

На правах рукописи

Ершов  
Владимир Анатольевич

МОРФОГЕНЕЗ ЦЕРВИКАЛЬНОЙ НЕОПЛАЗИИ,  
АССОЦИИРОВАННОЙ С ВИРУСАМИ ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА  
ВЫСОКОГО КАНЦЕРОГЕННОГО РИСКА

14.03.02 – патологическая анатомия  
14.01.12 – онкология

Автореферат  
диссертации на соискание учёной степени  
доктора медицинских наук

Санкт-Петербург  
2020

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном военном образовательном учреждении высшего образования “Военно-медицинская академия имени С. М. Кирова” Министерства обороны Российской Федерации

Научные консультанты:

доктор медицинских наук, профессор **Чирский Вадим Семенович**

доктор медицинских наук, профессор, заслуженный врач Российской Федерации, лауреат премии Правительства Российской Федерации **Манихас Георгий Моисеевич**

Официальные оппоненты:

**Волченко Надежда Николаевна**, доктор медицинских наук, профессор, Московский научно-исследовательский онкологический институт имени П. А. Герцена – филиал федерального государственного бюджетного учреждения “Национальный медицинский исследовательский центр радиологии” Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующая отделом онкоморфологии

**Кветной Игорь Моисеевич**, доктор медицинских наук, профессор, заслуженный деятель науки Российской Федерации, федеральное государственное бюджетное учреждение “Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии” Министерства здравоохранения Российской Федерации, руководитель Центра молекулярной биомедицины

**Урманчеева Адиллия Феттеховна**, доктор медицинских наук, профессор, заслуженный врач Российской Федерации, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования “Северо-Западный государственный медицинский университет имени И. И. Мечникова” Министерства здравоохранения Российской Федерации, профессор кафедры онкологии

**Ведущая организация:** федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования “Санкт-Петербургский государственный педиатрический университет” Минздрава России

Защита состоится 25 января 2021 года в 14<sup>00</sup> часов на заседании диссертационного совета Д215.002.02 на базе ФГБВОУ ВО “Военно-медицинская академия имени С. М. Кирова” МО РФ (194044, Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, 6)

С диссертацией можно ознакомиться в фундаментальной библиотеке и на официальном сайте ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С. М. Кирова» МО РФ

Автореферат разослан « \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2020 года.

Ученый секретарь диссертационного совета  
доктор медицинских наук, профессор

  
Чирский Вадим Семенович

### Актуальность темы.

Рак шейки матки (РШМ) занимает третье место в мировой (Hernández-Hernández D.M. et al., 2015; WHO Classification of tumours of female reproductive organs, 2014) и в российской структурах онкогинекологической заболеваемости (Злокачественные новообразования в России в 2016 году (заболеваемость и смертность), 2018). С начала второго десятилетия нынешнего века ежегодно в мире регистрируют более 500000 новых случаев цервикального рака (Nayir T. et al., 2015) и до 280000 смертельных исходов данного заболевания (Karimi Zarchi M. et al., 2017; Lorenzi A.T. et al., 2015). Пик возрастных показателей смертности РШМ выявляется на 10-15 лет ранее, чем при других раковых образованиях (Maguire R.L. et al., 2017).

В Российской Федерации численность больных РШМ с конца прошлого века неуклонно растет (Аксель Е.М., 2012). За 20 лет прирост его первично выявленных случаев составил 38,7 % (Петрова Г.В. и др., 2015) со среднегодовым увеличением на 2,21 % (Состояние онкологической помощи населению России в 2013 году, 2014). В 2016 году заболеваемость РШМ за предыдущий 30-летний период достигла максимального значения – 15,45 на 100000 женщин (Состояние онкологической помощи населению России в 2016 году, 2017).

Согласно современным представлениям формированию РШМ предшествуют несколько последовательных этапов – цервикальных интраэпителиальных неоплазий (ЦИН), геномные изменения которых до конца не изучены (Jung S.H. et al., 2015). Наличие длительного предракового периода определило стратегию скрининга РШМ, проведение которого в СССР (Деражне А.Б. и др., 1985) и экономически развитых странах мира (Arbyn M. et al., 2014) с радикальной тактикой лечения на стадии интраэпителиальных изменений существенно снизили в XX веке показатели заболеваемости РШМ.

В настоящее время с целью предотвращения РШМ также используют эксцизионный способ при ЦИН II-III степеней (Kang W.D. et al., 2016), выявляемых ежегодно у 2-3 % женщин в мире (Santesso N. et al., 2016). Однако, показатели заболеваемости РШМ, несмотря на программу его раннего выявления, остаются высокими, что характеризует ограниченность вторичной профилактики РШМ (Bresse X. et al., 2013; Maguire R.L. et al., 2017). В свою очередь, активное использование хирургического метода лечения интраэпителиальных изменений шейки матки у молодых женщин, как, оказалось, служит одним из факторов развития истмико-цервикальной недостаточности, приводящей к осложнению течения беременности вплоть до ее прерывания во втором триместре (House M. et al., 2012; Warren J.E. et al., 2009). Кроме того, согласно многолетним исследованиям прогрессия к РШМ характерна только для 1-1,5 случаев ЦИН (Киселев В.И. и др., 2012; Costa C. et al., 2009). У остальных 98,5-99 % женщин разные формы ЦИН завершаются самостоятельным регрессом, механизм которого до сих пор не известен, и вторичная профилактика РШМ с использованием эксцизии шейки матки в подавляющем большинстве выявленных интраэпителиальных неоплазий не целесообразна.

Основным этиологическим фактором РШМ считают эпителиотропный ДНК-вирус – вирус папилломы человека (ВПЧ), который при передаче преимущественно половым путем поражает у женщин в преобладающем числе случаев слизистые оболочки шейки матки (zur Hausen H., 2002). По данным литературы он широко распространен в мире и инфицирует около 300 миллионов женщин старше 15 лет (Лалианци Э.М. и др., 2011; Bruni L. et al., 2010; Vardas E. et al., 2011). Принято считать, что персистенция ВПЧ может запускать механизм канцерогенеза (Дмитриев Г.А. и др., 2006; Трушина О.И. и др., 2005; Jaisamrarn U. et al., 2013; Kocken M. et al., 2011; zur Hausen H., 2002), в результате которого в течение длительного периода – от 15 до 40 лет после заражения, формируется злокачественная опухоль эпителия шейки матки. Главную роль в этом отводят 30-ти генотипам ВПЧ, относимым к группе высокого канцерогенного риска (ВПЧ ВКР) (Bosch F.X. et al., 2008; Doorbar J., 2006).

Существующая концепция вирусного канцерогенеза для ДНК-вирусов рассматривает в качестве причины всех генетических изменений инфицированной клетки интеграцию ДНК ВПЧ в клеточную ДНК (Зильбер Л.А., 1968; Сейц И.Ф. и др., 1986; Andersson S. et al., 2005; Cricca M. et al., 2007). Однако, результаты многолетних исследований по изучению физического статуса ДНК ВПЧ при интраэпителиальной и инвазивной формах цервикальной неоплазии (Badaracco G. et al., 2002; Badaracco G. et al., 2005; Briolat J. et al., 2007; Peitsaro P. et al., 2002; Pett M.R. et al. 2007) позволяют констатировать, что эта гипотеза не нашла однозначного подтверждения. Данные о выявлении эписомной формы ДНК ВПЧ 16 генотипа в опухолевых клетках (Киселева В.И. и др., 2010; Киселева В.И. и др., 2017; Badaracco G. et al., 2005; Briolat J. et al., 2007; Pett M.R. et al., 2007) позволили предположить существование иного пути малигнизации эпителия шейки матки с более сложным биомолекулярным механизмом, отличным от предложенного в теории вирусного канцерогенеза XX века (Зильбер Л.А., 1968). Кроме того, несмотря на признание ведущей роли ВПЧ в развитии РШМ, в редких случаях определяют и ВПЧ-негативный путь канцерогенеза (Киселева В.И. и др., 2008).

Выделение ВПЧ в качестве основного этиологического фактора цервикальной неоплазии послужило основанием для скрининга ВПЧ (Минкевич К.В., 2010; Arbyn M. et al., 2014; Dillner J. et al., 2008; Luo H. et al., 2017) и для первичной профилактики РШМ путем вакцинирования. Проводимая в ряде стран вакцинация подростков против основных генотипов ВПЧ, несмотря на подтверждение ее экономической эффективности (Vaandrup L. et al., 2013; Bresse X. et al., 2013; Brotherton J.M. et al., 2011, Karimi Zarchi M. et al., 2017; Osborne S.L. et al., 2015; Querec T.D. et al., 2013; Wheeler C.M. et al., 2013), требует длительного изучения на протяжении жизни привитых женщин.

#### **Степень разработанности темы исследования.**

В качестве методологической и теоретической основы диссертационного исследования использованы труды отечественных и зарубежных ученых, посвященные папилломавирусной инфекции, цервикальной неоплазии и стволовым клеткам человека (Дмитриев Г.А. и др., 2006; Зильбер Л.А., 1968; Казанцева И.А., 1981; Киселёв Ф.Л., 2011; Лялина Л.В. и др., 2013; Репин В.С. и др., 2010; Badaracco G. et al., 2002; Badaracco G. et al., 2005; Clarke M.F., 2006; Doorbar J., 2005; Doorbar J., 2006; Huh Y.H. et al., 2015; Koss L.G., 2006; López J. et al., 2012; Martens J.E. et al., 2004; zur Hausen H., 2002; zur Hausen H., 2009).

Изложенные в этих публикациях представления оставляют нерешенными вопросы морфогенеза цервикальной неоплазии, ассоциированной с ВПЧ ВКР, одной из характерных особенностей которой является избирательность поражения ВПЧ эпителия шейки матки, приводящая в одних случаях к гиперпластическим изменениям (Цидаева И.Г. и др., 2006; Koss L.G., 2006), в других – к злокачественной трансформации (Шабалова И.П. и др., 2016; Koss L.G., 2006). По-видимому, имеет значение и принадлежность поражаемых ВПЧ резервных и базальных клеток к стволовым клеткам (СК) эпителия шейки матки (Herfs M. et al., 2013; Martens J.E. et al., 2004; Martens J.E. et al., 2007; Martens J.E. et al., 2009), роль которых в морфогенезе репаративной и патологической регенерации требует дальнейшего изучения.

Существующие представления о формировании опухоли (Hanahan D. et al., 2000) не позволяют объяснить и причины выборочной злокачественной перестройки небольшого количества клеток, окруженных неизменным эпителием шейки матки, в свою очередь, поддерживающим жизненный цикл ВПЧ. Не понятен и механизм альтернативного исхода предшествующих раку ЦИН. Попытка же свести патогенное действие ВПЧ к нарушению его жизненного цикла, приводящему к гиперпродукции ранних вирусных белков-онкогенов, не объясняет генез вышеперечисленных клеточных изменений.

Немногочисленные, на настоящий момент, исследования СК эпителия и стволовых клеток рака (СКР) шейки матки человека, выявившие их сходство в ряде признаков, позволяют предположить различные варианты злокачественной трансформации. При этом

особое место в канцерогенезе уделяется поддерживающей опухоль небольшой популяции СКР (Diehn M. et al., 2009), которые способны делиться, увеличивая свою численность (Cho R.W. et al., 2008), дифференцироваться в гетерогенные типы раковой клетки. Эти СКР являются стойкими к химиотерапевтическому (Moghbeli M. et al., 2014) и лучевому (Лушников Е.Ф., 1977) воздействиям, так как могут длительный период времени находиться в состоянии покоя. Отсутствие, на настоящий момент, способа их идентификации (Moghbeli M. et al., 2014) не позволяет выработать адекватную противоопухолевую терапию.

Вышеперечисленные вопросы обуславливают нерешенность проблемы морфогенеза цервикальной неоплазии, ассоциированной с ВПЧ ВКР.

### **Цель исследования.**

Дать характеристику морфогенеза цервикальной неоплазии, ассоциированной с вирусами папилломы человека высокого канцерогенного риска.

### **Задачи исследования.**

1. Изучить эпидемиологическую характеристику ВПЧ при интраэпителиальной, инвазивной формах неоплазии шейки матки и эктопии среди женщин Санкт-Петербурга, определить наиболее часто встречаемый генотип ВПЧ ВКР.

2. Сравнить морфологические и морфометрические критерии ЦИН при поражении эпителия шейки матки ВПЧ ВКР разных генотипов. Уточнить характер изменений эпителия шейки матки при нарастании тяжести ЦИН при поражении ВПЧ ВКР разных генотипов.

3. Сопоставить морфологические и морфометрические критерии инвазивного плоскоклеточного рака при инфицировании шейки матки ВПЧ ВКР разных генотипов.

4. Соотнести морфологические и морфометрические критерии эктопии при поражении эпителия шейки матки ВПЧ ВКР разных генотипов.

5. Определить роль количественной характеристики и степени интеграции ДНК ВПЧ ВКР 16 генотипа в формировании цервикальной неоплазии. Изучить связь продукции капсидного белка L1 ВПЧ ВКР 16 генотипа при цервикальной неоплазии с клеточной дифференцировкой.

6. Установить особенности ВПЧ16-позитивной цервикальной неоплазии, отличные от неоплазии шейки матки при поражении ВПЧ ВКР других генотипов.

7. Раскрыть варианты развития ЦИН, ассоциированной с ВПЧ ВКР 16 генотипа, в зависимости от выбора стволовыми клетками (резервными, базальными) способа своего деления.

8. Уточнить особенности генеза инвазивного плоскоклеточного рака шейки матки в зависимости от механизма прогрессии и поддержания опухоли.

9. Дать характеристику самопроизвольного регресса ЦИН, ассоциированного с ВПЧ ВКР 16 генотипа.

### **Научная новизна исследования.**

Впервые исследована и доказана ведущая роль ВПЧ 16 генотипа в генезе цервикальных неоплазий у женщин Санкт-Петербурга.

Впервые проведен сравнительный анализ пролиферации, апоптоза, межклеточных связей, гормонального стимулирования, ядерных и цитоплазматических изменений при интраэпителиальной и инвазивной формах цервикальной неоплазии, ассоциированных с ВПЧ ВКР разных филогенетических групп.

Впервые в механизме формирования интраэпителиальной и инвазивной форм цервикальной неоплазии, ассоциированных с ВПЧ ВКР разных филогенетических групп, показано значение продукции белка ядерного митотического аппарата.

Впервые при цервикальной неоплазии наиболее тяжелые повреждения митотического аппарата выявлены в случаях ее ассоциации с ВПЧ 16 генотипа в отличие от поражения эпителия шейки матки ВПЧ ВКР других генотипов.

Впервые в механизме развития цервикальной неоплазии, ассоциированной с ВПЧ ВКР 16 генотипа, показано отсутствие зависимости от физического статуса вирусной ДНК. Отмечено, что при ЦИН нарастание интеграции ДНК ВПЧ ВКР 16 в ДНК клетки определяло увеличение пролиферативной активности атипичных клеток.

Впервые изучена экспрессия гистона H2A.Z при ВПЧ16-позитивных интраэпителиальной и инвазивной формах цервикальной неоплазии человека, позволяющая определить различия в их генезе.

Впервые исследован механизм самопроизвольного регресса ЦИН, ассоциированных с ВПЧ 16 генотипа, на основании которого разработана оригинальная методика оценки риска прогрессии ВПЧ16-позитивной ЦИН, проанализирована ее информативность.

### **Теоретическая и практическая значимость работы.**

Полученные результаты исследования позволяют определить морфогенез повреждения цервикального эпителия, вызываемого ВПЧ ВКР. Выбор стволовыми клетками асимметричного или симметричного митоза определяет механизм формирования ЦИН. Способность клеток РШМ к различным вариантам митоза поддерживает опухоль и осуществляет ее прогрессирование. Использование критериев сохранения контроля собственным циклом и дифференцировки поражаемых ВПЧ клеток позволяет спрогнозировать прогрессию цервикальной интраэпителиальной неоплазии к раку шейки матки или ее регресс.

### **Методология и методы исследования.**

Работа выполнена в дизайне сравнительного открытого проспективного, ретроспективного клинико-морфологического и молекулярно-генетического исследования. Основой работы послужило морфологические и молекулярно-генетические исследования эпителия шейки матки женщин, находившихся на стационарном лечении в Санкт-Петербургском государственном бюджетном учреждении здравоохранения “Городской клинический онкологический диспансер” в период с января 2005 года по сентябрь 2018 года. Для морфологического исследования использовали цитологический, гистологический, иммуноцитохимический, иммуногистохимический, ультраструктурный методы. Методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени обнаружены и генотипированы вирусы папилломы человека, определено их количественное содержание, число копий генов E2 и E7 ВПЧ 16 генотипа.

На проведение работы получено разрешение независимого Этического комитета при Военно-медицинской академии имени С. М. Кирова (протокол № 221 от 23 апреля 2019 г.).

### **Положения, выносимые на защиту.**

1. Наиболее встречаемым у женщин Санкт-Петербурга с заболеваниями шейки матки является ВПЧ 16 генотипа.
2. В основе развития цервикальных неоплазий лежат нарушения клеточного цикла и дифференцировки клеток, при этом различия в генезе ЦИН и РШМ при инфицировании ВПЧ ВКР разных генотипов отсутствуют.
3. Выраженность интеграции вирусной ДНК при ВПЧ16-позитивных ЦИН связана с ростом пролиферативной активности атипичных клеток и повреждений митотического аппарата, приводящих к нарушению клеточной дифференцировки.
4. Морфогенез ЦИН и инвазивного плоскоклеточного рака при поражении ВПЧ ВКР 16 генотипа различен и зависит от выбора стволовыми клетками эпителия или стволовыми клетками рака способа деления.
5. Сохранение контроля клеточным циклом и способность атипичных клеток к дифференцировке служат критериями самопроизвольного регресса ЦИН.

### **Степень достоверности результатов исследования.**

Степень достоверности полученных результатов определяется объемом исследованного материала, полученного от 1104 пациенток СПб ГБУЗ “Городской клинический онкологический диспансер”, адекватностью методов исследования, корректным применением современных статистических методов обработки полученных данных, использованием сертифицированного оборудования.

### **Внедрение результатов работы.**

Результаты диссертационного исследования используются в научной и учебной работе кафедры патологической анатомии ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С. М. Кирова» МО РФ, в диагностической практике патоморфологического отдела Центральной патологоанатомической лаборатории МО РФ, в практической деятельности цитологической и патологоанатомической лабораторий СПб ГБУЗ “Городской клинический онкологический диспансер”.

### **Апробация результатов исследования.**

Полученные результаты представлены и обсуждены: на международном симпозиуме “Папилломавирусная инфекция и злокачественные новообразования. Интегрированная система надзора и профилактики” (Санкт-Петербург, 2009), на 8th Nordic-Baltic Congress on Infectious Diseases (Санкт-Петербург, 2009), на научно-практической конференции Северо-западного Федерального Округа с международным участием “Актуальные вопросы профилактики, скрининга, диагностики и лечения опухолей репродуктивных органов” (Великий Новгород, 2010), на II симпозиуме с международным участием “Папилломавирусная инфекция и рак. Интегрированная система надзора и профилактики” (Санкт-Петербург, 2011), на международной конференции “Молекулярная эпидемиология актуальных инфекций” (Москва, 2013), на VIII ежегодной Всероссийской научно-практической конференции с международным участием “Здоровье – основа человеческого потенциала: проблемы и пути их решения” (Санкт-Петербург, 2013), на Всероссийской конференции “Актуальные вопросы патологической анатомии в мирное и военное время” (Санкт-Петербург, 2014), на III симпозиуме с международным участием “Папилломавирусная инфекция и рак: эпидемиология, клиника, диагностика. Вакцинопрофилактика” (Санкт-Петербург, 2014), на VIII междисциплинарной научно-практической конференции “Урогенитальные инфекции и репродуктивное здоровье: клиничко-лабораторная диагностика и терапия” (Санкт-Петербург, 2015), на 30th International Papillomavirus Conference & Clinical and Public Health Workshops (Лиссабон, Португалия, 2015), на Всероссийской конференции с международным участием “Современные подходы в клиничко-морфологической диагностике и лечении заболеваний человека”, VI научные чтения, посвящённые памяти чл.-корр. РАМН, з. д. н. РФ, профессора О. К. Хмельницкого (Санкт-Петербург, 2015), на Всероссийской научно-практической конференции “Новые технологии в клиничко-медицине” (Санкт-Петербург, 2016), на IX научно-практической конференции с международным участием “Амбулаторная акушерско-гинекологическая помощь от рождения до старости. Возможности профилактики” (Санкт-Петербург, 2016), на Всероссийской конференции, посвященной 75-летию Центральной патологоанатомической лаборатории МО РФ ВМедА им. С. М. Кирова “Вопросы организации патологоанатомической работы в мирное и военное время” (Санкт-Петербург, 2017), на 12 съезде Ассоциации клиничко-цитологов России (Санкт-Петербург, 2017), на научно-практической конференции с международным участием “Амбулаторная онкология: новые возможности” (Санкт-Петербург, 2017), на III национальном научно-образовательном конгрессе “Онкологические проблемы от менархе до постменопаузы” (Москва, 2019), на V Всероссийском симпозиуме с международным участием “Папилломавирусная инфекция и

рак: единая система эпидемиологического надзора и профилактики” (Санкт-Петербург, 2019), на IV национальном научно-образовательном конгрессе “Онкологические проблемы от менархе до постменопаузы” (Москва, 2020).

### **Публикации.**

По материалам диссертационного исследования опубликованы 45 печатных работ, в том числе, 16 статей в рецензируемых научных изданиях ВАК РФ, 8 – Scopus, 1 информационно-методическое письмо Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

### **Личное участие автора в получении научных результатов.**

Автором проведен анализ отечественной и зарубежной литературы, определены цель, задачи и дизайн методов исследования. Автором проведено патоморфологическое исследование биоптатов шейки матки цитологическим, гистологическим методами на архивном материале патологоанатомического отделения и цитологической лаборатории СПб ГБУЗ “Городской клинический онкологический диспансер”, Автором проведены иммуногистохимические и иммуноцитохимические исследования, морфометрические исследования клеточного состава цитологических препаратов эктопии и цервикальной неоплазии. Автор осуществлял статистическую обработку и интерпретацию полученных результатов. Автором разработана оригинальная методика оценки риска прогрессии ЦИН к инвазивному плоскоклеточному РШМ, проведена статистическая обработка полученных результатов. Все это позволило сформулировать выводы диссертационного исследования и практические рекомендации. Доля участия автора в накоплении, обобщении и анализе материала составляет 100 %.

### **Объем и структура диссертационного исследования.**

Диссертация изложена на 342 страницах, содержит введение, обзор литературы, описание материала и методов исследования, 4 главы собственных исследований, выводы, практические рекомендации, список литературы, приложение. Библиографический указатель представлен 517 литературными источниками, из которых 124 отечественных и 393 зарубежных авторов. Работа иллюстрирована 29 рисунками и 112 таблицами.



## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Основой работы послужили морфологическое и молекулярно-генетическое исследования эпителия шейки матки 1104 женщин 18-74 лет, находившихся на стационарном лечении в Санкт-Петербургском государственном бюджетном учреждении здравоохранения “Городской клинический онкологический диспансер” (СПб ГБУЗ ГКОД) в период с января 2005 года по сентябрь 2018 года.

### Материалы и методы морфологического исследования

Для морфологического исследования использовали цитологический, гистологический, иммуноцитохимический, иммуногистохимический и ультраструктурный методы.

Во всех 1104 случаях при первичном посещении проводили забор биологического материала для цитологического исследования при браш-биопсии, для гистологического исследования – при инцизионной биопсии эпителия шейки матки. С учетом их результатов 828 пациенткам в условиях гинекологического отделения СПб ГБУЗ ГКОД проведена конусовидная электроэксцизия шейки матки, 142 женщинам – комбинированное (радиологическое, химиотерапевтическое и хирургическое) лечение в зависимости от стадии злокачественного процесса, 134 женщины были включены в группу динамического наблюдения.

Все больные с учётом возраста и результатов морфологического исследования были распределены по нескольким группам (таблица 1).

Таблица 1. Количество больных в возрастных группах.

Возрастные группы	Количество женщин в возрастных группах (M±m %)					Инвазивный РШМ	Всего
	Эктопия	ЦИН I	ЦИН II	ЦИН III			
		LSIL	HSIL				
		Слабая дисплазия	Умеренная дисплазия	Тяжелая дисплазия	Ca in situ		
≤19	1	1	1				3
	0,52±0,07	0,45±0,06	0,49±0,06				0,27±0,05
20-29	61	49	52	37	22	5	226
	31,44±0,46	22,07±0,41	25,5±0,44	19,9±0,39	14,1±0,35	3,52±0,18	20,47±0,4
30-39	74	82	69	70	49	30	374
	38,14±0,48	36,94±0,48	33,82±0,47	37,63±0,48	31,41±0,46	21,13±0,4	33,88±0,47
40-49	42	45	47	41	42	35	252
	21,65±0,41	20,27±0,4	23,04±0,42	22,04±0,41	26,92±0,44	24,65±0,43	22,83±0,41
50-59	16	34	22	22	27	35	156
	8,25±0,12	15,32±0,36	10,78±0,31	11,83±0,32	17,31±0,38	24,65±0,43	14,13±0,34
60-69		7	13	10	8	22	60
		3,15±0,17	6,37±0,24	5,38±0,22	5,13±0,22	15,49±0,36	5,43±0,22
70-79		4		6	8	15	33
		1,8±0,13		3,22±0,18	5,13±0,22	10,56±0,31	2,99±0,17
Всего	194	222	204	186	156	142	1104

p<0,05

Заключения результатов гистологических исследований формулировали в соответствии с действующей редакцией классификации ВОЗ, цитологических исследований – классификацией ВОЗ и классификацией “The Bethesda System for reporting cervical cytologic diagnoses” 2001 года. В классификационных группах выделяли критерии ЦИН, признаки слабой, умеренной, тяжелой форм дисплазии, Ca in situ, степени дифференцировки и злокачественности инвазивного рака.

Материал для цитологического исследования влажной части шейки матки и цервикального канала получали с помощью одноразового стерильного урогенитального зонда “Цитощетка” (тип Д МЕ-95) производства КНР.

Цитологические препараты в 347 случаях окрашивали гематоксилином и эозином, в 757 случаях – по методу Папаниколау, используя в 357 случаях красители OG6 (05-12013/L, R11S7 16), EA50 (05-12019/L, R11S7 16), гематоксилин Карацци (05-06012/L, R11S7 10) производства фирмы Bio-Optica (Италия), в 400 случаях – фирмы Биовитрум (Россия).

Для гистологического исследования использовали материал, полученный при электроэксцизии шейки матки из йод-негативных участков слизистой оболочки с помощью аппарата для электроэксцизии “Söring” (Германия) или опухолевую ткань, полученную при операции Вертгейма-Мейгса. Кусочки эпителия и стромы шейки матки или раковой опухоли фиксировали в 10 % растворе нейтрального формалина, обезживали в спиртах восходящей концентрации, заливали в парафиновые блоки, резали на санном микротоме с толщиной среза 5-7 мкм, окрашивали гематоксилином и эозином.

У 394 женщин провели иммуноморфологическое исследование, используя иммуноцитохимический (n=1665) или иммуногистохимический (n=617) методы, для которых применяли системы визуализации и первичные антитела (таблица 2). Первичные антитела разводили раствором UltraAb Plus Ab Diluent (REF: TA-125-UDX, Lot#UDX90521), Thermo Scientific для Lab Vision Corporation (США). Для демаскировки антигенов депарафинизированные гистологические срезы перед использованием разведенных первичных антител помещали в раствор Target Retrieval Solution 10X Concentrate (Dako), а перед использованием готовых к применению первичных антител – в раствор Epitope Retrieval Solution (x10 Concentrate) pH9 (Novocastra™ Leica Biosystems), после чего нагревали на водяной бане 20 минут.

Ультраструктурное исследование слизистой оболочки эктоцервикса проведено в лаборатории структурной и функциональной протеомики Федерального государственного бюджетного учреждения “Научно-исследовательский институт гриппа Минздрава России имени А. А. Смородинцева”. Материал участка Ca in situ (ЦИН III степени) шейки матки, полученный при конусовидной электроэксцизии, измельчили до 1 мм<sup>3</sup>, фиксировали в 2,5 % растворе глутаральдегида на 0,1М какодилатном буфере и в 1 % растворе четырехоксида осмия на том же буфере, обезживали в серии этиловых спиртов восходящей концентрации и заключали в смесь смол эпона и аралдита. Ультратонкие срезы изготавливали на ультратоме LKB-100 (Швеция) и анализировали в просвечивающем электронном микроскопе JEM-1011 (Япония).

Микроскопирование цитологических и гистологических препаратов осуществляли при помощи микроскопа “Axiostar plus” Karl Zeiss (Германия).

Используя программное обеспечение “ProgRes Capture Pro\_V 2.7.7” к видеокамере “Progres C3” в режиме “Measure”×100 в цитологических препаратах измеряли периметр ядра и цитоплазмы всех клеток многослойного плоского эпителия, резервных клеток, метаплазированных резервных клеток, атипичных и опухолевых клеток, подсчитывали их численность. Средние значения периметра ядер и цитоплазмы клеток рассчитывали путем вычисления среднего арифметического значения искомым показателей с помощью программного обеспечения “ProgRes Capture Pro\_V 2.7.7”.

Используя видеоанализатор “ВидеоТест-Морфология” (компьютерная версия 5.2) в цитологических и гистологических препаратах подсчитывали количество клеток разных по форме, с различным по структуре и плотности хроматином, с митозами, в том числе, с патологическими митозами, с цианофильной и эозинофильной цитоплазмой, с дистрофическими изменениями, в иммуногистохимических и иммуноцитохимических препаратах – количество клеток с экспрессией исследуемых маркеров.

Статистический анализ результатов исследований проводили с помощью компьютерной программы “Statistica 6,0”. Заключение о статистической значимости давали при уровне вероятности ошибочного заключения  $p$  не более 0,05.

Таблица 2. Реактивы для иммуноморфологического исследования.

Название и характеристика		Производитель
Система визуализации		
"Ultravision LP Detection System HRP Polymer&DAB Plus Chromogen" (TL-015-HD, LHD 100414 и LHD 120208)		Thermo Scientific для Lab Vision Corporation
NOVOLINK™ Polymer Detection System (REF: RE7140-K, Lot#6049856)		Leica Microsystems
Reveal Biotin-Free Polyvalent HRP-DAB Detection System		SPRING Bioscience
Первичные антитела		
Histone H2A.Z	моноклональные кроличьи [EPR6172] к гистону H2A.Z, 124793 100µl	Abcam
Ki-67	моноклональные кроличьи к Ki-67 (SP6), REF: RM-9106-SO, Lot#9106S 1003B, 0,1ml (Culture Sup.)	Thermo Scientific для Lab Vision Corporation
	кроличьи Anti-Ki-67 (SP6) MAb, M3060, Lot#141022ALVB, 0,1ml Concentrate	SPRING
	моноклональные мышинные Anti-Human Ki-67 Antigen, Clone MIB-1, REF: M7240, Lot#20043124, 1ml	Dako
PCNA	моноклональные кроличьи Anti-PCNA PAb, REF: E2850, Lot#150115LVB, 0,1 ml Concentrate	SPRING
EGFR	моноклональные кроличьи антитела Anti-EGFR (SP9) MAb, REF: 05494834001, Lot#160615B, 0,1 ml Concentrate	Sigma
NuMA1	моноклональные кроличьи NuMA1 LS-B7380, Lot#44529, 50µl	LifeSpanBioSciences Inc
	моноклональные мышинные Anti-NUMA, HPA018858, Lot#R08370, 0,2 ml, Concentrate 0,1 mg/ml	BD Transduction Laboratories
	поликлональные кроличьи NuMA antibody (EP3976), GTX62871, Lot#821501651, 100 µl	GeneTex
	поликлональные кроличьи Anti-NUMA1 HPA019859, Lot# R08370, 100 µl, Concentrate 0,1 mg/ml	Sigma
p53	моноклональные кроличьи к p53 (SP5), REF: RM-9105-SO, Lot#9105S 1005A, 0,1 ml (Culture Sup.)	Thermo Scientific для Lab Vision Corporation
	моноклональные мышинные к p53 (D07) REF: 453M-94, Lot#1510704F, 0,1 ml	Cell Marque
p63	моноклональные мышинные к p63 (7JUL) REF PA0103, LOT60851 7ml	Leica Bond
BCL-2	моноклональные мышинные к BCL-2 (124), REF: 226M-94, Lot# 1505802E, 0,1 ml	Cell Marque
Цитокератин 5	моноклональные кроличьи Keratin 5 (EP1601Y), RM: 2106-SO, Lot# 2106S912C, 0,1 ml	Thermo Scientific для Lab Vision Corporation
	моноклональные кроличьи Cytokeratin 5 (EP1601Y) REF: 305R-14, Lot#1611902C, 0,1 ml	Cell Marque
Цитокератин 10	моноклональные мышинные Keratin 10 Ab-2 (DE-K10), REF: MS611PO, Lot#611P91OF, 0,1 ml (0,2mg/ml)	Thermo Scientific для Lab Vision Corporation
	моноклональные мышинные Anti-Cytokeratin 10 Antibody (DE-K10) REF: Mob055-05, Lot#D549, 0,5 ml Concentrate	Diagnostic Biosystems Leica
Е-кадхерин	моноклональные мышинные E-Cadherin (SPM471), REF: VS-9470-PO, Lot#9470P 1009J, 0,2 mg/ml	Thermo Scientific для Lab Vision Corporation
	моноклональные мышинные Anti-Human E-cadherin Clone NCH-38, REF: M3612, Lot#10123814, 1ml	Dako
Эстрогено-рецепторы α	моноклональные кроличьи к рецепторам эстрогена (SP1), REF: RM9101-SO, Lot#9101S1003C, 0,1 ml	Thermo Scientific для Lab Vision Corporation
	моноклональные кроличьи Rb Anti-Estrogen Receptor (SP1) MAb, REF: M3010, Lot#150108LVE, 0,1 ml Concentrate	SPRING
	моноклональные мышинные NCL-L-ER-6F11, Lot#6049794, 1 ml (4,4g/l)	Leica Biosystems
Капсидный белок L1	моноклональные мышинные anti HPV 16 Antibody (CAMVIR-1), REF: Mob 394-05, Lot#A872 и Lot#G234E, 0,5 ml или 1 ml	Diagnostic BioSystems (DBS)

## Материалы и методы молекулярно-генетического исследования

У всех пациенток в лабораториях Санкт-Петербурга методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) обнаружены ВПЧ и проведено их генотипирование. В 163 случаях выявление и генотипирование ВПЧ, в 108 случаях количественное определение содержания вируса, в 87 случаях определение числа копий генов E2 и E7 ВПЧ 16 генотипа проведено в лаборатории молекулярной эпидемиологии и эволюционной генетики Федерального бюджетного учреждения науки “Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера”.

Соскоб слизистой цервикального канала для проведения ПЦР, полученный с помощью одноразового стерильного урогенитального зонда “Цитощетка” (КНР), помещали в полипропиленовую пробирку емкостью 1,5 мл типа “Эппендорф” с транспортной средой с муколитиком (TCM) “AmpliSens”, и отправляли в лабораторию для исследования методом ПЦР на наличие ВПЧ.

Для постановки ПЦР использовали амплификатор PTC 100 (MJ Res. Inc., USA). Выявление, количественное определение и генотипирование ДНК ВПЧ проводили методом мультиплексной ПЦР в режиме реального времени на приборе Rotor Gene (“Corbett Research”, Австралия) с использованием комплектов реагентов производства Федерального государственного учреждения науки “Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии” (ФГУН ЦНИИЭ (Россия)).

У 1104 женщин провели генотипирование ВПЧ, используя “Набор реагентов для выявления и дифференциации ДНК вирусов папилломы человека (ВПЧ) высокого канцерогенного риска (ВКР) 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 типов в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией “АмплиСенс® ВПЧ ВКР генотип-FL” (Россия). В 108 случаях определили количественное содержания ВПЧ, используя “Набор реагентов для выявления и количественного определения ДНК вирусов папилломы человека (ВПЧ) высокого канцерогенного риска (ВКР) 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 типов в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией “АмплиСенс® ВПЧ ВКР скрин-титр-FL” по ТУ 9398-053-01897593-2008” (Россия).

В 87 случаях, ассоциированных с ВПЧ 16 генотипа, определили число копий генов E2 и E7, используя “Набор реагентов для научных исследований” производства ФГУН ЦНИИЭ (Россия). Физический статус ДНК ВПЧ 16 оценивали по соотношению количества вирусных генов E2 и E7 с учетом стандартного отклонения и коэффициента вариации. При эписомной форме это соотношение считали равным 1, при 100 % интеграции – 0, при смешанной (эписомная + интегрированная) форме – от 0 до 1.

Расчет степени интеграции ДНК ВПЧ 16 генотипа осуществляли по формуле:

$(1 - E2/E7) \times 100 \%$ , где E2 – число копий гена E2, E7 – число копий гена E7.

Степень интеграции ДНК ВПЧ 16 генотипа определяли как низкую (от 1 до 33 %), умеренную (от 34 до 66 %), выраженную (от 67 до 99 %), полную (100 %).

### Методика оценки исхода цервикальной интраэпителиальной неоплазии, ассоциированной с ВПЧ ВКР 16 генотипа

Для изучения вариантов исхода ЦИН разработана оригинальная методика, в которой объединены критерии продукции капсидного белка L1 ВПЧ и белка ядерного митотического аппарата NuMA1.

#### 1. Забор биоптатов и подготовка препаратов.

Женщинам с морфологически верифицированными (при гистологическом и/или цитологическом исследовании) формами ЦИН проводили забор материала эктоцервикса и эндоцервикса методом соскоба и помещали в консервант (транспортную среду). В лаборатории из осадка, полученного методом центрифугирования, готовили 4 препарата.

Первый (из материала эктоцервикса) и второй (из материала эндоцервикса) препараты окрашивали по методу Папаниколау. Третий и четвертый препараты готовили из объединенных осадков экто- и эндоцервикса. В одном из них проводили реакцию на выявление в атипичных клетках белка L1, в другом – NuMA1.

## 2. Оценка результата.

Положительной реакцию считали при наличии экспрессии исследуемого белка в не менее чем 5 % атипичных клеток. Положительную реакцию на антитела к обоим протеинам или к одному из них расценивали как критерий низкого риска прогрессии интраэпителиального поражения. Женщин данной группы включали в группу наблюдения. Каждые 3 месяца им проводили контрольные осмотры, в ходе которых гинеколог забирал материал для цитологического исследования. Показанием для исключения из данной группы служило морфологическое подтверждение регресса или прогрессирования первично выявленной формы ЦИН. В случае выявления морфологических критериев прогрессирования ЦИН женщинам из группы наблюдения проводили электроэксцизию шейки матки.

Отрицательной реакцию считали при отсутствии экспрессии обоих белков и трактовали как высокий риск прогрессии ЦИН, что служило основанием для электроэксцизии шейки матки.

Данная методика применена у 196 женщин 18-62 лет, находившихся на обследовании и/или лечении в Санкт-Петербургском ГБУЗ “Городской клинический онкологический диспансер” с октября 2014 года по сентябрь 2018 года. Из них ВПЧ 16 генотипа обнаружен у 135 (68,88 %) женщин, его сочетания с ВПЧ других генотипов филогенетической группы (ФГГ)  $\alpha 9$  – у 47 (23,98 %) и с ФГГ  $\alpha 7$  – у 14 (7,14 %) пациенток. Во всех случаях проводили иммуноцитохимические исследования с использованием системы детекции “Novolink<sup>TM</sup>” и моноклональных антител к NuMA1 (LS-B7380, 44529), LifeSpanBioSciences Inc (США) и моноклональных антител к белку L1 вируса папилломы человека 16 генотипа – HPV 16 (CAMVIR-1, Mob 394, P333), DBS (США).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

## Молекулярно-генетические критерии ВПЧ ВКР при эктопии и цервикальной неоплазии

При эктопии шейки матки ВПЧ 16 генотипа определили в 51,53 % (n=100) случаев (рисунок 1). Из них в качестве монотипа его обнаружили у 52 % (n=52), в ассоциации с ВПЧ ФГГ  $\alpha 9$ ,  $\alpha 7$ ,  $\alpha 6$  – у 48 % (n=48) женщин. ВПЧ ФГГ  $\alpha 9$  (без ВПЧ 16) выявили в 17,53 % (n=34), ВПЧ ФГГ  $\alpha 7$  – в 15,47 % (n=30) исследований. Сочетание ВПЧ ФГГ  $\alpha 9$  (без ВПЧ 16) и ФГГ  $\alpha 7$  определили в 6,19 % (n=12), сочетания ВПЧ ФГГ  $\alpha 6$  – наблюдали в 6,19 % (n=12) случаев эктопии.

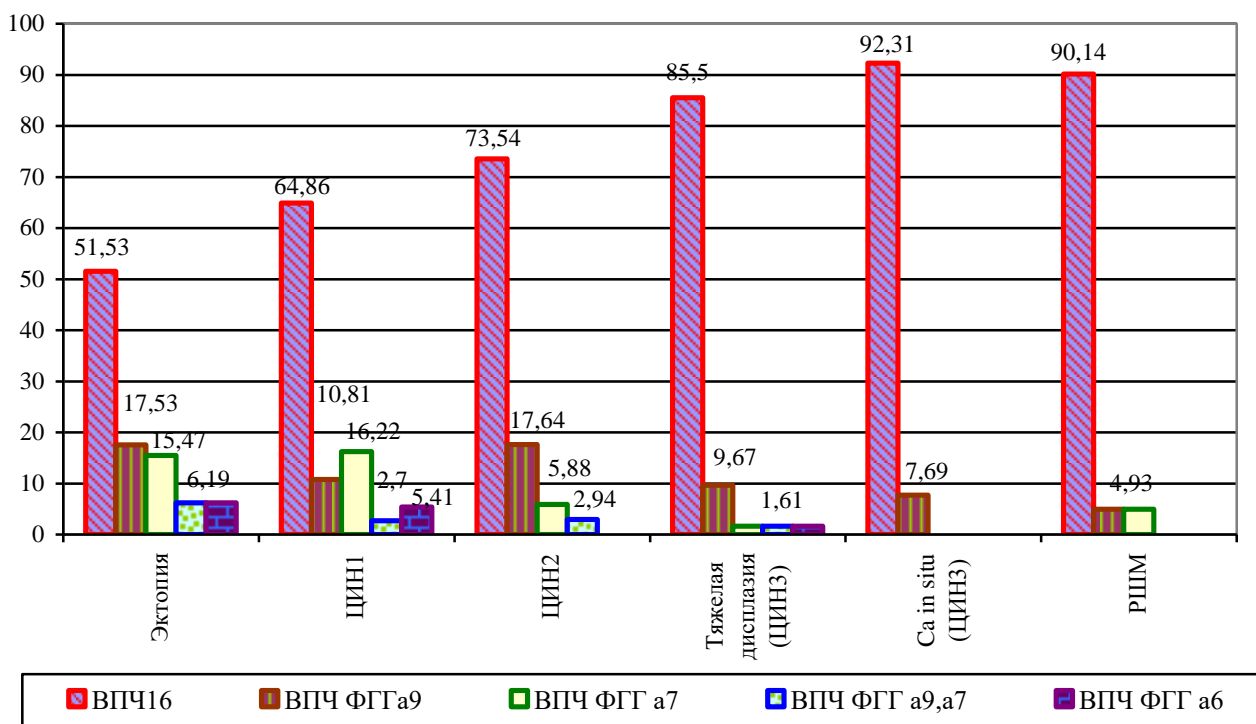


Рисунок 1. Относительные показатели встречаемости ВПЧ разных генотипов при и цервикальной неоплазии.

При ЦИН ВПЧ 16 генотипа определили в 597 (77,73 %) из 768 исследуемых случаев.

При нарастании тяжести ЦИН отметили увеличение частоты встречаемости ВПЧ 16 генотипа (рисунок 1) с 64,86 % (n=144) при ЦИН I до 73,54 % (n=150) при ЦИН II, до 85,5 % (n=159) при тяжелой дисплазии (ЦИН III), и достигающей максимального показателя – 92,31 % (n=144) при Ca in situ (ЦИН III).

В 59,3 % (n=354) ВПЧ 16-позитивных ЦИН выявили монотип, в 40,7 % (n=243) – сочетания с ВПЧ других генотипов. Наибольшую численность случаев определения монотипа ВПЧ 16 – 70,83 % (n=102) отметили при ЦИН I. При нарастании тяжести интраэпителиального поражения встречаемость ВПЧ 16 в качестве монотипа преобладала над выявлением в ассоциации с другими генотипами ВПЧ, и составила при ЦИН II 56 % (n=84), при тяжелой форме дисплазии плоского эпителия (ЦИН III степени) – 52,83 % (n=84), при Ca in situ шейки матки (ЦИН III) – 58,33 % (n=84).

ВПЧ ФГГ  $\alpha 9$  (без учета ВПЧ 16) в качестве монотипа определили в 34,78 %, ВПЧ ФГГ  $\alpha 7$  – в 42,11 % от их общей численности в наших исследованиях. При ЦИН I ВПЧ ФГГ  $\alpha 9$  (без учета ВПЧ 16) выявили в 10,81 % (n=24), ВПЧ ФГГ  $\alpha 7$  – в 16,22 % (n=36) исследований. Комбинацию ВПЧ ФГГ  $\alpha 9$  с ВПЧ ФГГ  $\alpha 7$  отметили в 2,7 % (n=6), ВПЧ ФГГ  $\alpha 6$  в – 5,41 %

(n=12) наблюдений ЦИН I. При ЦИН II ВПЧ ФГГ  $\alpha 9$  (без учета ВПЧ 16) обнаружили в 17,64 % (n=36), ВПЧ ФГГ  $\alpha 7$  – в 5,88 % (n=12), сочетания ВПЧ ФГГ  $\alpha 7$  и ВПЧ ФГГ  $\alpha 9$  – в 2,94 % (n=6) случаев. При тяжелой форме дисплазии плоского эпителия (ЦИН III) ВПЧ ФГГ  $\alpha 9$  (без учета ВПЧ 16) определили в 9,67 % (n=18), ВПЧ ФГГ  $\alpha 7$  – в 1,61 % (n=3), сочетание ВПЧ ФГГ  $\alpha 7$  с ВПЧ ФГГ  $\alpha 9$  – в 1,61 % (n=3), ВПЧ ФГГ  $\alpha 9$  с ВПЧ ФГГ  $\alpha 5$  ФГГ  $\alpha 6$  – в 1,61 % (n=3) наблюдений. При *Ca in situ* шейки матки (ЦИН III) ВПЧ ФГГ  $\alpha 9$  (без ВПЧ16) выявили в 7,69 % (n=12) исследований.

При инвазивном плоскоклеточном РШМ ВПЧ 16 генотипа определили в 90,14 % (n=128) исследований, что в 1,6 раза превышало (Видяева И.Г. и др., 2009; Bosch F.X. et al.; 2008, Doorbar J., 2006) или было сопоставимо с результатами исследований других авторов (Уразова Л.Н. и др., 2009; de Sanjose S. et al., 2010). В качестве монотипа ВПЧ 16 отметили в 56,25 % (n=72), в сочетании с ВПЧ других генотипов – в 43,75 % (n=56) случаев РШМ. На долю инвазивного плоскоклеточного РШМ приходилось 15,15 % всех случаев выявления ВПЧ 16 генотипа, 5,34 % – ВПЧ ФГГ  $\alpha 9$  (ВПЧ 31, ВПЧ 33) и 7,95 % случаев определения ВПЧ ФГГ  $\alpha 7$  (ВПЧ 45, ВПЧ 59).

Полученные результаты определения ВПЧ 16 генотипа в качестве монотипа или в комбинации с ВПЧ других генотипов филогенетических групп  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$ ,  $\alpha 7$ ,  $\alpha 9$  ВКР у женщин Санкт-Петербурга при эктопии и разных формах неоплазии эпителия шейки матки согласуются с зарубежными и отечественными литературными данными, характеризующими высокую распространенность данного генотипа ВПЧ в мире и России, в которой он занимает первое место по встречаемости (Абрамовских О.С. и др., 2014; Бахлаев И.Е. и др., 2009; Бруснигина Н.Ф. и др., 2014; Гончаревская З.Л. и др., 2014; Ермоленко Д.К. и др., 2009; Ибрагимова М.К. и др., 2014; Мысливцева Г.А. и др., 2014; Протас В.В. и др., 2014; Шипулина О.Ю. и др., 2009; Шипулина О.Ю. и др., 2014).

### **Морфологические критерии эктопии шейки матки, ассоциированной с ВПЧ ВКР разных филогенетических групп**

Из 194 случаев эктопии у 47,94 % (n=93) женщин выявлена псевдоэрозия в стадии заживления, у 52,06 % (n=101) – ее рецидивирующая форма. Независимо от генотипа, инфицирующего ВПЧ ВКР нарушений дифференцировки многослойного плоского эпителия шейки матки не наблюдали, что подтверждается сохранением стратификации плоского эпителия, отсутствием статистически значимых различий ( $p < 0,01$ ) периметра ядра, цитоплазмы и ядерно-цитоплазматического соотношения клеток соответствующих слоев с мембранной экспрессией во всех них ( $p < 0,01$ ) Е-кадгерина (Yaldizl M. et al., 2005). Преобладание во всех исследованиях ( $p < 0,01$ ) базальных клеток с экспрессией цитокератина 5 над численностью базальных клеток с продукцией цитокератина 10 свидетельствует о длительности процесса метаплазии (Hwang L.Y. et al., 2012). Наиболее выражено это свойство при ВПЧ16-позитивных эктопиях, подтверждаемое неоднородностью белкового состава цитоплазмы, проявляющейся двухкомпонентным характером ее окраски (Koss L.G., 2006; Papanicolaou G.N., 1963) 33,84±0,95 % метаплазированных клеток ( $p < 0,05$ ).

Отсутствие в преобладающем количестве резервных и базальных клеток экспрессии белков Ki-67, PCNA и p53 характеризовало их выход из клеточного цикла, а не “слабую пролиферативную активность базальных клеток” при эпидермизации псевдоэрозии (Казачков Е.Л. и др., 2005). При этом, численность базальных клеток в интерфазе с экспрессией NuMA1 превышала количество клеток с экспрессией BCL-2 и EGFR ( $p < 0,01$ ), что подтверждало сохранение ими способности запуска механизма апоптоза.

Выявленная в единичных базальных и парабазальных клетках М фаза служила результатом митотической задержки (Казанцева И.А., 1981) в контрольной точке клеточного цикла (Попов Б.В., 2010). Численность метафаз ( $p < 0,01$ ), отмечаемых в 0,22±0,04 % клеток в 6 % ВПЧ16-позитивных случаев, в 0,22±0,04 % клеток в 8,82 % исследований, ассоциированных с ВПЧ 33 генотипа ФГГ  $\alpha 9$  и в 0,11±0,03 % клеток в 8,33 % наблюдений, ассоциированных с ВПЧ 56 и 66 генотипов ФГГ  $\alpha 6$ , соответствовала показателям

митотического индекса плоского эпителия шейки матки типичного строения (Казанцева И.А., 1981), но уступала митотической активности “незрелой” плоскоклеточной метаплазии при эпидермизации псевдоэрозий (Данилова Н.В. и др., 2011). Обнаруженная митотическая задержка, по-видимому, была обусловлена неким дефектом ДНК, не позволившим продолжить М фазу, но сохранившим строение ядерного митотического аппарата, подтверждаемое экспрессией белка NuMA1 в составе метафазной пластинки в 83,33 % ВПЧ16-позитивных эктопий, в 66,67 % случаев, ассоциированных с ВПЧ 33 генотипа ФГГ $\alpha$ 9 и во всех наблюдениях, ассоциированных с ВПЧ 56 и 66 генотипов ФГГ $\alpha$ 6.

### **Морфологические критерии цервикальной интраэпителиальной неоплазии, ассоциированной с ВПЧ ВКР разных филогенетических групп**

При ЦИН, независимо от генотипа ассоциированных с ней ВПЧ ВКР, выявили критерии нарушения дифференцировки многослойного плоского эпителия шейки матки. В первую очередь, это проявилось замещением диспластическими участками от одной трети до всей толщи эпителиального пласта без повреждения базальной мембраны. При ЦИН I (n=222) атипичные клетки, сопоставимые по морфометрическим параметрам с базальными клетками, и дополняемые их койлоциты, уступающие соответствующим размерам клеток промежуточного и поверхностного слоев плоского эпителия типичного строения ( $p < 0,01$ ), свидетельствовали об изменениях их дифференцировки. Для ЦИН II и ЦИН III была характерна задержка “созревания” атипичных клеток на уровне глубоких слоев плоского эпителия (Artacho-Pérula E. et al., 1993) и отсутствие экспрессии эстрогенорецепторов  $\alpha$ . При ЦИН II степени (n=204) их морфометрические параметры были сопоставимы ( $p < 0,01$ ) с параметрами метаплазированной клетки, при тяжелой дисплазии (ЦИН III) (n=186) – с соответствующими показателями парабазальной и метаплазированной клеток ( $p < 0,01$ ), при интраэпителиальной карциноме (ЦИН III) (n=156) – несколько превышали соответствующие размеры базальной, парабазальной и метаплазированной клеток многослойного плоского эпителия ( $p < 0,01$ ).

Еще одним признаком нарушения дифференцировки эпителия может служить ослабление межклеточной адгезии диспластических участков в стратифицированном эпителии, не являющееся характерным для типичного строения плоского эпителия (Yaldizl M. et al., 2005). Так, независимо от генотипа ВПЧ ВКР, при нарастании тяжести интраэпителиального повреждения отмечено снижение продукции E-кадгерина ( $p = 0,03$ ), меньшие показатели экспрессии которого – в  $32,94 \pm 2,16$  % атипичных клеток, выявлены при тяжелой дисплазии (ЦИН III), ассоциированной с ВПЧ 16 генотипа.

Соотношение показателей экспрессии цитокератина 5, свойственной стволовым предшественницам (Martens J.E. et al., 2009) атипичных клеток, и продукции цитокератина 10, отражающей их плоскоклеточную дифференцировку (Fichorova R.N. et al., 1997; Ivanova P. et al., 2008), характеризовало, в первую очередь, процесс метаплазии в измененных участках эпителия шейки матки.

При нарастании тяжести интраэпителиального повреждения, независимо от генотипов ВПЧ, увеличивалось количество атипичных клеток в интерфазе клеточного цикла ( $p = 0,02$ ), о чем, кроме экспрессии белка Ki-67, свидетельствовала и продукция PCNA, p53, NuMA1, BCL-2. Рост в наших исследованиях численности атипичных клеток с экспрессией Ki-67 в интерфазе, характеризующее их пролиферативную активность (рисунок 2), согласуется с литературными данными (Данилова Н.В. и др., 2011; Евстигнеева Н.П. и др., 2014; Короленкова Л.И., 2011; Conesa-Zamora P. et al., 2009; García-Tamayo J. et al., 2009; Liang C.W. et al. 2010; Nai M.M. et al., 2009; Tan G.C. et al., 2008; Walts A.E. et al., 2009; Yu L. et al., 2010).

Отсутствие экспрессии атипичными клетками Ki-67 в 75 % ЦИН I, 12,5 % ЦИН II и 77,5 % тяжелой дисплазии (ЦИН III), ассоциированных с ВПЧ 16 генотипа, в 25 % ЦИН II и 40 % тяжелой дисплазии (ЦИН III), ассоциированных с ВПЧ других генотипов ФГГ $\alpha$ 9, отмечаемое и другими исследователями (Данилова Н.В. и др., 2011; Короленкова Л.И. и др.,



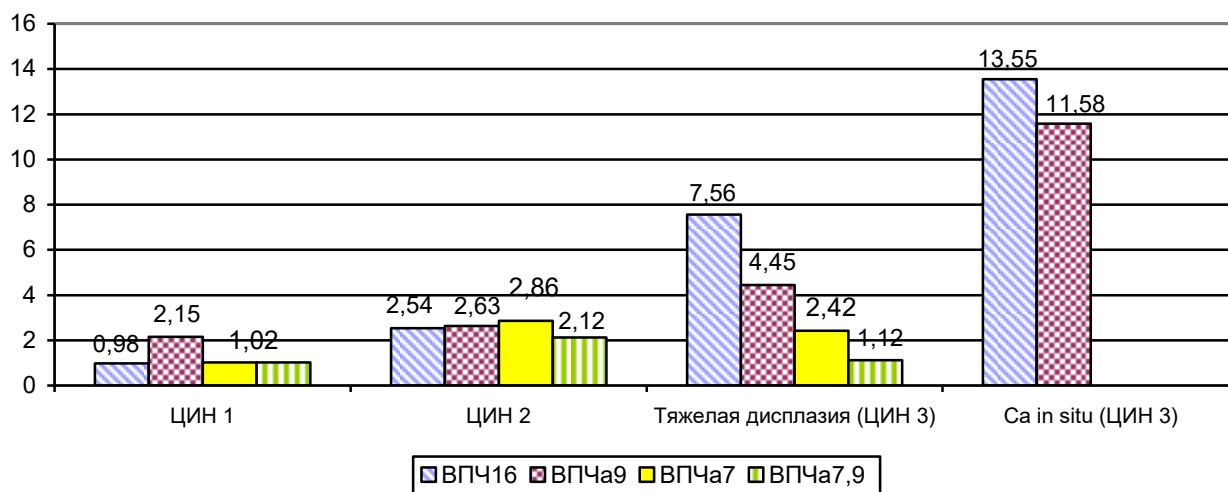


Рисунок 2. Экспрессия Ki-67 в атипичных клетках ЦИН, ассоциированных с ВПЧ ВКР разных генотипов.

2011; Tan G.C. et al., 2008), свидетельствует о завершении атипичными клетками своего цикла, а не служит критерием “неизбежной прогрессии от ЦИН к инвазивному раку” (Короленкова Л.И. и др., 2011).

При ЦИН, ассоциированных с ВПЧ 16 генотипа и ВПЧ других генотипов ФГГ  $\alpha 9$ , уменьшение количества атипичных клеток в интерфазе с экспрессией NuMA1 ( $p=0,04$ ) с  $0,92\pm 0,11$  % и  $2,51\pm 0,28$  % при ЦИН I до  $0,12\pm 0,02$  % и  $0,12\pm 0,02$  % при Ca in situ (ЦИН III), соответственно, характеризовало нарушение связи NuMA1 с p53 и p21 (Kivinen K. et al., 2010; Ohata H. et al., 2013), затруднявшее запуск апоптоза (Kivinen K. et al., 2005; Kivinen K. et al., 2010; Lin H.H. et al., 2007; Lu H. et al., 2010). Выявленное изменение продукции NuMA1, по-видимому, сыграло свою роль в нарушении митоза как стволовых клеток эпителия шейки матки, так и их дочерних атипичных клеток (Nguyen C.L. et al., 2009; Poulson N.D. et al., 2010; Vega S.L. et al., 2017; Vidi P.A. et al., 2012), затронув сегрегацию клеточной и вирусной ДНК (Ohata H. et al., 2013; Visocek L. et al., 2017), что, вероятно, послужило причиной формирования диспластических участков в многослойном плоском эпителии. Провести сравнительный анализ собственных исследований экспрессии NuMA1 при ЦИН с литературными данными не представляется возможным в связи с отсутствием последних.

Независимо от генотипа ВПЧ ВКР, пролиферативную активность атипичных клеток характеризовало и протекание в них M фазы цикла. При нарастании тяжести ЦИН отметили увеличение митотического индекса ( $p<0,01$ ), минимальные показатели которого –  $0,22\pm 0,04$  % при ЦИН I, максимальные –  $5,88\pm 0,88$  % при Ca in situ (ЦИН III) определены при инфицировании ВПЧ 16. При этом, независимо от тяжести поражения цервикального эпителия, во всех случаях более половины клеток M фазы отметили в метафазе ( $p<0,01$ ), что можно расценить как критерий “митотической задержки”, затрудняющей вступление в анафазу (Nguyen C.L. et al., 2009) и свидетельствующей о нарушениях метафазы вследствие дестабилизации шпинделя (Kivinen K. et al., 2010; Poulson N.D. et al., 2010; Woodard G.E. et al., 2010), приводящей к образованию дефектов при выравнивании хромосом в метафазной пластинке. При утяжелении интраэпителиальных изменений максимальные значения увеличения численности клеток в метафазе с  $55,22\pm 0,96$  % при ЦИН I до  $66,67\pm 0,45$  % при Ca in situ, характеризующие рост нарушений митотического аппарата, определены при инфицировании ВПЧ ФГГ  $\alpha 9$ .

Независимо от генотипа ВПЧ о дестабилизации митотического шпинделя свидетельствовало в наших исследованиях и снижение частоты выявления NuMA1 в метафазной пластинке (рисунок 3). Механизм этого нарушения митотического аппарата при

инфицировании ВПЧ 16 генотипа (Kivinen K. et al., 2010; Poulson N.D. et al., 2010; Woodard G.E. et al., 2010) обусловлен связью NuMA1 с С-терминалом вирусного белка E7 (Nguyen C.L. et al., 2009).

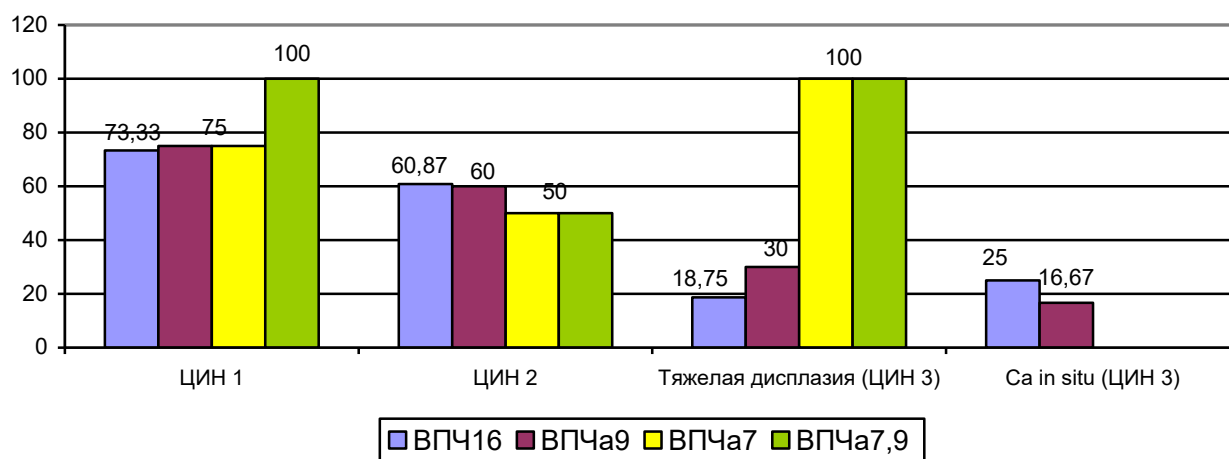


Рисунок 3. Выявление NuMA1 в метафазной пластинке при ЦИН, ассоциированных с ВПЧ ВКР разных генотипов.

Независимо от генотипов ВПЧ ВКР, еще одним критерием повреждения ядерного митотического аппарата (Kivinen K. et al., 2010; Poulson N.D. et al., 2010; Woodard G.E. et al., 2010) служит нарастание патологических митозов с  $1,88 \pm 0,69$  % при ЦИН II до максимальных значений –  $2,12 \pm 0,24$  % при ВПЧ16-позитивном Ca in situ (ЦИН III) с характерным отсутствием в них экспрессии NuMA1. О нарушении его формирования свидетельствовали “полые метафазы” и многополюсные митозы, а о его “грубых” повреждениях вплоть до полной дезорганизации – преобладающие по численности и составляющие более 60 % к-митозы (Казанцева И.А., 1981).

Выявленные многоядерные атипичные и окружающие их клетки плоского эпителия можно считать последствиями изменений митоза (рисунок 4), в частности, нарушения цитотомии из-за диссоциации между ядерными и цитоплазматическими изменениями. Продвижение в многослойном плоском эпителии трех- и более ядерных клеток, сформированных в результате многополюсных митозов из-за повреждений митотического аппарата (Казанцева И.А., 1981) при разрушении NuMA1 (Lin H.N. et al., 2007), как и в случае двуядерных клеток, обусловлено нарушением внутриклеточного механизма апоптоза.

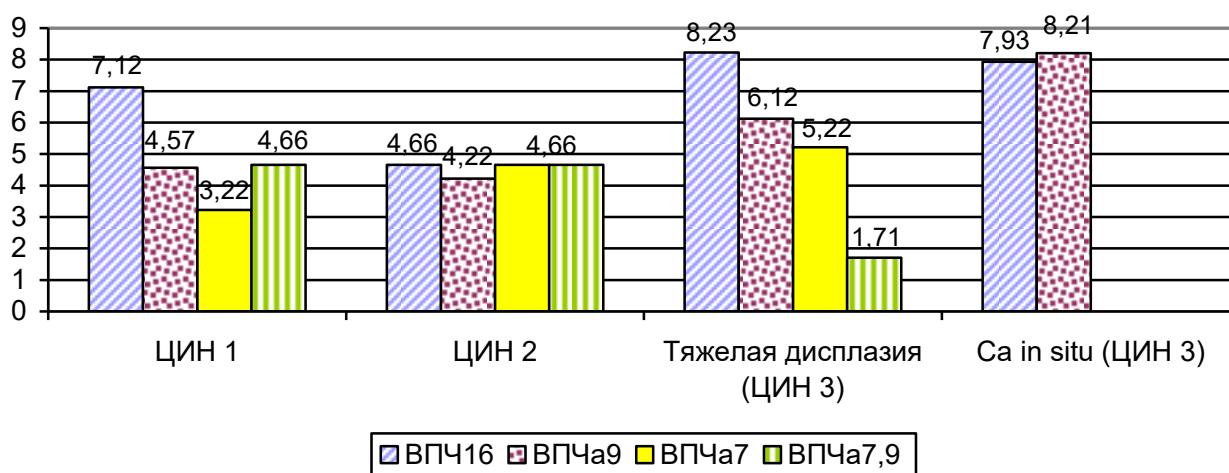


Рисунок 4. Многоядерные клетки при ЦИН, ассоциированных с ВПЧ ВКР разных генотипов.

Отличием поражения ВПЧ 16 генотипа явилась способность атипичных клеток формировать вследствие многополюсных митозов более многоядерные, чем при

инфицировании другими ВПЧ ВКР, клетки, содержащие при ЦИН I степени до 7 ядер, при ЦИН III (тяжелой дисплазии и Ca in situ) – до 6 ядер, что можно расценить как еще одним подтверждением повреждения их митотического аппарата (Казанцева И.А., 1981).

### Морфологические критерии инвазивного плоскоклеточного рака шейки матки, ассоциированного с ВПЧ ВКР разных филогенетических групп

При инвазивном плоскоклеточном раке независимо от генотипа ВПЧ ВКР гетерогенность опухоли проявилась, в первую очередь, различиями морфометрических характеристик опухолевых клеток. Их параметры, сопоставимые с клетками глубоких слоев стратифицированного эпителия ( $p < 0,01$ ), характеризовали задержку дифференцировки клеток рака, а сходные с клетками поверхностных слоев – способность к дифференцированию, вплоть до патологического ороговения.

До четверти клеток инвазивного РШМ находились в клеточном цикле. Наибольшие показатели экспрессии Ki-67 –  $25,33 \pm 5,01$  %, выявлены при инфицировании ВПЧ 16 генотипа (таблица 3).

Таблица 3. Маркеры РШМ, ассоциированного с ВПЧ ВКР разных генотипов.

Маркер			Количество клеток ( $M \pm m$ %)		
			ВПЧ16	ВПЧ ФГГ $\alpha 9$ (без 16)	ВПЧ ФГГ $\alpha 7$
Ki-67			$25,33 \pm 5,01$	$18,67 \pm 3,96$	$22,67 \pm 4,02$
Митоз	G1	T	$5,33 \pm 0,98$	$4,25 \pm 0,99$	$2,88 \pm 0,68$
		П	$3,02 \pm 0,44$	$2,67 \pm 0,98$	$1,56 \pm 0,56$
	G2	T	$5,92 \pm 0,98$	$4,88 \pm 0,98$	$3,11 \pm 0,34$
		П	$2,92 \pm 0,42$	$1,99 \pm 0,54$	$1,48 \pm 0,12$
Метафаза			G1	$75,11 \pm 0,29$	$66,12 \pm 0,52$
			G2	$80,33 \pm 0,36$	$82,67 \pm 0,56$
NuMA1 в метафазной пластинке			$6,25 \pm 0,04$	$14,29 \pm 0,06$	$14,29 \pm 0,06$
МЯК			$6,12 \pm 0,78$	$6,78 \pm 0,78$	$2,56 \pm 0,46$
Е-кадхерин			$23,99 \pm 4,99$	$36,44 \pm 6,02$	$15,89 \pm 3,78$

$p < 0,01$

(G1 – плоскоклеточный рак G1, G2 – плоскоклеточный рак G2;

Митоз: T – типичный, П – патологический; МЯК – многоядерные клетки)

В этих же случаях отметили наиболее высокий –  $5,92 \pm 0,98$  %, митотический индекс и наиболее выраженные повреждения митотического аппарата ( $p < 0,01$ ), характеризующиеся численностью опухолевых клеток в метафазе (с “митотической задержкой”), с минимальной экспрессией NuMA1 в метафазной пластинке, с патологическими митозами и содержащими два и более ядер (таблица 3).

Формирование структуры опухоли было обусловлено не количественной характеристикой межклеточной адгезии, наименьшие показатели которой –  $15,89 \pm 3,78$  % выявлены при ВПЧ45-позитивном РШМ, а изменением во всех исследованиях характера экспрессии Е-кадхерина с мембранной на цитоплазматическую.

### Физический статус ДНК ВПЧ 16 генотипа при эктопии и неоплазии шейки матки

При эктопии ( $n=10$ ) в 60 % случаев обнаружили эписомную, в 40 % – низко интегрированную (от 10 % до 32 %) форму вирусной ДНК (рисунок 5), выявление которой уступала литературным данным (Miyatake T. et al., 2007).

При ЦИН I ( $n=5$ ) эписомную форму вирусной ДНК отметили в 20 % случаев, низкую степень интеграции (от 12 до 23 %) – в 60 %, умеренную (38 %) – в 20 % исследований. При ЦИН II ( $n=16$ ) эписомную форму вирусной ДНК определили в 37,5 % случаев, низкую степень интеграции ДНК ВПЧ (от 7 % до 20 %) – в 31,25 %, умеренную степень (от 39 % до 46 %) – в 25 %, выраженную (75 %) – в 6,25 % исследований. При тяжелой дисплазии ( $n=32$ )

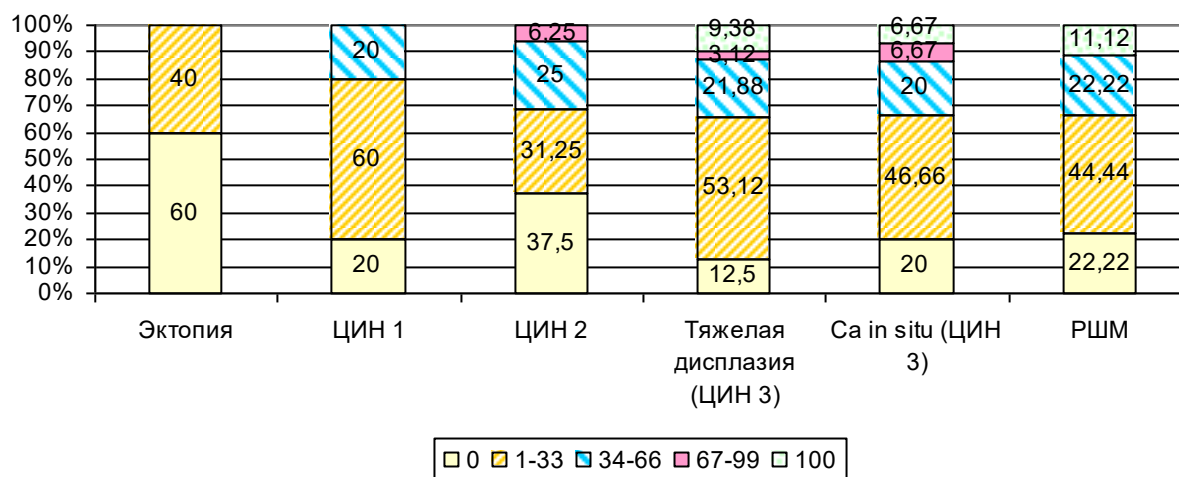


Рисунок 5. Физический статус ДНК ВПЧ 16 генотипа.

плоского эпителия (ЦИН III) в 12,5 % исследований выявили эписомную форму ДНК ВПЧ 16, низкую степень интеграции вирусной ДНК в клеточную ДНК (от 1 % до 30 %) – в 53,13 %, умеренную (от 34 % до 54 %) – в 21,88 %, выраженную (71 %) – в 3,12 %, полную (100 %) – в 9,38 % случаев. При Ca in situ (ЦИН III) шейки матки (n=15) в 20 % исследований наблюдали эписомную форму ДНК ВПЧ, низкую степень интеграции вирусной ДНК (от 5 % до 32 %) – в 46,66 %, умеренную (от 41 % до 66 %) – в 20 %, выраженную (69 %) – в 6,67 %, полную (100 %) – в 6,67 % наблюдений. Всего при исследовании ЦИН (n=68) разная степень интеграция ДНК ВПЧ 16 генотипа в ДНК клетки определена в 79,41 % (n=54), эписомная форма вирусной ДНК – в 20,59 % (n=14) случаев.

При инвазивном плоскоклеточном РШМ (n=9) эписомную форму ДНК ВПЧ 16 обнаружили в 22,22 %, интегрированную форму разной степени выраженности – в 77,78 % случаев. Низкую степень интеграции ДНК ВПЧ (от 18 % до 33 %) отметили в 44,44 %, умеренную (от 41 % до 66 %) – в 22,22 %, полную (100 %) – в 11,12 % исследований.

При нарастании тяжести повреждения эпителия шейки матки определили снижение встречаемости неинтегрированной формы ДНК ВПЧ с 60 % при эктопии до минимальных значений – 12,5 % при тяжелой форме дисплазии (ЦИН III), которые, в свою очередь, в 1,7 раза уступали частоте выявления данной формы физического статуса вирусной ДНК в случаях Ca in situ и инвазивного РШМ. Показатели эписомной формы при Ca in situ и РШМ в наших исследованиях превышали (Badaracco G. et al., 2005) или уступали данным литературы (Киселева В.И. и др., 2010).

Статистически значимых различий эписомной и интегрированной форм ДНК ВПЧ 16 генотипа при Ca in situ и инвазивном РШМ не выявили ( $p < 0,05$ ).

Наибольшие показатели низко интегрированной формы ДНК ВПЧ 16 – 60 %, обнаружены при ЦИН I, наименьшие – 31,25 %, при ЦИН II (рисунок 5). Умеренную интеграцию ДНК ВПЧ в сопоставимых между собой значениях ( $p < 0,05$ ) отметили при всех формах ЦИН и инвазивном плоскоклеточном раке, выраженную интеграцию – только при ЦИН II и ЦИН III с максимальными ее значениями при Ca in situ (Briolat J. et al., 2007). Частота выявления полностью интегрированной формы вирусной ДНК возрастала при утяжелении ЦИН, достигая при инвазивном раке максимальных значений (рисунок 5), сопоставимых с данными литературы (Киселева В.И. и др., 2010; Arias-Pulido H. et al., 2006; Badaracco G. et al., 2005).

### Количественная характеристика ВПЧ 16 генотипа при эктопии и неоплазии шейки матки

При нарастании тяжести эпителиального повреждения возрастало количество случаев выявления показателей “вирусной нагрузки”, превышающих порог клинической значимости

3 lg копий ДНК ВПЧ/10<sup>5</sup> клеток (Кувда Д.А. и др., 2007; Del Río-Ospina L. et al., 2015; Deruydt С.Е. et al., 2015). Однако, четкой корреляции между количеством ВПЧ в биоптате со степенью тяжести повреждения цервикального эпителия, по сравнению с исследованиями других авторов (Мысливцева Г.А. и др., 2014; Трушина О.И. и др., 2014; Филиппова Ю.Н. и др., 2009; Pirami L. et al., 1997), нами не выявлено.

Так, при цервикальной эктопии определили как клинически мало значимые уровни инфицирования – 2,49 lg копий ДНК ВПЧ/10<sup>5</sup> клеток, так и высокие показатели количества папилломавируса 16 генотипа – 6,84 lg копий ДНК ВПЧ/10<sup>5</sup> клеток, отмечаемые другими авторами (Тимошук Г. И. и др., 2014). Для ЦИН II и тяжелой формы дисплазии (ЦИН III) были характерны показатели “вирусной нагрузки” свыше 4 lg копий ДНК ВПЧ/10<sup>5</sup> клеток. В случаях ЦИН I, Ca in situ и инвазивного плоскоклеточного рака количество вируса папилломы человека 16 генотипа превышало 5 lg копий ДНК ВПЧ/10<sup>5</sup> клеток (рисунок 6).

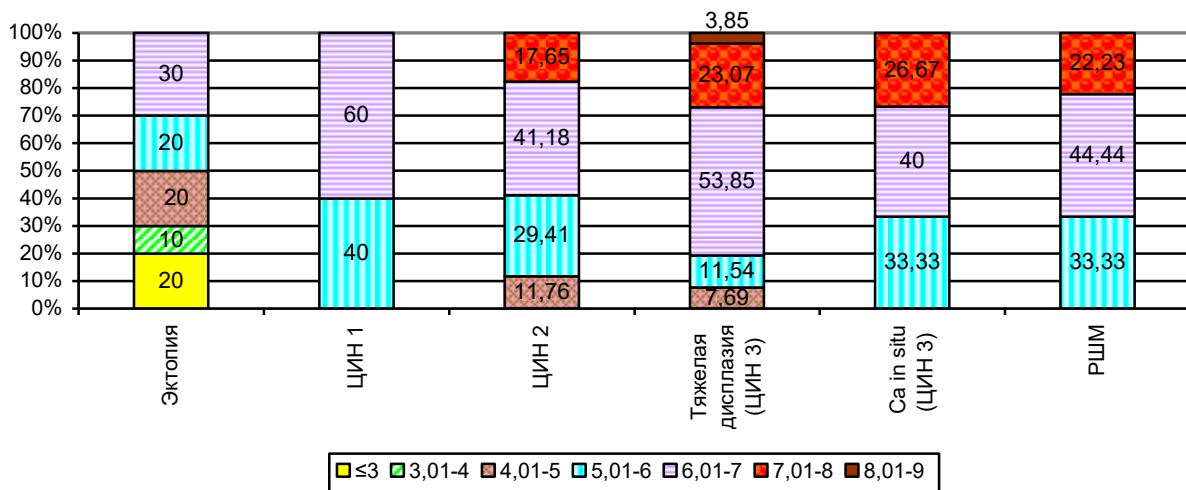


Рисунок 6. Частота выявления “вирусной нагрузки” ВПЧ 16 генотипа при эктопии и цервикальной неоплазии.

Какой-либо корреляции количественных показателей ДНК ВПЧ 16 с ее физическим статусом не выявлено ( $p=0,018$ ) в отличие от исследований других авторов (Киселева В.И. и др., 2010; Киселева В.И. и др., 2014), обнаруживших обратную связь “вирусной нагрузки” со степенью интеграции вирусной ДНК или предположивших, что большое количество копий генома, наоборот, увеличивает вероятность интеграции вирусной в клеточную ДНК (Кувда Д.А. и др., 2007; Andersson S. et al., 2005; Cricca M. et al., 2007; Peitsaro P. et al., 2002).

### Структурно-функциональная характеристика ВПЧ 16 генотипа при эктопии и неоплазии шейки матки в инфицированных клетках

Продукция капсидного белка L1 ВПЧ 16 генотипа исследована в 377 случаях эктопии и неоплазии шейки матки.

Из 164 женщин с эктопией белок L1 определили в 55,49 % ( $n=91$ ) случаев (рисунок 7). Из них L1 в 74,73 % ( $n=68$ ) исследований обнаружили в ядрах  $19,18 \pm 0,39$  % поверхностных клеток плоского эпителия, в 25,27 % ( $n=23$ ) – в ядрах  $9,33 \pm 0,29$  % резервных клеток.

Из 86 случаев ЦИН I продукцию капсидного белка наблюдали в 70,93 % ( $n=61$ ) исследований. Из них в 81,97 % ( $n=50$ ) случаев протеин L1 выявили в ядрах  $32,14 \pm 0,47$  % поверхностных и прилежащих к ним промежуточных клеток, в том числе койлоцитах и клетках без околядерной зоны просветления – “некойлоцитах”. В 16,39 % ( $n=10$ ) наблюдений их дополняла, а в 1,64 % ( $n=1$ ) была единственной экспрессия данного вирусного белка в ядрах и цитоплазме (рибосомах)  $10,68 \pm 0,44$  % резервных клеток.

Из 68 случаев ЦИН II белок L1 в ядрах  $16,48 \pm 0,74$  % атипичных клеток выявили в 39,71 % ( $n=27$ ) исследований. У 7,35 % ( $n=5$ ) пациенток при отсутствии в атипичных клетках



Рисунок 7. Встречаемость L1 ВПЧ 16 при эктопии и цервикальной неоплазии.

капсидный белок наблюдали в ядрах  $24,69 \pm 0,86$  % поверхностных клеток, прилежащих к участку ЦИН II.

Из 47 случаев тяжелой дисплазии плоского эпителия (ЦИН III) экспрессию L1 ВПЧ отметили в 25,53 % (n=12) исследований в ядрах  $15,88 \pm 0,73$  % атипичных клеток. В 14,89 % (n=7) случаев при отсутствии L1 в атипичных клетках данный протеин обнаружили в ядрах  $10,25 \pm 0,61$  % поверхностных клеток плоского эпителия, прилежащих к участку дисплазии.

Из 6 случаев Ca in situ (ЦИН III) шейки матки продукцию белка L1 определили в 16,67 % (n=1) исследований в ядрах  $4,66 \pm 0,86$  % атипичных клеток. В этом же случае при ультраструктурном исследовании в ядрах эпителиальных клеток и в околоядерной цитоплазме обнаружили вирусоподобные частицы, которые имели сферическую форму и размеры около 50 нм (Karageosov I. et al., 1995; Sato S. et al., 1988; Wang H-K. et al., 2009). В других 33,33 % (n=2) случаев Ca in situ белок L1 выявили в ядрах  $23,25 \pm 0,92$  % промежуточных клеток плоского эпителия, прилежащих к опухолевому участку.

Из 13 исследований инвазивного плоскоклеточного РШМ в 7,69 % (n=1) случаев капсидный белок L1` определили в  $3,33 \pm 1,12$  % опухолевых клеток вытянутой формы. В других 7,69 % (n=1) исследований продукцию данного вирусного протеина отметили в ядрах  $56,44 \pm 0,99$  % поверхностных клеток паратуморальной зоны.

Продукция капсидного белка L1 при эктопии и ЦИН I характеризовала интенсивность жизненного цикла ВПЧ с сохранением внутриядерной экспрессии в дифференцированных клетках, что свойственно циклу развития ВПЧ (Doorbar J., 2005; Griesser H. et al., 2004; Ungureanu C. et al., 2010). Отмечаемое в наших исследованиях уменьшение продукции L1 ( $p=0,023$ ) при ЦИН II, III степеней и инвазивном РШМ свидетельствовало о дисбалансе продукции вирусных генов при нарастании нарушений дифференцировки эпителия шейки матки, что согласуется с литературными данными (Griesser H. et al., 2009; Xiao W. et al., 2010; Yu L. et al., 2010). При этом продукция L1 ВПЧ в случаях ЦИН I была ниже, а в случаях тяжелой дисплазии (ЦИН III) – выше показателей, полученных другими исследователями (Xiao W. et al., 2010). При ЦИН II частота выявления экспрессии L1 ВПЧ сопоставима с результатами других авторов, у которых этот белок отмечен в 39-41,81 % (Kösel S. et al., 2009; Xiao W. et al., 2010) случаев.

Обнаруженный в наших исследованиях синтез капсидных белков ВПЧ, исходя из критериев его жизненного цикла (Doorbar J., 2005), был обусловлен сохранением пораженными ВПЧ атипичными клетками свойств дифференцировки, механизм которого изучен недостаточно.

### **Нарушение дифференцировки при эктопии и цервикальной неоплазии, ассоциированных с ВПЧ 16 генотипа**

При эктопии шейки матки независимо от физического статуса ДНК ВПЧ 16 генотипа ( $p < 0,05$ ) клетки сохранили присущие им форму и организацию хроматина, белковую структуру цитоплазмы, морфометрические параметры ( $p < 0,01$ ), свойства межклеточной адгезии ( $p < 0,01$ ), соответствующие их локализации в плоскоэпителиальном пласте.

При ЦИН независимо от физического статуса ДНК ВПЧ 16 генотипа ( $p < 0,05$ ) отметили нарушения дифференцировки многослойного плоского эпителия шейки матки, занимающих от одной трети до всей толщи эпителиального пласта без повреждения базальной мембраны. При ЦИН I степени морфометрические параметры атипичных клеток, сопоставимые с соответствующими размерами базальных клеток, и дополняемых их койлоцитов ( $p < 0,01$ ), уступающие параметрам клеток типичного строения, свидетельствовали об их способности к дифференцировке. ЦИН II и III степеней характеризовались задержкой дифференцировки атипичных клеток на уровне глубоких слоев плоского эпителия (Artacho-Pérula E. et al, 1993). При ЦИН II их морфометрические параметры были сопоставимы с критериями метаплазированной клетки, при тяжелой дисплазии (ЦИН III) – парабазальной и метаплазированной клеток, при *Ca in situ* (ЦИН III) – превышали размеры базальной, парабазальной и метаплазированной клеток многослойного плоского эпителия.

При ЦИН ослабление межклеточной адгезии диспластических участков выявили как при нарастании тяжести интраэпителиального поражения в случаях ЦИН II и ЦИН III степеней, так и при нарастании степени интеграции ДНК ВПЧ в ДНК клетки ( $p < 0,01$ ). Исключение составили лишь случаи *Ca in situ* с полностью интегрированной формой ДНК ВПЧ 16 генотипа, в которых атипичные клетки были полностью связаны друг с другом.

При инвазивном плоскоклеточном РШМ независимо от физического статуса ДНК ВПЧ 16 генотипа ( $p < 0,05$ ) морфометрические параметры опухолевых клеток, сопоставимые с клетками глубоких слоев стратифицированного эпителия ( $p < 0,01$ ), характеризовали задержку дифференцировки клеток рака, а сходные с поверхностно расположенными в многослойном эпителии клетками – были способны к дифференцированию, вплоть до патологического ороговения. Сформированная структура опухоли была обусловлена не столько количественной характеристикой межклеточной адгезии, наименьшие показатели которой –  $10,22 \pm 0,98$  % выявлены при умеренной степени интеграции вирусной ДНК, а сменой во всех случаях мембранной экспрессии E-кадгерина на цитоплазматическую.

### **Характеристика клеточного цикла при эктопии и цервикальной неоплазии, ассоциированных с ВПЧ 16 генотипа**

При эктопии преобладание резервных, метаплазированных и базальных клеток с экспрессией цитокератина 5 над численностью клеток с продукцией цитокератина 10 ( $p < 0,01$ ) и продукция ими BCL-2 свидетельствовало о сохранении данными клетками ряда свойств родительских СК эпителия шейки матки вследствие длительности процесса метаплазии. При ЦИН и РШМ какой-либо корреляции экспрессии цитокератинов 5 и 10 с физическим статусом вирусной ДНК не отметили.

Отсутствие при эктопии экспрессии Ki-67 и PCNA в базальных и метаплазированных клетках характеризовало завершение ими клеточного цикла, а отсутствие EGFR – завершение стимуляции регенерации цервикального эпителия ростовыми факторами.

Независимо от физического статуса ДНК ВПЧ 16 о сохранении клетками контроля собственного цикла при эктопии свидетельствовала экспрессия NuMA1, при ЦИН I дополняемая экспрессией p53, показатели которых при этих изменениях эпителия превышали продукцию Ki-67. При ЦИН II, ЦИН III и РШМ независимо от физического статуса вирусной ДНК продукция p53 и NuMA1 или уступала показателям продукции Ki-67, PCNA и EGFR или, как в исследованиях тяжелой дисплазии (ЦИН III) с интеграцией ДНК ВПЧ 16 более 34 % – полностью отсутствовала. Отмечаемое снижение численности клеток с

экспрессией белка NuMA1 в интерфазе при прогрессировании цервикального поражения характеризовало нарушение организации хроматина и утрату его связи с p53 и p21 (Ohata H. et al., 2013), затруднявшее запуск апоптоза (Kivinen K. et al., 2005; Kivinen K. et al., 2010; Lin H.H. et al., 2007). Эти изменения наблюдали на фоне снижения экспрессии p53 при низкой интеграции вирусной ДНК или полного отсутствия продукции данного белка при других интегрированных формах ДНК ВПЧ16, что характеризовало угнетение апоптоза.

Утяжеление ЦИН при разной степени интеграции ДНК ВПЧ 16 генотипа сопровождалось ростом числа клеток с экспрессией Ki-67, что отмечено в другими авторами (Данилова Н.В. и др., 2011; Короленкова Л.И. и др., 2011; Conesa-Zamora P. et al., 2009; García-Tamayo J. et al., 2009; Liang C.W. et al., 2010; Nai M.M. et al., 2009; Yu L. et al., 2010). Максимальные показатели экспрессии данного белка при смешанной форме интеграции вирусной ДНК (рисунок 8) выявлены при Ca in situ и сопоставимы с литературными данными (Tan G.C. et al., 2008).

При ЦИН II и ЦИН III отмечен рост численности клеток с экспрессией Ki-67 при увеличении степени интеграции вирусной ДНК – от низкой до полной (рисунок 8).

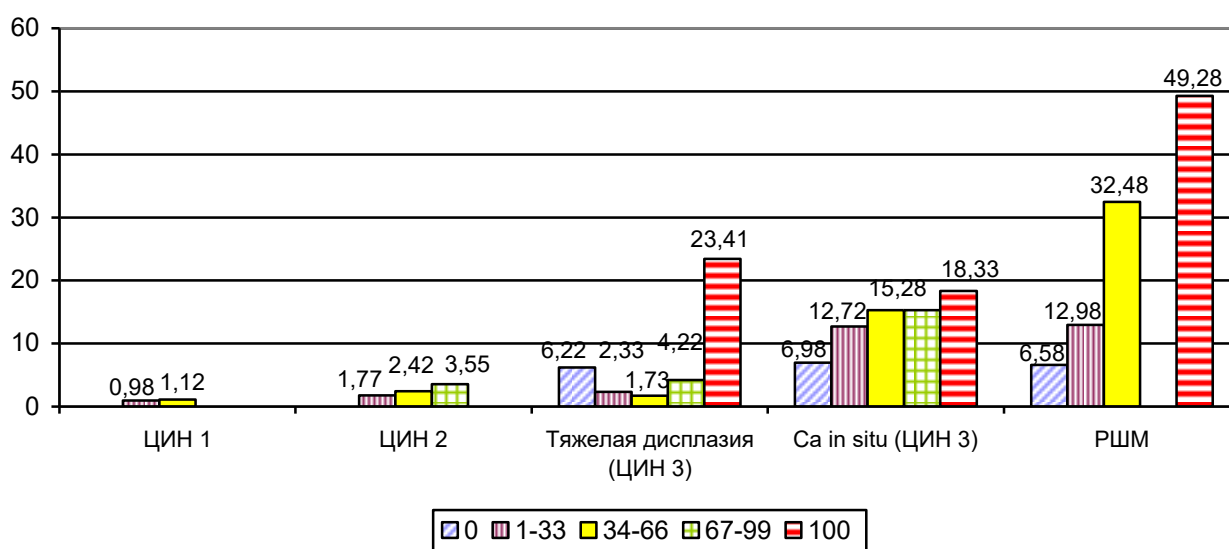


Рисунок 8. Экспрессия Ki-67 в клетках цервикальной неоплазии при разном физическом статусе ДНК ВПЧ 16 генотипа.

Данных литературы, характеризующих экспрессию Ki-67 при различных, впервые предложенных нами степенях интеграции вирусной ДНК, не найдено. Лишь в единичных публикациях отмечено усиление экспрессии Ki-67 при интегрированной форме ДНК ВПЧ 16 генотипа по сравнению с ее эписомной формой (Диагностика, профилактика и лечение папилломавирусной инфекции гениталий у женщин, 2010).

Однако сохранение пролиферативной способности обнаружили не у всех атипичных клеток и не во всех наблюдениях, что отмечали и другие исследователи (Данилова Н.В. и др., 2011; Короленкова Л.И. и др., 2011; Tan G.C. et al., 2008). Так, при ЦИН I степени наблюдали экспрессию Ki-67 в 33,33 % случаев с низко интегрированной и во всех случаях с умеренно интегрированной формами вирусной ДНК, при ЦИН II – в 60 % случаев при низко-, в 75 % с умеренно- и во всех – с выраженной формами интеграции ДНК ВПЧ16, при тяжелой дисплазии (ЦИН III) в 75 % случаев с эписомной, в 58,82 % случаев – с низкой, в 71,43 % – с умеренной и во всех с выраженной и полностью интегрированной ДНК ВПЧ (рисунок 9).

По-видимому, выявленное отсутствие Ki-67 может служить свидетельством выхода атипичных клеток из цикла и, соответственно, утраты ими пролиферативных свойств материнских СК.

При Ca in situ и при инвазивном РШМ, белок Ki-67 отметили в каждом исследовании независимо от физического статуса ДНК ВПЧ. При нарастании степени интеграции



вирусной ДНК в ДНК клетки в этих случаях возрастала и пролиферативная активность опухолевых клеток (рисунок 8).

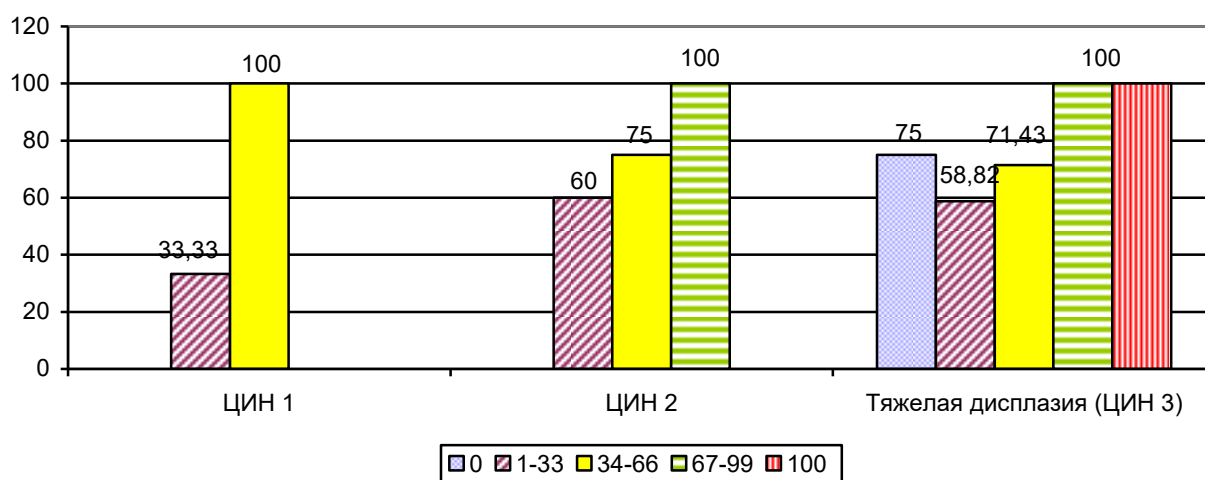


Рисунок 9. Относительные показатели выявления Ki-67 в клетках цервикальной неоплазии при разном физическом статусе ДНК ВПЧ 16 генотипа.

Нахождение атипичной клетки в клеточном цикле при ЦИН II и III характеризовала и экспрессия PCNA ( $p < 0,01$ ), рост продукции которого, как и Ki-67, был связан с экспрессией EGFR, наибольшие показатели которого ( $12,22 \pm 1,44$  %), в свою очередь, выявлены при полной интеграции вирусной ДНК при тяжелой дисплазии (ЦИН III).

#### Нарушение митотического аппарата при эктопии и цервикальной неоплазии, ассоциированных с ВПЧ 16 генотипа

Единственным критерием нарушения митотического аппарата при эктопии при разном физическом статусе ДНК ВПЧ являлась "митотическая задержка", обусловленная замедлением прикрепления хромосом и вирусной ДНК к митотическому веретену (Попов Б.В., 2010), что не позволило начать анафазу и остановило клеточный цикл.

При цервикальной неоплазии при эпизодической форме и разных степенях интеграции ДНК ВПЧ 16 нарушения ядерного митотического аппарата нарастали при утяжелении интраэпителиального поражения, с характерным снижением экспрессии NuMA1 вплоть до полного его отсутствия в составе митотического веретена при Ca in situ и инвазивном раке при полностью интегрированной форме вирусной ДНК (рисунок 10).

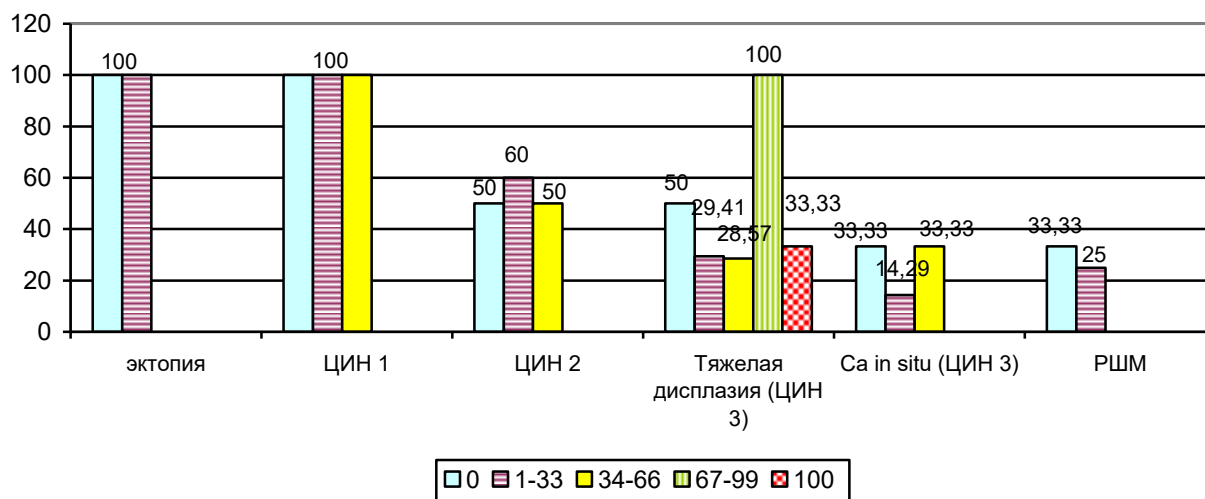


Рисунок 10. Выявление NuMA1 в метафазной пластинке при эктопии и цервикальной неоплазии при разном физическом статусе ДНК ВПЧ 16 генотипа.

Независимо от физического статуса вирусной ДНК еще одним критерием повреждения митотического аппарата (Казанцева И.А., 1981) из-за разрушения NuMA1 (Lin H.H. et al., 2007) служили многоядерные клетки (рисунок 11).

При ЦИН II, тяжелой форме дисплазии (ЦИН III), Ca in situ (ЦИН III) и инвазивном плоскоклеточном РШМ независимо от степени интеграции вирусной ДНК ( $p < 0,01$ ) о нарушении строения митотического аппарата свидетельствовали и патологические митозы с характерным отсутствием участия NuMA1 в сборке митотического веретена.

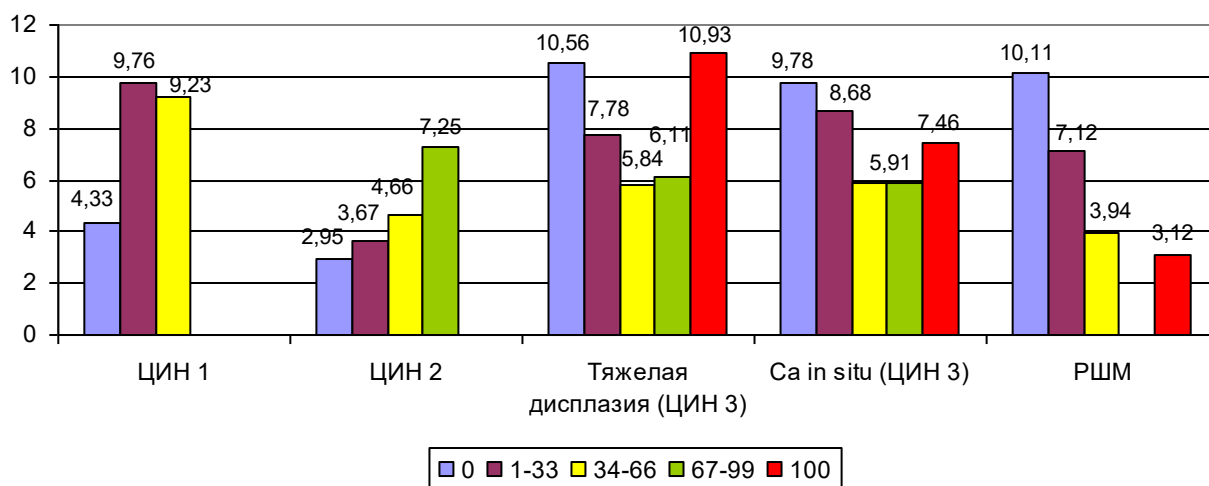


Рисунок 11. Многоядерные клетки цервикальной неоплазии при разном физическом статусе ДНК ВПЧ 16 генотипа.

### Экспрессия гистона H2A.Z как маркер стволовых свойств клеток при эктопии и цервикальной неоплазии, ассоциированных с ВПЧ 16 генотипа

При эктопии отсутствие гистона H2A.Z в эпителии шейки матки позволило констатировать, что его СК был использован симметричный вариант деления, подтверждением чему служили участки базальноклеточной и резервноклеточной гиперплазии в регенерирующем цервикальном эпителии.

Выявленное в наших исследованиях ЦИН I и ЦИН II и в 87,5 % случаев тяжелой дисплазии (ЦИН III) отсутствие экспрессии H2A.Z свидетельствовало о выборе атипичными клетками симметричного пути деления, что позволяет трактовать данные варианты ЦИН как гиперпластический процесс.

В отличие от них, наблюдаемая в  $8,77 \pm 0,62$  % атипичных клеток в 12,5 % случаев тяжелой дисплазии (ЦИН III) и в  $10,48 \pm 1,12$  % клеток во всех случаях Ca in situ экспрессия H2A.Z подтверждала использование этими клетками асимметричного митоза (Nuh Y.H. et al., 2015), а остальными  $91,23 \pm 0,99$  % и  $89,52 \pm 1,42$  %, соответственно – симметричного способа деления. Наличие в этих исследованиях ЦИН III атипичных клеток с признаками стволовости (Попов Б.В., 2010; Репин В.С. и др. 2010; Пучинская М.В. и др., 2016) позволяет предположить, что данные свойства играют роль в процессе малигнизации (Lobo N.A. et al., 2007). При этом, в случаях Ca in situ экспрессия гистона H2A.Z, по-видимому, вызвала и дефекты в митотической прогрессии (Takahashi D. et al., 2017), характеризующейся ростом митотического индекса и количеством патологических митозов.

Во всех исследованиях плоскоклеточного РШМ G1 отсутствие экспрессии гистона H2A.Z в высокодифференцированных клетках рака позволяет предположить механизм опухолевой прогрессии с помощью симметричного митоза клеток-предшественников с утратой признаков стволовости.

Из всех исследований инвазивного РШМ G2 в 55,56 % (n=10) случаев в  $25,54 \pm 6,33$  % опухолевых клеток, напоминающих по форме и морфометрическим параметрам базальные клетки многослойного плоского эпителия, отметили экспрессию гистона H2A.Z. Наличие

наряду с ними опухолевых клеток и без продукции гистона H2A.Z свидетельствовало о способности клеток инвазивного плоскоклеточного РШМ степени злокачественности G2 кроме асимметричного и к симметричному вариантам деления. Экспрессия гистона H2A.Z в этих опухолевых клетках позволяет расценить их как СКР, способные к самовоспроизводству, необходимому для поддержания опухоли (Cho R.W. et al., 2008; Clarke M.F. et al., 2006; Diehn M. et al., 2009; Reya T. et al., 2001).

### Факторы прогноза развития цервикальной интраэпителиальной неоплазии, ассоциированной с ВПЧ 16 генотипа

При иммуноцитохимическом исследовании биопсий шейки матки 196 женщин у 66 (33,67 %) из них выявили экспрессию капсидного белка L1 ВПЧ 16 генотипа и белка ядерного митотического аппарата NuMA1, у 39 (19,9 %) – продукцию протеина L1, у 26 (13,27 %) – белка NuMA1. У 65 (33,16 %) пациенток антител к обоим белкам не обнаружили (таблица 4).

Таблица 4. Количество случаев ЦИН, ассоциированных с ВПЧ 16 генотипа, с экспрессией белков L1 и NuMA1.

Морфология		Количество случаев				Всего
		L1+, NuMA1+	L1+, NuMA1-	L1-, NuMA1+	L1-, NuMA1-	
ЦИН I	абс.	38	23	9	15	85
	%	44,71±0,99	27,06±0,89	10,58±0,62	17,65±0,76	100
ЦИН II	абс.	18	11	12	26	67
	%	26,87±0,89	16,41±0,74	17,91±0,77	38,81±0,97	100
Тяжелая дисплазия (ЦИН III)	абс.	10	5	5	22	42
	%	23,82±0,85	11,9±0,65	11,9±0,65	52,38±1,01	100
Ca in situ (ЦИН III)	абс.	0	0	0	2	2
	%				100	100
Всего	абс.	66	39	26	65	196
	%	33,67±0,95	19,9±0,81	13,27±0,68	33,16±0,68	100

p<0,05

5,1 % (n=10) женщин были беременны. Из них ЦИН I верифицирована у 1,02 % (n=2) пациенток в первом триместре, ЦИН II – у 1,02 % (n=2) в первом и у 0,51 % (n=1) – во втором триместре. У 2,04 % (n=4) женщин тяжелая дисплазия (ЦИН III степени) выявлена в сроки 14-15 недель, у 0,51 % (n=1) – на 30 неделе беременности.

Из всех случаев ЦИН I продукцию обоих белков определили в 44,71 % (n=38), экспрессию только L1 – 27,06 % (n=23), только NuMA1 – в 10,58 % (n=9) случаев. Отсутствие обоих белков обнаружили 17,65 % (n=15) случаях. Всего белок L1 наблюдали в 71,76 % (n=61), NuMA1 – в 55,29 % (n=47) случаев ЦИН I.

При ЦИН II продукцию обоих белков отметили в 26,87 % (n=18), экспрессию только L1 – в 16,41 % (n=11), только NuMA1 – в 17,91 % (n=12) наблюдений. Отсутствие обоих белков обнаружили в 38,81 % (n=26) случаев. Всего L1 определили в 43,28 % (n=29), белок NuMA1 – в 44,78 % (n=30) случаев ЦИН II степени.

При тяжелой дисплазии (ЦИН III) продукцию обоих белков обнаружили в 23,82 % (n=10), экспрессию только L1 – 11,9 % (n=5), только NuMA1 – в 11,9 % (n=5) исследований. Отсутствие обоих белков выявили в 52,38 % (n=22) случаев. Всего белок L1 отметили в 35,71 % (n=15), NuMA1 – в 35,71 % (n=15) случаев тяжелой дисплазии (ЦИН III).

При интраэпителиальном раке (ЦИН III) в обоих случаях экспрессия NuMA1 и L1 в атипичных клетках отсутствовала.

Положительные реакции на L1 и NuMA1 выявили у всех беременных с ЦИН I степени и у 2-х женщин с тяжелой дисплазией (ЦИН III степени) во втором и третьем триместрах,

соответственно. Экспрессию белка NuMA1 отметили у 2-х пациенток с ЦИН II в первом и втором триместрах и у 1-й – с тяжелой дисплазией (ЦИН III степени) во втором триместре. Отрицательные реакции на антитела к обоим белкам обнаружены у 1-й женщины в первом триместре с ЦИН II и у 2-х – во втором триместре с ЦИН III (тяжелой дисплазией).

62 больным ЦИН, в том числе, 2 пациенткам с Ca in situ, с отрицательными реакциями на оба белка провели электроэксцизию шейки матки.

131 женщину с экспрессией атипичными клетками L1 и NuMA1 или одного из них и 3-х беременных с отрицательными реакциями на антитела к обоим ядерным протеинам оставили для динамического наблюдения. Контрольные осмотры и забор материала для цитологического исследования проводили каждые 3 месяца. 84 женщины наблюдали свыше 24 месяцев, 6 – 24 месяца, 12 – 21 месяц, 1 – 18 месяцев, 7 – 15 месяцев, 2 – 12 месяцев, 11 – 9 месяцев, 9 – 6 месяцев, 2 – 3 месяца.

В 81,82 % (n=54) из 66 исследований ЦИН с ядерной экспрессией белков L1 и NuMA1 отметили регресс дисплазии (таблица 5). Из них плоский эпителий шейки матки восстановил типичное строение у 35 женщин с ЦИН I, у 9-и – с ЦИН II, у 4-х – с тяжелой дисплазией (ЦИН III) спустя 12 месяцев, у 4-х больных ЦИН II и у 2-х с тяжелой дисплазией (ЦИН III) – через 9 месяцев (рисунок 12).

В 13,63 % (n=9) исследований ЦИН с экспрессией обоих белков отметили сохранение степени тяжести поражения плоского эпителия (таблица 5). Из них в 1-м случае ЦИН I, в 4-х ЦИН II и в 4-х случаях тяжелой дисплазии (ЦИН III) в течение 12 месяцев наблюдали изменения эпителия, выявленные первично.

В 4,55 % (n=3) случаев ЦИН с продукцией в атипичных клетках обоих протеинов обнаружили прогрессирование дисплазии (таблица 5). Из них в 2-х случаях ЦИН I через 6 месяцев выявили критерии умеренной дисплазии, в 1-м случае ЦИН II через 9 месяцев – тяжелую дисплазию (ЦИН III) (рисунок 12).

Таблица 5. Развитие ЦИН при экспрессии L1 и NuMA1 атипичными клетками.

Исход ЦИН	Количество случаев экспрессии белков			Всего	
	L1 «+», NuMA1«+»	L1 «+», NuMA1«-»	L1 «-», NuMA1«+»		
Регресс	абс.	54	18	19	91
	%	81,82±0,77	46,15±0,99	73,07±0,89	69,46±0,92
Персистенция	абс.	9	19	7	35
	%	13,63±0,69	48,72±1,01	26,93±0,89	26,72±0,88
Прогрессирование	абс.	3	2	0	5
	%	4,55±0,42	5,13±0,44	0	3,82±0,38
Всего		66	39	26	131

p<0,05

В 46,15 % (n=18) из 33 случаев ЦИН с экспрессией только L1 в ядрах атипичных клеток отметили регресс клеточных поражений (таблица 5). Из них у 10 пациенток ЦИН I, у 2-х с ЦИН II и у 2-х с тяжелой дисплазией (ЦИН III) спустя 12 месяцев обнаружены критерии эктопии, а у 2-х больных ЦИН II и у 2-х с тяжелой дисплазией спустя 12 месяцев критерии ЦИН I степени шейки матки.

В 48,72 % (n=19) исследований ЦИН с положительной реакцией на антитела к L1 (таблица 5) первично выявленные изменения плоского эпителия были сохранены в срок от 6 до 30 месяцев. Из них первично выявленную ЦИН I отмечали в 7-и случаях в срок до 6 месяцев, в 3-х случаях – в течение 12 месяцев и в 3-х – в течение 24 месяцев. Изменения плоского эпителия шейки матки, выявленные первично, отмечали в 4-х случаях ЦИН II в течение 12 месяцев и в 1-м – в течение 30 месяцев, в 1-м случае тяжелой дисплазии (ЦИН III степени) – в течение 12 месяцев. В 5,13 % (n=2) случаев у больных ЦИН II диагностировано прогрессирование дисплазии (таблица 5). Из них у 1-й больной через 3 месяца и у 1-й через 9 месяцев обнаружены критерии тяжелой дисплазии (ЦИН III) (рисунок 12).

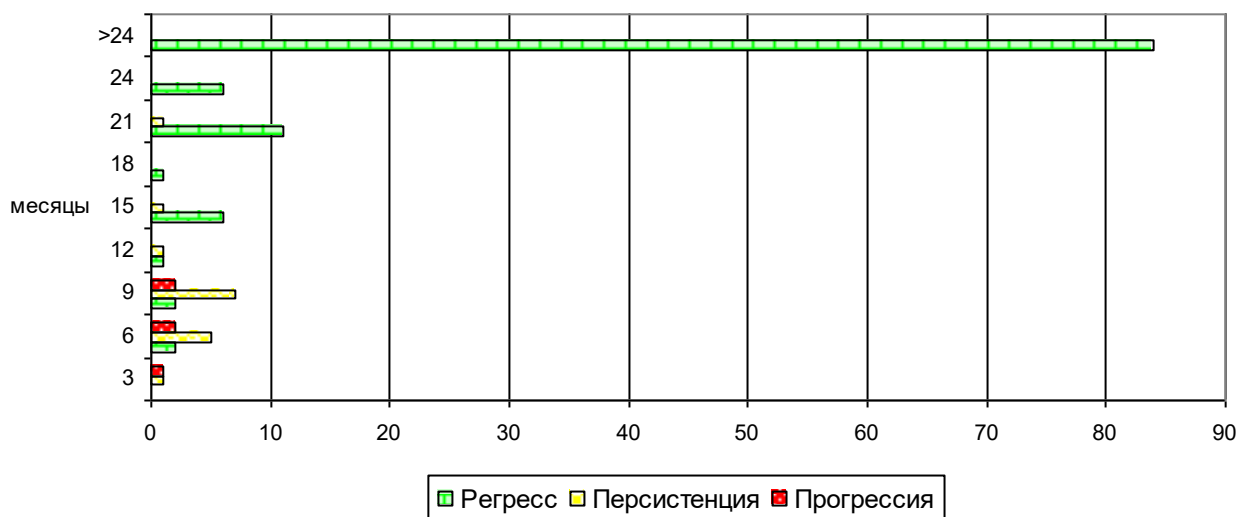


Рисунок 12. Исход ЦИН, ассоциированных с ВПЧ 16 генотипа.

В 73,07 % (n=19) наблюдений ЦИН с экспрессией только NuMA1 в ядрах атипичных клеток плоский эпителий восстановил типичное строение (таблица 5). Из них отсутствие атипии обнаружили спустя 6 месяцев у 8-и больных ЦИН I, через 12 месяцев у 10 ЦИН II и у 1-й ЦИН III. В остальных 26,93 % (n=7) исследований в срок до 24 месяцев явления атипии были сохранены в 1-м случае ЦИН I, в 2-х случае ЦИН II, в 4-х случаях ЦИН III.

Всего из 131 случая ЦИН с ядерной экспрессией L1 и NuMA1 или одного из этих белков регресс дисплазии отметили в 69,46 % (n=91), персистенцию в 26,72 % (n=35), прогрессирование в 3,82 % (n=5) исследований.

Через 3 месяца наблюдения у всех беременных ЦИН I с экспрессией обоих белков отметили восстановление типичного строения плоского эпителия, у 1-й с ЦИН III – признаки эндоцервикальной эктопии. У 1-й больной с тяжелой дисплазией (ЦИН III) с обоими положительными маркерами только после родов определили восстановление эпителия. Через 3 месяца у беременных ЦИН II с экспрессией NuMA1 наблюдали снижение степени атипии до ЦИН I, у беременной ЦИН III изменения эпителия присутствовали до родов. У женщин с отрицательными реакциями на оба белка с ЦИН II и ЦИН III тяжесть поражения плоского эпителия шейки матки была сохранена на всем протяжении беременности. При контрольных осмотрах после родов отметили восстановление типичного строения плоского эпителия.

Частота выявления регресса ЦИН в 68,57 % (n=72) и персистенции в 26,67 % (n=28) L1-положительных случаев (в сочетании с экспрессией NuMA1 или без нее) превысила литературные данные (Griesser H. et al., 2009; Moscicki A.V. et al., 2012), а показатели прогрессии ЦИН, отмечаемой в 4,76 % (n=5) L1-позитивных случаев, наоборот, им уступали (D'Ottaviano M. G. et al., 2013; Griesser H. et al., 2009; Jaisamrarn U. et al., 2013; Persson M. et al., 2012; Stemberger-Papic S. et al., 2010). Течение ЦИН с экспрессией только белка L1 характеризовалось наибольшими показателями персистенции и прогрессирования, отмечаемых, соответственно, в 48,72 % и 5,13 % случаев (таблица 5).

Наиболее благоприятный исход отмечен в случаях NuMA1-позитивных ЦИН с сохранением контроля клеточным циклом и способностью пораженных клеток к дальнейшей дифференцировке, которые завершились в наших исследованиях регрессом или длительной персистенцией.

Регресс 81,82 % случаев ЦИН с сочетанной экспрессией белков L1 и NuMA1 атипичными клетками превышал его численность в L1-позитивных дисплазиях (p=0,01), а персистенция, наоборот, им уступала (таблица 5). Показатели прогрессирования ЦИН (таблица 5) были сопоставимы (p<0,05) с собственными аналогичными случаями ЦИН с экспрессией только белка L1 и, по-видимому, могли быть обусловлены папилломавирусной инфекцией. Если регресс и персистенция ЦИН в наших исследованиях объяснимы сохранением атипичными клетками контроля клеточного цикла и их способности к

последующей дифференцировке, то механизм прогрессии ЦИН требует дальнейшего изучения, по-видимому, с учетом сохранения исследуемыми клетками стволовых свойств эпителия шейки матки.

Сроки наступления регресса ЦИН в сроки от 6 до 12 месяцев согласуются с литературными данными (D'Ottaviano M.G. et al., 2013; Moscicki A.V. et al., 2010; Munro A. et al., 2016). Длительность персистенции ЦИН от 12 до 30 месяцев и выявление прогрессирования в сроки от 3 до 9 месяцев были сопоставимы (Griesser H. et al., 2009; Zhang H. et al., 2015) или наступили ранее временных параметров, изложенных в других исследованиях (D'Ottaviano M.G. et al., 2013; Moscicki A.V. et al., 2010). Механизм регресса 3-х случаев ЦИН с отрицательными реакциями на L1 и NuMA1, выявленный после родов, требует дальнейшего изучения.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ВПЧ 16 генотипа у женщин Санкт-Петербурга является основным этиологическим фактором цервикальной неоплазии. Роль ВПЧ 16 подтверждается выявлением его как монотипа, так и в сочетании с ВПЧ других генотипов, большинство из которых в качестве монотипа редко запускают механизм раковой трансформации пораженного эпителия шейки матки.

Механизм формирования ЦИН не зависит от генотипа ассоциированного с ней ВПЧ ВКР. Общими критериями ЦИН являются задержка клеточной дифференцировки с ослаблением межклеточной адгезии и сохранением пролиферативных свойств и белковой структуры цитоплазмы стволовых материнских клеток. Утяжеление интраэпителиального поражения сопровождается нарастанием пролиферативной активности и нарушений митотического аппарата. Наибольшие показатели пролиферации и, как следствие, наиболее выраженные повреждения митотического аппарата характерны для плоскоклеточного РШМ, независимо от генотипа ассоциированного с ним ВПЧ ВКР. При эктопии шейки матки, также независимо от генотипа ассоциированного с ней ВПЧ ВКР, репаративная регенерация характеризуется повреждениями митотического аппарата лишь единичных СК, которые не приводят к нарушению дифференцировки многослойного плоского эпителия шейки матки.

При поражении эпителия шейки матки ВПЧ ВКР 16 генотипа формирование цервикальных неоплазий связано со значительной вирусной нагрузкой (больше 3 lg копий ДНК ВПЧ 16/10<sup>5</sup> клеток), но не зависит от физического статуса вирусной ДНК в клетках эпителия. Отсутствие статистически значимых различий физического статуса ДНК ВПЧ 16 генотипа при ЦИН и РШМ отражает сходство “поведения” вирусной ДНК, которая может или не встраиваться, или встраиваться частично или полностью в ДНК пораженной клетки. Выявление наряду с полностью интегрированной формой и смешанной формы ДНК ВПЧ 16 генотипа при инвазивном плоскоклеточном раке позволяет предположить, что истинными стволовыми раковыми клетками являются не все клетки злокачественной опухоли эпителия шейки матки. В случае определения эписомной формы ДНК ВПЧ 16 вопрос о механизме вирусного канцерогенеза при инвазивном плоскоклеточном РШМ остается открытым.

Полученные нами впервые в мире результаты экспрессии гистона H2A.Z, служащего маркером асимметричного типа деления и характеризующего свойство стволовости исследуемых клеток, позволили предположить различия генеза эктопии и цервикальной неоплазии человека. Использование стволовыми и их дочерними – атипичными клетками только симметричного митоза, определяет изменения эпителия при эктопии, ЦИН I, ЦИН II и 87,5 % тяжелой дисплазии (ЦИН III), ассоциированных с ВПЧ ВКР 16, как гиперпластический процесс. Симметричный и асимметричный варианты деления атипичных клеток в 12,5 % тяжелой дисплазии (ЦИН III) и во всех случаях *Ca in situ* (ЦИН III) характеризуют наличие у них критериев стволовости, которые, по-видимому, и играют роль в процессе малигнизации. При плоскоклеточном РШМ G1 и в половине исследованных случаев РШМ G2, ассоциированных с ВПЧ ВКР 16, рост данных опухолей осуществляется за счет симметричного митоза раковых клеток-предшественников. В половине исследований

РШМ G2 его прогрессирование осуществляется с использованием симметричного и асимметричного способов деления, являющегося критерием СКР.

Вариант исхода ЦИН зависит от способности атипичных клеток к дифференцировке при сохранении контроля собственного цикла.

## ВЫВОДЫ

1. Цервикальные неоплазии ассоциированы с вирусами папилломы человека высокого канцерогенного риска 16 генотипа (ВПЧ ВКР 16) в 77,73 % цервикальных интраэпителиальных неоплазий (ЦИН), 90,14 % инвазивного плоскоклеточного рака, эктопия шейки матки – в 51,53 % случаев.

2. ЦИН, независимо от генотипа ассоциированного с ней ВПЧ ВКР, формируют производные стволовых клеток эпителия шейки – атипичные клетки с характерной задержкой дифференцировки, сходные по морфометрическим параметрам ( $p < 0,05$ ) с клетками глубоких слоев плоского эпителия с ослабленной межклеточной адгезией (наименьшие показатели экспрессии E-кадгерина –  $32,94 \pm 2,16$  % клеток при ЦИН III), сохраняющие пролиферативные свойства и белковую структуру цитоплазмы стволовых материнских клеток.

3. Нарастание тяжести ЦИН, независимо от генотипа ассоциированного с ней ВПЧ ВКР, сопровождается увеличением митотического индекса (с  $0,22 \pm 0,04$  % при ЦИН I до  $5,88 \pm 0,88$  % при Ca in situ) с ростом нарушений митотического аппарата, вызывающих митотические задержки (с  $55,22 \pm 0,96$  % клеток в M фазе при ЦИН I до  $66,67 \pm 0,45$  % при Ca in situ), увеличение численности патологических митозов (с  $1,88 \pm 0,69$  % при ЦИН II до  $2,12 \pm 0,24$  % при Ca in situ) и многоядерных клеток (с  $7,12 \pm 1,25$  при ЦИН I до  $8,21 \pm 1,01$  % при Ca in situ).

4. Инвазивный плоскоклеточный рак шейки матки (РШМ), независимо от генотипа ассоциированного с ним ВПЧ ВКР, характеризуется нахождением до  $25,33 \pm 5,01$  % опухолевых клеток в пролиферативном цикле с достоверно ( $p < 0,03$ ) более высоким, чем при ЦИН митотическим индексом и выраженными ( $p < 0,05$ ) повреждениями митотического аппарата при сохранении межклеточных связей.

5. Эктопия шейки матки, независимо от генотипа ассоциированного с ней ВПЧ ВКР, характеризуется наличием единичных ( $0,22 \pm 0,04$  %) стволовых (базальных) клеток с повреждениями митотического аппарата, не приводящих к нарушению дифференцировки многослойного плоского эпителия шейки матки.

6. Формирование цервикальной неоплазии, ассоциированной с ВПЧ ВКР 16, обусловлено значительной вирусной нагрузкой (больше 3 lg копий ДНК ВПЧ 16/ $10^5$  клеток), но не зависит от физического статуса вирусной ДНК в клетках эпителия: эписомная форма выявлена в 20,59 % ЦИН и 22,22 % случаев инвазивного плоскоклеточного рака шейки матки, интегрированная форма – в 79,41 % случаях ЦИН и в 77,78 % случаев РШМ. В случаях ЦИН нарастание интеграции ДНК ВПЧ ВКР 16 в ДНК клетки определяло увеличение пролиферативной активности атипичных клеток ( $p < 0,02$ ).

7. Нарушение дифференцировки плоского эпителия при цервикальной неоплазии, ассоциированной с ВПЧ ВКР 16, определяет угнетение синтеза капсидных белков с 70,93 % при ЦИН I до 7,69 % при инвазивном плоскоклеточном РШМ ( $p = 0,02$ ).

8. Особенностью цервикальной неоплазии, ассоциированной с ВПЧ 16 генотипа, в отличие от других ВПЧ ВКР, является достоверно ( $p < 0,05$ ) более выраженные при ЦИН I, ЦИН III степеней и инвазивном плоскоклеточном РШМ повреждения митотического аппарата.

9. Механизм развития ЦИН связан с выбором стволовыми клетками (резервными, базальными) способа своего деления. При использовании стволовыми и их дочерними – атипичными клетками только симметричного митоза, характеризующегося отсутствием экспрессии гистона H2A.Z, изменения эпителия при эктопии, ЦИН I, ЦИН II и 87,5 %

тяжелой дисплазии (ЦИН III), ассоциированных с ВПЧ ВКР 16, протекали как гиперпластический процесс.

10. В 12,5 % тяжелой дисплазии и во всех Ca in situ, ассоциированных с ВПЧ ВКР 16, атипичные клетки кроме симметричного использовали и асимметричный вариант митоза, что подтверждалось экспрессией в них гистона H2A.Z.

11. Во всех случаях инвазивного плоскоклеточного РШМ G1 и 44,44 % случаев рака G2, ассоциированных с ВПЧ ВКР 16, опухолевые клетки используют симметричный митоз. В 55,56 % случаев плоскоклеточного рака G2 его прогрессирование осуществляется с использованием симметричного и асимметричного способов деления, что является одним из критериев раковых стволовых клеток.

12. Регресс в 81,82 % случаев ВПЧ16-позитивной цервикальной интраэпителиальной неоплазии зависит от сохранения атипичными клетками способности к контролю своего цикла и/или дифференцировке, подтверждаемых экспрессией белков NuMA1 и L1.

### **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

На амбулаторном этапе при выявлении ЦИН с целью определения варианта ее развития и тактики лечения необходимо проведение комплексного молекулярно-генетического (методом ПЦР) и морфологического (цитологического) исследования, включающие следующие этапы:

1. Получение материала методом браш-биопсии.
2. Помещение в смотровом кабинете соскобов эктоцервикса и эндоцервикса в маркированные емкости с транспортной средой с последующим направлением в лабораторию.
3. Генотипирование выявленного в цервикальном содержимом вируса папилломы человека методом ПЦР.
4. Изготовление в лаборатории из осадка, полученного методом центрифугирования, 4 препаратов. Первый (из материала эктоцервикса) и второй (из материала эндоцервикса) препараты окрашиваются по методу Папаниколау. Из двух препаратов, приготовленных из объединенных осадков экто- и эндоцервикса, в одном проводится иммуноцитохимическое исследование на выявление в атипичных клетках белка L1, в другом – NuMA1.
5. Оценка результата. Положительной реакцией считается при наличии экспрессии исследуемого белка в не менее чем 5 % атипичных клеток. Выявление экспрессии обоих протеинов или одного из них расценивается как критерий низкого риска прогрессии интраэпителиального поражения. Отсутствие продукции обоих белков трактуется как высокий риск прогрессии ЦИН и служит показанием для электроэксцизии шейки матки.

### **ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ**

Дальнейшее изучение критериев стволовости атипичных клеток при цервикальной интраэпителиальной неоплазии и сопоставление их с различными изменениями продукции генов ВПЧ высокого канцерогенного риска позволит расширить представление о механизме вирусного канцерогенеза шейки матки.

### **СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

- ВПЧ – вирус папилломы человека  
 ВКР – высокий канцерогенный риск  
 ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота  
 СК – стволовая клетка  
 СКР – стволовая клетка рака  
 РШМ – рак шейки матки  
 ЦИН – цервикальная интраэпителиальная неоплазия



EGFR – рецептор эпидермального фактора роста  
 NuMA1 – белок ядерного митотического аппарата  
 PCNA – ядерный белок пролиферирующих клеток

### СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Ершов, В.А. Фоновые процессы и неоплазия эпителия шейки матки / В.А. Ершов, О.В. Нарвская. – СПб.: ООО “Человек”, 2007 – 80 с.
2. Вязовая, А.А. Выявление вируса папилломы человека высокого канцерогенного риска для предупреждения неоплазии эпителия шейки матки / А.А. Вязовая, Н.В. Банюк, Д.К. Ермоленко, В.А. Ершов, О.В. Нарвская, А.Б. Жебрун // Материалы 4 международной конференции “Идеи Пастера в борьбе с инфекциями”, посвящённой 85-летию Санкт-Петербургского института имени Пастера и 120-летию Парижского института Пастера: 17 июня 2008 г. – СПб.: СПб НИИЭМ, 2008. – С. 77
3. Вязовая, А.А. Выявление различных генотипов вируса папилломы человека высокого канцерогенного риска у женщин Санкт-Петербурга / А.А. Вязовая, В.А. Ершов, Н.В. Банюк, О.В. Нарвская // Материалы международного симпозиума “Папилломавирусная инфекция и злокачественные новообразования. Интегрированная система надзора и профилактики”: 4-5 июня 2009 г. – СПб.: Издат. НИИЭМ им. Пастера, 2009. – С. 26-27.
4. Vayzovaya, A. Prevalence of high risk human papillomavirus types in women in St. Petersburg / A. Vayzovaya, V. Yershov, N. Banyuk, O.Narvskaya // Well-known infections the hottest features of diagnostics and treatment, St. Petersburg, September 23-26, 2009: Proc. 8<sup>th</sup> Nordic-Baltic Congress on Infectious Diseases. – St. Petersburg, 2009. – P. 82.
5. Нарвская, О.В. Диагностика инфекции, обусловленной вирусами папилломы человека высокого канцерогенного риска, и перспективы профилактики рака шейки матки / О.В. Нарвская, В.А. Ершов // Лабораторная диагностика России 2010/2011. Ежегодный справочник. – СПб.: Изд-во “Человек”, 2010. – С. 109-113.
6. Вязовая, А.А. Распространенность вируса папилломы человека у женщин с признаками цервикальной интраэпителиальной неоплазии / А.А. Вязовая, О.В. Нарвская, И.Н. Воробцова, В.А. Ершов // Материалы международной конференции “Развитие научных исследований и надзор за инфекционными заболеваниями”: 18-20 мая 2010 г. – СПб.: НИИЭМ им. Пастера, 2010. – С. 52.
7. Ершов, В.А. ВПЧ-ассоциированные клеточные изменения высокой степени интраэпителиального повреждения плоского эпителия шейки матки / В.А. Ершов // Материалы научно-практической конференции СЗФО с международным участием конференции “Актуальные вопросы профилактики, скрининга, диагностики и лечения опухолей репродуктивных органов”: 17-18 сентября 2010 г. – Великий Новгород, 2010. – С. 50-51.
8. Ершов, В.А. Цитологические особенности высокой степени интраэпителиального повреждения плоского эпителия шейки матки, обусловленные вирусом папилломы человека / В.А. Ершов, А.С. Лисянская // Учёные записки СПб ГМУ им. акад. И.П. Павлова. – 2010. – Т. 17, № 3. – С. 88-89.
9. Вязовая, А.А. Инфицированность женщин с признаками цервикальной интраэпителиальной неоплазии вирусом папилломы человека / А.А. Вязовая, О.В. Нарвская, В.А. Ершов // Сборник трудов VII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием “Молекулярная диагностика-2010”. Т. 3: 24-26 ноября 2010 г. – М., 2010. – С. 361-362.
10. Вязовая, А.А. Интеграция ДНК вируса папилломы человека 16 генотипа в геном клеток цервикального эпителия при фоновых процессах и неоплазии шейки матки / А.А. Вязовая, Д.А. Куевда, О.Б. Трофимова, В.А. Ершов, О.В. Нарвская // Материалы II симпозиума с международным участием “Папилломавирусная инфекция и рак. Интегрированная система надзора и профилактики”: 7-9 июня 2011 г. – СПб.: Издат. НИИЭМ им. Пастера, 2011. – С. 12-14.

11. Ершов, В.А. Морфологические изменения цервикального эпителия, ассоциированные с вирусами папилломы человека высокого канцерогенного риска / В.А. Ершов, А.А. Вязовая, О.В. Нарвская // *Материалы II симпозиума с международным участием “Папилломавирусная инфекция и рак. Интегрированная система надзора и профилактики”*: 7-9 июня 2011 г. – СПб.: Издат. НИИЭМ им. Пастера, 2011. – С. 67-70.
12. Ершов, В.А. Встречаемость 16 генотипа у женщин, инфицированных вирусом папилломы человека / В.А. Ершов, А.С. Лисянская, А.А. Вязовая, О.В. Нарвская // *Учёные записки СПб ГМУ им. акад. И.П. Павлова*. – 2011. – Т. 18, № 3. – С. 85-86.
13. Ершов, В.А. СК10 в цервикальном эпителии больных интегрированной формой ПВИ, развившейся на фоне эндоцервикоза / В.А. Ершов, А.С. Лисянская, О.А. Татарина // *Учёные записки СПб ГМУ им. акад. И.П. Павлова*. – 2011. – Т. 18, № 3. – С. 86-88.
14. Ершов, В.А. Капсидный белок L1 ВПЧ 16 генотипа в измененном цервикальном эпителии / В.А. Ершов, Е.В. Ильинская // **Вопросы онкологии**. – 2013. – Т. 59, № 2 – С. 47-51.
15. Ершов, В.А. Репродукция вируса папилломы человека 16 генотипа и интеграция вирусной ДНК в измененном цервикальном эпителии / В.А. Ершов, А.А. Вязовая, Е.В. Ильинская, А.С. Лисянская, Д.А. Куевда, О.Б. Трофимова, О.Ю. Шипулина, О.В. Нарвская // **Онкология. Журнал им. П. А. Герцена**. – 2013. – № 1. – С. 21-26.
16. Ершов, В.А. Активность процессов пролиферации и апоптоза при интеграции в цервикальный эпителий ДНК вируса папилломы человека 16 генотипа / В.А. Ершов, В.С. Чирский, А.А. Вязовая, О.В. Нарвская, А.С. Лисянская // **Архив патологии**. – 2013. – Т.75, № 2. – С. 16-19.
17. Вязовая, А.А. Выявление вирусов папилломы человека высокого канцерогенного риска и оценка физического статуса вирусной ДНК методом ПЦР при поражении цервикального эпителия / А.А. Вязовая, Д.А. Куевда, О.Б. Трофимова, О.Ю. Шипулина, В.А. Ершов, Л.В. Лялина, О.В. Нарвская // **Клиническая лабораторная диагностика**. – 2013. – № 8. – С. 24-26.
18. Ершов, В.А. Повреждения плоского эпителия шейки матки при папилломавирусной инфекции / В.А. Ершов, А.А. Вязовая, О.В. Нарвская, Л.В. Лялина, А.С. Лисянская // **Инфекция и иммунитет**. – 2013. – Т. 3, № 1. – С. 79-82.
19. Ершов, В.А. Изменения цервикального эпителия при продуктивной и интегративной формах папилломавирусной инфекции / В.А. Ершов, А.А. Вязовая, О.В. Нарвская // *Материалы международной конференции “Молекулярная эпидемиология актуальных инфекций”*: 5-7 июня 2013 г. // **Инфекция и иммунитет**. – 2013. – Т. 3, № 2. – С. 127-128.
20. Чирский, В.С. Степень повреждения цервикального эпителия и статус ДНК вируса папилломы человека 16 генотипа / В.С. Чирский, В.А. Ершов, А.А. Вязовая, О.В. Нарвская // **Вестник Российской Военно-медицинской академии**. – 2013. – № 3 (43). – С. 96-98.
21. Чирский, В.С. Нарушение клеточной дифференцировки при высокой степени интраэпителиального повреждения и раке шейки матки, ассоциированных с вирусами папилломы человека высокого канцерогенного риска / В.С. Чирский, В.А. Ершов // **Вестник Российской Военно-медицинской академии**. – 2013. – № 4 (44). – С. 192-194.
22. Ершов, В.А. Морфологические особенности поражения цервикального эпителия вирусом папилломы человека / В.А. Ершов, В.С. Чирский // *Библиотека патологоанатома*. – 2013. – Вып. 141. – С. 22-33.
23. Ершов, В.А. Физический статус ДНК вируса папилломы человека 16 генотипа и апоптоз при цервикальных неоплазиях / В.А. Ершов, А.А. Вязовая, О.В. Нарвская // *Материалы 8 Ежегодной Всероссийской научно-практической конференции с международным участием “Здоровье – основа человеческого потенциала: проблемы и пути их решения”*. Т. 8, часть 2: 21-23 ноября 2013 г. – СПб, 2013. – С. 557-559.
24. Ершов, В.А. Изменения пролиферации цервикального эпителия при поражении вирусом папилломы человека / В.А. Ершов, В.С. Чирский, А.А. Вязовая, О.В. Нарвская // **Вестник Санкт-Петербургского университета. Серия 11**. – 2014. – Вып. 1. – С. 153-159.

25. Ершов, В.А. Иммуноморфологические критерии койлоцитов / В.А. Ершов, А.А. Вязовая, О.В. Нарвская // **Вестник Санкт-Петербургского университета. Серия 11.** – 2014. – Вып. 2. – С. 171-174.
26. Ершов, В.А. Механизм онкогенного повреждения цервикального эпителия вирусом папилломы человека / В.А. Ершов, В.С. Чирский // Сборник научных трудов Всероссийской конференции “Актуальные вопросы патологической анатомии в мирное и военное время”, посвященной 155-летию кафедры патологической анатомии Военно-медицинской академии им. С. М. Кирова: 18 апреля 2014 г. – СПб.: ВМедА, 2014. – С. 74-76.
27. Ершов, В.А. Механизм развития неоплазии при поражении эпителия шейки матки вирусом папилломы человека высокого канцерогенного риска / В.А. Ершов // **Инфекция и иммунитет.** – 2014. – Т. 4, № 2. – С. 167-172.
28. Чирский, В.С. Цервикальная неоплазия и вирусная нагрузка ВПЧ 16 генотипа / В.С. Чирский, В.А. Ершов, А.А. Вязовая, О.В. Нарвская, Л.В. Лялина // **Инфекция и иммунитет.** – 2014. – Т. 4, № 2. – С. 192-196.
29. Чирский, В.С. Роль эстрогенов в развитии высокой степени интраэпителиального повреждения плоского эпителия шейки матки, ассоциированного с вирусом папилломы человека высокого канцерогенного риска / В.С. Чирский, В.А. Ершов, А.С. Лисянская, Н.И. Кулябко // **Клиническая патофизиология.** – 2014. – № 3. – С. 17-19.
30. Ершов, В.А. Изменения ядерного митотического аппарата как признак цервикальной неоплазии, ассоциированной с вирусом папилломы человека высокого канцерогенного риска / В.А. Ершов, В.С. Чирский, А.С. Лисянская // **Онкология. Журнал им. П. А. Герцена.** – 2015. – № 2. – С. 24-28.
31. Лялина, Л.В. Вакцинация против папилломавирусной инфекции и особенности оценки ее эффективности / Л.В. Лялина, О.Ю. Стебелько, Н.Ю. Гульцева, Е.В. Касаткин, В.А. Ершов, Л.К. Чернова, И.Г. Петрова, О.В. Парков // *Terra medica.* – 2015. – № 1-2 (79-80). – С. 82-83.
32. Lyalina, L. Vaccination against Human Papillomavirus Infection in Saint-Petersburg / L. Lyalina, O. Stebelko, E. Kasatkin, V. Ershov // *Abstracts of 30<sup>th</sup> International Papillomavirus Conference & Clinical and Public Health Workshops: September 17-21, 2015.* – Lisbon, Portugal, 2015. – P. 1195.
33. Ершов, В.А. Особенности морфогенеза цервикальной неоплазии, обусловленной вирусом папилломы человека высокого канцерогенного риска / В.А. Ершов // Сборник научных трудов шестых научных чтений Всероссийской конференции с международным участием “Современные подходы в клинико-морфологической диагностике и лечении заболеваний человека”, посвящённой памяти чл.-корр. РАМН, з.д.н. РФ, профессора О.К. Хмельницкого: 9-10 октября 2015 г. – СПб., 2015. – С. 74-78.
34. Ершов, В.А. Морфогенез неоплазии шейки матки, ассоциированной с вирусом папилломы человека / В.А. Ершов // Сборник научных трудов “Современные достижения практической онкологии”, посвященный 70-летию СПб ГБУЗ “Городской клинический онкологический диспансер”. – СПб.: Аграф+, 2016. – С. 126-137.
35. Ершов, В.А. Распределение больных дисплазиями шейки матки, ассоциированными с вирусом папилломы человека, по возрастным и социальным группам по данным Госпитального регистра Городского клинического онкологического диспансера Санкт-Петербурга с 2003 по 2014 годы / В.А. Ершов, М.К. Сереброва, М.Ю. Кротов // Сборник научных трудов “Современные достижения практической онкологии”, посвященный 70-летию СПб ГБУЗ “Городской клинический онкологический диспансер”. – СПб.: Аграф+, 2016. – С. 331-338.
36. Ершов, В.А. Информативность факторов прогноза ВПЧ-позитивной дисплазии плоского эпителия шейки матки / В.А. Ершов, А.С. Лисянская, Е.А. Ронжина, Е.Р. Рахминова // Сборник научных трудов “Современные достижения практической онкологии”, посвященный 70-летию СПб ГБУЗ “Городской клинический онкологический диспансер”. – СПб.: Аграф+, 2016. – С. 352-358.
37. Ершов, В.А. Неоплазии эпителия шейки матки / В.А. Ершов. – СПб.: ООО “Человек”,

2016. – 200 с.

38. Ершов, В.А. Изменение жизненного цикла вируса папилломы человека высокого канцерогенного риска и клеточного цикла цервикальной интраэпителиальной неоплазии / В.А. Ершов // Сборник научных трудов Всероссийской конференции “Вопросы организации патологоанатомической работы в мирное и военное время”, посвященной 75-летию Центральной патологоанатомической лаборатории МО РФ ВМедА им. С. М. Кирова: 21 апреля 2017 г. – СПб., ВМедА, 2017. – С. 30-31.

39. Ершов, В. А. Оценка информативности экспрессии белков L1 ВПЧ и NuMA1 в прогнозе цервикальной интраэпителиальной неоплазии, ассоциированной с вирусом папилломы человека высокого канцерогенного риска / В.А. Ершов // Библиотека патологоанатома. – 2017. – Вып. 176. – С. 22-30.

40. Ершов, В.А. Критерии стволовых клеток рака шейки матки после проведения химиотерапевтического лечения / В.А. Ершов, А.С. Лисянская, Н.Н. Безпечук, Р.П. Саломатов // Сборник научных трудов Всероссийской конференции с международным участием “Современные подходы в клинико-морфологической диагностике и лечении заболеваний человека”, седьмые научные чтения, посвященные памяти член-корр. РАМН, з.д.н. РФ, профессора О. К. Хмельницкого: 13 октября 2017 г. – СПб., 2017 – С. 45-47.

41. Ершов, В.А. Результаты применения методики, позволяющей оценить риск прогрессии цервикальной интраэпителиальной неоплазии, ассоциированной с вирусом папилломы человека высокого канцерогенного риска / В.А. Ершов, А.С. Лисянская, Е.А. Ронжина, Е.Р. Рахминова // Материалы научно-практической конференции с международным участием “Амбулаторная онкология: новые возможности”: 12-13 октября 2017 г. – СПб.: Гиппократ, 2017. – С. 36-37.

42. Ершов, В.А. Значение белков L1 вируса папилломы человека и NuMA1 в прогнозе цервикальной интраэпителиальной неоплазии, ассоциированной с вирусом папилломы человека высокого канцерогенного риска / В.А. Ершов, А.С. Лисянская, Е.А. Ронжина, Е.Р. Рахминова // **Акушерство и гинекология**. – 2017. – № 11. – С. 63-68.

43. Эпидемиологическое обоснование вакцинопрофилактики папилломавирусной инфекции: информационно-методическое письмо / Л.В. Лялина, Е.В. Касаткин, Ю.Н. Филиппова, В.А. Ершов, В.В. Казиахмедова, Н.Ю. Гульцева, Е.В. Хорькова, О.Д. Цыганова, Е.А. Горяев, Д.В. Холопов, Г.В. Чугунова. – СПб.: ФБУН НИИЭМ им. Пастера, 2018. – 16 с.

44. Ершов, В.А. Резервные и базальные клетки эпителия шейки матки как источник цервикальных неоплазий, ассоциированных с вирусами папилломы человека / В.А. Ершов, В.М. Михайлов, В.С. Чирский // **Гены и клетки**. – 2019. – Т. 14, № 1. – С. 80-84.

45. Ершов, В.А. Продукция белков L1 ВПЧ и NuMA при цервикальной интраэпителиальной неоплазии / В.А. Ершов, А.С. Лисянская, Г.М. Манихас // **Учёные записки СПб ГМУ им. акад. И. П. Павлова**. – 2019. – Т. 26, № 2. – С. 18-27.