

На правах рукописи

Кадырова Айзада Эркинбаевна

**Клинико-патогенетические особенности патологических
процессов шейки матки, ассоциированных с папилломавирусной
инфекцией**

14.01.01 – акушерство и гинекология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва – 2017

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

Научный руководитель:

доктор медицинских наук,
профессор

Унаниян Ара Леонидович

Официальные оппоненты:

Прилепская Вера Николаевна – доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заместитель директора по научной работе, руководитель научно-поликлинического отделения

Минкина Галина Николаевна – доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра акушерства и гинекологии, профессор кафедры

Ведущая организация – Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Московской области «Московский областной научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии» (ГБУЗ МО МОНИИАГ)

Защита состоится «_____» _____ 2017 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 208.040.03. при ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу (119991, г. Москва, ул. Трубецкая, д.8, стр.2).

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

Автореферат разослан «___» _____ 2017 года

Ученый секретарь

диссертационного совета,
доктор медицинских наук,
профессор

Шулутко Александр Михайлович

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

Заболевания шейки матки, ассоциированные с вирусом папилломы человека (ВПЧ), являются актуальной проблемой современного акушерства и гинекологии, прежде всего ввиду высокой частоты встречаемости и возможности развития предраковых процессов и рака шейки матки (РШМ) [Стрижаков А.Н., Давыдов А.И., 2011; Прилепская В.Н., 2011; Сидорова И.С., 2012; Ищенко А.И. 2013, Макацария А.Д., 2014; Радзинский В.Е., 2012; Подзолкова Н.М., 2014; Минкина Г.Н., 2014; Роговская С.И., 2015].

Значительное место в структуре заболеваний шейки матки (ШМ), ассоциированных с ВПЧ, занимают цервикальные интраэпителиальные неоплазии (CIN), которые нередко приводят к развитию РШМ [Прилепская В.Н., 2008; Ищенко А.И., Зуев В.М., 2009; Короленкова Л.И., 2014]. Существующая в настоящее время тактика ведения и лечения при выявлении CIN различна: от наблюдения с применением ВПЧ-тестирования и цитологического контроля до эксцизии, носящей в ряде случаев повторный характер, и даже гистерэктомии [Минкина Г.Н., 2012; Роговская С.И., 2016]. В то же время причина столь разной тактики ведения не всегда однозначна и нуждается в патогенетическом обосновании с целью выявления наиболее эффективных подходов в лечении женщин репродуктивного возраста.

Требуемым особого внимания фактором в тактике ведения женщин с CIN является возможность развития резидуальной/рецидивной болезни [Ulrich D., 2012; Wu J., 2015; Jin J., 2015; Ayhan A., 2016]. Резидуальная/рецидивная болезнь выявляется, как правило, у больных, имеющих неопластический процесс в краях резецированной ткани.

В настоящее время существующие методы прогнозирования прогрессирования остаточного неопластического процесса, вплоть до его злокачественной трансформации, недостаточно эффективны, в связи с чем принципы формирования групп повышенного онкологического риска требуют дальнейшей разработки.

В последнее время значимую роль в процессе канцерогенеза играют эпигенетические

изменения [Vanno K. et al., 2012; Barrow T.M., Michels K.B., 2014; Huo J.S. et al., 2014]. Одним из основных эпигенетических событий, необходимых для развития опухоли, является ацетилирование гистонов и метилирование генов-супрессоров опухолевого роста, которые представляют собой наиболее ранние события в процессе канцерогенеза [Сидорова И.С., Залетаев Д.В., Унанян А.Л., 2011; Киселев В.И., Муйжнек Е.Л., 2014]. Однако выявление их клинического значения и особенностей в генезе прогрессирования патологических процессов ШМ требуют дальнейших исследований ввиду недостаточного количества работ в данном направлении.

Цель исследования: определить клиническое значение эпигенетических маркеров у пациенток репродуктивного возраста при заболеваниях шейки матки, ассоциированных с папилломавирусной инфекцией.

Задачи исследования:

1. Выявить наиболее значимые клиничко-анамнестические факторы риска прогрессирования патологических процессов, ассоциированных с папилломавирусной инфекцией, и развития злокачественной трансформации шейки матки у женщин репродуктивного возраста по мере их важности с учетом статистического анализа.

2. Изучить роль и особенности ацетилирования гистонов при заболеваниях шейки матки, ассоциированных с папилломавирусной инфекцией, на основании иммуногистохимических характеристик экспрессий гистондеацетилаз (HDAC 1, HDAC 2) – от доброкачественных до неопластических процессов шейки матки.

3. Оценить иммуногистохимические уровни экспрессий ДНК-метилтрансфераз (DNMT1, DNMT 2) и маркера пролиферации (Ki-67) и p-53 при заболеваниях шейки матки, ассоциированных с папилломавирусной инфекцией.

4. Разработать патогенетически обоснованный подход к формированию групп повышенного онкологического риска на основании анализа и сопоставления клинических и эпигенетических показателей при заболеваниях шейки матки, ассоциированных с папилломавирусной инфекцией.

Научная новизна

Полученные результаты исследования позволяют расширить теоретические представления о роли эпигенетических изменений при заболеваниях ШМ, ассоциированных с ВПЧ.

Выявлены особенности эпигенетических нарушений у пациенток репродуктивного возраста с патологическими процессами ШМ, ассоциированными с ВПЧ: доброкачественные заболевания; CIN I; CIN II; CIN III; инвазивный плоскоклеточный РШМ.

Установлены факторы риска и определена их значимость в развитии злокачественной трансформации ШМ на основании статистического анализа клинико-анамнестических и эпигенетических показателей.

Разработан индивидуальный (персонализированный) способ определения риска злокачественной трансформации ШМ (низкий, высокий) на основании выявленных клинических и эпигенетических факторов, вовлеченных в прогрессирование патологического процесса ШМ, что создает основу для осуществления дифференцированного подхода к тактике ведения при заболеваниях ШМ, ассоциированных с ВПЧ.

Практическая значимость работы

В результате проведенной работы установлена прогностическая значимость эпигенетических изменений при патологических процессах ШМ, ассоциированных с ВПЧ.

Выявленные клинико-эпигенетические факторы риска развития злокачественных новообразований ШМ у пациенток репродуктивного возраста с вирус-ассоциированными патологическими процессами явились основанием для формирования групп повышенной онкологической настороженности, что может послужить основой для дифференцированного подхода к тактике ведения больных.

Обнаруженные особенности ацетилирования гистонов и метилирования при патологических процессах ШМ открывают перспективы для разработки новых практических подходов к патогенетической профилактике РШМ, заключающихся в

разработке и применении препаратов, способствующих деметилированию и ингибированию деацетилирования.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту:

1. Анализ клинико-anamnestических и статистических данных при заболеваниях ШМ, ассоциированных с ВПЧ, в репродуктивном возрасте позволяет выявлять клинически значимые факторы риска прогрессирования патологического процесса и злокачественной трансформации шейки матки, связанные с особенностями течения ВПЧ-инфекции (персистенция, вирусная нагрузка, сочетанные варианты ВПЧ), наличием сопутствующих аномальных процессов, а также наследственными и поведенческими факторами.

2. Частота и показатели ацетилирования, метилирования и пролиферации при заболеваниях шейки матки, ассоциированных с папилломавирусной инфекцией, характеризуются прогрессирующим возрастанием их цифровых значений по мере увеличения степени тяжести предракового процесса шейки матки, вплоть до злокачественной трансформации. В ходе канцерогенеза рака шейки матки, ассоциированного с ВПЧ, задействованы эпигенетические механизмы и компенсаторно-приспособительные реакции, направленные на деацетилирование и деметилирование, срыв этих приспособительных реакций может привести к прогрессированию предракового процесса и развитию рака шейки матки.

3. Сочетанный анализ выявленных клинико-эпигенетических особенностей патологических процессов шейки матки у пациенток репродуктивного возраста позволяет определять группу повышенного онкологического риска среди больных с заболеваниями шейки матки, ассоциированными с ВПЧ, создавая основу для реализации дифференцированного подхода к тактике ведения данной категории пациенток.

Личный вклад автора. Автором самостоятельно разработаны дизайн и программа исследования, диссертант принимал непосредственное участие в обследовании и лечении пациенток с заболеваниями ШМ, ассоциированных с ВПЧ. Автор освоил методы, применяемые для получения и оценки результатов исследования, выполнил статистический анализ и описание полученных результатов основных клинических и

инструментальных исследований, сформулировал выводы и основные положения, выносимые на защиту.

Апробация результатов исследования

Диссертация обсуждена и апробирована на конференции кафедры акушерства и гинекологии № 1 Первого Московского Государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова 27 января 2016г. (Протокол № 5). Диссертация рекомендована к защите.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 6 научных работ, в том числе 4 в журналах, входящих в перечень ведущих рецензируемых научных журналов, рекомендованных ВАК Министерства образования РФ, а также 1 статья в иностранном журнале BioNanoScience (SJR =0,434), индексируемый в базе данных Scopus.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Научные положения диссертации соответствуют формуле специальности 14.01.01 – акушерство и гинекология. Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальности, конкретно пункту 3 паспорта специальности – исследование эпидемиологии, этиологии, патогенеза гинекологических заболеваний.

Структура и объем диссертации. Диссертация включает в себя введение, обзор литературы, описание методов исследования и клиническую характеристику больных, результаты собственных исследований и их обсуждение, выводы, практические рекомендации и список литературы. Работа изложена на 200 страницах машинописного текста, содержит 64 таблицы и 26 рисунков. Библиография включает 243 литературных источников, в том числе 75 на русском и 168 на иностранных языках.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.

Исследование проводилось на клинических базах кафедры акушерства и гинекологии № 1 (зав. кафедрой - д.м.н., профессор Ищенко А.И.) ФГБОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова и в ООО «Инвитро».

В исследовании проведены проспективный и ретроспективный анализы 185 пациенток репродуктивного возраста с заболеваниями ШМ; возраст обследованных женщин колебался в пределах 25–44 лет.

Ретроспективно все пациентки были разделены на 5 групп в зависимости от морфологического типа патологического процесса ШМ: 1 группа – пациентки с доброкачественными процессами, ассоциированными с ВПЧ (n=32); 2 группа – женщины с CIN I (n=43); 3 группа – пациентки с CIN II (n=46); 4 группа – женщины с CIN III (n=42); 5 группа – пациентки с инвазивным плоскоклеточным РШМ (I стадия; n=22). **Пациенток с морфологически верифицированным диагнозом CIN III или инвазивным плоскоклеточным РШМ для дальнейшего лечения направляли к онкологу.** Пациентки с аденокарциномой ШМ в исследовании не встречались.

Критерии включения – репродуктивный возраст, морфологически верифицированные случаи патологических процессов ШМ, ассоциированных с ВПЧ, выявленный ВПЧ ВР (высокого онкогенного риска), наличие парафиновых блоков у женщин с ранее проведенной биопсией или эксцизией ШМ.

Критерии исключения: беременность и лактация, применение вакцины против ВПЧ, тяжелая соматическая отягощенность больных (почечная, печеночная, сердечно-сосудистая недостаточности), морфологически верифицированные злокачественные образования (кроме плоскоклеточного РШМ).

В процессе определения урогенитальных инфекций использовали диагностические системы «ДНК-сорб-АМ», «АмплиСенс ВПЧ ВКР скрин-титр-FL», Cobas 4800 (Roche Molecular Systems, США). Проводили традиционный и жидкостной методы цитологического исследования (классификация Bethesda system), кольпоскопию (Sensitec OC-100 и SLC-2000). Прицельную биопсию и LLETZ, или конусовидную эксцизию, проводили на аппарате ЭХВЧа-140-02 «Фотек» (Россия) и Surgitron DF 120 4.0 MHz (USA). УЗИ выполнялось на аппаратах «Acuson 128 XP 10» (USA), «Dornier AI 5200» (Germany), «Logiq C5» (USA). Деструктивные методы лечения проводились аппаратом «PlasmaJet» (Great Britain).

В последней классификации WHO [Kurman R.J., Henson ML, 2014] различают LSIL, синонимом которого является CIN I, и HSIL, синонимами которого являются CIN

II и CIN III. Однако следует отметить, что классификация, подразделяющая CIN на CIN I, CIN II и CIN III [IARC WHO Classification of Tumour, 2003], более детально отражает поэтапное развитие неопластического процесса ШМ, что явилось основанием для применения именно данной классификации в собственной исследовательской работе.

Морфологическое исследование макропрепаратов, удаленных в ходе операции, и иммуногистохимические (ИГХ) методы изучения биомолекулярных маркеров с использованием высокоспецифичных антител проводили под руководством заведующего кафедрой патологической анатомии Первого МГМУ имени И.М. Сеченова, д.м.н., профессора Е.А. Коган.

ИГХ исследование было выполнено на операционном и биопсийном материалах. В качестве первичных специфических антител использовались антитела к; ДНК-метилтрансферазе (DNMT1, DNMT 2, Sigma, USA), гистондеацетилазе (HDAC1, HDAC2; Sigma, USA), Ki-67 (DAKO) – маркер пролиферации, p-53 (DAKO) – ген-супрессор опухолевого роста. В качестве вторичных антител и визуализирующей системы применялся стрептавидиновый комплекс (LSAB KIT (DAKO)). Результаты ИГХ реакций для p-53, DNMT1, DNMT 2, HDAC1, HDAC2 оценивались в баллах полуколичественным методом по проценту окрашенных клеток. Оценка экспрессии Ki-67 проводилась путем подсчета процента окрашенных ядер на 3000 клеток.

Все полученные количественные данные обработаны методом вариационной статистики с помощью электронных таблиц «Microsoft Excel», а также пакетом прикладных программ «Statistica for Windows» v. 7.0, Stat Soft Inc. (США).

Вероятность наступления события для некоторого случая рассчитывалась по

формуле,
$$p = \frac{1}{1 + e^{-z}}$$
, где $z = b_1 \cdot X_1 + b_2 \cdot X_2 + \dots + b_n \cdot X_n + \dots$

X_1 – значения независимых переменных, b_1 – коэффициенты, расчёт которых является задачей бинарной логистической регрессии, e – натуральный логарифм и равен 2,718. В полученной в результате построения уравнения бинарной логистической регрессии рассчитывали прогноз (низкий риск – $p < 0,5$, высокий риск – $p > 0,5$) прогрессирования патологического процесса ШМ, ассоциированного с ВПЧ.

Результаты исследования и их обсуждение

Нами проведен детальный сравнительный анализ клинико-анамнестических и диагностических показателей в сформированных группах больных. Средний возраст обследованных пациенток составил $38,4 \pm 1,4$ лет. С помощью корреляционного анализа Пирсона нами была выявлена прямая умеренная зависимость между возрастом и степенью прогрессирования патологического процесса ШМ ($r=0,3485$, $p<0,0001$), что свидетельствует о тенденции к повышению частоты заболеваний ШМ с увеличением возраста. Возрастной промежуток 40–44 года был выбран в качестве значимого фактора риска прогрессирования патологического процесса ШМ в связи с максимально высоким относительным риском (ОР) (больше 1), по сравнению с другими аналогичными показателями, а также с учетом того, что нижняя граница 95% доверительного интервала (ДИ) $>1,0$. Следует отметить, что, согласно данным WHO 2013 г. (Guidelines for screening and treatment of precancerous lesions for cervical cancer prevention), наибольший риск возникновения РШМ имеет место в возрасте от 30 до 49 лет. Возраст женщин как фактор риска возникновения патологических процессов ШМ отмечен также другими исследователями [Saslow D., Solomon D. et al., 2012].

Нами была выявлена умеренная зависимость (с помощью корреляционного анализа Спирмена) между степенью прогрессирования заболеваний ШМ и наличием отягощенной наследственности (рак органов репродуктивной системы) ($R=0,5679$, $p<0,0001$), а также рака других локализаций. С учетом определения ОР больше 1; 95% ДИ $>1,0$, это позволило отнести данные факторы наследственной отягощенности онкологическими заболеваниями к статистически значимым факторам риска злокачественной трансформации и прогрессирования патологического процесса ШМ. Наследственный фактор, как правило, реализуется через механизм предрасположенности к болезни, когда те или иные наследуемые адаптативно-защитные механизмы не в состоянии противодействовать экзогенным канцерогенным воздействиям [Прилепская В.Н., 2005]. Ряд исследователей отмечали высокую степень наследственной отягощенности больных по развитию опухолевых заболеваний половых органов, что, по их мнению, является важным фактором, предрасполагающим к развитию заболеваний ШМ [Костава М.Н., 2009; Бебнева Т.Н., 2011].

При изучении соматических заболеваний обнаружено, что различия в частоте заболеваний органов дыхания, мочевыделительной, нервной систем, ЖКТ в группах сравнения были статистически незначимы ($p > 0,05$).

При исследовании репродуктивного анамнеза обращает на себя внимание тот факт, что количество родов и абортос статистически значимо не различалось между группами, однако выявлено значительное преобладание постабортных и послеродовых травматических повреждений ШМ у женщин с CIN III (83,3%) и инвазивным раком ШМ (90,9%) по сравнению с пациентками первых трех групп (9,4%, 11,6% и 43,5% соответственно); ($p < 0,05$). Травматические повреждения ШМ (послеродовые, постабортные и др.) в прогрессировании патологического процесса ШМ были определены в качестве значимого фактора риска на основании расчета ОР. Согласно мнению В.Н. Прилепской (2005) травматические повреждения ШМ с дальнейшей ее деформацией приводят к нарушению физиологического барьера, что сопровождается снижением местного иммунитета и облегчением проникновения инфекции. Данные других исследователей свидетельствуют, что предрак и РШМ нередко формируются на фоне постабортной и послеродовой рубцовой деформации ШМ и эктропиона [Радзинский В.Е., 2013; Ордянец И.М., 2013].

С помощью корреляционного анализа Пирсона нами была выявлена прямая умеренная зависимость между длительностью табакокурения и степенью прогрессирования патологического процесса ШМ ($r = 0,4176$, $p < 0,0001$), что свидетельствует о тенденции к увеличению частоты заболеваний ШМ при длительном курении. В качестве фактора прогрессирования неопластического процесса ШМ было выбрано табакокурение более 7 лет в связи с максимально высоким ОР по сравнению с другими аналогичными показателями, а также с учетом того, что нижняя граница 95% ДИ выше 1, что свидетельствует о статистической значимости данного фактора. Согласно данным многочисленных исследований, у курящих женщин по сравнению с некурящими в 2–3 раза выше риск развития РШМ [Daling J.R., Madeleine M.M., 2004; Schiffman M. et al., 2007].

Заслуживают внимания данные о перенесенных инфекциях у обследованных больных. Выявлено наиболее значимое возрастание частоты микст-инфекций

(сочетание 3 и более) в группах сравнения от 1 (3,1%) к 5 (72,7%) у обследованных больных; ($p < 0,05$), а также рецидивирующего бактериального вагиноза в этих же группах сравнения в 1 (9,4%) и 5 (86,4%); ($p < 0,05$). Факторы микст-инфекции (сочетание 3 и более) и рецидивирующего бактериального вагиноза в связи с максимально высокими ОР и показателем ДИ выше 1, были оценены как статистически значимые. Выводы других исследований свидетельствуют, что наличие микст-инфекций может способствовать развитию дистрофических изменений в многослойном плоском эпителии, нарушению межклеточных контактов, лейкоцитарной и лимфоцитарной инфильтрации стромы [Ищенко А.И., Побединский Н.М. и др., 1997; Афанасьев М.С., 2006; Унанян А.Л., 2012; Качалина Т.С., 2012; Стрижаков А.Н., 2014]. Данные систематического обзора, проведенного EF Murta, MA Souza, E Júnior Araújo (2000), подтверждают значимую связь между бактериальным вагинозом и CIN.

В собственном исследовании была выявлена высокая частота хронического цервицита у женщин с CIN II (58,7%), CIN III (59,5%) и плоскоклеточным РШМ (86,4%); ($p < 0,05$) относительно данного состояния в группах сравнения, что, наряду, с показателями ОР и ДИ, позволило выделить хронический цервицит в качестве фактора риска прогрессирования патологии ШМ. По данным Л.М. Лебедева (2009), у 47,1% больных хроническим цервицитом имеет место высокая частота инфицированности ВПЧ-ВП. Согласно мнению ряда других авторов, хронический цервицит является одним из основных экзогенных факторов, способствующих развитию дисплазий и РШМ [Афанасьев М.С., 2004; Качалина О.В., 2012; Унанян А.Л., 2012].

При анализе особенностей сексуальной жизни и контрацепции у обследованных женщин обращает на себя внимание статистически значимые показатели раннего начала половой жизни (до 18 лет, без применения барьерной контрацепции) и количества половых партнеров более 7 (с момента начала половой жизни) у женщин 4 (38,1%) и 5 (36,4%) групп по сравнению с аналогичными показателями у пациенток 1, 2 и 3 групп (9,4%, 16,3% и 21,7% соответственно); ($p < 0,05$). Расчет ОР фактора количества половых партнеров более 7 (с момента начала половой жизни) и начала половой жизни до 18 лет (без применения барьерной контрацепции) позволил выделить данный фактор в качестве статистически значимого критерия в прогрессировании

патологии ШМ. Взаимосвязь между инфицированием ВПЧ и беспорядочной половой жизнью была отмечена в других исследованиях [Молочков В.А., 2005; Роговская С.И., 2011].

Анализ клинической картины у больных с патологическими процессами ШМ свидетельствует, что клиническая симптоматика, у пациенток с заболеваниями ШМ, как правило, бывает обусловлена наличием сочетанной патологии матки (эндо- и миометрия). Сочетание миомы матки с аденомиозом и/или гиперпластическим процессом эндометрия у пациенток с CIN III (47,6%) и РШМ (59,1%) встречалось значительно чаще по сравнению с частотой встречаемости сочетанной патологии матки у женщин групп сравнения; ($p < 0,05$). Данный факт, по-видимому, обусловлен взаимостимулирующим влиянием патологических процессов эндо- и миометрия на состояние ШМ, которое реализуется через механизмы межклеточных взаимодействий факторов роста [Пальцев М.А., 1995]. Согласно данным И.С. Сидоровой и А.В. Залетаева (2012), существуют значимые различия в частоте возникновения CIN у женщин с сочетанной по сравнению с изолированной патологией матки ($p < 0,001$), где относительный риск возникновения CIN у женщин с сочетанными заболеваниями матки (миома матки, аденомиоз, гиперплазия эндометрия) в 6,2 раза выше, чем у женщин с любым изолированным заболеванием матки. В работе В.Н. Прилепской, А.Ю. Шиляева (2009) было выявлено, что у больных с миомой матки частота возникновения патологических процессов ШМ и вероятность их прогрессирования несколько выше, чем у женщин без патологии тела матки.

В нашем исследовании выявлена персистенция ВПЧ-ВР у 80 женщин (43,2%), вирусная нагрузка ВПЧ-ВР более 10^5 геномных эквивалентов у 83 женщин (44,9%), а также одновременное сочетание двух и более типов ВПЧ-ВР инфекции у 96 женщин (51,9%). Анализ инфицированности ВПЧ и расчета ОР позволил определить в качестве значимых факторов прогрессирования неопластического процесса - персистенцию ВПЧ-ВР, вирусную нагрузку ВПЧ-ВР более 10^5 геномных эквивалентов, а также одновременное сочетание двух и более типов ВПЧ-ВР. Данные литературы свидетельствуют, что однолетняя или двухлетняя персистенция, особенно ВПЧ 16 типа, является фактором высокого риска для развития CIN 3 или 3+ [Сухих Г.Т., Прилепская

В.Н., 2012; Роговская С.И., Липова Е.В., 2014]. В исследовании С.И. Роговской (2012) сочетанная ВПЧ-инфекция свойственна в большей степени больным с HSIL (58%), чем пациенткам с латентной папиллома-вирусной инфекцией (ПВИ) и LSIL (46%). Вместе с тем Г.Н. Минкина и Е.В. Комарова (2010) выявили, что 40,2% пациенток с интраэпителиальными поражениями были одновременно инфицированы несколькими типами ВПЧ, а у 59,8% обнаружен один тип, причем степень тяжести поражения, по данным авторов, не зависела от количества идентифицированных типов ВПЧ. Данные других источников литературы также свидетельствуют, что вирусная нагрузка ассоциирована со степенью CIN, однако с указанием на то, что вирусная нагрузка как единственный маркер определения риска неопластической трансформации недостаточно информативна [Сухих Г.Т, Прилепская В.Н., 2012; Роговская С.И., 2014; Минкина Г.Н., 2014].

Оценка случаев наличия морфологически верифицированного CIN в анамнезе (данный факт регистрировали при запросе парафиновых блоков и пересмотре «стеклол» препарата) выявила его статистическую значимость в отношении возможного прогрессирования патологического процесса ШМ в 4 (28,6%) и 5 (31,8%) группах по сравнению с тремя остальными группами (3,1%, 9,3% и 15,2% соответственно); ($p < 0,05$).

Таким образом, полученные результаты клинико-анамнестических и диагностических особенностей в исследуемых группах больных позволили определить статистически значимые факторы риска развития злокачественной трансформации ШМ. Для дальнейшего усовершенствования подхода к формированию групп повышенного онкологического риска нами был проведен следующий этап исследования, направленный на выявление патогенетических факторов риска развития РШМ, путем детального анализа молекулярно-биологических особенностей ацетилирования и метилирования с вышеуказанными клиническими факторами риска при патологических процессах ШМ, ассоциированных с ВПЧ.

Молекулярно-биологические особенности процессов ацетилирования, метилирования и пролиферации при заболеваниях шейки матки, ассоциированных с папилломавирусной инфекцией

В настоящее время в разгадке причин возникновения и прогрессирования опухолевого процесса особое место принадлежит эпигенетическим изменениям. Эпигенетические технологии относятся к важнейшим инновациям, способным в ближайшей перспективе достигнуть значительных успехов в борьбе над раком путем создания новых высокоселективных методов молекулярной диагностики и терапии [Ferrari R., 2012; Chen P., 2013; Johannsen E., 2013; Kallestad L., 2013].

Согласно мнению многих современных исследователей, роль эпигенетики в профилактике и лечении рака значительно весомее, чем роль и значение генетики [Schapira M., 2011; Mirabello L., 2013; Wilson G.A., 2013; Wollebo H.S., 2013]. К основным эпигенетическим процессам относятся ацетилирование гистонов и метилирование ДНК [Li X., 2012; Liu N., 2012; Lu Q., 2012; Haery L., 2015].

Ацетилирование гистонов является одним из важных звеньев эпигенетики, представляющей собой перспективное направление, как в отношении прогнозирования опухолевого процесса, так и в создании противоопухолевых препаратов для лечения различных видов злокачественной патологии, в связи с чем ее роль в патогенезе развития РШМ вызывает большой интерес [Danam R.P., 2005; Chen P., 2013; Carrer A., 2014].

С целью выявления особенностей процесса ацетилирования при заболеваниях шейки матки нами была проведена оценка уровней экспрессий гистондеацетилазы HDAC1 и гистондеацетилазы HDAC2 в ткани шейки матки при доброкачественных процессах, CIN I, CIN II, CIN III и инвазивном раке. Гистондеацетилазы (HDACs) – ферменты, способствующие удалению ацетильной группы гистонов, т.е. деацетелированию [Haberland M., 2009; Li X., 2012; Micelli C., 2012]. Гистондеацетилазы I класса (HDAC 1, HDAC 2) относятся к классическим, располагаются в ядре клетки и катализируют ряд негистоновых субстратов, включая транскрипционные факторы [Li X., 2012; Haery L., 2015; Micelli C., 2015; Song C., 2015]. В нашем исследовании наиболее высокие уровни экспрессий HDAC1 и HDAC2 отмечались в 4 и 5 группах (по сравнению с первыми тремя группами), достигая максимума в 4 группе, соответственно, HDAC1 – 3,53, а HDAC2 – 3,83. С результатами нашего исследования согласуются данные M. Anton, M. Horký, S. Kuchtícková (2004),

которые в цервикальных мазках выявили роль ацетилирования гистонов в прогрессировании неопластического процесса ШМ.

Другим значимым эпигенетическим событием является процесс метилирования ДНК, который реализуется за счет активности ферментов ДНК-метилтрансфераз: DNMT1, DNMT2, DNMT3a, DNMT3b [Chalernet K., 2015; Siegel E.M., 2015]. Представляет собой особый интерес тот факт, что DNMT1 является белком, ассоциированным с гистондеацетилазами HDAC1 и HDAC2, с фактором репликации PCNA, белком гена-супрессора опухолевого роста Rb и др. [Banno K., 2014; Chalernet K., 2015]. DNMT2 осуществляет процесс метилирования тРНК [Liu N., 2012; Lu Q., 2012].

С целью изучения молекулярно-биологических особенностей процесса метилирования при патологических процессах ШМ были оценены уровни экспрессии ДНК-метилтрансферазы DNMT1 и ДНК-метилтрансферазы DNMT2 в ткани ШМ у исследуемых групп больных. Наибольшие показатели экспрессий DNMT1 и DNMT2 отмечались в 4 группе (по сравнению с первыми тремя группами), составляя, соответственно: DNMT1 – 5,52, а DNMT2 – 5,50; а в 5 группе DNMT1 – 3,63, а DNMT2 – 3,61.

Важно отметить, что полученные результаты исследования эпигенетических маркеров свидетельствуют о том, что показатели деацетилирования и деметилирования возрастают в ряду от доброкачественных процессов ШМ к неопластическим процессам, достигая максимальных значений при CIN III, а при инвазивном РШМ отмечается некоторое снижение указанных показателей. Это по-видимому, связано с инициацией злокачественного роста при CIN III процессами деацетилирования и деметилирования, и отсутствием их ключевой роли для дальнейшего прогрессирования инвазивного процесса при РШМ, которая обеспечивается комплексом других молекулярных механизмов.

Ранее в исследовании И.П. Евтиной (2011 г.) удалось выявить, что аномальное метилирование определенных генов (MLH1, HIC1, RASSF1A, MGMT, N33 и CDH1), характеризующиеся повышением их частоты в ряду от доброкачественных процессов ШМ до РШМ. Однако следует отметить, что в указанном исследовании

(Евтина И.П., 2011) проводилась оценка метилирования по факту случившегося эпигенетического события, что, несомненно, является более поздним прогностическим маркером, чем оценка активности ферментных систем, предшествующих и реализующих процесс метилирования.

Важным критерием пролиферативной активности при заболеваниях ШМ является определение уровней экспрессий Ki-67 и p-53, в связи с чем нами были исследованы ИГХ показатели, отражающие степень экспрессии указанных генов в ткани шейки матки у всех больных обследованных групп. Белок p-53 является продуктом гена-супрессора опухолевого роста, при повреждении которого белок p-53 активируется, что выражается в остановке клеточного цикла и репликации ДНК [Alonio L.V., 2000; Hellberg P., 2009]. Высокие уровни экспрессий Ki-67 и p-53 отмечались в 4 и 5 группах (по сравнению с первыми тремя группами), составляя, соответственно, в 4 гр. Ki-67 – 86,1, а p-53 – 8,2; в 5 группе Ki-67 – 77,2, а p-53 – 3,61. В связи с полученными нами результатами заслуживают внимания данные ряда других исследований, показывающие p53-зависимое индуцирование апоптоза ингибиторами HDAC [Bandyopadhyay D., 2004], что может свидетельствовать о наличии p53-зависимого варианта регуляции процесса апоптоза.

С помощью корреляционного анализа Пирсона нами была выявлена прямая сильная зависимость между HDAC1 ($r=0,7024$, $p<0,0001$), HDAC2 ($r=0,7123$, $p<0,0001$), DNMT1 ($r=0,7360$, $p<0,0001$), DNMT2 ($r=0,7494$, $p<0,0001$), Ki-67 ($r=0,8643$, $p<0,0001$), p-53 ($r=0,8643$, $p<0,0001$) и степенью прогрессирования патологического процесса ШМ.

Полученные результаты исследования в целом согласуются с рядом других работ, свидетельствующих о тесной взаимосвязи процессов ацетилирования, метилирования и пролиферации. R.P. Danam, S.R. Howell и T.P. Brent (2005) удалось выявить (в клеточных линиях), что в эпигенетическое регулирование экспрессии гена-супрессора Об-methylguanine-DNA-methyltransferase (MGMT) вовлечено ацетилирование гистонов и метилирование CpG-связанных белков. В исследованиях D. Liu, P. Zhou (2012) было выявлено влияние комплекса HDAC1/DNMT при раке шейки матки на подавление Oct4 (Octamer-bindingtranscriptionfactor 4), который представляет собой важный эмбриональный транскрипционный фактор.

Далее для оценки риска прогрессирования (прогнозирования) злокачественной трансформации (переход в CIN III и инвазивный плоскоклеточный рак) нами был проведен многофакторный анализ (бинарная логистическая регрессия) полученных клинико-молекулярных показателей, в связи с чем была построена значимая модель (Chi-квадрат=92,620, $p < 0,00001$) для оценки факторов риска.

Коэффициенты уравнения наиболее значимых клинических прогностических факторов прогрессии, высчитанных на основании расчета формулы бинарной логистической регрессии, были использованы в оценке риска прогрессирования злокачественной трансформации. В итоге была получена формула: $Z = -42,107 + 2,401 * X1 + 2,314 * X2 + 2,195 * X3 + 1,386 * X4 + 1,371 * X5 + 1,342 * X6 + 1,328 * X7 + 1,304 * X8 + 1,298 * X9 + 1,275 * X10 + 1,238 * X11 + 1,168 * X12 + 1,029 * X13 + 0,485 * X14 + 0,837 * X15 + 0,82 * X16 + 1,435 * X17 + 1,504 * X18 + 1,406 * X19 + 1,437 * X20 + 1,204 * X21 + 1,137 * X22$, где * – умножение, 3,714 – натуральный логарифм, X1 – диагноз, соответствующий доброкачественным процессам (0), CIN I – 1, CIN II – 2, CIN III – 3, X2 – вирусная нагрузка ВПЧ-ВР более 10^5 геномных эквивалентов – выше, X3 – персистенция ВПЧ высокого онкогенного риска, X4 – морфологически верифицированный CIN в анамнезе, X5 – ИППП микст-инфекции (3 и более), X6 – рецидивирующий бактериальный вагиноз, X7 – травматические повреждения ШМ (послеродовые, постабортные и др.), X8 – возраст от 40 лет, X9 – раннее начало регулярной половой жизни (до 18 лет) без применения барьерных методов контрацепции, X10 – более 7 половых партнеров (с момента сексуального дебюта), X11 – одновременное сочетание двух и более типов ВПЧ высокого онкогенного риска инфекции, X12 – хронический цервицит, X13 – рак органов репродуктивной системы: наследственность, X14 – наследственная отягощенность по другим онкологическим заболеваниям, X15 – сочетание миомы матки с аденомиозом и/или гиперпластическим процессом эндометрия, X16 – табакокурение (в течение более чем 7 лет и не менее 5 шт. в день), X17 – HDAC 1, X18 – HDAC 2, X19 – DNMT1, X20 – DNMT2, X21 – Ki-67, X22 – p-53.

Расчетный прогноз вероятности – значение более 0,5 – означает высокую вероятность злокачественной трансформации (переход в CIN III и инвазивный

плоскоклеточный рак), а значение менее 0,5 означает низкую вероятность злокачественной трансформации.

Таким образом, при определении тактики ведения пациенток с заболеваниями ШМ целесообразно установление степени риска злокачественной трансформации для последующего дифференцированного и наиболее обоснованного подхода, особенно в случаях, при которых существуют крайне различные подходы к выбору тактики лечения и ведения данной группы больных.

Оценка вероятности злокачественной трансформации была возможна только после морфологической верификации патологического процесса ШМ. Материал для морфологического исследования получали в результате проведенной прицельной биопсии и/или эксцизии ШМ.

С лечебно-диагностической целью проводили прицельную биопсию ШМ (39,5%), петлевую эксцизию LEEP (loop electrosurgical excisional procedure) и конусовидную эксцизию (всего 76,8%). При гистологическом исследовании особое внимание уделяли морфологическому анализу состояния краев удаленного после эксцизии участка ШМ. «Чистые» края резекции были отмечены у 110 пациенток (59,5%), а наличие остаточного CIN в крае резекции – у 32 женщин (17,3%).

Наиболее важным клиническим аспектом после проведенной эксцизии является вероятность повторного развития патологического процесса ШМ, в частности возникновения резидуальной/рецидивной болезни. В нашем исследовании рецидивы CIN (n=35) регистрировались преимущественно у больных третьей и четвертой групп. Из общего количества случаев рецидивирования (n=35) рецидив CIN в течение 2 лет после эксцизии имел место у 21 (11,4%) женщин, а рецидив CIN у больных с остаточным CIN в крае резекции (в течение 2 лет) выявлен у 14 (7,6%) пациенток.

Непараметрический корреляционный анализ Спирмена показал сильную корреляционную зависимость между наличием рецидивов в течение 2 лет и возрастанием степени активности патологического процесса ШМ ($R=0,716$, $p<0,001$).

С учетом важности проблемы рецидивирования неопластического процесса ШМ нами проведен сравнительный анализ числа общего количества рецидивов, в том числе рецидивов CIN, у больных с остаточным CIN в крае резекции, с наличием

установленного факта низкой или высокой степени риска злокачественной трансформации. Заслуживает внимания тот факт, что у женщин с рецидивом выявлена высокая степень риска злокачественной трансформации ШМ. В частности, все случаи (n=21) рецидивов в течение 2 лет после проведенной эксцизии и рецидивов (n=14) у больных с остаточным CIN в крае резекции (в течение 2 лет) характеризовались принадлежностью к группе высокого риска развития злокачественной трансформации ШМ. С помощью корреляционного анализа Спирмена подтверждена сильная зависимость между рецидивами и высокой степенью риска развития злокачественной трансформации ШМ ($R=0,298$, $p=0,002$).

М. Herfs, J. Somja, В.Е. Howitt (2015) с целью оценки частоты и особенностей рецидивирования неопластического процесса ШМ провели ИГХ исследование у 131 пациенток после процедуры эксцизии. Авторы выявили, что рецидивирование CIN, кроме характера проведенной эксцизии и состояния зоны трансформации, в большей степени зависело от варианта p16 иммунофенотипа.

Результаты многочисленных исследований свидетельствуют, что после хирургического лечения CIN следует быть настороженным как в плане рецидивирования неопластического процесса, так и в отношении возникновения инвазивной карциномы [Park J.Y. et al., 2007; Prato B. et al., 2008].

Риск резидуальной/рецидивной болезни после хирургического лечения CIN составляет 3–29% и проявляется преимущественно в течение первых двух лет после операции [Soutter W.P., 1997; Flannely G., 2001]. Вместе с тем отсутствие атипичных клеток в краях удаленной ткани не исключает повторного развития неопластического процесса, хотя известны наблюдения спонтанной регрессии очагов CIN в окружности ткани после эксцизии.

Рецидивы, как правило, возникают в течение первых 2 лет после операции [Подзолкова Н.М., 2011; Минкина Г.Н., Калинина В.С., 2011; Роговская С.И., 2014]. Следует иметь в виду, что патологический процесс может локализоваться вне зоны трансформации и, соответственно, быть причиной рецидивирования болезни. Согласно мнению С.И. Роговской (2014), у женщин, лечившихся от CIN, имеет место

пятикратно высокий риск инвазивного процесса, поэтому считается целесообразным наблюдение женщин после лечения CIN в течение 10 лет.

Согласно данным литературы, после эксцизии шейки матки (петлевой или конизационной), проводимой в связи с CIN, в 5–53% случаев в краях резекции обнаруживаются атипичные клетки [Cox J.T., 2002; Минкина Г.Н., Манухин И.Б., 2009; Калинина В.С., 2011; Сухих Г.Т., Прилепская В.Н., 2012; Подзолкова Н.М., 2013; Роговская С.И., 2016]. Резидуальная болезнь не проявляется примерно у половины больных, у которых в краях резецированной ткани имеет место неопластический процесс, так как атипичные изменения могут спонтанно регрессировать [Flannely G., 2001; Paraskevaidis E., 2004]. Однако важно отметить, что отсутствие атипичных клеток в краях удаленной ткани не исключает резидуальную болезнь.

В то же время существующая в настоящее время дальнейшая тактика ведения и терапии при выявлении CIN II или CIN III в краях резецированной ткани различна: от наблюдения с применением ВПЧ-тестирования и цитологического контроля до повторной эксцизии и даже гистерэктомии [Nuovo J., 2000; Wright T.C.Jr., 2004; Jordan J., 2008].

Результаты наших исследований могут внести определенный вклад в решение вопросов, связанных с тактикой ведения и лечения у больных с CIN I, а также в случаях CIN I–III в крае резекции. В частности, при выявлении высокого риска при CIN I следует рассмотреть возможность проведения эксцизии ШМ, а при обнаруженном низком риске допустима тактика дальнейшего наблюдения с применением цитологического контроля и ВПЧ-тестирования с типированием. В случае остаточного CIN в резецированных краях и при определении высокого риска предпочтение следует отдавать повторной эксцизии, а в ряде случаев рассмотреть целесообразность проведения гистерэктомии. При выявленном низком риске рецидивирования патологического процесса у женщин с остаточным CIN в резецированных краях допустима тактика наблюдения.

Результаты наших исследований также подтвердили целесообразность и перспективность разработки направления таргетной (целевой, направленной) терапии при неопластическом процессе ШМ, заключающейся в применении ингибиторов

гистондеацетилазы. Согласно мнению многих исследователей, ингибиторы гистоновой деацетилазы (iHDACs) представляют собой новый класс таргетных препаратов против рака, в том числе рака шейки матки [Chavez-Blanco A., Segura-Pacheco B., 2005; Lin Z., Bazzaro M., 2009; Borutinskaite V.V., Magnusson K.E., 2012].

В заключении следует отметить, что полученные результаты работы создают основу для реализации персонализированной стратегии прогнозирования и профилактики РШМ путем междисциплинарного подхода с использованием данных клиники, морфологических исследований и результатов эпигенетических исследований.

Выводы

1. Наиболее клинически и статистически значимыми факторами риска (по степени значимости) прогрессирования патологического процесса, ассоциированного с ВПЧ, и риска развития злокачественной трансформации шейки матки являются (с максимально высоким ОР >1 и с нижней границей 95% ДИ >1): вирусная нагрузка ВПЧ высокого онкогенного риска более 10^5 геномных эквивалентов; персистенция ВПЧ высокого онкогенного риска; ранее морфологически верифицированная CIN; микст-инфекции, передаваемые половым путем (3 и более); рецидивирующий бактериальный вагиноз; травматические повреждения шейки матки (послеродовые, постабортные); возраст более 40 лет; раннее начало регулярной половой жизни (до 18 лет) без применения барьерных методов контрацепции; более 7 половых партнеров (с момента сексуального дебюта); одновременное сочетание двух и более типов ВПЧ высокого онкогенного риска; хронический цервицит; наследственная отягощенность раком органов репродуктивной системы; наследственная отягощенность общими онкологическими заболеваниями; сочетание миомы матки с аденомиозом и/или гиперпластическим процессом эндометрия; табакокурение.

2. Показатели экспрессий гистондеацетилаз (HDAC1, HDAC2) возрастают в ряду от доброкачественных процессов шейки матки до цервикальной интраэпителиальной неоплазии тяжелой степени, что свидетельствует о вовлеченности ацетилирования гистонов в прогрессировании ВПЧ-ассоциированного патологического процесса и злокачественной трансформации шейки матки.

3. Уровни экспрессий ДНК-метилтрансфераз (DNMT1, DNMT 2), а также маркеров пролиферации (Ki-67, p-53) характеризуются увеличением их показателей, достигающих максимального значения при цервикальной интраэпителиальной неоплазии тяжелой степени.

4. Сочетанное определение клинических и молекулярно-биологических особенностей с использованием многофакторного анализа методом бинарной логистической регрессии позволило разработать способ определения степени риска прогрессирования патологического процесса, ассоциированного с ВПЧ, и злокачественной трансформации шейки матки, и научно обоснованно сформировать группы пациенток низкой и высокой степени онкологического риска. Частота рецидивирующих цервикальных интраэпителиальных неоплазий характеризуется сильной корреляционной зависимостью со степенью возрастания выраженности неопластического процесса, а больные с рецидивирующими CIN после остаточной неоплазии в крае резекции относятся к группе высокого риска по прогрессированию предракового процесса и злокачественной трансформации шейки матки.

Практические рекомендации

- Для осуществления индивидуального (персонализированного) подхода при заболеваниях шейки матки, ассоциированных с папилломавирусной инфекцией, целесообразно проведение комплексного клинического обследования с определением эпигенетических особенностей, наряду с оценкой клинико-anamnestических показателей, и в итоге с определением групп повышенного или пониженного онкологического риска.
- Тактика ведения и лечения у больных с CIN, в частности при CIN I, а также в случаях CIN в крае резекции должна базироваться на определении степени риска прогрессирования патологических процессов, ассоциированных с папилломавирусной инфекцией, и развития злокачественной трансформации шейки матки.
- У пациенток с CIN I при определении высокой степени риска злокачественной трансформации ($p > 0,5$) тактика ведения должна базироваться на проведении более радикальных подходов (эксцизия).

- В случаях остаточного CIN в краях резекции после проведенной эксцизии и определения высокой степени риска злокачественной трансформации ($p > 0,5$) тактика ведения должна базироваться на проведении повторной эксцизии.

- Новым и перспективным направлением практической реализации эффективной профилактики рака шейки матки при заболеваниях, ассоциированных с папилломавирусной инфекцией, является поиск и разработка препаратов, ингибирующих гистон-деацетилазу.

Список работ, опубликованных по теме диссертации:

1. Евтина И.П., Сидорова И.С., Унанян А.Л., **Кадырова А.Э.**, Карпов Д.В. и др.

Современные аспекты патогенеза доброкачественных и предраковых заболеваний шейки матки (обзор литературы) // **Medline.ru** (<http://www.medline.ru/public/art/tom12/art36.html>) – 2011. – Т. 12. – С. 431–447.

2. Сидорова И.С., Унанян А.Л., **Кадырова А.Э.** Бактериальный вагиноз: особенности этиопатогенеза, клиники, диагностики, лечения и профилактики // Эффективная фармакотерапия. Акушерство и гинекология. – 2011. – №1. – С.62–67.

3. Ша Ша, Сидорова И.С., Унанян А.Л., Жолобова М.Н., **Кадырова А.Э.** и др. Клинико-анамнестическая характеристика больных с доброкачественными и предраковыми процессами шейки матки при сочетанной патологии матки // **Акушерство, гинекология и репродукция.** – 2012. – № 1. – С. 23–26.

4. Унанян А.Л., Сидорова И.С., **Кадырова А.Э.** и др. Вопросы патогенеза и терапии заболеваний шейки матки, ассоциированных с папилломавирусной инфекцией // **Акушерство, гинекология и репродукция.** – 2012. – № 1. – С. 27–30.

5. Сидорова И.С., Унанян А.Л., Аракелов С.Э., **Кадырова А.Э.** и др. Хронический цервицит и хронический эндометрит: общие аспекты патогенеза и патогенетической терапии // **Медицинский совет.** – 2013. – № 4. – С. 88–94.

6. E.A. Kogan, A.L. Unanyan, **A.E. Kadyrova**, I.S. Sidorova, A.I. Ischenko et. al. "Immunohistochemical Analysis of Epigenetic Markers in Cervical Pathologies Associated with Human Papillomavirus Infection" *BioNanoScience* (2016): 1–4, doi: 10.1007/s12668-016-0339-1