

ПРИСЯЖНАЯ

Татьяна Сергеевна

**КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНОЕ ЗНАЧЕНИЕ ОЦЕНКИ ЭКСПРЕССИИ
МИКРО-РНК В ДИАГНОСТИКЕ
ЦЕРВИКАЛЬНЫХ ИНТРАЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ НЕОПЛАЗИЙ**

3.1.4. Акушерство и гинекология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Санкт-Петербург
2022

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научный руководитель:

Берлев Игорь Викторович - доктор медицинских наук, профессор

Официальные оппоненты:

Кедрова Анна Генриховна - доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой акушерства и гинекологии Академии последипломного образования ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий ФМБА России», заведующая отделением онкологии.

Леваков Сергей Александрович - доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой акушерства и гинекологии ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет).

Ведущая организация: ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии».

Защита состоится «_____» _____ 2022 года в ___ часов на заседании Диссертационного совета 99.2.037.02 при ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. И.П.Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 197022, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, д. 6-8.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. И.П.Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации и на сайте www.lspbgmu.ru

Автореферат разослан «__» _____ 2022 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор медицинских наук

Молчанов Олег Леонидович

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность и степень разработанности темы исследования

Цервикальные интраэпителиальные неоплазии относятся к заболеваниям, предшествующим инвазивному раку шейки матки. Злокачественные новообразования шейки матки являются одними из самых распространенных заболеваний в мире, занимая четвертое место в структуре женской онкологической заболеваемости (GLOBOCAN, 2020). В России удельный вес рака шейки матки в структуре заболеваемости злокачественными новообразованиями составляет 5,2% (Каприн А.Д., 2020).

Своевременное выявление наличия, распространенности и тяжести цервикальной интраэпителиальной неоплазии является важной клинической задачей, способствующей снижению заболеваемости раком шейки матки.

Традиционно в качестве скрининга цервикальной онкопатологии используется цитологическое исследование мазков, взятых с экто-эндоцервикса (Chantziantoniou N., 2017; Каприн А.Д., 2015). Несмотря на широкое применение в качестве основного метода скрининга рака шейки матки, Пап-тест имеет ограничения, что влечет за собой необходимость повторного проведения исследования и высокую частоту проведения кольпоскопии (Schiffman M., 2017).

Скрининг на основе ВПЧ-тестирования, а также комбинирование его с цитологическим является более эффективным, чем цитологическое исследование, и позволяет увеличивать межскрининговый интервал (Chrysostomou A., 2018; Yang J., 2018). Однако высокая распространенность ВПЧ-инфекции в сочетании с низкой специфичностью ограничивают использование тестирования на наличие вируса. Прогностическое значение тестирования на ВПЧ пациенток с уже имеющимися поражениями (CIN или SIL) также является низким, требуя проведения дальнейшего обследования (Melnikow J., 2018; Smith R.A., 2018).

Для углубленной диагностики широко используется кольпоскопия с прицельной биопсией и гистологической оценкой материала. В роли ранних предвестников тяжелых поражений рака шейки матки предложено иммуноцитохимическое и иммуногистохимическое определение онкобелков p16/Ki67 и тестирование на мРНК ВПЧ E6/E7 (Zhu Y., 2019).

Несмотря на существенные достижения в диагностике патологии шейки матки, в последние годы наблюдается неуклонный рост цервикальных неоплазий. Более 15% случаев злокачественных новообразований шейки матки диагностируют в возрасте от 20 до 34 лет (Сухих Г.Т., 2019). В связи с этим большую актуальность имеет разработка и внедрение в

клиническую практику новых диагностических и прогностических методов цервикальных интраэпителиальных неоплазий.

В последнее время появляется все больше работ, подчеркивающих важную роль микро-РНК в развитии и прогрессировании различных заболеваний, в том числе злокачественных (Колесников Н.Н., 2016; Luo M., 2019). Молекулы микро-РНК обладают высокой стабильностью (Friga T., 2015), что позволяет определять их уровень в биологических средах с помощью количественной ПЦР и некоторых других методов (Lopez J.P., 2015).

В настоящее время имеется определенный опыт тестирования микро-РНК в тканях шейки матки. Тем не менее значимость тестов анализа экспрессии микро-РНК в диагностике, оценке эффективности лечения и прогнозе течения цервикальных интраэпителиальных неоплазий да настоящего времени в полной мере не определена.

Цель исследования

Повышение эффективности диагностики и прогнозирования цервикальных интраэпителиальных неоплазий на основе оценки экспрессии микро-РНК в клетках цервикального эпителия.

Задачи исследования

1. Изучить клинические характеристики, данные микроскопического и кольпоскопического исследования у пациенток с поражениями шейки матки различной степени тяжести, уточнить факторы, определяющие развитие и клиническое течение SIL.
2. Изучить уровень инфицирования папилломавирусами высокоонкогенного типа у женщин с цервикальными неоплазиями различной степени тяжести, определить роль ВПЧ – тестирования в диагностике заболевания.
3. Изучить спектр микро-РНК в материале цервикального мазка у пациенток с эпителиальными аномалиями различной степени тяжести, определить молекулы, использование которых возможно в качестве диагностического маркера неопластических поражений шейки матки.
4. Изучить спектр микро-РНК в материале цервикального мазка у пациенток с различным течением цервикальных интраэпителиальных неоплазий легкой степени, определить молекулы, изменение экспрессии которых коррелирует с прогнозом течения заболевания.
5. Разработать метод анализа ряда «маркерных» молекул микро-РНК и алгоритм клинической интерпретации полученных результатов.

Научная новизна исследования

На основании анализа результатов клинико-лабораторных и инструментальных

методов исследования у пациенток с поражениями шейки матки различной степени тяжести, уточнены факторы риска развития и клинического течения цервикальных неоплазий.

Разработан метод на основе определения «реципрокных» пар микро-РНК» в клетках цервикального эпителия, позволяющий повысить эффективность диагностики и прогнозирования цервикальных интраэпителиальных неоплазий.

Впервые показано, что «реципрокные» пары микроРНК-126/микроРНК-375, микроРНК-20а/микроРНК-375, микроРНК-126/микроРНК-145 могут быть использованы в качестве диагностического маркера неопластических поражений шейки.

Впервые показано, для прогноза течения поражений шейки матки легкой степени тяжести могут быть использованы «реципрокные» пары: микроРНК-126/микроРНК-182, микроРНК-21/микроРНК-182, микроРНК-1246/микроРНК-182, микроРНК-10b/микроРНК-126, микроРНК-197b/микроРНК-126, микроРНК-29b/микроРНК-126.

Положения, выносимые на защиту

1. На основании сравнительного анализа результатов клинико-лабораторных и инструментальных методов исследования у пациенток с поражениями шейки матки различной степени тяжести показано, что факторы риска развития цервикальных интраэпителиальных неоплазий отличаются от факторов, способствующих прогрессированию уже имеющихся изменений плоскоклеточного эпителия.

2. Общий уровень инфицирования ВПЧ женщин с LSIL составляет 70,91%, с HSIL - 93,33%. Ко-инфекция несколькими генотипами являются факторами риска развития и прогрессирования предраковых заболеваний шейки матки. Отсутствие ВПЧ не позволяет исключить развитие плоскоклеточных интраэпителиальных поражений и их прогрессирование.

3. Злокачественная трансформация цервикального эпителия является мультистадийным процессом, характеризующимся прогрессивным изменением экспрессии некоторых молекул микро-РНК: активацией экспрессии микроРНК-20а, микроРНК-126, микроРНК-106, микроРНК-196 и угнетением экспрессии микроРНК-375 и микроРНК-145 ($p < 0,05$). Пары микро-РНК с разнонаправленными изменениями экспрессионной активности: микроРНК-20а / микроРНК -375, микроРНК -106/ микроРНК-375 и микроРНК-196/ микроРНК-145 могут быть использованы в качестве диагностического маркера неопластических поражений шейки.

4. Повышение экспрессии микроРНК-126, микроРНК-375, микроРНК-21, микроРНК-1246 и снижение экспрессии микроРНК-182 коррелируют с неблагоприятным течением интраэпителиальных поражений легкой степени. Снижение уровней микроРНК-126 и микроРНК-29b характеризуют регресс аномалий цервикального эпителия.

«Реципрокные» пары: микроРНК-126/микроРНК-182, микроРНК-21/микроРНК-182, микроРНК-1246/микроРНК-182, микроРНК-10b/микроРНК-126, микроРНК-197b/микроРНК-126, микроРНК-29b/микроРНК-126 могут рассматриваться в качестве потенциальных биомаркеров прогноза течения предраковых заболеваний шейки матки легкой степени.

Теоретическая и практическая значимость работы

Высокий диагностический потенциал микро-РНК позволит использовать метод «реципрокных пар» в ситуациях, когда невозможно или нежелательно проведения прицельной биопсии с последующим гистологическим исследованием полученного материала: во время беременности, на фоне выраженного воспалительного процесса, при соматических противопоказаниях. Высокая прогностическая ценность микро-РНК в оценке риска прогрессирования цервикальных интраэпителиальных неоплазий до рака позволит уменьшить чрезмерную диагностическую и лечебную агрессию в отношении женщин с поражениями шейки матки.

Использование результатов диссертационного исследования позволит врачам акушерам-гинекологам и онкологам выявлять факторы риска развития и прогрессирования предраковых заболеваний шейки матки и своевременно проводить первичную и вторичную профилактику рака шейки матки.

Разработка диагностических и прогностических методов на основе анализа пар микро-РНК с разнонаправленными изменениями экспрессионной активности, позволяет включить определения уровня микро-РНК, наряду с ВПЧ – тестированием и расширенной кольпоскопией, в программы комплексного обследования женщин с патологией шейки матки с целью снижения заболеваемости цервикальными неоплазиями.

Апробация, внедрение и личный вклад автора

Результаты исследования и основные положения диссертационной работы доложены и обсуждены на следующих научно-практических конференциях и конгрессах: 92-ая Всероссийская научно – практической конференции с международным участием «Мечниковские чтения-2019» (Санкт-Петербург, 2019 г.), II Всероссийская конференция с международным участием (Горно-Алтайск, 2-5 июля 2019 г.), VI Петербургского международного онкологического форума «Белые ночи 2020» (Санкт-Петербург, 11 сентября 2020 г.), 4th ESGO State of the Art Conference of the European Society of Gynaecological Oncology, (Copenhagen, Denmark, December 14–16, 2020 г. (постерный доклад), 9-я всероссийская научно-практическая конференция молодых ученых и специалистов «Трансляционная медицина: от теории к практике» (Санкт-Петербург, 22 апреля 2021 г.), 94-ая Всероссийская научно – практической конференции с международным участием «Мечниковские чтения-2021» (Санкт-Петербург, 28-29 апреля 2021 г.). Апробация работы проведена на заседании кафедры акушерства и

гинекологии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (протокол №2 от 23.01.2021 года) и на заседании научной проблемной комиссии №8 «Здоровье матери и ребенка» федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (протокол №2 от 01.03.2021 г.).

Результаты исследования внедрены в лечебную деятельность хирургического онкогинекологического отделения и научно-исследовательскую деятельность научной лаборатории субклеточных технологий с группой онкоэндокринологии федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Петрова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, в учебный процесс кафедры акушерства и гинекологии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

По теме диссертации опубликовано 10 научных работ, в том числе 3 публикации в рецензируемых научных журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией для публикации основных научных результатов диссертаций, 2 публикации в англоязычных журналах.

Автором лично выполнены анализ литературных данных, определены цель и задачи исследования, проанализированы амбулаторные карты и сформированы исследовательские группы. Автором лично проводилось клинико-лабораторное и инструментальное обследование женщин, выделение микро-РНК из материала цитологических мазков пациенток с цервикальными неоплазиями. Автором самостоятельно проводилось статистическая обработка, обобщение и анализ материалов исследования. Текст диссертации и автореферата написаны лично автором.

Структура диссертации

Диссертация изложена на 146 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, 2 глав собственных исследований, обсуждения результатов, выводов и 4 приложений. Текст иллюстрирован 21 таблицей, 26 рисунками. Указатель литературы содержит названия 24 работ отечественных и 237 зарубежных авторов.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования. Было проведено проспективное когортное исследование по типу случай-контроль среди женщин, проходивших обследование / лечение в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Петрова», в женской консультации №19 (СПбГБУЗ «Городская поликлиника №44»), в Центре охраны репродуктивного здоровья (СПбГБУЗ «Городская поликлиника №76»), в женской консультации №8 (СПбГБУЗ «Детская городская поликлиника №68») с июля 2017 года по декабрь 2019 года.



Рисунок 1 - Формирование исследовательских групп

Исследовательские группы формировались на основании представленных ниже критериев включения и невключения.

Критерии включения в группу LSIL: наличие информированного согласия пациентки, цитологически подтвержденный диагноз поражения шейки матки, отсутствие вакцинации против ВПЧ, отсутствие деструктивных методов лечения в анамнезе, отсутствие онкологических заболеваний в анамнезе, возраст с 18 до 45 лет.

Критерии невключения в группу LSIL: возраст менее 18 или более 45 лет, применение деструктивных методов лечения за время наблюдения, беременность, лактация, наличие тяжелой экстрагенитальной патологии, отсутствие информированного согласия.

Критерии включения в группу HSIL: наличие информированного согласия пациентки, возраст от 18 до 45 лет, гистологически подтвержденный диагноз HSIL, история заболевания до 4 месяцев, отсутствие онкологических заболеваний в анамнезе.

Критерии невключения в группу HSIL: возраст менее 18 или более 45 лет, деструктивные методы лечения патологии шейки матки в анамнезе, беременность, лактация, наличие тяжелой экстрагенитальной патологии, отсутствие информированного согласия.

Критерии *включения в группу контроля*: наличие информированного согласия пациентки, возраст с 18 до 45 лет, отсутствие аномальных кольпоскопических изменений, отрицательный цитологический скрининг, отсутствие воспалительных типов мазка, отсутствие в анамнезе неопластических заболеваний шейки матки.

Критерии *невключения в группу контроля*: положительный тест на ВПЧ, возраст менее 18 или более 45 лет, беременность, лактация, наличие тяжелой экстрагенитальной патологии, отсутствие информированного согласия.

Критерии *включения в группу сравнения*: наличие информированного согласия пациентки, возраст от 18 до 45 лет, впервые поставленный диагноз РШМ, гистологически подтвержденный диагноз РШМ, отсутствие в анамнезе онкологических заболеваний (кроме РШМ).

Критерии *невключения в группу сравнения*: возраст менее 18 или более 45 лет, беременность, лактация, наличие тяжелой экстрагенитальной патологии, отсутствие информированного согласия.

Методы исследования: общеклинический и гинекологический осмотр, сбор жалоб и анамнеза, анализ представленной медицинской документации, микроскопическое исследование отделяемого влагалища и шейки матки, рН-метрия вагинального отделяемого, цитологическое исследование цервикальных мазков, расширенная кольпоскопия, биопсия шейки матки и выскабливание цервикального канала (по показаниям) с последующим гистологическим исследованием, ВПЧ - генотипирование (14 типов) методом Real-time-ПЦР, определение уровня экспрессии микро-РНК методом ОТ-ПЦР Real-time.

Количественную экспрессию микро-РНК определяли в научной лаборатории субклеточных технологий с группой онкоэндокринологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, (заведующая - к.м.н. Малек А.В.). Для снижения уровня технических погрешностей все измерения проводились в трех экземплярах, а результаты усреднялись. Значения порогового цикла выше 38 рассматривались как фоновые и исключались из анализа. Полученные результаты уровня экспрессии микро-РНК нормализовывались относительно значения C_t , среднего для каждого образца, по стандартной методике подсчета $dCt = 2^{(C_t \text{ микроРНК} - C_t \text{ норм})}$.

Статистическая обработка выполнялась методами параметрической и непараметрической статистики, оценка диагностической и прогностической значимости - с помощью ROC-анализа. За уровень достоверности был принят уровень $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Клинико-лабораторная характеристика пациенток и оценка факторов риска развития и прогрессирования цервикальных неоплазий. Анализ клинических данных проводился в основных группах и в подгруппах женщин LSIL с различными исходами заболевания. Исследуемые группы не имели различий по возрасту менархе, характеристикам менструального цикла, количеством беременностей, родов и самопроизвольных выкидышей. Женщины подгруппы LSIL- прогрессирование гораздо чаще сообщали об искусственных абортах в анамнезе по сравнению с группами персистенции и выздоровления ($P < 0,05$) (таблица 1).

ТАБЛИЦА 1 - Результаты сравнения показателей репродуктивной функции ($M \pm s.d$; min ÷ max; Me [LQ; UQ])

Показатель	Здоровые	LSIL	HSIL	Выздоровление	Персистенция	Прогрессирование
Беременности	1,33±1,49	1,66 ±1,60	1,83±2,39	1,33±1,49	1,66 ±1,60	1,83±2,39
	0-5	0-8	0-10	0-5	0-8	0-10
	1(0-3)	1(0-3)	1(0-3)	1(0-3)	1(0-3)	1(0-3)
Роды	0,80±0,96	0,90 ±0,93	0,70±0,79	0,80±0,96	0,90 ±0,93	0,70±0,79
	0-3	0-4	0-2	0-3	0-4	0-2
	0,5 (0-1)	1(0-1)	0,5 (0-1)	0,5 (0-1)	1(0-1)	0,5 (0-1)
Аборты	0,47±0,68	0,65 ±0,94	1,07±1,78	0,47±0,68*	0,65 ±0,94*	1,07±1,78*
	0-2	0-4	0-8	0-2	0-4	0-8
	0(0-1)	0(0-1)	0(0-2)	0(0-1)	0(0-1)	0(0-2)
	P>0,05			P>0,05; *P _{1,2,3} = 0,15 ; P _{1-2,3} = 0,028		

Результаты анализа сексуальной жизни показали статистически значимые отличия по возрасту полового дебюта и по количеству половых партнеров как в основных группах, так и в подгруппах с различными исходами LSIL (таблица 2).

ТАБЛИЦА 2 - Результаты анализа половой жизни и количества половых партнеров ($M \pm s.d$; min ÷ max; Me [LQ; UQ])

Показатель	Здоровые	LSIL	HSIL	Выздоровление	Персистенция	Прогрессирование
Начало половой жизни (лет)	19,07±2,03	17,59±2,02	16,77±2,06	17,93±2,16	17,66±1,97	16,5±1,46
	16÷ 25	14÷ 25	13÷ 21	14÷ 25	14÷ 23	14÷ 19
	19[18;20]	18[16;19]	17[15;18]	18[16-19]	18[16-19]	17 [15.5-17.5]
Количество половых партнеров	4,13±2,53	7,46±5,71	11,07±10,82	5,08±2,93	7,81±5,54	12,44 ±8,06
	1÷10	1÷30	1÷50	1÷ 10	1÷ 25	3÷ 30
	3 [2;5]	6 [4;10]	7,5 [5;12]	5 [3;7]	6 [4;10]	10 [6;20]
	P<0,05			P<0,05		

Здоровые женщины гораздо чаще регулярно использовали барьерные методы контрацепции, чем женщины, имеющие аномальные цитологические мазки ($p < 0,05$). Значимых ассоциаций между другими методами контрацепции и тяжестью поражения или исходами LSIL мы не выявили (рисунок 2).

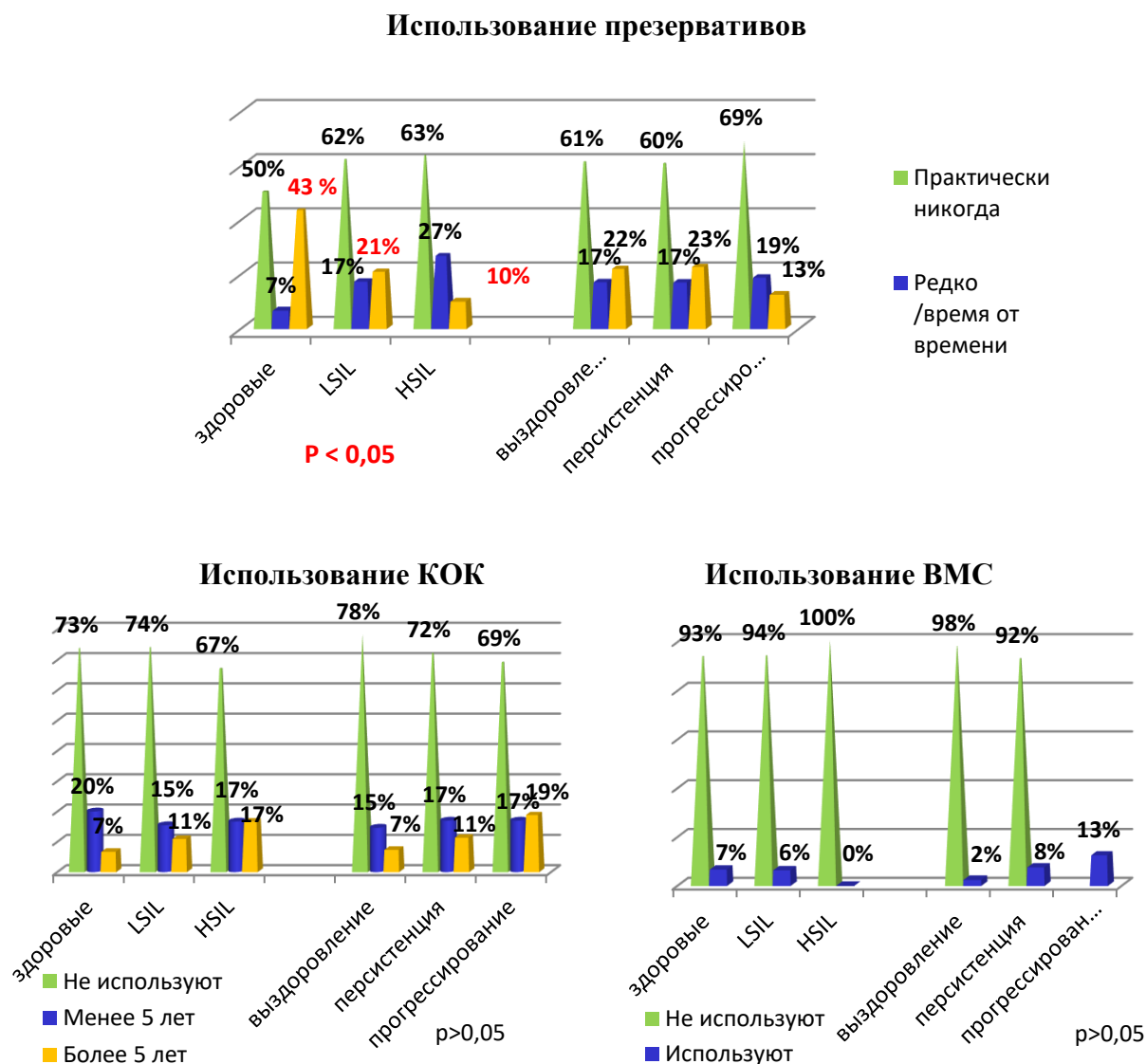


Рисунок 2 - Результаты сравнения методов контрацепции

По данным расширенной кольпоскопии у 66,36% женщин с LSIL и 73,33% HSIL имелись признаки эктопии цервикального эпителия и лишь в 13,33% у здоровых женщин. Во всех подгруппах женщин с LSIL с одинаковой частотой выявлялось смещение цилиндрического эпителия на экзоцервикс (рисунок 3).

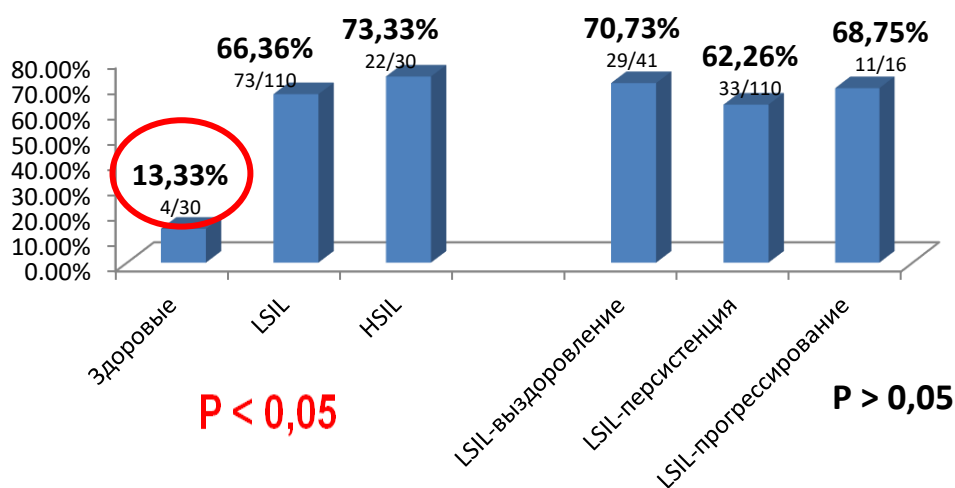


Рисунок 3 - Частота выявления эктопии шейки матки по данным кольпоскопии

По данным микроскопического и цитологического исследований регистрировалась высокая частота цервицита у женщин с аномальными цитологическими мазками (44,71%). Прогрессирование неопластического процесса сопровождалось прогрессивным увеличением частоты воспалительных заболеваний шейки матки, выздоровление - снижением (рисунок 4).

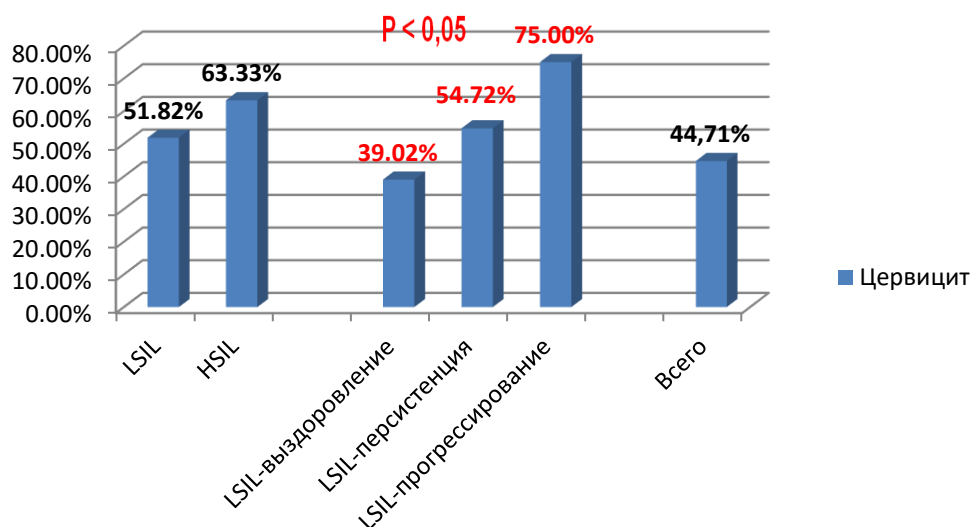


Рисунок 4 - Частота выявления цервицита у женщин с SIL

При лабораторном обследовании на дисбиоз урогенитального тракта существенных различий между группами женщин LSIL и HSIL выявлено не было (соответственно 41,82% и 40,0%). Однако у женщин с NILM явления бактериального вагиноза встречались в четыре раза реже (10,0%), чем у пациенток с цервикальными интраэпителиальными неоплазиями ($p < 0,05$). В нашем исследовании нарушения влагалищной микрофлоры не показали своего влияния на течение преинвазивных неоплазий легкой степени ($p > 0,05$) (рисунок 5).

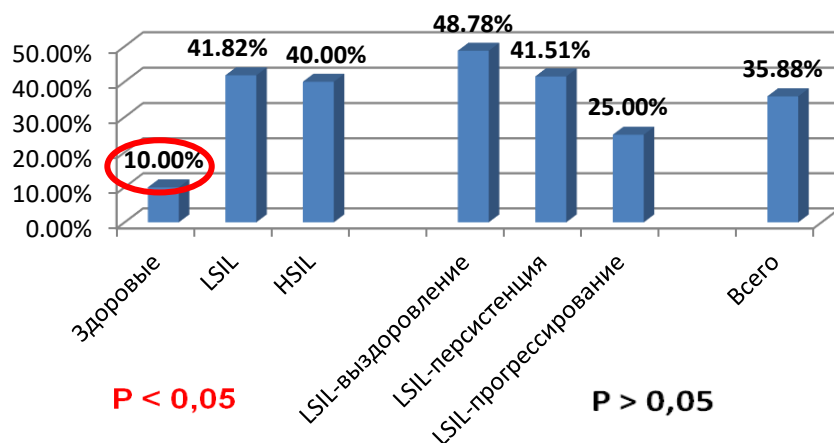


Рисунок 5 - Частота выявления бактериального вагиноза среди женщин, включенных в исследование

Общая распространенность ВПЧ среди женщин с патологией шейки матки составила 75,71% (106/140). Инфицированность ВПЧ была значительно выше среди женщин с поражениями тяжелой степени (93,33%), чем с LSIL (70,91%; $p < 0,05$). Подгруппа прогрессирования также характеризовалась более частым выявлением ВПЧ (93,75%), чем подгруппы персистенции и регрессе (% и % соответственно; $p < 0,05$).

Анализ разнообразия вирусной ДНК показал статистически значимые различия в исследуемых группах. Регистрировалось увеличение мультиинфекции по мере прогрессирования неопластического процесса. Но, ни в одной из исследуемых групп пациенток с атипией цервикального эпителия инфицирование не достигло 100% (рисунок 6).

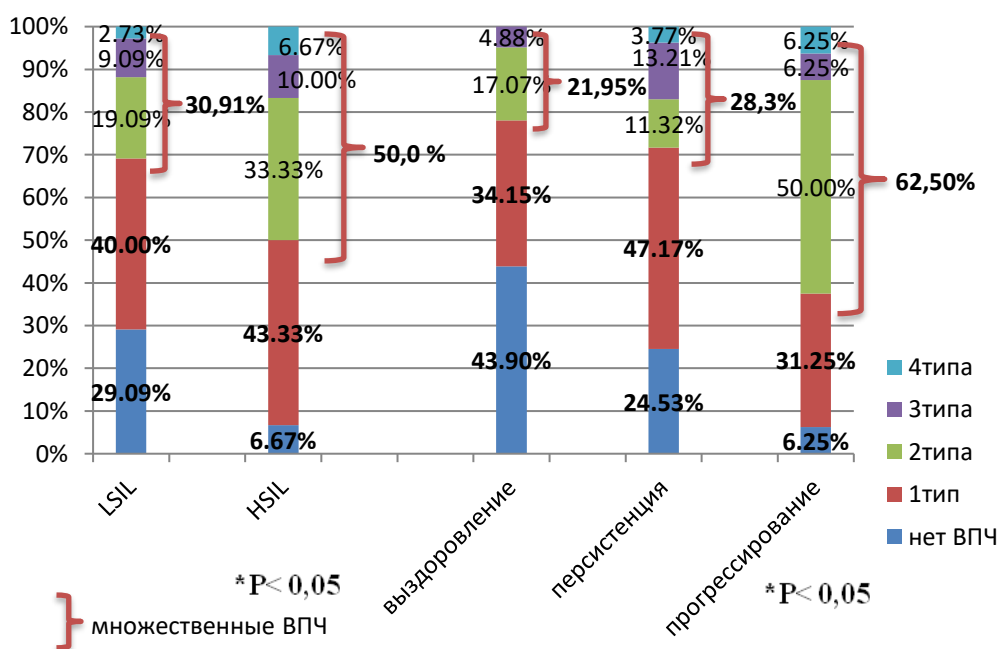


Рисунок 6 - Сравнение инфицированности ВПЧ у женщин с SIL, (%)

ИССЛЕДОВАНИЕ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ МИКРО-РНК В ЦИТОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТАХ

Возможности использования микро-РНК в качестве диагностического маркера неопластических поражений шейки. Выбор молекул – потенциальных диагностических маркеров - был сделан на основе анализа литературы. Уровень экспрессии 18 потенциальных маркерных микро-РНК (miR-106, miR-1246, miR-125b, miR-126, miR-145, miR-146a, miR-146b, miR-155, miR-192, miR-196b, miR-200b, miR-203, miR-20a, miR-21, miR-31, miR-34a) исследовался в 20 образцах РНК, выделенных из эпителия здоровых женщин, в 34 образцах женщин с LSIL, в 33 образцах женщин с HSIL и в 26 образцах женщин с инвазивным раком шейки матки.

Нормализация полученных абсолютных данных проводилась по формуле $\Delta Ct = 2^{(Ct_{\text{microRNA}} - Ct_{\text{norm}})}$. Было показано прогрессивное изменение активности 6 молекул микро-РНК по мере возрастания степени тяжести неопластического процесса: усиление экспрессии микроРНК-126, микроРНК-20a, микроРНК-196 микро-РНК 106b и снижение экспрессии микроРНК-375, микроРНК-145 (таблица 3).

ТАБЛИЦА 3 - Уровень экспрессии в зависимости от диагноза (Me [25%;75%])

микроРНК	Диагноз				Ранговый дисперсионный анализ по Краскелу-Уоллису
	Норма	LSIL	HSIL	Рак	
микроРНК-106b	1,33 [0,01; 2,01]	1,26 [-1,28; 1,77]	1,38 [-1,03; 1,79]	2,53 [1,66; 3,19]	0,0014
микроРНК-126	-16,67 [-73,37; -8,70]	-8,99 [-34,91;-	-8,79 [-38,39;-4,16]	-3,29 [-7,54;-1,51]	0,0026
микроРНК-145	-15,54 [-28,37; -7,63]	-13,26 [-23,51;-	-25,79 [-36,56;-	-42,40 [-62,95; -	< 0,0001
микроРНК-196b	-20,55 [-33,90;-	-15,95 [-25,03; -	-12,35 [-21,97; -6,41]	-8,27 [-11,94;-5,81]	0,012
микроРНК-20a	3,84 [2,46; 5,42]	4,95 [3,46; 6,27]	5,55 [2,99; 7,99]	10,39 [7,00; 16,24]	< 0,0001
микроРНК-375	4,30 [3,77; 5,98]	3,44 [2,02; 4,99]	1,64 [1,02; 3,41]	-2,55 [-6,74; 1,18]	< 0,0001

Однако трудоемкий процесс нормализации «абсолютных» значений затрудняет их использование в клинической практике. В качестве альтернативного способа анализа экспрессии микро-РНК мы использовали метод "реципрокных пар". Две микро-РНК, одна из которых имела постепенное увеличение, а другая - уменьшение экспрессии составляли

"реципрокную пару". Соотношение концентрации двух молекул с противоположной активностью рассчитывалось по формуле $\text{Ratio} = 2^{\text{Ct}(\text{miR-A}) - \text{Ct}(\text{miR-B})}$. ROC-анализ соотношений уровней экспрессии «реципрокных пар» микро-РНК в группах NILM/LSIL и HSIL/CC показал высокую диагностическую значимость трех пар микро РНК: микроРНК-20а / микроРНК-375, микроРНК-106/ микроРНК-375, микроРНК-196/ микроРНК-145 (таблица 4).

ТАБЛИЦА 4 - Показатели диагностической значимости "реципрокных пар" микроРНК в группах NILM/LSIL и HSIL/CC

«Реципрокные пары» микро-РНК	AUC, [95% ДИ]	Cut off, [95% ДИ]	Чувствительность, [95% ДИ]	Специфичность, [95% ДИ]
miR-20a/ miR-375	0,81 [0,73-0,89]	2,594	0,74 [0,60 -0,85]	0,75 [0,62 -0,85]
miR-106/ miR-375	0,80 [0,72-0,88]	0,65	0,74 [0,60 -0,85]	0,75 [0,62 -0,85]
miR-196/ miR-145	0,85 [0,78-0,93]	1,58	0,85 [0,73 -0,93]	0,76 [0,63 -0,86]

Определение прогностической ценности микро-РНК при поражениях шейки матки легкой степени

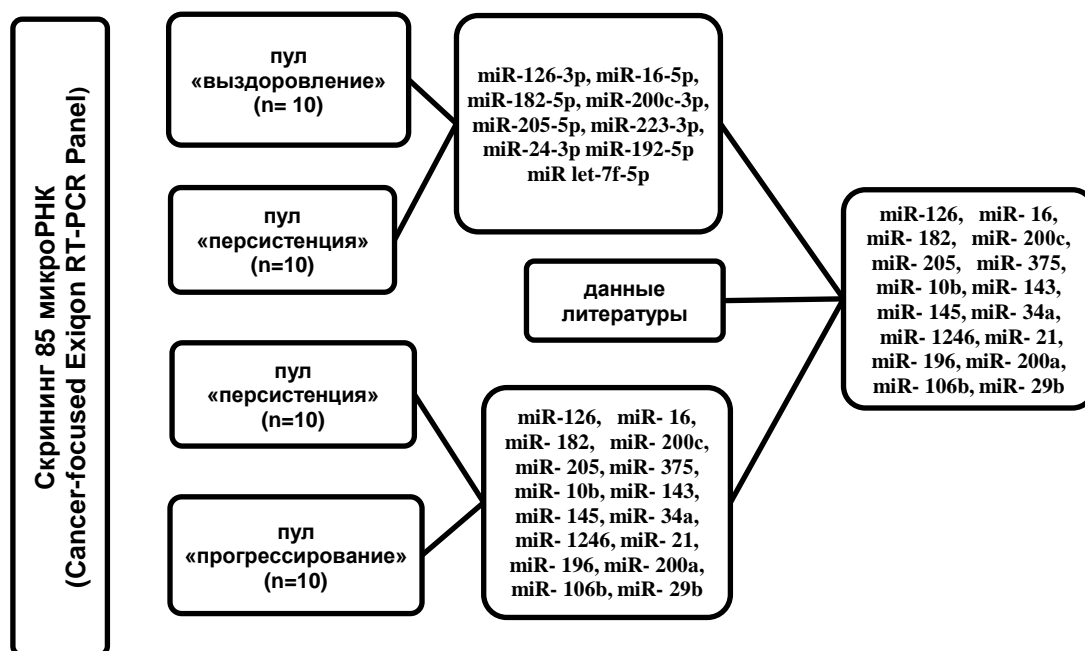


Рисунок 8 - Дизайн отбора потенциальных прогностических микроРНК-маркеров

По результатам сочетанного анализа (профайлинга) и данных литературы 16 молекул микро-РНК были определены в качестве потенциальных маркеров прогноза течения LSIL (miR-126, miR- 16, miR- 182, miR- 200c, miR- 205, miR- 375, miR- 10b, miR- 143, miR-

145, miR- 34a, miR- 1246, miR- 21, miR- 196, miR- 200a, miR- 106b, miR- 29b). Уровень экспрессии этих микро-РНК анализировался в 20 образцах РНК, выделенных из эпителия выздоровевших женщин, в 24 образцах женщин с персистенцией атипичии цервикального эпителия в процессе динамического наблюдения, и в 12 образцах женщин с прогрессирующим поражением. При прогрессировании неопластического поражения отмечалось статистически значимое увеличение экспрессионной активности микроРНК-126, микроРНК-375, микроРНК-21, микроРНК-1246, снижение микроРНК-182; при выздоровлении: снижение экспрессии микроРНК-126, микроРНК-29b и увеличение микроРНК-1246.

ТАБЛИЦА 5- Уровень экспрессии микроРНК в подгруппах с различным течением LSIL (Me [25%;75%])

Микро РНК	Относительный уровень экспрессии			Mann Whitney	Mann Whitney	Kruskal -Wallis
	выздоровле ние	персистенци я	прогрессируван ие	P ₁₋₂	P ₂₋₃	
miR-126	2,82 [1,92; 6,82]	1,5 [0,94; 2,39]	3,36 [1,48; 13,99]	0,003	0,09	0,01
miR- 182	0,01 [0,004; 0,01]	0,01 [0,004; 0,01]	0,003 [0,003; 0,004]	0,49	0,0004	0,002
miR-375	0,006 [0,001; 0,015]	0,004 [0,0013; 0,008]	0,026 [0,005; 0,07]	0,7	0,047	0,1
miR- 21	0,24 [0,17; 0,34]	0,27 [0,17; 0,60]	0,74 [0,11; 1,23]	0,6	0,0366	0,26
miR-29b	0,018 [0,01;0,032]	0,031 [0,022; 0,058]	0,026 [0,001; 0,067]	0,05	0,43	0,18
miR-1246	1322 [472,8;2851]	635,5 [396,4; 1214]	1452 [801,1; 1940]	0,06	0,048	0,07

Но в ходе оценки диагностической значимости полученных экспрессионных данных с помощью ROC - анализа, площадь под кривой для молекул микроРНК-126, микроРНК-182, микроРНК-21, микроРНК-375 и микроРНК-1246 не превышала 0,70.

Для повышения прогностической значимости микро-РНК было решено применить метод «реципрокных пар». ROC-анализ попарного сравнения микроРНК с разнонаправленным характером изменения экспрессии в подгруппах LSIL-выздоровление и LSIL-персистенция показал высокую прогностическую значимость пар: микроРНК-10b / микроРНК-126, микроРНК-196b / микроРНК-126 , микроРНК-29b / микроРНК-126; в подгруппах LSIL-персистенция и LSIL- прогрессирующее: микроРНК-126/микроРНК-182, микроРНК-21/микроРНК-182, микроРНК-1246/микроРНК-182 (таблица 6).

ТАБЛИЦА 6 - Показатели прогностической значимости «реципрокных пар» микроРНК в подгруппах LSIL

«Реципрокные пары» микро-РНК	AUC, [95 % ДИ]	Cut off [95 % ДИ]	Чувствительность [95 % ДИ]	Специфичность [95 % ДИ]
подгруппы LSIL-выздоровление и LSIL-персистенция				
miR-10b / miR-126	0,8 [0,67 - 0,94]	0,0113	0,7 [0,51 - 0,91]	0,83 [0,63 - 0,95]
miR-196b / miR-126	0,81 [0,67 - 0,95]	8,092	0,77 [0,52 - 0,94]	0,70 [0,49 - 0,87]
miR-29b / miR-126	0,82 [0,68 - 0,95]	0,0156	0,88 [0,64 - 0,99]	0,75 [0,53 - 0,90]
подгруппы LSIL-персистенция и LSIL- прогрессирувание				
miR-126/miR-182	0,82 [0,67 - 0,96]	311,0	0,75 [0,53 - 0,90]	0,86 [0,57 - 0,98]
miR-21/miR-182	0,84 [0,72 - 0,96]	57,21	0,71 [0,49 - 0,87]	0,86 [0,57 - 0,98]
miR-1246/miR-182	0,89 [0,77 - 1,0]	266148,0	0,92 [0,73 - 0,99]	0,86 [0,57 - 0,98]

ВЫВОДЫ

1. Риск возникновения цервикальных интраэпителиальных неоплазий у женщин повышают эктопия шейки матки и бактериальный вагиноз, в то время как использование презервативов, более позднее начало половой жизни, ограничение количества половых партнеров снижают риск заболевания.

Значимыми факторами, определяющими клиническое течение LSIL, являются большое количество искусственных абортов, ранний сексуальный дебют, множественные половые партнеры и цервициты.

2. Папилломавирусная инфекция встречается у 70,91% женщин с LSIL и у 93,33% с HSIL. Большое разнообразие вирусной ДНК в исходном состоянии определяет менее благоприятный исход заболевания. Отрицательные показатели ВПЧ-теста не позволяют исключить наличие плоскоклеточных интраэпителиальных поражений и их прогрессирование, и требуют проведения дальнейшего диагностического поиска с целью исключения ложноположительных и ложноотрицательных результатов обследования.

3. Исследование микро-РНК в цитологических препаратах показало, что с прогрессией поражений (N > LSIL > HSIL > CC) отмечается прогрессивное изменение состава микро-РНК клеток цервикального эпителия: повышается экспрессия микроРНК-20а, микроРНК-126, микроРНК-106, микроРНК-196, снижается микроРНК-145, микроРНК-375 ($p < 0,05$).

Высокие диагностические показатели для трех пар микро-РНК : микроРНК-20а / микроРНК-375, микроРНК-106/ микроРНК-375 и микроРНК-196/ микроРНК-145 (AUC,

чувствительность и специфичность соответственно 0.81, 0.80, 0.85; 74%, 74%, 85%; 75%, 75%, 76%) позволяют рекомендовать включение этих молекул в уточняющую клинико-лабораторную диагностику цервикальных неоплазий.

4. Профиль экспрессии микро-РНК в атипическом эпителии различен у женщин с различными исходами LSIL. При прогрессировании отмечается увеличение экспрессионной активности микроРНК-126, микроРНК-375, микроРНК-21, микроРНК-1246, снижение микроРНК-182; при выздоровлении - снижение экспрессии микроРНК-126 и микроРНК-29b.

Использование «реципрокных» пар микроРНК-126/микроРНК-182; микроРНК-21/микроРНК-182, микроРНК-1246/микроРНК-182 и микроРНК-10b/микроРНК-126, микроРНК-196b/микроРНК-126, микроРНК-29b/микроРНК-126 в качестве маркеров прогноза течения цервикальных неоплазий может быть очень полезны, так как позволит уменьшить чрезмерную диагностическую и лечебную агрессию в отношении женщин с поражениями шейки матки легкой степени, что особенно важно у пациенток репродуктивного возраста.

5. Метод на основе определения «реципрокных» пар микро-РНК в цитологических мазках цервикального эпителия позволяет внедрить анализ экспрессии микро-РНК в клиническую практику с целью повышения эффективности диагностики и прогнозирования цервикальных интраэпителиальных неоплазий.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

При гинекологическом обследовании женщин необходима оценка факторов риска развития и прогрессирования предраковых заболеваний шейки матки.

Женщины, имеющие факторы риска прогрессирования предраковых заболеваний, нуждаются в более тщательном наблюдении за цитологическими аномалиями, чем женщины в общей популяции.

ВПЧ - тестирование с генотипированием должно применяться при углубленном обследовании пациенток с цитологическими аномалиями.

Целесообразно включение диагностических и прогностических методов на основе анализа микро-РНК, наряду с ВПЧ – тестированием и расширенной кольпоскопией, в программы комплексного обследования при неопластических заболеваниях шейки матки.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Маржевская, В.В. Молекулярно-генетические основы эндометриоза: диагностический потенциал наследуемых и экспрессируемых факторов. / В.В. Маржевская,

Т.С. Присяжная, В.И. Жамойдик, И.В. Берлев, А.В. Малек // Журнал акушерства и женских болезней. – 2018 – Т. 67 – № 3 – с. 64-73.

2. Присяжная, Т.С. Оценка структуры заболеваемости и инфицированности вирусом папилломы человека у женщин с цервикальными неоплазиями.// Мечниковские чтения-2019: материалы 92-й Всероссийской научно - практической конференции с международным участием. 24-25 апреля 2019 года / под ред. А.В. Силина, С.В. Костюкевича. –СПб.: Изд-во СЗГМУ им. И.И. Мечникова, 2019 г. – с. 43.

3. Иванов, М.К. Выявление новообразований шейки матки в цитологических препаратах с помощью комбинированного молекулярного классификатора./ М.К. Иванов, С.Е. Титов, В.В. Дзюбенко, С.А. Глушков, С.Э. Красильников, А. С. Мансурова, Ю.А. Ланцухай, И.Э. Вахтурова, И.Д. Нущик, **Т.С. Присяжная, Н.А. Назмиева, А.В. Малек // Опухолевые маркеры: молекулярно-генетические и клинические аспекты: материалы II Всероссийской конференции с международным участием, 2-5 июля 2019 г. – Горно-Алтайск, 2019 – с. 25-29.**

4. Ivanov, M.K. Detection of cervical lesions and cancer in air-dried cytological smears by combined analysis of mRNA and microRNA expression levels. / М.К. Ivanov, S.E. Titov, V.V. Dzyubenko, S. A. Glushkov, S. E. Krasilnikov, A. S. Mansurova, A.V. Malek, I.V. Berlev, **T.S. Prisyazhnaya, S.V. Kuleshova, A.A. Hodkevich, Y.A. Lancuhaj, T.A. Dimitriadi, E. F. Agletdinov// The Journal of Molecular Diagnostics – 2021. – V.23 - №5 – pp. 541–554.**

5. Borisov, E. Analysis of reciprocally dysregulated miRNAs in eutopic endometrium is a promising approach for low invasive diagnostics of adenomyosis / E. Borisov, M. Knyazeva, V. Novak, L. Zabegina, **T. Prisyazhnaya, A. Karizkiy, I. Berlev, A. Malek // Diagnostics – 2020 – V.10 – № 10 – p. 782.**

6. Князева, М.С. Прогностическое значение анализа микроРНК в клетках цервикального эпителия при дисплазии легкой степени./ М.С. Князева, **Т.С. Присяжная, Л.М. Забегина, О.А. Смирнова, А.А. Михетько, И.В. Берлев, А.В. Малек // Опухоли женской репродуктивной системы. - 2020 – Т.17 - № 4 – с. 66-75.**

7. Присяжная, Т.С. Факторы риска, модулирующие течение плоскоклеточных интраэпителиальных поражений низкой степени у женщин репродуктивного возраста. / **Т.С. Присяжная, В.А. Михайлюкова, И.В. Берлев, А.В. Малек // Опухоли женской репродуктивной системы. - 2021 – Т.17 – №1 – с. 45-52.**

8. Присяжная, Т.С. Анализ экспрессии микро-РНК в цитологических мазках у женщин с поражениями шейки матки легкой степени. / Т.С. Присяжная, М.С. Князева, И.В. Берлев, А.В. Малек / Современные проблемы подростковой медицины и репродуктивного здоровья молодежи. Сборник трудов Всероссийской научно-практической конференции,

Санкт – Петербург, 4 декабря 2020 года / Под ред. А.М. Куликова, М.Ф. Ипполитовой. – Санкт – Петербург, 2020 – с. 43-45.

9. **Prisyazhnaya, T.** Evaluation of micro-RNA expression in cytological smears in women with low grade squamous intraepithelial lesions. / T. Prisyazhnaya, M. Knyazeva, I. Berlev, A. Malek // International Journal of Gynecological Cancer. ESGO SoA 2020 Conference Abstracts. – Dec. 2020 – V.30 – Suppl 4 – A 118.

10. **Присяжная, Т.С.** Прогностическое значение оценки микро-РНК в цитологических препаратах при цервикальных интраэпителиальных неоплазиях легкой степени. / Т.С. Присяжная, М.С. Князева, Л.М. Забегина, И.В. Берлев, А.В. Малек // Сборник научных трудов 9-й всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов «Трансляционная медицина: от теории к практике», Санкт-Петербург, 22 апреля 2021 г. / под ред. А.В. Силина, С.А. Артюшкина. – СПб.: Изд-во СЗГМУ им. И.И. Мечникова, 2021 – с. 201-206.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВПЧ - вирус папилломы человека;

ОТ- ПЦР - обратнотранскриптазная полимеразная цепная реакция;

ПЦР - полимеразная цепная реакция;

AUC (Area Under Curve) - площадь под кривой;

CC (cervical cancer) – рак шейки матки;

CIN (cervical intraepithelial neoplasia) - цервикальная интраэпителиальная неоплазия;

E7, E6 - ранние онкобелки, контролирующие репликацию вируса, транскрипцию и клеточную трансформацию;

HSIL (high-grade squamous intraepithelial lesion) - плоскоклеточное интраэпителиальное поражение высокой степени;

LSIL (low-grade squamous intraepithelial lesion) - плоскоклеточное интраэпителиальное поражение низкой степени;

NILM (negative for intraepithelial lesion or malignancy) – интраэпителиальные изменения и злокачественные процессы отсутствуют;

PAP - Паппаниколау;

ROC (receiver operating characteristic) – рабочая характеристика приёмника;

Se (sensitivity) - чувствительность;

Sp (specificity) - специфичность;

SIL (squamous intraepithelial lesion) - плоскоклеточное интраэпителиальное поражение.