На правах рукописи

Дамирова

Кемер Фирудин Кызы

ИММУНОЦИТОХИМИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ПРИВЫЧНОГО НЕВЫНАШИВАНИЯ БЕРЕМЕННОСТИ

3.1.4. Акушерство и гинекология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва – 2023 год

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Российский университет дружбы народов» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Научный руководитель:
член-корреспондент РАН,
доктор медицинских наук,
профессор **Радзинский Виктор Евсеевич**

Официальные оппоненты:
Зуев Владимир Михайлович – доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), профессор кафедры акушерства и гинекологии №1 клиники акушерства и гинекологии имени В.Ф. Снегирева;

Ледина Антонина Виталиевна – доктор медицинских наук, Общество с ограниченной ответственностью «Хавен» Клинический госпиталь Лапино «Мать и Дитя», врач акушер-гинеколог.

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

Защита состоится «_____» 2023 г., в_____ ч. 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 (https://moniiag.ru) Государственного бюджетного учреждения здравоохранения Московской области «Московский областной научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии» Министерства здравоохранения Московской области.

Автореферат разослан «_____» «_____» 2023 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета
доктор медицинских наук, профессор Щукина Наталья Алексеевна

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проведенного исследования

Привычное невынашивание беременности (ПНБ) – медико-социальная проблема, признанная современной эпидемией, с тенденцией к росту репродуктивных потерь во всем мире ежегодно на 15,0–20,0%. Распространенность привычного выкидыша среди пар, планирующих беременность, составляет от 0,6 до 2,3% (Айламазян Э.К. и соавт., 2014).

Сложившиеся представления о причинах привычного выкидыша: хромосомные аномалии, возраст супружеских пар, семейная предрасположенность, иммунологические факторы; инфекции, передаваемые половым путем (ИППП); наследственные и приобретенные нарушения в системе гемостаза - не отражают всех аспектов этой многофакторной проблемы. Эпидемиологические и генетические исследования приводят данные о взаимосвязи иммунологических нарушений с привычным выкидышем, однако роль аберрантной индукции регуляторных pTreg-клеток мало изучена (Williams Z., 2012; …,2020).

Микроокружение клеток шейки матки состоит из иммунных клеток и специфической микробиоты, модулирующей локальные иммунные реакции (Audirac-Chalifour A. et al., 2016; Rose W.A.2nd. et al., 2012; Koyanagi Y. et al., 2019). Концепция взаимодействия микробиоты и иммунной системы, открывающая возможности профилактики повторных потерь беременности, представляется наиболее вероятной при персистенции высокоонкогенных штаммов вируса папилломы человека (ВПЧ). Мета-анализ показал повышенный риск заражения ВПЧ беременных женщин, однако реализации его цитопатического, в том числе онкогенного эффекта, способствуют микробиологические и иммунные эффекты (Liu P. et al., 2014).

Степень разработанности темы исследования

Связь привычного выкидыша с повышением провоспалительных цитокинов в периферической крови подтверждена (Радзинский В.Е., 2017), однако особенности локального иммунного профиля малоизучены (Кононова И.Н., Ворошилина Е.С., 2014). Иммунные причины, отторжение или развитие микросреды, неблагоприятной для развития эмбриона/плода, вероятны как механизмы так называемого идиопатического ПНБ.

Состояние эндо- и экзоцервикса женщин с различными репродуктивными исходами при инфицировании шейки матки ВПЧ практически не изучено. Выявление

молекулярно-биологических предикторов позволило расширить представления о генезе предраковых заболеваний шейки матки, однако влияние на исходы беременности последствий персистенции ВПЧ малоизучено. Доказательства передачи ВПЧ через плаценту неоднозначны; сообщается о выявлении дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) ВПЧ у 4,0–75,0% женщин с выкидышем и 20–24,0% – абортами (Liu P. et al., 2014). Данные о выкидышах и плацентарных аномалиях при персистенции ВПЧ позволяют предположить дисрегуляцию иммунных механизмов пролонгации беременности (Hahn H.S. et al., 2013; Ambühl L.M.M. et al., 2016).

Перспективность внедрения в алгоритм обследования женщин с ПНБ неясного генеза, помимо традиционных при цервикальном скрининге методик (полимеразно-цепная реакция в реальном времени (ПЦР-РВ) с типированием и определением количества геномных эквивалентов ВПЧ или реакции гибридизации вирусной ДНК с РНК (рибонуклеиновой кислотой)-зондом (Digene-тест)), оценки продукции вирусных онкогенов и онкобелков инфицированной эпителиальной клеткой требует детальных исследований (Feng Y.K. et al., 2015). Гиперэкспрессия онкопротеина p16ink4-α INK4A и Ki67 расценивается как маркер цервикальной интраэпителиальной неоплазии (CINII/CINIII) и рака шейки матки, однако их роль в генезе привычного выкидыша малоизучена (Tropé A. et al., 2012; Gagea J.C. et al., 2016). Для прогнозирования, диагностики и лечения ВПЧ-ассоциированных поражений эпителия шейки матки изучаются микро-РНК (miR), эпигенетические биомаркеры, отражающие функциональные изменения в тканях (Rusanova I. et al., 2019).

Эффективность микронизированного прогестерона на прегравидарном этапе и в ранние сроки гестации при привычном выкидыше доказана, однако причины неэффективности лечения угрожающего прерывания беременности гормонами неясны (Coomarasamy A. et al., 2015; Devall A.J. et al., 2020; Stephenson M.D. et al., 2016; Ismail A.M. et al., 2018). Изучение особенностей гормонорецепции в клетках эндоцервикса в патогенезе ПНБ с позиций вирусной нагрузки ВПЧ, экспрессии онкобелков и микроРНК позволит улучшить исходы заболевания.

Уточнение молекулярно-биологических маркеров (экспрессии онкопротеинов и мРНК), гормонорецепции, взаимосвязи вагинальной микробиоты с особенностями локального иммунного статуса позволит осуществлять прогнозирование и персонифицированную реабилитацию женщин с привычным выкидышем.

Цель исследования

Улучшить прогнозирование, раннюю диагностику и повысить эффективность лечения привычного невынашивания беременности вне и во время беременности.

Задачи исследования

- Выявить цитологические особенности состояния эндоцервикса женщин с ПНБ.
- Установить наличие цитологических изменений в эндоцервиксе после неразвивающейся беременности.
- Представить концепцию взаимосвязи клеточного состава эндоцервикса и микробиоценоза влагалища.
- Выявить роль изменений гормонорецепции в клетках эндоцервикса в патогенезе ПНБ.
- Оценить эффективность прогнозирования и лечения доброкачественных болезней шейки матки, воздействия на локальный иммунный статус и микробиоту влагалища на исходы следующей беременности женщин с ПНБ.

Научная новизна исследования

Расширены представления о патогенетических звеньях ПНБ, прежде всего, идиопатических, неясного генеза на основании доказанной связи нарушений микробиоты влагалища с молекулярно-клеточными изменениями эндоцервикса.

Научно обоснована целесообразность включения в алгоритм обследования женщин с привычным невынашиванием высокотехнологичных методов (жидкостная цитология, иммуноцитохимическое исследование) для выявления ВПЧ-ассоциированных особенностей эндоцервикса.

Установлены механизмы нарушения клеточной пролиферации эндоцервикса женщин с ПНБ на основании комплексной оценки ВПЧ-статуса, экспрессии маркеров p15/Ki-67, BCL-2 и противоонкогенных миРНК-145, -34a. Выявленные нарушения гормонорецепции эндоцервикса обосновывают исследование у женщин с ПНБ экспрессии мРНК прогестеронового рецептора PGR-A.

Определены особенности вагинальной микробиоты при различном клеточном составе эндоцервикса женщин с ПНБ, наличии ВПЧ-инфекции. Установлена роль нарушений локального иммунного статуса (преобладание активности провоспалительных Т-лимфоцитов Th17/Th1 и снижение уровня регуляторных CD4+ Treg) в генезе НБ.

Впервые методом логистической регрессии разработана модель прогнозирования повторного невынашивания на основании комплексной оценки молекулярно-биологических маркеров, позволяющая осуществлять персонифицированную прегравидарную подготовку и стратификацию беременных в зависимости от степени риска.

Научно доказана эффективность персонифицированной оценки риска повторных потерь беременности и прогрессирования ВПЧ-ассоциированных цервикальных интраэпителиальных неоплазий.

Теоретическая и практическая значимость работы

Представлены характеристики вагинальной микробиоты женщин с ПНБ и клеточного состава эндоцервикса, наиболее выраженные при ВПЧ-ассоциированных изменениях.

Обоснована целесообразность комплексного использования молекулярно-биологических методов для оценки активности клеточной пролиферации и противоонкогенного потенциала эндоцервикса, дисбаланс которых повышает как риск повторного невынашивания, так и неопластической трансформации шейки матки.

Представлена необходимость исследования локального иммунного профиля эндоцервикса женщин с НБ, позволяющего судить об объеме лечебно-реабилитационных мероприятий.

Разработанный алгоритм ведения женщин с ПНБ предусматривает оценку пролиферативной активности эндоцервикса (жидкостная цитология, иммуноцитохимическое исследование экспрессии мРНК и ми-РНК), особенно при ВПЧ-ассоциированных цервикальных изменениях, нарушениях локального иммунного статуса (Th17/Th1, CD4+ Treg) и гормонорецепции (мРНК).

Разработанная математическая модель определяет выбор персонифицированной тактики при различном риске (высокий, низкий) повторного выкидыша.

Положения, выносимые на защиту

1. Цитологические особенности эндоцервикса женщин с ПНБ неясного генеза (ASC-US/LSIL), ассоциированные с ВПЧ-инфицированием, и нарушением цервико-вагинальной микробиоты (воспалительные, дисбиотические изменения), срывом локального иммунного статуса (преобладание провоспалительных Т-лимфоцитов Th17/Th1 и снижение уровня регуляторных CD4+ Treg) при НБ подтверждает

необходимость прегравидарного обследования и оздоровления для улучшения исходов беременности.

2. Иммуноцитохимическая презентация повышения пролиферативного потенциала клеток эндоцервикса (гиперэкспрессия p16/Ki-67, регулятора апоптоза BCL-2, мРНК-34 и -145) при аномальных цитограммах (ASC-US, LSIL) подтверждает общность молекулярно-биологических механизмов ПНБ и ВПЧ-ассоциированных поражений шейки матки, сопровождаемых повреждением рецепторного аппарата (снижение экспрессии мРНК гена, кодирующего PGR-A) и развитием прогестеронрезистентности.

3. Разработанный алгоритм ведения женщин с ПНБ, предусматривающий исследование эндоцервикса инновационными методами (жидкостная цитология, иммуноцитохимический, проточная цитометрия) и оценку персонифицированного риска по прогностической модели, позволяет предотвратить прогрессию ВПЧ-ассоциированных цервикальных интраэпителиальных поражений (у 14,0% беременных и 52,2% с ПНБ) и способствуют благоприятным исходам текущей и планируемой беременности (отказ от неэффективной гестагенной терапии; срочные роды в 80,4%, повторный выкидыш – 8,5%).

Методология и методы исследования

Настоящее когортное проспективное сравнительное исследование выполнено в 2018-2019 гг. на базах кафедры акушерства и гинекологии с курсом перинатологии (заведующий кафедрой — член-корр. РАН, заслуженный деятель науки РФ, д.м.н., проф. В.Е. Радзинский) Медицинского института Федерального Государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов», гинекологическом отделении и отделении патологии беременных ГКБ им. С.С. Юдина (главный врач - Проценко Д.Н.), женской консультации №1 ГКБ им. Н.И. Пирогова “Филиал Родильный дом №25” (заместитель главного врача по акушерству и гинекологии, заведующая родильным домом - Оленева М.А.).

Исследование выполнено в рамках основной научно-исследовательской деятельности кафедры «Репродуктивное здоровье населения Московского мегаполиса и пути его улучшения в современных экологических и социально-экономических условиях» (номер гос. регистрации 01.9.70 007346, шифр темы 317712).

Дизайн исследования – открытое сравнительное проспективное в параллельных группах с использованием современных лабораторно-инструментальных методов.

Этапы исследования: на I-м проводили клинико-анамнестическую оценку факторов риска ПНБ, цервикальный скрининг с использованием молекулярно-биологических методов у женщин с рецидивирующим выкидышем (n=59) и здоровых беременных, не имеющих в анамнезе неблагополучных репродуктивных исходов (n=57); на II этапе оценивали эффективность лечения женщин с ПНБ на основании факта ее наступления и исходов беременности после реабилитации на прегравидарном этапе. Исследование одобрено локальным этическим комитетом ФГАОУ РУДН до начала исследования (протокол №2 от 18.10.2018г).

Критерии включения в группу ПНБ: возраст от 18 до 45 лет, два и более выкидыша в анамнезе; неясная этиология, визуально неизмененная шейка матки при осмотре в зеркалах и кольпоскопии, добровольное информированное согласие на участие в исследовании и забор биологического материала, возможность следовать протоколу.

Критерии исключения: морфологически измененная шейка матки (цервициты, рубцы, дисплазии, кисты), наличие соматических заболеваний (острые инфекционные заболевания, в т.ч. ВИЧ, гепатиты В и С, сопутствующие экстрагенитальные заболевания в стадии суб- и декомпенсации), кесарево сечение и миомэктомия в анамнезе, отказ следовать протоколу.Обследование беременных с ЭГЗ включало: сбор анамнеза, жалоб, оценку индекса массы тела (ИМТ, расчет по формуле: m/p^2, где m - масса тела, кг; р - рост, м), стандартный клинический осмотр (данные объективного и влагалищного исследования).

Всем пациенткам, включенным в исследование, проводилась pH-метрия отделяемого половых путей. Для оценки биоценоза влагалища осуществлялось ПЦР-тестирование с детекцией продуктов в режиме реального времени и расчетом логарифмов соотношений концентраций ДНК Lactobacillus spp. и других бактерий в виде заключений (нормоценоз, БВ, вульвовагинальный кандидоз, аэробный вагинит); инфекций, передаваемых половым путем. С целью выявления инфицированности цервикального канала проводили бактериологический посев отделяемого на флору и чувствительность к антибиотикам.

Жидкостную цитологию с применением молекулярно-биологических методов полимеразной цепной реакции (ПЦР) на инфекции, передаваемые половым путем (ИППП) (хламидии, микоплазмы, вирус простого герпеса 2 типа (ВПГ 2), и ВПЧ-генотипирования, проводили до бимануального исследования. Результаты оценивали по классификации Бетесда (1988) с выделением основных видов цитограмм:

нормальная, без изменений; «непонятные мазки», не позволяющие оценить характер изменений, но не являющиеся нормой (Atypical Squamous Cells of Undetermined Significiance – ASC-US) и предрак: низкой степени выраженности (Low-grade Squamous Intraepitelial Lesions – LSIL) и высокой (High-grade Squamous Intraepitelial Lesions – HSIL).

ВПЧ-тестирование осуществляли с помощью набора реагентов для выявления и генотипирования ДНК вирусов высокого онкогенного риска (ВР) 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 типов методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией.

Определение экспрессии мРНК p16, Ki-67, BCL-2, PGR проводилось иммуноцитохимическим исследованием.

Методом проточной цитометрии в эндоцервикальном содержимом пациенток с рецидивирующим выкидышем выявлен выраженный дисбаланс соотношения Т-лимфоцитов Th17/Th1 и CD4+ Treg. Исследование проводили на базе клинико-диагностической лаборатории ФБУН «ЦНИИ» Эпидемиологии Роспотребнадзора), г. Москва.

Всем пациенткам, включенным в исследование, производили простую и расширенную кольпоскопию. При описании результатов кольпоскопии использована международная терминология, принятая на 14-м Всемирном конгрессе IFCPC (2011) с выделением категорий: нормальная кольпоскопическая картина, аномальная, подозрение на инвазию и прочие. Дизайн обследования женщин с ПНБ и здоровых беременных представлен на Рисунке 1.

Рисунок 1 – Дизайн исследования (женщины с ПНБ и здоровые беременные).

Клинические данные были подвергнуты статистическому анализу на основе принципов и методик программы «Statistica 10» (StatSoft, США). Статистический анализ проводили с использованием непараметрических методов ввиду несоответствия данных нормальному распределению (критерий Шапиро-Уилка).

При обработке данных использовали статистические методы:

а) для количественных данных рассчитывали медиану (Me) и интерквартильный размах (Q1; Q3). Статистическую значимость различий рассчитывали с помощью критерия Манна-Уитни (U) для сравнения двух независимых выборок.

б) проверку значимости связи между двумя качественными переменными проводили в таблицах сопряженности 2x2 с помощью критерия хи-квадрат (χ^2) с поправкой Йетса на непрерывность;

г) шансы возникновения изучаемого события в группах оценивали по отношению шансов (ОШ) с 95% доверительным интервалом (95% ДИ); ОШ Me (95% ДИ);

д) прогностическую значимость изучаемых переменных оценивали методом пошагового логистического регрессионного анализа, для анализа клинической информативности и выбора пороговых значений использовался ROC анализ (receiver operating characteristic).

Расчет осуществляли по формуле:

$p = \frac{1}{1+e^{-z}}$, z = a0 + a1x1 + a2x2 + a3x3 + … + anxn, где p – вероятность наступления исхода, x1…xn – значения предикторов, измеренные в номинальной, порядковой или количественной шкале, a1…an – коэффициенты регрессии. Статистическую значимость модели определяли с помощью критерия χ2, вычисляли чувствительность, специфичность и диагностическую эффективность модели. Данные ROC-анализа представлены в виде площади под кривой AUC (Area under ROC curve).

Уровень статистической значимости (p) принимали равным при $p<0,05$.

Апробация диссертации проведена на кафедре акушерства и гинекологии с курсом перинатологии Медицинского института ФГБОУ ВО МЗ РФ РУДН (Протокол №16 от 08.06.2022 года).

Результаты, полученные в ходе диссертационного исследования, внедрены в практическую работу гинекологического отделения и отделения патологии беременных ГБУЗ ММКЦ «Коммунарка» ДЗМ, а также в учебный процесс кафедры акушерства и гинекологии с курсом перинатологии Медицинского института РУДН.

Личный вклад соискателя заключается в участии во всех этапах диссертационного исследования: анализе современной литературы, посвященной проблеме диссертационного исследования, курации 116 пациенток, включенных в исследование, обработке и интерпретации полученных результатов, подготовке основных публикаций по результатам работы, отражающих научные положения диссертации. Сформулированы положения, выносимые на защиту, сделаны обоснованные выводы.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 6 научных работ в отечественной и зарубежной печати, из них – 4 в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ.

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 116 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, главы, посвященной материалу и методам исследований, трех глав собственных исследований, обсуждения полученных результатов, заключения, включающего выводы и практические рекомендации, указателя литературы. Работа содержит 25 таблиц, иллюстрирована 16 рисунками. Список литературы включает 161 источников, из них 17 на русском и 144 на иностранном языках.

Результаты собственных исследований и их обсуждение

Средний возраст обследованных женщин обеих групп значимо не отличался, варьируя в пределах 26–37 лет. Сравнительный анализ базовых социальных и клинико-анамнестических характеристик женщин с ПНБ и здоровых беременность показал их сопоставимость по основным анализируемым параметрам.

Высокий показатель хронических инфекционно-воспалительных заболеваний органов дыхательной системы (хронический тонзиллит (49,2% против 28,1%, $p=0,02$, $\chi2=5,4$), частые острые респираторные вирусные инфекции (ОРВИ) (50,9% против 28,1%, $p=0,01$, $\chi2=6,3$), бронхиты, пневмонии (44,1% против 17,5%, $p=0,003$, $\chi2=9,5$)) женщин с ПНБ представляет интерес с позиций опосредованного отрицательного влияния на микроэкологию влагалищного биотопа.

Качественный и количественный состав цервико-вагинальной микробиоты женщин с ПНБ мог быть значим не только в рецидивировании неспецифических вагинитов (67,8% против 26,3%, $p<0,001$, $\chi2=20,2$) и перенесенных урогенитальных инфекций (40,7% против 14,0%, $p=0,002$, $\chi2=10,3$), особенно – генитального герпеса

(20,3% против 5,3%, p=0,02, χ2=5,8), но и отражать низкую приверженность барьерному методу контрацепции – при ПНБ в четыре раза реже, чем здоровых беременных (10,2% против 40,4%, p<0,001, χ2=14,1).

Нарушения микроэкологии влагалища женщин с ПНБ подтверждала бОльшая частота, чем в контроле:

- pH секрета – более 5,0 (5,1 (4,5; 5,7) против 4,8 (4,2; 5,4) в контроле) (p=0,005, χ2=7,9, ОШ 1,67 (1,16;2,42)), как признак ощелачивания среды и снижения пула лактобактерий. Достоверность методики подтверждает чувствительность – 59,3%, специфичность – 66,7%, эффективность – 62,9%, AuROC – 0,58.
- повышение лейкоцитов более 10 в поле зрения – в два раза (81,4% против 42,1%) (p=0,0009, χ2=18,9, ОШ 6,0(2,59; 13,90), чувствительность исследования – 81,4%, специфичность – 57,9%, эффективность – 69,6%);
- преобладание кокко-бациллярной флоры (23,7%) – в три раза чаще, чем в контроле (8,8%) (p=0,005, χ2=4,7, ОШ 3,24 (1,08; 9,7)).

Исследование микробиоты половых путей женщин с ПНБ (по результатам микроскопии мазка и Фемофлор-16) показало преобладание в сравнении с контролем:

- неспецифического вагинита – практически в три раза чаще, чем в контрольной группе (33,9% против 12,3%, p=0,006; χ2=7,6);
- воспалительных и дисбиотических состояний – в два раза (81,4% против 42,1%, p=0,000; χ2=19,0).

Видовых различий биотопа женщин обеих групп практически не наблюдалось, как и количества исследуемых образцов с высокой микробной концентрацией.

Вирусную инфекцию при ПНБ выявляли втрое чаще, чем в контроле (47,4% против 15,8%, p=0,0001; χ2=13,4, ОШ 6,8 (2,9; 15,6), специфичность исследования – 78,9%), с преобладанием 16 генотипа (18,6% против 5,3%, p=0,03; χ2=4,8).

Показатель высокой вирусной нагрузки (более 10^5 ДНК ВПЧ в 1 мл) в группах отличался, но недостоверно: у 17 женщин с ПНБ (60,7%) против двух (22,2%) в контроле (p>0,05).

Среди цитологических характеристик эндоцервикса женщин с ПНБ неясного генеза в сравнении со здоровыми беременными чаще встречались:

- атипичные клетки плоского эпителия неясного значения (ASC-US) – в 2,5 раза (25,4% против 10,5% в контроле, p<0,001, χ2=13,9, ОШ 2,9 (1,04; 8,12));

- косвенные признаки ВПЧ (койлоцитоз) – в 2,5 раза (50,9% против 21,1%, p=0,0008, χ2=11,1; ОШ 3,9 (1,7;8,8), специфичность – 78,9%);
- варианты LSIL, соответствующие плоскоклеточным интраэпителиальным поражениям низкой степени тяжести – в три раза (27,1% против 8,8%, p<0,001, χ2=13,9, ОШ 3,82 (1,31; 11,42)).

Соответствие мазков цитологической норме в группе с ПНБ встречалось в 1,7 раза реже (47,4% против 80,7%, p<0,001, χ2=13,9, ОШ 0,22 (0,1; 0,51)).

Аномальную цитологическую картину (заключения ASC-US и LSIL) имели 52,5% женщин с ПНБ и только 19,3% здоровых беременных. Нормальная кольпоскопическая картина, выбранная критерием включения в выборку с ПНБ, позволяет оспаривать мнение о развитии CIN исключительно на фоне послеродовой и послеабортной травмы, приводящей к снижению локального иммунитета.

Сопоставимая встречаемость отдельных факторов при градации женщин по заключениям жидкостной цитологии (ASC-US и LSIL) нивелировала их прогностическую ценность. Частота наследственной отягощенности по ракам органов репродуктивной системы составила 41,9%, высокого инфекционного индекса (ОРВИ более 6 раз в год) – 54,8%, интенсивного и длительного табакокурения (более пяти лет и пяти сигарет в день) – 35,5%, микстов урогенитальных инфекций – 77,4%.

Вероятность нарушения локального иммунного статуса у женщин с ПНБ и изменениями цитограмм определяли рецидивы БВ (100,0%) и отсутствие барьерной контрацепции (100,0%).

Преобладание у ВПЧ-позитивных беременных с ПНБ дисбиотических нарушений и интраэпителиальных поражений шейки матки (75,0%) позволяет сделать заключение о единстве изменений: вагинального биотопа – цервикального эпителия – эмбрио-трофобластных взаимодействий.

Особенности иммунного ответа, определяемые при оценке эндоцервикального содержимого женщин с НБ методом проточной цитометрии, заключались в нарушении лимфоцитарного баланса:

- с поляризацией в сторону провоспалительных лимфоцитов Th17/Th1 – втрое выше (55,0% против 15,8%, p=0,0001, χ2=20,2, ОШ 6,8 (2,8; 16,3), специфичность – 84,2%), чем в контроле. Эти заключения согласуются с данными Wang S. et al. (2021); Xu L. и соавт. (2020), указавших на повышение индекса Th1/Th2 при дефиците лактобацилл у 80,0% женщин с ПНБ;

- снижением регуляторных Т-лимфоцитов CD4+ Treg – в 3,5 раза (20,3% против 70,2%, p=0,0008, χ2=29,1, ОШ 9,22 (3,94; 21,58)) в сравнении с контролем.

Полученные данные свидетельствуют об иммунорегуляторных нарушениях толерантности к полуаллогенному плоду.

Таким образом, инфицирование онкогенными типами ВПЧ практически половины беременных с ПНБ сопровождалось изменением клеточного состава эндоцервикса, при НБ – иммунным дисбалансом, подавлением реакций врожденного и приобретенного иммунитета. Полагаем, что изменение вагинальной микробиоты с развитием иммуновоспалительных реакций, чаще при вирусной персистенции, повышает риск повторных выкидышей, что согласуется с представленными ранее данными Wiik J. et al. (2021); Farsimadan M. (2021).

Инфицирование ВПЧ 47,4% женщин с ПНБ обосновывает оценку риска неопластической трансформации шейки матки, как и механизмов повторных репродуктивных потерь. С этой целью выполнен анализ экспрессии регуляторов клеточной пролиферации мРНК (p16, Ki-67) и BCL-2, обладающего антиапоптотическим эффектом, противоонкогенных miR-145 и miR-34a в образцах цервикального эпителия (эндо- и экзоцервиксе).

Особенности экспрессии мРНК женщин с ПНБ в сравнении с женщинами с благоприятными исходами беременности (Рисунок 2):

- двойная гиперэкспрессия маркеров нарушения клеточной пролиферации p16/Ki-67 – практически в три раза чаще (52,2% против 15,8%, p=0,0001, χ2=17,3, ОШ 5,9 (2,46; 14,17) и ОШ 2,1 (1,50; 2,95) соответственно (специфичность метода – 84,21%, чувствительность – 52,5%, эффективность – 68,4%);

- экспрессия BCL-2 значимо преобладала в группе с ПНБ – практически в четыре раза (54,2% против 14,0%, p=0,0001, χ2=20,7, ОШ 7,26 (2,93; 17,96), специфичность исследования – 85,9%, эффективность – 70,1%, чувствительность – 54,2%).

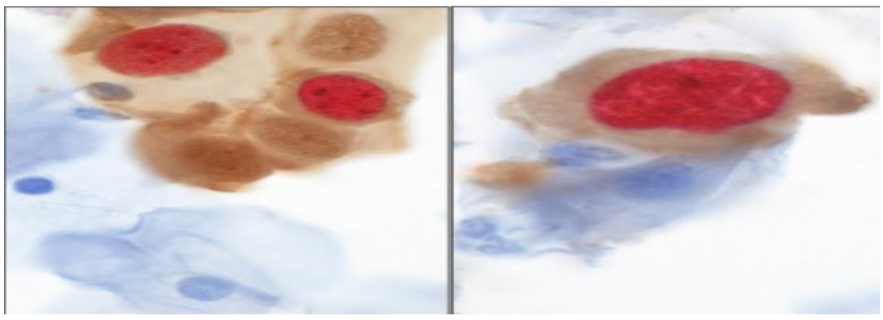

Рисунок 2 – Двойное окрашивание клеток при коэкспресии p16/Ki-67

Избыточная экспрессия молекулярно-биологических маркеров контроля митотического цикла (p16, Ki-67) и блокатора апоптоза BCL-2 выявлена у 52,2% женщин с ПНБ и цитограммой ASC-US/LSIL. Средний показатель экспрессии p16/Ki-67 в группе с повторным выкидышем составил 0,65, контрольной – 0,045.

Гиперэкспрессия маркеров пролиферации наряду с ВПЧ-типированием повышает качество диагностики истинных дисплазий – у 25,4% женщин с заключением ASC-US и требует динамического мониторинга у 15,8% беременных с NILM.

Методом ПЦР в режиме Real Time с обратной транскрипцией в эндоцервиксе пациенток с ASC-US и LSIL выявлено достоверное снижение экспрессии противоонкогенных миРНК в сравнении с контролем (Рисунок 3):

- миРНК-145 – в три раза чаще (41,4% против 12,5%, p=0,0005, $\chi 2$=11,9, ОШ 4,94 (1,91; 12,76));
- миРНК-34а – в четыре раза чаще (49,3% против 10,5%, p=0,0002, $\chi 2$=15,0, ОШ 5,83 (2,16; 15,73)).

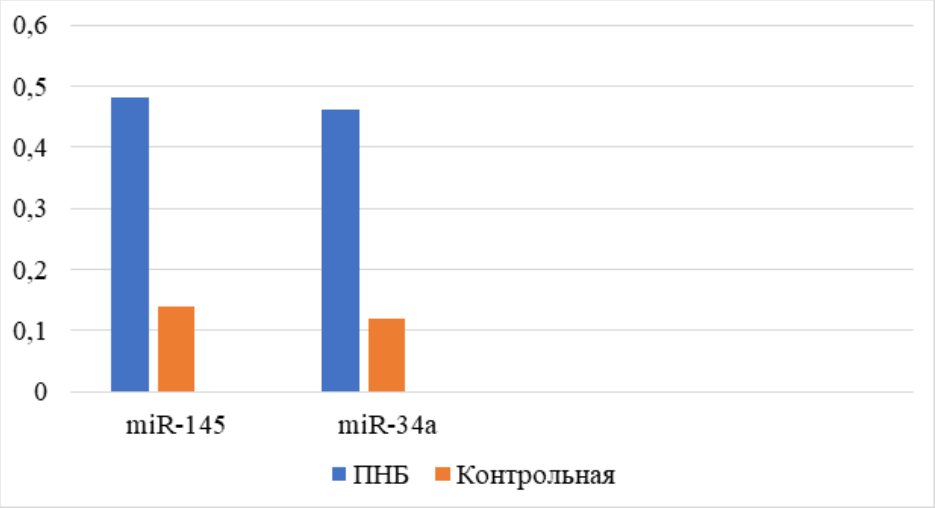

Рисунок 3 – Уровень экспрессии миРНК в группах

Низкая экспрессия мРНК гена, кодирующего PGR-A и противоонкогенных miR-145 и miR-34a, указывает на изменение митотического цикла клеток эндоцервикса, дисбаланс процессов пролиферации и апоптоза у женщин с ПНБ. Способность миРНК к эпигенетической регуляции клеточной пролиферации делает их маркерами неопластической трансформации шеечного эпителия, повышает качество диагностики истинных дисплазий и способствует сокращению необоснованных хирургических вмешательств при отрицательных результатах исследования.

Изменение уровня миРНК у пациенток с ПНБ и аномальными заключениями цитограмм подтверждает общность молекулярно-биологических механизмов

заболеваний (нарушений иммунного ответа организма и клеточного повреждения эндоцервикса). Вероятна связь персистенции онкогенных типов ВПЧ с диспластическими изменениями не только эндоцервикса, но и срыва эмбриогенеза, повреждения синцитиотрофобласта. В качестве механизмов, способствующих дисфункции трофобласта и привычному прерыванию беременности, предположительны индуцированные онкобелками E6 и E7 молекулярно-биологические «события»: подавление апоптоза и усиление клеточной пролиферации, возрастание анеуплоидий и аномалий хроматина.

Полагаем, что пусковым механизмом ПНБ неясного генеза выступает каскад локальных молекулярно-клеточных «поломок», в том числе, рецепторного аппарата эндоцервикса; вероятна концепция иммунорегуляторного повреждения ключевых молекул контроля инвазии трофобласта и нормального развития плацентарного ложа. Нарушение иммунного ответа при повреждении эндоцервикса заключается в снижении не только Treg-ответов, но и способности к подавлению микробной и вирусной агрессии, реализации эффектов прогестерона.

Поиск факторов риска привычного выкидыша показал бОльшую встречаемость ряда факторов (Таблица 1) в выборках женщин с аномальными цитограммами и ПНБ в сравнении со здоровыми.

Таблица 1 – Клинико-анамнестические и лабораторные факторы риска прерывания беременности у женщин с ПНБ и здоровых женщин, имеющих аномальные заключения цитограммы (ASC-US и LSIL)

Группа	Рецидивы бактериального вагиноза	Микcты урогенитальной	Отсутствие барьерной контрацепции	ВПЧ	Высокая вирусная нагрузка (больше 10^5)	miR-145	miR-34a	Th17/Th1	p16	Ki-67	BCL-2	PGR-A
ПНБ ASC-US (n=15) +LSIL (n=16), всего (n=31)	31	24	31	28	19	24	29	29	31	31	31	30
	100,0	77,4	100,0	90,3	61,3	77,4	93,5	93,5	100,0	100,0	100,0	96,8
Контроль ASC-US (n=15) +LSIL (n=16), всего (n=11)	11	3	4	5	2	3	3	5	0	0	5	0
	100,0	27,3	36,4	45,4	18,2	27,3	27,3	45,4	0	0	45,4	0

ОШ (отношение шансов)		9,1 (1,9 – 44,0)		11,2 (2,1 – 60,2)	7,1 (1,3 – 38,8)	9,1 (1,9 – 44,0)	11,1 (2,2 – 54,9)	17,4 (2,7–111,8)				

Женщины с ПНБ в сравнении со здоровыми отличаются бОльшей частотой:

- урогенитальной микст-инфекции – практически в три раза (77,4% против 27,3%, ОШ 9,1(1,9–44,0));
- инфицированностью ВПЧ ВР – в два раза (90,3% против 45,4%, ОШ 11,2(2,1–60,2)),
- высокой вирусной нагрузкой ВПЧ (больше 10^5) – в 3,4 раза (61,3% против 18,2%, ОШ 7,1(1,3–38,8));
- снижением экспрессии противоонкогенных miR-145 и miR-34a – практически в два и три раза соответственно (77,4% против 27,3%, ОШ 9,1(1,9–44,0); 93,5% против 27,3%, ОШ 11,1(2,2–54,9));
- повышенным уровнем Th17/Th1 – в два раза (ОШ 17,4(2,7–111,8)).

В группах с ПНБ и аномальными цитограммами (LSIL или ASC-US) с одинаковой частотой (100,0%) выявляли: клинически - рецидивы БВ, отсутствие барьерной контрацепции; молекулярно-биологические маркеры неопластического процесса - избыточная экспрессия p16, Ki-67, BCL-2, снижение экспрессии PGR-A.

Вероятно, прогрессирующее повреждение клеток эндоцервикса (LSIL), обусловлено иммунным дисбалансом, более выраженном при высокой вирусной нагрузке и повышающим риск миграции потенциальных инфектов в верхние отделы репродуктивной системы, что в итоге может быть этиологически значимым фактором и механизмом развития НБ.

С помощью метода логистической регрессии разработана прогностическая модель ПНБ. На первоначальном этапе построения модели отсечены факторы, не имеющие прогностической ценности, втором – выбраны статистически значимые, частота которых у женщин с ПНБ оказалась выше, чем в контроле (Таблица 2).

Таблица 2 – Значения коэффициентов регрессии β и факторов риска ПНБ (В)

Переменные в уравнении

	B	Стд.ошибка	Вальд	Значение	Exp(B)
mir145	2,856	1,357	4,426	0,035	17,387
mir34a	4,112	1,217	11,418	0,001	61,058
Th17Th1	3,287	1,188	7,651	0,006	26,761
p16inkKi67	3,377	1,265	7,128	0,008	29,275
Константа	-6,982	1,949	12,833	0,000	0,001

Расчет прогнозирования повторных репродуктивных потерь осуществляется по формуле: $P = \frac{1}{1+e^{-z}}$, z = a0 + a1x1 + a2x2 + a3x3 + … + anxn, где p – вероятность наступления исхода, x1…xn – значения предикторов в номинальной, порядковой или количественной шкале, a1…an – коэффициенты регрессии. На основании представленных в прогностической модели параметров: коэффициент регрессии B (–6,9); статистика Вальда χ^2 – 12,8; p <0,000; Exp B – 0,001.

Эффективность прогностической модели оценивали с помощью построения ROC-кривой (Рисунок 4).

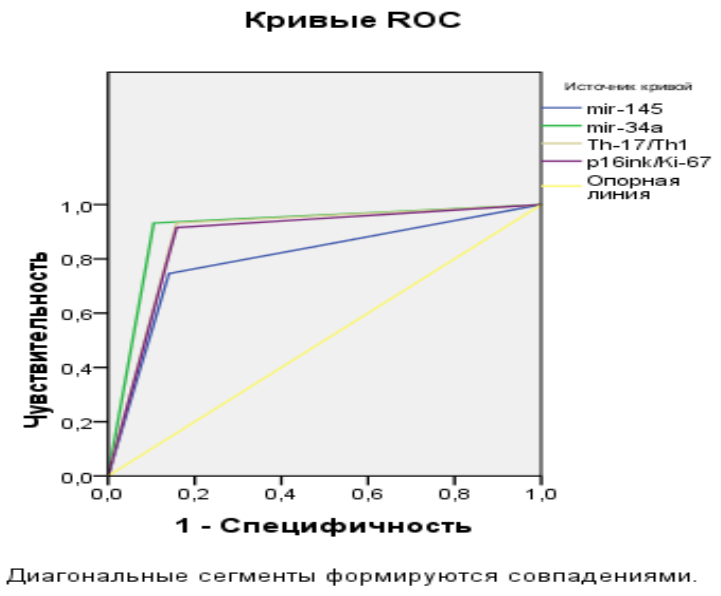

Рисунок 4 – ROC-кривая прогностической модели выявления женщин с риском невынашивания беременности

Диапазон площади под кривой для каждой переменной позволяет расценивать ее как статистически значимую (Таблица 3).

Таблица 3 – Площадь под кривой

Тестовая переменная(ые)	Площадь
mir-145	0,803
mir-34a	0,913
Th-17/Th1	0,887
p16ink/Ki-67	0,879

Показатели AUC (площади под кривой) указывают на «очень хорошее» и «отличное» качество модели. Для переменной mir-145 чувствительность и специфичность составила 74,6% и 86,0% соответственно, mir-34a – 93,2% и 89,5% соответственно, Th-17/Th1 – 93,2% и 84,2% соответственно, p16ink/Ki-67–91,5% и 84,2% соответственно.

Таким образом, представленные в модели молекулярно-биологические маркеры нарушения клеточного цикла эндоцервикса при вирусной персистенции и срыва локальных иммунных механизмов защиты можно рассматривать как причину повреждения трофобласта и риска репродуктивных потерь. Представления о молекулярно-биологических характеристиках эндоцервикса (клеточной рецепции, пролиферативной активности и локальных иммунокомпетентных клетках) обосновывает необходимость пересмотра протоколов ведения женщин с ПНБ и заболеваниями шейки матки.

Персонифицированная терапия женщин с ПНБ осуществлялась с учетом степени риска, точка отсечения (cut off) составила 0,5. Далее по степени риска индивидуально подбиралась терапия:

- при высокой степени (cut off>0,5) - хирургическое лечение шейки матки (биопсия, эксцизия и/или конизация радиоволновым методом аппаратом «Фотек ЕА142М» в режиме «Смесь», выскабливание стенок цервикального канала).

Комплексная терапия при высокой вирусной нагрузке (ДНК ВПЧ более 10^4), нарушении гормонорецепции на фоне иммунодефицитного состояния (снижение продукции противоонкогенных миРНК) предусматривала противовирусные препараты (Инозин пранобекс), иммуномодуляторы и антиоксиданты, двухэтапную коррекцию дисбиотических и воспалительных состояний нижних половых путей.

- У беременных женщин с высоким риском прогрессирования повреждений эндоцервикса, ассоциированных с ПВИ, на первом этапе проводили лечение воспалительных и дисбиотических состояний нижних отделов репродуктивной системы с восстановлением нормоценоза.

Восстановление нормоценоза достигалось при одновременном лечении ПВИ и ассоциированных с вирусной персистенцией диспластических заболеваний шейки матки. Скрининг на генитальные инфекции, особенно ВПЧ-позитивных пациенток позволяет снизить кумулятивное действие микробных ассоциаций на активность иммунокомпетентных клеток. После снижения обсемененности вагинального биотопа условно-патогенной флорой с целью повышения концентрации лактобактерий рекомендовали топические пробиотики (в том числе эстрогенсодержащие).

В результате элиминационной и противовоспалительной терапии восстановление вагинального нормоценоза было достигнуто у 35,1% пациенток с ПНБ и у 42,1% здоровых беременных. Остальных женщин отличала картина умеренного патоценоза и потребность в более длительной терапии пробиотиками – системно и локально.

После комплексной противовирусной и иммуномодулирующей терапии, благополучного деторождения биопсию шейки матки выполнили у 8 женщин (14,0%) из группы контроля ввиду сохранности маркеров пролиферативных изменений эндоцервикса, по результатам гистологического исследования биоптатов – петлевую эксцизию.

В группе с ПНБ двухэтапная коррекция нарушений цервико-вагинальной микробиоты с достижением нормоценоза оказалась эффективна в 67,8% из 81,4%; рецидивы, потребовавшие дополнительной терапии, имели место в 13,6%. Биопсия и радиоволновое лечение болезней шейки матки выполнены у 31 женщины с ПНБ, гистологическое подтверждение LSIL (CIN I) при аналогичной цитологической картине у 16 (27,1%) и 10,2% женщин с ASC-US из 25,4%.

Диагностика и лечение заболеваний шейки матки на прегравидарном этапе позволили улучшить исходы последующих беременностей. Эффективность тактики ведения (реабилитации) женщин с различной степенью риска повторных репродуктивных потерь, рассчитанной по прогностической модели (высокая, низкая), подтверждает сопоставимо высокий показатель наступления беременности (70,9% и 85,7% соответственно). Срочные роды произошли у 62,7% женщин, преждевременные – 6,8%. Показатель повторных репродуктивных потерь - НБ и выкидыша – 8,5% в среднем указывает на необходимость пересмотра традиционных лечебно-диагностических подходов.

Заключение

Полученные нами данные, представленные на основании инновационной методики обследования женщин с ПНБ неясного генеза, позволило расширить представления о патогенезе заболевания. В основе патогенеза привычного невынашивания рассматривается совокупность ВПЧ-ассоциированных изменений эндоцервикса (ASC-US, LSIL): нарушение соотношения процессов клеточной пролиферации и апоптоза, гормонорецепции.

Потенциальной причиной НБ выступает дисбаланс локального иммунитета, сочетанный с цервико-вагинальным дисбиозом и нарушением механизмов материнско-фетальной толерантности. Представленные инновационные методы исследования эндоцервикса позволяют прогнозировать повторное невынашивание у женщин с аномальными цитограммами. Анализ экспрессии молекулярно-биологических маркеров повышает диагностическую точность при верификации ВПЧ-ассоциированных диспластических изменений эндоцервикса. Интерпретация молекулярных показателей как предикторов ПНБ и прогрессирования повреждений шейки матки формирует предпосылки расчета персонифицированных рисков заболеваний по разработанной прогностической модели с последующей реализацией лечебно-профилактических мероприятий.

Избыточная экспрессия маркеров клеточной пролиферации у 15,8% здоровых женщин с нормальными цитограммами указывает на необходимость мониторинга состояния эндоцервикса, вагинальной микробиоты, локального иммунитета, а также выбора адекватного метода оздоровления. Восстановление рецепторов к прогестерону после курса лечебно-реабилитационной терапии представляется перспективным научным направлением.

Выводы

1. Современные методы исследования эндоцервикса (жидкостная цитология, проточная цитометрия, иммуноцитохимические методы) позволяют выявить факторы риска повторных репродуктивных потерь: гиперэкспрессия маркеров пролиферативного потенциала клеток (ASC-US, LSIL – 52,5% против 15,0% в контроле) p15/Ki-67 (52,5%), регулятора апоптоза BCL-2 (54,2%) и снижение противоонкогенных миРНК-145 (41,4%), -34a (49,4%) на фоне персистенции высокоонкогенных штаммов ВПЧ (47,4%).

2. Механизмы повреждения эндоцервикса при персистенции высокоонкогенных штаммов ВПЧ (избыточная пролиферация клеток (гиперэкспрессия p16/Ki-67 BCL-2) при снижении мРНК-34 и -145) составляют единую патогенетическую основу неопластической трансформации шейки матки и повторного выкидыша.

Гиперэкспрессия маркеров p15/Ki-67 у 52,2% женщин с ПНБ и 15,8% здоровых беременных повышает вероятность дифференцировки истинного неопластического процесса при аномальных цитограммах ASC-US и LSIL соответственно.

3. Особенность цитограмм после неразвивающейся беременности - иммунный дисбаланс: повышение провоспалительных Т-лимфоцитов (Th17/Th1) (55,9%) и снижение регуляторных CD4+ Treg (20,3%) эндоцервикса, контролирующих развитие толерантной реакции к полуаллогенному плоду. Предикторами локального иммунодефицита женщин с ПНБ выступают рецидивирующие вагиниты (67,8% против 26,3% в контроле), перенесенные урогенитальные инфекции (40,7% против 14,0%), особенно – генитальный герпес (20,3% против 5,3%) на фоне низкой приверженности к барьерной контрацепции (10,2% против 40,4%).

4. Нарушение клеточного состава эндоцервикса сопровождается дисбиотическими и воспалительными процессами, с выраженным нарушением цервико-вагинальной микробиоты при ВПЧ-ассоциированных повреждениях (100,0%) и преобладанием анаэробной флоры G. vaginalis (43,8%) и A. vaginae (37,5%).

5. Повреждение рецепторного аппарата клеток эндоцервикса, подтверждаемое снижением экспрессии мРНК гена, кодирующего рецепторы прогестерона (PGR-A) (50,8%), только у женщин с ПНБ, детерминирует неэффективность гестагенной профилактики и лечения привычного невынашивания.

6. Дифференцированный выбор способа коррекции нарушений вагинально-цервикального биотопа и воздействия на воспалительный компонент способствует восстановлению нормоценоза у 86,4% и снижению микробной контаминации 13,6% женщин, предотвращает прогрессию ВПЧ-ассоциированных пролиферативных изменений эндоцервикса (ASC-US и LSIL) и необоснованное хирургическое лечение при беременности в 5,3%, обеспечивает эффективное излечение доброкачественных заболеваний шейки матки у 100,0% женщин с ПНБ (без рецидивов в течение двух лет).

7. Предложенный алгоритм обследования и расчета персонифицированного риска по разработанной прогностической модели позволяет улучшить исходы лечения женщин с ПНБ и достичь последующей реализации репродуктивной функции (наступление

беременности у 77,9% пролеченных; срочные роды - 62,7%; повторные выкидыши – 8,5%).

Практические рекомендации

- В обследование женщин с ПНБ неясного генеза целесообразно включать тестирование на ВПЧ ВР, при выявлении которого рекомендуется цитологическое исследование (предпочтительна жидкостная цитология), комплексное исследование микробиоты нижних отделов репродуктивной системы (бактериоскопия, Фемофлор-16 (ПЦР РВ), бактериологическое исследование отделяемого цервикального канала на флору и чувствительность к антибиотикам, исследование на ИППП);
- При аномальных цитограммах (ASC-US, LSIL) целесообразно ИЦХ исследование соскоба эндоцервикса для оценки экспрессии маркеров p16, Ki67, BCL-2, miR-145, miR-34a с целью верификации истинного неопластического процесса или реактивных изменений;
- При повышении уровней маркеров клеточной пролиферации рекомендуется исследование экспрессии PGR-A; снижение рецептивности прогнозирует неэффективность терапии препаратами прогестерона;
- Оценка локального иммунитета методом проточной цитометрии при НБ (интерлейкины Th17/Th1 и CD4+Treg) и коррекция сочетанных с иммунным дисбалансом нарушений цервико-вагинальной микробиоты позволяет улучшить исходы лечения и реабилитации пациенток с ПНБ.

Оптимизация ведения женщин с ПНБ неясного генеза и аномальными цитограммами предполагает расчет персонифицированного риска повторных репродуктивных потерь и прогрессии CIN по разработанной прогностической модели:

- принадлежность к группе низкого риска обосновывает необходимость цитологического и кольпоскопического мониторинга (раз в три месяца), поддержания нормоценоза влагалища. При высоком риске (p>0,5) необходима активная врачебная тактика:
- на прегравидарном этапе – противовирусная, иммуномодулирующая терапия, коррекция нарушений микробиоты, биопсия шейки матки/эксцизия/конизация, контроль излеченности (жидкостная цитология, ВПЧ-типирование, определение экспрессии p16/Ki-67) каждые три месяца в течение года;
- при беременности – двухэтапная терапия нарушений микробиоты с восстановлением нормобиоценоза, контролем излеченности (микробиологический

мониторинг); оценкой цитограмм в динамике и хирургическим лечением после деторождения.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Дамирова К.Ф., Бебнева Т.Н. Цервикальный скрининг // **Акушерство и гинекология: новости, мнения, обучение.** - 2019. - Т. 7. - № 3. - Приложение. - С. 87-92.
2. Радзинский В.Е., Хамошина М.Б., Тулупова М.С., Дамирова К.Ф., Рамазанова Ф.У., Каушанская Л.В. Прогестерон: спорные вопросы терапии и профилактики невынашивания и недонашивания беременности // **Акушерство и гинекология: новости, мнения, обучение**. - 2019. - Т. 7. - № 3. - Приложение. - С. 74-82.
3. Бебнева Т.Н., Дамирова К.Ф. Воспалительные заболевания органов малого таза. // **Гинекология**. – 2019. – Т. 21. - №5. – С. 39–44.
4. Радзинский В.Е., Оразмурадов А.А., Савенкова И.В., Дамирова К.Ф., Хаддад Х. Преждевременные роды — нерешенная проблема XXI века // **Кубанский научный медицинский вестник**. – 2020. – Т. 27. - №4. – С. 27–37.
5. Influence of Gestational Weight Gain on the Development of Complications of Gestational Diabetes Mellitus: A Literature Review. Orazmuradov A.A., Akhmatova A.N., Savenkova I.V., Arakelyan G.A., Damirova K.F., Haddad Kh., Orazmuradova A.A. Sys Rev Pharm. – 2020. – 11(7). – P. 462-464.
6. The Results of Bacteriological Examination in Premature Infants with Neonatal Morbidity and Mortality Agamurad A. Orazmuradov; Igor N. Kostin; Anastasiya N. Akhmatova; Kemer F. Damirov; Irina V. Savenkova; Gayane A. Arakelyan; Khalid Haddad; Alexander M. Lopatin; Sergey I. Kyrtikov; Aleksey A. Lukaev. International Journal of Biomedicine. - 2020; - 10(4): - P.357-361.

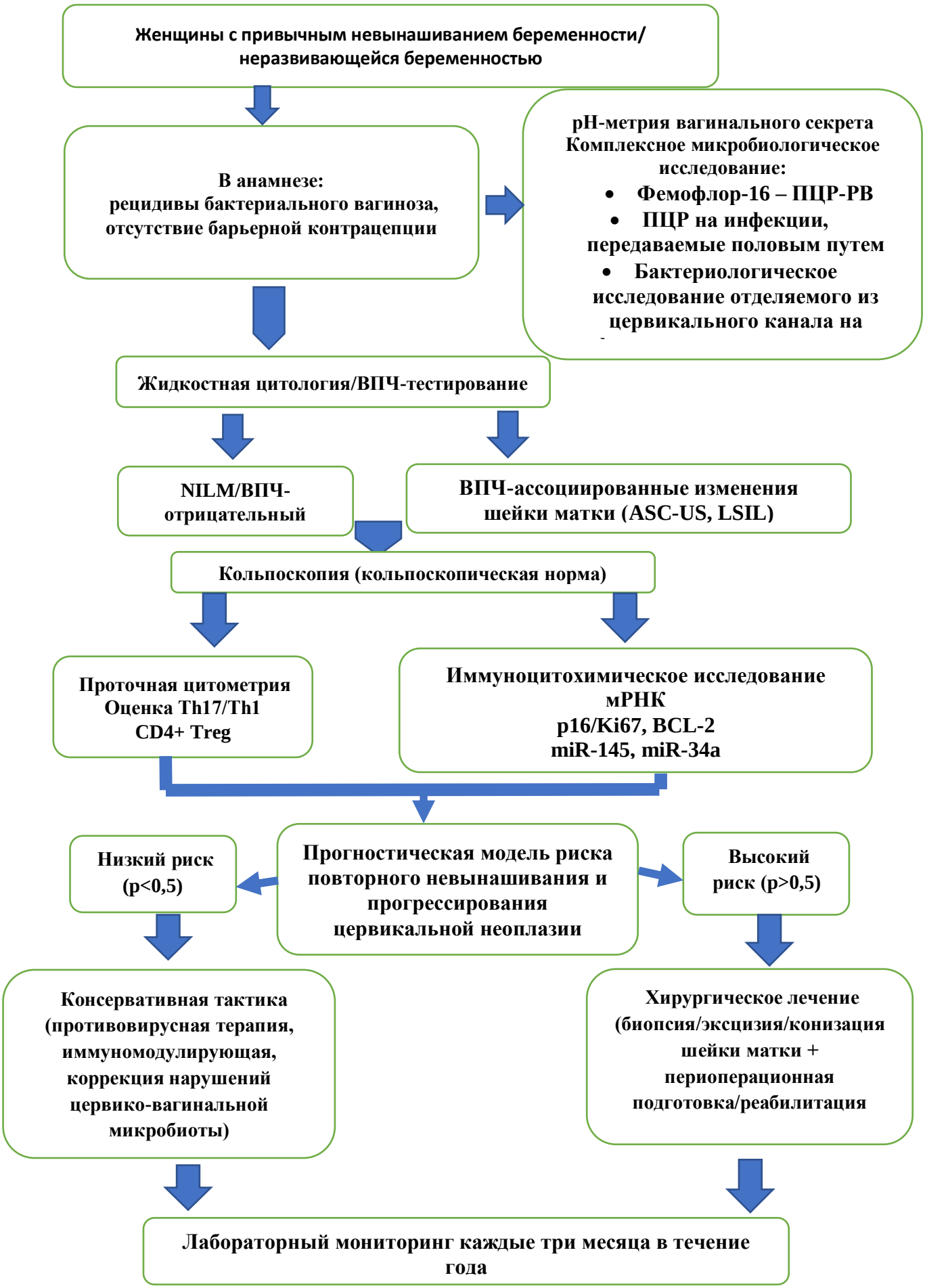

Рисунок 5 – Алгоритм обследования и ведения женщин с ПНБ