

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САМАРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

На правах рукописи

УДК 616-08:616-006.52

АРТЕМОВА ОЛЬГА ИГОРЕВНА

**ОПТИМИЗАЦИЯ ВЕДЕНИЯ ПАЦИЕНТОК С ПАТОЛОГИЯМИ ШЕЙКИ
МАТКИ, АССОЦИИРОВАННЫМИ С ВИРУСОМ ПАПИЛЛОМЫ
ЧЕЛОВЕКА**

14.01.01 – Акушерство и гинекология

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук,
доцент

**Ольга Павловна
Виноградова**

Самара-2020

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
Актуальность темы исследования	4
Г Л А В А 1 ПАТОЛОГИИ ШЕЙКИ МАТКИ, АССОЦИИРОВАННЫЕ С ВИРУСОМ ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ).....	13
1.1. Роль вируса папилломы человека в формировании патологии шейки матки .	13
1.2. Современные методы диагностики заболеваний шейки матки, ассоциированных с вирусом папилломы человека.....	19
1.3. Процесс апоптоза при патологиях шейки матки	23
Г Л А В А 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	27
2.1. Материалы исследования	27
2.2. Методы исследования.....	30
2.2.1. Оценка инфекционной составляющей нижнего отдела генитального тракта	31
2.2.2. Цитологическое исследование.....	32
2.2.3. Кольпоскопическое исследование.....	33
2.2.4. Гистологическое исследование шейки матки	34
2.2.5. Определение содержания уровней каспазы 1, каспазы 3 и каспазы 9.....	36
2.2.6. Методы статистической обработки.....	37
Г Л А В А 3 КЛИНИКО-ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ КРИТЕРИИ ОЦЕНКИ СТЕПЕНИ ТЯЖЕСТИ ПОРАЖЕНИЯ ЭПИТЕЛИЯ ШЕЙКИ МАТКИ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ ВИРУСА ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА.....	38
3.1. Группа контроля	38
3.2. Описание группы пациенток с цервикальной интраэпителиальной неоплазией I степени, ассоциированной с вирусом папилломы человека	42
3.3. Описание группы пациенток с цервикальной интраэпителиальной неоплазией II степени, ассоциированной с вирусом папилломы человека	57

3.4. Автоматизированная система обследования и лечения женщин с патологией шейки матки, инфицированной вирусом папилломы человека	70
3.5. Разработка дополнительных критериев оценки степени поражения шейки матки при вирусе папилломы человека	73
Г Л А В А 4 СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ПОДХОДОВ ВЕДЕНИЯ ПАЦИЕНТОК С CIN I И CIN II, АССОЦИИРОВАННЫМИ С ВИРУСОМ ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА	78
4.1. Сравнительная оценка эффективности терапии пациенток группы с цервикальными интраэпителиальными неоплазиями I степени, ассоциированными с вирусом папилломы человека	78
4.2. Сравнительная оценка эффективности терапии пациенток с цервикальной интраэпителиальной неоплазией II степени, ассоциированной с вирусом папилломы человека	85
Г Л А В А 5	95
ЗАКЛЮЧЕНИЕ. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	95
ВЫВОДЫ.....	106
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	107
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ.....	109
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	110
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	111
ПРИЛОЖЕНИЕ 1.....	129
ПРИЛОЖЕНИЕ 2	127
ПРИЛОЖЕНИЕ 3	129

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Рак шейки матки (РШМ) является одним из лидеров онкологических заболеваний у женщин [30, 32], что остается важной социальной и медицинской проблемой. Атипичические изменения в цервикальной зоне в 99 % случаев связаны с персистенцией вируса папилломы человека (ВПЧ) [14, 31, 96]. Однако установлено, что на начальных этапах возникновения изменений под воздействием вируса возможен как прогресс, так и регресс патологии [33, 41, 43, 102]. Так как внедрение вируса осуществляется в незрелые эпителиальные клетки базального слоя, то пролиферативные процессы осуществляются без вирусной репликации, т.е. не поддерживается полный цикл существования ВПЧ [8, 13, 83]. Такими действиями ограничена латентная фаза течения инфекции. После завершения репликативного этапа в клетках многослойного плоского эпителия, которые подверглись дифференцировке, вирус нивелирует воздействие иммунной системы человека [83, 94]. Доказано, что процесс малигнизации клеток, инфицированных вирусом, способствует синтезу ряда онкобелков [49, 53, 57]. Однако до конца не изучены механизмы формирования цервикальных изменений под воздействием ВПЧ на молекулярном уровне [16, 33].

При исследовании процессов канцерогенеза отмечено, что процесс формирования атипичических изменений сопровождается нарушениями апоптоза, а именно замедлением процесса программированной клеточной гибели [49, 81] за счет снижения активности цистеиновых протеаз-каспаз [49, 97, 100]. Возможно, на начальных этапах инвазии данного вируса в клетки эпителия цервикса также формируются изменения апоптотической программы. Изучение этих процессов и определение маркеров позволят обеспечить максимально раннюю диагностику и определить эффективные подходы к терапии. В связи с тем, что пока не существует специфической противовирусной терапии [8, 12, 36], которая воздействовала бы непосредственно на вирус, то, как следствие, основным

направлением является терапия клинических форм данной инфекции и устранение условий, формирующих прогрессию ВПЧ. Существуют различные подходы и стандарты ведения пациенток с интраэпителиальными поражениями легкой и средней степени тяжести, но отсутствуют единые алгоритмы, так как на выбор тактики ведения влияет значительное количество различных факторов (возраст, репродуктивный анамнез, вредные привычки, патогенетические особенности, активность иммунной системы и т.д.), что определяет необходимость поиска новых современных методов диагностики, прогнозирования и лечения данной категории больных.

Степень разработанности темы

Эпидемиологические исследования последних пяти лет определили разнообразие типов вируса, которые участвуют в процессе формирования дисплазии и малигнизации [31, 33, 40, 69, 108]. Информация о распространенных типах вируса папилломы человека в регионах Российской Федерации носит разобщенный характер [31, 32]. Поэтому, ведение пациенток с ВПЧ-ассоциированными заболеваниями, основанное на принципах доказательности, является основным направлением профилактики заболеваний шейки матки.

При развитии атипии в клетках, инфицированных вирусом папилломы человека, активизируется синтез ряда специфических белков [13, 49, 53, 57, 133], т.е. оказывается влияние на естественные клеточные циклы. Данные белки способны стимулировать или ингибировать неопластические процессы [52, 64, 78, 80, 129]. Установлено, что при cancer in situ происходит нарушение процесса апоптоза за счет снижения активности цистеиновых протеаз-каспаз [49]. Каспаза 3 и каспаза 9 являются основными звеньями апоптотического пути, который играет основную роль в поддержании гомеостаза в клетках [9, 20, 110, 121, 141]. Каспаза 3 является конечным звеном внешнего пути и называется эффекторной, а каспаза 9 замыкает внутренний, митохондриальный, каскад реакций [127, 136, 144]. Известно, что процесс программированной клеточной гибели подвергается

изменению при воздействии различных внешних триггеров [115, 121]. В этой связи каспазы 3 и 9 можно рассматривать как биомаркеры интраэпителиальных процессов под воздействием ВПЧ.

Все вышеизложенное послужило основанием для проведения данного исследования, посвященного оптимизации ведения пациенток с заболеваниями шейки матки, ассоциированными с вирусом папилломы человека, на основании анализа и изучения апоптотических изменений с целью оценки риска развития и прогрессии CIN I и CIN II.

Цель работы

Оптимизация ведения пациенток с ВПЧ-ассоциированными CIN I и CIN II шейки матки с учетом индукторов апоптоза.

Задачи исследования

1. Определить видовую структуру ВПЧ при патологиях шейки матки (CIN I, CIN II) в г. Пенза
2. Изучить внутриклеточные патогенетические механизмы апоптоза при ВПЧ ассоциированных патологиях шейки матки (CIN I, CIN II).
3. Исследовать диагностическую и прогностическую роль индукторов апоптоза (каспаза 1, каспаза 3, каспаза 9) при развитии и течении ВПЧ-ассоциированных цервикальных интраэпителиальных неоплазий легкой и средней степени тяжести.
4. Оптимизировать подходы ведения ВПЧ-положительных пациенток с диагнозом слабовыраженная дисплазия шейки матки (CIN I) и умеренная дисплазия шейки матки (CIN II) с учетом оценки параметров индукторов апоптоза.
5. Оценить эффективность применения противовирусного препарата в терапии ВПЧ-ассоциированных CIN I, CIN II.

Научная новизна

Впервые изучена значимость серотипов ВПЧ в формировании патологий шейки матки (CIN I, CIN II) в г. Пенза.

Впервые в исследованы внутриклеточные патогенетические механизмы апоптоза с участием каспаз 3 и 9 при ВПЧ-ассоциированных поражениях цервикального эпителия легкой и средней степени тяжести.

Впервые определена диагностическая и прогностическая ценность показателей каспазы 1, 3 и 9 при развитии и течении легкой и средней степеней поражения эпителия шейки матки, ассоциированных с вирусом папилломы человека.

Впервые проведено сравнительное исследование эффективности применения противовирусного препарата гистидил-глицил-валил-серил- глицил-гистидил-глицил-глутаминил-гистидил-глицил-валил-гистидил-глицин (препарат Аллоферон) в терапии патологий шейки матки (CIN I, CIN II), ассоциированных с вирусом папилломы человека.

Научная новизна проведенного диссертационного исследования подтверждена свидетельством о государственной регистрации компьютерной программы для ЭВМ от 23.03.2020 № 2020613770.

Теоретическая и практическая значимость работы

Результаты диссертационного исследования формируют представления о молекулярных механизмах апоптоза в нормальных клетках и при цервикальных эпителиальных дисплазиях легкой и умеренной степени тяжести, ассоциированных с вирусом папилломы человека.

Результаты работы позволяют проследить изменения активности процессов апоптоза на разных этапах формирования атипических поражений многослойного плоского эпителия шейки матки.

По результатам сравнительного исследования, с учетом изучения показателей активности апоптоза, определены оптимальные подходы к тактике

ведения пациенток с легкой и средней степенями поражения эпителия шейки матки, ассоциированными с папилломавирусной инфекцией.

Полученные результаты смогут послужить основой для внедрения диагностических тестов, предназначенных для определения степени поражения цервикального эпителия при персистенции ВПЧ, и могут быть использованы для динамического наблюдения пациенток после курса терапии.

Методология и методы исследования

В работе применялись следующие диагностические методы заболеваний шейки матки, ассоциированных с вирусом папилломы человека: клинический осмотр, цитологическое исследование шейки матки, расширенная кольпоскопия, гистологическое исследование биопсийного материала, ВПЧ-генотипирование в режиме «real-time» с определением вирусной нагрузки с помощью полимеразной цепной реакции, изучение уровня маркеров апоптоза путем забора клеток цервикального канала с помощью «cervix-brush» и последующим определением показателей каспазы 1, каспазы 3, каспазы 9, методом ИФА.

Статистическая обработка результатов производилась с применением стандартных приложений Intel ® Core (TM) i7 CPU в среде Windows 10 с активацией пакета Office для Microsoft, программный продукт «Solution PS IMAGO: IBM SPSS Statistics Base, IBM SPSS Custom Tables Authorized» (лицензия № 5823-A61) с учетом правил применения для исследований в биологической и медицинской сферах.

Положения, выносимые на защиту

1. При инвазии вируса папилломы человека в клетки цервикального эпителия активируются процессы апоптоза, направленные на уничтожение пораженной клетки, которые протекают с запуском иницирующих и эффекторных каспаз, активность которых изменяется по мере утяжеления интраэпителиального повреждения.

2. Оценка степени тяжести поражения эпителия шейки матки должна основываться на комплексе данных, с учетом клинической картины, кольпоскопии, ВПЧ-типирования с оценкой вирусной нагрузки и параметрах индукторов апоптоза (каспаза 3, каспаза 9), что позволит повысить точность прогноза течения заболевания.

3. Использование противовирусного препарата гистидил-глицил-валил-серил-глицил-гистидил-глицил-глутаминил-гистидил-глицил-валил-гистидил-глицин (Аллоферон) имеет высокую эффективность при лечении ВПЧ-ассоциированных цервикальных интраэпителиальных неоплазий легкой и умеренной степени тяжести.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертационная работа соответствует паспорту специальности 14.01.01 – «Акушерство и гинекология» по нескольким областям:

Пункт 3. Исследование эпидемиологии, этиологии, патогенеза гинекологических заболеваний.

Пункт 4. Разработка и усовершенствование методов диагностики и профилактики осложненного течения беременности и родов, гинекологических заболеваний. Оптимизация диспансеризации беременных и гинекологических больных.

Пункт 5. Экспериментальная и клиническая разработка методов оздоровления женщины в различные периоды жизни, вне и во время беременности и внедрение их в клиническую практику.

Степень достоверности и апробация результатов

Использование достаточного объема клинического материала, наличие репрезентативной выборки обследованных определяют достоверность полученных в ходе научного исследования результатов. Дизайн исследования соответствует целям и задачам. Выбранные методы статистической обработки

отвечают современным требованиям доказательной медицины. Комиссия по проверке первичной документации констатировала, что все материалы диссертации достоверны и получены лично автором, выполнявшим работу на всех этапах исследования.

Апробация диссертации

Достоверность результатов диссертационного исследования, обоснована применением молекулярных и клинических методов диагностики в достаточном количестве. В работе использовали методы статистической обработки с привлечением доказательной медицины.

Материалы диссертации докладывались и обсуждались на следующих мероприятиях: межрегиональной конференции РОАГ (Российского общества акушеров и гинекологов) «Женское здоровье» «Актуальные проблемы акушерства и гинекологии» (г. Пенза, 2018); Международной научно-практической конференции «Прорывные научные исследования как двигатель науки» (г. Томск, 2019); межрегиональной конференции «Акушерство и гинекология: Актуальные и дискуссионные вопросы» (г. Пенза, 2019); Международной научной конференции, посвященной 80-летию Пензенской области «Актуальные проблемы медицинской науки и образования» (г. Пенза, 2019); LVI Международной научно-практической конференции «Инновационные подходы в современной науке» (г. Москва, 2019); XXVI Международной научно-практической конференции «Advances in Science and Technology» (г. Москва, 2020); Международной конференции «Нижегородские чтения-2020» (г. Нижний Новгород, 2020); межрегиональной конференции «Astrum feminam: Здоровая женщина-здоровый ребенок: задачи акушеров-гинекологов, неонатологов, педиатров» (г. Казань, 2020); XX межрегиональной научно-практической конференции «Актуальные вопросы диагностики, лечения и реабилитации больных» (г. Пенза, 2020); XIV Общероссийском научно – практическом семинаре «Репродуктивный потенциал России: версии и контраверсии» (г. Сочи, 2020).

Обсуждение результатов диссертационного исследования проводилось на совместной научной конференции кафедр акушерства и гинекологии № 1, акушерства и гинекологии №2, акушерства и гинекологии института профессионального образования федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации 4 сентября 2020г., протокол № 3.

Внедрение результатов работы

Результаты, полученные в диссертационном исследовании, внедрены в работу акушерско-гинекологической службы стационарного и амбулаторного звеньев г. Пензы, а именно в женские консультации ГБУЗ «Пензенский городской родильный дом», в отделение гинекологии «ИНМЕД» и в клинично-диагностический центр «Медиклиник». Материалы диссертационной работы включены в учебный процесс кафедры акушерства и гинекологии Пензенского института усовершенствования врачей – филиала ФГБОУ ДПО «РМАНПО» МЗ РФ г. Пенза и используются на занятиях при подготовке ординаторов и врачей. Результаты диссертационного исследования внедрены в работу лаборатории научно-исследовательского института фундаментальных и прикладных исследований ФГБОУ ВО «Пензенский государственный университет» Министерства науки и высшего образования РФ.

Личный вклад автора

Автор принимал участие в выборе направления исследования и темы, постановке задач, клинично-лабораторном обследовании пациенток, сборе биологического материала, лечении, в оформлении и проведении анализа медицинской документации, в статистической обработке и обобщении полученных результатов.

Публикации

По теме диссертационной работы получено 1 свидетельство на программу для ЭВМ. По материалам диссертационного исследования опубликовано 18 научных печатных работ, в том числе 7 работ – в рецензируемых научных журналах, определенных списком ВАК РФ, 1 работа – в иностранных изданиях и 1 – в журнале, входящем в международную базу цитирования Scopus и Web of Science.

Структура и объём диссертации

Диссертационная работа изложена на 135 страницах, включает в себя 49 таблиц и иллюстрирована 15 рисунками. Диссертация состоит из: введения, обзора литературы по исследуемому вопросу, главы материалы и методы исследования, двух глав собственных исследований, выводов, практических рекомендаций, перспектив дальнейшего исследования и библиографического списка. Список литературы включает в себя 144 литературных источника (95 иностранных и 49 отечественных).

Г Л А В А 1

ПАТОЛОГИИ ШЕЙКИ МАТКИ, АССОЦИИРОВАННЫЕ С ВИРУСОМ ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1. Роль вируса папилломы человека в формировании патологии шейки матки

В течение последних 10 лет отмечается рост количества молодых женщин с патологиями шейки матки, ассоциированными с вирусом папилломы человека [3, 15, 31, 33, 46], с нередким исходом в малигнизацию. Рак шейки матки (РШМ) занимает одну из лидирующих позиций среди онкопатологий женского населения. Стоит отметить, что за последние шесть лет растет частота выявляемости РШМ среди женщин молодого возраста [30, 32, 69]. Каждый год данная онкопатология диагностируется более чем у 500 тысяч женщин, а ежегодно погибает от атипических изменений в шейке матки около 270 тысяч женщин [92, 95 103]. Как известно, в 99 % случаев РШМ ассоциируется с вирусом папилломы человека [2, 16, 34, 44, 104, 105, 110]. Одним или более типами ВПЧ инфицировано примерно 64 % взрослого населения планеты, живущего активной половой жизнью [10, 130, 142], причем зачастую генитальная инфекция диагностируется случайно [3, 15]. Наиболее распространенным путем заражения ВПЧ считается контакт кожных покровов и слизистых оболочек [10, 103, 112]. Исследования последних десятилетий обозначили основные моменты становления патологий шейки матки, ассоциированных с ВПЧ, что позволило разрабатывать новые методы максимально ранней диагностики.

На сегодняшний день известно около 200 типов ВПЧ. Данный вирус является ДНК-содержащим и имеет икосаэдрическую форму. Каждый тип ВПЧ поражает свою ткань-мишень, таким образом, папилломавирусы обладают тканеспецифичностью, но только 40 типов вируса обладают тропностью к эпителию генитального тракта [31, 33, 69]. Такие необычные свойства вируса

обусловлены его строением. Основной мишенью для данной инфекции являются участки тканей с митотической активностью, например, зона трансформации, зона метаплазии, резервные и травмированные клетки [130, 142]. В начале XXI в. были определены наиболее часто диагностируемые типы ВПЧ, поражающие урогенитальный тракт, и в дальнейшем произвели деление на группы высокого, среднего и низкого онкогенного риска. Однако по результату исследования 2004 г. IARC в 99,5 % случаев диагностированного РШМ определялись только 13 типов вируса [31]. Длительное время считалось, что более высокоонкогенными типами являются 16 и 18, потому что именно они были диагностированы при карциноме в конце XX в. В течение последних восьми лет в своих работах отечественные исследователи подтверждают широкое распространение и онкогенный потенциал и других типов ВПЧ [33, 36, 40], в связи, с чем, вероятно, распространённость и онкопотенциал различных типов вируса не до конца оценены при формировании изменений на шейке матки.

Для развития патологии в зоне трансформации на фоне ВПЧ определены факторы, которые условно подразделяются на эндогенные и экзогенные. К последним относятся особенности полового поведения, т.е. ранний половой дебют (до 18 лет); полигамность половых отношений; количество половых партнеров более семи; наличие сопутствующих заболеваний, передающихся половым путем; абортивные исходы беременностей в анамнезе; употребление алкоголя; изменение иммунитета под воздействием каких-либо факторов; авитаминоз и т.д. [2, 10, 15, 26, 68, 71, 117]. В литературных источниках [130] указывается, что вероятность спонтанной регрессии ВПЧ-ассоциированной патологии ниже у сексуально активных женщин. В научных исследованиях также указывается на агрессивное действие никотина на эпителиальные клетки цервикальной зоны при выработке токсина [68, 117]. Критическое количество сигарет в день для определения данного фактора – более семи.

По данным исследований, наибольшее количество инфицированных женщин встречается в молодом возрасте (до 30 лет- наиболее сексуально активная часть женского населения), поскольку чаще имеет место эктопия

цилиндрического эпителия и процессы малигнизации, так как незрелые эпителиоциты более восприимчивы к инфекционным агентам, а именно к агрессивному воздействию вируса [10, 94, 104].

Одним из наиболее опасных факторов для формирования патологии является персистенция ВПЧ более двух лет [14, 15, 41, 46]. Именно за такой временной промежуток среди наиболее сексуально активного населения происходит патологическое воздействие на клетки незрелого эпителия шейки матки, который восприимчив к инфекционным воздействиям [95, 103, 111].

В клетках вирус способен существовать в двух формах: эписомальной и интегрированной в геном клетки. В момент инфицирования ВПЧ вирусные вирионы через микроповреждения в зоне трансформации (ЗТ) проникают в базальные клетки. Капсид вируса включает основной белок L1 и малый белок L2. При внедрении вирусного капсида в клетку происходит множество конформаций, что в дальнейшем приводит к эписомальному поглощению вириона и транспортировке малого белка L2 совместно с ДНК ВПЧ в комплекс Гольджи [83, 103]. После чего наступает этап развития инфекции – репликация. Первично происходит экспрессия ранних генов E1, E2, E5, E6 и E7, после чего снижается их экспрессивность и повышается экспрессия поздних генов L1 и L2. За последние годы стало известно, что онкобелки E6 и E7 из-за мутационных изменений при эпигенетических модификациях могут приводить к генетической нестабильности, в результате чего формируется атипическая трансформация инфицированных вирусом клеток [57, 80, 83, 87, 94, 103, 109].

При проникновении в клетку ДНК ВПЧ находится в эписомальной и интегрированной формах. В первом состоянии вирус диагностируется на самых первых этапах трансформации, которые являются обратимыми, в отличие от более позднего варианта течения заболевания, которое наиболее часто заканчивается цервикальной интраэпителиальной неоплазией тяжелой степени [31, 33, 134]. Считается, что доброкачественные изменения в эпителиальном слое на шейке матки под воздействием ВПЧ происходят пока вирусная ДНК существует в эпителиальной клетке в эписомальной форме, но при

активной пролиферации уже регистрируется интеграция в геном клетки. Происходит это за счет потери белка E2 и разрыва ДНК вируса, что стимулирует экспрессию гена E6 и снижение активности гена E7 [13, 57]. Следующим этапом является интеграция ДНК вируса в ДНК клетки хозяина. Взаимодействие E6 с p53 вызывает убиквитинирование p53, что в результате приводит к протеасомной деградации и предотвращению апоптоза [144], а это, по мнению исследователей, и приводит к формированию тяжелых поражений шейки матки.

Таким образом, обобщая вышеизложенную информацию, за последние 10 лет были определены следующие формы течения инфекции, которые зависят от состояния иммунной системы: персистирующее, транзитное и латентное [126, 134]. В 85 % обследований инфекция протекает транзитно, а значит, есть вероятность вирусной элиминации [30]. Такой исход наиболее часто имеет место у женщин с нормальным состоянием иммунной системы, как правило, в молодом возрасте. Латентная форма течения данной вирусной инфекции не проявляется изменениями в морфологии ткани [94, 111]. Но вирус способен в многослойном плоском эпителии крайне долго персистировать, а при сниженном иммунном статусе может приводить к рецидиву заболевания. Таким образом, в трети случаев при персистенции вируса папилломы человека диагностируется прогрессия заболевания.

Прогрессирование ВПЧ связано с изменениями, как в местном иммунитете, так и в гомеостазе организма в целом [4, 16, 135]. Иммуносупрессия увеличивается по мере роста опухолевого процесса [20]. Влияние продуктов генов ВПЧ снижает возможность клетки продуцировать интерфероны, за счет чего снимаются антиапоптотические блоки с генов [37, 101, 121, 139]. При сочетании патологии шейки матки и ВПЧ имеет место развитие вторичных иммунодефицитов за счет формирования «пробелов» в звеньях иммунной системы [81, 120]. Вирус может достаточно длительное время находиться в клетках многослойного плоского эпителия и быть незамеченным. Что позволяет ДНК ВПЧ встраиваться в клеточный геном и активировать закодированную программу, способную осуществлять вирусную репродукцию, что может

приводить к пролиферативным процессам и к неопластическим трансформациям. Устойчивость вируса к воздействию лечебных компонентов формирует неоплазию высокой степени, и данный этап называется репликационным [33, 35]. Однако у женщин, поврежденные клетки могут отторгаться, что обеспечивает самоэлиминацию вируса [39, 52, 69], это возможно при нормальном течении пролиферативных процессов, то есть при транзитном характере.

Таким образом, вирусные трансформации в эпителиальных клетках подразделяются на следующие этапы:

1. Первичное инфицирование вирусом.
2. Персистенция в эписомальной форме и продукция частиц вируса с дальнейшей вторичной инфекцией.
3. Интегрирование ДНК вируса в геном клетки.
4. Индукция мутационной активности в ДНК клетки, с последующей дестабилизацией генома клетки хозяина.
5. Селекция клональных клеток с мутационной ДНК.
6. Активное размножение клональных клеток и рост опухоли.

Некоторые исследователи считают, что для формирования атипических изменений в цервикальной зоне под воздействием ВПЧ только инфицирования эпителиальных клеток недостаточно. Для прогрессии и формирования атипии нужна еще индукция повреждений хромосомной ДНК в инфицированных клетках с нарушениями апоптотической программы, с последовательной активацией каспазного каскада. Если организм имеет недостаточность иммунитета, то клетки, которые поражены вирусом, не будут уничтожаться при выработке антител. Таким образом, ВПЧ способен длительное время уклоняться от контакта с иммунной системой хозяина, так как имеет место недостаточная выработка антител к естественной инфекции [97, 113, 125]. Согласно результатам фундаментальных исследований 2017 года, вирус не обладает цитопатическими свойствами и не разрушает кератиноциты, в которых он размножается, соответственно, не образуются воспалительные цитокины и не наблюдается местной воспалительной реакции [63, 64, 66].

Соответственно, сам трансформационный процесс в клетках слизистой цервикальной зоны представляет собой цепочку строгих изменений, при которых в клетках могут определяться признаки как ядерных, так и клеточных диспластических процессов. Такого рода нарушения в эпителиальном пласте могут проходить без разрушения базальной мембраны и без проникновения измененных клеток в подлежащие слои [14].

Прогрессирование цервикальной патологии на фоне ВПЧ в цервикальные интраэпителиальные поражения по разным источникам возможны у женщин от 1 и до 65 % случаев [13, 33]. По данным профессора В. Н. Прилепской [15], с момента инфицирования вирусом папилломы человека у 30 % пациенток через 3 года может определяться диспластический процесс тяжелой степени. При начальных поражениях шейки матки, когда имеются проявления вирусоносительства, а именно дисплазия легкой степени на фоне ВПЧ, у 55 % женщин может происходить регрессирование патологии, у 30 % – персистенция, у 12 % – активная прогрессия и развитие *cancer in situ* – у 2 %. При дисплазии средней степени тяжести вероятность развития рака – у 5 %, а прогрессия – у четверти пациенток.

Ранее упоминалось, что на фоне вирусной инфекции возможны любые проявления на шейке матки. Поэтому все поражения цервикальной зоны на фоне ВПЧ обладают широким полиморфизмом проявлений, а накопление знаний о природе возникновения тех или иных изменений приводит к постоянному поиску новых маркеров для максимально ранней и точной диагностики. На сегодняшний день метод определения дальнейшего течения вирусной инфекции, который был бы способен достоверно определить вероятность персистенции или прогрессии, не найден.

1.2. Современные методы диагностики заболеваний шейки матки, ассоциированных с вирусом папилломы человека.

Сегодня в арсенале акушера-гинеколога есть множество способов диагностики заболеваний шейки матки, ассоциированных с вирусом папилломы человека. Условно все диагностические возможности можно разделить на современные и классические методы. Первая группа в себя включает определение уровней молекулярных маркеров, ПЦР диагностика [8, 11, 25, 34, 41, 48]. К более классическим методам традиционно относят кольпоскопический и цитологический исследования, гистологическое изучение пораженного участка (мультифокусная биопсия шейки матки).

С 2009 года цитологический метод диагностики применяется как скрининговый для определения заболеваний шейки матки с 21 года по рекомендации международного агентства по исследованию рака [30, 45, 137]. Это обусловлено тем, что в течение последних 6 лет отмечается рост заболеваемости у женщин фертильного возраста, особенно в данной возрастной группе [114, 130]. Цитологический метод исследования делает возможным оценку клеточного состава ткани, то есть позволяет выявить атипически измененные клетки. Для папилломавирусной инфекции традиционным признаком при данном исследовании считается клетка с атипизацией ядра, незрелая и т.д. Этот метод диагностики, бесспорно, остается самым бюджетным, и как следствие наиболее доступным [25, 28, 41, 42, 48, 50, 131]. Однако у него есть и свои минусы – зависимость от правильности забора мазка, квалификация врача - цитолога, которые могут показать ложно-отрицательные результаты [25, 51, 56, 143], что влечет за собой упущенные возможности своевременной диагностики РШМ.

В течение последних лет более широко стала использоваться жидкостная цитология, при которой биоматериал сразу погружается в стабилизирующий раствор, сохраняющий морфологические свойства клеток [47, 48, 65]. Европейскими экспертами, которые занимаются вопросами профилактики рака, определено, что цитология, как при традиционном, так и при жидкостном способе

исследования является низкоспецифическим методом [72, 119, 138]. По результатам исследований чувствительность жидкостной цитологии составляет от 72 до 95 %, а специфичность – от 68 до 89 %, в то время как у традиционной цитологии – от 35 до 90 % и специфичность не более 62 % [48, 65, 72, 85, 116].

После того, как была доказана главенствующая роль вируса в диагностике РШМ, определение ВПЧ стало важным моментом скрининга цервикальной атипии [1, 40, 84]. Эти методы ориентированы на поиск фрагментов ДНК ВПЧ в мазке или биоптате тканей. ВПЧ-типирование является более чувствительным относительно цитологического метода [40, 51, 59, 82]. По данным проведенных исследований, примерно у 30 % пациенток с диспластическим процессом низкой степени, не диагностированным при цитологическом исследовании, была определена ДНК вируса в материале с цервикальной зоны [107]. В свободном доступе есть группы тестов для определения ДНК ВПЧ. Например, неамплификационный метод ПЦР определяет наличие ДНК, а амплификационный метод позволяет определить разные серотипы вируса. Однако наиболее перспективным методом считают вариант, при котором можно определить концентрацию вируса, – метод диагностики ПЦР в «real-time» [40, 111, 138]. Этот способ позволяет выявить количество вирусных генов, что делает возможным прогнозировать элиминацию или прогрессию. Тем не менее, положительный тест на ВПЧ не является показанием к оперативному вмешательству, а только дает возможность сформировать тактику ведения.

Наиболее перспективным вектором в современной медицине является поиск молекулярно-генетических маркеров для определения выраженности повреждения эпителия и определения вероятности малигнизации. Беспорядочная пролиферативная активность клеток при развитии атипических изменений в шейке матки может быть выявлена посредством определения белка p16INK4a, который является контролером этого процесса. Таким образом, обнаружение p16INK4a свидетельствует о наличии атипических клеток в материале. Данный метод диагностики обладает информативностью выше при дисплазии средней степени тяжести в сравнении с цитологическим методом исследования и ВПЧ-

типированием. Также при многочисленных исследованиях было установлено, что при отсутствии диспластического процесса в клетках белок p16INK4a не определяется [13, 41, 49, 52, 60, 80]. Таким образом, при наличии ВПЧ в цервикальной зоне без морфологически измененных клеток данный белок экспрессироваться не будет. В ходе проведенных исследований было определено, что чувствительность этого метода – около 55 %, специфичность составляет 82 %, а ценность результата (прогностическая) – 87 % [80].

Следующими перспективными диагностическими маркерами являются белки E6 и E7. Данные онкобелки считаются обязательными участниками атипического процесса в клетках шейки матки [57, 70, 80, 106, 124, 139]. Процесс внедрения ДНК вируса фиксируется формированием изменений в структуре гена белка E2 или за счет определения степени синтеза другого белка - E7. Обнаружение в цервикальных пробах данного онкобелка является признаком начавшегося трансформационного преобразования в клетках эпителия, которые содержат интегрированную в геном копию ВПЧ. В 2002 г. в НИИ молекулярной медицины ММА им. Сеченова положено начало определению информативности белка E7 в диагностике тяжести поражений шейки матки. Полученные результаты масштабного исследования показали, что онкобелок E7 диагностируется в 84 % диспластических процессов. Измерение уровня опухолевого белка E7 в цервикальном образце помогает диагностировать стадийность процесса инфекции вирусом (повышение концентрации уровня онкобелка E7 свидетельствует о стадии интеграции с низкой долей вероятности спонтанной элиминации). Кроме того, опухолевый белок E7 является мощным иммунодепрессантом, значительно снижающим эффективность иммунных препаратов. Патогистологическое синтезирование E6 и E7 происходит при внедрении ДНК ВПЧ в геном клетки, что влечет за собой малигнизацию, на фоне этого крайне низок вариант регресса [120, 128, 139]. Определяют данные онкобелки с помощью амплификации определенных нуклеиновых кислот. В Российской Федерации есть разработки для

обнаружения онкобелков E6 и E7 – это ИФА-тест – система для количественной диагностики E7 ВПЧ 16 и 18 типов [139].

У каждого имеющегося метода диагностики – свои минусы, которые не дают тому или иному способу быть лидером. Таким образом, есть необходимость в широкоспекторном подходе к диагностике ВПЧ для уменьшения частоты ложных результатов.

Наиболее достоверным и точным методом для диагностики является гистологическое исследование. Однако данный способ нельзя считать скрининговым, так как практически исключена многократность его применения, достаточно высока стоимость и в работе практикующего врача акушера-гинеколога этот метод диагностики должен быть конечным этапом диагностики [29, 30]. К гистологическому методу диагностики ВПЧ существуют определенные показания и противопоказания и отсутствуют четкие признаки верификации типов вируса.

В некоторых исследованиях [20, 97, 140, 144] при изучении биоптатов с шейки матки у пациенток с дисплазиями высокой степени и РШМ были определены уровни цистеиновых протеаз-каспаз, которые являются основными звеньями апоптоза. По мнению авторов [20, 97, 144], при внедрении ВПЧ в клетки цервикальной зоны происходит нарушение в течение естественных процессов, что влечет за собой и нарушение апоптотической программы. При исследовании каспаз 3, 5, 8 и 9 при CIN III и РШМ [20] были получены результаты, которые указывают на снижение уровня исследуемых каспаз ниже установленных показателей нормы по мере прогрессирования атипии. При определении уровня каспаз в биоптатах были получены корреляционные связи, которые могли бы быть использованы в практическом здравоохранении. Однако биопсия шейки матки не является методом, подходящим для динамического контроля за пациенткой и отслеживанием изменений патологического процесса, что является необходимым для оценки качества проводимой терапии [30]. Также метод биопсии крайне экономически затратен и многоэтапен.

Одним из наиболее перспективных направлений исследований считается скрининговая диагностика некоторых генетических нарушений в многослойном плоском эпителии (МПЭ) при заборе мазков из шейки матки у вирусоносителей до проявления атипических признаков [87, 97, 101]. Данный факт актуален с точки зрения практического здравоохранения [21], так как является основным на доклинической и ранней стадиях заболевания.

1.3. Процесс апоптоза при патологиях шейки матки

Одним из наиболее интересных и неизученных процессов является процесс апоптоза. Апоптоз – это запрограммированная гибель клетки. Среди многоклеточных данный процесс способствует поддержанию адекватного гомеостаза в клетках, отвечает за правильную дифференцировку тканей и морфогенез. За счет своих основных направлений процесс апоптоза задействован в иммунном ответе [55, 62, 73, 76, 78]. Достоверно определено, что протеазы семейства каспаз играют главенствующую роль в активации и процессинге апоптоза [76, 79, 93].

Семейство протеаз (цистеиновых) включает в себя каспазы, которые участвуют в расщеплении полипептидной цепочки остатка аспарагиновой кислоты. Впервые 20 лет назад было установлено участие каспаз в реализации запрограммированной клеточной гибели-апоптоза. Сами каспазы подразделяются на апоптотические и воспалительные. К первым относятся – каспаза 3, 6, 7, 8, 9, а во вторую группу – 1, 4, 5, 12. Среди каспаз, которые принимают участие в запрограммированной клеточной гибели, выделяют эффекторные, которые гидролизуют белки клетки (3, 6, 7) и инициаторные, которые принимают сигнал к апоптозу (8, 9) и передают его эффекторным [93, 98, 110, 115]. Каспаза 3, относясь к эффекторным, не имеет в своем составе домена, поэтому ее активация возможна после этапа протеолитического расщепления и димеризации. Каспаза 9, являясь инициаторной, имеет продомен в своем составе, который считается неотъемлемой частью белок - белковых взаимодействий [110, 127, 140, 141, 144].

Интерактивность N-концевых доменов с адаптивными белками способна приводить к димеризации прокаспаз и дальнейшей активации. Абсолютно каждый каскад молекулярных реакций, который приводит к запрограммированной гибели, сопровождается участием нескольких типов каспаз, а так же адаптированных белков. Все происходящие каскады условно подразделяются на две категории, исходя из того, откуда посылается сигнал для старта апоптоза: извне или изнутри самой клетки. Первый путь носит название внешний, а второй-внутренний [66, 87, 127]. Индукция апоптоза по внешнему типу (или рецепторному) активируется после взаимодействия внеклеточного лиганда с мембранным рецептором. Данные рецепторы располагаются на мембране клетки и именуются рецепторами смерти (DED). Рецепторы смерти так же как и рецептор TNF 1 (TNFR1); CD95 (Fas рецептор); рецептор смерти 3 (DR3); рецептор апоптоз-индуцирующего лиганда 1 (TRAILR1 или DR4), TRAIL-R2 (известный как DR5) относятся к надсемейству рецепторов фактора некроза опухоли (TNF). Соответственно, лигандами для данных рецепторов являются: TNF, лиганд CD95 (CD95-L или Fas-L), TRAIL (Apo2-L), TNF-подобный лиганд 1A (TL1A) [64, 66, 75, 78]. Связывание прокаспазы 8 происходит при взаимодействии лиганда с рецептором и активации через домен рецептора смерти с комплексом DISC, который индуцирует гибель. Индуцирующий гибель сигнальный комплекс является частью цитоплазматического активированного рецептора смерти, и с одним из белков адаптеров, FADD (FAS-ассоциированный домен смерти) или TRADD (TNFR-ассоциированный домен смерти) [98]. После взаимодействия прокаспазы-8 с образованным комплексом, происходит димеризация и ее активация. При утрате каспазы 8 у клетки будет сформирована устойчивость к апоптозу, также как и при отсутствии белков-адаптеров TRADD или FADD [78, 98]. Молекулярный каскад реакций, которые активируется при взаимодействии каспазы 8 и белков смерти, будет приводить к клеточной гибели. Какой именно каскад, зависит исключительно от типа клеток в нем участвующих: в каких-то клетках каспаза 8 будет инициатором непосредственно апоптоза, после расщепления эффекторной каспазы.

Так же существуют пути апоптоза, при которых каспаза 8 сначала запускает внутренний путь [57, 80, 110]. Как в первом сценарии, так и во втором, клетки будут отличаться друг от друга только наличием или отсутствием ингибиторов апоптоза внутри клетки. Белки семейства IAP являются ингибиторами каспаз-эффекторов, но способны подавлять белками, которые высвобождаются при внутреннем апоптотическом пути апоптоза - митохондриальном [110]. Данный путь активации программированной клеточной гибели носит такое название, так как главенствующую роль в нем играют митохондрии. Известно несколько моделей активации внутреннего пути, осуществляемого за счет клеточного стресса: изменение целостности цитоскелета, влияние на целостность ДНК, скопление поврежденных белков и т.д.[132].

При внутреннем апоптотическом пути инициаторной каспазой является каспаза 9. Активация данного участника программированной клеточной гибели возможна при димеризации предшественника-прокаспазы 9, что происходит после присоединения белка-адаптера APAF1 [100]. Образовавшийся комплекс представляет собой неактивные мономеры, расположенные в цитоплазме. Нарушение целостности мембраны союза прокаспазы 9 и белка-адаптера возможно при стрессе, что влечет за собой высвобождение цитохрома С. После чего, последний связываясь с адаптерным белком APAF1, вызывает его конформацию, в результате чего присоединяется дезоксинуклеотид дАТР, что влечет за собой повторную конформацию. Формируется комплекс-апоптосома, который состоит из субъединиц: цитохром-АРАF1-дАТР. Затем апоптосома связывает прокаспазу-9 через CARD-домен, что активирует каспазу 9. Клетки, которые в своем составе не имеют цитохром С, не могут индуцировать апоптоз по внутреннему типу. Однако, функционал цитохрома С как активатора белка АРАF1 и транспортера электронов не зависят друг от друга, потому что возобновляется различными доменами внутри молекулы [93, 98, 100].

Обобщая все вышесказанное, можно сделать выводы о том, что каспазы находятся в клетке конститутивно, что обеспечивает моментальную индукцию апоптоза. Первый путь запуска программированной клеточной гибели

обеспечивается при связывании индуктора со специфическими рецепторами на мембране, а второй путь – за счет активации каспазы апоптосомой через комплекс (дАТФ+АРАF1+цитохром C) [4, 7, 19, 54]. При любом варианте итоговым моментом будет активация эффекторной каспазы 3, 6 или 7, которые отличны между собой по внутриклеточной локализации [19, 58, 66]. Каспаза 3, 6 и 7 располагаются в цитоплазме- в основном звене апоптоза. Поэтому нокаут гена каспазы 3 может повлечь за собой уменьшение числа процессируемых после индукции программированной клеточной гибели субстратов данного фермента, а в клетках MCF-7, в которых конститутивно отсутствует каспаза 3, характерный для апоптоза процессинг большинства белков вообще не происходит [67, 74].

Таким образом, на сегодняшний день не существует универсального метода скрининга, а для уточнения диагноза и формирования тактики ведения однозначно необходимо комплексное применение различных методов диагностики папилломавирусной инфекции. При этом снижается вероятность ложноположительных и ложноотрицательных результатов, так как различные методы обладают разной чувствительностью, специфичностью и прогностической ценностью. Поэтому поиск эффективных маркеров для максимально ранней диагностики является актуальной задачей.

Г Л А В А 2

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы исследования

Для решения поставленных задач в диссертационном исследовании были обследованы 150 женщин в возрасте от 18 до 45 лет (средний возраст – $32,1 \pm 2,4$ года). Наблюдение за пациентками производилось $18,9 \pm 5,3$ месяцев. Исследование было проведено в лаборатории Научно-исследовательского института фундаментальных и прикладных исследований ФГБОУ ВО «Пензенский государственный университет», клинко-диагностической лаборатории ГБУЗ «Пензенский областной клинический центр крови», Женской консультации № 2 ГБУЗ «Пензенский городской родильный дом».

Исходя из поставленных задач, на первом этапе была сформирована группа контроля, в которую вошли относительно здоровые женщины, обратившиеся в женскую консультацию для прохождения медицинского осмотра. Для данной группы были определены следующие **критерии включения**:

- Возраст от 18 до 45 лет.
- Подписанное информированное согласие.
- Отсутствие гинекологических и экстрагенитальных заболеваний.
- Оценка «нормоценоз» по результату микроскопии.
- Отсутствие ВПЧ, вируса герпеса и ИППП.
- ЗТ I или II типа.
- Отсутствие проведения вакцинации от папилломавирусной инфекции.

Критерии исключения для группы контроля:

- Положительный тест на беременность и планирование беременности в период исследования.
- Наличие изменений цервикальной зоны по результатам кольпоскопического или цитологического исследования.
- Тяжелая гинекологическая или соматическая патология.
- Прием лекарственных препаратов, которые могли повлиять на исследуемые показатели.
- Невозможность следовать условиям протокола.

На втором этапе проведено обследование 110 ВПЧ-положительных женщин фертильного возраста. Деление на данные группы проводилось ретроспективно, на основании результатов гистологического заключения.

Критерии включения для обследования данных групп:

- Возраст от 18 до 45 лет.
- Наличие ВПЧ-инфекции.
- CIN I, CIN II, подтвержденные гистологически.
- Наличие ЗТ I или II типа при условии полной визуализации зоны стыка.
- Отсутствие гинекологической и экстрагенитальной патологии.
- Отсутствие терапии иммуномодулирующими препаратами за последние 7 месяцев до начала исследования.
- Оценка «нормоценоз» по результату микроскопии.
- Отсутствие на момент вступления в протокол, или пролеченные до начала исследования ИППП.
- Использование барьерного метода контрацепции на протяжении всего исследования
- Подписанное информированное согласие на участие в исследовании.

Критерии исключения:

- Положительный тест на беременность
- Тяжелая соматическая или гинекологическая патология.
- Вакцинация против вируса папилломы человека.
- Прием лекарственных препаратов, которые могли повлиять на исследуемые показатели.
- Невозможность следовать условиям протокола.

Первую группу составили ВПЧ-положительные пациентки с ретроспективно установленным диагнозом CIN I в количестве 55 пациенток в возрасте от 18 до 45 лет, средний возраст – $28,6 \pm 2,8$ лет.

Вторая группа состояла из 55 ВПЧ-положительных пациенток с CIN II, средний возраст которых составил $29,1 \pm 4,1$ лет.

Дизайн исследования представлен на рисунке 2.1.

Все пациентки, которые принимали участие в исследование, перед вступлением в протокол были ознакомлены с используемыми методами обследования и подписали информированное согласие на проведение комплекса обследования. В работе с пациентками соблюдались этические принципы, предъявляемые Хельсинкской декларацией ВМА «Этические принципы научных и медицинских исследований с участием человека» (с поправками 2008 г.), «Правилами клинической практики в Российской Федерации» (приказ Министерства здравоохранения и социального развития РФ № 266 от 19.06.2003), Национальным стандартом РФ «Надлежащая клиническая практика» (2005). Оценку клинического состояния пациенток проводили на основе данных обследования согласно приказу Минздрава России от 01.11.2012 № 572Н «Об утверждении порядка оказания медицинской помощи по профилю "Акушерство и гинекология (за исключением использования вспомогательных репродуктивных технологий)"».

Согласно письму Министерства здравоохранения РФ от 2 ноября 2017 г. N 15-4/10/2-7676 О направлении клинических рекомендаций (протокола лечения) "Доброкачественные и предраковые заболевания шейки матки с позиции профилактики рака" женщинам «с доказанной в биоптате...CIN I... и удовлетворительной кольпоскопией...предпочтительна выжидательная тактика с цитологией через 6 месяцев...», а для пациенток с « CIN II, подтвержденной в биоптате, проводилась LEEP/LLETZ/ЭХВЧ-конизация не зависимо от возраста». Разницей в проведении была оценка зоны трансформации, так как при ЗТ 1 типа, располагающейся полностью на эктоцервиксе, независимо от размера, глубина иссечения была не менее 7 мм, а при ЗТ 2 типа глубина иссечения увеличивалась до 10 мм.

В исследовании использовался препарат гистидил-глицил-валил-серил-глицил-гистидил-глицил-глутаминил-гистидил-глицил-валил-гистидил-глицин (препарат «Аллоферон»). Механизм действия данного препарата обусловлен индукцией синтеза интерферонов, а также стимуляцией системы естественных

киллеров. За счет чего аллоферон может цитотоксическими лимфоцитами активировать лизис клеток с дефектом, чем и обеспечивается противовирусный эффект данного препарата. Согласно официальной инструкции, при подкожном введении «Аллоферон» достаточно скоро проникает в кровь, для осуществления взаимодействия с иммунокомпетентными клетками, после чего определение концентрации «Аллоферона» затруднено из-за близкого структурного сходства его метаболитов с белками сыворотки крови. Препарат «Аллоферон» обладает высокой эффективностью в отношении вируса папилломы человека. Данный препарат не обладает общей токсичностью, аллергенными свойствами, мутагенным и канцерогенным действием, не оказывает эмбриотоксического действия и не влияет на репродуктивную функцию.



Рисунок 2.1 – Дизайн исследования

2.2. Методы исследования.

2.2.1. Оценка инфекционной составляющей нижнего отдела генитального тракта

В ходе данного исследования всем пациенткам проводился **бактериоскопический метод** диагностики вагинального содержимого. Этот вид обследования основывается на данных комплексного подхода: микроскопия мазков из влагалища, которые окрашиваются по Граму, и культуральное исследование содержимого. Данное обследование проводилось всем пациенткам в начале исследования и на этапе финальной оценки состояния. При проведении данного метода обследования производилась оценка микроскопической картины: принимали во внимание количество, тип эпителиальных клеток, количество лейкоцитов, характер микрофлоры.

Соскоб эпителиальных клеток для данного исследования получали стерильным одноразовым инструментом из уретры, влагалища и цервикального канала. Интерпретацию результатов бактериоскопического метода диагностики проводили в соответствии с общеизвестными рекомендациями Е. Ф. Кира (2001).

В наше исследование включались пациентки по результатам данного обследования «нормоценоз».

Исследование на облигатные патогены проводилось **методом полимеразной цепной реакции (ПЦР)** без количественного определения инфекционного возбудителя с помощью наборов реагентов: *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis*, *Mycoplasma genitalium*, *Cytomegalovirus*, *Herpes Simplex virus 1, 2* в формате «реальное время» – ПЦР-real time на наборах фирмы «ДНК-технология» (г. Москва). В исследование включались пациентки с отсутствием вышеперечисленных инфектов.

Для определения **ВПЧ** использовался **молекулярно-биологический метод диагностики**. Взятие биологического материала (соскоб эпителиальных клеток из зоны трансформации) осуществляли в пробирки с физиологическим раствором. Осаждение клеток проводили путем центрифугирования при 13 000 G в течение 10 минут. Полученные клетки ресуспендировали в 100 мкл физиологического

раствора. Для выделения ДНК использовали наборы «Проба ГС» («ДНК-Технология», Россия). Данный метод осуществляется при лизисе клеток сильного хаотропного агента с последующей сорбцией нуклеиновых кислот на твердом носителе, последующих отмывках сорбента и элюции ДНК с сорбента. Амплификацию типоспецифических фрагментов ДНК-вируса папилломы человека и человеческой ДНК (контроль адекватности взятия биоматериала) проводили с помощью комплекта реагентов для выявления, типирования и количественного определения вируса папилломы человека методом ПЦР HPV «Квант-21» («ДНК-Технология», Россия). Амплификацию осуществляли в режиме «реального времени» на приборе «ДТ-964» («ДНК-Технология», Россия). Измерение уровня флуоресценции проводили на каждом цикле амплификации по каналам FAM, HEX, ROX и Cy5. Обработка результатов осуществлялась автоматически с помощью программного обеспечения к приборам. Конечный результат нормированной концентрации ДНК ВПЧ на количество клеток человека рассчитывали по формуле

$$I_g \times 200\,000 = I_g (\text{ВПЧ на } 100\,000 \text{ клеток}).$$

Результаты концентрации ДНК ВПЧ выражали в I_g (ВПЧ на 100 000 клеток) и оценивали следующим образом: менее 3 I_g – малозначимая, от 3 до 5 I_g – клинически значимая и более 5 I_g – повышенная вирусная нагрузка.

Обязательным критерием включения в исследование для группы контроля было отсутствие ВПЧ, а в группе исследования – его наличие.

2.2.2. Цитологическое исследование

Для верификации диагноза при обследовании пациенткам проводилось **цитологическое исследование мазков**. Забор материала для данного метода диагностики проводился с поверхности влажной части шейки матки и цервикального канала.

При данном этапе использовали одноразовые цервикальные щеточки «Cervix-brush» для сбора материала с экзоцервикса, а также с зоны

трансформации. Мазок не брали ранее 48 часов после полового контакта, кольпоскопии, гинекологического осмотра и в период лечения воспалительных заболеваний. Материал забирался с трех зон: с эктоцервикса, с зоны стыка и из нижней трети эндоцервикса. Для проведения традиционного цитологического исследования полученный материал наносился в одном направлении на обезжиренные предметные стекла, которые затем подвергались окраске по Папаниколау. Метод Папаниколау предполагает фиксацию клеток в спиртосодержащей среде. Окраску при данном методе проводили гематоксилином, фосфорновольфрамовой кислотой и оранжевым G, а затем световым зеленым, бисмарком коричневым и эозином.

Для оценки результатов цитологического исследования использовали классификацию Папаниколау.

Обязательным условием для цитологической оценки был «удовлетворительный» результат. «Удовлетворительные» образцы должны содержать как минимум 8000–12 000 хорошо визуализируемых плоских клеток в традиционном мазке, кроме того, обязательно наличие компонентов эндоцервикса или зоны трансформации, которые должны быть представлены не менее 10 хорошо сохранными эндоцервикальными или метапластичными клетками. Также описание цитологической оценки включает наличие инфекции, реактивные изменения (связанные с воспалением, включая репаративные; атрофию с воспалением; изменения, связанные с внутриматочной спиралью, и др.). Классификацию полученных результатов проводили в соответствии с Терминологической системой Бетесда, 2001 г.

2.2.3. Кольпоскопическое исследование

Кольпоскопия – один из ведущих методов обследования пациенток с патологическими изменениями цервикса. Задачами данного исследования являются оценка состояния эпителия шейки матки и влагалища [5], выявление очага поражения для проведения дальнейшей прицельной биопсии шейки матки.

Для проведения кольпоскопического обследования пациенток использовался кольпоскоп «Олимпус-500», который обеспечивал 15–30-кратное увеличение. В ходе кольпоскопического исследования слизистую шейки матки исследовали как без обработки, так и с последующим нанесением 3 % раствора уксусной кислоты, а затем 3 % водного раствора Люголя (проба Шиллера). Документацию кольпоскопических картин осуществляли графически в соответствии с условным циферблатом (рисунок 2.2).

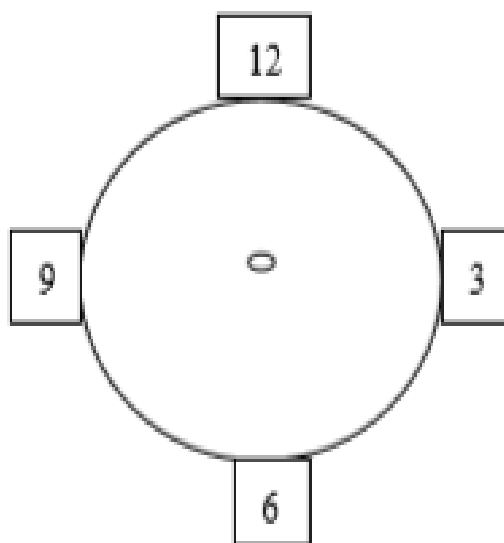


Рисунок 2.2 – Графическая визуализация локализации поражений по часам

При оценке кольпоскопических картин использовалась Международная классификация кольпоскопических терминов, принятая с учетом изменений 2011 г. в Рио-де-Жанейро.

2.2.4. Гистологическое исследование шейки матки

После анализа цитологического заключения, результатов расширенной кольпоскопии и определения наличия ВПЧ производили **прицельную мультифокусную биопсию шейки матки (МБШМ)**.

Гистологическое исследование биоптата пораженных участков шейки матки (экзоцервикса и соскобов эндоцервикса) [107] проводилось с целью уточнения диагноза и исключения низкодифференцированных клеток

(малигнизации). Противопоказаниями к проведению МБШМ были острые воспалительные заболевания и выраженные коагулопатии. Цервикобиоптаты помещали в фиксатор (10 % формалин на фосфатном буфере при $\text{pH} = 7,2\text{--}7,4$) на 18–20 часов. Для гистологической резки объектов применяли ротационный микротомполуавтомат НМ-340Е с системой водного переноса срезов STS (Microm, Германия). С целью проведения обзорной микроскопии материала применяли окраску гематоксилином и эозином. Микроскопия проводилась в световом микроскопе (Carl Zeiss, Германия). МБШМ проводили в условиях асептики и антисептики под внутривенной анестезией (в условиях стационара), без анестезии (амбулаторно) или под местным обезболиванием (10 % раствор Лидокаина в форме спрея). В асептических условиях шейку матки обнажали в зеркалах. Мультифокусную биопсию шейки матки производили радиоволновым петлевым электродом или скальпелем. Материал брали из наиболее подозрительных участков шейки матки по результатам расширенной кольпоскопии.

Важным условием было получение достаточно большого (около 3–5 мм в ширину и 6 мм в глубину) биоптата с пяти подозрительных зон. Зону биопсии документировали, материал маркировали и отправляли на гистологическое исследование. В лаборатории его фиксировали в парафин или замораживали в термостате. Затем парафиновый блок или замороженный кусочек резали и помещали срезы на стекла, окрашивали и исследовали под микроскопом. По завершении гистологического метода исследования полученные образцы оценивались по классификации ВОЗ от 2014 г.

При диагностированной CIN II после мультифокусной биопсии шейки матки пациенткам с зоной трансформации 1 типа глубина LEEP-конизации составляла 7 мм, а у пациенток с зоной трансформации 2 типа глубина иссечения увеличивалась до 10 мм.

В исследование были включены пациентки с гистологически подтвержденными результатами – дисплазия легкой степени, дисплазия умеренной степени.

2.2.5. Определение содержания уровней каспазы 1, каспазы 3 и каспазы 9

Содержание уровня исследуемых каспаз определялось с помощью наборов для **определения сэндвич-методом ИФА** в гомогенатах тканей, клеточных лизатах и других биологических жидкостях человека. Для определения уровня каждой каспазы использовались наборы фирмы Cloud Clone corp. Материалом для исследования являлись клетки из цервикального канала, которые получали при использовании одноразовой цервикальной щетки «Cervix brush». Набор на 96 определений каждой каспазы включал следующие составляющие (таблица 2.1).

Таблица 2.1 – Состав набора на 96 определений

Реагент	Количество	Реагент	Количество
96-луночный стрипованный планшет, сорбированный	1	Плётка для заклейки 96-луночного планшета	4
Стандарт	2	Растворитель для стандарта	1×20 мл
Детектирующий реагент А	1×120 мкл	Растворитель А	1×12 мл
Детектирующий реагент В	1×120 мкл	Растворитель В	1×12 мл
ТМБ	1×9 мл	Стоп-реагент	1×6 мл
Промывающий раствор (30×концентрат)	1×20 мл	Инструкция	1

Полученный материал переносили в пробирки с 0,7 мл фосфатно-солевого буфера (ФСБ). После того как образцы были доставлены в лабораторию, их промывали в охлажденном ФСБ 0,01 моль/л, рН 7,0–7,2, чтобы удалить лишнюю кровь перед гомогенизацией. Следующий этап – образец измельчали и гомогенизировали в 5–10 мл ФСБ стеклянным гомогенизатором на льду. Для разрушения клеточных мембран использовали тройной цикл замораживания/размораживания, после чего производили центрифугирование 5 минут с

ускорением 5000g, удаляли супернатант и производили анализ. Результаты ИФА диагностики уровня каспаз получали в нг/мл.

2.2.6. Методы статистической обработки

Статистическая обработка полученных в диссертационном исследовании результатов была проведена на персональном компьютере с использованием набора стандартных приложений Intel ® Core (TM) i7 CPU в среде Windows 10 с применением пакета Office для программного обеспечения Microsoft, программный продукт «Solution PS IMAGO: IBM SPSS Statistics Base, IBM SPSS Custom Tables Authorized» (лицензия № 5823-A61) с учетом правил применения для исследований в биологической и медицинской сферах. Для количественных признаков описательная статистика представлена в виде значений M (среднего) и отклонения стандартного ($M \pm СКО$). Для сравнения в рамках исследования подгрупп и групп применяли непараметрический дисперсионный анализ Краскела–Уоллиса с дальнейшим сравнениями межгрупповыми с поправкой Бонферрони по критерию Манна–Уитни–Вилкоксона. Исследование взаимосвязей проводили с помощью корреляционного анализа Пирсона. Статистическая значимость изменений в каждой группе и подгруппе на разных этапах исследования оценена по парному критерию Вилкоксона. Оценивая вклад исследуемых признаков в риск прогрессии неопластического процесса использовали логистические регрессии: одномерную и многомерную. Для оценки качества прогнозирования применяли ROC-анализ. Результаты при $p < 0,05$ считались статистически значимыми.

Г Л А В А 3

КЛИНИКО-ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ КРИТЕРИИ ОЦЕНКИ СТЕПЕНИ ТЯЖЕСТИ ПОРАЖЕНИЯ ЭПИТЕЛИЯ ШЕЙКИ МАТКИ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ ВИРУСА ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА

3.1. Группа контроля

На первом этапе диссертационного исследования была сформирована исследовательская когорта согласно критериям включения и исключения из исследования. В группу контроля вошли 40 здоровых женщин, которые проходили медицинский осмотр в амбулаторно-поликлиническом звене акушерско-гинекологической помощи г. Пензы. Средний возраст в данной группе составил $26,7 \pm 3,5$ лет.

Для подтверждения однородности в группах исследования все пациентки в группе контроля были распределены по возрастным категориям (таблица 3.1).

Таблица 3.1 – Распределение пациенток по возрастным группам

Возрастная группа	Абсолютные числа	Относительные числа, %
От 18 до 30 лет	26	65
От 31 до 45 лет	14	35

Соответственно, группу контроля, преимущественно, составили пациентки молодого возраста до 30 лет.

При оценке гинекологического статуса женщин учитывался средний возраст начала менструации, который у пациенток группы контроля составил $14,5 \pm 2,4$ года. Также у всех пациенток в данной группе исследования менструальный цикл носил регулярный характер, а средняя длительность менструации и менструального цикла соответствовала среднестатистическим параметрам.

На следующем этапе проводилась оценка акушерского анамнеза, для этого учитывались возраст полового дебюта, общее количество беременностей,

количество абортивных исходов беременностей, число самопроизвольных родов. Исходя из данных акушерского анамнеза, в группе контроля средний возраст полового дебюта составил $19,7 \pm 3,5$ лет. Самопроизвольный абортивный исход беременности у себя отметили только 13 % от общего числа группы, а искусственное прерывание беременности было у 33 % женщин.

При анкетировании женщин из группы контроля ни одна пациентка в индивидуальной карте не указала никотиновую зависимость.

Всем пациенткам из группы контроля было проведено обследование согласно приказу Минздрава России от 01.11.2012 № 572Н «Об утверждении Порядка оказания медицинской помощи по профилю "Акушерство и гинекология (за исключением использования вспомогательных репродуктивных технологий)"», а также дополнительные методы обследования в рамках данного исследования. При включении в исследование одним из критериев при оценке состояния нижнего отдела генитального тракта было заключение «нормоценоз». Соответственно, данный диагноз был установлен всем пациенткам группы контроля по результатам мазка на флору, обследования на инфекции, передаваемые половым путем, и ВПЧ-типирования. При проведении ВПЧ-типирования было установлено, что ни у одной пациентки из группы исследования не выявлено наличие вируса папилломы человека.

Для исключения иммунодефицитных состояний и системных вирусных заболеваний все пациентки сдавали кровь на ВИЧ-инфекцию, гепатит В, гепатит С и на сифилис. Все результаты в группе контроля по данным инфекциям были отрицательные.

С целью диагностики патологических изменений в малом тазу, которые могли повлиять на результаты исследования, всем женщинам проводилось ультразвуковое исследование (УЗИ) на 5–7-й день менструального цикла. При трансвагинальном (ТВ) УЗИ не было диагностированной патологии, которая требовала бы оперативного лечения или могла повлиять на результаты исследования.

Следующим этапом было проведение цитологического исследования

материала. Данный метод является скрининговым и позволяет выявить патологические изменения в эпителиальной зоне шейки матки. У всех женщин (100 %) контрольной группы цитограмма была с нормальным клеточным составом, что соответствует Class I, и негативная в отношении интраэпителиальных поражений. Такое описание при цитологическом исследовании соответствует заключению NILM (рисунок 3.1).

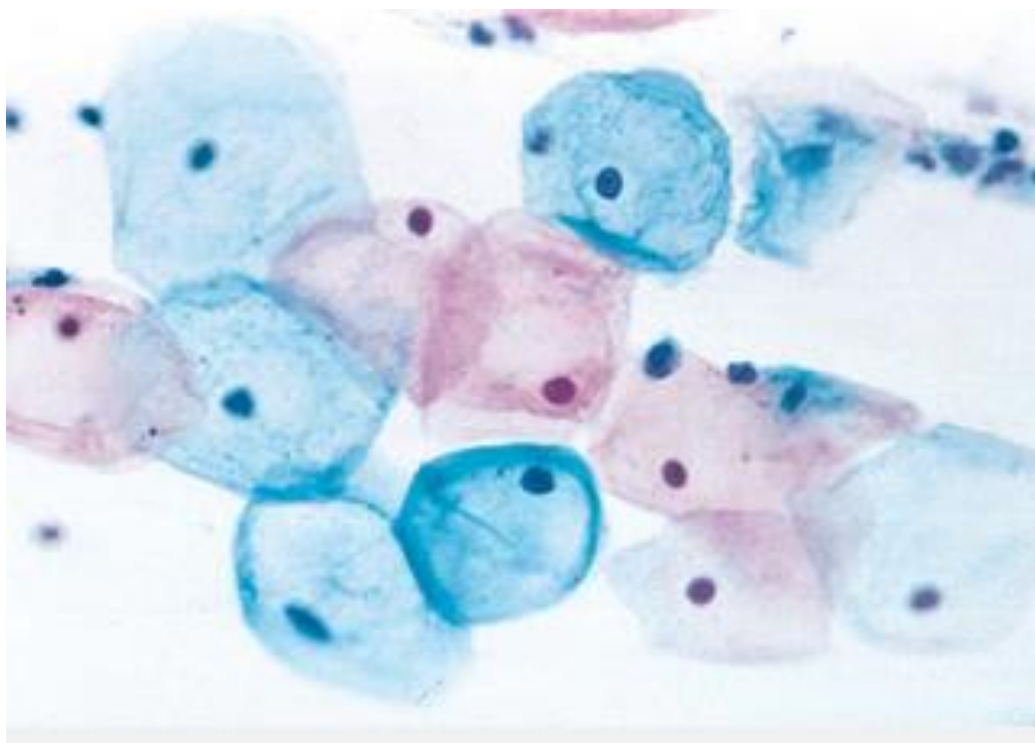


Рисунок 3.1 – NILM. Окрашивание по Папаниколау, x400

Для комплексной оценки цервикальной зоны проводилась расширенная кольпоскопия [86, 118]. При проведении кольпоскопического исследования у всех пациенток (100 %) кольпоскопическая картина была адекватная, зона трансформации 1 типа, что позволило полностью визуализировать стык многослойного плоского эпителия. У всех пациенток данной группы была нормальная кольпоскопическая картина, представленная оригинальным МПЭ с выводными протоками желез (рисунок 3.2А, 3.2Б, 3.3В).



Рисунок 3.2А – Нормальная кольпоскопическая картина

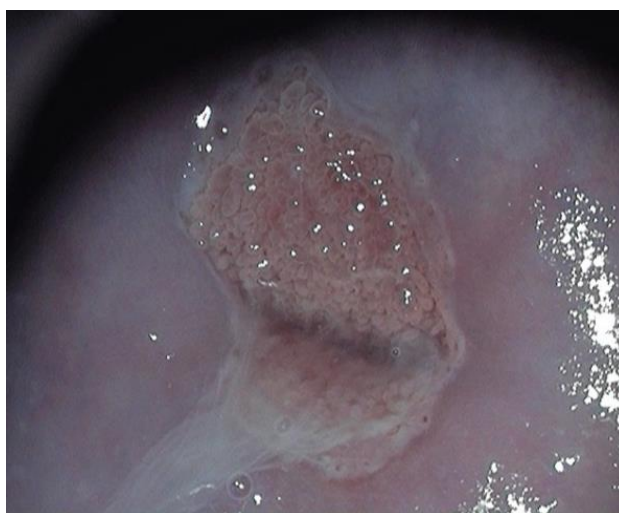


Рисунок 3.2Б –Кольпоскопическая картина после нанесения
3% раствора уксусной кислоты

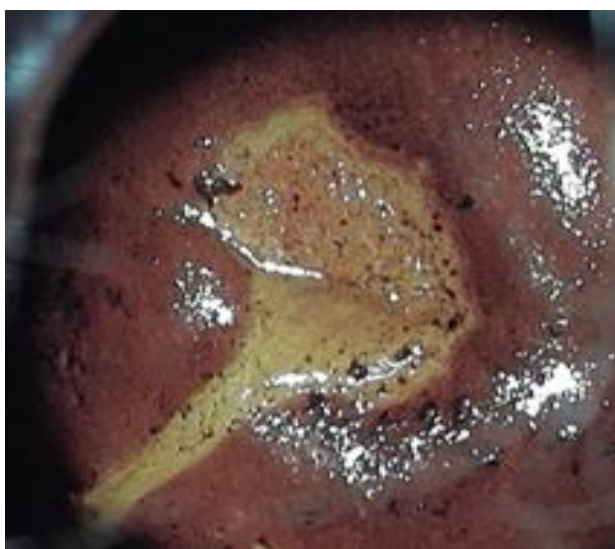


Рисунок 3.2В –Кольпоскопическая картина после нанесения
3% водного раствора Люголя (проба Шиллера)

На следующем этапе работы были проанализированы апоптотические маркеры, которые включены в исследование для определения выраженности процессов апоптоза в клетках эпителия шейки матки при ВПЧ. В доступной литературе найти нормы для показателей каспазы 1, 3 и 9, полученных методом ИФА-диагностики, не предоставляется возможным. В связи с поставленными задачами для определения нормальных показателей было произведено обследование группы контроля (таблица 3.2).

Таблица 3.2 – Уровни каспазы 1, 3 и 9 в группе контроля

Показатель	Значения, нг/мл
Caspase 1	0,060±0,01
Caspase 3	0,188±0,04
Caspase 9	0,213±0,03

В группе контроля значения каспазы 1 соответствовали 0,060±0,01 нг/мл, значения каспазы 3 - 0,188±0,04 нг/мл, а значения каспазы 9 были равны 0,213±0,03 нг/мл.

В связи с присутствием апоптоза в здоровых клетках, полученные значения маркеров при обследовании группы контроля свидетельствовали о естественно текущем отмирании, за счет которого происходит регуляция клеточного обновления в тканях шейки матки [57, 136, 144].

3.2. Описание группы пациенток с цервикальной интраэпителиальной неоплазией I степени, ассоциированной с вирусом папилломы человека

I группа исследования была сформирована ретроспективно, на основании результатов гистологического исследования. Группу I составили 55 ВПЧ-положительных пациенток (средний возраст – 28,6±2,8 лет) с гистологически подтвержденным диагнозом CIN I.

В соответствии с обозначенными ранее факторами риска для прогрессии ВПЧ-ассоциированных цервикальных неоплазий, в группе CIN I пациентки были разделены согласно возрастным интервалам (таблица 3.3).

Таблица 3.3 – Распределение пациенток по возрастным группам

Возрастная группа	Абсолютные числа	Относительные числа, %
От 18 до 30 лет	38	69
От 31 до 45 лет	17	31

Среди пациенток I группы исследования 38 пациенток (69%) были в возрасте от 18 до 30 лет, а 17 пациенток (31 %) были старше 31 года, однако, возраст пациенток не превышал 35 лет. Настоящее разделение использовано для более детального изучения элиминации вируса, исходя из возрастных показателей и опираясь на данные некоторых авторов, которые в своих работах отмечают, что возможна спонтанная элиминация ВПЧ в более молодом возрасте до 30 лет [114]. В группе исследования был проведен корреляционный анализ между выбранными критериями для оценки состояния пациенток относительно фактора риска – возраста старше 30 лет (таблица 3.4).

Таблица 3.4 – Анализ зависимости исследуемых показателей с возрастом у пациенток с CIN I (корреляционный анализ по Спирмену – Spearman Rank)

Показатель	Количество наблюдений	Возраст старше 30 лет	
		Коэффициент корреляции R	Уровень p
Курение >7 сигарет	55	0,1886	0,0513
Ранний половой дебют	55	0,4382*	0,0001
Количество половых партнеров >7	55	0,4653*	0,0004
Артифициальные аборты	55	0,6234*	0,0002
Кольпоскопия	55	0,2473*	0,0001
Онкоцитология	55	0,3486*	0,0536
ВПЧ (3–5lg, >5lg)	55	0,5924*	0,0004
Уровень caspase 3	55	0,6504*	0,0005
Уровень caspase 9	55	0,5732*	0,0004
Гистологическое заключение	55	0,6982*	0,0003

Примечание. * – статистически значимая корреляционная зависимость ($p < 0,05$).

Стоит отметить, что между изучаемыми показателями были установлены только прямые связи. Сильных корреляционных связей не было выявлено между возрастом и ни одним исследуемым показателем.

По мнению исследователей [10, 68, 114, 117, 130], существуют факторы риска, которые способствуют формированию и прогрессии заболеваний цервикальной зоны на фоне ВПЧ. Например, к таковым относятся курение, воспалительные заболевания женских половых органов, раннее начало половой жизни, количество половых партнеров, нарушение менструальной функции и т.д. Среди пациенток группы I исследования были выявлены пациентки с никотиновой зависимостью. Был проведен анализ, в результате которого установлено, что среди пациенток группы I была 21 (38 %) курящая женщина (более семи сигарет в день), но по результатам корреляционного анализа данный фактор не имел особого значения при развитии CIN I (таблица 3.5).

Таблица 3.5 – Анализ зависимости исследуемых показателей с курением у пациенток с CIN I (корреляционный анализ Spearman Rank)

Показатель	Количество наблюдений	Курение >7 сигарет	
		Коэффициент корреляции R	Уровень p
Возраст старше 30 лет	55	0,1886	0,0513
Ранний половой дебют	55	0,4593*	0,0004
Количество половых партнеров >7	55	0,6594*	0,0005
Артифициальные аборты	55	0,5341*	0,0004
Кольпоскопия	55	0,5693*	0,0002
Онкоцитология	55	0,3918*	0,0003
ВПЧ (3–5lg, >5lg)	55	0,4582*	0,0002
Уровень caspase 3	55	0,6235*	0,0003
Уровень caspase 9	55	0,6623*	0,0002
Гистологическое заключение	55	0,6817*	0,0002

Примечание. * – статистически значимая корреляционная зависимость ($p < 0,05$).

В доступной литературе влияние курения на формирование патологий шейки матки объясняется тем, что токсин, содержащийся в сигарете, проходит биотрансформацию в организме человека [68], а затем выделяется половыми железами и повреждает эпителиальные клетки цервикальной зоны [117], что делает их более восприимчивыми к воздействию вирусов. По мнению авторов, критическим количеством сигарет, выкуренных женщиной в сутки является цифра семь и более [10, 68, 117].

При анализе сексуального поведения обследуемых пациенток 1 группы учитывался возраст начала половой жизни и количество половых партнеров. Считается, что риск инфицирования при данных ситуациях может произойти раньше и, соответственно, возможно более длительное по времени воздействие вируса на клетки цервикальной зоны. В ходе анализа сексуального поведения в группе I было установлено раннее начало половой жизни – $17,4 \pm 3,9$ лет у 26 пациенток (47 %) и у 23 пациенток (42 %) было отмечено более семи половых партнеров. Эти факторы являются общепризнанными и ведущими для инфицирования ВПЧ и прогрессии в цервикальные неоплазии [10, 130] (таблица 3.6).

Таблица 3.6 – Анализ сексуального поведения I группы исследования

Показатель	I группа исследования	
	Абсолютные числа	Относительные числа, %
Половой дебют до 18 лет	26	47
Половой дебют после 18 лет	29	53
Количество половых партнеров < 7	32	58
Количество половых партнеров > 7	23	42

Следующим этапом был проведен корреляционный анализ сексуального поведения с исследуемыми показателями (таблица 3.7):

Таблица 3.7 – Анализ зависимости исследуемых показателей с количеством половых партнеров > 7 и ранним половым дебютом у пациенток с CIN I (корреляционный анализ Spearman Rank).

Показатель	Количество наблюдений	Ранний половой дебют		Количество половых партнеров >7	
		Коэффициент корреляции R	Уровень р	Коэффициент корреляции R	Уровень р
Курение > 7сигарет	55	0,4593*	0,0004	0,6594*	0,0005
Возраст старше 30 лет	55	0,4382*	0,0001	0,4653*	0,0004
Ранний половой дебют	55	1,0000	-----	0,5672*	0,0001
Количество половых партнеров >7	55	0,5672*	0,0001	1,0000	-----
Артифициальные аборты	55	0,4245*	0,0001	0,3827*	0,0005
Кольпоскопия	55	0,4995*	0,0005	0,5024*	0,0003
Онкоцитология	55	0,4172*	0,0004	0,3453*	0,0001
ВПЧ (3–5lg, >5lg)	55	0,6573*	0,0001	0,7129*	0,0003
Уровень caspase 3	55	0,6742*	0,0004	0,6932*	0,0001
Уровень caspase 9	55	0,4912*	0,001	0,4839*	0,0004
Гистологическое заключение	55	0,4732*	0,004	0,7038*	0,0004

Примечание. * – статистически значимая корреляционная зависимость ($p < 0,05$).

В ходе проведенного анализа (таблица 3.7) установлена прямая сильная связь между количеством половых партнеров и клинически значимой вирусной нагрузкой ($R = 0,7129$, $p = 0,0003$) и гистологическим заключением ($R = 0,7038$, $p = 0,0004$). Количество половых партнеров больше семи относится к ведущим экзогенным факторам [33, 130], способствующим формированию ВПЧ-ассоциированных патологий шейки матки. Это объясняется тем, что от каждого

нового полового партнера женщина получает новые штаммы вируса папилломы человека, формируя микст комбинации, являющиеся более агрессивными по отношению к клеткам цервикального эпителия, что в свою очередь приводит к развитию дисплазий.

В ходе исследования у пациенток в группах оценивалось количество искусственных абортов как одного из основных кофакторов [10, 114, 142] развития атипии на шейке матки. так как при данной процедуре происходит травматизация данной зоны, которая снижает устойчивость эпителиальных клеток к воздействию вируса и способствует формированию изменений в цервиксе (таблица 3.8).

Таблица 3.8 – Анализ зависимости исследуемых показателей с фактом травматизации шейки матки у пациенток с CIN I (корреляционный анализ Spearman Rank).

Показатель	Количество наблюдений	Искусственные аборты	
		Коэффициент корреляции R	Уровень р
Курение > 7 сигарет	55	0,5341*	0,0004
Возраст старше 30 лет	55	0,6234*	0,0002
Ранний половой дебют	55	0,4245*	0,0001
Количество половых партнеров >7	55	0,3827*	0,0005
Кольпоскопия	55	0,4365*	0,0003
Онкоцитология	55	0,3165	0,057
ВПЧ (3–5lg, >5lg)	55	0,2865*	0,0003
Уровень caspase 3	55	0,6232*	0,0005
Уровень caspase 9	55	0,6846*	0,0005
Гистологическое заключение	55	0,6784*	0,0004

Примечание. * – статистически значимая корреляционная зависимость ($p < 0,05$).

В группе 1 у 20 пациенток (36%) было проведено прерывание беременности путем проведения Abrasio cavi uteri, но по результатам проведенного анализа среди пациенток первой группы исследования фактор травматизации шейки не оказывал явного влияния на формирование цервикальной интраэпителиальной

неоплазии 1 степени тяжести.

При проведении онкоцитологического исследования у пациенток с CIN I были получены следующие цитологические заключения (таблица 3.9).

Таблица 3.9 – Результаты цитологического исследования в группе I

Результат	NILM	LSIL	HSIL
Абсолютные числа	21	34	-
Относительные числа, %	38	62	-

Данный метод является скрининговым и дает возможность выявить группы женщин, угрожаемых по развитию неоплазии и рака шейки матки. Принимая во внимание, что чувствительность и специфичность цитологического метода исследования (не более 60 %) [116, 131], то при интерпретации результатов цитологии было получено 38 % ложноотрицательных результатов. Цитологическая картина L-SIL представлена на рисунке 3.3.

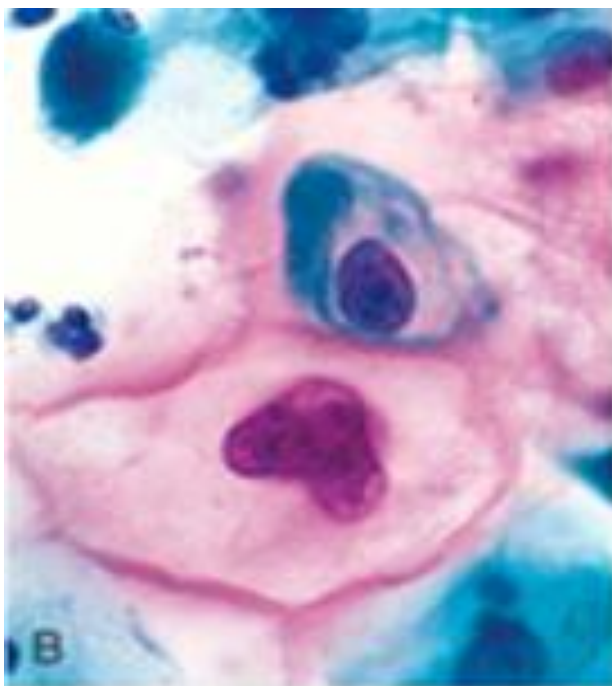


Рисунок 3.3 – L-SIL. Окрашивание по Папаниколау, х400

Взаимосвязи (таблица 3.10) между заключениями онкоцитологии и изучаемыми показателями не продемонстрировали сильных взаимодействий, что, в свою очередь, подтверждает данные о низкой чувствительности и специфичности рассматриваемого метода диагностики.

Таблица 3.10 – Анализ зависимости исследуемых показателей и онкоцитологии у пациенток с CIN I (корреляционный анализ Spearman Rank)

Показатель	Количество наблюдений	Онкоцитология	
		Коэффициент корреляции R	Уровень р
Курение > 7 сигарет	55	0,3918*	0,0003
Возраст старше 30 лет	55	0,3486	0,0536
Ранний половой дебют	55	0,4172*	0,0004
Количество половых партнеров >7	55	0,3453*	0,0001
Артифициальные аборты	55	0,3165*	0,0005
Кольпоскопия	55	0,4324*	0,0005
ВПЧ (3–5lg, >5lg)	55	0,4912*	0,0005
Уровень caspase 3	55	0,6023*	0,0004
Уровень caspase 9	55	0,6145*	0,0005
Гистологическое заключение	55	0,4742*	0,0001

Примечание. * – статистически значимая корреляционная зависимость ($p < 0,05$).

Для определения характера поражений цервикальной зоны было проведено расширенное кольпоскопическое исследование. Основным критерием для включения в исследование было наличие зоны трансформации I или II типа, что делало возможным полноценную оценку состояния шейки матки. У всех ВПЧ-положительных пациенток с CIN I была диагностирована аномальная кольпоскопическая картина. Слабовыраженные поражения (степень I) на шейке матки диагностированы у 36 пациенток, что составило 65 %, а выраженные поражения (степень II) – у 19 пациенток (35 %) (рисунок 3.4А, 3.4Б, 3.4В).

Слабовыраженные поражения при кольпоскопическом исследовании были представлены нежной мозаикой (15 %), тонким ацето-белым эпителием (25 %) и нежной пунктацией (29 %). Выраженные поражения на шейке матки при кольпоскопии были представлены плотным АБЭ у 17 пациенток (31 %); грубая мозаика выявлена у 21 пациентки (38 %); четкие границы определены

у 13 пациенток (24 %) (таблица 3.11).



Рисунок 3.4А – Аномальная кольпоскопическая картина. Степень I (Слабовыраженное поражение цервикальной зоны при кольпоскопическом исследовании)

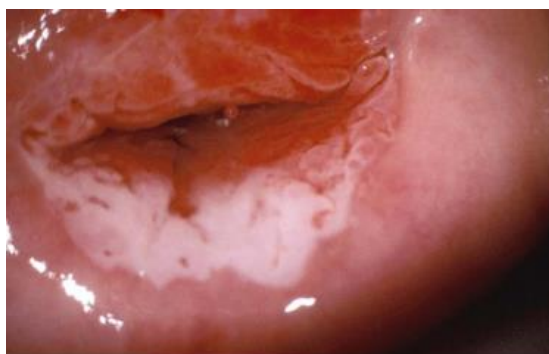


Рисунок 3.4Б – Аномальная кольпоскопическая картина. Степень I (Слабовыраженное поражение цервикальной зоны) после нанесения 3% раствора уксусной кислоты

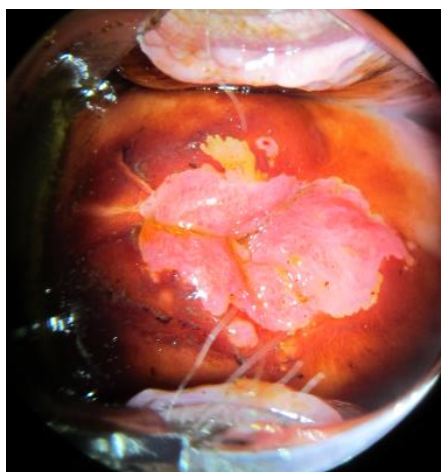


Рисунок 3.4В – Аномальная кольпоскопическая картина. Степень I (Слабовыраженное поражение цервикальной зоны) после нанесения 3% водного раствора Люголя (проба Шиллера)

У 28 пациенток (51 %) с CIN I определялись сочетания нескольких кольпоскопических признаков, чаще всего это было сочетание плотного ацетобелого эпителия с участками грубой мозаики у (27 %).

Таблица 3.11 – Результаты кольпоскопического исследования в группе I

Кольпоскопическая картина			Абсолютны е числа	Относительны е числа, %
Аномальная кольпоскопиче ская картина	Степень I (слабовыражен ное поражение)	Нежная мозаика	8	15
		Нежная пунктация	16	29
		Тонкий АБЭ	14	25
	Степень II(выраженное поражение)	Грубая мозаика	21	38
		Плотный АБЭ	17	31
		Четкие границы	13	24

Взаимосвязи кольпоскопического исследования отражены в таблице 3.12.

Таблица 3.12 – Анализ зависимости исследуемых показателей с результатами кольпоскопии у пациенток с CIN I (корреляционный анализ Spearman Rank)

Показатель	Количество наблюдений	Кольпоскопия	
		Коэффициент корреляции R	Уровень p
Курение > 7 сигарет	55	0,5693*	0,0002
Возраст старше 30 лет	55	0,2046*	0,0006
Ранний половой дебют	55	0,4995*	0,0005
Количество половых партнеров >7	55	0,5024*	0,0003
Артифициальные аборты	55	0,4365*	0,0003
Онкоцитология	55	0,4324*	0,0005
ВПЧ (3–5lg, >5lg)	55	0,6421*	0,0005
Уровень caspase 3	55	0,7124*	0,0004
Уровень caspase 9	55	0,7148*	0,0004
Гистологическое заключение	55	0,4846*	0,0001

Примечание. * – статистически значимая корреляционная зависимость ($p < 0,05$).

Обращает на себя внимание отсутствие сильной взаимосвязи КПС и гистологического заключения. Данный факт подтверждает предположение о том,

что кольпоскопия относится к субъективным методам диагностики и обладает 30-60% специфичности и 80-90 % чувствительности. Но благодаря кольпоскопической визуализации возможно проведение мультифокусной биопсии из наиболее подозрительных участков, что помогает проведение верификации диагноза.

Так как, формирование дисплазии представляет собой результат нарушения естественного баланса между процессами пролиферации и клеточной гибели (апоптоза), имеющиеся данные о изучении различных механизмов формирования устойчивости опухолевых клеток к апоптотическим факторам направлены, в конечном счете, на подавление активности этих процессов. В связи с этим актуально исследовать взаимосвязи данных показателей и параметров характерных для дисплазии 1 степени тяжести. Проведенный анализ показал сильные прямые корреляционные связи КПС с уровнем каспазы 3 ($R = 0,7123$, $p = 0,0004$) и уровнем каспазы 9 ($R = 0,7148$, $p = 0,0004$). Это объясняется тем, что изменение уровней каспазы 3 и каспазы 9 происходит под воздействием внешнего фактора, которым выступает ВПЧ [66, 97], что в свою очередь приводит к формированию преобразований в структуре клетки [66, 87, 97, 110] и, как следствие, визуализации новых элементов при кольпоскопическом исследовании.

И в нашем исследовании, именно по результатам цитологии и МБШМ при отсутствии расхождений между заключениями этих исследований пациенткам из группы I исследования было поставлен диагноз: CIN I.

Следующим этапом исследования всем пациенткам было проведено ВПЧ-типирование в режиме реального времени с оценкой вирусной нагрузки. При определении наличия ВПЧ у обследуемых из группы I было выявлено сочетание различных по онкогенности типов вируса, но у всех присутствовали высокоонкогенные типы (рисунок 3.5).

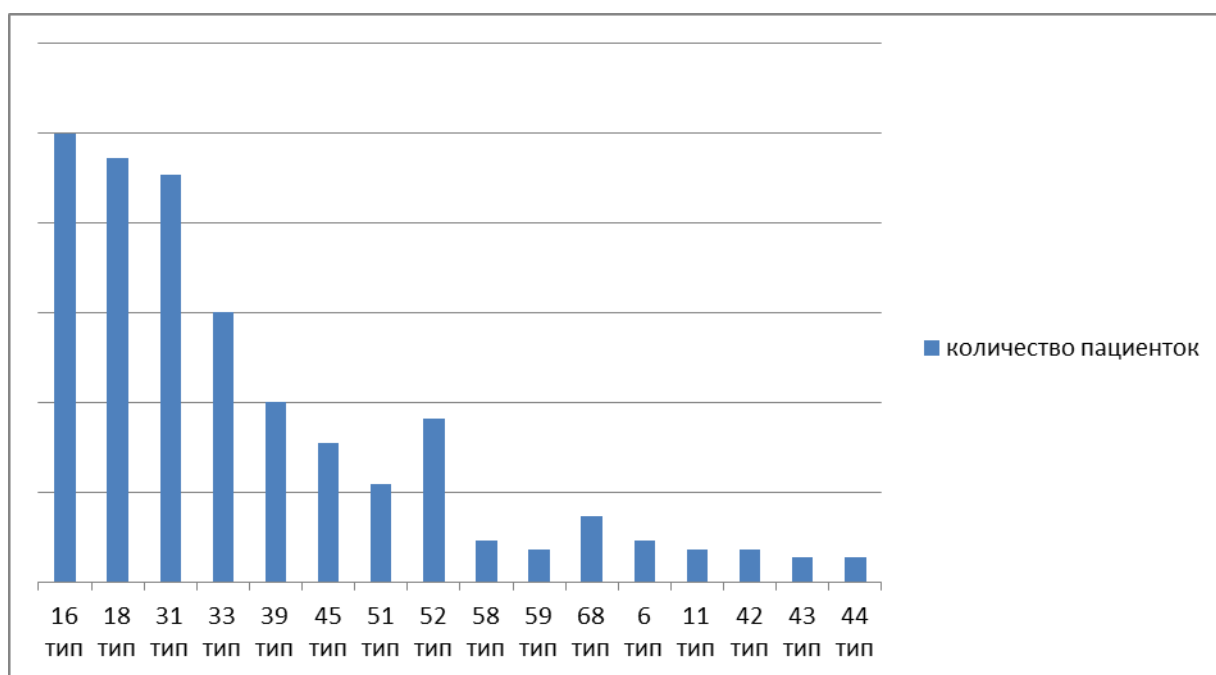


Рисунок 3.5 – Распределение пациенток по типам ВПЧ

Затем была произведена оценка вирусной нагрузки (таблица 3.13).

Таблица 3.13 – Оценка вирусной нагрузки в группе I исследования

Тип вируса	16	18	31	33	35	39	45	52
Вирусная нагрузка	3–5lg, > 5 lg	3–5lg, > 5 lg	3–lg, > 5 lg	3–5lg, > 5 lg	3–5lg, > 5 lg	3–5lg, > 5 lg	3–5lg, > 5 lg	3–5lg, > 5 lg
Группа I, %	100	95	91	67	60	40	31	36

При анализе исследуемого параметра было установлено, что у всех пациенток с CIN I были определены сочетания нескольких типов ВПЧ и клинически значимая вирусная нагрузка (3–5lg, > 5 lg). У 100 % обследованных пациенток был диагностирован 16 тип ВПЧ; 18 тип ВПЧ был определен у 95 %; 31 тип – у 91 %; 33 тип – у 67 %; 35 тип – у 60 %; 39 тип ВПЧ определен у 40 %; 52 тип – у 36 % пациенток и 45 тип был диагностирован у 31 %. Затем был произведен анализ корреляционных зависимостей (таблица 3.14).

В ходе анализа были определены прямые сильные корреляционные связи между клинически значимой вирусной нагрузкой и уровнем исследуемых каспазы 3 ($R = 0,7418$, $p = 0,0001$) и каспазы 9 ($R = 0,7113$, $p = 0,0004$).

Таблица 3.14 – Анализ зависимости исследуемых показателей с ВПЧ (3–5lg, >5lg) у пациенток с CIN I (корреляционный анализ Spearman Rank).

Показатель	Количество наблюдений	ВПЧ (3–5lg, >5lg)	
		Коэффициент корреляции R	Уровень p
Курение > 7 сигарет	55	0,4582*	0,0002
Возраст старше 30 лет	55	0,5924*	0,0004
Ранний половой дебют	55	0,6573*	0,0001
Количество половых партнеров >7	55	0,7129*	0,0003
Артифициальные аборты	55	0,2865*	0,0003
Кольпоскопия	55	0,6421*	0,0005
Онкоцитология	55	0,4912*	0,0005
Уровень caspase 3	55	0,7418*	0,0001
Уровень caspase 3	55	0,7113*	0,0001
Гистологическое заключение	55	0, 7188*	0,0001

Примечание. * – статистически значимая корреляционная зависимость ($p < 0,05$).

Установленные корреляционные связи между значениями каспазы 3 и каспазы 9 относительно ВПЧ (3–5lg, > 5 lg) связаны с тем, что вирус выступает триггером, который воздействует на течение реакций клеточного цикла [115, 121, 124, 139], что влечет за собой стимуляцию апоптотических каспаз, как финальных этапов внутреннего и внешнего путей самоуничтожения инфицированной клетки [139].

Для определения выраженности нарушения процессов апоптоза в цервикальной зоне на фоне ПВИ была проведена оценка уровня каспазы 1 (таблица 3.15). Каспаза 1 занимает ведущее место в клеточном иммунитете в качестве инициатора воспалительного ответа, так как инициирует провоспалительный ответ, активируя воспалительные цитокины интерлейкин 1 β (IL-1 β) и интерлейкин 18 (IL-18), а также процесс пироптоза, направленный на запрограммированную гибель клетки [115]. В связи с этим, воспалительный ответ увеличивает экспрессию CASP1 по принципу положительной обратной связи,

который усиливает реакцию воспаления, в связи, с чем изучение развития воспалительной реакции при персистенции ВПЧ в клетках цервикального эпителия представляется крайне интересным.

Таблица 3.15 – Уровень каспазы 1 в группе контроля и группе I

Группа исследования	Уровень caspase 1, нг/мл
Группа контроля	0,060±0,01
Группа I	0,062±0,03

Значения каспазы 1 в группе исследования I были равны 0,062±0,03нг/мл, и статистически не отличались от группы контроля, то есть находились на пределе чувствительности метода. Так как, каспаза 1 играет ведущую роль в активации воспалительного ответа, то полученные данные дают возможность сделать вывод, что у пациенток с CIN I отсутствует воспалительный компонент в формировании патологических изменений на шейке матки.

Для изучения патогенетических аспектов инвазии вируса папилломы человека в эпителиальные клетки, основным этапом работы была оценка выраженности апоптоза за счет определения уровней каспазы 3 и каспазы 9 (таблица 3.16).

Таблица 3.16 – Показатели апоптоза у пациенток с цервикальной интраэпителиальной неоплазией I степени

Показатели	Группа контроля (n = 40)	Группа I исследования (n = 55)	Уровень достоверности p
Уровень caspase 3, нг/мл	0,188±0,04	2,772±0,03	0,0001*
Уровень caspase 9, нг/мл	0,213±0,03	2,311±0,05	0,0001*

Примечание. Оценка статистической достоверности изменений активности каспазы 3 и каспазы 9 проводилась в соответствии с критериями Уилкоксона–Манна–Уитни. Символом * маркированы группы, в которых активность каспазы достоверно отличается от группы «контроля» (различия полагаются достоверными с $p < 0,05$).

В ходе проведенного исследования получены результаты показателей каспазы 9 - 2,311 ±0,05 нг/мл и каспазы 3- 2,772 ±0,03 нг/мл, которые достоверно

отличались от группы контроля ($p=0,0001$), что позволяет сделать вывод о том, что при инвазии вируса папилломы человека в клетки цервикального эпителия активируются процессы апоптоза, направленные на уничтожение пораженной клетки. В связи с тем, что апоптотические программы протекают с запуском иницирующих и эффекторных каспаз, активность которых изменяется по мере утяжеления интраэпителиального повреждения. Взаимосвязь формирования атипических поражений эпителия и усиление выработки индукторов апоптоза подтверждается корреляционным анализом, отраженным в таблице 3.17.

Таблица 3.17 – Анализ зависимости исследуемых показателей и уровня caspase 3, уровня caspase 9 у пациенток с CIN I (корреляционный анализ Spearman Rank)

Показатель	Количество наблюдений	Уровень caspase 3		Уровень caspase 9	
		Коэффициент корреляции R	Уровень p	Коэффициент корреляции R	Уровень p
Курение > 7 сигарет	55	0,6235*	0,0003	0,6623*	0,0002
Возраст старше 30 лет	55	0,6504*	0,0005	0,5732*	0,0004
Ранний половой дебют	55	0,6742*	0,0004	0,4912*	0,0001
Количество половых партнеров >7	55	0,6932*	0,0001	0,4839*	0,0004
Артифициальные аборты	55	0,6232*	0,0005	0,6846*	0,0005
Кольпоскопия	55	0,7124*	0,0004	0,7148*	0,0004
Онкоцитология	55	0,6023*	0,0004	0,6145*	0,0005
ВПЧ (3–5lg, >5lg)	55	0,7418*	0,0001	0,7113*	0,0001
Уровень caspase 3	55	1,0000	-----	0,6182*	0,0001
Уровень caspase 9	55	0,6182*	0,0001	1,0000	-----
Гистологическое заключение	55	0,7531*	0,0001	0,7127*	0,0001

Примечание. * – статистически значимая корреляционная зависимость ($p < 0,05$).

При проведении корреляционного анализа были установлены сильные

прямые связи между уровнем каспазы 3 и клинически значимой вирусной нагрузкой ($R = 0,7418$, $p = 0,0001$); уровнем каспазы 3 и гистологическим заключением ($R = 0,7531$, $p = 0,0001$); уровнем каспазы 3 и кольпоскопическим исследованием ($R = 0,7124$, $p = 0,0004$); уровнем каспазы 9 и клинически значимой вирусной нагрузкой ($R = 0,7113$, $p = 0,0001$); уровнем каспазы 9 и кольпоскопическим исследованием ($R = 0,7148$, $p = 0,0001$); уровнем каспазы 9 и гистологическим заключением ($R = 0,7127$, $p = 0,0001$).

Так как ВПЧ оказывает влияние на все процессы внутри клетки, в том числе на запрограммированную гибель – апоптоз [110, 136, 139], поэтому и значения каспазы 3 и каспазы 9 были значительно выше группы контроля. Таким образом, полученные результаты при изучении ВПЧ-ассоциированной CIN I позволяют предположить, что при встраивании РНК вируса в ДНК клетки хозяина происходит усиление апоптоза, как защитной реакции поврежденной клетки [66, 97], что дает начало ее самоуничтожению. Таким образом, при ВПЧ-ассоциированной CIN I происходит усиление апоптоза за счет непрерывной стимуляции рецепторов эпителиальных клеток, как на ее поверхности, так и в митохондриях.

3.3. Описание группы пациенток с цервикальной интраэпителиальной неоплазией II степени, ассоциированной с вирусом папилломы человека

Для проведения следующего этапа исследования по результатам гистологического заключения, полученного при проведении мультифокусной биопсии была сформирована группа пациенток с диагнозом цервикальная интраэпителиальная дисплазия 2 степени тяжести. В эту группу вошли 55 ВПЧ-положительных женщин в возрасте от 18 до 45 лет (средний возраст – $29,1 \pm 4,6$ года). При анализе возрастных параметров, женщины от 18 до 30 лет составили 33 % и от 31 года до 45 лет – 67 % (таблица 3.18).

Таблица 3.18 – Распределение пациенток по возрастным группам

Возрастная группа	Абсолютные числа	Относительные числа, %
От 18 до 30 лет	18	33
От 31 до 45 лет	37	67

Возраст пациентки является важным фактором развития дисплазии, так как по мнению многих авторов для развития более тяжелых форм интраэпителиального повреждения требуется от 5 до 30 лет, в связи с этим анализ данного показателя вошел в наше исследование.

Таблица 3.19 – Анализ зависимости исследуемых показателей и возраста у пациенток с CIN II (корреляционный анализ Spearman Rank)

Показатель	Количество наблюдений	Возраст старше 30 лет	
		Коэффициент корреляции R	Уровень p
Курение > 7 сигарет	55	0,5231*	0,0001
Ранний половой дебют	55	0,4819*	0,0001
Количество половых партнеров >7	55	0,3625*	0,00003
Артифициальные аборты	55	0,4529*	0,0004
Кольпоскопия	55	0,4531*	0,0001
Онкоцитология	55	0,5126*	0,0436
ВПЧ (3–5lg, >5lg)	55	0,7102*	0,0004
Уровень caspase 3	55	0,6862*	0,0005
Уровень caspase 9	55	0,7122*	0,0004
Гистологическое заключения	55	0,7522*	0,0005

Примечание. * – статистически значимая корреляционная зависимость ($p < 0,05$).

На данном этапе исследования были установлены прямые сильные корреляционные связи между возрастом и клинически значимой вирусной нагрузкой ($R = 0,7102$, $p = 0,0004$); гистологическим заключением ($R = 0,7522$, $p = 0,0005$); и уровнем каспазы 9 ($R = 0,7122$, $p = 0,0004$). Такие взаимодействия обусловлены тем, что, в возрасте после 30 лет спонтанная элиминация практически не возможна [114]. Как следствие постоянное присутствие триггера – ВПЧ, что провоцирует усиление апоптоза [136, 139] и

прогрессию цервикальных поражений [2, 30].

Учитывая, что курение является фактором риска развития и прогрессии ВПЧ ассоциированных дисплазий [68, 117, 130], то в наше исследование вошло изучение состава группы с учетом курения и проведение корреляционного анализа (таблица 3.20). Среди пациенток с ВПЧ-ассоциированной CIN II были 38 женщин, которые курили более семи сигарет в день, что составило 69 % от общего числа группы.

Таблица 3.20– Анализ зависимости исследуемых показателей и курения у пациенток с CIN II (корреляционный анализ Spearman Rank)

Показатель	Количество наблюдений	Курение > 7 сигарет	
		Коэффициент корреляции R	Уровень p
Возраст старше 30 лет	55	0,5231*	0,0001
Ранний половой дебют	55	0,4193*	0,0003
Количество половых партнеров >7	55	0,1827	0,1203
Артифициальные аборты	55	0,6972*	0,0005
Кольпоскопия	55	0,6134*	0,0002
Онкоцитология	55	0,4872*	0,0003
ВПЧ (3–5lg, >5lg)	55	0,6539*	0,0002
Уровень caspase 3	55	0,7104*	0,0003
Уровень caspase 9	55	0,7059*	0,0002
Гистологическое заключение	55	0,7003*	0,0002

Примечание. * – статистически значимая корреляционная зависимость ($p < 0,05$).

Были установлены сильные прямые корреляционные связи между курением и уровнем каспазы 3 ($R = 0,7104$, $p = 0,0003$); уровнем каспазы 9 ($R = 0,7059$, $p = 0,0002$); и гистологическим заключением ($R = 0,7003$, $p = 0,0002$). Такие корреляции можно попытаться объяснить тем, что выработка токсина, который формируется при курении, проходит биотрансформацию и продуцируется половыми железами, агрессивно воздействуя на эпителиальные клетки [68]. Данный токсин формирует снижение резистентности клеток к

бактериальным агентам и вирусам [117, 130], что способствует персистенции ВПЧ и прогрессии цервикальной патологии.

При анализе сексуального поведения пациенток с дисплазией умеренной степени тяжести учитывался возраст начала половой жизни и количество половых партнеров и у 36 (65 %) обследуемых было отмечено раннее начало половой жизни и средний возраст первого коитуса составил $15,8 \pm 1,7$ лет (таблица 3.21).

Таблица 3.21 – Анализ зависимости исследуемых показателей с сексуальным поведением у пациенток с CIN I (корреляционный анализ Spearman Rank)

Показатель	Количество наблюдений	Ранний половой дебют		Количество половых партнеров >7	
		Коэффициент корреляции R	Уровень p	Коэффициент корреляции R	Уровень p
Курение >7 сигарет	55	0,4193*	0,0004	0,1827	0,1203
Возраст старше 30 лет	55	0,4819	0,2659	0,3625*	0,0001
Ранний половой дебют	55	1,0000	-----	0,5741*	0,003
Количество половых партнеров >7	55	0,5741*	0,003	1,0000	-----
Артифициальные аборты	55	0,5673*	0,0005	0,6829*	0,0003
Кольпоскопия	55	0,1726	0,1291	0,7291*	0,0005
Онкоцитология	55	0,5328	0,2931	0,2837*	0,0003
ВПЧ (3–5lg, >5lg)	55	0,7101*	0,0003	0,7049*	0,0004
Уровень caspase 3	55	0,4592*	0,0003	0,7128*	0,0005
Уровень caspase 9	55	0,4829*	0,0004	0,7219*	0,0004
Гистологическое заключение	55	0,7242	0,0004	0,7379	0,0002

Примечание. * – статистически значимая корреляционная зависимость ($p < 0,05$).

При проведении статистической обработки были установлены прямые сильные корреляционные связи между ранним половым дебютом и клинически значимой вирусной нагрузкой ($R = 0,7101$, $p = 0,0003$); ранним половым дебютом

и гистологическим заключением ($R = 0,7242$, $p = 0,0004$). Такие взаимодействия обусловлены тем, что ранний половой дебют предполагает раннее инфицирование ВПЧ, что позволяет вирусу более длительный период персистировать в цервикальной зоне и, соответственно, влиять на клетки, что в свою очередь приводит к формированию цервикальной неоплазии [130].

С учетом данных о количестве половых партнеров был проведен анализ сексуального поведения. В группе пациенток с CIN II у 38 женщин (69 %) было более семи половых партнеров, что также является ведущим фактором прогрессии ВПЧ-ассоциированных неоплазий. Установлены прямые сильные корреляционные связи между количеством половых партнеров и клинически значимой вирусной нагрузкой ($R = 0,7049$, $p = 0,0004$); кольпоскопической картиной ($R = 0,7291$, $p = 0,0005$); уровнем каспазы 3 ($R = 0,7128$, $p = 0,0005$); уровнем каспазы 9 ($R = 0,7219$, $p = 0,0004$); гистологическим заключением ($R = 0,7379$, $p = 0,0002$). Количество половых партнеров более семи увеличивает риск инфицирования ВПЧ [30, 88, 130,], это связано с тем, что вероятность инфицирования ПВИ с каждым новым партнером повышается и может формироваться микс из типов ВПЧ, что более агрессивно воздействует на эпителиальные клетки и снижает возможность элиминации вируса [130], а также приводит к изменению кольпоскопической картины. Таким образом, среди пациенток группы исследования CIN II на фоне ПВИ были определены основные факторы прогрессии ВПЧ – ранний половой дебют, количество половых партнеров более семи и курение.

Учитывая, что механические повреждения шейки матки, которые возникают при абортивных исходах беременности, являются входными воротами для ВПЧ, была произведена оценка акушерского анамнеза для выявления рисков травматизации шейки матки. Таким образом, было определено, что пациентки с абортивными исходами беременностей (56 %) имели травматизм шейки матки, как фактор прогрессии цервикальных неоплазий (таблица 3.22). Но при проведении статистической обработки сильных связей с фактором травматизации

шейки матки установлено не было.

Таблица 3.22 – Анализ зависимости исследуемых показателей с искусственными абортами у пациенток с CIN II (корреляционный анализ Spearman Rank)

Показатель	Количество наблюдений	Искусственные аборты	
		Коэффициент корреляции R	Уровень р
Курение >7 сигарет	55	0,6972*	0,0005
Возраст старше 30 лет	55	0,4529*	0,0004
Ранний половой дебют	55	0,5673*	0,0005
Количество половых партнеров >7	55	0,6829*	0,0003
Кольпоскопия	55	0,6824*	0,0005
Онкоцитология	55	0,6893*	0,0005
ВПЧ (3–5lg, >5lg)	55	0,6729*	0,0003
Уровень caspase 3	55	0,5195*	0,0005
Уровень caspase 9	55	0,6744*	0,0003
Гистологическое заключение	55	0,6539*	0,0003

Примечание. * – статистически значимая корреляционная зависимость ($p < 0,05$).

В рамках скрининга для оценки состояния шейки матки всем женщинам проведено цитологическое исследование. При его проведении в данной группе были получены следующие результаты (рисунок 3.6, таблица 3.23).

Таблица 3.23 – Результаты цитологического исследования в группе II исследования

Результат	NILM	LSIL	HSIL
Абсолютные числа	-	14	41
Относительные числа, %	-	25	75

Опираясь на данные литературных источников, цитологический метод исследования обладает достоверностью около 60 % [25, 28, 59], поэтому в данной группе были получены различные результаты: 75 % (41 пациентка) было заключение HSIL и у 25 % (14 пациенток) получено заключение LSIL.

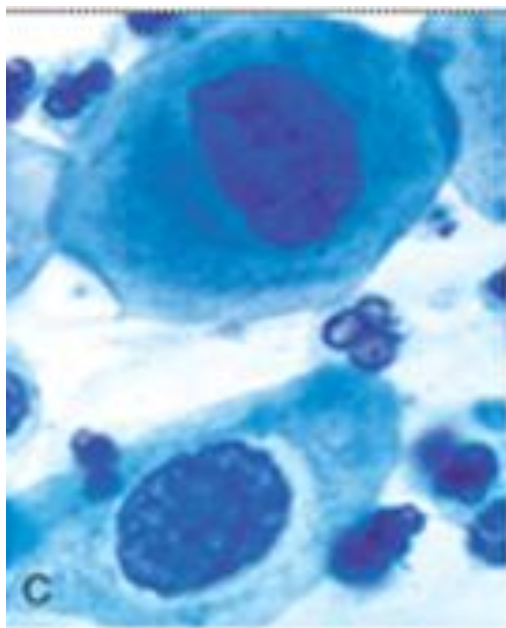


Рисунок 3.6 – H-SIL. Окрашивание по Паппаниколау, x400

Результаты исследования продемонстрировали факт того, что цитологический метод обладает низкой специфичностью и чувствительностью. При проведении корреляционного анализа между онкоцитологией и другими признаками не было установлено сильных корреляционных связей.

Это подтверждает тот факт, что скрининговые программы позволяют выявить лишь часть атипических процессов на шейке матки.

Для определения степени выраженности поражений цервикальной зоны и характера этих изменений всем пациенткам было проведено расширенное кольпоскопическое исследование (таблица 3.24).

Таблица 3.24 – Результаты кольпоскопического исследования в группе II исследования

Кольпоскопическая картина			Абсолютные числа	Относительные числа, %
Аномальная кольпоскопическая картина	Степень I (слабовыраженное поражение)	Нежная мозаика	12	22
		Нежная пунктация	14	25
		Тонкий АБЭ	9	16
	Степень II (выраженное поражение)	Грубая мозаика	29	53
		Плотный АБЭ	37	67
		Четкие границы	23	42

Наиболее часто встречалась комбинация плотного АБЭ и участков грубой мозаики – у 25 женщин (45 %), сочетание нежной пунктации и участков грубой мозаики были описаны у 16 пациенток (29 %).

По результатам расширенного кольпоскопического исследования среди пациенток с CIN II чаще диагностировались выраженные изменения (рисунок 3.7А, 3.7Б, 3.7В) и сочетание нескольких кольпоскопических признаков сразу.



Рисунок 3.7А– 3.4А – Аномальная кольпоскопическая картина. Степень II (Выраженное поражение цервикальной зоны при кольпоскопическом исследовании)



Рисунок 3.7 Б– Аномальная кольпоскопическая картина. Степень II (Выраженное поражение цервикальной зоны при кольпоскопическом исследовании)



Рисунок 3.7 В– Аномальная кольпоскопическая картина. Степень II (Выраженное поражение цервикальной зоны при кольпоскопическом исследовании)

Затем был проведен анализ зависимости исследуемых показателей и результатов кольпоскопического исследования в группе пациенток с CIN II (таблица 3.25).

Таблица 3.25 – Анализ зависимости исследуемых показателей с кольпоскопией у пациенток с CIN II (корреляционный анализ Spearman Rank)

Показатель	Количество наблюдений	Кольпоскопия	
		Коэффициент корреляции R	Уровень p
Курение >7 сигарет	55	0,6134*	0,0004
Возраст старше 30 лет	55	0,4531*	0,0006
Ранний половой дебют	55	0,1726	0,1291
Количество половых партнеров >7	55	0,4714*	0,0005
Артифициальные аборты	55	0,6824*	0,0005
Онкоцитология	55	0,5387*	0,0005
ВПЧ (3–5lg, >5lg)	55	0,6113*	0,0005
Уровень caspase 3	55	0,6146*	0,0004
Уровень caspase 9	55	0,6924*	0,0004
Гистологическое заключение	55	0,5629*	0,0001

Примечание. * – статистически значимая корреляционная зависимость ($p < 0,05$).

В связи с тем, что цитологический метод не имеет 100 % чувствительности, то кольпоскопическое исследование помогло определить участки для проведения мультифокальной биопсии шейки матки, по результатам которой был выставлен диагноз CIN II.

Во II группе пациенток было проведено ВПЧ-типирование с оценкой вирусной нагрузки, так как папилломавирусная инфекция играет ведущую роль в формировании и прогрессии неопластических процессов.

На рисунке 3.8 изображены все типы вируса папилломы человека, которые диагностированы у пациенток второй группы исследования с цервикальной интраэпителиальной неоплазией второй степени. При проведении ВПЧ-типирования в режиме «real-time» у всех пациенток с CIN II было выявлено только сочетание нескольких типов вируса, причем от трех и более.

Среди наиболее часто встречающихся типов вируса во второй группе исследования была определена клинически значимая вирусная нагрузка (3–5 lg, > 5 lg) (таблица 3.26).

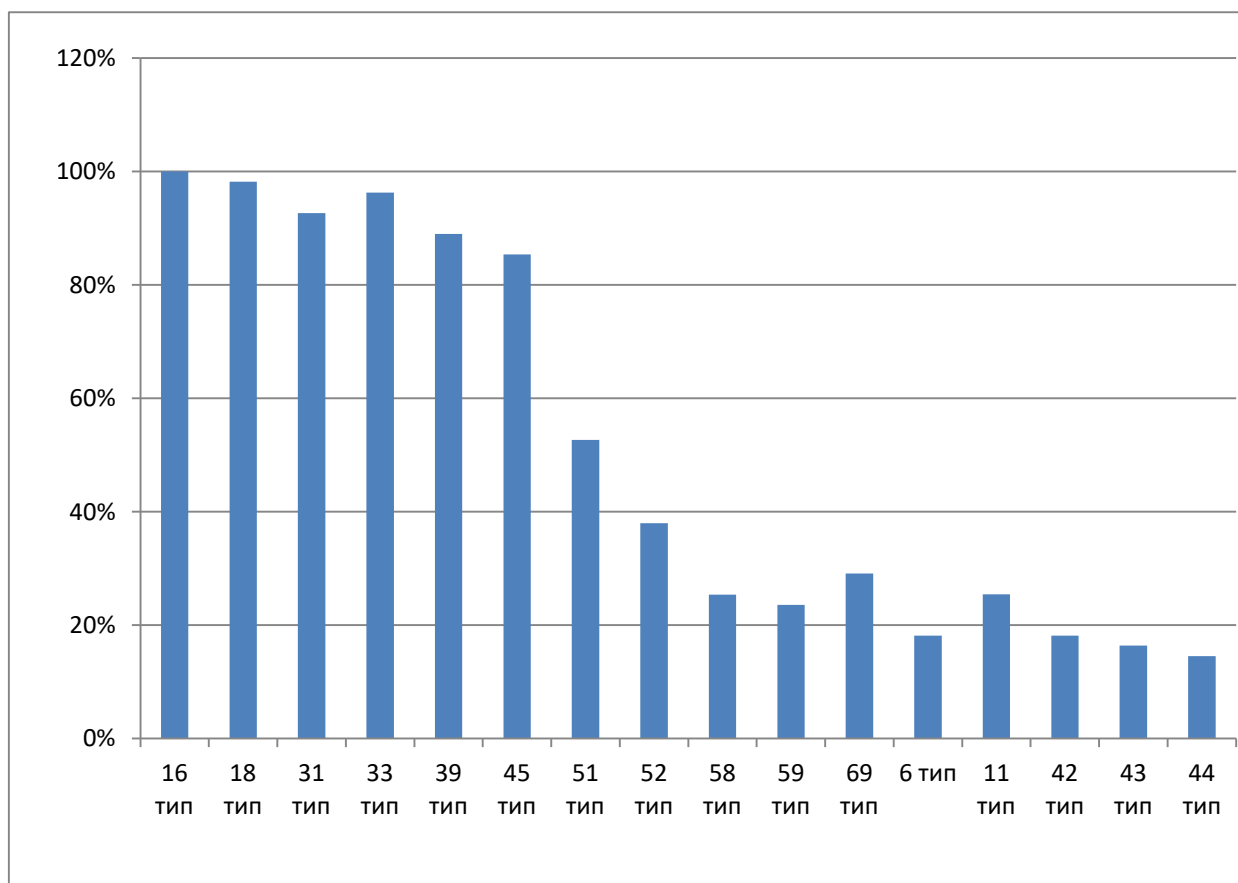


Рисунок 3.8 – Распределение типов ВПЧ в группе II исследования

Таблица 3.26 – Оценка вирусной нагрузки в группе II исследования

Тип вируса	16	18	31	33	39	45	51
Вирусная нагрузка	3–5 lg, > 5 lg	3–5 lg, > 5 lg	3–5 lg, > 5 lg	3–5 lg, > 5 lg	3–5 lg, > 5 lg	3–5 lg, > 5 lg	3–5 lg, > 5 lg
Группа II, %	100	98	93	96	89	86	53

Анализируя данные таблицы 3.26, очевидно, что типы вируса, которые были диагностированы у большинства пациенток, имели высокую вирусную нагрузку и встречались сочетано усиливая негативное влияние на клетки цервикального эпителия. На данном этапе работы были также определены корреляционные связи (таблица 3.27).

Таблица 3.27 – Анализ зависимости исследуемых показателей с ВПЧ (3–5lg, >5lg) у пациенток с CIN II (корреляционный анализ по Spearman Rank)

Показатель	Количество наблюдений	ВПЧ (3–5lg, >5lg)	
		Коэффициент корреляции R	Уровень p
Курение >7 сигарет	55	0,6539*	0,0002
Возраст старше 30 лет	55	0,7102*	0,0004
Ранний половой дебют	55	0,7101*	0,0003
Количество половых партнеров >7	55	0,7049*	0,0004
Артифициальные аборты	55	0,6729*	0,0003
Кольпоскопия	55	0,6113*	0,0005
Онкоцитология	55	0,6824*	0,0005
Уровень caspase 3	55	0,7263*	0,0001
Уровень caspase 9	55	0,7482*	0,0001
Гистологическое заключение	55	0, 7139*	0,0001

Примечание. * – статистически значимая корреляционная зависимость ($p < 0,05$).

При проведении анализа взаимосвязей исследуемых параметров установлены прямые сильные связи между клинически значимой вирусной нагрузкой и возрастом ($R = 0,7102$, $p = 0,0004$); количеством половых партнеров

($R = 0,7049$, $p = 0,0004$); ранним половым дебютом ($R = 0,7101$, $p = 0,0003$); уровнем каспазы 3 ($R = 0,7263$, $p = 0,0001$); уровнем каспазы 9 ($R = 0,7482$, $p = 0,0001$); гистологией ($R = 0,7139$, $p = 0,0001$).

Полученные корреляционные взаимодействия обусловлены тем, что формирования цервикальной интраэпителиальной неоплазии средней степени необходимы несколько факторов, например, наличие персистенции высокоонкогенных типов вируса с высокой вирусной нагрузкой, ранний половой дебют, количество половых партнеров более семи, длительная временная персистенция вируса, что в свою очередь будет приводить к изменениям апоптотической активности каспаз [110, 139, 141].

Одной из задач исследования было изучение процессов апоптоза в клетках эпителия шейки матки при умеренной дисплазии. Для решения этой задачи была произведена оценка уровня каспазы 1 (таблица 3.28).

Таблица 3.28– Изменение уровня каспазы 1 в группах исследования

Группа исследования	Уровень caspase 1, нг/мл
Группа контроля	0,060±0,01
Группа II	0,061±0,02

Среди пациенток II группы значение уровня каспазы 1 достоверно не отличалось от группы контроля (0,061±0,02 нг/мл). Что позволяет заключить, что в формировании ВПЧ-ассоциированной цервикальной неоплазии не участвует воспалительный компонент, так как изменение каспазы 1 свидетельствует о наличии активного воспалительного процесса в цервикальной зоне [110, 141].

При изучении влияния ВПЧ на процессы жизнедеятельности клетки важным этапом было исследование апоптотических процессов в эпителиальных клетках цервикальной зоны. Результаты анализа основных звеньев цепочек внутреннего и внешнего путей апоптоза за счет определения значений каспазы 3 и каспазы 9 представлены в таблице 3.29.

Таблица 3.29 – Показатели апоптоза у пациенток с цервикальной интраэпителиальной неоплазией II степени

Показатели	Группа контроля (n = 40)	Группа II исследования (n = 55)	Уровень достоверности p
Уровень caspase 3, нг/мл	0,188±0,04	3,192±0,04	0,0012*
Уровень caspase 9, нг/мл	0,213±0,03	2,713±0,05	0,0009*

Примечание. Оценка статистической достоверности изменений активности каспазы 3 и каспазы 9 проводилась в соответствии с критериями Уилкоксона–Манна–Уитни. Символом * маркированы группы, в которых активность каспазы достоверно отличается от группы «контроля» (различия полагаются достоверными с $p < 0,05$).

Таблица 3.30 – Анализ зависимости исследуемых показателей с уровнем каспазы 3 и уровнем каспазы 9 у пациенток с CIN II (корреляционный анализ по Спирмену – Spearman Rank)

Показатель	Количество наблюдений	Уровень caspase 3		Уровень caspase 9	
		Коэффициент корреляции R	Уровень p	Коэффициент корреляции R	Уровень p
Курение >7 сигарет	55	0,7104*	0,004	0,6924*	0,0001
Возраст старше 30 лет	55	0,6862*	0,0005	0,7122*	0,0004
Ранний половой дебют	55	0,4592*	0,0003	0,4829*	0,0004
Количество половых партнеров >7	55	0,7128*	0,0005	0,7219*	0,0004
Артифициальные аборты	55	0,5195*	0,0005	0,6744*	0,0003
Кольпоскопия	55	0,6146*	0,0004	0,6925*	0,0004
Онкоцитология	55	0,6785*	0,0004	0,6976*	0,0005
ВПЧ (3–5lg, >5lg)	55	0,7263*	0,0001	0,7482*	0,0001
Уровень caspase 3	55	1,00000	-----	0,7685*	0,0001
Уровень caspase 9	55	0,7685*	0,0001	1,0000	-----
Гистологическое заключение	55	0,7235*	0,0001	0,7631*	0,0001

Примечание. * – статистически значимая корреляционная зависимость ($p < 0,05$).

При анализе параметров значения каспазы 3 ($3,192 \pm 0,04$ нг/мл) и каспазы 9 ($2,713 \pm 0,05$ нг/мл) достоверно отличались от группы контроля ($p=0,0012$; $p=0,0009$).

Так же были установлены прямые сильные корреляционные связи между уровнем каспазы 3 и количеством половых партнеров больше семи ($R = 0,7128$, $p = 0,0005$); курением ($R = 0,7104$, $p = 0,0003$); клинически значимой вирусной нагрузкой ($R = 0,7263$, $p = 0,0003$); уровнем каспазы 9 ($R = 0,7685$, $p = 0,0001$); и гистологическим заключением ($R = 0,7235$, $p = 0,0001$). При исследовании взаимодействий показателя каспазы 9 установлено сильная связь с возрастом ($R = 0,7122$, $p = 0,0004$); количеством половых партнеров больше семи ($R = 0,7219$, $p = 0,0004$); клинически значимой вирусной нагрузкой ($R = 0,7482$, $p = 0,0001$); и гистологическим заключением ($R = 0,7631$, $p = 0,0001$) (таблица 3.30).

Определенные связи позволяют говорить о влиянии вируса папилломы на эпителий шейки матки, которое напрямую связано с концентрацией вируса и проявляется повышением показателей апоптотических маркеров, которые отвечают за запрограммированную гибель клетки. В результате запуска каспазного каскада происходит уничтожение инфицированных клеток и организм создает условия для того что бы не дать возможность инфицированным клеткам делиться и занимать все больший пласт эпителия. Изменения значений каспазы 3 и каспазы 9 говорят о влиянии ВПЧ на эпителиальные клетки за счет нарушения апоптотической программы, а именно ее усиления, такой факт позволяет сделать вывод о становлении апоптоз-резистентного фенотипа в клетках цервикальной зоны.

3.4. Автоматизированная система обследования и лечения женщин с ВПЧ – ассоциированными дисплазиями 1 и 2 степени тяжести.

Полученные в ходе исследования данные пациенток легли в основу формирования компьютерной программы для обследования и лечения женщин с ВПЧ – ассоциированными дисплазиями 1 и 2 степени тяжести (Свидетельство о

государственной регистрации программы для ЭВМ, регистрационный № 2020613770 от 23.03.2020 «Автоматизированная система обследования и лечения женщин с патологией шейки матки, ассоциированной с вирусом папилломы человека»).

Данное программное обеспечение является компьютерным анализатором. В автоматическом режиме происходит ввод параметров и предлагается алгоритм ведения пациенток фертильного возраста с ВПЧ-ассоциированными дисплазиями легкой и умеренной степени тяжести (рисунок 3.9).

Анализ совокупных показателей производится в автоматическом режиме, после чего на экране появляются рекомендации. Пациенткам с высоким риском развития тяжелых поражений цервикальной зоны рекомендуется пройти предложенную терапию, которая включает применение противовирусного препарата.

Фамилия	Имя	Отчество	Возраст до 30	Количество абортов менее 3	Курение
Ключикова	Анна	Николаевна	☒	☒	☒
Васина	Вера	Васильевна	☐	☒	☐
Курагина	Зоя	Степановна	☐	☒	☒
Семечкина	Надежда	Петровна	☒	☐	☐
Соломатина	Елена	Владимировна	☐	☒	☐
Зотова	Алла	Ивановна	☒	☒	☐
Белусова	Снежана	Олеговна	☐	☒	☒
Шилина	Галина	Андреевна	☐	☐	☐
Рогова	Ева	Александровна	☒	☐	☒
Иванова	Светлана	Андреевна	☐	☒	☐
Саликова	Марина	Викторовна	☒	☒	☒
Носова	Мария	Сергеевна	☐	☐	☐
Краснова	Вера	Алексеевна	☐	☒	☒
Колосова	Татьяна	Владимировна	☒	☐	☒
Митрофанова	Ирина	Георгиевна	☒	☐	☐
Корова	Олеся	Геннадьевна	☒	☒	☒
Малюкина	Елена	Викторовна	☐	☐	☐
Себерасова	Ольга	Сергеевна	☒	☐	☐
Вершинина	Наталья	Кирилловна	☐	☒	☐
Сеняна	Валентина	Петровна	☒	☒	☐
Кранина	Варвара	Леонидовна	☒	☒	☐
Авдонина	Анна	Сергеевна	☐	☒	☐
Кошкина	Елизавета	Романовна	☒	☐	☒
Анкина	Марина	Александровна	☐	☒	☐
Павина	Надежда	Константиновна	☐	☐	☒
Сомкина	Мая	Рудольфовна	☒	☐	☒

Рисунок 3.9 – Главное окно программы «Автоматизированная система обследования и лечения женщин с патологией шейки матки, ассоциированной с вирусом папилломы человека».

Программа представляет собой четырехступенчатый подход к ведению ВПЧ-положительных пациенток фертильного возраста с патологиями шейки матки. Обследование предполагает следующие этапы: сбор анамнестических данных и выявление факторов прогрессии ПВЧ (с сильными корреляционными взаимодействиями), а также два диагностических этапа, которые включают показатели с сильными корреляционными связями: расширенную кольпоскопию,

ПЦР-диагностику ВПЧ-типирования в режиме «реального времени» и определение уровня каспаз (рисунки 3.10, 3.11).

АИС обследования и лечения женщин с патологией шейки матки, инфицированных вирусом папилломы человека

Обследование **Кольпоскопические признаки**

Цвет

- ☒ Слабое, неполное побеление, прозрачная или полупрозрачная поверхность при воздействии уксусной кислотой. Ацетобелое окрашивание за пределами зоны трансформации. В пределах зоны трансформации – белоснежная окраска с блестящим отливом (редко)
- ☐ Промежуточный оттенок – светлосерое окрашивание и блестящая поверхность (большинство повреждений)
- ☐ Тусклая, непрозрачная, мутно-белая поверхность; серое

Состояние краев повреждения и форма поверхности

- ☒ Микрокондиломатозные или микропапиллярные образования. Плоские образования с нечеткими краями. Перистые или фесточатые края. Угловатые, зубчатые образования. Сопутствующие образования за пределами зоны трансформации
- ☐ Правильной формы, симметричные образования с гладкими, ровными контурами
- ☐ Закрученные, отслоенные края. Внутренняя демаркация между участками с разными кольпоскопическим и явлениями – с серьезными изменениями в центре и более слабыми по периферии

Сосуды

- ☒ Тонкие сосуды одного калибра, расположенные на одинаковом близком расстоянии друг от друга. Слабо выраженная нежная пунктация и/или мозаика. Сосуды видны за пределами зоны трансформации. Тонкие сосуды внутри микрокондилом или микропапиллярных образований
- ☐ Отсутствие сосудов
- ☐ Ярко выраженная грубая пунктация или мозаика, четко ограниченная, широко и неравномерно разбросанная

Окрашивание йодом

- ☒ Положительная реакция – бурокоричневое окрашивание. Отрицательная реакция – желтым цветом окрашиваются мелкие. Частичная реакция – неоднородные. Большие йоднегативные участки – желтым цветом окрашиваются образования, оцененные в 3 и менее баллов по предыдущим критериям.
- ☐ Йоднегативные участки за пределами зоны трансформации (часто вследствие паракератоза)
- ☐ Пестрое окрашивание повреждения, уже оцененные в 4 и более бала по предыдущим критериям

[Рассчитать индекс Рейда](#)

Клинико-кольпоскопический индекс Рейда (баллы): 0

[Далее](#)

Рисунок 3.10 – Окно «Обследование-Кольпоскопические признаки» программы ««Автоматизированная система обследования и лечения женщин с патологией шейки матки, ассоциированной с вирусом папилломы человека»».

АИС обследования и лечения женщин с патологией шейки матки, инфицированных вирусом папилломы человека

Обследование **Уровень каспаз**

Каспаза 3

- ☒ 0,061-0,848
- ☐ 0,892-1,753
- ☐ 1,884-2,64
- ☐ 2,73-3,249

Каспаза 9

- ☒ 0,104-0,521
- ☐ 0,598-1,894
- ☐ 1,912-2,701
- ☐ 2,786-3,004

[Далее](#)

Рисунок 3.11 – Окно «Обследование-Уровень каспаз» программы ««Автоматизированная система обследования и лечения женщин с патологией шейки матки, ассоциированной с вирусом папилломы человека»».

Система внедрена в работу Женских консультаций ГБУЗ «Пензенский городской родильный дом», гинекологических отделений КДЦ «Медиклиник» и ООО «ИНМЕД» г. Пензы. Внедрение автоматизированной системы ведения женщин с ВПЧ-ассоциированными дисплазией 1 и 2 степени тяжести дает возможность оптимизировать подходы ведения данных групп пациенток.

3.5. Разработка дополнительных критериев оценки степени поражения эпителия шейки матки при персистенции вируса папилломы человека

В ходе проведенного исследования было установлено, что значения каспазы 3 и каспазы 9 в группах исследования среди ВПЧ-положительных пациенток достоверно отличались от полученных значений группы контроля. Таким образом, было оценено состояние апоптотического процесса путем определения значений маркеров у пациенток с гистологическими подтвержденными цервикальными интраэпителиальными поражениями. Результаты оценки представлены в таблице 3.31.

Таблица 3.31 – Показатели апоптоза у ВПЧ-положительных пациенток с заболеваниями шейки матки

Показатели	Группа контроля	Пациенты с ВПЧ		Уровень достоверности		
		Группа I	Группа II	p1	p2	p3
Уровень каспазы 3, нг/мл	0,188±0,04	2,772±0,03	3,192±0,04	0,0002*	0,0001*	0,00012*
Уровень каспазы 9, нг/мл	0,213±0,03	2,311±0,05	2,713±0,05	0,00001*	0,0001*	0,0009*

Примечание. * – статистически значимое различие при сравнении групп (Тест Mann-Whitney, $p > 0,05$); p1 – уровень достоверности различия между группой I исследования и группой II исследования; p2 – уровень достоверности различия между группой I исследования и группой контроля; p3 – уровень достоверности различия между группой II исследования и группой контроля.

На основании полученных значений для каждого образца в группах исследования был произведен расчет вероятности развития цервикальных

интраэпителиальных поражений шейки матки. Для решения этой задачи была определена точка cut-off (критическое значение вероятности), в связи с чем был произведен ROC-анализ. Таким образом, на следующем этапе работы проведен ROC-анализ по показателям: каспаза 3 и каспаза 9. Сначала произведен анализ по показателю каспазы 3 между группами I и II исследования (рисунок 3.12).

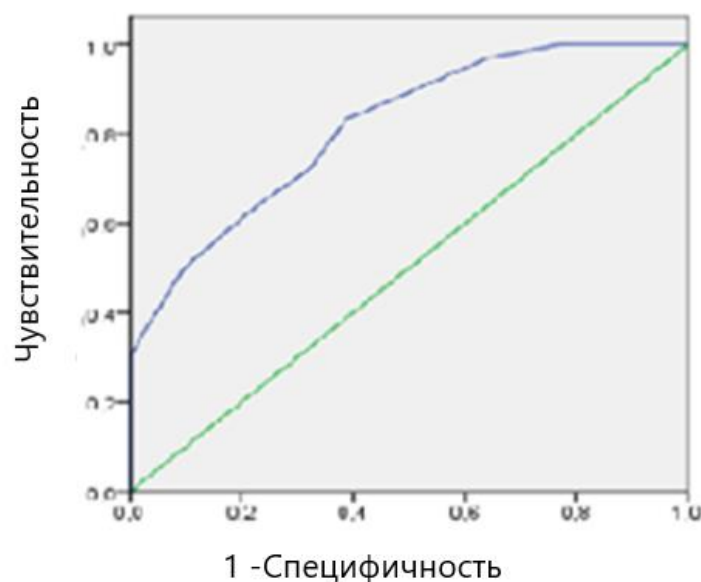


Рисунок 3.12 – ROC-кривая для показателя каспаза 3
в группах I и II исследования

Как видно из параметров, представленных на рисунке 3.12, площадь под кривой для уровня показателя каспаза 3 среди пациенток из групп I и II исследования равна $0,827 \pm 0,147$, $p < 0,001$, что достоверно отличается от 0,5 (таблица 3.32).

Таблица 3.32 – Площадь под ROC-кривыми для параметра каспаза 3

Группы	Caspase 3		
	Площадь	Стандартная ошибка	Уровень
Группы I и II	0,827	0,050	0,001

Таким образом, площадь под ROC-кривой составила $AUC = 0,827$ и $AUC = 0,928$, что позволило оценить модель как отличную.

Следующим этапом работы стал ROC-анализ по показателю каспазы 9 среди пациенток групп I и II исследования (рисунок 3.12).

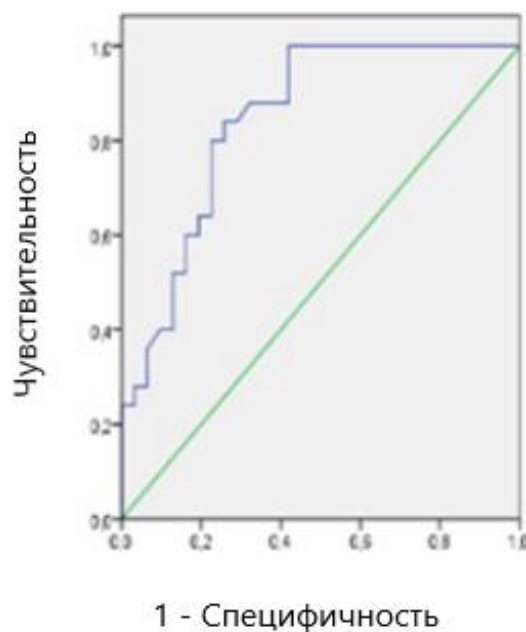


Рисунок 3.13 – ROC-кривая для показателя каспаза 9
в группах I и II исследования

Как представлено на рисунке 3.13, площадь под кривой для уровня показателя каспазы 9 среди пациенток из групп I и II исследования составила $0,832 \pm 0,127$, $p < 0,001$.

В таблице 3.33 приведены данные о площади под ROC-кривыми для параметра каспаза 9.

Таблица 3.33 – Площадь под ROC-кривыми для параметра каспаза 9

Группы	Caspase 9		
	Площадь	Стандартная ошибка	Уровень
Группы I и II	0,832	0,043	0,001

Таким образом, площадь под ROC-кривой составила $AUC = 0,832$ и $AUC = 0,971$, что позволило оценить модель как отличную. Это свидетельствует о высокоточной классификации по уровню показателя каспаза 9 между пациентками с CIN I и CIN II.

Таким образом, проведенный анализ позволил выявить пороговые значения переменных предикторов для определения апоптотической активности:

Между цервикальной интраэпителиальной неоплазией I степени и здоровыми женщинами:

- значения каспазы 3 $\geq 1,71$ нг/мл характерны для пациенток с цервикальной интраэпителиальной неоплазией I степени (чувствительность 97,1 % и специфичность 98,6%);

- значения каспазы 9 $\geq 1,93$ нг/мл характерны для пациенток с цервикальной интраэпителиальной неоплазией I степени (чувствительность 96,9 % и специфичность 99,7%);

Между цервикальной интраэпителиальной неоплазией I степени и цервикальной интраэпителиальной неоплазией II степени:

- значения каспазы 3 $\geq 2,90$ нг/мл характерны для пациенток с цервикальной интраэпителиальной неоплазией II степени (чувствительность 99,8 % и специфичность 97,6%);

- значения каспазы 9 $\geq 2,71$ нг/мл характерны для пациенток с цервикальной интраэпителиальной неоплазией II степени (чувствительность 98,5 % и специфичность 99,3%);

Доверительный интервал характерный для параметров CIN II был ограничен:

- значением каспазы 3 $\leq 3,35$ нг/мл характерным для пациенток с цервикальной интраэпителиальной неоплазией II степени (чувствительность 96,8 % и специфичность 97,1%);

- значением каспазы 9 $\leq 3,01$ нг/мл характерным для пациенток с цервикальной интраэпителиальной неоплазией II степени (чувствительность 99,3 % и специфичность 98,5%);

В таблице 3.34 представлены интервалы распределения параметров по группам исследования:

Таблица 3.34 – Пороговые значения переменных предиктов

Патология шейки матки	Caspase 3	Caspase 9
CIN I	1,71–2,89 нг/мл	1,93–2,70 нг/мл
CIN II	2,90–3,35 нг/мл	2,71–3,01 нг/мл

Следовательно, учитывая данные ROC-анализа, можно определить степень риска развития и прогрессии тяжести поражения шейки матки, используя такие маркеры апоптоза, как каспаза 3 и каспаза 9.

Выявленные критерии дифференциальной диагностики цервикальных поражений позволит оптимизировать определение патологии шейки матки на фоне ВПЧ и сделать это не инвазивным методом, с наименьшими материальными и временными затратами.

Г Л А В А 4

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ПОДХОДОВ ВЕДЕНИЯ ПАЦИЕНТОК С CIN I И CIN II, АССОЦИИРОВАННЫМИ С ВИРУСОМ ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА

4.1. Сравнительная оценка эффективности терапии пациенток группы с цервикальными интраэпителиальными неоплазиями I степени, ассоциированными с вирусом папилломы человека

За последние пять лет отмечается стремительный рост ВПЧ-ассоциированных патологий шейки матки. Как известно, при персистенции вируса в течение трех лет у трети женщин могут развиваться интраэпителиальные неоплазии, которые в свою очередь способствуют формированию РШМ. Поэтому максимально ранняя терапия данных патологий является на сегодняшний день острым вопросом гинекологии. Согласно клиническим рекомендациям, пациенткам с CIN I «предпочтительна выжидательная тактика», однако при наличии ПВЧ возможно и «...лечение... продуктивного компонента ВПЧ-инфекции... эффективность его исследуется по ...изменениям вирусной нагрузки...». На основании этого пациентки внутри группы I исследования случайным образом были разделены на две подгруппы: Ia – в количестве 27 человек – находилась под динамическим наблюдением, а Ib включала 28 человек, которые находились так же под наблюдением и получали терапию препаратом, разрешенным для лечения папилломавирусной инфекции (Аллоферон). Согласно дизайну исследования, в подгруппах в динамике через 3 и 6 месяцев производились расширенное кольпоскопическое и цитологическое исследования и определение уровней каспазы 3 и каспазы 9. Так как, одним из ведущих факторов формирования CIN является наличие ВПЧ, всем пациенткам, включенным в исследование, в динамике проводилось ВПЧ-типирование с определением вирусной нагрузки.

Критериями излеченности считались нормализация кольпоскопической картины и снижение вирусной нагрузки ниже 3 lg или отрицательные показатели выявления ВПЧ (рисунок 4.1).

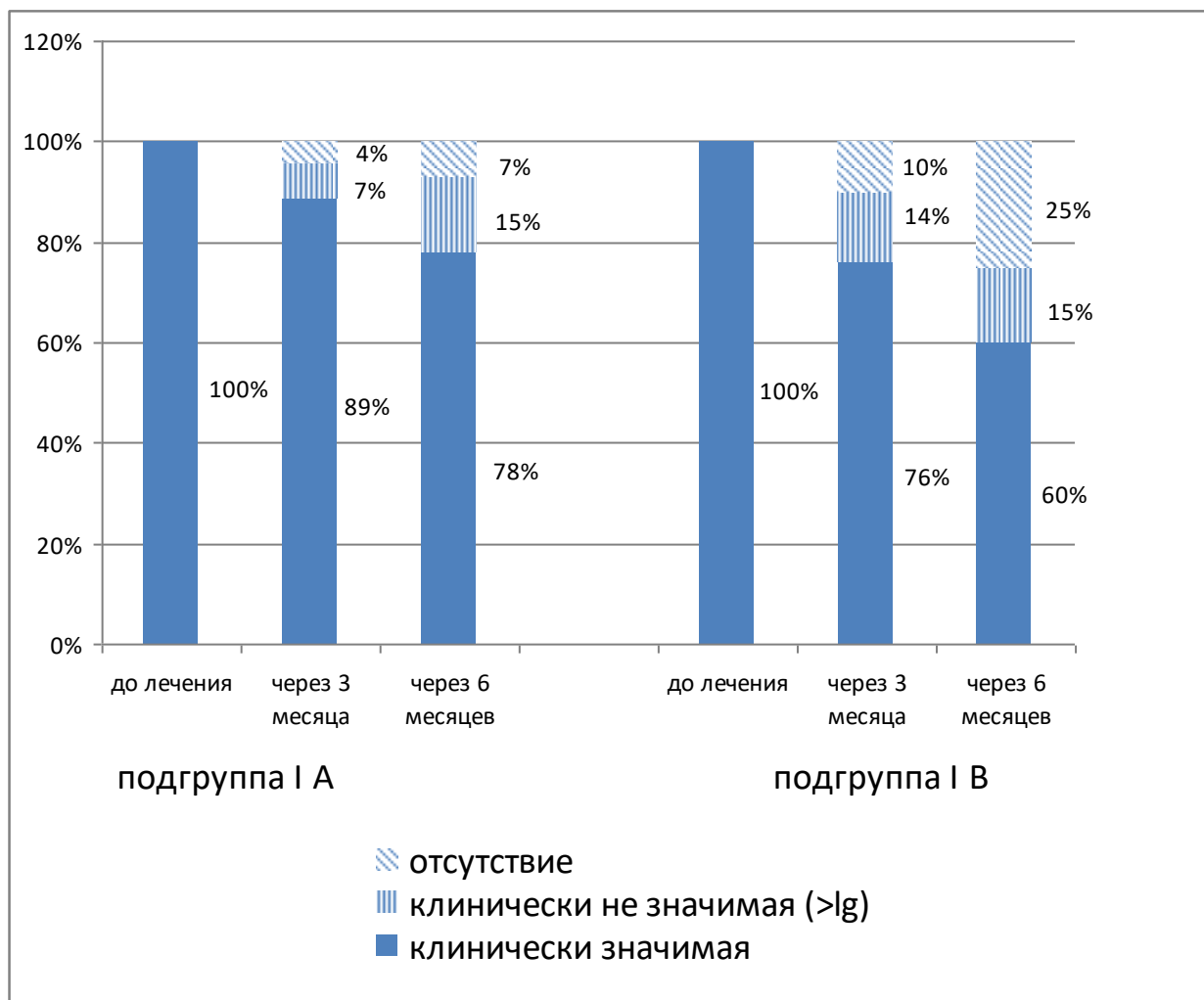


Рисунок 4.1 – Суммарная излеченность в подгруппах Ia и Ib

Среди пациенток подгруппы Ia через 3 месяца отмечена излеченность у 11 %, а в подгруппе Ib – у 24 %. При анализе результатов в подгруппах через 6 месяцев получены следующие результаты: в Ia – у 22 % пациенток значения вирусной нагрузки были ниже 3lg, а в подгруппе Ib – у 40 %. Более подробная интерпретация результатов представлена в таблицах 4.1, 4.2.

Таблица 4.1 – Динамика изменения ВПЧ внутри подгрупп Ia и Ib

Подгруппа	Ia		Ib	
Временной промежуток	3 месяца	6 месяцев	3 месяца	6 месяцев
> 5 lg	74 %	70 %	57 %	53 %
3–5 lg	15 %	8 %	19 %	7 %
< 3 lg	7 %	15 %	14 %	15 %
Не выявлен	4 %	7 %	10 %	25 %

Таблица 4.2 – Сравнение подгрупп внутри группы I

Параметры	CIN I подгруппа 1a (n = 27)	CIN I подгруппа 1b (n = 28)
	p	p
Вирусная нагрузка Ig ВПЧ на 10^5 копии до лечения	0,6538	0,5288
Вирусная нагрузка Ig ВПЧ на 10^5 копии через 3 месяца	0,0021*	0,0018*
Вирусная нагрузка Ig ВПЧ на 10^5 копии через 6 месяцев	0,0009*	0,0011*

Примечание. * – достоверное различие между подгруппами (тест Манна–Уитни, $p < 0,05$).

При анализе полученных результатов отмечена достоверная разница между подгруппами через 3 и 6 месяцев. Через 3 месяца с момента первичного обследования в подгруппе Ia вирусная нагрузка ниже клинически значимых величин диагностирована у 7 % пациенток, а у 4 % вирус не определился, т.е. суммарная излеченность составила 11 %. Среди пациенток подгруппы Ib, через такой же временной промежуток, у 14 % обследуемых было выявлено снижение вирусной нагрузки ниже клинически значимых показателей, а у 10 % пациенток ВПЧ-скрининг был отрицательный, таким образом, суммарная излеченность в данной подгруппе была 24 %. Оценивая через 6 месяцев аналогичные показатели, были получены следующие результаты: среди пациенток в подгруппе Ia снижение

вирусной нагрузки ниже клинически значимых значений зафиксировано у 15 % пациенток, а отсутствие вируса – у 7 %, т.е. суммарная излеченность составила 22 %. В то время как в подгруппе IIб вирусная нагрузка снизилась у 15 % пациенток, а у 25 % обследуемых вирус не определился вовсе, таким образом, суммарная излеченность в подгруппе составила 40 %.

В ходе наблюдения прослеживалась тенденция к снижению ВПЧ-положительных результатов среди пациенток двух подгрупп, однако наиболее выраженное снижение происходило в подгруппе с терапевтическим лечением – IIб. Это связано с тем, что вирус, проникая в эпителиоциты базального слоя и находясь в эписомальной форме, остается не опознанным иммунной системой организма хозяина. Это в свою очередь может способствовать пролиферации и интеграции вируса в здоровые клетки с последующим прогрессированием патологического процесса. Однако применение противовирусного препарата (гистидил-глицил-валил-серил-глицил-гистидил-глицил-глутаминил-гистидил-глицил-валил-гистидил-глицин) сопровождается эффективным синтезом эндогенных интерферонов и активатором системы естественных киллеров, что способствовало стимуляции распознавания и лизиса дефектных клеток цитотоксическими лимфоцитами за счет повышения доступности пораженных вирусом клеток.

Во всех подгруппах исследования проводился динамический контроль, путем проведения рассматриваемых методов диагностики, одним из которых был цитологический скрининг (таблица 4.3).

В подгруппе пациенток, принимавших препарат, у 22 женщин (79 %) цитологическая картина соответствовала заключению NILM. В то время как в группе динамического наблюдения таких пациенток было 52 %, но следует отметить, что в данной группе у 7 % пациенток так же диагностировано HSIL, чего не было в подгруппе IIб.

Таблица 4.3 – Результаты динамического цитологического исследования в подгруппах Ia и Ib

Группа исследования	Подгруппа Ia		Подгруппа Ib		Уровень достоверности	
	3 месяца	6 месяцев	3 месяца	6 месяцев	p1	p2
NILM	16 (59 %)	14 (52%)	21 (75 %)	22 (79 %)	0,0032*	0,0041*
LSIL	9 (33 %)	11 (41 %)	7 (25 %)	6 (21 %)	0,0025*	0,0005*
Кератоз	1 (4 %)	–	–	–	0,0001*	-
HSIL	1 (4 %)	2 (7 %)	–	–	0,0001*	0,0001*

Примечание. Оценка статистической достоверности изменений результатов онкоцитологии проводилась в соответствии с критериями Уилкоксона–Манна–Уитни. Символом * маркированы значения, которые имеют статистически значимое различие ($p < 0,05$); p1 – достоверность различий подгрупп «Ia» и «Ib» через 3 месяца (различия полагаются достоверными с $p < 0,005$); p2 – достоверность различий подгрупп «Ia» и «Ib» через 6 месяцев (различия полагаются достоверными с $p < 0,005$).

Опираясь на критерии оценки достоверности сравниваемых параметров все они, в соответствии с критериями Уилкоксона–Манна–Уитни, имели статистически значимое различие.

Для полноценного анализа состояния цервикальной зоны среди пациенток подгрупп Ia и Ib проводилась расширенная кольпоскопия так же, через 3 и 6 месяцев. Несмотря на то, что интерпретация результатов кольпоскопии является субъективной оценкой, была зафиксирована положительная динамика в обеих исследуемых подгруппах и получены следующие результаты (таблица 4.4).

Таблица 4.4 – Кольпоскопическая картина в динамике в подгруппах Ia и Ib

Название подгруппы	Подгруппа Ia		Подгруппа Ib		Уровень достоверности	
Временной промежуток	3 месяца	6 месяцев	3 месяца	6 месяцев	p1	p2
Нормальная кольпоскопическая картина	7 (26 %)	11 (41 %)	7 (27 %)	13 (50 %)	0,0004*	0,0003*
Аномальная кольпоскопическая картина (слабовыраженное поражение)						
Нежная мозаика	5 (19 %)	3 (11 %)	7 (27 %)	3 (12 %)	0,0002*	0,00021*
Нежная пунктация	4 (15 %)	3 (11 %)	5 (19 %)	5 (19 %)	0,00017*	0,00026*
Сочетание мозаики и пунктации	5 (19 %)	6 (22 %)	7 (27 %)	4 (15 %)	0,0037*	0,0048*
Аномальная кольпоскопическая картина (выраженное поражение)						
Грубая мозаика	3 (11 %)	2 (7 %)	–	–	0,0042*	0,0023*
Плотный АБЭ	3 (11 %)	2 (8 %)	–	–	0,00029*	0,0004*

Примечание. Оценка статистической достоверности изменений результатов кольпоскопического исследования проводилась в соответствии с критериями Уилкоксона–Манна–Уитни. Символом * маркированы значения, которые имеют статистически значимое различие ($p < 0,05$); p1 – достоверность различий подгрупп «Ia» и «Ib» через 3 месяца (различия полагаются достоверными с $p < 0,005$); p2 – достоверность различий подгрупп «Ia» и «Ib» через 6 месяцев (различия полагаются достоверными с $p < 0,005$).

Таким образом, анализируя изменения кольпоскопической картины среди пациенток данных подгрупп, можно отметить положительную динамику, так как имело место появление нормальной кольпоскопической картины в каждой подгруппе. Однако наибольшее число пациенток с нормальной кольпоскопической картиной определено в подгруппе Ib (50 %), причем разница в подгруппах так же была достоверной по всем диагностированным кольпоскопическим признакам. Это объясняется тем, что канцерогенное влияние вируса наиболее часто происходит на незрелые клетки эпителия, которые располагаются в зоне трансформации, но при мультифокусной биопсии шейки

матки наиболее подозрительные участки были удалены, а в подгруппе с индексом «б» впоследствии использовался противовирусный препарат, который способствовал многофакторному устранению [23, 38, 39] возможного атипического влияния вируса на клетки переходной зоны и зоны крипт.

Согласно дизайну исследования для наиболее полной оценки состояния цервикальной зоны была произведена оценка апоптотических изменений при внедрении ВПЧ в геном клетки при CIN I. Учитывая то, что основным условием для прогрессии неоплазии является персистенция ВПЧ, механизм осуществления этой программы зависит от состояния эпителиоцитов и иммунного ответа организма. В развитии иммунного ответа цервикальной зоны ведущую роль играет процесс апоптоза, основными звеньями которого являются каспазы. Для оценки выраженности апоптотических изменений через 3 и 6 месяцев были оценены показатели каспазы 3 и каспазы 9 (таблица 4.5).

Таблица 4.5 – Изменения уровня каспазы 3 и уровня каспазы 9 в подгруппах

Под-группа	Группа контроля (n = 40)	До лечения	Через 3 месяца		Через 6 месяцев		Уровень достоверности			
			Ia (n = 27)	Iб (n = 28)	Ia (n = 27)	Iб (n = 28)	p1	p2	p3	p4
Caspase 3 (нг/мл)	0,188 ±0,04	2,772 ±0,03*	2,164 ±0,05* p1, p3	1,613 ±0,04* p4	1,914 ±0,05* p2, p3	1,391 ±0,04* p4	0,0308*	0,0029*	0,001*	0,002*
Caspase 9 (нг/мл)	0,213 ±0,03	2,311 ±0,05*	1,904 ±0,05* p1, p3	1,474 ±0,05* p4	1,673 ±0,05* p2, p3	1,029 ±0,05* p4	0,0028*	0,001*	0,003*	0,001*

Примечание. Оценка статистической достоверности изменений активности каспазы 3 и каспазы 9 проводилась в соответствии с критериями Уилкоксона–Манна–Уитни. Символом * маркированы значения, которые имеют достоверное различие с группой контроля (тест Манна–Уитни, $p < 0,05$); p1 – достоверность различий подгруппы «Ia» с подгруппой «Iб» через 3 месяца (различия полагаются достоверными с $p < 0,05$); p2 – достоверность различий подгруппы «Ia» с подгруппой «Iб» через 6 месяцев (различия полагаются достоверными с $p < 0,05$); p3 – достоверность различий подгруппы «Ia» с показателями до лечения (различия

полагаются достоверными с $p < 0,05$); p_4 – достоверность различий подгруппы «Iб» с показателями до лечения (различия полагаются достоверными с $p < 0,05$).

Интерпретируя результаты значений уровнями каспазы 3 и каспазы 9 в подгруппах через 3 и 6 месяцев, было установлено, что все показатели достоверно отличались между подгруппами и относительно значений до лечения ($p < 0,05$).

В подгруппе Ia показатели каспазы 3 до лечения составили $2,772 \pm 0,03$ нг/мл, через 3 месяца $-2,164 \pm 0,05$ нг/мл, а через 6 месяцев – $1,914 \pm 0,05$ нг/мл, а среди пациенток в подгруппе Ib значения через 3 месяца были $1,613 \pm 0,04$ нг/мл и через 6 месяцев – $1,391 \pm 0,04$ нг/мл.

Значения каспазы 9 до лечения в группе I были равны $2,311 \pm 0,05$ нг/мл, в подгруппе Ia через 3 месяца $1,904 \pm 0,05$ нг/мл ($p=0,0028$) и $1,673 \pm 0,05$ ($p=0,001$) – через 6 месяцев. Значения каспазы 9 в подгруппе Ib через 3 месяца – $1,474 \pm 0,05$ нг/мл и через 6 месяцев – $1,029 \pm 0,05$ нг/мл. Значения также достоверно отличались друг от друга ($p < 0,05$).

Стоит отметить, что значения каспазы 3 и каспазы 9 в подгруппе Ib были ниже значений за аналогичный период в подгруппе Ia.

Так как, некоторые авторы полагают, что цервикальная неоплазия легкой степени косвенно указывает на активность иммунной системы [37, 39, 99] то, возможно, установленный уровень каспаз является достаточным для лизиса атипических клеток. Однако под воздействием противовирусного лечения процесс лизиса клеток многослойного плоского эпителия, пораженных вирусом протекает интенсивнее, о чем свидетельствовало более динамичное достоверное снижение уровней каспазы 3 и каспазы 9.

4.2. Сравнительная оценка эффективности терапии пациенток с цервикальной интраэпителиальной неоплазией II степени, ассоциированной с вирусом папилломы человека

Как упоминалось ранее, персистенция вируса папилломы человека приводит к трансформационным изменениям в цервикальной зоне, что влечет за

собой формирование цервикальной интраэпителиальной неоплазии, прогрессия которой в инвазивный рак может происходить в течение пяти лет и более [2, 8, 17, 30].

Согласно клиническим рекомендациям по ведению пациенток с патологиями шейки матки, при постановке диагноза N87.1 умеренная дисплазия обязательным является хирургический этап лечения. Согласно клиническим рекомендациям при подтверждении в биоптате CIN II и с зоной трансформацией 1 типа проводилась LEEP-конизация с глубиной иссечения не менее 7 мм, а при зоне трансформации 2 типа глубина иссечения увеличивалась до 10 мм. После чего, согласно дизайну исследования все пациентки случайным образом внутри группы II были разделены на подгруппы: подгруппа IIa – в количестве 28 человек, которые после хирургического этапа лечения находились под динамическим наблюдением согласно клиническим рекомендациям; подгруппа IIб – в количестве 27 человек, которые после хирургического этапа лечения получали терапию противовирусным препаратом «Аллоферон».

Эффективность лечения определялась ВПЧ-типированием в режиме «реального времени», кольпоскопическим исследованием и определением уровней каспазы 3 и каспазы 9 через 3 и 6 месяцев.

Анализируя данные ВПЧ-типирования по подгруппам, у всех пациенток зафиксировано снижение вирусной нагрузки (рисунок 4.2).

Через 3 месяца среди пациенток в подгруппе пациенток с проведенной петлевой LEEP эксцизией снижение вирусной нагрузки зафиксировано у 21 % и вирус не определялся у 54 %, т.е. общая эффективность лечения составила 75 %. Через 6 месяцев среди пациенток в подгруппе IIa у 7 % определено снижение вирусной нагрузки ниже клинически значимой, а у 57 % в подгруппе тест на ВПЧ был отрицательным. Таким образом, суммарная излеченность в данной подгруппе составила 64 %. В то время как, в подгруппе с противовирусной терапией, через 3 месяца у 7 % зафиксировано снижение показателей вирусной нагрузки, а у 78 % вирус не определялся, что составило суммарный результат 85 %. Все полученные значения были достоверны ($p < 0,005$) и статистически различались между собой.

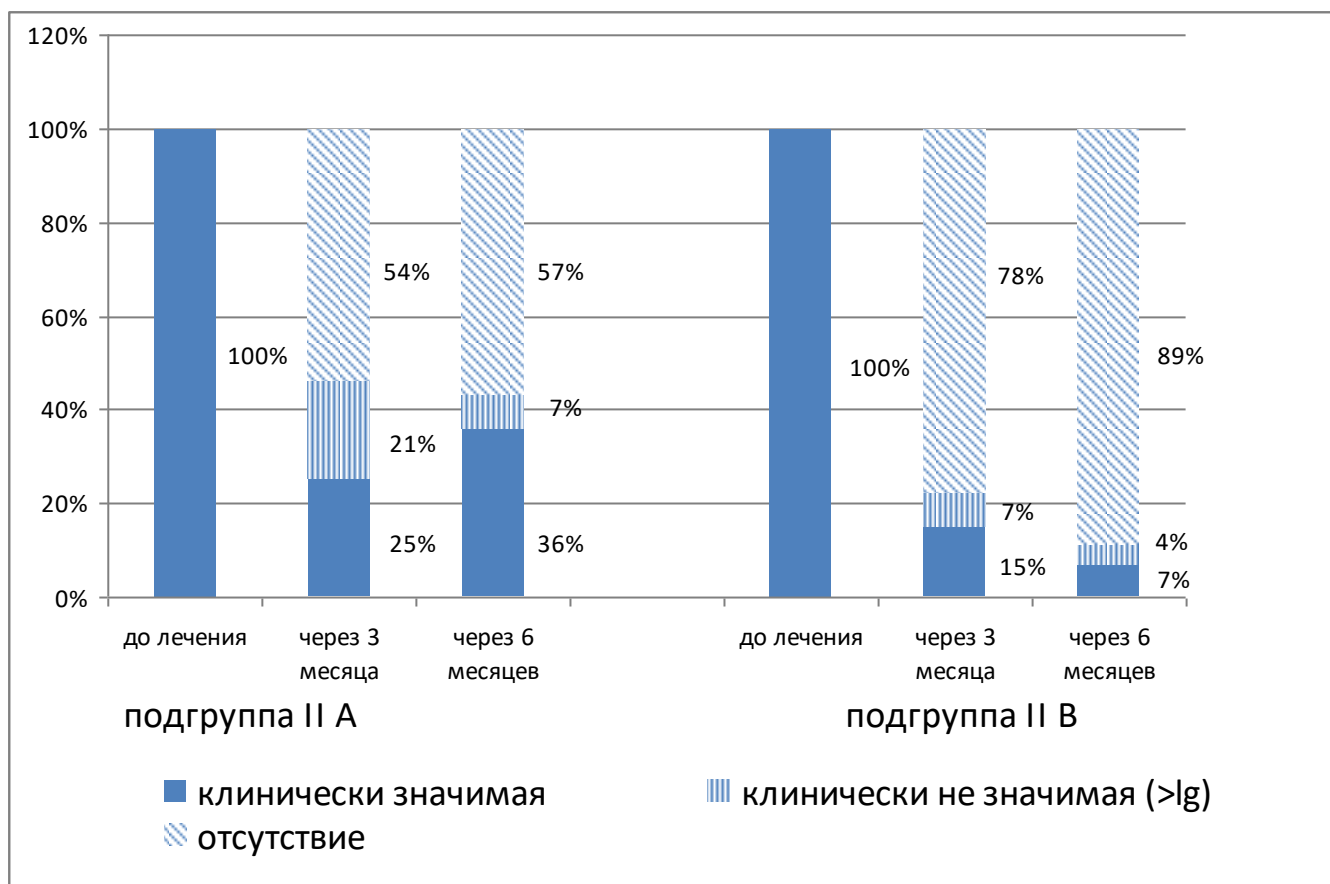


Рисунок 4.2 – Суммарная излеченность в подгруппах IIа и IIб

Через 6 месяцев среди пациенток в подгруппе IIб у 4 % определено снижение вирусной нагрузки ниже клинически значимой, а у 89 % в подгруппе тест на ВПЧ был отрицательным. Таким образом, суммарная излеченность в данной подгруппе составила 93% (таблицы 4.6, 4.7).

Таблица 4.6 – Динамика изменения ВПЧ внутри подгрупп IIа и IIб

Подгруппа	IIа		IIб	
Временной промежуток	3 месяца	6 месяцев	3 месяца	6 месяцев
> 5lg	3 (11 %)	4 (14 %)	0 (0 %)	0 %
3–5 lg	4 (14 %)	6 (21 %)	4 (15 %)	2 (7 %)
< 3 lg	6 (21 %)	2 (7 %)	2 (7 %)	1 (4 %)
Не выявлен	15 (54 %)	16 (57 %)	21 (78 %)	24 (89 %)

Таблица 4.7 – Сравнение подгрупп внутри группы II

Параметры	CIN II подгруппы IIa (n = 28)	CIN II подгруппы IIb (n = 27)
	p	p
Вирусная нагрузка Ig ВПЧ на 10^5 копии до лечения	0,2135	0,3629
Вирусная нагрузка Ig ВПЧ на 10^5 копии через 3 месяца	0,0023*	0,0019*
Вирусная нагрузка Ig ВПЧ на 10^5 копии через 6 месяцев	0,0031*	0,0047*

Примечание. * – достоверное различие между подгруппами (тест Манна–Уитни, $p < 0,05$).

Проводя сравнительный анализ излеченности через 3 и 6 месяцев в группе IIa, обращает на себя внимание то, что через 3 месяца излеченность составляет 85%, а через 6 месяцев снижается до 64%. Видимо, это связано с тем, что, несмотря на проведенную всем в группе с CIN II петлевую эксцизию, в криптах сохраняются эпителиальные клетки, пораженные вирусом [11]. Это способствует в дальнейшем вовлечению в неопластический процесс рядом расположенных здоровых клеток эпителия шейки матки.

В подгруппе IIb через 3 и 6 месяцев отмечается прогрессивное улучшение показателей излеченности.

Таким образом, на фоне применения препарата «Аллоферон» в связи с усилением синтеза интерферона наблюдается усиление устойчивости клеток цервикального эпителия к воздействию вируса папилломы человека, так же активизируются процессы гуморального и Т-клеточного иммунитета и, соответственно, уменьшается риск рецидива неопластических процессов на шейке матки.

Проведенный этап обследования позволил сравнить подходы к лечению пациенток с CINII на фоне ВПЧ. Среди пациенток в каждой подгруппе достоверно имели место снижение вирусной нагрузки и ВПЧ-негативация. Данный факт связан с тем, что хирургический этап лечения при данной патологии предполагает иссечение ткани с клетками, поврежденными вирусом. Но, так как

канал шейки матки покрыт цилиндрическим эпителием и имеет целый ряд продольных складок с ветвлением к периферии, создающих многочисленные ложные железы глубиной от 1–2 до 12 мм, которые в толще цервикса формируют сложную структуру – крипты. [11], то некоторые авторы в своих исследованиях отмечают, что данный метод не всегда обладает 100 % результатом, так как имеет место сохранение нерезецированных участков неоплазированного эпителия в остатке шейки матки, в первую очередь в криптах. В связи с этим вовлеченность крипт, которые порой не возможно удалить при ЛЕЕР-эксцизии, может снижать эффективность терапии эпителиальных повреждений и быть причиной неэффективности лечения. Также, на фоне присутствия ВПЧ, даже в клинически не значимых концентрациях, стволовые клетки также подвергаются плоскоклеточной метаплазии с чрезмерной несанкционированной пролиферативной активностью и с возможным повторным формированием CIN.

Более высокая ВПЧ-реконвалесценция наблюдалась в подгруппе с комплексным подходом, который включал применение противовирусного препарата «Аллоферон», так как противовирусная активность препарата обусловлена активацией биохимических процессов в макрофагах, которые в свою очередь способствуют продукции интерлейкинов, и за счет повышения синтеза антител, что приводит к повышенной пролиферации натуральных киллеров и Т-лимфоцитов [99, 113].

Для оценки состояния цервикальной зоны у пациенток с CIN II согласно дизайну исследования проводили цитологическое исследование через 3 и 6 месяцев (таблица 4.8).

Таблица 4.8 – Результаты цитологического исследования в подгруппах IIa и IIб

Группа исследования	Подгруппа IIa		Подгруппа IIб		Уровень достоверности	
	3 месяца	6 месяцев	3 месяца	6 месяцев	p1	p2
NILM	25 (89 %)	23 (82 %)	25 (93 %)	26 (96 %)	0,004*	0,0046*
LSIL	2 (7 %)	4 (14 %)	2 (7 %)	1 (4 %)	0,0039*	0,0024*
HSIL	1 (4 %)	1 (4 %)	–	–	0,0042*	0,0021*

Примечание. Оценка статистической достоверности изменений результатов онкоцитологии проводилась в соответствии с критериями Уилкоксона–Манна–Уитни. Символом * маркированы значения, которые имеют статистически значимое различие ($p < 0,05$); p_1 – достоверность различий подгрупп «IIa» и «IIб» через 3 месяца (различия полагаются достоверными с $p < 0,005$); p_2 – достоверность различий подгрупп «IIa» и «IIб» через 6 месяцев (различия полагаются достоверными с $p < 0,005$).

Среди подгруппы IIa у 25 (89 %) пациенток через 3 месяца и 23 (82 %) пациенток через 6 месяцев заключение по результату цитологии было NILM ($p < 0,005$). Внутри данной подгруппы через 3 месяца было два случая (7 %) LSIL, а через 6 месяцев – уже четыре случая (14 %). Также внутри данной подгруппы у 1 пациентки (4 %) через 3 месяца было заключение HSIL, соответственно, данная пациентка была направлена на следующий этап лечения, согласно клиническим рекомендациям.

Среди пациенток подгруппы IIб, у которых применялся противовирусный препарат, нормальная цитологическая картина была диагностирована у 25 (93 %) пациенток через 3 месяца и у 26 (96 %) пациенток через 6 месяцев. Заключение LSIL среди подгруппы IIб было у 2 (7 %) пациенток через 3 месяца и у 1 (4 %) пациентки через 6 месяцев. Таким образом, результаты цитологического скрининга в подгруппах через 3 и 6 месяцев были достоверны с показателем ($p < 0,05$) и имели положительную динамику.

Для полноценной оценки состояния цервикса среди пациенток группы II проводилось расширенное кольпоскопическое исследование. Согласно дизайну исследования кольпоскопия была произведена через 3 и 6 месяцев от первичного обследования. У всех больных с видимой зоной трансформации изучены кольпоскопические признаки, позволяющие оценить качество проведенного хирургического метода лечения.

Проводя анализ динамики изменения кольпоскопических картин у пациенток в подгруппах IIa и IIб, были получены результаты, интерпретация которых представлена в таблице 4.9.

Таблица 4.9 – Кольпоскопическая картина в подгруппах IIa и IIб

Название подгруппы	Подгруппа IIa		Подгруппа IIб		Уровень достоверности	
	3 месяца	6 месяцев	3 месяца	6 месяцев	p1	p2
Временной промежуток						
Нормальная кольпоскопическая картина	23 (82 %)	22 (77 %)	24 (86 %)	25 (93 %)	0,0004*	0,0047*
Аномальная кольпоскопическая картина (слабовыраженное поражение)						
Нежная мозаика	1 (4 %)	1 (4 %)	–	1 (4 %)	0,0002*	0,0034*
Нежная пунктация	2 (7 %)	2 (7 %)	1 (4 %)	1 (4 %)	0,00043 *	0,0029*
Сочетание мозаики и пунктации	1 (4 %)	2 (7 %)	2 (7 %)	–	0,00046 *	0,0035*

Примечание. Оценка статистической достоверности изменений результатов кольпоскопического исследования проводилась в соответствии с критериями Уилкоксона–Манна–Уитни. Символом * маркированы значения, которые имеют статистически значимое различие ($p < 0,05$); p1 – достоверность различий подгрупп «IIa» и «IIб» через 3 месяца (различия полагаются достоверными с $p < 0,005$); p2 – достоверность различий подгрупп «IIa» и «IIб» через 6 месяцев (различия полагаются достоверными с $p < 0,005$).

Среди группы пациенток с CIN II в подгруппах IIa и IIб была положительная динамика кольпоскопической картины. Через 3 месяца нормальная кольпоскопическая картина отмечена у 23 человек (82 %) в подгруппе IIa и у 24 (86 %) – в подгруппе IIб. Слабовыраженные изменения определены в подгруппе проведенной эксцизии у 4 пациенток (14 %), а в подгруппе с комплексным лечением – у 3 пациенток (11 %). Таким образом, проводя анализ кольпоскопических картин, можно сделать вывод об уменьшении цервикальных проявлений в обеих подгруппах. Однако, как упоминалось ранее, реактивация вирусной инфекции может быть и после проведенной эксцизии, что объясняет единичные случаи появления слабовыраженных изменений.

Внедрение новых технологий с применением гистохимических и комплексных маркеров диагностики позволяет прогнозировать течение патологического процесса в цервикальной зоне. Установлено, что существуют ведущие механизмы, которые при формировании атипического процесса в шейке матки могут оказывать системное влияние на иммунную систему [6, 122]. Реализация этих процессов возможна за счет влияния, например, на процессы апоптоза, посредством активации пула эффекторных клеток [110, 139].

Для всесторонней оценки состояния шейки матки под воздействием вируса в ходе исследования производилась оценка изменений в процессах апоптоза, согласно дизайну исследования, через 3 и 6 месяцев, путем оценки значений каспазы 3 и каспазы 9 (таблица 4.10).

Таблица 4.10 – Изменения уровней каспазы 3 и каспазы 9 в подгруппах IIa и IIб

Под- группа	Группа контро ля (n = 40)	До лечен ия	Через 3 месяца		Через 6 месяцев		Уровень достоверности			
			IIa (n = 28)	IIб (n = 27)	IIa (n = 28)	IIб (n = 27)	p1	p2	p3	p4
Каспаза 3 (нг/мл)	0,188 ±0,04	3,192 ±0,04 *	0,589 ±0,05* p3	0,594 ±0,05* p4	0,841 ±0,04* p2, p3	0,378 ±0,05* p4	0,07 5	0,01 2*	0,03 8*	0,04 3*
Каспаза 9 (нг/мл)	0,213 ±0,03	2,713 ±0,05 *	0,490 ±0,03* p1, p3	0,473 ±0,05* p4	0,873 ±0,05* p2, p3	0,419 ±0,05* p4	0,001 8*	0,002 7*	0,002 6*	0,001 9*

Примечание. Оценка статистической достоверности изменений активности каспазы 3 и каспазы 9 проводилась в соответствии с критериями Уилкоксона–Манна–Уитни. Символом * маркированы значения, которые имеют достоверное различие с группой контроля (тест Манна–Уитни, $p < 0,05$); p1 – достоверность различий подгруппы «IIa» с подгруппой «IIб» через 3 месяца (различия полагаются достоверными с $p < 0,05$); p2 – достоверность различий подгруппы «IIa» с подгруппой «IIб» через 6 месяцев (различия полагаются достоверными с $p < 0,05$); p3 – достоверность различий подгруппы «IIa» с показателями до лечения (различия

полагаются достоверными с $p < 0,05$); p_4 – достоверность различий подгруппы «Пб» с показателями до лечения (различия полагаются достоверными с $p < 0,05$).

При анализе полученных результатов значений каспазы 3 и каспазы 9 в подгруппах с CIN II через 3 и 6 месяцев установлено, что все значения достоверно отличались от значений до лечения ($p < 0,005$). В подгруппе IIa показатели каспазы 3 до лечения составили $3,192 \pm 0,04$ нг/мл, а через 3 месяца – $0,589 \pm 0,05$ нг/мл и $0,841 \pm 0,04$ нг/мл через 6 месяцев. Внутри подгруппы II б через 3 месяца значения каспазы 3 были равны $0,594 \pm 0,05$ нг/мл, а через 6 месяцев $0,378 \pm 0,05$ нг/мл.

Все показатели достоверно отличались друг от друга и от значений до лечения. Значения каспазы 9 до лечения в группе II были равны $2,713 \pm 0,05$ нг/мл, через 3 месяца в подгруппе II а данный показатель был равен $0,490 \pm 0,03$ нг/мл, а через 6 месяцев $0,873 \pm 0,05$ нг/мл. В подгруппе IIб показатель каспаза 9 через 3 месяца равнялся $0,419 \pm 0,05$, а через 6 месяц $0,473 \pm 0,05$ нг/мл, с достоверностью ($p < 0,005$).

Таким образом, через 3 месяца в подгруппах IIa и IIб отмечается снижение уровня каспазы 9. Однако через 6 месяцев в подгруппе IIa отмечено повышение значения каспазы 9, а в подгруппе с применением противовирусного препарата данный показатель снижался.

Данные изменения исследуемых параметров происходят за счет особенностей генетического кода вируса и синтеза капсидных белков, обладающих высокой иммуногенностью и даже в малых количествах, тормозящих развитие противовирусного иммунитета [38, 39]. Кроме того, суперэкспрессия белков E6 и E7 возникает при интеграции ВПЧ в геном клетки хозяина, а онкогенный потенциал белков E6 и E7 [106] проявляется через формирование комплексов со специальными белками, регулирующими клеточное деление p53 и Rb, которые обычно выполняют в клетке противоопухолевую функцию. В связанном с онкобелками состоянии они теряют это свойство, что вызывает снижение внутриклеточных противоопухолевых систем защиты. Так, например, белок E6 способен на этапах активного канцерогенеза подавлять активность

защитного белка p53, стимулируя его деградацию путем протеолиза, в который вовлечен ассоциированный с Е6 белок Е6АР. Данная функция Е6АР характерна только для образцов цервикальной карциномы, но не для нормального эпителия [57, 89, 90, 105]. В клетках цервикальной зоны без пролиферативной активности было установлено, что при внедрении вируса в клетку происходит снижение активации антиапоптотического потенциала белка Е6, что в свою очередь приводит к стимуляции онкосупрессора p53, который является ключевым звеном в апоптотической модели [57]. Посредством снятия антиапоптотических блоков с мембран происходит воздействие онкосупрессора на прокаспазу-9 [110, 136]. Основной функцией данной прокаспазы является активация каспазы 9, которая завершает внутренний путь апоптотической реакции.

При анализе изменений уровня каспазы 3 в подгруппах установлено, что значения в Па и Пб через 3 месяца достоверно не отличались. Однако через 6 месяцев показатели каспазы 3 в подгруппе с проведенной LEEP -эксцизией стали повышаться, в то время как в подгруппе с LEEP –эксцизией и противовирусным лечением стремились к значениям контрольной группы. Данные изменения эффекторной каспазы при цервикальной интраэпителиальной неоплазии II степени объясняются тем, что при использовании противовирусного препарата происходило влияние на факторы естественного иммунитета, а именно на НК-киллеры, что было невозможным в подгруппе только хирургического лечения. Таким образом, среди пациенток подгруппы Пб за счет стимуляции процессов лизиса пораженных клеток макрофагами происходило увеличение продукции интерлейкинов и повышение пролиферации Т-лимфоцитов [24, 27, 36, 99, 113,]. При таких процессах не происходит супер-экспрессии p53, за счет чего блокируется одновременная экспрессия bcl-2, что делает возможным активацию каспазы 3 по внешнему пути без стимуляции триггерных механизмов [57].

Таким образом, по результатам сравнительного исследования, с учетом определения показателей активности апоптоза, определены оптимальные подходы по тактике ведения пациенток с легкой и средней степенями поражения эпителия шейки матки, ассоциированными с вирусом папилломы человека.

Г Л А В А 5

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В течение последних пяти лет отмечается рост патологий шейки матки, ассоциированных с вирусом папилломы человека, у женщин фертильного возраста с нередким исходом в малигнизацию. Рак шейки матки является одним из лидеров онкопатологии женской половой сферы, что остается острой социальной и медицинской проблемой. По ежегодным отчетам Всемирной организации здравоохранения выявляются около 500 тысяч впервые диагностированных случаев РШМ. Как известно, данной онкопатологии в 99,4 % случаев предшествуют поражения шейки матки, ассоциированные с вирусом папилломы человека. Очевидно, что ВПЧ оказывает существенное влияние на здоровье миллионов женщин репродуктивного возраста. Поэтому максимально ранняя и своевременная диагностика является основным столбом профилактики данной заболеваемости. В связи с этим крайне важно продолжать дальнейшее изучение патогенеза, методов диагностики и лечения ВПЧ-ассоциированных патологий шейки матки, а также поиск новых диагностических критериев.

Согласно предлагаемой клиническими рекомендациями концепции обоснована выжидательная тактика с устранением воспалительного компонента. Однако такое ведение зачастую не бывает успешным, так как риск малигнизации при цервикальных неоплазиях на фоне ВПЧ, по мнению разных авторов, составляет от 15 до 79 % [14, 30, 39]. Для женщин с CIN II показана эксцизия шейки матки с последующим контролем за состоянием зоны трансформации. Тем не менее, по данным исследований, утяжеление CIN II после такого лечения определяется у 39 %, так как в крипах сохраняются клетки [11], пораженные вирусом, что дает толчок к формированию неоплазии снова.

Доказано, что вирус папилломы человека оказывает влияние на естественные клеточные циклы. Важным патогенетическим звеном формирования изменений в шейке матки при ВПЧ являются выработка белков, которые,

возможно, могут оказывать стимулирующее или ингибирующее действие на неопластические процессы. К сожалению, в диагностике и терапии патологий шейки матки на фоне ВПЧ пока что не учитываются данные патогенетические аспекты.

На основании проведенного обзора литературных источников найдены противоречивые данные о состоянии естественного клеточного цикла при ВПЧ и патологиях шейки матки у женщин фертильного возраста. В связи с этим, проведено исследование процессов программированной гибели клетки-апоптоза, при ВПЧ-ассоциированных патологиях шейки матки. В ходе работы исследовались такие маркеры, как каспаза 1, каспаза 3 и каспаза 9, а также проведена оценка клинической значимости исследуемых показателей в диагностике степени тяжести поражения шейки матки, позволяющая провести патогенетическую терапию. В когортном, параллельном, лонгитудинальном исследовании приняли участие 150 пациенток: группа контроля – 40 человек (относительно здоровые пациентки в возрасте от 18 до 45 лет); I группа исследования – 55 пациенток с ВПЧ ассоциированной цервикальной интраэпителиальной неоплазией 1 степени; II группа исследования – 55 пациенток с ВПЧ ассоциированной цервикальной интраэпителиальной неоплазией 2 степени.

Согласно дизайну исследования на первом этапе была обследована группа контроля, которую составили в основном пациентки молодого возраста до 30 лет, средний возраст которых – $26,7 \pm 3,5$ лет. Исходя из данных гинекологического анамнеза, средний возраст полового дебюта составил $19,7 \pm 3,5$ лет. У всех женщин было проведена микроскопия мазка и результатом «нормоценоз», так же все пациентки имели отрицательные результаты наличия инфекций, передаваемых половым путем и вируса папилломы человека. При цитологическом обследовании в группе контроля у всех пациенток (100 %) цитограмма была с нормальным клеточным составом, что соответствует Class I, и негативная в отношении интраэпителиальных поражений. При проведении расширенной кольпоскопии у

40 пациенток (100 %) были нормальной кольпоскопическая картина, зона трансформации I типа, где полностью визуализировался стык МПЭ.

На следующем этапе работы были проанализированы маркеры апоптоза. В доступной литературе нормы для показателей каспазы 1, каспазы 3 и каспазы 9, полученных методом ИФА, найти не представилось возможным, поэтому было проведено обследование группы контроля и получены следующие значения: каспаза 1 = $0,060 \pm 0,01$ нг/мл; каспаза 3 = $0,188 \pm 0,04$ нг/мл; каспаза 9 = $0,213 \pm 0,03$ нг/мл. В связи с присутствием апоптоза в здоровых клетках для регуляции нормальных процессов, полученные значения маркеров в группе контроля, свидетельствовали о наличии естественно текущего отмирания, за счет которого происходит регуляция клеточного обновления.

Затем были проанализированы анамнестические данные и было проведено обследование согласно дизайна исследования пациенток с цервикальными интраэпителиальными неоплазиями. У всех исследованных пациенток обязательным условием было отсутствие ЗППП, «нормоценоз» при исследовании мазков на флору и положительный тест на ВПЧ.

Пациентки с CIN I были преимущественно старше 30 лет (средний возраст – $28,6 \pm 2,8$ лет). По данным анкетирования никотиновая зависимость (более семи сигарет в день) указана у 21 (38 %) пациентки. Ранний половой дебют ($17,4 \pm 3,9$ лет) указан у 3 (5 %), а больше семи половых партнеров, согласно собранного анамнеза, отметили 23 (42 %) пациентки.

При проведении ВПЧ-типирования и определения вирусной нагрузки было установлено сочетание нескольких типов вируса с клинически значимой вирусной нагрузкой. Чаще всего в данной группе диагностировались 16, 18, 31, 33, 45 и 52 типы.

По результатам цитологического исследования были определены как нормальные цитограммы у 21 пациенток (38 %), так и LSIL у 34 пациенток (62 %).

У всех ВПЧ-положительных пациенток с CIN I была диагностирована аномальная кольпоскопическая картина. Слабовыраженные изменения на шейке матки диагностированы у 36 пациенток, что составило 65 %, а выраженные

изменения – у 19 пациенток (35 %)

Значения каспазы 1 в группе ВПЧ-положительных с пациенток с CIN I были на пределе чувствительности метода составив $0,062 \pm 0,03$ нг/мл и статистически не отличались от группы контроля. По данным различных источников каспаза 1 играет центральную роль в клеточном иммунитете в качестве инициатора воспалительного процесса, поэтому полученные показатели позволяют сделать вывод об отсутствии воспалительного процесса в эпителиальных клетках цервикальной зоны. Так как, ВПЧ при внедрении в цервикс оказывает влияние на все процессы внутри клетки, в том числе на запрограммированную гибель – апоптоз, то и значения каспазы 3 и каспазы 9 были выше показателей группы контроля и составили $2,772 \pm 0,03$ нг/мл ($p=0,0001$) и $2,311 \pm 0,05$ нг/мл ($p=0,0001$), соответственно. Повышение уровня каспазы 9 связано с участием во внутреннем, митохондриальном пути за счет активации после высвобождения апоптосомы и снятия антиапоптотических блоков с митохондриальных комплексов [87, 110, 136]. Учитывая особенность каспазы 3 приводить к тотальной смерти всех клеток, она, являясь конечным звеном внешнего пути, замыкает каскад реакций, запуск которых начинается при влиянии триггера (в нашем случае – это ВПЧ) на рецепторы смерти [110, 136, 139, 141].

В ходе корреляционного анализа установлены прямые сильная связи между количеством половых партнеров и клинически значимой вирусной нагрузкой и между количеством половых партнеров и гистологическим заключением CIN I, клинически значимой вирусной нагрузкой и уровнем каспазы 3; клинически значимой вирусной нагрузкой и уровнем каспазы 9. Так же при проведения статистического анализа были установлены сильные прямые связи между уровнем каспазы 3 и гистологическим заключением; уровнем каспазы 3 и кольпоскопическим исследованием; уровнем каспазы 9 и гистологическим заключением. Установленные корреляционные связи между значениями каспазы 3, 9 и ВПЧ ($3-5 \lg$, $>5 \lg$), КПС и гистологическим заключением, подтверждающим наличие интраэпителиального поражения объясняются тем, что вирус выступает триггером, который увеличивая свою концентрацию поражает все большее

количество клеток цервикального эпителия, приводя к изменениям, которые визуализируются при кольпоскопии, а так же воздействует на течение клеточного цикла пораженных клеток, что влечет за собой стимуляцию апоптотических каспаз, как финальных этапов внутреннего и внешнего пути уничтожения инфицированной клетки.

Таким образом, полученные результаты при изучении ВПЧ-ассоциированной CIN I позволяют предположить, что при инвазии вируса в клетку на начальных этапах его жизнедеятельности, при встраивании в ДНК клетки хозяина происходит усиление апоптоза, как защитной реакции поврежденной клетки. Учитывая особенность каспазы 3 приводить к тотальной смерти всех клеток, она, являясь конечным звеном внешнего пути, замыкает каскад реакций, запуск которых начинается при влиянии вируса на рецепторы смерти. Повышение уровня каспазы 9 связано с участием во внутреннем, митохондриальном пути, за счет активации после высвобождения апоптосомы и снятия антиапоптотических блоков с митохондриальных комплексов. Таким образом, при ВПЧ-ассоциированной CIN I происходит усиление апоптоза за счет непрерывной стимуляции рецепторов эпителиальных клеток как на поверхности, так и в митохондриях.

Среди группы с CIN II пациентки были преимущественно старше 30 лет (средний возраст – $29,1 \pm 4,1$). 24 % обследованных отметили курение более семи сигарет в день, а количество половых партнеров более трех отмечено у 40 % пациенток. При анализе сексуального поведения пациенток у 36 (65 %) обследуемых было отмечено раннее начало половой жизни и средний возраст первого коитуса составил $15,8 \pm 1,7$ лет.

При проведении ВПЧ-типирования было установлено сочетание трех и более типов вируса и клинически значимая вирусная нагрузка.

При анализе цитологических результатов у 75 % (41 пациентка) было заключение HSIL и у 25 % (14 пациенток) получено заключение LSIL.

При КПС исследовании наиболее часто встречалась комбинация плотного АБЭ и участков грубой мозаики – у 25 женщин (45 %), сочетание нежной

пунктации и участков грубой мозаики были описаны у 16 пациенток (29 %).

Значения каспазы 1 статистически не отличались от группы контроля и были равны $0,061 \pm 0,04$ нг/мл, что также свидетельствовало об отсутствии воспаления в формировании CIN II у пациенток. Уровень каспазы 9 был равен $2,713 \pm 0,05$, а уровень каспазы 3 равнялся $3,192 \pm 0,04$, что было достоверно выше значений в группе пациенток с CIN I и группе контроля.

Важным этапом исследования было определение взаимосвязей исследуемых параметров и прямые сильные корреляционные связи установлены между возрастом и клинически значимой вирусной нагрузкой; возрастом и гистологическим заключением; возрастом и уровнем каспазы 9; курением и уровнем каспазы 3, каспазы 9; курением и гистологическим заключением; ранним половым дебютом и клинически значимой вирусной нагрузкой; ранним половым дебютом и гистологическим заключением, клинически значимой вирусной нагрузкой и количеством половых партнеров; клинически значимой вирусной нагрузкой и уровнем каспазы 3; клинически значимой вирусной нагрузкой и уровнем каспазы 9; клинически значимой вирусной нагрузкой и гистологией, между уровнем каспазы 3 и количеством половых партнеров больше семи; уровнем каспазы 3 и уровнем каспазы 9; уровнем каспазы 3 и гистологическим заключением; уровнем каспазы 9 и гистологическим заключением. Полученные показатели говорят о взаимодействии нескольких факторов, которые взаимодействуя потенцируют негативное влияние вируса папилломы человека на эпителиальные клетки шейки матки, отягощающая течение интраэпителиального повреждения.

На основании полученных в ходе исследования данных был проведен ROC-анализ, который позволил выявить пороговые значения переменных предиктов. Таким образом, площадь под ROC-кривой для показателя каспаза 3 составила $AUC = 0,827$ и $AUC = 0,928$, а площадь под ROC-кривой для показателя каспаза 9 составила $AUC = 0,832$ и $AUC = 0,971$, что позволило оценить модели как отличные. Чувствительность 97,1 % и специфичность 98,6% определена для значения каспазы 3 $\geq 1,71$ нг/мл для пациенток с цервикальной интраэпителиальной неоплазией I степени, а для значения каспазы 9 $\geq 1,93$ нг/мл

(чувствительность 96,9 % и специфичность 99,7%) характерны для пациенток с цервикальной интраэпителиальной неоплазией I степени. Значение каспазы 3 $\geq$ 2,90 нг/мл характерны для пациенток с цервикальной интраэпителиальной неоплазией II степени (чувствительность 99,8 % и специфичность 97,6%) и значение каспазы 9 $\geq$ 2,71 нг/мл характерны для пациенток с цервикальной интраэпителиальной неоплазией II степени (чувствительность 98,5 % и специфичность 99,3%).

Таким образом, для оптимизации диагностики определены доверительные интервалы, позволяющие провести неинвазивную диагностику изменений эпителия шейки матки, используя показатель каспазы 3: 1,71–2,89 нг/мл – CIN I и 2,90–3,35 нг/мл – CIN II и показатель каспазы 9: 1,93–2,70 нг/мл – CIN I и 2,71–3,01 нг/мл – CIN II.

Выявленные критерии дифференциальной диагностики цервикальных поражений позволяют оптимизировать определение степени тяжести интраэпителиального повреждения эпителия шейки матки на фоне ВПЧ, сделать это неинвазивным методом, с наименьшими материальными и временными затратами, а также прогнозировать течение заболевания. Данные преимущества помогут быстро подобрать правильную тактику ведения пациентки, предотвратив развитие цервикальных интраэпителиальных поражений высокой степени тяжести.

Согласно дизайну исследования и клиническим рекомендациям, на следующем этапе исследования все пациентки рандомно были разделены на подгруппы. Среди пациенток с CIN I 27 женщин подгруппы Ia находились под наблюдением, а 28 пациенток подгруппы Ib получали противовирусную терапию. В группе CIN II всем пациенткам было проведено деструктивное лечение с иссечением пораженного участка. Согласно дизайну исследования, 28 пациенток после деструкции находились под наблюдением (подгруппа IIa), а 27 пациенткам деструкция была проведена на фоне применения противовирусного препарата (IIб). Оценку эффективности выбранной терапии проводили через 3 и 6 месяцев.

Основным критерием эффективности лечения была оценка наличия или отсутствия ВПЧ или снижение вирусной нагрузки ниже значимых величин.

Среди результатов цитологического исследования через 3 и 6 месяцев пациенток группы I была зафиксирована положительная динамика. Через 3 месяца заключение NILM в подгруппе Ia было у 16 пациенток (59%) и в подгруппе Ib у 21 (75%) пациентки. Результат LSIL определен у 9 (33%) женщин в Ia и у 7 (25%) в Ib подгруппах. Заключение «кератоз» через 3 месяца по результату цитологического исследования поставлен только в подгруппе Ia у 1 пациентки (4%), и цитограмма, соответствующая HSIL, определена у 1 пациентки (4%) в подгруппе Ia через 3 месяца.

Через 6 месяцев цитограмма NILM диагностирована у 14 (52%) пациенток в подгруппе Ia и у 22 (79%) пациенток в Ib ($p=0,0041$). Цитологическое заключение LSIL поставлено в Ia 11 (41%) женщинам, а в Ib - 6 (21%) через 6 месяцев. Цитограмма, соответствующая HSIL, через 6 месяцев определена только в подгруппе Ia у 2 (7%) пациенток. Таким образом, наиболее благоприятные результаты цитологии были в подгруппе Ib через 6 месяцев. Аналогичные изменения определены по результатам кольпоскопического исследования. В двух подгруппах зафиксировано преобладание нормальной кольпоскопической картины: через 3 месяца в Ia у 7 (26%) пациенток, а в подгруппе Ib у 7 (27%), а через 6 месяцев у 11 (41%) и 13 (50%) соответственно. То есть, наиболее благоприятные результаты кольпоскопического исследования – в подгруппе Ib.

Установлено, что все показатели после терапии достоверно отличались от группы контроля, т.е. не были в пределах нормы. В подгруппе Ia показатели каспазы 3 до лечения составили – $2,772 \pm 0,03$ нг/мл, через 3 месяца – $2,164 \pm 0,05$ нг/мл, а через 6 месяцев $1,914 \pm 0,05$ нг/мл, а среди пациенток в подгруппе Ib значения через 3 месяца были $1,613 \pm 0,04$ нг/мл и через 6 месяцев $1,391 \pm 0,04$ нг/мл. Значения каспазы 9 до лечения в группе I были равны $2,311 \pm 0,05$ нг/мл, в подгруппе Ia через 3 месяца $1,904 \pm 0,05$ нг/мл и $1,673 \pm 0,05$ – через 6 месяцев. Значения каспазы 9 в подгруппе Ib через 3 месяца – $1,474 \pm 0,05$ нг/мл и

через 6 месяцев – $1,029 \pm 0,05$ нг/мл. Значения также достоверно отличались друг от друга.

Так как некоторые авторы полагают, что цервикальная неоплазия легкой степени косвенно указывает на активность иммунной системы, то, возможно, установленный уровень каспаз является достаточным для лизиса атипических клеток. Однако под воздействием противовирусного лечения у пациенток процесс лизиса пораженных вирусом клеток многослойного плоского эпителия протекал интенсивнее, о чем свидетельствует более динамическое снижение показателей каспазы 3 и каспазы 9.

При анализе подходов ведения пациенток с дисплазией легкой степени тяжести, включающих в себя динамическое наблюдение и лечение противовирусным препаратом «Аллоферон» отмечена ВПЧ-негативация и снижение вирусной нагрузки ниже клинически значимых цифр в группе, получавшей лечение, причем эффективность терапии была в 1,8 раз выше.

При обследовании пациенток с CIN II и проведении цитологического исследования в подгруппе IIa у 25 (89 %) пациенток через 3 месяца и 23 (82 %) пациенток через 6 месяцев заключение по результату цитологии было NILM. Внутри данной подгруппы через 3 месяца было два случая (7 %) LSIL, а через 6 месяцев – уже четыре случая (14 %). Также внутри данной подгруппы у 1 пациентки (4 %) через 3 месяца было заключение HSIL, соответственно, данная пациентка была направлена на следующий этап лечения, согласно клиническим рекомендациям. Благоприятная цитологическая картина диагностирована в подгруппе IIб, у которых было проведено противовирусное лечение. Нормальная цитологическая картина в группе II б была диагностирована у 25 (93 %) пациенток через 3 месяца и у 26 (96 %) пациенток через 6 месяцев. Заключение LSIL среди подгруппы IIб было у 2 (7 %) пациенток через 3 месяца и у 1 (4 %) пациентки через 6 месяцев. По результатам расширенного кольпоскопического исследования эффективность от терапии в подгруппе IIб была выше, так как нормальная кольпоскопия определена в подгруппе IIa лишь у 79 %, а в подгруппе

Пб – у 93 %. Следующим этапом работы было определение вирусной нагрузки ВПЧ. Через 3 месяца в подгруппе Па снижение вирусной нагрузки зафиксировано у 21 % и вирус не определялся у 54 %, т.е. общая эффективность лечения составила 75 %, в то время как в подгруппе с применением противовирусной терапии (Пб) у 7 % вирусная нагрузка была ниже клинически значимой, а у 78 % обследованных вирус не определился (суммарно 85 %). Через 6 месяцев в подгруппе Па уменьшилось количество пациенток, у которых отмечено снижение вирусной нагрузки и составило 7 %, а отрицательным тест был у 57 % (суммарный показатель – 64 %). В подгруппе Пб у 4 % от количества пациенток диагностировано снижение вирусной нагрузки ниже клинически значимой и у 89 % не было выявлено ВПЧ (суммарно 93 %).

Полученные результаты свидетельствуют о возможном рецидивировании поражения цервикального эпителия ВПЧ. Таким образом, на фоне применения противовирусного препарата ВПЧ подвергается воздействию иммунной системы, что позволяет защитить здоровые клетки от воздействия вируса, возможно, сохранившегося в криптах, которые были неполностью резецированы при эксцизии.

При анализе полученных результатов значений каспазы 3 и каспазы 9 в подгруппах с CIN II через 3 и 6 месяцев установлено, что все значения достоверно отличались от значений до лечения ($p < 0,005$). Через 3 месяца в подгруппах Па $-0,490 \pm 0,03$ нг/мл и Пб $-0,473 \pm 0,05$ нг/мл, отмечается снижение уровня каспазы 9. Однако через 6 месяцев в подгруппе Па отмечено повышение значения каспазы 9 $-0,873 \pm 0,05$ нг/мл, а в подгруппе с комплексным лечением данный показатель снижался до $0,419 \pm 0,05$ нг/мл с достоверностью ($p < 0,005$).

При анализе изменений уровня каспазы 3 в подгруппах установлено, что значения в Па и Пб через 3 месяца достоверно не отличались. Однако через 6 месяцев показатели каспазы 3 в подгруппе с проведенной LEEP -эксцизией стали повышаться ($0,841 \pm 0,04$ нг/мл, в то время как в подгруппе с LEEP –эксцизией и противовирусным лечением ($0,378 \pm 0,05$ нг/мл, стремились к значениям контрольной группы.

Данные изменения эффекторной каспазы при цервикальной интраэпителиальной неоплазии II степени объясняются тем, что при использовании противовирусного препарата происходило влияние на факторы естественного иммунитета, а именно на NK-киллеры, что было невозможным в подгруппе только хирургического лечения. Таким образом, среди пациенток подгруппы IIб за счет стимуляции процессов лизиса пораженных клеток макрофагами происходило увеличение продукции интерлейкинов и повышение пролиферации Т-лимфоцитов [24, 27, 36, 99, 113,]. При таких процессах не происходит супер-экспрессии p53, за счет чего блокируется одновременная экспрессия bcl-2, что делает возможным активацию каспазы 3 по внешнему пути без стимуляции триггерных механизмов[57, 70, 101, 113, 124].

Использование противовирусной терапии при лечении CIN II позволяет избежать рецидивирования в 30 % случаев и повысить эффективность лечения в 1,4 раза.

Анализируя различные подходы к лечению, наиболее благоприятные результаты были получены в подгруппах с противовирусным лечением. Возможно, это связано с тем, что при проведении противовирусного лечения происходила медикаментозная активация NK-клеток, которые опосредованно запускали цитокиновые реакции и приводили к прямому лизису зараженных клеток. В то время как у пациенток без противовирусного лечения клетки с ВПЧ были «защищены» от лимфоцитов за счет блокирования активности NK-клеток [99, 113].

ВЫВОДЫ

1. У женщин Пензенской области при цервикальной интраэпителиальной неоплазии I и II степени преобладает сочетание ВПЧ- ВКР [16, 18, 31, 33, 51] с высокой вирусной нагрузкой (более 3 lg).
2. При ВПЧ-ассоциированных заболеваниях (CIN I и CIN II) запускается апоптоз-индуцирующий каскад реакций с активацией внутреннего апоптотического пути, что связано с достоверным повышением уровня инициаторной каспазы 9, которая приводит к активации и достоверному повышению уровня эффекторной каспазы 3, приводящей к тотальной смерти пораженных клеток.
3. Наиболее достоверными показателями повышения апоптотической активности в клетках при персистенции вируса папилломы человека являются каспаза 3 и каспаза 9, которые напрямую коррелируют с тяжестью интраэпителиального поражения.
4. Предложенные критерии ведения пациенток с ВПЧ-ассоциированными формами интраэпителиальных поражений I и II степени с учетом индукторов апоптоза помогут избежать инвазивных вмешательств на шейке матки, улучшить диагностику с целью повышения точности и оптимизировать подходы к лечению.
5. Терапия препаратом гистидил-глицил-валил-серил-глицил-гистидил-глицил-глутаминил-гистидил-глицил-валил-гистидил-глицином (Аллоферон) при лечении CIN I, повышает эффективность лечения в 1,8 раза ($p=0,0011$), составляя 40% по сравнению с 22% в группе динамического наблюдения. Использование противовирусной терапии при лечении CIN II повышает эффективность лечения в 1,4 раза ($p=0,0047$), составляя в группе сочетанной терапии (эксцизий на фоне противовирусной терапии) 93%, по сравнению с группой эксцизионного лечения, где в 30% отмечено рецидивирование патологического процесса и соответственно эффективность лечения составила 64%.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Наиболее частой причиной ВПЧ-ассоциированных заболеваний шейки матки в Пензенской области являются ВПЧ-ВКР 16, 18, 31, 33, 51 типов, которые должны входить в тест системы при комплексной оценке тяжести поражения эпителия шейки матки вместе с общепринятыми методами, такими как цитологический скрининг и расширенная кольпоскопия.

2. Всем пациенткам с цервикальной интраэпителиальной неоплазией I степени на фоне папилломавирусной инфекции целесообразно использование наблюдательной тактики для оценки активности элиминации вируса, включающей онкоцитологическое исследование, расширенную кольпоскопию, определение вирусной нагрузки, исследование уровня каспазы 3, 9.

3. Пациенткам с цервикальной интраэпителиальной неоплазией II степени показано комбинированное лечение, включающее LEEP-эксцизию шейки матки на фоне противовирусного препарата, с оценкой эффективности терапии посредством онкоцитологического исследования, расширенной кольпоскопии, определения вирусной нагрузки и исследования уровней каспазы 3 и каспазы 9, позволяющих контролировать уровень апоптоза, как фактора элиминации вируса.

4. Определение группы риска по формированию дисплазии легкой и средней степени тяжести является показанием для динамического наблюдения пациенток старше 30 лет, с никотиновой зависимостью (курение более 7 сигарет в сутки) и наличием более 7 половых партнеров.

5. Использование противовирусной терапии гистидил-глицил-валил-серил-глицил-гистидил-глицил-глутаминил-гистидил-глицил-валил-гистидил-глицином (Аллаферон) может быть рекомендовано для терапии женщин с дисплазией легкой степени для повышения эффективности лечения до 40% в течение 6 месяцев.

6. Применение противовирусной терапии гистидил-глицил-валил-серил-глицил-гистидил-глицил-глутаминил-гистидил-глицил-валил-гистидил-глицином (Аллаферон) в сочетании с эксцизионными методами может быть рекомендовано

для терапии женщин с дисплазией умеренной степени тяжести, так как позволяет избежать рецидивирования на 30% и повышает эффективности лечения до 93% в течение 6 месяцев.

7. Пропаганда здорового образа жизни, направленная на повышение образование девочек и подростков в отношении гигиены сексуальных отношений, особенно раннего начала половой жизни, борьба с курением, использование барьерных методов контрацепции, профилактика и выявление факторов риска распространения папилломавирусной инфекции и других инфекций, передаваемых половым путем, позволит снизить число заболеваний шейки матки, в том числе и рака.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Проведенное исследование не решает все вопросы по проблеме патогенеза и лечения диспластических процессов на шейки матки, ассоциированных с вирусом папилломы человека. Требуют дальнейшего изучения вопросы влияния медикаментозной терапии на более поздних этапах развития цервикальных интраэпителиальных неоплазий у женщин с ВПЧ-инфекцией. Следует также конкретизировать при каких именно уровнях маркеров апоптоза регресс патологии будет более выражен и наименее возможен рецидив диспластического процесса в будущем.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АБЭ – ацетобелый эпителий

ВАК – Высшая аттестационная комиссия

ВИЧ – вирус иммунодефицита человека

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения

ВПЧ – вирус папилломы человека

ВПЧ-ВКР- вирус папилломы человека высокого канцерогенного риска

ДИ – доверительный интервал

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ЗТ – зона трансформации

ИМТ – индекс массы тела

ИППП – инфекции, передаваемые половым путем

ИФА – иммуноферментный анализ

мРНК – микрорибонуклеиновая кислота

Пап-тест – тест по Папаниколау

ПЦР – полимеразно-цепная реакция

РШМ – рак шейки матки

ASC-US – atypical squamous cells of undetermined significance

CIN – cervical intraepithelial neoplasia

FDA – food and drug administration

HPV – human papilloma virus

HSIL – high-grade squamous intraepithelial lesions

LSIL – low-grade squamous intraepithelial lesions

NILM – negative for intraepithelial lesion or malignancy

SIL – squamous intraepithelial lesions

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Артымук, Н.В. Эффективность выявления вируса папилломы человека при помощи устройства для самостоятельного забора вагинального отделяемого / Н.В. Артымук, К.В. Марочко // Акушерство и гинекология. – 2016. – № 3. – С. 85–91.
2. Ассоциации генитальных инфекций и вируса папилломы человека как конфаундинг-факторы цервикальной интраэпителиальной неоплазии / Т.Е. Белокриницкая, Н.И. Фролова, Д.А. Тарбаева, Е.Ю. Глотова, А.А. Золотарёва, Т.В. Мальцева // Доктор.Ру. – 2015. – № 2 (12). – С. 14–17.
3. Балтер, Р.Б. Лечение и профилактика дисплазий шейк матки у женщин, проживающих в экологически неблагоприятных районах / Р.Б. Балтер, Л.С. Целкович, И.Е. Никулина // Аспирантский вестник поволжья – 2015. – № 5-6. – С. 7–9.
4. Барышников, А.Ю. Иммунологические проблемы апоптоза / А.Ю. Барышников, Ю.В. Шишкин. – Москва : Эдиториал УРСС, 2002. – 320 с.
5. Бауэр, Г. Цветной атлас по кольпоскопии / Г. Бауэр ; пер. с нем. О.А. Зубановой ; под ред. С.И. Роговской. – Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2015. – 287 с.
6. Боровиков, И.О. Опыт применения иммуномодулирующего препарата в терапии папилломавирусной инфекции гениталий у женщин / И.О. Боровиков, И.И. Куценко, Х.И. Горринг // Акушерство и гинекология. – 2018. – № 3. – С. 122–128.
7. Викторов, И.В. Стволовые клетки мозга млекопитающих: биология стволовых клеток *in vivo* и *in vitro* / И.В. Викторов // Известия Академии наук. Сер.: Биология. – 2001. – № 6. – С. 646–655.
8. Виноградова, О.П. Особенности консервативной иммунопротивовирусной терапии пациенток с ВПЧ-ассоциированными цервикальными интраэпителиальными неоплазиями I степени / О.П. Виноградова, О. В. Епифанова, Н. А. Андреева // Акушерство и гинекология. – 2020. – № 2.
9. Губский, Ю.И. Смерть клетки: свободные радикалы, некроз, апоптоз / Ю.И. Губский. – Винница : Нова Книга, 2015. – 360 с.

10. Данькина, И.А. Влияние различных факторов на возникновение заболеваний шейки матки у пациенток репродуктивного возраста / И.А. Данькина, С.А. Джеломанова, В.В. Данькина, А.А. Чистяков // Актуальные проблемы медицины : материалы ежегодной итоговой науч.-практ. конф. – Гродно, 2017. – С. 250–254.
11. Диагностика остаточных/рецидивных предраковых заболеваний шейки матки после электроэксцизии / Г.Н. Минкина [и др.] // Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. – 2009. – Т. 8, № 5. – С. 23–27.
12. Доброхотова, Ю.Э. Эффективность комплексного подхода к лечению дисплазий эпителия шейки матки умеренной и тяжелой степени на фоне инфицирования вирусом папилломы человека / Ю.Э. Доброхотова, М.Г. Венедиктова // Фарматека. – 2015. – № 3.
13. Ершов, В.А. Значение белков L1 вируса папилломы человека и NuMA1 в прогнозе цервикальной интраэпителиальной неоплазии, ассоциированной с вирусом папилломы человека высокого канцерогенного риска / В.А. Ершов, А.С. Лисянская, Е.А. Ронжина, Е.Р. Рахминова // Акушерство и гинекология. – 2017. – № 4. – С. 63–68.
14. Ершов, В.А. Неоплазии эпителия шейки матки / В.А. Ершов. – Санкт-Петербург : Человек, 2016. – 200 с.
15. Заболевания шейки матки и генитальные инфекции / под ред. В.Н. Прилепской. – Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2016. – 384 с.
16. Зильбер, Л.А. Вирусно-генетическая теория возникновения опухолей / Л.А. Зильбер. – Москва : Наука, 1968. – 344 с.
17. Каприн, А.Д. Состояние онкологической помощи населению России в 2016 году / А.Д. Каприн, В.В. Старинский, Г.В. Петрова. – Москва : МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2017. – 236 с.
18. Кедрова, А.Г. Отдаленные результаты лечения доброкачественных изменений эпителия шейки матки, ассоциированных с вирусом папилломы

человека / А.Г. Кедрова, С.А. Леваков, М.Д. Царенко // Опухоли женской репродуктивной системы. – 2016. – № 2 (12). – С. 77–83.

19. Клиническое значение индуцированного трофобластом апоптоза иммунокомпетентных клеток при осложненном течении беременности / А.Н. Стрижаков, Ю.В. Тезиков, И.С. Липатов, И.А. Агаркова, И.В. Иванова // Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. – 2011. – Т. 10, № 6. – С. 26–31.

20. Колебания клеточного иммунитета и активности апоптоза лимфоцитов периферической крови при цервикальных интраэпителиальных неоплазиях и микрокарциноме шейки матки. Возможности иммуномодулирующей терапии / П.И. Ковчур, И.Е. Бахлаев, О.В. Курмышкина, Т.О. Волкова, А.Н. Полторак // Амбулаторно-поликлиническая помощь – в эпицентре женского здоровья : материалы Всерос. конгресса с междунар. участием. – Москва, 2013. – С. 197–200.

21. Концепция «4П»- медицины будущего: пути реализации / О.И. Линева, Н.В. Спиридонова, В.Ф. Казаков, А.В. Казакова, Е.П. Шатунова // Кремлевская медицина. Клинический вестник. – 2020. – № 2. – С. 43–47.

22. Куклина, Е.М. Участие семафорина Sema4D в Т-зависимой активации В-лимфоцитов / Е.М. Куклина, И.В. Некрасова, Ю.В. Валиева // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2017. – Т. 163, № 4. – С. 444–448.

23. Ледина, А.В. Эффективность терапии больных с ВПЧ-ассоциированным цервицитом, обусловленная местным воздействием кавитированного («озвученного») раствора препарата панавир / А.В. Ледина, И.П. Аминова, А.Х. Гайдарова, Т.Н. Бебнева // Российский вестник акушера-гинеколога. – 2016. – Т. 16, № 6. – С. 77–82.

24. Липатов, И.С. Эффективность профилактики гестационной и перинатальной патологии при часто рецидивирующем герпесе с применением цитокиноподобного пептида на прегравидарном этапе / И.С. Липатов, Ю.В. Тезиков, М.А. Овчинникова // Акушерство и гинекология. – 2020. – № 1. – С. 94–102.

25. Манухин, И.Б. «Подводные камни» цервикального скрининга / С.В. Фириченко, И.Б. Манухин, С.И. Роговская и др. // Доктор.ру. – 2018. – № 2 (146). – С. 26–34.
26. Манухин, И.Б. Роль микробиоты влагалища у беременных после эксцизии шейки матки / И.Б. Манухин, С.В. Фириченко и др. // Акушерство и гинекология. – 2017. – № 10. – С. 41-46.
27. Минкина, Г.Н. Достижения и перспективы вакцинопрофилактики папилломавирусной инфекции и ассоциированных заболеваний / Г.Н. Минкина // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2020. – Т. 19. – № 2. – С. 110-118
28. Минкина, Г.Н. Цитологический скрининг рака шейки матки: от традиционного пап-теста к компьютерным технологиям / Г.Н. Минкина // Акушерство, гинекология и репродукция. – 2017. – Т. 11. – № 1. – С.56-64.
29. Национальное руководство по гинекологии / под ред. Г.М. Савельевой, Г.Т. Сухих, В.Н. Серова, В.Е. Радзинского, И.Б. Манухина. – Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2017. – 989 с.
30. О направлении клинических рекомендаций (протокола лечения) «Доброкачественные и предраковые заболевания шейки матки с позиции профилактики рака» : письмо Министерства здравоохранения РФ от 2 ноября 2017 г. № 15-4/10/2-7676. – URL: <https://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/71716538/> (дата обращения: 26.07.2019).
31. Папилломавирусная инфекция уrogenитального тракта: эпидемиологические аспекты (обзор) / О.С. Абрамовских, В.Ф. Долгушина, Л.Ф. Телешева, О.И. Летяева, Е.А. Антимирова // Гинекология. – 2016. – № 2. – С. 34–39.
32. Паяниди, Ю.Г. Рак шейки матки в России. Пути профилактики / Ю.Г. Паяниди, К.И. Жордания, М.В. Савостикова, А.Н. Маргарян // Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. – 2015. – Янв.-март. – Т. 26, № 1 (94). – С. 33–42.
33. Прогнозирование риска развития и прогрессирования цервикальных интраэпителиальных неоплазий, ассоциированных с папилломавирусной инфекцией / О.В. Бурменская, Н.М. Назарова, В.Н. Прилепская, Г.М. Мзарелуа,

Н.В. Бестаева, Д.Ю. Трофимов, Г.Т. Сухих // Акушерство и гинекология. – 2016. – № 2. – С. 92–98. – URL: <http://dx.doi.org/10.18565/aig.2016.2.92-98>

34. ОКТ-кольпоскопия в диагностике цервикальной патологии / О.В. Качалина, И.А. Кузнецова, А.А. Коренькова // Исследования и практика в медицине.- 2018.- Т. 5.- № S1. -С. 41.

35. Остроконечные кондиломы аногенитальной области: новый путь решения распространенной проблемы урологии (результаты долгосрочного наблюдения) / А.Д. Протасов, И. С. Липатов, М.П. Костинов, Ю.В. Тезиков, А.Д. Шмитько, Д.В. Пахомов, Д.А. Благовидов, А.В. Жестков, А.А. Рыжов, Е.В. Вехова // Урология. – 2016. – № 5. – С. 47–51.

36. Сочетанное применение вакцинации и иммунопрепарата в достижении длительной клинической ремиссии хронической ВПЧ-инфекции, проявляющейся остроконечными кондиломами аногенитальной области / А.Д. Протасов, Ю.В. Тезиков, М.П. Костинов, И.С. Липатов, О.О. Магаршак, А.А. Рыжов // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2016. – Т. 15, № 3 (88). – С. 60–66.

37. Радзинский, В.Е. Индукторы интерферонов в комплексной терапии заболеваний шейки матки при персистирующей папилломавирусной инфекции / В.Е. Радзинский, И.М. Ордянц, Н.В. Буянова, Е.В. Зыков // Акушерство и гинекология. – 2018. – № 1. – С. 121–126.

38. Роговская, С.И. Комплексная терапия заболеваний шейки матки с применением препаратов депантол и лавомакс / С.И. Роговская, Л.А. Теребнева, Н.М. Подзолкова // Акушерство и гинекология. – 2014. – № 10. – С. 95–103.

39. Роговская, С.И. Ведение пациенток с легкой цервикальной дисплазией. Возможности аргонплазменной абляции / С.И. Роговская, А.В. Ледина, Т.Н. Бебнева, А.Х. Гайдарова // Доктор.Ру. –2016. № 8 (125) – 9 (126). – С. 11–15.

40. Роль ВПЧ-тестирования и генотипирования в диагностике цервикальных интраэпителиальных неоплазий / Е.В. Комарова [и др.] // Медицина критических состояний. – 2010. – № 1. – С. 26–29.

41. Сычева, Е.Г. «Малые» формы поражения шейки матки, ассоциированные с вирусом папилломы человека: диагностика, мониторинг,

прогноз / Е.Г. Сычева, Н.М. Назарова, В.Н. Прилепская, О.В. Бурменская // Акушерство и гинекология. – 2017. – № 9. – С. 28–33.

42. Титмуш, Э. Шейка матки. Цитологический атлас / Э. Титмуш, К. Адамс ; пер. с англ. Н.И. Кондрикова. – Москва : Практическая медицина, 2009.

43. Течение беременности и родов у пациенток, ранее перенесших патологию, ассоциированную с вирусом папилломы человека / О.В. Качалина, Т.С. Качалина, Г.А. Вахабова // Акушерство и гинекология. -2018.- № 7. -С. 62-66.

44. Трушина, О.И. Фотодинамическая терапия: новый подход в лечении ВПЧ-ассоциированной патологии шейки матки / О.И. Трушина, Е.Г. Новикова // Акушерство и гинекология. – 2015. – № 1. – С. 79–84.

45. Федеральный закон «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации» от 21.11.2011 No323-ФЗ.

46. Фролова, Н.И. Эпидемиология и структура заболеваний шейки матки у студенток вуза / Н.И. Фролова, Т.Е. Белокриницкая, Н.Г. Геворгян // Доктор.Ру. – 2014. – № 1(89). – Р. 20–24.

47. Цервикальные интраэпителиальные неоплазии: анализ профиля мРНК в практике жидкостной цитологии / Н.В. Мельникова, В.К. Боженко, И.Б. Антонова, Н.А. Бабаева, Н.Ю. Яровая, Н.А. Болотина, М.В. Захаренко, А.Л. Сенчукова, Н.Б. Акопова, Н.В. Александрова, О.В. Бурменская, Л.А. Ашрафян // Акушерство и гинекология. – 2017. – № 4. – С. 95–100.

48. Цитология жидкостная и традиционная при заболеваниях шейки матки / под ред. И.П. Шабаловой, К.Т. Касоян. – Москва : Триада, 2015. – 316 с.

49. Экспрессия генов раннего ответа в опухолевой ткани – маркер развития ранних форм рака шейки матки / П.И. Ковчур, И.Е. Бахлаев, О.В. Курмышкина, Т.О. Волкова, А.Н. Полторак // Вопросы онкологии : материалы VIII Всерос. съезда онкологов. Т. II. Приложение к № 3. – 2013. – Т. 59. – С. 728–729.

50. A comparative study of conventional and liquid-based cervical cytology / M.Ş. Budak, M.B. Senturk, C. Kaya, S. Akgol, M.H. Bademkiran, A.E. Tahaoğlu [et al.] // Ginekol. Pol. – 2016. – Vol. 87, № 3. – P. 190–193.

51. A study of HPV typing for the management of HPV-positive ASC-US cervical cytologic results / M. Schiffman, L.M. Vaughan, T.R. Raine-Bennett [et al.] // *Gynecol. Oncol.* – 2015. – № 138. – P. 573–578.

52. Aberrant expression of the cell polarity regulator aPKC λ /1 is associated with disease progression in cervical intraepithelial neoplasia (CIN): a possible marker for predicting CIN prognosis / T. Mizushima, M. Asai-Sato, K. Akimoto [et al.] // *Int. J. Gynecol. Pathol.* – 2016. – № 35(2). – P. 106–117.

53. An, H.T. α -Actinin-4 induces the epithelial-to-mesenchymal transition and tumorigenesis via regulation of Snail expression and β -catenin stabilization in cervical cancer / H.T. An, S. Yoo, J. Ko // *Oncogene*. – 2016. – Nov. 10. – № 35 (45). – P. 5893–5904.

54. Apoptotic activity of MeCP2 is enhanced by C-terminal truncating mutations / A.A. Williams, V.J. Mehler, C. Mueller, F. Vonhoff, R. White, C. Duch // *PLoS One*. – 2016. – № 11 (7). – P. e 0159632. – DOI 10.1371/journal.pone. 0159632. PMID: 27442528

55. Argüelles S, Guerrero-Castilla A, Cano M, Muñoz MF, Ayala A. Advantages and disadvantages of apoptosis in the aging process. *Ann N Y Acad Sci*. 2019 May;1443(1):20-33. doi: 10.1111/nyas.14020. Epub 2019 Mar 6. PMID: 30839127

56. Attitudes and factors affecting acceptability of self-administered cervicovaginal sampling for human papillomavirus (HPV) genotyping as an alternative to Pap testing among multiethnic Malaysian women / M. Ma'som, N. Bhoo-Pathy, N.H. Nasir, J. Bellinson, S. Subramaniam, Y. Ma // *BMJ Open*. – 2016. – Vol. 6, № 8. – P. 11–22.

57. Binase treatment increases interferon sensitivity and apoptosis in SiHa cervical carcinoma cells by downregulating E6 and E7 human papilloma virus oncoproteins / V.A. Mitkevich, K.M. Burnysheva, I.Yu. Petrushanko, A.A. Adzhubei, A.A. Schulga, P.M. Chumakov, A.A. Makarov // *Oncotarget*. – 2017. – № 8. – P. 72666–72675.

58. Brief Report: Interleukin-38 Exerts Antiinflammatory Functions and Is Associated With Disease Activity in Systemic Lupus Erythematosus / I. Rudloff,

J. Godsell, Nold-Petry Claudia A., James Harris, A. Hoi, E. F. Morand, Marcel F. Nold // *Arthritis & Rheumatology*. – 2016. – № 67(12). – P. 3219–3225.

59. Burd, E.M. Human papillomavirus laboratory testing: the changing paradigm / E.M. Burd // *Clin. Microbiol. Rev.* – 2016. – Vol. 29, № 2. – P. 291–319.

60. Candidate biomarkers in the cervical vaginal fluid for the (self-)diagnosis of cervical precancer / X. Van Ostade, M. Dom, W. Tjalma, G. Van Raemdonck // *Arch. Gynecol. Obstet.* – 2018. – Feb. – № 297(2). – P. 295–311. – DOI 10.1007/s00404-017-4587-2 (Epub2017Nov15).

61. Castle, P.E. Prophylactic HPV vaccination: past, present, and future / P.E. Castle, M. Maza // *Epidemiol. Infect.* – 2016. – Vol. 144, № 3. – P. 449–468.

62. Cell cycle- and cancer-associated gene networks activated by Dsg2: evidence of cystatin A deregulation and a potential role in cell-cell adhesion / A. Gupta, D. Nitoiu, D. Brennan-Crispi, S. Addya, N.A. Riobo, D.P. Kelsell, M.G. Mahoney // *PLoS One*. – 2015. – Mar. 18. – № 10 (3). – P. e 0120091.

63. Cells of human immortalized keratinocytes / V. Domínguez-Catzín, A.M. Reveles-Espinoza, J. Sánchez-Ramos, R. Cruz-Cadena, D. Lemus-Hernández, E. Garrido // *Virol. J.* – 2017. – Apr. 3. – № 14 (1). – P. 65.

64. Changes in activities of caspase-8 and caspase-9 in human cervical malignancy / M.T. Ekonomopoulou, E. Babas, E. Mioglou-Kalouptsi [et al.] // *Int. J. Gynecol. Cancer*. – 2011. – Vol. 21(3). – P. 435–438.

65. Chen, K. Excellent analytical and clinical performance of a dry self-sampling device for human papillomavirus detection in an urban Chinese referral population / K. Chen, Y. Ouyang, P. Hillemanns, M.J. Jentschke // *J. Obstet. Gynaecol. Res.* – 2016. – Vol. 42, № 12. – P. 1839–1845.

66. Cheng, X. Apoptosis propagates through the cytoplasm as trigger waves / X. Cheng, J.E. Jr. Ferrell // *Science*. – 2018. – Vol. 361 (6402). – P. 607–612. –DOI 10.1126/science.aah4065

67. Choudhary GS, Al-Harbi S, Almasan A. Caspase-3 activation is a critical determinant of genotoxic stress-induced apoptosis. *Methods Mol Biol.* 2015;1219:1-9. doi: 10.1007/978-1-4939-1661-0_1. PMID: 25308257.

68. Cigarette smoke causes caspase-independent apoptosis of bronchial epithelial cells from asthmatic donors / F. Bucchieri, M. Gammazza, A.A. Pitruzzella, A. Fucarino, F. Farina, P. Howarth, S.T. Holgate, G. Zummo, D.E. Davies // *PLoS One*. – 2015. – № 10 (3). – P. e 0120510. – DOI 10.1371/journal.pone.0120510. PMID: 25793769
69. Clifford, G. The burden of HPV associated cancers in men and women / G. Clifford, S. Franceschi, M. Plummer, C. De Martel // *Eurogin 2016. Abstracts. Part 1. Main conference program*. – P. 2–3.
70. Clinical performance of hybrid capture 2 human papillomavirus testing for recurrent highgrade cervical / A.D. De Vivar, M. Dawlett, J.P. Wang [et al.] // *Arch. Pathol. Lab. Med.* – 2015. – Feb. – № 139(2). – P. 219–224.
71. Common filaggrin gene mutations and risk of cervical cancer / P. Bager, J. Wohlfahrt, E. Sørensen, H. Ullum, C.K. Høgdaal, C. Palle, L.L. Husemoen, A. Linneberg, S.K. Kjaer, M. Melbye, J.P. Thyssen // *Acta Oncol.* – 2015. – Feb. – № 54(2). – P. 217–223.
72. Community-randomised controlled trial embedded in the Anishinaabek Cervical Cancer Screening Study: human papillomavirus self-sampling versus Papanicolaou cytology / I. Zehbe, R. Jackson, B. Wood, B. Weaver, N. Escott, A. Severini // *BMJ Open*. – 2016. – Vol. 6, № 10. – P. 117–154.
73. Cooper KF. Till Death Do Us Part: The Marriage of Autophagy and Apoptosis. *Oxid Med Cell Longev*. 2018 May 8;2018:4701275. doi: 10.1155/2018/4701275. PMID: 29854084; PMCID: PMC5964578.
74. Crowley LC, Waterhouse NJ. Detecting Cleaved Caspase-3 in Apoptotic Cells by Flow Cytometry. *Cold Spring Harb Protoc*. 2016 Nov 1;2016(11). doi: 10.1101/pdb.prot087312. PMID: 27803251.
75. CD4(+)CD25high regulatory T-cell frequency correlates with persistence of human papillomavirus type 16 and T helper cell responses in patients with cervical intraepithelial neoplasia / J.W. Molling, T.D. de Gruijl, J. Glim [et al.] // *Int. J. Cancer*. – 2007. – Vol. 121(8). – P. 1749–1755.

76. D'Arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol Int.* 2019 Jun;43(6):582-592. doi: 10.1002/cbin.11137. Epub 2019 Apr 25. PMID: 30958602.

77. De Sanjose, S. MTC 01-02: The state of the art of HPV epidemiology, cervical vs oral / S. De Sanjose // *Eurogin 2016. Abstracts. Part 1. Main conference program.* – P. 4–5.

78. Death receptors and ligands in cervical carcinogenesis: an immuno-histochemical study / N. Reesink-Peters, B.M. Hougardy, F.A. van den Heuvel [et al.] // *Gynecol. Oncol.* – 2005. – Vol. 96(3). – P. 705–713.

79. Delou JM, Biasoli D, Borges HL. The Complex Link between Apoptosis and Autophagy: a Promising New Role for RB. *An Acad Bras Cienc.* 2016 Oct-Dec;88(4):2257-2275. doi: 10.1590/0001-3765201620160127. PMID: 27991962.

80. Diagnostic implications of L1, p16, and Ki-67 proteins and HPV DNA in low-grade cervical intraepithelial neoplasia / L.B. Gatta, A. Berenzi, P. Balzarini, E. Dessy, F. Angiero, G. Alessandri // *J. Gynecol. Pathol.* – 2011. – Vol. 30 (6). – P. 597–604.

81. Differentially expressed proteins among normal cervix, cervical intraepithelial neoplasia and cervical squamous cell carcinoma / Q. Zhao, Y. He, X.L. Wang, Y.X. Zhang, Y.M. Wu // *Clin. Transl. Oncol.* – 2015. – Aug. – № 17(8). – P. 620–631.

82. Direct comparison of two vaginal self-sampling devices for the detection of human papillomavirus infections / M. Jentschke, K. Chen, M. Arbyn, B. Hertel, M. Noskowicz, P. Soergel, P.J. Hillemanns // *Clin. Virol.* – 2016. – № 82. – P. 46–50.

83. Doorbar, J. Human papillomavirus molecular biology and disease association / J. Doorbar, N. Egawa, H. Griffin, C. Kranjec, I. Murakami // *Rev. Med. Virol.* – 2015. – Vol. 25(suppl.1). – P. 22–23. – DOI 10.1002/rmv.1822

84. Efficacy of self-sampling in promoting participation to cervical cancer screening also in subsequent round / A. Del Mistro, H. Frayle, A. Ferro, G. Fantin, E. Altobelli, P. Giorgi Rossi // *Prev. Med. Rep.* – 2016. – №. 5. – P. 166–168.

85. Evaluation of the impact of human papillomavirus DNA self-sampling on the Uptake of Cervical Cancer Screening / E.L.Y. Wong, K.S. Chan Paul, J.S.Y. Chor, A.W.L. Cheung, F. Huang, S.Y.S. Wong // *Cancer Nurs.* – 2016. – Vol. 39, № 1. – P. 1–11.

86. Explanation and use of the colposcopy terminology of the IFCPC (International Federation for Cervical Pathology and Colposcopy) Rio 2011 / J. Quaas [et al.] // *Geburtshilfe Frauenheilkd.* – 2013. – № 73 (9). – P. 901–907.

87. Expression of FasL in squamous cell carcinomas of the cervix and cervical intraepithelial neoplasia and its role in tumor escape mechanism / R. Ibrahim, H. Frederickson, A. Parr [et al.] // *Cancer.* – 2006. – Vol. 106 (5). – P. 1065–1077.

88. Follow up in women with biopsy diagnosis of cervical low-grade squamous intraepithelial lesion (LSIL): how long should it be? / A. Ciavattini, N. Clemente, D. Tsiroglou, F. Sopracordevole, M. Serri, G. Delli Carpini [et al.] // *Arch. Gynecol. Obstet.* – 2017. – Vol. 295, № 4. – P. 997–1003.

89. Functional significance of transgelin-2 in uterine cervical squamous cell carcinoma / K. Yakabe, A. Murakami, T. Kajimura // *J. Obstet. Gynaecol. Res.* – 2016. – № 42(5). – P. 566–572.

90. Gene signature based on degradome-related genes can predict distal metastasis in cervical cancer patients / J. Fernandez-Retana, H. Zamudio-Meza, M. Rodriguez-Morales, A. Pedroza-Torres, D. Isla-Ortiz, L. Herrera, N. Jacobo-Herrera, O. Peralta-Zaragoza, C. LópezCamarillo, F. Morales-Gonzalez, D. Cantu de Leon, C. Pérez-Plasencia // *Tumour Biol.* – 2017. – Jun. – № 39 (6).

91. Genotyping for human papillomavirus types 16 and 18 in women with minor cervical lesions: a systematic review and meta-analysis / M. Arbyn, L. Xu, F. Verdoodt, J. Cuzick, A. Szarewski, J.L. Belinson // *Ann. Intern. Med.* – 2017. – Vol. 166, № 2. – P. 118–127.

92. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries / F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram [et al.] // *CA Cancer J. Clin.* – 2018. – № 68 (6). – P. 394–424.

93. Guo Y, Tan J, Miao Y, Sun Z, Zhang Q. Effects of Microvesicles on Cell Apoptosis under Hypoxia. *Oxid Med Cell Longev*. 2019 Apr 17;2019:5972152. doi: 10.1155/2019/5972152. PMID: 31178970; PMCID: PMC6501227.
94. Hammad, H. Barrier epithelial cells and the control of type 2 immunity / H. Hammad, B.N. Lambrecht // *Immunity*. – 2015. – Vol. 43. – P. 29–40.
95. Hernández-Hernández, D.M. Epidemiological overview of uterine cervical cancer / D.M. Hernández-Hernández, T. Apresa-García, R.M. Patlán-Pérez // *Rev. Med. Inst. Mex. Seguro. Soc.* – 2015. – № 53 (suppl. 2). – P. 154–161.
96. HPV Infection and Prognostic Factors of Tongue Squamous Cell Carcinoma in Different Ethnic Groups from Geographically Closed Cohort in Xinjiang, China / H. Zhang, Y. Zhang, H. Zhao, H. Niyaz, P. Liu, L. Zhang, S. Zhang, Y. Rehemani, Y. Bao, X. Chen // *Biochem Res. Int.* – 2016. – DOI 10.1155/2016/ 7498706
97. HPV+ cervical carcinomas and cell lines display altered expression of caspases / E. Aréchaga-Ocampo, A.L. Pereira-Suárez, O. del Moral-Hernández [et al.] // *Gynecol. Oncol.* – 2008. – Vol. 108 (1). – P. 10–18.
98. Hsu, H. The TNF Receptor 1-Associated Protein TRADD Signals Cell Death and NF- κ B Activation / H. Hsu, J. Xiong, D.V. Goeddel // *Cell*. – 1995. – Vol. 81. – P. 495–504.
99. Hu, D.Y. IL-2 Prevents Deletion of Developing T-Regulatory Cells in the Thymus / D.Y. Hu, R.C. Wirasinha, C.C. Goodnow, S.R. Daley // *Cell Death Differ.* – 2017. – Vol. 24. – P. 1007–1016.
100. Huber KL, Serrano BP, Hardy JA. Caspase-9 CARD:core domain interactions require a properly formed active site. *Biochem J*. 2018 Mar 29;475(6):1177-1196. doi: 10.1042/BCJ20170913. PMID: 29500231; PMCID: PMC5878146.
101. Human leukocyte antigen class I, MHC class I chain-related molecule A, and CD8+ regulatory T-cell ratio: which variable determines survival of cervical cancer patients? / E.S. Jordanova, A. Gorter, O. Ayachi [et al.] // *Clin. Cancer Res.* – 2008. – Vol. 14 (7). – P. 2028–2035.

102. Human papillomavirus genotypes associated with cervical precancerous lesions and cancer in the highest area of cervical cancer mortality, Longnan, China / J. Zhao, Z. Guo, Q. Wang, T. Si, S. Pei, C. Wang // *Infect. Agent. Cancer.* – 2017. – № 12. – P. 8.

103. ICO Information Centre on HPV and Cancer. Human papillomavirus and related diseases in the world / L. Bruni, L. Barrionuevo-Rosas, G. Albero, B. Serrano, M. Mena, D. Gómez // *Summary Report.* – 2016. – Dec. 15. – 310 p.

104. Identification of protein biomarkers for cervical cancer using human cervicovaginal fluid / G.A. Van Raemdonck [et al.] // *PLoS One.* – 2014. – Sep. 12. – Vol. 9 (9). – P. e106488. – DOI 10.1371/journal.pone.0106488. eCollection 2014

105. Imiquimod treatment effectively reduces the percentage of viable cells in a cervical carcinomacell line but does not affect the expression of HLA-G or OCT-4 / K. Stefanidis, J. Patta, V. Pergialiotis [et al.] // *J. Stem Cells.* – 2015. – № 10 (4). – P. 217–223.

106. iTRAQ-based quantitative proteomic analysis of cervical cancer / Y. Ding, M. Yang, S. She, H. Min, X. Xu, X. Ran, Y. Wu, W. Wang, L. Wang, L. Yi, Y. Yang, Q. Gao // *Int. J. Oncol.* – 2015. – Apr. – № 46 (4). – P. 1748–1758.

107. Kang, W.D. Is human papillomavirus genotype important in predicting disease progression in women with biopsy-proven negative or CIN1 of atypical squamous cell of undetermined significance (ASC-US) cytology? / W.D. Kang, U.C. Ju, S.M. Kim // *Gynecol. Oncol.* – 2018. – № 148 (2). – P. 305–310.

108. Kim, Y.S. Clinical progress of human papillomavirus genotypes and their persistent infection in subjects with atypical squamous cells of undetermined significance cytology: Statistical and latent Dirichlet allocation analysis / Y.S. Kim, S. Lee, N. Zong, J. Kahng // *Exp. Ther. Med.* – 2017. – Vol. 13, № 6. – P. 3032–3038.

109. L-37 requires the receptors IL-18R α and IL-1R8 (SIGIRR) to carry out its multifaceted anti-inflammatory program upon innate signal transduction / C.A. Nold-Petry, C.Y. Lo, I. Rudloff, K.D. Elgass, S. Li, M.P. Gantier, A.S. Lotz-Havla, S.W. Gersting, S.X. Cho, J.C. Lao [et al.] // *Nat. Immunol.* – 2015. – Vol. 16, № 4. – P. 354–365.

110. Li P, Zhou L, Zhao T, Liu X, Zhang P, Liu Y, Zheng X, Li Q. Caspase-9: structure, mechanisms and clinical application. *Oncotarget*. 2017 Apr 4;8(14):23996-24008. doi: 10.18632/oncotarget.15098. PMID: 28177918; PMCID: PMC5410359.

111. Lorenzi, A.T. Human papillomavirus (HPV) screening and cervical cancer burden. A Brazilian perspective / A.T. Lorenzi, K.J. Syrjänen, A. Longatto-Filho // *Virol. J.* – 2015.

112. Lowy, D.R. HPV vaccination to prevent cervical cancer and other HPV-associated disease: from basic science to effective interventions / D.R. Lowy // *J. Clin. Invest.* – 2016. – № 126 (1). – P. 5–11.

113. Malate dehydrogenase-2 inhibitor LW6 promotes metabolic adaptations and reduces proliferation and apoptosis in activated human T-cells / T. Eleftheriadis, G. Pissas, G. Antoniadi, V. Liakopoulos, I. Stefanidis // *Exp. Ther. Med.* – 2015. – № 10 (5). – P. 1959–1966. – DOI 10.3892/etm.2015.2763. PMID: 26640580

114. Management of atypical squamous cells of undetermined significance or lowgrade squamous intraepithelial lesions of the uterine cervix with human papilloma virus infection among young women aged less than 25 years / K.J. Ryu, S. Lee, K.J. Min, J.H. Hong, J.Y. Song, J.K. Lee, N.W. Lee // *Diagn. Cytopathol.* – 2016. – Dec. – № 44(12). – P. 959–963.

115. Molecular Mechanisms of Cell Death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018 / L. Galluzzi, I. Vitale, S.A. Aaronson, J.M. Abrams, D. Adam, P. Agostinis, E.S. Alnemri, L. Altucci, I. Amelio, D.W. Andrews // *Cell Death Differ.* – 2018. – Vol. 25, № 3. – P. 486–541.

116. mRNA biomarker detection in liquid-based cytology: a new approach in the prevention of cervical cancer / M. Del Pino, C. Svanholm-Barrie, A. Torné, L. Marimon, J. Gaber, A. Sagasta [et al.] // *Mod. Pathol.* – 2015. – Vol. 28(2). – P. 312–320. – DOI 10.1038/modpathol.2014.106

117. Oh, H.Y. Association of combined tobacco smoking and oral contraceptive use with cervical intraepithelial neoplasia 2 or 3 in Korean women / H.Y. Oh, M.K. Kim, S. Seo, J.K. Lee // *J. Epidemiol.* – 2016. – № 26(1). – P. 22–29. – DOI 10.2188/jea.JE20150047

118. Olaniyan, O.B. Validity of colposcopy in the diagnosis of early cervical neoplasia : a review / O.B. Olaniyan // *Afr. J. Reprod. Health.* – 2002. – Vol. 6 (3). – P. 59–69.

119. Pap-test accuracy and severity of squamous intraepithelial lesion / R. Cobucci, M. Maissonnette [et al.] // *Indian J. Cancer.* – 2016. – № 53 (1). – P. 74–76.

120. Patel, S. Host immune responses to cervical cancer / S. Patel, S. Chiplunkar // *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* – 2009. – Vol. 21 (1). – P. 54–59.

121. Pistritto G, Trisciuglio D, Ceci C, Garufi A, D'Orazi G. Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging (Albany NY)*. 2016 Apr;8(4):603-19. doi: 10.18632/aging.100934. PMID: 27019364; PMCID: PMC4925817.

122. Potential therapeutic effect of the secretome from human uterine cervical stem cells against both cancer and stromal cells compared with adipose tissue stem cells / N. Eiró, J. Sendon-Lago, S. Seoane [et al.] // *Oncotarget.* – 2014. – № 5(21). – P. 10692–10708.

123. Prevalence of human papillomavirus infection and genotyping for population-based cervical screening in developed regions in China / Y. Zhang, Y. Wang, L. Liu, C. Guo, Z. Liu, S. Nie // *Oncotarget.* – 2016. – Vol. 7, № 38. – P. 62411–62424.

124. Prognostic significance of annexin A2 and annexin A4 expression in patients with cervical cancer / C.H. Choi, J.Y. Chung, E.J. Chung, J.D. Sears, J.W. Lee, D.S. Bae, S.M. Hewitt // *BMC Cancer.* – 2016. – Jul. 11. – № 16. – P. 448.

125. Progression of naive intraepithelial neoplasia genome to aggressive squamous cell carcinoma genome of uterine cervix / S.H. Jung, Y.J. Choi, M.S. Kim [et al.] // *Oncotarget.* – 2015. – № 6 (6). – P. 4385–4393.

126. Proteomic identification of potential biomarkers for cervicalsquamous cell carcinoma and human papillomavirus infection / S. Qing, W. Tulake, M. Ru, X. Li, R. Yuemaier, D. Lidifu, A. Rouzibilali, A. Hasimu, Y. Yang, R. Rouziahong, H. Upur, A. Abudula // *Tumour Biol.* – 2017. – Apr. – № 39 (4).

127. Qin J, Ning H, Zhou Y, Hu Y, Huang B, Wu Y, Huang R. LncRNA Uc.173 is a key molecule for the regulation of lead-induced renal tubular epithelial cell apoptosis. *Biomed Pharmacother.* 2018 Apr;100:101-107. doi: 10.1016/j.biopha.2018.01.112. Epub 2018 Feb 6. PMID: 29425744.

128. Regulatory (FOXP3+) T cells as target for immune therapy of cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer / C. Loddenkemper, C. Hoffmann, J. Stanke [et al.] // *Cancer Sci.* – 2009. – Vol. 100 (6). – P. 1112–1117.

129. Remodeling of extracellular matrix by normal and tumor-associated fibroblasts promotes cervical cancer progression / A. Fullár, J. Dudás, L. Oláh, P. Hollósi, Z. Papp, G. Sobel, K. Karászi, S. Paku, K. Baghy, I. Kovalszky // *BMC Cancer.* – 2015. – Apr. 11. – № 15. – P. 256.

130. Remschmidt, C. Sexual behavior and factors associated with young age at first intercourse and HPV vaccine uptake among young women in Germany: implications for HPV vaccination policies / C. Remschmidt, M. Fesenfeld, A.M. Kaufmann, Y. Deleré // *BMC Public Health.* – 2014. – Vol. 14. – P. 1248. – DOI 10.1186/1471-2458-14-1248

131. Risk stratification using human papillomavirus testing among women with equivocally abnormal cytology: results from a state-wide surveillance program / J.C. Gage, W.C. Hunt, M. Schiffman, H.A. Katki, L.C. Cheung, J. Cuzick // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* – 2016. – Vol. 25, № 1. – P. 36–42.

132. ROCK1 but Not LIMK1 or PAK2 Is a Key Regulator of Apoptotic Membrane Blebbing and Cell Disassembly / R. Tixeira, T.K. Phan, S. Caruso, B. Shi, G.K. Atkin-Smith, C. Nedeva, J.D.Y. Chow, H. Puthalakath, M.D. Hulett, M.J. Herold, I.K.H. Poon // *Cell Death Differ.* – 2019. – P. 1–15. – URL: <https://www.nature.com/articles/s41418-019-0342-5>

133. Schmidt, D. Modern biomarkers for precancerous lesions of the uterine cervix: Histological-cyological correlation and use / D. Schmidt // *Pathologe.* – 2016. – Sep. 15.

134. Skinner, S.R. Progression of HPV infection to detectable cervical lesions or clearance in adult women: Analysis of the control arm of the VIVIANE study / S.R.

Skinner, C.M. Wheeler, B. Romanowski // *Int. J. Cancer.* – 2016. – May 15. – № 138 (10). – P. 2428–2438.

135. Simon, A.K. Evolution of the immune system in humans from infancy to old age [Text] / A.K. Simon, G.A. Hollander, A. McMichael // *Proc Biol Sci.*—2015.—Dec 22;282(1821):20143085. doi: 10.1098/rspb.2014.3085

136. Stavrou M, Philip B, Traynor-White C, Davis CG, Onuoha S, Cordoba S, Thomas S, Pule M. A Rapamycin-Activated Caspase 9-Based Suicide Gene. *Mol Ther.* 2018 May 2;26(5):1266-1276. doi: 10.1016/j.ymthe.2018.03.001. Epub 2018 Mar 9. PMID: 29661681; PMCID: PMC5993966.

137. Study protocol of the CHOICE trial: a three-armed, randomized, controlled trial of home-based HPV self-sampling for non-participants in an organized cervical cancer screening program / M. Tranberg, B.H. Bech, J. Blaaker, J.S. Jensen, H. Svanholm, B. Andersen // *BMC Cancer.* – 2016. – Vol. 16, № 1. – P. 835.

138. The Impact of Triage for Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance with Human Papillomavirus Testing in Cervical Cancer Screening in Japan / H. Fujiwara, M. Suzuki, H. Morisawa [et al.] // *Asian Pac. J. Cancer Prev.* – 2019. – № 20 (1).

139. Triggering of death receptor apoptotic signaling by human papillomavirus 16 E2 protein in cervical cancer cell lines is mediated by interaction with c-FLIP / W. Wang, Y. Fang, N. Sima [et al.] // *Apoptosis.* – 2011. – Vol. 16 (1). – P. 55–66.

140. Villanova L, Careccia S, De Maria R, Fiori ME. Micro-Economics of Apoptosis in Cancer: ncRNAs Modulation of BCL-2 Family Members. *Int J Mol Sci.* 2018 Mar 23;19(4):958. doi: 10.3390/ijms19040958. PMID: 29570632; PMCID: PMC5979352.

141. Wang Y, Zhong J, Bai J, Tong R, An F, Jiao P, He L, Zeng D, Long E, Yan J, Yu J, Cai L. The Application of Natural Products in Cancer Therapy by Targeting Apoptosis Pathways. *Curr Drug Metab.* 2018;19(9):739-749. doi: 10.2174/1389200219666180511154722. PMID: 29749309.

142. Wira, C.R. Sex hormone regulation of innate immunity in the female reproductive tract: the role of epithelial cells in balancing reproductive potential with

protection against sexually transmitted pathogens / C.R.Wira, J.V.Fahey, M.Ghosh [et al.]// Am. J. Reprod. Immunol.—2010.—Vol.63(6).—P.544–565

143. Women's Understanding of the Term 'Pap smear': a comparison of spanishspeaking versus english-speaking women / D.L. Howard [et al.] // Matern. Child. Health. J. – 2016. – Vol. 20, № 11. – P. 2336–2347.

144. Wu L , Hu Y , He Y , Xia Y , Lu H , Cao Z , Yi X , Wang J . Dual-channel surface plasmon resonance monitoring of intracellular levels of the p53-MDM2 complex and caspase-3 induced by MDM2 antagonist Nutlin-3. Analyst. 2019 Jul 7;144(13):3959-3966. doi: 10.1039/c9an00301k. Epub 2019 May 28. PMID: 31134974.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

Индивидуальная регистрационная карта случая

ФИО № карты		
Возраст	18–20	
	21–25	
	26–30	
	31–35	
	36–40	
	41–45	
Образование	Среднее	
	Средне-специальное	
	Неполное высшее	
	Высшее	
Профессия	Не работает	
	Рабочий	
	Служащий	
	Учащийся	
Физическое развитие	Рост	
	Вес	
Возраст и характер начала половой жизни	До 14 лет	
	15–17	
	18 и старше	
Частота половых контактов	До 2 раз в неделю	
	1 раз в неделю	
	Реже 1 раза в неделю	
	Нерегулярные	
Количество половых партнеров	1	
	2–3	
	Более 4	
Соматическая патология в анамнезе	Ожирение I–II степени	
	Ожирение III–IV степени	
	Дефицит веса	
	Заболевания нервной системы	
	Заболевания желудочно-кишечного тракта	
	Заболевания дыхательной системы	
	Анемия железодефицитная	
Оперативные вмешательства в анамнезе	Тубэктомия	

	Частичная резекция яичников	
	Аднексэктомия	
	Апендэктомия	
	Нет	
НЭС	ВДКН	
	СПКЯ	
	Гипоталамический синдром	
	Нет	
Перенесенные гинекологические	Эндометриоз	
	Кисты яичников	
	Половые инфекции (уточнить какие и когда)	
	Нет	
Возраст менархе	До 10 лет	
	11–15 лет	
	16 лет и более	
Длительность менструального цикла	21–24 дня	
	25–31 день	
	32–35 дней	
	Овуляторные кровотечения	
	Ановуляторные кровотечения	
Условия жизни	Производственная вредность	
	Статическая работа преимущественно сидя	
	Тяжелый физический труд	
	Студент	
Характер питания	Дефицит белка	
	Дефицит углеводов	
	Дефицит жиров	
	Дефицит витаминов	
Осмотр шейки в зеркалах		
	Элонгация	
	Гипертрофия	
	Разрывы после родов	
	Состояние после операции по Штурмдорфу	
Бактериологический посев	Нет роста микрофлоры	
	10^1	
	10^2	
ККИ	1 балл	
	2 балла	

	3–4 балла	
	5 баллов	
	6 баллов	
Кольпоскопия	Нормальная кольпоскопическая картина	
	Аномальная кольпоскопическая картина	
	L-SIL	
	H-SIL	
Цитологическое заключение	Без особенностей	
	Лейкоплакия шейк матки	
	Дисплазия 1	
	Дисплазия 2	
Гистологическое заключение	Лейкоплакия шейки матки	
	Дисплазия I степени	
	Дисплазия II степени	
Уровень каспазы 1		
Уровень каспазы 3		
Уровень каспазы 9		

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

Корреляционный анализ между исследуемыми показателями у пациенток с CIN I

CIN I	Возраст	Курение > 7 сигарет	Кольпо- скопия	Онко- цитология	ВПЧ (3–5lg, >5lg)	Уровень каспазы 3	Уровень каспазы 9	Половой дебют	Половые партнеры	Арт. аборт	Гист. заклю- чение
Возраст	1,0000	0,1886	0,2473	0,3486	0,5924	0,6504	0,5732	0,4382	0,4653	0,6234	0,6982
	p-----	p = 0,0513	p = 0,0001	p = 0,0536	p = 0,0004	p = 0,0005	p = 0,0004	p = 0,0001	p = 0,0004	p = 0,0002	p = 0,0003
Курение > 7 сигарет	0,1886	1,0000	0,5693	0,3918	0,4582	0,6235	0,6623	0,4593	0,6594	0,5341	0,6817
	p = 0,0513	p-----	p = 0,0002	p = 0,0003	p = 0,0002	p = 0,0003	p = 0,0002	p = 0,0004	p = 0,0005	p = 0,0004	p = 0,0002
Кольпо- скопия	0,2473	0,5693	1,0000	0,4324	0,6421	0,7123	0,7148	0,4995	0,5024	0,4365	0,4846
	p = 0,0001	p = 0,0002	p-----	p = 0,0005	p = 0,0005	p = 0,0004	p = 0,0004	p = 0,0005	p = 0,0003	p = 0,0003	p = 0,0001
Онко- цитология	0,3486	0,3918	0,4324	1,0000	0,4912	0,6023	0,6145	0,4172	0,3453	0,3165	0,4742
	p = 0,0536	p = 0,0003	p = 0,0005	p-----	p = 0,0005	p = 0,0004	p = 0,0005	p = 0,0004	p = 0,0001	p = 0,0005	p = 0,0001
ВПЧ (3–5lg, >5lg)	0,5924	0,4582	0,6421	0,4912	1,0000	0,7418	0,7113	0,6573	0,7129	0,2865	0,7188
	p = 0,0004	p = 0,0002	p = 0,0005	p = 0,0005	p-----	p = 0,0001	p = 0,0001	p = 0,0001	p = 0,0003	p = 0,0003	p = 0,0001
Уровень каспазы 3	0,6504	0,6235	0,7123	0,6023	0,7418	1,0000	0,6182	0,6742	0,6932	0,6232	0,7531
	p = 0,0005	p = 0,0003	p = 0,0004	p = 0,0004	p = 0,0001	p-----	p = 0,0001	p = 0,0004	p = 0,0001	p = 0,0005	p = 0,0001
Уровень каспазы 9	0,5732	0,6623	0,7148	0,6145	0,7113	0,6182	1,0000	0,4912	0,4839	0,6846	0,7127
	p = 0,0004	p = 0,0002	p = 0,0004	p = 0,0005	p = 0,0001	p = 0,0001	p-----	p = 0,0001	p = 0,0004	p = 0,0005	p = 0,0001

Продолжение таблицы

CIN I	Возраст	Курение	КПС	ОЦ	ВПЧ (3–5lg, >5lg)	Уровень каспазы 3	Уровень каспазы 9	Половой дебют	Половые партнеры	Арт. аборт	Гист.заклю- чение
Половой дебют	0,4382	0,4593	0,4995	0,4172	0,6573	0,6742	0,4912	1,0000	0,5672	0,4245	0,4732
	p = 0,0001	p = 0,0004	p = 0,0005	p = 0,0004	p = 0,0001	p = 0,0004	p = 0,0001	p-----	p = 0,0001	p = 0,0001	p = 0,0004
Половые партнеры	0,4653	0,6594	0,5024	0,3453	0,7129	0,6932	0,4839	0,5672	1,0000	0,3827	0,7038
	p = 0,0004	p = 0,0005	p = 0,0003	p = 0,0001	p=0,0003	p = 0,0001	p = 0,0004	p = 0,0001	p-----	p = 0,0005	p = 0,0003
Арт.аборты	0,6234	0,5341	0,4365	0,3165	0,2865	0,6232	0,6846	0,4245	0,3827	1,0000	0,6784
	p = 0,0002	p = 0,0004	p = 0,0003	p = 0,0005	p = 0,0003	p = 0,0005	p = 0,0005	p = 0,0001	p = 0,0005	p-----	p = 0,0004
Гист.заклю- чение	0,6982	0,6817	0,4846	0,4742	0, 7188	0,7531	0,7127	0,4732	0,7038	0,6784	1,0000
	p =0,0003	p =0,0002	p = 0,0001	p = 0,0001	p = 0,0001	p = 0,0001	p = 0,0001	p = 0,0004	p = 0,0003	p = 0,0004	p-----

ПРИЛОЖЕНИЕ 3

Корреляционный анализ между исследуемыми показателями у пациенток с CIN II

CIN II	Возраст	Курение	Кольпо-скопия	Онко-цитология	ВПЧ (3–5lg, >5lg)	Уровень каспазы 3	Уровень каспазы 9	Половой дебют	Половые партнеры	Арт. аборт	Гист.заключение
Возраст	1,0000	0,5231	0,4531	0,5126	0,7102	0,6862	0,7122	0,4819	0,3625	0,4529	0,7522
	p-----	p = 0,0001	p = 0,0001	p = 0,0436	p = 0,0004	p = 0,0005	p = 0,0004	p=0,2659	p=0,00003	p=0,0004	p = 0,0005
Курение	0,5231	1,0000	0,6134	0,4872	0,6539	0,7104	0,7059	0,4193	0,1827	0,6972	0,7003
	p = 0,0001	p-----	p = 0,0002	p = 0,0003	p = 0,0002	p = 0,0003	p = 0,0002	p=0,0021	p=0,1203	p=0,0005	p = 0,0002
Кольпо-скопия	0,4531	0,6134	1,0000	0,5387	0,6113	0,6146	0,6925	0,1726	0,4714	0,6824	0,5629
	p = 0,0006	p = 0,0002	p-----	p = 0,0005	p = 0,0005	p = 0,0004	p = 0,0004	p=0,1291	p=0,0005	p=0,0005	p = 0,0001
Онко-цитология	0,5126	0,4872	0,5387	1,0000	0,6824	0,6785	0,6976	0,5328	0,2837	0,6893	0,4653
	p = 0,0436	p = 0,0003	p = 0,0005	p-----	p = 0,0005	p = 0,0004	p = 0,0005	p=0,2931	p=0,0003	p=0,0005	p = 0,0001
ВПЧ (3–5LG, >5LG)	0,7102	0,6539	0,6113	0,6824	1,0000	0,7263	0,7482	0,7101	0,7049	0,6729	0,7139
	p = 0,0004	p = 0,0002	p = 0,0005	p = 0,0005	p-----	p = 0,0001	p = 0,0001	p=0,0003	p=0,0004	p=0,0003	p = 0,0001
Уровень каспазы 3	0,6862	0,7104	0,6146	0,6785	0,7263	1,0000	0,7685	0,4592	0,7128	0,5195	0,7235
	p = 0,0005	p = 0,0003	p = 0,0004	p = 0,0004	p = 0,0001	p-----	p = 0,0001	p=0,0003	p=0,0005	p=0,0005	p = 0,0001
Уровень каспазы 9	0,7122	0,7059	0,6925	0,6976	0,7482	0,7685	1,0000	0,4829	0,7219	0,6744	0,7631
	p = 0,0004	p = 0,0002	p = 0,0004	p = 0,0005	p = 0,0001	p = 0,0001	p-----	p=0,0004	p=0,0004	p=0,0003	p = 0,0001

Продолжение таблицы

CIN II	Возраст	Курение	Кольпо- скопия	Онко- цитология	ВПЧ (3–5lg, >5lg)	Уровень каспазы 3	Уровень каспазы 9	Половой дебют	Половые партнеры	Арт. аборт	Гист. заклю- чение
Половой дебют	0,4819	0,4193	0,1726	0,5328	0,7101	0,4592	0,4829	1,0000	0,5741	0,5673	0,7242
	p=0,2659	p=0,0021	p=0,1291	p=0,2931	p=0,0003	p=0,0003	p=0,0004	p-----	p=0,003	p=0,0005	p=0,0004
Половые партнеры	0,3625	0,1827	0,7291	0,2837	0,7049	0,7128	0,7219	0,5741	1,0000	0,6829	0,7379
	p=0,00003	p=0,1203	p=0,0005	p=0,0003	p=0,0004	p=0,0005	p=0,0004	p=0,003	p-----	p=0,0003	p=0,0002
Арт. аборты	0,4529	0,6972	0,6824	0,6893	0,6729	0,5195	0,6744	0,5673	0,6829	1,0000	0,5874
	p=0,0004	p=0,0005	p=0,0005	p=0,0005	p=0,0003	p=0,0005	p=0,0003	p=0,0005	p=0,0003	p-----	p=0,0003
Гист. Заклю- чение	0,7522	0,7003	0,5629	0,4653	0,7139	0,7235	0,7631	0,5478	0,6734	0,6539	1,0000
	p=0,0005	p=0,0002	p=0,0001	p=0,0001	p=0,0001	p=0,0001	p=0,0001	p=0,0003	p=0,0003	p=0,0003	p-----