

На правах рукописи

АНДОСОВА ЛАРИСА ДМИТРИЕВНА

КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНЫЕ АСПЕКТЫ В ОЦЕНКЕ
ЗАБОЛЕВАНИЙ ШЕЙКИ МАТКИ ПРИ
ПАПИЛЛОМАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

14.03.10 – клиническая лабораторная диагностика

А в т о р е ф е р а т

диссертации на соискание ученой степени

доктора медицинских наук

Нижний Новгород – 2014

Работа выполнена в ГБОУ ВПО «Нижегородская государственная медицинская академия» Минздрава России

Научный консультант:

Конторщикова Клавдия Николаевна – доктор биологических наук, профессор

Официальные оппоненты:

Эмануэль Владимир Леонидович – доктор медицинских наук, профессор, ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Минздрава России, кафедра клинической лабораторной диагностики с курсом молекулярной медицины, заведующий;

Плотникова Надежда Алексеевна – доктор медицинских наук, профессор, Медицинский институт ФГБОУ ВПО «Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва», кафедра патологии с курсом патологической физиологии, заведующая;

Короленкова Любовь Ивановна – доктор медицинских наук, ФГБНУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина», отделение научно-консультативное, старший научный сотрудник.

Ведущая организация: ГБОУ ВПО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России

Защита состоится 18 марта 2015 года в 10 часов на заседании диссертационного совета Д 208.071.04 при ГБОУ ДПО «Российская медицинская академия последипломного образования» Минздрава России по адресу: 125993, г. Москва, ул. Баррикадная, д.2/1

С диссертацией можно ознакомиться в фундаментальной библиотеке ГБОУ ДПО РМАПО Минздрава России по адресу: 125445, г. Москва, ул. Беломорская, д.19 и на сайте РМАПО <http://www.rmapo.ru>

Автореферат разослан « ____ » _____ 2014г.

Ученый секретарь диссертационного совета

доктор медицинских наук,
профессор

Луговская Светлана Алексеевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

На сегодняшний день одной из наиболее значимых инфекций вирусной этиологии, передающихся половым путем, является папилломавирусная инфекция (ПВИ). Актуальность проблемы ПВИ определяется ростом заболеваемости во всем мире, значительной контагиозностью и высоким онкогенным потенциалом данного возбудителя. ПВИ обусловлена вирусом папилломы человека (ВПЧ), встречается у 30,3% населения европейского региона России и у 44,3% пациенток, обращающихся в гинекологическую клинику (Радзинский В.Е., 2007; Роговская С.И., Прилепская В.Н., 2008; Трофимов Д.Ю., 2012). Инфицирование ВПЧ ассоциировано с риском возникновения цервикальных интраэпителиальных неоплазий (ЦИН) и инвазивных опухолей. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), рак шейки матки (РШМ) занимает второе место в мире по частоте среди злокачественных новообразований органов репродуктивной системы у женщин. Заболеваемость РШМ в России остается на одном из первых мест и за последние 10 лет увеличилась с 15,1 до 17,3 на 100 000 населения (Чиссов В.И. с соавт., 2010). РШМ занимает первое место среди всех онкологических заболеваний у женщин в возрасте до 30 лет (Козаченко В.П., 2012; Jemal A. et al., 2006).

В результате проведенных эпидемиологических и клинических исследований установлено, что ВПЧ высокого онкогенного риска является важнейшим фактором в канцерогенезе шейки матки, однако, механизмы, определяющие характер и течение патологического процесса, обусловленного ВПЧ, риск развития злокачественной трансформации цервикального эпителия полностью не изучены (Бибнева Т.Н., 2007; Кисина В.И., Кубанов А.А., 2005; Липова Е.В., 2012; Минкина Г.Н., 2010; Прилепская В.Н., 2011; Hausen H., 2009).

Ключевым событием в злокачественной трансформации эпителиальных клеток считается интеграция вирусной ДНК в ДНК клетки «хозяина». Несмотря на то, что явление интеграции вирусной ДНК активно изучается, имеющиеся данные не позволяют однозначно оценить его клиническое значение. Большой интерес представляет взаимосвязь микробиоценоза урогенитального тракта и состояния слизистой оболочки шейки матки (Аганезова Н.В., 2008; Костава М.Н., 2012; Минкина Г.Н., 2008; Покровский В.И., 2006;

Рудакова Е.Б., 2010; Maeda S., Deguchi T., Ishiko H., 2008). Согласно существующим наблюдениям, важную роль в генезе развития неопластических изменений шейки матки при ПВИ играет система иммунитета, в первую очередь, локальная защита репродуктивного тракта женщины (Манухин И.Б., 2010; Мынбаев В.Н., 2011; Нестерова И.В., 2008; Семенов Д.М. с соавт., 2008; Шварц Г.Я., 2011; Rudolf S. et al., 2010). ВПЧ не вызывает системного или сильного локального иммунного ответа, так как не относится к классу литических вирусов. Инфицирование не сопровождается воспалительной реакцией, также для ВПЧ-обусловленных эпителиальных процессов не характерна виремия (Шульженко А.Е., 2014; Stanley M., 2009). Неопластические клетки способны уклоняться от иммунных механизмов контроля, что сопровождается формированием толерантности и иммуносупрессии (Stern P., Kitchener H., 2009). Непосредственными участниками этих процессов являются регуляторные Т-клетки (T-reg) и цитокины – интерлейкин (ИЛ) 10 и трансформирующий фактор роста бета (ТФР-β), которые в норме играют существенную роль в поддержании иммунного гомеостаза (Олейник Е.К., 2013; Уразова О.И., 2011). Как и почему повышается активность Т-reg при неоплазиях, каковы взаимоотношения опухоли с Т-reg остается неясным. Поэтому изучение закономерностей формирования иммунного ответа при ПВИ, баланса супрессирующих цитокинов, механизмов их активации позволит не только составить представление о роли иммунной системы в канцерогенезе, но и может быть основой для более эффективного решения диагностических задач.

Общепринято, что мишенью для воздействия онкогенных типов ВПЧ является зона трансформации шейки матки, где и развиваются предраковые изменения. Данные цитологических исследований продемонстрировали, что между плоскоклеточными интраэпителиальными поражениями низкой (LSIL) и высокой (HSIL) степени не всегда имеется отчетливо воспроизводимая диагностическая граница (Ганцев Ш.Х., 2011; Дисаи Ф. Дж., Крисман У.Т., 2011; Подистов Ю.И. с соавт., 2003; Smith A.E. et al., 2010; Woodhouse S.L. et al., 2009). Проблема усугубляется тем, что плоскоклеточные интраэпителиальные поражения высокой степени (high-grade squamous intraepithelial lesions, HSIL) часто существуют одновременно с плоскоклеточными интраэпителиальными

поражениями низкой степени (low-grade squamous intraepithelial lesions, LSIL), клетки которых могут доминировать и маскировать поражения высокой степени (HSIL) (Ашрафян Л.А., Киселев В.И., 2008). Более того, цитологические мазки, классифицированные в соответствии с Терминологической системой Бетесда (Terminology Bethesda System, TBS), не всегда точно соответствуют гистологическому диагнозу. Так, при последующем гистологическом исследовании менее тяжелое поражение было выявлено у 35%, а более тяжелое у 31% пациенток (Massad L.S. et al., 2001). В связи с этим возникает необходимость разработки новых путей диагностики, более эффективных и беспристрастных, с учетом особенностей патогенеза заболевания и поведения вируса папилломы при неопластических поражениях шейки матки. В частности, для повышения качества диагностики цервикальных поражений актуальным является внедрение в клиническую практику новых высокоинформативных лабораторных методов, включая методы определения биомаркеров p16 и E7 ВПЧ, трансформирующих факторов роста.

Таким образом, широкая распространенность ВПЧ-ассоциированных заболеваний шейки матки, возможность развития тяжелых осложнений, в том числе злокачественной патологии, трудности в оценке характера протекающего инфекционно-воспалительного процесса, необходимость получения новых знаний об особенностях этиопатогенеза ВПЧ-инфицирования определяют актуальность исследования.

Степень разработанности темы

Литературные данные свидетельствуют о том, что проблеме заболеваний шейки матки при ПВИ посвящено значительное количество исследований, в которых рассматриваются этиологические, клинические, морфологические аспекты этой сложной формы патологии гениталий. Отдельные стороны вопроса достаточно изучены и представлены в работах отечественных и зарубежных ученых (Ашрафян Л.А.; Бебнева Т.Н.; Качалина Т.С.; Киселев В.И.; Козаченко В.П.; Краснопольский В.И.; Куевда Д.А.; Липова Е.В.; Минкина Г.Н.; Муйжнек Е.Л.; Подзолкова Н.М.; Полонская Н.Ю.; Прилепская В.Н.; Роговская С.И.; Савичева А.М.; Шабалова И.П.; Шахова Н.М.; Шипулина О.Ю.; Bosch X.; Hausen H.; P'yasova D.; Kesic V.; Munoz N.; Sherman M.E.; Szarewski A.; Wright

V. и другие). Предпринятые усилия, в частности, показали, что имеют место ошибки в дифференциальной диагностике эпителиальных поражений шейки матки. Разделение патологических изменений на две категории – плоскоклеточные интраэпителиальные поражения низкой (LSIL) и высокой (HSIL) степени часто бывает субъективным и недостоверным, что выявляется при цитоморфологических сопоставлениях. До настоящего времени не определены в полной мере лабораторные критерии различий плоскоклеточных интраэпителиальных ВПЧ-обусловленных поражений шейки матки.

Некоторые вопросы диагностики также не имеют окончательного ответа в связи с противоречивыми результатами исследований и отсутствием единого патогенетического подхода к распознаванию, терапии и профилактике ВПЧ-ассоциированных заболеваний. Неопределенными остаются некоторые инфекционные факторы ВПЧ, состав микробиоценоза урогенитального биотопа, особенности локального иммунитета. В значительной части эти исследования охватывают оценку вагинального микробиоценоза с позиции только микробиологических исследований (Анكيرская А.С., 2010; Савичева А.М., 2008; Шипицына Е.В., 2004). Состояние иммунитета изучалось в соответствии с морфологической классификацией заболеваний шейки матки без учета патогенетических особенностей развития ПВИ (Абрамовских О.С., 2010; Зароченцева Н.В., 2012; Минкина Г.Н., 2010; Подистов Ю.И., 2006; Серова О.Ф., 2012; Herdman M. et al., 2006; Russomano F., 2004; Seresini S. et al., 2007). В серии предыдущих исследований было показано значение определения биомаркеров p16, E7 при дисплазии и РШМ (Ахметзянова А.В., 2012; Городецкая С.Б., 2010; Евстигнеева Н.П., 2007; Короленкова Л.И., 2010; Раскин Г.А., 2009; Роговская С.И., 2011; Bottley G. et al., 2008; Mao C. et al., 2007; Schledermann D. et al., 2008). В свою очередь, опубликованы лишь единичные исследования, посвященные анализу одновременного выявления биомаркеров p16 и E7, в том числе применительно к амбулаторным условиям и с учетом патогенетических аспектов развития ПВИ (Клинышкова Т.В., Самосудова И.Б., 2012; Schmidt D. et al., 2011).

Можно заключить, что определение клинико-лабораторных показателей в оценке состояния цервикального матрикса требует дополнительных исследований, что откроет возможности для диагностики и профилактики ВПЧ-зависимых заболеваний.

Цель исследования: определить диагностические аспекты молекулярно-биологических и иммунологических показателей цервикального матрикса и их взаимосвязь в системе «вирус – клетка – ткань» при заболеваниях шейки матки, ассоциированных с папилломавирусной инфекцией.

Задачи исследования:

1. Провести анализ совместной экспрессии протеинов p16 и E7 в слизи цервикального канала у женщин с латентной формой папилломавирусной инфекции, предраковыми заболеваниями и при раке шейки матки с определением качественных и количественных характеристик ВПЧ-инфицирования.

2. Исследовать состояние вагинального биоценоза с помощью метода ПЦР в режиме «реального времени» (ПЦР-РВ) у пациенток вышеуказанных групп.

3. Установить характер локальных иммунологических нарушений при патологии шейки матки, обусловленной продуктивной или интегративной стадиями папилломавирусной инфекции.

4. Изучить лабораторные характеристики плоскоклеточных интраэпителиальных поражений шейки матки низкой (LSIL) и высокой (HSIL) степени с целью определения эффективных и объективных способов их дифференциальной диагностики.

5. Разработать с помощью регрессионного анализа молекулярно-биологические и иммунологические критерии прогрессии эпителиальных поражений инфекционного генеза.

Научная новизна

Доказано, что протеин p16 является значимым лабораторным показателем, дополнительным критерием различий плоскоклеточных интраэпителиальных ВПЧ-ассоциированных поражений шейки матки низкой (LSIL) и высокой (HSIL) степени. Экспрессия белка E7 ВПЧ не может служить критерием в диагностике данных патологических состояний, а также РШМ.

Приоритетными являются результаты, свидетельствующие о том, что дисбиотические нарушения в микроэкологии влагалища, установленные методом ПЦР-РВ с определением количественных соотношений групп микроорганизмов в биоценозе, являются сопутствующим фактором тяжести цервикального поражения, а также маркером супрессивных нарушений в местной иммунной

системе при ВПЧ-зависимых патологических процессах шейки матки. Обнаружено, что оценку микробиоценоза урогенитального тракта у женщин с вирус-детерминированной цервикальной патологией необходимо проводить с обязательным учетом сохранности нормофлоры. Только целостная система количественной оценки баланса биоты методом ПЦР-РВ выявляет различия в группах плоскоклеточных интраэпителиальных поражений шейки матки низкой (LSIL) и высокой (HSIL) степени.

Впервые получены сведения о том, что характер локальных иммунологических нарушений имеет особенности, обусловленные продуктивной и интегративной стадиями ВПЧ-инфекции. Цитоморфологические формы цервикальной патологии не отражают патогенетические аспекты формирования иммунитета при ПВИ.

Впервые дана комплексная оценка качественных и количественных показателей ВПЧ-инфицирования, иммунологических данных цервикальной слизи и микробиоценоза урогенитального тракта, выявлены корреляции, позволившие определить диагностическую значимость лабораторных тестов в оценке заболеваний шейки матки при ПВИ.

Сформулирована концепция лабораторных характеристик цитоморфологического диагноза плоскоклеточных интраэпителиальных ВПЧ-ассоциированных поражений шейки матки низкой (LSIL) и высокой (HSIL) степени. Доказана возможность использовать клиничко-лабораторные тесты в оценке различий цервикальных патологических процессов.

Усовершенствован алгоритм клиничко-лабораторной диагностики ВПЧ-обусловленной цервикальной патологии. Предложены математические критерии прогрессии плоскоклеточных интраэпителиальных поражений шейки матки с помощью исследования экспрессии протеинов p16 и E7, комплексной оценки микробиоценоза влагалища, определения ТФР- β .

Практическая значимость

Акушерско-гинекологической практике предложен алгоритм лабораторной диагностики патологии шейки матки. Последовательность методов предусматривает использование передовых лабораторных технологий: иммуноцитохимического исследования биомаркера p16, метода ПЦР-РВ для оценки микробиоценоза урогенитального тракта, иммуноферментного

анализа для изучения экспрессии протеина E7, ТФР-β. Перечисленные лабораторные тесты дополняют традиционное цитологическое исследование, определяют, насколько активным является вирус, снижают риск ошибок в оценке степени поражения шейки матки и позволяют выбрать необходимый объем лечебных мероприятий.

Положения, выносимые на защиту

1. Дисбиоз вагинального биотопа сопутствует тяжести цервикального поражения, выступает маркером супрессивных нарушений в местной иммунной системе при ВПЧ-ассоциированных плоскоклеточных интраэпителиальных поражениях шейки матки.

2. Характер локальных иммунологических нарушений при ВПЧ-зависимой цервикальной патологии имеет особенности, обусловленные патогенетическими формами, продуктивной и интегративной стадиями папилломавирусной инфекции.

3. Экспрессия биомаркера p16, дисбиотические нарушения в микроэкологии влагалища, гиперпродукция ТФР-β являются значимыми лабораторными показателями плоскоклеточных интраэпителиальных поражений шейки матки низкой (LSIL) и высокой (HSIL) степени, дополнительными критериями различий данных патологических процессов при ВПЧ-инфекции.

Соответствие диссертации Паспорту научной специальности

Диссертационное исследование проведено в соответствии с формулой специальности 14.03.10 – «Клиническая лабораторная диагностика», занимающейся разработкой лабораторных методов объективного химического и морфологического анализа биологических материалов (жидкостей, тканей, клеток) человеческого организма; оценкой с помощью этих методов патологических нарушений в деятельности органов, систем организма человека; установлением диагнозов болезней и осуществлением лабораторного контроля за динамикой патологического процесса (пп.1, 2 и 4 области исследования).

Внедрение результатов исследования в практику

Обоснованный алгоритм лабораторной диагностики ВПЧ-зависимой патологии шейки матки внедрен в практику работы учреждений здравоохранения Нижегородской области и г.Нижнего Новгорода: «Нижегородский областной онкологический диспансер», «Родильный дом № 1 Нижегородского района», «Родильный дом № 3

Автозаводского района», «Нижегородская областная клиническая больница им. Н.А. Семашко», медицинского центра «Александрия». Разработанные диссертационные положения включены в программу повышения квалификации врачей, врачей-интернов на кафедрах клинической лабораторной диагностики, онкологии, акушерства и гинекологии ГБОУ ВПО «Нижегородская государственная медицинская академия» Минздрава России (ГБОУ ВПО НижГМА Минздрава России).

Публикации

По материалам диссертации опубликована 61 печатная работа, в том числе 27 из перечня изданий, рекомендованных ВАК РФ (из них 8 статей в изданиях, включенных в международные базы цитирования).

Личное участие соискателя в получении результатов работы

Автором были выполнены отбор пациенток для исследования, составление анкет, индивидуальных карт. Результаты клинко-лабораторных показателей по оценке заболеваний шейки матки проанализированы в соответствии с критериями, разработанными соискателем для формирования базы данных и статистической обработки материалов. Автором лично проведены лабораторные исследования с использованием молекулярно-биологических, иммунологических технологий, разработан алгоритм клинко-лабораторной диагностики ВПЧ-ассоциированной патологии шейки матки. Были подготовлены в качестве первого автора доклады, статьи.

Апробация материалов диссертации

Диссертация апробирована на совместном заседании проблемной комиссии «Регенерация, адаптация, функциональная морфология и гомеостаз» ГБОУ ВПО НижГМА Минздрава России, кафедры травматологии, ортопедии и военно-полевой хирургии ГБОУ ВПО НижГМА Минздрава России, кафедры хирургии ЦПК и ППС (курса травматологии и ортопедии) при ГБОУ ВПО НижГМА Минздрава России, отделения экспериментальной медицины и отделения термической травмы ФГБУ «ННИИТО» Минздрава России (протокол № 2) от 20 февраля 2014 г.

Результаты исследования были опубликованы и представлены на конференциях, форумах, съездах российского и международного значения: Всероссийская научно-практическая конференция

«Лабораторная медицина в свете Концепции развития здравоохранения России до 2020 года» (Москва 2009), Научная конференция молодых ученых с международным участием «Актуальные вопросы инфекционной патологии – 2009» (Санкт-Петербург 2009), III Междисциплинарная научно-практическая конференция «Урогенитальные инфекции и репродуктивное здоровье: клиничко-лабораторная диагностика и терапия» (Москва 2010), VII Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Молекулярная диагностика-2010» (Москва 2010), XVI научно-практическая конференция «Высокие технологии и модернизация в лабораторной медицине» (Москва 2011), XII Всероссийский научный форум «Мать и дитя» (Москва 2011), Всероссийский конгресс с международным участием «Новые технологии в диагностике и лечении гинекологических заболеваний» (Москва 2011), Всероссийский конгресс с международным участием «Амбулаторно-поликлиническая практика – в эпицентре женского здоровья» (Москва 2012), Международный междисциплинарный форум «Шейка матки и вульвовагинальные болезни» (Москва 2012), XIV Всероссийский научный форум «Мать и дитя» (Москва 2013), Межрегиональная научно-практическая конференция врачей-лаборантов Приволжского федерального округа и России «Роль лабораторной диагностики в прогнозировании и профилактике развития заболеваний» в рамках 14-го Международного медицинского форума «Технологии профилактики – современный путь развития здравоохранения» (Нижний Новгород 2013).

Основные положения диссертации доложены и обсуждены на заседаниях регионального общества врачей клинической лабораторной диагностики (2010, 2012, 2013 г.г.), региональной научно-практической конференции сотрудников кафедры акушерства и гинекологии ГБОУ ВПО НижГМА Минздрава России и Нижегородского областного общества акушеров-гинекологов (Нижний Новгород 2012, 2013 г.г.).

Соблюдение этических принципов исследования с участием человека отмечено в Протоколе № 8 от 23 сентября 2009 года заседания Этического комитета по проведению научных исследований ГБОУ ВПО НижГМА Минздрава России.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 262 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, 2 глав (7 подглав) собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы, включающего 261 отечественных и 159 зарубежных источников. Работа иллюстрирована 46 таблицами, 26 рисунками и 4 схемами.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал и методы исследования

Для данного исследования за период с 2008 по 2014 годы в результате целенаправленного отбора под наблюдение были взяты женщины с патологическими, невоспалительными процессами шейки матки, обусловленными ПВИ. Общая организация исследования включала в себя три этапа: I этап – стандартная оценка клинико-анамнестических данных и контроль соответствия критериям включения; II этап – лабораторное обследование пациенток в соответствии с целью и задачами исследования; III этап – оценка результатов, статистическая обработка и выявление связей между значимыми показателями.

Следуя задаче I этапа, были обследованы 322 женщины, средний возраст которых составил $35,1 \pm 1,5$ года, из них: 220 с предраковыми состояниями (64 пациентки с факультативными (фоновыми) процессами и 156 женщин с облигатными предраковыми заболеваниями), 38 больных с диагнозом РШМ и 32 человека с латентной формой ПВИ (отсутствие клинических, морфологических или гистологических изменений при обнаружении ДНК ВПЧ). Группа контроля включала 32 здоровые женщины, ВПЧ-тест отрицательный.

Критерии включения пациенток в группы исследования: возраст от 17 до 50 лет; патология шейки матки, подтвержденная клинико-морфологическим исследованием; положительные результаты ВПЧ-теста, полученные методом ПЦР; отсутствие заболеваний, вызванных облигатными патогенами; не применение антимикробной терапии в последние два месяца; информированное согласие. Критерии исключения из исследования: беременность или лактация; гормонозависимые заболевания; наличие в течение шести месяцев острых воспалительных и обострения хронических процессов;

применение антибактериальных, противовирусных и иммунотропных препаратов в последние два месяца; использование местных лекарственных препаратов в течение трех недель, предшествующих обследованию. Критерии принадлежности к группе контроля: отрицательные результаты ВПЧ-теста; отсутствие гинекологической и соматической патологии; репродуктивный возраст.

Обследование на первом этапе предусматривало оценку анамнестических данных, результатов клинического осмотра, инструментального и первичного лабораторного исследований. Детально изучали общий и акушерско-гинекологический анамнез, оценивали возраст, социальный статус, семейное положение, сексуальное поведение, вредные привычки, репродуктивную функцию, сопутствующие гинекологические и экстрагенитальные заболевания. Оценка клинико-анамнестических сведений показала наличие совокупности экзогенных и эндогенных факторов риска злокачественной эволюции ПВИ и развития РШМ: это раннее начало половой жизни, высокая сексуальная активность, вредные привычки (курение), экстрагенитальные заболевания, высокая частота урогенитальных инфекций и воспалительных заболеваний малого таза. Пациентки с плоскоклеточными интраэпителиальными поражениями шейки матки низкой (LSIL) и высокой (HSIL) степени практически не различались по социально-гигиенической характеристике, анамнезу, что предполагает сходство патологических механизмов их развития.

На основе клинико-анамнестических и первичных лабораторных данных были отобраны пациентки, нуждающиеся в углубленном обследовании. В связи с этим был выделен **II этап** работы, целью которого явилось детальное лабораторное исследование для определения диагностических аспектов молекулярно-биологических и иммунологических показателей в оценке заболеваний шейки матки при ПВИ. Рабочая программа второго этапа состояла из трех задач: 1 задача – установление молекулярно-биологических и микробиотических характеристик ВПЧ-ассоциированных заболеваний шейки матки; 2 задача – выявление иммунологических особенностей слизистой оболочки шейки матки при продуктивной и интегративной стадиях ПВИ; 3 задача – определение лабораторных аспектов при различных формах ВПЧ-зависимых неопластических поражений.

Клиническое обследование пациенток включало применение кольпоскопического, цитологического (традиционный метод) и гистологического исследований, которые были выполнены в государственном бюджетном учреждении здравоохранения Нижегородской области «Нижегородский областной онкологический диспансер». Гистологическую верификацию проводили по материалам тканей шейки матки, полученным путем прицельной биопсии и (или) кюретажа, петлевой эксцизии, конизации. По результатам цитоморфологического исследования в зависимости от наличия или отсутствия ЦИН, степени тяжести эпителиального поражения шейки матки были выделены 2 группы (156 женщин): плоскоклеточные интраэпителиальные поражения низкой степени (LSIL) с койлоцитозом и ЦИН I – 62 пациентки и плоскоклеточные интраэпителиальные поражения высокой степени (HSIL) – ЦИН II, ЦИН III, преинвазивный рак – 94 больные. Всего выборочная совокупность составила 290 человек, которые представили основную группу обследуемых: латентная форма ПВИ – 32 пациентки, группа 1; факультативные заболевания шейки матки – 64 (эктопии), группа 2; плоскоклеточные интраэпителиальные поражения низкой степени (LSIL) – 62, группа 3; плоскоклеточные интраэпителиальные поражения высокой степени (HSIL) – 94 женщины, группа 4; рак шейки матки – 38 больных, группа 5.

Исследования были проведены с использованием современных лабораторных технологий. Объектом изучения являлись соскобы эпителиальных клеток, слизь цервикального канала. Для выявления и количественного определения ДНК ВПЧ использовали наборы «Ампли Сенс ВПЧ ВКР генотип-Fl», «Ампли Сенс ВПЧ ВКР скринтитр-Fl» компаний «ДНК-Технология», «Интерлабсервис» (Россия). Исследование белка E7 ВПЧ 16 и 18 типов проводилось с применением реагентов для иммуноферментного выявления «E7-ВПЧ-16/18-Диагност» производства ОАО «Биомед» им. И.И. Мечникова (Россия). Материал получали из цервикального канала и/или в виде соскоба с шейки матки. Иммуноцитохимические анализы выполнены при помощи наборов Cintec «Цитология» компании «Биолайн» эксклюзивного дистрибьютора «МТМ laboratories AG» (Германия). Препараты были подготовлены методом жидкостной цитологии. Оценивались ядерная и сочетанная ядерная и цитоплазматическая реакции. Для анализа локальных

иммунологических нарушений у женщин исследовалась цервикальная слизь с изучением экспрессии цитокинов: ИФН- α , ИФН- γ , ИЛ-18, ИЛ-10, ТФР- β . Количественное определение ИЛ-18 и ИЛ-10 проводилось иммуноферментным методом с использованием реактивов ЗАО «Вектор-Бест» (Россия); ТФР- β – тест-системой компании «DRG ELISA-TGF β 1» (Германия); интерферонов наборами «Bender Med Systems» (США). Изучение биоценоза влагалища осуществлялось методом ПЦР-РВ реагентами «Фемофлор» компании «ДНК-Технология» (Россия) в детектирующем амплификаторе ДТ-96. При микроскопическом исследовании мазков из урогенитального тракта особое внимание уделялось состоянию вагинального эпителия, лейкоцитарной реакции, характеру микрофлоры. Статистическую обработку полученных результатов выполняли с использованием пакета прикладных программ для статистической обработки данных «Microsoft Excel-2007», «AtteStat 32».

Результаты исследования и их обсуждение

Анализ совместной экспрессии биомаркеров p16 и E7 ВПЧ показал, что для повышения эффективности прогнозирования и профилактики предопухолевых процессов шейки матки имеют значение методы, направленные не только на определение ВПЧ, но и позволяющие установить форму течения ПВИ и объективно оценить клиническую ситуацию. При иммуноцитохимическом исследовании на наличие экспрессии биомаркера p16 в группах с латентной формой ПВИ, факультативными заболеваниями шейки матки все результаты были негативными (рисунок 1).

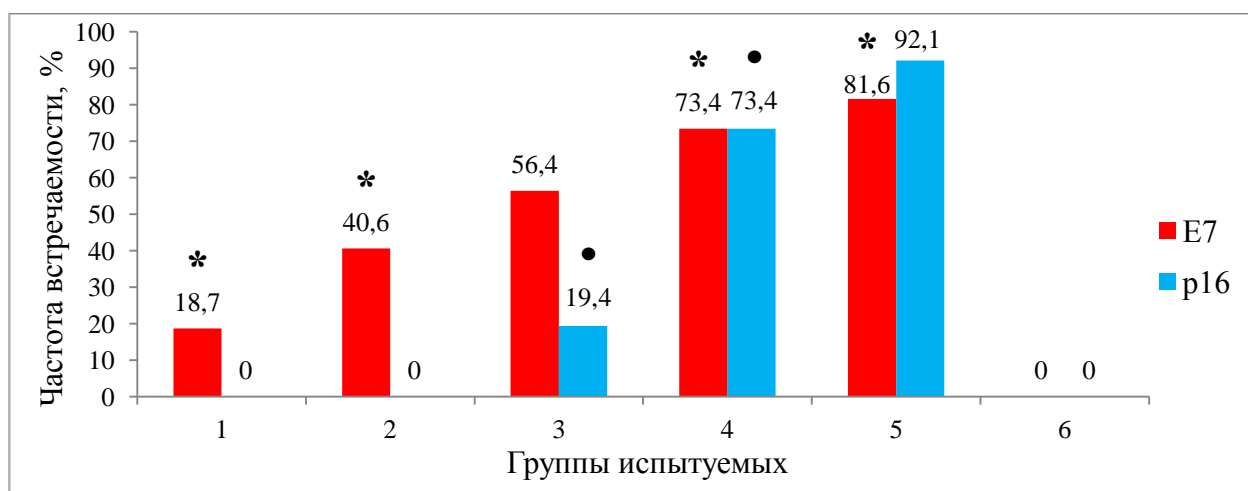


Рисунок 1 – Экспрессия белков p16 и E7 в группах у ВПЧ-позитивных женщин.

1 – латентная форма ПВИ; 2 – факультативные заболевания шейки матки;

3 – LSIL; 4 – HSIL; 5 – РШМ; 6 – контрольная группа, здоровые женщины с отрицательным ВПЧ-тестом.

- * - статистически значимые различия в группах сравнения по показателю E7: $p_{4-1,5-1} < 0,0001$, $p_{4-2,5-2} = 0,0002$;
- - в группах LSIL и HSIL по показателю p16: $p < 0,0001$.

В группе HSIL экспрессия онкопротеина p16 встречалась в 4 раза чаще (73,4%), чем в группе LSIL (19,4%). Позитивный тест на наличие E7 в цервикальных пробах отмечен при латентной форме ПВИ (18,7%), факультативных заболеваниях шейки матки (40,6%), что было статистически значимо по сравнению с контрольной группой ($p = 0,000$), в которой наблюдались исключительно негативные результаты. У женщин с плоскоклеточными интраэпителиальными поражениями высокой степени (HSIL), при РШМ встречаемость белка E7 была статистически значимо чаще ($p_{4-1} < 0,0001$, $p_{4-2} = 0,0002$; $p_{5-1} < 0,0001$, $p_{5-2} = 0,0002$). У каждой второй пациентки из группы плоскоклеточных интраэпителиальных поражений низкой степени (LSIL) подтверждено наличие протеина E7 (56,4%); в группах HSIL (73,4%) и РШМ (81,6%) эти цифры выше.

В исследовании не установлены различия по частоте обнаружения E7 при сравнении групп больных с плоскоклеточными интраэпителиальными поражениями низкой (LSIL) и высокой (HSIL) степени ($p_{3-4} = 0,037$), также нет различий в группах факультативные заболевания шейки матки и латентная форма ПВИ ($p_{2-1} = 0,040$), LSIL и факультативные заболевания шейки матки ($p_{3-2} = 0,212$), РШМ и LSIL, HSIL ($p_{5-3} = 0,016$, $p_{5-4} = 0,376$). Из этого можно заключить, что экспрессия белка E7 не может служить критерием в диагностике плоскоклеточных интраэпителиальных поражений низкой (LSIL) и высокой (HSIL) степени, а также РШМ.

Для установления роли факторов, определяемых физическим статусом ВПЧ в развитии неопластических процессов шейки матки при сопоставлении клинико-морфологических данных с результатами лабораторных методов обследования, были сформированы новые исследовательские категории. Объединены 1 и 2 группы (латентная форма ПВИ + факультативные заболевания шейки матки, $n=96$) – категория «ВПЧ-инфицирование» с преобладанием продуктивной формы ПВИ. Продолжено изучение группы плоскоклеточных интраэпителиальных поражений низкой степени – категория «LSIL» ($n=62$) и выделена объединенная группа, включающая 4 и 5 группы,

то есть плоскоклеточные интраэпителиальные поражения высокой степени (HSIL) + рак шейки матки (n=132) – категория «тяжелые интраэпителиальные цервикальные поражения» с преобладанием интегративной формы ПВИ.

В исследовании было выполнено совместное выявление биомаркеров в объединенных группах испытуемых, в том числе применительно к амбулаторным, поликлиническим условиям, и не только в зависимости от степени поражения шейки матки, но и с учетом патогенетических аспектов развития ПВИ. В объединенной группе «4 + 5» (HSIL + РШМ) количество позитивных результатов E7 (75,8%) и p16 (78,8%) выше, чем в группах сравнения (рисунок 2).

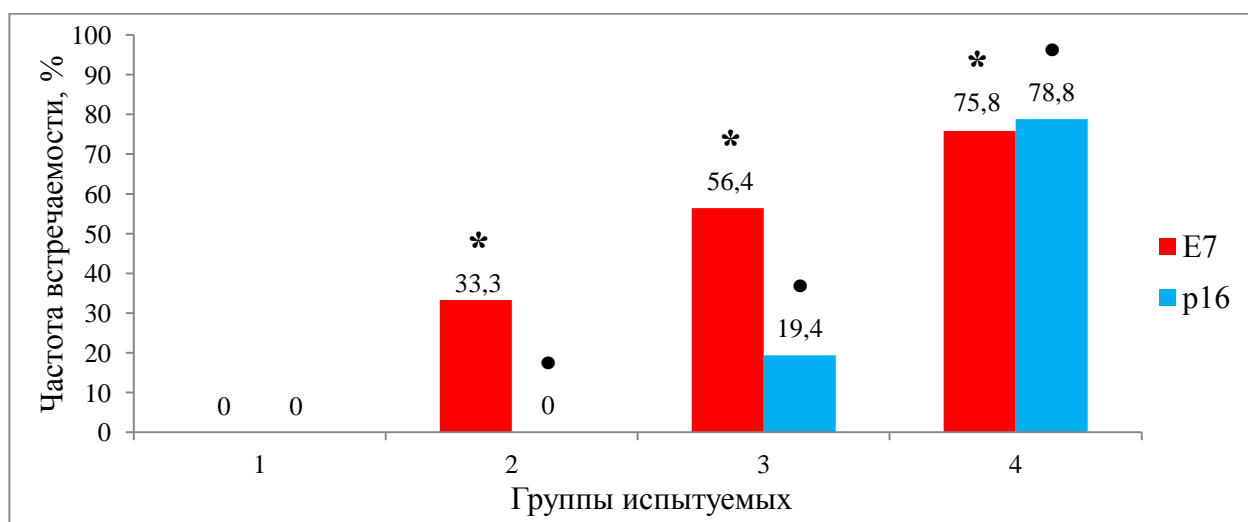


Рисунок 2 – Экспрессия белков p16 и E7 в объединенных группах женщин.

1 – контрольная группа, здоровые женщины с отрицательным ВПЧ-тестом; 2 – объединенная группа «1 + 2» (латентная форма ПВИ + факультативные заболевания шейки матки); 3 – LSIL; 4 – объединенная группа «4 + 5» (HSIL + РШМ).

- * - статистически значимые различия в группе LSIL и объединенной группе «1 + 2»: по показателю E7: $p = 0,0051$; • - по показателю p16: $p < 0,0001$;
- * - в группе LSIL и объединенной группе «4 + 5»: по показателю E7: $p = 0,0077$;
- - p16: $p < 0,0001$.

Группа LSIL статистически значимо отличается по содержанию белка E7 от группы «1 + 2» (латентная форма ПВИ + факультативные заболевания шейки матки) ($p_{1+2,3} = 0,0051$) и группы «4 + 5» (HSIL + РШМ) ($p_{4+5,3} = 0,0077$); по экспрессии p16 отличия также статистически значимы ($p < 0,0001$). Высокие значения коэффициента корреляции связи показателей E7 и p16 в группах LSIL ($R = 0,430$),

HSIL ($R = 1,0$), PШМ ($R = 0,616$), в объединенной группе «4 + 5» (HSIL + PШМ) ($R = 0,917$) свидетельствуют о прямой, сильной связи между этими лабораторными тестами. Совместное использование биомаркеров p16 и E7 определяет биологическую сущность патологического процесса и позволяет выявлять группы повышенного онкогенного риска.

Для определения характеристик ВПЧ-инфицирования проведено изучение распространенности онкогенных типов вируса по превалирующему типу в соскобах эпителия цервикального канала. В целом во всех обследуемых группах чаще других встречаются генотипы филогенетических групп: А9 – 16, 33, 31 типы, А5 – 51 тип и А6 – 56 тип. Частота встречаемости отдельных генотипов в группах исследования показала ту же тенденцию, что и в общей популяции женщин, чаще всего выявлялся 16 тип ВПЧ высокого канцерогенного риска (ВКР). Частота встречаемости ВПЧ 16 типа в группах плоскоклеточных интраэпителиальных поражений высокой степени (HSIL) и PШМ выше, чем в группах женщин с латентной формой ПВИ ($p_{1-4} < 0,0001$, $p_{1-5} < 0,0001$), факультативными заболеваниями шейки матки ($p_{2-4} < 0,0001$, $p_{2-5} < 0,0001$) и плоскоклеточными интраэпителиальными поражениями низкой степени (LSIL) ($p_{3-4} < 0,0001$, $p_{3-5} < 0,0001$). В объединенных группах определяется та же закономерность: так в объединенной группе «1 + 2» (латентная форма ПВИ + факультативные заболевания шейки матки) частота встречаемости ВПЧ 16 типа значительно ниже, чем в группе «4 + 5» (HSIL + PШМ) – 38,5% и 78,8% ($p_{1+2,4+5} < 0,0001$). Следовательно, частота выявления ВПЧ 16 типа возрастает по мере увеличения степени тяжести цервикального поражения. По составу других генотипов закономерности не были выявлены.

Тем не менее, только тип вируса не является определяющим в развитии цервикальной неоплазии. Существуют и другие факторы, влияющие на исход заболевания. В работе были выполнены анализ встречаемости моно-, мультиинфицирования, кратности инфицирования, а также определение вирусной нагрузки ВПЧ ВКР. Характеризуя частоту встречаемости количества типов ВПЧ высокого риска в исследуемых группах, необходимо отметить, что при латентной форме ПВИ и факультативных заболеваниях шейки матки в 65,6% случаев выявлено инфицирование одним типом ВПЧ. Сходная частота встречаемости моно- и микстинфекции отмечена в группах

LSIL и HSIL: 40,0% – моноинфекция, 60,0% – микстинфекция. Группы 3 и 4 – плоскоклеточные интраэпителиальные поражения низкой (LSIL) и высокой степени (HSIL) не имеют статистически значимых отличий по показателям «моно-, мультиинфицирование», «кратность инфицирования». При исследовании объединенных групп «1 + 2» и «4 + 5» со значениями 65,6% и 43,9% – моноинфицирование и 34,4% и 56,1% – мультиинфицирование установлено, что в объединенной группе «1 + 2» доля моноинфицированных выше, чем в объединенной группе «4 + 5» ($p_{4+5,1+2} = 0,002$). Выявлены статистически значимые отличия объединенной «1 + 2» (латентная форма ПВИ + факультативные заболевания шейки матки) и 3 (LSIL) групп по показателю «моно-, мультиинфицирование» ($p_{1+2,3} = 0,003$). Начальные формы ПВИ – категория «ВПЧ-инфицирование» в объединенных группах представлены моноинфекцией, а тяжелые интраэпителиальные цервикальные поражения (преимущественно интегративная форма ПВИ) – мультиинфицированием. По показателю «средняя вирусная нагрузка» в объединенных группах выявлены статистически значимые различия, а именно: в объединенной группе «1 + 2» (латентная форма ПВИ + факультативные заболевания шейки матки) средняя вирусная нагрузка была ниже – 3,47 lg ВПЧ на 100 тыс. клеток человека, чем в объединенной группе «4 + 5» (HSIL + РШМ) – 4,27 lg ВПЧ на 100 тыс. клеток человека ($p_{4+5,1+2} = 0,0008$). Установлены статистически значимые отличия группы LSIL и объединенной группы «1 + 2» (латентная форма ПВИ + факультативные заболевания шейки матки) ($p_{3,1+2} = 0,0419$). Анализ кратности инфицирования ВПЧ, зависимости моноинфицирования и мультиинфекции от возраста пациентки, кратности инфицирования двумя, тремя и более типами вируса в различных возрастных группах, распределения вирусной нагрузки в группах исследования были представлены без соответствия с клинико-морфологическими особенностями патологии шейки матки.

Таким образом, у больных с тяжелыми интраэпителиальными цервикальными поражениями относительно пациенток с ВПЧ-инфицированием качественные и количественные показатели инвазии характеризуются частым выявлением ВПЧ 16 типа ($p < 0,0001$), мультиинфицированием ($p = 0,002$), высокими значениями средней вирусной нагрузки ($p = 0,0008$).

В работе была выполнена диагностически значимая оценка состояния биоценоза урогенитального тракта, заключающаяся в формировании характеристик различных его вариантов: от состояния нормоценоза до выраженного дисбиоза с изучением урогенитальной биоты в целом. В группе женщин с латентной формой ПВИ состояние «нормоценоз» занимает лидирующее положение – 78,1%, высокие цифры по данному показателю отмечены и в группе с факультативными заболеваниями шейки матки – 65,6% (рисунок 3).

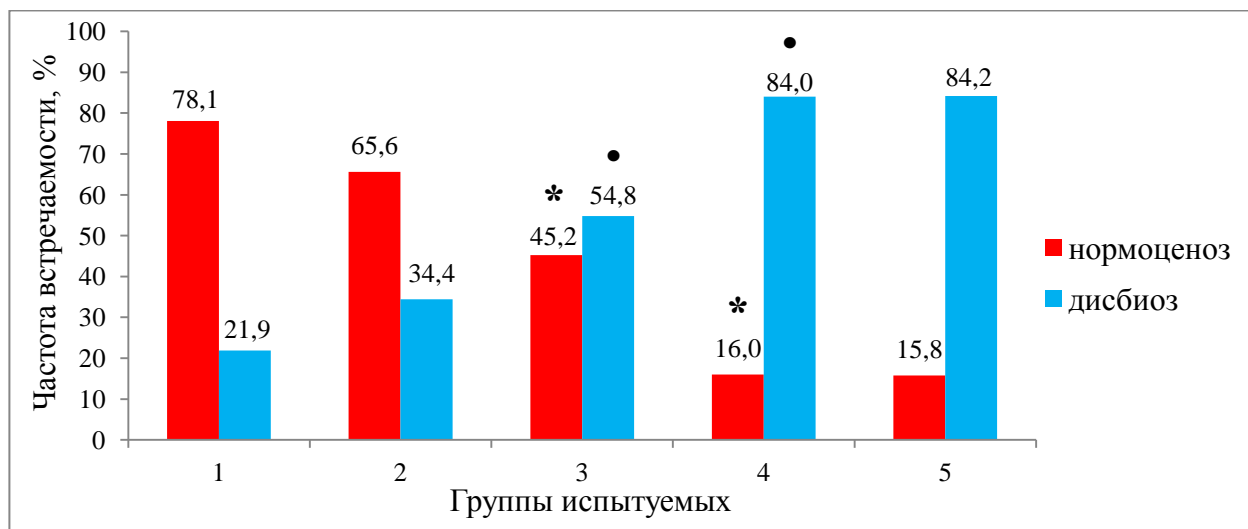


Рисунок 3 – Варианты биоценозов в группах у ВПЧ-позитивных женщин.

1 – латентная форма ПВИ; 2 – факультативные заболевания шейки матки; 3 – LSIL; 4 – HSIL; 5 – РШМ.

* - статистически значимые различия в группах LSIL и HSIL по показателю «нормоценоз»; • - по показателю «дисбиоз»: $p = 0,0001$.

Дисбиотические процессы были выявлены во всех исследуемых группах. У женщин с латентной формой ПВИ и факультативными заболеваниями шейки матки количество дисбиозов было меньше, чем при LSIL, HSIL и РШМ – 21,9% и 34,4%. В категории с низкой степенью плоскоклеточных интраэпителиальных поражений (LSIL) у половины женщин отмечено нормальное состояние урогенитального биоценоза – 45,2%, при этом у 54,8% пациенток выявлено состояние дисбиоза. В группе HSIL дисбиоз составил уже 84,0%, в категории РШМ – 84,2%. У больных с высокой степенью плоскоклеточного интраэпителиального поражения (HSIL) категория «нормоценоз» составила 16,0%, РШМ – 15,8%. Частота нормоценозов в 1 группе (латентная форма ПВИ) оказалась выше, чем в группах 3 (LSIL) (p_{3-1}

= 0,004), 4 (HSIL) и 5 (РШМ) ($p_{4-1,5-1} < 0,00001$). В группе 2 (факультативные заболевания шейки матки) частота нормоценозов выше, чем в группах 4 (HSIL) и 5 (РШМ) ($p_{4-2,5-2} < 0,00001$). В группе 3 (LSIL) частота нормоценозов выше, чем в группах 4 (HSIL) ($p_{4-3} = 0,0001$) и 5 (РШМ) ($p_{5-3} = 0,004$).

В объединенной группе «1 + 2» (латентная форма ПВИ + факультативные заболевания шейки матки) количество нормоценозов выше, чем в группах 3 (LSIL) ($p_{1+2,3} = 0,003$), «4 + 5» (HSIL + РШМ) ($p_{4+5,1+2} < 0,0001$). Обратная ситуация отмечена относительно дисбиотических процессов. У больных в объединенной группе «4 + 5» (HSIL+ РШМ) количество дисбиозов оказалось выше, чем у пациенток с LSIL ($p_{4+5,3} < 0,0001$).

Оценка нормобиоты урогенитального тракта женщин вышеуказанных групп с помощью теста «Фемофлор» выявила максимальное угнетение нормофлоры у больных с HSIL и РШМ. В группах с латентной формой ПВИ и факультативными заболеваниями шейки матки содержание лактобактерий выше, чем в группах женщин с HSIL ($p_{4-1} = 0,0004$, $p_{4-2} < 0,00001$) и РШМ ($p_{5-2} = 0,0007$). У женщин с LSIL количество лактобактерий в составе биоценоза выше, чем в группе больных с HSIL ($p_{4-3} = 0,003$).

При корреляционном анализе выявлены отрицательные связи различной силы между показателями «лактобактерии» и белками «Е7», «р16», «вирусная нагрузка», состоянием «дисбиоз» во всех испытуемых группах. Положительные связи установлены с категориями «моноинфицирование», «нормоценоз». Следовательно, можно считать, что латентная форма ПВИ, факультативные заболевания шейки матки меньше связаны с дисбиотическими нарушениями. При LSIL количество лактобактерий в составе биоценоза падает, уступая место условно-патогенной флоре. Обнаружено, что HSIL и РШМ ассоциированы с дисбиозом в виде выраженного угнетения лактобактерий на фоне повышения содержания представителей условно-патогенной флоры, преимущественно анаэробной.

В группе женщин с LSIL показатели «нормоценоз» и «дисбиоз» представлены практически одинаково, но, несмотря на выявление дисбаланса микробиоты, имеет место сохранность лактобактерий – 62,9% (рисунок 4).

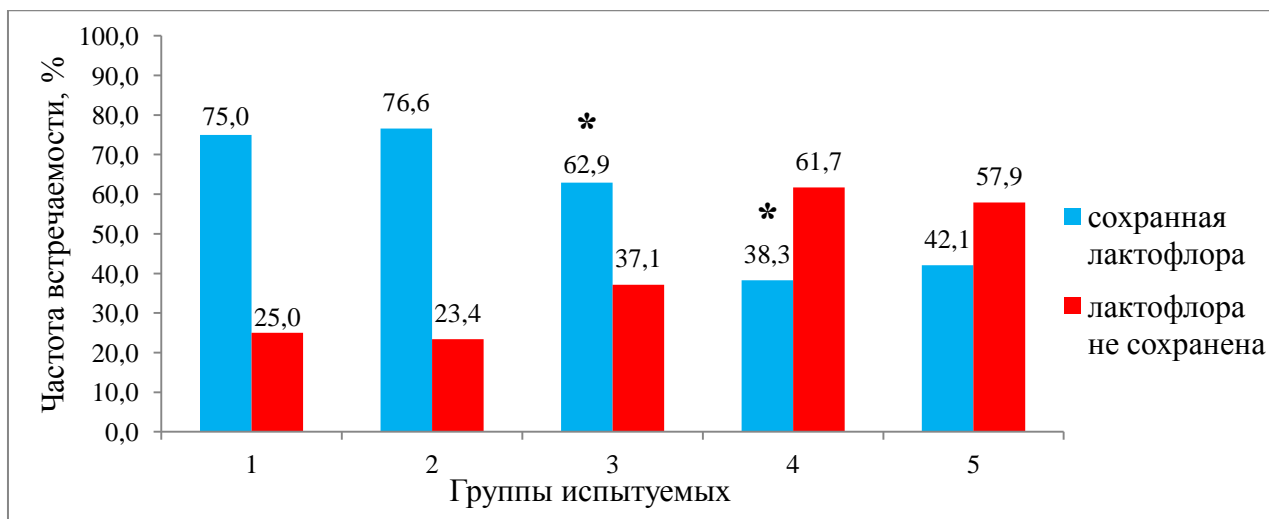


Рисунок 4 – Состояние нормофлоры в группах у ВПЧ-позитивных женщин.

1 – латентная форма ПВИ; 2 – факультативные заболевания шейки матки;
3 – LSIL; 4 – HSIL; 5 – РШМ.

* - статистически значимое различие в группах LSIL и HSIL по показателю «сохранная лактофлора»: $p = 0,003$.

При HSIL лактофлора сохранена лишь у 38,3% пациенток. Очевидно, это свидетельствует о том, что дефицит лактобактерий, выступающих в роли доминантного вагинального микросимбионта, является фактором, определяющим подлинный дисбаланс биоты урогенитального тракта.

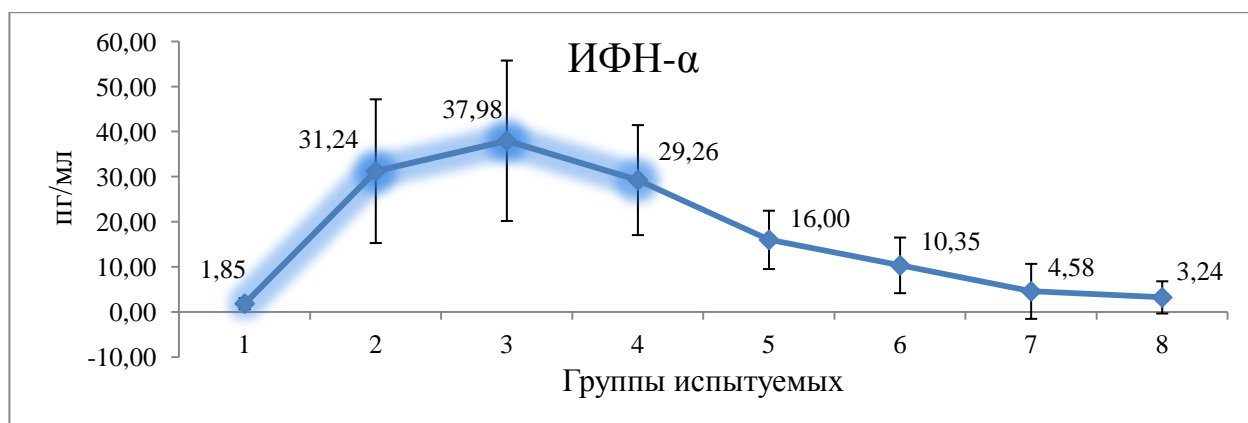
Исследование биоценоза методом ПЦР-РВ с изучением биоты в целом позволило выявить статистически значимые различия по составу микробиоценоза с позиции сохранной нормофлоры в группах плоскоклеточных интраэпителиальных поражений шейки матки низкой (LSIL) и высокой (HSIL) степени.

Результаты проведенного комплексного исследования биоценоза урогенитального тракта методом ПЦР-РВ в группах у ВПЧ-позитивных женщин показали существование связи между дисбиотическими изменениями биоты влагалища, состоянием нормофлоры и заболеваниями шейки матки при ПВИ. Выявлены положительные связи средней силы протеинов E7 и p16 с состоянием «дисбиоз» ($R_1 = 0,666$, $R_2 = 0,509$), отрицательные связи с нормоценозом ($R_1 = -0,666$, $R_2 = -0,509$). Согласно мнению исследователей, белки E7 и p16 являются маркерами опухолевой трансформации в цервикальном эпителии (Бибнева Т.Н., 2009; Роговская С.И., 2011; Киселев В.И., Муйжнек Е.Л., 2011). Характер

выявленных взаимосвязей позволяет утверждать, что дисбиотические нарушения чаще сопутствуют неопластическим цервикальным изменениям.

Существенную роль в развитии ВПЧ-обусловленного патологического процесса играют особенности локального иммунитета пациенток. Одна из задач исследования представляла собой выявление иммунологических особенностей продуктивной (E7-) и интегративной (E7+) стадий ПВИ. Пациентки были разделены на группы по экспрессии протеина E7 (продуктивная и интегративная формы ПВИ): 1 группа: 20 практически здоровых женщин, с отрицательным результатом ВПЧ-теста (n=20); 2 группа: латентная форма ПВИ, белок E7 отрицательный результат «ВПЧ+ E7-» (n=40); 3 группа: латентная форма ПВИ, белок E7 положительный результат «ВПЧ+ E7+» (n=40); 4 группа: низкая степень плоскоклеточного интраэпителиального поражения (LSIL), белок E7 отрицательный результат «LSIL E7-» (n=40); 5 группа: низкая степень плоскоклеточного интраэпителиального поражения (LSIL), белок E7 положительный результат «LSIL E7+» (n=40); 6 группа: высокая степень плоскоклеточного интраэпителиального поражения (HSIL), белок E7 отрицательный результат «HSIL E7-» (n=20); 7 группа: высокая степень плоскоклеточного интраэпителиального поражения (HSIL), белок E7 положительный результат «HSIL E7+» (n=40); 8 группа: рак шейки матки «РШМ E7+» (n=40).

При анализе иммунологических показателей в слизи цервикального канала выявлены повышенные концентрации интерферонов в группах женщин с латентной формой ПВИ «ВПЧ+ E7-», «ВПЧ+ E7+», плоскоклеточными интраэпителиальными поражениями низкой степени «LSIL E7-» по сравнению с группой контроля (рисунок 5).



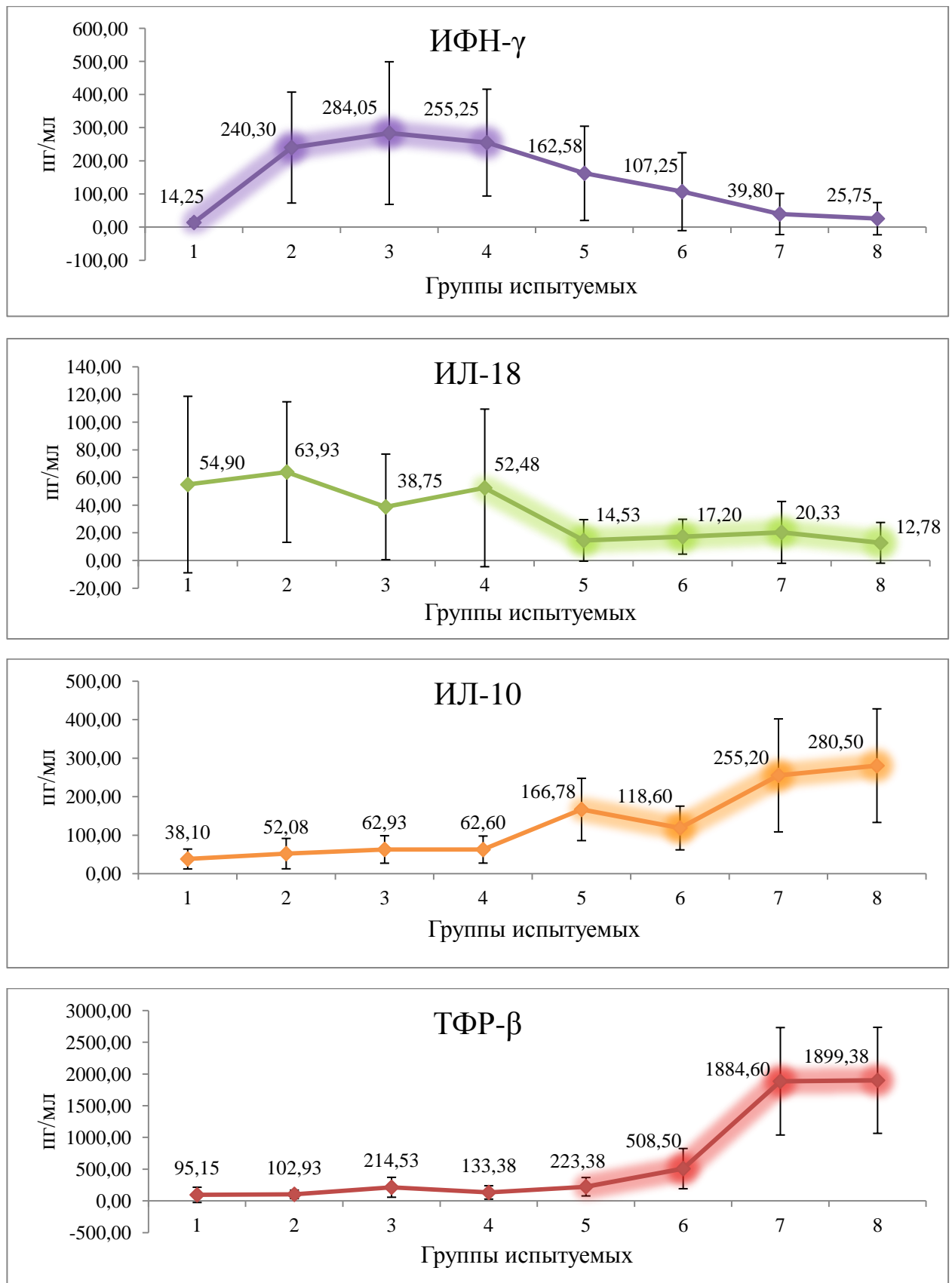


Рисунок 5 – Показатели цитокинов в различные стадии ПВИ.

1 – здоровые женщины с отрицательным результатом ВПЧ-теста;
 2 – «ВПЧ+ E7-»; 3 – «ВПЧ+ E7+»; 4 – «LSIL E7-»; 5 – «LSIL E7+»;
 6 – «HSIL E7-»; 7 – «HSIL E7+»; 8 – «РШМ E7+».

При сравнении групп с латентной формой ПВИ между собой по экспрессии интерферонов отмечается незначительное повышение ИФН- α в 3 группе «ВПЧ+ E7+» ($p_{3-2} = 0,014$). При сравнении группы «LSIL E7-» с группой «ВПЧ+ E7-» различия не выявлены, с группой «ВПЧ+ E7+» отмечается снижение концентрации ИФН- α ($p_{4-3} = 0,004$). В группе женщин «LSIL E7+» наблюдается повышение концентрации интерферонов по сравнению с группой контроля (ИФН- α $p_{5-1} = 0,000019$, ИФН- γ $p_{5-1} = 0,00019$) и снижение значений во всех группах сравнения. В категории «HSIL E7-» значения отличаются от группы контроля в сторону повышения (ИФН- α $p_{6-1} = 0,00996$, ИФН- γ $p_{6-1} = 0,0360$). При анализе категорий «HSIL E7-», «HSIL E7+» и РШМ обнаружено статистически значимое снижение интерферонов по сравнению с группами латентная форма ПВИ и LSIL. Экспрессия интерферонов в группах «HSIL E7+» и РШМ не отличается от значений в группе контроля и не изменена при сравнении групп между собой ($p_{7-1}, p_{8-1}, p_{8-7} > 0,05$). При исследовании характера локальных иммунологических нарушений, обусловленных продуктивной или интегративной стадиями ПВИ, установлено, что в группах женщин «LSIL E7+» и «LSIL E7-» существуют статистически значимые различия по концентрации ИФН- α ($p_{5-4} = 0,000010$) и ИФН- γ ($p_{5-4} = 0,00202$) с уменьшением значений в группе «LSIL E7+».

В категории женщин с латентной формой ПВИ (группы 2 и 3) выявлены статистически значимые различия по экспрессии ИЛ-18 в группах с продуктивной (E7-) и интегративной (E7+) формами ПВИ, во втором случае со снижением значений ($p_{3-2} = 0,0433$). В группе плоскоклеточных интраэпителиальных поражений низкой степени «LSIL E7-» содержание ИЛ-18 не снижено, в группе «LSIL E7+» отмечено уменьшение значений почти в 4 раза по сравнению с группой «LSIL E7-» ($p_{5-4} = 0,0007$) и группами сравнения – контрольной ($p_{5-1} = 0,0004$), «ВПЧ+ E7-» ($p_{5-2} = 0,00003$) и в 3 раза с группой «ВПЧ+ E7+».

Повышение экспрессии по показателям ИЛ-10 выявлено уже на начальных стадиях интраэпителиального поражения. На стадии плоскоклеточных интраэпителиальных поражений низкой степени «LSIL E7+» (5 группа) содержание ИЛ-10 оказалось почти в 3 раза выше, чем в группе плоскоклеточных интраэпителиальных поражений низкой степени «LSIL E7-» ($p_{5-4} = 0,000026$). Установлено,

что на стадии «HSIL E7-» (6 группа) имеет место повышение значений ИЛ-10 по сравнению с группами – контрольной ($p_{6-1} = 0,0029$), «ВПЧ+ E7-» ($p_{6-2} = 0,0155$), «ВПЧ+ E7+» ($p_{6-3} = 0,0128$), «LSIL E7-» ($p_{6-4} = 0,0328$); с группой «LSIL E7+» (интегративная стадия инфекции) – понижение концентраций ($p_{6-5} = 0,031$).

Не выявлены различия по содержанию ТФР- β в категориях «ВПЧ+ E7-», «ВПЧ+ E7+», «LSIL E7-», «LSIL E7+». Повышение концентраций ТФР- β отмечено в группе «HSIL E7-» по сравнению с группой контроля ($p_{6-1} = 0,0056$) и в группах сравнения ($p < 0,05$); повышение со статистически значимыми различиями также отмечено в группах «HSIL E7+», РШМ и группах сравнения ($p < 0,05$). Обращает на себя внимание отсутствие статистически значимой разницы в группах «HSIL E7+» и РШМ ни по одному из анализируемых иммунологических показателей ($p_{8-7} > 0,05$). Концентрация ТФР- β в группе пациенток с HSIL в 7 раз выше, чем при LSIL ($p = 0,000012$).

Гиперэкспрессия ИЛ-10 в группах «LSIL E7+», «HSIL E7-», «HSIL E7+», ТФР- β в группах «HSIL E7-», «HSIL E7+» может служить одним из признаков неблагоприятного развития цервикальной патологии. Увеличение экспрессии ИЛ-10, ТФР- β в группе «HSIL E7-» позволяет предположить, что ИЛ-10 и ТФР- β не только присутствуют в большом количестве в начальной стадии возможной опухолевой прогрессии «HSIL E7-», но и служат в качестве основного механизма уклонения трансформированных клеток от иммунной атаки.

Таким образом, в зависимости от степени выраженности неопластического процесса, ассоциированного с ВПЧ, и в соответствии со стадией ПВИ выявлены разнонаправленные изменения факторов местного иммунитета: продуктивная форма (E7-) характеризуется индукцией выработки ИФН- α и ИФН- γ , низкими значениями экспрессии ИЛ-10 и ТФР- β на стадиях латентной инфекции (ВПЧ+ E7-) и эпителиальных поражений низкой степени (LSIL E7-). Интегративная форма (E7+) обнаруживает снижение концентрации ИФН- α и ИФН- γ , ИЛ-18, а также локальную иммуносупрессию, которая выражается повышением значений ИЛ-10 и ТФР- β на стадии эпителиальных поражений низкой степени (LSIL E7+), эпителиальных поражений высокой степени (HSIL E7+) и на стадии рак шейки матки (РШМ E7+).

Формирование локальной иммуносупрессии происходит уже на ранних этапах цервикальной патологии: в группе плоскоклеточных интраэпителиальных поражений низкой степени (LSIL) при переходе в интегративную форму. Далее в процессе канцерогенеза на стадии интегративной инфекции (E7+) усиливается и расширяется иммунная супрессия, которая способствует опухолевой прогрессии.

Из этого можно заключить, что цитоморфологическая форма цервикальной патологии не отражает патогенетические аспекты формирования иммунитета при ПВИ. Для оценки характера патологического процесса в шейке матки с определением аспектов местного иммунитета необходимо установить форму ПВИ с изучением экспрессии биомаркера E7 ВПЧ 16/18 типов, что позволит улучшить прогноз ВПЧ-обусловленного заболевания.

Развитие заболеваний на фоне ПВИ во многом определяется состоянием иммунной реактивности организма, в первую очередь, локальной защиты репродуктивного тракта женщины. Одним из физиологических барьеров, обеспечивающих инфекционную резистентность, является микроэкология влагалища. Микробиоценоз является весьма чувствительным индикатором, реагирующим количественными и качественными изменениями на любые сдвиги внешней и внутренней среды (Савичева А.М., 2004).

В пользу этой точки зрения свидетельствуют выявленные, статистически значимо отличающиеся от нуля, прямые взаимосвязи между содержанием цитокина ИЛ-10 и характером микробиоценоза ($R = 0,520$), а также содержанием цитокина ТФР- β и характером микробиоценоза ($R = 0,750$) в группах женщин с ВПЧ-ассоциированной патологией шейки матки.

Состояния «нормоценоз» и «дисбиоз» статистически значимо различаются по содержанию ИЛ-10 и ТФР- β , по ТФР- β различия более значимы (рисунок 6, рисунок 7).

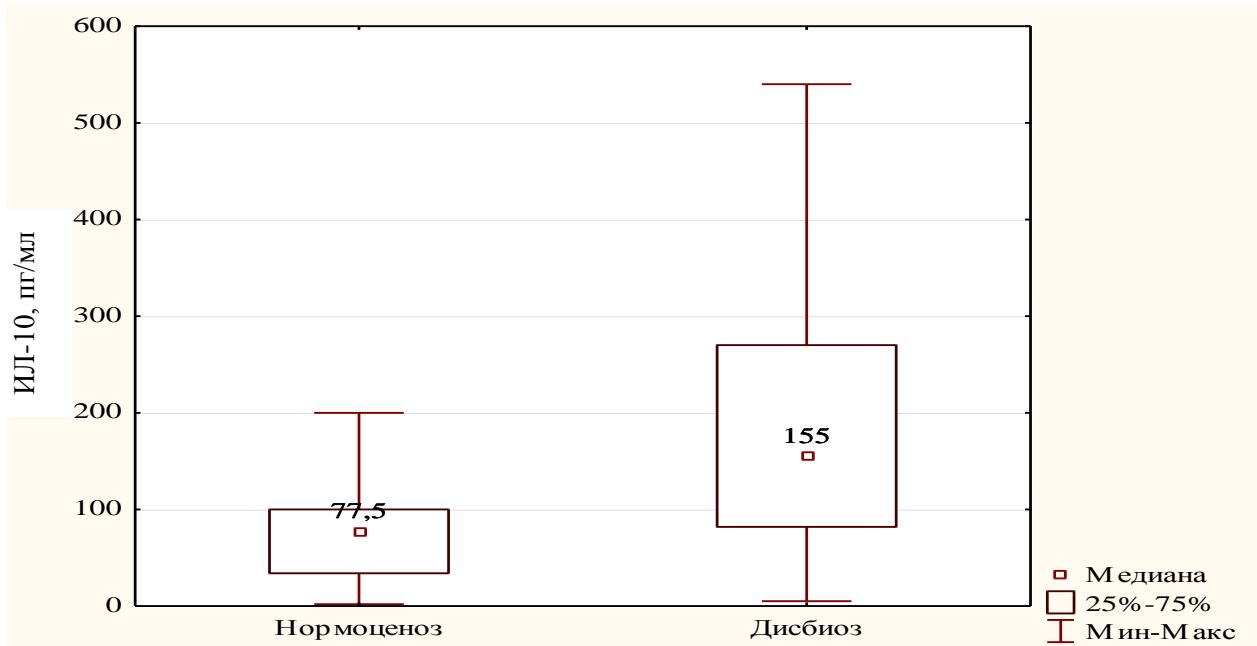


Рисунок 6 – Связь между показателем ИЛ-10 и вагинальным микробиоценозом у женщин с ВПЧ-ассоциированной патологией шейки матки.

Медиана – показателя ИЛ-10 ($M_1 = 77,5$; $M_2 = 155$); сравнение средних по критерию Манна-Уитни ($U = 1774,5$, $p < 0,0001$).

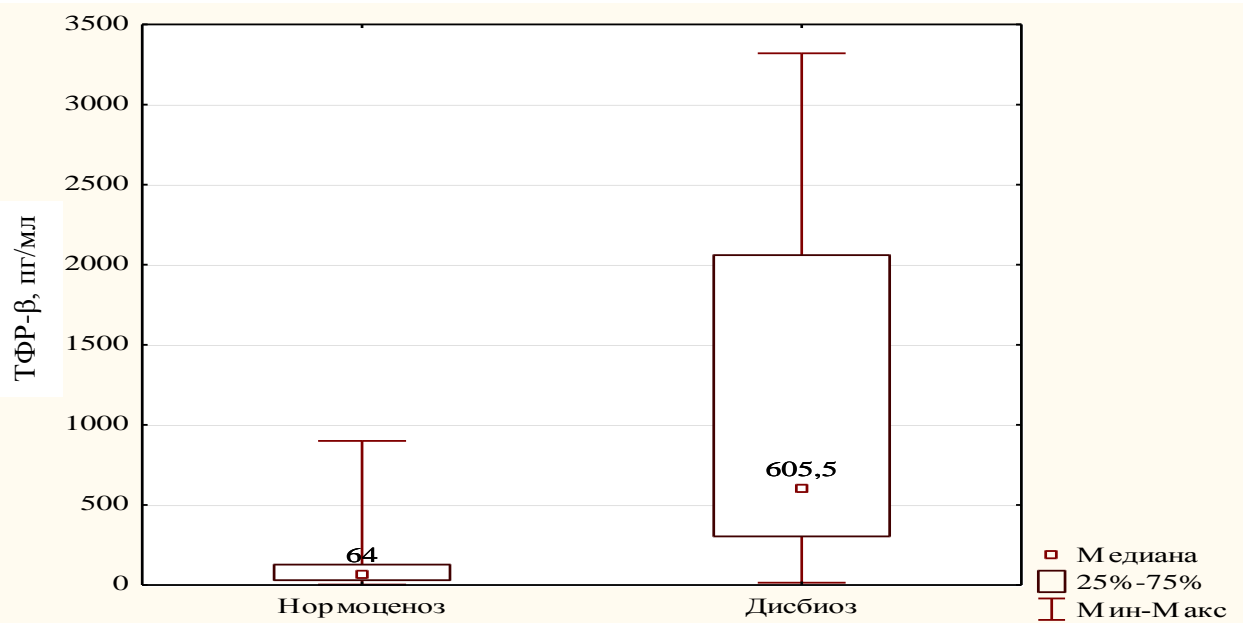


Рисунок 7 – Связь между показателем ТФР-β и вагинальным микробиоценозом у женщин с ВПЧ-ассоциированной патологией шейки матки.

Медиана – показателя ТФР-β ($M_1 = 64,0$; $M_2 = 605,5$); сравнение средних по критерию Манна-Уитни ($U = 588,5$, $p < 0,0001$).

Изменение ИЛ-10 в объединенных группах при состоянии «нормоценоз» представлено ростом значений при развитии патологических клеточных изменений без статистически значимых различий группы плоскоклеточных интраэпителиальных поражений низкой степени (LSIL) и групп сравнения (рисунок 8). Для попарного сравнения между объединенными группами использовали непараметрический z-критерий с поправкой Бонферрони $p_{1-2} = 0,059$, $p_{1-3} = 0,024$, $p_{2-3} = 0,63$.

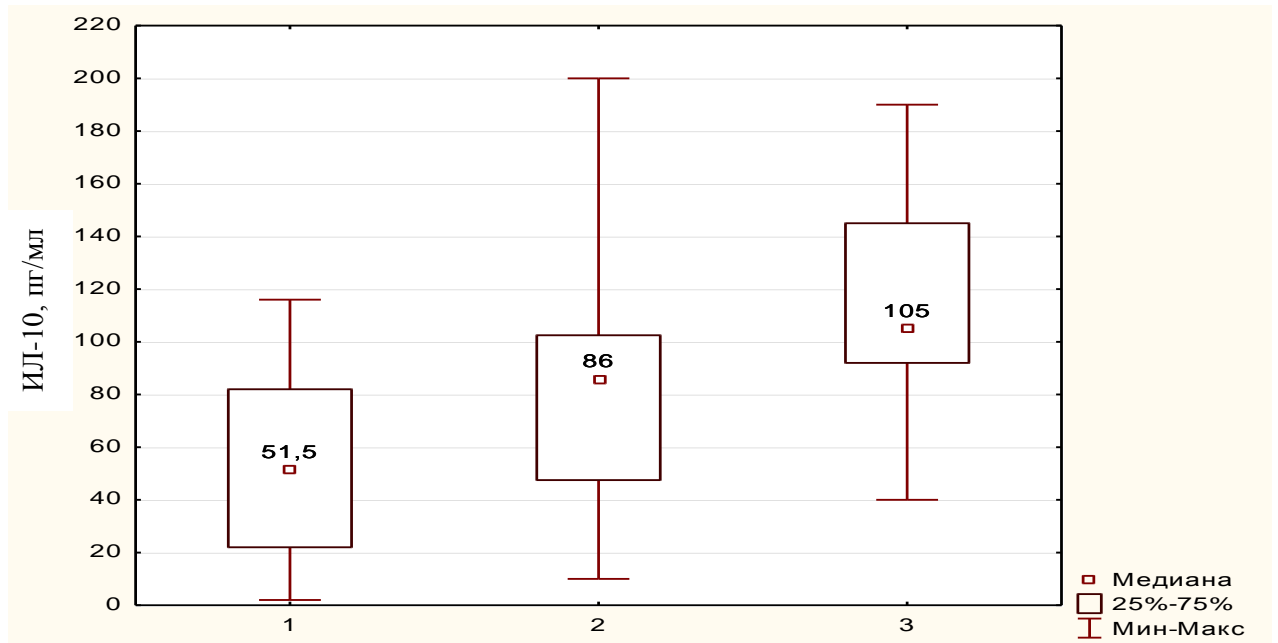


Рисунок 8 – Содержание ИЛ-10 в объединенных группах при состоянии «нормоценоз» у ВПЧ-положительных женщин.

1 – объединенная группа «1 + 2» (латентная форма ПВИ + факультативные заболевания шейки матки); 2 – LSIL; 3 – объединенная группа «4 + 5» (HSIL + РШМ).

Изменение ТФР- β в объединенных группах при состоянии «нормоценоз» отмечает высокую медиану в объединенной группе «4 + 5» (HSIL + РШМ), имеют место статистически значимые различия группы LSIL и объединенной группы «4 + 5» (HSIL + РШМ) ($p_{2-3} = 0,0005$) (рисунок 9). Для попарного сравнения между объединенными группами использовали непараметрический z-критерий с поправкой Бонферрони $p_{1-2} = 1,00$, $p_{1-3} = 0,0005$, $p_{2-3} = 0,0005$.

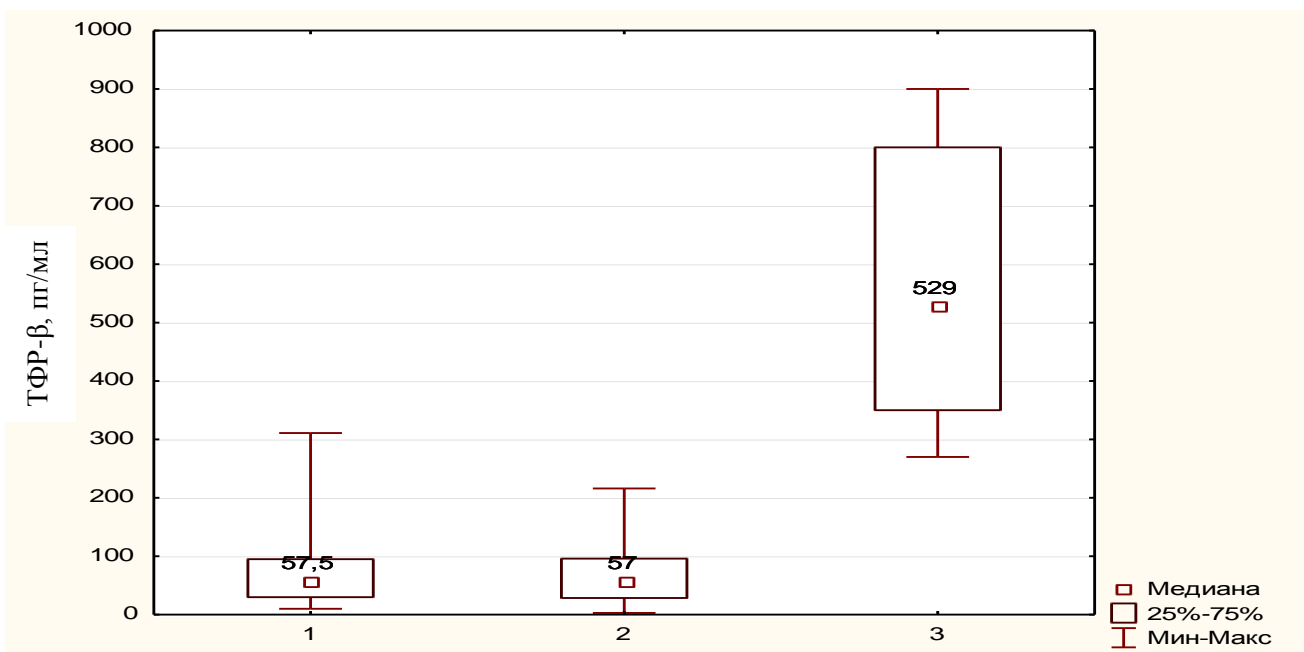


Рисунок 9 – Содержание ТФР-β в объединенных группах при состоянии «нормоценоз» у ВПЧ-позитивных женщин.

1 – объединенная группа «1 + 2» (латентная форма ПВИ + факультативные заболевания шейки матки); 2 – LSIL; 3 – объединенная группа «4 + 5» (HSIL + РШМ).

При состоянии «дисбиоз» группа плоскоклеточных интраэпителиальных поражений низкой степени (LSIL) по экспрессии ИЛ-10 статистически значимо отличается от объединенных групп «1 + 2» (латентная форма ПВИ + факультативные заболевания шейки матки) ($p_{1-2} = 0,034$) и «4 + 5» (HSIL + РШМ) ($p_{2-3} = 0,0043$) с ростом значений в группе с тяжелой патологией шейки матки (рисунок 10). Для попарного сравнения между объединенными группами использовали непараметрический z-критерий с поправкой Бонферрони $p_{1-2} = 0,034$, $p_{1-3} < 0,0001$, $p_{2-3} = 0,0043$.

По экспрессии ТФР-β отмечено, что группа плоскоклеточных интраэпителиальных поражений низкой степени (LSIL) имеет статистически значимые различия с объединенной группой «4 + 5» (HSIL + РШМ), в последней концентрации фактора роста выше, чем в группах сравнения ($p_{2-3} < 0,0001$) (рисунок 11). Для попарного сравнения между объединенными группами использовали непараметрический z-критерий с поправкой Бонферрони $p_{1-2} = 1,00$, $p_{1-3} < 0,0001$, $p_{2-3} < 0,0001$.

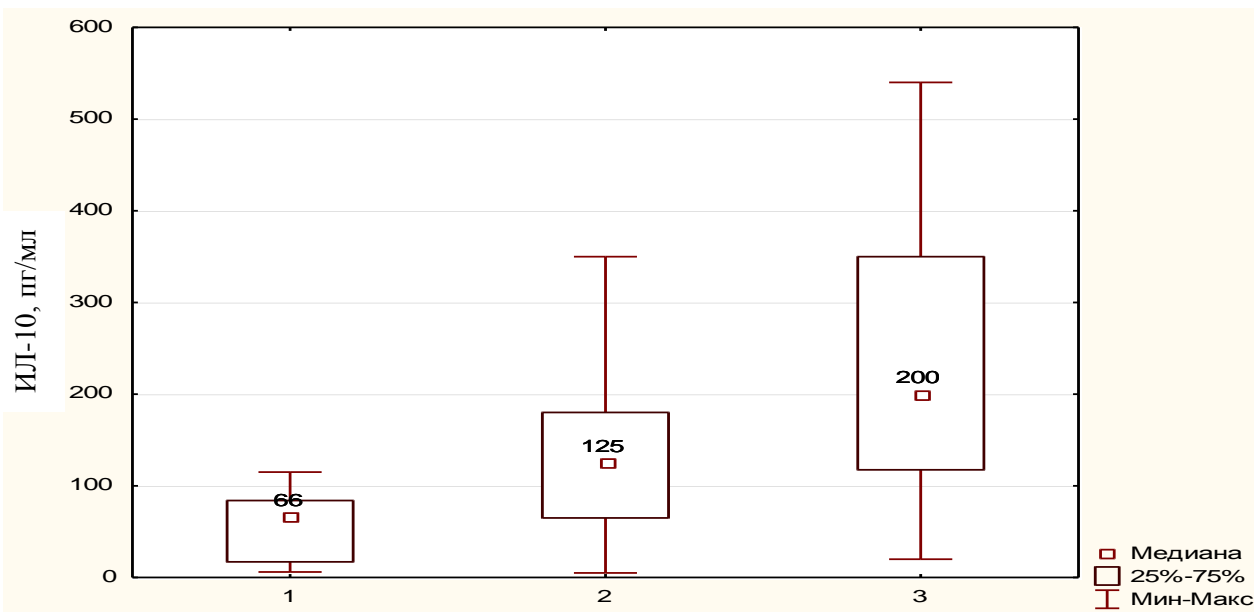


Рисунок 10 – Содержание ИЛ-10 в объединенных группах при состоянии «дисбиоз» у ВПЧ-позитивных женщин.

1 – объединенная группа «1 + 2» (латентная форма ПВИ + факультативные заболевания шейки матки); 2 – LSIL; 3 – объединенная группа «4 + 5» (HSIL + РШМ).

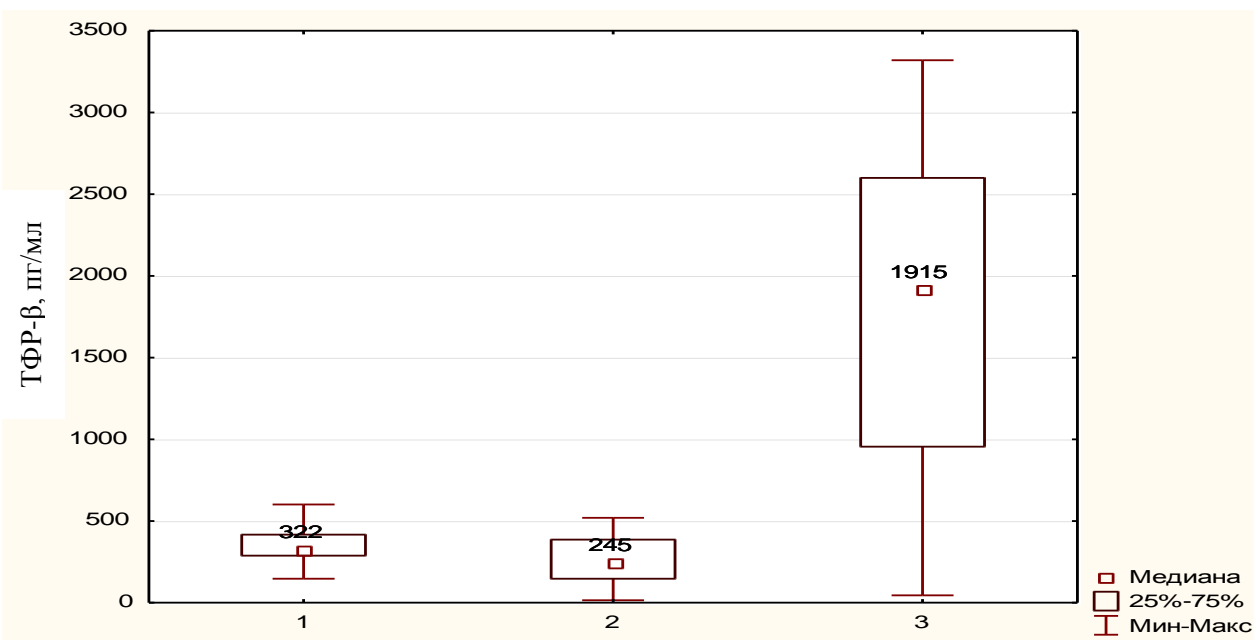


Рисунок 11 – Содержание ТФР-β в объединенных группах при состоянии «дисбиоз» у ВПЧ-позитивных женщин.

1 – объединенная группа «1 + 2» (латентная форма ПВИ + факультативные заболевания шейки матки); 2 – LSIL; 3 – объединенная группа «4 + 5» (HSIL + РШМ).

При оценке связи между ИЛ-10 и вагинальным микробиоценозом установлено, что при состоянии «нормоценоз» различия между плоскоклеточными интраэпителиальными поражениями низкой (LSIL) и высокой (HSIL) степени статистически не значимы, при состоянии «дисбиоз» различия между этими группами статистически значимы. Для сравнения групп между собой использовали критерий Манна-Уитни. При нормоценозе различия между LSIL и HSIL не значимы ($U = 55,5$; $p = 0,206$). При дисбиозе различия между этими группами статистически значимы ($U = 515,0$; $p = 0,006$) (рисунок 12).

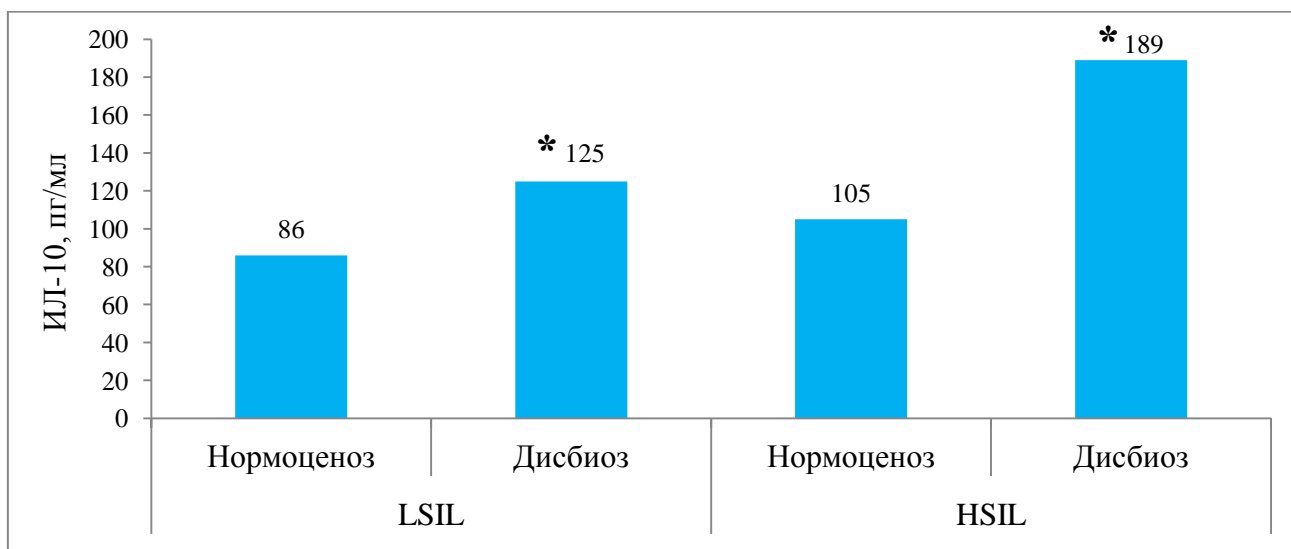


Рисунок 12 – Связь между средними значениями показателя ИЛ-10 и вагинальным микробиоценозом в группах неоплазий.

* - статистически значимое различие в группах LSIL и HSIL по показателю «дисбиоз»: $p = 0,006$.

Экспрессия ТФР- β подтверждает связь вагинального микробиоценоза с нарушениями в системе локального иммунитета и со степенью выраженности деструктивных изменений на шейке матки. При нормоценозе и дисбиозе различия между плоскоклеточными интраэпителиальными поражениями низкой (LSIL) и высокой (HSIL) степени статистически значимы ($U = 102,5$; $p = 0,0002$ и $U = 169,0$; $p < 0,0001$, соответственно) (рисунок 13).

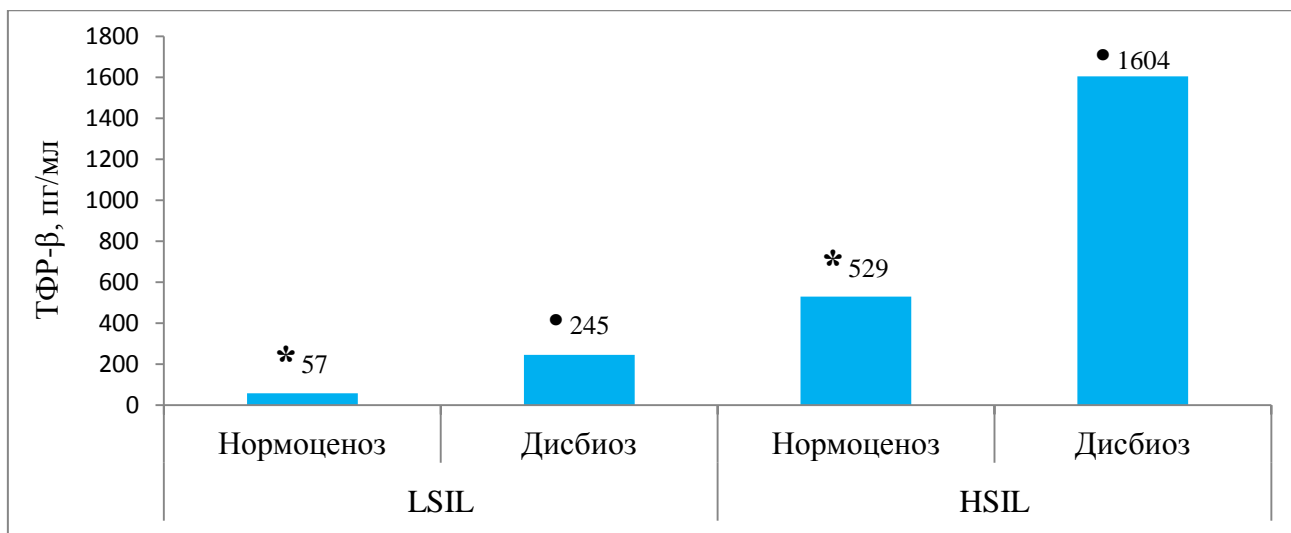


Рисунок 13 – Связь между средними значениями показателя ТФР-β и вагинальным микробиоценозом в группах неоплазий.

* - статистически значимые различия в группах LSIL и HSIL по показателю «нормоценоз»: $p = 0,0002$; • - по показателю «дисбиоз»: $p < 0,0001$.

Полученные данные позволяют говорить о том, что состояние «дисбиоз» на стадии плоскоклеточных интраэпителиальных поражений высокой степени (HSIL) связано с локальными иммунными нарушениями. Вполне вероятно, что дисбиоз, будучи сопутствующим фактором, не является непосредственной причиной развития и прогрессирования цервикальной неоплазии, но на фоне снижения локальной иммунной защиты создаются условия как для дисбаланса биоты, так и для прогрессирования неопластических процессов шейки матки, ассоциированных с ВПЧ-инфекцией.

Особенности этиопатогенеза заболеваний шейки матки при ПВИ свидетельствуют о возможности предотвращения прогрессирования патологического процесса при условии своевременного обнаружения предраковых заболеваний. С помощью статистического метода бинарной логистической регрессии показано, что высокой прогностической значимостью развития эпителиальных поражений шейки матки обладают маркеры p16 и E7. Набор этих лабораторных тестов с большей долей вероятности позволяет предсказать 91,0% заключений по интраэпителиальным поражениям высокой степени (HSIL), РШМ, в среднем прогностическая способность теста 84,0%. Для указанных переменных характерна высокая значимость влияния на зависимую переменную ($p < 0,0001$). При исключении из оценки признаков p16 и E7 высокую значимость приобретают следующие

показатели: генотип ВПЧ 16 типа, состояние вагинального микробиоценоза с учетом сохранности нормофлоры (лактобактерии). Набор из этих переменных позволяет правильно предсказать 89,4% заключений ВПЧ-ассоциированных поражений высокой степени (HSIL), РШМ, в среднем по неоплазиям прогностическая способность 78,4%. Для признака генотип ВПЧ 16 типа характерна высокая значимость влияния на зависимую переменную ($p < 0,0001$). Необходимо отметить высокую прогностическую значимость ТФР- β . Данный иммунологический признак позволяет правильно прогнозировать 91,4% заключений по плоскоклеточным интраэпителиальным поражениям низкой степени (LSIL) и 85,4% диагнозов плоскоклеточных интраэпителиальных поражений высокой степени (HSIL), РШМ, в среднем 87,9% правильных предсказаний ($p < 0,0001$). При прогнозировании эпителиальных ВПЧ-ассоциированных поражений значение имеют ИЛ-10, генотип вируса 51, вирусная нагрузка, условно-патогенные микроорганизмы (УПМ) (*Atorobium vaginae*), в среднем прогностическая способность 78,0%. Значимое влияние на независимую переменную имеют ИЛ-10 ($p < 0,001$) и вирусная нагрузка ($p < 0,05$). Для остальных переменных влияние не значимо, они увеличивают процент правильных предсказаний. Разработанные с помощью математического анализа молекулярно-биологические, иммунологические критерии позволяют определять риск прогрессии эпителиальных поражений шейки матки, ассоциированных с ПВИ.

Деление патологии шейки матки на плоскоклеточные интраэпителиальные поражения низкой (LSIL) и высокой (HSIL) степени и вариантов развития ПВИ на продуктивную и интегративную формы отражают важные молекулярно-биологические и иммунологические доказательства того, что между эпителиальными неоплазиями имеется отчетливо воспроизводимая патогенетически обусловленная, диагностическая граница. Лабораторными характеристиками цитоморфологического выражения плоскоклеточных интраэпителиальных ВПЧ-обусловленных поражений шейки матки низкой (LSIL) и высокой (HSIL) степени являются показатели: экспрессия маркера p16, дисбиотические нарушения вагинального микробиоценоза, гиперпродукция ТФР- β , что дает возможность использовать их в качестве дополнительных критериев диагностики данных патологических процессов.

На основании многофакторного корреляционного анализа между биомаркерами p16, E7, показателями ВПЧ-инфицирования, состояния микробиоценоза, локального иммунитета впервые установлены корреляции, позволившие определить диагностическую значимость лабораторных тестов в оценке заболеваний шейки матки при ПВИ.

Необходимо отметить, что в качестве перспективного направления успешного решения вопросов выявления и лечения ВПЧ-обусловленных цервикальных поражений является изучение и внедрение лабораторных критериев для осуществления патогенетического подхода к диагностике и профилактике путем воздействия на ключевые звенья биоиммунного гомеостаза.

ВЫВОДЫ

1. При плоскоклеточных интраэпителиальных поражениях шейки матки высокой степени (HSIL) экспрессия биомаркера p16 выше, чем при плоскоклеточных интраэпителиальных поражениях низкой степени (LSIL) ($p < 0,0001$). Детекция p16 увеличивается по мере нарастания тяжести ВПЧ-поражения, что может быть использовано в качестве дополнительного показателя степени выраженности неопластических изменений.

2. Экспрессия протеина E7 ВПЧ 16 и 18 типов в цервикальных пробах является значимым критерием в оценке патогенеза неопластической клеточной трансформации, но не может выступать дифференциально-диагностическим признаком плоскоклеточных интраэпителиальных поражений низкой (LSIL) и высокой (HSIL) степени, а также рака шейки матки.

3. У больных с тяжелыми интраэпителиальными цервикальными поражениями относительно пациенток с ВПЧ-инфицированием качественные и количественные показатели инвазии характеризуются частым выявлением ВПЧ 16 типа ($p < 0,0001$), мультиинфицированием ($p = 0,002$), высокими значениями средней вирусной нагрузки ($p = 0,0008$). ВПЧ-тестирование позволяет выделить группу повышенного риска развития неопластических изменений в шейке матки.

4. В группе плоскоклеточных интраэпителиальных поражений высокой степени (HSIL) количество дисбиозов выше, чем у пациенток с плоскоклеточными интраэпителиальными поражениями низкой степени (LSIL) ($p = 0,0001$). Дисбиотические нарушения в микроэкологии влагалища являются сопутствующим фактором

тяжести цервикального поражения.

5. При оценке связи между ИЛ-10, ТФР- β и вагинальным микробиоценозом установлено, что при состоянии «дисбиоз» различия между плоскоклеточными интраэпителиальными поражениями низкой (LSIL) и высокой (HSIL) степени статистически значимы ($p = 0,006$, $p < 0,0001$). Дисбиоз вагинального биотопа выступает маркером супрессивных нарушений в местной иммунной системе при заболеваниях шейки матки, обусловленных ВПЧ.

6. В зависимости от степени выраженности неопластического процесса шейки матки и в соответствии со стадией ПВИ выявлены разнонаправленные изменения факторов местного иммунитета. Продуктивная форма характеризуется индукцией выработки ИФН- α и ИФН- γ , низкими значениями экспрессии ИЛ-10 и ТФР- β . Интегративная форма инфекции на стадии «LSIL E7+» обнаруживает значимое снижение концентрации ИФН- α ($p = 0,000010$) и ИФН- γ ($p = 0,00202$), ИЛ-18 ($p = 0,0007$), повышение значений ИЛ-10 ($p = 0,000026$) по сравнению со стадией «LSIL E7-»; на стадии «HSIL E7+» имеют место снижение экспрессии ИФН- α ($p = 0,03434$), а также локальная иммуносупрессия, выражающаяся в увеличении содержания ИЛ-10 ($p = 0,000022$), ТФР- β ($p = 0,000009$) в сравнении с группой «HSIL E7-». Характер локальных иммунологических нарушений при ВПЧ-ассоциированной цервикальной патологии имеет особенности, обусловленные патогенетическими формами, продуктивной и интегративной стадиями ПВИ.

7. При плоскоклеточных интраэпителиальных поражениях шейки матки высокой степени (HSIL) концентрация ТФР- β в цервикальной слизи выше, чем при плоскоклеточных интраэпителиальных поражениях низкой степени (LSIL) ($p = 0,000012$), что может быть аналитическим критерием тяжести эпителиального поражения.

8. Лабораторными характеристиками цитоморфологического выражения плоскоклеточных интраэпителиальных ВПЧ-обусловленных поражений шейки матки низкой (LSIL) и высокой (HSIL) степени являются показатели: экспрессия онкопротеина p16, дисбиотические нарушения вагинального биотопа, гиперпродукция ТФР- β , что дает возможность использовать их для диагностики различий данных патологических процессов и обоснованно выбрать необходимый объем лечебных мероприятий.

9. Молекулярно-биологические, иммунологические показатели: протеины p16 и E7, дисбиоз вагинального биотопа, ТФР-β, выделенные при помощи бинарной логистической регрессии, позволяют определять риск прогрессии плоскоклеточных интраэпителиальных поражений шейки матки при ПВИ.

10. На основании многофакторного корреляционного анализа между биомаркерами p16 и E7, показателями ВПЧ-инфицирования, состояния микробиоценоза, локального иммунитета впервые установлены корреляции, позволившие определить диагностическую значимость лабораторных тестов в оценке заболеваний шейки матки при ПВИ.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Анализ результатов собственных исследований и систематизация данных литературы относительно причин развития ВПЧ-зависимых неопластических образований шейки матки позволяют рекомендовать следующие патогенетически обоснованные лабораторные критерии диагностики и прогнозирования: 1. выявление качественных и количественных характеристик ВПЧ-инфицирования (скрининг на ВПЧ, генотипирование ВПЧ ВКР, вирусная нагрузка); 2. установление статуса ДНК ВПЧ (эписомальная, интегрированная формы) по экспрессии протеинов E7 в цервикальных пробах и p16 в цитологических препаратах; 3. исследования по изучению микробиоценоза урогенитального тракта методом ПЦР-РВ с обязательным учетом сохранности нормофлоры; 4. оценку состояния локального иммунитета с определением ТФР-β в слизи цервикального канала.

Предложенная лабораторная тестовая система обеспечивает эффективную диагностику, позволяет выбрать оптимальную лечебную тактику, что предполагает снижение показателей заболеваемости и смертности среди женщин с ВПЧ-ассоциированной патологией шейки матки.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

(* - публикации в изданиях, рекомендованных ВАК)

1. Выявление вирусов папилломы человека с использованием технологии полимеразной цепной реакции с признаками цервикальной патологии / Л.Д. Андосова, К.Н. Конторщикова, О.Л. Блатова, О.В. Михалева, С.Ю. Куделькина // Всероссийская научно-

практическая конференция «Лабораторная медицина в свете Концепции развития здравоохранения России до 2020 года»: Труды научно-практической конференции. – М., 2009. – С. 138-139.

2. Выявление вируса папилломы человека методом полимеразной цепной реакции у женщин репродуктивного возраста / Л.Д. Андосова, К.Н. Контрщикова, О.Л. Блатова, Е.А. Нестерова // Всероссийская научно-практическая конференция «Лабораторная медицина в свете Концепции развития здравоохранения России до 2020 года»: Труды научно-практической конференции. – М., 2009. – С. 217-218.

3. Анализ частоты выявления онкогенных типов вируса папилломы человека у женщин с различной гинекологической патологией / Л.Д. Андосова, К.Н. Контрщикова, О.Л. Блатова, О.В. Михалева // Научная конференция молодых ученых с международным участием «Актуальные вопросы инфекционной патологии – 2009»: Материалы конференции. – СПб., 2009. – С. 69.

4. Способ прогнозирования развития плацентарной недостаточности инфекционного генеза / К.Н. Контрщикова, Л.Д. Андосова, Н.Ю. Каткова // Бюллетень ФГУ «Федеральный институт промышленной собственности Федеральной службы по интеллектуальной собственности, патентам и товарным знакам». – 2009. – № 23 (IV ч.). – С. 948-949.

5. Характеристика биоценозов уrogenитального тракта у женщин репродуктивного возраста с применением теста «Фемофлор» / Л.Д. Андосова, К.Н. Контрщикова, О.Л. Блатова, О.В. Михалева, С.Ю. Куделькина // III Междисциплинарная научно-практическая конференция: «Уrogenитальные инфекции и репродуктивное здоровье: клиничко-лабораторная диагностика и терапия»: Сборник материалов. – М., 2010. – С. 12-13.

6. Генодиагностика папилломавирусной инфекции у женщин с различной гинекологической патологией / Л.Д. Андосова, К.Н. Контрщикова, О.Л. Блатова, О.В. Михалева, С.Ю. Куделькина // IV Региональный научный форум «Мать и дитя»: Материалы форума. – Екатеринбург, 2010. – С. 13-14.

7. ВПЧ-тестирование у женщин, проходящих обследование на генитальные инфекции / Л.Д. Андосова, К.Н. Контрщикова, О.Л. Блатова, О.В. Михалева, С.Ю. Куделькина // IV Региональный научный форум «Мать и дитя»: Материалы форума. – Екатеринбург,

2010. – С. 14-15.

8. Генодиагностика папилломавирусной инфекции высокого канцерогенного риска / Л.Д. Андосова, К.Н. Конторщикова, О.Л. Блатова, С.Ю. Куделькина, О.В. Михалева, А.В. Белов, И.А. Кузнецова // XI Всероссийский научный форум «Мать и дитя»: Материалы форума. – М., 2010. – С. 296-297.

9. Характеристика биоценозов урогенитального тракта женщин репродуктивного возраста / Л.Д. Андосова, К.Н. Конторщикова, О.Л. Блатова, С.Ю. Куделькина, О.В. Михалева, А.В. Белов, И.А. Кузнецова // XI Всероссийский научный форум «Мать и дитя»: Материалы форума. – М., 2010. – С. 297-298.

10. Выявление ВПЧ высокого канцерогенного риска у женщин репродуктивного возраста / Л.Д. Андосова, К.Н. Конторщикова, С.Ю. Куделькина, О.В. Михалева, О.Л. Блатова // VII Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Молекулярная диагностика-2010»: Сборник трудов. – М., 2010. – Том V. – С. 32-33.

11. Использование онкопротеина p16INK4a и ПЦР-анализа вирусов папилломы человека в диагностике дисплазий и рака шейки матки / Л.Д. Андосова, К.Н. Конторщикова, С.Ю. Куделькина, О.В. Михалева, О.Л. Блатова // VII Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Молекулярная диагностика-2010». – М., 2010. – Том III. – С. 354-356.

12. Выявление онкогенных типов вируса папилломы человека у женщин с патологией шейки матки / С.Ю. Куделькина, Л.Д. Андосова, К.Н. Конторщикова, А.В. Белов // VII Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Молекулярная диагностика-2010». – М., 2010. – Том III. – С. 373-375.

13. Генодиагностика папилломавирусной инфекции высокого канцерогенного риска / Л.Д. Андосова, К.Н. Конторщикова, С.Ю. Куделькина, О.Л. Блатова, О.В. Блатова // XIV Российский онкологический конгресс: Материалы конгресса. – М., 2010. – С. 334-335.

14. Прогностическая значимость оценки иммунного статуса в диагностике фетоплацентарной недостаточности при инфекционной патологии у беременных / Л.Д. Андосова, Н.Ю. Каткова, Т.С. Качалина, К.Н. Конторщикова // Научно-практический журнал Практикум Мед Акушерство и гинекология. – 2010. – № 1 (01). – С.

21-23.

15. Распространенность онкогенных типов вируса папилломы человека у женщин репродуктивного возраста / Л.Д. Андосова, К.Н. Конторщикова, О.Л. Блатова, О.В. Михалева, С.Ю. Куделькина // Лаборатория. – 2010. – № 2. – С. 8.

16.* **Окислительный стресс при наружном генитальном эндометриозе в сочетании с гипотиреозом / Т.С. Качалина, Л.Г. Стронгин, М.В. Семерикова, Л.Д. Андосова // Медицинский альманах. – 2010. – № 3 (12). – С. 114-117.**

17.* **Особенности иммунного и гормонального статуса больных с наружным генитальным эндометриозом в сочетании с гипотиреозом / М.В. Семерикова, Т.С. Качалина, Л.Г. Стронгин, Л.Д. Андосова // Современные технологии в медицине. – 2010. – № 4. – С. 73-76.**

18.* **Использование онкопротеина p16INK4a и ПЦР-анализа вирусов папилломы человека в диагностике дисплазий и рака шейки матки / О.В. Михалева, Л.Д. Андосова, К.Н. Конторщикова, С.Ю. Куделькина, О.Л. Блатова, И.А. Кузнецова // Медицинский альманах. – 2010. – № 4 (3). – С. 143-145.**

19.* **Выявление вируса папилломы человека высокого канцерогенного риска у женщин репродуктивного возраста / Л.Д. Андосова, К.Н. Конторщикова, С.Ю. Куделькина, О.В. Михалева, О.Л. Блатова, И.А. Кузнецова // Медицинский альманах. – 2010. – № 4 (3). – С. 155-157.**

20.* **Характеристика биоценозов урогенитального тракта у женщин репродуктивного возраста с применением теста «Фемофлор» / Л.Д. Андосова, К.Н. Конторщикова, С.Ю. Куделькина // Медицинский альманах. – 2010. – № 4 (3). – С. 177-179.**

21. Исследование биоценозов урогенитального тракта у женщин с патологией шейки матки / Л.Д. Андосова // IV Междисциплинарная научно-практическая конференция: «Урогенитальные инфекции и репродуктивное здоровье: клиничко-лабораторная диагностика и терапия»: Сборник материалов. – СПб., 2011. – С. 10-11.

22. Показатели местного гуморального иммунитета при заболеваниях шейки матки инфекционного генеза / Л.Д. Андосова, К.Н. Конторщикова // XVI научно-практическая конференция «Высокие технологии и модернизация в лабораторной медицине»:

Тезисы докладов. – М., 2011 // Лаборатория. – 2011. – № 1. – С. 36.

23. Количественный подход в диагностике генитальной папилломавирусной инфекции / Л.Д. Андосова, К.Н. Конторщикова, А.В. Белов, С.Ю. Куделькина // V Региональный научный форум «Мать и дитя»: Материалы форума. – Геленджик, 2011. – С. 169-170.

24. Генодиагностика папилломавирусной инфекции гениталий / Л.Д. Андосова, К.Н. Конторщикова, А.В. Белов, С.Ю. Куделькина // V Региональный научный форум «Мать и дитя»: Материалы форума. – Геленджик, 2011. – С. 170-171.

25. Генодиагностика папилломавирусной инфекции гениталий / Л.Д. Андосова, К.Н. Конторщикова, О.В. Качалина, А.В. Белов, С.Ю. Куделькина // XII Всероссийский научный форум «Мать и дитя»: Материалы форума. – М., 2011. – С. 256-257.

26. Исследование биоценоза урогенитального тракта у женщин с воспалительными процессами репродуктивной сферы / Л.Д. Андосова, А.В. Белов, С.Ю. Куделькина, О.В. Михалева // Всероссийский конгресс с международным участием «Новые технологии в диагностике и лечении гинекологических заболеваний»: Материалы конгресса. – М., 2011. – С. 46-47.

27. Исследование биоценозов урогенитального тракта у женщин с патологией шейки матки / Л.Д. Андосова, А.В. Белов, С.Ю. Куделькина // Всероссийский конгресс с международным участием «Новые технологии в диагностике и лечении гинекологических заболеваний»: Материалы конгресса. – М., 2011. – С. 47-48.

28. *Анализ частоты выявления онкогенных типов вируса папилломы человека у женщин с гинекологической патологией / О.Л. Блатова, К.Н. Конторщикова, Л.Д. Андосова, О.В. Михалева, С.Ю. Куделькина // Вестник дерматологии и венерологии. – 2011. – № 1. – С. 66-68.

29. *Генодиагностика папилломавирусной инфекции высокого канцерогенного риска / Л.Д. Андосова, К.Н. Конторщикова, С.Ю. Куделькина, О.Л. Блатова, О.В. Михалева, И.А. Кузнецова, Р.А. Байкова // Российский вестник акушера-гинеколога. – 2011. – № 2. – С. 13-15.

30. *Новый подход к исследованию биоценоза урогенитального тракта у женщин с инфекционно-воспалительными процессами репродуктивной сферы / Л.Д. Андосова, А.В. Белов, С.Ю. Куделькина, О.В. Михалева //

- Уральский медицинский журнал. – 2011. – № 03 (81)'11. – С. 19-21.
- 31.*Исследование биоценозов урогенитального тракта у женщин с патологией шейки матки / Л.Д. Андосова // Уральский медицинский журнал. – 2011. – № 03 (81)'11. – С. 22-25.
- 32.*Исследование биоценозов урогенитального тракта у женщин с патологией шейки матки с использованием метода полимеразной цепной реакции в реальном масштабе времени // Л.Д. Андосова, К.Н. Конторщикова, О.В. Михалева, С.Ю. Куделькина, О.Л. Блатова, И.А. Кузнецова// Современные технологии в медицине. – 2011. – № 4. – С. 113-116.
- 33.*Показатели гуморального иммунитета при заболеваниях шейки матки инфекционного генеза / Л.Д. Андосова, О.В. Качалина, С.Ю. Куделькина, О.В. Михалева // Вестник новых медицинских технологий. – 2011. – № 4. – С. 175-177.
- 34.*Использование технологии ПЦР-реальное время для выявления и дифференциации вирусов папилломы человека высокого канцерогенного риска / Л.Д. Андосова, К.Н. Конторщикова, О.Л. Блатова, С.Ю. Куделькина, И.А. Кузнецова, А.В. Белов, Р.А. Байкова // Клиническая лабораторная диагностика. – 2011. – № 7. – С. 42-43.
- 35.*Современные представления о роли вируса папилломы человека в генезе цервикального рака / Л.Д. Андосова, К.Н. Конторщикова, О.В. Качалина // Медицинский альманах. – 2011. – № 5 (18). – С. 170-176.
- 36.*Методы ранней диагностики и новые скрининговые технологии при заболеваниях шейки матки / Л.Д. Андосова, К.Н. Конторщикова, О.В. Качалина // Медицинский альманах. – 2011. – № 6 (19). – С. 98-102.
- 37.*Характеристика биоценозов урогенитального тракта у женщин с патологией шейки матки / Л.Д. Андосова, К.Н. Конторщикова, С.Ю. Куделькина, А.В. Белов // Клиническая лабораторная диагностика. – 2011. – № 9. – С. 42.
38. Характеристика биоценозов урогенитального тракта у женщин репродуктивного возраста / Л.Д. Андосова, К.Н. Конторщикова, О.В. Качалина, Е.С. Гонова, С.Ю. Куделькина // Всероссийский конгресс с международным участием «Амбулаторно-поликлиническая практика – в эпицентре женского здоровья». – М., 2012. – С. 145-147.

39. Новый подход к диагностике и лечению цервицитов, обусловленных папилломавирусной инфекцией, у женщин репродуктивного возраста / О.В. Качалина, Д.Д. Елисеева, Т.С. Качалина, Н.М. Шахова, Л.Д. Андосова // Всероссийский конгресс с международным участием «Амбулаторно-поликлиническая практика – в эпицентре женского здоровья». – М., 2012. – С. 232-233.

40. Использование онкопротеина p16ink4a в диагностике дисплазий и рака шейки матки / Л.Д. Андосова, К.Н. Конторщикова, О.В. Качалина, Т.С. Качалина, С.Ю. Куделькина, О.В. Михалева, Д.Д. Елисеева // XIII Всероссийский научный форум «Мать и дитя»: Материалы форума. – М., 2012. – С. 218-219.

41. Экспрессия онкобелка E7 у пациенток с урогенитальной папилломавирусной инфекцией / О.В. Качалина, Т.С. Качалина, Л.Д. Андосова, С.Ю. Куделькина, К.Н. Конторщикова, О.В. Михалева, Д.Д. Елисеева // XIII Всероссийский научный форум «Мать и дитя»: Материалы форума. – М., 2012. – С. 269-270.

42. Результаты ДНК-генотипирования пациенток с ВПЧ-ассоциированными заболеваниями шейки матки / Л.Д. Андосова, О.В. Качалина // Международный междисциплинарный форум «Шейка матки и вульвовагинальные болезни»: Тезисы форума. – М., 2012. – С. 6-8.

43. Определение онкобелка E7 в комплексной диагностике заболеваний шейки матки у женщин репродуктивного возраста / О.В. Качалина, Л.Д. Андосова, Д.Д. Елисеева // Международный междисциплинарный форум «Шейка матки и вульвовагинальные болезни»: Тезисы форума. – М., 2012. – С. 41-43.

44. Пути снижения диагностической и лечебной агрессии при ВПЧ-ассоциированном цервиците в репродуктивном возрасте / Т.С. Качалина, Н.М. Шахова, О.В. Качалина, Л.Д. Андосова, Д.Д. Елисеева, Т.В. Сумина, Е.М. Михайлова, Т.С. Лабутина // Тематический сборник научных трудов, посвященный 75-летию Кировского роддома №2 «Актуальные вопросы акушерства и гинекологии». – Киров, 2012. – С. 79-85.

45. *Изменение вагинальной микробиоты у женщин с заболеваниями шейки матки / Л.Д. Андосова, О.В. Качалина, А.В. Белов, С.Ю. Куделькина // Казанский медицинский журнал. – 2012. – № 1, Том ХСШ. – С. 76-79.

46. *Генодиагностика папилломавирусной инфекции

гениталий / Л.Д. Андосова, О.В. Качалина, А.В. Белов, С.Ю. Куделькина // Вестник новых медицинских технологий. – 2012. – № 1. – С. 67-68.

47.*Генодиагностика папилломавирусной инфекции у женщин с различной патологией репродуктивной системы / Л.Д. Андосова, О.В. Качалина, С.Ю. Куделькина, Е.С. Гонова // Медицинский альманах. – 2012. – № 2 (21). – С. 71-73.

48.*ВПЧ-ассоциированный цервицит в репродуктивном возрасте / Т.С. Качалина, Н.М. Шахова, О.В. Качалина, Л.Д. Андосова, Д.Д. Елисеева, Т.В. Сумина, Е.М. Михайлова // Вестник российского университета дружбы народов. – 2012. – № 5. – С. 204-211.

49.*Выявление онкогенных типов вируса папилломы человека у женщин с патологией шейки матки / Л.Д. Андосова, О.В. Качалина, О.В. Михалева, С.Ю. Куделькина, Е.С. Гонова // Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание. – 2012. – № 1. – <http://www.medtsu.tula.ru/VNMT/index.html>.

50.Количественный подход в диагностике папилломавирусной инфекции у пациенток с ВПЧ-ассоциированной патологией шейки матки / Л.Д. Андосова, К.Н. Контрощикова, О.В. Качалина, А.А. Радаев // XXVI Международный конгресс с курсом эндоскопии «Новые технологии в диагностике и лечении гинекологических заболеваний»: Материалы конгресса. – М., 2013. – С. 142-143.

51.Состояние локального иммунитета в зависимости от тяжести плоскоклеточного интраэпителиального поражения шейки матки / Л.Д. Андосова // XIV Всероссийский научный форум «Мать и дитя»: Материалы форума. – М., 2013. – С. 247-248.

52.*Характеристика биоценозов урогенитального тракта у женщин репродуктивного возраста / Л.Д. Андосова, К.Н. Контрощикова, О.В. Качалина, А.В. Белов, Е.С. Гонова, С.Ю. Куделькина // Клиническая лабораторная диагностика. – 2013. – № 1. – С. 51-53.

53.*Роль определения онкобелка E7 16 и 18 типов вируса папилломы человека в комплексной диагностике цервикальной патологии у женщин репродуктивного возраста / О.В. Качалина, Л.Д. Андосова, Д.Д. Елисеева, С.В. Засыпкина, Г.А. Микаилова // Лечение и профилактика. – 2013. – № 2 (6). – С. 26-31.

54.*Количественный подход в диагностике

папилломавирусной инфекции у пациенток с ВПЧ-ассоциированной патологией шейки матки / Л.Д. Андосова, К.Н. Конторщикова, О.В. Качалина // Медицинский альманах. – 2013. – № 2 (26). – С. 172-174.

55.*Цитокиновый профиль при ВПЧ-ассоциированной патологии шейки матки / Л.Д. Андосова, К.Н. Конторщикова, О.В. Качалина, А.А. Радаев // Российский иммунологический журнал. – 2013. – Т.7 (16), № 2-3. – С. 288.

56.*Определение онкобелка E7 вируса папилломы человека 16-го и 18-го типов при цервикальной патологии у женщин репродуктивного возраста / О.В. Качалина, Л.Д. Андосова, Д.Д. Елисеева, С.В. Засыпкина, Г.А. Микаилова // Российский вестник акушера-гинеколога. – 2013. – № 3. – С. 27-32.

57.*Современные подходы к диагностике и лечению ВПЧ-ассоциированных заболеваний шейки матки у женщин репродуктивного возраста / О.В. Качалина, Л.Д. Андосова, Д.Д. Елисеева, С.В. Засыпкина, Г.А. Микаилова // Уральский медицинский журнал. – 2013. – № 4 (109). – С. 41-45.

58.*Состояние локального иммунитета в зависимости от тяжести плоскоклеточного интраэпителиального поражения шейки матки / Л.Д. Андосова // Медицинский альманах. – 2013. – № 6 (30). – С. 66-69.

59.Патент на изобретение Способ прогнозирования развития плацентарной недостаточности инфекционного генеза / К.Н. Конторщикова, Л.Д. Андосова, Н.Ю. Каткова. – №2364872, 20.08.2009г.

60.Патент на изобретение Способ выбора тактики ведения больных с неоплазиями шейки матки / О.В. Качалина, Т.С. Качалина, Н.М. Шахова, Д.Д. Елисеева, Л.Д. Андосова, Е.М. Михайлова, Е.В. Гребенкина, О.В. Михалева. – №2472424, 20.01.2013г.

61.Папилломавирусная инфекция и заболевания шейки матки: учебно-методическое пособие / Л.Д. Андосова, К.Н. Конторщикова, Т.С. Качалина, О.В. Качалина, Н.М. Шахова, И.А. Ляпина, М.С. Зиновьева, А.Н. Зиновьев, Т.М. Мотовилова – Нижний Новгород: Издательство НГМА, 2011. – 108 с.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ВКР	высокий канцерогенный риск
ВОЗ	Всемирная организация здравоохранения
ВПЧ	вирус папилломы человека
Е6Е7	ранние онкобелки вируса
ИЛ	интерлейкин
ИФН	интерферон
ПВИ	папилломавирусная инфекция
ПЦР-РВ	полимеразная цепная реакция в режиме реального времени
РШМ	рак шейки матки
ТФР	трансформирующий фактор роста
УПМ	условно-патогенные микроорганизмы
ЦИН	цервикальная интраэпителиальная неоплазия
HSIL	плоскоклеточное интраэпителиальное поражение высокой степени тяжести (high-grade squamous intraepithelial lesions)
LSIL	плоскоклеточное интраэпителиальное поражение низкой степени тяжести (low-grade squamous intraepithelial lesions)
p16	белок регулятор пролиферации клетки
Pap-тест	мазки по Папаниколау
R	коэффициент корреляции
TBS	Терминологическая система Бетесда (Terminology Bethesda System)