

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

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

Диссертация

на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Научные руководители:

доктор медицинских наук

НАЗАРОВА Нисо Мирзоевна

кандидат физико-математических наук

ФРАНКЕВИЧ Владимир Евгеньевич

Москва – 2020

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
Глава 1. ПЕРСПЕКТИВЫ ПРОФИЛАКТИКИ РАКА, АССОЦИИРОВАННОГО С ВИРУСОМ ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА	11
1.1. ВПЧ: роль в развитии цервикальных интраэпителиальных неоплазий и рака шейки матки	11
1.2. Первичная профилактика ВПЧ-ассоциированных заболеваний: оценка эффективности, побочных эффектов, вероятности перекрестной защиты	15
1.3. Анализ результатов Национальных программ профилактики ВПЧ- ассоциированных заболеваний	20
1.4. Дальнейшие перспективы вакцинации: терапия неопластической трансформации эпителия шейки матки	22
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	24
2.1. Материал исследования	24
2.2. Методы исследования	27
2.3. Методы статистической обработки	38
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	40
3.1. Результаты ретроспективного исследования	40
3.2. Клинико-anamnestический анамнез	42
3.3. Результаты ВПЧ-генотипирования	43
3.4. Результаты цитологического исследования	59
3.5. Результаты кольпоскопии	60
3.6. Результаты морфологического исследования	65
3.7. Результаты экспрессии мРНК генов	67
3.8. Результаты протеомного анализа цервикагинальной жидкости	72
Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ	91

ВЫВОДЫ	105
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	106
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	107
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	109
ПРИЛОЖЕНИЕ А	127
ПРИЛОЖЕНИЕ Б	128
ПРИЛОЖЕНИЕ В	129

ВВЕДЕНИЕ

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. 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 [1,2].

Известно, что примерно 90% случаев дисплазии шейки матки (цервикальная интраэпителиальная неоплазия, CIN) и 99% случаев РШМ возникают у ВПЧ-положительных пациенток. 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. Данные об эффективности вакцинации в отношении других невакцинальных типов ВПЧ высокого риска недостаточны и порой противоречивы [3]. 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.

Ряд исследований свидетельствуют о том, что встречаемость четырех вакцинальных типов ВПЧ среди вакцинированных женщин составляет 0,4–2,4% [4-6], при этом почти у половины из них (46,8%) выявляется, по крайней мере, один онкогенный тип ВПЧ [7].

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. Вероятной причиной перекрестной защиты от филогенетических групп ВПЧ А7 и А9 [5] может являться как схожесть капсидного белка L1, так и изменение белкового состава цервикагинальной жидкости (ЦВЖ) у ранее вакцинированных от ВПЧ женщин.

Одним из главных достижений последних десятилетий в области профилактики рака шейки матки стало изобретение и внедрение в клиническую практику программ вакцинации от ВПЧ [5, 9, 10]. Вакцины от ВПЧ используются в клинической практике в России с начала 2000-ых годов. Однако в настоящее время изучение распределения типов ВПЧ участвующих в формировании неопластической трансформации у вакцинированных ранее против ВПЧ женщин не проводилось.

Четырехвалентная вакцина от ВПЧ демонстрирует крайне высокую эффективность в предотвращении CIN 2 + у женщин в возрасте 15-26 лет [3, 6, 11-13], однако в настоящее время недостаточно исследований о возможной перекрестной защиты вакцины от не вакцинальных типов ВПЧ и, соответственно, эффективности в предотвращении РШМ, вызванном не вакцинальными типами ВПЧ [14].

Все вышеизложенное определяет актуальность планируемой работы, посвященной совершенствованию тактики ведения вакцинированных женщин с ВПЧ-ассоциированными заболеваниями шейки матки на основе определения частоты встречаемости других канцерогенных типов и групп ВПЧ участвующих в неопластической трансформации шейки матки, протеома ЦВЖ и молекулярно-генетических маркеров.

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 [8]. 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 разработкой алгоритма обследования с применением клинических, молекулярно-генетических и протеомных методов исследований.

Задачи исследования

1. Изучить клинико-anamнестическую 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) шейки матки у женщин, вакцинированных от ВПЧ.
4. Оценить различия в белковом составе ЦВЖ вакцинированных от ВПЧ женщин методом масс-спектрометрии. Проанализировать диагностическую ценность панели белков для определения групп риска развития патологии шейки матки.

5. Определить наличие дифференциально-экспрессированных генов мРНК у вакцинированных женщин.
6. Обосновать тактику ведения женщин, вакцинированных от ВПЧ, с патологией шейки матки на основании особенностей панели белков, разработанной методом масс-спектрометрии.

Научная новизна исследования

Впервые определена частота встречаемости 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.

После проведенной вакцинации наблюдалось статистически значимое снижение частоты других онкогенных типов ВПЧ по сравнению с группами HSIL и NILM. Подтверждена перекрестная защита от ВПЧ филогенетических групп А7 и А9.

Впервые изучен протеомный состав ЦВЖ у вакцинированных женщин и определены различия экспрессии 9 белков ЦВЖ, непосредственно участвующих в реализации иммунного ответа *APOB*, *FABP5*, *GRN*, *HP*, *MUC5AC*, *OLFM4*, *PKP1*, *QSOX1*, *S100A8*.

Впервые выявлено значение генов мРНК *MYBL2*, *SERPINB5*, *CCNB1*, определяющих противовирусную защиту вакцинированных женщин.

Практическая значимость

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

Определена 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 малоинвазивного 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*.

Положения, выносимые на защиту

1. В когорте российских женщин, ранее вакцинированных от ВПЧ, выявлена высокая частота встречаемости ВПЧ, 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 кольпоскопии с целью определения дальнейшей тактики ведения.
3. Белки цервикалоагинальной 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, дизайн исследования. Автор участвовал в клинико-лабораторном исследовании, ведении пациенток с ВПЧ-ассоциированными

заболеваниями, в качестве ассистента 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 Международного конгресса «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, протокол №29).

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 12 научных работ, из них 6 в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных высшей аттестационной комиссией (ВАК), 1 в англоязычном научном издании.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 130 странице 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 121 иностранный источников. Работа иллюстрирована 16 таблицами и 24 рисунками.

ГЛАВА 1

ПЕРСПЕКТИВЫ ПРОФИЛАКТИКИ РАКА, АССОЦИИРОВАННОГО С ВИРУСОМ ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА

1.1. ВПЧ: роль в развитии цервикальных интраэпителиальных неоплазий и рака шейки матки

Вирус папилломы человека (ВПЧ) является одной из самых распространенных вирусных инфекций, передаваемых половым путем. ВПЧ представляет собой обширную группу вирусов (более 100 типов или штаммов), часть которых обладает доказанной канцерогенной активностью. При персистенции в организме данных типов ВПЧ они способны вызывать различные заболевания, самыми опасными из которых являются злокачественные заболевания аногенитальной области: рак шейки матки (РШМ), вульвы, влагалища, ануса. ВПЧ классифицируется по способности штаммов вызывать неопластические процессы и по клиническим проявлениям. Так, помимо широко известной классификации ВПЧ на вирусы низкого (3, 6, 11, 13, 32, 34, 40, 41, 42, 43, 44, 51, 61, 72, 73), среднего (30, 35, 45, 52, 53, 56, 58) и высокого (16, 18, 31, 33, 39, 50, 59, 64, 68, 70) онкогенного риска, в мире в настоящее время применяется классификация Международного агентства по изучению рака (International Agency for Research on Cancer), выделяющая несколько групп: «канцерогенные» (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59), «вероятно, канцерогенные» (68) и «возможно, канцерогенные» (26, 30, 34, 53, 66, 67, 69, 70, 73, 82, 85, 97) [1]. Типы ВПЧ пронумерованы в порядке идентификации [15]. В мета-анализе Castellsague X. *и соавт.* [16], в который были включены более 155 тыс. женщин из 36 стран, выявили 8 самых распространенных типов ВПЧ: 16, 18, 31, 33, 35, 45, 52 и 58. При этом ВПЧ 16 типа являлся самым распространенным типом во всех странах (в США встречался в 3–4% нормальных цитологий, в Европе – в 2%), ВПЧ 18 типа занимает второе место (1% в США, 0,8% в Европе).

В настоящее время среди ряда исследователей [17–19] существует мнение, что для развития папилломавирусной инфекции (ПВИ) вирусу необходимо внедриться не

просто в базальный слой эпителия кожи или слизистой оболочки, а в плюрипотентную стволовую клетку. Как правило, ПВИ протекает годами, в то же время постоянно происходит обновление эпителия путем пролиферации стволовых и им подобных клеток в базальном слое. Они продуцируют клетки со способностью к делению и ограниченной пролиферацией, которые постепенно перемещаются к поверхности эпителия. Продолжительность данного процесса гораздо короче жизненного цикла ВПЧ [20]. Основываясь на этом, ученые пришли к выводу, что ВПЧ внедряется в базальные клетки со свойствами стволовых клеток или, в случае с ВПЧ высокого онкогенного риска, такие свойства прививаются другим клеткам, в которые он внедряется [17]. Данный вывод подтверждается экспериментальными исследованиями на животных [21], где было доказано, что ВПЧ CRPV (кроличий тип) в основном внедряется в волосяные фолликулы, где находятся эпителиальные стволовые клетки. Аналогичные исследования отсутствуют, поэтому данное мнение пока остается гипотезой, хоть и очень вероятной.

ВПЧ способен вызывать поражения эпителия слизистой генитального тракта, анального канала, верхних дыхательных путей и полости рта. При наличии микроскопических повреждений кожи и слизистой оболочки вирус проникает в клетки базального слоя эпителия. За прикрепление вируса к клеткам отвечает белок L1 («late» – «поздний» структурный белок вирусного капсида), а за освобождение ДНК и проникновение в ядро клетки – L2. Затем с помощью «ранних» белков E1 и E2 происходит репликация ДНК вируса синхронно с репликацией ДНК пораженной клетки с последующим встраиванием вирусной ДНК в ДНК клетки; при этом белки E6 и E7 не только подавляют клеточные белки-онкосупрессоры p53 и pRb, но и повреждают ядерный белок митотического аппарата NuMa [22]. Данные эффекты E6 и E7 приводят к нарушению митохондриального пути апоптоза и процесса дифференцировки и адгезии клеток, т.е. к дисрегуляции клеточного цикла и прогрессии процесса.

Развитие злокачественного процесса происходит из-за нарушения внутриклеточных механизмов, возникающих при неопластических процессах шейки

матки, что определяет возможность изучения ключевых этапов развития канцерогенеза. Так называемые “ранние” признаки предрака охватывают несколько биологических функций с дальнейшим прогрессированием процесса и приводят к нарушению дифференцировки и созревания клеток многослойного плоского эпителия шейки матки, молекулярно-генетическим, иммунологическим изменениям в виде подавления иммунного ответа, ингибиторов роста, апоптоза, индукции ангиогенеза, увеличения энергетического обмена. Полагают, что эти белки могут явиться маркерами диагностики предраковых состояний и их прогрессирования на ранних стадиях. Панели таких биомаркеров могут быть использованы в качестве информативных тестов для повышения точности диагностики патологических изменений шейки матки и определения критериев риска развития озлокачествления процесса.

В зависимости от того, какую часть эпителиального пласта составляют атипические клетки, выделяют следующие степени цервикальной интраэпителиальной неоплазии (CIN): CIN 1 – менее $\frac{1}{3}$ эпителиального пласта, CIN 2 – до $\frac{2}{3}$, CIN 3 – тотальное поражение эпителиального пласта, в котором уже не дифференцируются слои, отмечается большое количество клеток с увеличенными или разрушенными ядрами, выявляются низкодифференцированные клетки, но прорастание в нижележащие ткани отсутствует. Хотя заболевание часто протекает бессимптомно, CIN – потенциально чрезвычайно опасное заболевание, т.к. оно способно прогрессировать в РШМ [23].

Ежегодно в мире регистрируется более 600 тыс. случаев ВПЧ-ассоциированного рака, абсолютное большинство из которых – РШМ. В России РШМ занимает 2-е место по заболеваемости и 1-е место по смертности среди женщин до 45 лет [24]. При этом в течение 10 лет от 2006 г. встречаемость РШМ увеличилась с 17,3 до 25,1 на 100 тыс. человек [25], а в 35% случаев рак выявлялся только на III-IV стадиях.

Большое количество типов ВПЧ могут вызывать аногенитальные кондиломы, но до 90% всех случаев – 6 и 11 типами [26-27]. Аногенитальные кондиломы (аногенитальные бородавки, остроконечные кондиломы) – небольшие мягкотканые

образования на тонком основании в виде сосочков или узелков. Систематический обзор показал, что общая годовая заболеваемость аногенитальными кондиломам среди мужчин и женщин варьирует от 160 (Испания) [28] до 289 случаев (Великобритания) [29] на 100 тыс. человек, со средним значением 194,5 на 100 тыс. человек. По оценкам, средний ежегодный уровень заболеваемости аногенитальными кондиломами составил 137 случаев на 100 тыс. среди мужчин и 120,5 на 100 тыс. среди женщин [30].

Подтверждение этиологической роли ВПЧ в развитии РШМ способствовать тому, что тест на ВПЧ стал главным компонентом скрининга рака шейки матки. Однако наличие ВПЧ в организме пациентки не может рассматриваться как маркер прогрессирования или регресса патологического процесса.

Удобными для применения в клинической практике могут стать диагностические системы, основанные на определении биомаркеров в цервикалоагинальной жидкости (ЦВЖ). Панель белков ЦВЖ позволяет составить точную характеристику состояния органов женской репродуктивной системы, в том числе при неопластических процессах шейки матки.

При инфицировании мужчин в большинстве случаев клинические симптомы заболеваний, связанных с ПВИ (независимо от типа ВПЧ), отсутствуют: инфекция у мужчин, как правило, проходит транзиторно, не вызывая проблем со здоровьем. Однако низкоонкогенные типы ВПЧ также могут являться причиной аногенитальных кондилом, а высокоонкогенные типы ВПЧ могут вызывать рак полового члена, рак анального канала и рак горла [31]. Результаты статистических исследований Национального центра по контролю и профилактике заболеваний США (CDC) показали, что около 1% сексуально активных мужчин в США больны аногенитальными кондиломами [32]. По данным CDC 2015 г., ежегодно в США среди мужчин выявляются новые случаи ВПЧ-ассоциированного рака: полового члена – 800 случаев, анальный рак – 1100, рак горла – 5700 [32]. Клиническая картина при аногенитальных кондиломах у мужчин характеризуется наличием образований на пенисе, яичках, области паха, бедер, анальной области, которые могут появиться через

нескольких недель или месяцев после сексуального контакта с инфицированным человеком.

При отсутствии специфического лечения ВПЧ, единственным эффективным методом предотвращения РШМ и других опасных ВПЧ-ассоциированных заболеваний является профилактика инфицирования ВПЧ. В настоящее время в мире для этой цели зарегистрированы и активно применяются три вакцины от ВПЧ: двухвалентная, четырехвалентная и девятивалентная.

1.2. Первичная профилактика ВПЧ-ассоциированных заболеваний: оценка эффективности, побочных эффектов, вероятности перекрестной защиты

ВПЧ не размножается и не выращивается на искусственных средах – с чем связаны трудности его изучения. Настоящим прорывом в создании вакцины против ВПЧ стало открытие учеными Жианом Жоу, Яном Фрейзером и исследователями [33-34] рекомбинантной вирусоподобной частицы (Virus-like particles, VLP). Она была синтезирована искусственным путем и не содержит ДНК вируса. VLP были получены путем встраивания открытых рамок считывания L1 (кодирующей капсидный белок) ВПЧ 16 типа в векторную систему вируса оспы, что привело к крайне высокой экспрессии L1 в дрожжах. При электронной микроскопии VLP не отличается от вириона ВПЧ и не способна вызвать ПВИ, однако успешно стимулирует продукцию нейтрализующих антител, которые впоследствии связываются с капсидом ВПЧ при инфицировании. В нейтрализации вируса принимают участие только нейтрализующие антитела, продуцируемые плазматическими клетками В-лимфоцитами, продолжительность жизни которых ограничена. Поэтому чрезвычайно важным условием долговременной эффективности вакцины является стимуляция иммунной памяти. Благодаря иммунной памяти при контакте с антигеном в будущем запускается процесс новой выработки нейтрализующих антител. Контакт с антигеном приводит к созданию комплекса антиген–антитело, которое легко распознается цитотоксическими клетками организма (макрофагами и т.п.), пораженная клетка разрушается, лизируется

и выводится из организма вместе с генным материалом ВПЧ. После очистки в вакцину вводятся специальные вещества адъюванты, которые значительно усиливают иммунный ответ. Следует еще раз отметить, что вакцины разрабатывались и были зарегистрированы для предотвращения заражения ВПЧ, а не для лечения.

Четырехвалентная вакцина содержит не инфекционные (т.е. вакцина не содержит вирусные ДНК и живые биологические продукты) белковые антигены (вирусоподобные антигены) ВПЧ 6, 11, 16 и 18 типов: ВПЧ 16 и 18 вызывают более 70% случаев РШМ, низкоонкогенные 6 и 11 – до 90% случаев аногенитальных кондилом. К 2018 г. четырехвалентная вакцина включена в календарь иммунизации 91 страны. В соответствии с рекомендациями производителя [35] четырехвалентная вакцина показана невакцинированным женщинам и мужчинам в возрасте 9–26 лет. Впервые вакцина зарегистрирована в США в 2006 г. В России она зарегистрирована и применяется с 2009 г. Вакцина вводится внутримышечно в область дельтовидной мышцы по схеме 0-2-6 месяцев. Девочкам и мальчикам в возрасте 9–13 лет вакцина вводится по схеме 0-6 месяцев, но, если вторая доза вводится ранее, чем через 6 месяцев после первой, необходимо введение третьей дозы. По данным ВОЗ [36], обе вакцины от ВПЧ могут вводиться одновременно с другими вакцинами при использовании отдельных шприцев и разных мест для инъекций.

Девятивалентная вакцина охватывает также 31, 33, 45, 52 и 58 типы. Вакцина была одобрена Управлением по контролю за продуктами питания и лекарственными средствами США (FDA) в 2014 г. В октябре 2018 г. FDA одобрила применение вакцины женщинам и мужчинам в возрасте 27–45 лет [37]. Эффективность вакцины в предотвращении аногенитальных кондилом, предраковых поражений шейки матки, вульвы и влагалища в данной возрастной группе составила 88% [37]. В настоящее время вакцина Гардасил-9 в России не зарегистрирована.

Двухвалентная вакцина содержит антигены ВПЧ 16 и 18 типов. Впервые зарегистрирована в 2007 г. в Австралии, в настоящее время вакцина зарегистрирована и применяется в 97 странах, включая Россию с 2008 г. Вакцина вводится внутримышечно в область дельтовидной мышцы по схеме 0-1-6 месяцев.

Двухвалентная вакцина основана на новом адъюванте AS04 (500 мкг гидроксида алюминия, 50 мкг монофосфорил липида А MPL). Считается, что использование нового адъюванта в бивалентной вакцине обеспечит более высокую иммуногенность, по сравнению с вакцинами, содержащими гидроксид алюминия.

Противопоказанием к четырех- и девятивалентным вакцинам является гиперчувствительность к дрожжеподобным грибам. Двухвалентная вакцина противопоказана людям с анафилактической реакцией на латексный компонент [38]. При легких формах респираторных, кишечных и других инфекций прививки целесообразно проводить после нормализации температуры [39-41].

Все три вакцины с использованием рекомбинантной технологии получены из очищенных капсидных белков L1, которые путем самосборки образуют ВПЧ типоспецифические пустые оболочки или вирусоподобные частицы. В настоящее время ведется разработка вакцины на основе очищенного капсидного белка L2 [42]. Новое поколение вакцин нацелено на консервативные эпитопы, присутствующие на минорном белке L2. В отличие от вакцин, основанных на белке L1, она, вероятно, предоставит перекрестный иммунитет от других типов ВПЧ.

Основной путь передачи ВПЧ – половой, поэтому максимальная эффективность вакцинации от ВПЧ достигается при вовлечении в программу детей и подростков до полового дебюта. Как правило, первичной целевой группой являются дети и подростки в возрасте 9–14 лет [43]. В исследованиях международного агентства по изучению рака отмечается крайне высокая (>90%) эффективность вакцин (двухвалентной и четырехвалентной) в предотвращении CIN 2 + у женщин в возрасте 15-26 лет [44]. «Золотым стандартом» оценки эффективности профилактики и лечения являются рандомизированные контролируемые исследования. Как краткосрочную, так и долгосрочную эффективность четырехвалентной вакцины оценили в рандомизированных, контролируемых, двойных-слепых, многоцентровых исследованиях FUTURE I, II, III (The Females United to Unilaterally Reduce Endo/Ectocervical Disease) [14, 45, 46].

В исследовании FUTURE II [14, 45] приняли участие 12 167 женщин в возрасте 16–24 лет: в группу вакцинации были включены 6087 женщин, в группу плацебо – 6080. Оценивалось количество случаев CIN 2/3, аденокарциномы шейки матки *in situ* (AIS), РШМ, ассоциированных с ВПЧ 16, 18 типов в течение 3 лет после проведения вакцинации. Эффективность вакцины составила 95% [45]. В группе вакцинации CIN 2/3 возник у 3 пациенток (у одной пациентки - CIN 2 (<0,1%), у 2 пациенток - CIN 3 (<0,1%), AIS в группе вакцинации не был диагностирован); в группе плацебо – у 62 (CIN 2 – у 40 (0,2%), CIN 3 – у 43 (0,3%), AIS – у 4 пациенток (<0,1)) [47]. Исследователи отмечают, что данные результаты применимы только к женщинам, ранее не инфицированным ВПЧ 16 и 18 типов.

В исследовании FUTURE I приняли участие 5455 женщин в возрасте 16–24 лет: группа вакцинированных – 2723 женщины, группа плацебо – 2732. Оценивалась заболеваемость аногенитальными кондиломами, интраэпителиальной неоплазией вульвы (VIN), интраэпителиальной неоплазией влагалища (VaIN) и раком влагалища, CIN 1–3, AIS и РШМ, ассоциированными с ВПЧ в течение 4 лет. В группе вакцинации все пациентки были ВПЧ-негативны на момент включения в исследование. Анализ результатов исследования показал, что в данной группе отсутствовали случаи аногенитальных кондилом, VIN 2-3, VaIN 2-3, CIN 2-3, AIS и РШМ. Эффективность вакцины в предотвращении VIN, VaIN и рака влагалища, CIN 2/3, AIS и РШМ, ассоциированного с ВПЧ, составила 100% в течение 4 лет [46].

Е. Jorga *и соавт.* [37] в рандомизированном, плацебо-контролируемом исследовании, в котором приняло участие более 18 тыс. женщин в возрасте 16–26 лет, доказали 100% (95% CI 72-100) эффективность четырехвалентной вакцины в предотвращении VIN 2/3 и VaIN 2/3, ассоциированных с ВПЧ 16 и 18 типов. Эффективность в предотвращении VIN и VaIN, ассоциированных и не ассоциированных с ВПЧ, составила 49%. Исследование продолжалось в течение 4 лет.

В рандомизированном, плацебо-контролируемом исследовании, проведенном Lehtinen M. *и соавт.* [48], приняло участие 4808 человек: из них 2473 женщины были включены в группу вакцинации и 2399 – в группу плацебо. В течение 10 лет в группе

вакцинированных было выявлено 4 случая CIN 3 (все четыре пациентки были ВПЧ-положительны на момент вступления в исследование), в группе плацебо – 80 случаев CIN 3. Все случаи CIN 3 были определены в период от 4,5 до 10 лет с момента вакцинации. Общая эффективность четырехвалентной вакцины в предотвращении CIN 3 в течение 10 лет составила 66%. Несмотря на полученные высокие цифры эффективности, необходимо помнить, что вакцинация от ВПЧ не предотвращает проявлений ВПЧ при наличии у пациентки ВПЧ до вакцинации.

В рандомизированном плацебо-контролируемом двойном-слепом исследовании FUTURE II было отмечено небольшое количество побочных эффектов [14, 45]. Самым частым из них была боль в месте инъекции: 84,4% пациенток в группе вакцинации и 77,9% пациенток в группе плацебо предъявили жалобы – разница рисков 6,5 (95% ДИ). Жалобы на общую усталость, повышенную утомляемость (системный эффект) предъявили 61,4% в группе вакцинации и 60% в группе плацебо – разница рисков составила 1,4 (95% ДИ). Тяжелые побочные эффекты вакцинации (гастроэнтерит, головная боль, повышение артериального давления, уменьшение объема движения в суставе) выявлены у 3 пациенток (<0,1%) в группе вакцинации и у 2 пациенток (<0,1) в группе плацебо – разница рисков 0 (95% ДИ).

Беременность во время проведения исследований FUTURE I и II наступила у 1598 пациенток в группе вакцинации и у 1627 – в группе плацебо [45]. Беременность закончилась рождением живого ребенка у 66% в группе вакцинации и у 63,4% – в группе плацебо. Роды естественным путем произошли в 74,2% в группе вакцинации и в 74,9% - в группе плацебо. Среди рожденных детей пороки развития выявлены у 20 детей в группе вакцинации и 22 – в группе плацебо (разница рисков -1.0 (95% ДИ) [45]. Процентное соотношение женщин, чьи беременности закончились рождением живых детей, самопроизвольных аборт и внутриутробной смерти на поздних сроках беременности, были практически идентичны в группах вакцинированных и плацебо [45]. Это еще раз подчеркивает, что на фоне вакцинации фертильность женщины не снижается.

1.3. Анализ результатов Национальных программ профилактики ВПЧ-ассоциированных заболеваний

В настоящее время во многих странах наблюдается четкая позиция по профилактике заболеваний, а не лечения последствий; так, 98 страна включили вакцину от ВПЧ в Национальную программу вакцинации, при этом в 39 странах применяется гендерно-нейтральная программа (вакцинация как девочек, так и мальчиков) [49-57].

В 2007 г. Австралия стала одной из первых стран, включившей четырехвалентную вакцину против ВПЧ в Национальную программу иммунизации; в 2013 г. программа стала гендерно-нейтральной [5]. С 2007 по 2014 гг. частота РШМ уменьшилась с 18 до 7,4 случаев на 100 тыс. человек. Распространенность ВПЧ снизилась с 28,7 до 2,3% (в сравнении с невакцинированными людьми) [5]. Встречаемость CIN 2+ среди пациенток в возрасте моложе 20 лет уменьшилась более чем в 2 раза [5]. В 2012 г. было зафиксировано более чем 90% снижение заболеваемости аногенитальными кондиломами среди вакцинированных девушек. К 2015 г. обращение в клиники и больницы по поводу аногенитальных кондилом снизилось на 89% среди молодых людей в возрасте 12–17 лет и на 72,7% – в возрасте 18–26 лет. Среди вакцинированных мужчин обращаемость к врачу по поводу аногенитальных кондилом снизилась в группе 18–26 лет на 38%, в группе 27–30 лет – на 21%. Встречаемость рецидивирующего респираторного папилломатоза снизилась с 0,16 до 0,02 на 100 тыс. человек [5]. В январе 2018 г. в Австралии применяется только девятивалентная вакцина против ВПЧ. Patel С. и соавт. считают, что, в сравнении с четырехвалентной вакциной, переход Национальной программы на девятивалентную вакцину позволит предотвратить практически все случаи ВПЧ-ассоциированного анального рака (95%) и аногенитальных кондилом (до 100%), дополнительно снизить распространенность рака влагалища на 18%, рака вульвы – на 14%, рака пениса – на 9% и РШМ – на 15% [58]. Максимальная эффективность вакцинации достигается при охвате первичной целевой группы более 70%.

Для расчета эффективности внедрения школьной программы вакцинации у мальчиков в Австралии в 2013 г. использовалась динамическая популяционная компарментная модель. Основываясь на данных о том, что начатая в 2007 г. школьная программа вакцинации девушек 12–13 лет уже привела к снижению встречаемости аногенитальных кондилом, модель прогнозирует почти полное искоренение (снижение инцидентности $>90\%$) аногенитальных кондилом к 2030 г. В случае, если программа вакцинации среди мужской популяции не была бы внедрена, к 2050 г. ожидалось бы 85% снижение встречаемости среди девушек и 75% – среди гетеросексуальных юношей [59].

В настоящее время все провинции и территории Канады проводят вакцинацию школьников обоих полов, однако возраст вступления в программу зависит от территории. Школьная программа вакцинации началась в Канаде в 2007 г. [22], и в течение 10 лет в Канаде проводилось несколько Государственных программ вакцинации от ВПЧ с различным охватом целевой группы: от 39,3 до 93,0%. М. Steben и соавт. приводят данные о 10-летней эффективности четырехвалентной вакцины в Канаде. Среди вакцинированных людей значительно снизилась распространенность ВПЧ 6, 11, 16 и 18 типов – 1,5% в сравнении с 11,0% у невакцинированных. Частота выявляемости аногенитальных кондилом снизилась на 45%, по сравнению с невакцинированными. В течение 10 лет частота выявляемости CIN 2+ значительно снизилась – на 86% [22].

В России Региональная программа вакцинации девочек-подростков от ВПЧ началась в 2009 г. Были проведены две региональные программы: в 2008–2009 гг. и в 2014 г. (вакцинировано 4936 человек). Анализ заболеваемости ВПЧ-ассоциированными заболеваниями в Ханты-Мансийском автономном округе показал снижение частоты выявляемости аногенитальных кондилом у девочек-подростков в 2013-2014 гг. как по результатам профилактических осмотров, так и по обращаемости в кабинеты детских гинекологов [60].

С 2007 г. в Московской области так же, как и в 27 регионах Российской Федерации, проводится программа «Вакцинопрофилактика онкологических

заболеваний, вызываемых ВПЧ». На протяжении 9 лет в Московской области накоплен наибольший опыт в России по применению вакцины против ВПЧ, привиты более 19 тыс. девочек-подростков в возрасте 12-17 лет и женщин моложе 45 лет. Из всех привитых 78% девочек вакцинированы четырехвалентной вакциной, а 22% – двухвалентной. На основании анализа статистических отчетов сделан вывод о снижении заболеваемости девочек аногенитальными кондиломами в 2015 г. по сравнению с 2009 г. – с 14,2 до 6,1 на 100 тыс. в возрасте от 0 до 17 лет в результате проведенной вакцинации [61].

1.4. Дальнейшие перспективы вакцинации: терапия неопластической трансформации эпителия шейки матки

Профилактические вакцины – эффективный метод профилактики ВПЧ и ВПЧ-ассоциированных заболеваний, однако для инфицированных ВПЧ женщин требуется метод лечения, предотвращающий трансформацию клеток шейки матки в плоскоклеточные интраэпителиальные поражения тяжелой степени (HSIL) и РШМ. GTL001 – бивалентная (ВПЧ 16/18) терапевтическая вакцина, разработанная для профилактики развития РШМ у женщин, инфицированных ВПЧ 16 или 18 типов с нормальной цитологической картиной или поражениями легкой степени. Данная вакцина, на основе вирусного вектора аденилатциклазы *Bordetella pertussis*, доставляет вирусные антигены CD11b к антиген–презентирующим клеткам и индуцирует антиген–специфический CD4 и CD8 Т-клеточный ответ. На первой стадии клинического исследования применялись две формы вакцины: раствор и порошок – в обоих случаях в качестве адьюванта применялся крем имиквимод. Обе формы безопасны и индуцировали E7–специфический CD8 Т–клеточный ответ. В исследовании на мышах после второй прививки GTL001 (28 дней после первой) определялось значительное уменьшение размера опухоли, продуцирующей E7 ВПЧ 16 типа, и полное исчезновение опухоли к 60 дню исследования у 100% вакцинированных мышей [40]. В то время как в группах плацебо и плацебо+имиквимод наблюдался рост

опухоли. В настоящее время порошковая форма проходит вторую стадию клинического испытания (NCT01957878) [62].

Таким образом, одним из главных достижений в течение последних десятилетий в области профилактики РШМ стало изобретение и внедрение в клиническую практику вакцинации против ВПЧ. Однако, несмотря на высокую эффективность в предотвращении вакцинальных типов ВПЧ, она не предохраняет от других канцерогенных типов. В этой связи может быть актуальным определение широкого спектра типов ВПЧ (не входящих в состав вакцины), разработка диагностической панели белков ранней диагностики HSIL [41] у вакцинированных от ВПЧ женщин путем изучения протеомного состава цервикагинальной жидкости методом масс-спектрометрии и определения экспрессии мРНК функциональных генов человека.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материал исследования

Исследование проводилось на базе научно-поликлинического отделения, отдела системной биологии в репродукции человека, лаборатории молекулярно-генетических методов и лаборатории патоморфологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

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, EHO1, 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).

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

Был проведен анализ результатов обследования пациенток, обратившихся в Научно-поликлиническое отделение НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова в 2017–2020 гг. В исследовании приняло участие 141 пациентки, которые были разделены на 3 основные группы: группа 1 – вакцинированные пациентки, получившие все 3 дозы четырехвалентной вакцины (n=62), разделен на 2 подгруппы: 1a – вакцинированные до начала половой жизни (n=26) и 1b – вакцинированные после начала половой жизни (n=36); группа 2 – HSIL (n=42), включающая пациенток с цитологическим диагнозом

HSIL и группа 3 (контрольная группа, n=37), в которую были включены пациентки с цитологическим диагнозом NILM. Исследование было одобрено Комиссией по этике биомедицинских исследований Центра.

Критерии включения в группу 1, подгруппу 1a:

репродуктивный возраст (от 18 до 45 лет)

регулярный менструальный цикл

вакцинация от ВПЧ четырехвалентной (ВПЧ 6, 11, 16, 18) вакциной (Гардасил) до начала половой жизни – 3 дозы в течение 1 года (стандартная или «ускоренная» схема вакцинации), время от последней дозы вакцины: минимум 3 года с момента последней дозы вакцины.

Критерии включения в группу 1, подгруппу 1b:

репродуктивный возраст (от 18 до 45 лет)

регулярный менструальный цикл

вакцинация от ВПЧ четырехвалентной (ВПЧ 6, 11, 16, 18) вакциной (Гардасил) до начала половой жизни – 3 дозы в течение 1 года (стандартная или «ускоренная» схема вакцинации), время от последней дозы вакцины: минимум 3 года с момента последней дозы вакцины.

Критерии включения в группу 2:

репродуктивный возраст (18–45 лет)

регулярный менструальный цикл

цитологический диагноз HSIL (CIN 2+).

Критерии включения в группу 3:

репродуктивный возраст (18–45 лет)

регулярный менструальный цикл

цитологический диагноз NILM.

Критериями исключения для всех групп:

воспалительные заболеваниями специфической и неспецифической этиологии в стадии обострения

нарушение функции печени, легких, почек в стадии декомпенсации

психоневрологические заболевания

период лактации

беременность.

Также был проведен ретроспективный анализ частоты встречаемости вакцинированных женщин в общей структуре 702 женщин репродуктивного возраста, обратившихся по поводу обследования состояния шейки, из которых 64 были вакцинированы (9,11%), 638 невакцинированных (90,8%), «малые» поражения шейки матки были определены у 444 пациентки (63,2%), 258 – без признаков патологии (ВПЧ-отрицательные пациентки, цитологический диагноз NILM)

2.2. Методы исследования

Обязательными методами исследования явились:

1. Клиническое исследование: анамнез, общий осмотр и данные гинекологического исследования.
2. Цитологический метод исследования шейки матки: цитологическое исследование проводилось для включения пациенток в группы контроля (NILM, HSIL) и для оценки эпителия шейки матки у вакцинированных пациенток группы 1.
3. Морфологические методы исследования: при выявлении кольпоскопических изменений эпителия шейки матки проводилась биопсия шейки матки с последующим гистологическим исследованием биопсийного материала.
4. Молекулярно-генетические методы: всем пациенткам (группы 1-3) проводилось ВПЧ-генотипирование широкого спектра (21 тип).
5. Кольпоскопия проводилась всем пациенткам, участвующим в исследовании.

Специальными методами исследования явились:

1. Анализ протеомного состава цервикагинальной жидкости методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (HPLC-nESI-MS/MS).
2. Молекулярно-генетические методы: изучение экспрессии 12 мРНК функциональных генов человека MKI67, PGR, CDKN2A, MYBL2, UBE2T, EXO1, SERPINB5, CCNB1, ESR1, BAG1, BCL2 и ANLN.

Клинический осмотр

В клиническое исследование включалось сбор анамнеза, проведение общего осмотра и сбор данных гинекологического исследования. При сборе анамнеза особое внимание уделялось сведениям о соматическом анамнезе, методе применяемой контрацепции, возрасте полового дебюта и числе половых партнеров.

Общий («объективный») осмотр включал в себя расчет индекса массы тела по формуле *Brey*, оценка состояния молочных желез, желудочно-кишечного тракта, органов дыхания, сердечно-сосудистой системы, включая артериальное давление, пульс, оценку вен нижних конечностей.

Гинекологическое исследование состояло из оценки степени и характера оволосения, состояние слизистой оболочки влагалища, наличие и характер выделений, форма шейки матки и состояние ее эпителия.

При бимануальном влагалищном исследовании была проведена оценка величины и положения тела матки, наличие спаечного процесса в малом тазу.

Цитологическое исследование шейки матки

В момент вступления в исследования всем пациенткам проводилось цитологическое исследование.

Материал для цитологического исследования (жидкостная цитология) собирался с помощью специальной цервикальной щетки с экто- и эндоцервикальным компонентом *Cervex-Brush*. Центральная часть щетки вводилась в цервикальный канал, боковые щетинки распределялись на влагалищной части шейки матки. Для сбора материала производились 5 оборотов щетки по часовой стрелке. После сбора материала съемная часть щетки помещалась в стабилизирующий раствор. Результаты цитологического исследования оценивались в соответствии с классификацией Бетесда (*Bethesda*) (табл. 1).

Таблица 1 – Классификация Бетесда (Terminology Bethesda System)

Атипичные железистые клетки	AGC
Атипичные железистые клетки, похожие на неопластичные	AGC, favor neoplastic
Атипичные клетки плоского эпителия	ASC
Атипичные клетки плоского эпителия неясного значения	ASC-US
Атипичные клетки плоского эпителия, не позволяющие исключить HSIL	ASC-H
Цервикальная интраэпителиальная неоплазия 1, 2 или 3 степени	CIN 1, 2, 3
Карцинома in situ	CIS
Высокая степень плоскоклеточного интраэпителиального поражения	HSIL
Низкая степень плоскоклеточного интраэпителиального поражения	LSIL
Не определенные иначе	NOS
Плоскоклеточное интраэпителиальное поражение	SIL

Цитологическая классификация Бетесда основывается на термине SIL: плоскоклеточные интраэпителиальные поражения (Squamous Intraepithelial Lesion). Клинически значимы 3 типа заключений:

NILM: без цитологических патологических изменений;

HSIL и LSIL: плоскоклеточные интраэпителиальные поражения умеренной и тяжелой степени (high grade SIL – HSIL) и легкой степени (low grade SIL – LSIL);

ASCUS: клетки плоского эпителия неясного значения (Atypical squamous cells of undertermined significance).

Молекулярно-биологические методы исследования

Всем пациенткам, включенным в исследование, проводилось 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 методом ПЦР с детекцией результатов в режиме «real time», разработанным «ДНК-технология», Россия.

Центральная часть щетки вводилась в цервикальный канал, боковые щетинки распределялись на влагалищной части шейки матки. Для сбора материала производились 5 оборотов щетки по часовой стрелке. После сбора материала съемная часть щетки помещалась в стабилизирующий раствор.

Взятие биологического материала производилось путем взятия клеток из зоны переходного эпителия щеткой с помощью специальной цервикальной щетки с экто- и эндоцервикальным компонентом Cervex-Brush, которую помещали в пробирку, объемом 1,5мл с 0,9% раствором натрия хлорида и вращали в ней в течение 10-15 секунд. Затем пробирка доставлялась в лабораторию. В лаборатории производилось центрифугирование 13 тыс. оборотов в мин. в течение 10 мин. Осадок замораживался при температуре -70 °С.

Наборы компании «ДНК-технологии» «Проба ГС» применялись для выделения ДНК с помощью хаотропного агента для лизирования клеток. Затем проводилась сорбция нуклеиновых кислот на твердом носителе и элюция ДНК с сорбента.

Аmplификация осуществлялась в режиме «real time» на приборе «ДТ-964» («ДНК-Технология», Россия). На каждом цикле амплификации определялся уровень флуоресценции. Полученные результаты обрабатывались автоматически при помощи используемого ПО (программного обеспечения).

Определение экспрессии мРНК генов

С помощью ПЦР в режиме real time проводилась оценка уровней экспрессии мРНК генов человека MKI67, PGR, CDKN2A, MYBL2, UBE2T, EXO1, SERPINB5, CCNB1, ESR1, BAG1, BCL2 и ANLN в материале переходного эпителия шейки матки. Биоматериал собирался из области переходного эпителия с помощью цервикальной щеточки, после чего щеточка помещалась в эппендорф с раствором гуанидина

тиоцианата. Щеточка вращалась в пробирке в течение 15 секунд, после чего пробирку маркировали. Пробирки доставлялись в лабораторию по сбору и хранению биоматериалов ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова», где они хранились при -70°C в течение 1 года.

Медиана (Me) использовалась в качестве меры центральной тенденции количественных показателей; для интервальной оценки применялись нижний (первый) Q1 (0,25) и верхний (третий) Q3 (0,75) квартили.

Для оценки достоверности межгрупповых различий количественных показателей применялся критерий Манна-Уитни, для качественных – критерий с поправкой Йетса.

Кольпоскопия

Кольпоскопическое исследование – метод визуализации патологии эпителия шейки матки, его характера и определения локализации участка проведения прицельной биопсии шейки матки. Проводилось кольпоскопическое исследование не только эпителия шейки матки, но и слизистой оболочки влагалища и под увеличением в 7-30 раз.

Кольпоскопия проводилась с помощью кольпоскопа «Leisegang» (Германия), с 7-ми, 15-ти и 30-ти кратным увеличением. Кольпоскопия проводилась всем пациенткам, участвующим в исследовании. Для обследования эпителий шейки матки орошалась 3% раствором уксусной кислоты, затем – 0,5% раствором Люголя (проба Шиллера). При выявлении патологических участков во время кольпоскопии отмечались места для дальнейшего взятия соскобов или прицельной биопсии с последующим морфологическим исследованием.

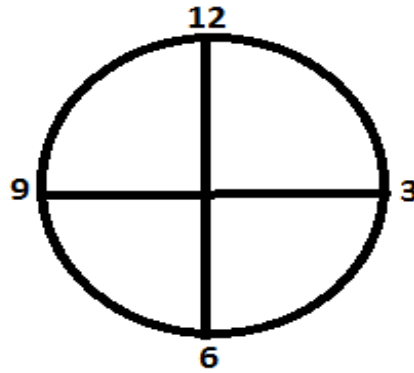


Рисунок 1. Схематическая локализация поражения «по часам».

Для описания патологических участков эпителия шейки матки использовался схематический метод «по часам» для уменьшения ошибки при передаче данных (рис. 1).

Для интерпретации кольпоскопической картины оценивали следующие параметры:

1. цвет
2. состояние сосудистого рисунка
3. поверхность и уровень многослойного плоского эпителия
4. стык эпителиев (характер и локализация)
5. наличие и форма желез
6. реакция на 3% раствор уксусной кислоты
7. реакция на раствор Люголя
8. границы образований
9. тип эпителия

При оценке кольпоскопической картины использовали единую международную классификацию кольпоскопических терминов IFCPC, предложенную в 2011 г. и дополненную в 2017 г. (табл. 2).

Одним из наиболее важных информативных критериев кольпоскопического исследования является визуализация зоны стыка двух эпителиев шейки матки – «зоны трансформации». На основании оценки зоны трансформации кольпоскопическая картина оценивается как удовлетворительная или неудовлетворительная.

Ряд признаков, характерных для интраэпителиальных неоплазий, составляют аномальную кольпоскопическую картину, наиболее важным из которых является выявление ацетобелого эпителия.

При этом определение пунктации и мозаики является признаком наличия атипических сосудов эпителия шейки матки. У всех пациенток проводилась документация кольпоскопической картины схематически в соответствии с условным циферблатом, представленном выше (рис. 1).

Важным фактом является то, что кольпоскопия позволяет оценить степень тяжести поражения эпителия шейки матки, т.к. данное исследование позволяет выделить «слабо выраженные» и «выраженные» изменения эпителия, тем самым давая четкое заключение о его патологии.

Таблица 2 – Международная классификация кольпоскопической терминологии IFCPC, 2011 (дополненная 2017 г.)

Общие сведения	Удовлетворительная / неудовлетворительная кольпоскопия (из-за воспаления, кровотечения, рубцовая деформация и тд); В новой классификации: полностью видимая, полностью не видимая; Стык между многослойным плоским и цилиндрическим эпителиями визуализируется – полностью, частично, не визуализируется; В новой классификации: полностью видимые, полностью не видимые; Тип зоны трансформации 1,2		
Нормальная кольпоскопическая картина	Оригинальный многослойный плоский эпителий : зрелый, атрофичный; Цилиндрический эпителий: Эктопия; Метаплазированный эпителий: - Наботовы кисты, открытые устья желез; Децидуоз при беременности;		
	Общие сведения	Локализация повреждения: внутри или вне ЗТ, Расположение повреждения по часам; Размер повреждения, по числу занимаемых квадрантов шейки матки , Размер повреждения в % соотношении	
Не нормальная КС картина	Слабовыраженные изменения	Тонкий ацетобелый эпителий, нечеткая граница	Нежная пунктация; Нежная мозаика
	Выраженные изменения	Плотный ацетобелый эпителий. Быстрое проявление ацетобелости; Измененное устье открытой железы	Грубая мозаика; Грубая пунктация; Граница поражения четкая, внутренняя бровка; Симптом “горного хребта”
	Неспецифические изменения	Лейкоплакия (кератоз, гиперкератоз), Эрозия; Проба Шиллера: йоднегатив, йодпозитив	
Подозрение на инвазию	Атипичные сосуды. Дополнительные признаки: хрупкие сосуды. Неоднородная поверхность, экзофит , некроз, некротическая язва, опухоль		
Разное	Врожденная ЗТ, Кондилома, Полип экзоцервикса/эндоцервикса; Воспаление		Стеноз, врожденные аномалии, последствия лечения, эндометриоз

Морфологические методы исследования

При выявлении изменений эпителия шейки матки во время кольпоскопического исследования, цитологического исследования, положительного результата при ВПЧ-генотипировании проводилась прицельная биопсия шейки матки с последующим гистологическим исследованием биопсийного материала. Противопоказаниями к проведению биопсии явились острые воспалительные заболевания органов малого таза и изменения в системе гемостаза.

До проведения прицельной биопсии шейки матки проводилось полное клинико-лабораторное исследование в соответствии со стандартами гинекологической практики. Пациентки подписывали согласие на проведение процедуры в письменном виде.

Прицельная биопсия проводилась амбулаторно под местным обезболиванием (10% лидокаин-спрей). Прицельную биопсию шейки матки производили радиоволновым методом (петлевым электродом). Участок – или участки, при множестве патологических участков – для проведения биопсии выбирался при проведении кольпоскопического исследования шейки матки.

Размер биоптата должен был быть около 5 мм, помимо плоского эпителия захватывали около 3–5 мм стромы. Зона проведения биопсии была документирована. В лаборатории для проведения гистологического исследования, материал фиксировали при помощи парафина, после чего получали срезы из парафинового блока и помещали на стекла. Затем стекла окрашивали для исследования под микроскопом.

Протеомный анализ

Забор ЦВЖ осуществлялся путем орошения влагалища и шейки матки 0,9% раствором натрия хлорида. Жидкость центрифугировалась при 2000 g в течение 10 мин при 4°C, супернатант замораживали и хранили до анализа при -80 о С. После быстрого размораживания к образцу добавляли восстанавливающий буфер (0.2 М Tris-HCl, pH

8.5, 2.5 mM EDTA, 8 M мочевины), затем восстанавливали цистеины в белках дитиотреитолом (0.1 M, 45 минут при +39 °C) и алкилировали свободные –SH цистеинов йодацетамидом (0.05 M, 45 минут, +20 °C, в темноте). Белки осаждали добавлением 5 объемов ледяного ацетона с 0,1% ТФУ, с последующим растворением осадка в 200mM АВВ до концентрации 0,1 мг/мл (определенной по методу Брэдфорда), гидролизовали трипсином в течение 16 часов при 37 °C (белок/фермент – 50:1).

Поиск, идентификация белков и полуколичественный анализ проводился по базе данных UniProt Knowledgebase (UniProtKB, версия 16.05.2014) в программе MaxQuant software, version 1.1.1.2. Для MS/MS поиска в него включалось до 8 главных пиков в 100 Da окне. Идентификация сформированных списков проводилась по прямой и обратной версии базы данных SwissProt, с максимальным допустимым отклонением от массы предшественника 6 ppm, Карбамидометилированием цистеинов в качестве фиксированной модификации а ацитилированием N-конца белков и окислением метионинов - как вариабельных модификаций. Пептиды идентифицировались минимум по 7 аминокислотам с установленным значением исключения при ложном поиске равным 0,01. В работе использовались только те белки, которые идентифицировались минимум по 2 пептидным фрагментам, причем один из них должен быть уникальным. Для полуколичественного анализа использовался метод «без метки» с дополнительной опцией «match between the runs». Статистический анализ полученных данных проводился с помощью программного пакета Perseus.

Для изучения особенностей изменения состава и уровня экспрессии белков ЦВЖ применяли протеомные методы исследования всем 141 пациенткам. Из ЦВЖ выделяли белки, затем проводился трипсинолиз белков с последующим анализом пептидов методом жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрии. По полученным спектрам произвели идентификацию белков с использованием баз данных белков человека (Swiss Prot)

Тандемная хромато-масс-спектрометрия (ВЭЖХ-МС/МС)

Полученная пептидная смесь разделялась на высокоэффективном жидкостном хроматографе (Agilent 1100, USA) в трех повторах: 120 минутный градиент (H₂O/ACN: 0-15 мин с 3% ACN, 15-110 мин с 90% ACN, 115-120 мин с 3% ACN), скорость потока 300 нл/мин, набивная колонка с C18 сорбентом (диаметр частиц 3 мкм, диаметр пор 100 Å). Масс-спектрометрический анализ проводился на приборе 7-Tesla LTQ-FT Ultra mass spectrometer (Thermo Electron, Bremen, Germany) с электроспрейным источником ионов в DDA моде.

Биоинформационный анализ данных

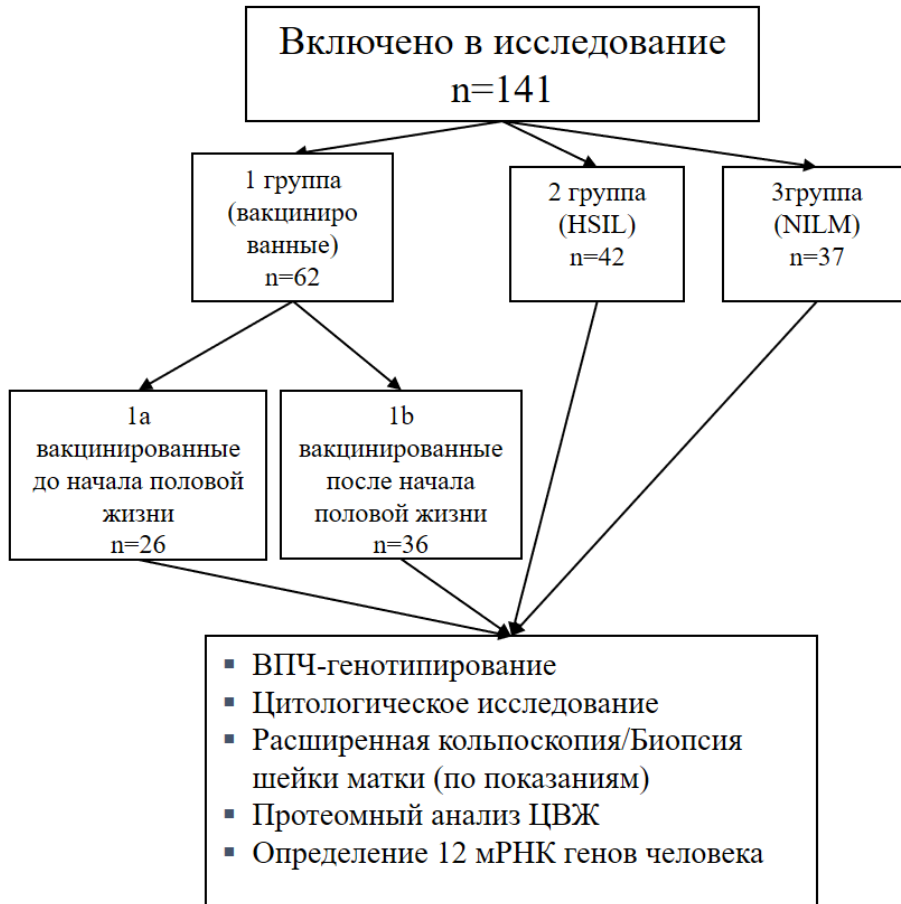
Полученные данные обрабатывались с помощью биоинформационного пакета MaxQuant (версия 1.5) . Идентификация сформированных списков проводилась по прямой и обратной версии базы данных SwissProt. Пептиды идентифицировались минимум по 7 аминокислотам, значение исключения при ложном поиске было 0,01. В работе использовались только те белки, которые идентифицировались минимум по 2 пептидным фрагментам, причем один из них должен быть уникальным.

Полуколичественный анализ без меток проводился в программе Perseus. Для статистического анализа использовался Т-тест Крамера-Уэлча с поправкой Бенжаминни-Ходберг на множественные сравнения. Анализ сверхпредставленности биологических процессов по базе GeneOntology (GO) осуществлялся с помощью биоинформационного ресурса STRING.

2.3. Методы статистической обработки

Дизайн исследования

2.3.1. Проспективное исследование



2.3.2. Ретроспективное исследование

ВПЧ-позитивные женщины
n=644



Оценить ретроспективно:

- Встречаемость вакцинированных пациенток среди ВПЧ положительных пациенток
- Встречаемость вакцинированных пациенток среди ВПЧ отрицательных пациенток
- Частоту встречаемости вакцинированных пациенток (по обращаемости в НПО)

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Результаты ретроспективного исследования

Согласно первой задаче, было ретроспективно проанализировано результаты ВПЧ-тестирования 644 женщины, обратившихся в течение 2018 года в НПО Центра по поводу профилактического осмотра. По результатам ВПЧ-тестирования пациентки были разделены на 2 группы: ВПЧ положительные (427) и ВПЧ отрицательные (217), в группе ВПЧ положительных женщин 14 (3,3%) были ранее вакцинированы от ВПЧ, в группе ВПЧ отрицательных 48 (22,1%) были ранее вакцинированы (рис. 2). В целом 62 (9,6%) пациентки были ранее вакцинированы от ВПЧ, 582 (90,3%) были не вакцинированы (табл. 3). Средний возраст вакцинированных 30 ± 2.5 лет, средний возраст невакцинированных составил 31 ± 0.8 лет.

Результаты исследования показали, что, несмотря на то что, ВПЧ значительно чаще обнаруживается в группе невакцинированных молодых женщин (70,9%), он также выявляется среди женщин, ранее вакцинированных от ВПЧ (22,5%), что требует комплексной оценки состояния шейки матки, в том числе ранее вакцинированных женщин, включающей ВПЧ-генотипирование широким спектром.

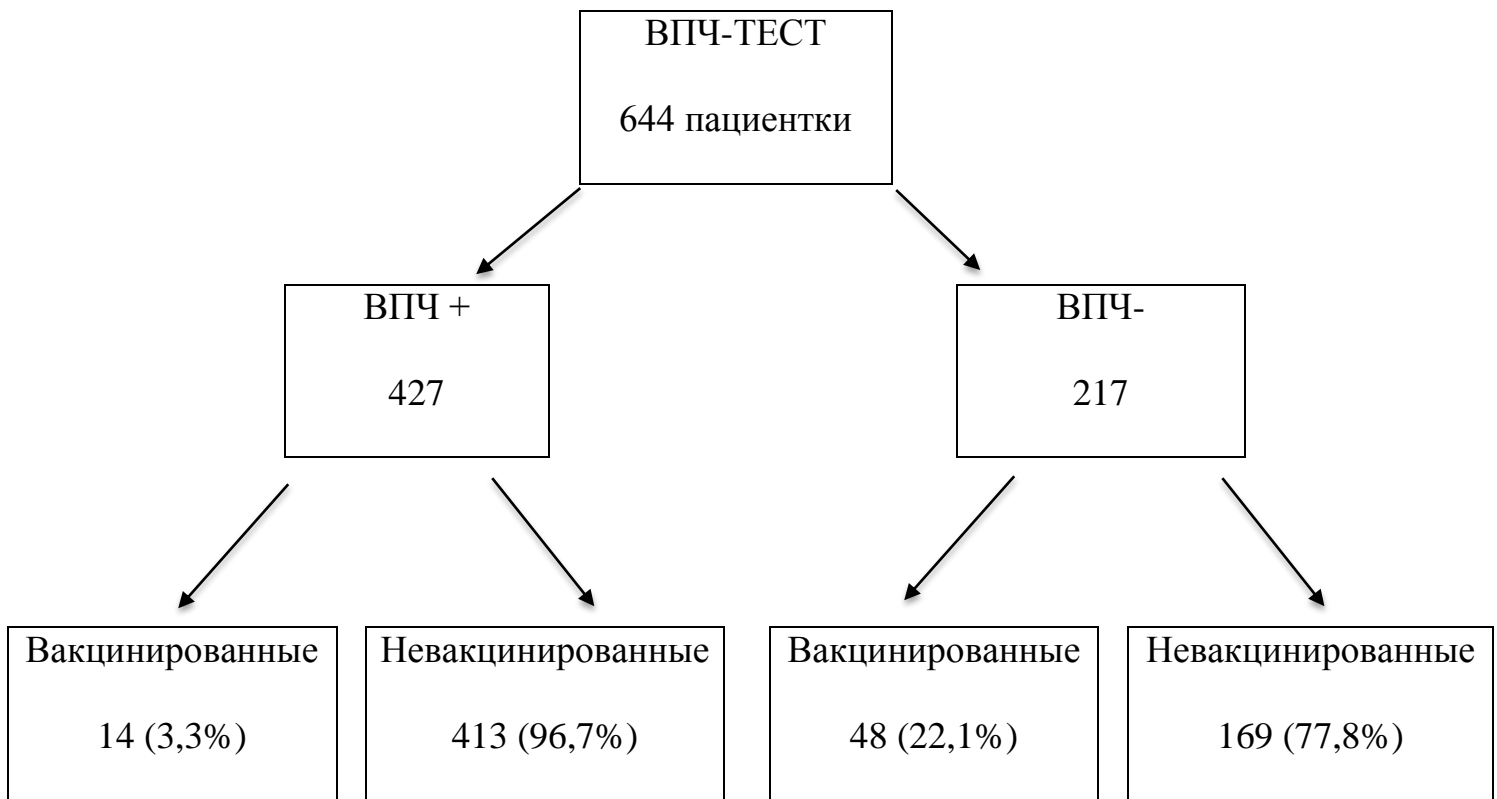


Рисунок 2. Результаты ВПЧ-тестирования: распределение вакцинированных и невакцинированных пациенткам.

Встречаемость ВПЧ в группе вакцинированных пациенток была значительно ниже – почти в 3 раза. После проведения ВПЧ-генотипирования было выявлено, что в структуре невакцинированных пациенток, обратившихся в НПО Центра, наиболее часто встречаемыми типами ВПЧ были группы А9 (58,5% – среди ВПЧ+), А7 (16,4%), А6 (9,6%), в то время как в группе вакцинированных пациенток наиболее часто встречается ВПЧ группы А6 (9,6%).

Таблица 3 – Результаты ВПЧ-тестирования женщин, обратившихся в НПО по поводу профилактического обследования

	Вакцинированные	Невакцинированные
Всего	62	582
ВПЧ +	14 (22,5%)	413 (70,9%)
ВПЧ -	48 (77,5%)	169 (29%)

3.2. Клинико-anamнестический анамнез

При сборе клинико-anamнестической анамнеза учитывались следующие факторы: возраст, масса тела и рост, наследственность (наличие онкологических заболеваний у ближайших родственников), особенности менструального цикла, возраст менархе, возраст полового дебюта, количество половых партнеров за всю жизни, наличие гинекологической и соматической патологии, возраст вакцинации (для группы вакцинированных женщин).

Оценивалась менструальная функция пациенток в 3 группах (менархе, длительность менструального цикла, продолжительность менструаций). Различий в группах, имеющих статистическую значимость, не было выявлено. Характеристика менструального цикла исследуемых пациенток представлена в таблице 4.

Таблица 4 – Характеристика менструальной функции по группам

Показатель	Группа 1 (n=62) M ± δ*	Группа 2 (n=42) M ± δ*	Группа 3 (n=37) M ± δ*	t-критерий Стьюдента**; p-уровень***
Возраст менархе (лет)	13,2 ± 1,5	13,1 ± 1,0	13,4 ± 1,3	1,972; p>0,05
Длина цикла (дней)	28,7 ± 1,9	28,0 ± 1,2	28,5 ± 2,8	1,972; p>0,05
Длительность менструации (дней)	5,4 ± 1,9	4,9 ± 1,9	5,3 ± 1,0	1,972; p>0,05

При анализе особенностей половой жизни пациенток выявлено, 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 $18,3 \pm 3,1$ во 3 группе). Среднее количество половых партнеров составило в 1 группе – $2,8 \pm 2,0$, во 2 группе, $1,9 \pm 1,1$, в 3 группе – $3,3 \pm 2,6$. Половую жизнь вне брака начали 95 (67,3%) пациенток. Более 3х половых партнеров в 1 группе отметили 24 (38,7%) пациентки, во 2 группе – 15 (35,7%), в 3 группе – 22 (59,4%).

Клинико-anamнестический анализ показал, что приблизительно половина женщин (48% случаев) с ВПЧ-ассоциированными заболеваниями отмечали раннее начало половой жизни (до 18 лет). При изучении возрастного распределения выяснилось, что у женщин в возрасте до 30 лет чаще встречались ВПЧ-ассоциированные заболевания, вызванные высокоонкогенными типами ВПЧ.

3.3. Результаты ВПЧ-генотипирования

В исследование было включено 141 пациентки, средний возраст которых составил 31 год, было сформировано 3 группы: вакцинированные (группа 1), невакцинированные пациентки NILM (2), невакцинированные пациентки HSIL (3).

В группу вакцинированных пациенток было включено 62 пациентки в возрасте от 19 до 45 лет, средний возраст составлял $30 \pm 2,5$ года. Данная группа была разделена на 2 подгруппы: 1a – вакцинированные до начала половой жизни ($n=26$, 41,9%) и 2b – вакцинированные после начала половой жизни ($n=36$, 58,06%). Все пациентки подгруппы 1a были ВПЧ-отрицательны (рис. 3). По данным цитологического исследования в группе вакцинированных ни в одном случае не было выявлено патологии шейки матки. В подгруппе 1b ВПЧ определялся у 14 пациенток (38,8%). У 8 (22,2%) пациенток были выявлены ВПЧ группы 1 («канцерогенные»): у 2 пациенток – ВПЧ А9 (ВПЧ 16), у 6 – ВПЧ А6 (ВПЧ 56), у 2 – ВПЧ А5 (ВПЧ 51). У 4 (11,1%) пациенток были выявлены ВПЧ группы 2В («возможно, канцерогенные»): у 2 (5,5%) –

ВПЧ А6 (ВПЧ 53), у 2 – ВПЧ А11 (ВПЧ 73) (табл. 5). Следует отметить, что у 2 пациенток был выявлен ВПЧ 16 – вакцинальный тип.

Таблица 5 – Классификация ВПЧ по IARC

Классификация	Типы ВПЧ
Группа 1, Канцерогенные (высокий риск)	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59
Группа 2А Вероятно канцерогенные (высокий риск)	68
Группа 2В Возможно канцерогенные (средний риск)	26, 53, 66, 67, 70, 73, 82
Группа 2В Риск неизвестен	30, (34), 69, (85), 86, (97)
Группа 3 Низкий риск	6, 11, 40, 42, 43, (44), 54, 61, (71), (72), 81, 89, 90

В группу 2 (HSIL) было включено 42 пациентки. Все пациентки данной группы (100%) были ВПЧ-положительны, при этом ВПЧ группы 1 встречался у 42 (100%) пациенток: у 31 (73,8%) пациентки были выявлены ВПЧ А9, в 6 (14,2%) случаях выявлялся ВПЧ А7, в 2 (4,7%) – А6, в 3 (7,1%) – А5. ВПЧ группы 2А («вероятно, канцерогенные») был выявлен у 3 (7,1%) пациенток. В 1 (2,3%) случае – ВПЧ группы 2В.

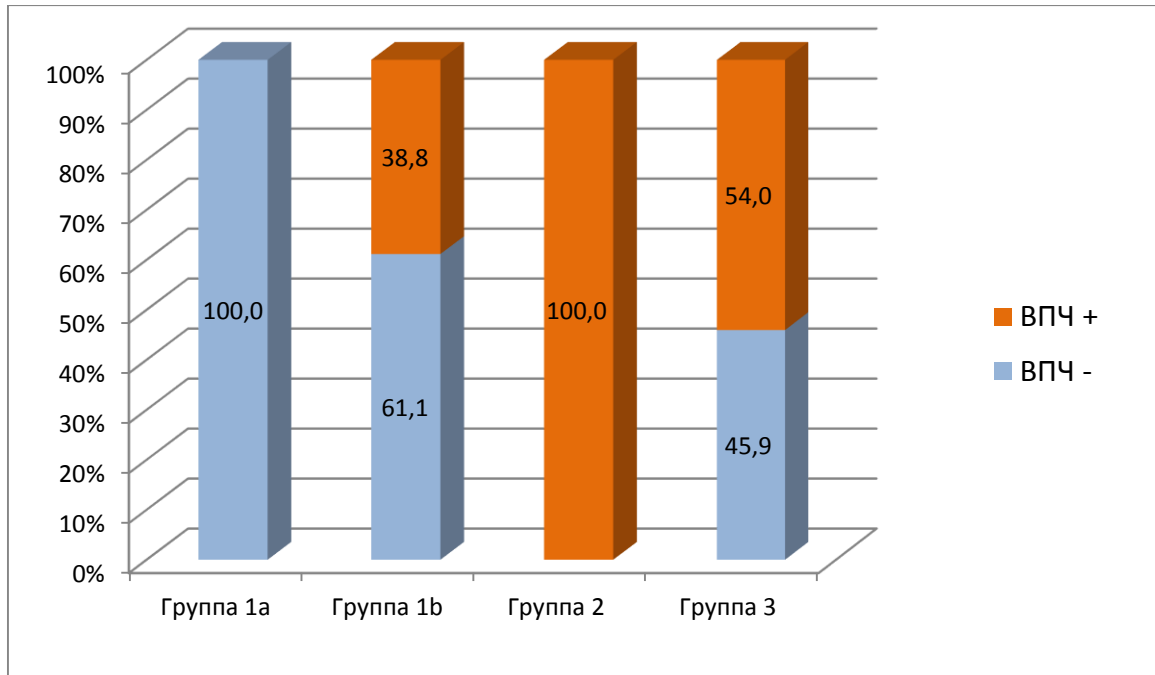


Рисунок 3. Встречаемость ВПЧ в группах.

В группу NILM было включено 37 пациенток в возрасте от 18 до 45 лет, средний возраст составлял 31 год. В данной группы 20 пациенток (54%) были ВПЧ положительны. ВПЧ группы 1 определялся у 18 (48,6%) пациенток: у 16 (43,2%) – ВПЧ А9 (у 7 (18,9%) – ВПЧ 16, у 5 (13,5%) – ВПЧ 31, у 3 (8,1%) – ВПЧ 35, у 1 (2,7%) – ВПЧ 52), в 8 (21,6%) случаях был выявлен ВПЧ А7 (у 2 (5,4%) – ВПЧ 18, у 4 (10,8%) – ВПЧ 39, у 2 (5,4%) – ВПЧ 45), в 4 (10,8%) случаях определялся ВПЧ А6 (ВПЧ 56), ВПЧ А5 (ВПЧ 51) также встречался также в 4 случаях (10,8%) (табл. 6).

Таблица 6 – Распределение всех типов ВПЧ в исследуемых группах

	Группа 1 (вакцинированные) (n=62)		Группа HSIL (n=42)	Группа NILM (n=37)
	Подгруппа 1а вакцинирова нные «до начала	Подгруппа 1б вакциниро ванные «после		

	половой жизни» (n=26)	начала половой жизни» (n=36)		
Пациенток ВПЧ -	26 (100%)	22 (61,1%)	0	17 (45,9%)
Пациенток ВПЧ +	0	14 (38,8%)	42 (100%)	20 (54%)
ВПЧ Группы 1	0	8 пациенток (22,2%) Всего о ВПЧ: 10	42 (100%)	18 пац. (включая пациенток с полиинфекцией) (48,6%) Всего ВПЧ: 32
A9	0	2 (5,5%)	31 (73,8%)	16 (43,2%)
ВПЧ 16	0	2 (5,5%)	-	7 (18,9%)
ВПЧ 31	0	0	-	5 (13,5%)
ВПЧ 33	0	0	-	0
ВПЧ 35	0	0	-	3 (8,1%)
ВПЧ 52	0	0	-	1 (2,7%)
ВПЧ 58	0	0	-	0

A7	0	0	6 (14,2%)	8 (21,6)
ВПЧ 18	0	0	-	2 (5,4%)
ВПЧ 39	0	0	-	4 (10,8%)
ВПЧ 45	0	0	-	2 (5,4%)
A6	0	6 (16,6%)	2 (4,7%)	4 (10,8%)
ВПЧ 56	0	6 (16,6%)	2 (4,7%)	4 (10,8%)
A5	0	2 (5,5%)	3 (7,1%)	4 (10,8%)
ВПЧ 51	0	2 (5,5%)	3 (7,1%)	4 (10,8%)
Группа 2А	0	0	3 (7,1%)	3 (8,1%)
A7	0	0	3 (7,1%)	3 (8,1%)
ВПЧ 68	0	0	3 (7,1%)	3 (8,1%)
Группа 2В	0	4 (11,1%)	1 (2,3%)	9 (24,3%)
A6	0	2 (5,5%)	1 (2,3%)	3 (8,1%)
ВПЧ 53	0	2 (5,5%)	-	1 (2,7%)
ВПЧ 66	0	0	-	2 (5,4%)

A5	0	0	0	3 (8,1%)
ВПЧ 82	0	0	-	3 (8,1%)
A11	0	2 (5,5%)	0	3 (8,1%)
ВПЧ 73	0	2 (5,5%)	-	3 (8,1%)
ВПЧ 11	0	0	-	0
ВПЧ 6	0	2 (5,5%)	-	2 (5,4%)
Вакцина льные типы (ВПЧ 16, 18, 6, 11)	0	4 (11,1%)		11 (29,7%)

Всего в исследовании приняло участие 141 пациентка. ВПЧ положительными были 76 (53,9%) пациенток. ВПЧ-положительными были 100% пациенток в группе HSIL, 54% – в группе NILM и 22,5% в группе вакцинированных (38,8% в подгруппе вакцинированных после начала половой жизни и 0% – в подгруппе вакцинированных после начала половой жизни).

ВПЧ группы 1 («канцерогенные») были выявлены в 8 случаях в группе вакцинированных (все – в подгруппе вакцинированных после начала половой жизни), в 42 случаях – в группе HSIL и в 18 случаях – в группе NILM. ВПЧ группы 1 статистически значимо встречались ниже в группе 1b (22,2%), чем в группе 2 (100%, $p < 0,01$) и чем в группе 3 (48,6%, $p = 0,027$, $p < 0,05$).

ВПЧ группы 2A («вероятно канцерогенные») в обеих подгруппах вакцинированных пациенток не было выявлено, в группе HSIL – в 3 случаях

(статистическая связь не установлена: $p=0.1$, $p>0,05$), в группе NILM – в 3 случаях (статистическая связь не установлена: $p=0.11$, $p>0,05$).

ВПЧ группы 2В («возможно канцерогенные») был выявлен в 4 случаях в группе вакцинированных пациенток (все – в подгруппе вакцинированных после начала половой жизни), в группе HSIL – в 1 случае (статистическая связь не выявлена: $p=0.17$, $p>0,05$), в группе NILM встречался в 9 случаях (статистическая связь не выявлена: $p=0.22$, $p>0,05$).

ВПЧ группы А9 статистически значимо встречался ниже подгруппе 1b (11,1%, $p<0,01$), чем в группе 2 (HSIL), А7 – не встречался в группе вакцинированных ($p=0.028$, $p<0,05$) (рис. 4).

ВПЧ вакцинальных типов встречались статистически значимо ниже (6,4%) в группе 1, чем в группе 3 (29,7%) ($p=0.003$, $p<0,01$) (табл. 7).

В группе 1 (вакцинированные) самым часто встречаемым типом ВПЧ являлся ВПЧ 56 (9,6%), в группах 2 и 3 – ВПЧ 16 (73,8% в группе 2 и 18,9% в группе 3).

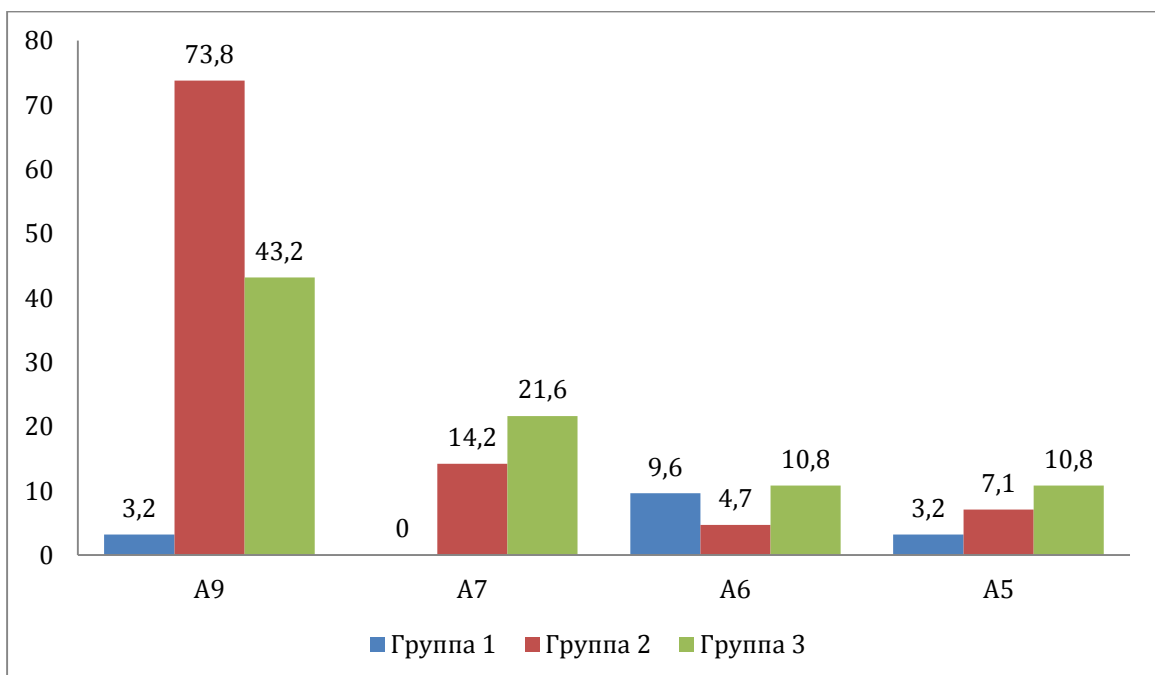


Рисунок 4. Распределение филогенетических групп ВПЧ среди вакцинированных пациенток и пациенток с цитологическими диагнозами NILM, HSIL, %.

Частота встречаемости невакцинальных типов ВПЧ у вакцинированных женщин составила 16,1% (n=10), доминирующими типами являлись ВПЧ группы А6 (9,6%).

До настоящего времени ВПЧ генотипирование (21 тип) у вакцинированных женщин не проводилось. Как правило проводится оценка вакцинальных типов [60, 61]. Помимо этого, низкие показатели эффективности вакцин от ВПЧ в предотвращении CIN 3+ в некоторых исследованиях связаны с отсутствием разделения на группы вакцинированных до и после начала половой жизни [62]. Несмотря на то, что двух дозовая схема вакцинации была утверждена для некоторых стран в 2014 году стратегической консультативной группа экспертов ВОЗ по вакцинации для девочек в возрасте до 15 лет [63], данные о концентрации антител против ВПЧ 16 и 18 после двух доз вакцины получены только за период 2 года после момента вакцинации [64]. В нашем исследовании все пациентки из группы вакцинированных пациенток получили все три дозы четырехвалентной вакцины.

Таблица 7 – Распределение типов ВПЧ в исследуемых группах

	Группа 1 (n=62)		Группа 2 (n=42)	Группа 3 (n=37)
	Подгруппа 1a (n=26)	Подгруппа 1b (n=36)		
ВПЧ -	26 (100%)	22 (61,1%)	0	17 (45,9%)
ВПЧ +	0	14 (38,8%)	42 (100%)	20 (54%)

ВПЧ	0	8 (22,2%)	42 (100%)	18 (48,6%)
Группы 1		Всего ВПЧ: 10		Всего ВПЧ: 32
A9	0	2 (5,5%)	31 (73,8%)	16 (43,2%)
A7	0	0	6 (14,2%)	8 (21,6%)
A6	0	6 (16,6%)	2 (4,7%)	4 (10,8%)
A5	0	2 (5,5%)	3 (7,1%)	4 (10,8%)
Группа 2А	0	0	3 (7,1%)	3 (8,1%)
A7	0	0	3 (7,1%)	3 (8,1%)
Группа 2В	0	4 (11,1%)	1 (2,3%)	9 (24,3%)
A6	0	2 (5,5%)	1 (2,3%)	3 (8,1%)
A5	0	0	0	3 (8,1%)
A11	0	2 (5,5%)	0	3 (8,1%)

Таким образом, полученные нами результаты демонстрируют эффективную защиту вакцинации против инфицирования и возникновения предраковых

заболеваний шейки матки, обусловленными генотипами ВПЧ, входящими в состав вакцины и не входящими в ее состав в виде перекрестной защиты (филогенетические группы А9 и А7) (табл. 8). Следует также отметить, что ВПЧ группы 2В («возможно канцерогенные») определялись в основном в группе вакцинированных пациенток и не исключено их участие в формировании неопластического процесса шейки матки.

Таблица 8 – Распределение всех типов ВПЧ в группах

Группа вакцинированных		Группа HSIL		Группа NILM	
Общее количество пациенток	62	Общее количество пациенток	42	Общее количество пациенток	37
Пациенток ВПЧ -	48	Пациенток ВПЧ -	0	Пациенток ВПЧ -	17
Пациенток ВПЧ +	14	Пациенток ВПЧ +	42	Пациенток ВПЧ +	20
Пациенток ВПЧ +, %	22,5 %	Пациенток ВПЧ +, %	100 %	Пациенток ВПЧ +, %	54,05 %
ВПЧ Группы 1	10 пациенток Всего ВПЧ: 10	ВПЧ Группы 1	42 (100%)	ВПЧ Группы 1	18 пац. (48,6 %) (включая пациенток с ко-инфекцией)

					Всего ВПЧ: 32
А9	2	А9	31	А9	16
ВПЧ 16	2	ВПЧ 16	-	ВПЧ 16	7
ВПЧ 31	0	ВПЧ 31	-	ВПЧ 31	5
ВПЧ 33	0	ВПЧ 33	-	ВПЧ 33	0
ВПЧ 35	0	ВПЧ 35	-	ВПЧ 35	3
ВПЧ 52	0	ВПЧ 52	-	ВПЧ 52	1
ВПЧ 58	0	ВПЧ 58	-	ВПЧ 58	0
А7	0	А7	6	А7	8
ВПЧ 18	0	ВПЧ 18	-	ВПЧ 18	2
ВПЧ 39	0	ВПЧ 39	-	ВПЧ 39	4
ВПЧ 45	0	ВПЧ 45	-	ВПЧ 45	2
А6	6	А6	2	А6	4

ВПЧ 56	6	ВПЧ 56	2	ВПЧ 56	4
A5	2	A5	3	A5	4
ВПЧ 51	2	ВПЧ 51	3	ВПЧ 51	4
Группа 2A	0	Группа на 2A	3	Группа на 2A	3
A7	0	A7	3	A7	3
ВПЧ 68	0	ВПЧ 68	3	ВПЧ 68	3
Группа 2B	4	Группа на 2B	1	Группа на 2B	9
A6	2	A6	1	A6	3
ВПЧ 53	2	ВПЧ 53	-	ВПЧ 53	1
ВПЧ 66	0	ВПЧ 66	-	ВПЧ 66	2
A5	0	A5	0	A5	3
ВПЧ 82	0	ВПЧ 82	-	ВПЧ 82	3
A11	2	A11	0	A11	3
ВПЧ 73	2	ВПЧ 73	-	ВПЧ 73	3

ВПЧ высокого риска по классификации IARC (филогенетических групп A9: 16, 18, 31, 33, 35, 52, 58; A7: 39, 45; A5: 51, A6: 56) были выявлены в 10 случаях (16,1%)

в группе вакцинированных пациенток (табл. 9), в то время как в группе HSIL ВПЧ высокого онкогенного риска определялись в 39 случаях (92,8%). Частота встречаемости ВПЧ высокого онкогенного риска была статистически значимо ниже в группе вакцинированных пациенток ($p < 0,01$). Среди вакцинированных пациенток ВПЧ вакцинальных типов встречались в 6,45% случаев (рис. 5).

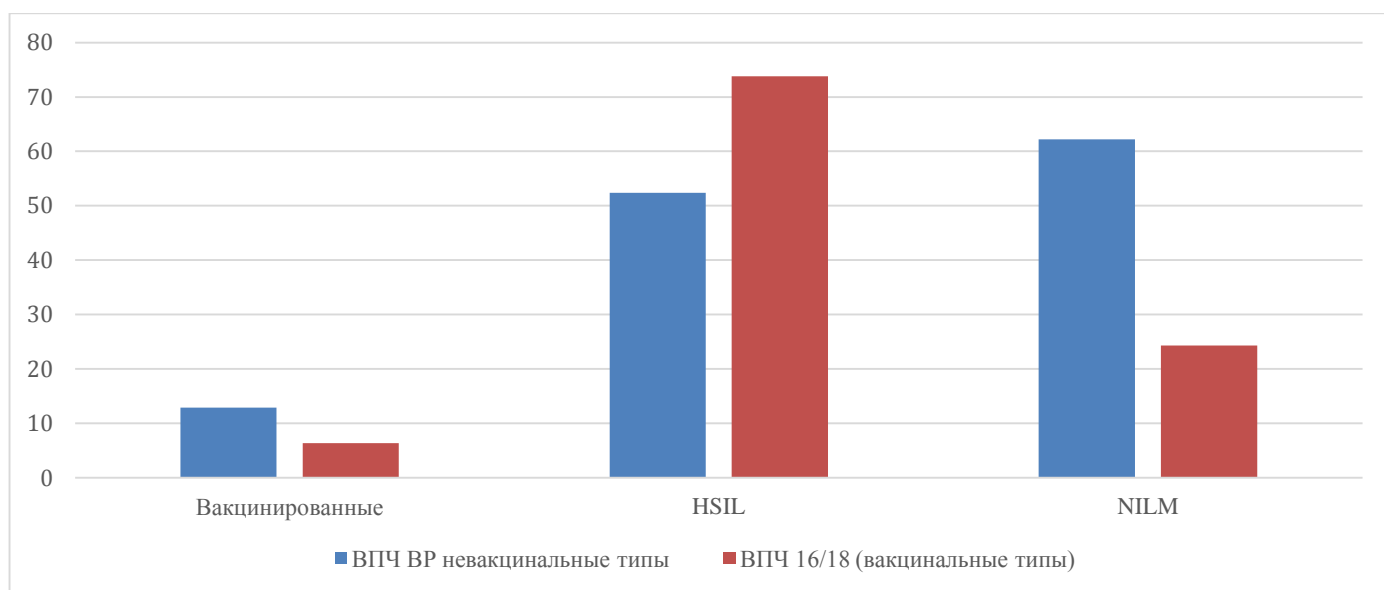


Рисунок 5. Распределение пациенток с ВПЧ ВР вакцинальных и других (невакцинальных) типов по группам, %.

Таблица 9 – Распределение ВПЧ высокого онкогенного риска среди вакцинированных пациенток и пациенток с HSIL

Группа 1 (вакцинированные) (n=62)		Группа 2 (HSIL) (n=42)
ВПЧ–ВР + (невакцинальные типы) (A9: 16, 18, 31, 33, 35, 52, 58; A7: 39, 45; A5: 51, A6: 56) За исключением 16/18	ВПЧ–ВР -	ВПЧ–ВР + (A9: 16, 18, 31, 33, 35, 52, 58; A7: 39, 45; A5: 51, A6: 56)
8 (12,9%)	52 (83,8%)	22 (52,4%)

Таблица 10 – Распределение ВПЧ высокого онкогенного риска и вакцинальных типов ВПЧ среди вакцинированных пациенток

Группа 1 (вакцинированные) (n=62)				
ВПЧ–ВР + (A9: 16, 18, 31, 33, 35, 52, 58; A7: 39, 45; A5: 51, A6: 56)	ВПЧ–ВР + (Невакцинальны е типы) (A9: 16, 18 , 31, 33, 35, 52, 58; A7: 39, 45; A5: 51, A6: 56)	ВПЧ–ВР -	ВПЧ вакцинальные типы +	ВПЧ вакцинальные типы -
10 (16,1%)	8 (12,9%)	52 (83,9%)	4 (6,45%)	58 (93,5%)

ВПЧ высокого канцерогенного риска невакцинальных типов (не-ВПЧ 16/18) в группе вакцинированных пациенток были выявлены в 8 случаях (12,9%) (табл. 10). В группе HSIL ВПЧ высокого риска невакцинальных типов были выявлены в 22 случаях (52,4%). Частота встречаемости ВПЧ высокого канцерогенного риска невакцинальных типов статистически значимо реже в группе вакцинированных, чем в группе HSIL ($p < 0,01$). Среди вакцинированных пациенток с ВПЧ высокого канцерогенного риска встречаемость невакцинальных типов составила 80% (8 из 10 пациенток): 60% ВПЧ 51, 20% ВПЧ 56 (Рис. 6).

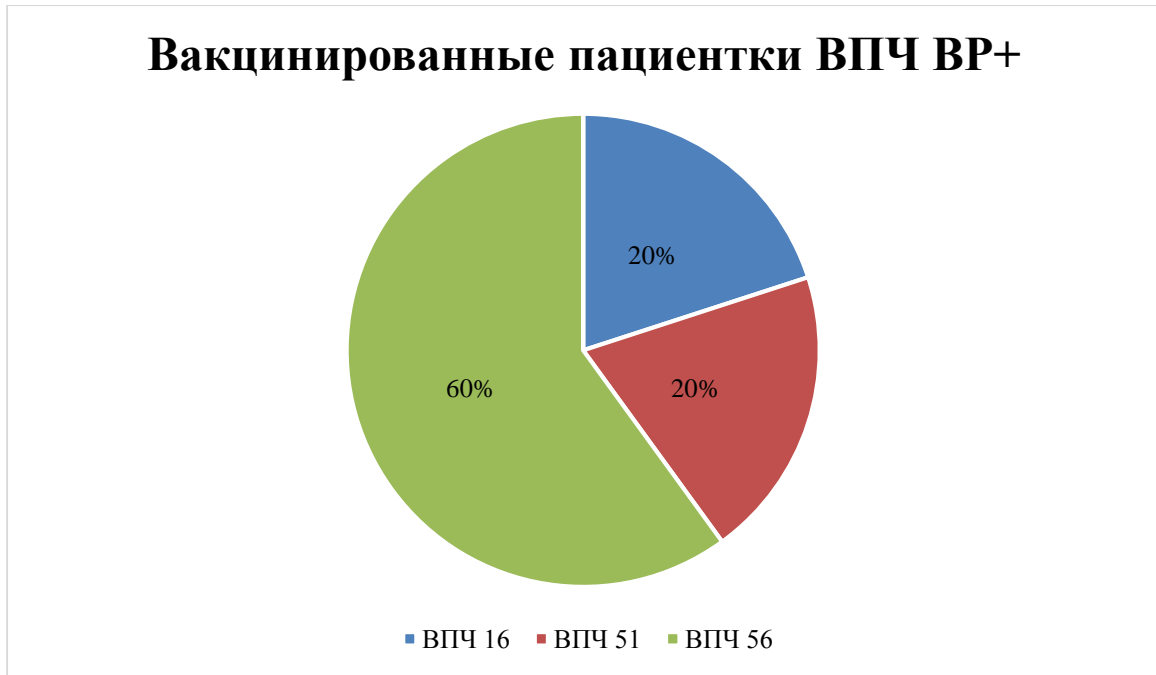


Рисунок 6. Распределение типов ВПЧ высокого канцерогенного риска среди ВПЧ-ВР положительных вакцинированных пациенток (группа 1).

Полученные нами данные позволяют предположить, что среди вакцинированных пациенток другие типы ВПЧ высокого канцерогенного риска (А6 ВПЧ 56 тип (9,6%), А5 ВПЧ 51 тип (3,2%)) замещают преобладающий в общей популяции ВПЧ 16 типа.

ВПЧ высокого канцерогенного риска среди вакцинированных пациенток статистически значимо встречался ниже, чем в группе NILM ($p < 0,01$) (табл. 11).

Таблица 11 – Распределение ВПЧ высокого онкогенного риска среди вакцинированных пациенток и пациенток с NILM

Группа 1 (вакцинированные) (n=62)		Группа 3 (NILM) (n=37)	
ВПЧ–ВР + (невакцинальные типы)	ВПЧ–ВР -	ВПЧ–ВР + (А9: 16, 18, 31, 33, 35, 52, 58; А7: 39, 45; А5: 51, А6: 56)	ВПЧ–ВР -

(A9: 16, 18, 31, 33, 35, 52, 58; A7: 39, 45; A5: 51, A6: 56) За исключением 16/18			
8 (12,9%)	52 (83,8%)	23 (62,2%)	14 (37,8%)

В группе NILM чаще всего встречались: ВПЧ 16 (n=7, 18,9%), ВПЧ 31 (n=5, 13,5%), ВПЧ 39 (n=4, 10,8%), ВПЧ 56 (n=4, 10,8%) и ВПЧ 51 (n=4, 10,8%) типов (рис. 7).

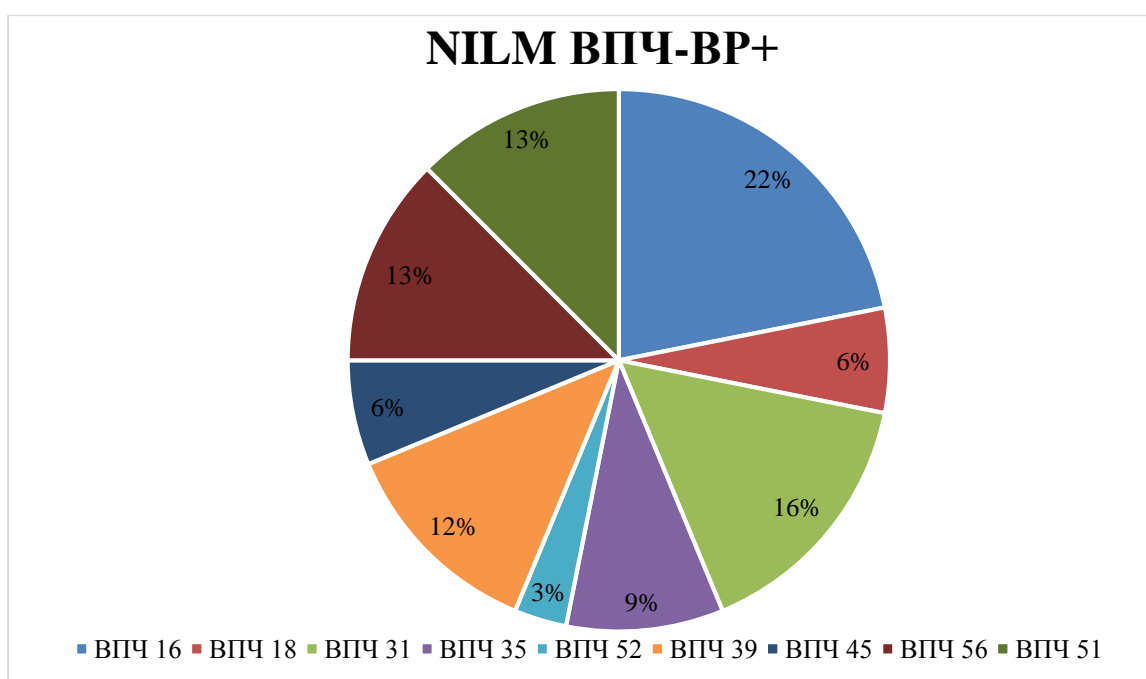


Рисунок 7. Распределение ВПЧ *высокого канцерогенного риска* среди пациенток в группе с цитологическим заключением NILM (группа 3).

Нами обнаружены статистически достоверные данные о перекрестной защите от невакцинальных типов ВПЧ *высокого канцерогенного риска* (ВПЧ A9, A7) среди вакцинированных пациенток по сравнению с группой не вакцинированных пациенток групп HSIL (A9: $p < 0,01$, A7: $p = 0.0034$), и NILM (A9: $p < 0,01$, A7: $p < 0,01$), что может свидетельствовать о перекрестной защите от ВПЧ группы A9 и A7, не входящими в

состав вакцины, и вероятно предоставляет дополнительную защиту от развития CIN 2+.

При наличии ВПЧ 16 типа до проведения вакцинации возможна его дальнейшая персистенция, приводящая к трансформации эпителии.

3.4. Результаты цитологического исследования

Цитологическое исследование проводилось всем 141 пациенткам (табл. 12).

У всех вакцинированных пациенток цитологическое заключение соответствовало NILM. ВПЧ группы 2В («возможно канцерогенные») определялись в 6,45% группе вакцинированных пациенток и не исключено их участие в формировании неопластического процесса шейки матки. А также связи с тем, что ВПЧ 56 типа в группе вакцинированных пациенток определялся в 9,7%, данным пациенткам проводилось кольпоскопическое исследование с целью выявления поражения эпителия шейки матки и последующего места проведения биопсии шейки матки.

Таблица 12 – Результаты цитологического исследования группы 1

Результаты цитологического исследования у вакцинированных пациенток	Количество пациенток (%)
Общее количество пациенток	62
NILM	62 (100%)

«Малые» формы поражения: ASCUS сопровождалась наличием койлоцитоза, большого количестве плоских клеток с выраженным перинуклеарным гало,

замещающим большую часть цитоплазмы эпителиоцита, уплотнением и более интенсивным окрашиванием каемки цитоплазмы, LSIL – дискариозом легкой степени тяжести, увеличенным ядерно-цитоплазматического соотношения и гиперхромией.

Тяжелые поражения шейки матки (HSIL) при цитологии сопровождались выраженным нарушением ядерно-цитоплазматического соотношения, гиперхромированными ядрами неправильной формы и дискариозом умеренной и тяжелой степени.

3.5. Результаты кольпоскопии

Помимо ВПЧ-типирования и цитологического исследования всем пациенткам (n=141) проводилось кольпоскопическое исследование.

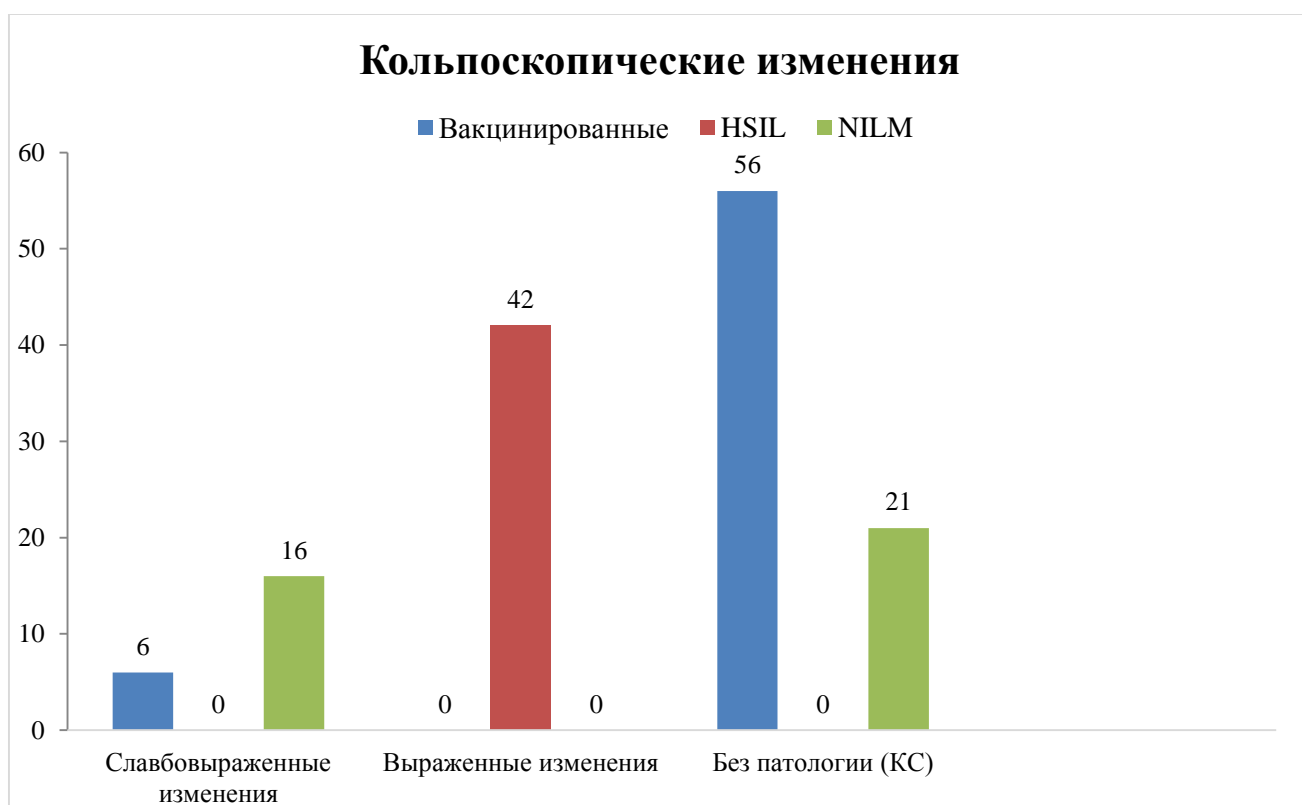


Рисунок 8. Заключение кольпоскопического исследования в исследуемых группах.

Всем пациенткам, участвующим в исследовании (n=141) была проведена кольпоскопия: в группе вакцинированных пациенток (NILM, группа 1) изменения кольпоскопической картины выявлены у 6 пациенток (4,25%). Данные пациентки были

вакцинированы после начала половой жизни, они также были ВПЧ положительны: ВПЧ 16 – у 2 пациентки, ВПЧ 56 – у 4 (филогенетическая группа А9 n=2, группа А6 n=4). При этом у всех 6 пациенток были отмечены слабовыраженные изменения цервикального эпителия в виде нежного ацетобелого эпителия, пунктации или мозаики (Рис. 8-11).

В группе невакцинированных пациенток NILM (группа 3) слабовыраженные изменения эпителия шейки матки были выявлены у 16 пациенток (11,3%) (табл. 11, 12; рис. 11).

Было отмечено статистически значимое снижение встречаемости слабовыраженных изменений у вакцинированных пациенток по сравнению с группой NILM ($p=0.00028$).

В группе HSIL слабовыраженных изменений выявлено не было (рис. 12).

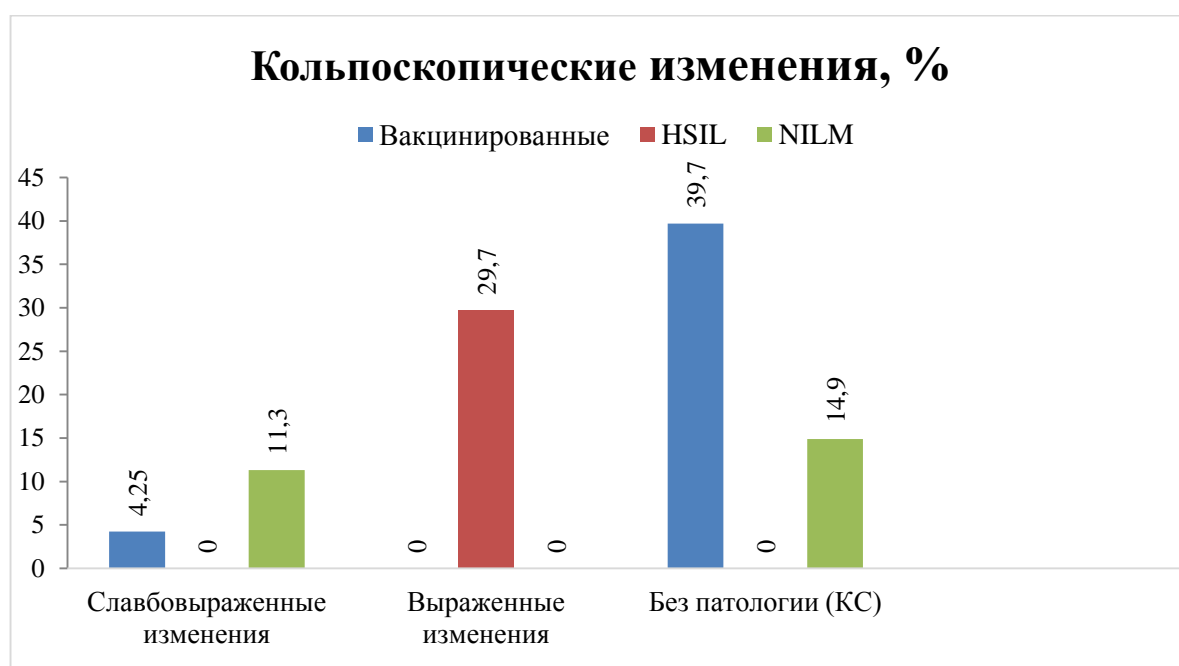


Рисунок 9. Результаты расширенной кольпоскопии по группам, %.



Рисунок 10. Слабовыраженные изменения при кольпоскопии у ВПЧ-положительной (ВПЧ 56) вакцинированной пациентки после начала половой жизни. Цитологический диагноз: NILM. Гистологический диагноз: LSIL (CIN 1).



Рисунок 11. Слабовыраженные изменения при кольпоскопии у ВПЧ-положительной (ВПЧ 56) вакцинированной после начала половой жизни пациентки. Цитологический диагноз: NILM. Гистологический диагноз: LSIL (CIN 1).

В группе HSIL были выявлены выраженные кольпоскопические изменения у всех пациенток группы (n=42, 100%): грубый АБЭ, грубая мозаика, грубая пунктация, быстрая и выраженная реакция на пробу с уксусной кислотой, наличие атипических сосудов (рис. 12-13).

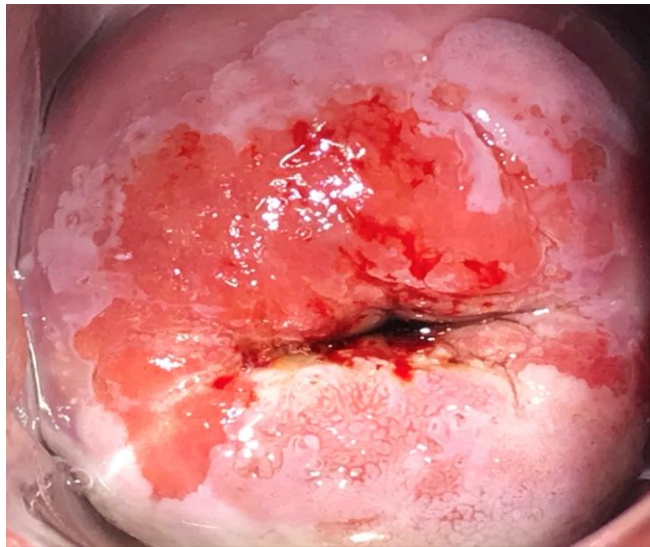


Рисунок 12. Кольпоскопическая картина невакцинированной пациентки (ВПЧ 16 тип). Выраженные изменения при кольпоскопии. Цитологический диагноз: HSIL. Гистологический диагноз: HSIL (CIN 3).



Рисунок 13. Выраженные изменения при кольпоскопии невакцинированной пациентки (ВПЧ 16 тип). Цитологический диагноз: HSIL. Гистологический диагноз: HSIL (CIN 3).

Таким образом у вакцинированных от ВПЧ пациенток с наличием ВПЧ невакцинальных типов (ВПЧ 56 типа филогенетической группы А6) также способны вызывать изменения эпителия шейки матки с последующим риском неопластической трансформации. По сравнению с невакцинированными пациентками группы NILM у вакцинированных пациенток было отмечено статистически значимое снижение встречаемости слабовыраженных изменений у вакцинированных пациенток по сравнению с группой NILM ($p < 0.01$). В 6 случаях была проведена биопсия шейки матки для определения дальнейшей тактики ведения. У невакцинированных пациенток группы HSIL ($n=42$) во всех случаях была рекомендована биопсия шейки матки. В группе невакцинированных пациенток группы NILM в 16 случаях была рекомендована биопсия шейки матки – таким образом, в группе вакцинированных пациенток

показаний для назначения биопсии было в 2,6 раза меньше по сравнению с группой 3 (NILM) и в 7 раз с группой 2 (HSIL).

3.6. Результаты морфологического исследования

В группе вакцинированных пациенток в 6 случаях была проведена биопсия шейки матки (рис. 14, 15), показаниями для биопсии служило: наличие ВПЧ канцерогенного риска (филогенетические группы А9, А6), слабовыраженные изменения эпителия шейки матки при кольпоскопии. Гистологический диагноз во всех случаях (n=6) в группе 1 соответствовал LSIL (CIN1), дальнейшая тактика ведения пациенток осуществлялась в соответствии с существующими рекомендациями: цитологическое исследование 1 раз в течение 6 месяцев, ВПЧ-тест в течение 12 месяцев.

В группе 3 (NILM невакцинированные) гистологический диагноз соответствовал LSIL (CIN 1) в 62,5% (n=10), в 37,5% (n=6) – хронический цервицит.

В группе 2 (HSIL по цитологии) биопсия шейки матки была проведена в 100% случаев (n=42), гистологический диагноз соответствовал: LSIL (CIN 1) 12% (n=5), HSIL (CIN 2/3) 88% (n=37) (рис. 14). Дальнейшая тактика ведения пациенток осуществлялась в соответствии с существующими стандартами: электро-конизация была проведена 37 пациенткам (88%). Пациентки были приглашены на дополнительное обследование: через 3 и 6 месяцев для цитологического исследования; ВПЧ-генотипирование и расширенную кольпоскопию проводились через 6 месяцев. Рецидивов заболевания не наблюдалось, отмечалась элиминация ВПЧ. При расширенной кольпоскопии изменений эпителия шейки матки не наблюдалось. Лечение и наблюдение пациенток с CIN различной степени тяжести проводилось в соответствии с существующими стандартами.

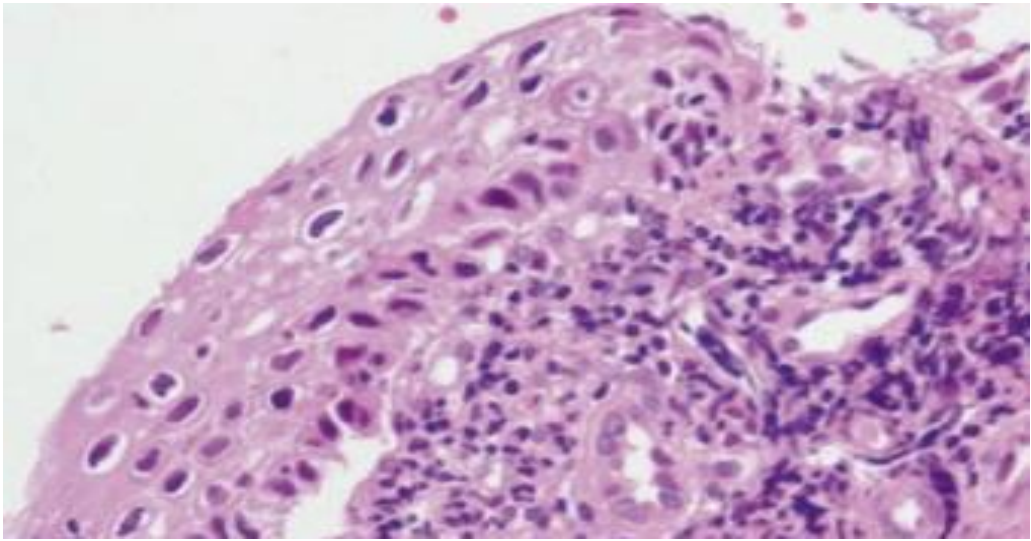


Рисунок 14. Морфологическое исследование вакцинированной пациентки (ВПЧ 56). LSIL (CIN 1).

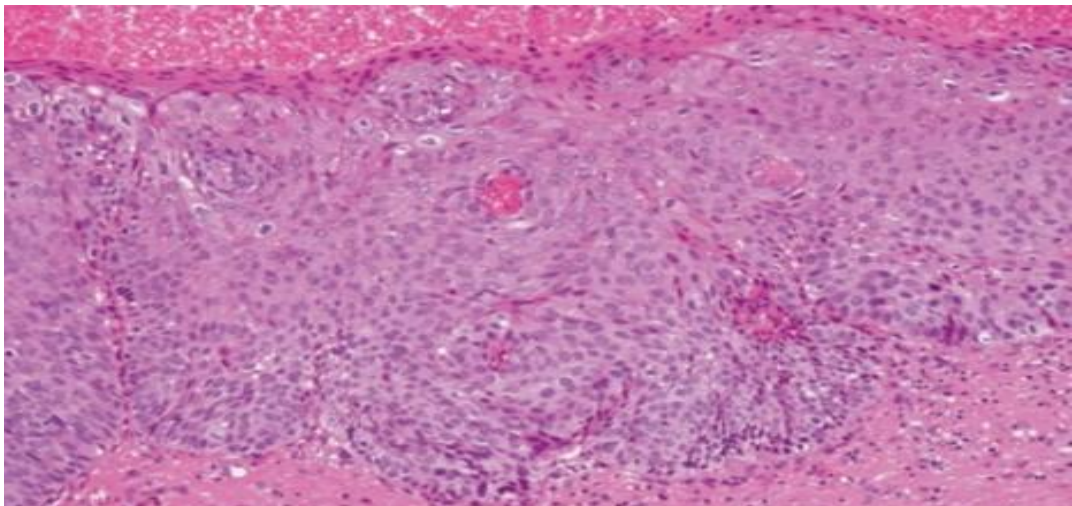


Рисунок 15. Морфологическое исследование невакцинированной пациентки (ВПЧ 16). HSIL (CIN 3).

3.7. Результаты экспрессии мРНК генов

В исследовании был проведен анализ мРНК 12 генов человека: MKI67, PGR, CDKN2A, MYBL2, UBE2T, EXO1, SERPINB5, CCNB1, ESR1, BAG1, BCL2 и ANLN среди вакцинированных и невакцинированных женщин с цитологическим заключением NILM. Результаты представлены в таблице 13.

Таблица 13 – Уровень экспрессии мРНК в группах вакцинированных и невакцинированных пациенток (NILM)

мРНК	Невакцинированные женщины Me (Q1-Q3)	Вакцинированные женщины Me (Q1-Q3)	p-value
MKI67	0.0048 (0.0031-0.010)	0.0046 (0.0027-0.0063)	0.0526
PGR	0.0096 (0.0014-0.044)	0.0078 (0.00036-0.051)	0.344
CDKN2A	0.032 (0.018-0.070)	0.049 (0.024-0.071)	0.477
MYBL2	0.004372 (0.0027-0.0095)	0.003645 (0.0025-0.0053)	0.0259
UBE2T	0.003146 (0.0013-0.0068)	0.00286 (0.00058-0.0074)	0.164
EXO1	0.000278 (0.00018-0.00070)	0.000188 (0.00011-0.00035)	0.1054
SERPINB5	0.025627 (0.0075-0.047)	0.014082 (0.0049-0.022)	0.0163
CCNB1	0.006954 (0.0031-0.014)	0.004334 (0.0023-0.010)	0.0433

ESR1	0.340103 (0.13-0.78)	0.372419 (0.094-0.75)	0.486
BAG1	0.063046 (0.023-0.090)	0.066986 (0.034-0.099)	0.186
BCL2	0.006401 (0.0044-0.0087)	0.006024 (0.0047-0.0079)	0.227
ANLN	0.00213 (0.0011-0.0047)	0.002363 (0.00074-0.0032)	0.062

Статистически значимые отличия в экспрессии ($p < 0,05$) были выявлены для следующих генов: MYBL2 ($p=0.025$), SERPINB5 ($p=0.016$), CCNB1 ($p=0.043$).

Было отмечено снижение уровня экспрессии мРНК в группе вакцинированных пациенток (NILM) по сравнению с группой невакцинированных пациенток (NILM): MYBL2 – в 1,2 раза (рис. 16), CCNB1 – в 1,6 раз (рис. 17), SERPINB5 – в 1,8 раз (рис. 18).

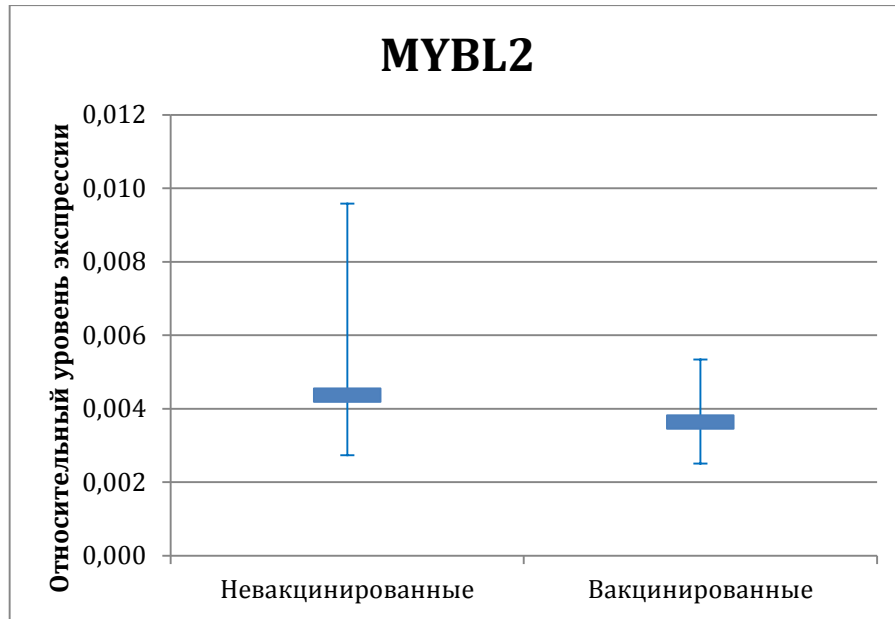


Рисунок 16. Изменение уровня экспрессии мРНК MYBL 2 в группе вакцинированных пациенток (NILM) по сравнению с группой невакцинированных пациенток (NILM).

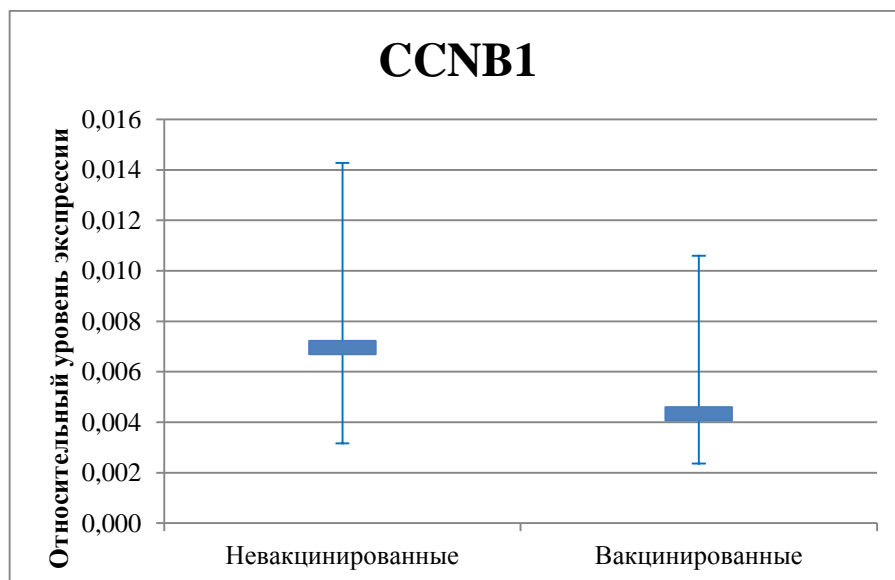


Рисунок 17. Изменение уровня экспрессии мРНК CCNB1 в группе вакцинированных пациенток (NILM) по сравнению с группой невакцинированных пациенток (NILM).

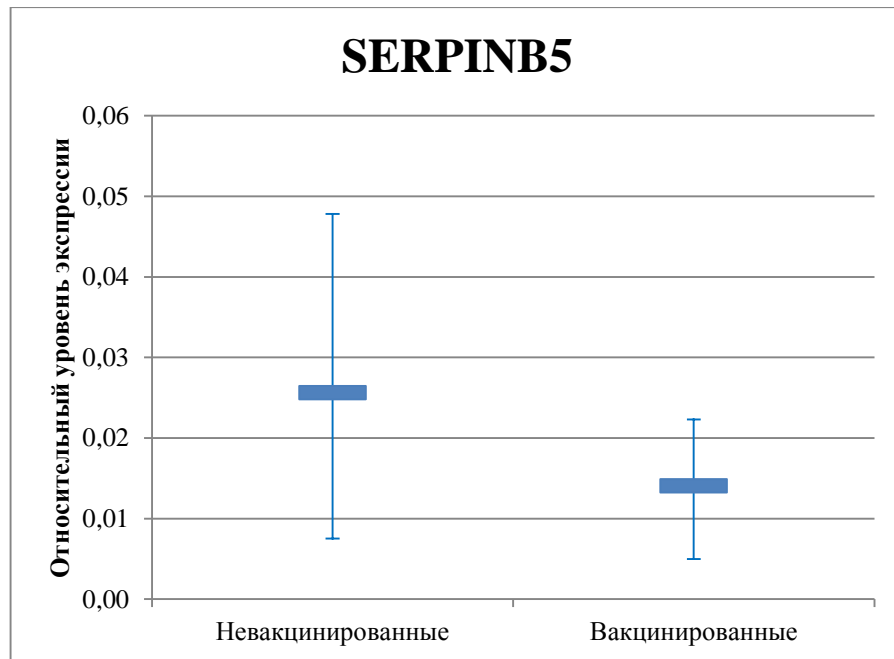


Рисунок 18. Изменение уровня экспрессии мРНК SERPINB5 в группе вакцинированных пациенток (NILM) по сравнению с группой невакцинированных пациенток (NILM).

MYBL2 (MYB proto-oncogene like 2, ген транскрипционных факторов) кодирует белок из семейства Myb. При фосфорилировании циклин-А/циклин-зависимой киназой 2 в S-фазе клеточного цикла данный ядерный белок приобретает свойства как активатора, так и супрессора. Известно, что он активирует гены *cdc2* (cell division cycle 2), циклина D1 (cyclin D1) и белка, связывающего инсулиноподобный фактор роста 5 (insulin-like growth factor-binding protein 5).

SERPINB5 (serpin family B member 5) кодирует белок maspin (mammary serine protease inhibitor). Ген экспрессируется в основном в пищеводе, коже, мочевом пузыре, двенадцатиперстной и тонкой кишке. Изначально считалось, что SERPINB5 – ген-супрессор опухолей эпителиальных клеток, подавляет инвазию и метастазирование опухолевых клеток в другие ткани [65], однако в дальнейших исследованиях [66] участие SERINB5 в биологических процессах инвазии и метастазирования опухолей была опровергнута. Белок maspin не экспрессируется в раннем эмбриогенезе. Точные функции maspin в настоящее время неизвестны, существуют данные о его участии в

воспалении, особенно при раке и опухолевых процессах. При этом публикуются работы, рассматривающие изменения экспрессии maspin при аденокарциноме пищевода в качестве возможного маркера для прицельного скрининга [67] и о статусе метилирования гена SERPB5 для оценки прогноза при раке желчного пузыря [68]. Также опубликованы исследования, показывающие роль maspin в развитии воспаления при красном плоском лишае ротовой полости. Вероятно, при лечении данный белок может являться терапевтической мишенью [69].

Ген CCNB1 кодирует белок циклин В1 (G2/mitotic-specific cyclin-B1, циклин В1, специфичный для митоза) – регуляторный белок, участвующий в митозе. Циклин В1 функционирует как «выключатель», регулируя вступление клетки в митоз [70]. Роль циклина В1 - перевести клетку из фазы G2 в фазу М, но при опухолях происходит гиперэкспрессия циклин В1 и присоединение к циклинзависимых киназ (Cdkс), что приводит к неконтролируемому клеточному росту. Известно, что при опухолях происходит гиперэкспрессия циклина В1 и циклинзависимых киназ [71], что приводит к неконтролируемому клеточному росту. Данный процесс часто происходит на фоне инактивации белка онко-супрессора р53, способного подавлять гиперэкспрессию циклина В1.

Высокая экспрессия циклина В1 обнаружены при целом спектре опухолей, например, при раке молочной железы, желудка, области головы и шеи, простаты, колоректальном раке, раке полости рта и пищевода. Уровень экспрессии циклина В1 может коррелировать с уровнем инвазии и агрессивностью рака, поэтому данный белок, вероятно, может применяться для прогнозирования течения онко-заболеваний. Отмечается значительное повышение экспрессии циклин В1/cdc2 в ткани опухоли молочной железы и при метастазировании. Опубликованы работы, демонстрирующие, что уменьшение экспрессии циклина В1 может приводить к регрессии опухоли. Вероятным методом супрессии опухоли может являться внедрение гена или белка, нацеленного на разрушение циклина В1, т.к. циклин В1 необходим для выживания опухолевых клеток – уменьшение его уровня приводит к гибели опухолевых клеток и не влияет на гибель нормальных клеток [72].

Полученные нами результаты о снижении экспрессии мРНК 3 генов свидетельствуют о снижении пролиферативной активностью клеток, обусловленной отсутствием активности ВПЧ у вакцинированных женщин. Указанные гены могут в перспективе быть использованы в качестве диагностических маркеров течения ПВИ для вакцинированных от ВПЧ женщин.

3.8. Результаты протеомного анализа цервикагинальной жидкости

Для выявления изменения протеомной композиции ЦВЖ при использовании вакцинных препаратов использовался полуколичественный подход на основе масс-спектрометрического метода. Образцы ЦВЖ были получены от 37 пациенток, наблюдавшихся на базе поликлинического отделения ФГБУ Научного центра акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В. И. Кулакова. Всего в образцах ЦВЖ было выявлено более 419 различных белков (Рис. 19).

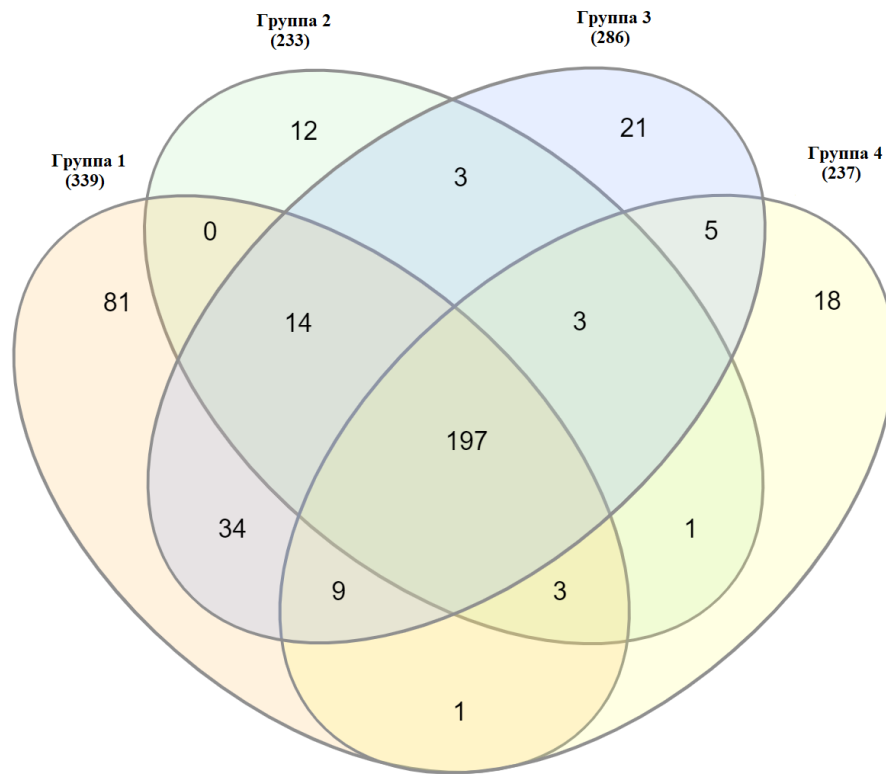


Рисунок 19. Диаграмма Венна протеомной композиции ЦВЖ в зависимости от статуса вакцинации: группа 1 ВПЧ+ не вакцинированные; группа 2 ВПЧ- не вакцинированные; группа 3 ВПЧ+ вакцинированные; группа 4 ВПЧ- вакцинированные.

Анализ выявленных белков, по базе Gene Ontology (GO) ‘Cellular compounds’ позволил выявить, что большинство протеинов относилось к цитоплазматическим белкам (актин, актин-связывающие белки цитоскелета, промежуточные филаменты, белки микротрубочек), метаболит взаимодействующим ферментам (изомеразы, лигазы, гидролазы), а также к классам различных ферментов (протеазы, фосфатазы). Оценка вариабельности протеомной композиции между техническими заколами, а также внутри исследуемых групп проводилось с использованием критерия Пирсона. В целом наблюдался высокий уровень корреляции между техническими заколами (<0.9), однако ряд образцов имел более низкий уровень внутри группы, это может быть обусловлено различным физиологическими параметрами. Выявленные белки

зачастую имели клеточное происхождение (41.5%) и лишь 15% белков имели внеклеточную локализацию.

Более 200 выявленных белков выявлялись во всех четырех группах, данные белки входят в белковый core ЦВЖ, выявленный в более ранних исследованиях. Также среди выявленных белков 34 белка встречались только у вакцинированных пациенток. Большинство данных белков принимают участие в химических реакциях и биологических путях с участием органических или неорганических соединений, которые содержат азот (CFL1, VTN, P4NB и т.д.), а также в иммунных процессах (AGT, AMBP, ITIN1, RNH1, C5 и т.д.) и в частности в врожденных иммунных процессах и лейкоцит опосредованных иммунных процессах.

Для выявления особенности белкового состава ЦВЖ вакцинированных и не вакцинированных от ВПЧ женщин применялся статистический метод с использованием Т-критерия Стьюдента ($p < 0,01$). В результате статистического анализа было выявлено 89 белков (Табл. 14) изменяющихся относительно контрольных групп. В группе не вакцинированных пациенток с диагностированной ВПЧ инфекцией было выявлено 62 различных белка (Рис. 20).

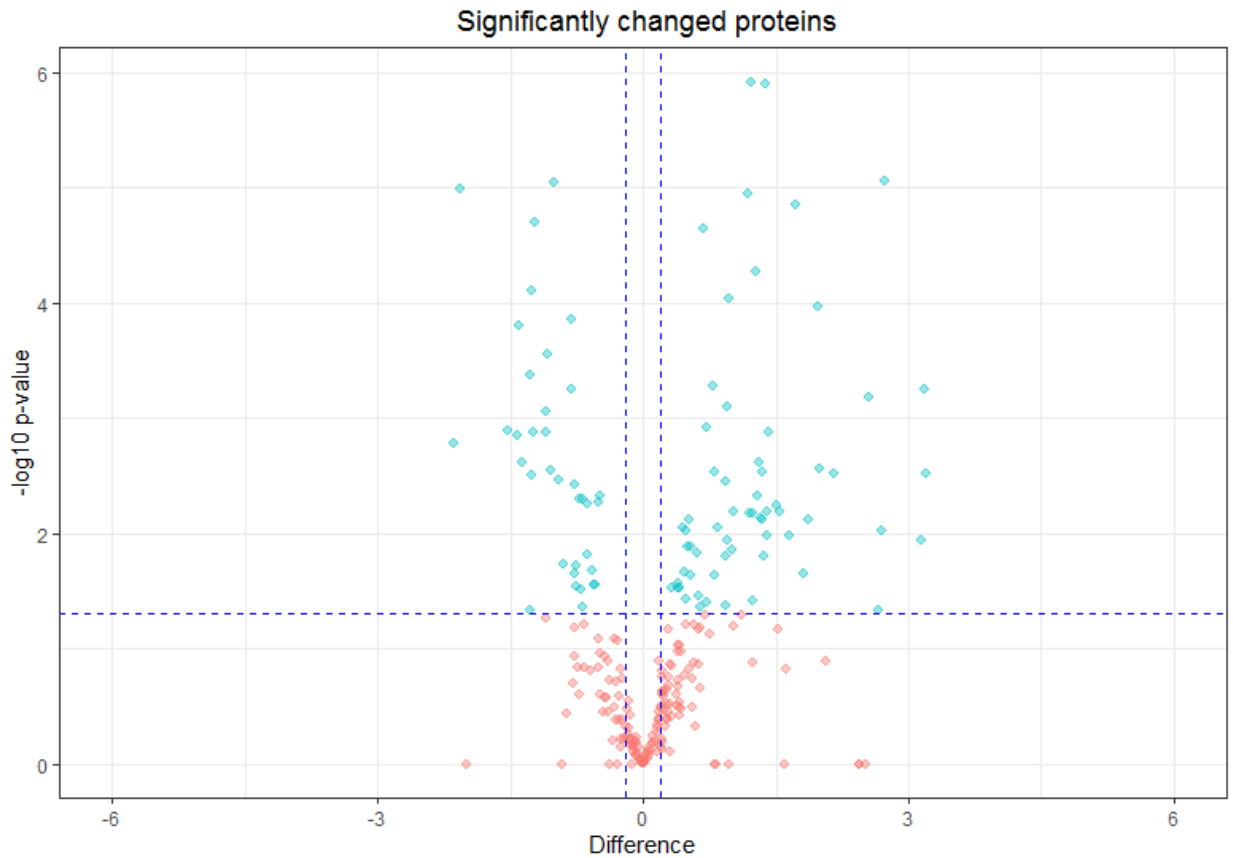


Рисунок 20. Изменение уровня статистически значимо изменяющихся белков (p -value $< 0,01$) в группе не вакцинированных пациенток ВПЧ+ относительно контрольной группы не вакцинированных пациенток ВПЧ-.

Примечание: на оси абсцисс представлен логарифм разницы значений относительно группы контроля, по оси ординат – статистическая значимость ($-\log_2(p\text{-value})$).

Таблица 14 – Изменение уровня статистически значимо изменяющихся белков в группе не вакцинированных пациенток ВПЧ+ относительно контрольной группы невакцинированных пациенток ВПЧ-

ID белков	Названия белков	Названия генов	Число уникальных пептидов	p-value	log Разницы
P01040	Cystatin-A;Cystatin-A, N-terminally processed	CSTA	9	0,002978	0,80
P01876	Ig alpha-1 chain C region	IGHA1	8	0,000009	-1,01
P07476	Involucrin	IVL	29	0,009076	0,83
P30050	60S ribosomal protein L12	RPL12	2	0,000011	1,19
P52566	Rho GDP-dissociation inhibitor 2	ARHGDIB	2	0,001348	1,42
P59666	Neutrophil defensin 3; Neutrophil defensin 1	DEFA3; DEFA1	2	0,000001	1,37
Q16610	Extracellular matrix protein 1	ECM1	12	0,008895	0,44
O00299	Chloride intracellular channel protein 1	CLIC1	6	0,000009	2,72
O60235	Transmembrane protease serine 11D	TMPRSS11D	4	0,003538	0,93
O95171	Sciellin	SCEL	12	0,001196	0,72
P00338	L-lactate dehydrogenase A chain	LDHA	5	0,000571	-0,80
P00558	Phosphoglycerate kinase 1	PGK1	6	0,000109	1,98
P00747	Plasminogen	PLG	11	0,002850	-1,05
P00915	Carbonic anhydrase 1	CA1	8	0,000651	2,55
P01023	Alpha-2-macroglobulin	A2M	47	0,000160	-1,41
P01871	Ig mu chain C region	IGHM	10	0,000079	-1,27
P02042	Hemoglobin subunit delta	HBD	5	0,002730	2,00

P02675	Fibrinogen beta chain;Fibrinopeptide B;Fibrinogen beta chain	FGB	14	0,003488	-0,95
P02749	Beta-2-glycoprotein 1	APOH	10	0,005098	-0,68
P02751	Fibronectin	FN1	13	0,001277	-1,52
P02788	Lactotransferrin	LTF	25	0,000281	-1,08
P02790	Hemopexin	HPX	11	0,001349	-1,09
P04040	Catalase	CAT	8	0,000092	0,98
P04075	Fructose-bisphosphate aldolase A	ALDOA	11	0,007718	0,53
P04080	Cystatin-B	CSTB	6	0,001333	-1,24
P04217	Alpha-1B-glycoprotein	A1BG	5	0,000888	-1,11
P04406	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH	8	0,000023	0,68
P05090	Apolipoprotein D	APOD	3	0,003773	-0,78
P05164	Myeloperoxidase	MPO	20	0,005577	-0,63
P07737	Profilin-1	PFN1	4	0,001648	-2,14
P08123	Collagen alpha-2(I) chain	COL1A2	8	0,003025	2,15
P08758	Annexin A5	ANXA5	3	0,009397	0,48
P09211	Glutathione S-transferase P	GSTP1	6	0,006480	1,01
P09467	Fructose-1,6-bisphosphatase 1	FBP1	3	0,009504	2,69
P09960	Leukotriene A-4 hydrolase	LTA4H	5	0,002461	1,32
POC0L4	Complement C4	C4A; C4B	19	0,003149	-1,27
P11142	Heat shock cognate 71 kDa protein	HSPA8	7	0,007506	1,33
P14780	Matrix metalloproteinase-9	MMP9	6	0,001411	-1,42
P17174	Aspartate aminotransferase, cytoplasmic	GOT1	3	0,005036	-0,72
P19827	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1	ITIH1	4	0,002417	-1,37

P22735	Protein-glutamine gamma- glutamyltransferase K	TGM1	3	0,000020	-1,22
P29401	Transketolase	TKT	3	0,006524	1,54
P30044	Peroxiredoxin-5, mitochondrial	PRDX5	5	0,000564	3,19
P31946	14-3-3 protein beta/alpha	YWHAB	5	0,003016	3,20
P31949	Protein S100-A11	S100A11	5	0,006769	1,25
P32926	Desmoglein-3	DSG3	15	0,000535	0,79
P40925	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	MDH1	3	0,000811	0,96
P41439	Folate receptor gamma; Folate receptor beta	FOLR3; FOLR2	2	0,000010	-2,08
P49913	Cathelicidin antimicrobial peptide	CAMP	4	0,000426	-1,28
P61158	Actin-related protein 3	ACTR3	2	0,007645	1,35
P62937	Peptidyl-prolyl cis- trans isomerase A	PPIA	4	0,007600	1,86
P69905	Hemoglobin subunit alpha	HBA1	8	0,006641	1,19
Q01518	Adenylyl cyclase- associated protein 1	CAP1	5	0,000014	1,72
Q13421	Mesothelin	MSLN	3	0,004783	-0,48
Q14508	WAP four-disulfide core domain protein 2	WFDC2	4	0,000141	-0,82
Q6ZVX7	F-box only protein 50	NCCRP1	7	0,002950	1,35
Q8WUM4	Programmed cell death 6-interacting protein	PDCD6IP	7	0,005799	1,51
Q96C19	EF-hand domain- containing protein D2	EFHD2	2	0,006577	1,40
Q99536	Synaptic vesicle membrane protein VAT-1 homolog	VAT1	3	0,005364	-0,50

Q9NQ38	Serine protease inhibitor Kazal-type 5	SPINK5	31	0,000053	1,28
Q9UBX7	Kallikrein-11	KLK11	4	0,004773	1,29
Q9UGL9	Cysteine-rich C-terminal protein 1	CRCT1	2	0,000001	1,23

Анализ обогащения выявленных белков по базам GO, позволил выявить их значимое участие различных процессах и биологических путях. Важным аспектом данной работы являлось выявление белков, ассоциированных с различными процессами иммунной системы (Рис. 21), кроме того были выявлены белки непосредственно участвующие в реализации иммунного ответа (*A1BG, ACTR3, ALDOA, C4A, CAMP, CAP1, CAT, CSTB, GSTP1, HSPA8, LTA4H, LTF, MMP9, MPO, PPIA, S100A11, VAT1*). В основном данные белки принимают участие в реализации процессов врожденного иммунитета, включая иммунный ответ против вирусов и микробов (Рис. 18).

Так, белки HSPA8, LTF, PPIA принимают участие в регуляции репликации вируса. Белок HSPA8 является белком-шоппером и принимает участие в различных клеточных процессах включая защиту белковой композиции от стресса, свертывание и транспорте вновь синтезированных полипептидов [73], данный белок также принимает участие в регуляции репликации вирусного генома, чем может быть обусловлено увеличение его уровня в группе ВПЧ положительных пациенток. HSPA8 входит в семейство HSP70. Также у пациенток происходило снижение уровня лактотрансферрина (LTF) обладающего бактерицидной функцией, данный белок также обладает противовирусной активностью, в частности, против папилломавирусной инфекции. LTF стимулирует сигнальный путь TLR4, ведущий к активации NF-каппа-В и последующей провоспалительной продукции цитокинов, а также участвует в липополисахарид опосредованную (LPS) передачу сигналов TLR4 [74-75]. Также он участвует в ингибировании миграции нейтрофильных гранулоцитов в местах апоптоза. Белок стимулирует VEGFA-опосредованную миграцию и

пролиферацию эндотелиальных клеток. Связывает гепарин, хондроитинсульфат и, возможно, другие гликозаминогликаны (GAG).

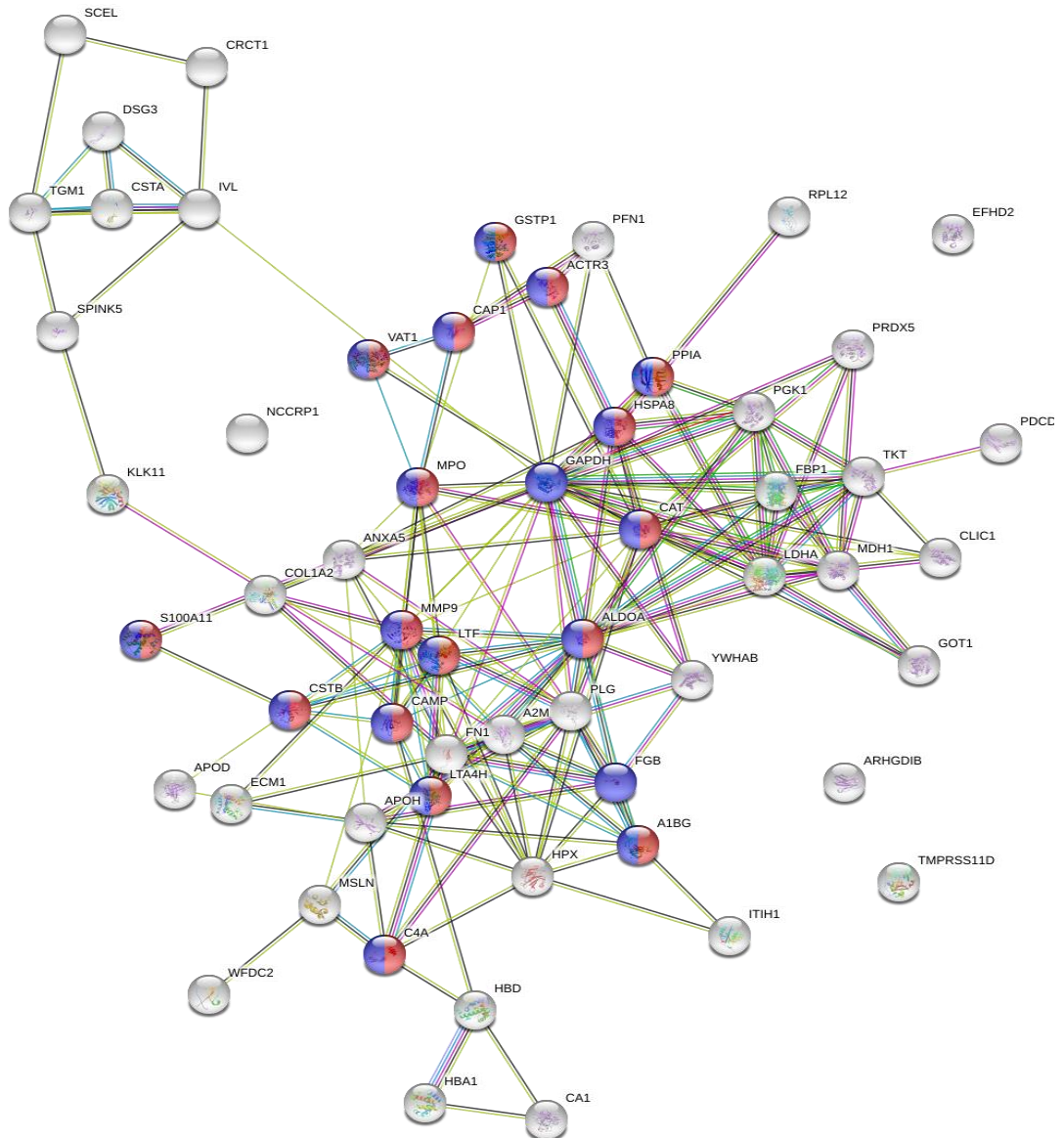


Рисунок 21. Анализ белок-белковых взаимодействий для списка белков статистически значимо изменяющихся в группе не вакцинированных пациенток ВПЧ+ относительно контрольной группы не вакцинированных пациенток ВПЧ-.

Среди белков иммунного ответа более, чем в 2 раза изменялись 13 белков: A1BG (Alpha-1B-glycoprotein), ACTR3 (Actin-related protein 3), C4A (Complement C4), CAMP (Cathelicidin antimicrobial peptide), CAP1 (Adenylyl cyclase-associated protein 1), CSTB (Cystatin-B), GSTP1 (Glutathione S-transferase P), HSPA8 (Heat shock cognate 71 kDa protein), LTA4H (Leukotriene A-4 hydrolase), LTF (Lactotransferrin), MMP9 (Matrix metalloproteinase-9), PPIA (Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A) и S100A11 (Protein S100-A11) (табл. 15). У вакцинированных пациенток наблюдается изменение иммунного ответа, с чем связано изменение данных белков в ЦВЖ. Активация врожденного иммунитета может быть ассоциировано с перекрестной защитой от ВПЧ.

В группе ВПЧ положительных вакцинированных пациенток было выявлено 34 различных белка (Табл. 15) относительно ВПЧ отрицательных вакцинированных пациенток (Рис. 22).

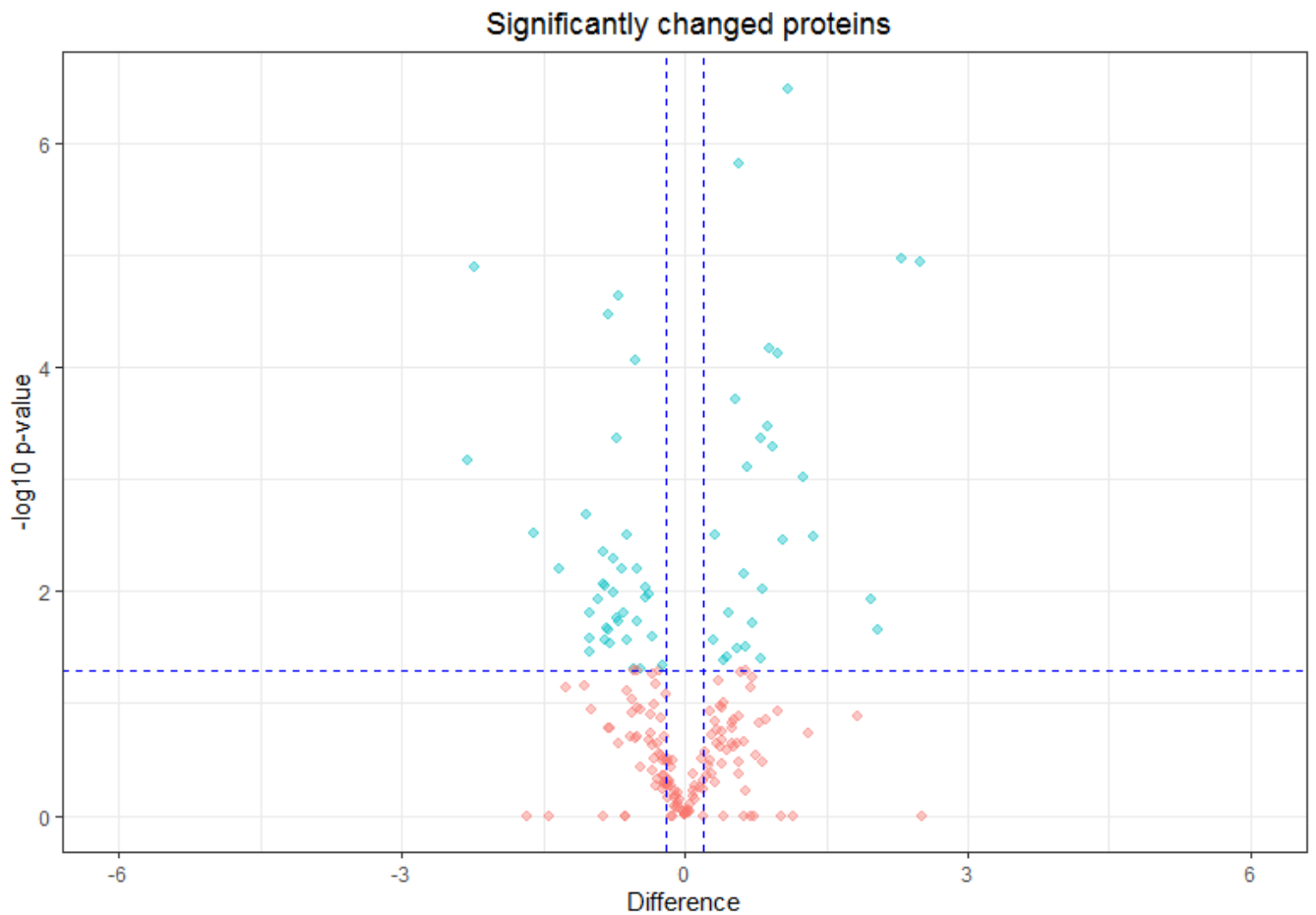


Рисунок 22. Изменение уровня статистически значимо изменяющихся белков (p -value $>0,01$) в группе вакцинированных пациенток ВПЧ+ относительно контрольной группы вакцинированных пациенток с ВПЧ-.

Примечание: на оси абсцисс представлен логарифм разницы значений относительно группы контроля, по оси ординат – статистическая значимость ($-\log_2(p\text{-value})$).

Таблица 15 – Изменение уровня статистически значимо изменяющихся белков в группе не вакцинированных пациенток ВПЧ+ относительно контрольной группы не вакцинированных пациенток ВПЧ-

ID белков	Названия белков	Названия генов	Число уникальных пептидов	p-value
P01040	Cystatin-A;Cystatin-A, N-terminally processed	CSTA	9	0,000002
P01876	Ig alpha-1 chain C region	IGHA1	8	0,006399
P07476	Involucrin	IVL	29	0,000000
P30050	60S ribosomal protein L12	RPL12	2	0,000034
P52566	Rho GDP-dissociation inhibitor 2	ARHGDI2	2	0,000683
P59666 ;P59665	Neutrophil defensin 3;HP 3-56;Neutrophil defensin 2;Neutrophil defensin 1;HP 1-56;Neutrophil defensin 2	DEFA3;DEF A1	2	0,006221
Q16610	Extracellular matrix protein 1	ECM1	12	0,000784
P20930	Filaggrin	FLG	16	0,00631
O00391	Sulfhydryl oxidase 1	QSOX1	6	0,00908
O15231	Zinc finger protein 185	ZNF185	8	0,00043
O43240	Kallikrein-10	KLK10	5	0,00313
O43768	Alpha-endosulfine	ENSA	2	0,00051
P00738	Haptoglobin;Haptoglobin alpha chain;Haptoglobin beta chain	HP	20	0,00437
P02787	Serotransferrin	TF	41	0,00508
P04114	Apolipoprotein B-100;Apolipoprotein B-48	APOB	32	0,00001
P05109	Protein S100-A8;Protein S100-A8, N-terminally processed	S100A8	7	0,00002
P09525	Annexin A4	ANXA4	7	0,00207
P15311	Ezrin	EZR	3	0,00949
P19823	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2	ITIH2	5	0,00320
P28799	Granulins;Acrogranin;Paragrulin;Granulin-1;Granulin-2;Granulin-3;Granulin-4;Granulin-5;Granulin-6;Granulin-7	GRN	6	0,00706
P31151 ;Q86SG5	Protein S100-A7; Protein S100-A7A	S100A7;S100 A7A	8	0,00001

P35321	Cornifin-A	SPRR1A	2	0,00345
P36952	Serpin B5	SERPINB5	6	0,00854
P37837	Transaldolase	TALDO1	3	0,00043
P43652	Afamin	AFM	4	0,00007
P98088	Mucin-5AC	MUC5AC	13	0,00001
Q01469	Fatty acid-binding protein, epidermal	FABP5	15	0,00009
Q13835	Plakophilin-1	PKP1	8	0,00034
Q16270	Insulin-like growth factor- binding protein 7	IGFBP7	5	0,00096
Q5VT7 9	Annexin A8-like protein 2	ANXA8L2	1	0,00020
Q6UX0 6	Olfactomedin-4	OLFM4	6	0,00899
Q96R M1	Small proline-rich protein 2F	SPRR2F	3	0,00303
Q9UB G3	Cornulin	CRNN	22	0,00318
Q9Y6R 7	IgGFc-binding protein	FCGBP	49	0,00007

Для создания диагностической панели белков для ВПЧ положительных женщин, ранее вакцинированных от ВПЧ, проводился анализ обогащения функциональных групп генов кодирующие статистически значимо изменяющиеся белки по базам GO. Анализ по базам GO Function и GO Pathways позволило выявить значимое участие данных белков в процессах иммунной системы (Рис. 23). В основном данные белки принимают участие в реализации процессов врожденного иммунитета (APOB, FABP5, GRN, HP, MUC5AC, OLFM4, PKP1, QSOX1, S100A8).

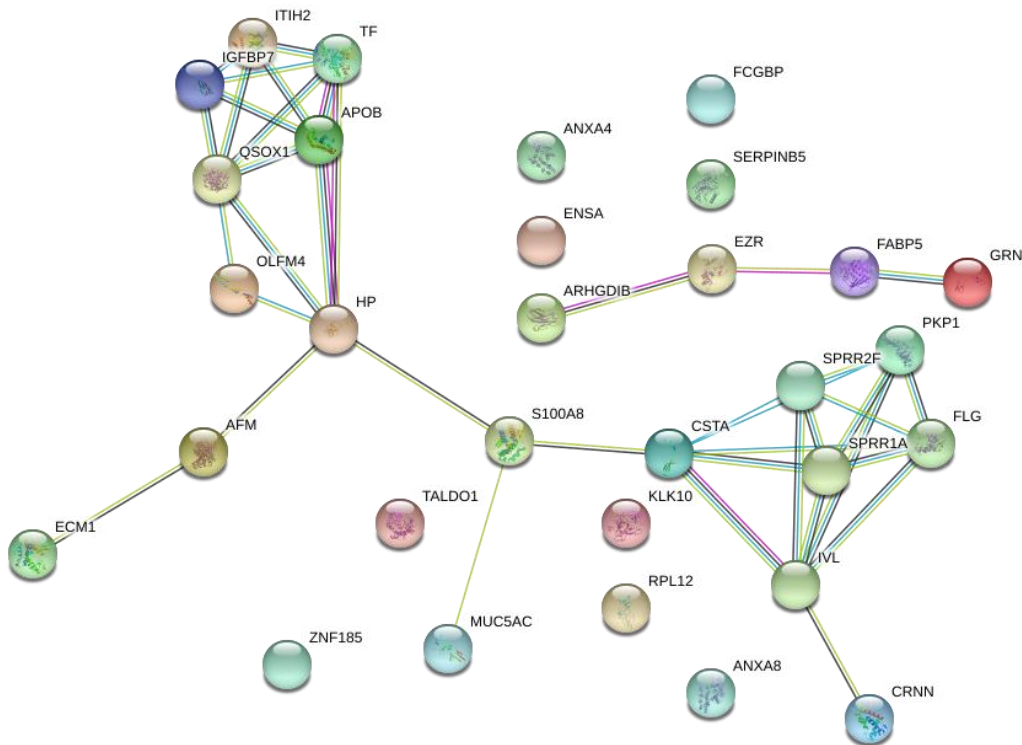


Рисунок 23. Анализ белок-белковых взаимодействий для списка белков статистически значимо изменяющихся в группе не вакцинированных пациенток ВПЧ+ относительно контрольной группы не вакцинированных пациенток ВПЧ-.

Среди выявленных белков осуществляющие иммунные функции стоит выделить гелеобразующий гликопротеин эпителия (MUC5AC), который защищает слизистую оболочку от инфекции и химического повреждения путем связывания с микроорганизмами, которые впоследствии удаляются [76-77]. Однако, уровень белка Ольфактомедин 4 (OLFM4) участвующего в пролиферации онкогенных клеток (к примеру, при онкологии поджелудочной железы) и способствующий переходу от фазы S к фазе G2 / M, был снижен относительно группы контроля [78]. Также данный белок в клеточных линиях миелоидных лейкозов способствует ингибированию роста клеток, в также вызывает дифференцировку клеток и последующий апоптоз [79]. Кроме того, OLFM4 может играть роль в ингибировании фосфорилирования и дезактивации EIF4EBP1. Снижение данного белка возможно обусловлено эффектом ранее

введенного вакцинного препарата. Также в группе вакцинированных пациентов происходит увеличение уровня пролактина -1 (PKP1), по-видимому, участвующего в первую очередь в формировании соединительно тканых бляшек и способствующего эпидермальному морфогенезу [80].

Отдельного внимания заслуживает белок S100A8 кальций- и цинк-связывающий белок, который играет важную роль в регуляции воспалительных процессов и реализации иммунного ответа, индуцируя нейтрофильный хемотаксис и адгезию. Преимущественно данный белок встречается в организме в виде кальпротектина (S100A8 / A9), который обладает широким спектром внутри- и внеклеточных функций [81]. Внутриклеточные функции включают в себя: содействие трафику и метаболизму арахидоновой кислоты лейкоцитов, модуляцию тубулинзависимого цитоскелета при миграции фагоцитов, а также активацию нейтрофильной НАДФН-оксидазы. Активированная НАДФН-оксидаза путем облегчения сборки ферментного комплекса на клеточной мембране, с помощью переноса арахидоновой кислоты, необходимого кофактора, в ферментный комплекс, способствует сборке фермента, напрямую связываясь с NCF2 / P67PHOX [81]. Внеклеточные функции включают в себя провоспалительную, антимикробную, окислительную и апоптозную активность. Провоспалительная активность включает рекрутирование лейкоцитов, стимулирование продукции цитокинов и хемокинов, а также регуляцию адгезии и миграции лейкоцитов. Действуя как молекула алармина или молекулярного фрагмента, ассоциированный с повреждениями (DAMP) S100A8, стимулирует врожденные иммунные клетки посредством связывания с рецепторами распознавания рецепторов, такими как Toll-подобный рецептор 4 (TLR4) и рецептор конечных продуктов гликирования (AGER). Связывание с TLR4 и AGER активирует MAP-киназные и NF-каппа-B сигнальные пути, что приводит к усилению провоспалительного каскада. S100A8 в первую очередь обладает антимикробной активностью в отношении бактерий и грибов и проявляет свою антимикробную активность, по-видимому, за счет хелатирования Zn^{2+} , которое необходимо для роста микроорганизмов [82-84].

Также белок способен вызывать гибель клеток через аутофагию и апоптоз связываясь с митохондриями и лизосомами через активные формы кислорода (АФК) с помощью BNIP3 [85]. Наконец S100A8 может регулировать количество нейтрофилов и апоптоз с помощью антиапоптотического эффекта; регулирует выживание клеток через ITGAM / ITGB и TLR4 и механизм передачи сигналов, включающий MEK-ERK [86].

34 белка встречались только у вакцинированных пациенток. Большинство данных белков принимают участие в химических реакциях и биологических путях с участием органических или неорганических соединений, которые содержат азот (*CFL1*, *VTN*, *P4HB* и др.), а также в иммунных процессах (*AGT*, *AMBIP*, *ITIH1*, *RNH1*, *C5* и др.) и в частности в врожденных иммунных процессах и лейкоцит опосредованных иммунных процессах (рис. 24).

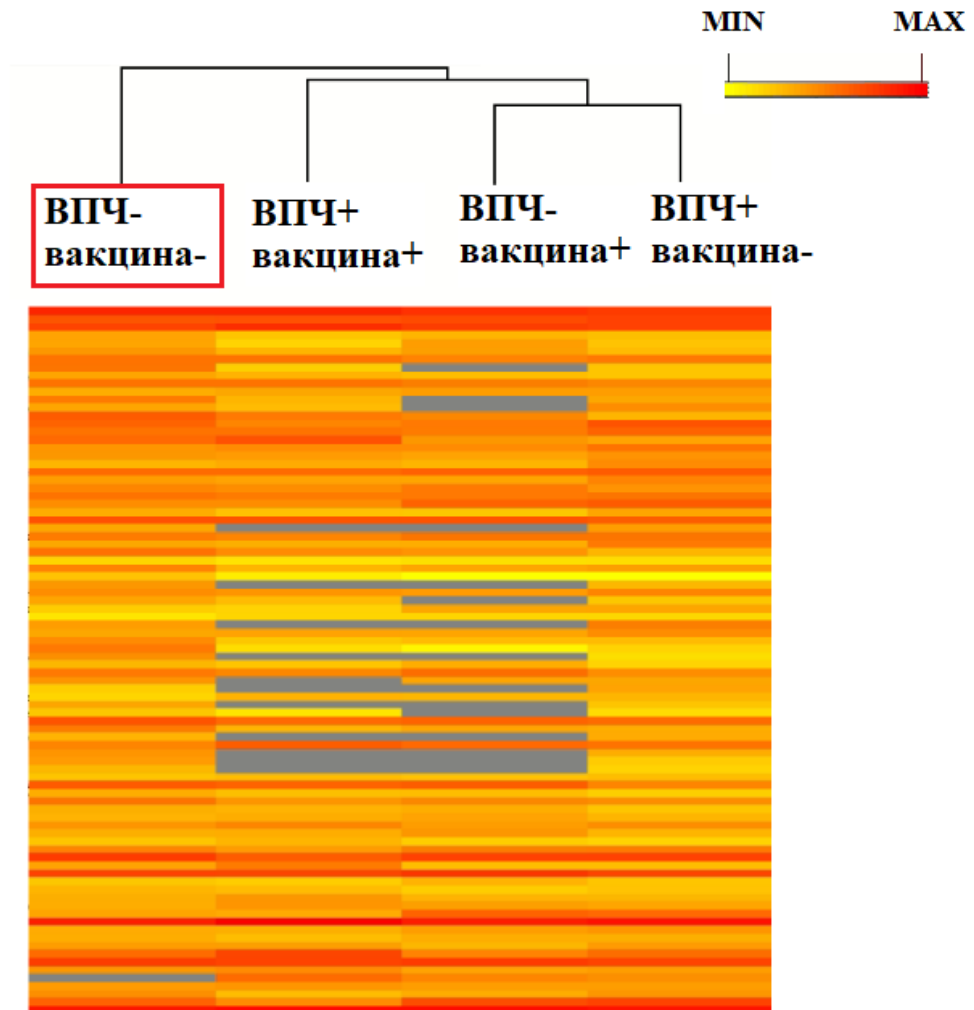


Рисунок 24. Филогенетическое дерево, построенное на основе протеома ЦВЖ.

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* (табл. 16)

Таблица 16 – Статистически значимо изменяющиеся белки ЦВЖ 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	↑

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.

Заключение:

Таким образом, нами были выявлены маркеры (белки ЦВЖ методом масс-спектрометрии *APOB*, *FABP5*, *GRN*, *HP*, *MUC5AC*, *OLFM4*, *PKP1*, *QSOX1*, *S100A8*), позволяющих оценить локальный иммунный ответ и определить группы риска

развития неопластической трансформации эпителия шейки матки 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.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Известно, что примерно 99% случаев РШМ и 90% случаев CIN возникают у ВПЧ-положительных пациенток. Доказано, что единственным эффективным методом предотвращения РШМ и других ВПЧ-ассоциированных заболеваний является профилактика инфицирования ВПЧ. В настоящее время для этой цели применяются профилактические вакцины. Известно, что вакцины статистически достоверно снижают частоту CIN, ассоциированного с вакцинальными типами ВПЧ. Данные об эффективности вакцинации в отношении других невакцинальных типов ВПЧ высокого риска недостаточны и порой противоречивы [91].

Ряд исследований свидетельствуют о том, что встречаемость четырех вакцинальных типов ВПЧ среди вакцинированных женщин составляет 0,4–2,4% [58, 87-88], при этом почти у половины из них (46,8%) выявляется, по крайней мере, один онкогенный тип ВПЧ [90].

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. Вероятной причиной перекрестной защиты от филогенетических групп ВПЧ А7 и А9 может являться как схожесть капсидного белка L1, так и изменение белкового состава цервикагинальной 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 в связи с внедрением в науку и практику масс-спектрометрии, позволяющей оценивать локальный иммунный ответ и определять особенности белкового состава ЦВЖ, что может обеспечивать дополнительную перекрестную защиту.

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.

Принимая во внимание вышеизложенное, цель данной работы заключалась в совершенствовании диагностики и тактики ведения вакцинированных от ВПЧ женщин с разработкой алгоритма обследования с применением клинических, молекулярно-генетических и протеомных методов исследований.

Согласно первой задаче, 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%). 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.), где было продемонстрировано, что 28,6% вакцинированных женщин были ВПЧ-положительными [87], более 38% – в исследовании Е. Enerly (2019 г.) [88].

Согласно второй задаче исследования, пациенткам, включенным в исследование, было проведено ВПЧ-генотипирование широкого спектра типов (21 тип). В подгруппе 1а (вакцинированных до начала половой жизни) не было выявлено вируса папилломы человека ни в одном случае. Полученные нами данные совпадают с данными исследования Е. Enerly (2019 г.), в котором частота встречаемости вакцинальных типов среди вакцинированных женщин составила 0,4% [88]. В подгруппе 1б

(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 женщин [88]. В группах HSIL и NILM наиболее часто определялся ВПЧ 16 типа (73,8% и 18,9%, соответственно). Полученные нами данные позволяют предположить, что у вакцинированных происходит замещение ВПЧ 16, преобладающего в общей популяции, другими онкогенными типами ВПЧ. Аналогичные данные получены в исследовании С. Patel (2019 г.), в котором, в рамках Национальной программы вакцинации от ВПЧ, 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) [89].

Ряд исследований свидетельствуют о том, что встречаемость вакцинальных типов ВПЧ как в общей популяции, так и среди вакцинированных составляет 0,4–2,4% [87-90]. Распространенность дополнительных вакцинальных типов, входящих в девятивалентную вакцину (31, 33, 45, 52, 58) составляет 19,3%, при этом у 46,8% женщин, прошедших скрининг в Австралии, был определен по крайней мере 1 онкогенный тип ВПЧ [90].

Профилактические вакцины от ВПЧ типов 6/11/16/18 и ВПЧ 16/18 статистически достоверно снижают частоту CIN, ассоциированного с вакцинальными типами ВПЧ. Однако данных об эффективности четырехвалентной вакцины в отношении других типов ВПЧ высокого риска недостаточно [91]. Частота ВПЧ-инфекции в популяции и среди женщин с поражениями шейки матки показали, что пятью наиболее распространенными типами ВПЧ (без цитологических нарушений) были ВПЧ 16 (2,3%), 31 (2,1%), 51 (1,6%), 53 (1,5%) и 59 (1,4%), тогда как при плоскоклеточном интраэпителиальном поражении (HSIL) наиболее распространенными типами были 16 (34,9%), 31 (23,9%), 39 (12,8%), 52 (12,8%) и 51 (11,9%) [92].

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 группы A9 [93].

В отличие от представленных нами данных, Jeannot *и соавт.* не обнаружили статистически значимых данных относительно перекрестной защиты от других типов ВПЧ. В исследовании Emilien Jeannot *и соавт.* [94] приняло участие 409 женщин в возрасте 18-31 год, 69% из которых были вакцинированы четырехвалентной вакциной. ВПЧ 16 или 18 типов был выявлен у 7,2% невакцинированных пациенток, в группе вакцинированных – 1,1%. Также следует отметить, что в отличие от нашего исследования, в котором критерием включения в группу вакцинированных пациенток являлась получение всех 3 рекомендованных доз вакцины, в исследовании Emilien Jeannot 28% вакцинированных пациенток получили не все 3 дозы вакцины [94]. Ограничением исследования также является отсутствие разделения на вакцинированных до и после начала половой жизни. Как известно, первичной целевой группой вакцинации, для которой доказана высокая эффективность вакцин, являются девушки 9-14 лет (до полового дебюта и, как правило, ВПЧ-отрицательные) [95-96]. В нашем исследовании в подгруппе вакцинированных до начала половой жизни не был определен ни один тип ВПЧ. В то время как 38,8% пациенток подгруппы вакцинированных после начала половой жизни были ВПЧ-положительными.

Сообщалось, что вакцинация снижает распространенность ВПЧ 31/33/45/52/58 типов на 17,7% и CIN1-3 или аденокарциному *in situ* (AIS) на 18,8% [97]. Вакцинация также снизила частоту заболеваемости CIN1-3 и AIS, ассоциированных с ВПЧ 31/58/59 на 26,0%, 28,1% и 37,6% соответственно [98]. Наблюдалось небольшое снижение

CIN2, ассоциированного с ВПЧ 31/33/45/52/58, но оно не было статистически значимым. Данный факт четко показывает ограничения вакцины, особенно в отношении невакцинальных типов ВПЧ высокого риска (не-ВПЧ 16/18), а также необходимость последующего клинического наблюдения за пациентами, несмотря на факт вакцинации. Более того для определения отдаленных результатов популяционного иммунитета после вакцинации от ВПЧ требуется более длительное наблюдение. В перспективе считается, что клинический эффект перекрестной защиты от невакцинальных типов ВПЧ будет схож с эффективностью предотвращения патологий, ассоциированных с ВПЧ 6, 11, 16 и 18 типами.

ВПЧ 51 типа считается ВПЧ высокого риска, частота встречаемости которого у пациенток с CIN низкая (0-2,3%) [99]. Данных об эффективности предотвращения CIN, ассоциированного с ВПЧ 51 типа, мало, однако скорее всего четырехвалентная вакцина не эффективна в отношении ВПЧ 51 типа [100].

Применяемые в настоящее время клеточные диагностические тесты и вторичная профилактика ВПЧ-ассоциированных заболеваний, включающая обнаружение ВПЧ на молекулярном уровне, могут быть ограничены в случаях, когда ВПЧ-ассоциированный рак труднодоступен для исследования или не может быть идентифицирован. В данных случаях изобретение метода раннего скрининга и метода после-хирургического контроля опухоли, основанного на биомаркерах цервикагинальной жидкости или крови будет играть важную роль.

Согласно третьей задаче, при анализе результатов цитологического исследования у всех пациенток обеих подгрупп (1a, 1b) вакцинированных (100%) женщин соответствовало NILM. Слабовыраженные изменения эпителия при кольпоскопии были выявлены только у ВПЧ-положительных вакцинированных пациенток группы 1 (10%), требовавшие проведение прицельной биопсии. Во всех случаях гистологическое заключение соответствовало LSIL (CIN 1). Полученные нами данные свидетельствуют о целесообразности проведения кольпоскопии всем пациенткам, вакцинированным после начала половой жизни при наличии ВПЧ, для раннего выявления изменений эпителия шейки матки. Полученные нами данные

совпадают с результатами исследования С.Е. Schulmeyer (2019 г.) [123], в котором также продемонстрирована высокая информативность кольпоскопии у пациенток с наличием ВПЧ высокого канцерогенного риска, вне зависимости от цитологической картины.

Полученные нами данные также сходятся с данными Salaheddin M. *и соавт.* [124], исследование которых было сфокусировано на измерении эффективности вакцинации, основанном на анализ цитологических заключений (ASCUS, LSIL, HSIL). При этом было продемонстрировано, что вакцинация не оказывает протективного эффекта в отношении развития CIN2+ у вакцинированных пациенток (полная схема вакцинации, 3 дозы вакцины в течение 1 года), в случаях, если у пациенток была по крайней мере 1 аномальная цитология в анамнезе. Данный факт еще раз подчеркивает важность обследования пациенток до проведения вакцинации.

В соответствии с четвертой задачей, 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. 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.

Мы предполагаем, что перекрестная защита вакцины от невакцинальных типов ВПЧ филогенетических групп А9 и А7 может объяснена именно различием белкового состава ЦВЖ у вакцинированных и невакцинированных женщин: APOB, FABP5, GRN, HP, MUC5AC, OLFM4, PKP1, QSOX1, S100A8. Данные белки иммунного ответа в ЦВЖ для вакцинированных женщин нами были выделены впервые. В настоящее время недостаточно исследований изучения белкового состава пациентов, вакцинированных от ВПЧ.

В виду отсутствия подобных исследований, нами был проведен анализ литература оценки иммунного ответа пациентов, ранее вакцинированных от гепатита В. Так, большой интерес исследователей вызывает изучение гуморального иммунитета у вакцинированных от гепатита В. Согласно данным Shuye Zhang *и соавт.* [125] В-лимфоциты и антитела могут использоваться в качестве маркеров эффективности терапии гепатита и связаны с патогенезом заболевания.

Особого внимания среди выделенных белков ЦВЖ у ВПЧ-положительных вакцинированных пациенток заслуживают:

Белок АРОВ (Аполипопротеин В) – первичный аполипопротеин хиломикронов. Все функциональные роли АроВ внутри частиц ЛПНП изучены не полностью, известно, что АроВ в составе ЛПНП действует как лиганд для рецепторов ЛПНП в различных клетках по всему телу. Высокие уровни АроВ вносят большой вклад в развитие сосудистых заболеваний (атеросклероза) [104]. Уровни экспрессии белка обычно измеряются с помощью ELISA.

FABP5 (эпидермальный белок, связывающий жирные кислоты) у человека кодируется геном FABP5. Данный белок обнаруживается в эпидермальных клетках. Впервые повышение его уровня было идентифицировано в псориазной ткани. Считается, что функции FABP включают поглощение, транспорт и метаболизм жирных кислот [105]. Было отмечено взаимодействие FABP5 взаимодействует и S100A7 в кератиноцитах.

Granulin (Гранулин) кодируется геном GRN. Каждый белок гранулина отщепляется от его предшественника програнулина, который экспрессируется нейронами, клетками микроглии, астроцитами и эндотелиальными клетками. Хотя точную функцию програнулина и гранулина еще предстоит определить, обе формы белка вовлечены в процессы развития, воспаления и пролиферации клеток и гомеостаза белка. Экспрессия програнулина повышается при воспалении тканей. После ранения кератиноциты, макрофаги и нейтрофилы увеличивают выработку програнулина. Нейтрофилы способны секретировать эластазу во внеклеточный

матрикс, который способен расщеплять програнулин на гранулин, что способствует дальнейшему развитию воспаления [106]. Програнулин высоко экспрессируется в клетках, которые по своей природе обладают высокой пролиферацией. Несколько исследований предполагают участие програнулина в онкогенезе и росте нейронов. Програнулин способствует митогенезу в эпителиальных культурах [106].

Белок HP, Haptoglobin (Гаптоглобин) — белок плазмы крови, с высокой аффинностью связывающий гемоглобин, высвобождающийся из эритроцитов, и тем самым ингибирующий его окислительную активность. Комплекс гемоглобин-гаптоглобин затем удаляется клетками ретикуло-эндотелиальной системы [107].

MUC5AC (Муцин 5AC) у человека кодируется геном MUC5AC. Данный ген был связан с гиперсекрецией слизи в дыхательных путях и связан с хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ) [76-77].

OLFM4 избирательно экспрессируется при воспалительных заболеваниях эпителия толстой кишки. Кодируемый белок представляет собой гликопротеин внеклеточного матрикса, который способствует адгезии клеток и росту опухолей [108].

Белки PKP 1 (plakophilin 1) плакофилина локализируются в десмосомах и ядрах клеток и участвуют в связывании кадгеринов с промежуточными филаментами в цитоскелете. Этот белок может участвовать в рекрутировании и стабилизации молекул во время образования десмосом [80]. Мутации в этом гене связаны с синдромом эктодермальной дисплазии и ломкости кожи.

Экспрессия гена QSOX1 (Сульфгидрил оксидаза 1) индуцируется, когда фибробласты начинают выходить из пролиферативного цикла и переходить в состояние покоя, что позволяет предположить, что этот ген играет важную роль в регуляции роста [109].

MYBL2 (MYB proto-oncogene like 2, гены транскрипционных факторов) кодирует белок из семейства Myb: ядерный белок, одна из известных функций которого, поддержание клеточного цикла. При фосфорилировании циклин-А/циклин-

зависимой киназой 2 в S-фазе клеточного цикла он приобретает свойства как активатора, так и репрессора [110]. Известно, что он активирует гены *cdc2* (cell division cycle 2), циклина D1 (cyclin D1) и белка, связывающего инсулиноподобный фактор роста 5 (insulin-like growth factor-binding protein 5).

Цистатин-А (Cystatin-A) входит в суперсемейство цистатина, включающего в себя белки, которые содержат множество цистатиноподобных последовательностей. Некоторые белки являются активными ингибиторами цистеиновой протеазы, в то время как другие утратили или, возможно, никогда не приобрели эту ингибирующую активность. В [118] суперсемействе есть три семейства ингибиторов, включая цистатины типа 1 (стефины), цистатины типа 2 и кининогены. Этот ген кодирует стефин, который действует как ингибитор цистеиновой протеазы, образуя плотные комплексы с папаином и катепсинами В, Н и L. Этот белок является одним из белков-предшественников оболочки ороговевших клеток в кератиноцитах и играет роль в развитии эпидермиса и поддержание. Стефины были предложены в качестве прогностического и диагностического средства для лечения рака: низкая экспрессия CSTA характерная для метастазов в головном мозгу при раке легкого, высокий уровень экспрессии CSTA коррелируется с прогрессированием плоскоклеточной карциномой пищевода, миоэпителиальные клетки экспрессируют стефин А в качестве супрессора ранней инвазии рака молочной железы.

Белки семейства матриксных металлопротеиназ (ММП) участвуют в процессах расщепления внеклеточного матрикса при нормальных физиологических процессах, таких как эмбриональное развитие, репродукция и ремоделирование тканей, а также при заболеваниях, таких как артрит и метастазирование [119]. Большинство ММП секретируются как неактивные про-протеины, которые активируются при расщеплении внеклеточными протеиназами. Фермент, кодируемый этим геном, разрушает коллагены IV и V типов. Ряд исследований предполагают, что фермент участвует в ИЛ-8-индуцированной мобилизации гемопоэтических клеток-предшественников из костного мозга, а исследования на мышцах предполагают роль в ремоделировании тканей, связанных с опухолью.

S100 A9 (S100A9), также известный как кальгранулин В и MRP14, кодируется геном S100A9. Белки S100 локализуются в цитоплазме или ядре целого спектра клеток и участвуют в регуляции ряда клеточных процессов, таких как прогрессирование и дифференцировка клеточного цикла. Гены S100 включают в себя по меньшей мере 13 членов, которые расположены в виде кластера на хромосоме 1q21. Этот белок может функционировать в ингибировании казеинкиназы.

Комплексы S100 A9 с MRP-8 (S100A8) регулируют функцию миелоидных клеток, связываясь с Toll-подобным рецептором 4 (TLR4). Изменение экспрессии белка S100A9 может быть ассоциирована с муковисцидозом. Комплекс MRP-8/14 широко регулирует воспаление сосудов и способствует биологическому ответу на повреждение сосудов, способствуя перераспределению лейкоцитов [120].

S100A9 также участвует в аномальной дифференцировке миелоидных клеток в строме опухолей и в развитии лейкемии [121-122], что способствует созданию общей иммуносупрессивной микросреды, которая может способствовать неспособности защитного или терапевтического клеточного иммунного ответа. Комплекс S100A9 /A8 также рассматриваются как белки-маркеры для ряда воспалительных заболеваний, особенно при ревматоидном артрите.

В соответствии с T.Weiland *и соавт.* [101] в настоящее время ни в одном исследовании не был обнаружен маркер специфичный только для ВПЧ-ассоциированной патологии вне зависимости от локализации, который можно было бы использовать для диагностики, контроля лечения или раннего обнаружения рецидива ВПЧ-ассоциированного рака. В исследовании T.Weiland в качестве биомаркера ВПЧ-ассоциированного рака был предложен DRH1 – специфичное моноклональное антитело капсидного белка L1 ВПЧ 16 типа [101]. До настоящего времени капсидные белки L1 и, особенно, гуморальный иммунный ответ на данные белки не считался подходящим маркером раннего обнаружения ВПЧ-ассоциированного рака, так как считалось, что экспрессия капсидного белка L1 производится только окончательно дифференцированными клетками и не производится опухолями, а также то, что гуморальный иммунный ответ на L1 белки отражает инфицирование ВПЧ в течение

жизни, а не активный процесс. В человеческом организме DRH1 связаны с ВПЧ-ассоциированными опухолями и могут быть использованы для предсказания течения заболевания. В проспективном пилотном исследовании было продемонстрировано, что антитела DRH1 могут выявляться за 293 дней до обнаружения опухоли.

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 соответствии с пятой задачей исследования был проведен анализ мРНК 12 генов человека: MKI67, PGR, CDKN2A, MYBL2, UBE2T, EHO1, SERPINB5, CCNB1, ESR1, BAG1, BCL2 и ANLN среди вакцинированных и невакцинированных женщин с цитологическим заключением NILM. Статистически значимые отличия в экспрессии ($p < 0,05$) были выявлены для следующих генов: MYBL2 ($p = 0,025$), SERPINB5 ($p = 0,016$), CCNB1 ($p = 0,043$). Было отмечено снижение уровня экспрессии мРНК в группе вакцинированных пациенток (NILM) по сравнению с группой невакцинированных пациенток (NILM): MYBL2 – в 1,2 раза (рис. 16), CCNB1 – в 1,6 раз (рис. 17), SERPINB5 – в 1,8 раз (рис. 18).

SERPINB5 (serpin family B member 5) кодирует белок maspin (mammary serine protease inhibitor). Ген экспрессируется в основном в пищеводе, коже, мочевом пузыре, двенадцатиперстной и тонкой кишке. Изначально считалось, что SERPINB5 – ген-супрессор опухолей эпителиальных клеток, способный супрессировать возможность опухолевых клеток к инвазии и метастазов в другие ткани [111], однако в дальнейших исследованиях [112] участие SERINB5 в биологических процессах опухолей была опровергнута. Белок maspin не экспрессируется в раннем эмбриогенезе. Точные функции maspin в настоящее время неизвестны, существуют данные о его участии в воспалении, особенно при раке и опухолевых процессах. При этом публикуются работы, рассматривающие изменения экспрессии maspin при аденокарциноме

пищевода в качестве возможного маркера для прицельного скрининга [113] и статус метилирования гена *SERPВ5* для оценки прогноза при раке желчного пузыря [114]. Также опубликованы исследования, показывающие роль *maspin* в развитии воспаления при красном плоском лишае ротовой полости. Вероятно, при лечении данный белок может являться терапевтической мишенью [115].

Ген *CCNB1* кодирует белок циклин В1 (*G2/mitotic-specific cyclin-B1*, циклин В1, специфичный для митоза) – регуляторный белок, участвующий в митозе. Циклин В1 функционирует как «выключатель», регулируя вступление клетки в митоз. Одним из главных свойств рака является нарушение регуляции клеточного цикла. Роль циклина В1 – перевести клетку из фазы G2 в фазу М, но при опухолях происходит гиперэкспрессия циклин В1 и присоединение к *Cdks*, что приводит к неконтролируемому клеточному росту. Данный процесс происходит при инактивации белка онко-супрессора *p53*, т.к. *p53* способен подавить гиперэкспрессию циклина В1 [116].

Высокая экспрессия циклина В1 обнаружены при целом спектре опухолей, например, при раке молочной железы, желудка, области головы и шеи, простаты, колоректальном раке, раке полости рта и пищевода. Уровень экспрессии циклина В1 может коррелировать с уровнем инвазии и агрессивностью рака, поэтому данный белок, вероятно, может применяться для прогнозирования течения онко-заболеваний. Отмечается значительное повышение экспрессии циклин В1/*cdc2* в ткани опухоли молочной железы и при метастазировании. Опубликованы работы, демонстрирующие, что уменьшение экспрессии циклина В1 может приводить к регрессии опухоли [116-117]. Вероятным методом супрессии опухоли может являться внедрение гена или белка, нацеленного на разрушение циклин В1, т.к. циклин В1 необходим для выживания опухолевых клеток – уменьшение его уровня приводит к гибели опухолевых клеток и не влияет на гибель нормальных клеток. Гибель клеток достигается нарушением деления клеток в фазе G2 и нарушением конденсации и движения хромосом.

По данным V.Colmenares *и соавт.* [102] ВПЧ способен ингибировать секрецию гамма-интерферона (IFN- γ) и экспрессию некоторых рецепторов иммунных врожденных клеток. ILT2 (immunoglobulin-like transcript 2, иммуноглобулиноподобный транскрипт 2) является регуляторным рецептором, который, возможно участвует в патогенезе вирусной инфекции. В исследовании V.Colmenares изучили экспрессию ILT2 и других рецепторов NK-клеток у 23 здоровых женщин до и после иммунизации четырехвалентной вакциной против ВПЧ. После проведения вакцинации было определено значительное увеличение экспрессии ILT2 NK-клетками и CD3(+) CD56(+) лимфоцитами и моноцитами, а также значительное увеличение экспрессии NKG2D, NKp30 и NKp46 NK-клетками и CD3(+) CD56(+) лимфоцитами [102]. Продемонстрированные данные указывают на то, что вакцинация от ВПЧ связана со значительными изменениями экспрессии и функции различных врожденных иммунных рецепторов, включая ILT2, которые могут участвовать в защитном действии вакцин против ВПЧ.

В качестве потенциального маркера дифференциальной диагностики степени тяжести также рассматривался маркер СК7 (цитокератин 7). В настоящее время для точной верификации гистологического диагноза CIN2 рекомендуется проводить ИГХ-исследование экспрессии онкобелка p16. В исследовании B.Umphress *и соавт.* приняло участие 116 пациенток с первичным диагнозом CIN2. В 68,1% случаев был выявлен p16, в 90,5% – СК7. Чувствительность СК7 для CIN2 составила 100% [103], а p16 – 95,5% (21/22 случаев), а то время как специфичность для прогнозирования последующего развития CIN 3 существенно отличалась: p16 – 37,4%, а СК7 – 8% ($p < 0,01$). СК7, в отличие от p16, не является эффективным прогностическим маркером CIN2, но потенциально может быть эффективным прогностическим маркером CIN1 [103].

Полученные нами результаты о снижении экспрессии генов мРНК (MYBL2, CCNB1, SERPINB5) свидетельствуют о снижении пролиферативной активностью клеток, обусловленной отсутствием активности ВПЧ у вакцинированных женщин.

Указанные гены могут быть использованы в качестве диагностической панели течения ПВИ для вакцинированных от ВПЧ женщин, имеющих ВПЧ.

По итогам проведенного исследования нами были выявлены маркеры (белки ЦВЖ методом масс-спектрометрии) для определения группы риска по развитию неопластических процессов шейки матки в дополнение к клиническим, морфологическим и молекулярно-генетическим методам исследования. 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 (Приложение Б).

ВЫВОДЫ

1. Выявлена высокая частота ВПЧ в когорте российских женщин, ранее вакцинированных от ВПЧ (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 2 (А9: $p < 0,01$, А7: $p < 0,01$) и 3 (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 (CIN 1) у вакцинированных женщин участвовали ВПЧ филогенетических групп А6, А9: ВПЧ 56 и 16 типов (9,6%).
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

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

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

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

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

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 СОКРАЩЕНИЙ

АБЭ – ацетобелый эпителий

БШМ – биопсия шейки матки

ВАК – высшая аттестационная комиссия

ВИЧ – вирус иммунодефицита человека

ВПЧ – вирус папилломы человека

ДИ – доверительный интервал

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ЗТ – зона трансформации

ИМТ – индекс массы тела

ИППП – инфекции, передаваемые половым путем

КС – кольпоскопия

мРНК – микро рибонуклеиновая кислота

НМИЦ АГП – Научный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии

Пап-тест – тест по Папаниколау

ПВИ – папилломавирусная инфекция

ПЦР – полимеразно-цепная реакция

РШМ – рак шейки матки

ФГБУ – Федеральное государственное бюджетное учреждение

ASC-H – atypical squamous cells, cannot exclude high-grade squamous intraepithelial lesion

ASC-US – atypical squamous cells of undetermined significance

CIN – cervical intraepithelial neoplasia

FDA – food and drug administration

HPV – human papilloma virus

HSIL – high-grade squamous intraepithelial lesions

LSIL – low-grade squamous intraepithelial lesions

NILM – negative for intraepithelial lesion or malignancy

IARC – International Agency for Research on Cancer (Международное агентство по изучению рака)

SIL – squamous intraepithelial lesions

TBS – terminology Bethesda system

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans IARC Monographs, Volume 100 (B), ISBN-13 9789283213192, ISBN-10 928321319X. 2012.
2. 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
3. Muñoz N, Kjaer SK, Sigurdsson K, Iversen OE, Hernandez-Avila M, Wheeler CM, Perez G, Brown DR, Koutsky LA, Tay EH, Garcia PJ, Ault KA, Garland SM, Leodolter S, Olsson SE, Tang GW, Ferris DG, Paavonen J, Steben M, Bosch FX, Dillner J, Huh WK, Joura EA, Kurman RJ, Majewski S, Myers ER, Villa LL, Taddeo FJ, Roberts C, Tadesse A, Bryan JT, Lupinacci LC, Giacoletti KE, Sings HL, James MK, Hesley TM, Barr E, Haupt RM. Impact of human papillomavirus (HPV)-6/11/16/18 vaccine on all HPV-associated genital diseases in young women // *J Natl Cancer Inst*. 2010 Mar 3;102(5):325-39. doi: 10.1093/jnci/djp534. Epub 2010 Feb 5. PMID: 20139221.
4. Enerly E, Flingtorp R, Christiansen IK, Campbell S, Hansen M, Myklebust TÅ, Weiderpass E, Nygård M. An observational study comparing HPV prevalence and type distribution between HPV-vaccinated and -unvaccinated girls after introduction of school-based HPV vaccination in Norway. *PLoS One*. 2019 Oct 10;14(10):e0223612. doi: 10.1371/journal.pone.0223612. // *PLoS One*. 2019 Dec 12;14(12):e0226706. PMID: 31600341; PMCID: PMC6786612.
5. Patel C, Brotherton JM, Pillsbury A, Jayasinghe S, Donovan B, Macartney K, Marshall H. The impact of 10 years of human papillomavirus (HPV) vaccination in Australia: what additional disease burden will a nonavalent vaccine prevent? // *Euro Surveill*. 2018 Oct;23(41):1700737. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2018.23.41.1700737. PMID: 30326995; PMCID: PMC6194907.
6. Jacot-Guillarmod M, Pasquier J, Greub G, Bongiovanni M, Ahtari C, Sahli R. Impact of HPV vaccination with Gardasil® in Switzerland // *BMC Infect Dis*. 2017 Dec

- 22;17(1):790. doi: 10.1186/s12879-017-2867-x. PMID: 29273004; PMCID: PMC5741926.
7. Shilling H, Murray G, Brotherton JML, Hawkes D, Saville M, Sivertsen T, Chambers I, Roberts J, Farnsworth A, Garland SM, Hocking JS, Kaldor J, Guy R, Atchison S, Costa AM, Molano M, Machalek DA. Monitoring human papillomavirus prevalence among young Australian women undergoing routine chlamydia screening // *Vaccine*. 2020 Jan 29;38(5):1186-1193. doi: 10.1016/j.vaccine.2019.11.019. Epub 2019 Nov 22. PMID: 31767467.
 8. Starodubtseva NL, Brzhozovskiy AG, Bugrova AE, Kononikhin AS, Indeykina MI, Gusakov KI, Chagovets VV, Nazarova NM, Frankevich VE, Sukhikh GT, Nikolaev EN. Label-free cervicovaginal fluid proteome profiling reflects the cervix neoplastic transformation // *J Mass Spectrom*. 2019 Aug;54(8):693-703. doi: 10.1002/jms.4374. PMID: 31116903.
 9. Marc Steben, Mattea Tan Thompson, Caroline Rodier, Nathalie Mallette, Voica Racovitan, Fern DeAngelis, Melissa Stutz, Emmanouil Rampakakis, A Review of the Impact and Effectiveness of the Quadrivalent Human Papillomavirus Vaccine: 10 Years of Clinical Experience in Canada // *Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada*, Volume 40, Issue 12, 2018, ISSN 1701-2163, <https://doi.org/10.1016/j.jogc.2018.05.024>.
 10. Lehtinen M, Lagheden C, Luostarinen T, Eriksson T, Apter D, Harjula K, Kuortti M, Natunen K, Palmroth J, Petäjä T, Pukkala E, Siitari-Mattila M, Struyf F, Nieminen P, Paavonen J, Dubin G, Dillner J. Ten-year follow-up of human papillomavirus vaccine efficacy against the most stringent cervical neoplasia end-point-registry-based follow-up of three cohorts from randomized trials // *BMJ Open*. 2017 Aug 18;7(8):e015867. doi: 10.1136/bmjopen-2017-015867. PMID: 28821519; PMCID: PMC5629648.
 11. Human Papillomavirus (HPV) Vaccine Merck Sharp; Dohme, August 2019 [Электронный ресурс] URL: <https://www.msdmanuals.com/home/infections/immunization/human-papillomavirus-hpv-vaccine>

12. FDA approves expanded use of Gardasil 9 to include individuals 27 through 45 years old. U.S. Food & Drug Administration, 5 October 2018;
13. FUTURE II Study Group. Quadrivalent vaccine against human papillomavirus to prevent high-grade cervical lesions // *N Engl J Med.* 2007 May 10;356(19):1915-27. doi: 10.1056/NEJMoa061741. PMID: 17494925.
14. Garland SM, Hernandez-Avila M, Wheeler CM, Perez G, Harper DM, Leodolter S, Tang GW, Ferris DG, Steben M, Bryan J, Taddeo FJ, Railkar R, Esser MT, Sings HL, Nelson M, Boslego J, Sattler C, Barr E, Koutsky LA; Females United to Unilaterally Reduce Endo/Ectocervical Disease (FUTURE) I Investigators. Quadrivalent vaccine against human papillomavirus to prevent anogenital diseases // *N Engl J Med.* 2007 May 10;356(19):1928-43. doi: 10.1056/NEJMoa061760. PMID: 17494926.
15. C.M. Fguquet; 8th ICTV Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, Ver. 4, based on Virus Taxonomy // Elsevier, Academic Press, 2005; – 1259 p.
16. Castellsague X, de Sanjose S, Aguado KS; WHO/ICO Information Centre on HPV and Cervical Cancer. HPV and cervical cancer in the 2007 report. // *Vaccine*, 25: Suppl 3C1-C230. PMID:18068032
17. Egawa K. Do human papillomaviruses target epidermal stem cells? // *Dermatology.* 2003;207(3):251-4. doi: 10.1159/000073085. PMID: 14571065.
18. Herfs, M.; Vargas, S.O.; Yamamoto, Y.; Howitt, B.E.; Nucci, M.R.; Hornick, J.L.; McKeon, F.D.; Xian, W.; Crum, C.P. A novel blueprint for “top down” differentiation defines the cervical squamocolumnar junction during development, reproductive life, and neoplasia. // *J. Pathol.* 2013, 229, 460–468.
19. Herfs, M.; Yamamoto, Y.; Laury, A.; Wang, X.; Nucci, M.R.; McLaughlin-Drubin, M.E.; Munger, K.; Feldman, S.; McKeon, F.D.; Xian, W.; et al. A discrete population of squamocolumnar junction cells implicated in the pathogenesis of cervical cancer. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2012, 109, 10516–10521.
20. Potten CS. Cell replacement in epidermis (keratopoiesis) via discrete units of proliferation. // *Int Rev Cytol.* 1981;69:271-318. doi: 10.1016/s0074-7696(08)62326-8. PMID: 6163744.

21. Schmitt, A.; Rochat, A.; Zeltner, R.; Borenstein, L.; Barrandon, Y.; Wettstein, F.O.; Iftner, T. The primary target cells of the high-risk cottontail rabbit papillomavirus colocalize with hair follicle stem cells. // *J. Virol.* 1996, 70, 1912–1922.
22. Steben M., Tan Thompson M., Rodier C. Review of the Impact and Effectiveness of the Quadrivalent Human Papillomavirus Vaccine: 10 Years of Clinical Experience in Canada. // *J Obstet Gynaecol Can.* 2018 Dec;40(12):1635-1645.
23. Мальцева Л.И., Ахметзянова А.В., Фаррахова Л.Н., and Нигматуллина Н.А.. "Цервикальная интраэпителиальная неоплазия: возможности диагностики и лечения" // *Практическая медицина*, no. 9 (65), 2012, pp. 52-55.
24. Bruni L. et al. IARC/ICO Information Centre on HPV and Cancer (HPV Information Centre). Human Papillomavirus and Related Diseases in Russian Federation. Summary Report 10 December 2018. [Электронный ресурс] URL: <http://www.hpvcentre.net/statistics/reports/RUS.pdf?t=1548009998402>
25. Грецова О.П., Костин А.А., Самсонов Ю.В., Петрова Г.В., Простов М.Ю., Простов Ю.И. ЗАБОЛЕВАЕМОСТЬ И СМЕРТНОСТЬ ОТ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ВИРУСОМ ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА // *Исследования и практика в медицине.* 2017;4(3):33-50.
26. Greer CE, Wheeler CM, Ladner MB, Beutner K, Coyne MY, Liang H, Langenberg A, Yen TS, Ralston R. Human papillomavirus (HPV) type distribution and serological response to HPV type 6 virus-like particles in patients with genital warts. // *J Clin Microbiol.* 1995 Aug;33(8):2058-63. doi: 10.1128/JCM.33.8.2058-2063.1995. PMID: 7559948; PMCID: PMC228335.
27. Sturegård E, Johansson H, Ekström J, Hansson BG, Johnsson A, Gustafsson E, Dillner J, Forslund O. Human papillomavirus typing in reporting of condyloma. // *Sex Transm Dis.* 2013 Feb;40(2):123-9. doi: 10.1097/OLQ.0b013e31827aa9b3. Erratum in: *Sex Transm Dis.* 2013 Sep;40(9):760. PMID: 23324975.
28. Castellsague X, Cohet C, Puig-Tintore LM, Acebes LO, Salinas J, San Martin M, Breitscheidel L, Remy V: Epidemiology and cost of treatment of genital warts in Spain. // *Eur J Public Health.* 2009, 19: 106-110.

29. Desai S, Wetten S, Woodhall SC, Peters L, Hughes G, Soldan K. Genital warts and cost of care in England. // *Sex Transm Infect.* 2011 Oct;87(6):464-8. doi: 10.1136/sti.2010.048421. Epub 2011 Aug 3. PMID: 21813567; PMCID: PMC3253068.
30. Patel H, Wagner M, Singhal P, Kothari S. Systematic review of the incidence and prevalence of genital warts. // *BMC Infect Dis.* 2013 Jan 25;13:39. doi: 10.1186/1471-2334-13-39. PMID: 23347441; PMCID: PMC3618302.
31. HPV and Men - Fact Sheet Centers for Disease Control and Prevention (CDC), February 4, 2015 // Папилломавирусная инфекция (ВПЧ) у мужчин. Вопросы и ответы. Официальная позиция CDC (Национального центра по контролю и профилактике заболеваний), США, 2015 г.
32. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Human papillomavirus–associated cancers—United States. *Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR)* 2012;61(15):258–261
33. Zhou J., Frazer I.H. Expression of vaccinia recombinant HPV 16 L1 and L2 ORF proteins in epithelial cells is sufficient for assembly of HPV virion-like particles. // *Virology.* 1991 Nov;185(1):251-7
34. Kirnbauer R, Booy F, Cheng N, Lowy DR, Schiller JT. Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 Dec 15;89(24):12180-4. doi: 10.1073/pnas.89.24.12180. PMID: 1334560; PMCID: PMC50722.
35. Human Papillomavirus (HPV) Vaccine Merck Sharp & Dohme, July 2018 [Электронный ресурс] URL: <https://www.msdmanuals.com/professional/infectious-diseases/immunization/human-papillomavirus-hpv-vaccine>
36. Еженедельный эпидемиологический бюллетень № 43, 2014,89, 465-492 Вакцины против папилломавирусной инфекции человека: документ по позиции ВОЗ, октябрь 2014 [Электронный ресурс] URL: https://www.who.int/immunization/policy/position_papers/PP_HPВ_Russian_Oct2014.pdf

37. FDA approves expanded use of Gardasil 9 to include individuals 27 through 45 years old. U.S. Food & Drug Administration, 5 October 2018. [Электронный ресурс] URL: <https://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm622715.htm>
38. Markowitz LE, Dunne EF, Saraiya M, et al.; Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Human papillomavirus vaccination: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep* 2014; 63 (No. RR-05): 1-30.
39. Вакцины против папилломавирусной инфекции человека: документ по позиции ВОЗ, октябрь 2014, N 43, 2014, 89, 465-492
40. An Advisory Committee Statement (ACS) National Advisory Committee on Immunization (NACI) "Updated Recommendations on Human Papillomavirus (HPV) vaccine and clarification of minimum intervals between doses in the HPV immunization schedule" July 2016.
41. An Advisory Committee Statement (ACS) National Advisory Committee on Immunization (NACI) "Updated Recommendations on Human Papillomavirus (HPV) Vaccines: 9-valent HPV vaccine 2-dose immunization schedule and the use of HPV vaccines in immunocompromised population, May 2017.
42. Schellenbacher C, Roden RBS, Kimbauer R. Developments in L2-based human papillomavirus (HPV) vaccines. // *Virus Res.* 2017 Mar 2;231:166-175. doi: 10.1016/j.virusres.2016.11.020. Epub 2016 Nov 23. PMID: 27889616; PMCID: PMC5549463..
43. Center for Disease Control and Prevention. Recommended Immunizations for Children 7-18 Years Old, 2018. January 17, 2018 CS289048-A [Электронный ресурс] URL: <https://www.cdc.gov/vaccines/schedules/downloads/teen/parent-version-schedule-7-18yrs.pdf>
44. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans IARC Monographs, Volume 100 (B), ISBN-13 9789283213192, ISBN-10 928321319X. 2012; – p261.
45. The FUTURE II Study Group. Quadrivalent vaccine against human papillomavirus to prevent high-grade cervical lesions // *N Eng J Med* 2007;356(19): 1915–27.

46. Garland S.M. et al. Quadrivalent vaccine against human papillomavirus to prevent anogenital diseases. // *N Engl J Med* 2007;356(19): 1928–43.
47. Joura EA, Leodolter S, Hernandez-Avila M, Wheeler CM, Perez G, Koutsky LA, Garland SM, Harper DM, Tang GW, Ferris DG, Steben M, Jones RW, Bryan J, Taddeo FJ, Bautista OM, Esser MT, Sings HL, Nelson M, Boslego JW, Sattler C, Barr E, Paavonen J. Efficacy of a quadrivalent prophylactic human papillomavirus (types 6, 11, 16, and 18) L1 virus-like-particle vaccine against high-grade vulval and vaginal lesions: a combined analysis of three randomised clinical trials. // *Lancet*. 2007 May 19;369(9574):1693-702. doi: 10.1016/S0140-6736(07)60777-6. PMID: 17512854.
48. Lehtinen M, Lagheden C, Luostarinen T, Eriksson T, Apter D, Harjula K, Kuortti M, Natunen K, Palmroth J, Petäjä T, Pukkala E, Siitari-Mattila M, Struyf F, Nieminen P, Paavonen J, Dubin G, Dillner J. Ten-year follow-up of human papillomavirus vaccine efficacy against the most stringent cervical neoplasia end-point-registry-based follow-up of three cohorts from randomized trials. *BMJ Open*. 2017 Aug 18;7(8):e015867. doi: 10.1136/bmjopen-2017-015867. PMID: 28821519; PMCID: PMC5629648.
49. WHO vaccine-preventable diseases: monitoring system. 2020 global summary, 2020 [Электронный ресурс] URL:
http://apps.who.int/immunization_monitoring/globalsummary/schedules?sc%5Br%5D%5B%5D=AFRO&sc%5Br%5D%5B%5D=AMRO&sc%5Br%5D%5B%5D=EMRO&sc%5Br%5D%5B%5D=EURO&sc%5Br%5D%5B%5D=SEARO&sc%5Br%5D%5B%5D=WPRO&sc%5Bd%5D=&sc%5Bv%5D%5B%5D=HPV&sc%5BOK%5D=OK
50. Human Papillomavirus and Related Diseases Report UNITED ARAB EMIRATES United Arab Emirates 2019 [Электронный ресурс] URL:
<https://hpcvcentre.net/statistics/reports/ARE.pdf>
51. Vaccine Scheduler, HPV vaccination, Slovakia 2019 [Электронный ресурс] URL:
<https://vaccine-schedule.ecdc.europa.eu/Scheduler/ByDisease?SelectedDiseaseId=38&SelectedCountryIdByDisease=187>
52. HPV vaccination in adults in Bahamas [Электронный ресурс] URL:

<https://www.gov.bm/immunization-schedules-children-and-adults>

53. Gardasil use Gibraltar [Электронный ресурс] URL: <https://www.gibraltar.gov.gi/new/sites/default/files/press/2018/Press%20Releases/479-2018.pdf>
54. Vaccination HPV in Puerto Rico [Электронный ресурс] URL: <http://www.salud.gov.pr/Dept-de-Salud/Documents/itinerarioVacNinosAdol2017%202.pdf>
55. HPV vaccination Virgin islands [Электронный ресурс] URL: <https://doh.vi.gov/programs/family-planning/discover/reproductive-cancers/hpv-who-should-get-vaccine> \
56. Vaccine Scheduler, HPV vaccination Europe [Электронный ресурс] URL: <https://vaccine-schedule.ecdc.europa.eu/Scheduler/ByDisease?SelectedDiseaseId=38&SelectedCountryIdByDisease=-1>
57. WHO. Vaccine in National Immunization Programme Update October 2019. [Электронный ресурс] URL: https://www.who.int/immunization/monitoring_surveillance/en/d
58. Patel C, Brotherton JM, Pillsbury A, Jayasinghe S, Donovan B, Macartney K, Marshall H. The impact of 10 years of human papillomavirus (HPV) vaccination in Australia: what additional disease burden will a nonavalent vaccine prevent? // *Euro Surveill.* 2018 Oct;23(41):1700737. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2018.23.41.1700737. PMID: 30326995; PMCID: PMC6194907.
59. Korostil IA, Ali H, Guy RJ, Donovan B, Law MG, Regan DG. Near elimination of genital warts in Australia predicted with extension of human papillomavirus vaccination to males. // *Sex Transm Dis.* 2013 Nov;40(11):833-5. doi: 10.1097/OLQ.000000000000030. PMID: 24113401.
60. Paz-Zulueta M, Álvarez-Paredes L, Rodríguez Díaz JC, Parás-Bravo P, Andrada Becerra ME, Rodríguez Ingelmo JM, Ruiz García MM, Portilla J, Santibañez M. Prevalence of high-risk HPV genotypes, categorised by their quadrivalent and nine-valent HPV vaccination coverage, and the genotype association with high-grade

- lesions. // *BMC Cancer*. 2018 Jan 30;18(1):112. doi: 10.1186/s12885-018-4033-2. PMID: 29382323; PMCID: PMC5791190.
61. Jeannot E, Viviano M, de Pree C, Amadane M, Kabengele E, Vassilakos P, Petignat P. Prevalence of Vaccine Type Infections in Vaccinated and Non-Vaccinated Young Women: HPV-IMPACT, a Self-Sampling Study // *Int J Environ Res Public Health*. 2018 Jul 9;15(7):1447. doi: 10.3390/ijerph15071447. PMID: 29987255; PMCID: PMC6069376.
62. Lehtinen M, Lagheden C, Luostarinen T, Eriksson T, Apter D, Harjula K, Kuortti M, Natunen K, Palmroth J, Petäjä T, Pukkala E, Siitari-Mattila M, Struyf F, Nieminen P, Paavonen J, Dubin G, Dillner J. Ten-year follow-up of human papillomavirus vaccine efficacy against the most stringent cervical neoplasia end-point-registry-based follow-up of three cohorts from randomized trials. // *BMJ Open*. 2017 Aug 18;7(8):e015867. doi: 10.1136/bmjopen-2017-015867. PMID: 28821519; PMCID: PMC5629648.
63. World Health Organization, Weekly epidemiological record №21, 2014; 64. Two-dose schedules for human papillomavirus vaccine: Systematic review and meta-analysis Maddalena D'Addario, Shelagh Redmond, *Vaccine*, Elsevier, May 2017;
64. D'Addario M, Redmond S, Scott P, Egli-Gany D, Riveros-Balta AX, Henao Restrepo AM, Low N. Two-dose schedules for human papillomavirus vaccine: Systematic review and meta-analysis. // *Vaccine*. 2017 May 19;35(22):2892-2901. doi: 10.1016/j.vaccine.2017.03.096. Epub 2017 Apr 25. PMID: 28455170.
65. Zou Z, Anisowicz A, Hendrix MJ, Thor A, Neveu M, Sheng S, Rafidi K, Seftor E, Sager R. Maspin, a serpin with tumor-suppressing activity in human mammary epithelial cells. // *Science*. 1994 Jan 28;263(5146):526-9. doi: 10.1126/science.8290962. PMID: 8290962.
66. Teoh SS, Vieusseux J, Prakash M, Berkowicz S, Luu J, Bird CH, Law RH, Rosado C, Price JT, Whisstock JC, Bird PI 2014. Maspin is not required for embryonic development or tumour suppression. // *Nat Commun*. 5: 3164. Bibcode:2014NatCo...5.3164T. doi:10.1038/ncomms4164. PMC 3905777. PMID 24445777

67. Dzinic SH, Mahdi Z, Bernardo MM, et al. Maspin differential expression patterns as a potential marker for targeted screening of esophageal adenocarcinoma/gastroesophageal junction adenocarcinoma. // *PLoS One*. 2019;14(4):e0215089. 2019 Apr 19. doi:10.1371/journal.pone.0215089
68. Baghel K, Kazmi HR, Chandra A, Raj S, Srivastava RN. Significance of methylation status of MASPIN gene and its protein expression in prognosis of gallbladder cancer. *Asia Pac // J Clin Oncol*. 2019;15(5):e120-e125. doi:10.1111/ajco.13129
69. Xu N, Li B, Liu Z, et al. Role of mammary serine protease inhibitor on the inflammatory response in oral lichen planus. // *Oral Dis*. 2019;25(4):1091-1099. doi:10.1111/odi.13054
70. Mohammad Sabbaghi, Gabriel Gil-Gómez, et al. Defective Cyclin B1 Induction in Trastuzumab-emtansine (T-DM1) Acquired Resistance in HER2-positive Breast Cancer // *Clin Cancer Res* 2017 doi: 10.1158/1078-0432.CCR-17-0696
71. Chenyang Ye, Ji Wang, et al. Prognostic role of cyclin B1 in solid tumors: a meta-analysis. // *Oncotarget*. 2017
72. Song W, Guo C, Chen J, Duan S, Hu Y, Zou Y, Chi H, Geng J, Zhou J. Silencing PSME3 induces colorectal cancer radiosensitivity by downregulating the expression of cyclin B1 and CKD1. // *Exp Biol Med (Maywood)*. 2019 Nov;244(16):1409-1418. doi: 10.1177/1535370219883408. Epub 2019 Oct 20. PMID: 31630568; PMCID: PMC6900698.
73. Mayer MP, Bukau B. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. // *Cell Mol Life Sci*. 2005 Mar;62(6):670-84. doi: 10.1007/s00018-004-4464-6. PMID: 15770419; PMCID: PMC2773841.
74. Sánchez L, Calvo M, Brock JH. Biological role of lactoferrin. // *Arch Dis Child*. 1992 May;67(5):657-61. doi: 10.1136/adc.67.5.657. PMID: 1599309; PMCID: PMC1793702.
75. Kang JF, Li XL, Zhou RY, Li LH, Feng FJ, Guo XL. Bioinformatics analysis of lactoferrin gene for several species. // *Biochem Genet*. 2008 Jun;46(5-6):312-22. doi: 10.1007/s10528-008-9147-9. Erratum in: *Biochem Genet*. 2009 Dec;47(11-12):911. PMID: 18228129.

76. Van de Bovenkamp JH, Mahdavi J, Korteland-Van Male AM, Büller HA, Einerhand AW, Borén T, Dekker J. The MUC5AC glycoprotein is the primary receptor for *Helicobacter pylori* in the human stomach. // *Helicobacter*. 2003;8(5):521-32. doi: 10.1046/j.1523-5378.2003.00173.x. PMID: 14535999.
77. Perez-Vilar J, Randell SH, Boucher RC. C-Mannosylation of MUC5AC and MUC5B Cys subdomains. // *Glycobiology*. 2004 Apr;14(4):325-37. doi: 10.1093/glycob/cwh041. Epub 2004 Jan 12. PMID: 14718370.
78. Kobayashi D, Koshida S, Moriai R, Tsuji N, Watanabe N. Olfactomedin 4 promotes S-phase transition in proliferation of pancreatic cancer cells. // *Cancer Sci*. 2007 Mar;98(3):334-40. doi: 10.1111/j.1349-7006.2007.00397.x. PMID: 17270022.
79. Liu W, Lee HW, Liu Y, Wang R, Rodgers GP. Olfactomedin 4 is a novel target gene of retinoic acids and 5-aza-2'-deoxycytidine involved in human myeloid leukemia cell growth, differentiation, and apoptosis. // *Blood*. 2010 Dec 2;116(23):4938-47. doi: 10.1182/blood-2009-10-246439. Epub 2010 Aug 19. PMID: 20724538; PMCID: PMC3012588.
80. McGrath JA, McMillan JR, Shemanko CS, Runswick SK, Leigh IM, Lane EB, Garrod DR, Eady RA. Mutations in the plakophilin 1 gene result in ectodermal dysplasia/skin fragility syndrome. // *Nat Genet*. 1997 Oct;17(2):240-4. doi: 10.1038/ng1097-240. PMID: 9326952.
81. Ryckman C, Vandal K, Rouleau P, Talbot M, Tessier PA. Proinflammatory activities of S100: proteins S100A8, S100A9, and S100A8/A9 induce neutrophil chemotaxis and adhesion. // *J Immunol*. 2003 Mar 15;170(6):3233-42. doi: 10.4049/jimmunol.170.6.3233. PMID: 12626582.
82. Nakatani Y, Yamazaki M, Chazin WJ, Yui S. Regulation of S100A8/A9 (calprotectin) binding to tumor cells by zinc ion and its implication for apoptosis-inducing activity. // *Mediators Inflamm*. 2005 Oct 24;2005(5):280-92. doi: 10.1155/MI.2005.280. PMID: 16258195; PMCID: PMC1279038.
83. Vogl T, Ludwig S, Goebeler M, Strey A, Thorey IS, Reichelt R, Foell D, Gerke V, Manitz MP, Nacken W, Werner S, Sorg C, Roth J. MRP8 and MRP14 control microtubule reorganization during transendothelial migration of phagocytes. // *Blood*.

- 2004 Dec 15;104(13):4260-8. doi: 10.1182/blood-2004-02-0446. Epub 2004 Aug 26. PMID: 15331440.
84. Sroussi HY, Köhler GA, Agabian N, Villines D, Palefsky JM. Substitution of methionine 63 or 83 in S100A9 and cysteine 42 in S100A8 abrogate the antifungal activities of S100A8/A9: potential role for oxidative regulation. // *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2009 Jan;55(1):55-61. doi: 10.1111/j.1574-695X.2008.00498.x. Epub 2008 Dec 11. PMID: 19087201; PMCID: PMC2730662.
85. Ghavami S, Eshragi M, Ande SR, Chazin WJ, Klonisch T, Halayko AJ, McNeill KD, Hashemi M, Kerkhoff C, Los M. S100A8/A9 induces autophagy and apoptosis via ROS-mediated cross-talk between mitochondria and lysosomes that involves BNIP3. // *Cell Res*. 2010 Mar;20(3):314-31. doi: 10.1038/cr.2009.129. Epub 2009 Nov 24. PMID: 19935772; PMCID: PMC4161879.
86. Atallah M, Krispin A, Trahtemberg U, Ben-Hamron S, Grau A, Verbovetski I, Mevorach D. Constitutive neutrophil apoptosis: regulation by cell concentration via S100 A8/9 and the MEK-ERK pathway. // *PLoS One*. 2012;7(2):e29333. doi: 10.1371/journal.pone.0029333. Epub 2012 Feb 17. PMID: 22363402; PMCID: PMC3281816.
87. Jacot-Guillarmod M, Pasquier J, Greub G, Bongiovanni M, Ahtari C, Sahli R. Impact of HPV vaccination with Gardasil® in Switzerland. // *BMC Infect Dis*. 2017 Dec 22;17(1):790. doi: 10.1186/s12879-017-2867-x. PMID: 29273004; PMCID: PMC5741926.
88. Enerly E, Flintorp R, Christiansen IK, Campbell S, Hansen M, Myklebust TÅ, Weiderpass E, Nygård M. An observational study comparing HPV prevalence and type distribution between HPV-vaccinated and -unvaccinated girls after introduction of school-based HPV vaccination in Norway. // *PLoS One*. 2019 Oct 10;14(10):e0223612. doi: 10.1371/journal.pone.0223612. Erratum in: *PLoS One*. 2019 Dec 12;14(12):e0226706. PMID: 31600341; PMCID: PMC6786612.
89. Patel C, Brotherton JM, Pillsbury A, Jayasinghe S, Donovan B, Macartney K, Marshall H. The impact of 10 years of human papillomavirus (HPV) vaccination in Australia: what additional disease burden will a nonavalent vaccine prevent? // *Euro Surveill*.

2018 Oct;23(41):1700737. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2018.23.41.1700737. PMID: 30326995; PMCID: PMC6194907.

90. Shilling H, Murray G, Brotherton JML, Hawkes D, Saville M, Sivertsen T, Chambers I, Roberts J, Farnsworth A, Garland SM, Hocking JS, Kaldor J, Guy R, Atchison S, Costa AM, Molano M, Machalek DA. Monitoring human papillomavirus prevalence among young Australian women undergoing routine chlamydia screening. // *Vaccine*. 2020 Jan 29;38(5):1186-1193. doi: 10.1016/j.vaccine.2019.11.019. Epub 2019 Nov 22. PMID: 31767467.
91. Muñoz N, Kjaer SK, Sigurdsson K, Iversen OE, Hernandez-Avila M, Wheeler CM, Perez G, Brown DR, Koutsky LA, Tay EH, Garcia PJ, Ault KA, Garland SM, Leodolter S, Olsson SE, Tang GW, Ferris DG, Paavonen J, Steben M, Bosch FX, Dillner J, Huh WK, Joura EA, Kurman RJ, Majewski S, Myers ER, Villa LL, Taddeo FJ, Roberts C, Tadesse A, Bryan JT, Lupinacci LC, Giacoletti KE, Sings HL, James MK, Hesley TM, Barr E, Haupt RM. Impact of human papillomavirus (HPV)-6/11/16/18 vaccine on all HPV-associated genital diseases in young women. // *J Natl Cancer Inst*. 2010 Mar 3;102(5):325-39. doi: 10.1093/jnci/djp534. Epub 2010 Feb 5. PMID: 20139221.
92. Arbyn M, Benoy I, Simoens C, Bogers J, Beutels P, Depuydt C. Pre vaccination distribution of human papillomavirus types in women attending at cervical cancer screening in Belgium. // *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009 Jan;18(1):321-30. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-08-0510. PMID: 19124515.
93. Garland SM, Hernandez-Avila M, Wheeler CM, Perez G, Harper DM, Leodolter S, Tang GW, Ferris DG, Steben M, Bryan J, Taddeo FJ, Railkar R, Esser MT, Sings HL, Nelson M, Boslego J, Sattler C, Barr E, Koutsky LA; Females United to Unilaterally Reduce Endo/Ectocervical Disease (FUTURE) I Investigators. Quadrivalent vaccine against human papillomavirus to prevent anogenital diseases. // *N Engl J Med*. 2007 May 10;356(19):1928-43. doi: 10.1056/NEJMoa061760. PMID: 17494926.
94. Jeannot E, Viviano M, de Pree C, Amadane M, Kabengele E, Vassilakos P, Petignat P. Prevalence of Vaccine Type Infections in Vaccinated and Non-Vaccinated Young Women: HPV-IMPACT, a Self-Sampling Study. // *Int J Environ Res Public Health*.

- 2018 Jul 9;15(7):1447. doi: 10.3390/ijerph15071447. PMID: 29987255; PMCID: PMC6069376.
95. WHO: Guide to Introducing HPV Vaccine into National Immunization Programmes 20 October 2016 [Электронный ресурс] URL: https://www.who.int/immunization/diseases/hpv/HPV_vaccine_intro_guide_draft_Nov2016.pdf
96. USA National Cancer Institute: Human Papillomavirus (HPV) Vaccines 2019
97. FUTURE II Study Group. Quadrivalent vaccine against human papillomavirus to prevent high-grade cervical lesions. // *N Engl J Med*. 2007 May 10;356(19):1915-27. doi: 10.1056/NEJMoa061741. PMID: 17494925.
98. Brown DR, Kjaer SK, Sigurdsson K, Iversen OE, Hernandez-Avila M, Wheeler CM, Perez G, Koutsky LA, Tay EH, Garcia P, Ault KA, Garland SM, Leodolter S, Olsson SE, Tang GW, Ferris DG, Paavonen J, Steben M, Bosch FX, Dillner J, Joura EA, Kurman RJ, Majewski S, Muñoz N, Myers ER, Villa LL, Taddeo FJ, Roberts C, Tadesse A, Bryan J, Lupinacci LC, Giacoletti KE, Sings HL, James M, Hesley TM, Barr E. The impact of quadrivalent human papillomavirus (HPV; types 6, 11, 16, and 18) L1 virus-like particle vaccine on infection and disease due to oncogenic nonvaccine HPV types in generally HPV-naive women aged 16-26 years. // *J Infect Dis*. 2009 Apr 1;199(7):926-35. doi: 10.1086/597307. PMID: 19236279.
99. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. IARC press; 2007.
100. Halfon P, Ravet S, Khiri H, Penaranda G, Lefoll C. Incident HPV 51 Infection After Prophylactic Quadrivalent Human Papillomavirus (Types 6, 11, 16, and 18) L1 Virus-Like Particle Vaccine Gardasil/Silgard. // *Clin Med Insights Case Rep*. 2010;3:69-71. doi: 10.4137/CCRep.S6177. Epub 2010 Dec 16. PMID: 21769258; PMCID: PMC3046010.
101. Weiland T, Eckert A, Tomazic PV, Wolf A, Pondorfer P, Vasicek S, Graupp M, Holzmeister C, Moser U, Andrianakis A, Kangler G, Kiss P, Brcic L, Kappler M, Wickenhauser C, Haak A, Krüger M, Al-Nawas B, Blatt S, Brockmeyer N, Skaletz-Rorowski A, Potthoff A, French LE, Charnowski S, Reinholz M, Kaufmann AM, Thies

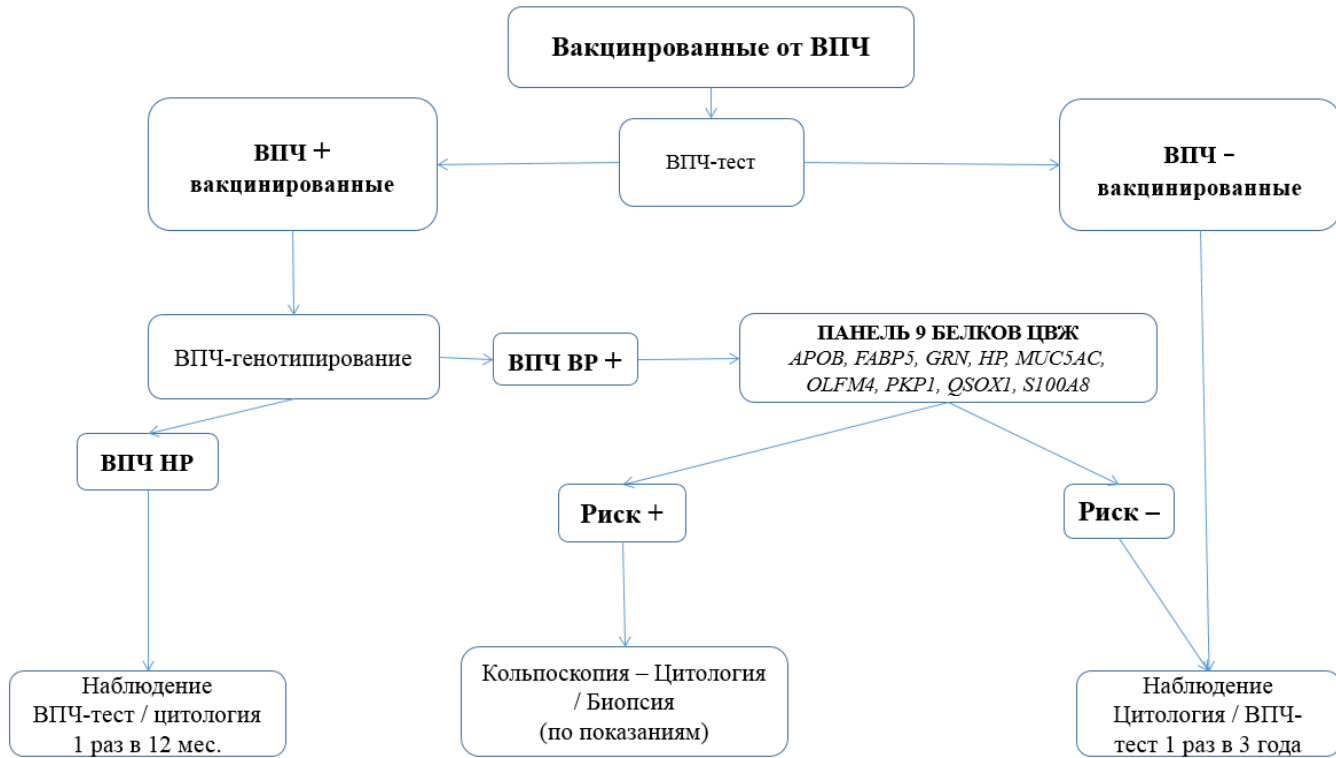
- S, Lambrecht HG, Seliger B, Wild DC, Thurnher D. DRH1 - a novel blood-based HPV tumour marker. // EBioMedicine. 2020 Jun;56:102804. doi: 10.1016/j.ebiom.2020.102804. Epub 2020 Jun 11. PMID: 32535546; PMCID: PMC7300133.
102. Colmenares V, Noyola DE, Monsiváis-Urenda A, Salgado-Bustamante M, Estrada-Capetillo L, González-Amaro R, Baranda L. Human papillomavirus immunization is associated with increased expression of different innate immune regulatory receptors. // Clin Vaccine Immunol. 2012 Jul;19(7):1005-11. doi: 10.1128/CVI.00043-12. Epub 2012 May 9. PMID: 22573736; PMCID: PMC3393366.
103. Umphress B, Sanchez B, Paintal A, Nayar R, Maniar KP. Utility of CK7 Versus p16 as a Prognostic Biomarker in CIN 2. // Am J Surg Pathol. 2018 Apr;42(4):479-484. doi: 10.1097/PAS.0000000000001032. PMID: 29438168.
104. Paz-Zulueta M, Álvarez-Paredes L, Rodríguez Díaz JC, Parás-Bravo P, Andrada Becerra ME, Rodríguez Ingelmo JM, Ruiz García MM, Portilla J, Santibañez M. Prevalence of high-risk HPV genotypes, categorised by their quadrivalent and nine-valent HPV vaccination coverage, and the genotype association with high-grade lesions. // BMC Cancer. 2018 Jan 30;18(1):112. doi: 10.1186/s12885-018-4033-2. PMID: 29382323; PMCID: PMC5791190.
105. Jacobson TA. Opening a new lipid "apo-theary": incorporating apolipoproteins as potential risk factors and treatment targets to reduce cardiovascular risk. // Mayo Clin Proc. 2011 Aug;86(8):762-80. doi: 10.4065/mcp.2011.0128. PMID: 21803958; PMCID: PMC3146376.
106. Elmes MW, Kaczocha M, Berger WT, Leung K, Ralph BP, Wang L, Sweeney JM, Miyauchi JT, Tsirka SE, Ojima I, Deutsch DG. Fatty acid-binding proteins (FABPs) are intracellular carriers for Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) and cannabidiol (CBD). // J Biol Chem. 2015 Apr 3;290(14):8711-21. doi: 10.1074/jbc.M114.618447. Epub 2015 Feb 9. PMID: 25666611; PMCID: PMC4423662.
107. Eriksen JL, Mackenzie IR. Progranulin: normal function and role in neurodegeneration. // J Neurochem. 2008 Jan;104(2):287-97. doi: 10.1111/j.1471-4159.2007.04968.x. Epub 2007 Oct 22. PMID: 17953663.

108. Schaer DJ, Vinchi F, Ingoglia G, Tolosano E, Buehler PW. Haptoglobin, hemopexin, and related defense pathways-basic science, clinical perspectives, and drug development. // *Front Physiol.* 2014 Oct 28;5:415. doi: 10.3389/fphys.2014.00415. PMID: 25389409; PMCID: PMC4211382.
109. Liu W, Zhu J, Cao L, Rodgers GP. Expression of hGC-1 is correlated with differentiation of gastric carcinoma. // *Histopathology.* 2007 Aug;51(2):157-65. doi: 10.1111/j.1365-2559.2007.02763.x. PMID: 17650212.
110. Thorpe C, Hooper KL, Raje S, Glynn NM, Burnside J, Turi GK, Coppock DL. Sulfhydryl oxidases: emerging catalysts of protein disulfide bond formation in eukaryotes. // *Arch Biochem Biophys.* 2002 Sep 1;405(1):1-12. doi: 10.1016/s0003-9861(02)00337-5. PMID: 12176051.
111. Musa J, Aynaud MM, Mirabeau O, Delattre O, Grünewald TG. MYBL2 (B-Myb): a central regulator of cell proliferation, cell survival and differentiation involved in tumorigenesis. // *Cell Death Dis.* 2017 Jun 22;8(6):e2895. doi: 10.1038/cddis.2017.244. PMID: 28640249; PMCID: PMC5520903.
112. Zou Z, Anisowicz A, Hendrix MJ, Thor A, Neveu M, Sheng S, Rafidi K, Seftor E, Sager R. Maspin, a serpin with tumor-suppressing activity in human mammary epithelial cells. // *Science.* 1994 Jan 28;263(5146):526-9. doi: 10.1126/science.8290962. PMID: 8290962.
113. Teoh SS, Vieusseux J, Prakash M, Berkowicz S, Luu J, Bird CH, Law RH, Rosado C, Price JT, Whisstock JC, Bird PI. Maspin is not required for embryonic development or tumour suppression. // *Nat Commun.* 2014;5:3164. doi: 10.1038/ncomms4164. PMID: 24445777; PMCID: PMC3905777.
114. Dzinic SH, Mahdi Z, Bernardo MM, Vranic S, Beydoun H, Nahra N, Alijagic A, Harajli D, Pang A, Saliganan DM, Rahman AM, Skenderi F, Hasanbegovic B, Dyson G, Beydoun R, Sheng S. Maspin differential expression patterns as a potential marker for targeted screening of esophageal adenocarcinoma/gastroesophageal junction adenocarcinoma. // *PLoS One.* 2019 Apr 19;14(4):e0215089. doi: 10.1371/journal.pone.0215089. PMID: 31002675; PMCID: PMC6474598.

115. Baghel K, Kazmi HR, Chandra A, Raj S, Srivastava RN. Significance of methylation status of MASPIN gene and its protein expression in prognosis of gallbladder cancer. // *Asia Pac J Clin Oncol*. 2019 Oct;15(5):e120-e125. doi: 10.1111/ajco.13129. Epub 2019 Feb 10. PMID: 30740890.
116. Xu N, Li B, Liu Z, Gao R, Wu S, Dong Z, Li H, Yu F, Zhang F. Role of mammary serine protease inhibitor on the inflammatory response in oral lichen planus. // *Oral Dis*. 2019 May;25(4):1091-1099. doi: 10.1111/odi.13054. Epub 2019 Mar 27. PMID: 30737971.
117. Yuan J, Krämer A, Matthess Y, Yan R, Spänkuch B, Gätje R, Knecht R, Kaufmann M, Strebhardt K. Stable gene silencing of cyclin B1 in tumor cells increases susceptibility to taxol and leads to growth arrest in vivo. // *Oncogene*. 2006 Mar 16;25(12):1753-62. doi: 10.1038/sj.onc.1209202. PMID: 16278675.
118. Dutta A, Chandra R, Leiter LM, Lester S. Cyclins as markers of tumor proliferation: immunocytochemical studies in breast cancer. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Jun 6;92(12):5386-90. doi: 10.1073/pnas.92.12.5386. PMID: 7539916; PMCID: PMC41699.
119. Brown WM, Dziegielewska KM. Friends and relations of the cystatin superfamily--new members and their evolution. // *Protein Sci*. 1997 Jan;6(1):5-12. doi: 10.1002/pro.5560060102. PMID: 9007972; PMCID: PMC2143511.
120. Verma RP, Hansch C. Matrix metalloproteinases (MMPs): chemical-biological functions and (Q)SARs. // *Bioorg Med Chem*. 2007 Mar 15;15(6):2223-68. doi: 10.1016/j.bmc.2007.01.011. Epub 2007 Jan 17. PMID: 17275314.
121. Nacken W, Roth J, Sorg C, Kerkhoff C. S100A9/S100A8: Myeloid representatives of the S100 protein family as prominent players in innate immunity. // *Microsc Res Tech*. 2003 Apr 15;60(6):569-80. doi: 10.1002/jemt.10299. PMID: 12645005.
122. Kerkhoff C, Nacken W, Benedyk M, Dagher MC, Sopalla C, Doussiere J. The arachidonic acid-binding protein S100A8/A9 promotes NADPH oxidase activation by interaction with p67phox and Rac-2. // *FASEB J*. 2005 Mar;19(3):467-9. doi: 10.1096/fj.04-2377fje. Epub 2005 Jan 10. PMID: 15642721.

123. Schulmeyer CE, Stübs F, Gass P, Renner SK, Hartmann A, Strehl J, Mehlhorn G, Geppert C, Adler W, Beckmann MW, Koch MC. Correlation between referral cytology and in-house colposcopy-guided cytology for detecting early cervical neoplasia. // *Arch Gynecol Obstet*. 2020 Jan;301(1):263-271. doi: 10.1007/s00404-019-05389-1. Epub 2019 Dec 6. PMID: 31811416.
124. Mahmud SM, Kliewer EV, Lambert P, Bozat-Emre S, Demers AA. Effectiveness of the quadrivalent human papillomavirus vaccine against cervical dysplasia in Manitoba, Canada. // *J Clin Oncol*. 2014 Feb 10;32(5):438-43. doi: 10.1200/JCO.2013.52.4645. Epub 2014 Jan 6. PMID: 24395857.
125. Zhang S, Zhao J, Zhang Z. Humoral immunity, the underestimated player in hepatitis B. // *Cell Mol Immunol*. 2018 Jun;15(6):645-648. doi: 10.1038/cmi.2017.132. Epub 2017 Dec 11. PMID: 29225341; PMCID: PMC6078975.

**АЛГОРИТМ ВЕДЕНИЯ ВАКЦИНИРОВАННЫХ ОТ ВПЧ ЖЕНЩИН С
УЧЕТОМ ПАНЕЛИ БЕЛКОВ ЦВЖ, РАЗРАБОТАННОЙ МЕТОДОМ
МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ**



ПРИЛОЖЕНИЕ Б

**ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ПАНЕЛЬ БЕЛКОВ ЦВЖ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ
ГРУППЫ РИСКА ПО РАЗВИТИЮ CIN+ ДЛЯ ВПЧ-ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ
ПАЦИЕНТОК, РАНЕЕ ВАКЦИНИРОВАННЫХ ОТ ВПЧ**

ID белков	Название белков	Название гена	Изменения в группе ВПЧ-положительных вакцинированных пациенток (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	↑

**ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ПАНЕЛЬ ДЛЯ ВАКЦИНИРОВАННЫХ ОТ ВПЧ
ПАЦИЕНТОК ПРИ ИНФИЦИРОВАНИИ ДРУГИМИ НЕВАКЦИНАЛЬНЫМИ
ТИПАМИ ВПЧ**

мРНК	Функции мРНК	Достоверное изменение в группе вакцинированных пациенток
MKI67	Пролиферация, митоз, регуляция клеточного цикла	—
CCNB1		↓
MYBL2		↓
CDKN2A	Пролиферация, митоз, регуляция клеточного цикла	—
EXO1	Репликации, репарации ДНК	—
SERPINB5	Супрессор опухолей в эпителиальных клетках	↓
ESR1	Рецепторный аппарат	—
PGR		—
UBE2T	Утилизации белков	—
BAG1	Апоптоз	—
BCL2		—

ANLN	Организация цитоскелета, миграция, инвазия	—
------	---	---