На правах рукописи

ОБУХОВА Елизавета Александровна

ПРОГНОСТИЧЕСКИЕ КРИТЕРИИ ОЗЛОКАЧЕСТВЛЕНИЯ ДОБРОКАЧЕСТВЕННЫХ И ПРЕДРАКОВЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ШЕЙКИ МАТКИ

3.1.4. Акушерство и гинекология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва – 2022 год

Работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)

Научный руководитель:
доктор медицинских наук, профессор **Леваков Сергей Александрович**

Официальные оппоненты:
Прилепская Вера Николаевна – доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, руководитель научно-поликлинического отделения

Берлев Игорь Викторович – доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Петрова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующий научным отделением онкогинекологии

Ведущая организация – Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «___»_____2022 г. в _____часов на заседании диссертационного совета 72.1.010.01 при Государственном бюджетном учреждении здравоохранения Московской области «Московский областной научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии» Министерства здравоохранения Московской области (101000, Москва, ул. Покровка, д. 22а).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Государственного бюджетного учреждения здравоохранения Московской области «Московский областной научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии» Министерства здравоохранения Московской области.

Автореферат диссертации размещен на сайте http://moniiag.ru

Автореферат разослан «___» _____ 2022 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор медицинских наук, профессор Зайдиева Янсият Зайдилаевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

В течение многих лет рак шейки матки является важнейшей мировой медико-социальной проблемой (Сухих Г.Т. и соавт., 2020; Леваков С.А. и соавт., 2021; Small et al., 2017). Согласно статистическим данным Международного агенства по изучению рака в 2020 году было выявлено 604127 новых случаев рака шейки матки, а ежегодная заболеваемость в разных странах варьирует от 4,1 до 40,1 на 100000 населения (GLOBOCAN, 2020). Смертность от рака шейки матки по-прежнему остается высокой, входит в тройку лидеров среди злокачественных опухолей женской репродуктивной системы и по последним данным ВОЗ составляет 8,2 на 100000 населения (GLOBOCAN, 2020). Основными задачами современной гинекологии является изучение патогенетических механизмов, поиск ранних диагностических маркеров и эффективных методов лечения предраковых поражений шейки матки (Сухих Г.Т. и соавт., 2020; Прилепская В.Н. и соавт., 2020; Леваков С.А. и соавт., 2021; Байрамова Г.Р. и соавт., 2019).

Окислительный стресс играет роль в развитии воспалительных заболеваний и злокачественных опухолей (Леваков С.А. и соавт., 2021, Шахпаронов М.И. и соавт., 2018; Silva et al., 2018; Shah et al., 2019). Одним из ферментов, нейтрализующих активные формы кислорода (АФК), является параоксоназа (PON) (Шахпаронов М.И. и соавт., 2018; Furlong et al., 2016). Ферменты PON1 и PON3 синтезируются в гепатоцитах и высвобождаются в плазму в состоянии, связанном с липопротеинами высокой плотности (ЛПВП) (Леваков С.А. и соавт., 2021; Furlong et al., 2016, Camps et al., 2016). Фермент PON2 локализуется внутриклеточно и не выявляется в плазме (Шахпаронов М.И. и соавт., 2018; Furlong et al., 2016, Camps et al., 2016). По химическим свойствам параоксоназы относятся к классу гидролаз, поэтому они способны нейтрализовать свободные радикалы кислорода, защищать липиды клеточных мембран от перекисного окисления, подавлять воспаление и регулировать процесс апоптоза (Furlong et al., 2016). Параоксоназы гидролизуют ацилгомосеринлактоны – сигнальные молекулы кворум-зависимых систем грамотрицательных бактерий, блокируя образование бактериальных биопленок, препятствуют хронизации процесса, способствуют антигенному распознаванию и элиминации бактериальных агентов (Camps et al., 2016). Снижение в плазме крови активности параоксоназ приводит к увеличению выраженности оксидативного стресса и риска развития атеросклероза, обменных нарушений, а также опухолевых заболеваний (Devarajan et al., 2014).

В настоящее время чрезвычайно популярным направлением молекулярной биологии стало изучение длинных некодирующих РНК (днРНК). К ним относятся РНК длиной более 200

нуклеотидов, не содержащих открытых рамок считывания (Wang et al., 2021). Многие исследования уже доказали существенную роль днРНК в регуляции экспрессии генов и в патогенезе нейродегенеративных, сердечно-сосудистых, гинекологических и онкологических заболеваний (Zhou et al., 2020; Ferg et al., 2018; Wang et al., 2021). Наиболее изучены в процессах канцерогенеза H9, H19, PCA3, MALAT1, HOTAIR, HULC, Linc 00874 и KRT19 (Wang et al., 2021; Bhan et al.,2017; Pawlowska et al., 2017; Pan et al. 2016). С плохим прогнозом заболевания связана повышенная экспрессия linc-ROR (Chen et al., 2020; Xu et al., 2018; Lou et al., 2017). Эта канцерогенная днРНК регулирует перепрограммирование плюрипотентных стволовых клеток, подавляет индукцию белка-онкосупрессора p53 после повреждения ДНК, модулирует ответ на гипоксию в клетках опухолей (Леваков и соавт., 2021; Chen et al. 2020; Xu et al., 2018). Сверхэкспрессия linc-ROR напрямую коррелирует с клинико-патологическими характеристиками и прогрессией опухолей (Chen et al., 2020; Xu et al., 2018). Повышение уровня MALAT1 наблюдалось при различных онкологических заболеваниях, включая рак легких, мочевого пузыря, молочной железы, шейки матки, толстой кишки, колоректальный рак, рак эндометрия, пищевода, желудка, гепатоцеллюлярную карциному, меланому, множественную миелому, нейробластому, остеосаркому, рак яичников и предстательной железы (Shen et al., 2019; Hao et al., 2020; Yang et al., 2015). ДнРНК могут стать претендентами на идеальные ранние биомаркеры дисплазии и рака шейки матки, так как они могут быть идентифицированы еще до экспрессии белков, что, несомненно, является их большим преимуществом. Таким образом, параоксоназы, днРНК linc-ROR и MALAT1 могут играть потенциальную роль в патогенезе рака шейки матки. Оценка прогнозов злокачественной трансформации цервикального эпителия имеет критически важное значение, поскольку женщины, у которых инвазивный рак обнаруживается на ранних стадиях, имеют существенно более высокие шансы на излечение, что в свою очередь, эффективно с точки зрения экономических затрат.

Степень разработанности темы исследования

Скрининг на выявление злокачественных новообразований шейки матки включает ВПЧ-тестирование и цитологическое исследование мазков с экто- и из эндоцервикса, в том числе жидкостную цитологию (Приказ Минздрава России от 20 октября 2020 г. №1130н «Об утверждении порядка оказания медицинской помощи по профилю «акушерство и гинекология»). Исследован ряд молекулярных биомаркеров, позволяющих дифференцировать неизмененные ткани, интраэпителиальные поражения и рак шейки матки: определение мРНК генов E6 и E7, p16ink4a, Ki-67, E-кадгерина, белка pAkt, сосудисто-эндотелиального фактора (VEGF),

циклооксигеназы-2 (COX2), теломеразы (hTERT), белков апоптоза (PTEN, Bcl-2, Bax), металопротеиназ (MMP2, MMP9) и онкомаркера SCC (Сухих Г.Т. и соавт., 2020; Краснопольский В.И. и соавт., 2020., Ашрафян Л.А. и соавт., 2021; Ying-Ai Shi et al., 2014). Несмотря на внедрение новых диагностических маркеров в клиническую практику, показатели заболеваемости и смертности от рака шейки матки по-прежнему остаются чрезвычайно высокими (GLOBOCAN, 2020). Исследование вирусной нагрузки, цитологический, морфологический, иммуноцитохимический и гистохимический методы дифференциальной диагностики заболеваний шейки матки необходимо дополнить молекулярно-генетическим методом исследования уровня экспрессии мРНК генов PON2 и PON3, днРНК linc-ROR и MALAT1, ответственных за антиокидантную защиту, регуляцию процессов апоптоза и клеточной репликации, что позволит выявить нарушения клеточного гомеостаза на раннем этапе развития заболевания.

Цель исследования

Оценка прогнозирования течения заболеваний шейки матки на основе разработки новых молекулярно-генетических диагностических критериев опухолевой трансформации для выбора дифференцированной тактики ведения пациенток.

Задачи исследования

1. Выявить наиболее значимые факторы риска прогрессирования и злокачественной трансформации предраковых заболеваний шейки матки;
2. При помощи молекулярно-генетического метода исследования (Real-time PCR) изучить и сравнить уровни экспрессии мРНК генов PON1, PON2 и PON3, отражающих активацию окислительного стресса, в нормальном цервикальном эпителии и при заболеваниях шейки матки;
3. Методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (Real-time PCR) изучить особенности экспрессии длинных некодирующих РНК (днРНК) MALAT1 и linc-ROR в неизмененном эпителии шейки матки и при наличии интраэпителиальных повреждений;
4. Провести сравнительный анализ экспрессии мРНК генов PON1, PON2, PON3, днРНК MALAT1 и linc-ROR в зависимости от степени вирусной нагрузки;
5. С помощью метода бинарной логистической регрессии разработать индекс риска малигнизации (ИРМ) для выявления группы высокого риска по прогрессированию интраэпителиальных поражений до дисплазии тяжелой степени (HSIL) и рака шейки матки;

6. Разработать патогенетически обоснованный дифференцированный подход ведения пациенток с LSIL с учетом клинических, патоморфологических методов и изученных молекулярно-генетических маркеров прогрессирования интраэпителиальных поражений.

Научная новизна исследования

Впервые проведено молекулярно-генетическое исследование уровня экспрессии генов, кодирующих ферменты антиоксидантной защиты организма PON1, PON2 и PON3, днРНК linc-ROR, регулирующей репрограммирование плюрипотентных стволовых клеток и подавляющей индукцию опухолевого протеина p53 при повреждении ДНК, в эпителиальных клетках шейки матки у женщин репродуктивного возраста. Изучены особенности экспрессии днРНК MALAT1 в нормальном эпителии, при доброкачественных и предраковых заболеваниях шейки матки. Определена роль митохондриальной дисфункции и окислительного стресса в развитии предраковых повреждений шейки матки. Определены новые прогностические критерии озлокачествления заболеваний шейки матки по уровню экспрессии днРНК и генов, кодирующих ферменты детоксикационной системы организма. С помощью метода бинарной логистической регрессии разработан индекс риска малигнизации (ИРМ) для выявления группы высокого риска по прогрессированию интраэпителиальных повреждений до дисплазии тяжелой степени (HSIL) и рака шейки матки. Разработан новый алгоритм ведения пациенток с заболеваниями шейки матки с использованием предложенных прогностических критериев.

Теоретическая и практическая значимость работы

Определены новые прогностические критерии злокачественной трансформации заболеваний шейки матки, на основании которых возможно определить пациенток, угрожаемых по риску развития рака шейки матки. Подтверждена роль митохондриальной дисфункции, окислительного стресса, нарушения процессов пролиферации и апоптоза в патогенезе дисплазии шейки матки. Повышенная экспрессия параоксоназ, linc-ROR и MALAT1 свидетельствует о повышенном риске неопластической трансформации цервикального эпителия.

Предложенная прогностическая модель, учитывающая уровень экспрессии генов PON2, PON3, MALAT1 и linc-ROR, позволяет выявить группу высокого риска по прогрессированию дисплазии и развитию рака шейки матки, сократить срок динамического наблюдения и выбрать оптимальный вариант хирургического лечения в данной группе пациенток. Результаты научной работы могут быть использованы в качестве практических рекомендаций врачам акушерам-гинекологам для оптимизации наблюдения и лечения заболеваний шейки матки с учетом онкологической настороженности.

Методология и методы исследования

Методология работы соответствует стандартам проведения биомедицинских исследований и основана на принципах доказательной медицины. На первом этапе проведено ретроспективное исследование с целью выявления частоты встречаемости различных типов ВПЧ, сопоставления результатов ВПЧ-тестирования с цитологическими и гистологическими заключениями и определения факторов риска развития интраэпителиальных повреждений. На втором этапе проводилось проспективное исследование, в которое включались пациентки с доброкачественными и предраковыми заболеваниями шейки матки. В ходе исследования проводился стандартный скрининг цервикальной патологии, включавший качественное и количественное определение ВПЧ, жидкостную цитологию и расширенную кольпоскопию. При наличии показаний проводилась радиоволновая биопсия шейки матки. Скрининг был дополнен исследованием уровня экспрессии мРНК генов PON1, PON2, PON3, днРНК linc-ROR и MALAT1. На третьем этапе проводился анализ уровня экспрессии изучаемых генов и возможности их использования в клинической практике. Построена прогностическая модель, оценена ее предиктивная значимость в диагностике злокачественной трансформации заболеваний шейки матки, разработан новый алгоритм ведения пациенток группы высокого риска по прогрессированию интраэпителиальных повреждений.

Положения, выносимые на защиту

1. Риск прогрессирования дисплазии и развития рака шейки матки зависит от длительности персистенции ВПЧ ВКР, уровня вирусной нагрузки, возраста начала половой жизни, количества половых партнеров в анамнезе, наличия повреждений шейки матки (хирургическое лечение, аборты, роды), курения, персистирующих урогенитальных инфекций;
2. При морфологической верификации LSIL и HSIL отмечается повышение экспрессии мРНК генов PON2 и PON3 в эпителии шейки матки, что отражает активацию оксидативного стресса и митохондриальную дисфункцию при наличии интраэпителиальных повреждений. Степень дисплазии шейки матки связана с уровнем повышения экспрессии PON 2 и PON3: при LSIL экспрессия PON2 повышена в 2,5 раза – 6,54 [4,25; 8,26], при HSIL в 3,8 раз – 10,10 [6,88; 13,75], экспрессия PON3 повышена в 2,76 раз при LSIL – 6,25 [3,43; 9,53], в 5,56 раз при HSIL – 12,57 [7,59; 17,10] ($p < 0{,}001$). Экспрессия гена, кодирующего фермент PON1, в цервикальном эпителии отсутствует и не изменяется при доброкачественных и предраковых заболеваниях шейки матки, что свидетельствует об отсутствии его прогностической значимости в процессе опухолевой трансформации заболеваний шейки матки;

3. Экспрессия днРНК linc-ROR и MALAT1 повышена у пациенток с цервикальной интраэпителиальной неоплазией и зависит от степени тяжести интраэпителиальных поражений: при LSIL экспрессия днРНК MALAT1 повышена в 2,26 раз – 3,23 [2,27; 3,92], экспрессия lincROR в 1,4 раза – 1,78 [1,25; 1,93], при HSIL экспрессия MALAT1 повышена в 3,94 раз – 5,73 [3,06; 6,46], lincROR в 1,54 раз – 1,92 [1,83; 2,07] ($p<0,001$);

4. Степень повышения экспрессии мРНК генов PON2, PON3, днРНК linc-ROR и MALAT1 в цервикальном эпителии зависит от уровня вирусной нагрузки ВПЧ ВКР ($p<0,001$). Наиболее сильная корреляционная связь выявлена между уровнем вирусной нагрузки и повышением экспрессии мРНК PON2 и PON3 (теснота связи по шкале Чеддока заметная, $p <0,001$);

5. Пациентки с LSIL, высокой вирусной нагрузкой (более 5,3 lg копий), сверхэкспрессией генов PON2, PON3, MALAT1 и linc-ROR и ИРМ> 0,5 подвержены повышенному риску развития рака шейки матки, что требует сокращения сроков динамического наблюдения и проведения хирургического лечения шейки матки.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов достигалась путем поэтапного выполнения плана исследования, использования достаточных по объему выборок, высокоточного лабораторного оборудования и выбора адекватных статистических методов. Результаты диссертации были озвучены на XIII Международном конгрессе по репродуктивной медицине (г. Москва, 21-24 января 2019г.), XIV Международном конгрессе по репродуктивной медицине (г. Москва, 21-24 января 2020г.), IV Национальном научно-образовательном конгрессе «Онкологические проблемы от менархе до постменопаузы» (г. Москва, 12-14 февраля 2020г.), научно-практической конференции «Зарождение жизни» (г. Москва, 04 марта 2020г.), XXXIII зимней молодежной научной школе "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии" (г. Москва, ИБХ РАН, 08-11.02.2021г.), XXII Всероссийском научно-образовательном форуме «МАТЬ И ДИТЯ - 2021», научно-практической конференции с международным участием «Междисциплинарные аспекты гинекологии: от зарождения жизни до профилактики заболеваний» (г. Москва 28 мая 2021 г), XXVII научно-практической конференции «Наука России: Цели и задачи» (г. Екатеринбург, 10 июня 2021 г).

Апробация диссертационной работы состоялась на кафедральной научно-практической конференции сотрудников кафедры акушерства и гинекологии ИКМ имени Н.В. Склифосовского ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет)

и врачей гинекологического отделения ГБУЗ «ГКБ имени братьев Бахрушиных ДЗМ» 14 мая 2021г. (протокол № 02-05 от 14.05.2021г.).

Личный вклад автора в проведенное исследование

Автором самостоятельно проведен библиографический поиск и анализ научной литературы по теме диссертации, сбор и анализ жалоб и данных анамнеза, ретроспективный анализ 198 историй болезней пациенток с заболеваниями шейки матки с 2016 по 2020гг, отбор пациенток для выполнения проспективного исследования. Автором самостоятельно проводилась радиоволновая биопсия/эксцизия шейки матки в гинекологическом отделении ГБУЗ «ГКБ имени братьев Бахрушиных ДЗМ» и амбулаторно в Центральной поликлинике ФГБУЗ КБ №85 ФМБА России, выделены тотальные мРНК, синтезированы кДНК PON1, PON2, PON3, linc-ROR и MALAT1 в каждом образце и проведено RTQ-PCR исследование под руководством к.б.н., старшего научного сотрудника лаборатории мембранных и биоэнергетических систем Института биоорганической химии имени М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН Антиповой Н.В. Автором самостоятельно выполнена статистическая обработка результатов исследования и построена прогностическая модель вероятности прогрессирования интраэпителиальных неоплазий. Разработан алгоритм ведения пациенток с преинвазивными поражениями шейки матки.

Внедрение результатов исследования в практику

Результаты исследования внедрены в практику гинекологических отделений ГБУЗ ГКБ им. братьев Бахрушиных ДЗМ, ФБУЗ «Лечебно-реабилитационный центр Минэкономразвития России» и в программу преподавания кафедры акушерства и гинекологии ИКМ имени Н.В. Склифосовского ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет).

Публикации по теме диссертации

По теме диссертации опубликовано 3 научные статьи в рецензируемых научных изданиях, определенных перечнем ВАК при Минобрнауки РФ и входящих в наукометрическую базу данных Scopus. По теме диссертации издано 1 методическое пособие.

Структура и объем диссертации

Текст диссертации включает 141 страницу, структура диссертации содержит разделы согласно положениям ГОСТа 7.0.11-2011. Список литературы включает 16 публикаций на русском языке и 181 на иностранном языке. Иллюстративный материал включает 39 таблиц и 33 рисунка.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Диссертационная работа проведена на клинических базах кафедры акушерства и гинекологии ИКМ имени Н.В. Склифосовского ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (заведующий кафедрой, доктор медицинских наук, профессор Леваков Сергей Александрович) ГБУЗ ГКБ им. братьев Бахрушиных ДЗМ и ФГБУЗ КБ №85 ФМБА России. В период с октября 2015 г. по февраль 2020 г. были обследованы 282 женщины репродуктивного возраста с заболеваниями шейки матки, обратившихся в Центральную поликлинику ФГБУЗ КБ №85 ФМБА России и в гинекологическое отделение ГБУЗ ГКБ им. братьев Бахрушиных ДЗМ. В соответствии с критериями включения в исследование было отобрано 210 пациенток, которым проводились цитологическое исследование, ВПЧ-тестирование, расширенная кольпоскопия, микроскопическое исследование вагинальных мазков, определение уровня экспрессии генов PON1, PON2, PON3, linc-ROR, MALAT1. Прицельная радиоволновая биопсия шейки матки с последующим патоморфологическим исследованием проводилась при отсутствии воспалительных заболеваний нижних отделов генитального тракта по показаниям: наличие плосколеточных интраэпителиальных поражений (SIL) по данным цитологического исследования в сочетании с положительным результатом ВПЧ-тестирования и/или аномальной кольпоскопической картиной, лейкоплакия шейки матки. При цитологическом заключении «HSIL» проводилась радиоволновая циркулярная эксцизия шейки матки и выскабливание цервикального канала последующим гистологическим исследованием операционного материала.

На основании цитологического исследования и ВПЧ-тестирования пациентки были разделены на 5 групп: 1 группа – 37 пациенток с цитологическим заключением «NILM» + ВПЧ ВКР, 2 группа – 43 пациентки с цитологическим заключением «LSIL» + ВПЧ ВКР, 3 группа - 46 пациенток с цитологическим заключением «HSIL» + ВПЧ ВКР, 4 группа – 39 пациенток с цитологическим заключением «NILM», гиперкератозом плоского эпителия и отсутствием ВПЧ инфекции, 5 – группа сравнения, включающая 45 пациенток с отсутствием интраэпителиальной клеточной атипии по результатам цитологического заключения и ВПЧ-инфекции по результатам ПЦР исследования. Все пациентки, принимавшие участие в исследовании, получили о нем полную информацию и подписали информированное добровольное согласие.

Критерии включения в исследования для групп 1,2 и 3: возраст от 18 до 49 лет; подписанное добровольное информированное согласие на участие в исследовании; подписанное добровольное информированное согласие на проведение прицельной радиоволновой биопсии шейки матки или

радиоволновой эксцизии шейки матки и выскабливания цервикального канала при наличии показаний; регулярный менструальный цикл; наличие ВПЧ высокого канцерогенного риска: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 и 68 типов; цитологическое заключение: NILM, LSIL, HSIL. Критерии включения в исследование для группы 4: репродуктивный возраст от 18 до 49 лет; подписанное добровольное информированное согласие на участие в исследовании; отсутствие ВПЧ инфекции; регулярный менструальный цикл; установленный диагноз «лейкоплакия шейки матки», «хронический цервицит»; цитологическое заключение: NILM. Критерии включение в исследование для группы сравнения: репродуктивный возраст от 18 до 49 лет; подписанное добровольное информированное согласие на участие в исследовании; отсутствие ВПЧ инфекции; регулярный менструальный цикл; цитологическое заключение: NILM.

Критерии исключения из исследования: острые воспалительные заболевания органов малого таза; беременность, послеродовый период и лактация; онкологические и аутоиммунные заболевания; экстрагенитальные заболевания в стадии декомпенсации; прием гормональных препаратов; отказ пациента от участия в исследовании; нарушение протокола исследования; вакцинация от ВПЧ-инфекции.

Анализ экспрессии генов PON1, PON2, PON3, linc-ROR, MALAT1 был проведен методом Realtime-PCR в лаборатории мембранных и биоэнергетических систем ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (руководитель д.х.н. Шахпаронов Михаил Иванович).

Исследование было одобрено комиссией Локального этического комитета ПМГМУ имени И.М. Сеченова (протокол № 01-18 от 17.01.2018г.)

Статистическая обработка результатов

Статистический анализ проводился с использованием программы StatTech v. 2.1.0 (разработчик - ООО "Статтех", Россия). Построение прогностической модели вероятности определенного исхода выполнялось при помощи метода логистической регрессии. Для оценки диагностической значимости количественных признаков при прогнозировании определенного исхода, применялся метод анализа ROC-кривых.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты ретроспективного исследования

При анализе 198 историй болезней пациенток репродуктивного возраста (18-49 лет) с ВПЧ-инфекцией частота встречаемости ВПЧ ВКР составила 154 (77,8%), ВПЧ НКР 44 (22,2%). Медиана возраста исследуемых пациенток составила 29 ± 7,14 лет. Аномальный результат

цитологического исследования выявлен у 89 (44,9%) пациенток: ASCUS в 19 (9,6%), LSIL в 47 (23,73%) и HSIL в 23 (11,62%) случаев. Цитологическое заключение NILM встречалось в 109 (55,05%) изученных историй болезней. Выявлено статистически значимое преобладание ВПЧ ВКР и нормальная цитологическая картина (критерий Манна-Уитни, p>0,05). Дисплазия шейки матки встречалась только у носителей ВПЧ ВКР. Наиболее часто встречались ВПЧ 16 и 18 типов. При прицельной биопсии шейки у пациенток с аномальными цитологическими заключениями дисплазия шейки матки легкой степени (LSIL, CIN I) выявлена у 56 (28,3%) пациенток и дисплазия тяжелой степени (HSIL, CIN II-III) у 19 (9,6%) пациенток. При динамическом наблюдении через 12 месяцев у 113 (57%) пациенток отмечалась спонтанная регрессия ВПЧ-инфекции, у 11 (5,56%) пациенток прогрессирование до LSIL, и у 7 (3,5%) до HSIL.

Результаты проспективного исследования

При анализе клинико-анамнестических данных все пациентки, принимавшие участие в исследовании, были сопоставимы по возрасту, характеру менструальной функции и частоте экстрагенитальных заболеваний. Все участницы исследования находились в возрасте от 18 до 49 лет. Медиана возраста обследуемых женщин группы 1 (NILM + ВПЧ ВКР) составила 28 лет, группы 2 (LSIL + ВПЧ ВКР) – 32 года, группы 3 (HSIL + ВПЧ ВКР) – 32 года, группы 4 (NILM, гиперкератоз плоского эпителия, ВПЧ -) – 35 лет, группы сравнения (NILM, ВПЧ -) – 29 лет. Степень тяжести интраэпителиальных поражений не была связана с возрастом. Медиана возраста пациенток с лейкоплакией шейки матки была достоверно больше остальных групп (p = 0,003, используемый метод: Критерий Краскела–Уоллиса).

По результатам анализа менструальной функции среди обследуемых пациенток не было выявлено статистически значимых различий (p> 0,05) (используемый метод: Критерий Краскела–Уоллиса). Медиана возраста менархе составила: в группе 1 (NILM + ВПЧ ВКР) – 12 лет, в группе 2 (LSIL + ВПЧ ВКР) – 13 лет, в группе 3 (HSIL + ВПЧ ВКР) – 13 лет, в группе 4 (NILM, гиперкератоз плоского эпителия, ВПЧ -) – 13 лет, в группе 5 (NILM, ВПЧ ВКР -) – 13 лет. У всех обследованных пациенток был регулярный менструальный цикл, продолжительностью от 26 до 35 дней, продолжительность менструаций составляла от 3 до 7 дней. У 7 пациенток (3,33%) выявлялись периодические межменструальные маточные кровотечения на фоне регулярного менструального цикла. Болезненные менструации наблюдались у 15 (7,1%) пациенток: группа 1 (NILM+ ВПЧ ВКР) – 3 (8,1%), группа 2 (LSIL + ВПЧ ВКР) – 4 (9,3%), группа 3 (HSIL + ВПЧ ВКР) – 3 (6,5%), группа 4 (NILM, гиперкератоз, ВПЧ -) – 2 (5,1%), группа сравнения (NILM, ВПЧ-) – в 3 (6,7%) случаях. Обильные менструации выявлены у 13 (6,2%) пациенток: группа 1

(NILM+ ВПЧ ВКР) – 3 (8,1%), группа 2 (LSIL + ВПЧ ВКР) – 2 (4,6%), группа 3 (HSIL + ВПЧ ВКР) – 2 (4,3%), группа 4 (NILM, гиперкератоз, ВПЧ -) 1 (2,6%), группа сравнения (NILM, ВПЧ-) – 3 (6,6%) случаев.

Анализ половой жизни выявил более ранний половой дебют у пациенток с ВПЧ инфекцией относительно группы сравнения (p <0,05). Среди участниц исследования наиболее рано (в среднем, в 17 лет) половую жизнь начинали пациентки с плоскоклеточными интраэпителиальными поражениями (p <0,001, используемый метод: Критерий Краскела–Уоллиса). Тяжесть интраэпителиальных повреждений зависела от количества половых партнеров: среднее количество половых партнеров у пациенток с дисплазией шейки матки оказалось статистически больше, чем в остальных группах (p <0,001) (используемый метод: Критерий Краскела–Уоллиса). Наибольшее количество половых партнеров наблюдалось у пациенток с тяжелой степенью интраэпителиальных повреждений и в среднем составляло более 5. Длительность персистенции ВПЧ-инфекции также зависела от количества половых партнеров: у пациенток с длительной персистенцией ВПЧ инфекции в среднем в анамнезе было больше половых партнеров (Me=4) по сравнению с пациентками, у которых отсутствовал ВПЧ по результатам ПЦР – исследования или длительностью инфекции менее 2 лет (Me = 2) (p < 0,001, используемый метод: Критерий Краскела–Уоллиса).

При анализе перенесенных гинекологических заболеваний были выявлены статистически значимые различия среди исследуемых групп в частоте выявления инфекций, передающихся половым путем (ИППП) в анамнезе. ВПГ-2 выявлялся у 3 (8,1%) пациенток с NILM+ВПЧ ВКР, у 9 (20,9%) пациенток с LSIL, у 8 (17,4%) пациенток с HSIL, у 1 (5,1%) пациентки с лейкоплакией шейки матки и у 2 пациенток группы сравнения. Бактериальные инфекции (Micoplasma genitalium, Chlamydia trachomatis, Neisseria gonorrhoeae, Trichomonas vaginalis) выявлены в 25 (11,9%), из них смешанные бактериально-вирусные инфекции – в 17 (68%) наблюдениях. Бактериальный вагиноз выявлялся в 42 (20%) случаях: у 5 (13,5%) пациенток с NILM+ВПЧ ВКР, у 9 (20,9%) пациенток с LSIL, у 15 (32,6%) пациенток с HSIL, у 9 (23,1%) пациенток с лейкоплакией шейки матки и у 4 (8,9%) пациенток группы сравнения.

У пациенток с ВПЧ-инфекцией и плоскоклеточными интраэпителиальными поражениями шейки матки статистически чаще встречалось сочетание эндометриоза, миомы матки, гиперплазии эндометрия и доброкачественной дисплазии молочной желез относительно группы сравнения (p <0,001) (используемый метод: Хи-квадрат Пирсона). Это свидетельствует о взаимосвязанных механизмах патогенеза данных процессов, которые включают дисбаланс

половых гормонов, хроническое воспаление, окислительный стресс, избыточную клеточную пролиферацию и снижение апоптоза.

При сравнении встречаемости типов ВПЧ обнаружено, что во всех исследованных группах доминирующим типом был ВПЧ 16 типа – в 38 (30,2%) наблюдений, далее генотипы 18 (11,9%), 31 (11,9%), 33 (6,35%), 35 и 59 (3,9%), 39 (2,3%), 45 (2,3%), 51 (3,9%), 52 (1,59%), 56 и 58 (0,79%) 59 (3,7%), 68 (1,59 %). Сочетание нескольких генотипов ВПЧ было выявлено в 23 (18,25%) наблюдениях. Среди смешанных инфекций чаще встречались сочетания 16 и 18 генотипов, которые выявлялись в 53,3% случаев, затем 16 и 31 генотипы – в 33,3%, 18 и 33 в 13,4% случаев. В группе пациенток с тяжелой степенью интраэпителиальных поражений наиболее часто встречались генотипы 16 (17/37,0% случаев) и 31 (10/21,7% случаев). Преобладающими генотипами у пациенток с легкой степенью интраэпителиальных поражений были 16 (11/25,6% случаев) и 18 (6/14% случаев).

Медиана уровня вирусной нагрузки в группе 1 (NILM + ВПЧ ВКР) составила 4,2 lg [3,8; 4,9 lg], в группе 2 (LSIL + ВПЧ ВКР) – 5,3 lg [4,3; 6,7 lg], в группе 3 (HSIL + ВПЧ ВКР) – 6,2 lg [5,2; 6,9 lg]. Наивысшая вирусная нагрузка выявлялась в группе пациенток с дисплазией шейки матки тяжелой степени ($p < 0,001$, используемый метод: Хи-квадрат Пирсона). В ходе исследования определена высокая частота встречаемости ВПЧ ВКР у пациенток как с легкой, так и с тяжелой степенью интраэпителиальных поражений.

Изменения эпителия шейки матки при расширенной кольпоскопии статистически чаще выявлялись в группах ВПЧ-инфицированных пациенток по сравнению с остальными группами ($p > 0,05$). Степень выраженности изменений напрямую зависела от степени тяжести интраэпителиальных поражений. Выраженные кольпоскопические изменения статистически чаще наблюдались в 3 группе (HSIL + ВПЧ ВКР): плотный ацетобелый эпителий выявлялся в 30 (65,2%) случаях, грубая мозаика в 19 (41,3%) и грубая пунктация в 7 (15,2%) ($p < 0,05$, используемый метод: Хи-квадрат Пирсона). По результатам исследования у 17 (36,9%) пациенток группы 3 (HSIL+ВПЧ ВКР) с наличием выраженных кольпоскопических изменений был выявлен ВПЧ 16 типа, у 8 (17,4%) – ВПЧ 31 типа. У пациенток группы 3 (HSIL+ВПЧ ВКР) статистически чаще наблюдалась кольпоскопическая картина с невозможностью визуализации ЗТ по сравнению с группами ($p < 0,05$, используемый метод: Хи-квадрат Пирсона). Таким образом, у пациенток с ЗТ, визуализируемой не полностью, существует риск гиподиагностики цервикальных интраэпителиальных поражений.

При выявлении кольпоскопических изменениий у пациенток с нормальной цитологической картиной, а также при цитологическом заключении «LSIL» выполнялась прицельная радиоволновая биопсия шейки матки, при заключении «HSIL» проводилось выскабливание цервикального канала и радиоволновая циркулярная эксцизия шейки матки. Цервикальная интраэпителиальная неоплазия (CIN) была морфологически верифицирована у 86 (40,9%) обследованных пациенток: в группе 1 (NILM+ ВПЧ ВКР) – в 10 (27%) случаях, в группе 2 (LSIL + ВПЧ ВКР) – в 33 (76,7%), в группе 3 (HSIL + ВПЧ ВКР) – в 40 (86,9%) случаях, в группе 4 (NILM, гиперкератоз плоского эпителия, ВПЧ -) – в 3 (7,7%) случаях. В группе пациенток с цитологическим заключением HSIL по результатам патоморфологического исследования выявлено 3 (6,5%) случая карциномы in situ (CIS). В 3 (7,69%) наблюдениях из группы 4 (NILM, гиперкератоз плоского эпителия, ВПЧ-) по результатам гистологического исследования выявлена CIN II-III (HSIL). Согласно результатам проведенного анализа цитологический и гистологический диагноз совпадал в 112 (67,8%) случаях: в группе 1 (NILM+ ВПЧ ВКР) – 27 (62,8%), в группе 2 (LSIL + ВПЧ ВКР) – 25 (51,0%), в группе 3 (HSIL + ВПЧ ВКР) – в 21 (67,7%) случаях, в группе 4 (NILM, гиперкератоз плоского эпителия, ВПЧ -) – в 36 (92,3%) случаях. Патоморфологическое исследование является золотым стандартом диагностики заболеваний шейки матки и должно проводиться при малейшем подозрении на SIL, даже при отрицательном тесте на ВПЧ.

В результате исследования установлено, что экспрессия гена, кодирующего фермент PON1, во всех исследуемых образцах шейки матки не выявлялась. Уровень экспрессии PON2 в неизмененном эпителии шейки матки составил 2,63 [1,92; 3,73] (рисунок 1).

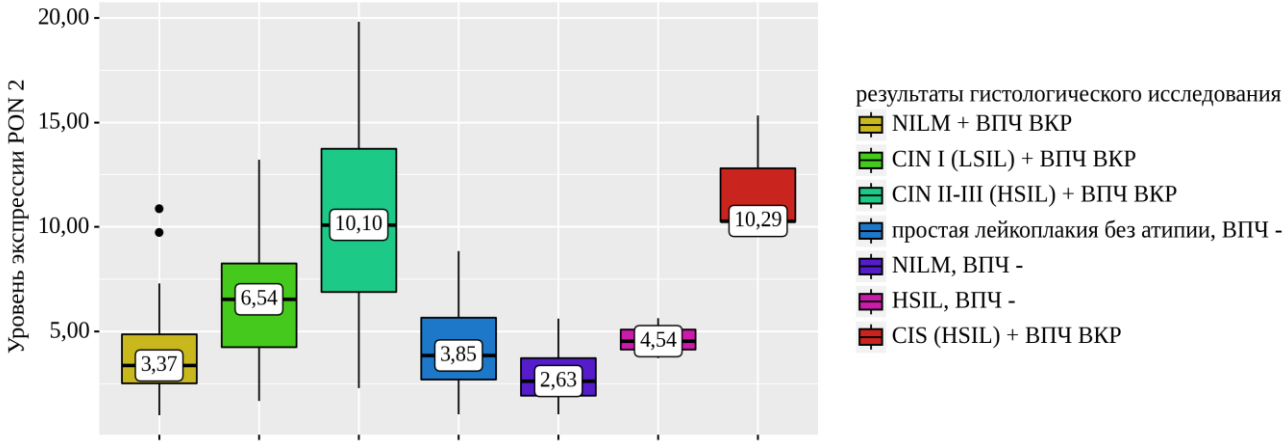

Рисунок 1 – Анализ отношения уровней мРНК PON2 в исследуемых группах

У носительниц ВПЧ-инфекции с нормальной цитологической картиной уровень экспрессии PON2 достоверно не отличался от группы сравнения и составил 3,37 [2,53; 4,86] (p >0,05, используемый метод: Критерий Краскела–Уоллиса). При простой лейкоплакии шейки матки без атипии в 52,8% (19 из 36 случаев) выявлен повышенный уровень экспрессии гена PON 2 и составил 3,85 [2,70; 5,66] (p = 0,039, используемый метод: Критерий Краскела–Уоллиса). При наличии SIL уровень экспрессии гена PON2 был значительно повышен: при LSIL уровень его экспрессии был в 2,5 раза больше, чем в группе сравнения и составил 6,54 [4,25; 8,26], при HSIL + ВПЧ ВКР отмечено повышение экспрессии в 3,8 раз и составило 10,10 [6,88; 13,75] (p <0,001, используемый метод: Критерий Краскела–Уоллиса). Повышенная экспрессия PON 2 в цервикальном эпителии выявлялась в 79,6% (39/49) случаев CIN I (LSIL) и 87% (27/31) случаев CIN II-III(HSIL), инфицированных ВПЧ-ВКР. У пациенток с гистологическим заключением HSIL и отрицательным тестом на ВПЧ уровень экспрессии PON 2 также был несколько выше относительно группы сравнения и составил 4,54 [4,13; 5,09]. Повышение уровня экспрессии PON2 отмечалось в 66,7% (2/3) случаев HSIL без ВПЧ-инфицирования. Таким образом, при наличии цервикальных интраэпителиальных поражений независимо от наличия ВПЧ-инфекции выявлялся повышенный уровень экспрессии PON2.

В группе пациенток с неизмененным эпителием шейки матки отмечена экспрессия гена PON3 и составляет 2,26 [1,25; 3,53] (рисунок 2).

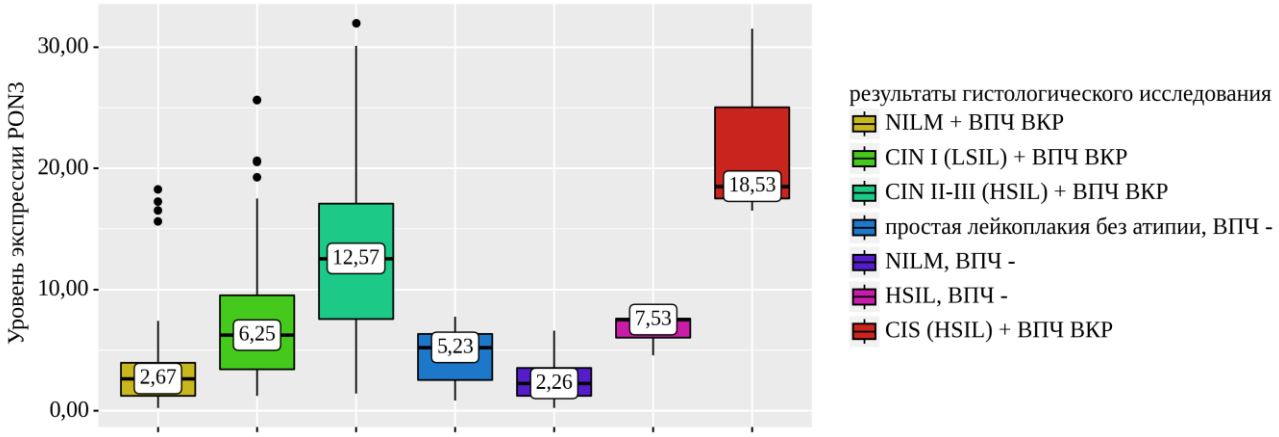

Рисунок 2 – Анализ отношения уровней мРНК PON3 в исследуемых группах

При наличии интраэпителиальных поражений шейки матки уровень экспрессии PON3 значительно возрастает: в 2,76 раз при LSIL и в 5,56 раз при HSIL относительно группы сравнения (p<0,001, Критерий Краскела-Уоллиса). Повышение экспрессии PON 3 выявлено в 73,47% (36/49) случаев LSIL и в 93,5% (29/31) случаев HSIL. При простой лейкоплакии без

атипии также была выявлена повышенная экспрессия гена PON3 и составила 5,25 [2,58; 6,54], что в 2,32 раза выше, чем в группе сравнения (p=0,006, Критерий Краскела-Уоллиса). Повышенная экспрессия PON3 детектировалась в 61,1% (22/36) случаев лейкоплакии шейки матки и хронического цервицита. При CIS (HSIL) относительный уровень экспрессии гена, кодирующего PON3, был в 8,2 раза выше, чем в группе пациенток с неизмененным цервикальным эпителием и составил 18,53 [17,53; 25,03]. Повышенная экспрессия PON3 выявлялась в 100% (3/3) случаев CIS. При гистологическом заключении HSIL и отсутствии ВПЧ-инфицирования уровень экспрессии PON3 также был повышен в 3,33 раза и составил 7,53 [6,04; 7,60]. Сверхэкспрессия PON3 при HSIL и отсутствии инфицирования ВПЧ отмечалась в 100% (3/3) случаев.

По результатам исследования выявлена повышенная экспрессия linc-ROR при интраэпителиальных поражениях шейки матки: при CINI (LSIL) 1,78 [1,25; 1,93], при CIN II-III (HSIL) 1,92 [1,83; 2,07] (p <0,001, критерий Краскела-Уоллиса) (рисунок 3).

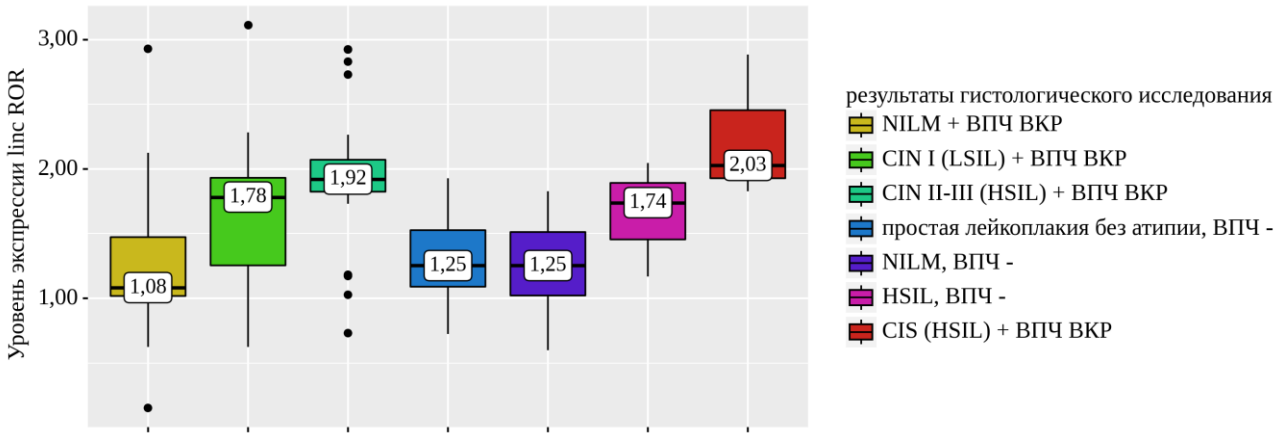

Рисунок 3 – Анализ отношения уровней днРНК linc-ROR в исследуемых группах

При LSIL сверхэкспрессия lincROR отмечена в 61,22% (30/49) случаев, при HSIL – в 74% (21/31) случаев. Выраженность экспрессии зависела от степени тяжести дисплазии. Наивысший уровень экспрессии linc-ROR был у пациенток с гистологическим заключением CIS (HSIL) и составлял 2,03 [1,93; 2,45], что превышало нормальные значения в 1,624 раз (p=0,043, критерий Краскела-Уоллиса). У всех 3 пациенток с гистологическим заключением CIS (HSIL) отмечалось повышение уровня экспрессии linc-ROR.

Результаты проведенного нами исследования продемонстрировали повышенную экспрессию MALAT 1 при дисплазии шейки матки относительно группы сравнения: при CIN I (LSIL) и CIN

II-III (HSIL) его уровень экспрессии повышался в 2,26 и 3,94 раз и составлял 3,23 [2,27; 3,92] и 5,73 [3,06; 6,46] соответственно (p<0,001, критерий Краскела-Уоллиса) (рисунок 4).

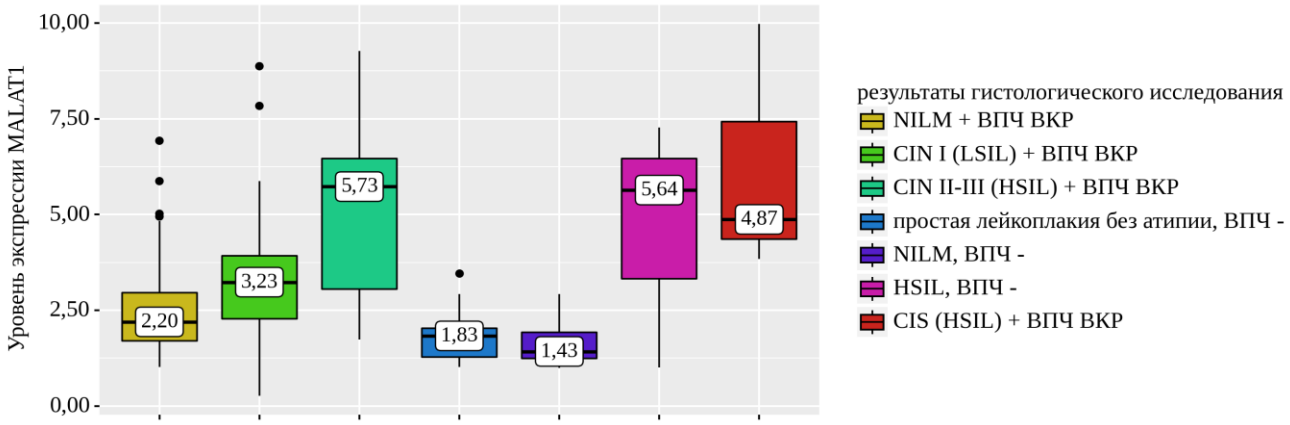

Рисунок 4 – Анализ отношения уровней днРНК MALAT1 в исследуемых группах

Экспрессия MALAT1 повышалась в 85,7% (42/49) случаев LSIL и в 90,3% (28/31) случаев HSIL. При носительстве ВПЧ-ВКР и нормальной цитологической картине уровень экспрессии MALAT1 был выше относительно группы сравнения и составлял 2,20 [1,70; 2,96] (p= 0,015, критерий Краскела-Уоллиса). При этом повышенная экспрессия выявлялась в 58,1% (25/43) случаев. Экспрессия MALAT1 достоверно не отличалась в группах пациенток с простой лейкоплакией шейки матки и нормальной цитологический картиной при отсутствии инфицирования ВПЧ и составляла 1,83 [1,28; 2,03] и 1,43 [1,25; 1,93] (p>0,05, критерий Краскела-Уоллиса). В группе с гистологическим заключением HSIL при отсутствии ВПЧ-инфекции уровень экспрессии MALAT1 был повышен относительно группы сравнения в 3,9 раз и составил 5,64 [3,33; 6,46] (p<0,05, критерий Краскела-Уоллиса). Экспрессия MALAT1 повышалась в 66,7% (2/3) случаев. При гистологическом заключении CIS (HSIL) экспрессия MALAT1 в 100% случаев была выше, чем в неизмененном цервикальном эпителии и составила 4,87 [4,36; 7,43] (p= 0,007, критерий Краскела-Уоллиса).

Согласно результатам корреляционного анализа уровень экспрессии генов PON2, PON3, linc-ROR и MALAT1 в эпителии шейки матки зависит не только от степени интраэпителиального поражения, но и от уровня вирусной нагрузки. Наиболее сильная прямая корреляционная связь выявлена между уровнем вирусной нагрузки и уровнем экспрессии мРНК генов PON2 и PON3 (теснота связи по шкале Чеддока: заметная) (таблица 1).

Таблица 1 – Результаты корреляционного анализа взаимосвязи уровня вирусной нагрузки и уровня экспрессии мРНК PON2, PON3, днРНК linc-ROR, MALAT1

Показатель	Характеристика корреляционной связи		
	ρ	Теснота связи по шкале Чеддока	p
Уровень вирусной нагрузки – Уровень экспрессии PON3	0,574	Заметная	< 0,001*
Уровень вирусной нагрузки – Уровень экспрессии PON 2	0,552	Заметная	< 0,001*
Уровень вирусной нагрузки – Уровень экспрессии linc ROR	0,364	Умеренная	< 0,001*
Уровень вирусной нагрузки – Уровень экспрессии днРНК MALAT1	0,414	Умеренная	< 0,001*

* – различия показателей статистически значимы ($p < 0,05$)

С целью выявления группы риска по прогрессированию интреэпителиальных поражений до дисплазии тяжелой степени (HSIL) и рака шейки матки нами был разработан индекс риска малигнизации (ИРМ) с помощью метода бинарной логистической регрессии. Предложенная прогностическая модель учитывает уровни экспрессии мРНК генов PON2, PON3, днРНК MALAT1 и linc-ROR. Чем ближе ИРМ к 1, тем больше вероятность развития рака шейки матки. Чем ближе ИРМ к 0, тем более вероятен благоприятный прогноз заболевания.

Индекс риска малигнизации рассчитывался по формуле:

$$ИРМ = \frac{1}{1+e^{-z}}$$

в которой e = 2,71828 – основание натурального логарифма,

$z = -7,733 + 0,367X_{MALAT1} + 1,359X_{linc\ ROR} + 0,209X_{PON\ 2} + 0,120X_{PON3}$

где ИРМ – индекс риска малигнизации,

X_{MALAT1} – уровень экспрессии MALAT1,

$X_{lincROR}$ – уровень экспрессии lincROR,

$X_{PON\ 2}$ – уровень экспрессии PON 2,

X_{PON3} – уровень экспрессии PON3.

За порог отсечения принята величина 0,5. Если ИРМ больше 0,5, то пациентка должна быть отнесена к группе высокого риска по прогрессированию дисплазии шейки матки. Полученная регрессионная модель является статистически значимой ($p < 0,001$). Исходя из значения коэффициента детерминации Найджелкерка, модель объясняет 59,0% наблюдаемой дисперсии

показателя "HSIL". Следовательно от факторов, учитываемых в данной модели, вероятность прогрессирования дисплазии шейки матки зависит на 59,0%. Исходя из значений регрессионных коэффициентов, была установлена прямая связь уровней экспрессии днРНК MALAT1, linc-ROR, мРНК PON2 и PON3 с вероятностью выявления HSIL (таблица 2).

Таблица 2 – Характеристики связи предикторов модели с вероятностью выявления HSIL

Предикторы	Unadjusted		Adjusted	
	COR; 95% ДИ	p	AOR; 95% ДИ	p
Уровень экспрессии MALAT1	1,987; 1,594 – 2,477	< 0,001*	1,443; 1,112 – 1,874	0,006*
Уровень экспрессии linc-ROR	9,850; 3,680 – 26,364	< 0,001*	3,893; 1,200 – 12,629	0,024*
Уровень экспрессии PON 2	1,542; 1,347 – 1,766	< 0,001*	1,232; 1,053 – 1,441	0,009*
Уровень экспрессии PON3	1,297; 1,196 – 1,406	< 0,001*	1,127; 1,023 – 1,242	0,016*

* – влияние предиктора статистически значимо (p < 0,05)

Оценка качества модели была проведена с использованием ROC-кривой. Основным критерием качества модели являлась оценка площади под кривой (AUC), в идеальном случае равняющаяся 1. Отсюда следует, что чем больше AUC, тем большей прогностической значимостью обладает модель. На рисунке 5 отображена ROC-кривая прогностической модели ИРМ, основанной на уровне экспрессии генов PON2, PON3, MALAT1 и linc-ROR. Площадь под ROC-кривой составила 0,942 ± 0,028 с 95% ДИ: 0,887 – 0,997. Полученная модель была статистически значимой (p < 0,001).

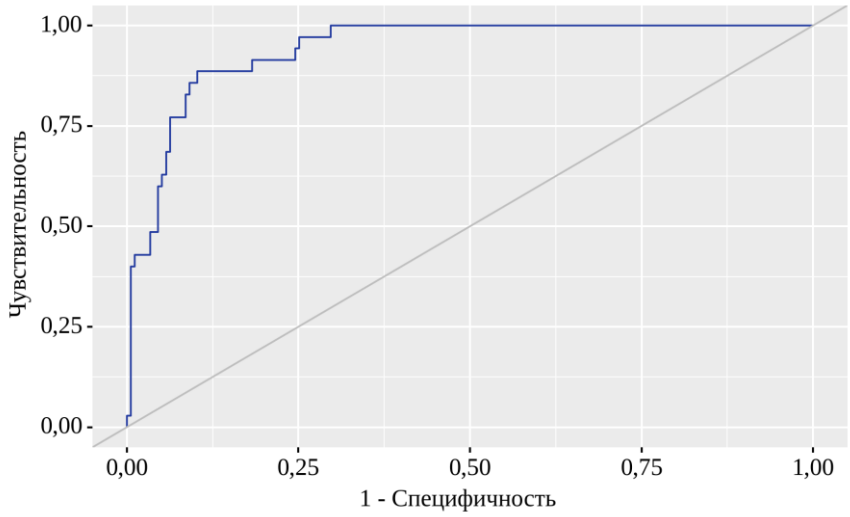

Рисунок 5 – ROC-кривая, характеризующая зависимость вероятности HSIL от значения логистической функции ИРМ

Пороговое значение логистической функции ИРМ в точке cut-off, которому соответствовало наивысшее значение индекса Юдена, составило 0,218. HSIL+ прогнозировалось при значении логистической функции P выше данной величины или равном ей. Чувствительность и специфичность модели составили 88,6% и 89,7%, соответственно.

Нами установлено, что индекс риска малигнизации, учитывающий уровень экспрессии мРНК PON2, PON3, днРНК linc-ROR и MALAT1 в эпителии шейки матки, с высокой чувствительностью (88,6%) и специфичностью (89,7%) характеризует тяжесть интраэпителиальных поражений. Это позволяет нам рекомендовать использование расчета индекса риска малигнизации для прогнозирования риска озлокачествления заболеваний шейки матки.

Ведение пациенток с морфологически верифицированным LSIL

В группе пациенток с морфологически верифицированным LSIL аномальное повышение экспрессии гена PON2 выявлено в 46,9% (23/49), PON3 – в 32,65% (16/49), linc-ROR – в 22,45% (11/49), и MALAT1 – в 53% (26/49) наблюдений, что свидетельствует о наличии тяжелой степени интраэпителиального поражения. При анализе факторов риска у пациенток с морфологически верифицированным LSIL и сверхэкспрессией генов PON2, PON3, linc-ROR и MALAT1, характерной для HSIL, в 75% (27/36) случаев, выявлена персистенция ВПЧ ВКР более 2 лет, высокий уровень вирусной нагрузки – 6,1 lg [4,7 – 6,7lg], более 5 половых партнеров в анамнезе. Наиболее часто, в 30,6% (11/36) случаев, встречалось инфицирование несколькими типами ВПЧ ВКР, в 27,8% (10/36) ВПЧ 16 типа, в 16,7% (6/36) ВПЧ 31 типа, в 5,6% (2/36) случаев ВПЧ 18 типа. Урогенитальные инфекции в группе пациенток с аномально высокими значениями экспрессии генов PON2, PON3, linc-ROR и MALAT1 встречались статистически чаще, чем у пациенток с нормальными значениями экспрессии данных генов: HSV II в 25% (9/36), Chlamydia trachomatis в 5,6% (2/36), Trichomonas vaginalis в 2,8% (1/36), бактериальный вагиноз в 25% (9/36), кандидозный вульвовагинит в 16,7% (6/36) случаев. Всем пациенткам с LSIL был рассчитан ИРМ. ИРМ> 0,5 выявлен у 34,7% (17/49) пациенток с LSIL, которым в связи с высоким риском прогрессирования дисплазии была выполнена петлевая электрохирургическая эксцизия шейки матки. По результатам гистологического исследования в 64,7% (11/17) случаев был диагностирован HSIL (CIN II-III), что свидетельствует о значимости маркеров PON2, PON3, linc-ROR и MALAT1 в диагностике предраковых заболеваний шейки матки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Возникновение рака шейки матки у женщин с негативным в отношении злокачественности и интраэпителиального поражения результатом цитологического исследования побуждает нас на поиск новых маркеров озлокачествления заболеваний шейки матки и на оптимизацию и усовершенствование существующего скрининга рака шейки матки. Более того, тактика ведения пациенток с плоскоклеточными интраэпителиальными поражениями легкой степени в настоящее время четко не определена и противоречива, особенно у молодых и нерожавших пациенток. Проведенное исследование позволило установить, что уровень экспрессии генов, кодирующих PON2 и PON3, MALAT 1 и linc-ROR, является важным прогностическим фактором возможной неопластической трансформации цервикального эпителия. Пациентки, имеющие повышенную экспрессию генов параоксоназ 2 и 3 типа, MALAT 1 и linc-ROR могут быть отнесены к группе высокого риска по развитию рака шейки матки. Разработана прогностическая модель, учитывающая уровни экспрессии мРНК генов PON2, PON3, днРНК MALAT1 и linc-ROR, с целью выявления группы риска по прогрессированию интреэпителиальных поражений до дисплазии тяжелой степени (HSIL) и рака шейки матки.

ВЫВОДЫ

1. Прогрессирование и злокачественная трансформация цервикального эпителия ассоциированы с комплексом клинико-анамнестических факторов риска. К наиболее значимым независимым предикторам прогрессирования предраковых заболеваний шейки матки относятся длительная персистенция ВПЧ ВКР (более 2 лет) (ОШ 6,469, 95% ДИ: 2,959 – 14,140), высокий уровень вирусной нагрузки (более 5,9 lg копий) (ОШ 2,280, 95% ДИ: 1,527 – 3,404), ранний половой дебют (до 18 лет) (ОШ 0,813, 95% ДИ: 0,665 – 0,994), большое количество половых партнеров в анамнезе (более 5) (ОШ 1,403, 95% ДИ: 1,130 – 1,744), травматическое повреждение шейки матки (хирургическое лечение, аборты) (ОШ 1,560, 95% ДИ: 1,148 – 2,121), персистирующие урогенитальные инфекции (ОШ 2,129, 95% ДИ: 0,945– 4,797).
2. Экспрессия мРНК PON2 повышена в эпителии шейки матки 79,6% (39/49) пациенток с LSIL и 87% (27/31) пациенток с HSIL, PON3 в 73,47% (36/49) случаев LSIL и 93,5% (29/31) случаев HSIL, что патогенетически отражает активацию окислительного стресса, митохондриальную дисфункцию и блокирование апоптоза. Степень дисплазии шейки матки напрямую зависит от уровня повышения экспрессии PON 2 и PON3: при LSIL экспрессия PON2 повышена в 2,5 раза – 6,54 [4,25; 8,26], при HSIL в 3,8 раз – 10,10 [6,88; 13,75], экспрессия PON3 повышена в 2,76 раз при LSIL – 6,25 [3,43; 9,53], в 5,56 раз при HSIL – 12,57 [7,59; 17,10] ($p <$

0,001). Экспрессия мРНК PON1 не детектируется в эпителии шейки матки, что демонстрирует отсутствие его прогностической значимости в процессе опухолевой трансформации цервикального эпителия.

3. Отмечена сверхэкспрессия днРНК MALAT1 в 85,7% (42/49) случаев LSIL и 90,3% (28/31) HSIL, днРНК linc-ROR в 61,22% (30/49) случаев LSIL и 74% (21/31) HSIL. Уровень экспресии linc-ROR и MALAT1 зависит от степени тяжести интраэпителиальных поражений: при LSIL экспрессия MALAT1 повышена в 2,26 раз – 3,23 [2,27; 3,92], экспрессия linc-ROR в 1,4 раза – 1,78 [1,25; 1,93], при HSIL экспрессия MALAT1 повышена в 3,94 раз – 5,73 [3,06; 6,46], linc-ROR в 1,54 раз – 1,92 [1,83; 2,07] (p<0,001). Повышение экспрессии днРНК linc-ROR и MALAT1 свидетельствует об усилении клеточной пролиферации, деградации деградации продукта гена p53 – супрессора опухолевого роста и замедлении процессов апоптоза.

4. Степень тяжести интраэпителиальных поражений и уровень экспресии PON2, PON3, linc-ROR и MALAT1 в цервикальном эпителии зависят от уровня вирусной нагрузки ВПЧ ВКР (p<0,001). В группе пациенток с NILM медиана уровня вирусной нагрузки составила 4,7 lg [4,4; 5,0 lg], при LSIL – 5,5 lg [4,2; 6,6 lg], при HSIL – 6,9 lg [5,9; 7,2 lg]. Наиболее сильная корреляционная связь выявлена между уровнем вирусной нагрузки и повышением экспрессии мРНК PON2 и PON3 (теснота связи по шкале Чеддока заметная, p <0,001).

5. Применение молекулярно-генетического метода исследования уровня экспрессии мРНК PON2, PON3, днРНК linc-ROR, MALAT1 и расчет (ИРМ) с высокой чувствительностью (83,8%) и специфичностью (91,3%) позволяет прогнозировать этапность опухолевой трансформации шейки матки.

6. При морфологической верификации LSIL, высокой вирусной нагрузке (более 5,9 lg копий), сверхэкспрессии экспрессии PON 2 (более 6,88), PON3 (более 7,59), MALAT1 (более 3,06) и linc-ROR (более 1,83), ИРМ > 0,5 существует высокий риск прогрессирования дисплазии и развития рака шейки матки, что требует сокращения сроков динамического наблюдения и проведения хирургического лечения.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1) В выявлении факторов риска озлокачествления заболеваний шейки матки необходимо учитывать не только факт наличия инфицирования вирусом папилломы человека, но и анамнестическую давность первичного диагноза, длительность персистенциии ВПЧ ВКР, уровень вирусной нагрузки, возраст полового дебюта, количество половых партнеров, наличие

инфекций, передаваемых половым путем, травматических повреждений шейки матки в анамнезе, курение сигарет, социально-экономический статус пациентки.

2) У пациенток с морфологически подтвержденным LSIL, при высокой вирусной нагрузке (более 5,3 lg копий) рационально дополнительно проводить определение уровня экспрессии мРНК генов PON2, PON3, MALAT1 и linc-ROR и рассчитывать ИРМ с целью выявления группы высокого риска по прогрессированию дисплазии шейки матки.

3) При выявлении сверхэкспрессии PON 2 (более 6,88), PON3 (более 7,59), MALAT1 (более 3,06), linc-ROR (более 1,83) и ИРМ > 0,5 существует высокий риск прогрессирования дисплазии и развития рака шейки матки, что требует сокращения сроков динамического наблюдения и проведения хирургического лечения.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1) Уровень экспрессии параоксоназ при диспластических процессах шейки матки / С. А. Леваков, Н. А. Шешукова, Е. А. Обухова [и др.] // Акушерство и гинекология. – 2020. – № 2. – С. 149-153. – DOI 10.18565/aig.2020.2.149-153.

2) Роль параоксоназ в патогенезе воспалительных, инфекционных и онкологических заболеваний / С. А. Леваков, Н. А. Шешукова, Е. А. Обухова [и др.] // Акушерство и гинекология. – 2020. – № 3. – С. 26-32. – DOI 10.18565/aig.2020.3.26-32.

3) Возможность использования длинных некодирующих РНК в прогнозировании развития злокачественной трансформации цервикального эпителия / С. А. Леваков, Е. А. Обухова, Н. А. Шешукова [и др.] // Акушерство и гинекология. – 2021. – № 9. – С. 120-126. – DOI 10.18565/aig.2021.9.120-126.

4) Доброкачественные и преинвазивные состояния шейки матки: учебно-методическое пособие / С.А. Леваков, Н.А. Шешукова, С.В. Пауков, Е.А. Обухова. — М.: Практическая медицина, 2022.