

На правах рукописи



ГУСАКОВ
Кирилл Ильич

ТАКТИКА ВЕДЕНИЯ ПАЦИЕНТОК, ВАКЦИНИРОВАННЫХ ОТ ВПЧ,
С ПРИМЕНЕНИЕМ КОМПЛЕКСА КЛИНИЧЕСКИХ,
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ И ПРОТЕОМНЫХ МЕТОДОВ
ИССЛЕДОВАНИЙ

14.01.01 – Акушерство и гинекология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва – 2020 г.

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

Научные руководители:

доктор медицинских наук, доцент
кандидат физико-математических наук

Назарова Нисо Мирзоевна
Франкевич Владимир Евгеньевич

Официальные оппоненты:

Минкина Галина Николаевна – доктор медицинских наук, профессор, ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра акушерства и гинекологии лечебного факультета, профессор кафедры

Мингалева Наталия Вячеславовна – доктор медицинских наук, профессор, ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра акушерства, гинекологии и перинатологии ФПК и ППС, профессор кафедры

Ведущая организация:

ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии»

Защита диссертации состоится «16» февраля 2021 г. в 13:00 на заседании диссертационного совета Д 208.125.01 на базе федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 117997, г. Москва, ул. Академика Опарина, д. 4.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

http://science.ncagp.ru/upfiles/pdf/Gusakov%20K.I.-dissertation_2020.pdf

Автореферат разослан «14» января 2021 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор медицинских наук, профессор



Калинина Елена Анатольевна

ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Вирус папилломы человека (ВПЧ) – один из основных возбудителей инфекций половых путей. Он способен вызывать злокачественную трансформацию клеток шейки матки, влагалища и вульвы. Известно, что ВПЧ представляет собой обширную группу (более 100 типов) вирусов, часть из которых обладает доказанной канцерогенной активностью. При персистенции в организме онкогенных типов ВПЧ они способны вызывать различные заболевания, самыми опасными из которых являются злокачественные заболевания шейки матки (Е.Г. Новикова, 2007 г., Л.А. Ашрафян, 2004 г., С. Patel, 2018 г.). По данным Международного агентства по изучению рака (IARC) ежегодно в мире регистрируется более 500 тыс. новых случаев ВПЧ-ассоциированного рака шейки матки (РШМ), что составляет 13,1 на 100 тыс. населения.

Известно, что примерно 90% случаев дисплазии шейки матки (цервикальная интраэпителиальная неоплазия, CIN) и 99% случаев РШМ возникают у ВПЧ-положительных пациенток (Г.Т.Сухих, В.Н. Прилепская, 2012 г., IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 2012 г.). Доказано, что единственным эффективным методом предотвращения РШМ и других ВПЧ-ассоциированных заболеваний является профилактика инфицирования ВПЧ. В настоящее время для этой цели применяются три вакцины. Известно, что вакцины статистически достоверно снижают частоту CIN, ассоциированного с вакцинальными типами ВПЧ (Г.Н. Минкина, 2010 г., В.Н. Прилепская, 2018 г., M. Steben *и соавт.*, 2018 г.). Данные об эффективности вакцинации в отношении других невакцинальных типов ВПЧ высокого риска недостаточны и порой противоречивы (N. Muñoz *и соавт.*, 2010 г., S. Kjaer *и соавт.*, 2009 г.). Кроме того, в соответствии с данными литературы, 35% женщин, по тем или иным причинам, получают не все три рекомендованные дозы вакцины, при этом более половины женщин (58%)

вакцинируются, уже будучи инфицированными, в том числе ВПЧ высокого риска (Н. Shiling *и соавт.*, 2019 г.).

Ряд исследований свидетельствуют о том, что встречаемость четырех вакцинальных типов ВПЧ среди вакцинированных женщин составляет 0,4–2,4% (Е. Enerly *и соавт.*, 2019 г., С. Patel *и соавт.*, 2018 г., М. Jacot-Guillarmod *и соавт.*, 2017 г.), при этом почти у половины из них (46,8%) выявляется, по крайней мере, один онкогенный тип ВПЧ (Н. Shilling *и соавт.*, 2019 г.).

Известно, что вакцинация от ВПЧ связана со значительными изменениями экспрессии и функции различных врожденных иммунных рецепторов, принимающих участие в защитном действии вакцин от ВПЧ. Перекрестная защита вакцинации и в настоящее время является предметом изучения (М. Jacot-Guillarmod *и соавт.*, 2017 г., М. Suzanne *и соавт.*, 2017 г.). Вероятной причиной перекрестной защиты от филогенетических групп ВПЧ А7 и А9 может являться как схожесть капсидного белка L1, так и изменение белкового состава цервикальной жидкости (ЦВЖ) у ранее вакцинированных от ВПЧ женщин. В этой связи чрезвычайно актуально изучение протеомного состава ЦВЖ у вакцинированных женщин при наличии других онкогенных типов ВПЧ. Это стало возможно благодаря внедрению в науку и практику масс-спектрометрии, позволяющей оценивать локальный иммунный ответ, определять особенности белкового состава ЦВЖ и его участие в перекрестной защите от других типов ВПЧ у вакцинированных женщин.

Степень разработанности темы исследования

В настоящее время для поиска биомаркеров часто применяется протеомный метод исследования белкового состава различных жидкостей организма, например, крови, мочи, ЦВЖ. Известно, что ЦВЖ играет значимую роль в иммунной защите, в том числе и женского полового тракта. Белковый состав ЦВЖ подвергается изменениям при различных заболеваниях, ассоциированных с ВПЧ. В этой связи белковый состав ЦВЖ можно рассматривать как источник биомаркеров неопластических процессов шейки

матки, в том числе у вакцинированных от ВПЧ женщин, имеющих другие онкогенные типы ВПЧ.

Цель исследования

Совершенствование диагностики и тактики ведения вакцинированных от ВПЧ женщин с применением клинических, молекулярно-генетических и протеомных методов исследований.

Задачи исследования

1. Изучить клинико-anamnestическую характеристику женщин, вакцинированных от ВПЧ, среди пациенток, обратившихся для обследования в научно-поликлиническое отделение.

2. Определить частоту инфицирования различными типами ВПЧ высокого канцерогенного риска среди вакцинированных и невакцинированных от ВПЧ женщин.

3. Изучить клинические проявления папилломавирусной инфекции (ПВИ) у женщин, вакцинированных от ВПЧ.

4. Оценить различия в белковом составе ЦВЖ вакцинированных от ВПЧ женщин методом масс-спектрометрии. Проанализировать диагностическую ценность панели белков ЦВЖ для определения групп риска развития неоплазии шейки матки.

5. Определить наличие дифференциально-экспрессированных генов мРНК у вакцинированных женщин.

6. Обосновать тактику ведения вакцинированных ВПЧ-положительных женщин на основании особенностей панели белков, разработанной методом масс-спектрометрии.

Научная новизна исследования

Впервые определена частота встречаемости других (невакцинальных) типов ВПЧ в когорте российских женщин, ранее вакцинированных от ВПЧ.

Показано, что вакцинальные типы ВПЧ выявляются только в группе пациенток, вакцинированных после начала половой жизни, тогда как в группе вакцинированных до начала половой жизни женщин инфицирование ВПЧ не встречалось.

Определено статистически значимое снижение частоты встречаемости других канцерогенных типов ВПЧ и установлена перекрестная защита от типов ВПЧ филогенетических групп А7 и А9 у вакцинированных женщин по сравнению с невакцинированными пациентками (NILM и HSIL).

Впервые изучен протеомный состав ЦВЖ у вакцинированных женщин методом масс-спектрометрии и разработана панель 9 белков ЦВЖ, непосредственно участвующих в реализации иммунного ответа *APOB*, *FABP5*, *GRN*, *HP*, *MUC5AC*, *OLFM4*, *PKP1*, *QSOX1*, *S100A8*.

Впервые определены гены мРНК *MYBL2*, *SERPINB5*, *CCNB1*, являющиеся маркерами благоприятного течения ПВИ.

Практическая значимость полученных результатов

Доказана практическая значимость определения широкого спектра типов ВПЧ для женщин, ранее вакцинированных от ВПЧ, как до, так и после начала половой жизни.

Установлена практическая значимость определения уровня экспрессии белков иммунного ответа *APOB*, *FABP5*, *GRN*, *HP*, *MUC5AC*, *OLFM4*, *PKP1*, *QSOX1*, *S100A8* в ЦВЖ и доказана целесообразность их применения для ранней диагностики CIN у ранее вакцинированных ВПЧ-положительных женщин в качестве дополнительного неинвазивного метода. Для раннего выявления группы риска по развитию ВПЧ-ассоциированных заболеваний шейки матки у вакцинированных женщин доказана целесообразность оценки экспрессии генов мРНК *MYBL2*, *SERPINB5*, *CCNB1*.

Методы исследования

Работа основана на использовании современных методов диагностики ВПЧ-ассоциированных заболеваний: клинический осмотр (жалобы, анамнез, гинекологический статус), цитологическое исследование, кольпоскопия, биопсия и гистологическое исследование материала (по показаниям), изучение экспрессии мРНК генов *MKI67*, *PGR*, *CDKN2A*, *MYBL2*, *UBE2T*, *EXO1*, *SERPINB5*, *CCNB1*, *ESR1*, *BAG1*, *BCL2* и *ANLN* с помощью ПЦР в режиме реального времени, протеомный анализ ЦВЖ методом HPLC-nESI-MS/MS (высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией).

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы «Statistica» v.10.0.

Положения, выносимые на защиту

1. В когорте российских женщин, ранее вакцинированных, встречаемость ВПЧ составила 22,5%, что требует последующего клинического наблюдения, несмотря на проведенную вакцинацию. У вакцинированных женщин доминирующими являлись другие онкогенные типы ВПЧ.

2. Нормальные результаты цитологического исследования при наличии других онкогенных типов ВПЧ у ранее вакцинированных женщин не исключают изменения эпителия шейки матки и требуют проведения расширенной кольпоскопии с целью определения дальнейшей тактики ведения.

3. Белки цервикагинальной жидкости *APOB*, *FABP5*, *GRN*, *HP*, *MUC5AC*, *OLFM4*, *PKP1*, *QSOX1*, *S100A8* участвуют в реализации иммунного ответа и формировании дополнительной перекрестной защиты от ВПЧ филогенетических групп А9 и А7 у вакцинированных женщин.

Личный вклад автора

Автором проведен анализ медицинских ресурсов по теме исследования, по его результатам подготовлен аналитический обзор, определены критерии

включения и исключения пациенток в исследование, разработан дизайн исследования. Автор участвовал в клинико-лабораторном исследовании, ведении пациенток с ВПЧ-ассоциированными заболеваниями, принимал участие в проведении биопсии шейки матки, а также осуществлял сбор биологического материала для лабораторных исследований. Результаты полученных исследований были систематизированы, проанализированы и статистически обработаны. Сформулированы выводы, установлены научная новизна и практическая значимость проведенных исследований.

Степень достоверности результатов исследования

Достоверность данных исследования подтверждается объемом выборки пациенток, включенных в исследование (141), а также результатами статистической обработки данных.

Соответствие диссертации паспорту полученной специальности

Научные положения диссертации соответствуют специальности 14.01.01 – «акушерство и гинекология», полученные результаты соответствуют области исследования по специальности, пунктам 3, 4, 5 паспорта акушерства и гинекологии.

Апробация диссертации

Основные положения диссертации и результаты работы были представлены и доложены на XXXI Международном конгрессе с курсом эндоскопии «Новые технологии в диагностике и лечении гинекологических заболеваний», Москва, 2018; XXV Всероссийском конгрессе с международным участием «Амбулаторно-поликлиническая помощь в эпицентре женского здоровья от менархе до менопаузы», Москва, 2019; XX Всероссийском научно-образовательном форуме «Мать и Дитя», Москва, 2019; XXXII Международном конгрессе «Новые технологии в диагностике и лечении гинекологических заболеваний», Москва, 2019; XII Региональном научно-образовательном

форуме и Пленуме Правления Российского общества акушеров-гинекологов «Мать и Дитя», Сочи, 2019; XV Международном конгрессе по репродуктивной медицине, Москва, 2020; 33rd International Papillomavirus Conference IPVC, Барселона, Испания, 2020; XXI Всероссийском научно-образовательном форуме «Мать и Дитя», Москва, 2020.

Диссертационная работа обсуждена на межклинической конференции (30.06.2020) и на заседании апробационной комиссии ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России (21.09.2020).

Внедрение результатов исследования в практику

Разработанный на основании полученных результатов алгоритм ведения вакцинированных от ВПЧ пациенток внедрен в практическую деятельность научно-поликлинического отделения ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Материалы диссертации используются в лекционных материалах на семинарах, симпозиумах, форумах. По теме диссертации опубликовано 15 научных работ, их них 6 – в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных высшей аттестационной комиссией (ВАК), 1 – в англоязычном научном издании, индексируемом SCOPUS.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 129 страницах компьютерного текста и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, клинической характеристики обследованных групп, результатов собственных исследований и их обсуждения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы, включающего 4 отечественных и 124 иностранных источников. Работа иллюстрирована 15 таблицами, 26 рисунками и 3 приложениями.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал исследования

С целью определения частоты встречаемости ВПЧ в структуре пациенток, обратившихся в научно-поликлиническое отделение для профилактического осмотра, был выполнен ретроспективный анализ 644 заключений ВПЧ-тестирования, проведенных в ФГБУ «НМИЦ акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова» МЗ РФ в 2018 г.

ВПЧ-генотипирование было проведено 141 пациентке, наблюдавшейся в ФГБУ «НМИЦ акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова» МЗ РФ в 2017–2020 гг. Основную группу составили 62 пациентки, ранее вакцинированные от ВПЧ четырехвалентной вакциной. Критериями включения являлись репродуктивный возраст (18–45 лет) с регулярным менструальным циклом, цитологическое заключение. Дополнительные критерии для включения в группу вакцинированных пациенток: вакцинация от ВПЧ четырехвалентной вакциной – 3 дозы в течение 1 года, время от введения последней дозы вакцины – минимум 3 года. Критериями исключения во всех группах являлись: беременность, период лактации, воспалительные заболевания специфической и неспецифической этиологии в стадии обострения, нарушение функции почек, печени, легких в стадии декомпенсации, психоневрологические заболевания. Было сформировано 2 группы контроля, в зависимости от цитологического заключения: HSIL (n=42) и NILM (n=37).

Все пациентки подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

Результаты исследования и их обсуждение

Ретроспективный анализ результатов ВПЧ-тестирования 644 женщин в возрасте от 25 до 45 лет показал, что 427 женщин были ВПЧ-положительными, 217 – ВПЧ-отрицательными. При этом 3,3% ВПЧ-положительных женщин были ранее вакцинированы от ВПЧ, среди ВПЧ-отрицательных вакцинированы

были 22,1% женщин. Полученные результаты показали, что ВПЧ значительно чаще диагностируется в группе невакцинированных женщин (70,9%). Встречаемость ВПЧ в группе вакцинированных от ВПЧ была в 3 раза ниже (22,5%) (рисунок 1).

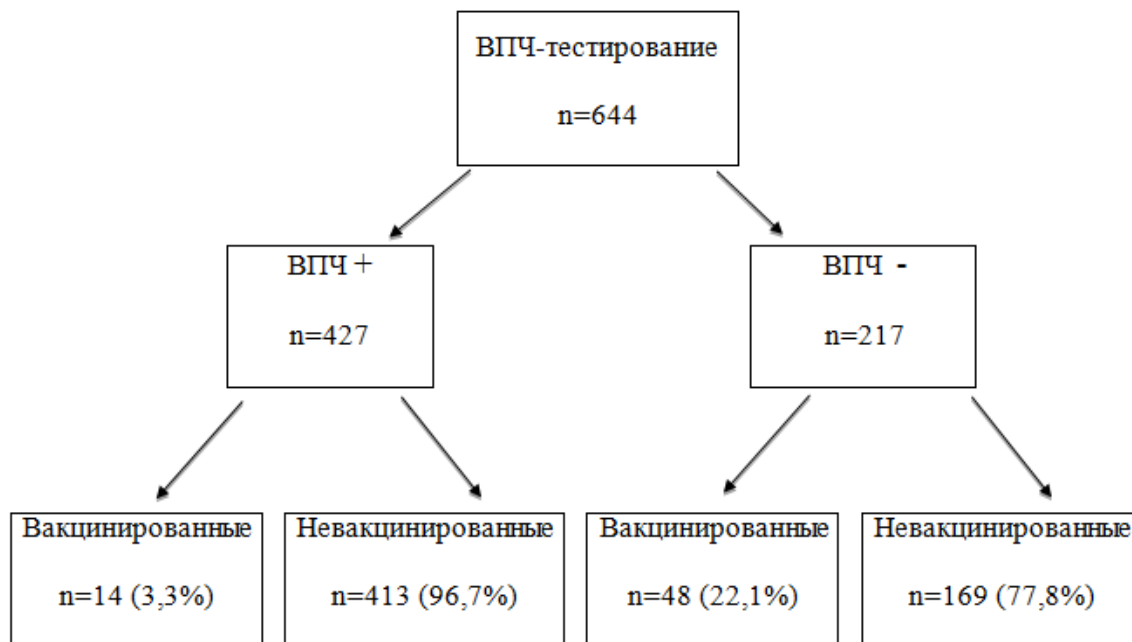


Рисунок 1. Результаты одномоментного ВПЧ-тестирования

Полученные нами результаты совпадают с результатами исследований, в которых также рассматривается целесообразность ВПЧ-генотипирования ранее вакцинированным от ВПЧ женщинам. Аналогичные данные получены в исследовании М. Jacot-Guillarmod (2017 г.), в котором было продемонстрировано, что 28,6% вакцинированных женщин были ВПЧ-положительными, более 38% – в исследовании Е. Enerly (2019 г.).

При анализе клинико-anamnestических данных 141 пациентки (одномоментное проспективное исследование) не было выявлено статистических различий по возрасту, антропометрическим данным, менструальной функции (менархе, длительность менструального цикла, продолжительность менструаций), акушерскому анамнезу и соматическим заболеваниям. При анализе особенностей половой жизни пациенток установлено, что 34% женщин начали половую жизнь до 18 лет (средний

возраст полового дебюта 18,3 лет: $19,0 \pm 4,8$ в 1 группе, $18,4 \pm 1,1$ во 2 и $18,3 \pm 3,1$ в 3 группе). При изучении структуры гинекологической патологии в анамнезе отмечались статистически значимые отличия с группой HSIL по нозологиям «аногенитальные кондиломы» и «хламидийная инфекция». Средний возраст вакцинации в подгруппе 1a составил $15,7 \pm 2,5$ лет, в подгруппе 1b – $27,2 \pm 4,6$ лет.

ВПЧ-генотипирование было проведено 141 пациентке, средний возраст которых составил 31 ($\pm 6,8$) год, было сформировано 3 группы: вакцинированные (группа 1, n=62), невакцинированные пациентки HSIL (2, n=42) и невакцинированные пациентки NILM (3, n=37).

Нами был проведен анализ распределения вакцинальных – 16/18 типов – и, отдельно, ВПЧ других онкогенных (невакцинальных) типов в исследуемых группах. Частота встречаемости вакцинальных типов ВПЧ высокого онкогенного риска (16, 18) была статистически значимо ниже в группе вакцинированных (3,2%), чем в группах 2 (73,8%) ($p < 0,01$) и 3 (24,3%) ($p < 0,01$). Другие типы ВПЧ высокого канцерогенного риска (невакцинальные, филогенетической группы 1) статистически чаще встречались в группе HSIL – в 52,4%, в NILM – 62,2%, в группе вакцинированных – только в 12,9% случаев ($p < 0,01$) (рисунок 2). Частота встречаемости невакцинальных типов ВПЧ (вероятно и возможно канцерогенного риска, ВПЧ группы 2A, 2B, IARC) у вакцинированных женщин составила 16,1%, наиболее часто встречаемыми типами были ВПЧ 56 и ВПЧ 51. Статистически достоверной разницы по встречаемости невакцинальных типов ВПЧ среди групп NILM и HSIL не было выявлено ($p = 0.495$).

В подгруппе 1a (вакцинированных до начала половой жизни) не было выявлено вируса папилломы человека ни в одном случае. Полученные нами данные совпадают с данными исследования E. Enerly (2019 г.), в котором частота встречаемости вакцинальных типов среди вакцинированных женщин составила 0,4%. В подгруппе 1b (вакцинированных от ВПЧ после начала половой жизни) ВПЧ положительными были 38,8% женщин, при этом наиболее

часто встречались ВПЧ 56 (16,6%), 16, 51, 53, 73 (5,5%) типов. Результаты исследования E. Enerly (2019 г.) также демонстрируют высокую частоту встречаемости других редких типов ВПЧ 42, 90, 53, 67, 89 у вакцинированных до и после начала половой жизни женщин. В группах HSIL и NILM наиболее часто определялся ВПЧ 16 типа – 73,8% и 18,9%, соответственно.

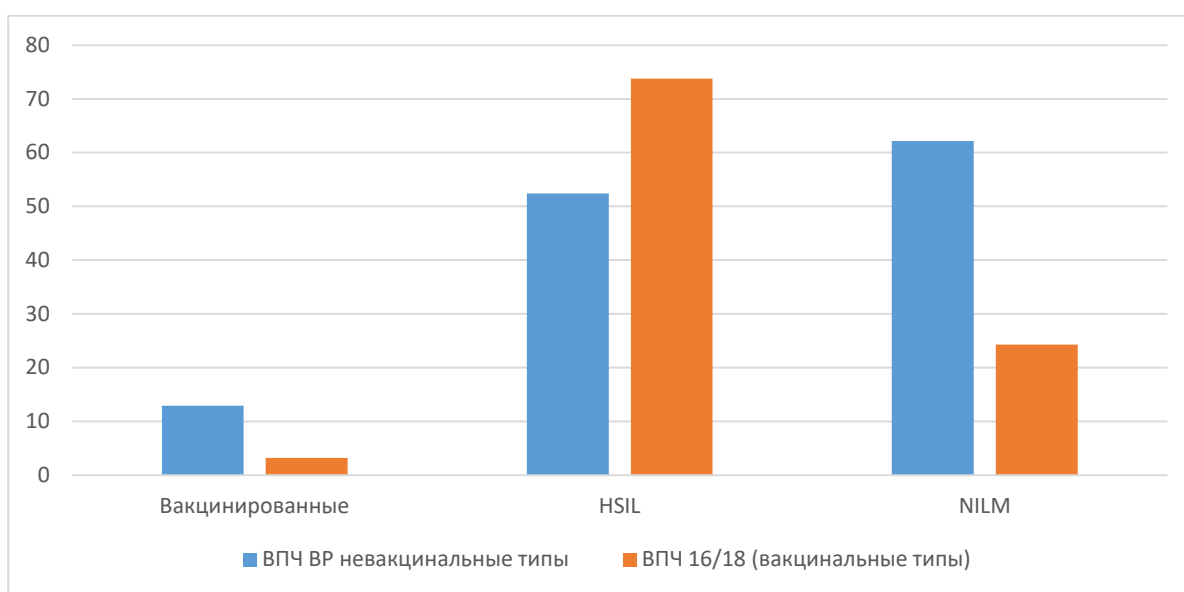


Рисунок 2. Распределение пациенток с ВПЧ ВР вакцинальных и других (невакцинальных) типов по группам, %

Полученные нами данные позволяют предположить, что у вакцинированных происходит замещение ВПЧ 16 типа, преобладающего в общей популяции, другими онкогенными типами ВПЧ. Аналогичные данные получены в исследовании C. Patel *и соавт.* (2019 г.), в котором отмечено значительное снижение вакцинальных типов ВПЧ в общей популяции (с 28,7 до 6,5%), при этом частота невакцинальных типов ВПЧ оставалась высокой (за исключением филогенетических групп А9, А7).

Частота встречаемости других (невакцинальных) типов ВПЧ филогенетических групп А7 и А9 была статистически достоверно ниже в группе вакцинированных (3,2%), чем в группах HSIL (88%) и NILM (64%) ($p < 0,01$).

Нами обнаружены статистически достоверные данные о перекрестной защите от невакцинальных типов ВПЧ высокого канцерогенного риска (A9, A7) среди групп вакцинированных пациенток по сравнению с HSIL (A9: $p < 0,01$, A7: $p < 0,01$) и NILM (A9: $p < 0,01$, A7: $p < 0,01$). Возможность перекрестной защиты часто объясняется филогенетическим сходством белка L1: ВПЧ 16 – с другими типами группы A9 и ВПЧ 18 – с ВПЧ группы A7. Представленные нами данные получены впервые в когорте российских женщин. Наши данные совпадают с результатами исследования M. Suzanne (2007 г.), в котором был продемонстрирован протективный эффект вакцинации применительно к невакцинальным типам ВПЧ группы A9.

Цитологическое заключение у всех пациенток обеих подгрупп (1a, 1b) вакцинированных (100%) женщин соответствовало NILM. Слабовыраженные изменения эпителия при расширенной кольпоскопии были выявлены только у 10% ВПЧ-положительных вакцинированных пациенток группы 1, в группе NILM – 43,2% ($p < 0,01$). В группе HSIL определялись только выраженные изменения.

Полученные нами данные свидетельствуют о целесообразности проведения кольпоскопии для ранней диагностики поражения эпителия шейки матки у всех вакцинированных ВПЧ-положительных женщин.

Гистологический диагноз CIN был верифицирован в группе 1 (вакцинированных): LSIL (CIN 1) – 9,3%; в группе 3 (HSIL): LSIL (CIN 1) – 12% ($p = 0,75$), HSIL (CIN 2-3) – 88% ($p < 0,01$). Дальнейшая тактика ведения пациенток проводилась в соответствии с существующими рекомендациями.

Для анализа протеомного состава ЦВЖ методом масс-спектрометрии было сформировано 4 группы ($n = 37$): группа 1 ВПЧ+/вакцина-, группа 2 ВПЧ-/вакцина-, группа 3 ВПЧ+/вакцина+; группа 4 ВПЧ-/вакцина+. Всего в образцах ЦВЖ было выявлено более 419 различных белков. Более 200 выявленных белков выявлялись во всех четырех группах, данные белки входят в «белковый кор» ЦВЖ (рисунок 3). Для создания диагностической панели белков для ВПЧ-положительных женщин, ранее вакцинированных от ВПЧ, проводился анализ

обогащения функциональных групп генов, кодирующих статистически значимо изменяющиеся белки по базам GO. Анализ по базам GO Function и GO Pathways позволил выявить значимое участие данных белков в процессах иммунной системы.

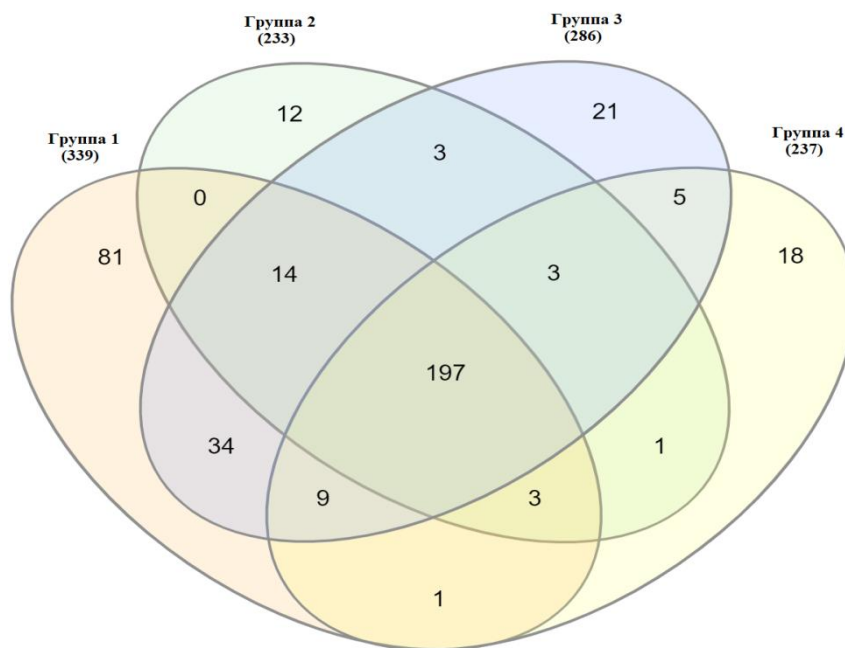


Рисунок 3. Внутри- и межгрупповая вариабельность протеома ЦВЖ в зависимости от статуса вакцинации: группа 1 ВПЧ+/вакцина-; группа 2 ВПЧ-/вакцина-; группа 3 ВПЧ+/вакцина+; группа 4 ВПЧ-/вакцина+

Для выявления особенности белкового состава ЦВЖ вакцинированных и невакцинированных от ВПЧ женщин применялся статистический метод с использованием Т-критерия Стьюдента ($p < 0,01$). В результате статистического анализа было выявлено 89 белков, изменяющихся относительно показателей контрольных групп (рисунок 4).

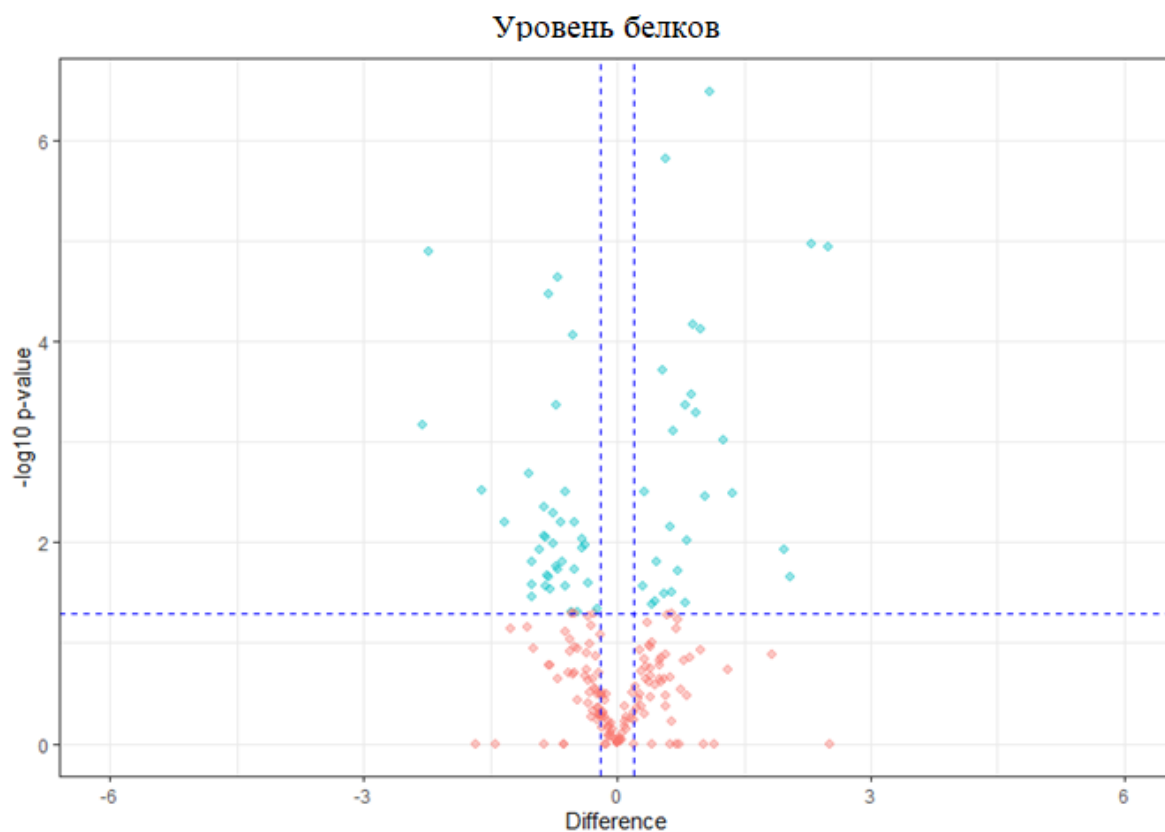


Рисунок 4. Изменение уровня статистически значимо изменяющихся белков ($p < 0,01$) в группе ВПЧ+/вакцина+ относительно контрольной группы ВПЧ-/вакцина+

Были выявлены 34 белка, изменяющихся только в группах вакцинированных пациенток (группы 3 и 4). Большинство данных белков принимают участие в химических и биологических реакциях с участием органических или неорганических соединений, которые содержат азот (CFL1, VTN, P4NB и др.), а также в иммунных процессах (AGT, AMBP, ITIN1, RNH1, C5 и др.) и, в том числе, во врожденных и лейкоцит-опосредованных иммунных реакциях (рисунок 5).

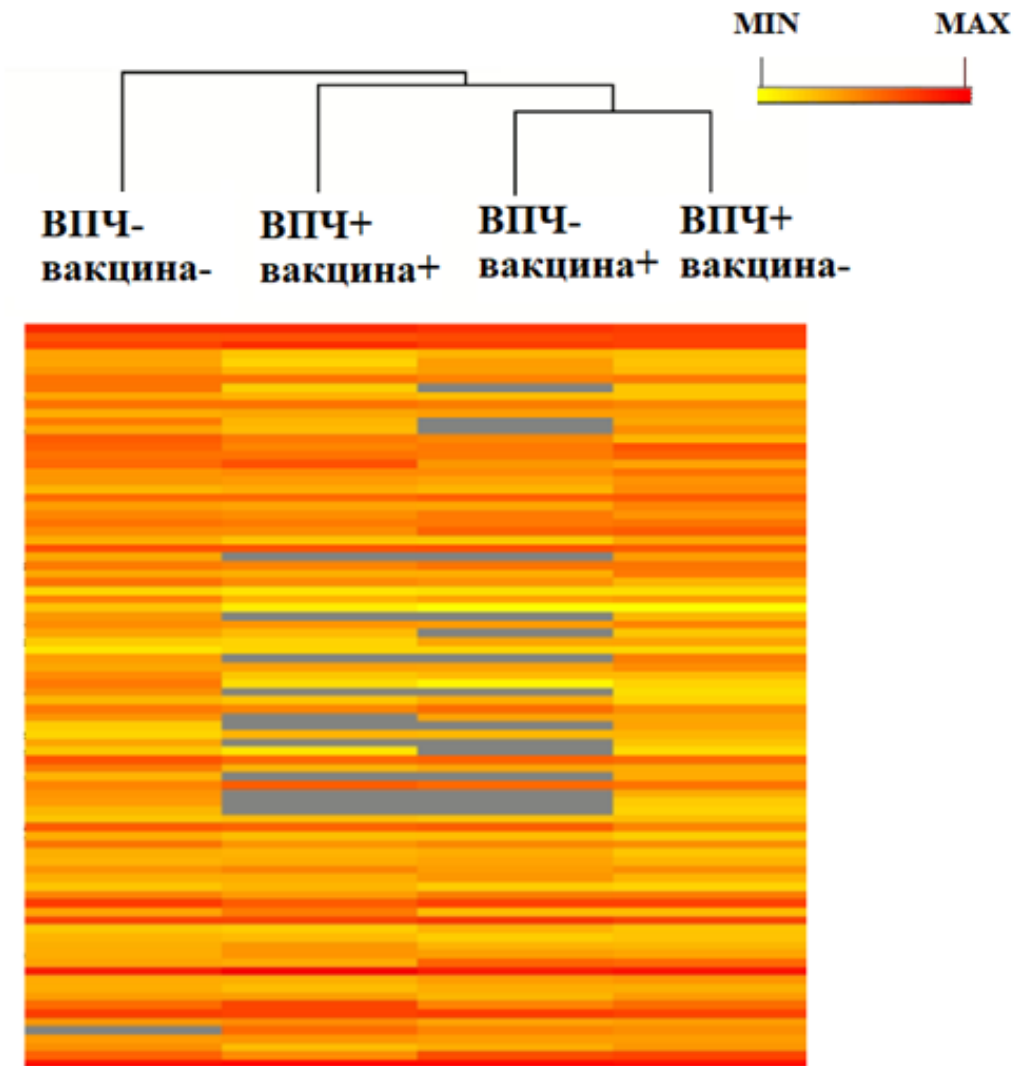


Рисунок 5. Филогенетическое дерево, построенное на основе различий протеомного состава цервикавагинальной жидкости

В соответствии с полученными результатами была создана диагностическая панель, состоящая из 9 белков, в основном принимающих участие в реализации процессов врожденного иммунитета: APOB, FABP5, GRN, HP, MUC5AC, OLFM4, PKP1, QSOX1, S100A8 (таблица 1, рисунок 6).

Таблица 1. Белки ЦВЖ, статистически достоверно изменяющиеся в группе ВПЧ+/вакцина+ относительно группы ВПЧ-/вакцина+.

ID белков	Название белков	Название гена	Изменения в группе ВПЧ+/вакцина+ (относительно контрольной группы)
P98088	Mucin-5AC	MUC5AC	↓
P28799	Granulins	GRN	↓
O00391	Sulfhydryl oxidase 1	QSOX1	↓
P05109	Protein S100-A8	S100A8	↓
P04114	Apolipoprotein B-100	APOB	↑
Q01469	Fatty acid-binding protein	FABP5	↑
P00738	Haptoglobin	HP	↑
Q6UX06	Olfactomedin-4	OLFM4	↑
Q13835	Plakophilin-1	PKP1	↑

Среди выявленных белков, осуществляющих иммунные функции, важно выделить 5 белков: гелеобразующий гликопротеин эпителия (MUC5AC), который оказывает протективный эффект для слизистой оболочки в отношении инфекций и химических повреждений путем связывания с микроорганизмами (J. Van de Vovenkamp, 2003 г., J. Perez-Vilar, 2004 г.); ольфактомедин 4 (OLFM4), участвующий в пролиферации атипических клеток (D. Kobayashi, 2007). Данный белок способствует ингибированию роста клеток, а также вызывает дифференцировку клеток, участвуя в процессе апоптоза (W. Liu, 2010 г.). Кроме этого, в группе вакцинированных пациенток происходит увеличение уровня пролактина-1 (PKP1), в первую очередь способствующего эпидермальному морфогенезу (J.A. McGrath, 1997 г.). Белок S100A8 (кальций-

и цинк-связывающий белок) играет важную роль в регуляции воспалительных процессов и реализации иммунного ответа, индуцируя нейтрофильный хемотаксис и адгезию, кроме того он способен вызывать гибель клеток посредством аутофагии и апоптоза, связываясь с митохондриями и лизосомами через активные формы кислорода (АФК) (S. Ghavami, 2010 г.). Изменение уровней белков иммунной системы ЦВЖ у вакцинированных от ВПЧ женщин может играть важную роль в формировании перекрестной защиты от групп А7 и А9, наравне с филогенетической схожестью капсидного белка L1.

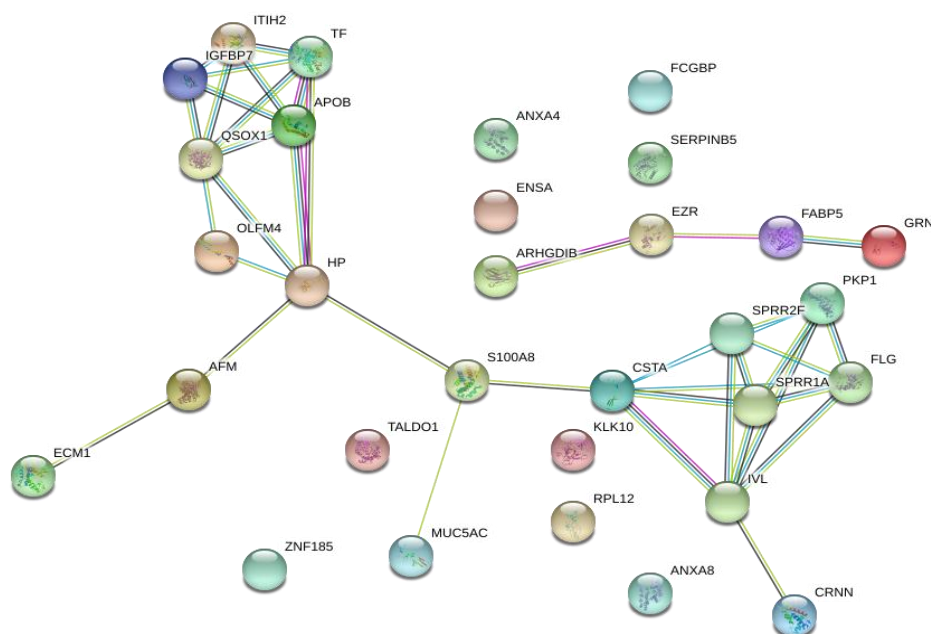


Рисунок 6. Анализ взаимодействий белков, статистически значимо изменяющихся в группе ВПЧ+/вакцина+ относительно контрольной группы ВПЧ-/вакцина+

Следовательно, анализ ЦВЖ методом масс-спектрометрии позволяет рассматривать его в качестве нового неинвазивного метода обнаружения биомаркеров ранней диагностики CIN, в том числе, у вакцинированных женщин. Масс-спектрометрию, по-видимому, можно рассматривать в качестве инновационного метода изучения роли протеомного состава ЦВЖ в формировании перекрестной защиты у вакцинированных женщин.

В настоящее время крайне актуальным является вопрос ревакцинации, однако данные о сроках ее проведения противоречивы. Так, по данным D. Harper *и соавт.* (2017 г.), P.V. Damme *и соавт.* (2016 г.) ревакцинация в течение 10 лет не показана ввиду высокой ее эффективности и в связи с экономическими затратами. Следовательно, выявленные нами белки локального иммунного ответа, помимо маркеров ВПЧ-ассоциированных заболеваний шейки матки у вакцинированных, могут в перспективе рассматриваться в качестве возможных предикторов, определяющих необходимость проведения ревакцинации у определенных групп пациенток.

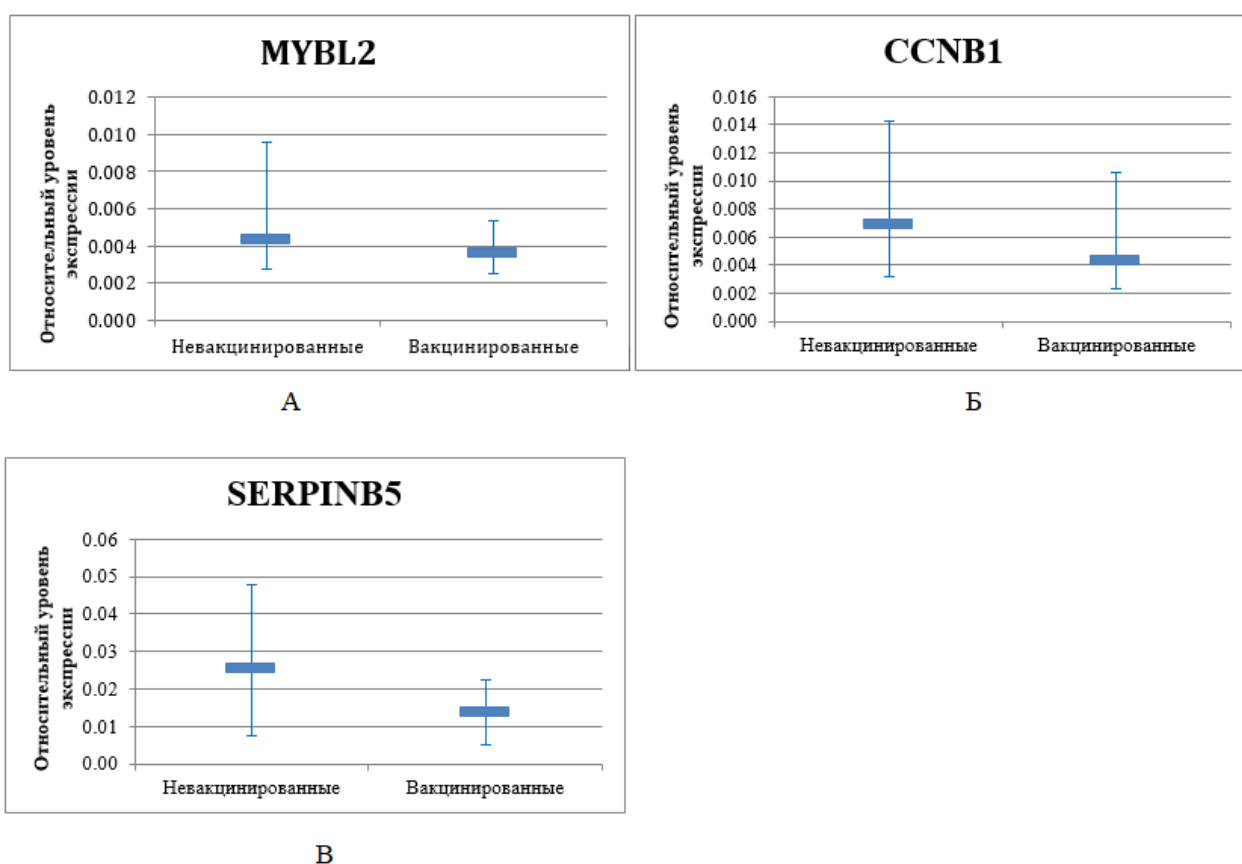


Рисунок 7. Изменение уровня экспрессии мРНК (*MYBL2* рис. 7А, *CCNB1* рис. 7Б, *SERPINB5* рис. 7В) в группе вакцинированных пациенток (NILM) по сравнению с группой невакцинированных пациенток (NILM)

С целью оценки пролиферативной активности клеток эпителия шейки матки была изучена экспрессия 12 мРНК функциональных генов человека

MKI67, PGR, CDKN2A, MYBL2, UBE2T, EXO1, SERPINB5, CCNB1, ESR1, BAG1, BCL2 и *ANLN* 99 пациенткам, из них 62 (62%) были вакцинированы (группа 1) и 37 (37%) – невакцинированы (группа 2, NILM). Было отмечено статистически значимое снижение экспрессии генов *MYBL2* ($p=0,025$), *SERPINB5* ($p=0,016$) и *CCNB1* ($p=0,043$) в группе 1 по сравнению с группой 2: *MYBL2* – в 1,2 раза, *CCNB1* – в 1,6 раз, *SERPINB5* – в 1,8 раз (рисунок 7 А, Б, В).

Полученные нами результаты свидетельствуют о снижении пролиферативной активности клеток, обусловленной отсутствием активности ВПЧ у вакцинированных женщин. Указанные гены мРНК могут быть использованы в качестве диагностической панели оценки благоприятного течения ПВИ.

Таким образом, нами были выявлены маркеры (белки ЦВЖ методом масс-спектрометрии *APOB, FABP5, GRN, HP, MUC5AC, OLFM4, PKP1, QSOX1, S100A8*), позволяющие оценить локальный иммунный ответ и определить группы риска развития неопластической трансформации эпителия шейки матки, в том числе у вакцинированных пациенток, в дополнение к клиническим, морфологическим и молекулярно-генетическим методам исследования. Впервые в когорте российских женщин были обнаружены статистически достоверные данные о перекрестной защите от невакцинальных типов ВПЧ высокого канцерогенного риска филогенетических групп А9 и А7 у вакцинированных пациенток по сравнению с невакцинированными пациентками NILM и HSIL. Выявленные белки ЦВЖ методом масс-спектрометрии и их роль в иммунных процессах позволяет предположить их участие в формировании дополнительной защиты у вакцинированных пациенток от невакцинальных типов ВПЧ групп А9 и А7. На основании полученных результатов была разработана тактика ведения вакцинированных от ВПЧ женщин с наличием других (невакцинальных) типов ВПЧ с учетом панели выделенных белков ЦВЖ методом масс-спектрометрии.

ВЫВОДЫ

1. Частота встречаемости вируса папилломы человека в когорте российских женщин, ранее вакцинированных от ВПЧ, составила 22,5%.

2. Вакцинальные типы выявлены только в группе женщин, вакцинированных после начала половой жизни: ВПЧ 16 (3,2%) и 6 (1,4%). Частота встречаемости других (невакцинальных) типов ВПЧ ВР у вакцинированных женщин составила 12,9%, доминирующими типами являлись: ВПЧ 56 (9,6%), ВПЧ 51 (3,2%) типов.

3. У вакцинированных женщин установлено статистически значимое снижение частоты встречаемости других типов ВПЧ филогенетических групп А9 и А7 по сравнению с группами HSIL (А9: $p < 0,01$, А7: $p < 0,01$) и NILM (А9: $p < 0,01$, А7: $p < 0,01$), что может свидетельствовать о перекрестной защите.

4. Цитопатические изменения, характерные для ВПЧ, не были обнаружены в группе вакцинированных женщин. У 9,6% ВПЧ-положительных вакцинированных женщин с нормальной цитологической картиной при кольпоскопии были выявлены изменения эпителия шейки матки, требовавшие проведения биопсии. В формировании LSIL у вакцинированных женщин участвовали ВПЧ филогенетических групп А6, А9: ВПЧ 56 (6,5%) и 16 типов (3,2%).

5. Определен 21 специфический белок ЦВЖ, характерный для ВПЧ-положительных вакцинированных пациенток. Установлена их прогностическая значимость для определения течения ПВИ и раннего выявления групп с высоким риском развития CIN.

6. Протеомный состав ЦВЖ у вакцинированных и невакцинированных женщин имеет различный профиль экспрессии белков, ответственных за определенные процессы иммунной системы. В группе вакцинированных пациенток были выявлены статистически значимые различия экспрессии 9

белков ЦВЖ, непосредственно участвующих в реализации иммунного ответа *APOB, FABP5, GRN, HP, MUC5AC, OLFM4, PKP1, QSOX1, S100A8*.

7. У вакцинированных женщин отмечается снижение экспрессии генов мРНК *MYBL2, CCNB1, SERPINB5*, свидетельствующее о низкой пролиферативной активности клеток, обусловленной отсутствием ВПЧ, что является основанием для их применения в качестве диагностической панели для раннего выявления CIN у ВПЧ положительных вакцинированных женщин.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Женщинам, вакцинированным от ВПЧ до начала половой жизни, рекомендуется проведение ВПЧ-тестирования для выявления групп риска по развитию патологии шейки матки.

2. При вакцинации после начала половой жизни целесообразно проводить ВПЧ-генотипирование на широкий спектр ВПЧ ВР для выявления невакцинальных типов ВПЧ.

3. Вакцинированным пациенткам, прошедшим только цитологическое исследование, даже при нормальном результате (NILM), целесообразно определение ВПЧ ВР (широкий спектр) для выявления группы высокого риска развития CIN.

4. При наличии других (невакцинальных) типов ВПЧ канцерогенного риска, рекомендуется проведение кольпоскопии и биопсии шейки матки (по показаниям).

5. Ранее вакцинированным ВПЧ-положительным женщинам и/или пациенткам с морфологически верифицированным LSIL, целесообразно определение панели белков ЦВЖ, участвующих в иммунных и противовирусных процессах *APOB, FABP5, GRN, HP, MUC5AC, OLFM4, PKP1, QSOX1, S100A8*, для раннего выявления групп с высоким риском развития CIN.

СПИСОК РАБОТ ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Аногенитальные кондиломы, ассоциированные с ВПЧ: клинико-морфологические аспекты и принципы терапии / Назарова Н.М., Некрасова М.Е., Прилепская В.Н., **Гусаков К.И.**, Трофимов Д.Ю. // **Медицинский совет.** – 2018. – №13. – стр. 10-15.
2. ВПЧ-ассоциированные аногенитальные кондиломы: этиопатогенетические и клинические аспекты диагностики, лечения и профилактики / Назарова Н.М., **Гусаков К.И.**, Прилепская В.Н., Трофимов Д.Ю., Франкевич В.Е. // **Opinion Leader.** – 2018. – № S1. – стр. 34-38.
3. ВПЧ-ассоциированные заболевания у женщин и мужчин: клинические и практические аспекты / Назарова Н.М., Прилепская В.Н., **Гусаков К.И.**, Сычева Е.Г. // **Медицинский оппонент.** – 2018. – № 4. – стр. 22-29.
4. Анализ липидного состава ткани методом масс-спектрометрии при ВПЧ-ассоциированных заболеваниях шейки матки / Некрасова М.Е., Назарова Н.М., Чеговец В.В., Стародубцева Н.Л., Кононихин А.С., **Гусаков К.И.**, Бурменская О.В., Франкевич В.Е. // Материалы XXIV Всероссийского конгресса с международным участием «Амбулаторно-поликлиническая помощь в эпицентре женского здоровья» – Москва, 3-5 апреля 2018.
5. Характеристика белкового состава цервикагинальной жидкости при ВПЧ-ассоциированных заболеваниях шейки матки / Зардиашвили М.Д., Кононихин А.С., Бржозовский А.Г., Бугрова А.Е., Чаговец В.В., Стародубцева Н.Л., **Гусаков К.И.**, Назарова Н.М., Франкевич В.Е. // Материалы XXIV Всероссийского конгресса с международным участием «Амбулаторно-поликлиническая помощь в эпицентре женского здоровья» – Москва, 3-5 апреля 2018.
6. ВПЧ и ассоциированные с ним заболевания шейки матки у женщин, применяющих гормональные методы контрацепции: лечебно-диагностическая тактика при аномальных результатах цитологии /

- Назарова Н.М., **Гусаков К.И.**, Сычева Е.Г. // **Медицинский совет.** – 2019. – №7. – стр. 34-38.
7. Вакцинация как эффективный метод профилактики заболеваний шейки матки, ассоциированных с вирусом папилломы человека (Обзор литературы) / Прилепская В.Н., **Гусаков К.И.**, Назарова Н.М. // **Гинекология.** – 2019. – №2. – стр. 23-27.
 8. Профилактика ВПЧ-ассоциированных заболеваний: достижение и перспективы / Прилепская В.Н., **Гусаков К.И.** // **Медицинский оппонент.** – 2019. – №3(7). – стр. 45-49.
 9. Перспективы профилактики рака, ассоциированного с ВПЧ / **Гусаков К.И.**, Назарова Н.М., Прилепская В.Н., Стародубцева Н.Л., Франкевич В.Е. // **Акушерство и гинекология.** – 2019. – №8. – стр. 33-39.
 10. Label-free cervicovaginal fluid proteome profiling reflects the cervix neoplastic transformation / Starodubtseva N.L., Brzhozovskiy A.G., Bugrova A.E., Kononikhin A.S., Indeykina M.I., **Gusakov K.I.**, Chagovets V.V., Nazarova N.M., Frankevich V.E., Sukhikh G.T., Nikolaev E.N. // **J Mass Spectrom.** – 2019. 54(8). – p. 693-703.
 11. Изменение экспрессия мРНК генов KI67, P16, PGR и BCL2 при ВПЧ-ассоциированных заболеваниях шейки матки / **Гусаков К.И.**, Бурменская О.В., Сычева Е.Г., Назарова Н.М., Трофимов Д.Ю., Сухих Г.Т. // Материалы XXV Юбилейного Всероссийского конгресса с международным участием «Амбулаторно-поликлиническая помощь в эпицентре женского здоровья от менархе до менопаузы» – Москва, 2-4 апреля 2019.
 12. Оценка протеомного состава цервикагинальной жидкости методом масс-спектрометрии при неопластической трансформации шейки матки, ассоциированной с ВПЧ / **Гусаков К.И.**, Стародубцева Н.Л., Франкевич В.Е., Назарова Н.М., Бугрова А.Е., Кононихин А.С., Бржозовский А.Г., Асатурова А.В. // Материалы XXV Юбилейного Всероссийского конгресса с международным участием «Амбулаторно-поликлиническая

помощь в эпицентре женского здоровья от менархе до менопаузы» – Москва, 2-4 апреля 2019.

13. Характеристика динамических изменений протеомного состава цервикагинальной жидкости при заболеваниях шейки матки, ассоциированных с ВПЧ-инфекцией / Стародубцева Н.Л., Бржозовский А.Г., Бугрова А.Е., Кононихин А.С., **Гусаков К.И.**, Назарова Н.М., Франкевич В.Е. // **Акушерство и гинекология.** – 2020. – №7. – стр. 111-116.
14. Результаты генотипирования вируса папилломы человека у женщин репродуктивного возраста, вакцинированных от вируса папилломы человека / **Гусаков К.И.**, Назарова Н.М., Франкевич В.Е., Стародубцева Н.Л., Бурменская О.В., Прилепская В.Н., Сухих Г.Т. // **Акушерство и гинекология.** – 2020. – №9. – стр. 114-119.
15. Экспрессионные профили мРНК генов в дифференциальной диагностики степени тяжести ВПЧ-ассоциированных поражений шейки матки / Назарова Н.М., Бурменская О.В., Довлетханова Э.Р., Абакарова П.Р., Шешко П.Л., Аттоева Д.И., **Гусаков К.И.** // **Акушерство и гинекология.** – 2020. – №4 (приложение). – стр. 157-159.