для гена Ki67 (уровень экспрессии повышен в 3 раза при HSIL ($p=0,0048$), в 6 раз при РШМ ($p=0,00017$) по сравнению с хроническим цервицитом.

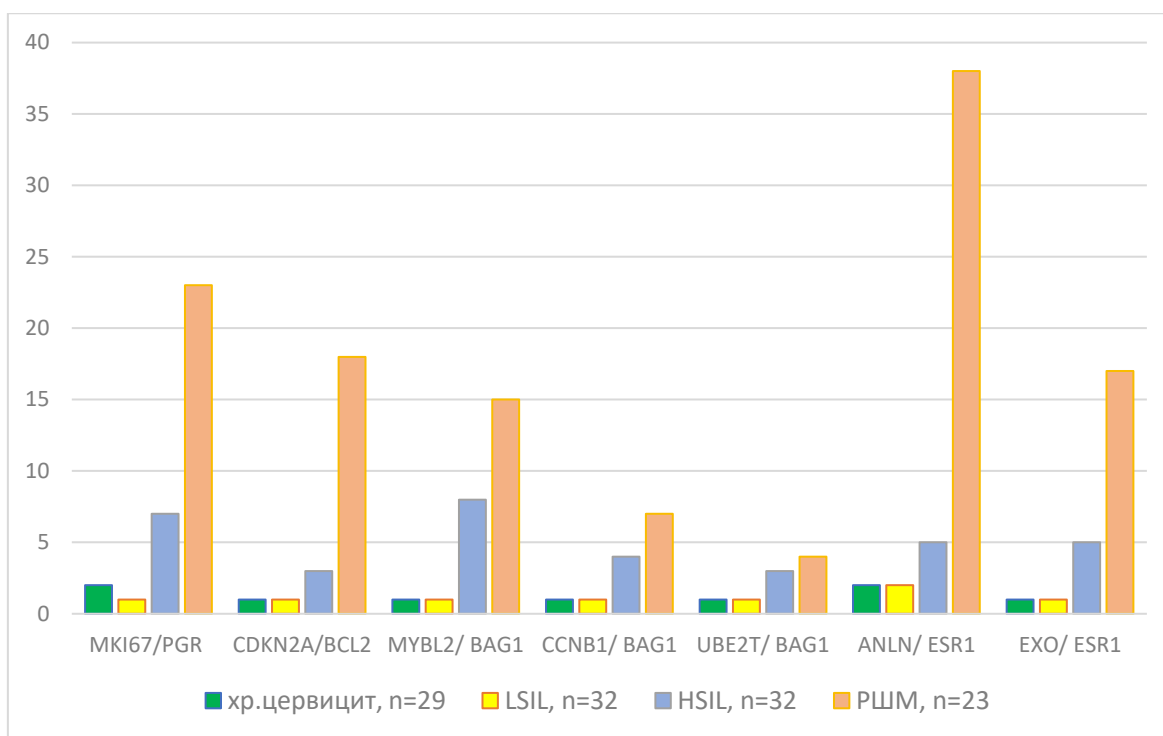


Рисунок 29. Профиль экспрессии мРНК генов в исследуемых группах.

Аналогичные результаты отмечены для гена p16 - повышение уровня экспрессии в 3 раза при HSIL ($p=0,00051$), в 6 раз при PШМ ($p=0,0038$) по сравнению с хроническим цервицитом. Уровень экспрессии гена PGR был снижен в 4 раза при PШМ по сравнению с LSIL ($p=0,042$).

Заключение

Анализ уровня экспрессии мРНК генов показал, что статистически значимые изменения отмечены для гена Ki67 (повышение уровня экспрессии в 3 раза при HSIL, в 6 раз при PШМ) и гена p16 (повышение уровня экспрессии в 4 раза при HSIL, в 6 раз при PШМ, по сравнению с хроническим цервицитом). Уровень экспрессии гена PGR был снижен в 4 раза при PШМ по сравнению с LSIL.

Результаты корреляционного анализа полученных липидов с морфологическими и молекулярно-генетическими методами исследования

При сравнении результатов, полученных при цитологическом и гистологическом анализах у 116 пациенток, точность постановки диагноза по цитологии составила 55% (таблица 24). При этом точность диагностики по липидному профилю в режиме положительных ионов составила 70% (таблица 25), по липидному профилю в режиме отрицательных ионов составила 71% (таблица 26), объединённая модель дала точность 79% (таблица 27).

Таблица 24. Число пациентов с определённым диагнозом (строки), которым был поставлен диагноз по цитологии (столбцы).

	NILM	Цервицит	LSIL	HSIL	РШМ
NILM	14	0	0	0	0
Цервицит	10	10	9	1	0
LSIL	2	5	21	7	0
HSIL	3	2	4	13	0
РШМ	0	0	0	5	0

Таблица 25. Данные о валидации модели для режима положительных ионов.

	NILM	Цервицит	LSIL	HSIL	РШМ
NILM	7	0	0	1	0
Цервицит	2	21	4	2	0
LSIL	4	2	24	2	0
HSIL	6	6	2	4	1
РШМ	0	0	0	1	22

Таблица 26. Данные о валидации модели для режима отрицательных ионов.

	NILM	Цервицит	LSIL	HSIL	РШМ
NILM	7	1	0	0	0
Цервицит	0	21	3	5	0
LSIL	0	7	17	7	1
HSIL	0	0	6	13	0
РШМ	1	0	0	1	21

Таблица 27. Данные о валидации объединённой модели.

	NILM	Цервицит	LSIL	HSIL	РШМ
NILM	8	0	0	0	0
цервицит	0	23	2	4	0
LSIL	0	5	23	4	0
HSIL	1	0	6	12	0
РШМ	0	0	0	1	22

Уровень статистически значимой корреляции липидов с mRNA лежит в диапазоне от 0.2 до 0.35 (таблица 28, таблица 29, рисунок 30, рисунок 31).

Таблица 28 - Липиды, зарегистрированные в режиме положительных ионов, имеющие статистически значимую корреляцию с mRNA.

Липид	mRNA	R	ДИ R	P
CE 24:1	CCNB1/ BAG1	-0.24	-0.42--0.032	0.02
Cer-NDS d18:0/22:0	MKI67/PGR	-0.32	-0.49--0.12	0.002
Cer-NDS d18:0/22:0	MYBL2/ BAG1	-0.21	-0.4--0.0026	0.047
Cer-NDS d18:0/22:0	ANLN/ ESR1	-0.27	-0.45--0.066	0.01
Cer-NDS d18:0/22:0	EXO/ ESR1	-0.23	-0.42--0.029	0.03
Cer-NDS d18:0/24:0	MKI67/PGR	-0.27	-0.45--0.063	0.01
Cer-NDS d18:0/26:0	MKI67/PGR	-0.28	-0.46--0.083	0.006
Cer-NDS d18:0/26:0	ANLN/ ESR1	-0.23	-0.42--0.029	0.03
Cer-NDS d20:0/26:0	MKI67/PGR	-0.29	-0.47--0.092	0.005
Cer-NDS d20:0/26:0	MYBL2/ BAG1	-0.21	-0.4--0.0024	0.048
Cer-NDS d20:0/26:0	ANLN/ ESR1	-0.26	-0.44--0.056	0.01
Cer-NDS d20:0/26:0	EXO/ ESR1	-0.22	-0.4--0.011	0.04
Cer-NDS d24:0/18:0	MKI67/PGR	-0.26	-0.44--0.06	0.01
Cer-NDS d24:0/18:0	ANLN/ ESR1	-0.21	-0.4--0.0088	0.04
Cer-NS d18:1/22:1	MKI67/PGR	-0.27	-0.45--0.063	0.01
Cer-NS d18:1/22:1	ANLN/ ESR1	-0.22	-0.41--0.014	0.04
Cer-NS d18:1/24:1	MKI67/PGR	-0.22	-0.41--0.016	0.03
Cer-NS d18:1/24:1	ANLN/ ESR1	-0.21	-0.4--0.0082	0.04
Cer-NS d18:1/24:2	MKI67/PGR	-0.21	-0.4--0.0025	0.048
Cer-NS d18:1/26:0	MKI67/PGR	-0.29	-0.47--0.093	0.005
Cer-NS d18:1/26:0	ANLN/ ESR1	-0.29	-0.46--0.085	0.006
Cer-NS d18:1/26:0	EXO/ ESR1	-0.22	-0.41--0.02	0.03
Cer-NS d18:1/26:1	MKI67/PGR	-0.3	-0.48--0.1	0.004
Cer-NS d18:1/26:1	MYBL2/ BAG1	-0.24	-0.42--0.033	0.02
Cer-NS d18:1/26:1	ANLN/ ESR1	-0.3	-0.48--0.1	0.004
Cer-NS d18:1/26:1	EXO/ ESR1	-0.25	-0.44--0.048	0.02
Cer-NS d18:1/26:2	MKI67/PGR	-0.28	-0.46--0.078	0.007
Cer-NS d18:2/16:0	MKI67/PGR	-0.3	-0.48--0.099	0.004

Cer-NS d18:2/16:0	ANLN/ ESR1	-0.26	-0.45--0.062	0.01
Cer-NS d18:2/24:0	MKI67/PGR	-0.27	-0.45--0.063	0.01
Cer-NS d18:2/24:0	ANLN/ ESR1	-0.24	-0.42--0.035	0.02
Cer-NS d18:2/24:0	EXO/ ESR1	-0.25	-0.43--0.046	0.02
Cer-NS d18:2/26:0	MKI67/PGR	-0.29	-0.47--0.093	0.005
Cer-NS d18:2/26:0	ANLN/ ESR1	-0.27	-0.45--0.072	0.009
Cer-NS d18:2/26:0	EXO/ ESR1	-0.24	-0.43--0.038	0.02
HexCer-NDS d18:0/26:0	MKI67/PGR	-0.23	-0.42--0.029	0.03
HexCer-NDS d18:0/26:0	MYBL2/ BAG1	-0.21	-0.4--0.00065	0.05
HexCer-NDS d20:0/26:0	MKI67/PGR	-0.26	-0.44--0.057	0.01
HexCer-NDS d20:0/26:0	MYBL2/ BAG1	-0.23	-0.42--0.029	0.03
HexCer-NDS d20:0/26:0	ANLN/ ESR1	-0.25	-0.44--0.051	0.01
HexCer-NDS d20:0/26:0	EXO/ ESR1	-0.21	-0.4--0.00091	0.049
HexCer-NS d18:1/16:1	MKI67/PGR	-0.24	-0.43--0.037	0.02
HexCer-NS d18:1/16:1	ANLN/ ESR1	-0.23	-0.41--0.023	0.03
HexCer-NS d18:1/24:1	MKI67/PGR	-0.23	-0.41--0.022	0.03
HexCer-NS d18:1/26:0	MKI67/PGR	-0.21	-0.4--0.0014	0.049
HexCer-NS d18:1/26:1	MKI67/PGR	-0.26	-0.44--0.059	0.01
HexCer-NS d18:1/26:1	ANLN/ ESR1	-0.24	-0.43--0.038	0.02
LPC 16:0	CCNB1/ BAG1	-0.21	-0.4--0.0025	0.047
LPC 16:0	CDKN2A/BCL2	0.25	0.041-0.43	0.02
LPC 16:0	CCNB1/ BAG1	-0.21	-0.4--0.0087	0.04
LPC 16:1	MYBL2/ BAG1	-0.22	-0.41--0.012	0.04
LPC 16:1	CCNB1/ BAG1	-0.29	-0.47--0.092	0.005
LPC 16:1	UBE2T/ BAG1	-0.26	-0.44--0.055	0.01
LPC 16:1	ANLN/ ESR1	-0.26	-0.44--0.06	0.01
LPC 18:0	CDKN2A/BCL2	0.23	0.027-0.42	0.03
LPC 18:1	CCNB1/ BAG1	-0.26	-0.44--0.055	0.01
LPC 18:1	UBE2T/ BAG1	-0.21	-0.4--0.0091	0.04
LPC 18:1	ANLN/ ESR1	-0.23	-0.42--0.028	0.03
LPC 18:2	CCNB1/ BAG1	-0.22	-0.41--0.018	0.03
MG 16:0	MKI67/PGR	-0.23	-0.41--0.022	0.03
OxLPC 20:2(OH)	CDKN2A/BCL2	-0.22	-0.41--0.012	0.04
OxTG 18:3 OOO_20:5(Ke,OH)_18:4	MKI67/PGR	-0.3	-0.48--0.099	0.004
PA 14:1_18:0	MKI67/PGR	-0.29	-0.46--0.085	0.006
PA 14:1_18:0	ANLN/ ESR1	-0.26	-0.44--0.055	0.01
PA 14:1_18:0	EXO/ ESR1	-0.21	-0.4--0.0034	0.047
PC 14:0_16:0	CDKN2A/BCL2	0.26	0.059-0.44	0.01
PC 16:0_16:0	CDKN2A/BCL2	0.23	0.022-0.41	0.03
PC 16:0_16:1	CCNB1/ BAG1	-0.21	-0.4--0.0038	0.046
PC 16:0_18:1	CDKN2A/BCL2	0.23	0.027-0.42	0.03
PC 8:0_18:1	MKI67/PGR	-0.28	-0.46--0.083	0.006
PC 8:0_18:1	ANLN/ ESR1	-0.26	-0.44--0.054	0.01
PE 18:0_18:1	CCNB1/ BAG1	-0.21	-0.4--0.0091	0.04
PE 18:0_18:1	ANLN/ ESR1	-0.22	-0.4--0.011	0.04
Plasmany-PC O-16:0/16:0	MKI67/PGR	-0.28	-0.46--0.075	0.01

Plasmany-PC O-16:0/16:0	MYBL2/ BAG1	-0.25	-0.43--0.044	0.02
Plasmany-PC O-16:0/16:0	ANLN/ ESR1	-0.29	-0.47--0.086	0.01
Plasmany-PC O-16:0/16:0	EXO/ ESR1	-0.23	-0.42--0.024	0.03
Plasmany-PC O-18:0/18:2	ANLN/ ESR1	-0.23	-0.42--0.027	0.03
Plasmany-PC O-18:0/18:2	EXO/ ESR1	-0.21	-0.4--0.0079	0.04
Plasmany-PC O-18:1/24:1	MYBL2/ BAG1	-0.26	-0.44--0.059	0.01
Plasmany-PC O-18:1/24:1	CCNB1/ BAG1	-0.24	-0.43--0.041	0.02
Plasmany-PC O-18:1/24:1	ANLN/ ESR1	-0.31	-0.48--0.11	0.003
Plasmany-PC O-18:1/24:1	EXO/ ESR1	-0.25	-0.43--0.045	0.02
Plasmany-PC O-20:0/18:2	MYBL2/ BAG1	-0.23	-0.42--0.029	0.03
Plasmany-PC O-20:0/18:2	ANLN/ ESR1	-0.27	-0.45--0.067	0.01
Plasmany-PC O-20:0/18:2	EXO/ ESR1	-0.24	-0.43--0.038	0.02
Plasmany-PC O-20:1/18:1	MYBL2/ BAG1	-0.24	-0.43--0.037	0.02
Plasmany-PC O-20:1/18:1	ANLN/ ESR1	-0.27	-0.45--0.069	0.009
Plasmany-PC O-20:1/18:1	EXO/ ESR1	-0.24	-0.42--0.031	0.02
Plasmany-PC O-22:0/18:1	MYBL2/ BAG1	-0.21	-0.4--0.0016	0.048
Plasmany-PC O-22:0/18:1	ANLN/ ESR1	-0.27	-0.45--0.064	0.01
Plasmany-PC O-22:0/18:1	EXO/ ESR1	-0.22	-0.4--0.011	0.04
Plasmany-PC O-22:0/18:2	MYBL2/ BAG1	-0.27	-0.45--0.068	0.01
Plasmany-PC O-22:0/18:2	CCNB1/ BAG1	-0.26	-0.44--0.055	0.01
Plasmany-PC O-22:0/18:2	ANLN/ ESR1	-0.31	-0.49--0.11	0.003
Plasmany-PC O-22:0/18:2	EXO/ ESR1	-0.24	-0.42--0.036	0.02
Plasmany-PC O-24:0/18:2	MYBL2/ BAG1	-0.24	-0.43--0.037	0.02
Plasmany-PC O-24:0/18:2	CCNB1/ BAG1	-0.23	-0.42--0.03	0.03
Plasmany-PC O-24:0/18:2	ANLN/ ESR1	-0.29	-0.47--0.087	0.006
Plasmany-PC O-24:0/18:2	EXO/ ESR1	-0.24	-0.42--0.032	0.02
Plasmany-PC O-24:1/16:0	MYBL2/ BAG1	-0.21	-0.4--0.0034	0.047
Plasmany-PC O-24:1/16:0	ANLN/ ESR1	-0.26	-0.44--0.06	0.01
Plasmany-PC O-24:1/16:0	EXO/ ESR1	-0.22	-0.4--0.01	0.04
Plasmany-PC O-24:1/18:1	MYBL2/ BAG1	-0.26	-0.44--0.059	0.01
Plasmany-PC O-24:1/18:1	CCNB1/ BAG1	-0.26	-0.44--0.056	0.01
Plasmany-PC O-24:1/18:1	ANLN/ ESR1	-0.31	-0.48--0.11	0.003
Plasmany-PC O-24:1/18:1	EXO/ ESR1	-0.25	-0.43--0.045	0.02
plasmany-TG O-16:0_16:0_18:1	MKI67/PGR	-0.25	-0.43--0.046	0.02
plasmany-TG O-16:0_18:1_18:2	MKI67/PGR	-0.24	-0.42--0.035	0.02
plasmany-TG O-18:0_16:0_18:1	MKI67/PGR	-0.23	-0.42--0.026	0.03
plasmany-TG O-18:1_16:0_16:1	MKI67/PGR	-0.26	-0.45--0.062	0.01
plasmany-TG O-18:1_16:0_18:1	MKI67/PGR	-0.22	-0.41--0.018	0.03
plasmany-TG O-18:1_18:2_18:3	MKI67/PGR	-0.26	-0.44--0.059	0.01
plasmany-TG O-18:1_18:2_18:3	ANLN/ ESR1	-0.21	-0.4--0.0011	0.049
Plasmenyl-PC P-16:1/24:0	MKI67/PGR	-0.23	-0.41--0.022	0.03
Plasmenyl-PC P-24:0/16:0	MYBL2/ BAG1	-0.24	-0.42--0.032	0.02
Plasmenyl-PC P-24:0/16:0	CCNB1/ BAG1	-0.23	-0.41--0.021	0.03
Plasmenyl-PC P-24:0/16:0	ANLN/ ESR1	-0.29	-0.47--0.087	0.006
Plasmenyl-PC P-24:0/16:0	EXO/ ESR1	-0.23	-0.42--0.029	0.03
Plasmenyl-PC P-24:0/18:1	MYBL2/ BAG1	-0.31	-0.49--0.11	0.003

Plasmenyl-PC P-24:0/18:1	CCNB1/ BAG1	-0.3	-0.48--0.1	0.004
Plasmenyl-PC P-24:0/18:1	UBE2T/ BAG1	-0.24	-0.42--0.034	0.02
Plasmenyl-PC P-24:0/18:1	ANLN/ ESR1	-0.35	-0.52--0.16	0.001
Plasmenyl-PC P-24:0/18:1	EXO/ ESR1	-0.29	-0.46--0.085	0.006
Plasmenyl-PE P-16:0/18:2	MKI67/PGR	-0.23	-0.41--0.02	0.03
Plasmenyl-PE P-16:0/18:2	ANLN/ ESR1	-0.22	-0.41--0.016	0.04
Plasmenyl-PE P-16:0/22:6	CDKN2A/BCL2	0.22	0.016-0.41	0.04
Plasmenyl-PE P-18:0/18:1	ANLN/ ESR1	-0.22	-0.41--0.013	0.04
PS 16:0_22:6	MKI67/PGR	-0.28	-0.46--0.081	0.007
SM d18:0/22:0	MKI67/PGR	-0.21	-0.4--0.0033	0.047
SM d18:3/18:0	ANLN/ ESR1	-0.21	-0.4--0.0059	0.04
SM d20:0/22:0	ANLN/ ESR1	-0.22	-0.4--0.011	0.04
TG 10:0_8:0_8:0	MKI67/PGR	-0.24	-0.43--0.036	0.02
TG 10:0_8:0_8:0	ANLN/ ESR1	-0.21	-0.4--0.0057	0.04
TG 14:0_16:0_16:1	MKI67/PGR	-0.21	-0.4--0.0019	0.048
TG 14:0_16:0_18:1	MKI67/PGR	-0.22	-0.4--0.011	0.04
TG 16:0_16:0_18:0	MKI67/PGR	-0.22	-0.41--0.018	0.03
TG 16:0_16:0_18:1	MKI67/PGR	-0.23	-0.41--0.023	0.03
TG 16:0_18:0_18:0	MKI67/PGR	-0.22	-0.41--0.019	0.03
TG 16:0_18:0_18:1	MKI67/PGR	-0.22	-0.41--0.015	0.04
TG 16:0_18:1_24:0	MKI67/PGR	-0.21	-0.4--0.0046	0.045
TG 18:0_18:0_18:1	MKI67/PGR	-0.22	-0.41--0.019	0.03
TG 18:0_18:1_24:0	MKI67/PGR	-0.26	-0.44--0.052	0.01
TG 18:1_18:1_24:0	MKI67/PGR	-0.22	-0.41--0.017	0.03
TG 18:1_18:1_24:0	ANLN/ ESR1	-0.25	-0.43--0.043	0.02
TG 18:1_18:2_20:0	ANLN/ ESR1	-0.23	-0.42--0.028	0.03
TG 18:1_20:1_26:0	MKI67/PGR	-0.23	-0.41--0.02	0.03

Таблица 29 - Липиды, зарегистрированные в режиме отрицательных ионов, имеющие статистически значимую корреляцию с mRNA.

Липид	mRNA	R	ДИ R	P
Cer-AP t18:1/26:0	EXO/ ESR1	-0.21	-0.4--0.0046	0.045
Cer-AS d26:1/16:0	MYBL2/ BAG1	-0.24	-0.43--0.038	0.02
Cer-AS d26:1/16:0	ANLN/ ESR1	-0.24	-0.42--0.034	0.02
Cer-NP t18:0/26:1	MKI67/PGR	-0.22	-0.41--0.015	0.04
Cer-NP t18:0/26:1	ANLN/ ESR1	-0.22	-0.41--0.015	0.04
Cer-NP t18:0/26:1	EXO/ ESR1	-0.22	-0.41--0.017	0.03
Cer-NP t18:1/24:1	MKI67/PGR	-0.22	-0.41--0.014	0.04
Cer-NP t18:1/24:1	ANLN/ ESR1	-0.22	-0.41--0.014	0.04
Cer-NP t18:1/24:1	EXO/ ESR1	-0.22	-0.41--0.016	0.04
Cer-NP t20:0/26:0	MKI67/PGR	-0.21	-0.4--0.0022	0.05
CL 16:0_16:1_18:0_18:1	MYBL2/ BAG1	-0.23	-0.42--0.025	0.03
CL 16:0_16:1_18:1_18:1	MYBL2/ BAG1	-0.24	-0.43--0.038	0.02
CL 16:0_16:1_18:1_18:1	ANLN/ ESR1	-0.22	-0.4--0.0098	0.04
CL 16:0_16:1_18:1_18:2	MYBL2/ BAG1	-0.22	-0.4--0.011	0.04

CL 16:0_18:1_18:2_20:1	MYBL2/ BAG1	-0.22	-0.4--0.011	0.04
CL 16:0_18:1_18:2_20:1	ANLN/ ESR1	-0.22	-0.41--0.02	0.03
CL 18:0_18:1_18:2_18:2	MYBL2/ BAG1	-0.24	-0.42--0.034	0.02
HexCer-AP t18:0/24:0	ANLN/ ESR1	-0.22	-0.4--0.0099	0.04
HexCer-AP t18:0/24:1	MKI67/PGR	-0.22	-0.41--0.013	0.04
HexCer-AP t18:0/24:1	MYBL2/ BAG1	-0.22	-0.4--0.011	0.04
HexCer-AP t20:0/22:0	MYBL2/ BAG1	-0.21	-0.4--0.0054	0.04
HexCer-AP t20:2/24:0	MYBL2/ BAG1	-0.23	-0.42--0.028	0.03
HexCer-NS d18:1/16:0	MYBL2/ BAG1	-0.23	-0.42--0.026	0.03
HexCer-NS d18:1/16:0	ANLN/ ESR1	-0.21	-0.4--0.0012	0.049
LPC 18:0	CCNB1/ BAG1	-0.22	-0.41--0.019	0.03
LPC 18:0	UBE2T/ BAG1	-0.22	-0.41--0.018	0.03
LPC 18:1	MYBL2/ BAG1	-0.22	-0.4--0.011	0.04
LPC 18:1	CCNB1/ BAG1	-0.24	-0.43--0.039	0.02
LPC 18:1	UBE2T/ BAG1	-0.23	-0.41--0.022	0.03
LPC 18:1	ANLN/ ESR1	-0.24	-0.42--0.033	0.02
LPE 16:0	CCNB1/ BAG1	-0.25	-0.43--0.045	0.02
LPE 16:1	CCNB1/ BAG1	-0.21	-0.4--0.003	0.05
LPE 18:0	MYBL2/ BAG1	-0.24	-0.42--0.031	0.02
LPE 18:0	CCNB1/ BAG1	-0.26	-0.44--0.052	0.01
LPE 18:0	UBE2T/ BAG1	-0.27	-0.45--0.062	0.01
LPG 16:1	MYBL2/ BAG1	-0.23	-0.42--0.026	0.03
LPG 16:1	CCNB1/ BAG1	-0.25	-0.43--0.042	0.02
LPG 16:1	UBE2T/ BAG1	-0.24	-0.42--0.035	0.02
OxCL 16:0_16:0_16:1(OOH)_18:1	MYBL2/ BAG1	-0.22	-0.41--0.017	0.03
OxCL 16:0_16:1_16:1(OOH)_18:1	MYBL2/ BAG1	-0.25	-0.43--0.048	0.02
OxCL 16:0_22:6_16:1_22:5(OOH)2	CDKN2A/BCL2	0.24	0.037-0.43	0.02
OxCL 16:1 OOH_18:2_18:1_18:2	MYBL2/ BAG1	-0.24	-0.42--0.032	0.02
OxCL 16:1_18:1_16:1(OOH)_18:1(OOH)	MYBL2/ BAG1	-0.24	-0.43--0.04	0.02
OxCL 16:1_18:1_16:1(OOH)_18:1(OOH)	ANLN/ ESR1	-0.22	-0.41--0.013	0.04
OxCL 16:1_18:1_16:1(OOH)_18:1(OOH)	EXO/ ESR1	-0.22	-0.41--0.012	0.04
OxCL 18:1_18:2_22:3(OH)_22:3(OH)	MYBL2/ BAG1	-0.24	-0.43--0.037	0.02
OxCL 18:1_20:1_20:3_20:3(OOH)2	MYBL2/ BAG1	-0.22	-0.41--0.016	0.04
OxLPE 16:1(OH)	MYBL2/ BAG1	-0.26	-0.44--0.058	0.01
OxLPE 16:1(OH)	ANLN/ ESR1	-0.24	-0.43--0.039	0.02
OxLPE 16:1(OH)	EXO/ ESR1	-0.23	-0.41--0.024	0.03
OxPC 16:0_14:1(COOH)	CDKN2A/BCL2	0.24	0.04-0.43	0.02
OxPC 18:1_14:0(CHO)	MYBL2/ BAG1	-0.25	-0.43--0.042	0.02
OxPC 18:1_14:0(CHO)	ANLN/ ESR1	-0.22	-0.4--0.0095	0.04
OxPG 16:0_18:0(10)	MYBL2/ BAG1	-0.23	-0.42--0.029	0.03
PC 16:0_16:1	CCNB1/ BAG1	-0.21	-0.4--0.0028	0.047
PC 16:1_18:1	MYBL2/ BAG1	-0.22	-0.41--0.016	0.03
PC 18:2_18:2	CDKN2A/BCL2	0.21	0.0038-0.4	0.046
PE 18:1_24:1	MYBL2/ BAG1	-0.24	-0.42--0.033	0.02
PG 22:0_22:0	MKI67/PGR	-0.24	-0.42--0.031	0.02
PG 22:0_22:0	MYBL2/ BAG1	-0.22	-0.41--0.018	0.03

PG 22:0_22:0	ANLN/ ESR1	-0.22	-0.41--0.015	0.04
Plasmanyl-PC O-16:0/16:0	MYBL2/ BAG1	-0.24	-0.42--0.035	0.02
Plasmanyl-PC O-16:0/18:1	MYBL2/ BAG1	-0.24	-0.42--0.034	0.02
Plasmanyl-PC O-20:0/18:0	MYBL2/ BAG1	-0.26	-0.44--0.06	0.01
Plasmanyl-PC O-20:0/18:0	ANLN/ ESR1	-0.21	-0.4--0.0013	0.049
Plasmanyl-PC O-20:0/18:2	MYBL2/ BAG1	-0.3	-0.47--0.095	0.005
Plasmanyl-PC O-20:0/18:2	CCNB1/ BAG1	-0.21	-0.4--0.005	0.04
Plasmanyl-PC O-20:0/18:2	ANLN/ ESR1	-0.23	-0.41--0.022	0.03
Plasmanyl-PC O-20:1/18:1	MYBL2/ BAG1	-0.26	-0.45--0.062	0.01
Plasmanyl-PC O-20:1/18:1	ANLN/ ESR1	-0.22	-0.4--0.011	0.04
Plasmanyl-PC O-22:0/18:1	MYBL2/ BAG1	-0.21	-0.4--0.0075	0.04
Plasmanyl-PC O-22:1/18:0	MYBL2/ BAG1	-0.29	-0.47--0.09	0.005
Plasmanyl-PC O-22:1/18:0	UBE2T/ BAG1	-0.21	-0.4--0.0012	0.049
Plasmanyl-PC O-22:1/18:0	ANLN/ ESR1	-0.24	-0.43--0.037	0.02
Plasmanyl-PC O-22:1/18:1	MYBL2/ BAG1	-0.33	-0.5--0.14	0.001
Plasmanyl-PC O-22:1/18:1	CCNB1/ BAG1	-0.28	-0.46--0.077	0.008
Plasmanyl-PC O-22:1/18:1	ANLN/ ESR1	-0.31	-0.49--0.11	0.003
Plasmanyl-PC O-22:1/18:1	EXO/ ESR1	-0.24	-0.43--0.037	0.02
Plasmanyl-PC O-24:1/18:2	MYBL2/ BAG1	-0.32	-0.49--0.12	0.002
Plasmanyl-PC O-24:1/18:2	CCNB1/ BAG1	-0.3	-0.48--0.1	0.004
Plasmanyl-PC O-24:1/18:2	UBE2T/ BAG1	-0.25	-0.44--0.05	0.02
Plasmanyl-PC O-24:1/18:2	ANLN/ ESR1	-0.28	-0.46--0.076	0.008
Plasmanyl-PC O-24:1/18:2	EXO/ ESR1	-0.21	-0.4--0.0083	0.04
Plasmanyl-PC O-24:2/16:0	MYBL2/ BAG1	-0.24	-0.43--0.041	0.02
Plasmanyl-PC O-24:2/16:0	CCNB1/ BAG1	-0.22	-0.41--0.015	0.04
Plasmanyl-PE O-20:0/18:2	ANLN/ ESR1	-0.22	-0.4--0.011	0.04
Plasmanyl-PE O-20:0/18:3	MKI67/PGR	-0.23	-0.42--0.028	0.03
Plasmanyl-PE O-20:0/18:3	ANLN/ ESR1	-0.22	-0.4--0.011	0.04
Plasmenyl-LPE P-16:0	MYBL2/ BAG1	-0.22	-0.41--0.017	0.03
Plasmenyl-LPE P-16:0	UBE2T/ BAG1	-0.22	-0.41--0.015	0.04
Plasmenyl-LPE P-18:0	MYBL2/ BAG1	-0.23	-0.41--0.023	0.03
Plasmenyl-LPE P-18:0	CCNB1/ BAG1	-0.22	-0.41--0.018	0.03
Plasmenyl-LPE P-18:0	UBE2T/ BAG1	-0.22	-0.4--0.01	0.04
Plasmenyl-PC P-20:0/18:1	MYBL2/ BAG1	-0.22	-0.41--0.012	0.04
Plasmenyl-PC P-22:0/18:1	MYBL2/ BAG1	-0.35	-0.51--0.15	<0.001
Plasmenyl-PC P-22:0/18:1	CCNB1/ BAG1	-0.3	-0.48--0.098	0.004
Plasmenyl-PC P-22:0/18:1	UBE2T/ BAG1	-0.23	-0.42--0.03	0.02
Plasmenyl-PC P-22:0/18:1	ANLN/ ESR1	-0.31	-0.48--0.11	0.003
Plasmenyl-PC P-22:0/18:1	EXO/ ESR1	-0.27	-0.45--0.063	0.01
Plasmenyl-PC P-24:0/18:2	MYBL2/ BAG1	-0.37	-0.53--0.17	<0.001
Plasmenyl-PC P-24:0/18:2	CCNB1/ BAG1	-0.31	-0.48--0.11	0.003
Plasmenyl-PC P-24:0/18:2	UBE2T/ BAG1	-0.27	-0.45--0.068	0.01
Plasmenyl-PC P-24:0/18:2	ANLN/ ESR1	-0.3	-0.48--0.099	0.004
Plasmenyl-PC P-24:0/18:2	EXO/ ESR1	-0.24	-0.42--0.035	0.02
Plasmenyl-PE P-16:0/18:1	MYBL2/ BAG1	-0.23	-0.42--0.026	0.03
Plasmenyl-PE P-16:0/18:2	MYBL2/ BAG1	-0.22	-0.41--0.013	0.04

Plasmenyl-PE P-18:0/18:2	MYBL2/ BAG1	-0.21	-0.4--0.007	0.04
Plasmenyl-PE P-18:0/18:2	ANLN/ ESR1	-0.22	-0.41--0.015	0.04
SM d22:0/16:0	MYBL2/ BAG1	-0.23	-0.41--0.024	0.03

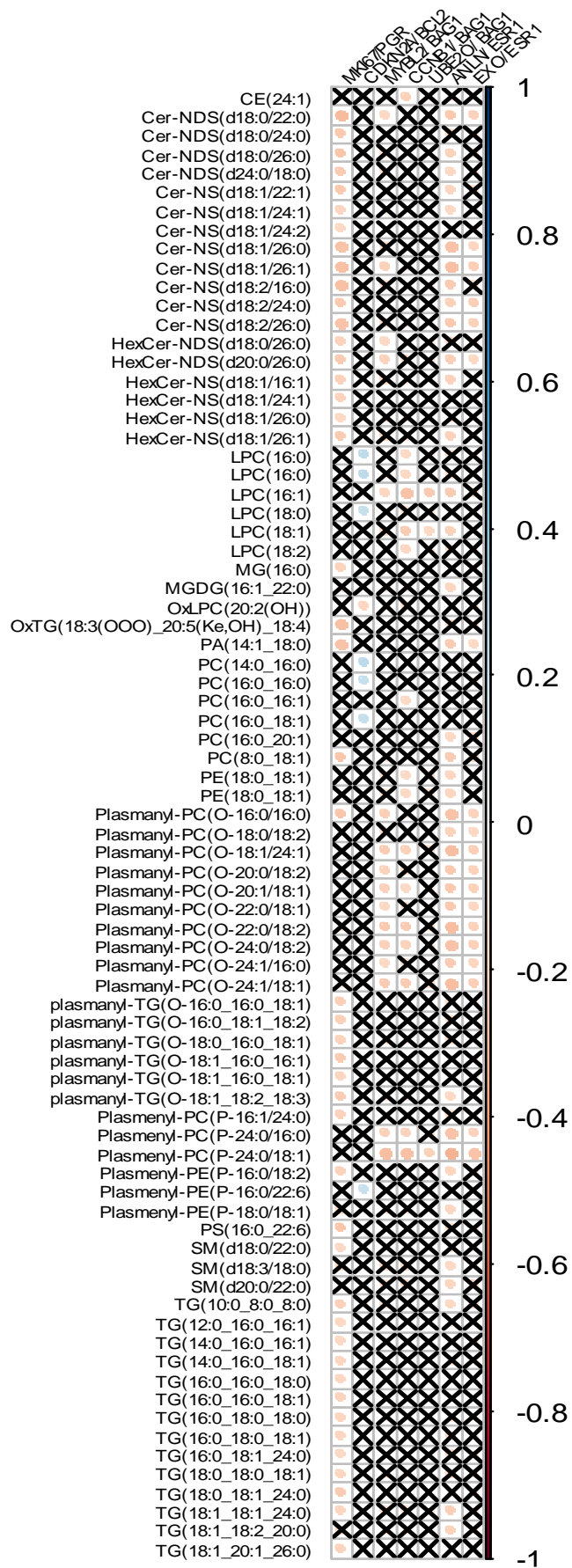


Рисунок 30. Корреляция липидов в режиме положительных ионов и м/з.

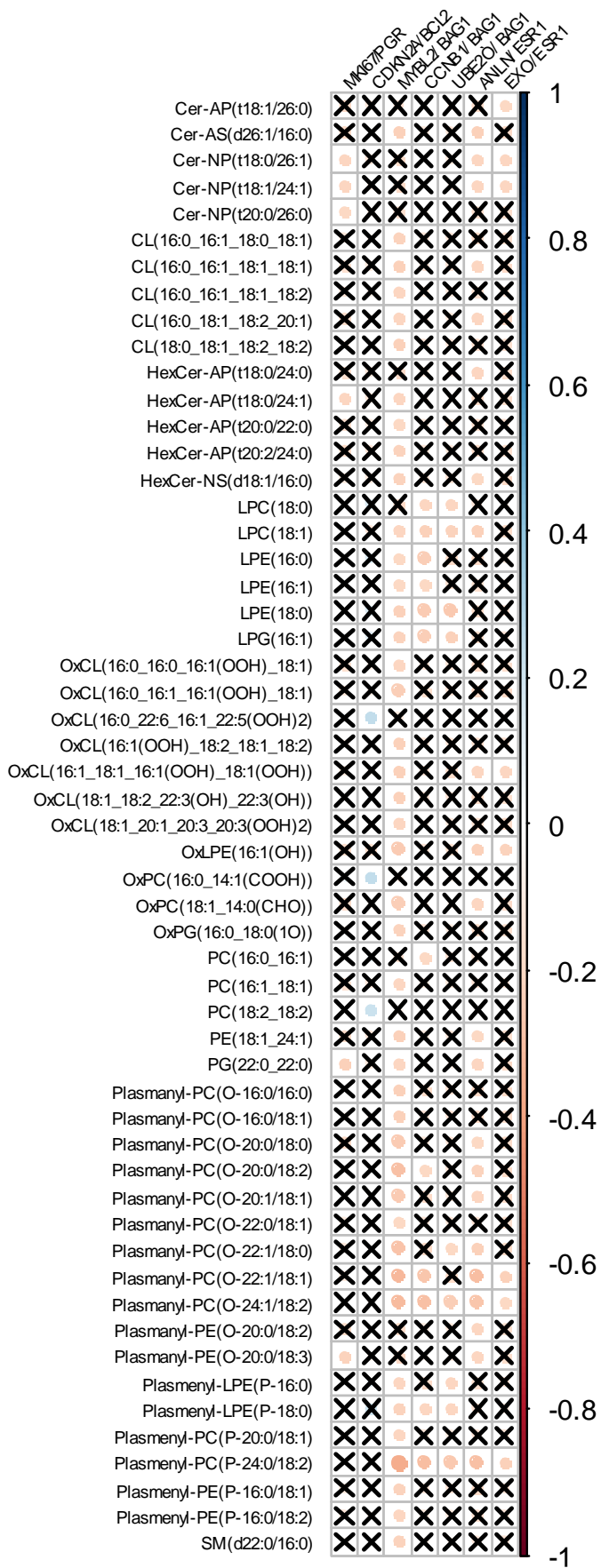


Рисунок 31. Корреляция липидов в режиме отрицательных ионов и мРНК.

Ведение пациенток с морфологически подтвержденными CIN II-III.

Женщины с HSIL (CIN II-III), подтвержденной биопсией, имеют повышенный риск развития инвазивного рака и должны быть пролечены согласно стандартам. Всем пациенткам из группы HSIL – 32 (27,5%) была проведена электроконизация шейки матки с последующим выскабливанием оставшейся части цервикального канала и гистологическим исследованием иссеченного конуса и соскоба. Пациентки группы РШМ – 23 (19,8%) были направлены на консультацию и дальнейшее лечение к онкогинекологу.

Для оценки процесса эпителизации шейки матки после проведенной конизации, осмотр пациенток был осуществлен через 1 месяц после лечения. Цитологическое исследование после конизации шейки матки осуществлялось каждые 3 месяца в течение первых 6 месяцев. Во всех случаях цитологическое заключение соответствовало NILM (100%). Через 6 месяцев было проведено также ВПЧ-тестирование и кольпоскопия. При ВПЧ-тестировании ВПЧ ВР был обнаружен у 2-х пациенток: в одном случае 16 тип совпадал с ранее выявленным, в другом случае были выявлены новые типы – 16,39,68,73, что свидетельствовало о реинфицировании другими типами ВПЧ и было связано со сменой полового партнера.

Кроме того, для определения группы риска по рецидивированию заболевания после хирургического лечения HSIL, было проведено исследование липидома эпителия шейки матки (сравнение с исходными показателями) и оценка уровня экспрессии мРНК генов, отвечающих за регуляцию клеточного цикла, пролиферацию (MKI67, CDKN2A, MYBL2, CCND1), репликацию и репарацию ДНК (EXO1), утилизацию белков (UBE2T), апоптоз (BCL2, BAG1), рецепторов гормонов (ESR1 (эстрогеновый), PGR (прогестероновый), инвазию (ANLN). Липидом эпителия шейки матки свидетельствовал об отсутствии неопластического процесса (Cer-NDS d16:0/16:0; PC 14:0_16:0; PC 16:1_18:0; PE 18:0_20:4; PE P-16:0/22:6).

Экспрессионные профили мРНК генов у всех пациенток после электроконизации шейки матки соответствовали норме (рисунок 32).

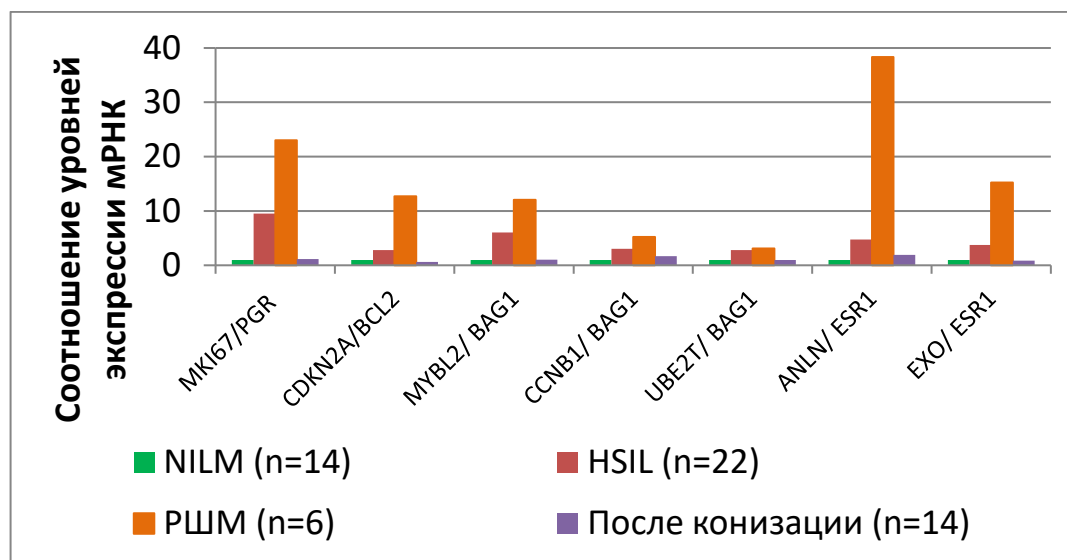


Рисунок 32. Результаты соотношения экспрессии мРНК генов у пациенток исследуемых групп.

Клинические случаи после хирургического лечения HSIL.

Клинический случай № 1

Пациентка К., 33 года после электроконизации шейки матки по поводу HSIL (CINIII). Цитология через 6 месяцев после лечения NILM. ВПЧ – не обнаружен. Кольпоскопия - патологии не выявлено (рисунок 33). Липидом эпителия шейки матки свидетельствовал об отсутствии неопластического процесса (Cer-NDS d16:0/16:0; PC 14:0_16:0; PC 16:1_18:0; PE 18:0_20:4; PE P-16:0/22:6). Для сравнения – липидом эпителия шейки матки до лечения соответствовал тяжелому поражению (HexCer-AP t20:2/24:0; LPC 18:1; OхCL 22:6_22:6_22:6(OOH)_22:6(OHH); OхPC 16:0_14:1 (CHO); PC 16:0_18:1; PC 16:0_18:2; PC 18:1_18:1; PC 18:2_18:2; SM d26:0/18, SM d16:0/18:1).

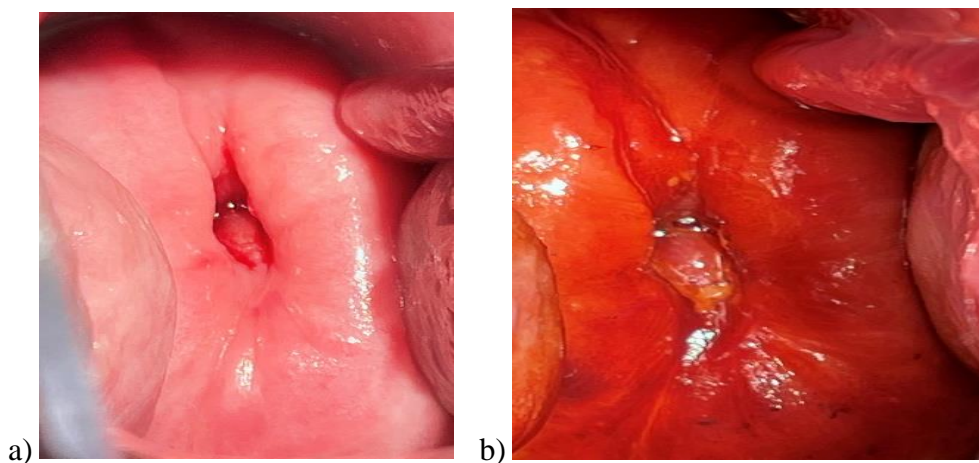


Рисунок 33. Результаты кольпоскопии после электроконизации шейки матки (клинический случай 1) а) проба с 3% раствором уксусной кислоты; б) проба с 2% раствором Люголя.

Клинический случай №2

Пациентка К., 39 лет, обследована через 6 месяцев после конизации шейки матки по поводу HSIL (CIN III). Цитологическое заключение – NILM. ВПЧ - не обнаружен. Кольпоскопия – патологии не выявлено (рисунок 34). Характеристика липидного профиля эпителия шейки матки (в режиме отрицательных ионов): ОхРС 16:0_14:1(COOH); ОхРГ 18:0_20:3(20); РС 16:0_18:1; РС 18:1_18:1; SM d16:0/18:1; SM d24:/18:1 – совпадала с результатами цитологии, тем самым указывая на отсутствие неопластического поражения шейки матки.

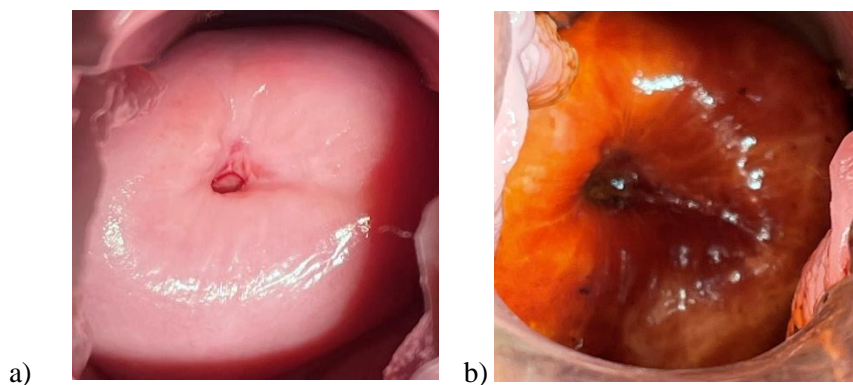


Рисунок 34. Результаты кольпоскопии после электроконизации шейки матки (клинический случай 2) а) проба с 3% раствором уксусной кислоты; б) проба с 2% раствором Люголя.

Заключение

Таким образом, соотношение экспрессионного профиля мРНК генов и липидомный анализ эпителия шейки матки методом хромато-масс-спектрометрии у пациенток после хирургического лечения HSIL, совпадают с результатами клинических методов исследований (цитология, кольпоскопия). Следовательно, мы предполагаем, что липидомный анализ эпителия шейки матки методом хромато-масс-спектрометрии у пациенток после хирургического лечения HSIL, у которых наблюдается персистенция ВПЧ, в дополнение к существующим клинико-лабораторным методам позволяет своевременно выявлять группу риска по рецидивированию заболевания.

Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Основу выявления предраковых и злокачественных заболеваний шейки матки составляет первичный скрининг – цитологическое исследование эпителия шейки матки и ВПЧ-тестирование. К углубленным методам изучения состояния эпителия шейки матки относится кольпоскопия, а также молекулярно-генетические методы исследования. Однако, доказательным методом диагностики является биопсия шейки матки с последующим гистологическим исследованием биопсийного материала.

Учитывая различия в ведении пациенток с диагнозом LSIL и HSIL, а также для оптимизации и улучшения диагностики в спорных ситуациях и выбора метода лечения, требуется сопоставление результатов морфологических методов исследований и поиск молекулярно-генетических и метаболомных маркеров.

В нашей работе, согласно 1 задаче исследования при ретроспективном анализе сопоставления результатов морфологических методов исследования у 415 пациенток, нами в 29 (6,9%) случаях были выявлены значительные несоответствия цитологического и гистологического методов исследований; незначительные несоответствия – у 192 (46%) пациенток; соответствия результатов цитологического и гистологического методов – у 194 (46,74%) пациенток.

Аналогичные результаты были получены в исследовании Ruchika Gupta et al. при оценке корреляции цитологии и гистологии шейки матки, согласно критериям ASC, значительные несоответствия наблюдались в 22 (6,4%) случаях, в то время как незначительные расхождения были отмечены в 70 (51%) случаях [70]. Также, процент значительных расхождений цитологического и гистологического методов составил 7,1% в исследовании авторов Crasta JA, Chaitra V, Simi C [71]. Значительными несоответствиями в их исследовании явились случаи цитологии HSIL и LSIL по гистологии.

Аналогичные исследования, проведенные Joste NE, Crum CP, Cibas ES, установили 175 случаев расхождений (11%) при изучении 1582

цитологических и гистологических заключений шейки матки [72]. Авторы также полагают, что ВПЧ-тестирование является важным критерием в постановке окончательного диагноза и определения тактики ведения пациента [72].

Ряд рандомизированных исследований и метаанализов показали, что ВПЧ-тест обладает высокой чувствительностью для выявления HSIL.

Так, например, авторами Bergeron C. von Knebel Doeberitz M. было обнаружено, что ВПЧ-тестирование обладает более высокой чувствительностью при выявлении плоскоклеточных интраэпителиальных поражений высокой степени (HSIL) [73].

Результаты исследования, проведенного авторами Chen C, Yang Z, Li Z, по оценке степени чувствительности и специфичности кольпоскопического метода в сравнении с тестированием на ВПЧ и цитологическим исследованием, показали, что чувствительность КС составила 77%, а специфичность – 87% [74]. Результаты метаанализа позволили авторам рекомендовать КС в качестве информативного метода выявления или исключения поражений эпителия шейки матки, подозрительных в отношении CIN. Проведенное нами исследование также показало высокую информативность кольпоскопии в выявлении выраженных и слабовыраженных изменений эпителия шейки матки, ассоциированных с ВПЧ высокоонкогенных типов.

Ince U, Aydin O, Peker предложили рассматривать отдельную диагностическую категорию LSIL-H, занимающую промежуточное положение между LSIL и HSIL, а также установить для данного заключения конкретные цитоморфологические критерии. Авторы показали, что диагностическая категория LSIL-H будет способствовать ранней диагностике CIN 2+ [75].

Кроме того, Monsonigo J. и соавт., установили, что в 1/3 случаев инвазивный рак обнаруживается у женщин, которые проходят регулярный

скрининг, в виду низкой чувствительности цитологии [28]. В 5% случаев онкологические заболевания наблюдались у женщин, которые подверглись неправильному лечению после получения аномальных результатов цитологического исследования. Авторы рекомендуют проводить цитологическое исследование, чувствительность которого составляет 70%, совместно с тестированием на ВПЧ. Чувствительность ВПЧ-теста для выявления поражений тяжелой степени превышает 95%.

По результатам метаанализа, проведенного в США, установлено, что у пациенток с цитологическим заключением LSIL гистологически верифицирован HSIL (CINII 17%, CINIII 12%). Основная тактика ведения пациенток с диагнозом LSIL – выжидательная. Это связано с тем, что CIN I способен самостоятельно регрессировать в течение 1-2 лет. Так, по результатам ретроспективного когортного исследования установлено, что у женщин с гистологическим диагнозом LSIL, регресс CIN I наблюдался у 88,5%, в то время как прогрессирование в сторону HSIL шейки матки было зарегистрировано у 0,7% пациенток. У 10,8% женщин не было отмечено изменений ни в сторону регресса, ни в сторону прогрессирования поражения шейки матки. Риск возникновения HSIL у пациенток с ВПЧ 16/18 типов значительно выше при цитологическом заключении LSIL (19%) по сравнению с пациентками – носителями других типов ВПЧ (5%) [76].

Под руководством авторов Castle P. E., Schiffman M. было проведено исследование, которое показало, что примерно 40% CIN II у ВПЧ-негативных пациенток регрессирует в течение 2 лет, в отличие от CIN II ассоциированного с ВПЧ ВР, который имеет значительно меньшую вероятность регресса. Тем не менее, CIN II принято классифицировать как тяжелую степень дисплазии, которая требует лечения, как и CIN III [77].

Lertvutivivat S. И соавторы рекомендуют проведение кольпоскопии во всех случаях ASC-H, независимо от результата ВПЧ [78].

Проведенный нами сравнительный анализ показал, что во всех группах имели место случаи гипо- и гипердиагностики при цитологическом исследовании.

Согласно второй задаче, всем пациенткам, включенным в исследование (n=116), был проведен липидомный анализ соскобов эпителия шейки матки с помощью хромато-масс-спектрометрии. Были выявлены следующие липиды: холестериновые эфиры (CE), фосфатидилхолины (PC), церамиды (Cer) и сфингомиелины (SM), содержание которых в эпителии шейки матки, значимо отличалось между исследуемыми группами (хронический цервицит/ВПЧ+, LSIL/ВПЧ+, HSIL/ВПЧ+, РШМ/ВПЧ+). Проведенный анализ липидного профиля позволяет дифференцировать HSIL и РШМ. Диагностическая панель липидома эпителия шейки матки у пациенток с HSIL и РШМ характеризуется преобладанием липидов группы фосфатидилхолинов (PC) и сфингомиелинов (SM), а также холестериновых эфиров (CE). Используемый в работе неинвазивный метод характеризуется высокой прогностической ценностью для дифференциальной диагностики воспаления и РШМ относительно нормы, а также средней для LSIL. Полученные нами результаты свидетельствуют о высокой информативности метода масс-спектрометрии для ранней диагностики предраковых заболеваний и рака шейки матки.

Как известно, липиды — это молекулы, которые играют важную роль в различных клеточных процессах. Так, изменения в липидоме могут быть использованы в качестве считывания признаков заболевания, подчеркивая важность рассмотрения липидов в качестве биомаркеров в дополнение к нуклеиновым кислотам и белкам. Липиды являются одними из основных структурных и функциональных компонентов биологических тканей, особенно клеточных мембран [81].

Наряду с формированием мембран, липиды также играют решающую роль в передаче клеточных сигналов, воспалении и накоплении энергии.

Установлено, что нарушения липидного обмена тесно связаны с развитием канцерогенеза [82]. Аналогичные результаты, полученные в исследовании Szlasa W, Zendran I, Zalesińska, в котором нарушение липидного обмена и, как следствие, измененный состав клеточной мембраны приводит к неопластической трансформации клеток. Так, повышение уровня фосфатидилсерина приводит к снижению иммунного ответа, модуляции ряда ферментов и накоплению энергетического материала. Изменения были настолько выражены, что такие липиды, как фосфатидилсерины, авторами предложено рассматривать в качестве биомаркеров рака [83].

Кроме того, роль липидов в развитии заболеваний актуальна и для бактериальных инфекций, при которых несколько факторов вирулентности бактерий-липидов распознаются врожденным иммунным ответом человека, таким как липополисахарид у грамотрицательных бактерий, липотейхоевая кислота – у грамположительных бактерий и липогликаны - у микобактерий. По сравнению с нуклеиновыми кислотами и белками, полный анализ липидома, который представляет собой комплексную характеристику различных семейств липидов, обычно является очень сложной задачей из-за неоднородности классов липидов и их физических свойств, вызванных различиями в компонентах каждого класса. Поэтому понимание химического разнообразия липидов имеет решающее значение для понимания их биологической значимости и, как следствие, их использования в качестве потенциальных биомаркеров в диагностике неинфекционных, инфекционных, а также онкологических заболеваний [84]. Измененный липидный обмен является одним из наиболее заметных метаболических изменений при раке. Повышенный синтез или поглощение липидов способствует быстрому росту раковых клеток и образованию опухолей [85].

Холестериновые эфиры и холестерол накапливаются в макрофагах, которые отвечают за поглощение умерших клеток [86]. Также, ранее было показано, что в раковых клетках нарушается холестеринный метаболизм на

примере рака почки [87]. Нейтральная сфингомиелаза, обеспечивающая разложение сфингомиелинов на церамиды и фосфат холина, является опухолевым супрессором и участвует в активации сигналов, связанных с воспалительными процессами [88]. Как показали авторы Hannun Y. A., Obeid L., фосфатидилхолины ассоциированы с процессом канцерогенеза [89].

Porcari A.M. и соавторами с была показана разница в уровнях церамидов и метаболитов сфингозина в нормальных тканях шейки матки и тканях с поражением HSIL+, а также потенциальная пригодность этих соединений для классификации норма/HSIL+. Авторы обнаружили, что метаболомный профил, полученный с помощью жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии (ЖХ-МС), выявил специфические маркеры, характерные для HSIL - двух церамидов и метаболита сфингозина. Эти молекулы существуют независимо от статуса ВПЧ у женщин и могут быть связаны с предопухолевым фенотипом. Статистические модели, основанные на таких результатах, могут правильно различать и выявлять женщин как с HSIL, так и с отсутствием поражения шейки матки (NILM) [90]. Результаты демонстрируют потенциал ЖХ-МС как новой технологии для клинического использования при скрининге РШМ, хотя по-прежнему необходима дальнейшая валидация с большим набором образцов.

Фосфатидилхолины и сфингомиелины были предложены Некрасовой М.Е. и соавторами для дифференциальной диагностики неопластических поражений при масс-спектрометрическом анализе биопсийного материала шейки матки [91].

На следующем этапе нашего исследования было установлено, что идентифицированные липиды - некоторые липиды из классов фосфатидилхолинов, сфингомиелинов, а также холестериновых эфиров наиболее применимы для дифференциации тяжелых поражений шейки матки (HSIL и РШМ). На основании статистически значимых липидов,

определенных на предыдущем этапе работы, были разработаны дискриминационные модели для попарного разделения исследуемых групп.

Выявлена положительная корреляционная связь липидома с цитологическим исследованием, которая отражает высокую специфичность метода выявления тяжелых поражений шейки матки. Схожие результаты получены Nam M, Seo SS, Jung S, которые сравнили липидом в ткани шейки матки при HSIL и РШМ с уровнем липидов в здоровых тканях с помощью масс-спектрометрии. Авторы установили, что при HSIL и РШМ наблюдаются сопоставимые изменения уровня липидов (фосфатидилхолинов, фосфатидилэтаноламинов, диглицеридов, свободных жирных кислот) по сравнению с группами контроля и LSIL. Результаты работы предполагают, что определение липидного профиля шейки матки является перспективным методом мониторинга прогрессирования РШМ [92]. Об обнаружении биомаркеров для неинвазивной и ранней диагностики предраковых заболеваний и РШМ сообщается в исследовании Khan I, Nam M, Kwon M. Так, семь метаболитов (АМФ, аспартат, глутамат, гипоксантин, лактат, пролин и пироглутамат) были изучены и сопоставлены при SIL и РШМ. Уровни метаболитов были значительно выше у пациентов с SIL различной степени тяжести по сравнению со здоровыми тканями. Кроме того, повышенные уровни семи метаболитов в сочетании с положительным ВПЧ-статусом коррелировали со значительным риском прогрессирования неопластического процесса [100].

Следует отметить более высокую специфичность разработанной модели в нашем исследовании относительно РШМ. Итоговая модель имела точность 79% и высокую прогностическую способность для цервицита и РШМ и среднюю для LSIL относительно нормы по сравнению с моделями, построенными на основе иммуноцитохимического анализа, также на основе белков p16/Ki-67, микроРНК и ВПЧ-теста. Международные рекомендации свидетельствуют, что для улучшения и оптимизации диагностики HSIL (CIN II+) в спорных ситуациях целесообразно определение экспрессии

биомаркеров. К ним относятся p16^{INK4a}, Ki67, отражающие метаболизм канцерогенеза в ВПЧ-инфицированных тканях шейки матки, тем самым улучшая точность интерпретации биопсийного препарата.

Результаты ряда работ демонстрируют, что иммуногистохимический анализ p16^{INK4a} существенно улучшает качество интерпретации морфологических образцов тканей шейки матки, помогая клиницистам в точной дифференцировке между CIN II – III [79].

Аналогичные выводы сделали ученые Gurrola-Díaz CM, Suárez-Rincón AE, Vázquez-Camacho G, установившие, что применение иммуногистохимического анализа p16^{INK4a} приводит к более рациональному ведению пациенток с предраковыми поражениями шейки матки, за счет значительного улучшения дифференциальной диагностики [80].

Аналогично высокий диагностический потенциал по разрешению NILM и SIL имеют модели на основе липидов-маркеров сыворотки крови [92]. Аналогичные изменения липидного профиля в образцах опухолей щитовидной и молочной желез были обнаружены в исследованиях Zhang J, Feider CL, Nagi C. Полученные ими результаты показали, что при метастазировании рака щитовидной железы отмечалось повышенное содержание церамидов и глицерофосфоинозитолов; при метастазировании рака молочной железы - повышалось содержание различных жирных кислот и глицерофосфолипидов [93]. Mun DG, Bhin J, Kim S и соавторы продемонстрировали существенное повышение уровня сфингомиелина и снижение уровня фосфатидилхолина в тканях желудка, подвергшихся малигнизации [94].

Как показали результаты проведенного нами исследования, оценка липидного профиля эпителия шейки матки после хирургического лечения HSIL позволяет подтвердить эффективность проведенного лечения. По данным зарубежных исследований, частота развития рецидивов CIN и РШМ после хирургического лечения варьирует от 1,2% до 30%, при этом наиболее

распространенным методом лечения CIN2+ в практике в настоящее время является петлевая электроэксцизия шейки матки (LEEP). По результатам исследования Shin JW, Rho HS, рецидивы CIN и РШМ достоверно чаще встречались у женщин, перенесших LEEP (15,6%), чем у женщин после ножевой конизации шейки матки (7,38%) [95].

Wang XI, Huang F показали, что с процедурой LEEP связано значительно меньшее число послеоперационных осложнений, по сравнению с ножевой конизацией шейки матки. В этой связи авторы рекомендуют LEEP в качестве метода выбора при лечении CIN2+ у пациенток, еще не реализовавших репродуктивную функцию [96].

По данным зарубежных исследований, частота обнаружения ВПЧ-инфекции у пациенток после хирургического лечения CIN и РШМ варьировала от 0 до 47%. Анализ данных исследования показал, что реже всего ВПЧ-инфекция возникала у молодых женщин, а также у пациенток, перенесших лазерную конизацию шейки матки [97].

Chen LM, Liu L установлено, что послеоперационное цитологическое исследование в сочетании с выявлением ВПЧ ВР имеет высокую чувствительность и высокую отрицательную предикторную ценность рецидива HSIL [98]. Аномальный результат жидкостной цитологии и положительный ВПЧ-тест после LEEP являются независимыми факторами, влияющими на рецидив HSIL у пациентов после LEEP ($P < 0,05$) [99].

В нашем исследовании для определения группы риска по рецидивированию заболевания после хирургического лечения HSIL, было проведено исследование липидома эпителия шейки матки (сравнение с исходными показателями) и оценка уровня экспрессии мРНК генов, отвечающих за регуляцию клеточного цикла, пролиферацию (MKI67, CDKN2A, MYBL2, CCND1), репликацию и репарацию ДНК (EXO1), утилизацию белков (UBE2T), апоптоз (BCL2, BAG1), рецепторов гормонов (ESR1

(эстрогеновый), PGR (прогестероновый), инвазию (ANLN). Липидом эпителия шейки матки свидетельствовал об отсутствии неопластического процесса (Cer-NDS d16:0/16:0; PC 14:0_16:0; PC 16:1_18:0; PE 18:0_20:4; PE P-16:0/22:6). Экспрессионные профили мРНК генов у всех пациенток после электроконизации шейки матки соответствовали норме.

Анализ липидного профиля эпителия шейки матки с использованием хромато-масс-спектрометрии, позволяет изучать молекулярные механизмы неопластической трансформации, выявляя патологию на ранних этапах развития, а также дифференцировать между собой доброкачественные, ВПЧ-ассоциированные предраковые и злокачественные заболевания шейки матки.

Таким образом, для оптимизации тактики ведения пациенток с ВПЧ-ассоциированными поражениями шейки матки, применение липидного анализа эпителия шейки матки, методом хромато-масс-спектрометрии, наряду с клинико-морфологическими и молекулярно-генетическими методами исследования, имеет большое значение для быстрой, ранней, дифференциальной, неинвазивной диагностики степени тяжести поражения, в том числе, в качестве дополнительного метода при несоответствиях результатов цитологического и гистологического методов исследований.

ВЫВОДЫ

1. Сопоставление результатов морфологических методов исследования (цитологии и гистологии) у пациенток с патологией шейки матки, ассоциированной с ВПЧ, выявило: соответствие – в 46,74%; незначительное несоответствие – 46%; значительное несоответствие – 6,9%.
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). Модели, построенные для режимов положительных и отрицательных ионов, имели точность 70% и 71%. Итоговая модель имела точность 79% и высокую диагностическую значимость для дифференциации тяжелых поражений (HSIL и РШМ) от легких (цервицит, LSIL).

3. Липидомный профиль эпителия шейки матки позволяет определять различия между нормой, воспалением, предраковыми поражениями и РШМ.
4. Оценка липидного профиля эпителия шейки матки после хирургического лечения HSIL позволяет подтвердить эффективность лечения.
5. Оценка состояния эпителия шейки матки с помощью метода хромато-масс-спектрометрии является неинвазивным, быстрым, оптимальным методом ранней диагностики HSIL и РШМ.
6. Выявлена положительная корреляционная связь липидома с цитологическим исследованием, которая отражает высокую специфичность метода выявления тяжелых поражений шейки матки.

Практические рекомендации

1. При незначительных и значительных несоответствиях результатов цитологического и гистологического методов исследований целесообразно дополнительно проводить оценку состояния липидома эпителия 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 оценить эффективность проведенного лечения.
 5. У пациенток с хроническим цервицитом и длительной персистенцией ВПЧ ВР, целесообразно проводить оценку липидома методом масс-спектрометрии для определения неопластического процесса и дальнейшей тактики ведения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. World Cancer Report. Edited by Stewart BW, Wild CP. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, World Health Organization; 2014.
2. Zur Hausen H. Papillomaviruses in the causation of human cancers—a brief historical account. *Virology* 2009; 384:260-5.
3. Smith JS, Lindsay L, Hoots B, Keys J, Franceschi S, Winer R, Clifford GM. Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update. *Int J Cancer*. 2007 Aug 1;121(3):621-32. doi: 10.1002/ijc.22527. PMID: 17405118.
4. Pett, M., and Coleman N. 2007. Integration of high-risk human papillomavirus: a key event in cervical carcinogenesis? *J. Pathol.* 212:356–367.

5. Goodman A. HPV testing as a screen for cervical cancer. *BMJ*. 2015 Jun 30;350:h2372. doi: 10.1136/bmj.h2372. PMID: 26126623). И Pett, M., and Coleman N. 2007. Integration of high-risk human papillomavirus: a key event in cervical carcinogenesis? *J. Pathol.* 212:356–367.
6. Clifford GM, Gonçalves MA, Franceschi S; HPV and HIV Study Group. Human papillomavirus types among women infected with HIV: a meta-analysis. *AIDS*. 2006 Nov 28;20(18):2337-44. doi: 10.1097/01.aids.0000253361.63578.14. PMID: 17117020.
7. Crow, J. M. 2012. HPV: The global burden. *Nature* 488: S2–S3.
8. Oto-De León S.C., Del Río-Ospina L., Camargo M., Sánchez R., Moreno-Pérez D.A., Pérez-Prados A. et al. Persistence, clearance and reinfection regarding six high risk human papillomavirus types in Colombian women: a follow-up study. *BMC Infect. Dis.* 2014; 14: 395.
9. Pal A., Kundu R. Human papillomavirus E6 and E7: the cervical cancer hallmarks and targets for therapy. *Front.Microbiol.* 2020; 10:3116.doi:10.3389/fmicb.2019.03116.
10. Doorbar J, Quint W, Banks L, Bravo IG, Stoler M, Broker TR, Stanley MA. The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine*. 2012 Nov 20;30 Suppl 5:F55-70. doi: 10.1016/j.vaccine.2012.06.083. PMID: 23199966.
11. Poljak, M. Nucleic Acid Tests for the Detection of Alpha Human Papillomaviruses / M. Poljak et al. // *Vaccine*. – 2012. – 30S. – P. F100–F106.
12. Bruni L, Diaz M, Castellsagué X, Ferrer E, Bosch FX, de Sanjosé S. Cervical human papillomavirus prevalence in 5 continents: meta-analysis of 1 million women with normal cytological findings. *J Infect Dis.* 2010 Dec 15;202(12):1789-99. doi: 10.1086/657321. Epub 2010 Nov 10. PMID: 21067372.
13. Poljak, M. Human Papillomavirus Prevalence and Type–Distribution, Cervical Cancer Screening Practices and Current Status of Vaccination Implementation in Central and Eastern Europe / M. Poljak et al. // *Vaccine*. – 2013. – 31. – P. H59–H70.

- 14.Revathidevi S, Murugan AK, Nakaoka H, Inoue I, Munirajan AK. APOBEC: A molecular driver in cervical cancer pathogenesis. *Cancer Lett.* 2021 Jan 1;496:104-116. doi: 10.1016/j.canlet.2020.10.004. Epub 2020 Oct 7. PMID: 33038491; PMCID: PMC7539941.
- 15.С.И. Роговская, И.В. Михеева, О.Ю. Шипулина и др. // Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. – 2012. – № 1 (62). – С. 25–33.
- 16.Raab SS, Grzybicki DM. Cytologic-histologic correlation. *Cancer Cytopathol.* 2011 Oct 25;119(5):293-309. doi: 10.1002/cncy.20165. Epub 2011 Jul 5. PMID: 21732549.
- 17.Sodhani P, Singh V, Das DK, Bhambhani S. Cytohistological correlation as a measure of quality assurance of a cytology laboratory. *Cytopathology.* 1997;8:103-107.
- 18.Crothers BA, Jones BA, Cahill LA, Moriarty AT, Mody DR, Tench WD, Souers RJ. Quality improvement opportunities in gynecologic cytologic-histologic correlations: findings from the College of American Pathologists Gynecologic Cytopathology Quality Consensus Conference working group 4. *Arch Pathol Lab Med.* 2013 Feb;137(2):199-213. doi: 10.5858/arpa.2012-0250-OA. PMID: 23368862.
- 19.Raab SS, Grzybicki DM. Cytologic-histologic correlation. *Cancer Cytopathol.* 2011 Oct 25;119(5):293-309. doi: 10.1002/cncy.20165. Epub 2011 Jul 5. PMID: 21732549.
- 20.Ouh YT, Park JJ, Kang M, Kim M, Song JY, Shin SJ, Shim SH, Yoo HJ, Lee M, Lee SJ, Shin W, Chong GO, Choi MC, Choi CH, Min KJ. Discrepancy between Cytology and Histology in Cervical Cancer Screening: a Multicenter Retrospective Study (KGOG 1040). *J Korean Med Sci.* 2021 Jun 21;36(24): e164. doi: 10.3346/jkms.2021.36.e164. PMID: 34155836; PMCID: PMC8216990.
- 21.Crothers BA. Cytologic-histologic correlation: Where are we now, and where are we going? *Cancer Cytopathol.* 2018 May;126(5):301-308. doi: 10.1002/cncy.21991. Epub 2018 Mar 26. PMID: 29579352.

22. Alanbay I, Öztürk M, Fıratlıgil FB, Karaşahin KE, Yenen MC, Bodur S. Cytohistological discrepancies of cervico-vaginal smears and HPV status. *Ginekol Pol.* 2017; 88:235-238.
23. Gupta R, Hariprasad R, Dhanasekaran K, et al. Reappraisal of cytology-histology correlation in cervical cytology based on the recent American Society of Cytopathology guidelines (2017) at a cancer research centre. *Cytopathology.* 2020; 31:53–58. <https://doi.org/10.1111/cyt.12774>.
24. Crasta JA, Chaitra V, Simi CM, Correa M. An audit of cervicovaginal cytology in a teaching hospital: are atypical glandular cells under-recognised on cytological screening? *J Cytol.* 2009; 26:69-73.
25. Joste NE, Crum CP, Cibas ES. Cytologic/histologic correlation for quality control in cervicovaginal cytology. Experience with 1,582 paired cases. *Am J Clin Pathol.* 1995 Jan;103(1):32-4. doi: 10.1093/ajcp/103.1.32. PMID: 7817940).
26. Halford J, Walker KA, Duhig J. A review of histological outcomes from perimenopausal and post-menopausal women with a cytological report of possible high grade abnormality: an alternative management strategy for these women. *Pathology.* 2010 Jan;42(1):23-7. doi: 10.3109/00313020903434363. PMID: 20025476.
27. Martin-Hirsch P. L., Koliopoulos G., Paraskevaidis E. Is it now time to evaluate the true accuracy of cervical cytology screening? A review of the literature. *Eur. J. Gynaecol. Oncol.* 2002; 23(4): 363–5.
28. Monsonego J. Prevention of cervical cancer: screening, progress and perspectives. *Presse Med.* 2007; 36(1 pt2): 92–111.
29. Scheck SM, Liddle C, Wood Z, Lockett B, Sircar S. Five-year follow-up after cervical cytology and histology discordance: A retrospective cohort study. *Aust N Z J Obstet Gynaecol.* 2021 Jun;61(3):424-429. doi: 10.1111/ajo.13329. Epub 2021 Apr 5. PMID: 33818769.
30. Ince U, Aydin O, Peker O. Clinical importance of "low-grade squamous intraepithelial lesion, cannot exclude high-grade squamous intraepithelial lesion

- (LSIL-H)" terminology for cervical smears 5-year analysis of the positive predictive value of LSIL-H compared with ASC-H, LSIL, and HSIL in the detection of high-grade cervical lesions with a review of the literature. *Gynecol Oncol.* 2011 Apr;121(1):152-6. doi: 10.1016/j.ygyno.2010.12.004. Epub 2011 Jan 5. PMID: 21211831.
31. Bofin AM, Nygård JF, Skare GB, Dybdahl BM, Westerhagen U, Sauer T. Papanicolaou smear history in women with low-grade cytology before cervical cancer diagnosis. *Cancer.* 2007 Aug 25;111(4):210-6. doi: 10.1002/cncr.22865. PMID: 17567833.
32. Kudela E, Laucekova Z, Nachajova M, Visnovsky J, Bielik T, Krivus S, Biringer K, Balharek T, Zubor P. Colposcopic scoring indexes in the evaluation of cervical lesions with the cytological result of atypical squamous cells, cannot exclude high-grade lesion. *J Obstet Gynaecol Res.* 2020.
33. Jung Y, Lee AR, Lee SJ, Lee YS, Park DC, Park EK. Clinical factors that affect diagnostic discrepancy between colposcopically directed biopsies and loop electrosurgical excision procedure conization of the uterine cervix. *Obstet Gynecol Sci.* 2018 Jul;61(4):477-488. doi: 10.5468/ogs.2018.61.4.477. Epub 2018 Jun 28. PMID: 30018902; PMCID: PMC6046358.
34. Ince U, Aydin O, Peker O. Clinical importance of "low-grade squamous intraepithelial lesion, cannot exclude high-grade squamous intraepithelial lesion (LSIL-H)" terminology for cervical smears 5-year analysis of the positive predictive value of LSIL-H compared with ASC-H, LSIL, and HSIL in the detection of high-grade cervical lesions with a review of the literature. *Gynecol Oncol.* 2011 Apr;121(1):152-6. doi: 10.1016/j.ygyno.2010.12.004. Epub 2011 Jan 5. PMID: 21211831.
35. Katki H.A., Schiffman M., Castle P.E. et al. Fiveyear risk of CIN 3+ and cervical cancer among women with HPV testing of ASC-US Pap results. *J Low Genit Tract Dis.* 2013;17:36–42.
36. Ciavattini A, Clemente N, Tsiroglou D, Sopracordevole F, Serri M, Delli Carpini G, Papiccio M, Cattani P. Follow up in women with biopsy diagnosis of

- cervical low-grade squamous intraepithelial lesion (LSIL): how long should it be? *Arch Gynecol Obstet.* 2017 Apr;295(4):997-1003. doi: 10.1007/s00404-017-4335-7. Epub 2017 Mar 3. PMID: 28255767.
37. Arbyn M., Xu L., Verdoodt F. et al. Genotyping for Human Papillomavirus Types 16 and 18 in Women With Minor Cervical Lesions: A Systematic Review and Meta-analysis. *Ann Intern Med.* 2017;166(2):118-127).
38. Del Mistro A, Matteucci M, Insacco EA, Onnis G, Da Re F, Baboci L, Zorzi M, Minucci D. Long-Term Clinical Outcome after Treatment for High-Grade Cervical Lesions: A Retrospective Monoinstitutional Cohort Study. *Biomed Res Int.* 2015;2015:984528. doi: 10.1155/2015/984528. Epub 2015 Jun 9. PMID: 26180819; PMCID: PMC4477134.
39. Jing L, Dan W, Zhunan L, Ying X, Yi C. Residual lesions in uterine specimens after loop electrosurgical excision procedure in patients with CIN. *Arch Gynecol Obstet.* 2018 Oct; 298 (4): 805-812.
40. El-Nashar SA, Shazly SA, Hopkins MR, Bakkum-Gamez JN, Famuyide AO. Loop Electrosurgical Excision Procedure Instead of Cold-Knife Conization for Cervical Intraepithelial Neoplasia in Women With Unsatisfactory Colposcopic Examinations: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Low Genit Tract Dis.* 2017 Apr;21 (2):129-136.
41. Jiang Y, Chen C, Li L. Comparison of Cold-Knife Conization versus Loop Electrosurgical Excision for Cervical Adenocarcinoma In Situ (ACIS): A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One.* 2017 Jan 26;12(1):e0170587.
42. Wang XI, Huang F, Zhang S. Loop Electrosurgical Excision Procedure vs. Cold Knife Cone in Treatment of Cervical Intraepithelial Neoplasia: Review of 447 Cases. *Ann Clin Lab Sci.* 2017 Nov;47(6). 卨 Liu L, Chen LM, Tao X, Dai F, Guo LP, Zhang HW et al. Clinical outcome and high risk factor for residual lesion analysis of HSIL half a year after loop electrosurgical excision procedure: a clinical study of 1 502 cases. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi.* 2017 Nov 25;52(11):751-756. Doi: 10:3760/cma.j.issn. 0529-567X.2017.11.007.

43. Wu J, Jia Y, Luo M, Duan Z. Analysis of Residual/Recurrent Disease and Its Risk Factors after Loop Electrosurgical Excision Procedure for High-Grade Cervical Intraepithelial Neoplasia. *Gynecol Obstet Invest.* 2015 Sep 3.
44. Rositch AF, Soeters HM, Offutt-Powell TN, Wheeler BS, Taylor SM, Smith JS. The incidence of human papillomavirus infection following treatment for cervical neoplasia: a systematic review. *Gynecol Oncol.* 2014 Mar;132(3):767-79.
45. Tanaka Y, Ueda Y, Kakuda M, Kubota S, Matsuzaki S, Iwamiya T et al. Predictors for recurrent/persistent high-grade intraepithelial lesions and cervical stenosis after therapeutic conization: a retrospective analysis of 522 cases. *Int J Clin Oncol.* 2017 Oct;22(5):921-926.
46. Ciavattini A, Clemente N, Delli Carpini G, Gentili C, Di Giuseppe J, Barbadoro P et al. Loop electrosurgical excision procedure and risk of miscarriage. *Fertil Steril.* 2015 Apr;103(4):1043-8.
47. Chen LM, Liu L, Tao X, He Y, Guo LP, Zhang HW, Zhou XR, Sui L. Analysis of recurrence and its influencing factors in patients with cervical HSIL within 24 months after LEEP]. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi.* 2019 Aug 25;54(8):534-540. Chinese. doi: 10.3760/cma.j.issn.0529-567x.2019.08.006. PMID: 31461810.
48. Schrimpe-Rutledge AC, Codreanu SG, Sherrod SD, McLean JA. Untargeted Metabolomics Strategies-Challenges and Emerging Directions. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2016 Dec;27(12):1897-1905. doi: 10.1007/s13361-016-1469-y. Epub 2016 Sep 13. PMID: 27624161; PMCID: PMC5110944.
49. Marien E, Meister M, Muley T, Gomez Del Pulgar T, Derua R, Spraggins JM, Van de Plas R, Vanderhoydonc F, Machiels J, Binda MM, Dehairs J, Willette-Brown J, Hu Y, Dienemann H, Thomas M, Schnabel PA, Caprioli RM, Lacal JC, Waelkens E, Swinnen JV. Phospholipid profiling identifies acyl chain elongation as a ubiquitous trait and potential target for the treatment of lung squamous cell carcinoma. *Oncotarget.* 2016 Mar 15;7(11):12582-97. doi: 10.18632/oncotarget.7179. PMID: 26862848; PMCID: PMC4914306.

50. Некрасова М.Е., Стародубцева Н.Л., Чаговец В.В., Назарова Н.М., Кононихин А.С., Франкевич В.Е. Липидомика: новые перспективы поиска маркеров неоплазий. *Акушерство и гинекология*. 2017; 3: 34-40.
51. Стародубцева Н.Л., Назарова Н.М., Зардиашвили О.В., Бурменская А.Е., Бугрова В.В., Чаговец В.В., Кононихин А.С., Трофимов В.Е., Франкевич Г.Т. Сухих Комбинация протеомного и транскриптомного подходов для определения риска малигнизации неоплазий шейки матки при ВПЧ-инфекции// *Акушерство и гинекология* – №5 - 2017– стр. 64-71.
52. Cui L, Lu H, Lee YH. Challenges and emergent solutions for LC-MS/MS based untargeted metabolomics in diseases. *Mass Spectrom Rev*. 2018 Nov;37(6):772-792. doi: 10.1002/mas.21562. Epub 2018 Feb 27. PMID: 29486047.
53. Zhou W, Liotta LA, Petricoin EF. The Warburg Effect and Mass Spectrometry-based Proteomic Analysis. *Cancer Genomics Proteomics*. 2017 Jul-Aug;14(4):211-218. doi: 10.21873/cgp.20032. PMID: 28647695; PMCID: PMC5572299.
54. Hussien R, Brooks GA. Mitochondrial and plasma membrane lactate transporter and lactate dehydrogenase isoform expression in breast cancer cell lines. *Physiol Genomics*. 2011 Mar 16;43(5):255-64. doi: 10.1152/physiolgenomics.00177.2010. Epub 2010 Dec 21. PMID: 21177384; PMCID: PMC3068517.
55. Bandu R, Mok HJ, Kim KP. Phospholipids as cancer biomarkers: Mass spectrometry-based analysis. *Mass Spectrom Rev*. 2018 Mar;37(2):107-138. doi: 10.1002/mas.21510. Epub 2016 Jun 8. PMID: 27276657.
56. Vogeser M, Seger C. A decade of HPLC-MS/MS in the routine clinical laboratory--goals for further developments. *Clin Biochem*. 2008 Jun;41(9):649-62. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2008.02.017. Epub 2008 Mar 14. PMID: 18374660.
57. Líska M, Holčapek M. UHPSFC/ESI-MS Analysis of Lipids. *Methods Mol Biol*. 2018;1730:73-82. doi: 10.1007/978-1-4939-7592-1_5. PMID: 29363066.

58. Lu H, Zhang H, Zhou W, Chen H. Evaluation of the phytotoxicity of nanoparticles on mung beans by internal extractive electrospray ionization mass spectrometry. *Analyst*. 2021 Sep 13;146(18):5675-5681. doi: 10.1039/d1an00871d. PMID: 34388232.
59. Dória ML, Cotrim Z, Macedo B, Simões C, Domingues P, Helguero L, Domingues MR. Lipidomic approach to identify patterns in phospholipid profiles and define class differences in mammary epithelial and breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*. 2012 Jun;133(2):635-48. doi: 10.1007/s10549-011-1823-5. Epub 2011 Oct 25. PMID: 22037781.
60. Adamyan L., Starodubtseva N., Borisova A., Stepanian S., Chagovets V., Salimova D., Zhihao Wang, Kononikhin A., Popov I., Bugrova A., Chingin K., Kozachenko K., Chen H., Frankevich V. Direct Mass Spectrometry Differentiation of Ectopic and Eutopic Endometrium in Patients with Endometriosis// *J Minim Invasive Gynecol*. 2018, 25(3):426-433.
61. Chagovets V. , Zhihao Wang, Kononikhin A., Starodubtseva N., Borisova A., Salimova D., Popov I., Kozachenko A., Chingin K., Chen H., Frankevich V., Adamyan L., Sukhikh G. A Comparison of Tissue Spray and Lipid Extract Direct Injection Electrospray Ionization Mass Spectrometry for the Differentiation of Eutopic and Ectopic Endometrial Tissues. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2018, 29(2):323-330. 2017.
62. Kang S., Lee A., Park S.Y., Han S.Y. et. Al. Alteration in lipid and protein profiles of ovarian cancer similarity to breast cancer. *Int. J.Gynecol. Cancer*. 2011; 21;(9): 1566-72.
63. M.Pietrowska, L.Marczak, J.Polanska. Mass spectrometry-based serum proteome pattern analysis in molecular diagnostics of early stage breast cancer. *Journal of translational medicine* 7(1), 60, 2009.
64. Moro K, et al. *Oncotarget*. Ceramide species are elevated in human breast cancer and are associated with less aggressiveness. *Oncotarget*. 2018 Apr 13;9(28):19874-19890. Doi: 10.18632 /oncotarget.24903. eCollection 2018.

65. Andrea M Porcari, Fernanda Negrao, Guilherme Lucas Tripodi, Denise Rocha Pitta. Molecular Signatures of High Cervical Lesions. *Front Oncol.* 2018 Apr 12;8:99. Doi:0.3389/fonc.2018.00099. eCollection 2018.
66. Qiu F, Chen F, Liu D, Xu J, Xiao J, Cao L, Huang X. LS-MS/MS-based screening of new protein biomarkers for cervical precancerous lesions and cervical cancer. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 2019 Jan 30;39(1):13-22. Doi: 10.12122/j.issn.1673-4254.2019.01.03.
67. Nayar R., Wilbur D. C. The Pap test and Bethesda 2014. *Acta Cytologica* 2015; 59(2):121–132. doi:10.1159/000381842.
68. Koelmel J. P., Kroeger N. M., Ulmer C. Z., et al. LipidMatch: An automated workflow for rule-based lipid identification using untargeted high-resolution tandem mass spectrometry data. *BMC Bioinformatics* 2017; 18(1):1–11. doi:10.1186/s12859-017-1744-3.
69. Sud M., Fahy E., Cotter D., et al. LMSD: LIPID MAPS structure database. *Nucleic Acids Research.* 2007; 35(SUPPL. 1):527–532. doi:10.1093/nar/gkl838.
70. Gupta R, Hariprasad R, Dhanasekaran K, et al. Reappraisal of cytology-histology correlation in cervical cytology based on the recent American Society of Cytopathology guidelines (2017) at a cancer research centre. *Cytopathology.* 2020;31:53–58. <https://doi.org/10.1111/cyt.12774>.
71. Crasta JA, Chaitra V, Simi CM, Correa M. An audit of cervicovaginal cytology in a teaching hospital: are atypical glandular cells under-recognised on cytological screening? *J Cytol.* 2009;26:69-73.
72. Joste NE, Crum CP, Cibas ES. Cytologic/histologic correlation for quality control in cervicovaginal cytology. Experience with 1,582 paired cases. *Am J Clin Pathol.* 1995 Jan;103(1):32-4. doi: 10.1093/ajcp/103.1.32. PMID: 7817940.
73. Bergeron C, von Knebel Doeberitz M. The Role of Cytology in the 21st Century: The Integration of Cells and Molecules. *Acta Cytol.* 2016;60 (6):540-542. doi: 10.1159/000449402. Epub 2016 Oct 28. PMID: 27788516.

74. Chen C, Yang Z, Li Z, Li L. Accuracy of several cervical screening strategies for early detection of cervical cancer: a meta-analysis. *Int J Gynecol Cancer*. 2012 Jul;22 (6):908-21. doi: 10.1097/IGC.0b013e318256e5e4. PMID: 22672987.
75. Ince U, Aydin O, Peker O. Clinical importance of "low-grade squamous intraepithelial lesion, cannot exclude high-grade squamous intraepithelial lesion (LSIL-H)" terminology for cervical smears 5-year analysis of the positive predictive value of LSIL-H compared with ASC-H, LSIL, and HSIL in the detection of high-grade cervical lesions with a review of the literature. *Gynecol Oncol*. 2011 Apr;121(1):152-6. doi: 10.1016/j.ygyno.2010.12.004. Epub 2011 Jan 5. PMID: 21211831.
76. Katki H.A., Schiffman M., Castle P.E. et al. Fiveyear risk of CIN 3+ and cervical cancer among women with HPV testing of ASC-US Pap results. *J Low Genit Tract Dis*. 2013;17:36–42.
77. Castle P. E., Schiffman M., Wheeler C. M., Solomon D. Evidence for frequent regression of cervical intraepithelial neoplasia-grade 2. *Obstet. Gynecol*. 2009; 113(1): 18–25.
78. Lertvutivivat S, Chanthasenanont A, Chanthasenanont A, Muangto T, Nanthakomon T, Pongroj paw D, Bhamarapratana K, Suwannarurk K. Silent High Grade.
79. Reuschenbach M, Wentzensen N, Dijkstra MG, von Knebel Doeberitz M, Arbyn M. p16INK4a immunohistochemistry in cervical biopsy specimens: A systematic review and meta-analysis of the interobserver agreement. *Am J Clin Pathol*. 2014 Dec;142(6):767-72. doi: 10.1309/AJCP3TPHV4TRIZEK. PMID: 25389329.
80. Gurrola-Díaz CM, Suárez-Rincón AE, Vázquez-Camacho G, Buonocunto-Vázquez G, Rosales-Quintana S, Wentzensen N, von Knebel Doeberitz M. P16INK4a immunohistochemistry improves the reproducibility of the histological diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia in cone biopsies.

- Gynecol Oncol. 2008 Oct;111(1):120-4. doi: 10.1016/j.ygyno.2008.06.032. Epub 2008 Aug 9. PMID: 18692882.
81. Van Meer G. Cellular lipidomics. *EMBO J*. 2005 Sep 21;24(18):3159-65. doi: 10.1038/sj.emboj.7600798. Epub 2005 Sep 1. PMID: 16138081; PMCID: PMC1224688.
82. Brügger B. Lipidomics: analysis of the lipid composition of cells and subcellular organelles by electrospray ionization mass spectrometry. *Annu Rev Biochem*. 2014;83:79-98. doi: 10.1146/annurev-biochem-060713-035324. Epub 2014 Mar 3. PMID: 24606142.
83. Szlasa W, Zendran I, Zalesińska A, Tarek M, Kulbacka J. Lipid composition of the cancer cell membrane. *J Bioenerg Biomembr*. 2020 Oct;52(5):321-342. doi: 10.1007/s10863-020-09846-4. Epub 2020 Jul 26. PMID: 32715369; PMCID: PMC7520422.
84. Hilton KLF, Manwani C, Boles JE, White LJ, Ozturk S, Garrett MD, Hiscock JR. The phospholipid membrane compositions of bacterial cells, cancer cell lines and biological samples from cancer patients. *Chem Sci*. 2021 Sep 28;12(40):13273-13282. doi: 10.1039/d1sc03597e. PMID: 34777745; PMCID: PMC8529332.
85. Snaebjornsson MT, Janaki-Raman. Snaebjornsson MT, Janaki-Raman S, Schulze A. Greasing the Wheels of the Cancer Machine: The Role of Lipid Metabolism in Cancer. *Cell Metab*. 2020 Jan 7;31(1):62-76. doi: 10.1016/j.cmet.2019.11.010. Epub 2019 Dec 5. PMID: 31813823.
86. Chistiakov D. A., Bobryshev Y. V., Orekhov A. N. Macrophage-mediated cholesterol handling in atherosclerosis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2016; 20(1):17–28. doi:10.1111/jcmm.12689.
87. Gebhard R. L., Clayman R. V., Prigge W. F., et al. Abnormal cholesterol metabolism in renal clear cell carcinoma. *Journal of Lipid Research*. 1987; 28(10):1177–1184. doi:10.1016/s0022-2275(20)38606-5.

88. Shamseddine A. A., Airola M. V., Hannun Y. A. Roles and regulation of neutral sphingomyelinase-2 in cellular and pathological processes. *Advances in Biological Regulation*. 2015; 57:24–41. doi:10.1016/j.jbior.2014.10.002.
89. Hannun Y. A., Obeid L. M. Sphingolipids and their metabolism in physiology and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2018; 19(3):175–191. doi:10.1038/nrm.2017.107.
90. Porcari A. M., Negrão F., Tripodi G.L., et al. Molecular Signatures of High-Grade Cervical Lesions. *Frontiers in Oncology* 2018; 8(April). doi:10.3389/fonc.2018.00099.
91. Nekrasova M. E., Chagovets V. V., Starodubtseva N. L., Kononikhin, A. S., Salimova, D. F., Tokareva A. O., Lagutin V. V., Naumov V. A., Nazarova, N. M., Frankevich V. E., Sukhikh G. T. Lipid markers of cervical epithelium neoplastic transformation in HPV-associated diseases. *Akusherstvo i Ginekologiya*. 2018; (4):64–70. doi: 10.18565/aig.2018.4.64-70 (in Russian).
92. Nam M, Seo SS, Jung S, Jang SY, Lee J, Kwon M, Khan I, Ryu DH, Kim MK, Hwang GS. Comparable Plasma Lipid Changes in Patients with High-Grade Cervical Intraepithelial Neoplasia and Patients with Cervical Cancer. *J Proteome Res*. 2021 Jan 1;20(1):740-750. doi: 10.1021/acs.jproteome.0c00640. Epub 2020 Nov 26. PMID: 33241689.
93. Zhang J, Feider CL, Nagi C, Yu W, Carter SA, Suliburk J, Cao HST, Eberlin LS. Detection of Metastatic Breast and Thyroid Cancer in Lymph Nodes by Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry Imaging. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2017 Jun;28(6):1166-1174. doi: 10.1007/s13361-016-1570-2. Epub 2017 Feb 28. PMID: 28247296; PMCID: PMC5750372.
94. Mun DG, Bhin J, Kim S, Kim H, Jung JH, Jung Y, Jang YE, Park JM, Kim H, Jung Y, Lee H, Bae J, Back S, Kim SJ, Kim J, Park H, Li H, Hwang KB, Park YS, Yook JH, Kim BS, Kwon SY, Ryu SW, Park DY, Jeon TY, Kim DH, Lee JH, Han SU, Song KS, Park D, Park JW, Rodriguez H, Kim J, Lee H, Kim KP, Yang EG, Kim HK, Paek E, Lee S, Lee SW, Hwang D. Proteogenomic

- Characterization of Human Early-Onset Gastric Cancer. *Cancer Cell*. 2019 Jan 14;35(1):111-124.e10. doi: 10.1016/j.ccell.2018.12.003. PMID: 30645970.
95. Shin JW, Rho HS, Park CY. Factors influencing the choice between cold knife conization and loop electrosurgical excisional procedure for the treatment of cervical intraepithelial neoplasia. *J Obstet Gynaecol Res*. 2009 Feb;35(1):126-30. doi: 10.1111/j.1447-0756.2008.00834.x. PMID: 19215559.
96. Wang XI, Huang F, Zhang S. Loop Electrosurgical Excision Procedure vs. Cold Knife Cone in Treatment of Cervical Intraepithelial Neoplasia: Review of 447 Cases. *Ann Clin Lab Sci*. 2017 Nov;47(6):663-667. PMID: 29263039.
97. Jiang Y, Chen C, Li L. Comparison of Cold-Knife Conization versus Loop Electrosurgical Excision for Cervical Adenocarcinoma In Situ (ACIS): A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One*. 2017 Jan 26;12(1):e0170587. doi: 10.1371/journal.pone.0170587. PMID: 28125627; PMCID: PMC5268480.
98. Chen L, Liu L, Tao X, Guo L, Zhang H, Sui L. Risk Factor Analysis of Persistent High-Grade Squamous Intraepithelial Lesion After Loop Electrosurgical Excision Procedure Conization. *J Low Genit Tract Dis*. 2019 Jan;23(1):24-27. doi: 10.1097/LGT.0000000000000444. PMID: 30371553.
99. Bogani G, DI Donato V, Sopracordevole F, Ciavattini A, Ghelardi A, Lopez S, Simoncini T, Plotti F, Casarin J, Serati M, Pinelli C, Valenti G, Bergamini A, Gardella B, Dell'acqua A, Monti E, Vercellini P, Fischetti M, D'Ippolito G, Aguzzoli L, Mandato VD, Carunchio P, Carlinfante G, Giannella L, Scaffa C, Falcone F, Borghi C, Ditto A, Malzoni M, Giannini A, Salerno MG, Liberale V, Contino B, Donfrancesco C, Desiato M, Perrone AM, Dondi G, De Iaco P, Leone Roberti Maggiore U, Signorelli M, Chiappa V, Ferrero S, Sarpietro G, Matarazzo MG, Cianci A, Bosio S, Ruisi S, Guerrisi R, Brusadelli C, Mosca L, Tinelli R, DE Vincenzo R, Zannoni GF, Ferrandina G, Petrillo M, Dessole S, Angioli R, Greggi S, Spinillo A, Ghezzi F, Colacurci N, Muzii L, Benedetti Panici P, Scambia G, Raspagliesi F. Recurrence rate after loop electrosurgical excision procedure (LEEP) and laser Conization: A 5-year follow-up study.

Gynecol Oncol. 2020 Dec;159(3):636-641. doi: 10.1016/j.ygyno.2020.08.025.
Epub 2020 Sep 3. PMID: 32893030.

100. Khan I, Nam M, Kwon M, Seo SS, Jung S, Han JS, Hwang GS, Kim MK. LC/MS-Based Polar Metabolite Profiling Identified Unique Biomarker Signatures for Cervical Cancer and Cervical Intraepithelial Neoplasia Using Global and Targeted Metabolomics. *Cancers (Basel)*. 2019 Apr 10;11(4):511. doi: 10.3390/cancers11040511. PMID: 30974861; PMCID: PMC6521312.