

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РФ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования

ПЕНЗЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

Факультет
физико-математических
и естественных наук

Кафедра
«Общая биология и биохимия»

Направление подготовки 06.04.01 Биология

Магистерская программа Биохимия и молекулярная биология

Форма обучения очная

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

на тему:

«АНАЛИЗ БИОХИМИЧЕСКИХ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ
МАРКЕРОВ РАКА ШЕЙКИ МАТКИ»

Студент	<u>Кап.</u>	Капустина Оксана Алексеевна
Руководитель	<u>А.Д.</u>	Кручинина А.Д.
Рецензент	<u>Р.А.</u>	Дружинина Т.А.
Нормоконтролер	<u>С.В.</u>	Клыченков С.В.

Работа допущена к защите (протокол заседания кафедры от 14.06.22 № 15)

Заведующий кафедрой Г.А. Карпова Г.А.

Работа защищена с отметкой отлично
(протокол заседания ГЭК от 22.06.22 № 3)

Секретарь ГЭК С.В. Клыченков С.В.

Пенза, 2022

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	6
1.1 Рак шейки матки как вид онкологической патологии.....	6
1.2 Мировое распространение заболевания	11
1.3 Классификация рака шейки матки	14
1.4 Рак шейки матки и вирус папилломы человека.....	16
1.5 Скрининг рака шейки матки	17
1.6 Молекулярно-генетические маркеры при раке шейки матки.....	18
1.7 Профилактика	21
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	24
2.1 Материалы исследования	24
2.2 Методы исследования:.....	24
2.2.1 Выделение (экстракция) ДНК из соскобного материала и отделяемого слизистых оболочек урогенитального тракта человека для последующего исследования на возбудителей рака шейки матки методом ПЦР (в реальном времени)	24
2.2.2 Выделения кДНК из клинического материала (плазмы крови) для последующего анализа полимеразной цепной реакции(электрофорез) для последующего исследования экспрессии онкобелка E7.....	25
2.2.3 Расширенный скрининг для дифференциального выявления ДНК вируса папилломы человека в режиме реального времени.....	27
2.2.4 Исследование экспрессии онкобелка E7 у пациенток с диагнозом рак шейки матки при положительной/отрицательной папилломавирусной инфекцией методом ПЦР (электрофорез)	27
2.2.5 Исследование биохимических показателей у пациентов с разными стадиями заболевания рака шейки матки	29
2.2.6 Методы статистической обработки результатов	31
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ.....	32

ОБСУЖДЕНИЕ	32
3.1 Результаты расширенного скрининга для дифференциального выявления ДНК вируса папилломы человека методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени	32
3.2 Результаты исследования экспрессии онкобелка E7 у пациенток с диагнозом РШМ при положительной/отрицательной папилломавирусной инфекцией методом ПЦР (электрофорез)	35
3.2 Результаты исследования биохимических показателей у пациентов с разными стадиями заболевания РШМ	37
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	55
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	57

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. Рак шейки матки занимает одно из ведущих мест среди патологий, связанных с онкогеникологией. При этом стоит отметить, что распространенность не только не стоит на месте, а, к сожалению, лишь возрастает, что, несомненно, является актуальной проблемой в сфере здравоохранения. В настоящее время научно подтверждено, что у РШМ существует вирусная этиология. ВПЧ 16-го и 18-го типов являются самыми распространенными среди онкогенных типов ВПЧ.

Если рассматривать свойства ВПЧ, стоит обратить внимание на такие онкобелки как Е6 и Е7. Данные белки способны проводить некоторые изменения в клеточном цикле опухоли, благодаря угнетению действие опухолевого супрессорного белка р53 и протеина ретинобластомы рRb.

Форма инфекции также играет несомненную роль в конечном ее исходе, а также клинической картины. Если вирус обнаруживается на раннем этапе, то такой случай инфицирования в большинстве случаев заканчивается элиминацией ВПЧ. Но если же ВПЧ находится уже в длительном существовании, то скорее всего это приведет к злокачественной трансформации клеток эпителия шейки матки.

Для профилактики предопухолевых процессов в шейке матки имеет большую важность постоянный мониторинг и скрининг ВПЧ.

Также важно проанализировать возможности рутинных методов лабораторной диагностики доступных врачам, занимающимся обследованием пациента для оценки степени распространенности опухолевого процесса и определения правильности тактики дальнейшего лечения.

Целью работы является анализ молекулярно-генетических маркеров рака шейки матки, а также оценка возможностей рутинных методов лабораторной диагностики для точного дооперационного стадирования у больных с данным заболеванием.

В соответствии с целью были поставлены следующие задачи:

- 1) провести статистический анализ расширенного скрининга для дифференциального выявления ДНК ВПЧ;
- 2) оценить экспрессию онкобелка E7 у пациенток с диагнозом РШМ при положительной/отрицательной папилломавирусной инфекцией методом ПЦР (электрофорез);
- 3) оценить возможность рутинных методов лабораторной диагностики (общий анализ крови, исследование крови на гемостаз, определение уровня D-димера, биохимических маркеров обмена железа и воспаления) для повышения точности дооперационного стадирования у больных с РШМ.

Магистерская диссертация написана на 62 листах, содержит 30 рисунков, 6 таблиц и список литературы на русском и английском языках из 59 источников.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Рак шейки матки как вид онкологической патологии

В настоящее время рак шейки матки (РШМ) является одним из важнейших направлений гинекологической онкологии. По статистике занимает второе место в структуре злокачественных опухолей женщин в мире [1].

Заболеваемость раком шейки матки среди женщин 20-40 лет увеличилась за последние годы почти вдвое (41,2%). Социально-экономическая значимость этой проблемы определяется увеличением числа больных женщин данным заболеванием [3].

Программы скрининга играют важную роль в своевременной диагностике, профилактике и адекватной терапии рака шейки матки [1]. Важно различать раннюю диагностику и скрининг. Таким образом, при ранней диагностике патологию выявляют, когда у людей появляются симптомы и симптомы заболевания [14].

История скрининговой диагностики началась в 1928 г., когда иммигрант из Франции Георгиос Папаниколау впервые заявил о возможности выявления злокачественных клеток при РШМ цитологическими методами исследования. Этот метод, позже известный как ПАП-тест, не был признан во всем мире до 1940 г. [3-5]. После введения цитологического скрининга в мировую статистику количество женщин с раком шейки матки уменьшилось [2, 6]. Так, например, в Советском Союзе после создания Центральной цитологической лаборатории (ЦЦЛ) число женщин, заболевших и умерших от рака шейки матки, значительно уменьшилось. Статистика диспансеризации в лечебно-профилактических учреждениях Октябрьской железной дороги (1965-1984 гг.) свидетельствует о достоверной тенденции снижения числа больных женщин на 74,3%. Однако после расформирования ЦЦЛ в 1990-х годах новый рост заболеваемости и смертности от рака шейки матки привлек внимание страны [2, 9].

По данным А.Д. Каприна, скрининг РШМ состоит из следующих этапов:

- I этап – популяционная, по результатам обследований образующая две основные группы – «здоровые» и «нездоровые» (во вторую группу также входят женщины с факторами риска);
- II этап – так называемый диагностический скрининг, при котором по результатам дополнительных методов исследования вторую группу делят на следующие подгруппы: фоновое течение, предраковые поражения и рак шейки матки;
- III этап – формирование групп для диспансерного наблюдения с целью дальнейшего мониторингирования больных [7].

Многие авторы придают большое значение курению как фактору риска развития рака шейки матки. Никотин и другие компоненты дыма, такие как окись и двуокись углерода, антрацен, бензопирен и т. д., считаются канцерогенными для всего организма, включая шейку матки, вызывая злокачественное новообразование эпителиальных клеток в ней. Имеются данные [9, 10], свидетельствующие о наличии компонентов сигаретного дыма в цервикальной слизи активных и пассивных курильщиков [25].

В лос-анджелесской работе Brinton указал, что гены и наследственность не играют существенной роли в патогенезе рака шейки матки, но могут определять тип течения заболевания [13].

Предположение о том, что ВПЧ играет важную роль в генезе раковой трансформации РШ появилось не так давно, а именно в 1919 году. В конце 20 столетия благодаря современным технологиям уже были доказана этиологическая роль вируса, благодаря гибридизации [18]. Вирусы включают в свой генетический материал специфические участки, ответственные за синтез белков Е6 и Е7, они в свою очередь, обуславливают злокачественные изменения эпителия ШМ [19–21].

По данным European Centre for Disease Prevention and Control считается, что у половины женщин после инфицирования вирусом папилломы человека

вырабатываются антитела, которые справляются с инфекцией и ПВИ носит транзиторный характер [17]. Стоит отметить, что по данным некоторых исследований, доказано, что у большей половины женщин, после того как происходит инфицирование ВПЧ вырабатываются специфические антитела, которые способны бороться с инфекцией, после чего ВПЧ способен элиминироваться из организма спустя несколько лет. Также вирус может приобрести латентное течение или быть реактивирован в форме персистирующей инфекции, а способствующими кофакторами являются тип и количество вируса, сочетание с другими инфекциями, передающимися половым путем и др. [18, 22, 23]. Таким образом, для возникновения РШМ необходимо обязательное условие – персистирование ПВИ [34].

Для того, чтобы обнаружить РШМ необходим цитологический метод исследования– мазок (тест) по Папаниколау и жидкостная цитология. Так как роль ВПЧ на сегодняшний день доказана, поэтому для скрининга также понадобятся такие методы как ПЦР и digene HPV тест[58].

На Рисунке 1–4 показано цитологическое исследование мазков по Папаниколау (увеличение x 400).

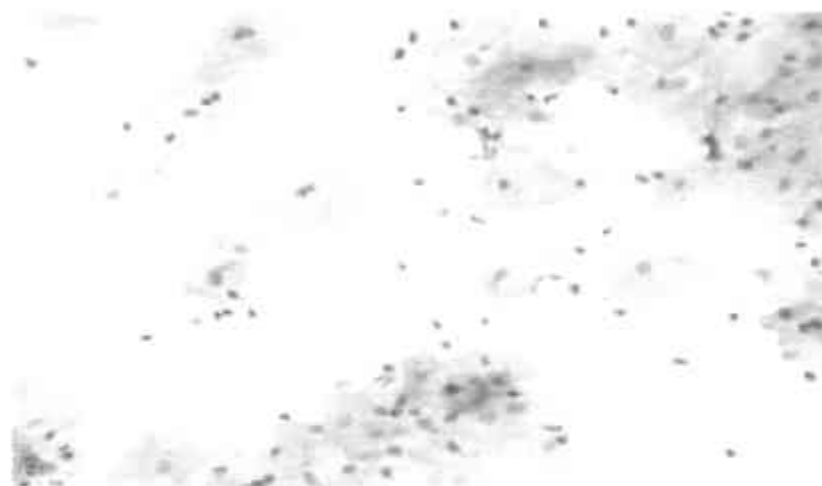


Рисунок 1. Цитологическое исследование мазков по Папаниколау –
нормоцитограмма



Рисунок 2. Цитологическое исследование мазков Папаниколау —
нейтрофильная инфильтрация.



Рисунок 3. Цитологическое исследование мазков Папаниколау —
цервикальная интраэпителиальная неоплазия I степени



Рисунок 4. Цитологическое исследование мазков Папаниколау —
койлоцитарная атипия

Для трактовки данных, полученных в результате цитологического исследования, применяют классификацию цитологических картин по Папаниколау и по Бетесда [47].

Неоднократно доказано, что ВПЧ играет основную роль в развитии РШМ. Объектом поражения онкогенных типов вируса является переходная зона ШМ, где располагаются активно делящиеся клетки (рисунок 5). Процесс развития РШМ от заражения до клинической симптоматики может занимать от года до десяти лет[51].

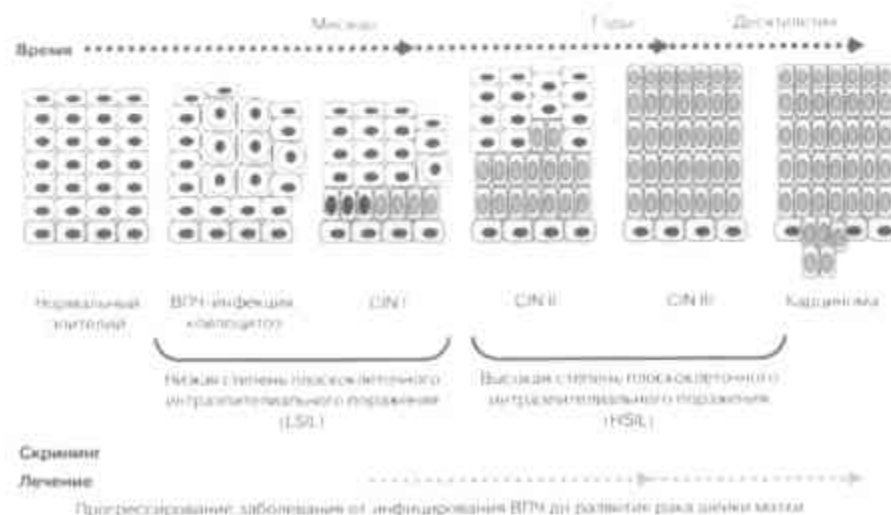


Рисунок 5. Прогрессирование заболевания от инфицирования ВПЧ до развития РШМ

При соотнесении цитологического метода скрининга и теста на ВПЧ можно заметить, что чувствительность теста на ВПЧ значительно выше, однако специфичность немного уступает цитологическому методу, что объясняется транзитным характером ПВИ у некоторых женщин [55]. Также плюсом ВПЧ-тестирование является то, что он дает возможность выделить группу риска женщин с ПВИ с целью дальнейшего наблюдения, однако не исключает гипердиагностику в связи с носительством ВПЧ [44]. Сочетание методов увеличивают точность скрининга и позволяет на ранних стадиях диагностировать интраэпителиальную неоплазию.

Женщины в возрасте от 25 до 65 лет должны обязательно проходить цервикальный скрининг хотя бы раз в три года – таковы рекомендации ВОЗ.

1.2 Мировое распространение заболевания

Нужно отметить, что отсутствие эффективного скрининга является препятствием для раннего выявления заболевания, что приводит к высокой распространённости РШМ во многих странах [53].

Ежегодно в мире регистрируется 12,7 млн больных с впервые выявленными злокачественными новообразованиями и 1,2 млн из них приходится на заболевания органов репродуктивной системы. По данным ВОЗ, ежегодно в мире выявляется более 529,4 тысяч вновь заболевших раком шейки матки и 274,9 тысяч умирает от этого заболевания (Рисунок 6).

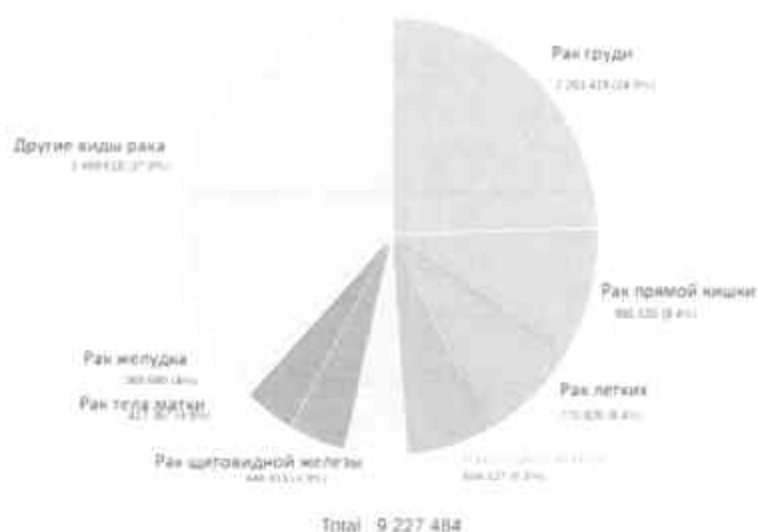


Рисунок 6. Расчетное количество новых случаев заболевания раком в мире за 2020 год.

Данные на 2020 год: рак шейки матки на 2 месте по распространенности в онкогинекологии. Первое место стабильно занимает рак груди [38].



Рисунок 7. Расчетные мировые показатели заболевания РШМ по возрасту за 2020 год

Рак шейки матки (РМШ) занимает второе место по заболеваемости среди женщин от 30 до 59 лет и в России (Рисунок 7) [46].

По состоянию на 2018 год около 311 000 женщин во всем мире умерли от рака шейки матки, и более 85% этих смертей произошли в странах с низким и средним уровнем дохода, где рак шейки матки является основной причиной смерти женщин от рака. Причина в том, что в этих частях мира очень ограничен доступ к скрининговым тестам, которые значительно увеличили бы шансы на раннее выявление и позволили бы более своевременно применять лечение[50].

Средний возраст заболевших раком шейки матки (РШМ) в России составляет 52 года. Летальность в течение первого года с момента установления диагноза составляет более 20%. (Рисунок 8).

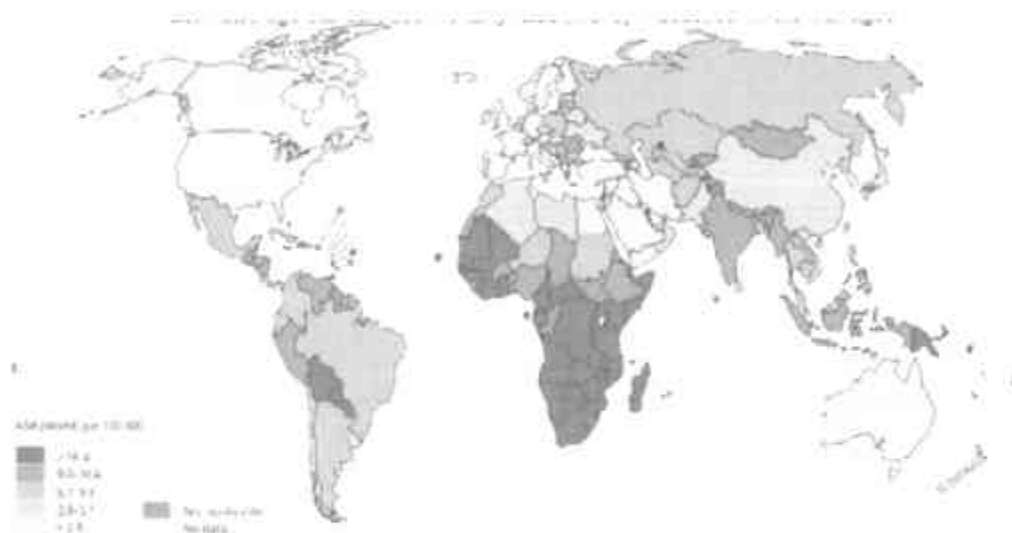


Рисунок 8. Расчетные мировые показатели смертности из-за РШМ за 2020 год

Заболеваемость раком шейки матки в России одна из самых высоких в Европе, в 2019 году выявлено более 17 тыс. новых случаев этого заболевания (Рисунок 9).

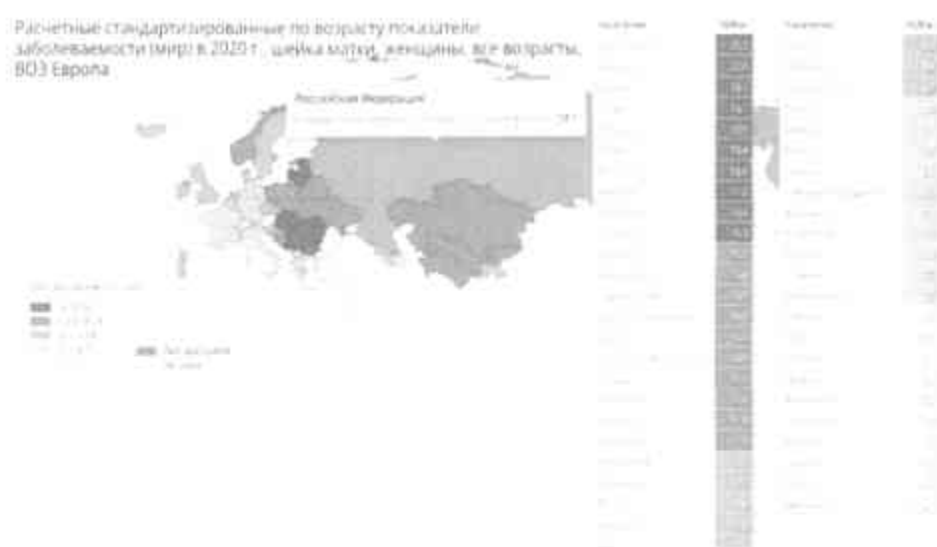


Рисунок 9. Расчетные стандартизированные по возрасту показатели заболеваемости раком шейки матки в 2020 году.

По данным на 2021 г в России ежегодно от рака органов репродуктивной системы погибает около 44 000 женщин [52].

1.3 Классификация рака шейки матки

Инфицирование эпителия шейки матки осуществляется половым путем.



Полные копии вируса обнаруживаются в эписомах клетки хозяина



В эписомах вирус завершает свой жизненный цикл, во многих случаях продуцирует транзиторную инфекцию, которая не вызывает никаких значительных цитологических изменений. При неонкогенных ВПЧ-инфекциях вирус исчезает в среднем в течение 6–9 мес.

Под дисплазией шейки матки понимают размножение эпителиальных клеток с появлением среди них атипичных, которые отличаются от нормальных строением, размерами и расположением относительно базальной мембраны. Такой эпителий в итоге утрачивает обычную «слоистость». Одна из основных причин дисплазии шейки матки — онкогенные вирусы папилломы человека, которые передаются половым путем [11] (Таблица 1).

Таблица 1 — Степени дисплазии шейки матки

Степени дисплазии	Характеристика
CIN1 (I (низкая) степени дисплазии)	Эти поврежденные клетки, выявляющиеся при PAP-анализе мазков с эпителия шейки матки с последующей биопсией, классифицируют как интраэпителиальные повреждения. На этой стадии риск развития последующих повреждений и переход в более тяжелую степень дисплазии небольшой. Однако у некоторых пациентов ВПЧ интегрирует собственную ДНК в геном клетки-хозяина, в результате чего развивается дисплазия высокой степени [57].

Таблица 1. Продолжение

CIN2 (средняя степень дисплазии)	Строение эпителиальных клеток изменяется значительно и хорошо выражено. Изменения затрагивают половину толщины слоя. Полностью излечима
CIN3 (высокая степень дисплазии)	Выступает последним предвестником рака и, по некоторым данным, может развиваться в среднем около 10 лет, последовательно переходя ко II, затем к III степени дисплазии [30]. Для возникновения и развития CIN3 требуется устойчивая инфекция ВПЧ высокого онкогенного риска [16]

При возникновении дисплазии клетки меняют свою структуру и форму, нарушается архитектоника слоев. В зависимости от глубины поражения эпителия выделяют 3 степени тяжести дисплазии или CIN (Рисунок 10)

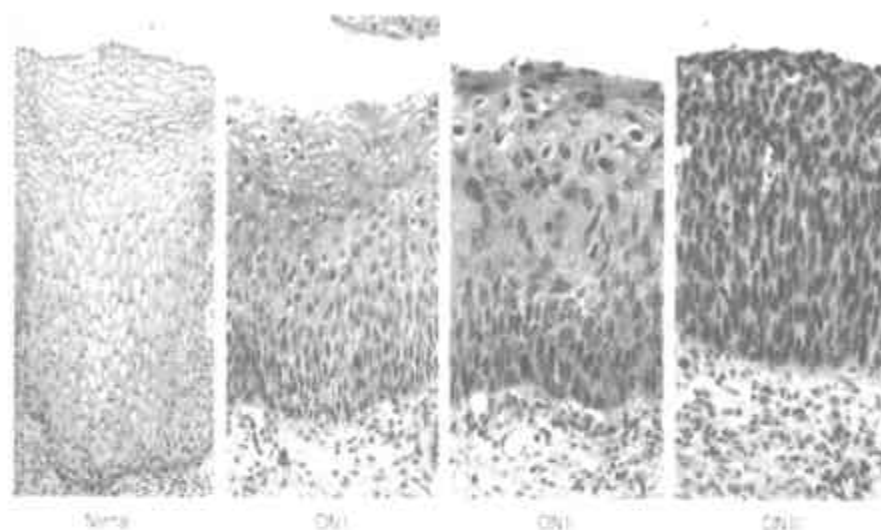


Рисунок 10. Степени дисплазии: норма, CIN I, CIN II, CIN III

1.4 Рак шейки матки и вирус папилломы человека

Стоит еще раз отметить, что молекулярно-генетические и иммунологические исследования позволили доказать происхождению РШМ способствует вирус [24].

ВПЧ относятся к семейству папилломавирусов. Вироны не имеют оболочки и содержат геном двухцепочечной ДНК. Генетический материал заключен в икосаэдрический капсид, состоящий из основных и второстепенных структурных белков L1 и L2 соответственно. Эти вирусы обладают высокой тканеспецифичностью и инфицируют как кожный, так и слизистый эпителий [31-33].

На основе геномной последовательности L1, гена, кодирующего основной белок капсида, было идентифицировано и охарактеризовано более 200 типов ВПЧ 5, по крайней мере 14 типов с высоким риском развития рака 6. Два типа ВПЧ (16 и 18) вызывают большинство видов рака, связанных с ВПЧ, и около 70% случаев рака шейки матки и предраковых поражений шейки матки [49].

Важно отметить, что ВПЧ в основном передается половым путем, но люди также могут заразиться при контакте кожа-к-коже. Примечательно, что около 80% людей — как мужчин, так и женщин — заражаются ВПЧ в какой-то момент своей жизни. Однако чаще всего иммунная система уничтожает вирус, но у некоторых инфекция сохраняется и может привести к предраковым изменениям. Более подробно, клетки, инфицированные ВПЧ высокого риска, увеличивают скорость своей пролиферации, и со временем, если иммунная система не контролирует их, они могут формировать предраковые изменения или опухоль. Следует отметить, что почти все случаи рака шейки матки связаны с инфекцией ВПЧ [35].

1.5 Скрининг рака шейки матки

На Рисунке 11 показаны рекомендации по применению теста на ВПЧ в скрининге рака шейки матки на основании данных, полученных во многих крупных международных исследованиях [5, 9, 14].



Рисунок 11. Скрининг рака шейки матки

Применение ВПЧ-теста в первичном скрининге рака шейки матки

Обзор исследований, проведенных с целью оценки диагностических характеристик цитологического исследования и тестирования на ВПЧ, показал, что:

- чувствительность ВПЧ-тестирования (88–100 %) значительно превышает чувствительность цитологического исследования (34–86 %);
- специфичность ВПЧ-тестирования (82–97 %) лишь немного уступает специфичности цитологического метода (78–99 %);
- чувствительность и прогностическая значимость отрицательного теста на ВПЧ в сочетании с отрицательным результатом цитологического теста приближаются к 100 % [26].

Высокая вирусная нагрузка также рассматривается как один из критериев клинически значимой инфекции, способной развиться в заболевание [39].

Использование теста на ВПЧ для мониторинга терапии

В настоящее время существует большой интерес к применению теста на ВПЧ для контроля терапии цервикальных поражений высокой степени. Основной предпосылкой применения теста на ВПЧ в данной области скрининга является то, что адекватное лечение цервикальных поражений приводит также к элиминации вируса, и положительный тест на вирус папилломы может служить ранним и точным индикатором рецидива[36].

Тесты для выявления и генотипирования ВПЧ, основанные на методах гибридизации и полимеразной цепной реакции (ПЦР), начали применять более 10 лет назад. Очевидно, что в скрининговых программах можно использовать только стандартизованные тесты, удовлетворяющие заданным требованиям по чувствительности и специфичности, и прошедшие клиническую апробацию[27].

1.6 Молекулярно-генетические маркеры при раке шейки матки

Геном вируса папилломы человека (ВПЧ) представлен циркулярной двуспиральной ДНК с молекулярной массой около 8 тыс. пар оснований, кодирующих всего 8 открытых рамок считывания. В процессе репликативного цикла геном ВПЧ экспрессирует от 8 до 10 белковых продуктов, и только для одного из них установлена ферментативная функция. Ранний белок E1 обладает функциями АТФазы и хеликазы. Хеликаза представляет собой фермент, расплетающий ДНК, и является известной мишенью для лекарственных препаратов[49-42].

Учитывая относительную простоту генома ВПЧ, целесообразно рассмотреть его основные функции и продукты экспрессии (Таблица 2). Известно, что 8 открытых рамок считывания кодируют 6 ранних белков и 2 поздних [45].

Таблица 2 – Продукты экспрессии генома ВПЧ, их функции.

Онкобелок	Функция
Онкобелок E5	При онкогенной трансформации клеток в своей активности он зависит от белка E7. Белок E5 нарушает процессы передачи клеточных сигналов на уровне лиганд-рецептор. Установлено, что белок E5 способен к образованию комплексов с H^+ АТФазой вакуолей и может ингибировать повышение концентрации водородных ионов (pH) в эндосомах.
Онкобелок E6	Белки E6 и E7 кооперативно вызывают иммортализацию первичных фибробластов человека и кератиноцитов. Онкобелок E6 высокоонкогенных типов ВПЧ классифицируется как белок высокого риска (high risk E6 proteins), взаимодействует с антионкобелком P53 и образует с ним устойчивый комплекс. Это приводит к быстрой протеолитической деградации P53 в убиквитин-зависимом пути протеолиза. Вместе с тем следует отметить, что онкобелок E6 вряд ли можно отнести к ключевым молекулярным мишеням. Его функция реализуется в отношении онкогенеза в очень узком интервале жизненного цикла ВПЧ и уже не играет роли в дальнейшем развитии опухоли в связи с частой делецией гена E6 в интегрированном геноме ВПЧ [56].

Таблица 2.Продолжение

Онкобелок E7	Онкобелки E7 не обладают ферментативными функциями. Этот класс вирусных белков является посредником в нарушении контроля клеточного роста, обрывая цепь физиологических сигналов клетки. Онкобелок E7 связывается с белком ретинобластомы (белок RB). Экспрессия белка E7 так же, как и белка E6, играет ключевую роль в репликации ВПЧ. Так как активная репликация ВПЧ происходит в дифференцирующихся кератиноцитах. В результате координированной экспрессии и активности белков E6 и E7 происходит выраженная экспансия шиповатого слоя эпидермиса [37]
Ранний белок E2 – транскрипционный модулятор и кофактор репликации.	Он обладает способностью сайт-специфически связываться с ДНК ВПЧ в области 12-членного палиндромного мотива, характерного для всех папилломавирусов. Белок E2 может проявлять функции как транскрипционного активатора, так и репрессора. Кроме этого, белок E2 необходим для репликации вирусной ДНК [28,48].
Белок E1 – вирусная хеликаза	Белок E1 является ДНК-хеликазой – ферментом, ответственным за деспирализацию вирусной ДНК в сайте инициации репликации – ориджине репликации. Поведение белка E1 на молекулярном уровне весьма необычно: при связывании с ДНК он образует гексомеры, т.е. ориджин репликации является инициатором его самосборки в надмолекулярный гексамерный комплекс.

Таблица 2.Продолжение

Ранний белок Е4	Белок Е4 вызывает дезинтеграцию клеточного скелета. Проявление этой уникальной функции сопровождается также олигомеризацией. Предполагается, что взаимодействие с цитоскелетом высокоспецифично и ограничено только специфическим распознаванием кератиновых филаментов [54].
Поздние белки Н1 и Н2	Основной капсидный белок вируса папилломы Н1, вероятно, несет функции распознавания клеточного рецептора, т.е. ответствен за инфицирование клеток базального слоя эпидермиса. Дальнейшая идентификация рецепторсвязывающего сайта должна привести к формулированию, стратегии конструирования лекарственных препаратов, направленных на ингибирование проникновения вируса в клетки эпидермиса [8].

1.7 Профилактика

Комплексная борьба с раком шейки матки включает:

- первичную профилактику (вакцинация против ВПЧ),
- вторичную профилактику (скрининг и лечение предраковых поражений),
- третичную профилактику (диагностику и лечение инвазивного рака шейки матки)
- и паллиативную помощь.

Вакцины, защищающие от ВПЧ 16 и 18, рекомендованы Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) и одобрены для использования во многих странах. Все мужчины и женщины в возрасте от 9 до 26 лет должны получить вакцину против ВПЧ. Наиболее эффективен в возрасте 11–12 лет. Вакцину вводят двумя дозами для мальчиков и девочек в возрасте 9–14

лет. Начиная с 15-летнего возраста и до 45 лет для полного иммунитета требуется три дозы. Эти вакцины состоят из рекомбинантных вирусных вакцинных белков, содержащих очищенные вирусоподобные частицы для каждого генотипа вируса, поэтому они защищают от разных типов ВПЧ. Важно отметить, что они не содержат вирусной ДНК, поэтому они неактивны и не могут инфицировать клетки. Что наиболее важно, вакцина против ВПЧ не защищает от всех типов ВПЧ, и поэтому женщины все равно должны проходить скрининг, несмотря на предыдущие прививки[43].

1.8 Лабораторные критерии прогрессии опухоли

Связь между опухолью и организмом осуществляется через циркуляцию крови и лимфы. Кровь определенным образом реагирует на появление и развитие злокачественной опухоли, а изменения ее показателей должны помочь клиницистам заподозрить наличие злокачественного процесса и его распространенность, как помогает оценить состояние организма при иных заболеваниях [18, 19].

К лабораторным критериям прогрессии опухоли, по данным многих исследований, относятся анемия, повышение скорости оседания эритроцитов (СОЭ), гиперкоагуляция, воспаление и их маркеры [14].

Ускорение СОЭ — скорость оседания эритроцитов считается одним из самых распространенных маркеров воспалительного процесса, так как СОЭ - это соотношения между белками и плазмы, а при воспалительном процессе повышается уровень белков острой фазы [49].

В исследованиях ряда авторов доказано, что у онкологических больных обычно наблюдаются аномалии в лабораторных тестах коагуляции, указывающие на длительно существующее субклиническое состояние **гиперкоагуляции**[29]. Это развернутое комплексное исследование гемостаза, которое позволяет оценить состояние разных звеньев свертывающей, противосвертывающей и фибринолитической систем крови и выявить риск гиперкоагуляции (чрезмерного свертывания) или

гипокоагуляции (кровотечения). Включает следующие показатели – протромбин, фибриноген, АЧТВ, тромбиновое время, антитромбин 3, D-димер.

Кроме того, опухолевые клетки продуцируют и выделяют **прокоагулянтные и фибринолитические белки**, а также воспалительные цитокины. Большинство из этих механизмов, помимо активации ими системы гемостаза, также способствуют росту опухоли [15]. С-реактивный белок (СРБ) – это основной белок плазмы крови, отражающий острые воспалительные процессы в организме. В биохимическом анализе крови повышение его уровня проявляется ростом фракции альфа-глобулинов. С-реактивный протеин назначают совместно с клиническим анализом крови, определением СОЭ[12].

Сывороточное железо важный микроэлемент, который участвует в таких важных процессах в организмах как перенос кислорода, окислительно-восстановительных реакциях, а также кроветворении [47].

Лактатдегидрогеназа содержится практически во всех тканях. Активность ЛДГ в крови повышается при заболеваниях, которые сопровождаются повреждением тканей, а также разрушением клеток. Поэтому нужно учесть данный показатель, так как он является важным маркером тканевой деструкции [55].

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материалы исследования

Для профилактики предопухолевых процессов шейки матки имеют значение методы позволяющие установить форму течения папилломавирусной инфекции, наряду с маркерами, контролирующими клеточный цикл.

Выделение (экстракция) ДНК из соскобного материала и отделяемого слизистых оболочек урогенитального тракта человека, а также плазмы крови для последующего исследования на возбудителей РШМ методом ПЦР осуществлялась с использованием соответствующих комплектов реагентов производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

2.2 Методы исследования:

2.2.1 Выделение (экстракция) ДНК из соскобного материала и отделяемого слизистых оболочек урогенитального тракта человека для последующего исследования на возбудителей рака шейки матки методом ПЦР (в реальном времени)

1. Подготовка пробы.

В чистые эппендорфы добавляем 100 мкл исследуемого образца, 300 мкл лизирующего раствора и 20 мкл сорбента (силики).

2. Лизис.

В термостате при 65 градусах в течении 5 минут. На данном этапе происходит разрушение клеточных мембран, а также вирусных оболочек, далее высвобождается ДНК, которая связывается с частицами сорбента.

3. Центрифугирование.

Клинические образцы откручиваются на при 10000 оборотах в течении 30 секунд. Надосадочная жидкость удаляется.

4. Отмывка.

Добавить 1000 мкл отмывочного раствора. Компоненты лизированного клинического материала остаются в растворе.

5. Повторное центрифугирование.

Надосадочная жидкость удаляется.

6. Сушка.

Образцы помещаются в термостат при температуре 65 градусов с открытыми крышками до полного высыхания сорбента.

7. Элюция.

После высыхания в каждый образец добавить 100 мкл элюирующего раствора. Оставить в термостате еще на 5 минут с закрытыми крышками. Происходит переход ДНК с поверхности силики в раствор.

8. Центрифугирование.

При максимальных оборотах в течение минуты.

Высокоочищенный препарат ДНК, свободный от ингибиторов реакции амплификации готов к ПЦР-исследованию.

2.2.2 Выделения кДНК из клинического материала (плазмы крови) для последующего анализа полимеразной цепной реакции (электрофорез) для последующего исследования экспрессии онкобелка E7

Для выделения РНК из плазмы крови использовался комплект реагентов «РИБО-преп».

1. Подготовка пробы.

Отобрать 1,5 мл цельной крови в чистый эппендорф, центрифугировать, отобрать 100 мкл плазмы.

2. Лизис.

В чистые эппендорфы добавить 300 мкл лизирующего раствора, 100 мкл плазмы образцов, тщательно перемешать на вортексе. Поместить в термостат на температуру 65 градусов на 5 минут. На данном этапе происходит разрушение клеточных мембран, а также вирусных оболочек, далее высвобождается ДНК, которая связывается с частицами сорбента.

3.Осаждение.

Добавить в эппендорфы по 400 мкл раствора для преципитации, перемешать на вортексе, центрифугировать в центрифуге 5 минут при 13 тыс об/мин, надосадочную жидкость удалить. Растворенная РНК/ДНК выпадает в осадок.

4.Отмывка.

Добавить 500 мкл раствора для отмывки 3. Центрифугировать 60 сек при 13 тыс об/мин. Надосадочную жидкость удалить.

Добавить 200 мкл раствора для отмывки 4. Центрифугировать 60 сек при 13 тыс об/мин. Надосадочную жидкость удалить.

5. Сушка.

Поместить эппендорфы в термостат при температуре 65 °С на 5 мин (при этом крышки пробирок должны быть открыты).

6. Элюция.

Добавить в эппендорфы по 50 мкл РНК-буфера. Перемешать на вортексе. Поместить в термостат при температуре 65 °С на 5 мин. Очищенная РНК переходит в раствор.

Для проведения дальнейшего анализа необходимо использовать кДНК. Для этого использовался также набор «РЕВЕРТА-L», предназначенный для получения кДНК на матрице РНК. В результате реакции обратной транскрипции синтезируется кДНК со всех РНК, присутствующих в исследуемом образце.

В отдельные эппендорфы отобрать по 10 мкл выделенной РНК из исследуемых образцов, добавить 10 мкл смеси «РЕВЕРТА-L». Инкубировать в течении 1 часа в термостате при 65 градусах.

2.2.3 Расширенный скрининг для дифференциального выявления ДНК вируса папилломы человека в режиме реального времени

Для выявления ДНК ВПЧ используется амплификация специфических участков вирусного генома методом ПЦР.

1. Подготовить необходимое количество стрипов со смесями для амплификации, поставить в штатив для удобства раскапки;
2. Во все лунки каждого стрипа внести по 10 мкл раствора Taq-полимеразы «Taq-тип»;
3. Во все лунки стрипа внести по 5 мкл соответствующей пробы ДНК;
5. Установить все стрипы в блок детектирующего амплификатора;
6. Запустить программу амплификации на ПК.

Детекция продуктов амплификации проводится в режиме реального времени. Сигнал о накоплении специфических продуктов амплификации регистрируется по каналу FAM и/или HEX.

2.2.4 Исследование экспрессии онкобелка E7 у пациенток с диагнозом рак шейки матки при положительной/отрицательной папилломавирусной инфекцией методом ПЦР (электрофорез)

Все пациентки, вошедшие в исследование, по результатам обследования на ВПЧ с типированием на три группы:

- 1 группа: положительный результат ВПЧ высокого канцерогенного риска (ВКР) (n=60),
- 2 группа: ВПЧ низкого канцерогенного риска (НКР) (n=60),
- 3 группа: пациентки с ВПЧ-отрицательным результатом (n=60).

1. Взять из набора тест-системы «Онкобелки E7» ПЦР пробирки. Непосредственно на воск в каждую пробирку внести по 10 мкл полимерары-Red, каплю органического масла, а также по 10 мкл выделенных кДНК-проб.

Загрузить в амплификатор «Терцик» пробы на специальную программу (57). По окончании программы, все пробирки собрать в один штатив.

2. Анализ продуктов амплификации проводится разделением фрагментов кДНК в агарозном геле.

Подготовить рабочий буфер:

Отвесить 54г ТРИСа+27,5г борной кислоты+ 20 мл ЭДТА, поместить все отвешенные реактивы в колбу, довести до 500 мл дистиллированной водой. Тщательно перемешать до полного растворения. 100 мл полученного 10-кратного буфера налить в мерную колбу, доавить 900 мл дистиллированной воды, перемешать. Рабочий (однократный) буфер готов к использованию.

1. в стеклянную колбу из термостойкого стекла на 250 мл : чайную ложку агарозы + 100 мл рабочего буфера. Перемешать, плавить в микроволновой печи до полного растворения агарозы. После перемешать.

2. Добавить 10 мкл бромистого этидия (аккуратно!)

3. Залить расплавленный гель в форму камеры. Установить гребенки.

4. Сушить 30 мин при комнатной температуре. После высыхания вынуть из него гребенки.

5.Пробирки с образцами выставить в штатив. Отобрать по 10 мкл пробы и внести в лунки. В последнюю лунку ряда добавить маркер молекулярных масс.

6. Поместить подложку с готовым гелем в камеру. Параметры источника: напряжение 155 В, стабилизация по напряжению, время электрофореза – 15 мин.

7. По завершении времени перенести гель на трансиллюминатор, Получить изображение геля на компьютере с помощью видеосистемы.

Учёт результатов ПЦР-анализа проводится по наличию или отсутствию на электрофореграмме специфических полос амплифицированной ДНК. Длина специфических полос амплифицированных фрагментов ДНК: E7.16=280 п.н, E7.18=238 п.н

2.2.5 Исследование биохимических показателей у пациентов с разными стадиями заболевания рака шейки матки

Процесс циркуляции крови и лимфы очень важен, как раз он поддерживает связь между опухолью и организмом. Клиницистам важно заранее заподозрить наличие злокачественной опухоли, а также стадию злокачественного процесса, для этого помощником выступает кровь, которая определенным образом реагирует на злокачественные процессы в организме.

Пациентки были поделены на группы в зависимости от стадии заболевания. Объем обследования всех пациенток включал (Таблица 3):

Таблица 3 – Объем исследования пациенток

Клинический анализ крови	Гемоглобин (НВ), эритроциты (RBC), средний объем эритроцита (MCV) и среднее содержание гемоглобина в эритроците, СОЭ и количество тромбоцитов
Коагулограмма	Фибриноген, АЧТВ, тромбиновое время (ТВ), протромбиновое время (ПТВ), агрегация тромбоцитов с аденозиндифосфатом (АДФ), активность антитромбина III, плазминоген, РФМК, D-димер
Определение биохимических маркеров обмена железа	Сывороточное железо (СЖ), ферритин, трансферрин
Определение биохимических маркеров и воспаления	С-реактивный белок (СРБ), лактатдегидрогеназа (ЛДГ)

Исследования клинического анализа производились на автоматическом гематологическом анализаторе Sysmex XN-1000.

Анализатор состоит из основных частей :

- основной блок : измерение и контроль пробы
- блок обработки информации

Исследуется венозная кровь, отобранная в вакутейнеры (вакуумные пробирки) с антикоагулянтом. Анализ проводится при помощи оптического блока. Анализ основан на методе проточной флуоресцентной цитометрии с использованием полупроводникового лазера. Эритроциты, гематокрит и тромбоциты анализируются при помощи эритроцитарного детектора с использованием метода гидродинамической фокусировки (DC проточный метод). Гемоглобин исследуется безцианидным SLS-методом. Этот метод интегрирует преимущества методов цианметгемоглобина и оксигемоглобина.

При проведении коагуляционных анализов использовался автоматический анализатор свертываемости крови Thrombolyzer. Принцип анализа основан на измерении отношения интенсивности потока излучения, прошедшего через измеряемый образец, и потока, падающего на образец, и последующим пересчетом его в величину определяемого параметра.

Управление и обработка результатов измерения анализатора производится с внешнего ПК

Определение биохимических маркеров обмена железа и воспаления, лактатдегидрогеназа производился на автоматическом анализаторе Cobas 6000. Принцип измерения: интегральное измерение электрохемилюминесцентного сигнала.

2.2.6 Методы статистической обработки результатов

Обработка данных осуществлялась в программном пакете Microsoft Excel методами описательной статистики: доли представлены в процентах, средние величины в виде средней со стандартным отклонением.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Результаты расширенного скрининга для дифференциального выявления ДНК вируса папилломы человека методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени

В течение последнего полугодия (1.11.2021-1.05.2022гг) по обращению пациентов при подозрении на ВПЧ-инфекцию, в лаборатории было обследовано 1821 человек. Результаты расширенного скрининга для дифференциального выявления ДНК ВПЧ представлены на Рисунке 12 и Рисунке 13.

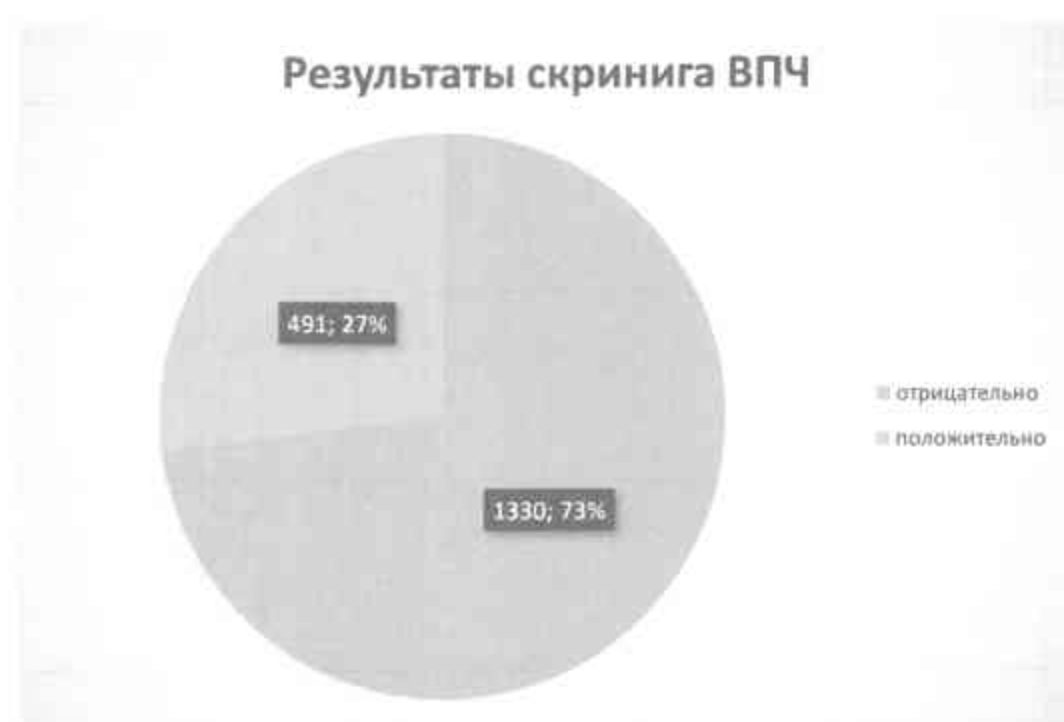


Рисунок 12. Результаты скрининга ВПЧ за 6 месяцев, %

По данным лабораторного тестирования, ДНК ВПЧ была выявлена у 491 (26,9%) пациентов. Также стоит отметить, что у 299 пациентов— моноинфекция, а смешанная инфекция, то есть 2 и более типов, была подтверждена у 192 пациентов.

Результаты типирования ВПЧ

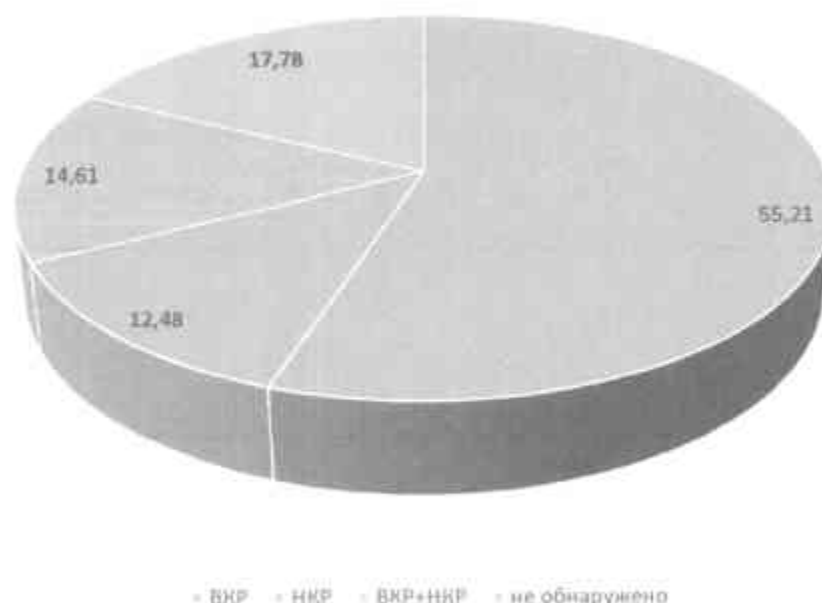


Рисунок 13. Результаты типирования ВПЧ за полгода, %

- У 55,21% обследованных были выявлены ВПЧ высокого канцерогенного риска.
- 12,48% пациенток были инфицированы ВПЧ низкого канцерогенного риска.
- У 14,61% случаев было сочетание ВПЧ ВКР и ВПЧ НКР.
- У 17,78% пациенток ДНК ВПЧ не было обнаружено.

Полимеразная цепная реакция с детекцией результатов в режиме реального времени производилось на оборудовании для амплификации «ДНК-технология» (Рисунок 14). Процесс амплификации заключается в повторяющихся циклах температурной денатурации ДНК, отжига праймеров с комплементарными последовательностями и последующей достройке полинуклеотидных цепей с этих праймеров Taq-полимеразой.

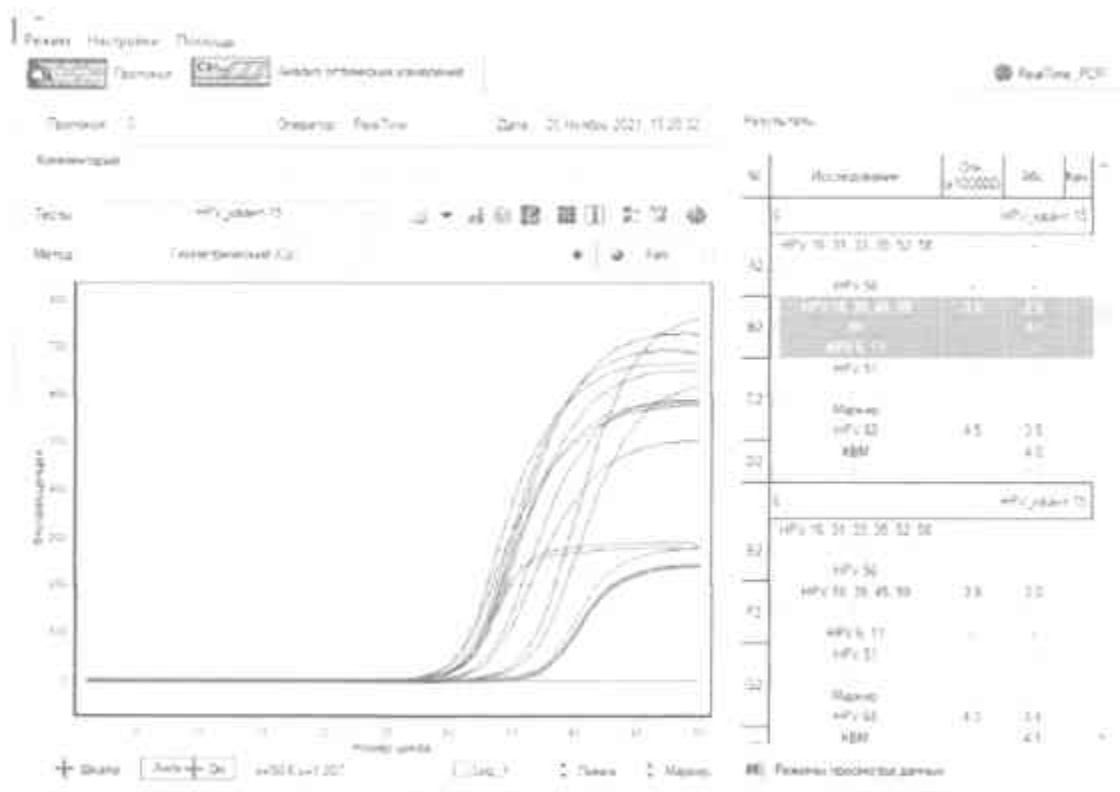


Рисунок 14. Пример результатов типирования HPV положительных образцов на графике Real-time (где красным цветом положительный результат, синий- внутренний контроль)

Учёт и интерпретация результатов реакции осуществляется автоматически с помощью программного обеспечения, поставляемого с амплификатором детектирующим. В результатах анализа необходимо учитывать значения контроля взятия материала (КВМ). При наличии в исследуемом образце ДНК одного из типов вируса папилломы человека, выявляемых набором HPV КВАНТ, в строке с названием этого типа вируса в графе «Абс.» (абсолютный тип анализа) будет указано абсолютное количество (степень десятичного логарифма концентрации, копий ДНК HPV на образец) данного типа вируса в образце.

3.2 Результаты исследования экспрессии онкобелка E7 у пациенток с диагнозом РШМ при положительной/отрицательной папилломавирусной инфекцией методом ПЦР (электрофорез)

Метод электрофореза в геле использует разницу в размере и заряде различных молекул в образце. Образец ДНК или белка, подлежащий разделению, погружают в пористый гель, помещенный в ионную буферную среду. При приложении электрического поля каждая молекула, имеющая разный размер и заряд, будет проходить через гель с разной скоростью.

Пористый гель, используемый в этой технике, действует как молекулярное сито, которое отделяет большие молекулы от более мелких. Меньшие молекулы движутся быстрее по гелю, а более крупные медленнее. Подвижность частиц также определится их индивидуальным электрическим зарядом. Два противоположно заряженных электрода, которые являются частью системы, тянут молекулы к себе на основе их заряда.

Все пациентки, вошедшие в исследование, по результатам обследования на ВПЧ с типированием на три группы:

- 1 группа: положительный результат ВПЧ высокого канцерогенного риска (ВКР) (n=60),
- 2 группа: ВПЧ низкого канцерогенного риска (НКР) (n=60),
- 3 группа: пациентки с ВПЧ-отрицательным результатом(контроль) (n=60).

На Рисунке 15 представлен пример положительных проб типирования образцов на агарозном геле(электрофорез).

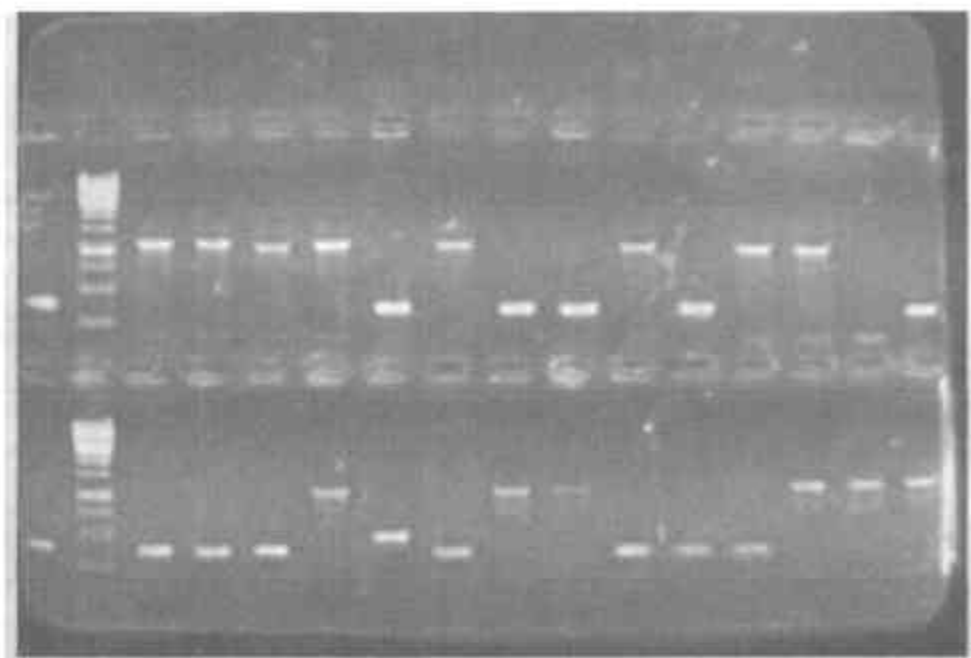


Рисунок 15. Один из результатов электроферетического разделения продуктов ПЦР-реакции

Согласно полученным результатам, E7-положительные результаты в первой группе исследуемых образцов составили 79,01% (при положительном ВПЧ). У 29,55% пациенток с цитологически подтвержденной ЦИН I, онкобелок E7 ВПЧ был отрицательным. Данные результаты могут говорить о том, что ВПЧ находился вне хромосом клетки (эписомальная форма), либо предраковая стадия заболевания (ЦИН I) развивалась из-за других ВКР типов ВПЧ.

Отмечено, что у пациентов с ВПЧ ВКР высокая частота обнаружения положительного онкобелка E7 ВПЧ, что нельзя сказать про пациентов с ВПЧ НКР. Данные результаты могут свидетельствовать о большем поражении клеток матки у группы с ВКР ВПЧ.

В третьей группе все результаты были негативными.

3.2 Результаты исследования биохимических показателей у пациентов с разными стадиями заболевания РШМ

Лабораторное исследование крови назначают при подозрении на любое заболевание. Этот тест не показывает конкретные патологии, но дает ценную информацию о состоянии организма, в частности, кроветворной и лимфатической системы.

Результаты исследования основных показателей клинического анализа крови у больных РШМ представлены в Таблице 4.

Таблица 4 – Результаты исследования основных показателей клинического анализа крови у больных РШМ

Показатель, норма	CIN1 (предраковое состояние)	T1 (Стадия I)	T1 (Стадия II)	III стадия	IV стадия
Гемоглобин, г/л 120-140	139	130	127	120	118
Эритроциты, $10^{12}/л$ 4-9	4,5	2	3,5	7	5
Ср. объем эритроцита, fl 80-100	93	91	90	87	85
Ср. содержание гемоглобина в эритроците 26-34	30	28	32	27	29

Таблица 4. Продолжение

СОЭ, мм/ч 2-15	4	7	8	18	20
Кол-во тромбоцитов, $10^9/\text{л}$, 150-400	255	236	249	301	296

Скорость оседания эритроцитов считается одним из самых распространенных маркеров воспалительного процесса, так как СОЭ - это соотношения между белками и плазмы.

На Рисунке 16 представлены результаты определения СОЭ у пациенток с разными стадиями заболевания РШМ.

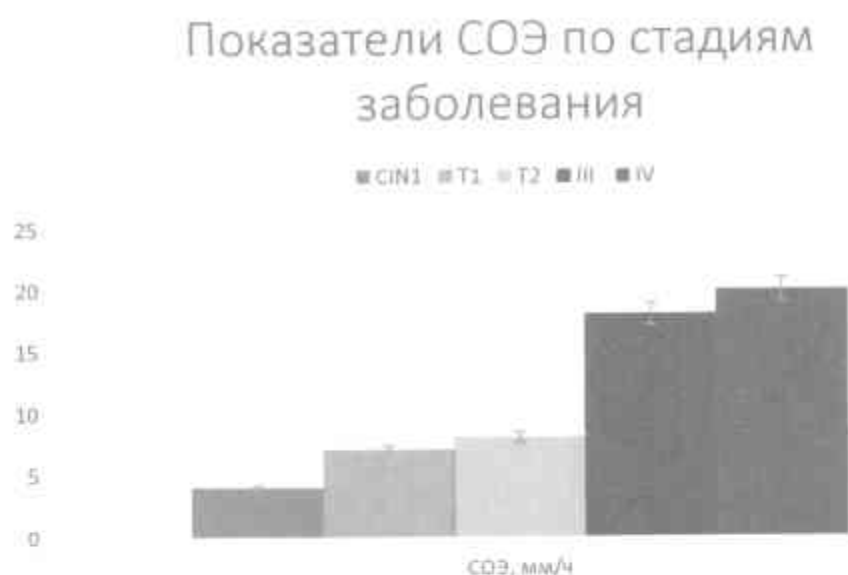


Рисунок 16. Результаты определения СОЭ у пациенток с разными стадиями заболевания РШМ(мм/ч, $M \pm m$, $n=60$)

Можно отметить, что СОЭ повышается с увеличением стадии заболевания РШМ. При воспалительном процессе повышается уровень белков острой фазы, следственно происходит и увеличение показателя СОЭ.

Ключевая задача гемоглобина в организме - доставка кислорода ко всем тканям и органам организма. Понижение уровня гемоглобина может свидетельствовать о начале кислородного истощения клеток, а также о снижении иммунитета.

На Рисунке 17 представлены результаты определения Hb у пациенток с разными стадиями заболевания РШМ.

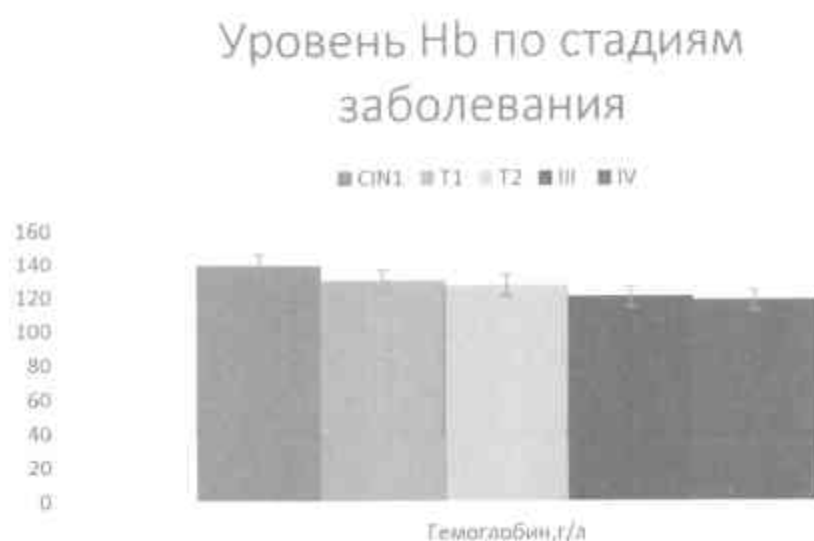


Рисунок 17. Результаты определения гемоглобина у пациенток с разными стадиями заболевания РШМ(г/л, $M \pm m$, $n=60$)

Уровень Hb также подвергся изменениям относительно повышения стадии заболевания, а именно, чем выше стадия, тем ниже уровень гемоглобина. Но стоит отметить, что уровень показателя не выходил из допустимых пределов нормы.

Эритроциты способствуют транспорту гемоглобина. Снижение уровня эритроцитов может говорить о хроническом или остром кровотечении, либо о том, что происходит разрушение эритроцитов внутри организма. Также причиной снижения данного показателя может свидетельствовать о недостатке железа или витамина В₁₂, которые способствуют образованию гемоглобина.

На Рисунке 18 представлены результаты определения эритроцитов у пациенток с разными стадиями заболевания РШМ.



Рисунок 18. Концентрация эритроцитов у пациенток с разными стадиями заболевания РШМ(fl, $M \pm m$, $n=60$)

Показатель эритроцитов находился в пределах нормы у всех стадий, при этом надо отметить, при повышении стадии РШМ происходит снижение показателя.

Показатели обмена железа участвуют в таких важных процессах в организмах как перенос кислорода, окислительно-восстановительных реакциях, а также кроветворении. Показатели воспаления (СРБ) отражают острые воспалительные процессы в организме.

В Таблице 5. представлены результаты анализа значений биохимических маркеров обмена железа и воспаления у больных РШМ.

Таблица 5 – Результаты анализа значений биохимических маркеров обмена железа и воспаления у больных РШМ.

Показатель, норма	CIN1 (предраковое состояние)	T1 (Стадия I)	T1 (Стадия II)	III стадия	IV стадия
СРБ, мл/л 0-5,0	1,0	3,0	12,0	8,0	9,0
Сывороточное железо, мкмоль/л 9,0-30,4	13,0	12,7	22,1	16,3	10,2
Трансферрин, г/л 2,5-3,8	2,7	2,4	3,1	2,1	2,9
Ферритин, мкг/л 10-120	33,8	27,8	89,0	66,9	86,3
ЛДГ, Ед/л 0-480	226,0	246,4	339,4	205,7	221,1

С-реактивный белок (СРБ) – это основной белок плазмы крови, отражающий острые воспалительные процессы в организме.

На Рисунке 19 представлены результаты определения уровня СРБ у пациенток с разными стадиями заболевания РШМ.



Рисунок 19. Уровень СРБ у пациенток с разными стадиями заболевания РШМ (мг/л, $M \pm m$, $n=60$)

Статистических значимых различий при исследовании уровня СРБ в зависимости от стадии заболевания РШМ в данном исследовании выявить не удалось. Данные результаты могут свидетельствовать о воспалительном процессе при выходе опухоли в параметрий (околоматочную клетчатку), что и свидетельствует об увеличении СРБ.

Сывороточное железо важный микроэлемент, который участвует в таких важных процессах в организмах как перенос кислорода, окислительно-восстановительных реакциях, а также кроветворении.

На Рисунке 20 представлены результаты определения концентрации СЖ у пациенток с разными стадиями заболевания РШМ.



Рисунок 20. Концентрация СЖ у пациенток с разными стадиями заболевания РШМ (мкмоль/л, $M \pm m$, $n=60$)

На основе выполненного анализа можно утверждать, что средние показатели уровня СЖ в зависимости от стадий заболевания, значимо не различались. Показатели оставались в пределах нормы во всех группах.

Трансферрин - гликопротеин, синтезирующийся в печени, главной задачей которого является связывание окисленного железа. Уменьшение этого показателя может свидетельствовать о дефиците железа в организме, увеличение – об интенсивном распаде гемоглобина.

На Рисунке 21 представлены результаты определения уровня трансферрина у пациенток с разными стадиями заболевания РШМ.

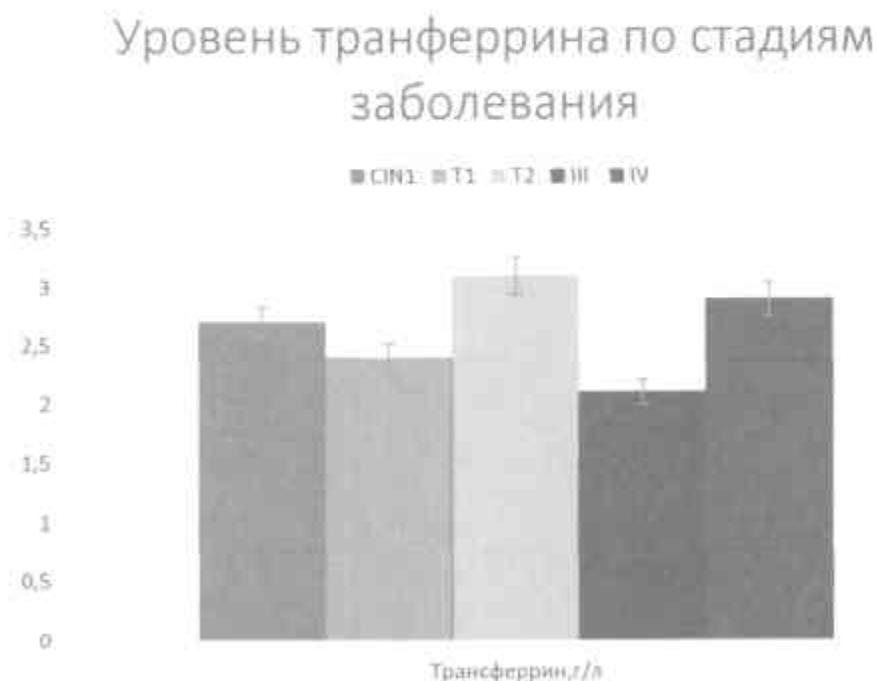


Рисунок 21. Уровень трансферрина у пациенток с разными стадиями заболевания РШМ (г/л, $M \pm m$, $n=60$)

Средние показатели уровня трансферрина у больных, в зависимости от стадий заболевания, значимо не различались. Показатели оставались в пределах нормы во всех группах.

Ферритин является главным показателем запаса железа в организме, помогает поддерживать железо в биологически полезной форме. Анализ крови на ферритин помогает в диагностике железодефицитной анемии, а также анемии, сопровождающей инфекционные, ревматические и опухолевые заболевания.

На Рисунке 22 представлены результаты определения уровня ферритина у пациенток с разными стадиями заболевания РШМ.

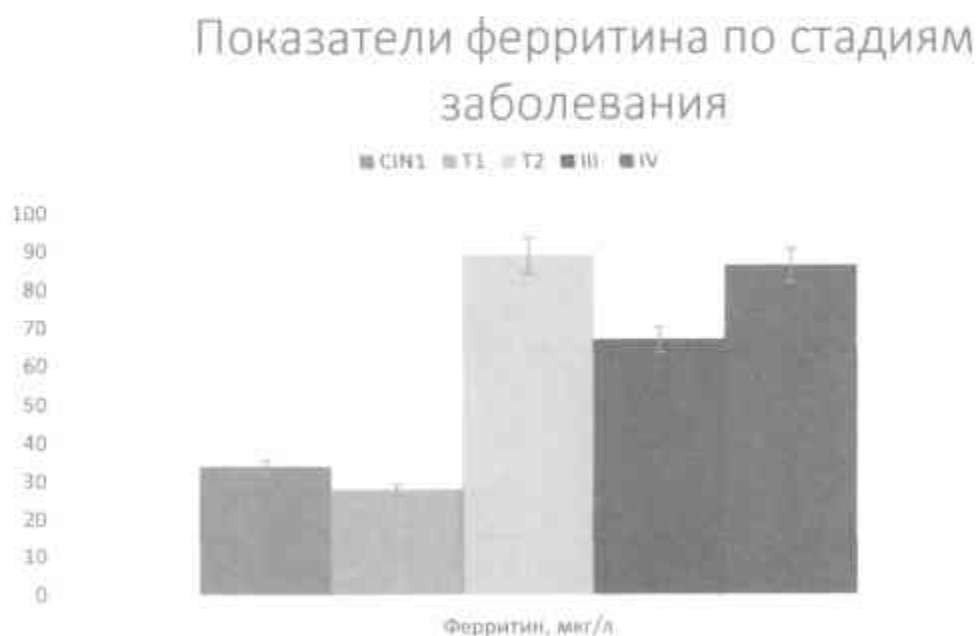


Рисунок 22. Уровень ферритина у пациенток с разными стадиями заболевания РШМ (мкг/л, $M \pm m$, $n=60$)

Средние показатели уровня ферритина у больных, в зависимости от стадий заболевания, значимо не различались. Показатели оставались в пределах нормы во всех группах.

Лактатдегидрогеназа содержится практически во всех тканях. Активность ЛДГ в крови повышается при заболеваниях, которые сопровождаются повреждением тканей, а также разрушением клеток. Поэтому нужно учесть данный показатель, так как он является важным маркером тканевой деструкции. Но стоит отметить, что увеличение активности фермента не обязательный фактор, указывающий на какое-то конкретное заболевание.

На Рисунке 23 представлены результаты определения активности ЛДГ у пациенток с разными стадиями заболевания РШМ.



Рисунок 23. Активность ЛДГ у пациенток с разными стадиями заболевания РШМ (Ед/л, $M \pm m$, $n=60$)

На основе выполненного анализа можно утверждать, что средние показатели уровня ЛДГ у больных, в зависимости от стадий заболевания, значимо не различались. Показатели оставались в пределах нормы во всех группах.

Результаты исследования значений биохимических маркеров обмена железа и воспаления у больных РШМ позволяют нам практически убедиться, что в целом данные показатели оказались неинформативными для оценки стадии опухолевого процесса. В Таблице 6 приведены результаты исследования гемостаза у больных РШМ.

Таблица 6 – Результаты исследования гемостаза у больных РШМ.

Показатель, норма	CIN1 (предраковое состояние)	T1 (Стадия I)	T1 (Стадия II)	III стадия	IV стадия
Фибриноген, г/л 2,0-4,0	2,3	2,5	2,7	2,8	3,1
РФМК, мг/мкл 0,0-4,0	5,0	5,9	5,7	13	14,5
Агрегация тромбоцитов с АДФ, % 80-120	91	88	71	68	71
D-димер, мг/л 0,0-0,55	0,1	0,2	0,1	0,4	0,3
АЧТВ,с 26,0-37,0	30,1	30,5	28,9	30,0	31,1
ПТВ,с 14,6-22,0	11,3	12,1	11,8	11,5	11,9
Активность антитромбина III, % 80-112	103,1	105,2	101,1	103,2	99,0

Фибриноген образуется в печени, главной его задачей является становиться растворимым, при этом переходя в волокнистую структуру благодаря ферменту тромбину. Данный процесс обуславливает свертываемость крови (коагуляцию).

На Рисунке 24 представлены результаты определения уровня фибриногена у пациенток с разными стадиями заболевания РШМ.

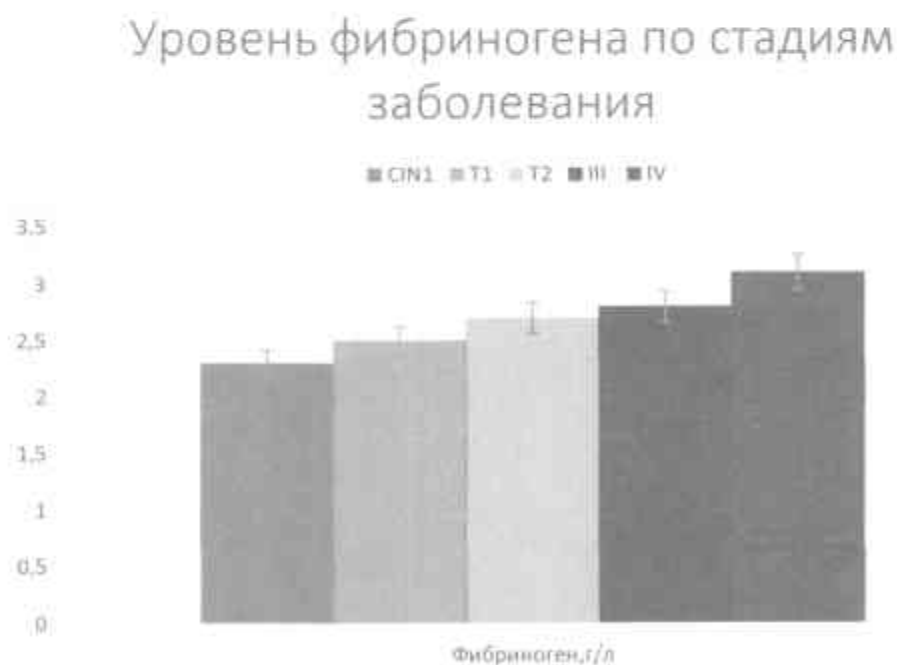


Рисунок 24. Уровень фибриногена у пациенток с разными стадиями заболевания РШМ (г/л, $M \pm m$, $n=60$)

Согласно полученным данным, можно сказать, что уровень фибриногена значительно повышается по возрастанию стадии заболевания, но при этом стоит отметить, что показатели остаются в пределах допустимой нормы. Таким образом, можем подтвердить важность исследования данного показателя в комплексе с другими показателями крови.

Растворимый фибрин-мономерные комплекс – это частицы тромбов, появляющиеся в крови в результате развития массивных тромбозах. Высокие концентрации РФМК обычно у больных с ДВС- синдромом.

На Рисунке 25 представлены результаты определения уровня РФМК у пациенток с разными стадиями заболевания РШМ.

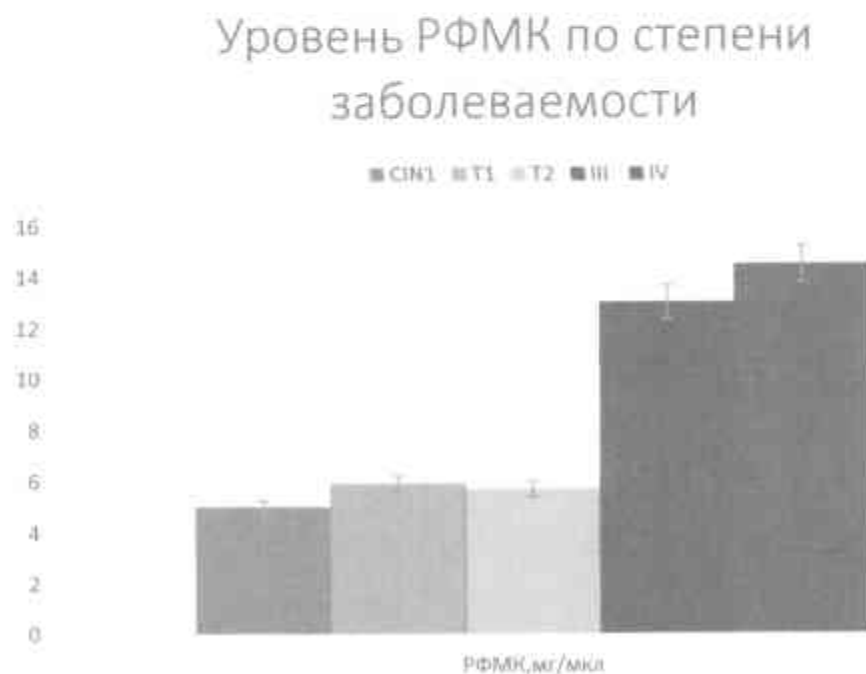


Рисунок 25. Уровень РФМК у пациенток с разными стадиями заболевания РШМ (мкг/мл, $M \pm m$, $n=60$)

Исследования также показали значимость анализа РФМК, так как мы можем подтвердить прямую зависимость между повышением уровня РФМК и степенью заболевания РШМ: чем выше стадия, тем выше уровень РФМК.

Важно для диагностики оценки нормального склеивания (агрегации), тромбоцитов, то есть свертываемости крови, с использованием специального индуктора агрегации — аденозиндифосфата (АДФ).

На Рисунке 26 представлены результаты определения агрегации тромбоцитов у пациенток с разными стадиями заболевания РШМ.

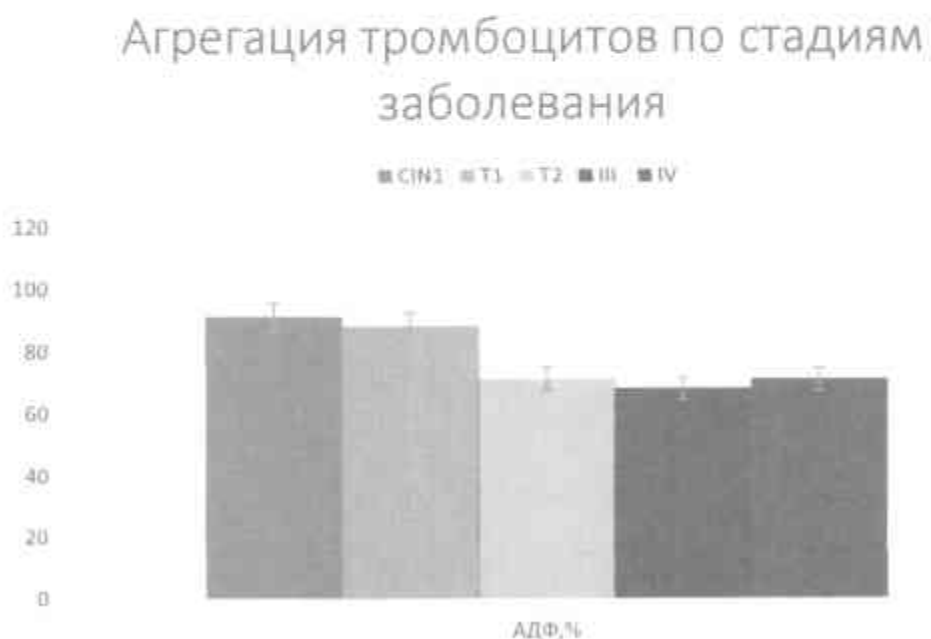


Рисунок 26. Определение агрегации тромбоцитов у пациенток с разными стадиями заболевания РШМ (мкг/л, $M \pm m$, $n=60$)

Отметим, что также существует обратная зависимость между снижением агрегации тромбоцитов с АДФ и повышением стадии заболевания РШМ.

На Рисунке 27 представлены результаты определения уровня D-димера у пациенток с разными стадиями заболевания РШМ.

Значения D-димера по стадиям заболевания

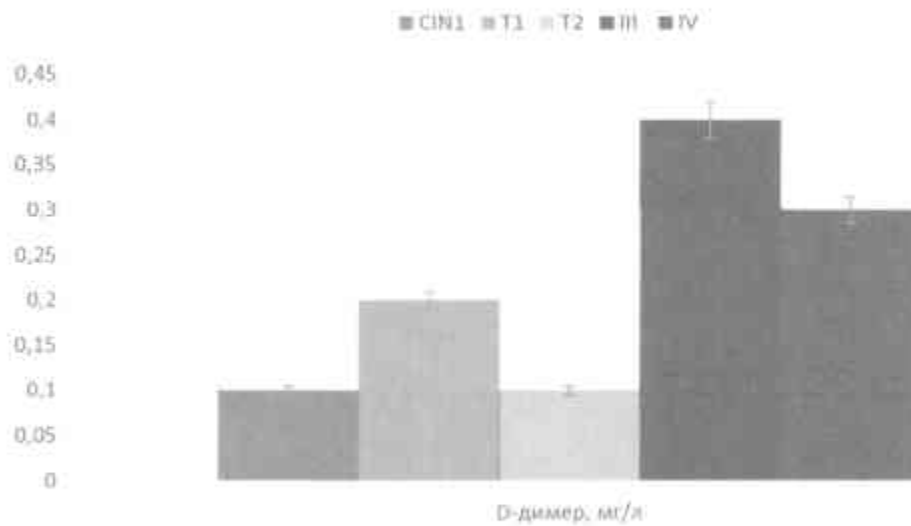


Рисунок 27. Уровень D-димера у пациенток с разными стадиями заболевания РШМ (мг/л, $M \pm m$, $n=60$)

Особый интерес представляют и изучения показателей D-димера. Значения были в пределах нормы, но при этом нельзя не отметить заметное увеличения показателей от начальных стадий заболевания к более поздней. Отсюда следует, что уровень D-димера также имеет важность исследования в комплексе с другими показателями крови при заболевании РШМ.

На Рисунке 28 представлены результаты определения значения АЧТВ у пациенток с разными стадиями заболевания РШМ.

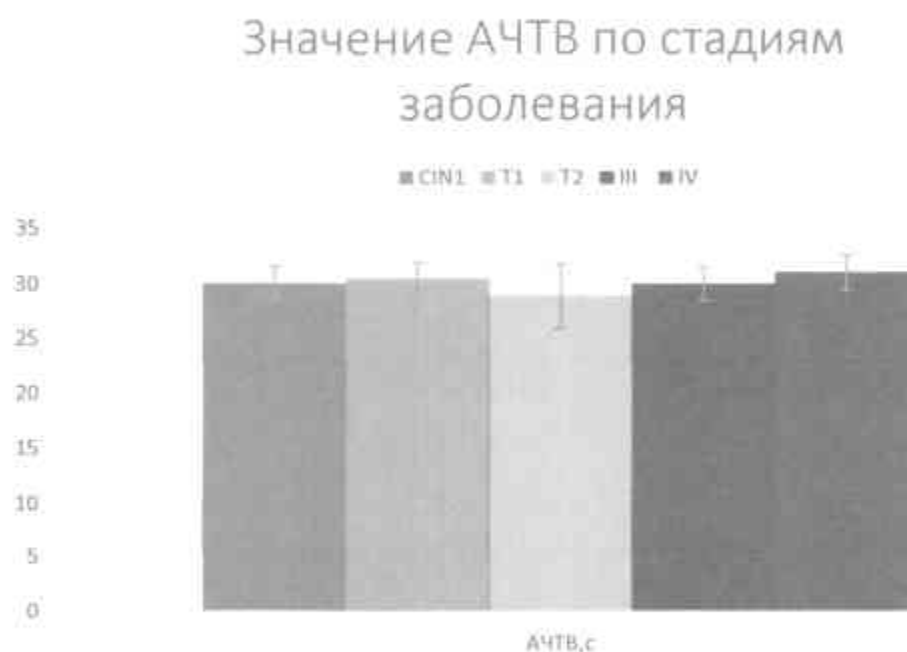


Рисунок 28. Значение АЧТВ у пациенток с разными стадиями заболевания РШМ (с, $M \pm m$, $n=60$)

Активированное частичное тромбопластиновое время исследуется для оценки скорости образования фибринового сгустка. Данный показатель помогает оценить эффективность остановки кровотечения плазменными факторами [17].

На Рисунке 29 представлены результаты определения значения ПТВ у пациенток с разными стадиями заболевания РШМ.

Также один из важнейших показателей коагулограммы, который оценивает состояние свертывающей системы крови.



Рисунок 29. Значение ПТВ у пациенток с разными стадиями заболевания РШМ (с, $M \pm m$, $n=60$)

На Рисунке 30 представлены результаты определения активности антитромбина у пациенток с разными стадиями заболевания РШМ.

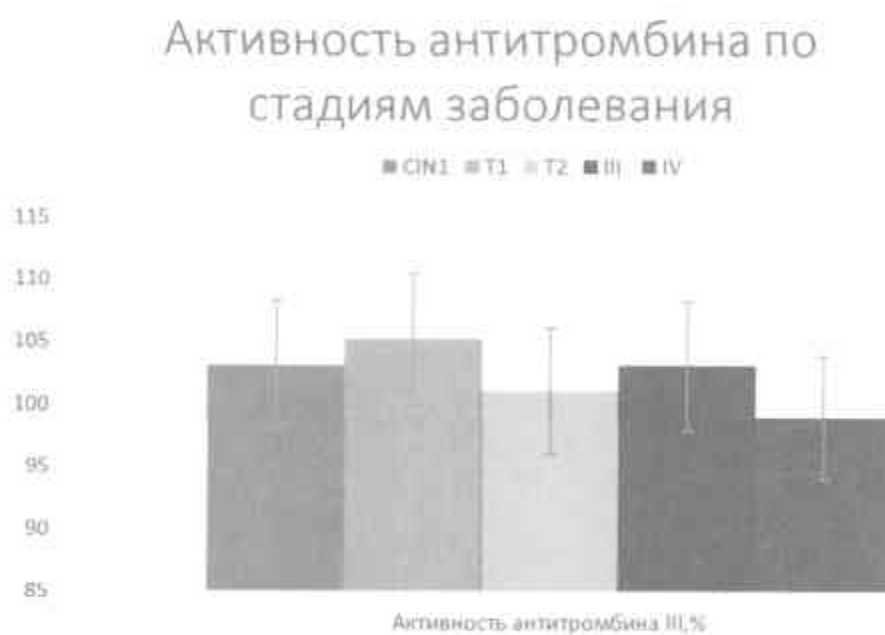


Рисунок 30. Активность антитромбина у пациенток с разными стадиями заболевания РШМ (% , $M \pm m$, $n=60$)

Задача антитромбина III заключается в том, чтобы кровь оставалась жидкой, то есть благодаря данному коагулянту происходит блокировка факторов свертываемости [47].

Приведенный выше анализ дает достаточные основания утверждать, что АЧТВ, ТВ, и ПТВ, активность антитромбина III не показали достоверных различий при исследовании больных с различными стадиями заболевания РШМ. Таким образом, не рекомендуется использовать данные показатели для повышения точности диагностики.

Подводя итоги, следует отметить, что недостаточный объем данных также сыграл огромную роль в исследовании. Поэтому рекомендуется, при получении дополнительных данных, скорректировать данную модель точности диагностирования стадии заболевания РШМ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в ходе выполнения магистерской работы был проведен статистический анализ расширенного скрининга для дифференциального выявления ДНК ВПЧ В, исходя из обращения пациентов в медицинский центр по поводу подозрения на ВПЧ-инфекцию в течение последнего полугодия (1.11.2021-1.05.2022гг), изучена экспрессия онкобелка Е7 у пациенток с диагнозом РШМ при положительной/отрицательной папилломавирусной инфекцией методом ПЦР (электрофорез), а также возможность методов лабораторной диагностики для повышения точности стадирования у больных с РШМ.

Исходя из результатов, можно сделать следующие **выводы**:

1) Благодаря полученным результатам, мы можем подтвердить высокий уровень инфицированности ВПЧ у женщин с различными гинекологическими заболеваниями, что указывает на необходимость проведения скрининговых исследований методом ПЦР для выявления ВПЧ высокого канцерогенного риска;

2) Отмечено, что у пациенток с заболеванием РШМ, а также при сопутствующей папилломавирусной инфекцией высокого канцерогенного риска, отмечается повышенное содержание онкобелка Е7. Данный результат говорит о том, что уровень Е7 является молекулярным маркером, который указывает на агрессивность зарождающегося опухолевого процесса;

3) Результаты клинического анализа показали, что данные показатели (СОЭ, гемоглобин, концентрация эритроцитов) можно учитывать как биомаркеры заболевания РШМ, также результаты основных показателей гемостаза (фибриноген, РФМК, агрегация тромбоцитов с АДФ), могут служить как маркеры заболевания и для диагностики метастазов, но анализ значений биохимических параметров обмена железа и воспаления показал, что, в целом, они оказались неинформативными для оценки степени распространенности опухолевого процесса.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АДФ – Аденозиндифосфат

АЧТВ – Активированное частичное тромбопластиновое время

ВПЧ – вирус папилломы человека

ВПЧ НКР – вирус папилломы человека низкого канцерогенного риска

ВПЧ ВКР – вирус папилломы человека высокого канцерогенного риска

ВОЗ – Всемирная Организация Здравоохранения

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ЛДГ – Лактатдегидрогеназа

ПТВ – Протромбиновое время

РФМК – растворимые фибрин-мономерные комплексы

РШМ – рак шейки матки ПЦР – полимеразная цепная реакция

СЖ – сывороточное железо

СОЭ – Скорость оседания эритроцитов

СРБ – С-реактивный белок

ТВ – тромбиновое время

CIN – Cervical Intraepithelial Neoplasia

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Баггиш М. Кольпоскопия. Атлас-справочник. Москва: Практика, 2008. 340 с.
2. Бургхардт Эрих, Пикель Гельмут, Жирарди Франк. Кольпоскопия. Атлас и руководство. Москва: Медицинская литература, 2013. 168 с.
3. Василенко Л., Садретдинова Т., Зрячкин Н. Патология шейки матки и перинатальные осложнения. Москва: LAP Lambert Academic Publishing, 2014. 120 с.
4. Ванденбуш К., З.Али, Л.Розенталь Д., Ванг Р. Цитологическое исследование цервикальных мазков. Атлас. Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2018. 206 с.
5. Дамиров М.М.. Кольпоскопия. Москва: Бином, 2016. 256 с.
6. Коротких Н. Лучевая терапия рака шейки матки при полирадиомодификации. Москва: LAP Lambert Academic Publishing, 2012. 104 с.
7. Краснопольский В.И. Облигатные формы предрака и инвазивный рак шейки матки. Руководство для врачей. Москва: Специальное издательство медицинских книг. 2017. 160 с.
8. Лапцевич Т.П., Истомин Ю.П., Чалов В.Н. Фотодинамическая терапия цервикальной интраэпителиальной неоплазии. Москва: LAP Lambert Academic Publishing. 2008. 104 с.
9. Л.Стерна П., Генри С.Китченера. Вакцины для профилактики рака шейки матки. Москва: МЕДпресс-информ. 2009. 192 с.
10. Максимов С.Я., Гусейнов К.Д., Баранов С.Б., Бахидзе Е.В. Комплексное лечение рака шейки матки. Методические рекомендации. Москва: Н-Л, 2008. 20 с.
11. Новикова Е.Г., Антипов В.А., Балахонцева О.С. Радикальная абдоминальная трахелэктомия. Москва: Практическая Медицина. 2012. 112 с.

- 12.Подистов Ю.И., Лактинов К.П., Петровичев Н.Н., В.В. Брюзгин. Эпителиальные дисплазии шейки матки (диагностика и лечение). Москва: ГЭОТАР-Медиа. 2006. 138 с.
- 13.Полонская Н.Ю., Юрасова И.В. Цитологическое исследование цервикальных мазков. Пап-тест. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2018. – 168 с.
- 14.Роговская С.И. Практическая кольпоскопия. Библиотека врача-специалиста. Москва: ГЭОТАР-Медиа. 2018. 256 с.
- 15.Риту Наяйр, Дэвид Уилбур. Цервикальная цитология по системе Бетесда. Терминология, критерии и пояснения. Москва: Практическая Медицина. 2017. 304 с.
16. Шайн А. А. Онкология. Учебник для студентов медицинских вузов. Москва: Медицинское информационное агентство.2004. 23 с.
- 17.ASCCP-Sponsored Consensus Conference.2006 consensus guidelines for the management of women with abnormal cervical screening tests // J Low Genit Tract Dis. - 2007. - Vo. 11, N 4. - P. 201-222.
18. Andrae B., Kemetli L. et al. Screening-preventable cervical cancer risks: evidence from a nationwide audit in Sweden // J. Natl. Cancer Inst. № 2. 2008. 29p.
19. American Society for Colposcopy and Cervical Pathology-sponsored Consensus Conference. 2006 consensus guidelines for the management of women with cervical intraepithelial neoplasia or adenocarcinoma in situ / T.C. Wright // J Low Genit Tract Dis. 2007. Vol. 11, N 4. P. 223-239.
20. ASCCP-Sponsored Consensus Conference.2006 consensus guidelines for the management of women with abnormal cervical screening tests / T.C. Wright // J Low Genit Tract Dis. 2007.Vo. 11, N 4. P. 201-222.
21. American Society for Colposcopy and Cervical Pathology-sponsored Consensus Conference. 2006 consensus guidelines for the management of women with cervical intraepithelial neoplasia or adenocarcinoma in situ / T.C. Wright // J Low Genit Tract Dis. 2007. Vol. 11, N 4. P. 223-239.

22. Bambauer R, Latzo R, Schiel R. therapeutic plasma exchange and selective plasma separation methods. Fundamental technologies, pathology and clinical results. 4th ed // Pabst science Publishers, D-49525 Lengerich. 2013. P.395-402.
23. Bae S, Oh K, Kim H et al. The effect of alloferon on the enhancement of NK cell cytotoxicity against cancer via the up-regulation of perforin/granzyme B secretion // Immunobiology. 2013. №218(8). P.1026.
24. Cole D.J., Jones A.C. The treatment of locally advanced carcinoma of the cervix with radiation, 5 fluorouracil and mitomycin C//Brit. J. Radiol. 1993. Vol. 66 (Suppl). P. 52.
25. Chen Z.Y., Ma Y.B., Shen X.G., Zhang X.L. // ZhongLiu Za Zhi. 2007 Apr. 29(4). P. 305-308.
26. Cuschieri K.S., Cubie H.A., Whitley M.W., Gilkison G., Arends M.J., Graham C., McGoogan E. Persistent high risk HPV infection associated with development of cervical neoplasia in a prospective population study // J Clin Pathol. 2005. P. 946—950.
27. Deks E. Curr Opin Oncol. 2007 Sep. P. 512-515
28. Decker K., Demers A. Papanicolaou test utilization and frequency of screening opportunities among women diagnosed with cervical cancer // Open Med. 2009. 2: p.140.
29. Higgins J.P.T., Altman D.G. In: Cochrane Handbook for systematic Reviews of interventions. West Sussex, UK: Wiley, 2008. 297-333.
30. E7Oncoprotein of human papilloma virus as new marker of early stages of carcinogenesis / V. I. Kiselyov, P. G. Sveshnikov, P. M. Baranovsky // Terra Medica. 2011 . Vol. 1 . P. 35.
31. European guidelines for quality assurance in cervical cancer screening: recommendations for cytology laboratories / H.G. Wiener //Cytopathology. 2007. N 18. P. 67-78

32. Guidelines for human papillomavirus DNA test requirements for primary cervical cancer screening in women 30 years and older / C.J. Meijer // *Int J Cancer*. 2009. Vol. 124, N 3. P. 516-520.
33. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods // *Int J Cancer*. 2019. 144(8). P. 1941-1953.
34. Jones W.B., Shingleton H.M., Russell A. et al. Patterns of care for invasive cervical cancer. Results of a national survey of 1984 and 1990 // *Cancer (Philad)*. 1995. Vol. 76 (10 Suppl.). P. 1934-1947.
35. Keys K.M., Bundy B.N., Stehman F.B. et al. Cisplatin, radiation and adjuvant hysterectomy compared with radiation and adjuvant hysterectomy for bulky stage Ib cervical carcinoma // *N. Engl. J. Med.* 1999. Vol. 340. P. 1154-1161.
36. Leutu C., Botezatu A., Goia C.D., Socolov D., Cornitescu F., Teleman S., Huica I., Iancu I., Anton G. P16INK4D — a possible marker in HPV persistence screening // *Roum Arch Microbiol Immunol*. 2009. P. 183—189
37. Schmidt D., Bergeron C., Denton K.J., Ridder R. P16/Ki-67 dualstain // *Vol. 340*. P. 14-19.
38. Menshenina AP, Kit OI, Moiseenko TI et al. Combination treatment with plasmapheresis and non-specific immunotherapy for locally advanced cervical cancer // *Journal of Critical Reviews*. 2020. 7(12). P. 2235-2241.
39. Mikkelsen L., Phillips D.E., AbouZahr C., Setel P.W., de Savigny D., Lozano R., Lopez A.D. A global assessment of civil registration and vital statistics systems: monitoring data quality and progress // *Lancet*. 2017. Vol. 386(10001). P. 1395-1406.
40. Mulder KCL, Lima LA, Miranda VJ et al. Current scenario of peptide-based drugs: the key roles of cationic antitumor and antiviral peptides *Frontiers in Microbiology*. 2013. p. 321.

41. Narimatsu A., Ito T. Neoadjuvant chemotherapy with continuous intraarterial infusion (CDDP, 5Fu) in the treatment of advanced cervical and endometrial adenocarcinoma//J. Jap. Soc. Cancer Ther. 2005. Vol. 30, N 2. P. 408.
42. Nevin J., Bloch B., Van Wijk L. et al. Primary chemotherapy with bleomycin, ifosfamide and cisplatin (BIP) followed by radiotherapy in the treatment of advanced cervical cancer. A pilot study//Europ. J. Gynaecol. Oncol. 2005. Vol.16 (1). P.170-175.
43. Okawa T. Controversy of treatment for recurrent cancer after definitive radiotherapy// Nihon gan chiryo gakkaiishi // J. Jap. Soc. Cancer Ther. 1995. Vol. 30, N2. P. 37.
44. Ogilvie G.S., van Niekerk D.J. et al. A randomized controlled trial of Human Papillomavirus (HPV) testing for cervical cancer screening: trial design preliminary results // BMC Cancer. 2010. P. 111.
45. Peirson L., Fitzpatrick-Lewis D. Screening for cervical cancer. Hamilton, ON/McMaster Evidence Review and Synthesis Centre, 2012.
46. Puccala E., Coebergh J.W.W et al. Mass screening programmes and trends in cervical cancer in Finland and the Netherlands // Int. J. Cancer. 2008. P.1854.
47. Rebolj M., van Ballegooijen M. et al. Incidence of cervical cancer after several negative smear results by age 50: prospective observational study // BMJ. 2009. P.1354.
48. Sankaranarayanan R., Nene B.M. et al. HPV screening for cervical cancer in rural India // N. Engl. J. Med. 2009. P.1385.
49. Sasieni P., Adams J. et al. Benefit of cervical screening at different ages: evidence from UK audit of screening histories. Br. J. Cancer. 2003.p. 288
50. Sasieni P., Castanon A. et al. Effectiveness of cervical screening with age: population based case - control study of prospectively recorded data // BMJ. 2009. P. 2968.

51. Sasieni P., Castanon A. et al. Screening and adenocarcinoma of the cervix // *Int. J. Cancer*. 2009.p. 529.
52. Parkin D.M. Death from cervical cancer//*Lancet*.1999. N8484. P. 797.
53. Rose P.G., Bundy B.N., Watkins E.B. et al. Concurrent cisplatin based radiotherapy and chemotherapy for locally advanced cervical cancer//*N. Engl. J. Med*. 1999. Vol.340. P.1144-1153.
- 54.Sardi J., Sananas C., Giaroli A. Neoadjuvant chemotherapy in cervical carcinoma stage lib: A randomized controlled trial//*Int. J. Gynecol. Cancer*. - 1998. Vol.8. P.441-450.
- 55.Trelford J. D., Kinney W., Vogt P. Positive peritoneal cytology in state 1 carcinoma of the cervix//*Acta Cytol*. 2005. Vol. 39, N2. P. 177-179.
- 56.Stanley M. A practitioner's guide to understanding Immunity to human papillomavirus//*US Obstet Gynec* 2009. P. 10—15.
57. Taghizadeh E, Jahangiri S, Rostami D Roles of E6 and E7 Human Papillomavirus Proteins in Molecular Pathogenesis of Cervical Cancer // *Curr Protein Pept* .2009. P. 107—157
- 58.Tomaic V. Functional roles of E6 and E7 oncoproteins in HPV-induced malignancies at diverse anatomical sites // *Cancers (Basel)*. 2016.p. 95.
- 59.Zur Hausen H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host — cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst*.2000.p. 690—698.