

*На правах рукописи*



**Душкин Александр Дмитриевич**

**Показатели мукозального иммунитета шейки матки  
в мониторинге клинического течения и эффективности  
фотодинамической терапии папилломавирусной инфекции**

3.2.7. Аллергология и иммунология

**Автореферат**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Москва – 2022

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

**Научный руководитель:**

доктор медицинских наук

**Афанасьев Максим Станиславович**

**Официальные оппоненты:**

**Гизингер Оксана Анатольевна** – доктор биологических наук, профессор, федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов», медицинский институт, кафедра микробиологии имени В.С. Киктенко, профессор кафедры

**Шульженко Андрей Евгеньевич** – доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научный центр «Институт иммунологии»» Федерального медико-биологического агентства, отделение аллергологии и иммунотерапии, заведующий отделением

**Ведущая организация:** федеральное государственное образовательное учреждение высшего образования Астраханский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «20» декабря 2022 г. в 14:00 часов на заседании диссертационного совета ДСУ 208.001.25 при ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119991, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

С диссертацией можно ознакомиться в ЦНМБ ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (119034, г. Москва, Зубовский бульвар, д.37/1) и на сайте организации: <https://www.sechenov.ru>

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2022 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

доктор медицинских наук, профессор



**Калужин Олег Витальевич**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования.** Течение и исход заболеваний, вызванных папилломавирусами, эффективность проводимой терапии, во многом определяется состоянием иммунной реактивности организма, и прежде всего, эффективностью локальной защиты репродуктивного тракта. Изучение механизмов врожденного иммунитета является одной из актуальных проблем иммунологии. Ключевые звенья системы врожденного иммунитета – паттерн-распознающие рецепторы, одними из которых являются Toll-подобные рецепторы (TLRs). Исследования, направленные на выявление дефектов системы местного иммунитета, способствуют пониманию врожденного и клеточного иммунного ответов, а также развитию новых методов диагностики и лечения [Гизингер О.А., Радзинский В.Е., 2021].

Папилломавирусная инфекция (ПВИ) является самой распространенной инфекцией, передаваемой половым путем в мире [ВОЗ, 2020]. Несмотря на определенные успехи, достигнутые в диагностике и терапии этого заболевания, количество инфицированных не только не имеет тенденции к снижению, но и продолжает повсеместно увеличиваться. Международное агентство по исследованию рака (IARC) приводит цифру 2869 млн. Именно столько женщин, которые в группе риска по развитию рака шейки матки (РШМ) в мире на 2022 г. Вирус папилломы человека (ВПЧ) классифицируется как инфекционный агент с доказанным канцерогенным потенциалом. Главной причиной развития РШМ является ВПЧ [ВОЗ, 2020]. IARC опубликовало данные по числу новых случаев РШМ – 604 127 и смертей – 341 831 в 2020 году [ICO/IARC, 2021]. В структуре смертей от злокачественных новообразований смертность от РШМ занимает 7-е место и 3-е в структуре злокачественных новообразований у женщин [ICO/IARC, 2021]. Прогнозируемое число ежегодно выявляемых случаев РШМ к 2040 году составит 855 130 по данным IARC. В настоящее время, происходит коллаборация методов верификации проявлений ПВИ для повышения чувствительности и специфичности её диагностики. Существует множество методов диагностики ПВИ шейки матки, начиная с визуального осмотра и заканчивая молекулярно-генетическим исследованием. На этапе визуального осмотра клиницист использует оптическое оборудование с цифровым выводом сигнала. Новейшее программное обеспечение обрабатывает цифровой сигнал и помогает обнаружить патологические изменения ткани. Спектральная визуализация изображения в узких диапазонах изменения интенсивности пикселей является мощным инструментом для дифференцировки патологического процесса. Это помогает поддерживать системы мониторинга, математического моделирования, дистанционного наблюдения за состоянием пациента. Данное исследование полностью соответствует национальной и всемирной стратегии профилактики, диагностики и лечения клинических проявлений ПВИ шейки матки.

**Степень разработанности темы исследования.** Многие работы, которые посвящены изучению ВПЧ-ассоциированных заболеваний в РФ затрагивают лишь терминальные стадии, а их выявление может занимать значительные временные промежутки, что приводит к ухудшению состояния больного [Лопухов П.Д., 2018; Vriko et al., 2020]. В РФ не в полной мере решены вопросы создания полноценной системы контроля пациенток с папилломавирусной инфекцией шейки матки, учитывающие междисциплинарный характер инфекционного процесса: клинический, иммунологический, морфологический и другие. В настоящее время диагностика предраковых изменений и РШМ базируется на молекулярно-генетической верификации ВПЧ полимеразной цепной реакции, а также патоморфологической оценке методами: жидкостной цитологией и/или гистологическом исследовании. Однако данные исследования базируются на уже фактических изменениях эпителиального пласта и не могут использоваться для прогноза течения ПВИ шейки матки. Применение иммунологических маркеров в комбинации с клинико-морфологическими и показателями цифрового анализа кольпоскопических изображений дает возможность определить состояние шейки матки при различной степени выраженности ПВИ и выявить специфическое соотношение показателей маркеров врожденного иммунитета, вирусной инфекции и клинико-морфологических характеристик, полученных методом математического прогнозирования с использованием машинного обучения. Таким образом, дальнейшее исследование особенностей течения папилломавирусной инфекции шейки матки и разработка методик мониторинга дает возможность для оптимизации лечебно-диагностических протоколов ПВИ шейки матки.

Все вышеизложенное позволило сформулировать цель и задачи настоящего исследования.

**Цель работы:** изучить маркёры мукозального иммунитета у больных папилломавирусной инфекцией шейки матки и возможность их использования для прогнозирования возникновения и течения этого заболевания, а также оценки эффективности фотодинамической терапии.

**Задачи исследования:**

1. Определить и сравнить экспрессию мРНК TLR2, TLR3, TLR4 и TLR8 в мазке-соскобе с экзоцервикса у больных ПВИ шейки матки с разной степенью плоскоклеточных интраэпителиальных поражений.
2. Определить и сравнить характер инфильтрации экзоцервикса лимфоидными клетками и нейтрофилами, а также число лейкоцитов в цервикальном секрете и периферической крови у больных ПВИ шейки матки с разной степенью плоскоклеточных интраэпителиальных поражений.
3. Выявить зависимость площади поражения экзоцервикса у больных ПВИ шейки матки по данным йодной пробы Шиллера с последующей цифровой обработкой кольпоскопических картин от степени интраэпителиального поражения.

4. У больных ПВИ шейки матки выявить и охарактеризовать корреляционные связи между экспрессией мРНК TLR2, TLR3, TLR4 и TLR8 в мазке-соскобе с экзоцервикса, вирусной нагрузкой, числом лейкоцитов в цервикальном секрете, площадью поражения эпителия экзоцервикса по данным йодной пробы Шиллера с цифровой обработкой кольпоскопических картин, числом нейтрофилов и моноцитов периферической крови.

5. Выявить анамнестические, клинико-диагностические и лабораторные (с фокусом на показатели врожденного мукозального иммунитета) признаки, влияющие на характер течения ПВИ шейки матки, которые могут учитываться при математическом прогнозировании этого заболевания.

6. Разработать математическую модель клинического течения ПВИ шейки матки на основе классифицирующих уравнений для прогноза заражения ВПЧ, возникновения и прогрессирования плоскоклеточного интраэпителиального поражения и развития РШМ.

7. Оценить эффективность фотодинамической терапии (ФДТ) у больных ПВИ по вирусологическим и цитологическим критериям в зависимости от исходной степени плоскоклеточного интраэпителиального поражения шейки матки.

8. Определить динамику концентрации IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-4, IFN- $\alpha$ , TNF- $\alpha$  и sIgA в цервикальном секрете, а также экспрессии мРНК TLR2, TLR3, TLR4 и TLR8 в мазке-соскобе с экзоцервикса через 2 часа после сеанса ФДТ.

**Научная новизна.** Исследована экспрессия мРНК TLR2, TLR3, TLR4 и TLR8 на поверхности эпителиоцитов шейки матки, число лейкоцитов в цервикальном секрете, расширенной лейкоцитарной формулы общего анализа крови; степень инфильтрации и морфологического типа клеток лимфоидного ряда и нейтрофилов, инфильтрирующих ткань шейки матки; цифровое интегральное значения поверхности шейки матки, отражающего площадь поражения эпителия экзоцервикса по данным уксусной и йодной проб в соответствии с клинической формой папилломавирусной инфекцией. Установлена их статистическая значимость как объективных предикторов клинических форм ПВИ шейки матки. Проведена оценка состояния мукозального иммунитета шейки матки при урогенитальной инфекции (патент РФ № 2715618), выраженности инфекционного процесса при урогенитальной инфекции (патент РФ № 2715626) и разработан способ прогнозирования течения урогенитальной инфекции с помощью экспрессии мРНК TLR2, TLR3, TLR4 и TLR8 на поверхности эпителиоцитов шейки матки (патент РФ № 2720135).

Рассчитана математическая модель прогнозирования течения клинических форм папилломавирусной инфекции с использованием клинико-эпидемиологических показателей (возраст, начало половой жизни), уровня экспрессии мРНК TLR2, TLR3, TLR4 и TLR8 на поверхности эпителиоцитов шейки матки, числа лейкоцитов в цервикальном секрете,

расширенной лейкоцитарной формулы общего анализа крови, значений цифрового интегрального значения поверхности шейки матки с использованием логистической регрессии.

Впервые разработан оригинальный метод цифровой количественной оценки изображения аномальных кольпоскопических картин при ПВИ шейки матки с использованием уксусной пробы (патент на изобретение РФ № 2758330).

Отдельно изучена экспрессия мРНК TLR2, TLR3, TLR4 и TLR8, концентрации IL-1 $\beta$ , IL-4, IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , sIgA и числа лейкоцитов в цервикальном секрете до и после фотодинамической терапии шейки матки *in vivo*. Обоснована значимость фотодинамической терапии как иммуномодулирующего метода лечения папилломавирусной инфекции шейки матки в онкогинекологии. Разработан протокол проведения ФДТ для эрадикации ВПЧ и злокачественной трансформации эпителиальных клеток шейки матки. Дополнительно выполнена оценка влияния фотодинамической терапии шейки матки на эрадикацию вируса папилломы человека и остановку злокачественной трансформации эпителиальных клеток шейки матки в соответствии с клинической формой ПВИ более чем для 1000 пациенток.

**Теоретическая и практическая значимость.** Определено, что при папилломавирусная инфекция без плоскоклеточного интраэпителиального поражения наибольший уровень экспрессии мРНК имеет TLR3. Вирусная нагрузка имеет положительную умеренную корреляцию с экспрессией мРНК TLR3 при данном состоянии.

Доказано, что папилломавирусная инфекция с легкой степенью плоскоклеточного интраэпителиального поражения имеет максимальный уровень экспрессии мРНК TLR2, TLR4 и TLR8. При угнетении экспрессии мРНК данных TLRs плоскоклеточное интраэпителиальное поражение легкой степени прогрессирует в более тяжелые формы папилломавирусной инфекции шейки матки. Для прогнозирования клинических форм папилломавирусной инфекции обоснована целесообразность применения таких показателей, как клинико-эпидемиологические (возраст, начало половой жизни), уровень экспрессии мРНК TLR2, TLR3, TLR4 и TLR8 на поверхности эпителиоцитов шейки матки, число лейкоцитов в цервикальном секрете, расширенная лейкоцитарная формула общего анализа крови, цифровое интегральное значение поверхности шейки матки.

Разработана программа ЭВМ «TLR Screen» для оценки состояния мукозального иммунитета шейки матки (свидетельство о регистрации ЭВМ № 2021681068) и устройство для скрининга патологии наружных и внутренних половых органов у женщин (патент на полезную модель №210078). Определено перспективное направление для оптимизации методик иммунологического мониторинга папилломавирусной инфекции шейки матки.

Доказано действие фотодинамической терапии на ткань шейки матки относительно эрадикации ВПЧ и остановки процесса злокачественной трансформации эпителиальных клеток

на статистически репрезентативном материале. Метод может быть рекомендован для оптимального неинвазивного лечения папилломавирусной инфекции шейки матки. Доказанная эффективность фотодинамической терапии клинических форм папилломавирусной инфекции шейки матки, обуславливает целесообразность проведения дальнейших работ по изучению эффективности и безопасности фотодинамической терапии в комбинации с другими методами лечения такими, как системная лекарственная терапия (химиотерапия, таргетная терапия, иммунотерапия), лучевая терапия, хирургическое лечение терминальных стадий рака шейки матки.

**Методология и методы исследования.** Методология работы спланирована соответственно поставленной цели и задачам исследования. Исследования, направленные на оценку уровня экспрессии мРНК TLRs эпителиоцитов шейки матки и концентрации цитокинов в цервикальном секрете методами ПЦР «real-time» совмещенным с обратной транскрипцией и иммуноферментным анализом соответственно, были проведены в лаборатории молекулярной иммунологии ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова (заведующая лабораторией – д.м.н., профессор, член-корр. РАН Свитич О.А.). Анализ полученных значений проводили на базе кафедры клинической иммунологии и аллергологии Института клинической медицины имени Н.В. Склифосовского ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (заведующий кафедрой – д.м.н., профессор, академик РАН А.В. Караулов). Лечение пациенток с различными клиническими формами ПВИ шейки матки проводилось с использованием фотодинамической терапии. Ретроспективная часть исследования основывалась на 1075 проанализированных историй болезней пациенток с различной степенью тяжести клинической формы ПВИ шейки матки с ноября 2015 по март 2022 года. Проспективная часть исследования основывалась на 122 пациентках с февраля 2021 по март 2022 года. У каждой пациентки из ретроспективной части были проанализированы клинико-эпидемиологические признаки, вирусологические признаки (ВПЧ инфекция в анамнезе, наличие кондилом, тип ВПЧ, вирусная нагрузка) и иммунологические признаки (число лейкоцитов в цервикальном секрете). В проспективной части проанализированы: экспрессия мРНК TLR2, TLR3, TLR4, TLR 8; степень инфильтрации и морфологического типа ИКК, инфильтрирующих тканей шейки матки; концентрация IL-1b, IL-4, IFN-a, IFN-g, TNF- a, sIgA и число лейкоцитов в цервикальном секрете.

**Положения диссертации, выносимые на защиту:**

1. Уровень экспрессии мРНК TLR2, TLR3, TLR4 и TLR8, характер лимфоидной и нейтрофильной инфильтрации экзоцервикса, число лейкоцитов в цервикальном секрете у больных ПВИ шейки матки отражают степень ВПЧ-ассоциированного плоскоклеточного интраэпителиального поражения.

2. Использование классификационных уравнений для прогнозирования наличия ВПЧ способствует повышению настороженности врача-клинициста на 31,8%. Дополнительное определение экспрессии мРНК TLR2, TLR3, TLR4 и TLR8 в сочетании с цифровым анализом кольпоскопического изображения позволяет выявить на 63,3% больше пациенток, которые подлежат цитологическому скринингу.

3. Клиническая эффективность ФДТ у больных ПВИ шейки матки по вирусологическим и онкоцитологическим критериям наиболее выражена при тяжелой степени плоскоклеточного интраэпителиального поражения.

4. Повышение концентрации IFN- $\gamma$  в цервикальном секрете через 2 часа после сеанса ФДТ является информативным ранним маркером эффективности лечения ПВИ шейки матки.

**Соответствие диссертации паспорту научной специальности.** Направление диссертационного исследования соответствует п.2 «Выяснение механизмов распознавания чужеродных субстанций, их удаления из организма и формирования иммунологической памяти.», п.3 «Изучение механизмов врожденного и адаптивного иммунитета в норме и при патологии.», п.4 «Исследование молекулярных и клеточных основ противобактериальной, противовирусной, противоопухолевой, противогрибковой, противопаразитарной иммунной защиты.», п.7 «Разработка фундаментальных основ иммунопрофилактики, иммунодиагностики и иммунотерапии.» и п.10 «Проектирование и создание оптимальных биоинформационных и математических моделей функционирования иммунной системы.» паспорта специальности 3.2.7. Аллергология и иммунология (медицинские науки).

**Степень достоверности и апробация работы.** Диссертация апробирована на заседании кафедры клинической иммунологии и аллергологии Института клинической медицины имени Н.В. Склифосовского ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова (Сеченовский университет) Минздрава России протокол № 7 от «7» июля 2022 г. Основные положения диссертационной работы доложены и обсуждены на 2<sup>nd</sup> International Conference on Photonics Research (Turkey, 2019); IX Международном конгрессе «Фотодинамическая Терапия и Фотодиагностика» (Москва, 2020); Photodynamic Therapy and Photodiagnosis Update 2020 E-CONGRESS (France, 2020); I Всероссийском Конгрессе с международным участием по фундаментальным проблемам лабораторной диагностики «Академия лабораторной медицины: новейшие достижения», (Московская область, Красногорск, 2021); X Международном конгрессе «Фотодинамическая Терапия и Фотодиагностика» (Москва, 2021); 16<sup>th</sup> International Conference «Optical Methods of Flow Investigation» (Moscow, 2021); Photogenic Science Contest IPA 2021 (France, 2021); Межрегиональной научно-практической конференции «X Розовая лента» (Тверь, 2021); I Научно-практическая конференция «Лазерная и фотодинамическая терапия: актуальные вопросы, достижения, инновации» (Обнинск, 2022).

Разработано учебное пособие для системы послевузовского профессионального образования врачей «Фотодинамическая терапия: иммуномодулирующий метод в онкогинекологии» регистрационный номер рецензии № 876 ЭКУ от 19.09.2019.

Основные научные положения, выводы и рекомендации диссертации внедрены в учебный процесс кафедры клинической иммунологии и аллергологии Института клинической медицины имени Н.В. Склифосовского ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) при изучении дисциплин «Иммунология» и «Клиническая иммунология» акт № 116 от 04.07.2022.

**Личный вклад автора.** Личный вклад автора составляет 90% при сборе первичной информации, 90% при анализе обобщенных результатов исследования и формулировании оптимизации иммунологических, микробиологических и профилактических направлений при папилломавирусной инфекции шейки матки, 80% при оформлении и написании научных публикаций по теме диссертации.

**Публикации.** По результатам исследования автором опубликовано 17 работ, из них 6 статей в изданиях, индексируемых в международных базах Web of Science, Scopus, PubMed, 2 иные публикации по результатам исследования, 4 патента на изобретение, 1 патент на полезную модель, 1 свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ, 3 публикаций в сборниках материалов международных и всероссийских научных конференций (из них 2 зарубежные конференции).

**Объем и структура работы.** Диссертация изложена на 128 страницах машинописного текста, иллюстрирована 10 таблицами, 36 рисунками. Работа состоит из введения, обзора литературы, глав материалов и методов исследования, результатов исследований, заключения, выводов и практических рекомендаций. Список литературы содержит 220 наименований, представленных 27 отечественными и 189 зарубежными источниками, а также 4 нормативно-правовых документа.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

**Материалы и методы исследования.** В исследовании проанализировано 1075 пациенток с клиническими формами ПВИ шейки матки, из которых 109 были отобраны для оценки мукозального иммунитета шейки матки. Полученные результаты сравнивали с относительно здоровыми женщинами (n=13; 11%), которые формировали группу контроля. Из числа включенных в проспективную часть исследования сформировано 4 группы в зависимости от течения ПВИ шейки матки: диагноз МКБ-10 – N72, B97.7 (n=8; 6%) – группа ПВИ с NILM;

диагноз МКБ-10 – N87.0 (n=13; 11%) – группа ПВИ с LSIL; диагноз МКБ-10 – N87.1, N87.2 (n=66; 54%) – группа ПВИ с HSIL; диагноз МКБ-10 – D06, C53 (n=22; 18%) – группа рака шейки матки. Возраст пациенток находился в диапазоне от 20 до 61 года.

В работе соблюдались этические принципы в соответствии со статьей 24 Конституции РФ и Хельсинской Декларацией Всемирной медицинской ассоциации (World Medical Association Declaration of Helsinki 1964). Карты пациенток были взяты из архива стационаров ООО «Гута-Клиник» и ООО «МедИнСервис» г. Москва в период с 2015 по 2022 гг. С февраля 2021 г. и по апрель 2022 г. происходил набор пациенток для проспективной части исследования. Работа одобрена локальным этическим комитетом ФГАОУ ВО Первого МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) – протокол № 15-21.

В работе были применены общеклинический; молекулярно-генетический; морфологический и цифровой методы исследования. Дополнительно была проведена субклиническая оценка состояния иммунной системы с использованием показателей расширенной лейкоцитарной формулы ОАК, описанными в статье [Botisov G. et al. 2015] и представленных материалах на конференции Российского общества клинической онкологии RUSSCO «Иммуноонкология» от 9 апреля 2022, Москва – доклад «К вопросу об иммунотипах онкологических пациентов». Исходя из полученных значений был рассчитан индекс соотношения абсолютного числа нейтрофилов к лимфоцитам (ИСНЛ) использовался в качестве маркера субклинического воспаления [Forget et al. 2017]. В данном исследовании для оценки ИСНЛ использовался диапазон в соответствии с референсными значениями при проведении общего анализа крови (ОАК). Диапазон значения нормы был от  $1,83 \left(\frac{5,5}{3}\right)$  до  $3,33 \left(\frac{4}{1,2}\right)$ .

После проверки соответствия пациентки критериям включения в исследование проводили сбор биологического материала. Оценку экспрессии мРНК TLR2, TLR3, TLR4, TLR8 на поверхности эпителиоцитов шейки матки проводили в образцах биологического материала, полученного с помощью скарификационной биопсией (три ротации на 360° по часовой и три ротации на 360° против часовой стрелки) из цервикального канала и поверхности шейки матки.

Биоматериал помещали в пробирки типа Эппендорф. Экспрессию мРНК TLRs определяли ПЦР в режиме реального времени с обратной транскрипцией (OT-Real-Time PCR) с красителем SYBR Green I (ООО «НПФ Синтол», Россия). Амплификатор DT-96 (ООО «ДНК-технология», Россия) использовался для ПЦР в режиме реального времени. Уровни экспрессии мРНК TLR2, TLR3, TLR4, TLR8 стандартизировали по уровню экспрессии мРНК GAPDH. Все образцы центрифугировались. Скорость вращения составляла 10 000 об/мин. Осадок и надосадочная жидкость были разделены. Растворение осадка осуществляли с помощью лизирующего раствора для экстракции нуклеиновой кислоты из клинических материалов «РИБО-сорб К2-1-Эт-100-СЕ» (Амплисенс Биотехнология, Россия). Разработка олигонуклеотидных праймеров для мРНК

TLR2, TLR3, TLR4, TLR8 была основана на биоинформационном анализе с программным обеспечением Vector NTI Advance 9.0 (ПК) (<http://www.invitrogen.com/site/us/en/home.html>), DNASTAR, BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi/>). Синтез олигонуклеотидов осуществлялся на автоматическом синтезаторе. Использовался амидофосфитный метод. Экспресс-уровень мРНК TLR стандартизирован геном GAPDH-F. Общая РНК была получена в соответствии с протоколом инструментария для экстракции ДНК/РНК путём аффинной сорбции на силикагеле из клинического материала (ООО «ИЛС», Россия). Формула «2<sup>-ddCT</sup>» [Livak K. et al, 2001] была использована для расчета количественной экспрессии.

Концентрацию IL-1 $\beta$ , IL-4, IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , sIgA в цервикальном секрете определяли с использованием методики иммуноферментного анализа (ИФА) наборами ИФА-БЕСТ (ЗАО «Вектор-Брест-Европа»). Биологический материал был помещён в питательную среду DMEM reduced serum (Hy Clone, USA) в количестве 600 мкл в эппендорфы объёмом 1,5 мл. Смывы были получены путём отбора надосадочной жидкости механическим дозатором после центрифугирования эппендорфов с содержимым со скоростью 10000 об/мин в течение 4 минут. Измерение величины оптической плотности растворов в лунках стрипов производилось на спектрофотометре вертикального сканирования Epsom LQ-100 в двухволновом режиме: при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения 630 нм. Время между остановкой реакции и измерением оптической плотности не превышало 10 минут.

Определение ДНК ВПЧ (тип 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68) и вирусной нагрузки в биологическом материале шейки матки проводили с помощью метода ПЦР «real-time» и тест-системой HPV КВАНТ по ТУ 9398-032-464820629-2019 (HPVквант-15). Оценка эрадикации ВПЧ из шейки матки происходила в биологическом материале, полученном скарификационной биопсией с помощью ВПЧ Digene-теста (DIGENE HYBRID CAPTURE, МЗ РФ № 98/61).

Прицельную биопсию шейки матки проводили с использованием «MAGNUM Автоматическая многоцветная биопсийная система» (BARD MAGNUM, РЗН 2015/2501). Материал отправлялся в Московскую международную лабораторию патоморфологии (ООО «Лаборатуар Де Жени», лиц. № ЛО-77-01-010998), где проводилась оценка степени инфильтрации тканей и тип ИКК, инфильтрирующих тканей цервикального канала и наружной поверхности шейки матки. Оценка биопсийного материала была проведена у пациенток, которым показано проведение гистологического исследования в соответствии с приложением 2 к приказу Департамента здравоохранения города Москвы от «22» апреля 2022 г. № 400.

Сбор цитологического материала проводили с помощью скарификационной биопсии с последующим исследованием методом жидкостная цитология согласно технологии BD SurePath liquid-based Pap test (BD SurePath, SKU/REF 491452) с автоматизированной системой просмотра

BD Focal Point GS (BD FocalPoint GS Imaging System, PID No. 779-04194-02) в лаборатории жидкостной цитологии КГ «Лапино» (ООО «ХАВЕН», лиц. № ЛО-50-01-011906). На основании результатов морфологического цитологического исследования проводилась оценка фотодинамической терапией индуцированного противоопухолевого действия. Конечной точкой оценки для проспективной части пациентов был 3-месячный, а для ретроспективной части был 12-месячный период и более.

Оцифровку поверхности шейки матки была проведена с помощью цифрового кольпоскопа Kernel-2200A. Для цифровой обработки кольпоскопических изображений использовали программное обеспечение «ImageJ» [Schneider et al. 2012]. Во время расширенного кольпоскопического исследования видеофиксировали уксусную и йодную пробы. С помощью функции «Screenshot» на персональном компьютере подготавливали изображения поверхности шейки матки в момент реагирования на нанесение уксусной кислоты и раствора Люголя. Далее изображение загружали в программу «ImageJ» v.2.3.0/1.53q. Изображение переводили в 8-битный формат. На изображении выделяли поверхность шейки матки. После выделения, определяли максимальную (MaxGV) и минимальную (MinGV) интенсивности значения серого пикселя после уксусной и йодной проб. Затем автоматизировано подсчитывалась пораженная площадь (%Area). В соответствии с полученными значениями рассчитывали интегральные значений между MaxGV, MinGV и %Area для уксусной и йодной проб. Формула для расчета  $IndGV = (MaxGV - MinGV) \times \%Area$ . При проведения цифрового анализа были разработаны авторская методика повышения эффективности определения степени тяжести ПВИ шейки матки по кольпоскопической картине (Патент РФ № 2758330) и устройство для скрининга патологии наружных и внутренних половых органов у женщин (Патент РФ 210078).

Фотодинамическая терапия проводилась на основании статьи 20 Федерального закона № 323. За 180–200 минут до фотооблучения (ФО) внутривенно вводят лекарственный препарат – фотосенсибилизатор (ФС). В данном исследовании использовали ФС на основе молекулы Хлорин Е6 (ООО «РАНФАРМА», рег. № ЛП-004885). Перед ФО проводили флуоресцентную диагностику (ФД) с использованием источника света длиной волны равной 400 нм и желтого светофильтра. На основании ФД определяли число полей (диаметр одного поля 25 мм) для ФО. Доза ФО цервикального канала составила 334 Дж/см<sup>2</sup>, одного поля шейки матки 291 Дж/см<sup>2</sup>. Процедуру ФО цервикального канала проводили с использованием световода диффузного типа, а поверхности шейки матки с использованием световода с микролинзой для лазерной аппаратуры «СИЛМА-01» (ООО «Полироник», РУ на медицинское изделие № РЗН 2017/5438). Для ФО использовали лазерный аппарат «ЛАХТА-МИЛОН» для фотодинамической терапии (MILON GROUP, РУ № ФСР 2010/09641), который генерирует свет с длиной волны равной 662 нм. По завершению ФО проводили ФД для контроля выгорания ФС.

**Статистическая обработка материала.** Сбор и хранение данных осуществляли в пакете Excel ПО Microsoft Office 365. Для обработки данных и вывода результатов использовался язык программирования Python v3.10.0 в IDE Visual Studio Code v1.66.2. Результаты исследования анализировались с применением современных параметрических и непараметрических методов статистики. Количественные показатели оценивались на предмет соответствия нормальному распределению с помощью критерия Шапиро-Уилка. Количественные показатели, имеющие нормальное распределение, описывались с помощью средних арифметических величин (M) и стандартных отклонений (SD), границ 95% доверительного интервала (95%ДИ). В случае отсутствия нормального распределения количественные данные описывались с помощью медианы (Me) и нижнего и верхнего квартилей ( $Q_1$ – $Q_3$ ). Категориальные данные описывались с указанием абсолютных значений и процентных долей. Сравнение двух групп по количественному показателю, имеющему нормальное распределение, выполнялось с помощью t-критерия Стьюдента. Сравнение трех и более групп по количественному показателю, имеющему нормальное распределение, выполнялось с помощью однофакторного дисперсионного анализа, апостериорные сравнения проводились с помощью критерия Тьюки. Сравнение групп по количественному показателю, распределение которого отличалось от нормального, выполнялось с помощью U-критерия Манна-Уитни (2-х групп) и критерия Краскела-Уоллиса ( $3 \leq$  групп), апостериорные сравнения – с помощью критерия Данна с поправкой Холма. Сравнение процентных долей при анализе четырехпольных таблиц сопряженности выполнялось с помощью критерия  $\chi^2$  – Пирсона (при значениях ожидаемого явления  $>10$ ), точного критерия Фишера (при значениях ожидаемого явления  $<10$ ). Направление и теснота корреляционной связи между двумя количественными показателями оценивались с помощью коэффициента ранговой корреляции Спирмена (при распределении показателей, отличном от нормального). Прогностическая модель, характеризующая зависимость количественной переменной от факторов, разрабатывалась с помощью метода линейной регрессии. Построение прогностической модели вероятности определенного исхода выполнялось при помощи метода логистической регрессии. Мерой определенности, указывающей на ту часть дисперсии, которая может быть объяснена с помощью логистической регрессии, служил коэффициент  $R^2$  Найджелкерка. Для оценки диагностической значимости количественных признаков при прогнозировании определенного исхода применялся метод анализа ROC-кривых. Разделяющее значение количественного признака в точке cut-off определялось по наивысшему значению индекса Юдена. При сравнении нормально распределенных количественных показателей, рассчитанных для двух связанных выборок, использовался парный t-критерий Стьюдента. При сравнении количественных показателей, распределение которых отличалось от нормального, в двух связанных группах, использовался

критерий Уилкоксона. Сравнение бинарных показателей, характеризующих две связанные совокупности, выполнялось с помощью теста МакНемара.

Анализ 5-летней безрецидивной выживаемости пациентов после фотодинамической терапии проводился по методу регрессии Кокса с построением графиков по процедуре Каплан-Мейера, подразумевающую прогнозирование риска наступления события для рассматриваемого объекта и оценку влияния заранее определенных независимых переменных на этот риск. Риск рассматривается как функция, зависящая от времени. Базовые предположения, лежащие в основе метода, состоят в том, что все объясняющие переменные независимы, линейно влияют на риск наступления события, а также что риски наступления события для любых двух объектов в любой отрезок времени пропорциональны. При этом использовали термин – медиана выживаемости для оценки эффективности проведенного лечения.

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На **первом этапе** исследования были проанализированы клиничко-эпидемиологические, иммунологические и цифровые признаки. Результаты исследований сравнивались между группами с клиническими формами ПВИ шейки матки и группой контроля.

Было определено, что степень плоскоклеточного интраэпителиального поражения при ПВИ нарастает в зависимости от возраста пациентки ( $p = 0,033$ ). В группах ПВИ с HSIL и РШМ регистрируется большее число половых партнеров чем в группах контроля, ПВИ с NILM и LSIL ( $p = 0,012$ ). Ацетобелый эпителий превалирует по всем группам по сравнению с контрольной ( $p < 0,001$ ). Максимальная частота была в группе ПВИ с LSIL – 92,3%. Второй по частоте была группа РШМ – 90,9%. При ПВИ с NILM и ПВИ с HSIL частоты регистрации составили 87,5% и 80,3% соответственно. Максимальная частота регистрации кондилом составила в группе ПВИ с NILM, а минимальная для ПВИ с HSIL – 50% и 13,6% случаев соответственно. При ПВИ с LSIL и РШМ данный показатель составил 23,1% и 18,2% соответственно. Инфицирование ВПЧ происходит как одним, так и более типами ( $p < 0,001$ ). Это сопровождается развитием локальной воспалительной реакции. Число лейкоцитов в цервикальном секрете возрастает в 2 раза по сравнению с группой контроля (Таблица 1).

Экспрессия мРНК TLR2 и TLR4 была выше в 1,3 и 1,6 раза соответственно по сравнению с группой контроля. Выраженная, умеренная и слабая степень инфильтрации ткани экзоцервикса иммунокомпетентными клетками лимфоидного ряда и нейтрофилами (ИКК) регистрируется в 17,5%, 7,5% и 10% случаев соответственно. В 65% случаев точная степень инфильтрации не определяется. При ПВИ с LSIL число лейкоцитов в цервикальном секрете снижается в 3,2 раза по сравнению с ПВИ с NILM. Экспрессия мРНК TLR2 и TLR4 выше в 1,84 и 1,62 раза соответственно по сравнению с ПВИ с NILM. Экспрессия мРНК TLR8 выше по сравнению со всеми остальными типами TLRs (Рисунок 1). Инфильтрация экзоцервикса ИКК при ПВИ с LSIL

имеет слабую степень в 16,7% случаев. В 83,3% случаев не удается определить точную степень инфильтрации экзоцервикса. С увеличением степени тяжести плоскоклеточного интраэпителиального поражения (SIL) снижается частота полиинфицирования ВПЧ ( $p < 0,001$ ). В группе ПВИ с HSIL регистрируется рост числа лейкоцитов в цервикальном секрете. Экспрессии мРНК TLR2 и TLR4 снижена в 1,46 и 1,57 раза соответственно по сравнению с ПВИ с LSIL. Уровень экспрессия мРНК TLR8 минимален по сравнению с группой ПВИ с LSIL.

Таблица 1 – Маркеры мукозального врожденного иммунитета у больных ПВИ шейки матки с разной степенью плоскоклеточного интраэпителиального поражения

Признак	Группа	Статистики			p-value
		Me	Q <sub>1</sub> – Q <sub>3</sub>	n	
Число лейкоцитов в цервикальном секрете (клеток в поле зрения)	Контроль	8	5 – 8	13	$< 0,001^*$ $p_{\text{PВИ}} - \text{Контроль} < 0,001$ $p_{\text{PВИ}} - \text{LSIL} < 0,001$ $p_{\text{PВИ}} - \text{HSIL} < 0,001$
	ПВИ	16	14 – 25	8	
	LSIL	5	2 – 12	13	
	HSIL	13	7 – 18	66	
	РШИМ	25	20 – 35	22	
TLR 2 (OE)	Контроль	0,95	0,73 – 1,27	12	$0,049^*$ $p_{\text{LSIL}} - \text{Контроль} = 0,034$
	ПВИ	1,23	1,00 – 1,48	8	
	LSIL	2,26	1,19 – 43,80	11	
	HSIL	1,54	1,04 – 2,18	18	
	РШИМ	1,77	0,97 – 2,62	15	
TLR 4 (OE)	Контроль	0,84	0,72 – 1,41	12	$0,025^*$ $p_{\text{LSIL}} - \text{Контроль} = 0,021$
	ПВИ	1,32	1,19 – 1,43	8	
	LSIL	2,14	1,19 – 60,28	11	
	HSIL	1,36	0,90 – 2,87	18	
	РШИМ	1,57	1,19 – 3,44	15	

\* – различия показателей статистически значимы ( $p < 0,05$ , критерий Краскела-Уоллиса)

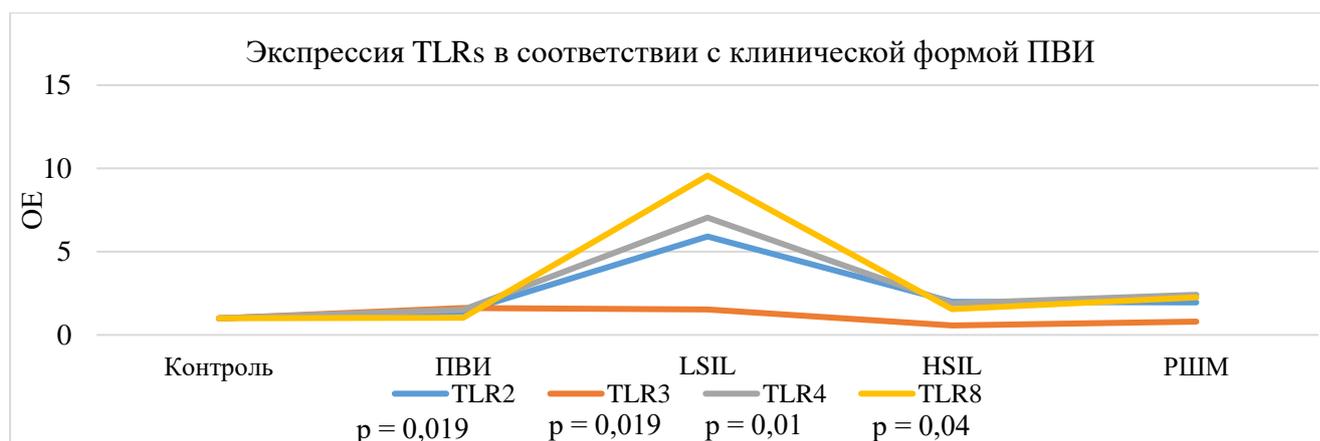


Рисунок 1 – Показатели экспрессии мРНК TLRs в мазках-соскобах с экзоцервикса у больных разными формами ПВИ шейки матки

При нарастании степени SIL увеличивается инфильтрация ИКК экзоцервикса. Выраженная инфильтрация регистрируется в 58,3% случаев при ПВИ с HSIL. Умеренная и слабая инфильтрация экзоцервикса регистрировалась в 4,7% и 8,3% соответственно. При РШИМ

экспрессия мРНК TLR2 и TLR4 нарастает по сравнению с группой ПВИ с HSIL на 13%. Ткань экзоцервикса имеет выраженную степень инфильтрации ИКК в 44,4% случаев, а неопределенную степень в 55,6% случаев. Влияние тяжести SIL на абс. число лейкоцитов, нейтрофилов и моноцитов ОАК не было значимым ( $p > 0,05$ ). Ареактивное субклиническое состояние системной клеточной иммунной реакции линейно снижалось от группы контроля к РШМ на 20,5% ( $R^2 = 0,95$ ). Системная иммунная реакция имеет тенденцию к субклинической иммунной недостаточности. Значение нарастало от группы ПВИ с NILM (0%) → ПВИ с LSIL (6%) → ПВИ с HSIL (17%) и снижалось к РШМ – 11% ( $R^2 = 0,96$ ). Существенные различия были получены для IndGV уксусной и йодной проб ( $p = 0,018$ ;  $p = 0,003$  соответственно). IndGV для уксусной пробы нарастал к ПВИ с LSIL. IndGV для уксусной пробы выявляется на сопоставимом уровне в группах с SIL. По сравнению с контрольной группой значение IndGV для йодной пробы нарастало в 2,15; 2,3; 2,6; 3,2 раза для ПВИ с NILM, ПВИ с LSIL, ПВИ с HSIL и РШМ соответственно. Остальные признаки не имели статистически значимых различий при сопоставлении с группой контроля.

**На втором этапе** проводили многофакторный анализ, результатом которого стали четыре классификационных уравнения прогноза наличия ВПЧ, SIL, HSIL и РШМ. Было выявлено, что большое число половых партнеров приводит к увеличению IndGV для йодной пробы ( $r_s = 0,23$ ;  $p = 0,01$ ). IndGV для уксусной и йодной проб снижается при переходе от 1 к 3 типу ЗТ ( $p < 0,001$ ;  $p < 0,001$  соответственно). Снижение IndGV для ацетобелого эпителия происходит при отсутствии кондилом ( $p = 0,031$ ). Длительность ПВИ снижает значение IndGV йодной пробы ( $r_s = -0,22$ ;  $p = 0,024$ ). Ацетобелый эпителий регистрируется на поверхности шейки матки. Продолжительная ПВИ вовлекает большее число эпителиальных клеток и проникает в цервикальный канал. Это приводит к угнетению иммунного ответа со стороны эндоцервикса. Продолжительная ПВИ шейки матки приводит к снижению числа лейкоцитов в цервикальном секрете. Так для числа лейкоцитов в цервикальном секрете менее 4-х в поле зрения длительность инфекции составила 39,65 месяцев против 4,67 месяцев для числа лейкоцитов в цервикальном секрете больше 40 в поле зрения ( $p = 0,036$ ). Отмечается, что такие признаки как ВПЧ в анамнезе, тип зоны трансформации, кондиломы не имели статистически значимого влияния на число лейкоцитов в цервикальном секрете ( $p > 0,05$ ). При обнаружении ацетобелого эпителия на поверхности шейки матки происходит снижение степени выраженности инфильтрации ИКК экзоцервикса ( $p = 0,045$ ). Наблюдается смещение иммунологической активности по мере инфицирования эпителиального пласта. Повышенное содержание лейкоцитов в цервикальном секрете регистрируется при наличии ацетобелого эпителия на поверхности шейки матки ( $p = 0,01$ ). Экспрессия мРНК TLR2 и TLR4 выше в 1,6 раза для обоих рецепторов при обнаружении ацетобелого эпителия на поверхности шейки матки ( $p = 0,018$ ;  $p = 0,006$  соответственно).

Экспрессия мРНК TLR2, TLR4 и TLR8 имеет обратную корреляцию с возрастом, что подтверждает повышенную иммунологическую активность эпителиоцитов у молодых пациенток (Таблица 2). Гинекологическая инфекция в анамнезе угнетает экспрессию мРНК TLR2 ( $p = 0,023$ ). Половой путь оказывает значимую роль на распространение ПВИ. Это прямо коррелирует с числом половых партнеров. В результате промискуитет приводит к повышенной экспрессии мРНК TLR2 и TLR8. Кондиломы на шейке матки и стенках влагалища образуются при продуктивной генитальной ПВИ, однако их образование не оказывает влияния на экспрессию мРНК TLRs ( $p > 0,05$ ). При переходе инфекции в интегративную форму начинает нарастать вирусная нагрузка и трансформирующее действие на эпителиальные клетки шейки матки. Выход лейкоцитов в составе цервикального секрета и экспрессия мРНК TLR3 нарастают. Если ПВИ развивается за счет инфицирования одним типом ВПЧ, то экспрессия мРНК TLRs будет выше (по медианному значению), чем при инфицировании двумя и более типами ( $p = 0,008$ ,  $p = 0,036$ ,  $p = 0,007$ ,  $p = 0,011$  соответственно) (Рисунок 2). Наибольший уровень экспрессии мРНК регистрируется для TLR3 (Рисунок 2). Однако среднее значение экспрессии мРНК TLRs нарастает линейно от отсутствия активной инфекции к полиинфекции ( $R^2 = 1$ ).

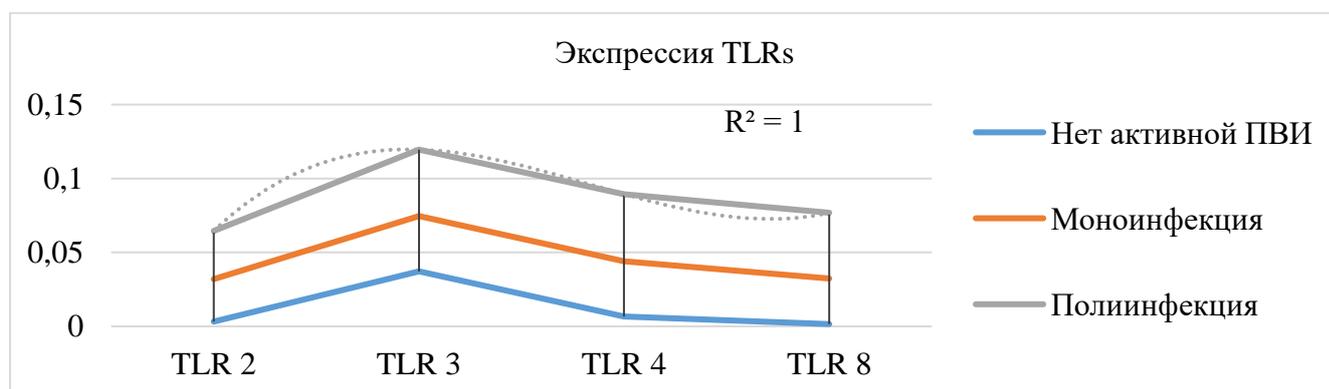


Рисунок 2 – Среднее значение экспрессии мРНК TLRs в зависимости от типа инфицированности

Между абсолютным числом лейкоцитов крови и числом лейкоцитов в цервикальном секрете не было обнаружено статистически значимой связи. Однако наблюдалось статистически значимое увеличение числа лейкоцитов в цервикальном секрете при субклинической системной реакции клетками врожденного (нейтрофилами и моноцитами) иммунитета ( $p = 0,013$ ). При выявлении ацетобелого эпителия на поверхности шейки матки существенных изменений в абсолютном числе лейкоцитов, нейтрофилов, лимфоцитов и моноцитов не обнаружено ( $p > 0,05$ ). Тип инфекции не оказывал статистически значимого влияния на показатели расширенной лейкоцитарной формулы ОАК ( $p > 0,05$ ). Абс. число нейтрофилов имеет слабую статистически значимую корреляцию с вирусной нагрузкой. ПВИ 16 типом вызывает снижение уровня лимфоцитов в системном кровотоке на 13,2% по сравнению с инфицированностью остальными

типами ВПЧ ( $p = 0,029$ ). Была обнаружена прямая корреляция абс. числа моноцитов с уровнем экспрессии мРНК TLR8. Процент пораженной площади поверхности шейки матки выше при субклинической системной активации клеточного звена адаптивного и врожденного иммунитета ( $p = 0,037$ ). Остальные показатели расширенной лейкоцитарной формулы ОАК не имели статистически значимой корреляции. При подсчете IndGV для уксусной и йодной проб регистрируется прямая зависимость для содержания лейкоцитов в цервикальном секрете и экспрессии мРНК TLR2, TLR3 и TLR4. TLR8 не имел статистически значимой зависимости.

Таблица 2 – Результаты корреляционного анализа экспрессии мРНК TLRs

Признак	TLR2 ( $r_s/p$ -value)	TLR3 ( $r_s/p$ -value)	TLR4 ( $r_s/p$ -value)	TLR8 ( $r_s/p$ -value)
Возраст	-0,27/0,029	-	-0,25/0,048	-0,25/0,042
Но. половых партнеров	0,25/0,05	-	-	0,3/0,017
Но. лейкоцитов в ц/секрете	-	0,43/0,009	-	-
Вирусная нагрузка	-	0,29/0,009	-	-
Абс. число моноцитов	-	-	-	0,28/0,023
IndGV (уксусная проба)	0,29/0,029	0,33/0,012	0,3/0,022	-
IndGV (йодная проба)	0,31/0,017	0,37/0,004	0,29/0,024	-

В результате проведенного анализа выявлены признаки для построения прогностической модели. Пошаговое включение признаков в функцию логистической регрессии ( $P = \frac{1}{(1+e^{-z})}$ , где  $z$  – регрессионные коэффициенты независимых переменных;  $P$  – вероятность события) позволило рассчитать их множители. Параметры, которые используются в уравнениях:  $X_{\text{Возраст}}$  – (лет),  $X_{\text{жалобы}}$  – (0 – да, 1 – нет),  $X_{\text{терапевтическое лечение в анамнезе}}$  – (0 – есть, 1 – нет),  $X_{\text{хирургическое лечение в анамнезе}}$  – (0 – нет, 1 – есть),  $X_{\text{Менархе}}$  – (лет),  $X_{\text{Начало половой жизни}}$  – (лет),  $X_{\text{число половых партнеров}}$  – количество человек,  $X_{\text{гинекологическое заболевание в анамнезе}}$  – (0 – да, 1 – нет),  $X_{\text{гинекологическая инфекция в анамнезе}}$  – (0 – да, 1 – нет),  $X_{\text{число лейкоцитов в цервикальном секрете}}$  – (клеток в поле зрения),  $X_{2 \text{ тип ЗТ}}$  – (0 – 1 тип, 1 – 2 тип),  $X_{3 \text{ тип ЗТ}}$  – (0 – 1 тип, 1 – 3 тип),  $X_{\text{наличие ацетобелого эпителия}}$  – (0 – да, 1 – нет),  $X_{\text{кондиломы}}$  – (0 – нет, 1 – есть),  $X_{\text{TLR2}}$  – (ОЕ),  $X_{\text{TLR3}}$  – (ОЕ),  $X_{\text{TLR4}}$  – (ОЕ),  $X_{\text{TLR8}}$  – (ОЕ),  $X_{\% \text{ площади йодной пробы}}$  – (%),  $X_{\% \text{ площади ацетобелого эпителия}}$  – (%),  $X_{\text{Абс. число нейтрофилов}}$  – (тыс/л).

Регрессионное уравнение **прогноза наличия ВПЧ** является статистически значимым ( $p = 0,012$ ). Исходя из значения коэффициента детерминации Найджелкерка, уравнение объясняет 31,8% наблюдаемой дисперсии наличия ВПЧ. Площадь под ROC-кривой составила  $0,805 \pm 0,043$  с 95% ДИ: 0,721–0,888. Чувствительность и специфичность составляют 55,1% и 91,7% соответственно. Уравнение **прогноза**:  $z = 1,807 + 0,041X_{\text{Возраст}} + 0,658X_{\text{жалобы}} - 0,159X_{\text{терапевтическое лечение в анамнезе}} - 0,100X_{\text{Начало половой жизни}} + 0,094X_{\text{число половых партнеров}} + 0,471X_{\text{гинекологическое заболевание в анамнезе}} + 0,471X_{\text{гинекологическая инфекция в анамнезе}} + 0,005X_{\text{число лейкоцитов в цервикальном секрете}} - 0,012X_{2 \text{ тип ЗТ}} - 0,477X_{3 \text{ тип ЗТ}} - 1,494X_{\text{ацетеобелый эпителий}} + 5,280X_{\text{кондиломы}} - 0,311X_{\text{Абс. число нейтрофилов}}$ .

Полученное регрессионное уравнение **прогноза наличия SIL** является статистически значимым ( $p = 0,001$ ). Исходя из значения коэффициента детерминации Найджелкерка, уравнение объясняет 63,3% наблюдаемой дисперсии наличия SILs. Площадь под ROC-кривой составила  $0,919 \pm 0,033$  с 95% ДИ: 0,854–0,985. Чувствительность и специфичность составляют 79,5% и 95,0% соответственно. Уравнение **прогноза**:  $z = -0,595 + 0,150X_{\text{Возраст}} - 0,015X_{\text{Менархе}} - 0,118X_{\text{Начало половой жизни}} + 0,296X_{\text{число половых партнеров}} - 0,033X_{\text{число лейкоцитов в цервикальном секрете}} + 0,283X_{\text{2 тип ЗТ}} - 3,839X_{\text{3 тип ЗТ}} - 1,764X_{\text{кондиломы}} - 0,256X_{\text{TLR2}} - 1,112X_{\text{TLR3}} + 1,260X_{\text{TLR4}} + 1,395X_{\text{TLR8}} + 0,047X_{\text{% площади йодной пробы}} + 0,024X_{\text{% площади ацетобелого эпителия}} - 2,031X_{\text{ВПЧ в анамнезе}} - 4,242X_{\text{хирургическое лечение в анамнезе}}$ ,

Полученное регрессионное уравнение **прогноза наличия HSIL** является статистически значимым ( $p < 0,001$ ). Исходя из значения коэффициента детерминации Найджелкерка, уравнение объясняет 64,3% наблюдаемой дисперсии наличия HSIL. Площадь под ROC-кривой составила  $0,911 \pm 0,038$  с 95% ДИ: 0,837–0,985. Чувствительность и специфичность составляют 81,8% и 87,1%, соответственно. Уравнение **прогноза**:  $z = -0,368 + 0,184X_{\text{Возраст}} - 0,279X_{\text{терапевтическое лечение в анамнезе}} - 4,253X_{\text{хирургическое лечение в анамнезе}} + 0,372X_{\text{Менархе}} - 0,368X_{\text{Начало половой жизни}} + 0,341X_{\text{число половых партнеров}} + 0,059X_{\text{число лейкоцитов в цервикальном секрете}} - 0,861X_{\text{2 тип ЗТ}} - 3,754X_{\text{3 тип ЗТ}} - 1,562X_{\text{кондиломы}} - 3,565X_{\text{ацетобелый эпителий}} - 0,072X_{\text{TLR2}}$

Полученное регрессионное уравнение **прогноза наличия РШМ** является статистически значимым ( $p = 0,001$ ). Исходя из значения коэффициента детерминации Найджелкерка, уравнение объясняет 23,5% наблюдаемой дисперсии РШМ. Площадь под ROC-кривой составила  $0,861 \pm 0,064$  с 95% ДИ: 0,736–0,986. Чувствительность и специфичность составляют 93,3% и 71,4% соответственно. Уравнение **прогноза**:  $z = -2,579 + 0,081X_{\text{число лейкоцитов в цервикальном секрете}}$ .

На **заключительном этапе** оценивали эффективности фотодинамической терапии (ФДТ) в раннем и отдаленном периодах. При анализе концентрации цитокинов в цервикальном секрете через 2 часа после ФДТ было выявлено увеличение IFN- $\gamma$  в 1,5 раза ( $p = 0,047$ ). Существенных различий между концентрациями IL-1 $\beta$ , IL-4, IFN- $\alpha$ , TNF- $\alpha$  и sIgA в цервикальном секрете до и через 2 часа после ФДТ ( $p > 0,05$ ). ФДТ не приводила к статистически значимому увеличению экспрессии мРНК мРНК TLR2, TLR3, TLR4 и TLR8 через 2 часа ни в одной из исследуемых групп ( $p > 0,05$ ). Однако, наблюдали тренд на снижение для TLR2 на 13% и увеличение для TLR4 на 16,7%. Через три месяца после ФДТ происходила нормализация лейкоцитарной реакции в цервикальном секрете. Число лейкоцитов в цервикальном секрете снижалось для ПВИ с NILM, с HSIL и РШМ ( $p = 0,039$ ;  $p = 0,002$ ;  $p < 0,001$  соответственно). Эрадикация ВПЧ через 3 месяца после ФДТ была достигнута в группах ПВИ с LSIL, HSIL и РШМ ( $p = 0,002$ ;  $p < 0,001$ ;  $p < 0,001$  соответственно). В группе ПВИ с NILM эрадикация ВПЧ не имела статистической значимости ( $p = 0,083$ ). При оценке влияния ФДТ на злокачественную трансформацию эпителиальных клеток

для всех групп был достигнут терапевтический эффект в отношении злокачественной трансформации ( $p < 0,001$ ).

Отдаленные результаты ФДТ ретроспективно оценивали на выборке из 1075 пациенток, которые были разделены на 4 группы: ПВИ с NILM ( $n=150$ ), ПВИ с LSIL ( $n=171$ ), ПВИ с HSIL ( $n=571$ ) и РШМ ( $n=183$ ). Было определено, что эрадикации ВПЧ хуже поддается группа ПВИ с LSIL. Самый большой риск рецидива наступает через 32 месяца. Более 45% пациенток из этой группы имели рецидив. Для группы ПВИ с NILM был 18-й месяц наступления рецидива более чем в 20% случаев. 80% больных РШМ имели безрецидивный период более 50 месяцев. Для группы ПВИ с HSIL такой процент держался до 32 месяцев. Для групп ПВИ с NILM, ПВИ с HSIL и РШМ наблюдается 60-месячный безрецидивный период в 68%, 63% и 70% соответственно.

Устранение злокачественной трансформации у больных ПВИ с LSIL и РШМ достигалось хуже, чем для других групп. Самую высокую вероятность наступления рецидива наблюдали через 30 и 52 месяца соответственно в 30% случаев. Для группы ПВИ с NILM периодом появления реактивных изменений в 20% случаев был 10-й месяц. Более 80% пациенток из группы ПВИ с HSIL имели безрецидивный период 40 месяцев. Для групп ПВИ с NILM, ПВИ с LSIL, ПВИ с HSIL и РШМ 60-месячный безрецидивный период был в 90%, 73%, 77% и 70% случаев соответственно.

## ВЫВОДЫ

1. При папилломавирусной инфекции (ПВИ) шейки матки максимальный уровень экспрессии мРНК TLR2, TLR4 и TLR8 в мазке-соскобе с экзоцервикса зарегистрирован у больных с плоскоклеточным интраэпителиальным поражением легкой степени (LSIL), TLR3 – у пациентов без плоскоклеточного интраэпителиального поражения (NILM). При плоскоклеточном интраэпителиальном поражении тяжелой степени (HSIL) экспрессия мРНК TLR2, TLR3, TLR4 и TLR8 снижалась.

2. При ПВИ с HSIL и раке шейки матки (РШМ) обнаружили более выраженную инфильтрацию экзоцервикса лимфоидными клетками и нейтрофилами, чем у больных ПВИ шейки матки с NILM; при LSIL степень инфильтрации этими клетками варьировала в широком диапазоне. В цервикальном секрете у больных РШМ и ПВИ с NILM число лейкоцитов увеличивалось в большей степени, чем при LSIL и HSIL. В венозной крови число лейкоцитов у пациентов с РШМ было на 20,5% ниже, чем у здоровых доноров; у пациентов с ПВИ количество лейкоцитов уменьшалось по мере роста степени плоскоклеточного поражения, но даже у больных с HSIL статистически значимо не отличалось от условной нормы.

3. У больных ПВИ шейки матки площадь поражения экзоцервикса по данным йодной пробы Шиллера с последующей цифровой обработкой кольпоскопических картин увеличивалась с ростом степени интраэпителиального поражения: NILM → LSIL → HSIL → РШМ.

4. У больных ПВИ шейки матки экспрессия мРНК TLR3 в мазке-соскобе с экзоцервикса находилась в прямой корреляционной связи с вирусной нагрузкой ( $r_s = 0,43$ ), числом лейкоцитов в цервикальном секрете ( $r_s = 0,29$ ) и площадью поражения эпителия экзоцервикса, оцениваемой йодной пробой Шиллера с цифровой обработкой кольпоскопических картин ( $r_s = 0,37$ ). Площадь поражения эпителия экзоцервикса, определенная вышеуказанным способом, коррелировала с числом лейкоцитов в цервикальном секрете ( $r_s = 0,26$ ), экспрессией мРНК TLR2 ( $r_s = 0,31$ ) и TLR4 ( $r_s = 0,29$ ) в образцах с поверхности шейки матки. Вирусная нагрузка была прямо связана с числом лейкоцитов в цервикальном секрете ( $r_s = 0,29$ ), а также абсолютным числом нейтрофилов крови ( $r_s = 0,23$ ). Экспрессия TLR8 в мазке-соскобе с экзоцервикса прямо коррелировала с абсолютным числом моноцитов крови ( $r_s = 0,28$ ).

5. На характер клинического течения ПВИ шейки матки влияют следующие признаки, которые могут учитываться при математическом прогнозировании: возраст; наличие жалоб, с которыми больные ПВИ обращаются к врачу; начало половой жизни; число половых партнеров; наличие терапевтического и хирургического лечения шейки матки в анамнезе; наличие иных гинекологических заболеваний или инфекций в анамнезе; тип зоны трансформации; число лейкоцитов в цервикальном секрете; экспрессия мРНК TLR2, TLR3, TLR4 и TLR8 в мазке-соскобе с экзоцервикса; интегральный цифровой индекс (IndGV), отражающий площадь поражения эпителия экзоцервикса по данным уксусной и йодной проб; наличие ацетобелого эпителия; наличие кондилом.

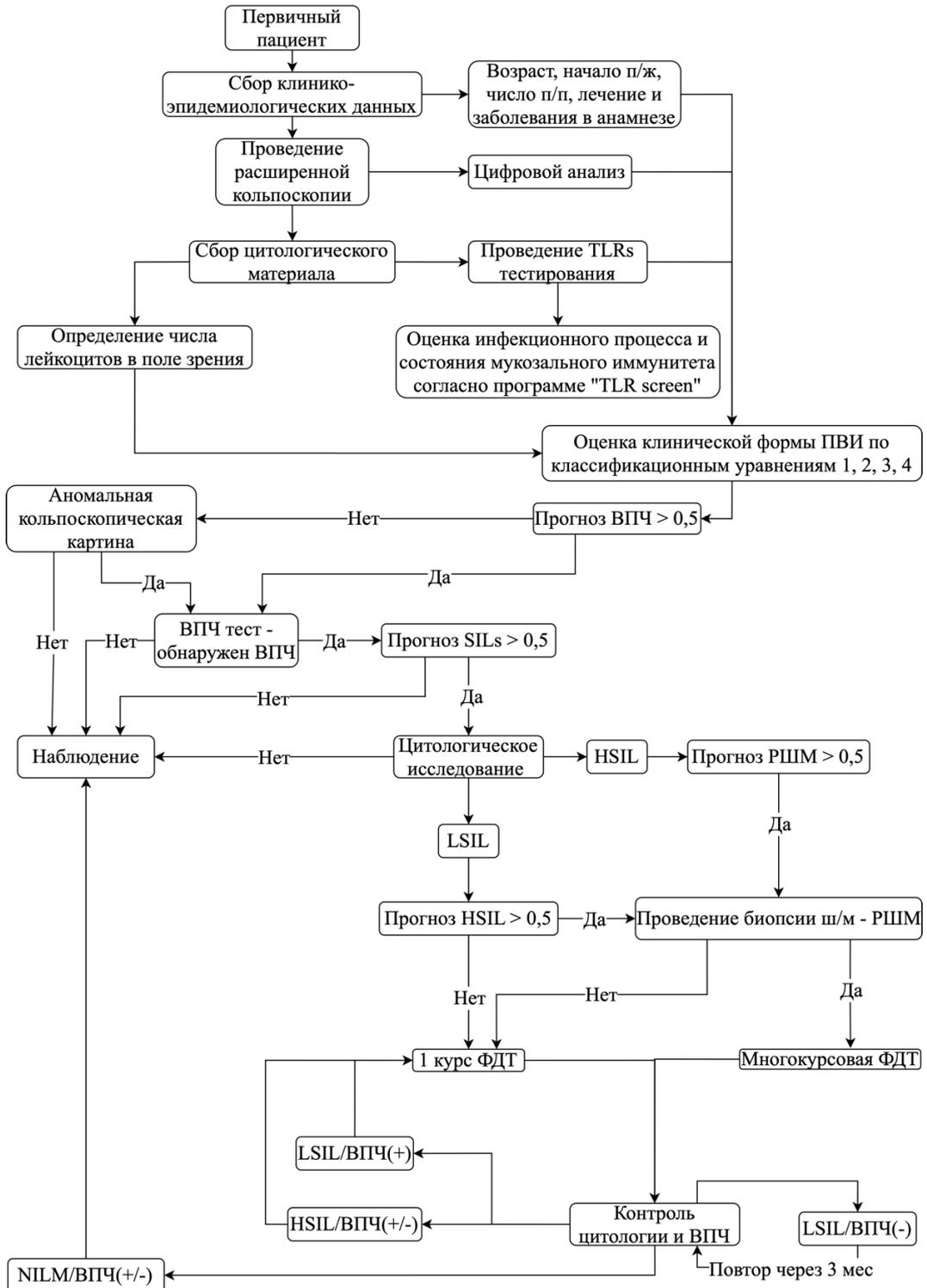
6. Разработана математическая модель клинического течения ПВИ шейки матки на основе четырёх классифицирующих уравнений для прогноза наличия: вируса папилломы человека (ВПЧ), плоскоклеточного интраэпителиального поражения, HSIL и РШМ. Модель позволяет увеличить настороженность клинициста в отношении наличия ВПЧ на 31,8% и наличия плоскоклеточного интраэпителиального поражения на 63,3%.

7. Во всех группах больных ПВИ шейки матки с плоскоклеточным интраэпителиальным поражением через 3 месяца после фотодинамической терапии (ФДТ), направленной на цервикальный канал и экзоцервикс, снижалась доля ВПЧ-положительных лиц; при этом вирусологическая эффективность ФДТ была выше у пациенток с LSIL, чем у таковых с HSIL и РШМ. В группе больных ПВИ без плоскоклеточных интраэпителиальных поражений (NILM) через 3 месяца после ФДТ выявлена лишь тенденция к снижению числа ВПЧ-положительных лиц. Доля пациентов без признаков злокачественной трансформации эпителиоцитов в мазках-соскобах с экзо- и эндоцервикса через 3 месяца после ФДТ была выше в группах с более высокой исходной степенью интраэпителиального поражения шейки матки. У 1/5 больных с NILM через 3 месяца после фотооблучения выявляли реактивные изменения в эпителиоцитах без признаков атипии.

8. Через 2 часа после завершения сеанса ФТД концентрация IFN- $\gamma$  в цервикальном секрете была выше исходных значений в 1,5 раза; статистически значимых изменений уровня IL-1 $\beta$ , IL-4, IFN- $\alpha$ , TNF- $\alpha$  и sIgA не выявили. ФДТ также не изменяла экспрессию мРНК TLR3 и TLR8 в мазке-соскобе с экзоцервикса, вместе с тем наблюдали тенденцию к снижению экспрессии мРНК TLR2 и увеличению экспрессии мРНК TLR4.

### ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

В соответствии с изложенными результатами проведенного исследования разработан алгоритм проведения клиничко-иммунологического мониторинга ПВИ шейки матки.



**СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. Пат. **2715618 РФ**, С1 С12Q 1/6806. Способ оценки состояния мукозального иммунитета при урогенитальной инфекции у беременных / Афанасьев С.С., Караулов А.В., Алёшкин В.А. [и др.] - № 2019114012; заявл. 08.05.2019; опубл. 02.03.2020, Бюл. № 7. -16 с.
2. Пат. **2715626 РФ**, С1 С12Q 1/6806. Способ оценки выраженности инфекционного процесса при урогенитальной инфекции у беременных / Афанасьев С.С., Караулов А.В., Алёшкин В.А. [и др.] - № 2019114010; заявл. 08.05.2019; опубл. 02.03.2020, Бюл. № 7. -15 с.
3. Пат. **2720135 РФ**, G01N 33/487. Способ прогнозирования течения беременности при урогенитальной инфекции / Афанасьев С.С., Караулов А.В., Алёшкин В.А. [и др.] - № 2019111494; заявл. 17.04.2019; опубл. 24.04.2020, Бюл. № 12. -12 с.
4. PDT is an accomplished method to treat acute HPV infection, cervical intraepithelial neoplasia and invasive cancer / Maxim Afanasiev, Tatyana Grishacheva and Alexander Dushkin // PDT&PD Update 2020 eCongress. – 2020. – P. 11.
5. Исследование противоопухолевой и противовирусной эффективности фотодинамической терапии в группах с легкой и тяжелой дисплазией шейки матки / Афанасьев М.С., Гришачева Т.Г., Душкин А.Д., Пылев А.Л. // IX Международный конгресс «Фотодинамическая терапия и фотодиагностика». -2020. -С. 61-62.
6. Душкин А.Д. Фотодинамическая терапия: иммуномодулирующий метод в онкогинекологии. Учебное пособие для системы послевузовского профессионального образования врачей / Караулов А.В., Афанасьев М.С., Петрищев Н.Н. [и др.] // ООО «Контакт» 2020. 1000 экз.
7. A Comprehensive Approach for Preventing and Treating Squamous Intraepithelial Lesions with HPV Infection / Afanasiev M.S., Grishacheva T.G., Dushkin A.D. // EC Gynaecology. 2021; 10(2), С. 25–31. [Publons]
8. The Multi-Course Approach of Photodynamic Therapy to Treat Invasive Cervical Cancer IB2: A Case Report / Afanasiev, M., **Dushkin, A.**, Grishacheva, T. et al. // **Case Reports in Oncology**. 2021; 14(1). [Scopus]
9. Пат. **2758330 РФ**, А61В 1/303. Способ определения степени дисплазии шейки матки / Афанасьев С.С., Душкин А.Д., Алёшкин В.А. [и др.] - № 2020120982; заявл. 25.06.2020; опубл. 28.10.2021, Бюл. № 31. – 20 с.
10. Цифровой анализ и количественная оценка изменений поверхности шейки матки при дисплазии / Душкин А.Д., Афанасьев М.С., Затевалов А.М. [и др.] // **Клиническая лабораторная диагностика**. 2021. Т. 66, №7. С. 417–421. [Scopus]
11. Dushkin A. PDT on the guard of your health / Alexander Dushkin // IPA 2021 Photogenic Science Contest. Category: Clinical Science. 2021.

12. Digital analysis of colposcopic images in papillomavirus infection / **Dushkin, A.**, Afanasiev, M., Afanasiev, S., Grishacheva, T. // **Journal of Physics: Conference Series**, 2021; 2127(1). [Scopus]

13. **Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ 2021681068 Российская Федерация.** TLR screen / Алёшкин В.А., Затевалов А.М., Афанасьев С.С. [и др.]; заявитель и правообладатель ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека - № 2021680158; заявл. 08.12.2021; опубл. 17.12.2021.

14. Photodynamic therapy for early-stage cervical cancer treatment / Afanasiev, M.S., **Dushkin, A.D.**, Grishacheva, T.G., Afanasiev, S.S., Karaulov A.V. // **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**. 2022; 37, 102620. [Scopus]

15. **Пат. 210078 РФ**, U1 А61В 1/042. Устройство для скрининга патологии наружных и внутренних половых органов у женщин / Афанасьев М.С., **Душкин А.Д.**, Афанасьев С.С. - № 2021132049; заявл. 02.11.2021; опубл. 28.03.2022, Бюл. № 4. – 12 с.

16. Цифровой анализ кольпоскопических изображений при уксуснобелом эпителии в режиме реального времени / **Душкин А.Д.**, Афанасьев М.С., Гришачева Т.Г. [и др.] // **Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии**. 2022. Том 21, №2. С. 129–139. [Scopus]

17. Personalized approach to manage high-grade squamous intraepithelial lesion / **Alexander Dushkin**, Maxim Afanasiev, Stanislav Afanasiev et al. // **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**. 2022; 39, 103038. [Scopus]

### СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ИКК – иммунокомпетентные клетки лимфоидного ряда и нейтрофилы

ПВИ – папилломавирусная инфекция

ФДТ – фотодинамическая терапия

HSIL – тяжелая степень плоскоклеточного интраэпителиального поражения

IndGV – интегральный цифровой индекс, отражающий площадь поражения эпителия экзоцервикса по данным уксусной и йодной проб

LSIL – легкая степень плоскоклеточного интраэпителиального поражения

NILM – отсутствие плоскоклеточного интраэпителиального поражения

sIgA – секреторный иммуноглобулин А

TLRs – Toll-подобные рецепторы