

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«СЕВЕРО-ЗАПАДНЫЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ  
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И.И. МЕЧНИКОВА»  
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

**Присяжная  
Татьяна Сергеевна**

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

3.1.4.- акушерство и гинекология

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:  
доктор медицинских наук,  
профессор Берлев Игорь Викторович

Санкт-Петербург  
2022

## ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение.....	4
Глава 1. Обзор литературы.....	25
1.1. Эпидемиология и факторы риска цервикальных неоплазий.....	25
1.2. Молекулярные основы цервикального онкогенеза, роль микроРНК.....	29
1.3. Современные диагностические подходы, их преимущества и недостатки..	34
1.4. Потенциал микро-РНК в диагностике неопластических поражений шейки матки.....	37
1.4.1. Данные сравнительных исследований материала биопсий.....	37
1.4.2. Возможности анализа микроРНК в материале цервикальных мазков.....	41
Глава 2. Клинико-диагностическая характеристика пациенток и оценка факторов риска развития и прогрессирования цервикальных неоплазий .....	43
2.1. Анализ клинико-anamnestических данных.....	43
2.1.1. Характеристика жалоб, предъявляемых обследованными женщинами...	43
2.1.2. Анализ менструальной и репродуктивной функции.....	45
2.1.3. Анализ сексуальной жизни.....	49
2.1.4. Оценка методов контрацепции.....	50
2.1.5. Анализ сопутствующей гинекологической и соматической патологии..	53
2.1.6. Оценка статуса курильщика.....	57
2.2. Анализ результатов лабораторных и инструментальных методов обследования женщин.....	58
2.2.1. Оценка статуса инфицирования ВПЧ.....	58
2.2.2. Инфекционные ко-факторы ВПЧ-инфекции.....	62
2.2.3. Кольпоскопическое исследование пациенток.....	66
Глава 3. Исследование уровня экспрессии микро-РНК в цитологических препаратах .....	69
3.1. Возможности использования микро-РНК в качестве диагностического маркера неопластических поражений шейки матки.....	69
3.1.1. Поиск потенциальных диагностических «маркерных» молекул, оценка диагностической ценности микроРНК .....	69

3.1.2. Применение метода «реципрокных пар» для диагностики цервикальных неоплазий.....	76
3.2. Определение прогностической ценности анализа микро-РНК при поражениях шейки матки легкой степени (LSIL).....	78
3.2.1. Поиск потенциальных прогностических микроРНК-маркеров.....	79
3.2.2. Определение молекул микроРНК, изменение экспрессии которых коррелирует с прогнозом течения заболевания.....	81
3.2.3. Применения метода «реципрокных пар» для прогноза течения LSIL.....	88
Глава 4. Обсуждение результатов.....	92
Выводы.....	104
Практические рекомендации.....	106
Список сокращений.....	107
Приложение 1 .....	109
Приложение 2 .....	111
Приложение 3.....	113
Приложение 4 .....	116
Список литературы .....	118

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность 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 [1][2]. В России удельный вес рака шейки матки в структуре заболеваемости злокачественными новообразованиями составляет 5,2% [3].

Вирус папилломы человека (ВПЧ) признан основным этиологическим фактором злокачественной трансформации цервикального эпителия [4][5][6]. Папилломавирусная инфекция широко распространена в человеческой популяции [7]. Наибольшая инфицированность наблюдается в возрасте до 25 лет [8][9]. В большинстве случаев происходит спонтанное очищение организма от вируса [10][11]. Персистирование инфекции может привести к внутриэпителиальным поражениям [12], классифицируемым как цервикальные интраэпителиальные неоплазии (CIN) 1-го, 2-го или 3-го класса, или сквамозные интраэпителиальные поражения (SIL) низкой и высокой степени [13].

Основные механизмы ВПЧ - канцерогенеза включают активность двух вирусных онкопротеинов E6 и E7, которые деактивируют гены опухолевых супрессоров p53 и ретинобластомы (RB) [14][15]. Кроме того, E6 и E7 связаны с изменениями метилирования ДНК хозяина и ДНК вируса. Взаимодействия E6 и E7 с клеточными белками и модификациями метилирования ДНК индуцирует повреждения ключевых клеточных путей, регулирующих генетическую целостность, клеточную адгезию, иммунный ответ, апоптоз и клеточный контроль [16][17][18].

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 [19][20][21]. 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 [22][23].

Скрининг на основе ВПЧ-тестирования, а также комбинирование его с цитологическим является более эффективным, чем цитологическое исследование, и позволяет увеличивать межскрининговый интервал [24][25][26][27][28]. 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 [29][30][31][32].

Для углубленной диагностики широко используется кольпоскопия с прицельной биопсией и гистологической оценкой материала [33]. В роли ранних предвестников тяжелых поражений рака шейки матки предложено иммуноцитохимическое и иммуногистохимическое определение онкобелков p16/Ki67 и тестирование на мРНК ВПЧ E6/E7 [34].

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 [35]. В связи с этим большую актуальность имеет разработка и внедрение в клиническую практику новых диагностических и прогностических методов цервикальных интраэпителиальных неоплазий.

### **Степень разработанности темы исследования**

В последнее время появляется все больше работ, подчеркивающих важную роль микро-РНК в развитии и прогрессировании различных заболеваний, в том числе злокачественных [36][37][38][39].

Микро-РНК - это короткие (~ 22 нуклеотида), одноцепочечные некодирующие РНК, которые модулируют экспрессию генов за счет активации деградации мРНК или путем ингибирования трансляции мРНК [40]. Одна микро-РНК может влиять на экспрессию многих генов. И наоборот, один ген может регулироваться десятками разных микро-РНК, что резко повышает разнообразие эффектов [41][42].

В иммортализованных клетках могут наблюдаться как сверх-экспрессии микро-РНК, так и снижение их уровня [43][44], обусловленные генетическими и эпигенетическими влияниями [45] [46] [47]. Большинство генов, кодирующих микро-РНК, расположены в хрупких сайтах и хромосомных областях. Инфицирование высокоонкогенными типами ВПЧ и интеграция вирусной ДНК в хрупкие участки генома человека приводит к aberrантной экспрессии микро-РНК клеток хозяина [48][49].

Молекулы микро-РНК обладают высокой стабильностью [50], что позволяет определять их уровень в биологических средах с помощью количественной ПЦР и некоторых других методов [51].

В настоящее время имеется определенный опыт тестирования микро-РНК в тканях шейки матки. Тем не менее значимость тестов детектирования 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, что 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.

### **Формирование исследовательских групп**

Было проведено проспективное когортное исследование по типу случай-контроль.

В исследование были включены пациентки репродуктивного возраста с 18 до 45 лет, проходившие 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.

Из 436 пациенток с цитологически установленным диагнозом плоскоклеточных интраэпителиальных поражений (SIL) в исследование были включены 143 женщины на основании представленных ниже критериев включения и невключения. Обследованные женщины были разделены на две группы в зависимости от тяжести поражения шейки матки: I группа - с патологией шейки матки стадии LSIL (n=110); II группа - с патологией шейки матки стадии HSIL (n=33).

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.

Результаты повторного цитологического исследования, проведенного через 6-12 месяцев, определили распределение 110 пациенток группы LSIL на три подгруппы. В первую подгруппу – «с персистенцией» - вошли 54 женщины с сохраняющимися плоскоклеточными поражениями легкой степени. Вторую подгруппу - «выздоровления» - составили 40 пациенток без клеточной атипии и отрицательным тестом на ВПЧ. Третья подгруппа - «прогрессирования» - была сформирована из 16 пациенток, у которых наблюдалось прогрессирование процесса до стадии H-SIL.

#### 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.

Контрольная группа из 30 пациенток формировалась за аналогичный период времени из контингента женщин без заболеваний шейки матки, обратившихся в женскую консультацию №8 СПб ГБУЗ «Детской городской поликлиники №68», в женскую консультацию №19 СПб ГБУЗ «Городской поликлинике №44» и в Центр охраны репродуктивного здоровья СПбГБУЗ «Городской поликлиники №76 для прохождения профилактического осмотра.

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.

Группа сравнения была сформирована из 30 женщин с диагнозом инвазивного рака шейки матки, проходивших лечение в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Петрова» с июля 2017 года по декабрь 2019 года.

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.

От каждой пациентки было получено письменное информированное согласие на исследовательское использование биологического материала и клинических данных, которые были деперсонализированы. Протокол данного исследования был рассмотрен и одобрен Этическим комитетом СЗГМУ им. И.И. Мечникова.

### **Клинико-лабораторные методы исследования**

Всем пациенткам основных клинических групп и группы контроля были выполнены общеклинический и гинекологический осмотр, сбор жалоб и анамнеза, ознакомление с представленной медицинской документацией, 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 ПЦР, определение уровня экспрессии микро-РНК методом ОТ-ПЦР Real-time.

Для каждой пациентки составлялась индивидуальная карта учета, в которую были внесены анамнестические данные, результаты общего и гинекологического осмотра, инструментальных и лабораторных исследований.

При сборе анамнеза внимание уделяли следующим факторам: возраст пациентки; менархе и менструальная функция; возраст начала половой жизни; количество половых партнеров; методы контрацепции; курение; носительство ВПЧ в анамнезе и дебют неопластических заболеваний шейки матки; акушерский анамнез (число беременностей, родов и абортов); наличие в настоящий момент или в анамнезе сексуально-трансмиссивных инфекций

(*Chlamidia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma species*, *Trichomonas vaginalis*, *Herpes genitalium*, ВИЧ-инфекция, сифилис, гепатит В, гепатит С), наличие сопутствующих гинекологических заболеваний (инфекционно-воспалительных, гиперпластических процессов матки, нарушений менструального цикла, бесплодия); наличие экстрагенитальной патологии.

### **Цитологическое исследование мазков с экзо - и эндоцервикса**

Забор материала с шейки матки для цитологического исследования не проводился во время менструации, после вагинального исследования, в период терапии инфекций, передающихся половым путем, в течение 48 часов после полового акта.

Для цитологического исследования шейку матки визуализировали в зеркалах и бережно удаляли слизь. Взятие эпителия производили с наружной части шейки матки и из цервикального канала с помощью одноразовых инструментов *cyto-brush* и *cervix-brush*. После 4–5 вращательных движений цитощёткой материал с эндо- и экзоцервикса наносили тонким слоем на стекла для приготовления традиционных цитологических препаратов. Окрашивание мазков - соскобов цервикального эпителия проводили гематоксилином Майера – эозином, микроскопию - с помощью оптического микроскопа Olympus BX-46 с системой визуализации и анализа микроизображений.

Описание цитологических препаратов проводилось в соответствии с терминологической системой Бетесда (The Bethesda System – TBS) [182][183]:

- NILM (negative for intraepithelial lesion or malignancy) - негативный в отношении интраэпителиальных поражений или злокачественного процесса результат;
- LSIL (low grade squamous intraepithelial lesion) – плоскоклеточное интраэпителиальное поражение низкой степени (включая койлоцитоз и CIN I);

- HSIL (high grade squamous intraepithelial lesion)- плоскоклеточное интраэпителиальное поражение высокой степени (включая CIN II, CIN III, карциному in situ).

Цитологическое исследование цервикальных мазков проводилось двумя независимыми цитологами. При сомнительных или взаимоисключающих заключениях образцы изымались из исследования.

### **Исследование биоценоза урогенитального тракта**

Для оценки состояния биоценоза урогенитального тракта проводили микроскопию вагинального мазка, окрашенного по Грамму. Материал для исследования из заднего свода влагалища и цервикального канала получали с помощью специальных одноразовых стерильных инструментов.

При микроскопии мазка оценивали количество лейкоцитов и эпителиальных клеток; морфологию, отношение к красителям, размер, расположение и количество бактерий; наличие ключевых клеток, грибов, простейших.

Определение pH среды влагалища проводилось с помощью тест-полосок «Кольпо-тест pH» (производитель ООО «Биосенсор»). Сравнивая окраску pH индикаторов с эталоном на цветовой шкале, величина pH вагинальной жидкости оценивалась полуколичественным методом. В норме кислотность влагалища варьирует в границах 3,7 — 4,5. Ощелачивание среды с показателями pH более 4,5 способствует активации условно-патогенной флоры и указывает на наличие дисбиотического состояния.

Диагноз бактериального вагиноза ставился при выявлении у женщин не менее трех критериев Амсея: однородных, серовато-белых выделений, покрывающих стенки влагалища тонкой пленкой; pH влагалища >4,5; положительного аминного теста; визуализации ключевых клеток в мазке.

При выявлении воспаления или бактериального вагиноза проводили санацию урогенитального тракта антибактериальными препаратами местного и

системного действия с последующим восстановлением нормальной флоры согласно Федеральным клиническим рекомендациям и протоколам.

### **Кольпоскопическое исследование шейки матки**

Для оценки состояния экзо-эндоцервикса, определения показаний и места для биопсии проводили расширенную кольпоскопию по стандартной методике с помощью оптического кольпоскопа Carl Zeiss E (Germany). Для выявления аномального эпителия применяли пробу с 3-5% водным раствором уксусной кислоты и 3% раствором Люголя (проба Шиллера). Интерпретацию данных проводили согласно Международной классификации кольпоскопических терминов, одобренной в 2011 г. в Рио-де-Жанейро на 14 Всемирном Конгрессе Международной Федерации по кольпоскопии и цервикальной патологии (IFCPC) [184].

### **Выявление ДНК вируса папилломы человека**

Детекцию ДНК ВПЧ проводили в научной лабораторией субклеточных технологий с группой онкоэндокринологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, (заведующая - к.м.н. Малек А.В.) методом полимеразной цепной реакции с применением тест-систем «Реал-Бест ДНК ВПЧ ВКР генотип», «РеалБест ДНК ВПЧ 66», «РеалБест ДНК ВПЧ 68» (АО Вектор-Бест, Россия). Набор «ВПЧ ВКР генотип» предназначен для дифференциального выявления в эпителии слизистых оболочек ДНК вирусов папилломы человека 12 типов (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 и 59), два других набора - соответственно для выявления ДНК вируса папилломы человека 66 и 68 типов. Все амплифицируемые фрагменты имели сходную длину.

### **Гистологическое исследование биоптатов шейки матки**

Всем женщинам с диагнозом HSIL проводилась радиохирургическая эксцизия или конизация шейки матки и выскабливание цервикального канала с последующим гистологическим исследованием.

Показаниями к выполнению биопсии шейки матки и выскабливанию цервикального канала у женщин с LSIL являлись выраженные изменения при расширенной кольпоскопии. Противопоказанием для биопсии были воспалительные заболевания урогенитального тракта в острой фазе.

Взятие материала для гистологической верификации проводилось под контролем кольпоскопа с помощью биопсийной петли для радиоволновой хирургии на электрохирургическом аппарате SURGITRON "СУРГИТРОН™ DF 120" (Ellman, США).

### **Определение экспрессии микро-РНК в цитологических препаратах**

С целью диагностики и прогнозирования развития и течения неопластической трансформации цервикального эпителия проводили определение уровня экспрессии микро-РНК методом ПЦР.

Материалом для исследования служили образцы эпителия с экзо- и эндоцервикса на стеклах. Забор материала из урогенитального тракта женщины проводили с использованием одноразовых цервикальных цитощеток Cervix-brush и Cytobrush.

Количественную экспрессию микро-РНК определяли в научной лабораторией субклеточных технологий с группой онкоэндокринологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, (заведующая - к.м.н. Малек А.В.).

### **Выделение тотальной РНК со стекол с цитологическими мазками**

Для выделения тотальной РНК использовали препараты (цитологические мазки) с достаточным количеством материала, который был подвержен стандартной процедуре фиксации и окрашивания. В исследование были включены препараты, полученные с 2017 до 2019 года, и хранившиеся до

начала исследования в обычных условиях. Выделение тотальной фракции РНК (включавшей различные классы РНК) из цервикальных образцов проводили по следующему протоколу: материал соскоба смывали со стекла 600 мкл лизис-буфера (4М ГНТЦ, 25 мМ цитрат натрия, 0,3% лаурилсаркозил натрия, 0,1% β-меркаптоэтанол) (в 3 шага по 200 мкл), переносили в 1,5 мл пробирку и инкубировали на термошейкере при температуре 65<sup>0</sup>С в течение 15 минут.

Далее пробирку центрифугировали при 10000g 10 минут, отбирали супернатант (~550мкл), добавляли к нему 550 мкл изопропанола и 20 мкл магнитных частиц («ALPREP», Альгимед Техно, Беларусь), перемешивали на вортексе и инкубировали при комнатной температуре 10-15 минут. Затем пробы центрифугировали при 18000g 15 минут и удаляли супернатант. Полученный осадок дважды промывали в 500 мкл 70% этанола и однократно в 300 мкл ацетона и вновь центрифугировали при 10000g 5 минут.

Осадок высушивали при комнатной температуре 2-3 минуты, добавляли 100 мкл элюирующего буфера (50 mM Tris-HCl, pH 6-7), инкубировали на термошейкере при 65<sup>0</sup>С 5 минут, центрифугировали при 10000g 3 минуты и отбирали супернатант в чистую пробирку. Концентрацию и качество выделенной РНК оценивали на спектрофотометре NanoPhotometr N50 (Implen, Германия/США). Количество и качество РНК, выделенной из материала цитологического препарата, оценивалось как достаточное для последующего анализа при значении концентрации более 0,2 мкг/мкл и значении коэффициента абсорбции при длине волны 260/280 нм в диапазоне 1,7 – 2,0.

### **Профайлинг микро-РНК**

Для отбора молекул, применение которых потенциально возможно для прогноза течения поражений легкой степени, был проведен скрининговый анализ экспрессии 85 микро-РНК на ограниченном материале, полученном от пациенток групп LSIL. Образцы выделенной РНК в эквивалентных количествах объединялись в два пула, каждый из которых анализировался путем

последовательного проведения реакций полиаденилирования, неспецифической обратной транскрипции и ПЦР.

Для профилирования 85 микро-РНК применялась система ПЦР miRCURY LNA miRNA (SYBR Green) датской компании Exiqon A/S. ПЦР проводили на аппарате CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, США). Все результаты, соответствующие значения  $C_t > 38$ , признавались отрицательными. Техническая разница между результатами анализа двух "пулов" нивелировалась с помощью межпластинчатых калибраторов.

### **Анализ отдельных молекул микро-РНК**

Оценку индивидуальной экспрессионной изменчивости «потенциальных маркерных» молекул микро-РНК проводили методом обратной транскрипции и последующей количественной ПЦР в реальном времени на приборе CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, США).

Для генерации комплиментарной ДНК РНК подвергали обратной транскрипции с помощью набора обратной транскрипции «РеалБест Мастер микс ОТ» (ЗАО «Вектор-Бест», Россия). Анализируемый образец инкубировали при температуре  $+42^{\circ}\text{C}$  в течение 30 минут. Для инактивации обратной транскриптазы реакционную смесь подвергали температурному воздействию  $+95^{\circ}\text{C}$  в течение 2 минут. В качестве экзогенного контроля малая ядерная РНК (яРНК) U6 была интегрирована в виде шаблона в синтез кДНК, чтобы обеспечить правильный процесс амплификации и надежную количественную ПЦР-конструкцию.

Количественный анализ методом ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени выполнялся с помощью реагентов ЗАО «Вектор-Бест» (Россия) «РеалБест Мастер микс», прямого и обратного праймеров (5,0 мкМ) и зондов (2,5 мкМ). В реакционный объем 30 мкл вводили 2,5 мкл раствора, содержащего комплиментарную ДНК. После предварительного прогрева в течение 2 минут при температуре  $+94^{\circ}\text{C}$  проводилось 50 циклов

амплификации : этап денатурации - нагрев до +94<sup>0</sup> С в течение 10 сек, этап отжига и этап элонгации - нагрев до + 60<sup>0</sup> С в течение 20 секунд.

Пороговые циклы, превышающие значения  $Ct = 38$ , признавались отрицательными и не использовались для дальнейших расчетов. Полученные результаты уровня экспрессии микро-РНК нормализовывались относительно значения  $Ct$ , среднего для каждого образца, по стандартной методике подсчета  $dCt = 2^{(Ct \text{ микроРНК} - Ct \text{ norm})}$ .

### **Методы статистической обработки результатов исследования**

Статистическая обработка результатов исследования выполнялась на персональном компьютере с операционной системой Windows 2010. Полученные данные вносились в базу данных, созданную для каждой группы в офисном приложении MS Excel 2016. Расчеты и визуализация полученных результатов проводились с использованием лицензионного пакета статистического анализа Statistica for Windows (Stat Soft, США) версии 10.0 , (лиц. BXXR310F964808FA-V) и графиков Excel.

Данные описательной статистики всех количественных показателей, в том числе оценка мер средних тенденций и показателей вариабельности, отображены в виде средних значений и их стандартных отклонений  $M \pm a$ , медианой, нижним и верхним квартилями в виде  $Me [25\%; 75\%]$ ; максимальным и минимальным значениями.

Соответствие количественных переменных теоретическому закону Гаусса проверялось критерием Колмогорова – Смирнова. В связи с несоответствием полученных данных критерию нормального распределения при проверке статистической значимости выявленных различий применялись непараметрические методы.

Сравнение изучаемых количественных параметров (возраст, количество беременностей, родов, абортов и выкидышей, длительность менструального цикла и др.) в клинических группах и подгруппах проводилось с

использованием критериев Колмогорова-Смирнова, Манна-Уитни, медианного хи-квадрата.

Статистическая значимость наблюдаемой разницы в экспрессии микро-РНК между двумя группами осуществлялся с помощью критерия Манна–Уитни (U-test Mann-Whitney), при множественных сравнениях – с помощью рангового дисперсионного анализа по Краскелу-Уоллису (Kruskal-Wallis Anova).

Для нахождения зависимостей между количественными признаками рассчитывался коэффициент ранговой корреляции Спирмена с оценкой тесноты связи по шкале Чеддока.

Обработка качественных показателей (курение, методы контрацепции, наличие сопутствующей патологии и др.) выполнялась с построением таблиц сопряженности и подсчетом критерия  $\chi^2$ , критерия  $\chi^2$  с поправкой Йетса (для малых групп), критерия Пирсона, критерия Фишера. Данные представлены в виде абсолютных значений и процентных долей.

В качестве критического порога значимости был установлен общепринятый в медицине уровень  $p < 0,05$ . Вывод о достоверности различий делался при получении идентичных результатов по всем применявшимся методам анализа.

Оценка диагностической и прогностической значимости выявленных различий микро-РНК проводилась с помощью ROC-анализа (ROC - receiver operating characteristic – рабочая характеристика приёмника, с англ.).

Вычислялись операционные характеристики диагностических методов.

Чувствительность (Sensitivity, Se) – это доля истинно положительных случаев (TPR - True Positives Rate), которые были правильно идентифицированы тестируемым методом:

$$Se (TPR) = \frac{TP}{TP + FN} \times 100\%$$

Специфичность (Specificity, Sp) – это доля истинно отрицательных

случаев (TNR - True Negatives Rate), которые были правильно идентифицированы тестируемым методом:

$$Sp (TNR) = \frac{TN}{TN + FP} \times 100\%$$

TP (True Positives) - истинно положительные случаи;

TN (True Negatives) - истинно отрицательные случаи;

FN (False Negatives) - ложно отрицательные случаи;

FP (False Positives) - ложно положительные случаи.

Далее определялись пороговые значения (Cut off), обеспечивающие максимальную суммарную чувствительность и специфичность модели при дихотомической диагностике пациенток. Для сравнительной оценки ROC-кривых, построенных для каждого включенного в анализ показателя микро-РНК, вычислялось значение площади под кривой (AUC - Area Under Curve), которое может варьировать от значения 1,0 (идеальный классификатор) до 0,5 (бесполезная модель) (таблица 2) [185][186].

**ТАБЛИЦА 1 - Шкала значений AUC для оценки качества модели [186]**

Интервал AUC	Качество модели
0,9-1,0	Отличное
0,8-0,9	Очень хорошее
0,7-0,8	Хорошее
0,6-0,7	Среднее
0,5-0,6	Неудовлетворительное

### 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. «Рецепрокные» 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 позволит 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 и реализация результатов исследования**

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.).

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.

### **Внедрение результатов исследования**

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.

### **Личный вклад автора**

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 проводилась 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.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Эпидемиология и факторы риска цервикальных неоплазий

Цервикальные интраэпителиальные неоплазии - это предраковые диспластические состояния, в относительно небольшом количестве случаев прогрессирующие до инвазивного рака шейки матки. По данным ВОЗ в мире заболеваемость CIN I составляет 30 млн случаев, а CIN II–III – 10 млн [52]. В последние годы наблюдается увеличение распространенности неоплазий среди женщин молодого возраста [35,53,54].

Возникновение и прогрессирование цервикальных неоплазий сложный и многофакторный процесс, основная роль в котором отводится вирусу папилломы человека (ВПЧ) [55]. Общемировая распространенность ВПЧ-инфекции высокого риска составляет 10,4% [56], а в некоторых развивающихся странах достигает 36,5% [57]. Каждый год выявляемость и заболеваемость ПВИ во всем мире увеличиваются и, по данным ВОЗ, составляют около 2,5–3,0 млн случаев [58].

Описано более 200 типов ВПЧ, и более 40 из них вызывают заболевания половых органов. Международным Агентством по исследованиям в области рака (МАИР) вирусы классифицируются на типы высокого канцерогенного риска (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59), «вероятного» или «возможного» канцерогенеза (68,26, 53, 66,67,70,73, 82) и низкого риска (6, 11, 13, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81, 89 и др.) [1].

Инфицирование папилломавирусом часто происходит после сексуальной инициации. В большинстве случаев ВПЧ не вызывает симптомов или заболеваний и самоэлиминируется в течение 6 – 24 месяцев после заражения. Лишь в 10-20% инфекция сохраняется, вызывая пренеопластические изменения. [59]. В дальнейшем возможно спонтанное исчезновение признаков поражения шейки матки без лечения, персистенция или прогрессирование с развитием более тяжелых форм, вплоть до инвазивного рака [60][61][62] [63].

LSIL (CIN 1) относятся к доброкачественным формам инфицирования ВПЧ. В 40 - 75% случаев в течение 9-12 месяцев происходит регресс поражений шейки матки без лечения, в 29-43% персистенция атипических изменений, и только в 5-10% отмечается прогресс в последующие стадии дисплазии [12]. Прогрессирование может происходить в течение широкого промежутка времени: от 1 года до 15 лет. Поэтому допускается консервативное ведение пациенток с этими формами поражения [64][33].

Напротив, HSIL (CIN2+) рассматриваются в качестве истинных предраковых поражений шейки матки, с высоким потенциалом прогрессирования в инвазивную опухоль и низким уровнем регресса [13] [65]. Поэтому, при выявлении тяжелых поражений шейки матки чаще применяются деструктивные методы лечения [64].

Однако, чрезмерная лечебная агрессия в отношении женщин с нереализованной репродуктивной функцией может негативно влиять на гравидарный процесс [66]. В то же время, консервативное ведение пациенток с цервикальными интраэпителиальными неоплазиями не лишено риска, так как диагностические признаки атипии могут быть недооценены [33].

Развитие цервикальных неоплазий в большинстве случаев обусловлено персистенцией ВПЧ 16 типа, встречаясь по данным разных авторов в 45-70 % случаев [67]. Реже при дисплазиях и раке шейки матки выявляются 18,31,33 и другие высокоонкогенные типы вируса [8][68][69]. ВПЧ 16 и 18 типов практически никогда не подвергаются самоэлиминации и характеризуются самым высоким риском прогрессии в CIN2+ [70].

Выявление высокоонкогенного типа ВПЧ является необходимым, но может быть не достаточным для возникновения и прогрессии CIN. Развитие рака шейки матки зависит от множества дополнительных факторов.

Эпидемиологические исследования отмечают, что ранний возраст сексуального дебюта [71], частая смена половых и наличие более чем одного сексуального партнера являются значимыми факторами риска заражения ВПЧ-инфекцией и развитием рака шейки матки [72]. Напротив, моногамность и

наличие длительной половой связи снижает риски.

В дополнение к сексуальной активности, возраст является важным фактором риска заражения и персистенции ВПЧ [73]. Пик распространенности ВПЧ наблюдается у молодых женщин 20-25 лет, постепенно снижается с возрастом [57]. Тем не менее, рак шейки матки чаще встречается у женщин старше 35 лет. Это обусловлено тем, что инфекция в молодом возрасте прогрессирует более медленно.

Рак шейки матки возникает в зоне трансформации, которая представляет собой область между плоским эпителием эктоцервикса и цилиндрическим эпителием эндоцервикса, где происходят непрерывные метапластические изменения [74]. Период наибольшей метапластической активности совпадает с наибольшим риском инфицирования ВПЧ [75], и это происходит в период полового созревания и первой беременности, а затем медленно снижается после наступления менопаузы. После достижения зрелости существует минимальный риск последующего развития плоскоклеточной неоплазии шейки матки.

В нескольких исследованиях сообщалось о связи высокого паритета с риском развития атипичии цервикального эпителия, главным образом у молодых женщин [76][77][78] [79], что объясняется влиянием эндогенных гормонов [80][81], питанием и изменением иммунного ответа на ВПЧ во время беременности [82][83], повреждениями шейки матки в процессе родов. Повышенные уровни эстрогенов и прогестерона во время беременности, вероятно, ответственны за изменения в зоне трансформации, вызывая снижение иммунного ответа на ВПЧ-инфекцию и влияя на риск персистенции или прогрессирования [84].

По данным некоторых работ риск РШМ возрастает с увеличением продолжительности применения гормональных контрацептивов [85][86]. Другие исследователи отмечают, что длительное применение оральных контрацептивов не связано с инфицированием ВПЧ, но может быть вовлечено в переход от латентной инфекции к неопластическим поражениям шейки матки [87].

В 2004 году Международное агентство по изучению рака (МАИР) добавило неоплазии шейки матки в список онкологических заболеваний, причинно связанных с курением [88]. Местная иммуносупрессия, индуцированная курением, и мутагенная активность компонентов сигарет способствуют персистенции ВПЧ и злокачественной трансформации многослойного плоского эпителия (МПЭ) подобно той, которая наблюдается в легких [89]. Однако, продолжают поступать противоречивые данные о связи курения и приобретением, устойчивостью и прогрессированием ВПЧ. Большинство исследований показали, что курение в настоящем времени, а не в прошлом увеличивает распространенность инфекции [78][90][91]. У активных курильщиков вирусная нагрузка ВПЧ высокого риска выше, чем у некурящих и бывших курильщиков [92]. Кроме того, у курящих женщин наблюдается замедленное очищение от вируса и более частое прогрессирование до CIN 2/3 [93][94]. Некоторые исследования показали, что курящие женщины с меньшей вероятностью соблюдают рекомендации по скринингу, тем самым подрывая силу связи между курением и развитием РШМ [95]. В работе американских ученых сообщалось о защитной функции курения против ВПЧ [96].

Существенным фактором, способствующим развитию заболевания, является длительное воспаление [97]. Хроническое воспаление связано с различными стадиями канцерогенеза, включая клеточную трансформацию, апоптоз, пролиферацию, инвазию, ангиогенез и метастазирование. О связи между цервицитом и высокодифференцированными цервикальными поражениями у женщин, инфицированных онкогенным ВПЧ, сообщили Castle et al. [98], Castro-Sobrinho J.M. [99].

Все большее число исследований показывают, что вагинальная микробиота и сопутствующие инфекции, передающиеся половым путем играют важную роль в возникновении предраковых поражений [100].

Крупное исследование показало, что частота развития неоплазии шейки матки выше у женщин с явлениями бактериального вагиноза. Castro-Sobrinho J.M. и другие, обнаружили, что цитологические картины LSIL и HSIL чаще

выявляются у женщин с бактериальным вагинозом [99]. В метаанализе, проведенном Liang Y., бактериальный вагиноз ассоциировался с повышенным риском развития CIN [101].

Имеются ограниченные данные, показывающие, что диета может играть роль в развитии цервикальных неоплазий. Так, S. Xiao и соавторы при изучении влияния уровня фолатов на встраивание ДНК ВПЧ 16 типа в геном кератиноцита выявили, что недостаток фолатов в рационе ведет к индукции туморогенеза [102]. Повышенное потребление рибофлавина, тиамина, витамина B12 и фолиевой кислоты с пищей ассоциировано с более низким уровнем CIN.[103].

## **1.2. Молекулярные основы цервикального онкогенеза, роль микроРНК**

В последнее десятилетие широко представлены исследования, изучающие молекулярные основы цервикального онкогенеза и их пользу в диагностике.

Геном ВПЧ включает в себя несколько открытых рамок считывания, которые кодируют белки, участвующие в репликации вирусной ДНК (E1 и E2), регуляции экспрессии вирусных генов (E2), сборке вирусов (E4) и immortalization и трансформации инфицированных эпителиальных клеток (E5, E6 и E7; только ВПЧ высокого риска). Открытые рамки считывания L1 и L2 кодируют два капсидных белка. ВПЧ нацелен на базальные клетки плоского эпителия. Полный жизненный цикл включает в себя три фазы, с последовательной экспрессией вирусных генов, приводящей к репликации вирусной ДНК и производству высокоинфекционных вирионов. Интеграция вирусной ДНК приводит к сверхэкспрессии двух вирусных онкопротеинов-E6 и E7. Эти белки в сочетании с E5 способствуют immortalization и трансформации инфицированных клеток [14].

Недавние исследования показали, что микро-РНК транскрипционно или посттранскрипционно регулируются онкопротеинами E6 и E7 [104].

Микро-РНК-это эндогенные некодирующие РНК с регуляторными функциями. Размеры микроРНК составляют от 18 до 25 оснований. При специфическом спаривании оснований с мРНК-мишенью микроРНК могут деградировать, ингибировать или активировать мРНК-мишень [105].

Сама микроРНК транскрипционно регулируется такими факторами, как с-Мус, р53 и E2F, а посттранскрипционно регулируется белками Drosha, DiGeorge Critical Region 8 (DGCR8) и Dicer, связанными с обработкой микроРНК [106][107].

Одна микро-РНК вызывает различные биологические эффекты, связываясь со многими мРНК-мишенями, а уровень экспрессии одной мРНК может регулироваться многими микро-РНК, что приводит к формированию сложной регуляторной сети [108].

Микро-РНК вовлечены в широкий спектр важных биологических процессов, таких как регуляция клеточной пролиферации и дифференцировки, иммунного ответа, воспаления и апоптоза [108][109]. Нарушение этой регуляции может приводить к формированию различных патологических состояний, включая все типы неоплазий [110].

Молекулы микро-РНК могут функционировать и как онкогены, и как опухолевые супрессоры. Онкогены включают в себя те микро-РНК, которые значительно сверхэкспрессируются в опухолевых тканях во время ВПЧ-инфекции и приводят к началу aberrантной клеточной пролиферации и росту [111]. Напротив, микроРНК-супрессоры опухолей недостаточно экспрессируются в ВПЧ-позитивных опухолях по сравнению с нормальными тканями [112].

При изучении роли генов-супрессоров опухолей и регуляторов апоптоза в опосредовании процесса малигнизации в ВПЧ-инфицированных клетках [113] основное внимание было сосредоточено на р53 и рRb, являющихся мишенями для онкогенов E6 и E7 [114].

E6 индуцирует деградацию белка-супрессора опухоли р53, который поддерживает целостность генома за счет активации апоптоза [115]. E7 может

связываться и инактивировать белок ретинобластомы (Rb), разлагать комплексы Rb-E2F путем фосфорилирования белка Rb. Высвобожденный E2F1 способствует трансактивации с-Мус, циклина А и Е (cyclin A/E) в пользу внутриклеточного синтеза ДНК и перехода клетки из фазы G1 в фазу S, способствуя клеточной пролиферации [116].

Интеграция ВПЧ E6/E7 происходит в хрупкие участки генов, находящихся в непосредственной близости от некоторых микро-РНК [117]. Персистенция вирусной инфекции в эпителиоцитах шейки матки ведет к усиленному образованию онкобелков E6 и E7, ингибированию p53 и pRb [114] и блокаде экспрессии этих микро-РНК.

Для каждой стадии цервикальной дисплазии и рака характерны специфические aberrации в уровнях микро-РНК [118]. Однако мало что известно о том, какие микро-РНК дисрегулируются.

Сегодня хорошо изучена роль мир-34а в подавлении клеточной пролиферации и миграции при злокачественных заболеваниях. МикроРНК-34а напрямую регулируется p53: белок E6 высокоонкогенных типов ВПЧ вызывает её торможение через p53 [119]. Снижение экспрессии микроРНК-34а возникает не только при раке шейки матки, а еще на стадии предраковых поражений за долго до появления морфологических изменений [120].

Если микроРНК-34а напрямую регулируется p53 и выступает в качестве супрессора, то микроРНК-122 положительно регулирует путь p53 через циклин G1 [17].

Влияние микроРНК125b в инфицированных клетках опосредуется онкобелком ВПЧ-L2 [121] , а также Vcl-2 [122]. Подавление экспрессии микроРНК-125b влечет за собой увеличение уровня онкопротеина p53 и индукцию клеточного апоптоза. [123].

МикроРНК-145 также имеет p53-зависимый путь регуляции. Показано, что эта микро-РНК подавляет пролиферацию, миграцию и инвазию, а также подавляет опухолевый рост и предотвращает метастазирование путем стимуляции апоптоза и подавления ангиогенеза [124].

Еще одной микро-РНК, снижение экспрессии которой связано с p53, является микроРНК-23b. Кроме того, снижение уровня микроРНК-23b ведет к увеличению экспрессии фермента активатора плазминогена урокиназного типа (urokinase-type plasminogen activator, uPA), определяющего инвазивный фенотип клеток [125].

Georges S.A. et al. и Braun C.J. et al. отдельно друг от друга обнаружили, что микроРНК-192, микроРНК-194 и микроРНК-215 индуцируют повреждение ДНК p53-зависимым образом [126][127].

Ингибирование онкосупрессора pRb белком E7 приводит к высвобождению активного транскрипционного фактора E2F и гиперэкспрессии микроРНК-15a, микроРНК-15b и микроРНК-16 [128].

Онкопротеин E7 способствует увеличению DGC8 и, как следствие, усилению экспрессионной активности микроРНК-27b, стимуляции пролиферации и снижению апоптоза злокачественных клеток шейки матки [129].

МикроРНК143/145 находится в непосредственной близости от хрупких участков генома хозяина. Избыточная экспрессия E7 приводит к угнетению микроРНК-145 и микроРНК-143 в инфицированных клетках [112].

Помимо онкогенных вирусных белков E6 и E7, прямо или косвенно приводящих к нарушению регуляции некоторых микро-РНК, существуют и другие микро-РНК-опосредованные механизмы канцерогенеза.

Показана важная роль некоторых микроРНК в воспалительных сигнальных путях [49][130]. Участвуя в таких путях (включая JAK/STAT3, MAPK, Wnt/ $\beta$ -catenin, NF $\kappa$ B, TGF- $\beta$ /Smad, and PI3K/Akt/mTOR [131], микро-РНК приводит к индукции хронического воспаления и возникновению рака шейки матки (таблица 1).

**ТАБЛИЦА 2 - Список микро-РНК, участвующих в воспалительных сигнальных путях при раке шейки матки**

Сигнальные пути	Микро РНК	Эффект	Цель	Литература
$\beta$ -catenin	микроРНК 135a	повышенная регуляция	SIAN1	[132]
NF- $\kappa$ B	микроРНК 429	понижающая регуляция	IKK BETA	[133]
	микроРНК 130a	неопределены	PTEN	[134]
PI3K/Akt	микроРНК 21	повышенная регуляция	неопределены	[135]
	микроРНК 181	повышенная регуляция	неопределены	[136]
	микроРНК 221	повышенная регуляция	PTEN	[137]
	микроРНК 491	понижающая регуляция	неопределены	[138]
	микроРНК 494	повышенная регуляция	PTEN	[139]
	микроРНК 196a	повышенная регуляция	FOXO1, P27KIP1	[140]
MTOR	микроРНК 634	понижающая регуляция	MTOR	[141]
	микроРНК 99a	понижающая регуляция	MTOR	[142]
	микроРНК 99b			

Таким образом, персистенция ВПЧ-инфекции, обусловленная разнонаправленным действием, значительно ухудшает функционирование клеток, что приводит к накоплению неблагоприятных изменений и индукции канцерогенеза.

### **1.3. Современные диагностические подходы, их преимущества и недостатки**

К настоящему времени разработано большое количество методов скрининга рака шейки матки.

С 1950-х годов «золотым стандартом» в скрининге цервикальных интраэпителиальных поражений является цитологическое исследование мазков с экзо-эндоцервикса (РАР- тест)[143]. Цитологический метод технически прост, быстр, сравнительно дешев, нетравматичен [19][20][21]. Однако данный метод имеет ряд существенных недостатков: субъективность трактовки результатов цитологом и сложность стандартизации, некачественный забор материала для исследования, что снижает чувствительность исследования до 35-76% [22][23][144].

В последнее время распространение получил метод жидкостной цитологии. По сравнению с традиционным цитологическим исследованием данный метод обладает такими преимуществами, как улучшенное качество эпителиальноклеточного материала, сохранение морфологических, иммуноцитохимических и генетических свойств клеток с последующей возможностью проведения дополнительных диагностических методов, стандартизация методики [145][146]. Большая трудоемкость и дороговизна метода не позволяет широко использовать его повсеместно [147], чаще используют при выявлении атипичных клеток неясного генеза (ASCUS), при мониторинге уже имеющегося поражения шейки матки. Кроме того, метод жидкостной цитологии не позволяет сделать прогноз в отношении прогрессирования, персистенции или регресса уже имеющегося заболевания

[61].

Изучение роли ВПЧ в цервикальном туморогенезе способствовало внедрению скрининга на основе детекции вирусной ДНК. ВПЧ –тестирование, а также его сочетание с цитологическим имеет большую чувствительность, чем цитологическое исследование, и позволяет увеличивать межскрининговый интервал [25][26][27][28][148].

Однако специфичность теста невысока, так как в 80 % случаев течение ВПЧ-инфекции является транзиторным, и инфицирование заканчивается спонтанным выздоровлением и элиминацией вируса [29][30][31] [32].

Имеются противоречия и в отношении ассоциации стадии поражения шейки матки с величиной вирусной нагрузки . Некоторые авторы показали, что вирусная нагрузка увеличивается прямопропорционально тяжести цервикальной неоплазии [62][149]. Присутствие вирусной ДНК в малых количествах не имеет клинической значимости и только свидетельствует о высокой вероятности регресса заболевания [150].

Сообщалось, что ВПЧ-16 может достигать гораздо более высокой вирусной нагрузки, чем другие типы, и только для ВПЧ-16 повышение вирусной нагрузки соотносится с увеличением тяжести заболевания. ВПЧ других типов способны вызывать злокачественные опухоли, даже если они присутствуют в малых количествах [151].

В других исследованиях по мере прогрессирования заболевания показано снижение показателей вирусной нагрузки в связи с переходом из продуктивной инфекции в интегрированную, что снижает прогностическую ценность определения вирусной нагрузки [152].

Кольпоскопия представляет собой второй этап диагностического поиска [33][153] являясь высокоинформативным и недорогим методом. Одна из главных целей кольпоскопии - визуальное обнаружение кольпоскопических аномалий для проведения диагностической биопсии с целью подтверждения патологии. Это обнаружение имеет важное значение для выявления

плоскоклеточного интраэпителиального поражения высокой степени, требующего немедленного лечения.

Выбор точки шейки матки, где будет проводиться биопсия, имеет решающее значение для получения правильного диагноза. Условно биопсия должна проводиться в наилучшем участке поражения шейки матки и должна быть репрезентативной для всего очага поражения

Кольпоскопическая точность зависит от квалификации врача [154], возраста пациента [155] и степени поражения. Brown В. и его коллеги в метаанализе сообщили, что чувствительность кольпоскопии варьировала от 60 до 99%, а специфичность- от 27 до 83 % [156]. В другом исследовании совпадение между кольпоскопией и гистологией составило 78,5% для CIN 1, 84% для CIN 2 и 88,6 % для CIN 3. Общая чувствительность кольпоскопии без биопсии составила 83,6 % [157].

Прицельная биопсия с последующим гистологическим исследованием полученного материала является «Золотым стандартом» диагностики цервикальных неоплазий [158]. Однако высокая стоимость, инвазивность, болезненность для пациентов препятствуют частому проведению процедуры. При этом на фоне выраженного воспалительного процесса, даже гистологическое исследование не всегда позволяет установить четкие признаки инфицирования вирусом [159].

Весьма перспективными тестами диагностики предраковых заболеваний и рака шейки матки являются методы иммуноферментного анализа онкобелков Е6 и Е7 и иммуноцитохимического определения онкобелков p16ink4α и Ki-67 в цервикальных мазках [34] [62] [160]. Эти методы также не лишены недостатков. Помимо большой стоимости и трудоёмкости для клинических лабораторий, эти методики применимы на поздних стадиях эпителиальных поражений [161][162].

Таким образом, несмотря на огромный прогресс, достигнутый в диагностике цервикальных неоплазий, существующие методы обладают некоторыми ограничениями [163]. Кроме того, на сегодняшний день не

существует ни одного метода, способного предсказывать длительность течения и исход заболевания, что приводит к отсутствию единого подхода к ведению пациенток с CIN. Из-за этого большое число женщин каждый год могут получать ненужное лечение или откладывать его.

Поэтому сохраняется потребность в разработке и внедрению в клиническую практику новых неинвазивных биомаркеров, которые будут улучшать диагностику, обладать прогностическим значением и способствовать объективизации лечебной тактики.

#### **1.4. Потенциал микроРНК в диагностике неопластических поражений шейки матки**

##### **1.4.1. Данные сравнительных исследований материала биопсий**

В ряде исследований, опубликованных за последние годы, были показаны существенные изменения профиля экспрессии микро-РНК в клетках цервикального эпителия в процессе его злокачественной трансформации и диагностический потенциал методов анализа этих изменений [164][118].

Одно из первых исследований, описывающее различия экспрессии шести микро-РНК в клетках карциномы шейки матки в сравнении с образцами нормального цервикального эпителия, было опубликовано Lui et al. [165]. Из 166 исследуемых микро-РНК, шесть молекул имели существенные различия между двумя группами: экспрессия let-7b, let-7c, miR-23b, miR-196b и miR-143 была выше, а miR-21 – ниже в клетках карциномы.

В другом исследовании [166] была показана избыточная экспрессия микроРНК-15а, микроРНК-26b, микроРНК-195, микроРНК-200с, микроРНК-223 и недостаточная экспрессия микроРНК-143 и микроРНК-145 в предраковых тканях.

Pereira P. с коллегами [167] продемонстрировали изменение экспрессии 21 микро-РНК в образцах здоровых тканей, с CIN и инвазивным РШМ. Уровни

микроРНК 29а, микроРНК -26а, микроРНК -145, микроРНК -143, микроРНК -99а, микроРНК -199а, микроРНК -203 и микроРНК -513 постепенно снижались, а микроРНК-196а, микроРНК-302b, микроРНК-10а, микроРНК-132 и микроРНК-148а увеличивались в этих группах. Для микроРНК-16, микроРНК-27а, микроРНК-106а, микроРНК-142-5р, микроРНК-197 и микроРНК-205 было показано снижение экспрессии при переходе от нормальной ткани к цервикальной дисплазии, с последующим увеличением от дисплазии к инвазивному РШМ, и наоборот, увеличение с последующим уменьшением для микроРНК-522-5р и микроРНК-512-3р.

При изучении профиля микро-РНК в тканях с CIN и инвазивным РШМ, Li Y. et al. [42] показали гиперэкспрессию 17 молекул и снижение экспрессии 14 молекул при переходе от нормального эпителия к раку. Было подтверждено уменьшение экспрессионной активности микроРНК-29а и микроРНК-99а, описанное в работе Pereira P. et al. [167]. Наряду с другими исследованиями [47][168] [41][169] были продемонстрированы более низкие уровни экспрессии микроРНК-218 и микроРНК-100 у пациентов с тяжелыми поражениями шейки матки, чем с легкими.

Проанализировав микро-РНК в здоровых тканях, в образцах с предраковыми поражениями и раком шейки матки, Li Y et al. выявили достоверную разницу только для микроРНК-99а и микроРНК-375 [42]. Снижение уровня микроРНК-375 при более выраженных изменениях, анализируемого в биоптатах методом количественной ПЦР, наблюдалось также Bierkens M. et al. [170].

Оценивая уровень экспрессии микро-РНК с помощью количественной ПЦР, Cheung et al. смогли четко отделить пациентов с CIN2 / 3 или РШМ от здоровых, используя 12 маркерных молекул [171]. Наибольший интерес авторов вызвала микроРНК - 9, поскольку она стимулирует ангиогенез, увеличиваясь в различных видах злокачественных опухолях [171], в том числе при цервикальной карциноме [167], [168].

Wilting S. et al. [47] методом микрочипов анализировали микро-РНК в образцах с нормальным эпителием, с CIN 2/3 и РШМ). В общей сложности изменения экспрессии 106 молекул микро-РНК коррелировали с тяжестью течения процесса в шейки матке. Авторы выделили «ранние транзиторные» микро-РНК (значительно выраженные при CIN 2/3 по сравнению с нормальным эпителием, но без разницы с РШМ и нормой), «поздние» микро-РНК (имеющие избыточную экспрессию при РШМ в сравнение со здоровыми тканями и CIN 2/3, но не дифференцирующие CIN 2/3 от нормальной ткани), и «ранние постоянные» микроРНК (молекулы, показывающие различия экспрессии при РШМ и CIN 2/3 по сравнению с нормой). Некоторые из этих изменений подтвердили результаты Pereira [167], Gocze K. [119] и Cheung [171]. Группа исследователей во главе с Wilting S., так же как Li с коллегами, наблюдали плавное увеличение уровня микроРНК-155 при переходе от CIN1 к цервикальному раку [47][42].

Zeng K. и его коллеги сравнили экспрессию микро-РНК в здоровых тканях шейки матки, с CIN и с инвазивным РШМ и нашли несколько микро-РНК, значения которых значительно отклонялись от нормы. В частности, при сравнении инвазивного РШМ с нормальными тканями было установлено повышение экспрессии микроРНК-21, микроРНК-15b и микроРНК-16 и снижение микроРНК-218 и микроРНК-376 [168].

Villegas-Ruiz и коллеги [172] показали возрастающую экспрессию микроРНК-196a от здоровых тканей через CIN низкой и высокой степени к злокачественной опухоли, подтвердив результаты Pereira и его коллег.

Gocze и соавт. выполнили микроРНК-профилирование биоптатов неоплазии шейки матки и описали активную экспрессию miR-21, miR-34a, miR-196a, miR-27a и miR-221, как специфических маркеров ВПЧ- позитивности независимо от клинической градации опухоли [119].

Deftereos et al. [173] проанализировали микроРНК -143 и микроРНК-21 в большой группе образцов с различными стадиями заболевания. Несмотря на сообщаемое в более ранних работах снижение уровня микроРНК-143 с

возрастанием степени тяжести заболевания [172], [167], в данной работе такой картины не наблюдалось. Но, как и у других исследователей [47],[119], [174],[175], имело место увеличение экспрессии микроРНК-21 от слабых дисплазий к тяжелым, и было максимальным при раке [173].

Shishoida и коллеги, проанализировав микроРНК-21 и микроРНК-let-7a, также установили, что повышение экспрессии микроРНК-21 связано с прогрессированием заболевания. При инвазивном раке выявлены более низкие уровни микроРНК-let-7a, по сравнению с предраком и нормальными образцами, в то время как самые высокие уровни были обнаружены в предраковых поражениях [174].

Leung и его коллеги наблюдали гиперэкспрессию микроРНК-135a в клетках цервикальной карциномы по сравнению с CIN1 и с CIN II-III [132].

В работе Wang et al. [176] повышенный уровень микроРНК-25, микроРНК-92a и микроРНК-378 наблюдались в ВПЧ-инфицированных тканях по сравнению с ВПЧ-негативными. Экспрессия miR-27a увеличивалась при сравнении образцов нормального эпителия шейки матки, CIN и РШМ, что согласуется с исследованием Gocze K. [119], но противоречит выводам Wilting S. и соавт.[47], в которых микроРНК-27a снижалась от нормы к инвазивному раку. В соответствии с данными предыдущих наблюдений [42], активность миR-29a также уменьшалась при сравнении нормальных тканей с CIN и РШМ.

В целом, обзор исследований, проведенных с целью сравнения профилей экспрессии микро-РНК в клетках нормального цервикального эпителия и эпителия, подверженного злокачественной трансформации, демонстрирует наличие существенной разницы. Но, представленные в научной литературе данные очень разнородны, и пока не позволяют в достаточной степени определить значимость таких молекул, которые могли бы служить диагностическими или прогностическими маркерами онкопроцесса. Причины этого, вероятно, имеют методологический характер. Известно, что характер биопсийного материала, метод выделения РНК и технология анализа микро-РНК оказывают влияние на результаты [177]. Поэтому поиск потенциальных

диагностических и/или прогностических микро-РНК маркеров цервикальных дисплазий логично вести с использованием материала и методов аналогичных тем, что предполагается реализовать в рамках технологий клинической диагностики. Так, например, цитологические препараты (мазки) цервикального эпителия являются наиболее широко используемым при диагностике цервикальных патологий вариантом биологического материала. Следовательно, разработка методов выделения и анализа микро-РНК и поиск маркерных молекул именно в этом материале имеет практическое значение.

#### **1.4.2. Возможности анализа микро-РНК в материале цервикальных мазков**

Цитологическое исследование мазков с экзо-эндоцервикса широко используется в скрининге РШМ. В последнее время появляются данные о возможности использования материала цитологических мазков для выделения и количественного анализа микроРНК.

Первое сообщение об обнаружении микро-РНК в эксфолиатных клетках шейки матки было опубликовано Tian et al. в 2014 году [178]. Образцы клеток от 1021 женщины были распределены на основе результатов PAP-теста и кольпоскопии на шесть групп: норма, ASCUS, LSIL, ASC-H, HSIL и CC. Количественный анализ ОТ-ПЦР показал, что относительные уровни экспрессии микроРНК-218, микроРНК-34а, микроРНК-424 и микроРНК-375 были значительно ниже в более продвинутых классах CIN, чем в начальных.

Шесть микроРНК, определенных в качестве потенциальных маркеров Li Y. с коллегами [42], были исследованы в образцах из 1021 ВПЧ-позитивных женщин. По мере усугубления тяжести поражения снижались уровни микроРНК-218, микроРНК-34а, микроРНК-424 и микроРНК-375, что частично подтверждает ранее полученные результаты в тканях шейки матки [42].

Ribeiro J. et al. [179] оценивали уровень микроРНК-34а и микроРНК-125б в цервикальных клетках (в нормальном эпителии с и без ВПЧ-инфекции, интраэпителиальных неоплазиях высокой и низкой степени градации и РШМ).

Исследование выявило повышенную экспрессию miR-125b у женщин с ВПЧ-инфекцией, но прогрессирующее снижение экспрессии, ассоциированное с увеличением тяжести поражений эпителия шейки матки. У женщин с нормальной шейкой матки и ВПЧ-инфекцией также повышался уровень экспрессии микроРНК-34a. Несмотря на отсутствие значительной корреляции с тяжестью поражения, его экспрессия при РШМ увеличивалась. Значительно более низкие уровни микроРНК-34a были обнаружены также при CIN2 / 3 по сравнению с CIN1, а также при РШМ по сравнению с CIN2 / 3, аналогичные тому, что наблюдали Gosze K. et al. в биоптатах [119].

В исследовании Kawai S. et al. значения четырех микро-РНК (микроРНК-126-3p, микроРНК-20b-5p, микроРНК -451a и микроРНК-144-3p) были значительно повышены при цервикальных неоплазиях по сравнению с нормой, а уровень их экспрессии коррелировал с тяжестью заболевания и риском инфицирования вирусом папилломы человека [180].

Уровень let-7c также был оценен методом ПЦР real-time в клеточных образцах нормального и атипического эпителия в исследовании M.Malta с коллегами [181]. Отмечалось постепенное снижение уровня let-7c по мере усугубления CIN. Вероятно, let-7c является мишенью p53, и его экспрессия индуцируется в ответ на активацию p53[181].

Таким образом, эти исследования показывают, что определение микро-РНК в материале цитологических мазков с шейки матки технически выполнимо, и может быть реализовано как в рамках фундаментальных исследований, так и в качестве клинических методов диагностики и прогноза течения цервикальных неоплазий.

## **ГЛАВА 2. КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ОБСЛЕДОВАННЫХ ГРУПП И ОЦЕНКА ФАКТОРОВ РИСКА РАЗВИТИЯ И ПРОГРЕССИРОВАНИЯ ЦЕРВИКАЛЬНЫХ НЕОПЛАЗИЙ**

### **2.1. Анализ клинико-анамнестических данных**

Средний возраст обследованных женщин составил  $31,7 \pm 7,0$  лет. Пациентки обеих клинических групп и группы контроля были сопоставимы по возрасту ( $p > 0,05$ ). Средний возраст больных с поражениями шейки матки легкой степени составил  $31,6 \pm 7,2$  лет, с тяжелыми -  $32,2 \pm 5,3$  лет, средний возраст в контрольной группе –  $31,6 \pm 8,0$  лет.

Разделение группы LSIL на подгруппы позволило наблюдать увеличение возраста от группы выздоровление ( $30,46 \pm 7,5$ ) через персистенцию ( $31,87 \pm 7,46$  лет) к прогрессированию ( $33,3125 \pm 4,867837$  лет), но, достоверных различий выявлено не было ( $p > 0,05$ ).

При проспективном наблюдении женщин с LSIL через 12 месяцев в 48,18% ( $n=53$ ) были выявлены стойкие плоскоклеточные изменения легкой степени, в 14,55% ( $n=16$ ) прогрессирование атипии цервикального эпителия до тяжелой; в 37,27% ( $n=41$ ) – нормализация аномальной картины с элиминацией ВПЧ. Случаев инвазивного рака шейки матки ни в одном случае диагностировано не было.

Ретроспективный анализ длительности заболевания у пациенток группы HSIL показал, что от момента первичного установления диагноза LSIL до прогрессирования проходит от 1 года до 10 лет, в среднем данный интервал составляет  $3,6 \pm 2,2$  лет.

#### **2.1.1 Характеристика жалоб, предъявляемых обследованными женщинами**

При изучении жалоб, предъявляемых пациентками с SIL, ведущими были патологические выделения из половых путей различного характера: слизисто – гнойные, гомогенные молочно-серого цвета с неприятным запахом, творожистые.

Второй по частоте была жалоба на зуд и жжение в области наружных половых органов. Около 1/3 исследуемых женщин предъявляли жалобы на боли во время полового акта. Данная жалоба в большинстве случаев была характерна для женщин с цитологическими аномалиями. Контактные кровянистые выделения беспокоили 10 % (17/170) женщин, чаще на эту патологию указывали женщины с HSIL. В ряде случаев женщины отмечали сочетания выделений с зудом и диспареунией.

Характер жалоб у пациенток основных клинических групп отражен в таблице 3, подгрупп LSIL – в таблице 4.

**ТАБЛИЦА 3 - Характер жалоб у пациенток с SIL (абс., %)**

Показатель	Здоровые n=30		LSIL n=110		HSIL n=30		Всего n=170	
	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%
<b>Патологические выделения из половых путей</b>								
Нет	27	90,00%	37	33,64%	5	16,67%	69	40,59%
Есть	3	10,00%	73	66,36%	25	83,33%	101	59,41%
<b>Зуд, жжение</b>								
Нет	29	96,67%	50,00%	45,45%	15	50,00%	94	55,29%
Есть	1	3,33%	60	54,55%	15	50,00%	76	44,71%
<b>Диспареуния</b>								
Нет	29	96,67%	75	68,18%	20,00%	66,67%	124	72,94%
Есть	1	3,33%	35	31,82%	10,00%	33,33%	46	27,06%

## ПРОДОЛЖЕНИЕ ТАБЛИЦЫ 3

Контактные кровотечения								
Нет	30	100,00%	99	90,00%	24	80,00%	153	90,00%
Есть	0	0,00%	11	10,00%	6	20,00%	17	10,00%

ТАБЛИЦА 4 - Характер жалоб у пациенток подгрупп LSIL ( абс., %)

Показатель	Выздоровление n=41		Персистенция n=53		Прогрессирование n=16	
	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%
<b>Патологические выделения из половых путей</b>						
Нет	13	31,71%	23	43,40%	1	6,25%
Есть	28	68,29%	30	56,60%	15	93,75%
<b>Зуд, жжение</b>						
Нет	24	58,54%	21	39,62%	5	31,25%
Есть	17	41,46%	32	60,38%	11	68,75%
<b>Диспареуния</b>						
Нет	36	87,80%	28	52,83%	11	68,75%
Есть	5	12,20%	25	47,17%	5	31,25%
<b>Контактные кровотечения</b>						
Нет	38	92,68%	48	90,57%	13	81,25%
Есть	3	7,32%	5	9,43%	3	18,75%
Всего						

**2.1.2. Анализ менструальной и репродуктивной функции**

Средний возраст менархе у исследуемых женщин составил  $13,15 \pm 1,08$  года. Длительность менструального цикла была  $30,18 \pm 5,49$  дня, продолжительность кровотечения -  $5,42 \pm 5,49$  дня. У 154 (90,59%) женщин

менструальный цикл был регулярным и только у 16 (9,41%) обнаружены различные аномалии менструального цикла.

Далее был проведен сравнительный анализ менструальной функции пациенток. Развитие и тяжесть неопластических заболеваний шейки матки не были связаны с возрастом менархе и характером менструального цикла (таблица 5).

**ТАБЛИЦА 5 - Результаты сравнения показателей менструальной функции ( $M \pm s.d$ ; min ÷ max; Me [LQ; UQ])**

Показатель	Здоровые n=30	LSIL n=110	HSIL n=30	Выздоров ление n=41	Персисте нция n=53	Прогрессир ование n=16
Возраст менархе (лет)	13,00±1,17	13,11±1,02	13,43±1,19	13,00±1,17	13,11±1,02	13,43±1,19
	11÷16	11÷16	11÷16	11÷16	11÷16	11÷16
	13[12-14]	13[12-14]	13[13-14]	13[12-14]	13[12-14]	13[13-14]
	P>0,05			P>0,05		
Длительность менструального цикла	29,47±3,50	30,48±6,28	29,80±3,70	29,47±3,50	30,48±6,28	29,80±3,70
	26÷45	24÷60	26÷45	26÷45	24÷60	26÷45
	28[28-30]	28[28-30]	28[28-30]	28[28-30]	28[28-30]	28[28-30]
	P>0,05			P>0,05		
Длительность менструального кровотечения	5,30±1,15	5,47 ±1,25	5,33±1,27	5,30±1,15	5,47 ±1,25	5,33±1,27
	3÷8	3÷8	3÷8	3÷8	3÷8	3÷8
	5[5-6]	5[5-6]	5[4-6]	5[5-6]	5[5-6]	5[4-6]
	P>0,05			P>0,05		

Корреляционный анализ методом Спирмена также не выявил взаимосвязей между менархе и возрастом инфицирования папилломавирусом или дебютом аномалий цервикального эпителия (таблица 6).

**ТАБЛИЦА 6 - Коэффициент корреляции между возрастом менархе и возрастом инфицирования папилломавирусом или дебютом аномалий цервикального эпителия**

	Количество пациентов	Коэффициент корреляции	Уровень статистической значимости, р
Менархе & возраст инфицирования ВПЧ	29	0,04	0,72
Менархе & возраст заболевания CIN	133	-0,08	0,33

Общее число беременностей у обследованного контингента составило 110 (37%), родов 97(32%), искусственных абортс 68 (23%); 17 (6%) беременностей завершились выкидышем и 5 (2%) внематочной беременностью.

Оценка акушерского анамнеза не выявила различий в группах по количеству беременностей, родов и выкидышей. Женщины, имеющие аномальные цитологические мазки, гораздо чаще сообщали об искусственных абортах в анамнезе по сравнению со здоровыми ( $p_{\text{тенд.}} = 0,088$ ). Аналогичные тенденции наблюдались среди пациенток с LSIL при менее благоприятном течение заболевания. Сравнение объединенной группы персистенция-

прогрессирование с группой выздоровления показало статистически значимые отличия по частоте искусственного прерывания беременности (таблица 7).

**ТАБЛИЦА – 7 Результаты сравнения показателей репродуктивной функции ( $M \pm s.d$ ;  $\min \div \max$ ;  $Me [LQ; UQ]$ )**

Показатель	Здоровые n=30	LSIL n=110	HSIL n=30	Выздоровл ение n=41	Персисти ция n=53	Прогресси рование n=16
Беременности	1,33±1,49	1,66 ±1,60	1,83±2,39	1,37±1,63	0,94±0,91	2,19±1,42
	0-5	0-8	0-10	0÷6	0÷8	0÷5
	1(0-3)	1(0-3)	1(0-3)	1 (0-2)	1(1-3)	2 (1,5-3)
	P>0,05			P>0,05		
Роды	0,80±0,96	0,90 ±0,93	0,70±0,79	0,89±1,05	0,70±1,97	0,8125±0,66
	0-3	0-4	0-2	0÷4	0÷3	0÷2
	0,5 (0-1)	1(0-1)	0,5 (0-1)	1 (0-1)	1 (0-2)	1(0-1)
	P>0,05			P>0,05		
Аборты	0,47±0,68	0,65 ±0,94	1,07±1,78	0,39±0,74	0,057±0,23	1,13±1,02
	0-2	0-4	0-8	0÷3	0÷4	0÷3
	0(0-1)	0(0-1)	0(0-2)	1 (0-1)	0(0-1)	1 (0-2)
	P <sub>1,2,3</sub> = 0,15			P <sub>1,2,3</sub> = 0,028		
Выкидыши	0,13±0,43	0,09 ±0,29	0,13±0,35	0,10±0,30	0,09±1,02	0,19±0,40
	0-2	0-1	0-1	0÷1	0÷1	0÷1
	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0(0-0)	0(0-0)	0(0-0)
	P>0,05			P>0,05		

### 2.1.3. Анализ сексуальной жизни

При оценке особенностей половой жизни женщин, включенных в исследование, выявлено, что средний возраст полового дебюта составил  $17,71 \pm 2,14$  лет. Среди пациенток с патологией шейки матки 51 % (71/140) начали половую жизнь ранее 18 лет, тогда как среди здоровых женщин только 20% (6/30) имели свой первый сексуальный опыт до совершеннолетия.

Анализ сексуальной жизни показал отличия по возрасту первого полового акта среди пациенток с LSIL и HSIL ( $17,59 \pm 2$  лет и  $16,77 \pm 2$  лет соответственно,  $p=0,05$ ). По сравнению с контрольной группой, где возраст полового дебюта составил  $19,07 \pm 2$  лет, эта разница была еще более значима ( $p < 0,001$ ). Аналогические данные были получены в ходе сравнения женщин с различным исходом LSIL.

Результаты анализа промискуитета показали статистически значимые отличия по количеству половых партнеров как в основных группах, так и в подгруппах с различными исходами LSIL (таблица 8).

**ТАБЛИЦА 8 - Результаты анализа начала половой жизни и количества половых партнеров (M  $\pm$  s.d; min  $\div$  max; Me [LQ; UQ])**

Показатель	Здоровые n=30	LSIL n=110	HSIL n=30	Выздоровл ение n=41	Персистенци я n=53	Прогрессиров ание n=16
Начало	$19,07 \pm 2,03$	$17,59 \pm 2,02$	$16,77 \pm 2,06$	<b><math>17,93 \pm 2,16</math></b>	<b><math>17,66 \pm 1,97</math></b>	<b><math>16,5 \pm 1,46</math></b>
половой	16 $\div$ 25	14 $\div$ 25	13 $\div$ 21	14 $\div$ 25	14 $\div$ 23	14 $\div$ 19
жизни (лет)	19[18;20]	18[16;19]	17[15;18]	18[16-19]	18[16-19]	17 [15.5-17.5]
	<b>P&lt;0,05</b>			<b>P&lt;0,05</b>		

## ПРОДОЛЖЕНИЕ ТАБЛИЦЫ 8

Количество	4,13±2,53	7,46±5,71	11,07±10,82	5,077±2,93	7,81±5,54	12,44±8,06
половых	1÷10	1÷30	1÷50	1÷ 10	1÷ 25	3÷ 30
партнеров	3[2;5]	6[4;10]	7,5[5;12]	5 [3;7]	6 [4;10]	10 [6;20]
	<b>P&lt;0,05</b>			<b>P&lt;0,05</b>		

Интервал между сексуальным дебютом и манифестацией атипии цервикального эпителия составил 12,7±6,31 лет и не отличался в группах исследования (таблица 9).

**ТАБЛИЦА 9 - Интервал между сексуальным дебютом и манифестацией SIL**

		Mean	Std.Dev.	Median	Lower Quartile	Upper Quartile	Min	Max	
Всего	133	12,71	6,31	12	8	16	1	30	
LSIL	109	12,72	6,73	12	8	17	1	30	P<0,05
HSIL	24	12,67	3,96	13	10	15,5	3	20	

#### 2.1.4. Оценка методов контрацепции

Из 170 опрошенных женщин 112 (66%) использовали в течение жизни различные методы контрацепции. Свою приверженность к барьерным методам контрацепции высказывали 39 (34%) пациенток.

Здоровые женщины статистически чаще сообщали о регулярном использовании презервативов ( $p < 0,05$ ). Не было обнаружено значимой связи между приемом гормональных оральных контрацептивов или ВМС и тяжестью заболевания (таблица 10).

**ТАБЛИЦА 10 - Результаты сравнения методов контрацепции основных групп (абс., %)**

Показатель	Здоровые		LSIL		HSIL		Всего	P
	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	
<b>Использование презервативов</b>								
Практически никогда	15	50,00%	68	61,82%	19	63,33%	102	<b>P&lt;0,05</b>
Редко / время от времени	2	6,67%	19	17,27%	8	26,67%	29	
Регулярно / практически всегда	<b>13</b>	<b>43,33%</b>	<b>23</b>	<b>20,91%</b>	<b>3</b>	<b>10,00%</b>	39	
Всего	30	17,65%	110	64,71%	30	17,65%	170	
<b>Использование ОК</b>								
Не используют	22	73,33%	81	73,64%	20	66,67%		<b>P&gt;0,05</b>
Менее 2 лет	6	20,00%	17	15,45%	5	16,67%		
Более 2 лет	2	6,67%	12	10,91%	5	16,67%		
Всего	30	17,65%	110	64,71%	30	17,65%		
<b>Использование ВМС</b>								
Да	2	6,67%	7	6,36%	0	0,00%	9(5,29%)	<b>P&gt;0,05</b>
Нет	28	93,33%	103	93,64%	21	30		
Всего	30	17,65%	110	64,71%	30	17,65%		

Использование барьерных или каких-либо других контрацептивов женщинами, уже имеющими атипичские изменения в цервикальных мазках, не влияло на течение заболевания (таблица 11).

**ТАБЛИЦА 11 - Результаты сравнения методов контрацепции подгрупп LSIL (абс.,%)**

Показатель	Выздоровление		Персистенция		Прогрессирование		Всего	P
	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	
<b>Использование презервативов</b>								
Практически никогда	25	60,98%	32	60,38%	11	68,75%	68	P>0,05
Редко / время от времени	7	17,07%	9	16,98%	3	18,75%	19	
Регулярно / практически всегда	9	21,95%	12	22,64%	2	12,50%	23	
Всего	41	37,27%	53	48,18%	16	14,55%	110	
<b>Использование ОК</b>								
Не используют	32	78,05%	38	71,70%	11	68,75%	81	P>0,05
Менее 5 лет	6	14,63%	9	16,98%	2	16,98%	17	
Более 5 лет	3	7,32%	6	11,32%	3	18,75%	12	
Всего	41	37,27%	53	48,18%	16	14,55%	110	
<b>Использование ВМС</b>								
Да	1	2,44%	4	7,55%	2	12,50%	7	P>0,05
Нет	40	97,56%	39	92,45%	14	87,50%	103	
Всего	41	37,27%	53	48,18%	16	14,55%	110	

### 2.1.5. Анализ сопутствующей гинекологической и соматической патологии

Далее была проанализирована гинекологическая патология, не связанная с шейкой матки: хронические воспалительные заболевания органов малого таза, гиперпластические процессы матки (эндометриоз, миома матки, гиперплазия эндометрия), кисты яичников, бесплодие, нарушение менструального цикла. Структура гинекологической патологией представлена на рисунке 1.



**Рисунок 1- Структура гинекологической патологии у обследованных женщин**

Сравнительный анализ данных гинекологического анамнеза показал, что у женщин с HSIL по сравнению с пациентками других групп чаще встречалась сальпингофорит (таблица 12).

**ТАБЛИЦА 12 - Сравнительный анализ сопутствующей гинекологической патологии у женщин, включенных в исследование (абс, %)**

	<b>Здоровые n=30</b>	<b>LSIL n=110</b>	<b>HSIL n=30</b>	<b>Выздоровление n=41</b>	<b>Персистенция n=53</b>	<b>Прогрессирование n=16</b>	<b>Всего</b>
<b>НМЦ</b>							
Нет	29	96	29	35	46	15	154
	96,67%	87,27%	96,67%	85,37%	86,79%	93,75%	90,59%
Есть	1	14	1	6	7	1	16
	3,33%	12,73%	3,33%	14,63%	13,21%	6,25%	9,41%
	p > 0,05			p > 0,05			
<b>Миома матки</b>							
Нет	28	97	26	39	46	12	151
	93,33%	88,18%	86,67%	95,12%	86,79%	75,00%	88,82%
Есть	2	13	4	2	7	4	19
	6,67%	11,82%	13,33%	4,88%	13,21%	25,00%	11,18%
	p > 0,05			p > 0,05			
<b>Аденомиоз</b>							
Нет	29	99	28	36	48	15	156
	96,67%	90,00%	93,33%	87,80%	90,57%	93,75%	91,76%
Есть	1	11	2	5	5	1	14
	3,33%	10,00%	6,67%	12,20%	9,43%	6,25%	8,24%
	p > 0,05			p > 0,05			
<b>Гиперплазия эндометрия</b>							
Нет	30	107	29	39	52	16	166
	100,00%	97,27%	96,67%	95,12%	98,11%	100,00%	97,65%
Есть	0,00%	3	1	2	1	0	4
	0,00%	2,73%	3,33%	4,88%	1,89%	0,00%	2,35%
	p > 0,05			p > 0,05			
<b>Хронический сальпингоофорит</b>							
Нет	30	93	26	36	44	13	149
	100,00%	84,55%	86,67%	87,80%	83,02%	81,25%	87,65%

## ПРОДОЛЖЕНИЕ ТАБЛИЦЫ 12

Есть	0,00%	17	4	5	9	3	21
	<b>0,00%</b>	<b>15,45%</b>	<b>13,33%</b>	12,20%	16,98%	18,75%	12,35%
	<b>p &lt; 0,05</b>			<b>p &gt; 0,05</b>			
<b>Бесплодие</b>							
Нет	29	106	29	41	49	16	164
	96,67%	96,36%	96,67%	100,00%	92,45%	100,00%	96,47%
Есть	1	4	1	0	4	0	6
	3,33%	3,64%	3,33%	0,00%	7,55%	0,00%	3,53%
	<b>p &gt; 0,05</b>			<b>p &gt; 0,05</b>			
<b>Кисты яичников</b>							
Нет	28	104	29	38	50	16	161
	93,33%	94,55%	96,67%	92,68%	94,34%	100,00%	94,71%
Есть	2	6	1	3	3	0	9
	6,67%	5,45%	3,33%	7,32%	5,66%	0,00%	5,29%
	<b>p &gt; 0,05</b>			<b>p &gt; 0,05</b>			

В структуре экстрагенитальной патологии преобладали заболевания желудочно-кишечного тракта (гастрит, дискинезия желчевыводящих путей, ЖКБ) и варикозная болезнь (18,24% и 12,94% соответственно), но, различия по данному показателю между пациентками исследуемых групп не имели уровня статистической значимости. Также не было обнаружено взаимосвязей между заболеваниями сердечно-сосудистой, дыхательной, эндокринной систем и неопластическими изменениями шейки матки. Воспалительные заболевания мочевыделительной системы (хронический пиелонефрит, хронический цистит) и ЛОР-органов (хронический тонзиллит, хронический отит, хронический гайморит) встречались чаще в группе HSIL ( $p < 0,05$ ) (таблица 13).

**ТАБЛИЦА 13 - Структура экстрагенитальной патологии в основных клинических группах (абс, %)**

	<b>Здоровые</b>	<b>LSIL</b>	<b>HSIL</b>	<b>Всего</b>
<b>Заболевания ЖКТ</b>				
Абс.	6	20	5	31
%	20,00%	18,18%	16,67%	18,24%
<b>Хронические воспалительные заболевания органов мочевого выделения</b>				
Абс.	1	11	4	16
%	3,33%	10,00%	13,33%	9,41%
<b>Хронические воспалительные заболевания ЛОР органов</b>				
Абс.	2	9	3	14
%	6,67%	8,18%	10,00%	8,24%
<b>Аутоиммунный тиреоидит</b>				
Абс.	3	12	3	18
%	10,00%	10,91%	10,00%	10,59%
<b>Сахарный диабет</b>				
Абс.	0	3	1	4
%	0,00%	2,73%	3,33%	2,35%
<b>Эндокринные заболевания (другие)</b>				
Абс.	1	4	1	6
%	3,33%	3,64%	3,33%	3,53%
<b>Заболевания сердечно-сосудистой системы</b>				
Абс.	0	3	2	5
%	0,00%	2,73%	6,67%	2,94%
<b>Респираторные заболевания</b>				
Абс.	0	5	1	6
%	0,00%	4,55%	3,33%	3,53%
<b>Доброкачественные заболевания молочных желез</b>				
Абс.	3	8	2	13
%	10,00%	7,27%	6,67%	7,65%
<b>Варикозная болезнь</b>				
Абс.	5	14	3	22
%	16,67%	12,73%	10,00%	12,94%

### 2.1.6. Оценка статуса курильщика

Распространенность курения среди женщин в нашем исследовании была высокой. Статистический анализ приведенных в таблицах 14 и 15 данных не выявил различий по интенсивности курения сигарет среди обследованных женщин.

**ТАБЛИЦА 14 - Частота курящих женщин в основных клинических группах (абс, %)**

Показатель	Здоровые		LSIL		HSIL		Всего		P
	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	
<b>Курение</b>									
некурящие	15	50,00%	55	50,00%	8	53,33%	86	50,49%	P > 0,05
менее <10 сигарет в сутки	7	23,33%	19	17,27%	2	23,33%	33	19,41%	
10 и более сигарет в сутки	8	26,67%	36	32,73%	6	23,33%	51	30,0%	
Всего	30	17,65%	110	64,71%	30	17,65%	170	100%	

**ТАБЛИЦА 15 - Частота курящих женщин в подгруппах женщин LSIL  
(абс, %)**

Показатель	Выздоровление		Персистенция		Прогрессирование		P
	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	
<b>Курение</b>							
некурящие	21	51,22%	26	49,06%	8	50,00%	P>0,05
менее <10 сигарет в сутки	9	21,95%	8	15,09%	2	12,50%	
10 и более сигарет в сутки	11	26,83%	19	35,85%	6	37,50%	
Всего	41	37,27%	53	48,18%	16	14,55%	

## **2.2. Анализ результатов лабораторных и инструментальных методов обследования женщин**

### **2.2.1. Оценка статуса инфицирования ВПЧ**

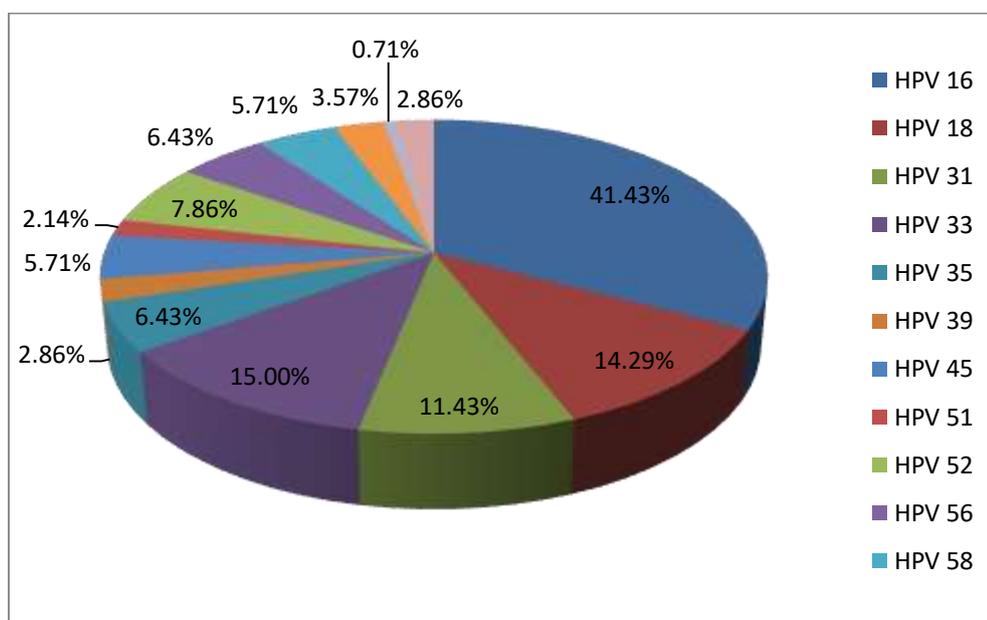
Общая распространенность ВПЧ среди женщин с патологией шейки матки составила 75,71% (106/140). Инфицированность ВПЧ была значительно выше среди женщин с поражениями тяжелой степени (93,33%), чем с LSIL (70,91%;  $p < 0,05$ ). Подгруппа прогрессирования также характеризовалась более частым выявлением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

Из всех женщин с положительным тестом на ВПЧ только 27,36 % (29/106) регулярно проходили обследование на вирус папилломы человека.

Через  $3 \pm 2,3$  года (от 1 года до 11 лет) от момента первичного инфицирования у них развилась дисплазия шейки матки легкой степени.

Корреляционный анализ показал высокозначимую положительную связь между возрастом инфицирования папилломавирусом и дебютом цервикальных неоплазий ( $r = 0,798$ ;  $p < 0,001$ ).

В исследуемой популяции женщин с цитологическими аномалиями доминирующими были ВПЧ 16 (41,43%), ВПЧ 33 (15,00%), ВПЧ 18 (14,29%) и ВПЧ 31 (11,43%) типов (рисунок 2).



**Рисунок 2 - Распространенность различных типов ВПЧ среди женщин, включенных в исследование**

Как видно из таблицы 16, эти же четыре типа наиболее часто выявлялись у женщин с тяжелыми поражениями цервикального эпителия.

**ТАБЛИЦА 16 - Распределение генотипов ВПЧ в различных патологических группах (абс, %)**

	LSIL		HSIL		LSIL-выздоровление		LSIL-персистенция		LSIL-прогрессирование	
	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%
HPV 16	39	35,45%	19	<b>63,33%</b>	6	<b>14,63%</b>	23	<b>43,40%</b>	10	<b>62,50%</b>
HPV 18	14	12,73%	6	<b>20,00%</b>	5	12,20%	4	7,55%	5	31,25%
HPV 31	11	10,00%	5	<b>16,67%</b>	1	2,44%	7	13,21%	3	18,75%
HPV 33	14	12,73%	7	<b>23,33%</b>	3	7,32%	9	16,98%	2	12,50%
HPV 35	8	7,27%	1	3,33%	4	9,76%	4	7,55%	0	0,00%
HPV 39	2	1,82%	2	6,67%	0	0,00%	2	3,77%	0	0,00%
HPV 45	7	6,36%	1	3,33%	4	9,76%	1	1,89%	2	12,50%
HPV 51	2	1,82%	1	3,33%	0	0,00%	2	3,77%	0	0,00%
HPV 52	9	8,18%	2	6,67%	3	7,32%	3	5,66%	3	18,75%
HPV 56	8	7,27%	1	3,33%	3	7,32%	5	9,43%	0	0,00%
HPV 58	5	4,55%	3	10,00%	3	7,32%	2	3,77%	0	0,00%
HPV 59	4	3,64%	1	3,33%	1	2,44%	2	3,77%	1	6,25%
HPV 66	1	0,91%	0	0,00%	0	0,00%	1	1,89%	1	6,25%
HPV 68	3	2,73%	1	3,33%	1	2,44%	1	1,89%	1	6,25%

Среди всех женщин с дисплазиями легкой степени также доминировали вышеуказанные генотипы, хотя и в меньшем процентом соотношении.

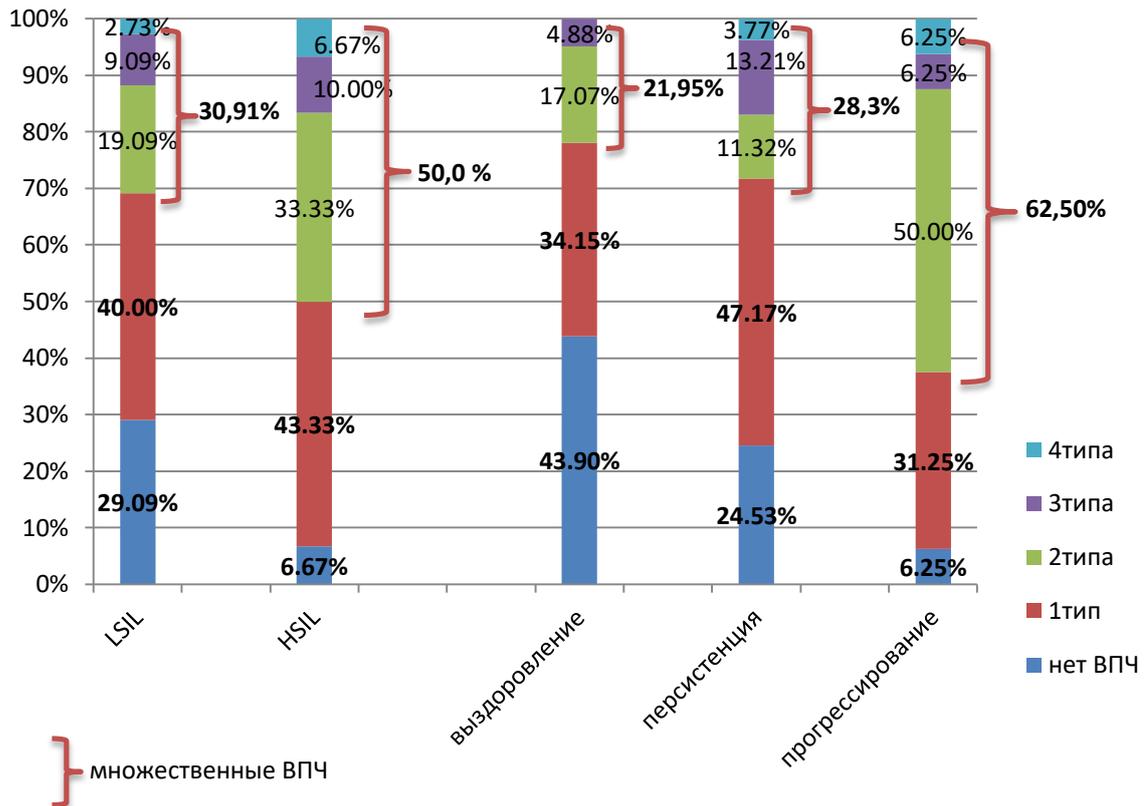
Подгруппы пациенток с LSIL отличались разнообразием папилломавирусов. Так, в подгруппе регресса преобладали ВПЧ16 (6/41; 14,63%), ВПЧ18 (5/41; 12,20%), ВПЧ 35 (4/41; 9,76%) и ВПЧ 45 (4/41; 9,76%) типов, среди персистирующих преобладали ВПЧ16 (23/53; 43,40%), ВПЧ33 (9/53; 16,98%) и ВПЧ31 (7/53; 13,21%), а в подгруппе прогрессирования - ВПЧ16 (10/16; 62,50%), ВПЧ18 (5/16; 31,25%), ВПЧ52 (3/16; 18,75%) и ВПЧ31 (3/16; 18,75%).

Но, только уровень ВПЧ 16 были значительно выше в подгруппе LSIL-прогрессирование (62,50%  $P < 0,05$ ), чем в группах LSIL-выздоровление и LSIL-персистенция (14,63% и 43,40%;  $P < 0,05$ ). Изучение связей между исходами LSIL и другими генотипами не показало значимых различий.

Анализ разнообразия вирусной ДНК показал статистически значимые различия в исследуемых группах. Так, при LSIL два и более типа ВПЧ встречались в 30,91% (34/110), при HSIL – в 50 % (15/30) случаев ( $P < 0,05$ ).

Сопоставление множественности генотипов ВПЧ с особенностями клинического течения LSIL также показало увеличение мультиинфицирования в группе прогрессированием (62,50%; 10/16) по отношению к группам персистирования (28,30%; 15/53) и выздоровления (21,95 %; 9/41) ( $P < 0,05$ ).

Но, не смотря на выраженное увеличение мультиинфекции по мере прогрессирования неопластического процесса, ни в одной из исследуемых групп пациенток с атипией цервикального эпителия инфицирование не достигло 100 % (рисунок 3).

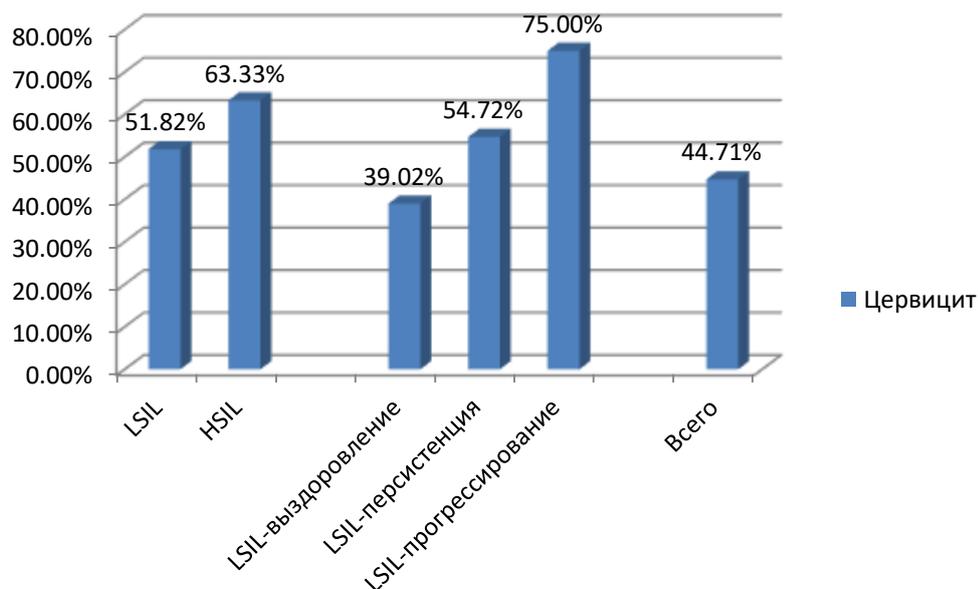


**Рисунок 3 - Сравнение инфицированности ВПЧ у женщин с SIL, (%)**

### 2.2.2. Инфекционные ко-факторы ВПЧ-инфекции

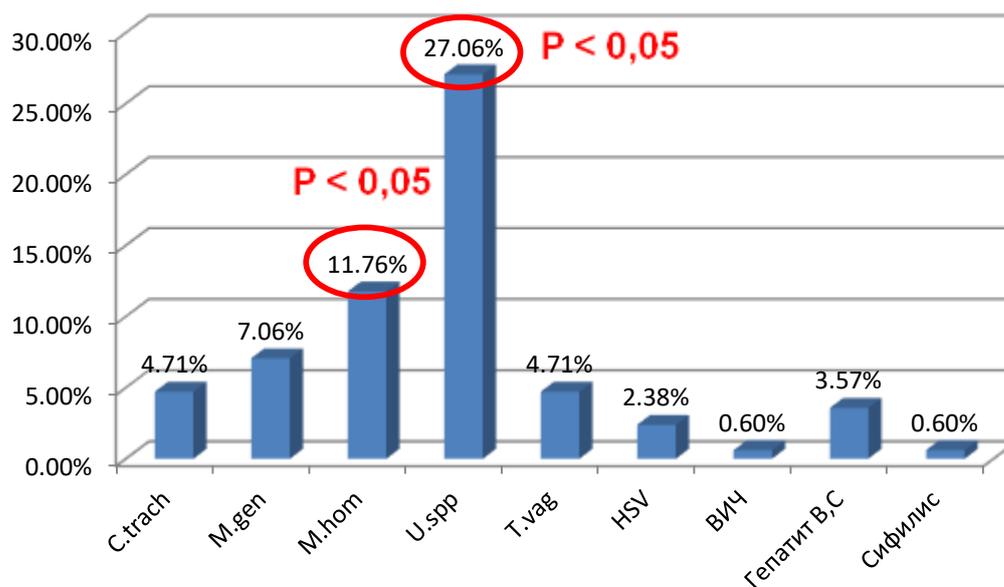
Чтобы выявить потенциальные инфекционные ко-факторы ВПЧ-инфекции, мы сравнили наличие бактериального вагиноза, цервицита и инфекций передающихся половым путем у женщин с поражениями цервикального эпителия различной степени тяжести и без них.

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).



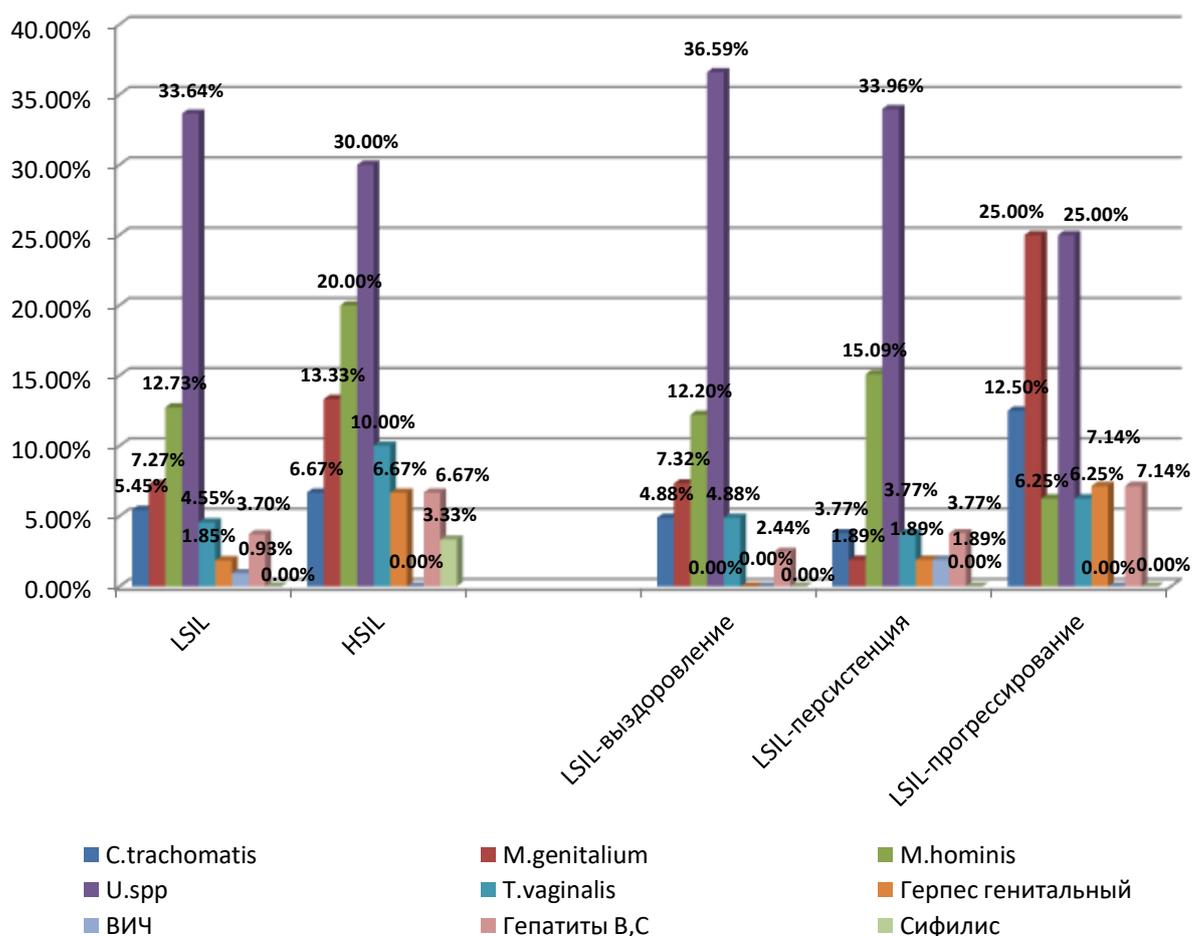
**Рисунок 4 - Частота выявления цервицита у женщин с SIL**

По данным анамнеза и представленной медицинской документации в структуре сексуально-трансмиссивных инфекций в группах пациенток с аномальными цитологическими мазками преобладала мико-уреаплазменная инфекция (*Mycoplasma hominis* 11,76% и *ureaplasma species* 27.06%), в отличие от здоровых женщин, где эти микроорганизмы обнаружены не были ( $p < 0,05$ ; рисунок 5).



**Рисунок 5 - Частота выявления сексуально-трансмиссивных инфекций среди женщин, включенных в исследование**

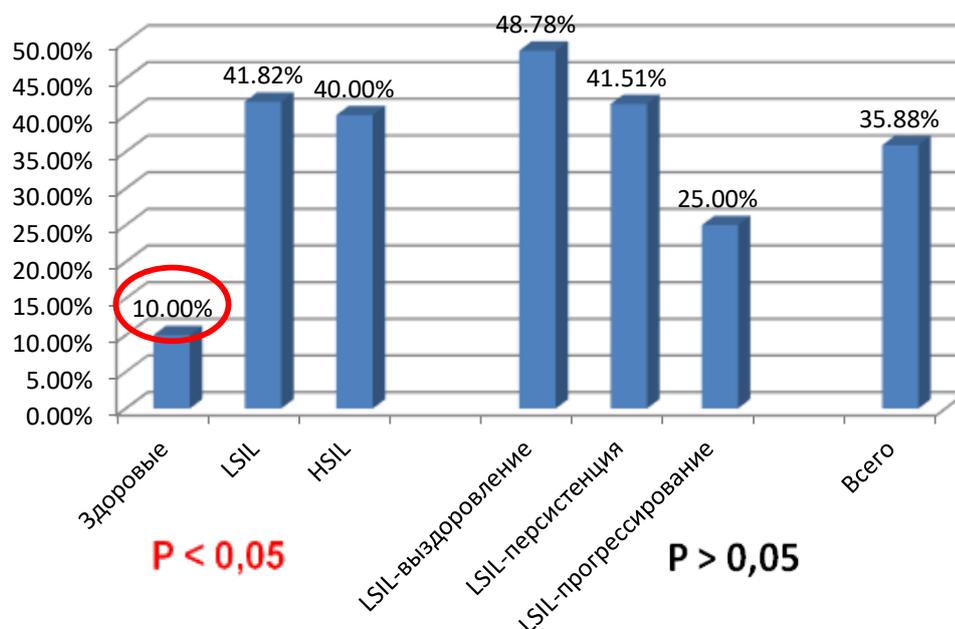
Анализ разнообразия инфекций, передающихся половым путем в зависимости от течения поражений легкой степени не выявил различий между подгруппами, за исключением *Mycoplasma genitalium*. *M. genitalium* были более распространены среди женщин LSIL-прогрессирующие ( $p < 0,05$ , рисунок 6).



**Рисунок 6 - Структура выявления инфекций, передающихся половым путем у женщин с плоскоклеточными интраэпителиальными поражениями**

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 7).

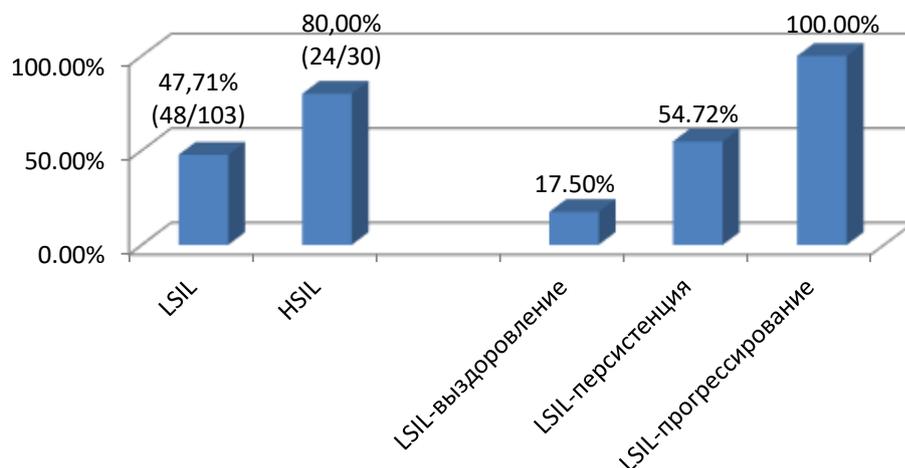


**Рисунок 7- Частота выявления бактериального вагиноза среди женщин, включенных в исследование**

### 2.2.3. Кольпоскопическое исследование пациенток

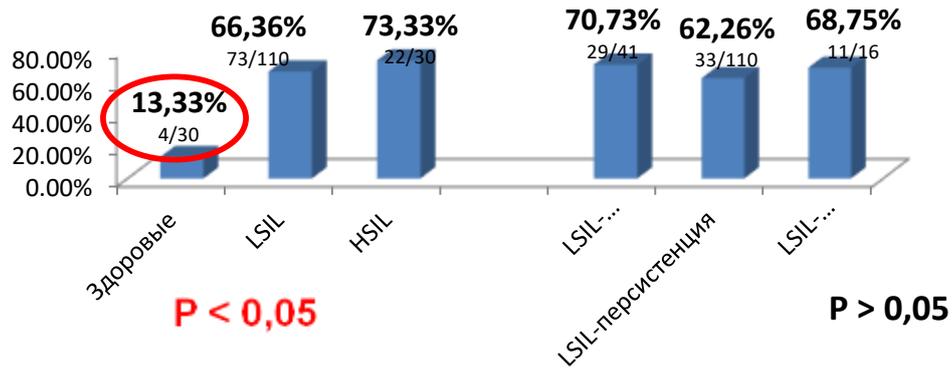
Мы проанализировали кольпоскопические данные в зависимости от тяжести цервикальной неоплазии. Аномальные кольпоскопические картины различного характера (пунктуация, мозаика, йод негативная зона, атипические сосуды) наблюдались у большинства женщин с патологическими результатами цитологического исследования (54,14%, 72/133). В группе HSIL почти в два

раза чаще регистрировалась атипические изменения эпителия, чем в группе LSIL (80%, 24/30 против 46,60%, 48/103,  $p > 0,05$ ) (рисунок 8).



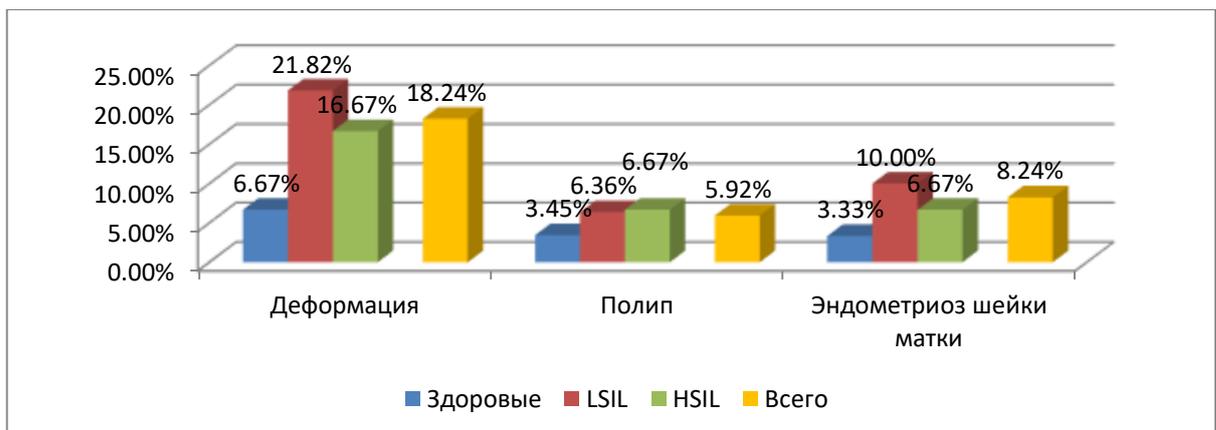
**Рисунок 8 - Частота выявления аномальной кольпоскопической картины у женщин с плоскоклеточными интраэпителиальными поражениями**

В группу здоровых включались женщины только с нормальными результатами кольпоскопии. При расширенной кольпоскопии у 66,36% (73/110) женщин с LSIL и 73,33% (22/30) с HSIL имелись признаки эктопии цервикального эпителия и лишь в 13,33% (4/30) у здоровых женщин. Во всех подгруппах женщин с LSIL с одинаковой частотой выявлялось смещение цилиндрического эпителия на экзоцервикс (рисунок 9).



**Рисунок 9 - Частота выявления эктопии шейки матки по данным кольпоскопии**

Кроме эктопии, у исследуемого контингента в 18,24% (31/170) наблюдалась рубцовая деформация шейки матки, в 5,92% (10/169) - полипы цервикального канала, в 8,24% (14/170) выявлялся эндометриоз шейки матки (рисунок 10).



**Рисунок 10 - Структура сопутствующей патологии шейки матки по данным кольпоскопии**

## **ГЛАВА 3. ИССЛЕДОВАНИЕ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ МИКРО-РНК В ЦИТОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТАХ**

### **3.1. Возможности использования микро-РНК в качестве диагностического маркера неопластических поражений шейки**

Следующей задачей исследования была оценка возможности использования анализа экспрессии микро-РНК в качестве диагностического маркера неопластических поражений шейки.

#### **3.1.1 Поиск потенциальных диагностических «маркерных» молекул, оценка диагностической ценности микроРНК**

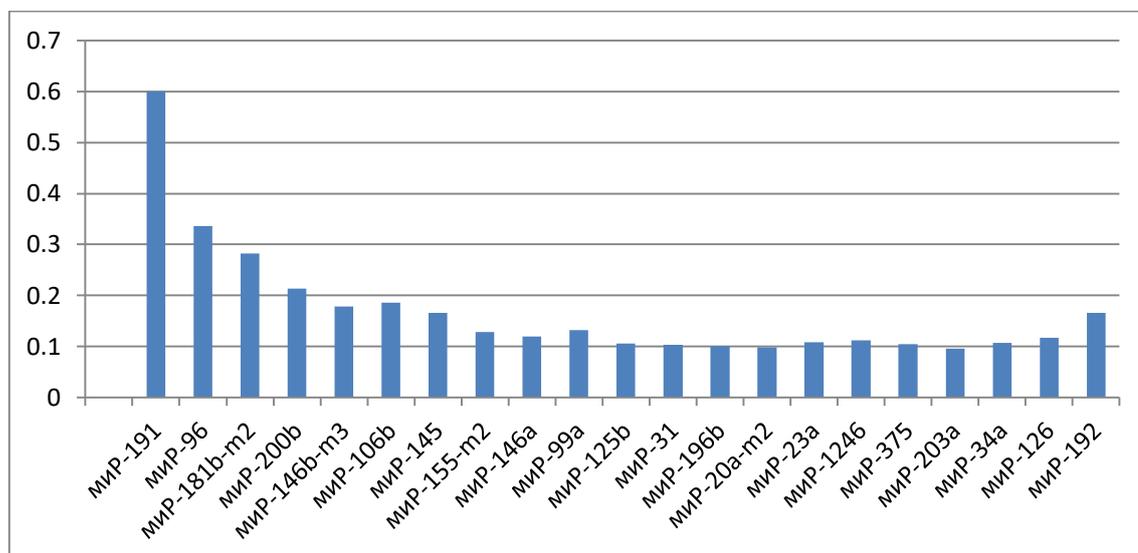
Выбор молекул – потенциальных диагностических маркеров - был сделан на основе анализа литературы (ПРИЛОЖЕНИЕ 1). Данные по структуре и номенклатуре маркерных молекул представлены в ПРИЛОЖЕНИИ 2.

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.

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. Абсолютный уровень экспрессии микро-РНК в различных группах представлен в ПРИЛОЖЕНИЕ 3.

Нормализация полученных абсолютных данных проводилась по формуле  $\Delta Ct = 2^{(Ct_{\text{microRNA}} - Ct_{\text{norm}})}$ . В качестве нормализатора использовалось среднее значение  $Ct$  трех молекул: микро-РНК 191, микро-РНК 181b и микро-РНК 96. Выбор этих трех молекул проводился с помощью алгоритма geNorm, где

оценивались индивидуальная экспрессионная изменчивость и ранжирование всех микро-РНК, включенных в анализ (рисунок 11).



**Рисунок 11 - Ранжирование микроРНК с помощью алгоритма geNorm**

Далее в группах NILM, L-SIL, H-SIL и CC рассчитывались средние значения нормализованных результатов по каждой микро-РНК. Статистическая обработка полученных данных проводилась с помощью рангового дисперсионного анализ Краскела-Уоллиса. Нормализованные данные представлены в таблице 17.

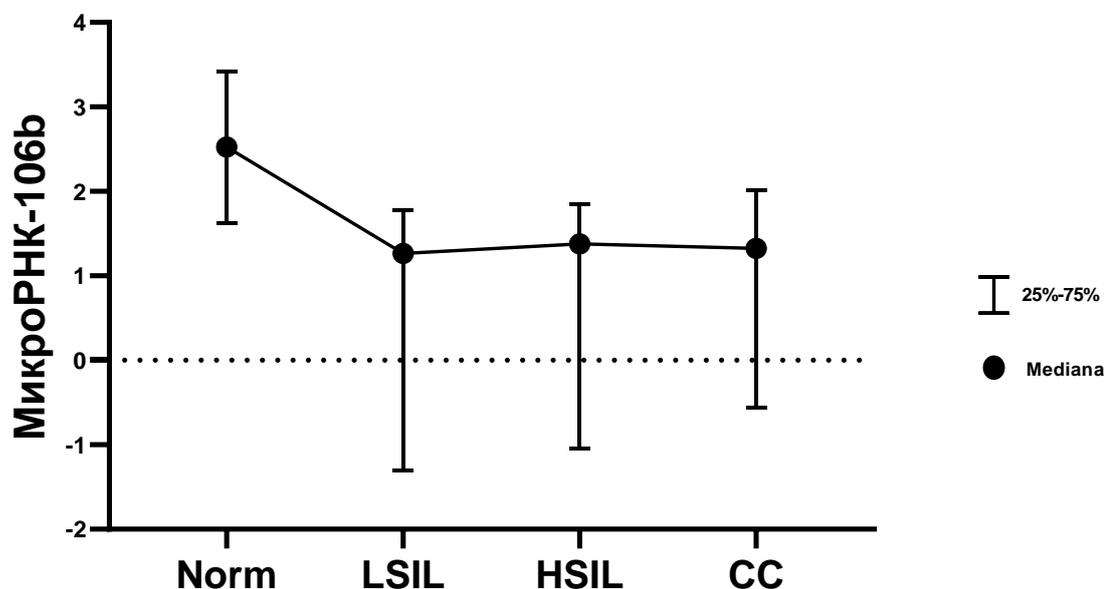
**ТАБЛИЦА 17 - Уровень экспрессии в зависимости от диагноза  
(Me [25%;75%])**

микроРНК	Диагноз				Ранговый дисперсионный анализ по Краскелу-Уоллису
	Норма	LSIL	HSIL	Рак	P
<b>микроРНК-106b</b>	<b>1,33</b> [0,01; 2,01]	<b>1,26</b> [-1,28; 1,77]	<b>1,38</b> [-1,03; 1,79]	<b>2,53</b> [1,66; 3,19]	<b>0,0014</b>
микроРНК-1246	3,18 [0,00; 5,44]	3,37 [1,05; 8,62]	4,71 [1,29; 7,91]	3,62 [1,79; 11,54]	0,67
микроРНК-125b	1,50 [-1,07; 1,98]	-0,01 [-2,19; 1,42]	1,15 [-1,29; 1,83]	-1,67 [-3,33; -1,09]	0,0008
<b>микроРНК-126</b>	<b>-16,67</b> [-73,37; -8,70]	<b>-8,99</b> [-34,91; -2,74]	<b>-8,79</b> [-38,39; -4,16]	<b>-3,29</b> [-7,54; -1,51]	<b>0,0026</b>
<b>микроРНК-145</b>	<b>-15,54</b> [-28,37; -7,63]	<b>-13,26</b> [-23,51; -7,89]	<b>-25,79</b> [-36,56; -16,07]	<b>-42,40</b> [-62,95; -26,64]	<b>&lt; 0,0001</b>
микроРНК-146a	-1,58 [-2,69; -1,23]	-3,08 [-5,80; -1,74]	-2,81 [-4,34; -1,89]	-3,49 [-5,58; -1,96]	0,020
микроРНК-146b	-1,75 [-2,43; -1,35]	-1,83 [-3,09; -1,47]	-2,22 [-2,97; -1,99]	-2,07 [-3,39; -1,45]	0,20
микроРНК-155	-8,15 [-16,35; -4,55]	-11,84 [-16,60; -5,54]	-10,05 [-17,23; -6,28]	-9,03 [-14,01; -3,28]	0,32
микроРНК-192	-4,08 [-8,37; 1,65]	11,62 [2,32; 82,53]	-4,66 [-11,85; 17,78]	-10,10 [-18,01; -4,20]	< 0,0001
<b>микроРНК-196b</b>	<b>-20,55</b> [-33,90; -10,65]	<b>-15,95</b> [-25,03; -9,05]	<b>-12,35</b> [-21,97; -6,41]	<b>-8,27</b> [-11,94; -5,81]	<b>0,012</b>
микроРНК-200b	6,34 [4,16; 8,29]	4,81 [3,00; 7,36]	5,59 [4,55; 7,59]	3,08 [1,69; 4,21]	0,0006
микроРНК-203a	1,36 [-3,14; 4,24]	1,40 [-2,01; 3,80]	-1,25 [-2,85; 2,40]	-1,36 [-7,16; 1,83]	0,19
<b>микроРНК-20a</b>	<b>3,84</b> [2,46; 5,42]	<b>4,95</b> [3,46; 6,27]	<b>5,55</b> [2,99; 7,99]	<b>10,39</b> [7,00; 16,24]	<b>&lt; 0,0001</b>
микроРНК-31	-2,06 [-3,00; -1,28]	-2,05 [-2,59; -1,57]	-1,40 [-2,63; 1,02]	-2,99 [-5,00; -1,60]	0,031
микроРНК-34a	-7,33 [-9,93; -4,54]	-4,93 [-7,32; -3,74]	-2,64 [-3,50; -2,18]	-6,17 [-11,44; -2,98]	0,0004
<b>микроРНК-375</b>	<b>4,30</b> [3,77; 5,98]	<b>3,44</b> [2,02; 4,99]	<b>1,64</b> [1,02; 3,41]	<b>-2,55</b> [-6,74; 1,18]	<b>&lt; 0,0001</b>
микроРНК-99a	-1,87 [-2,97; 0,02]	-1,54 [-2,83; 1,24]	-1,51 [-1,92; -1,10]	-1,86 [-4,62; -1,27]	0,22
микроРНК-23a	2,22 [1,60; 3,26]	2,77 [2,22; 4,63]	3,22 [2,30; 4,63]	1,74 [-1,30; 3,00]	0,015

Анализ экспрессии микро-РНК 1246, микроРНК-146b, микроРНК-155, микроРНК-203а, микроРНК-99а не показал различий между группами.

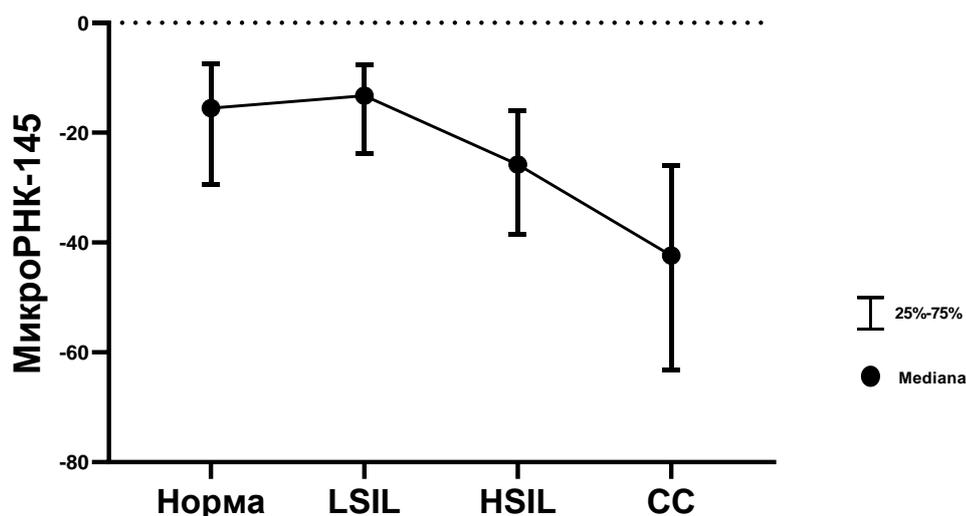
В отношении микро-РНК 125b, микроРНК-146а, микроРНК-192, микроРНК 200b, микро-РНК 34а, микро-РНК 23а, микро-РНК 31 были обнаружены статистически значимые изменения уровня экспрессии. Но, не было выявлено четких закономерностей этих изменений. Так, экспрессионная активность микро-РНК 192 увеличивалась от нормы к LSIL, но вновь уменьшалась к HSIL и раку. Экспрессия микро-РНК 23а повышалась от нормы к HSIL, и снижался при раке. Уровень микро-РНК 125b, микро-РНК 146а, микро-РНК 200b, микро-РНК 34а и микро-РНК 31 демонстрировал попеременное снижение и увеличение от группы к группе.

Активность микро-РНК 106b практически не отличалась в группах NILM и LSIL и плавно увеличивалась к HSIL и CC ( $p < 0,05$ , рисунок 12).



**Рисунок 12 - Уровень экспрессии микроРНК-106b в зависимости от стадии поражения цервикального эпителия**

Экспрессия микроРНК-145 также не показала значимых отличий между группами нормы и LSIL, но резко снижалась при тяжелых поражениях шейки матки ( $p < 0,001$ ) (рисунок 13).



**Рисунок 13 - Уровень экспрессии микроРНК-145 в зависимости от стадии поражения цервикального эпителия**

Только при оценке 4 молекул из 18 было показано прогрессивное изменение активности по мере возрастания степени тяжести неопластического процесса: усиление экспрессии микроРНК-126 (рисунок 14), микроРНК-20a (рисунок 15) и микроРНК-196 (рисунок 16) и снижением экспрессии микроРНК-375 (рисунок 17) ( $p < 0,05$ ).

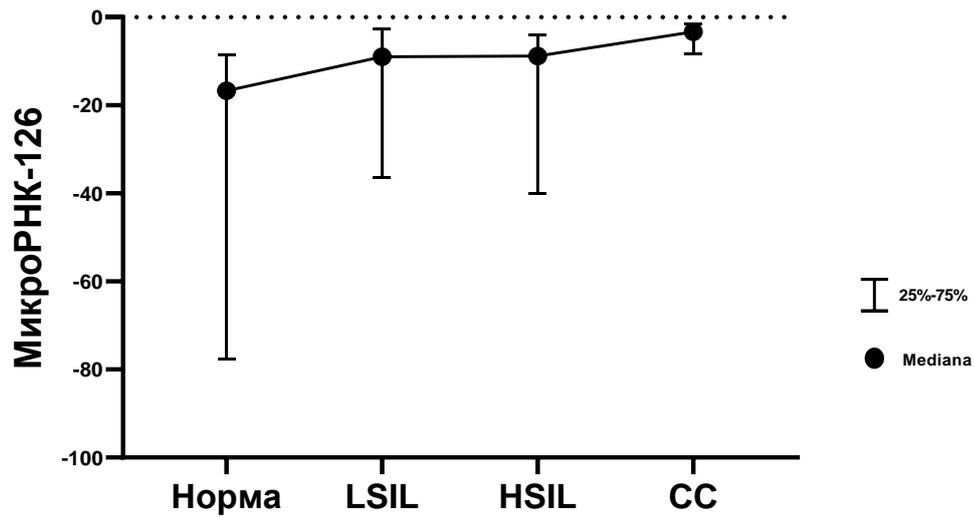


Рисунок 14 - Уровень экспрессии микроРНК-126 в зависимости от стадии поражения цервикального эпителия

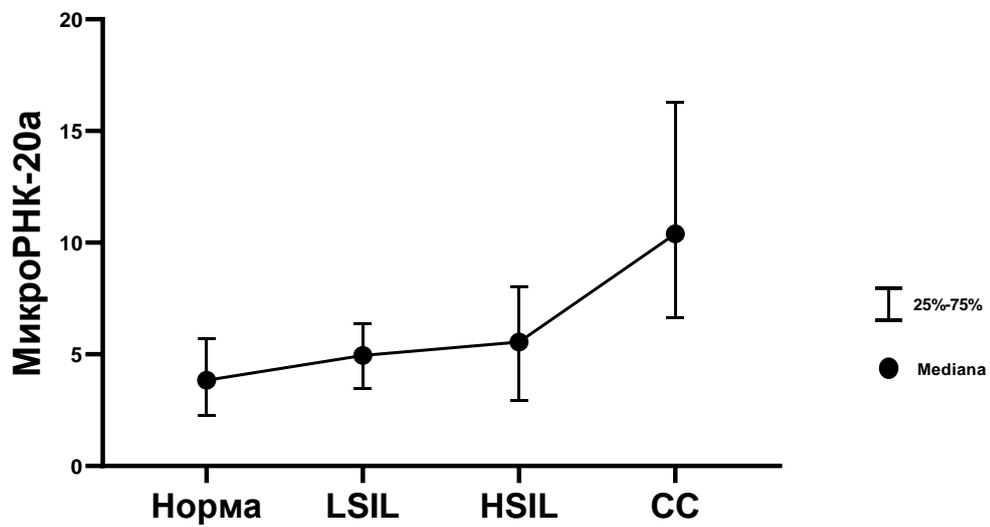


Рисунок 15 - Уровень экспрессии микроРНК- 20a в зависимости от стадии поражения цервикального эпителия

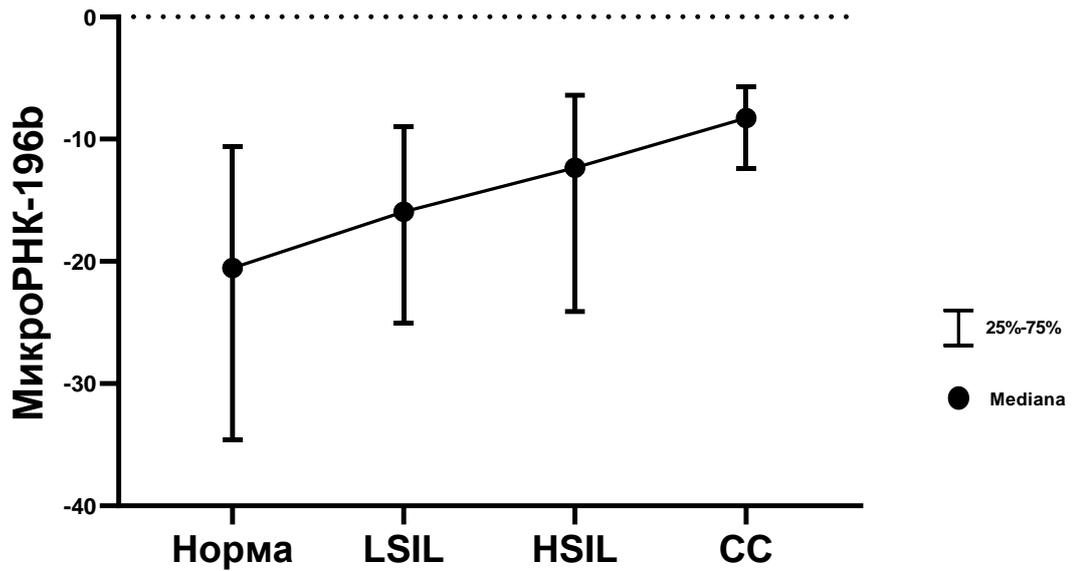


Рисунок 16 - Уровень экспрессии микроРНК-196b в зависимости от стадии поражения цервикального эпителия

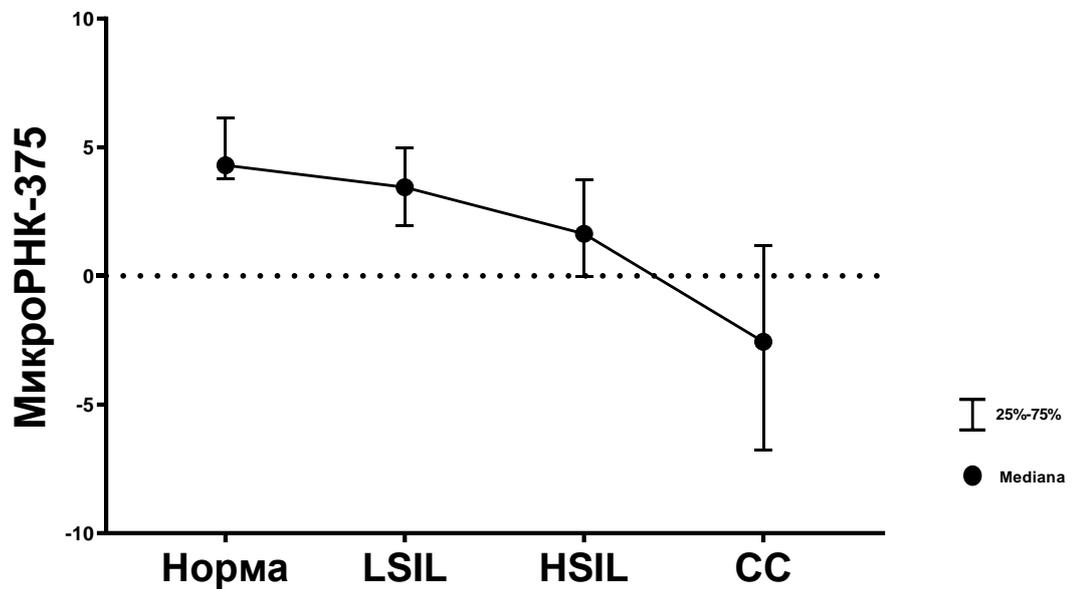


Рисунок 17 - Уровень экспрессии микроРНК-375 в зависимости от стадии поражения цервикального эпителия

Таким образом, степень тяжести неопластического поражения шейки матки сопровождается повышением экспрессионной активности микроРНК-20а, микроРНК-106, микроРНК-126 и микроРНК-196 и снижением микроРНК-375 и микроРНК-145.

Но, переменный характер их экспрессионной активности, трудоемкий процесс нормализации полученных абсолютных значений затрудняет их использование в качестве диагностических маркеров.

### **3.1.2. Применение метода «реципрокных пар» для диагностики цервикальных неоплазий**

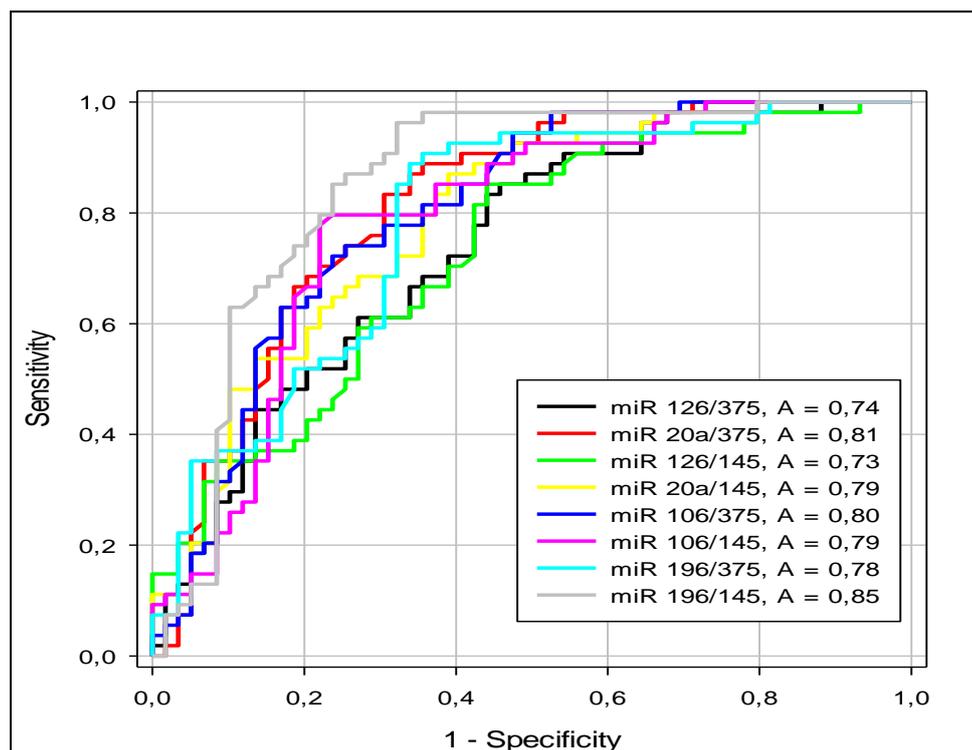
Отсутствие надежных референтных микро-РНК, которые могут быть использованы для нормализации результатов ПЦР-анализа микро-РНК, является известной проблемой.

В исследовании, описанном в первой части этого раздела, поиск референтных молекул проводился с помощью алгоритма geNorm. В случае изучения большого объема микро-РНК возможно использование усредненного (глобального) значения  $C_t$  нескольких измерений в качестве нормализатора. Однако эти подходы вряд ли применимы для небольших наборов данных, которые предназначены для реализации в качестве диагностических тестов в клинической практике.

В качестве альтернативного способа анализа данных экспрессии микро-РНК мы попытались использовать метод "реципрокных пар". Две микро-РНК, одна из которых имела постепенное увеличение, а другая - уменьшение экспрессии составляли "реципрокную пару".

Поиск таких пар осуществлялся путем тестирования всевозможных комбинаций шести дисрегулированных микро-РНК (микроРНК-20а, микроРНК-196, микроРНК-106, микроРНК-126, микроРНК-375 и микроРНК-145). Соотношение концентрации двух молекул с противоположной (реципрокной) активностью рассчитывалось по формуле  $Ratio =$

$2^{Ct(miR-A)-Ct(miR-B)}$ . Полученные таким методом значения применялись в качестве диагностического маркера для дифференцировки образцов HSIL/инвазивный рак от LSIL/здоровые. Оценка диагностического потенциала конкретных пар проводилась путем построения ROC-кривой (рисунок 18).



**Рисунок 18 - ROC-кривая анализа «реципрокных пар» микроРНК в группах NILM/LSIL и HSIL/CC**

Результаты исследования показали высокую диагностическую значимость трех пар микро РНК: микроРНК-20a / микроРНК-375, микроРНК-106/ микроРНК-375 и микроРНК-196/ микроРНК-145 (таблица 18).

**ТАБЛИЦА 18 - Показатели диагностической значимости расчетных показателей соотношений концентраций "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]

Таким образом, учитывая высокую диагностическую ценность, реципрокно-дисрегулированные пары микроРНК-20a / микроРНК-375, микроРНК-106/ микроРНК-375 и микроРНК-196/ микроРНК-145 могут быть использованы в качестве диагностического маркера неопластических поражений шейки.

### **3.2. Определение прогностической ценности микро-РНК при поражениях шейки матки легкой степени**

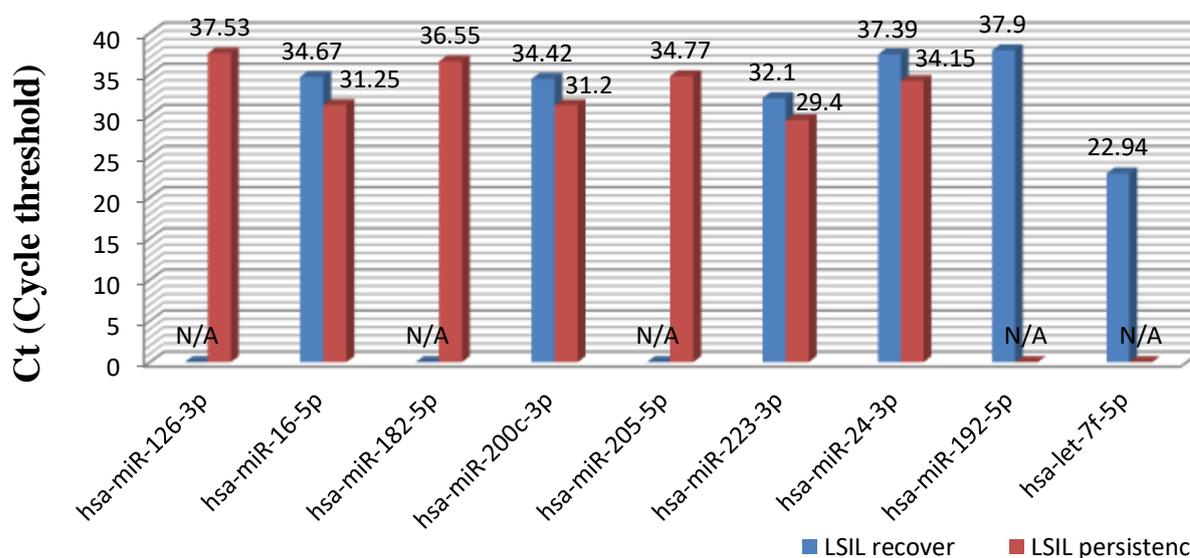
На следующем этапе изучался профиль микро-РНК в цервикальном эпителии женщин с различным течением поражений легкой степени.

### 3.2.1. Поиск потенциальных прогностических микроРНК-маркеров

Выбор кандидатов на роль «прогностических» маркеров проводился на основе «профайлинга» 85 микро-РНК в материале ограниченной группы пациенток, а также данных литературы.

На первом этапе образцы выделенной РНК, полученные от 20 женщин с плоскоклеточными поражениями легкой степени (LSIL), в эквивалентных количествах были объединены в два пула: LSIL-персистенция (n=10) и LSIL - выздоровление (n= 10) в зависимости от данных повторного цитологического исследования.

Анализ результатов микро-РНК «профайлинга» был проведен путем простого сравнения значений Ct, полученных при анализе «пулов» РНК. Из 85 молекул для 9 микроРНК была показана отчетливая разница (рисунок 19).

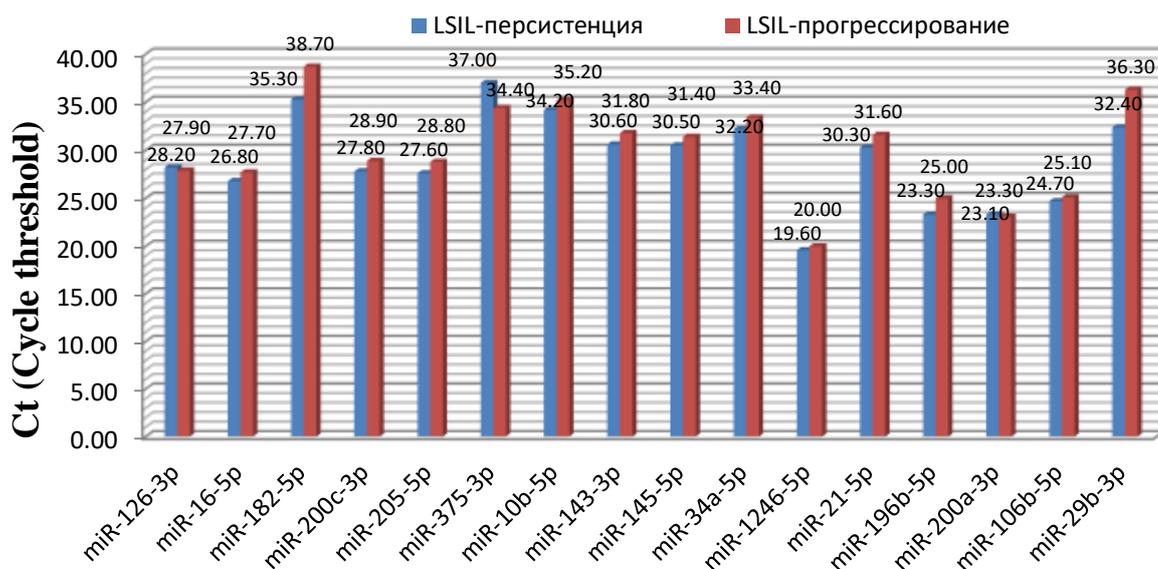


**Рисунок 19 - Результаты «профайлинга» микроРНК в «пулах» LSIL-персистенция и LSIL – выздоровление**

В группе образцов, полученных от женщин с персистирующими поражениями легкой степени, наблюдалась повышенная экспрессия молекул микро-РНК 16-5р, микро-РНК 24-3р, микро-РНК 126-3р, микро-РНК 182-5р, микро-РНК 200с-3р, микро-РНК 205-5р, микро-РНК 223-3р по сравнению со случаями регресса аномалий цервикального эпителия. Для микро-РНК let-7f-5р и микро-РНК 192-5р была характерна противоположная картина.

На следующем этапе был проведен «профайлинг» 85 микро-РНК в образцах, выделенных из материала пациенток других двух групп: LSIL-персистенции и LSIL-прогрессирования.

Наибольшая разница экспрессионной активности в «пулах» LSIL-персистенции и LSIL-прогрессирования было выявлена для 16 молекул микро-РНК: микроРНК- 10b, микроРНК- 16, микроРНК- 21, микроРНК- 29b, микроРНК- 34a, микроРНК- 106b, микроРНК-126, микроРНК- 143, микроРНК- 145, микроРНК- 182, микроРНК- 196, микроРНК- 375, микроРНК- 200a, микроРНК- 200с, микроРНК- 205, микроРНК- 1246 (рисунок 20).



**Рисунок 20 - Результаты «профайлинга» микроРНК в «пулах» LSIL-персистенция и LSIL-прогрессирования**

В заключение, был проведен анализ литературных данных с целью изучения причастности этих молекул в развитии неопластических заболеваний шейки матки.

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- 200с, miR- 205, miR- 375, miR- 10b, miR- 143, miR- 145, miR- 34a, miR- 1246, miR- 21, miR- 196, miR- 200a, miR- 106b, miR- 29b). Данные по структуре, номенклатуре и ссылки на цитируемые источники представлены в ПРИЛОЖЕНИИ 2.

### **3.2.2. Определение молекул микроРНК, изменение экспрессии которых коррелирует с прогнозом течения заболевания.**

Уровни экспрессии шестнадцати микро-РНК (микроРНК-126, микроРНК- 16, микроРНК- 182, микроРНК- 200с, микроРНК- 205, микроРНК- 375, микроРНК- 10b, микроРНК- 143, микроРНК- 145, микроРНК- 34a, микроРНК- 1246, микроРНК- 21, микроРНК- 196, микроРНК- 200a, микроРНК- 106b, микроРНК- 29b) были проанализированы в 20 образцах РНК, выделенных из эпителия выздоровевших женщин, в 24 образцах женщин с персистенцией атипии цервикального эпителия в процессе динамического наблюдения, и в 12 образцах женщин с прогрессированием поражения.

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. Профиль экспрессии микро-РНК в различных подгруппах представлен в таблице... (ПРИЛОЖЕНИЕ 4)

Полученные абсолютные данные были нормализованы относительно среднего значения  $C_t$  (концентрации) для каждой подгруппы. Далее в каждой исследуемой подгруппе рассчитывались средние значения нормализованных

результатов для каждой молекулы микро-РНК. Результаты, полученные нормализацией к среднему значению Ct, представлены в таблице 19.

Статистическая обработка результатов между тремя подгруппами проводилась методом Краскела — Уоллиса (Kruskal-Wallis), а попарно между подгруппами LSIL-выздоровление / LSIL-персистенция и LSIL-персистенция/LSIL-прогрессирование с помощью критерия Манна-Уитни (Mann-Whitney U-test).

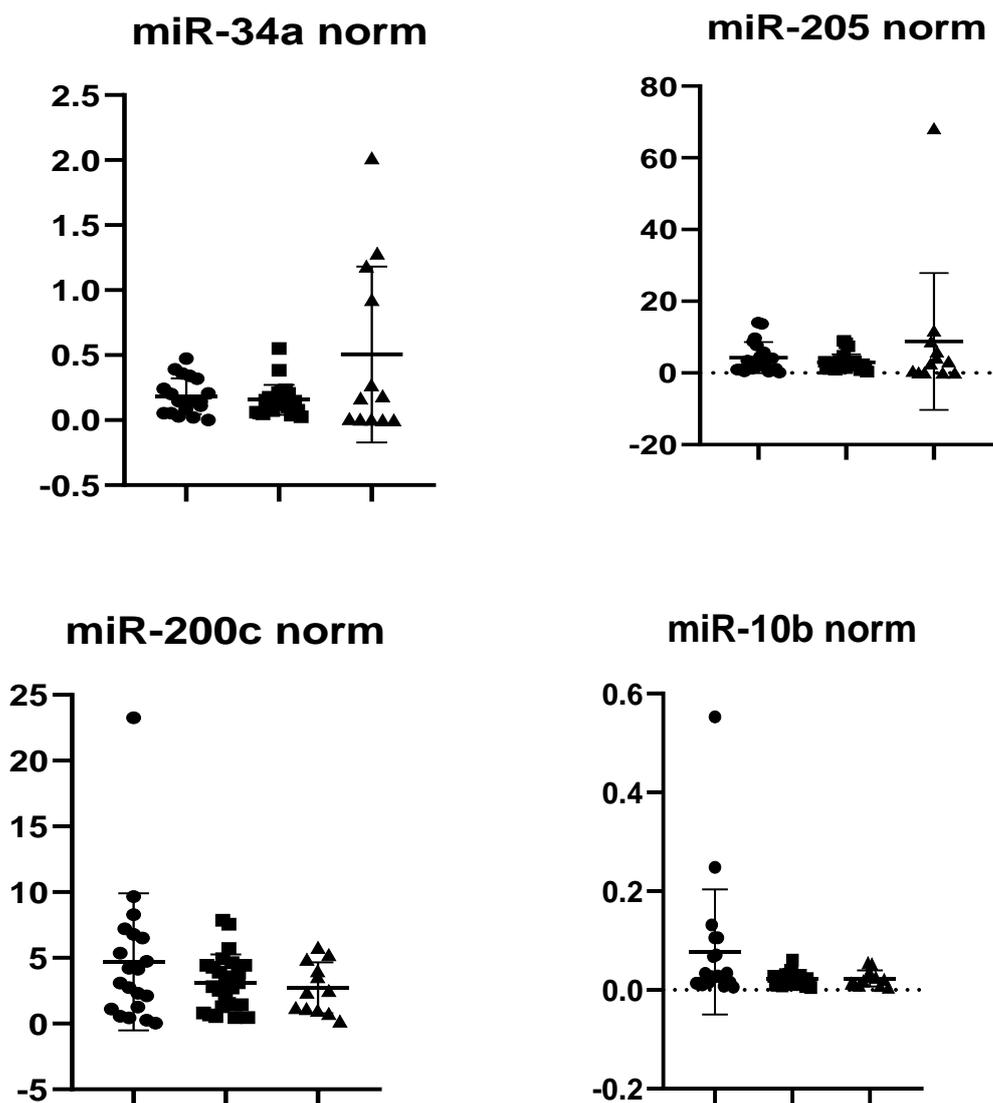
**ТАБЛИЦА 19 - Уровень экспрессии микроРНК в подгруппах с различным течением LSIL (Me [25%;75%])**

Микро РНК	Относительный уровень экспрессии			Mann Whitne y	Mann Whitne y	Krusk al-Wallis
	выздоров ление	персистенц ия	прогрессиров ание	P <sub>1-2</sub>	P <sub>2-3</sub>	
<b>miR-126</b>	<b>2,82</b> [1,92; 6,82]	<b>1,5</b> [0,94; 2,39]	<b>3,36</b> [1,48; 13,99]	<b>0,003</b>	<b>0,09</b>	<b>0,01</b>
<b>miR-16</b>	11,35 [4,13; 39,19]	11,74 [3,75; 22,14]	13,28 [0,14; 27,45]	0,30	0,83	0,56
<b>miR-182</b>	0,01 [0,004; 0,01]	<b>0,01</b> [0,004; 0,01 ]	<b>0,003</b> [0,003; 0,004 ]	0,49	<b>0,0004</b>	0,002
<b>miR-200c</b>	3,6 [1,2; 6,7]	2,97 [1,3 ;4,4 ]	2,4 [1,04; 4,67]	0,57	0,63	0,61
<b>miR-205</b>	2,5 [1,03; 7,20]	2,4 [1,50; 3,20 ]	2,9 [0,10; 8,08]	0,75	0,98	0,9
<b>miR-375</b>	0,006 [0,001; 0,015]	<b>0,004</b> [0,0013; 0,008]	<b>0,026</b> [0,005; 0,07 ]	0,7	<b>0,047</b>	0,1
<b>miR-10b</b>	0,03 [0,01; 0,1]	0,02 [0,01; 0,03 ]	0,02 [0,01; 0,03]	0,08	0,93	0,14
<b>miR-145</b>	0,4761 [0,3261; 0,7031]	0,56 [0,29; 1,56 ]	0,325 [0,04; 1,02]	0,31	0,31	0,49

ПРОДОЛЖЕНИЕ ТАБЛИЦЫ 19

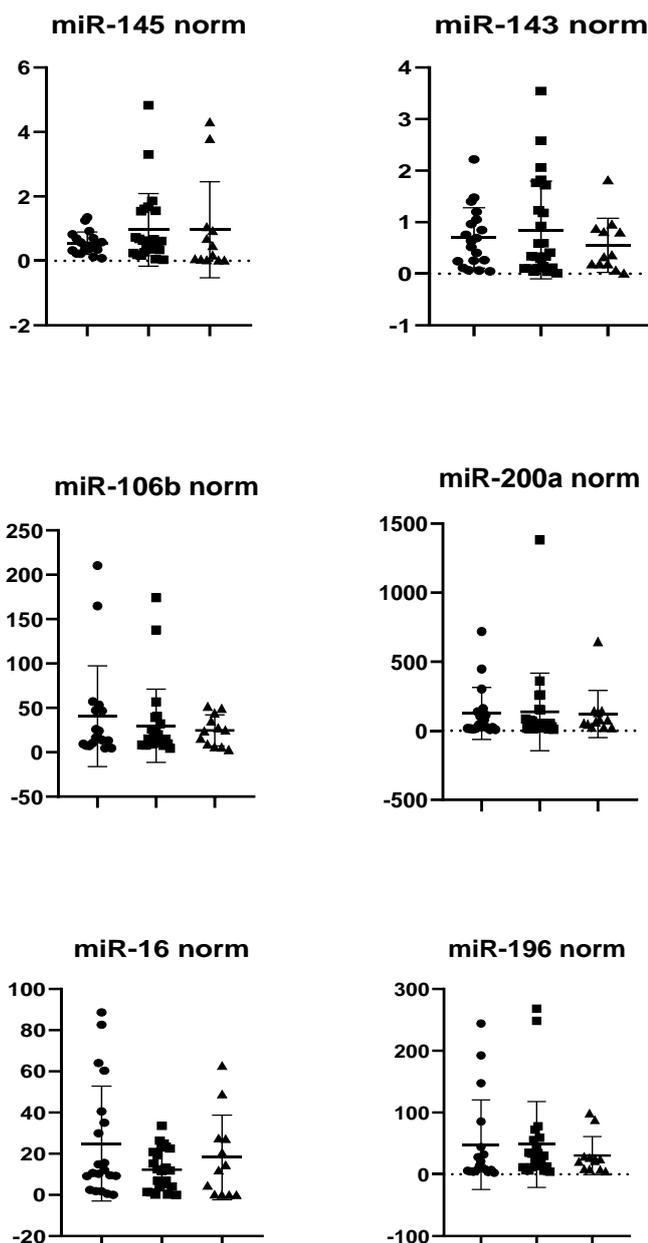
<b>miR-34a</b>	0,146 [0,055;0,318 ]	0,142 [0,073; 0,198 ]	0,178 [0,006; 1,1 ]	0,73	0,78	0,91
<b>miR- 21</b>	0,24 [0,17; 0,34 ]	<b>0,27</b> [0,17; 0,60]	<b>0,74</b> [0,11; 1,23 ]	0,6	<b>0,0366</b>	0,26
<b>miR-196</b>	12,51 [5,498;54,49]	26,45 [11,59; 55,41 ]	23,16 [8,4; 28,35 ]	0,25	0,57	0,46
<b>miR-200a</b>	34,83 [16,6;143,5 ]	50,17 [23,51; 136,4 ]	70,83 [31,92; 139,5]	0,7	0,4	0,56
<b>miR-106b</b>	16,1 [8,85; 48,66]	14,48 [9,336; 30,74 ]	24,4 [6,933; 41,82]	0,7	0,78	0,89
<b>miR-29b</b>	<b>0,018</b> [0,01;0,032 ]	<b>0,031</b> [0,022; 0,058 ]	0,026 [0,001; 0,067 ]	<b>0,05</b>	0,43	0,18
<b>miR-1246</b>	<b>1322</b> [472,8;2851]	<b>635,5</b> [396,4; 1214 ]	<b>1452</b> [801,1; 1940]	<b>0,06</b>	<b>0,048</b>	0,07
<b>miR-143</b>	0,64 [0,24; 1,05 ]	0,38 [0,11; 1,6]	0,35 [0,19; 0,86]	0,95	0,63	0,79

Как видно из рисунка 21, уровень экспрессии микроРНК-200с и микроРНК-205 отличался относительно высокой стабильностью во всех образцах, а микроРНК-10b, микроРНК-34а в двух из трех исследуемых групп, и не коррелировал с прогнозом течения поражений легкой степени.



**Рисунок 21 - Экспрессия микроРНК-205, микроРНК-200с, микроРНК-34а, микроРНК-10b**

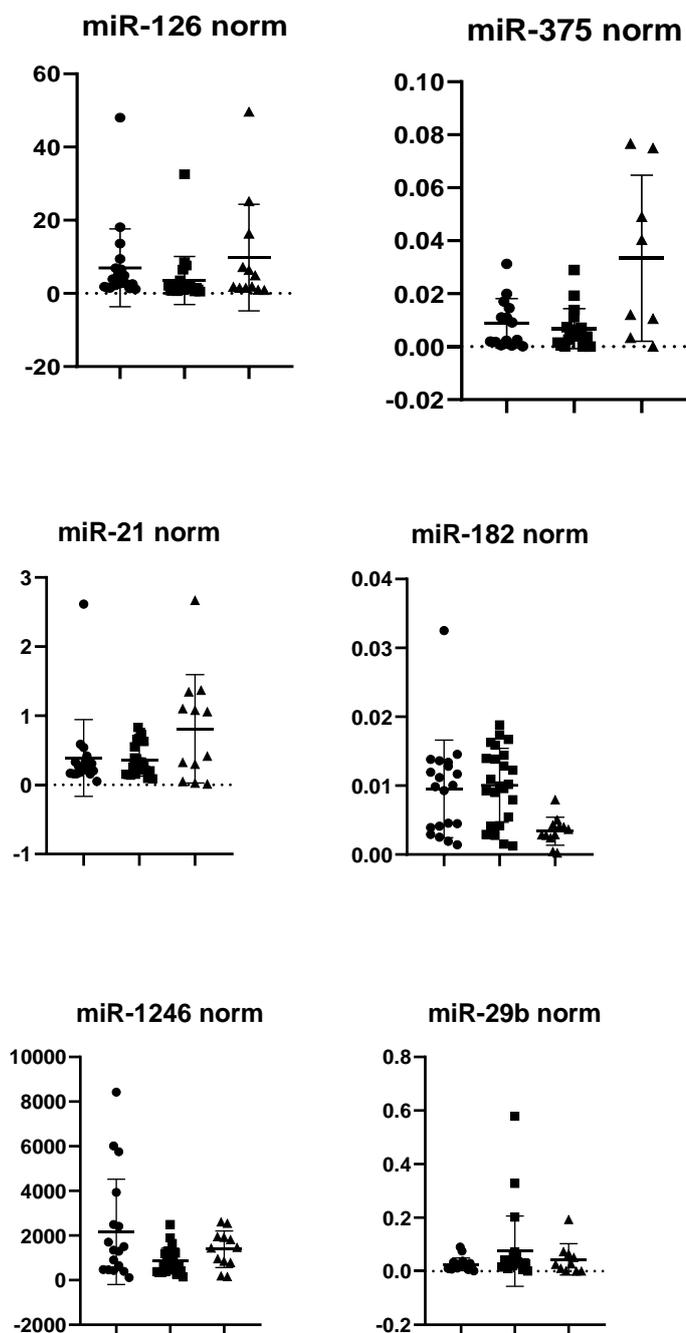
Экспрессионная активность молекул микроРНК-16, микроРНК-106b, микроРНК-145, микроРНК-196, микроРНК-200а, микроРНК-143 варьировала в относительно широком диапазоне значений, но сравнение подгрупп LSIL не выявило разницы или она была статистически не значима (рисунок 22)



**Рисунок 22 - Экспрессия микроРНК-145, микроРНК-143, микроРНК-106b, микроРНК-200a, микроРНК -16, микроРНК – 196**

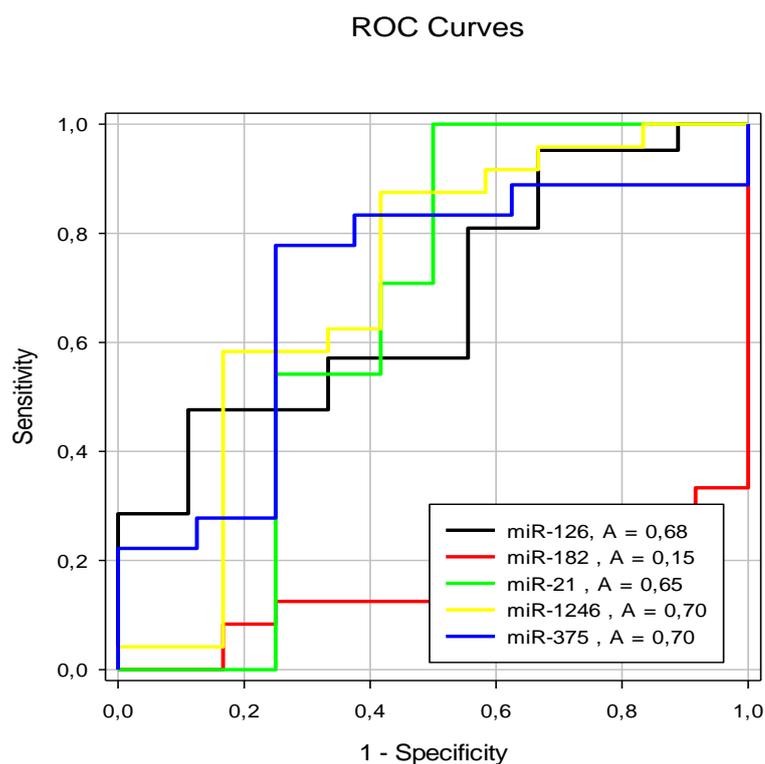
Для нескольких молекул были выявлены статистически значимые отличия уровней экспрессии (таблица 22). Так, при прогрессировании неопластического поражения отмечалось увеличение экспрессионной активности микроРНК-126, микроРНК-375, микроРНК-21, микроРНК-1246,

снижение микроРНК-182; при выздоровлении: снижение экспрессии микроРНК-126, микроРНК-29b и увеличение микроРНК-1246 (рисунок 23).



**Рисунок 23 - Экспрессия микроРНК-126, микроРНК-375, микроРНК-21, микроРНК-182, микроРНК -1246, микроРНК – 29b**

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 (рисунок 24).

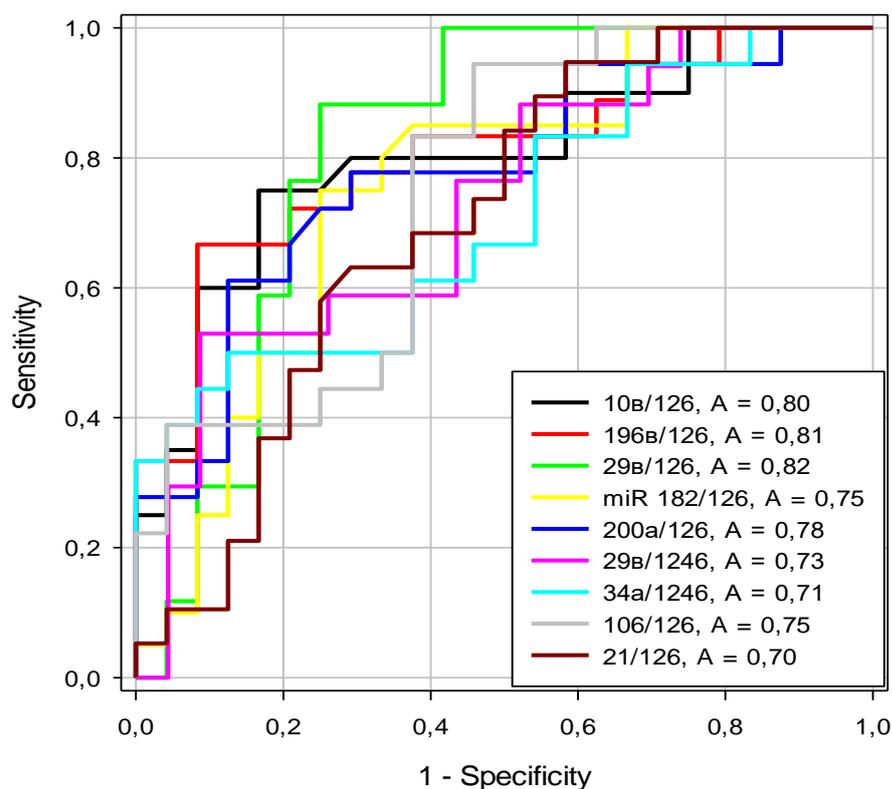


**Рисунок 24 - ROC-кривая анализа пяти микро-РНК: микроРНК-126, микроРНК-182, микроРНК-21, микроРНК-375, микроРНК-1246**

Учитывая низкий прогностический потенциал анализа единичных микро-РНК, был необходим поиск новых, более эффективных маркеров прогнозирования цервикальных неоплазий.

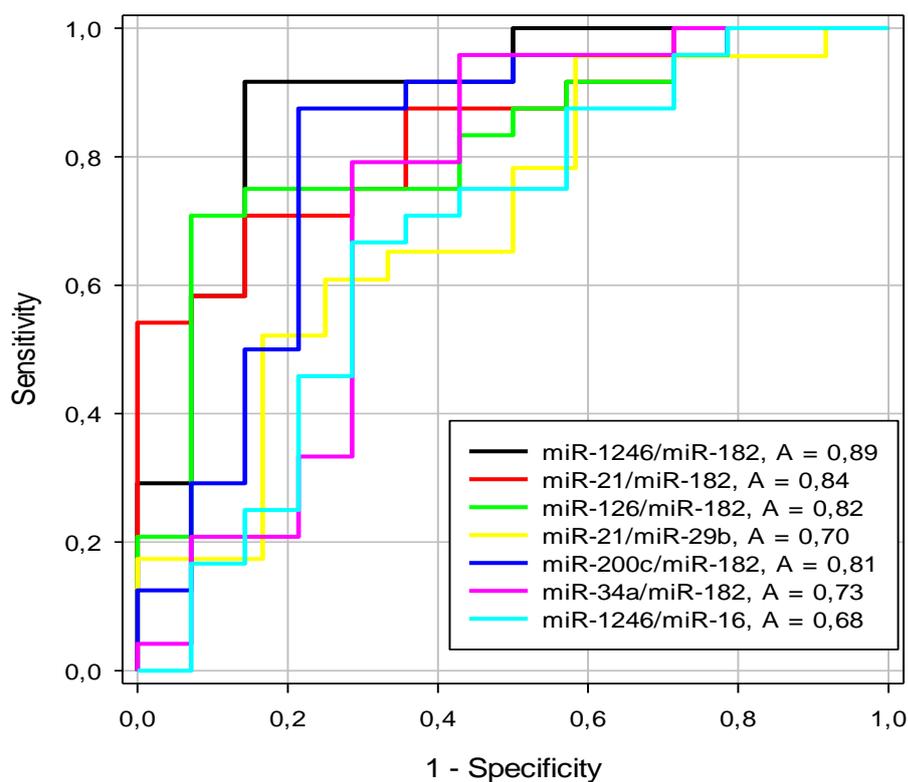
### 3.2.3 Применения метода «реципрокных пар» для прогноза течения поражений легкой степени

Для повышения прогностической значимости молекул микро-РНК было решено применить метод «реципрокных пар», описанный в разделе 3.1.2. Оценка прогностического потенциала конкретных пар проводилась путем построения ROC-кривой с попарным сравнением подгрупп LSIL-выздоровление / LSIL-персистенция (рисунок 25) и LSIL-персистенция/ LSIL-прогрессирование (рисунок 26).



**Рисунок 25 - ROC-кривая анализа «реципрокных пар» микроРНК в подгруппах LSIL-выздоровление и LSIL-персистенция**

## ROC Curves



**Рисунок 26 - ROC-кривая анализа «реципрокных пар» микроРНК в подгруппах LSIL-персистенция и LSIL- прогрессирующее**

Анализ попарного сравнения микроРНК с разнонаправленными характером изменения экспрессии в подгруппах LSIL-выздоровление и LSIL-персистенция показал высокую прогностическую ценность трех пар молекул: микроРНК-10b / микроРНК-126 (AUC = 0,8); микроРНК-196b / микроРНК-126 (AUC = 0,81); микроРНК-29b / микроРНК-126 (AUC = 0,82) (таблица 20).

**ТАБЛИЦА 20 - Показатели диагностической значимости расчетных показателей соотношений концентраций "реципрокных пар" микроРНК в группах LSIL-выздоровление и LSIL-персистенция**

«Реципрокные пары» микро-РНК	AUC, [95 % ДИ]	Cut off [95 % ДИ]	Чувствительность [95 % ДИ]	Специфичность [95 % ДИ]
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]

ROC-анализ соотношений уровней экспрессии «реципрокных пар» молекул микро-РНК в подгруппах LSIL-персистенция и LSIL-прогрессирование показал высокую прогностическую значимость пар: микроРНК-126/микроРНК-182, микроРНК-21/микроРНК-182 , микроРНК-1246/микроРНК-182 (таблица 21).

**ТАБЛИЦА 21 - Показатели диагностической значимости расчетных показателей соотношений концентраций "реципрокных пар" микроРНК в группах LSIL-персистенция и LSIL- прогрессирувание**

«Реципрокные пары» микро-РНК	AUC	Cut off [95 % ДИ]	Чувствительность	Специфичность
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]

Таким образом, использование «реципрокных» пар микроРНК-126/микроРНК-182, микроРНК-21/микроРНК-182, микроРНК-1246/микроРНК-182 и микроРНК-196b/микроРНК-126, микроРНК-10b/микроРНК-126, микроРНК-29b/микроРНК-126 возможно в качестве маркеров прогноза течения цервикальных неоплазий.

## ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Несмотря на вакцины против ВПЧ, в ближайшее десятилетие скрининг будет продолжать занимать центральное место в борьбе с раком шейки матки. Расширение охвата вакцинацией против ВПЧ приведет к снижению распространенности заболевания и введению новых подходов к скринингу.

В настоящем исследовании мы изучили клинико-диагностические характеристики пациенток с поражениями шейки матки различной степени тяжести в сравнении со здоровыми женщинами, выделили факторы, определяющие развитие и клиническое течение цервикальных неоплазий, выявили молекулы микро-РНК, применение которых возможно в скрининге рака шейки матки.

По результатам нашего исследования ВПЧ- встречалось в 70,91% при LSIL и 93,33% при HSIL, что оказалась выше по сравнению с другими работами [187]. Вариабильность этих показателей обусловлена разнообразием социокультурных факторов исследуемых популяций, различиями в качестве тестируемых образцов и чувствительности диагностических методов.

Хотя большинство цервикальных образцов содержало ВПЧ высокого риска, до 15% поражений показало отрицательный результат на ВПЧ. Неизвестно, являются ли эти повреждения предвестниками ВПЧ-негативного рака шейки матки, или отсутствие вирусной ДНК связано с качеством тестируемых образцов и чувствительности диагностических методов.

Некоторые исследователи показали, что ВПЧ-отрицательные опухоли представляют собой отдельную группу, которая может проявлять более агрессивное поведение и иметь более плохой прогноз [188]. Точный механизм, лежащий в основе ВПЧ-независимого рака шейки матки, неясен. Большинство исследователей считают, что он вызван мутациями в ассоциированных с опухолью генах, таких как TP53, PIK3CA и CDKN2A [189][190]. Существуют поражения, которые больше не экспрессируют онкогены ВПЧ E6/E7 (ВПЧ-

неактивны). Эти ВПЧ-неактивные опухоли имеют глобальное снижение метилирования ДНК и повышенную сигнализацию WNT/ $\beta$ -катенина [190].

Истинно негативный рак шейки матки имеет ВПЧ-независимый патогенез, вследствие чего вакцинация и тестирование на ВПЧ мало влияют на его профилактику. Диагноз истинно негативного рака шейки матки в основном зависит от цитологического скрининга и гистологических признаков. Поэтому для данных видов неопластических поражений актуальным является разработка новых биомаркеров.

Причиной ложноотрицательных результатов ВПЧ-тестирования является существенная разница между методами выявления ДНК или РНК вируса [191][192]. В нескольких исследованиях сообщалось о связи между раком шейки матки и ВПЧ низкого риска (6, 11, 42, 44 и 70 типов) [193] [194]. В настоящей работе использовались тесты для выявления ДНК ВПЧ высокого риска, что могло привести к частично ложноотрицательным результатам. Другим фактором, влияющим на ВПЧ-позитивность, является качество тестируемых образцов, зависящее от процедуры сбора и хранения биоматериала, методов выделения вирусного генома [192].

Соотношение типов ВПЧ различалось между женщинами с LSIL и HSIL. В целом было установлено, что ВПЧ 16,18, 31 и 33 типов являются наиболее доминирующими видами как среди LSIL, так и среди HSIL участников, что соответствует данным литературы [8][68]. Наряду с другими исследователями [67][70] мы показали, что ВПЧ 16 коррелирует с большим риском развития тяжелых дисплазий шейки матки по сравнению с другими типами. Регрессия LSIL менее вероятна, если поражения связаны с ВПЧ 16 типа. Изучение связей между течением заболевания и другими генотипами вируса не показало значимых различий.

Предметом дискуссии на сегодняшний день остается значение обнаружения нескольких типов канцерогенов с точки зрения последующего риска развития и прогрессирования дисплазий. В работе Salazar K.L. и др. показано, что множественность папилломавирусной инфекции является

обычным делом и не повышает риски, объясняя это более эффективными иммунными реакциями вследствие конкуренции нескольких генотипов [195]. Евстигнеева Л.А. и др. отмечает снижение множественности инфицирования ВПЧ по мере прогрессирования неопластического процесса, связывая это с интеграцией вируса в геном хозяина в процессы злокачественной трансформации цервикального эпителия [152].

В нашем исследовании, аналогично другим [65] [196], генотипирование показало значительно более высокое разнообразие вирусной ДНК у женщин с тяжелыми поражениями, чем с легкими. То же самое справедливо и при сравнении женщин подгрупп LSIL. Эти наблюдения свидетельствуют об общем способе передачи, биологическом взаимодействии между различными типами ВПЧ, а также особой восприимчивости некоторых женщин к инфицированию определенными типами ВПЧ [197].

Хотя онкогенная ВПЧ-инфекция была установлена как главная причина развития предвестников рака шейки матки и их прогрессирования, существуют некоторые другие предрасполагающие факторы, которые играют существенную роль в этих процессах.

Мы проанализировали факторы риска возникновения и прогрессирования плоскоклеточных интраэпителиальных поражений, и выявили некоторые различия что факторы риска развития плоскоклеточных интраэпителиальных поражений отличаются от факторов ,способствующих прогрессированию уже имеющихся изменений плоскоклеточного эпителия.

Предъявляемые женщинами жалобы и клинические симптомы чаще всего отсутствовали или были сопряжены с сопутствующими заболеваниями (хроническим цервицитом, миомой матки и т.п.) и не являлись патогномоничными для предраковых поражений шейки матки.

Согласно результатам предыдущих исследований, возраст играет важную роль в развитии CIN [73]. В нашей работе пациентки групп контроля, LSIL и HSIL не отличались по возрасту. Хотя женщины с LSIL персистенция были немного моложе, тех, у кого отмечалось прогрессирование процесса и

старше группы выздоровления, статистически значимых возрастных различий между этими тремя группами не было выявлено. Отсутствие различий в возрасте пациенток связано, по-видимому, с исключением из исследований женщин пременопаузального и менопаузального возраста.

Из потенциальных сопутствующих факторов, необходимых для развития CIN и рака, большое внимание привлекают факторы, связанные с репродукцией [76][77][78] [79]. Наши результаты не показали, что наличие большого количества беременностей и родов было связано с более высоким риском развития цервикальных неоплазий, что согласуется с работами Castle P.E.et al.[198]. Объяснение этому служит низкий паритет исследуемой популяции.

Однако мы выявили тенденцию к увеличению количества искусственным прерыванием беременности в группах с более тяжелым течением заболевания. Механизм наблюдаемой связи между абортами и цервикальными неоплазиями неизвестен. Возможно, увеличение риска связано с травмой шейки матки во время абортов [199], происходящими во время беременности локальной иммунной реакцией [200] или системной иммуносупрессией [11][82], благоприятствующих жизнедеятельности ВПЧ.

Интересен тот факт, что среди пациенток с патологией ШМ 41,79% (n=56) вообще не имели в анамнезе родов. Из них почти две трети (n=39, 69,64 %) с поражениями легкой степени. Агрессивное ведение женщин с этими аномалиями (необоснованная биопсия и конизация) потенциально имеет негативные репродуктивные последствия [201] [202][203][204] и требует более щадящего отношения к шейке матки.

Анализ сексуальной жизни показал статистически значимые отличия по возрасту сексуального дебюта у пациенток основных клинических групп, а также с различным течением LSIL. Наряду с другими исследователями [71], мы расцениваем это как указание на высокую значимость фактора длительного инфицирования папилломавирусом для развития последующих ВПЧ-ассоциированных заболеваний, поскольку у пациенток с ранним началом половой жизни можно ожидать первичное инфицирование в более молодом

возрасте и персистенцию сразу нескольких типов ВПЧ. Раннее начало сексуальной активности является фактором риска развития HSIL/РШМ вследствие активной метаплазии в области эктопии, часто выявляемой в молодом возрасте.

Тяжесть дисплазии цервикального эпителия, а также вероятность персистирования и прогрессирования LSIL были прямопропорциональны количеству половых партнеров в течение жизни, что согласуется с данными литературы [72]. Промискуитет увеличивает вероятность полового контакта с носителем вирусного агента, и коинфицирования несколькими типами ВПЧ. Частая смена половых партнеров ассоциируется с менее благоприятным экологическим составом вагинальной микробиоты, а бактериальный вагиноз является фактором риска развития и прогрессирования цервикальных неоплазий [101].

Несколько эпидемиологических исследований показали, что долгосрочное использование оральных контрацептивов является значимым фактором риска РШМ [85][86] [87]. Мы не обнаружили связи между использованием оральных контрацептивов и тяжестью предопухолевых изменений, что, по-видимому, связано с низкой приверженностью к длительной гормональной контрацепции в популяции Российских женщин.

На сегодняшний день остается спорным вопрос о роли барьерных методов контрацепции в развитие предраковых заболеваний и рака шейки матки. В некоторых работах отмечено, что презерватив не является высокоэффективным методом профилактики папилломавирусной инфекции [71]. Другие исследователи показали, что использование презервативов не только снижает риск заражения вирусом [205], но и увеличивает скорость регрессии ВПЧ ассоциированных заболеваний шейки матки [206]. Мы не обнаружили значимой связи между использованием барьерных методов контрацепции и исходами заболевания у женщин с LSIL. Однако, здоровые женщины статистически чаще сообщали о регулярном использовании презервативов ( $p < 0,05$ ). Протективный эффект, наблюдаемый среди

потребителей барьерных методов контрацепции, отражает защиту от инфицирования ВПЧ и не влияет на течение уже имеющихся предраковых заболеваниях.

Исследования, оценивающие связь между использованием ВМС и риском развития цервикальных неоплазий, немногочисленны и противоречивыми [84][207][79]. Мы не выявили значимых ассоциаций между предраковыми заболеваниями шейки матки и этим методом контрацепции.

Важным фактором риска рака шейки матки является курение [88]. У участниц нашего исследования не наблюдалось причинных связей между курением и неоплазиями шейки матки. Это связано, по-видимому, с тем, что мы делили женщин по интенсивности курения на курящих 10 и более сигарет в сутки, менее 10 сигарет и некурящих, и не учитывали информацию о возрасте начала курения и длительности никотиновой интоксикации.

Одной из причин, по которым некоторые ВПЧ-инфекции проходят, а другие сохраняются, повышая высокий риск плоскоклеточных интраэпителиальных поражений, является иммунный статус субъекта [208]. Наличие экстрагенитальных хронических воспалительных заболеваний (таких как хр.пиелонефрит и цистит, ЛОР-патология) и воспалительных заболеваний органов малого таза выступают в качестве маркеров ослабленного системного иммунитета у женщин. Поэтому лица с иммуносупрессией, обусловленной очагами хронической инфекции, подвергаются повышенному риску ВПЧ-ассоциированного заболеваний ШМ по сравнению со здоровыми, что было показано в нашем исследовании. Однако мы не исключаем, что высокая частота очагов хронической инфекции у женщин с HSIL имеет случайный характер, и связана с высокой распространенностью этих заболеваний в популяции.

Влияние нарушений влагалищной микрофлоры на течение и прогноз преинвазивных неоплазий широко обсуждается [99] [100] [101] [209]. При лабораторном обследовании на дисбиоз урогенитального тракта в нашем исследовании существенных различий между группами женщин LSIL и HSIL выявлено не было. Нарушения влагалищной микрофлоры не показали своего

влияния и на течение предраковых поражений легкой степени ( $p > 0,05$ ). Однако у женщин с NILM явления бактериального вагиноза встречались в четыре раза реже, чем у пациенток с цервикальными интраэпителиальными неоплазиями ( $p < 0,05$ ).

Диагностика бактериального вагиноза проводилась на основании критериев Амсела, которые устанавливают положительный диагноз при наличии по крайней мере трех из следующих клинических признаков: серые гомогенное выделение, наличие ключевых клеток, pH вагинальной жидкости  $> 4.5$ , «рыбный» запах. Во всем мире общеклиническими диагностическими подходами для бактериального вагиноза являются критерии Амсела и баллы Ньюджента, но чувствительность и специфичность обоих методов являются умеренными [210]. Молекулярно-биологическое исследование биоценоза позволило бы выявить более точно нарушения видового состава влагалища, но, область наших интересов в рамках данного исследования в большей степени распространялась на выявление новых молекулярно-генетических маркеров прогрессирования SIL, поэтому мы не включили ПЦР-диагностику микробиома влагалища в обследование пациенток.

В течение многих лет цервициты привлекают внимание клиницистов в качестве факторов риска малигнизации [99] [211]. В данном исследовании распространенность цервицита увеличивалась от подгруппы LSIL выздоровления к подгруппам персистирования и прогрессирования, что указывает на важную роль воспалительного процесса в цервикальном карциногенезе.

Мы предполагаем, что цервицит и аэробный вагинит более важны в патогенезе CIN и прогрессировании рака шейки матки, чем бактериальный вагиноз, и не должны игнорироваться при оценке вагинальной микробиоты [211].

Присутствие того или иного инфекционного агента в качестве ко-фактора персистирования и прогрессирования ВПЧ инфекции также широко обсуждается в литературе. В большинстве работ эта роль отводится Chlamydia

trachomatis [101][212], однако в нашем исследовании была наиболее распространена мико-уреаплазменная инфекция. Преобладание этих микроорганизмов косвенно указывает на наличие нарушений микрофлоры дисбиотического характера [213][214]. В данной работе инфицированность ИППП (за исключением ВПЧ) проводилась на основе данных анамнеза и изучения амбулаторных карт. Возможно, выявление сопутствующих инфекционных факторов непосредственно во время данного исследования показало бы другие ассоциации.

Наличие эктопии шейки матки предрасполагает к формированию обширной зоны трансформации, где происходят непрерывные метапластические изменения [74]. ВПЧ поражает незрелые клетки метапластического эпителия [14]. Эктопия является предикторным фактором инфицирования ВПЧ и, следовательно, повышает риск развития цервикальных интраэпителиальных неоплазий у женщин, но не влияет на течение уже имеющихся предраковых заболеваний шейки матки, что было подтверждено в нашей работе,

Таким образом, сравнительный анализ показал, что факторы риска развития сквамозных интраэпителиальных поражений отличаются от факторов, способствующих прогрессированию уже имеющихся изменений плоскоклеточного эпителия.

### **Микро-РНК**

В последнее время было показано, что микроРНК являются диагностическими биомаркерами во многих опухолях, в том числе и цервикальных неоплазиях [215].

Одной из задач диссертационной работы являлась оценка значимости анализа микро-РНК в клетках цервикального эпителия в качестве диагностического маркера неопластических поражений шейки.

Результаты исследования продемонстрировали прогрессивное изменение уровня экспрессии 6 микро-РНК в цервикальных мазках при трансформации

нормального эпителия в инвазивный рак: повышение экспрессии микро-РНК 126, микро-РНК 20а, микро-РНК 106 и микро-РНК 196 и снижением микро-РНК 145 и микро-РНК 375.

Сходные данные в отношении этих микро-РНК были продемонстрированы в работах других авторов. В частности, снижение уровней микроРНК-375 в цитологических образцах от поражений легкой степени к тяжелым было отмечено в исследованиях Li Y et al.[42], Tian et al. [178] и Bierkens et al.[170].

Повышение микроРНК-196b в атипических клетках шейки матки в сравнении с образцами нормального цервикального эпителия было опубликовано в работе Lui et al. [165], а увеличение микроРНК-106 отмечали Ma D. et al\_[216].

Wang X. [166] и Pereira et al. [167] сообщали о недостаточной экспрессии микроРНК-145 в группах CIN и инвазивным РШМ по отношению с пулом нормальных образцов. Группа исследователей во главе с Kawai S. так же, как мы, фиксировали постепенное увеличение уровня микроРНК-126 при переходе от CIN1 к РШМ [180].

В работе Zhao S. было установлено, что уровень экспрессии микроРНК-20а достоверно выше у больных раком шейки матки, чем у здоровых, аберрантная экспрессия микроРНК-20а коррелировала с метастазами в лимфатические узлы, гистологическим классом и диаметром опухоли [217].

Выявления значительных вариаций микроРНК-145, микроРНК- 375, микроРНК-126, микроРНК-20а, микро-РНК 106 и микроРНК-196 во время перехода от низкой к высокой степени поражений и к инвазивному раку шейки матки позволит им стать ценными терапевтическими мишенями в будущем [217].

Несмотря на подтверждение участие этих молекул в развитии SIL другими исследователями, использование микро-РНК клиницистами в качестве диагностических тестов затруднено.

Технические погрешности, возникающие на этапе подготовки образцов (процесс забора и исходное количество материала, условия хранения и эффективность выделения/транскрипции микро-РНК) сильно влияют на конечное количество микро-РНК, в итоге маскируя истинный биологический ответ. Для снижения аналитической изменчивости с целью получения наиболее достоверного и воспроизводимого биологического результата проводится нормализация абсолютных экспрессионных данных, т. е. математический процесс ранжирования набора генов-кандидатов по стабильности их экспрессии в заданном наборе образцов и в заданном экспериментальном проекте. Поэтому выбор подходящего нормализатора является решающим аспектом количественной оценки микроРНК, особенно для внедрения в клинические условия.

Среди нормализаторов, используемых при ОТ-ПЦР анализе микро-РНК, наиболее распространенными являются экзогенные синтетические олигонуклеотиды и эндогенные микроРНК [218]. Стратегии с использованием эндогенных микроРНК основаны на применении одной референтной микроРНК, комбинации нескольких микроРНК или использовании усредненного значения  $C_t$  всех анализируемых микроРНК (глобальное среднее) [219]. Согласно этим различным методологическим подходам, многие алгоритмы, такие как geNorm, NormFinder и BestKeeper, были разработаны для выявления наиболее стабильных эндогенных генов для использования в качестве эталонных в конкретных экспериментальных условиях. В настоящее время нет окончательных руководящих принципов, регулирующих нормализацию данных при анализе экспрессии микроРНК. Различные стратегии нормализации приводят к очень разным результатам с высоким риском возникновения путаницы [220].

Сложности внедрения в клиническую практику связаны и с большой вариабельностью экспрессионной активности (концентрации) отдельных молекул, наблюдаемой как в неизменном эпителии, так и в атипических клетках. [221]. Для решения этой проблемы необходим поиск молекул с

относительно стабильным уровнем экспрессионной активности в плоскоклеточном эпителии шейки матки и симультанная оценка нескольких молекул микро-РНК.

Предложенный метод «реципрокных пар», основанный на анализе концентрации нескольких молекул с разнонаправленным изменением экспрессии методом ОТ-ПЦР, позволяет решить проблемы, описанные выше. Во-первых, данный способ предполагает использование «сырых» экспрессионных данных без нормализации. Во-вторых, одновременный анализ нескольких молекул повышает надежность и воспроизводимость методики.

В данном исследовании были получены 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%), что позволяет использовать эти молекулы в качестве диагностических маркеров неопластических поражений шейки, а также внедрить в клиническую практику для уточняющей клинико-лабораторной диагностики цервикальных неоплазий.

В следующей части работы аналогичные подходы мы применили для поиска молекул микроРНК, изменение экспрессии которых коррелируют с прогнозом течения цервикальных интраэпителиальных неоплазий легкой степени.

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

Но, ни одна из шестнадцати включенных в исследование молекул не могла быть использована в качестве маркера для разграничения двух состояний LSIL-персистенция/LSIL-прогрессирование или LSIL-прогрессирование/LSIL-регресс ввиду низкой диагностической эффективности (AUC<0.7).

Использование соотношения концентраций «реципрокных пар» микроРНК-126 / микроРНК-182 (AUC - 0.82, Se - 0.75, Sp - 0.86), микроРНК-21 / микроРНК-182 (AUC = 0.84, Se-0.71, Sp - 0.86), микроРНК-1246 / микроРНК-182 (AUC - 0.89, Se - 0.92, Sp - 0.86) с достаточно высокой степенью специфичности и чувствительности позволило дифференцировать клинические группы прогрессирования и персистирования, а с помощью пар микроРНК-10b / микроРНК-126 (AUC - 0.8, Se - 0.7, Sp - 0.83); микроРНК-196b / микроРНК-126 (AUC - 0.81, Se - 0.77, Sp - 0.70), микроРНК-29b / микроРНК-126 (AUC - 0.82, Se - 0.88, Sp - 0.75) различить группы выздоровления и персистенции.

Таким образом, предложенная методология расчета соотношения концентраций пар микроРНК с так называемым «реципрокным» характером экспрессионных изменений показал высокую диагностический и прогностическую ценность.

Ни в отечественной, ни в зарубежной литературе нами не было найдено информации, объясняющей феномен «реципрокных пар». Представленный алгоритм позволяет повторить текущее исследование в любой лаборатории, а полученные данные являются объективным, т.к. не зависят от уровня специалиста.

Еще одним преимуществом нашей работы явилось оценка микроРНК в цитологических препаратах. Для анализа микроРНК в качестве биомаркера крайне важно использовать образцы, полученные неинвазивным методом. Сбор отшелушенных клеток шейки матки неинвазивен и широко используются при скрининге рака шейки матки, как для цитологических исследований, так и для ВПЧ-тестов [178].

Учитывая высокую стабильностью молекулы микро-РНК в биологических средах, доступность метода количественной ПЦР, неинвазивность забора цервикального эпителия, определение «реципрокных» пар микро-РНК в цитологических препаратах возможно при первичном скрининге рака шейки матки.

Также, микро-РНК тестирование допустимо в ситуациях с неясными

значениями цитологии , требующих проведения дальнейшего диагностического поиска с целью исключения ложноположительных и ложноотрицательных результатов обследования.

Анализ микро-РНК является высокопотенциальным на этапе диагностического поиска 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.

Кроме того, ни первичные скрининговые анализы (традиционная и жидкостная цитология, ВПЧ - тестирование), ни углубленное обследование (расширенная кольпоскопия и гистологическое исследование материала) не позволяют сделать прогноз в отношении прогрессирования, персистенции или регресса уже имеющегося заболевания, в то время как микро-РНК показывают высокую прогностическую ценность в оценке риска прогрессирования CIN до рака.

Использование «реципрокных» пар микро-РНК в качестве неинвазивных маркеров прогноза течения цервикальных неоплазий позволит уменьшить чрезмерную диагностическую и лечебную агрессию в отношении женщин с поражениями шейки матки легкой степени, что особенно важно у пациенток репродуктивного возраста.

## **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 СОКРАЩЕНИЙ

- ВОЗ - Всемирная организация здравоохранения;
- ВПЧ - вирус папилломы человека;
- ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота;
- ИППП - инфекции, передающиеся половым путем;
- МАИР - Международное агентство по изучению рака;
- МПЭ - многослойный плоский эпителий;
- мРНК- матричная рибонуклеиновая кислота;
- ОТ- ПЦР - обратнотранскриптазная полимеразная цепная реакция;
- ПЦР - полимеразная цепная реакция;
- ПВИ - папилломавирусная инфекция;
- РШМ - рак шейки матки;
- ТБС - терминологическая система Бетесда;
- ASCUS (atypical squamous cells of undetermined significance) - атипичные клетки плоского эпителия неопределённого значения;
- ASC-H (atypical squamous cells, cannot exclude HSIL) - атипичные клетки плоского эпителия, не исключают HSIL;
- AUC (Area Under Curve) - площадь под кривой;
- СС (cervical cancer) – рак шейки матки;
- CIN (cervical intraepithelial neoplasia) - цервикальная интраэпителиальная неоплазия;
- E7, E6, E5 - ранние онкобелки, контролирующие репликацию вируса, транскрипцию и клеточную трансформацию;
- IARC (International Agency of Cancer Research) – МАИР (Международное агентство по изучению рака);
- IFCPC (International Federation for Cervical Pathology and Colposcopy) - Международная Федерация по кольпоскопии и цервикальной патологии;
- 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;

RB - белок ретинобластомы;

ROC (receiver operating characteristic) – рабочая характеристика приёмника;

SIL (squamous intraepithelial lesion) - плоскоклеточное интраэпителиальное поражение.

**ПРИЛОЖЕНИЕ 1.****Результаты анализа литературы – выбор потенциальных диагностических маркеров**

N	Название	Изменение	Литература
1	2	3	4
1.	miR-20a-5p	Повышение экспрессии по мере прогрессирования неоплазии	[222],[217], [223],[224]
2.	miR-21-5p	Повышается и коррелирует с тяжестью дисплазии цервикального эпителия	[47], [165], [166],[176], [215], [225],[226]
3.	miR-31- 5p	Повышение уровня экспрессии по мере прогрессирования CIN, по сравнению со здоровыми	[227], [168], [228], [223]
4.	miR-34a-5p	Снижение уровня экспрессии при CIN2-3 по сравнению с образцами при CIN1, в образцах плоскоклеточного рака по сравнению с CIN2-3.	[119],[120], [179],[229], [230],[231]
5.	miR-99a-3p	Повышение экспрессии в тканях пациентов с РШМ по сравнению с нормальными тканями.	[167],[223],[232]
6.	miR-106b-5p	Экспрессия значительно выше в тканях РШМ по сравнению с нормальными образцами.	[47],[168], [233], [216],[234]
7.	miR-125b-5p	Потенциальный биомаркер инвазивного рака шейки матки.	[47],[179],[232]
8.	miR-126-3p	Повышение экспрессии по мере прогрессирования неоплазии.	[180],[166], [235],[236],[237]
9.	miR-145-5p	Снижение уровня экспрессии по мере прогрессирования	[112],[124], [166],[215], [225],[167],[238]

		неоплазии.	
10.	miR-146a-5p	Снижение уровня экспрессии по мере прогрессирования неоплазии	[166],[47],[239]
11.	miR-146b-3p	Повышение уровня экспрессии в тканях микроинвазивной аденокарциномы по сравнению с нормальными образцами.	[47],[223]
12.	miR-155-5p	Экспрессия увеличивается у пациентов с РШМ и коррелирует со стадиями FIGO.	[47],[166],[226]
13.	miR-192-5p	Снижение экспрессии при развитии инвазивного РШМ.	[47],[240],[241]
14.	miR-196b-5p	Повышение экспрессии по мере прогрессирования неоплазии.	[165],[242],[243],[39]
15.	miR-200b-3p	Снижение экспрессии по мере прогрессирования неоплазии.	[47],[223]
16.	miR-203a-3p	Угнетается в процессе злокачественной трансформации.	[119],[244],[239],[224]
17.	miR-375-3p	Снижение уровня экспрессии от поражений легкой степени к тяжелым.	[245],[246],[170]
18.	miR-1246-5p	Резкое снижение уровня экспрессии в образцах плоскоклеточного рака по сравнению с уровнем образцов CIN.	[247],[248],[249]

**ПРИЛОЖЕНИЕ 2.****Номенклатура молекул микро-РНК, включенных в исследование**

N	Название	РНК последовательность[250]	Идентификатор [250]	Литература
1	miR-10b-5p	UACCCUGUAGAACCGAAUUUGU G	MIMAT0000254	[168],[251], [252],[253]
2	miR-16-5p	UAGCAGCACGUAAAUAUUGGCG	MIMAT0000069	[47],[166], [176],[254], [215]
3	miR-20a-5p	UAAAGUGCUUAUAGUGCAGGUA G	MIMAT0000075	[222],[217], [223],[224]
4	miR-21-5p	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA	MIMAT0000076	[47],[165], [166],[176], [215], [225],[226]
5	miR-29b-3p	UAGCACCAUUUGAAAUCAGUGU U	MIMAT0000100	[47],[255], [256]
6	miR-31- 5p	AGGCAAGAUGCUGGCAUAGCU	MIMAT0000089	[227],[168] [228],[223]
7	miR-34a-5p	UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU	MIMAT0000255	[119],[120], [179],[229], [230],[231]
8	miR-99a-3p	CAAGCUCGCUUCUAUGGGUCUG	MIMAT0004511	[167],[223], [232]
9	miR-106b-5p	UAAAGUGCUGACAGUGCAGAU	MIMAT0000680	[47],[168], [233], [216],[234]
10	miR-125b-5p	UCCCUGAGACCCUAACUUGUGA	MIMAT0000423	[47],[179], [232]
11	miR-126-3p	UCGUACCGUGAGUAAUAAUGCG	MIMAT0000445	[180],[166],

				[235],[236], [237]
12	miR-143-3p	UGAGAUGAAGCACUGUAGCUC	MIMAT0000435	[112],[165], [166],[225], [167],[257]
13	miR-145-5p	GUCCAGUUUCCCAGGAAUCCCU	MIMAT0000437	[112],[124], [166],[215], [225],[167], [238]
14	miR-146a-5p	UGAGAACUGAAUCCAUGGGUU	MIMAT0000449	[166],[47], [239]
15	miR-146b-3p	GCCCUGUGGACUCAGUUCUGGU	MIMAT0004766	[47],[223]
16	miR-155-5p	UUAAUGC UAAUCGUGAUAGGGG UU	MIMAT0000646	[47],[166], [226]
17	miR-182-5p	UUUGGCAAUGGUAGAACUCACA CU	MIMAT0000259	[225],[258], [259]
18	miR-192-5p	CUGACCUAUGAAUUGACAGCC	MIMAT0000222	[47],[240], [241]
19	miR-196b-5p	UAGGUAGUUUCCUGUUGUUGGG	MIMAT0001080	[165],[242], [243],[39]
20	miR-200a-3p	U AACACUGUCUGGUAACGAUGU	MIMAT0000682	[47],[176], [230]
21	miR-200b-3p	UAAUACUGCCUGGUA AUGAUGA	MIMAT0000318	[47],[223]
22	miR-200c-3p	UAAUACUGCCGGGUA AUGAUGG A	MIMAT0000617	[47],[225], [223],[260]
23	miR-203a-3p	GUGAAAUGUUUAGGACCACUAG	MIMAT0000264	[119],[244], [239],[224]
24	miR-205-5p	UCCUUCAU UCCACCGGAGUCUG	MIMAT0000266	[167],[257], [261]
25	miR-375-3p	UUUGUUCGUUCGGCUCGCGUGA	MIMAT0000728	[245],[246], [170]
26	miR-1246-5p	AAUGGAUUUUUGGAGCAGG	MIMAT0005898	[247],[248], [249]

**ПРИЛОЖЕНИЕ 3.****Абсолютные показатели экспрессии микро-РНК в группах NILM, L-SIL, H-SIL и CC (Ct).**

miR-106b	miR-1246	miR-125b	miR-126	miR-145	miR-146a	miR-146b	miR-155	miR-192	miR-196b	miR-200b	miR-203a	miR-20a	miR-31	miR-34a	miR-375	miR-99a	miR-23a
<b>Норма</b>																	
26,60	25,16	26,47	30,05	31,36	27,71	28,58	30,52	29,50	31,52	24,88	25,08	25,03	29,06	30,92	25,63	27,85	26,96
26,14	24,17	26,67	33,92	30,13	27,76	28,01	30,57	29,57	30,56	24,62	25,29	25,18	28,67	30,29	25,00	28,06	25,46
26,16	27,31	26,17	29,99	32,64	26,73	27,12	30,63	30,26	31,55	22,82	28,29	24,65	27,24	29,26	24,45	27,59	26,07
26,33	25,36	27,14	30,71	31,96	27,35	27,55	30,10	30,77	32,26	24,01	29,62	25,07	29,01	29,86	24,59	28,73	25,89
29,33	27,74	26,93	32,74	30,93	30,87	29,15	34,48	32,72	31,87	26,08	28,59	28,49	29,44	31,63	27,19	28,77	27,84
26,18	26,52	26,96	30,84	29,10	26,18	26,49	29,02	21,55	31,44	24,18	28,86	24,98	28,08	30,12	24,05	28,54	25,37
26,67	26,96	24,57	30,49	31,92	29,08	28,79	30,74	24,30	32,01	23,74	27,36	24,82	27,07	28,84	24,96	26,33	25,41
24,45	26,23	24,27	31,08	28,63	25,61	25,57	29,90	27,07	29,55	21,28	25,65	23,23	24,51	27,86	21,38	25,25	24,35
25,66	25,04	26,82	32,45	31,11	27,61	25,84	27,07	19,39	30,48	24,14	25,42	24,09	27,67	29,62	24,88	27,51	24,90
26,57	25,05	25,73	31,70	30,40	27,47	27,01	28,41	18,88	30,35	24,91	24,72	24,75	27,03	29,11	24,48	26,58	25,43
29,15	26,31	26,98	35,59	33,43	29,81	29,56	31,17	27,85	32,74	25,20	25,58	27,28	28,00	30,22	25,47	27,31	27,04
23,87	27,04	26,76	25,93	30,26	26,34	26,35	30,76	25,14	29,93	23,48	27,27	21,84	27,27	29,39	24,60	27,80	26,09
26,92	25,68	26,63	30,45	31,31	28,11	28,41	30,06	28,12	32,10	24,48	26,66	25,23	28,30	30,26	24,16	28,09	26,80
25,03	24,31	26,17	33,26	28,73	28,51	28,00	27,87	28,40	29,24	25,12	24,40	24,03	28,83	29,49	24,17	27,57	24,32
25,66	23,18	26,14	29,19	29,84	27,28	28,45	30,01	28,99	29,94	24,90	23,57	24,17	28,02	28,52	24,19	26,62	25,11
26,28	24,72	29,33	30,05	30,13	27,24	27,24	28,01	29,60	31,58	25,53	29,16	24,95	29,26	30,48	26,47	30,43	24,97
25,20	25,09	24,11	29,19	29,58	25,03	25,49	28,22	28,52	30,02	21,67	24,71	24,06	24,96	27,15	22,82	25,44	24,16
24,41	23,09	25,61	30,89	28,41	29,41	27,68	28,78	27,90	29,86	24,29	28,30	23,48	28,81	30,98	24,98	27,62	24,04
26,40	24,33	25,24	30,00	30,25	28,11	27,38	27,70	29,73	29,15	24,38	23,01	24,89	27,22	27,45	24,06	26,20	25,12
25,50	25,10	25,28	31,34	29,66	25,65	26,64	29,88	28,82	30,46	22,33	25,98	24,53	26,02	27,91	23,38	27,14	24,61
<b>LSIL</b>																	
25,16	25,25	29,06	26,46	31,86	29,02	29,17	30,34	30,28	31,90	26,89	28,54	23,03	31,74	31,15	27,73	30,34	27,10
23,70	21,67	25,91	25,35	30,02	26,03	25,77	27,85	22,17	29,19	22,56	24,76	21,64	25,87	27,45	24,21	26,95	24,63
24,12	23,94	21,18	24,98	25,49	26,51	23,65	28,17	22,80	25,17	21,28	28,38	22,47	24,88	27,24	21,23	22,77	23,26
24,66	24,85	22,34	25,86	26,17	28,52	25,56	29,39	22,82	26,64	22,80	29,46	22,48	26,35	28,33	23,08	23,83	24,19
27,09	25,27	29,23	29,32	31,66	30,12	29,57	31,98	21,04	31,29	26,03	27,02	24,83	28,94	30,29	26,81	29,22	25,73
29,48	24,83	29,02	37,11	33,05	35,20	32,86	35,80	25,86	33,42	28,42	25,93	27,42	30,37	30,23	28,11	29,25	26,24
28,21	26,67	29,40	30,45	33,46	30,32	30,37	33,01	25,86	33,12	27,17	26,48	25,98	30,50	30,71	27,39	29,01	27,64
26,71	23,37	26,25	28,77	29,87	26,22	26,44	29,57	25,63	29,90	23,78	24,75	24,46	27,68	28,84	24,62	26,82	25,40
28,74	22,99	22,71	25,32	25,56	28,04	25,07	28,36	25,77	24,40	22,21	25,71	22,57	25,89	26,73	23,52	24,29	23,46
24,51	22,28	24,17	28,36	29,24	25,54	25,81	28,82	14,26	28,99	21,19	26,38	23,00	24,69	26,53	21,65	24,87	24,02
26,86	24,17	30,40	31,10	31,66	27,80	28,83	32,10	19,61	32,18	25,91	26,41	25,26	29,14	30,33	27,37	29,81	25,64
28,74	25,40	31,44	35,14	32,86	30,80	29,98	31,65	21,87	32,93	27,39	27,30	27,25	30,14	31,25	26,79	30,93	26,62
28,14	24,61	28,09	31,05	32,11	30,97	29,42	29,51	23,38	31,53	27,05	26,41	26,49	29,06	30,61	26,78	28,40	26,33
24,10	23,43	23,06	25,95	26,51	26,01	24,83	28,05	18,13	24,03	22,03	26,01	22,39	25,95	26,31	23,48	24,18	22,86
23,84	23,43	25,82	27,04	29,13	24,45	25,70	27,56	23,64	28,61	22,63	26,25	22,52	26,85	28,22	23,87	26,57	23,75

23,61	25,04	26,79	29,69	29,29	26,05	25,28	29,53	23,67	29,15	25,08	22,87	22,26	26,77	27,07	23,92	24,83	23,18
27,35	22,30	26,99	33,36	31,31	27,55	27,58	31,59	23,25	31,91	23,33	25,68	25,50	26,88	28,40	24,86	27,53	25,36
25,94	23,19	27,99	28,25	29,87	27,71	27,22	29,03	17,36	30,49	25,20	27,41	23,77	27,65	29,13	25,06	29,13	24,42
25,36	25,46	26,57	31,92	29,25	27,32	27,39	28,83	16,68	30,31	22,94	26,58	23,92	26,15	28,11	23,41	27,06	23,78
26,50	26,16	25,87	31,03	31,14	28,44	27,71	30,64	17,86	31,18	22,82	29,20	25,02	26,74	28,07	23,58	27,08	25,17
27,32	24,41	26,56	31,98	31,08	27,65	27,56	32,08	22,96	31,74	23,57	26,79	25,79	26,90	28,03	24,29	27,13	25,44
26,98	25,89	26,55	30,38	31,70	28,66	28,28	29,79	22,53	31,06	23,51	23,89	24,86	26,59	27,89	24,12	26,32	24,23
24,68	25,81	24,18	26,74	28,12	24,22	24,38	27,39	21,59	28,10	21,50	25,07	22,58	25,57	26,30	22,37	24,84	23,94
33,31	25,13	28,94	41,36	35,17	37,05	34,19	38,48	22,70	34,53	29,48	26,83	30,21	32,09	31,58	26,39	29,89	29,16
26,31	27,38	24,44	29,59	31,14	28,11	27,25	29,21	26,13	30,18	23,13	22,43	23,74	25,60	26,27	23,85	24,40	23,49
27,26	25,26	26,10	33,59	32,08	27,34	28,01	30,01	26,56	31,89	23,38	25,32	25,46	26,47	28,94	23,79	26,47	25,83
26,50	26,25	27,04	29,11	30,44	27,04	26,80	28,01	20,01	31,23	23,98	25,45	23,93	27,32	29,09	23,98	27,75	24,78
24,49	23,19	27,35	29,68	29,35	26,93	25,45	26,11	22,09	29,79	23,95	24,62	22,47	26,49	28,21	25,24	27,42	22,86
26,07	28,31	28,19	28,24	30,60	29,50	28,85	32,12	22,02	30,87	26,78	27,53	23,36	29,69	31,11	26,54	29,15	26,85
25,71	24,33	25,47	29,25	28,63	29,05	26,48	28,13	26,10	27,55	24,89	26,11	23,65	27,77	29,30	25,55	27,07	23,74
26,48	24,44	29,64	32,62	30,64	29,34	28,84	29,58	23,17	31,29	26,25	28,75	24,84	28,65	30,15	26,43	30,22	24,54
25,67	25,60	25,41	28,14	29,03	26,96	26,23	27,59	26,06	29,24	23,42	24,17	23,18	26,12	27,63	24,19	25,67	27,52
24,19	23,93	26,10	31,76	29,65	26,77	27,09	28,61	22,64	29,66	23,43	24,82	22,53	26,61	28,62	24,72	26,03	24,20
28,15	25,72	29,13	33,28	31,47	31,42	30,71	32,39	26,45	33,27	26,53	26,73	26,36	29,90	30,81	26,36	29,66	25,87
<b>HSIL</b>																	
28,78	28,94	28,63	36,92	34,90	31,25	30,27	33,85	23,28	35,72	25,24	30,41	28,36	30,25	37,25	27,96	30,49	31,99
27,67	25,86	28,30	34,85	32,65	28,41	28,02	30,28	29,16	31,03	25,23	30,18	26,51	29,91	36,40	28,28	29,77	30,51
25,85	23,33	26,13	32,22	30,95	28,75	27,16	29,33	24,68	29,60	24,81	24,16	25,05	29,38	35,14	27,31	27,64	29,14
26,83	25,31	26,22	32,48	31,69	29,91	27,26	29,08	20,22	28,82	23,91	25,83	25,67	28,36	33,58	27,72	28,01	29,11
28,12	28,69	25,33	31,19	33,34	30,08	24,77	29,74	21,89	36,48	27,89	30,10	27,01	30,97	36,28	31,44	29,70	31,14
30,61	26,51	28,08	34,37	33,29	28,75	29,88	31,85	32,02	32,34	26,36	32,30	29,09	31,31	30,10	26,43	29,71	27,59
24,33	25,73	25,30	27,29	32,67	30,95	29,13	31,31	29,87	30,72	27,27	25,42	22,15	30,01	29,83	25,42	26,88	27,53
27,97	25,81	29,13	33,34	33,58	30,12	30,92	31,76	32,53	33,25	26,34	29,20	26,32	30,08	30,16	27,52	29,64	26,18
28,74	27,12	28,04	34,81	34,23	29,67	30,19	32,07	31,87	33,88	26,18	28,06	26,97	28,49	29,74	26,04	29,19	26,91
26,51	27,60	30,55	36,13	34,13	31,10	30,17	29,49	32,48	32,70	24,55	28,86	24,71	26,49	28,75	30,04	31,40	24,62
30,63	30,12	29,65	35,02	37,08	33,45	32,30	32,27	33,67	33,26	28,48	30,43	28,30	30,90	31,18	30,09	30,24	28,37
26,41	25,01	26,69	30,02	32,90	27,29	28,28	29,82	30,50	31,59	24,44	27,49	24,17	27,06	28,29	26,35	27,38	25,11
24,62	25,74	23,13	27,81	27,58	27,44	26,66	29,88	29,41	26,09	22,58	26,62	22,52	25,75	26,77	23,55	25,13	23,85
25,71	23,45	26,19	30,78	30,87	27,68	27,19	28,04	24,69	28,57	23,50	26,01	24,14	27,08	26,81	28,51	27,33	24,20
29,79	25,72	29,13	34,47	33,61	28,42	28,85	33,22	29,84	32,81	25,35	30,72	27,91	30,11	29,89	26,38	29,75	27,38
29,59	27,04	30,02	35,73	34,47	31,61	31,43	33,40	23,64	32,41	27,24	29,20	27,16	29,97	30,59	30,10	30,02	27,20
24,12	25,26	24,27	26,32	27,14	28,02	26,35	28,66	20,51	27,01	22,98	28,87	22,05	26,05	26,99	24,17	25,62	23,50
24,67	24,88	25,10	26,88	29,64	26,18	26,24	29,58	28,49	28,96	22,48	26,75	22,45	25,98	26,79	24,81	26,00	24,22
24,58	27,34	24,43	27,03	30,01	24,54	25,68	28,17	26,72	29,49	21,50	24,03	22,92	24,64	26,30	23,18	25,06	23,99
25,38	24,11	26,29	27,75	31,47	30,69	29,30	31,50	29,50	30,01	25,35	23,96	23,19	27,88	28,30	22,91	26,92	24,96
27,26	21,29	26,64	34,81	32,57	29,68	29,83	31,89	29,89	29,89	24,14	23,37	27,91	27,06	26,21	23,60	27,99	23,82
25,03	22,72	25,10	28,73	30,68	24,99	26,93	28,09	30,13	29,07	22,62	25,37	22,51	25,74	26,05	25,61	25,79	23,25
29,00	26,41	30,45	31,89	32,72	31,87	31,28	32,91	32,38	33,68	29,10	28,51	26,47	30,32	31,12	29,17	30,99	27,47
23,93	26,32	22,98	26,04	27,85	25,68	25,11	28,71	28,34	28,74	21,59	25,14	21,83	23,32	25,99	22,68	23,71	22,19
26,36	26,11	25,61	29,75	31,00	27,61	27,38	29,63	30,17	31,27	23,46	25,09	24,29	25,55	27,26	24,14	25,87	24,20

26,18	26,02	28,30	29,11	32,26	28,38	28,26	31,15	31,13	31,98	24,29	29,43	23,98	28,50	28,14	26,62	28,21	25,57
26,42	24,79	26,71	29,20	30,68	27,62	27,42	29,14	29,91	29,36	23,86	27,04	24,16	26,51	27,74	26,32	26,67	24,63
23,42	22,24	26,33	25,15	30,05	26,02	26,66	28,84	29,05	29,06	22,69	23,34	21,37	25,40	27,25	26,19	26,40	23,42
27,29	23,43	28,59	31,35	32,22	29,44	29,49	31,19	31,10	32,08	26,79	26,24	25,29	29,85	30,02	25,40	28,64	25,91
28,36	24,56	27,58	30,19	31,82	28,15	28,44	31,90	21,85	31,02	24,79	29,84	25,78	29,22	28,91	25,54	28,20	26,21
28,52	25,95	28,29	33,20	33,83	29,14	29,52	32,48	22,54	32,00	25,90	28,53	25,44	28,35	29,79	27,77	27,66	26,24
26,97	26,44	27,62	29,20	31,02	29,96	29,40	31,68	23,08	29,91	24,61	27,57	24,44	26,79	28,87	26,90	28,17	25,86
26,47	22,72	27,47	28,44	31,77	30,14	28,71	31,20	23,19	31,17	26,27	25,50	23,78	28,16	29,14	27,28	27,37	25,19
<b>Рак</b>																	
25,90	23,82	28,54	30,13	32,49	29,45	28,04	31,18	30,88	30,70	25,02	26,07	24,85	30,15	35,66	28,20	30,20	29,83
25,55	23,17	25,65	28,81	31,29	25,98	26,72	30,03	20,69	30,03	23,36	26,95	24,81	28,30	34,17	26,21	26,64	30,04
24,83	25,37	26,54	31,40	31,67	27,65	27,32	29,97	29,23	28,67	23,32	24,57	23,89	28,22	32,30	27,23	28,19	28,56
23,63	24,21	27,08	25,80	30,84	27,23	27,11	28,29	21,53	29,06	24,18	24,86	20,88	26,69	27,25	26,42	26,55	24,03
24,91	24,28	24,41	26,14	27,08	28,15	26,49	28,66	23,32	24,97	24,74	29,40	22,59	27,58	27,14	27,11	25,84	24,04
26,02	24,13	27,92	27,27	32,13	26,17	23,37	26,00	23,34	25,93	22,85	27,13	21,43	25,07	27,44	26,54	23,56	25,54
25,11	23,61	25,02	26,72	27,86	27,71	26,23	27,33	23,07	27,65	24,70	29,08	22,50	26,57	26,76	28,52	26,52	24,03
25,08	22,27	28,73	27,81	32,78	26,62	25,35	26,35	30,05	31,58	27,41	28,84	22,65	29,92	29,45	27,66	32,35	27,64
25,20	22,23	30,43	28,35	33,04	26,38	26,74	27,55	29,48	29,63	24,40	26,69	23,09	25,82	28,74	27,69	31,59	26,10
27,12	25,39	27,14	33,00	32,29	29,32	26,98	27,87	31,41	30,09	24,22	25,25	25,08	25,74	27,16	26,06	27,24	24,47
22,36	24,24	26,30	23,81	30,65	27,46	27,35	29,54	28,22	28,54	25,07	28,65	19,79	28,70	28,33	29,23	26,18	24,63
25,12	24,28	29,12	27,13	32,39	29,53	28,48	30,02	28,79	29,50	25,13	29,58	22,43	30,12	28,82	27,90	29,68	25,32
23,17	23,04	24,59	25,09	29,03	25,21	25,68	25,70	29,20	27,00	22,60	24,66	20,42	25,87	27,36	27,48	25,30	27,15
24,18	22,52	27,20	26,71	31,40	27,50	27,31	27,53	29,67	28,61	23,47	26,37	22,04	31,11	26,76	28,36	26,27	23,28
22,32	24,35	25,67	24,47	29,08	28,03	26,21	28,14	28,39	26,88	22,15	26,01	20,00	27,31	26,02	23,21	25,39	23,15
24,13	23,17	27,01	27,05	30,84	26,45	25,26	26,27	29,40	28,41	24,32	25,12	21,43	25,28	28,76	27,77	28,29	24,59
22,54	24,45	23,30	24,75	28,54	25,35	24,32	27,69	27,81	25,26	21,81	26,48	20,36	24,32	27,06	25,76	23,99	23,42
24,13	21,84	26,48	26,35	32,06	27,97	28,05	30,49	29,14	29,55	24,58	25,62	21,73	27,95	28,94	26,95	26,62	24,42
26,62	23,76	27,27	31,54	32,31	29,07	28,54	30,26	30,65	30,98	24,93	24,54	24,37	27,22	28,13	25,66	26,71	24,32
23,90	26,78	26,11	27,03	30,62	30,10	27,26	29,28	29,37	28,28	23,97	26,20	21,48	25,83	26,88	28,10	26,28	23,97
26,64	23,82	27,86	30,34	32,78	28,40	28,79	30,34	31,01	31,37	25,51	26,43	24,62	29,06	29,23	26,03	27,50	26,20
26,22	26,20	27,13	31,24	32,14	27,04	26,61	29,75	30,89	30,24	23,36	25,71	24,44	25,25	27,39	24,09	27,18	24,40
23,98	28,69	31,40	25,75	33,26	31,11	29,36	31,97	29,65	30,09	28,90	32,12	21,19	31,07	31,64	32,01	32,45	27,31
22,65	22,51	26,55	23,92	30,56	26,43	26,60	27,22	28,23	29,41	26,04	26,73	20,80	28,36	31,04	27,75	28,78	26,42
23,63	23,05	23,48	28,01	31,89	27,63	26,08	27,42	29,82	27,38	22,05	24,43	21,91	26,00	28,01	25,12	24,31	24,84
27,70	23,16	29,68	33,82	32,34	31,55	31,32	33,84	32,06	33,61	29,28	27,91	26,67	31,56	32,51	28,12	31,08	27,67

**ПРИЛОЖЕНИЕ 4.****Абсолютные показатели экспрессии микроРНК в подгруппах 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 196a	miR 200a	miR 106b	miR 29b
<b>LSIL - выздоровление</b>															
29,14	28,25	36,92	27,28	28,02	37,87	34,87	31,33	33,44	33,27		30,49				
29,02	32,46	39,60	30,99	30,28		35,31	35,23								
27,08	23,94	34,39	24,58	24,57	33,82	31,99	30,08	30,16	29,58	17,04	30,73	25,98	24,64	24,96	34,02
26,68	22,72	34,87	26,13	25,96	35,27	33,65	27,98	27,91	31,10	19,08	30,97	26,81	24,49	25,27	33,13
28,99	27,50	39,73	30,91	31,35	43,29	36,98	33,09	32,12	33,87	19,40	32,74	24,44	24,78	26,01	34,50
29,22	32,46	39,21	32,33	31,51		36,58	35,29	34,99	35,68	22,21	33,93	23,63	22,76	25,80	36,67
27,78	25,91	37,14	28,18	27,48	35,73	35,45	29,18	29,76	32,02	19,47	30,02	24,86	22,95	25,56	36,53
26,71	21,98	35,84	26,42	26,94	36,66	34,82	26,72	27,43	29,91	17,17	30,06	24,85	23,74	23,91	32,74
27,20	21,81	34,25	25,38	25,76	33,87	35,19	28,31	28,07	29,44	16,59	29,91	25,55	24,74	24,43	34,15
27,57	25,51	35,31	25,87	27,52	33,89	34,86	29,56	29,69	29,99	18,56	31,54	26,87	24,30	26,71	34,84
28,84	29,33	40,14	34,48	33,66		35,69	36,35	33,58	37,93	24,07	36,71	27,62	25,35	24,97	39,12
28,91	27,68	39,07	28,79	27,12	41,80	35,97	32,09	32,40	33,55	18,60	32,66	28,02	23,87	25,38	37,24
27,57	22,03	34,14	25,66	27,04	38,80	34,65	29,17	29,29	30,46	15,70	29,89	24,62	23,64	24,61	34,92
27,86	21,90	34,43	26,47	25,03	36,88	32,74	27,57	28,80	31,08	16,53	30,50	25,60	24,20	24,94	34,05
26,85	23,46	34,96	29,48	30,92		34,44	28,70	28,83	32,43	18,09	30,55	24,85	23,81	23,77	33,33
27,55	22,92	34,08	25,26	27,21	36,47	33,19	28,03	28,10	29,44	16,85	29,98	25,29	23,96	25,83	33,59
27,40	25,45	35,47	28,67	28,51	35,70	33,97	29,08	30,37	32,56	19,56	31,01	23,05	23,14	24,56	32,78
27,29	28,87	37,28	27,22	27,57	39,76	34,26	33,55	33,42	32,67	20,83	31,88	25,16	23,14	25,28	35,59
28,50	30,89	41,43	30,56	31,55		35,10	36,31	34,01	36,96	22,39	32,70	25,26	23,40	25,85	42,05
28,48	41,12	42,98	39,29	35,53		35,04		35,71	45,85	27,17	35,45	26,44	24,50	26,67	
<b>LSIL - персистенция</b>															
29,93	24,62	32,38	24,33	25,57	31,59	31,91	28,26	27,06	28,68	19,34	26,88	22,78	21,15	22,59	30,60
27,28	23,36	33,64	26,35	25,71	40,98	32,84	27,40	26,39	29,87	16,00	29,21	21,90	21,55	22,97	32,14
27,3	23,84	34,27	25,65	25,98	35,46	32,46	26,66	25,76	29,73	18,51	28,34	24,86	23,94	25,37	31,59
27,88	33,55	36,55	30,46	29,64	39,37	33,98	32,42	32,85	33,41	20,59	31,49	26,09	24,70	25,48	34,60
29,7	25,44	34,51	27,60	26,93	37,54	33,40	28,98	29,69	32,59	18,86	28,79	20,16	22,01	23,21	33,15
28,47	24,82	35,52	25,65	26,36	34,73	31,64	30,91	32,29	30,54	17,78	29,18	15,83	22,18	22,88	32,75
28,74	33,14	36,22	30,37	30,45		35,11	34,50	34,18	33,83	20,54	32,33	24,16	21,55	24,75	30,84
28,73	25,13	34,83	29,77	28,63		34,68	29,61	30,15	34,10	20,78	32,24	24,55	23,28	25,15	31,16
27,62	23,25	34,26	26,67	26,86	35,58	34,84	31,06	30,21	32,05	19,86	29,72	23,21	23,21	24,95	29,92
27,96	26,38	34,91	26,65	25,70	34,45	35,48	31,82	31,30	31,64	20,17	30,34	25,02	23,91	25,49	
28,88	24,79	35,36	26,59	28,50	42,17	35,53	31,07	29,96	31,80	18,63	30,86	24,61	23,74	25,09	34,60
27,91	24,53	34,81	26,13	26,92	39,29	31,94	26,28	25,83	30,76	18,06	31,63	22,98	23,82	25,13	33,62
27,57	22,05	34,51	26,09	25,25	34,38	32,55	25,23	25,85	29,11	17,35	26,86	21,53	23,10	22,78	31,41
27,88	23,62	34,68	25,66	25,39	34,25	32,36	26,92	28,37	29,25	17,99	27,62	20,98	23,31	24,08	32,20
28,71	30,87	38,40	29,27	29,17	39,43	34,79	38,07	33,83	34,50	22,28	33,60	25,63	23,41	24,31	36,42
28,36	23,65	34,70	25,67	27,00	34,36	34,45	27,40	28,73	30,87	17,83	30,39	25,66	23,74	24,97	33,15

29,35	27,87	39,55	30,50	29,94		35,35	31,48	30,88	33,20	21,44	30,51	25,32	22,64	25,99	34,49
29,47	25,55	38,43	31,02	29,47		35,32	34,65	29,31	34,08	19,68	32,15	26,11	23,51	25,28	35,00
27,33	24,13	35,05	27,06	26,76	35,73	33,40	28,10	27,76	31,18	18,06	31,11	25,58	22,68	24,95	35,55
27,15	29,91	38,66	28,03	30,13	36,73	33,81	33,46	31,72	33,09	21,27	33,06	23,96	22,21	24,41	36,29
29,86	38,77	44,26	36,01	36,38		36,23	38,06	35,55	38,94	26,23	37,58	26,93	24,45	27,44	46,60
30,54	24,66	36,06	26,33	26,15	37,28	35,68	28,26	30,00	30,16	19,18	31,41	27,23	25,32	26,37	35,25
28,97	25,39	36,00	27,58	26,98	47,04	35,26	29,02	29,19	31,27	19,20	31,70	26,35	22,60	26,49	35,15
31,75	28,37	37,61	29,55	29,30		35,28	32,27	32,53	35,69	22,37	33,70	27,48	25,89	27,96	37,73
<b>LSIL - прогрессирувание</b>															
29,26	33,86	39,07	32,50	32,94		37,05	34,49	34,80	35,94	20,78	33,17	24,67	23,93	26,34	42,63
29,00	25,69	40,10	31,64	30,51		36,18	35,51	33,50	38,46	24,37	33,64	24,90	23,77	27,01	40,66
27,98	24,02	36,33	26,05	26,38	34,15	33,70	28,07	29,61	29,63	17,98	31,26	23,06	20,18	23,89	33,80
27,22	21,51	34,99	25,12	23,43	33,25	34,56	27,42	27,41	29,16	16,20	29,38	22,89	22,37	24,38	34,73
27,36	27,47	38,34	27,37	27,84	36,08	34,80	32,06	32,01	32,08	20,04	30,79	24,85	22,37	24,87	36,15
27,44	23,27	36,13	25,65	25,96	33,87	34,70	29,65	30,60	28,50	16,69	29,06	26,47	23,51	23,83	33,29
28,51	37,71	44,41	32,90	32,48		36,27	39,98	35,11	36,84	23,44	33,92	27,25	24,79	24,74	39,15
28,48	24,95	37,25	26,77	26,94	35,89	35,74	29,62	30,05	31,94	18,49	31,14	25,07	24,89	26,87	34,83
26,86	22,63	35,39	26,09	27,43	33,22	33,77	27,47	27,59	29,27	16,92	28,10	24,77	23,19	24,06	31,89
27,00	36,09	44,75	35,03	34,58		35,07	34,09	33,82	41,77	25,10	35,79	26,37	22,46	24,94	
28,29	25,57	37,64	27,90	28,14	37,75	35,30	28,29	29,44	31,40	18,25	31,05	25,16	23,24	25,56	33,47
29,15	36,92	40,81	32,99	33,64	43,66	36,09	35,59	34,43	37,05	22,65	34,92	26,60	25,01	28,05	

**Список литературы.**

1. Сайт МАИР. [Электронный ресурс]. URL: <https://www.iarc.fr>.
2. Bray, F. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries / F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram , [et al.] // CA: A Cancer Journal for Clinicians – 2018. – Т. 68 – № 6 – С.394–424.
3. Состояние онкологической помощи населению России в 2019 году // под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, А.О. Шахзадовой. – Москва: МНИОИ им. П.А. Герцена, филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2020.– 239с.
4. Zur Hausen, H. Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account / H. zur Hausen // Virology – 2009. – Т. 384 – № 2 – С.260–265.
5. Walboomers, J.M.M. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide / J.M.M. Walboomers, M.V. Jacobs, M.M. Manos, [et al.] // Journal of Pathology – 1999. – Т. 189 – № 1 – С.12–19.
6. Bosch, F.X. Comprehensive Control of Human Papillomavirus Infections and Related Diseases / F.X. Bosch, T.R. Broker., D. Forman , [et al.] // Vaccine – 2013. – Т. 31 – № Suppl 7 – С.H1–H31.
7. Crosbie, E.J. Human papillomavirus and cervical cancer / E.J.Crosbie, M.H.Einstein, S.Franceschi, H.C.Kitchener // The Lancet – 2013. – Т. 382 – № 9895 – С.889–899.
8. Bosch, F.X. Epidemiology and Natural History of Human Papillomavirus Infections and Type-Specific Implications in Cervical Neoplasia / F.X.Bosch, A.N.Burchell, M.Schiffman, [et al.] // Vaccine – 2008. – Т. 26 – № SUPPL. 10 – С.2008.
9. Smith, J.S. Age-Specific Prevalence of Infection with Human Papillomavirus in Females: A Global Review / J.S.Smith, A.Melendy, R.K.Rana, J.M.Pimenta // Journal of Adolescent Health – 2008. – Т. 43 – № 4 – С.S5.e1-S5.e62.
10. Dunne, E.F. Prevalence of HPV infection among females in the United States / E.F.Dunne, E.R.Unger, M.Sternberg, [et al.] // Journal of the American Medical

Association – 2007. – Т. 297 – № 8 – С.813–819.

11. Rodriguez, A.C. Rapid Clearance of Human Papillomavirus and Implications for Clinical Focus on Persistent Infections / A.C.Rodriguez, M.Schiffman, R.Herrero, [et al.] // JNCI Journal of the National Cancer Institute – 2008. – Т. 100 – № 7 – С.513–517.

12. Bogani, G. Retrospective study of the influence of HPV persistence on outcomes among women with high-risk HPV infections and negative cytology / G.Bogani, F.Taverna, C.Lombardo, [et al.] // International Journal of Gynecology & Obstetrics – 2017. – Т. 138 – № 1 – С.62–68.

13. McCredie, M.R. Natural history of cervical neoplasia and risk of invasive cancer in women with cervical intraepithelial neoplasia 3: a retrospective cohort study / M.R.McCredie, K.J.Sharple, C.Paul, [et al.] // The Lancet Oncology – 2008. – Т. 9 – № 5 – С.425–434.

14. Doorbar, J. The biology and life-cycle of human papillomaviruses // Vaccine. – 2012. – Т. 30. – № SUPPL.5.

15. Hebner, C.M. Human papillomaviruses: Basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity // Rev. Med. Virol. – 2006. – Т. 16. – № 2. – 83–97с.

16. Mittal, S. Molecular mechanisms underlying human papillomavirus E6 and E7 oncoprotein-induced cell transformation / S.Mittal, L.Banks // Mutation Research / Reviews in Mutation Research – 2017. – Т. 772 – С.23-35.

17. Steenbergen, R.D.M. Clinical implications of (epi)genetic changes in HPV-induced cervical precancerous lesions / R.D.M.Steenbergen, P.J.F.Snijders, D.A.M Heideman., C.J.L.M .Meijer. // Nature Reviews Cancer – 2014. – Т. 14 – № 6 – С.395-405.

18. Westrich, J.A. Evasion of host immune defenses by human papillomavirus / J.A.Westrich, C.J.Warren, D. Pyeon // Virus Research – 2017. – Т. 231 – С.21–33.

19. Новик, В.И. Скрининг рака шейки матки / В.И.Новик // Практическая онкология. – 2010. – Т. 11 – № 2 – С.66–73.

20. Chantziantoniou, N. Inception and Development of the Papanicolaou Stain Method / N.Chantziantoniou, A.D.Donnelly, M.Mukherjee, [et al.] // Acta Cytologica

– 2017. – Т. 61 – № 4–5 – С.266–280.

21. Каприн, А.Д. Скрининг рака шейки матки – нерешенные проблемы / А.Д.Каприн, Е.Г.Новикова, О.И.Трушина, О.П.Грецова // Исследования и практика в медицине – 2015. – Т. 2 – № 1 – С.36–41.

22. Schiffman, M. Proof-of-principle study of a novel cervical screening and triage strategy: Computer-analyzed cytology to decide which HPV-positive women are likely to have  $\geq$ CIN2 / M.Schiffman, K.Yu K., R.Zuna R., [et al.] // International Journal of Cancer – 2017. – Т. 140 – № 3 – С.718–725.

23. Nanda, K. Accuracy of the Papanicolaou Test in Screening for and Follow-up of Cervical Cytologic Abnormalities / K.Nanda, D.C. McCrory, E.R.Myers, [et al.] // Annals of Internal Medicine – 2000. – Т. 132 – № 10 – С.810.

24. Kothari, A. The introduction of the HPV primary screening programme / A.Kothari // Practice Nursing – 2017. – Т. 28 – № 4 – С.162–166.

25. Chrysostomou, A. Cervical Cancer Screening Programs in Europe: The Transition Towards HPV Vaccination and Population-Based HPV Testing / A.Chrysostomou, D.Stylianou, A.Constantinidou, L.Kostrikis // Viruses – 2018. – Т. 10 – № 12 – С.729.

26. C Kitchener, H. The clinical effectiveness and cost-effectiveness of primary human papillomavirus cervical screening in England: extended follow-up of the ARTISTIC randomised trial cohort through three screening rounds / H.C Kitchener, K.Canfell, C.Gilham, [et al.] // Health Technology Assessment – 2014. – Т. 18 – № 23.

27. Yang, J. Cytology and high risk HPV testing in cervical cancer screening program: Outcome of 3-year follow-up in an academic institute / J.Yang, F.S.Nolte, O.S.Chajewski, [et al.] // Diagnostic Cytopathology – 2018. – Т. 46 – № 1 – С.22–27.

28. Ruffin, M. Combined HPV and cytology better than cytology for protection against cervical cancer / M.Ruffin// Evidence-Based Medicine – 2014. – Т. 19 – № 4 – С.148.

29. Melnikow, J. Screening for Cervical Cancer With High-Risk Human

- Papillomavirus Testing / J.Melnikow, J.T.Henderson, B.U.Burda, [et al.] // JAMA – 2018. – Т. 320 – № 7 – С.687.
30. Ronco, G. Impact of variations in triage cytology interpretation on human papillomavirus–based cervical screening and implications for screening algorithms / G.Ronco, M.Zappa, S.Franceschi, [et al.] // European Journal of Cancer – 2016. – Т. 68 – С.148–155.
31. Smith, R.A. Cancer screening in the United States, 2018: A review of current American Cancer Society guidelines and current issues in cancer screening / R.A.Smith, K.S.Andrews, D.Brooks, [et al.] // CA: A Cancer Journal for Clinicians – 2018. – Т. 68 – № 4 – С.297–316.
32. Cuzick, J. Overview of the European and North American studies on HPV testing in primary cervical cancer screening / J.Cuzick, C.Clavel, K.-U.Petry, [et al.] // International Journal of Cancer – 2006. – Т. 119 – № 5 – С.1095–1101.
33. Клинические рекомендации “Цервикальная интраэпителиальная неоплазия, эрозия и эктропион шейки матки” (утв. Минздравом России). / – Москва, 2020.
34. Zhu, Y. Performance of p16/Ki67 immunostaining, HPV E6/E7 mRNA testing, and HPV DNA assay to detect high-grade cervical dysplasia in women with ASCUS / Y.Zhu, C.Ren, L.Yang, [et al.] // BMC Cancer – 2019. – Т. 19 – № 1 – С.271.
35. Сухих, Г.Т. Диагностика, лечение и профилактика впч-ассоциированных заболеваний шейки матки в акушерско-гинекологической практике. Учебное пособие. / Г.Т.Сухих, В.Н.Прилепская, Л.А.Ашрафян, [и др.] – Москва: Общество с ограниченной ответственностью "Издательский дом “БИНОМ” (Москва), 2019.– 84с.
36. Маржевская, В.В. Молекулярно-генетические основы эндометриоза: диагностический потенциал наследуемых и экспрессируемых факторов / Маржевская В.В., Присяжная Т.С., Жамойдик В.И., [и др.] // Журнал акушерства и женских болезней – 2018. – Т. 67 – № 3 – С.64–73.
37. Esquela-Kerscher, A. Oncomirs — microRNAs with a role in cancer / A.Esquela-Kerscher, F.J.Slack // Nature Reviews Cancer – 2006. – Т. 6 – № 4 – С.259-269.
38. Колесников, Н.Н. Повышение точности и информативности тонкоигольной

- аспирационной пункционной биопсии опухолей молочной железы путем анализа микроРНК в материале цитологического мазка / Н.Н.Колесников, С.Е.Титов, Ю.А.Веряскина, [и др.] – 2016. – Т. 3 – С.44–52.
39. Luo, M. MiR-196b affects the progression and prognosis of human LSCC through targeting PCDH-17 / M.Luo, G.Sun, J.Sun // *Auris Nasus Larynx* – 2019. – Т. 46 – № 4 – С.583–592.
40. Farazi, T.A. *MicroRNAs in Human Cancer*, 2013. – 1–20с.
41. Lewis, B.P. Conserved Seed Pairing, Often Flanked by Adenosines, Indicates that Thousands of Human Genes are MicroRNA Targets / B.P.Lewis, C.B.Burge, D.P.Bartel // *Cell* – 2005. – Т. 120 – № 1 – С.15–20.
42. Li, Y. Progressive miRNA expression profiles in cervical carcinogenesis and identification of HPV-related target genes for miR-29 / Y.Li, F.Wang, J.Xu, [et al.] // *Journal of Pathology* – 2011. – Т. 224 – № 4 – С.484–495.
43. Lin, S. MicroRNA biogenesis pathways in cancer / S.Lin, R.I. Gregory // *Nature Reviews Cancer* – 2015. – Т. 15 – № 6 – С.321–333.
44. Fiorucci, G. Cancer Regulator MicroRNA: Potential Relevance in Diagnosis, Prognosis and Treatment of Cancer / G.Fiorucci, M. V.Chiantore, G.Mangino, [et al.] // *Current Medicinal Chemistry* – 2012. – Т. 19 – № 4 – С.461–474.
45. Kavitha, N. MicroRNAs: Biogenesis, Roles for Carcinogenesis and as Potential Biomarkers for Cancer Diagnosis and Prognosis / N.Kavitha, S.Vijayarathna, S.L.Jothy, [et al.] // *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* – 2014. – Т. 15 – № 18 – С.7489–7497.
46. Iorio, M. V. Causes and Consequences of MicroRNA Dysregulation / M. V.Iorio, C.M. Croce // *The Cancer Journal* – 2012. – Т. 18 – № 3 – С.215–222.
47. Wilting, S.M. Altered microRNA expression associated with chromosomal changes contributes to cervical carcinogenesis / S.M.Wilting, P.J.F.Snijders, W.Verlaet, [et al.] // *Oncogene* – 2013. – Т. 32 – № 1 – С.106–116.
48. Poltronieri, P. State-of-the-Art on Viral microRNAs in HPV Infection and Cancer Development / P.Poltronieri, B.Sun, K.-Y.Huang, [et al.] // *MicroRNA* – 2018. – Т. 7 – № 2 – С.85–91.

49. Chiantore, M.V. Human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins affect the expression of cancer-related microRNAs: additional evidence in HPV-induced tumorigenesis / M.V.Chiantore, G.Mangino, M.Iuliano, [et al.] // *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* – 2016. – Т. 142 – № 8 – С.1751–1763.
50. Frixa, T. Oncogenic MicroRNAs: Key Players in Malignant Transformation / T.Frixa, S.Donzelli, G. Blandino // *Cancers* – 2015. – Т. 7 – № 4 – С.2466–2485.
51. Lopez, J.P. Biomarker discovery: quantification of microRNAs and other small non-coding RNAs using next generation sequencing / J.P.Lopez, A.Diallo, C.Cruceanu, [et al.] // *BMC Medical Genomics* – 2015. – Т. 8 – № 1 – С.35.
52. World Health Organization. (2013) .WHO guidelines for screening and treatment of precancerous lesions for cervical cancer prevention] .Электронный ресурс]. URL: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/94830>.
53. Song, B. Incidence and mortality of cervical cancer in China, 2013 / B.Song, C.Ding, W.Chen, [et al.] // *Chinese Journal of Cancer Research* – 2017. – Т. 29 – № 6 – С.471–476.
54. Профилактика рака шейки матки. Руководство для врачей. // под ред. Г.Т. Сухих, В.Н. Прилепской. – Москва, 2012. Вып. МЕДпресс-и– 192с.
55. Bosch, F.X. Human papillomavirus: science and technologies for the elimination of cervical cancer / F.X.Bosch // *Expert Opinion on Pharmacotherapy* – 2011. – Т. 12 – № 14 – С.2189–2204.
56. De Sanjosé, S. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis // *Lancet Infect. Dis.* – 2007. – Т. 7. – № 7. – 453–459с.
57. Bruni, L. Cervical Human Papillomavirus Prevalence in 5 Continents: Meta Analysis of 1 Million Women with Normal Cytological Findings / L.Bruni, M.Diaz, X.Castellsagué, [et al.] // *The Journal of Infectious Diseases* – 2010. – Т. 202 – № 12 – С.1789–1799.
58. World Health Organization. (2019). Fact sheet: Human papillomavirus (HPV) and cervical cancer. [Электронный ресурс]. URL: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/humanpapillomavirus-\(hpv\)-and-cervical-cancer](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/humanpapillomavirus-(hpv)-and-cervical-cancer).

59. De Sanjosé, S. The natural history of human papillomavirus infection / S. de Sanjosé, M. Brotons, M.A. Pavón // *Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology* – 2018. – Т. 47 – С.2–13.
60. Ашрафян, Л.А. Опухоли репродуктивных органов (этиология и патогенез). / Л. А. Ашрафян, В. И. Киселев – Москва, 2008. Вып. Дмитрийд Г– 216с.
61. Роговская, С.И. Папилломавирусная инфекция у женщин и патология шейки матки: в помощь практикующему врачу. 2-е изд. / С. И. Роговская – Москва, 2008. Вып. Гэотар-Мед.
62. Ordi, J. p16INK4a Immunostaining Identifies Occult CIN Lesions in HPV-positive Women / J.Ordi, S.Garcia, M. del Pino, [et al.] // *International Journal of Gynecological Pathology* – 2009. – Т. 28 – № 1 – С.90–97.
63. Серов, В.Н. Руководство по амбулаторно-поликлинической помощи в акушерстве и гинекологии. / В. Н. Серов / под ред. В.Н. Серова, Г.Т. Сухих, В.Н. Прилепской, В.Е. Радзинского. – Москва: 3-е изд., перераб. и доп, 2016. Вып. Гэотар-Мед– 1136с.
64. Качалина, О.В. Современные подходы к диагностике и лечению ВПЧ - ассоциированных заболеваний шейки матки у женщин репродуктивного возраста / О.В.Качалина, Л.Д.Андосова, Д.Д.Елисеева, [и др.] // *Уральский медицинский журнал* – 2013. – № 4 (109) – С.41–45.
65. Lie, A.K. HPV genotype profile in a Norwegian cohort with ASC-US and LSIL cytology with three year cumulative risk of high grade cervical neoplasia / A.K.Lie, A.Tropé, G.B.Skare, [et al.] // *Gynecologic Oncology* – 2018. – Т. 148 – № 1 – С.111–117.
66. Бебнева, Т.Н. Тактика ведения беременных женщин с предраковыми процессами шейки матки / Т.Н.Бебнева, В.Е.Радзинский, И.Н.Костин, Л.В.Покуль // *Доктор.Ру.* – 2017. – № 9 (138) – С.33–37.
67. Мкртчян, Л.С. Распространённость вируса папилломы человека высокого канцерогенного риска при неопластических патологиях шейки матки. / Мкртчян Л.С., Каприн А.Д., Иванов С.А. [и др.] // *Радиация и риск* – 2018. – Т. 27 – № 3 – С.55–64.

68. Минкина, Г.Н. Распространенность различных типов вируса папилломы человека у женщин с цервикальной интраэпителиальной неоплазией тяжелой степени. / Г.Н.Минкина, А.М.Савичева, К.Холл, [и др.] // Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии – 2013. – Т. 12 – № 3 – С.32–37.
69. Роговская, С.И. Распространенность папилломавирусной инфекции в России / С.И.Роговская, И.В.Михеева, О.Ю.Шипулина, [и др.] // Эпидемиология и вакцинопрофилактика –2012 – №1 (62) – С.25–33.
70. Bruni, L. Human papillomavirus and related diseases in the World. Summary report 17 June 2019.// ICO/IARC Information Centre on HPV and Cancer (HPV Information Centre). [Электронный ресурс]. URL: <https://hvpcentre.net/statistics/reports/XWX.pdf> (accessed: 03.12.2020).
71. Vaccarella, S. Sexual Behavior, Condom Use, and Human Papillomavirus: Pooled Analysis of the IARC Human Papillomavirus Prevalence Surveys / S.Vaccarella // Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention – 2006. – Т. 15 – № 2 – С.326–333.
72. Мзарелуа, Г.М. Распространенность типов вируса папилломы человека у пациенток с цервикальными интра-эпителиальными неоплазиями различной степени тяжести. / Г.М.Мзарелуа, Н.М.Назарова, М.Е.Некрасова, [и др.] // Акушерство и гинекология – 2018. – № 4– С.94-100.
73. Aykut Tuncer, H. The Effect of Age on Cervical Cancer Screening in Women Aged 20-29 / H.Aykut Tuncer // Acta Clinica Croatica – 2020.
74. Kombe Kombe, A.J. Epidemiology and Burden of Human Papillomavirus and Related Diseases, Molecular Pathogenesis, and Vaccine Evaluation / A.J.Kombe Kombe, B.Li, A.Zahid , [et al.] // Frontiers in Public Health – 2021. – Т. 8.
75. Hwang, L.Y. Active Squamous Metaplasia of the Cervical Epithelium Is Associated With Subsequent Acquisition of Human Papillomavirus 16 Infection Among Healthy Young Women / L.Y.Hwang, Y.Ma, S.C.Shiboski, [et al.] // Journal of Infectious Diseases – 2012. – Т. 206 – № 4 – С.504–511.
76. Hildesheim, A. HPV co-factors related to the development of cervical cancer: Results from a population-based study in Costa Rica / A.Hildesheim, R.Herrero,

- P.E.Castle, [et al.] // *British Journal of Cancer* – 2001. – T. 84 – № 9 – C.1219–1226.
77. Schiffman M.H. Epidemiologic evidence showing that human papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia / M.H.Schiffman, H.M.Bauer, R.N.Hoover, [et al.] // *Journal of the National Cancer Institute* – 1993. – T. 85 – № 12 – C.958–964.
78. Appleby, P. Carcinoma of the cervix and tobacco smoking: Collaborative reanalysis of individual data on 13,541 women with carcinoma of the cervix and 23,017 women without carcinoma of the cervix from 23 epidemiological studies / P.Appleby, V.Beral, A.Berrington De González, [et al.] // *International Journal of Cancer* – 2006. – T. 118 – № 6 – C.1481–1495.
79. Jensen, K.E. Parity as a cofactor for high-grade cervical disease among women with persistent human papillomavirus infection: A 13-year follow-up / K.E.Jensen, S.Schmiedel, B.Norrild, [et al.] // *British Journal of Cancer* – 2013. – T. 108 – № 1 – C.234–239.
80. Nair, H.B. Induction of Aromatase Expression in Cervical Carcinomas: Effects of Endogenous Estrogen on Cervical Cancer Cell Proliferation / H.B.Nair, R.Luthra, N.Kirma, [et al.] // *Cancer Research* – 2005. – T. 65 – № 23 – C.11164–11173.
81. Delvenne, P. Role of hormone cofactors in the human papillomavirus-induced carcinogenesis of the uterine cervix / P.Delvenne, L.Herman, N.Kholod, [et al.] // *Molecular and Cellular Endocrinology* – 2007. – T. 264 – № 1–2 – C.1–5.
82. Nobbenhuis, M.A.E. High-risk human papillomavirus clearance in pregnant women: trends for lower clearance during pregnancy with a catch-up postpartum / M.A.E.Nobbenhuis, T.J.M.Helmerhorst, A.J.C. van den Brule, [et al.] // *British Journal of Cancer* – 2002. – T. 87 – № 1 – C.75–80.
83. Sethi, S. Serologic response to the E4, E6, and E7 proteins of human papillomavirus type 16 in pregnant women / S.Sethi, M.Müller, A.Schneider, [et al.] // *American Journal of Obstetrics and Gynecology* – 1998. – T. 178 – № 2 – C.360–364.
84. Roura, E. The Influence of Hormonal Factors on the Risk of Developing Cervical Cancer and Pre-Cancer: Results from the EPIC Cohort / E.Roura, N.Travier,

- T.Waterboer, [et al.] // PLOS ONE – 2016. – T. 11 – № 1 – C.e0147029.
85. Appleby, P. Cervical cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data for 16 573 women with cervical cancer and 35 509 women without cervical cancer from 24 epidemiological studies / P.Appleby, V. Beral, A. B. de González, [et al.] // The Lancet – 2007. – T. 370 – № 9599 – C.1609–1621.
86. Moreno, V. Effect of oral contraceptives on risk of cervical cancer in women with human papillomavirus infection: the IARC multicentric case-control study / V.Moreno, F.X.Bosch, N.Muñoz, [et al.] // The Lancet – 2002. – T. 359 – № 9312 – C.1085–1092.
87. Vaccarella, S. Reproductive Factors, Oral Contraceptive Use, and Human Papillomavirus Infection: Pooled Analysis of the IARC HPV Prevalence Surveys / S.Vaccarella, R.Herrero, M.Dai, [et al.] // Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention – 2006. – T. 15 – № 11 – C.2148–2153.
88. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans Tobacco smoke and involuntary smoking. / IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans // IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans – 2004. – T. 83 – C.1–1438.
89. Qiu, F. Impacts of cigarette smoking on immune responsiveness: Up and down or upside down? / F.Qiu, C.L.Liang, H.Liu, [et al.] // Oncotarget – 2017. – T. 8 – № 1 – C.268–284.
90. Syrjänen, K. Smoking is an independent risk factor for oncogenic human papillomavirus (HPV) infections but not for high-grade CIN / K.Syrjänen, I.Shabalova, N.Petrovichev, [et al.] // European Journal of Epidemiology – 2007. – T. 22 – № 10 – C.723–735.
91. Vaccarella, S. Smoking and human papillomavirus infection: pooled analysis of the International Agency for Research on Cancer HPV Prevalence Surveys / S.Vaccarella, R.Herrero, P.J.F.Snijders, [et al.] // International Journal of Epidemiology – 2008. – T. 37 – № 3 – C.536–546.
92. Xi, L.F. Relationship Between Cigarette Smoking and Human Papilloma Virus

- Types 16 and 18 DNA Load / L.F.Xi, L.A.Koutsky, P.E.Castle, [et al.] // *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* – 2009. – T. 18 – № 12 – C.3490–3496.
93. Koshiol, J. Smoking and Time to Clearance of Human Papillomavirus Infection in HIV-Seropositive and HIV-Seronegative Women / J.Koshiol, J.Schroeder, D.J.Jamieson, [et al.] // *American Journal of Epidemiology* – 2006. – T. 164 – № 2 – C.176–183.
94. Collins, S. Cigarette smoking is an independent risk factor for cervical intraepithelial neoplasia in young women: A longitudinal study / S.Collins, T.P.Rollason, [et al.] // *European Journal of Cancer* – 2010. – T. 46 – № 2 – C.405–411.
95. Byrne, M.M. Cancer screening behaviors among smokers and non-smokers / M.M.Byrne, E.P.Davila, W. Zhao, [et al.] // *Cancer Epidemiology* – 2010. – T. 34 – № 5 – C.611–617.
96. Bierman, R. Natural History of Cervicovaginal Papillomavirus Infection in Young Women GYF Ho / R.Bierman, L.Beardsley, C.J.Chang, R.D.Burk // *Journal of Lower Genital Tract Disease* – 1998. – T. 2 – № 4 – C.235.
97. Fouad, Y.A. Revisiting the hallmarks of cancer. / Y.A.Fouad, C.Aanei // *American journal of cancer research* – 2017. – T. 7 – № 5 – C.1016–1036.
98. Castle, P.E. An association of cervical inflammation with high-grade cervical neoplasia in women infected with oncogenic human papillomavirus (HPV). / P.E Castle., S.L.Hillier, L.K.Rabe, [et al.] // *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* – 2001. – T. 10 – № 10 – C.1021–7.
99. De Castro-Sobrinho, J.M. Bacterial vaginosis and inflammatory response showed association with severity of cervical neoplasia in HPV-positive women / J.M. de Castro-Sobrinho, S.H.Rabelo-Santos, R.R.Figueiredo-Alves, [et al.] // *Diagnostic Cytopathology* – 2016. – T. 44 – № 2 – C.80–86.
100. Chen, Y. Human papillomavirus infection and cervical intraepithelial neoplasia progression are associated with increased vaginal microbiome diversity in a Chinese

cohort / Y.Chen, X.Qiu, W.Wang, [et al.] // BMC Infectious Diseases – 2020. – T. 20 – № 1.

101. Liang, Y. A meta-analysis of the relationship between vaginal microecology, human papillomavirus infection and cervical intraepithelial neoplasia / Y.Liang, M.Chen, L.Qin, [et al.] // Infectious Agents and Cancer – 2019. – T. 14 – № 1 – C.29.

102. Xiao, S. Folate Deficiency Facilitates Genomic Integration of Human Papillomavirus Type 16 DNA In Vivo in a Novel Mouse Model for Rapid Oncogenic Transformation of Human Keratinocytes / S.Xiao, Y.-S.Tang, P.Kusumanchi, [et al.] // The Journal of Nutrition – 2018. – T. 148 – № 3 – C.389–400.

103. Hernandez, B.Y. Diet and premalignant lesions of the cervix: evidence of a protective role for folate, riboflavin, thiamin, and vitamin B12. / B.Y.Hernandez, K.McDuffie, L.R.Wilkens, [et al.] // Cancer causes & control : CCC – 2003. – T. 14 – № 9 – C.859–70.

104. Zheng, Z.-M. Regulation of cellular miRNA expression by human papillomaviruses / Z.-M.Zheng, X.Wang // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms – 2011. – T. 1809 – № 11–12 – C.668–677.

105. Grimson, A. MicroRNA Targeting Specificity in Mammals: Determinants beyond Seed Pairing / A.Grimson, K.K.-H.Farh, W.K.Johnston, [et al.] // Molecular Cell – 2007. – T. 27 – № 1 – C.91–105.

106. Cullen, B.R. Viruses and microRNAs / B.R.Cullen // Nature Genetics – 2006. – T. 38 – № S6 – C.S25–S30.

107. Farazi, T.A. miRNAs in human cancer / T.A.Farazi, J.I.Spitzer, P.Morozov, T.Tuschl // The Journal of Pathology – 2011. – T. 223 – № 2 – C.102–115.

108. Melo, S.A. Dysregulation of microRNAs in cancer: Playing with fire / S.A.Melo, M.Esteller // FEBS Letters – 2011. – T. 585 – № 13 – C.2087–2099.

109. Malumbres, M. miRNAs versus oncogenes: the power of social networking / M.Malumbres // Molecular Systems Biology – 2012. – T. 8 – № 1 – C.569.

110. Peng, Y. The role of MicroRNAs in human cancer / Y.Peng, C.M.Croce // Signal Transduction and Targeted Therapy – 2016. – T. 1 – № 1 – C.15004.

111. Tomari, Y. MicroRNA Biogenesis: Drosha Can't Cut It without a Partner /

- Y.Tomari, P.D.Zamore // *Current Biology* – 2005. – T. 15 – № 2 – C.R61–R64.
112. Baffa, R. MicroRNA expression profiling of human metastatic cancers identifies cancer gene targets / R.Baffa, M.Fassan, S.Volinia, [et al.] // *The Journal of Pathology* – 2009. – T. 219 – № 2 – C.214–221.
113. Pande, S. Human Papillomavirus Type 16 Variant Analysis of E6, E7, and L1 Genes and Long Control Region in Biopsy Samples from Cervical Cancer Patients in North India / S.Pande, N.Jain, B.K.Prusty, [et al.] // *Journal of Clinical Microbiology* – 2008. – T. 46 – № 3 – C.1060–1066.
114. Bischof, O. Human Papillomavirus Oncoprotein E7 Targets the Promyelocytic Leukemia Protein and Circumvents Cellular Senescence via the Rb and p53 Tumor Suppressor Pathways / O.Bischof, K.Nacerddine, A.Dejean // *Molecular and Cellular Biology* – 2005. – T. 25 – № 3 – C.1013–1024.
115. Tommasino, M. The role of TP53 in Cervical carcinogenesis / M.Tommasino, R.Accardi, S.Caldeira, [et al.] // *Human Mutation* – 2003. – T. 21 – № 3 – C.307–312.
116. Wang, Y.-W. HPV-18 E7 conjugates to c-Myc and mediates its transcriptional activity / Y.-W.Wang, H.-S.Chang, C.-H.Lin, W.C.Y.Yu // *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* – 2007. – T. 39 – № 2 – C.402–412.
117. Schmitz, M. Non-Random Integration of the HPV Genome in Cervical Cancer / M.Schmitz, C.Driesch, L.Jansen, [et al.] // *PLoS ONE* – 2012. – T. 7 – № 6 – C.e39632.
118. Pardini, B. MicroRNAs as markers of progression in cervical cancer: a systematic review / B.Pardini, D. De Maria, A.Francavilla, [et al.] // *BMC Cancer* – 2018. – T. 18 – № 1 – C.696.
119. Gocze, K. MicroRNA expressions in HPV-induced cervical dysplasia and cancer. / K.Gocze, K.Gombos, K.Kovacs, [et al.] // *Anticancer research* – 2015. – T. 35 – № 1 – C.523–30.
120. Li, B. Reduced miR-34a Expression in Normal Cervical Tissues and Cervical Lesions With High-Risk Human Papillomavirus Infection / Li B., Hu Y., Ye F., [et al.] // *International Journal of Gynecological Cancer* – 2010. – T. 20 – № 4 – C.597–

604.

121. Nuovo, G.J. Strong Inverse Correlation Between MicroRNA-125b and Human Papillomavirus DNA in Productive Infection / G.J.Nuovo, X.Wu, S.Volinia, [et al.] // *Diagnostic Molecular Pathology* – 2010. – T. 19 – № 3 – C.135–143.

122. Zhao, A. MicroRNA-125b Induces Cancer Cell Apoptosis Through Suppression of Bcl-2 Expression / A.Zhao, Q.Zeng, X.Xie, [et al.] // *Journal of Genetics and Genomics* – 2012. – T. 39 – № 1 – C.29–35.

123. Le, M.T.N. MicroRNA-125b is a novel negative regulator of p53 / M.T.N.Le, C.Teh, N.Shyh-Chang, [et al.] // *Genes & Development* – 2009. – T. 23 – № 7 – C.862–876.

124. Gunasekharan, V. Human Papillomaviruses Modulate MicroRNA 145 Expression To Directly Control Genome Amplification / V.Gunasekharan, L.A. Laimins // *Journal of Virology* – 2013. – T. 87 – № 10 – C.6037–6043.

125. Au, Yeung C.L. Human papillomavirus type 16 E6 induces cervical cancer cell migration through the p53/microRNA-23b/urokinase-type plasminogen activator pathway / C.L.Au Yeung, T.Y.Tsang, P.L.Yau, T.T.Kwok // *Oncogene* – 2011. – T. 30 – № 21 – C.2401–2410.

126. Georges, S.A. Coordinated Regulation of Cell Cycle Transcripts by p53-Inducible microRNAs, miR-192 and miR-215 / S.A.Georges, M.C.Biery, S.-Y.Kim, [et al.] // *Cancer Research* – 2008. – T. 68 – № 24 – C.10105–10112.

127. Braun, C.J. p53-Responsive MicroRNAs 192 and 215 Are Capable of Inducing Cell Cycle Arrest / C.J.Braun, X.Zhang, I.Savelyeva, [et al.] // *Cancer Research* – 2008. – T. 68 – № 24 – C.10094–10104.

128. Myklebust, M.P. MicroRNA-15b is induced with E2F-controlled genes in HPV-related cancer / M.P. Myklebust, O.Bruland, O.Fluge, [et al.] // *British Journal of Cancer* – 2011. – T. 105 – № 11 – C.1719–1725.

129. Liu, F. MicroRNA-27b up-regulated by human papillomavirus 16 E7 promotes proliferation and suppresses apoptosis by targeting polo-like kinase2 in cervical cancer / F.Liu, S.Zhang, Z.Zhao, [et al.] // *Oncotarget* – 2016. – T. 7 – № 15 – C.19666–19679.

130. Satopathy, S. MicroRNAs in HPV associated cancers: small players with big consequences / S.Satopathy, J.Batra, V.Jeet, [et al.] // *Expert Review of Molecular Diagnostics* – 2017. – T. 17 – № 7 – C.711–722.
131. Hou, X. Signaling Pathways that Facilitate Chronic Inflammation-Induced Carcinogenesis / X.Hou, F.Yang, W.Liu, [et al.] // *Journal of Cell Signaling* – 2016. – T. 01 – № 01.
132. Leung, C.O.N. miR-135a leads to cervical cancer cell transformation through regulation of  $\beta$ -catenin via a SIAH1-dependent ubiquitin proteosomal pathway / C.O.N.Leung, W.Deng, T.-M.Ye, [et al.] // *Carcinogenesis* – 2014. – T. 35 – № 9 – C.1931–1940.
133. Fan, J. miR-429 is involved in regulation of NF- $\kappa$ B activity by targeting IKK $\beta$  and suppresses oncogenic activity in cervical cancer cells / J.Fan, Y.Fan, X.Wang, [et al.] // *FEBS Letters* – 2017. – T. 591 – № 1 – C.118–128.
134. Feng, Y. Nuclear factor- $\kappa$ B-dependent microRNA-130a upregulation promotes cervical cancer cell growth by targeting phosphatase and tensin homolog / Y.Feng, S.Zhou, Li G., [et al.] // *Archives of Biochemistry and Biophysics* – 2016. – T. 598 – C.57–65.
135. Song, L. MiR-21 modulates radiosensitivity of cervical cancer through inhibiting autophagy via the PTEN/Akt/HIF-1 $\alpha$  feedback loop and the Akt-mTOR signaling pathway / L.Song, S.Liu, L.Zhang, [et al.] // *Tumor Biology* – 2016. – T. 37 – № 9 – C.12161–12168.
136. Xu, H. Inhibition of microRNA-181a may suppress proliferation and invasion and promote apoptosis of cervical cancer cells through the PTEN/Akt/FOXO1 pathway / H.Xu, J.Zhu, C.Hu, [et al.] // *Journal of Physiology and Biochemistry* – 2016. – T. 72 – № 4 – C.721–732.
137. Du, J. MicroRNA-221 targets PTEN to reduce the sensitivity of cervical cancer cells to gefitinib through the PI3K/Akt signaling pathway / J.Du., L.Wang, C.Li, [et al.] // *Tumor Biology* – 2016. – T. 37 – № 3 – C.3939–3947.
138. Zhao, Q. MicroRNA-491-5p suppresses cervical cancer cell growth by targeting hTERT / Q.Zhao, Y.-X.Zhai, H.-Q.Liu, [et al.] // *Oncology Reports* – 2015. – T. 34 –

№ 2 – C.979–986.

139. Yang, Y.-K. MicroRNA-494 promotes cervical cancer proliferation through the regulation of PTEN / Y.-K. Yang, W.-Y Xi., R.-X.Xi, [et al.] // *Oncology Reports* – 2015. – T. 33 – № 5 – C.2393–2401.

140. Hou, T. MicroRNA-196a promotes cervical cancer proliferation through the regulation of FOXO1 and p27Kip1 / T.Hou, J.Ou, X.Zhao, [et al.] // *British Journal of Cancer* – 2014. – T. 110 – № 5 – C.1260–1268.

141. Cong, J. MiR-634 decreases cell proliferation and induces apoptosis by targeting mTOR signaling pathway in cervical cancer cells / J.Cong, R.Liu, X.Wang, [et al.] // *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology* – 2016. – T. 44 – № 7 – C.1694–1701.

142. Wang, L. miR-99a and -99b inhibit cervical cancer cell proliferation and invasion by targeting mTOR signaling pathway / L.Wang, L.Chang, Z.Li, [et al.] // *Medical Oncology* – 2014. – T. 31 – № 5 – C.934.

143. Diamantis, A. Pioneers of exfoliative cytology in the 19th century: the predecessors of George Papanicolaou / A.Diamantis, E. Magiorkinis // *Cytopathology* – 2014. – T. 25 – № 4 – C.215–224.

144. Whitlock, E.P. Liquid-Based Cytology and Human Papillomavirus Testing to Screen for Cervical Cancer: A Systematic Review for the U.S. Preventive Services Task Force / E.P.Whitlock, K.K.Vesco, M.Eder, [et al.] // *Annals of Internal Medicine* – 2011. – T. 155 – № 10 – C.687.

145. Latsuzbaia, A. Introduction of liquid-based cytology and human papillomavirus testing in cervical cancer screening in Luxembourg / A.Latsuzbaia, G.Hebette, M.Fischer, [et al.] // *Diagnostic Cytopathology* – 2017. – T. 45 – № 5 – C.384–390.

146. Ito, K. A comparison of liquid-based and conventional cytology using data for cervical cancer screening from the Japan Cancer Society / K.Ito, R.Kimura, H.Konishi, [et al.] // *Japanese Journal of Clinical Oncology* – 2020. – T. 50 – № 2 – C.138–144.

147. Ronco, G. [Health technology assessment report. Use of liquid-based cytology for cervical cancer precursors screening]. / G.Ronco, M.Confortini, V.Maccallini, [et

- al.] // *Epidemiologia e prevenzione* – Т. 36 – № 5 Suppl 2 – С.е1–е33.
148. Arbyn, M. Human papillomavirus testing versus repeat cytology for triage of minor cytological cervical lesions / M.Arbyn, J.Roelens, C.Simoens, [et al.] // *Cochrane Database of Systematic Reviews* – 2013.
149. Oyervides-Muñoz, M.A. Multiple HPV Infections and Viral Load Association in Persistent Cervical Lesions in Mexican Women. / M.A.Oyervides-Muñoz, A.A.Pérez-Maya, C.N.Sánchez-Domínguez, [et al.] // *Viruses* – 2020. – Т. 12 – № 4.
150. Ершов, В.А. Репродукция вируса папилломы человека 16 генотипа и интеграция вирусной ДНК в измененном цервикальном эпителии. / В.А.Ершов, А.А.Вязовая, Е. В.Ильинская, [и др.] // *Онкология. Журнал им. П.А. Герцена.* – 2013. – Т. 2 – № 1 – С.21–26.
151. Gravitt, P.E. High load for most high risk human papillomavirus genotypes is associated with prevalent cervical cancer precursors but only HPV16 load predicts the development of incident disease / P.E.Gravitt, M.B.Kovacic, R.Herrero, [et al.] // *International Journal of Cancer* – 2007. – Т. 121 – № 12 – С.2787–2793.
152. Евстигнеева, Л.А. Роль генотипа вируса папилломы человека, множественности вируса, вирусной нагрузки и иммунного статуса в патогенезе рака шейки матки. / Л.А Евстигнеева., Е.В.Бахидзе, В.В.Семиглазов // *Ученые записки Санкт-Петербургского государственного университета им. акад. И.П. Павлова.* – 2008. – Т. 5 – № 12 – С.10–14.
153. Kyrgiou, M. Cervical screening: ESGO-EFC position paper of the European Society of Gynaecologic Oncology (ESGO) and the European Federation of Colposcopy (EFC) / Kyrgiou M., Arbyn M., Bergeron C., [et al.] // *British Journal of Cancer* – 2020. – Т. 123 – № 4 – С.510–517.
154. Bifulco, G. A prospective randomized study on limits of colposcopy and histology: the skill of colposcopist and colposcopy-guided biopsy in diagnosis of cervical intraepithelial lesions / G.Bifulco, N. De Rosa, G.Lavitola, [et al.] // *Infectious Agents and Cancer* – 2015. – Т. 10 – № 1 – С.47.
155. Müller, K. Accuracy of Colposcopically Guided Diagnostic Methods for the Detection of Cervical Intraepithelial Neoplasia / K.Müller, P.Soergel, P.Hillemanns,

M.Jentschke // Geburtshilfe und Frauenheilkunde – 2016. – Т. 76 – № 02 – С.182–187.

156. Brown, B.H. The diagnostic accuracy of colposcopy – A review of research methodology and impact on the outcomes of quality assurance / B.H.Brown, J.A.Tidy // European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology – 2019. – Т. 240 – С.182–186.

157. Boicea, A. Correlations between colposcopy and histologic results from colposcopically directed biopsy in cervical precancerous lesions. / A.Boicea, A.Pătraşcu, V.Surlin, [et al.] // Romanian journal of morphology and embryology = Revue roumaine de morphologie et embryologie – 2012. – Т. 53 – № 3 Suppl – С.735–41.

158. WHO Guidelines for Treatment of Cervical Intraepithelial Neoplasia 2–3 and Adenocarcinoma in situ: Cryotherapy, Large Loop Excision of the Transformation Zone, and Cold Knife Conization [Электронный ресурс]. URL: [https:// apps. who. int /iris/bitstream/handle/10665/104174/9789241506779\\_eng.pdf?sequence=1](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/104174/9789241506779_eng.pdf?sequence=1).

159. Железнов, Б.И. Опухоли женского полового тракта / Патологоанатомическая диагностика опухолей человека: Руководство для врачей под ред. Н.А.Краевского, А.В. Смоляникова, Д.С. Саркисова. 1993. - Т.2. - С.264-308.

160. Omori, M. Estimation of Prognoses for Cervical Intraepithelial Neoplasia 2 by p16 INK4a Immunoeexpression and High-Risk HPV In Situ Hybridization Signal Types / M.Omori, A.Hashi, K.Nakazawa, [et al.] // American Journal of Clinical Pathology – 2007. – Т. 128 – № 2 – С.208–217.

161. Giorgi Rossi, P. p16/ki67 and E6/E7 mRNA Accuracy and Prognostic Value in Triaging HPV DNA-Positive Women / P.Giorgi Rossi, F.Carozzi, G.Ronco, [et al.] // JNCI: Journal of the National Cancer Institute – 2021. – Т. 113 – № 3 – С.292–300.

162. Wentzensen, N. Filling a gap in cervical cancer screening programmes / N.Wentzensen, M.Schiffman // The Lancet Oncology – 2014. – Т. 15 – № 3 – С.249–251.

163. Malila, N. The HPV test has similar sensitivity but more overdiagnosis than the

Pap test-A randomised health services study on cervical cancer screening in Finland / N.Malila, M.Leinonen, L.Kotaniemi-Talonen, [et al.] // International Journal of Cancer – 2013. – T. 132 – № 9 – C.2141–2147.

164. He, Y. A systematic study on dysregulated microRNAs in cervical cancer development / Y.He, J.Lin, Y.Ding, [et al.] // International Journal of Cancer – 2016. – T. 138 – № 6 – C.1312–1327.

165. Lui, W.-O. Patterns of Known and Novel Small RNAs in Human Cervical Cancer / W.-O.Lui, N.Pourmand, B.K.Patterson, A. Fire // Cancer Research – 2007. – T. 67 – № 13 – C.6031–6043.

166. Wang, X. Aberrant Expression of Oncogenic and Tumor-Suppressive MicroRNAs in Cervical Cancer Is Required for Cancer Cell Growth / X.Wang, S.Tang, S.-Y.Le, [et al.] // PLoS ONE – 2008. – T. 3 – № 7 – C.e2557.

167. Pereira, P.M. MicroRNA Expression Variability in Human Cervical Tissues / P.M.Pereira, J.P.Marques, A.R.Soaes, [et al.] // PLoS ONE – 2010. – T. 5 – № 7 – C.e11780.

168. Zeng, K. Dysregulated microRNAs involved in the progression of cervical neoplasm / K.Zeng, W.Zheng, X.Mo, [et al.] // Archives of Gynecology and Obstetrics – 2015. – T. 292 – № 4 – C.905–913.

169. Li, Y. High-Risk Human Papillomavirus Reduces the Expression of MicroRNA-218 in Women with Cervical Intraepithelial Neoplasia / Y.Li, J.Liu, C.Yuan, [et al.] // Journal of International Medical Research – 2010. – T. 38 – № 5 – C.1730–1736.

170. Bierkens, M. Focal aberrations indicate EYA2 and hsa-miR-375 as oncogene and tumor suppressor in cervical carcinogenesis / M.Bierkens, O.Krijgsman, S.M.Wilting, [et al.] // Genes, Chromosomes and Cancer – 2013. – T. 52 – № 1 – C.56–68.

171. Cheung, T. Dysregulated microRNAs in the pathogenesis and progression of cervical neoplasm / T.Cheung, K.M.Man, M.Yu, [et al.] // Cell Cycle – 2012. – T. 11 – № 15 – C.2876–2884.

172. Villegas-Ruiz, V. Heterogeneity of microRNAs expression in cervical cancer cells: over-expression of miR-196a. / V.Villegas-Ruiz, S.Juárez-Méndez, O.A.Pérez-

- González, [et al.] // International journal of clinical and experimental pathology – 2014. – T. 7 – № 4 – C.1389–401.
173. Deftereos, G. Expression of Mir-21 and Mir-143 in Cervical Specimens Ranging from Histologically Normal through to Invasive Cervical Cancer / G.Deftereos, S.R Corrie., Q.Feng, [et al.] // PLoS ONE – 2011. – T. 6 – № 12 – C.e28423.
174. Shishodia, G. Alterations in microRNAs miR-21 and let-7a correlate with aberrant STAT3 signaling and downstream effects during cervical carcinogenesis / G.Shishodia, S.Shukla, Y.Srivastava, [et al.] // Molecular Cancer – 2015. – T. 14 – № 1 – C.116.
175. Bumrunghai, S. Up-Regulation of miR-21 Is Associated with Cervicitis and Human Papillomavirus Infection in Cervical Tissues / S.Bumrunghai, T.Ekalaksananan, M.F.Evans, [et al.] // PLOS ONE – 2015. – T. 10 – № 5 – C.e0127109.
176. Wang, X. microRNAs are biomarkers of oncogenic human papillomavirus infections / X.Wang, H.-K.Wang, Y. Li, [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences – 2014. – T. 111 – № 11 – C.4262–4267.
177. Mestdagh, P. Evaluation of quantitative miRNA expression platforms in the microRNA quality control (miRQC) study / P.Mestdagh, N.Hartmann, L.Baeriswyl, [et al.] // Nature Methods – 2014. – T. 11 – № 8 – C.809–815.
178. Tian, Q. MicroRNA Detection in Cervical Exfoliated Cells as a Triage for Human Papillomavirus–Positive Women / Q.Tian, Y.Li, F.Wang, [et al.] // JNCI: Journal of the National Cancer Institute – 2014. – T. 106 – № 9.
179. Ribeiro, J. miR-34a and miR-125b Expression in HPV Infection and Cervical Cancer Development. / J.Ribeiro, J.Marinho-Dias, P.Monteiro, [et al.] // BioMed research international – 2015. – T. 2015 – C.304584.
180. Kawai, S. Identification of miRNAs in cervical mucus as a novel diagnostic marker for cervical neoplasia / S.Kawai, T.Fujii, I.Kukimoto, [et al.] // Scientific Reports – 2018. – T. 8 – № 1 – C.7070.
181. Malta, M. Let-7c is a candidate biomarker for cervical intraepithelial lesions: a pilot study / M.Malta, J.Ribeiro, P.Monteiro, [et al.] // Molecular Diagnosis &

Therapy – 2015. – Т. 19 – № 3 – С.191–196.

182. The Bethesda System for Reporting Cervical Cytology // под ред. R. Nayar, D.C. Wilbur. – Cham: Springer International Publishing, 2015.

183. The 2014 Bethesda Cervical Cytology Web Atlas. [Электронный ресурс]. URL: <https://bethesda.soc.wisc.edu/index.htm> (accessed: 17.11.2020).

184. Международная классификация кольпоскопических терминов, одобренная в Рио-де-Жанейро, 2011, IFCPC [Электронный ресурс]. URL: <http://ragin-std.ru/assets/files/int-classification.pdf>.

185. Королюк, И.П. Медицинская информатика : Учебник / И. П. Королюк – Самара: 2 издание, перераб. и доп., 2012. Вып. ООО «Офорт– 244с.

186. Григорьев, С.Г. Роль и место логистической регрессии и ROC-анализа в решении медицинских диагностических задач. / С.Г.Григорьев, Ю.В.Лобзин, Н.В.Скрипченко // Журнал инфектологии . – 2016. – Т. 8 – № 4.

187. Haldorsen, T. Results of delayed triage by HPV testing and cytology in the Norwegian Cervical Cancer Screening Programme / T.Haldorsen, G.B.Skare, G.Ursin, T.Bjørge // Acta Oncologica – 2015. – Т. 54 – № 2 – С.200–209.

188. DeBritton, R.C. Human papillomaviruses and other influences on survival from cervical cancer in Panama. / R.C.DeBritton, A.Hildesheim, S.L. De Lao, [et al.] // Obstetrics and gynecology – 1993. – Т. 81 – № 1 – С.19–24.

189. Jenkins, D. Molecular and pathological basis of HPV -negative cervical adenocarcinoma seen in a global study / D.Jenkins, A.Molijn, S.Kazem, [et al.] // International Journal of Cancer – 2020. – Т. 147 – № 9 – С.2526–2536.

190. Banister, C.E. Identification and characterization of HPV-independent cervical cancers / C.E.Banister, C.Liu, L.Pirisi, [et al.] // Oncotarget – 2017. – Т. 8 – № 8 – С.13375–13386.

191. Tjalma, W.A.A. Cervical cancer screening: which HPV test should be used—L1 or E6/E7? / W.A.A.Tjalma, C.E.Depuydt // European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology – 2013. – Т. 170 – № 1 – С.45–46.

192. Vassilakos, P. HPV-negative CIN3 and cervical cancer in Switzerland: any evidence of impact on screening policies? / P.Vassilakos, P.L.Tranb, R. Sahlic, [et

- al.] // *Swiss Medical Weekly* – 2017. – T. 147 – w14559.
193. Petry, K.U. Surgical staging identified false HPV-negative cases in a large series of invasive cervical cancers / K.U.Petry, C.Liebrich, A.Luyten, // *Papillomavirus Research* – 2017. – T. 4 – C.85–89.
194. Guimerà, N. Laser capture microdissection shows HPV11 as both a causal and a coincidental infection in cervical cancer specimens with multiple HPV types / N.Guimerà, B.Lloveras, L.Alemaný, [et al.] // *Histopathology* – 2013. – T. 63 – № 2 – C.287–292.
195. Salazar, K.L. Multiple Human Papilloma Virus Infections and Their Impact on the Development of High-Risk Cervical Lesions / K.L.Salazar, H.S.Zhou, J.Xu, [et al.] // *Acta Cytologica* – 2015. – T. 59 – № 5 – C.391–398.
196. Schmitt, M. Multiple human papillomavirus infections with high viral loads are associated with cervical lesions but do not differentiate grades of cervical abnormalities. / M.Schmitt, C.Depuydt, I.Benoy, [et al.] // *Journal of clinical microbiology* – 2013. – T. 51 – № 5 – C.1458–64.
197. Méndez, F. Cervical Coinfection with Human Papillomavirus (HPV) Types and Possible Implications for the Prevention of Cervical Cancer by HPV Vaccines / F.Méndez, N.Muñoz, H. Posso, [et al.] // *The Journal of Infectious Diseases* – 2005. – T. 192 – № 7 – C.1158–1165.
198. Castle, P.E. A Prospective Study of High-Grade Cervical Neoplasia Risk Among Human Papillomavirus-Infected Women / P.E.Castle // *Cancer Spectrum Knowledge Environment* – 2002. – T. 94 – № 18 – C.1406–1414.
199. Remennick, L.I. Induced abortion as cancer risk factor: a review of epidemiological evidence. / L.I. Remennick // *Journal of Epidemiology & Community Health* – 1990. – T. 44 – № 4 – C.259–264.
200. Muñoz, N. Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: the IARC multicentric case-control study / N.Muñoz, S.Franceschi, C.Bosetti, [et al.] // *The Lancet* – 2002. – T. 359 – № 9312 – C.1093–1101.
201. Maina, G. Obstetric outcomes in patients who have undergone excisional treatment for high-grade cervical squamous intra-epithelial neoplasia / G.Maina,

R.Ribaldone, S.Danese, [et al.] // *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology* – 2019. – Т. 236 – С.210–213.

202. Simoens, C. Adverse obstetrical outcomes after treatment of precancerous cervical lesions: A Belgian multicentre study / C.Simoens, F.Goffin, P.Simon, [et al.] // *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology* – 2012. – Т. 119 – № 10 – С.1247–1255.

203. Kyrgiou, M. Adverse obstetric outcomes after local treatment for cervical preinvasive and early invasive disease according to cone depth: Systematic review and meta-analysis / M.Kyrgiou, A.Athanasiou, M.Paraskevasidi, [et al.] // *BMJ (Online)* – 2016. – Т. 354.

204. Heinonen, A. Risk of preterm birth in women with cervical intraepithelial neoplasia grade one: a population-based cohort study / A.Heinonen, M.Gissler, J.Paavonen, [et al.] // *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica* – 2018. – Т. 97 – № 2 – С.135–141.

205. Winer, R.L. Condom Use and the Risk of Genital Human Papillomavirus Infection in Young Women / R.L.Winer, J.P.Hughes, Q.Feng, [et al.] // *New England Journal of Medicine* – 2006. – Т. 354 – № 25 – С.2645–2654.

206. Skorstengaard, M. Condom use to enhance regression of cervical intraepithelial neoplasia: study protocol for a randomized controlled trial / M.Skorstengaard, J.Suhr, E.Lynge // *Trials* – 2019. – Т. 20 – № 1 – С.473.

207. Castellsagué, X. Intrauterine device use, cervical infection with human papillomavirus, and risk of cervical cancer: a pooled analysis of 26 epidemiological studies / X.Castellsagué, M.Díaz, S.Vaccarella, [et al.] // *The Lancet Oncology* – 2011. – Т. 12 – № 11 – С.1023–1031.

208. Conesa-Zamora, P. Immune responses against virus and tumor in cervical carcinogenesis: Treatment strategies for avoiding the HPV-induced immune escape / P.Conesa-Zamora // *Gynecologic Oncology* – 2013. – Т. 131 – № 2 – С.480–488.

209. Берлев, И.В. Значение оценки нарушений биоценоза влагалища в аспекте диагностики и лечения преинвазивных неоплазий шейки матки. / И.В.Берлев, Е.В.Бахидзе, П.А.Архангельская // *Журнал акушерства и женских болезней* –

2015. – T. LXIV – № 5 – C.16–21.

210. Coleman, J.S. Molecular Diagnosis of Bacterial Vaginosis: an Update / Coleman J.S., Gaydos C.A. // *Journal of Clinical Microbiology* – 2018. – T. 56 – № 9.

211. Plisko, O. Aerobic Vaginitis—Underestimated Risk Factor for Cervical Intraepithelial Neoplasia / O.Plisko, J.Zodzika, I.Jermakova, [et al.] // *Diagnostics* – 2021. – T. 11 – № 1 – C.97.

212. Madaan, N. Association of abnormal cervical cytology with coinfection of human papillomavirus and Chlamydia trachomatis / N.Madaan, D.Pandhi, V.Sharma, [et al.] // *Indian Journal of Sexually Transmitted Diseases and AIDS* – 2019. – T. 40 – № 1 – C.57.

213. Mitra, A. The vaginal microbiota, human papillomavirus infection and cervical intraepithelial neoplasia: what do we know and where are we going next? / A.Mitra, D.A.MacIntyre, J.R.Marchesi, [et al.] // *Microbiome* – 2016. – T. 4 – № 1 – C.58.

214. Gillet, E. Bacterial vaginosis is associated with uterine cervical human papillomavirus infection: a meta-analysis / E.Gillet, J.F.Meys, H.Verstraelen, [et al.] // *BMC Infectious Diseases* – 2011. – T. 11 – № 1 – C.10.

215. Lajer, C.B. The role of miRNAs in human papilloma virus (HPV)-associated cancers: bridging between HPV-related head and neck cancer and cervical cancer / C.B.Lajer, E.Garnæs, L.Friis-Hansen, [et al.] // *British Journal of Cancer* – 2012. – T. 106 – № 9 – C.1526–1534.

216. Ma, D. Profiling of microRNA-mRNA reveals roles of microRNAs in cervical cancer. / D.Ma, Y.-Y.Zhang, Y.-L.Guo, [et al.] // *Chinese medical journal* – 2012. – T. 125 – № 23 – C.4270–6.

217. Zhao S. MiR-20a Promotes Cervical Cancer Proliferation and Metastasis In Vitro and In Vivo / S.Zhao, D.Yao, J.Chen, [et al.] // *PLOS ONE* – 2015. – T. 10 – № 3 – C.e0120905.

218. Marabita, F. Normalization of circulating microRNA expression data obtained by quantitative real-time RT-PCR / F.Marabita, P. de Candia, A.Torri, [et al.] // *Briefings in Bioinformatics* – 2016. – T. 17 – № 2 – C.204–212.

219. Mestdagh, P. A novel and universal method for microRNA RT-qPCR data

- normalization / P.Mestdagh, P. Van Vlierberghe, A. De Weer, [et al.] // *Genome Biology* – 2009. – T. 10 – № 6 – C.R64.
220. Faraldi, M. Free Circulating miRNAs Measurement in Clinical Settings , 2018. – 113–139c.
221. Rotival, M. Population variation of miRNAs and isomiRs and their impact on human immunity to infection // *bioRxiv*. – 2020.
222. Liu, S.S. Oncogenic microRNA signature for early diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia and cancer / S.S.Liu, K.K.L.Chan, D.K.H.Chu, [et al.] // *Molecular Oncology* – 2018. – T. 12 – № 12 – C.2009–2022.
223. Rao, Q. Aberrant microRNA expression in human cervical carcinomas / Q.Rao, H.Zhou, Y.Peng, [et al.] // *Medical Oncology* – 2012. – T. 29 – № 2 – C.1242–1248.
224. Zhao, S. Aberrant Expression of miR-20a and miR-203 in Cervical Cancer / S.Zhao, D.-S.Yao, J.-Y.Chen, N.Ding // *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* – 2013. – T. 14 – № 4 – C.2289–2293.
225. Okoye, J.O. Comparable expression of miR-let-7b, miR-21, miR-182, miR-145, and p53 in serum and cervical cells: Diagnostic implications for early detection of cervical lesions. / J.O.Okoye, A.A.Ngokere, C.C.Onyenekwe, C.A.Erinle // *International journal of health sciences* – T. 13 – № 4 – C.29–38.
226. Park, S. MiR-9, miR-21, and miR-155 as potential biomarkers for HPV positive and negative cervical cancer / S.Park, K.Eom, J.Kim, [et al.] // *BMC Cancer* – 2017. – T. 17 – № 1 – C.658.
227. Wang, N. MiR-31 is an independent prognostic factor and functions as an oncomir in cervical cancer via targeting ARID1A / N.Wang, Y.Zhou, L.Zheng, H.Li // *Gynecologic Oncology* – 2014. – T. 134 – № 1 – C.129–137.
228. Zheng, W. miR-31 functions as an oncogene in cervical cancer / W.Zheng, Z.Liu, W.Zhang, X.Hu // *Archives of Gynecology and Obstetrics* – 2015. – T. 292 – № 5 – C.1083–1089.
229. Zhu, Y. MiR-21-5p, miR-34a, and human telomerase RNA component as surrogate markers for cervical cancer progression / Y.Zhu, Y.Han, T.Tian, [et al.] // *Pathology - Research and Practice* – 2018. – T. 214 – № 3 – C.374–379.

230. Wang, H. Plasma expression of miRNA-21, -214, -34a, and -200a in patients with persistent HPV infection and cervical lesions / H.Wang, D.Zhang, Q.Chen, Y.Hong // *BMC Cancer* – 2019. – T. 19 – № 1 – C.986.
231. Wang, X. Oncogenic HPV infection interrupts the expression of tumor-suppressive miR-34a through viral oncoprotein E6 / X.Wang, H.-K.Wang, J.P.McCoy, [et al.] // *RNA* – 2009. – T. 15 – № 4 – C.637–647.
232. Gao, C. MicroRNA expression in cervical cancer: Novel diagnostic and prognostic biomarkers / C.Gao, C.Zhou, J.Zhuang, [et al.] // *Journal of Cellular Biochemistry* – 2018. – T. 119 – № 8 – C.7080–7090.
233. Fan, Y. LncRNA PTENP1 inhibits cervical cancer progression by suppressing miR-106b / Y.Fan, W.Sheng, Y.Meng, [et al.] // *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology* – 2020.
234. Yi, Y. Reconstruction and analysis of circRNA-miRNA-mRNA network in the pathology of cervical cancer / Y.Yi, Y.Liu, W.Wu, [et al.] // *Oncology Reports* – 2019.
235. Yan, Z. Polymorphisms in miRNA genes play roles in the initiation and development of cervical cancer / Z.Yan, Z.Zhou, Li C., [et al.] // *Journal of Cancer* – 2019. – T. 10 – № 20 – C.4747–4753.
236. Xu, J. The inhibition of miR-126 in cell migration and invasion of cervical cancer through regulating ZEB1 / J.Xu, H.Wang., H.Wang, [et al.] // *Hereditas* – 2019. – T. 156 – № 1 – C.11.
237. Wang, C. miR-126-5p Restoration Promotes Cell Apoptosis in Cervical Cancer by Targeting Bcl2l2 / C.Wang, B.Zhou, M.Liu, [et al.] // *Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics* – 2017. – T. 25 – № 4 – C.463–470.
238. Chen, Z. MicroRNA-1297 contributes to the progression of human cervical carcinoma through PTEN / Z.Chen, M.Zhang, Y.Qiao, [et al.] // *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology* – 2018. – T. 46 – № sup2 – C.1120–1126.
239. Peta, E. HPV16 E6 and E7 upregulate the histone lysine demethylase KDM2B through the c-MYC/miR-146a-5p axys / E.Peta, A.Sinigaglia, G.Masi, [et al.] //

- Oncogene – 2018. – T. 37 – № 12 – C.1654–1668.
240. Xu, J. Transcriptome analysis uncovers the diagnostic value of miR-192-5p/HNF1A-AS1/VIL1 panel in cervical adenocarcinoma / J.Xu, J.Zou, L.Wu, W.Lu // *Scientific Reports* – 2020. – T. 10 – № 1 – C.16584.
241. Lee, H. MicroRNA expression profiling and Notch1 and Notch2 expression in minimal deviation adenocarcinoma of uterine cervix / H.Lee, K.Kim, N.Cho, [et al.] // *World Journal of Surgical Oncology* – 2014. – T. 12 – № 1 – C.334.
242. Zhao, X. miR-196b is a prognostic factor of human laryngeal squamous cell carcinoma and promotes tumor progression by targeting SOCS2 / X.Zhao, W.Zhang, W.Ji // *Biochemical and Biophysical Research Communications* – 2018. – T. 501 – № 2 – C.584–592.
243. How, C. MicroRNA-196b Regulates the Homeobox B7-Vascular Endothelial Growth Factor Axis in Cervical Cancer / C.How, A.B.Y.Hui, N.M.Alajez, [et al.] // *PLoS ONE* – 2013. – T. 8 – № 7 – C.e67846.
244. Botezatu, A. Quantitative analysis of the relationship between microRNA-124a, -34b and -203 gene methylation and cervical oncogenesis / A.Botezatu // *Molecular Medicine Reports* – 2010.
245. Yu, X. miR-375 Affects the Proliferation, Invasion, and Apoptosis of HPV16-Positive Human Cervical Cancer Cells by Targeting IGF-1R / X.Yu, W.Zhao, X.Yang, [et al.] // *International Journal of Gynecologic Cancer* – 2016. – T. 26 – № 5 – C.851–858.
246. Wang, F. miR-375 Is Down-Regulated in Squamous Cervical Cancer and Inhibits Cell Migration and Invasion via Targeting Transcription Factor SP1 / F.Wang, Y.Li, J.Zhou, [et al.] // *The American Journal of Pathology* – 2011. – T. 179 – № 5 – C.2580–2588.
247. Yang, Y. Down-regulation of miR-1246 in cervical cancer tissues and its clinical significance / Y.Yang, Y.J Xie., Q.Xu, // *Gynecologic Oncology* – 2015. – T. 138 – № 3 – C.683–688.
248. Du, P. Lentivirus media miR-1246 knockdown inhibits tumor growth and promotes apoptosis of SiHa cells. / P.Du, Y.H.Lai, D.S.Yao, [et al.] // *Zhonghua fu*

- chan ke za zhi – 2018. – Т. 53 – № 7 – С.481–486.
249. Nagamitsu, Y. Profiling analysis of circulating microRNA expression in cervical cancer / Y.Nagamitsu , H.Nishi, T.Sasaki, [et al.] // *Molecular and Clinical Oncology* – 2016. – Т. 5 – № 1 – С.189–194.
250. База данных микроРНК [Электронный ресурс]. URL: [http:// microrna.sanger. ac.uk](http://microrna.sanger.ac.uk).
251. Hou, R. MicroRNA-10b inhibits proliferation, migration and invasion in cervical cancer cells via direct targeting of insulin-like growth factor-1 receptor / R.Hou, D.Wang, J.Lu// *Oncology Letters* – 2017. – Т. 13 – № 6 – С.5009–5015.
252. Zou, D. The Downregulation of MicroRNA-10b and its Role in Cervical Cancer / D.Zou, Q.Zhou, D.Wang, [et al.] // *Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics* – 2016. – Т. 24 – № 2 – С.99–108.
253. Yu, M. miR-10b Downregulated by DNA Methylation Acts as a Tumor Suppressor in HPV-Positive Cervical Cancer via Targeting Tiam1 / M.Yu, Y.Xu, L.Pan, [et al.] // *Cellular Physiology and Biochemistry* – 2018. – Т. 51 – № 4 – С.1763–1777.
254. Ding, Z. MiR-16 inhibits proliferation of cervical cancer cells by regulating KRAS / Z.Ding, S.J.Liu, X.W.Liu, [et al.] // *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* – 2020.
255. Szekerczés, T. Increased miR-20b Level in High Grade Cervical Intraepithelial Neoplasia / T.Szekerczes, A.Galamb, N.Varga, [et al.] // *Pathology & Oncology Research* – 2020. – Т. 26 – № 4 – С.2633–2640.
256. Li, Y. Chemotherapy-mediated miR-29b expression inhibits the invasion and angiogenesis of cervical cancer / Y.Li, Z.Zhang, Z.Xiao, [et al.] // *Oncotarget* – 2017. – Т. 8 – № 9 – С.14655–14665.
257. Wang, X. miR-143 is downregulated in cervical cancer and promotes apoptosis and inhibits tumor formation by targeting Bcl-2 / X.Wang // *Molecular Medicine Reports* – 2011.
258. Tang, T. MicroRNA-182 plays an onco-miRNA role in cervical cancer. / T.Tang, H.K.Wong, W.Gu, [et al.] // *Gynecologic oncology* – 2013. – Т. 129 – № 1 –

C.199–208.

259. Chen, J. The high-risk HPV oncogene E7 upregulates miR-182 expression through the TGF- $\beta$ /Smad pathway in cervical cancer / J.Chen, Y.Deng, L.Ao, [et al.] // Cancer Letters – 2019. – T. 460 – C.75–85.

260. Mei, J. MicroRNA-200c suppressed cervical cancer cell metastasis and growth via targeting MAP4K4 / J.Mei, D.H.Wang, L.L.Wang, [et al.] // European Review for Medical and Pharmacological Sciences – 2018. – T. 22 – № 3 – C.623–631.

261. Yang, W. LncRNA GAS5 suppresses the tumorigenesis of cervical cancer by downregulating miR-196a and miR-205 / W.Yang, L.Hong L., X.Xu , [et al.] // Tumor Biology – 2017. – T. 39 – № 7 – C.1-10.