

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

*На правах рукописи*

**Анисимова Мария Андреевна**

**Цервикальная интраэпителиальная неоплазия и рак шейки матки  
у женщин с выявленным вирусом папилломы человека высокого  
онкогенного риска: диагностическая ценность анализа  
метилирования CADM1, MAL, PAX1**

Специальность – 3.1.4. Акушерство и гинекология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Москва – 2025

Диссертация подготовлена на кафедре акушерства и гинекологии факультета фундаментальной медицины Медицинского научно-образовательного института МГУ имени М.В. Ломоносова.

**Научный  
руководитель:**

***Панина Ольга Борисовна*** –  
доктор медицинских наук, профессор

**Официальные  
оппоненты:**

***Соснова Елена Алексеевна*** –  
доктор медицинских наук, профессор,  
профессор кафедры акушерства и гинекологии № 1  
Института клинической медицины имени  
Н.В. Склифосовского Первого Московского  
государственного медицинского университета имени  
И.М. Сеченова Министерства здравоохранения  
Российской Федерации

***Паяниди Юлия Геннадьевна*** –  
доктор медицинских наук, профессор,  
ведущий научный сотрудник научно-образовательного  
отдела Московского научно-исследовательского  
онкологического института имени П.А. Герцена  
– филиала Национального медицинского  
исследовательского центра радиологии Министерства  
здравоохранения Российской Федерации

***Давыдов Александр Ильгизирович*** –  
доктор медицинских наук, профессор,  
профессор кафедры акушерства, гинекологии и  
репродуктивной медицины факультета непрерывного  
медицинского образования Медицинского института  
Российского университета дружбы народов  
имени Патриса Лумумбы

Защита диссертации состоится «24» декабря 2025 г. в 14 часов 00 минут на заседании диссертационного совета МГУ.031.2 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ломоносовский пр-т, д. 27, к. 10, учебный корпус Медицинского научно-образовательного института, 3 этаж, конференц-зал.

E-mail: [dissovet.msu@mail.ru](mailto:dissovet.msu@mail.ru)

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на портале: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/3721>

Автореферат разослан «\_\_» ноября 2025 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета МГУ.031.2,  
кандидат медицинских наук, доцент



Н.М. Гайфуллин

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования.** Рак шейки матки (РШМ) остаётся одним из наиболее значимых злокачественных новообразований у женщин. По данным Всемирной организации здравоохранения, ежегодно в мире регистрируется более 600 000 новых случаев РШМ, а число смертельных исходов превышает 340 000 [1]. В Российской Федерации ежегодно выявляется свыше 17 000 случаев РШМ, при этом более 6 000 женщин умирают от данного заболевания [2]. Несмотря на развитие методов скрининга и улучшение диагностических подходов, показатели заболеваемости остаются стабильно высокими [3].

Основным этиологическим фактором развития цервикальной интраэпителиальной неоплазии (ЦИН) и РШМ является персистирующая инфекция, вызванная вирусом папилломы человека (ВПЧ) высокого онкогенного риска [4]. Однако лишь у части инфицированных женщин ВПЧ-инфекция приобретает персистирующий характер и приводит к прогрессированию неопластического процесса [5].

В рамках федеральной программы скрининга РШМ в России применяется цитологическое исследование в сочетании с ВПЧ-тестированием. Однако цитология характеризуется ограниченной чувствительностью и высокой вариабельностью результатов [6], а ВПЧ-тесты обладают высокой чувствительностью при низкой специфичности, что увеличивает число необоснованных кольпоскопий и биопсий [7]. В связи с этим актуальна разработка дополнительных молекулярных маркеров, позволяющих повысить эффективность вторичной диагностики ЦИН высокой степени (ЦИН 2+) у ВПЧ-положительных женщин.

Среди перспективных подходов рассматриваются эпигенетические изменения, в частности метилирование ДНК в промоторных областях генов-супрессоров опухолевого роста [8]. Наибольшее внимание уделяется генам *CADMI*, *MAL* и *PAX1*, гиперметилирование которых ассоциировано с ЦИН 2+ и РШМ [9,10]. Международные исследования подтверждают диагностическую

значимость определения метилирования этих генов у ВПЧ-положительных пациенток [11–13].

Использование цифровой капельной ПЦР (цк-ПЦР) расширяет возможности точного определения уровня метилирования и может иметь значительное значение в оптимизации диагностических алгоритмов. В отечественных исследованиях цк-ПЦР для анализа метилирования *CADMI*, *MAL* и *PAXI* ранее не применялась [14], что подчёркивает необходимость проведения настоящего исследования.

Проведение исследования метилирования генов *CADMI*, *MAL* и *PAXI* методом цк-ПЦР у женщин с ВПЧ высокого онкогенного риска является обоснованным и своевременным шагом для повышения точности диагностики ЦИН 2+ и совершенствования существующих алгоритмов ведения пациенток.

**Степень разработанности темы исследования.** Ряд зарубежных исследований продемонстрировал диагностическую и прогностическую значимость анализа метилирования генов *CADMI*, *MAL* и *PAXI* при ВПЧ-ассоциированных поражениях шейки матки [14,15,16]. В последние годы в России появляются отдельные публикации, посвящённые роли метилирования в патогенезе цервикальных неоплазий и возможностям применения молекулярных методов диагностики [17]. Однако комплексные исследования, направленные на оценку клинической значимости метилирования генов *CADMI*, *MAL* и *PAXI* с использованием высокочувствительных технологий, таких как цк-ПЦР, в отечественной литературе отсутствуют.

**Цель исследования** – определить диагностическую ценность клиничко-анамнестических данных, вирусной нагрузки и метилирования генов *CADMI*, *MAL* и *PAXI* у женщин с цервикальными интраэпителиальными неоплазиями высокой степени и раком шейки матки, ассоциированными с ВПЧ высокого онкогенного риска.

Задачи исследования:

1. Определить клиничко-эпидемиологические и репродуктивные факторы, ассоциированные с развитием ЦИН и РШМ у женщин с инфекцией ВПЧ

высокого онкогенного риска, а также с уровнем метилирования генов *CADMI*, *MAL* и *PAXI*.

2. Оценить взаимосвязь наличия ВПЧ и уровня вирусной нагрузки с морфологическими изменениями шейки матки различной степени тяжести.

3. Установить ассоциации степени метилирования генов *CADMI*, *MAL* и *PAXI* с морфологическими характеристиками поражений шейки матки.

4. Определить диагностическую ценность метилирования генов *CADMI*, *MAL* и *PAXI* в отношении выявления ЦИН 2+ и РШМ для повышения эффективности алгоритмов вторичной диагностики у ВПЧ-положительных женщин.

**Объектом исследования** являются цервикальные интраэпителиальные неоплазии и рак шейки матки у женщин с инфекцией вируса папилломы человека высокого онкогенного риска.

**Научная новизна исследования.** Впервые в отечественной практике проведена комплексная оценка прогностической ценности метилирования генов *CADMI*, *MAL* и *PAXI*, определяемого методом цк-ПЦР, для вторичной диагностики ЦИН у женщин с ВПЧ высокого онкогенного риска.

Впервые продемонстрирована возможность применения метода цк-ПЦР для количественной оценки уровня метилирования в клинических образцах шейки матки. Показано, что использование цк-ПЦР обеспечивает высокую чувствительность и воспроизводимость результатов, превосходящие показатели real-time ПЦР.

Впервые установлены ассоциации гиперметилирования генов *CADMI*, *MAL* и *PAXI* с наличием ЦИН 2+ и РШМ у ВПЧ-положительных женщин. Полученные данные подтверждают клиническую значимость указанных эпигенетических маркеров как дополнительных диагностических инструментов в скрининге РШМ.

Впервые построена многофакторная модель, интегрирующая показатели метилирования и клинико-эпидемиологические факторы. Показано, что включение метилирования генов *CADMI*, *MAL* и *PAXI* в диагностический

алгоритм позволяет повысить точность стратификации риска ЦИН 2+ и РШМ по сравнению с использованием только ВПЧ-тестирования.

Результаты исследования расширяют представления о механизмах прогрессирования ЦИН и открывают перспективы внедрения молекулярных эпигенетических маркеров в клинические рекомендации по ведению женщин с ВПЧ высокого онкогенного риска.

**Теоретическая значимость работы** определяется комплексным анализом эпигенетических механизмов прогрессирования ЦИН и РШМ. Представленные данные углубляют современные представления о роли метилирования генов-супрессоров опухолевого роста *CADMI*, *MAL* и *PAXI* в патогенезе ВПЧ-ассоциированных поражений. Установленные закономерности соотношения метилирования отдельных генов и их комбинаций формируют научную основу для дальнейшего развития концепции панельного подхода к эпигенетической диагностике и стратификации риска ЦИН и РШМ.

**Практическая значимость работы** состоит в возможности применения полученных результатов для совершенствования диагностики ЦИН и РШМ у женщин с ВПЧ высокого онкогенного риска. Несмотря на широкое использование цитологического исследования и ВПЧ-тестирования в качестве основных методов скрининга, их ограниченная чувствительность и специфичность нередко приводят к избыточным числу кольпоскопий и биопсий. Метод цк-ПЦР показал высокую чувствительность и воспроизводимость при определении уровня метилирования генов *CADMI*, *MAL* и *PAXI* в клинических образцах шейки матки. Наибольшую диагностическую ценность для выявления ЦИН 2+ и РШМ продемонстрировали гены *CADMI* и *MAL*, что подтверждает эффективность их использования в составе эпигенетической панели. Применение данного подхода позволяет повысить специфичность вторичной диагностики и снизить частоту необоснованных инвазивных процедур, а внедрение разработанного алгоритма способствует снижению заболеваемости и смертности от РШМ, а также повышению качества оказания специализированной гинекологической помощи.

**Методология и методы исследования.** Методология диссертационного исследования основана на анализе современных литературных данных, формулировке цели и задач, а также клинико-молекулярной оценке выдвинутых гипотез.

Выборка формировалась из женщин, последовательно проходивших плановый профилактический осмотр в поликлинике и находившихся под наблюдением в отделении онкогинекологии МНОИ в период с января 2022 г. по октябрь 2023 г. и подписавших добровольное информированное согласие на участие в исследовании. Исследование проведено с соблюдением этических принципов и действующих нормативных требований, одобрено Локальным этическим комитетом Медицинского научно-образовательного центра МГУ имени М. В. Ломоносова 24 января 2022 г. (протокол № 01/22).

В исследование включена 121 женщина, проходившая профилактический гинекологический осмотр и наблюдение в отделении онкогинекологии. На первом этапе проводился сбор анамнестических и клинических данных, гинекологический осмотр и жидкостная цитология по системе Bethesda. На втором этапе из общей когорты отобраны 99 женщин для молекулярно-биологического исследования. В работе применялся комплексный клинико-морфологический и молекулярно-биологический подход. Выделение ДНК осуществляли с использованием набора PROBA-NK-PLUS (ООО «ДНК-Технология», Москва, Россия), бисульфитную модификацию - набора BisQuick (Евроген, Москва, Россия). Уровень метилирования генов *CADMI*, *MAL* и *PAXI* определяли методами цк-ПЦР и real-time ПЦР. Для контроля использовали ген *ACTB* и стандартные метилированные и неметилированные образцы (Qiagen GmbH, Hilden, Германия).

**Личный вклад автора.** Автор сформулировал цель и задачи исследования, разработал его дизайн, выполнил поиск и анализ литературы. Диссертант принимал участие в формировании выборки пациенток и сборе биологического материала, провёл статистическую обработку данных, сформулировал выводы и практические рекомендации.

В научных статьях, опубликованных соискателем в соавторстве, его вклад стал основополагающим.

**Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Ряд социально-демографических факторов повышает риск развития ЦИН 2+ у женщин с ВПЧ высокого онкогенного риска. Наибольшее влияние оказывают возраст старше 30 лет, курение, половая жизнь более 10 лет, наличие четырёх и более половых партнёров, отсутствие барьерной контрацепции и более двух беременностей в анамнезе. Выявленные клинико-эпидемиологические факторы отражают их возможное участие в формировании эпигенетических изменений, характеризующихся метилированием промоторных областей генов *CADM1*, *MAL* и *PAX1*, что может способствовать ЦИН.
2. Метилирование гена *CADM1* является независимым предиктором ЦИН 2+ и РШМ, тогда как метилирование генов *MAL* и *PAX1* выполняет вспомогательную роль. Совместная оценка *CADM1* и *MAL* обладает наибольшей диагностической ценностью и может быть использована в алгоритмах вторичной диагностики ВПЧ-ассоциированных поражений для повышения точности отбора женщин на углублённое обследование и снижения числа необоснованных инвазивных вмешательств.

**Степень достоверности и апробация результатов.** Достоверность результатов исследования обеспечена достаточным объемом выборки пациенток, применением современных молекулярно-биологических и клинико-лабораторных методов, а также использованием адекватных статистических подходов с применением пакетов IBM SPSS Statistics 26.0 (IBM, Армонк, Нью-Йорк, США). Различия считались статистически достоверными при значении  $p < 0,05$ . Полученные данные воспроизводимы и статистически обоснованы. Результаты исследования данной работы отражены в выводах и практических рекомендациях и подтверждают положения, выносимые на защиту.

Основные результаты исследования представлены в виде докладов на российских и международных конференциях и конгрессах: на конкурсе молодых ученых XIV Международного Интернет Конгресса (онлайн-формат, 2025),



XXVIII Российском онкологическом конгрессе Российского общества клинической онкологии (Москва, 2024). Апробация диссертационной работы состоялась на заседании сотрудников отдела гинекологии и репродуктивной медицины.

По результатам диссертационного исследования опубликованы 4 печатные работы в соавторстве (общим объемом – 2,51 п.л.), включая 3 статьи (объемом 1,88 п.л.) в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базе ядра Российского индекса научного цитирования "eLibrary Science Index", и 1 статью (объемом 0,63 п.л.) в журнале, входящем в Перечень ВАК.

**Структура и объем диссертации.** Диссертационная работа включает 13 рисунков и 16 таблиц и состоит из введения, обзора литературы, главы с описанием материалов и методов исследования, главы с описанием полученных результатов, обсуждением полученных результатов, заключения, практических рекомендаций и библиографии, а также приложения. Библиография включает 139 наименований, в том числе 40 отечественных, 99 зарубежных публикаций.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Материалы и методы исследования

#### Характеристика обследуемых.

##### Критерии включения:

женщины в возрасте от 21 до 65 лет, проходившие профилактический гинекологический осмотр или находившиеся под наблюдением в отделении онкогинекологии МНОИ в 2022–2023 гг. и подписавшие добровольное информированное согласие на участие в исследовании, включая проведение молекулярно-биологического анализа цервикального материала.

##### Критерии исключения:

предшествующее хирургическое лечение по поводу ЦИН 2+ или РШМ; наличие активного воспалительного процесса шейки матки или цервикального канала на момент обследования; беременность на момент включения; отказ от участия; невозможность получения интерпретируемого результата при молекулярном анализе.

Всего в исследование была включена 121 женщина. Первая группа включала женщин с цитологическим заключением *negative for intraepithelial lesion or malignancy* - NILM (n=66), во вторую группу были включены пациентки с *low-grade squamous intraepithelial lesions* - LSIL (n=27), третью группу составили пациентки с *high-grade squamous intraepithelial lesions* - HSIL (n=28). На первом этапе исследования был проведён сбор клинико-анамнестических данных с целью описания особенностей включённых в исследование пациенток. Результаты структурированы по сформированным диагностическим группам и представлены в виде таблиц и диаграмм.

Во второй этап исследования с проведением молекулярно-биологического анализа метилирования генов *CADMI*, *MAL* и *PAX1* включено 99 пациенток из общей выборки. Контрольную группу составили 26 ВПЧ-негативных женщин с нормальной цитологической картиной. Среди ВПЧ-положительных пациенток (n=73) выделены четыре группы в зависимости от морфологических характеристик: NILM (n=34), LSIL (n=15), HSIL (n=22) и рак шейки матки (n=12).

**Методы исследования.** Лабораторная часть исследования выполнена в отделе лабораторной диагностики МНОИ. В качестве биоматериала использовали цервикальные мазки, транспортированные в жидкую среду. Выделение ДНК проводили с использованием коммерческого набора, с последующим хранением при  $-80^{\circ}\text{C}$ . Бисульфитную модификацию ДНК осуществляли с контролем полноты конверсии по гену АСТВ.

Выявление и типирование ВПЧ выполняли тест-системой HPV Quant-21 (DNA-Technology), охватывающей 19 генотипов высокого онкогенного риска (ВПЧ 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 70, 73, 82). Уровни метилирования промоторных областей генов *CADMI*, *MAL* и *PAXI* определяли методами real-time ПЦР и цк-ПЦР с использованием платформы QX200 AutoDG ddPCR (Bio-Rad). Ген АСТВ использовали в качестве внутреннего контроля и для нормализации данных. Качество анализа обеспечивалось использованием метилированных/неметилированных стандартов и контролем воспроизводимости.

Предел определения метилирования составлял  $\sim 10\text{-}15\%$  для real-time ПЦР и менее  $1\%$  для цк-ПЦР, что обеспечивало высокую аналитическую чувствительность при низкой концентрации ДНК.

**Методы статистического анализа.** Анализ данных проводили с использованием IBM SPSS Statistics 26.0. Оценивали распределение данных (критерий Шапиро–Уилка). Для сравнения количественных показателей использовали критерий Манна–Уитни или Вилкоксона; для категориальных переменных -  $\chi^2$ -Пирсона или точный критерий Фишера. Статистически значимым считали значение  $p < 0,05$ .

Для оценки влияния факторов риска на наличие ЦИН 2+ применяли однофакторный и многофакторный логистический регрессионный анализ (stepwise метод), с расчётом отношения шансов (OR) и 95% доверительных интервалов. Диагностическая значимость маркёров метилирования оценивалась методом ROC-анализа с определением площади под кривой (AUC) и оптимальных пороговых значений по индексу Юдена.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Факторы риска развития цервикальных неоплазий по данным клинико-эпидемиологического анализа.** Анализ клинико-эпидемиологических характеристик продемонстрировал достоверные ассоциации ряда факторов риска с развитием цервикальных неоплазий. К числу значимых факторов относились: возраст старше 30 лет, курение, длительность половой жизни более 10 лет, большое число половых партнёров (>4), отсутствие использования барьерных методов контрацепции, три и более беременностей в анамнезе (Таблица 1).

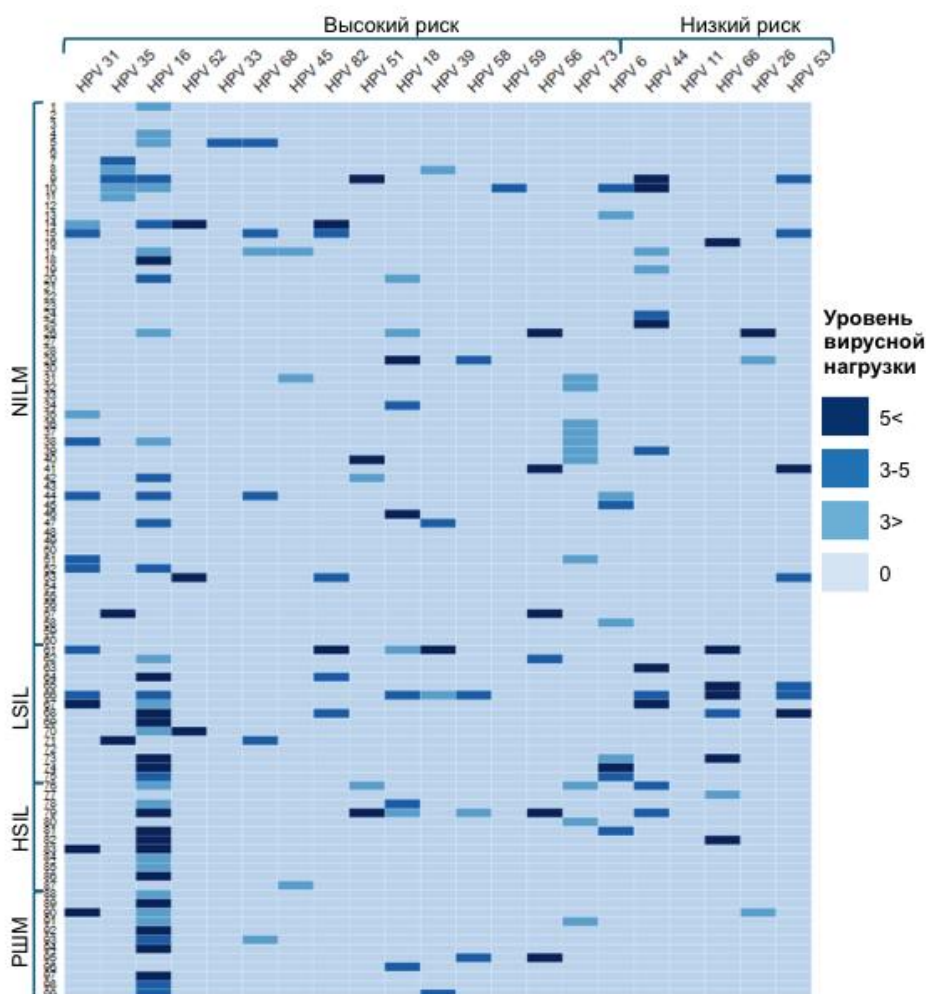
**Таблица 1**

### Факторы риска развития ЦИН 2+ (ОШ и 95% ДИ)

| Факторы риска<br>ЦИН 2+                    | 2 группа LSIL |              | 3 группа HSIL |              |
|--|---------------|--------------|---------------|--------------|
|  | n=27          |              | n=28          |              |
|  | ОШ            | 95% ДИ       | ОШ            | 95% ДИ       |
| Возраст >30 лет                            | 0,902         | 0,340-2,392  | 5,357         | 2,031-14,130 |
| Курение                                    | 2,538         | 0,816-7,891  | 3,434         | 1,161-10,155 |
| Продолжительность<br>половой жизни >10 лет | 0,750         | 0,275-2,048  | 9,857         | 3,291-29,527 |
| >4 половых партнера                        | 2,071         | 0,643-6,676  | 6,283         | 2,203-17,918 |
| Контрацепция ППА                           | 1,833         | 0,716-4,691  | 4,121         | 1,623-10,466 |
| >2 беременностей                           | 3,652         | 0,759-17,577 | 7,000         | 1,659-29,541 |

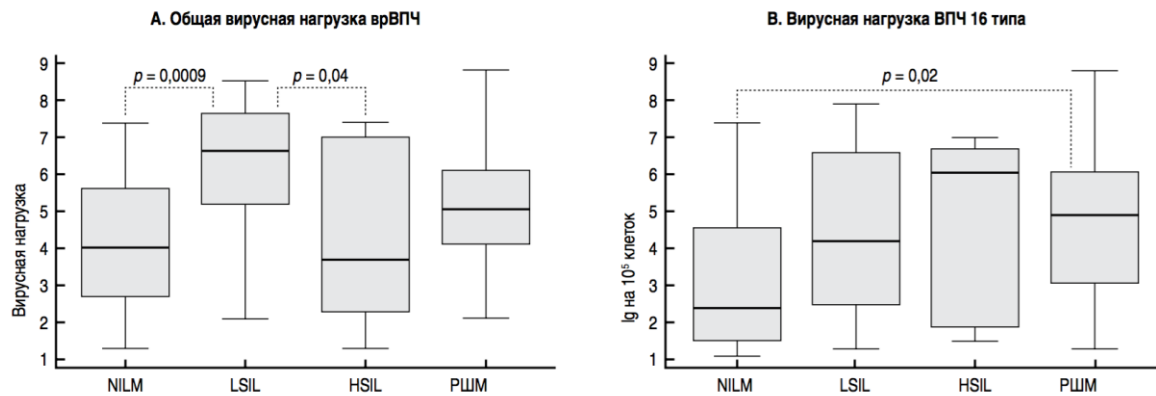
**Анализ распределения типов вируса папилломы человека и уровня вирусной нагрузки у обследованных женщин.** Анализ носительства различных типов ВПЧ и соответствующего уровня вирусной нагрузки у обследованных пациенток показал, что наиболее часто выявлялись ВПЧ 16, 18, 31 и 73, при этом у 57,7% женщин отмечалось инфицирование несколькими типами одновременно. На тепловой карте (Рисунок 1) представлено

носительство различных типов ВПЧ и уровень вирусной нагрузки у всех обследованных пациенток.



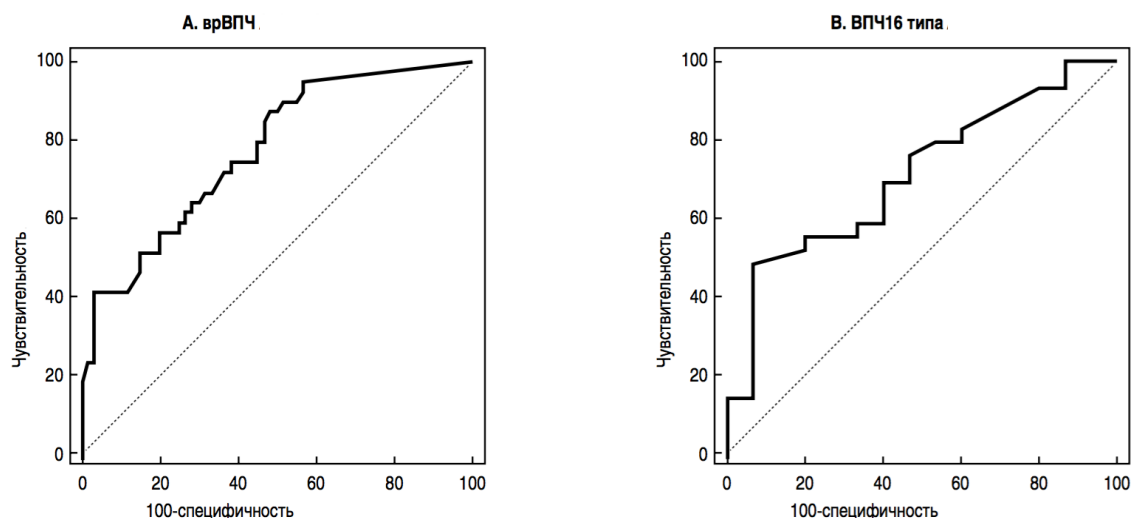
**Рисунок 1.** Вирусная нагрузка ВПЧ у пациенток с NILM, LSIL, HSIL, PШМ (тепловая карта).

Анализ вирусной нагрузки показал, что при сравнении между группами NILM, LSIL, HSIL и PШМ статистически значимых различий выявлено не было. Вместе с тем при попарном сопоставлении установлено, что общий уровень вирусной нагрузки был достоверно выше у пациенток с LSIL по сравнению с NILM, тогда как при HSIL он оказался ниже, чем при LSIL. Для ВПЧ 16 уровень вирусной нагрузки был существенно выше у женщин с PШМ по сравнению с другими группами (Рисунок 2).



**Рисунок 2.** Вирусная нагрузка ВПЧ ( $\lg 10^5$  копий/клетку) у пациенток с NILM, LSIL, HSIL, РШМ (А - данные для ВПЧ в целом, В - для ВПЧ 16 типа).

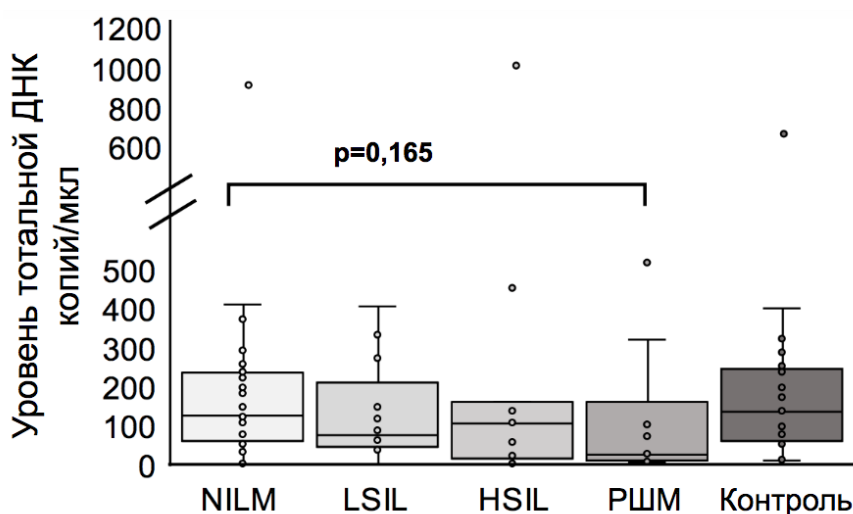
Высокая вирусная нагрузка (более 5  $\lg$  на  $10^5$  клеток) определялась у 20% пациенток с NILM и лишь у 3% - на уровне более 7  $\lg$ . В группе LSIL высокая вирусная нагрузка встречалась в 67% случаев, тогда как у пациенток с HSIL и РШМ - в 42%. В возрастной группе до 30 лет она чаще наблюдалась при LSIL, тогда как у женщин старше 30 лет - при HSIL и РШМ. Анализ ROC-кривых продемонстрировал, что прогностическая значимость общей вирусной нагрузки ВПЧ для выявления LSIL/HSIL/РШМ составила  $AUC=0,77$  (95% ДИ: 0,67–0,85), а вирусной нагрузки ВПЧ 16 типа -  $AUC=0,71$  (95% ДИ: 0,55–0,84) (Рисунок 3).



**Рисунок 3.** Оценка прогностической значимости вирусной нагрузки при заболеваниях шейки матки (А - совокупные данные по ВПЧ высокого онкогенного риска; Б - данные по ВПЧ 16 типа).

**Анализ уровней метилирования генов *CADMI*, *MAL* и *PAX1* в цервикальном материале у женщин с различной степенью поражения**

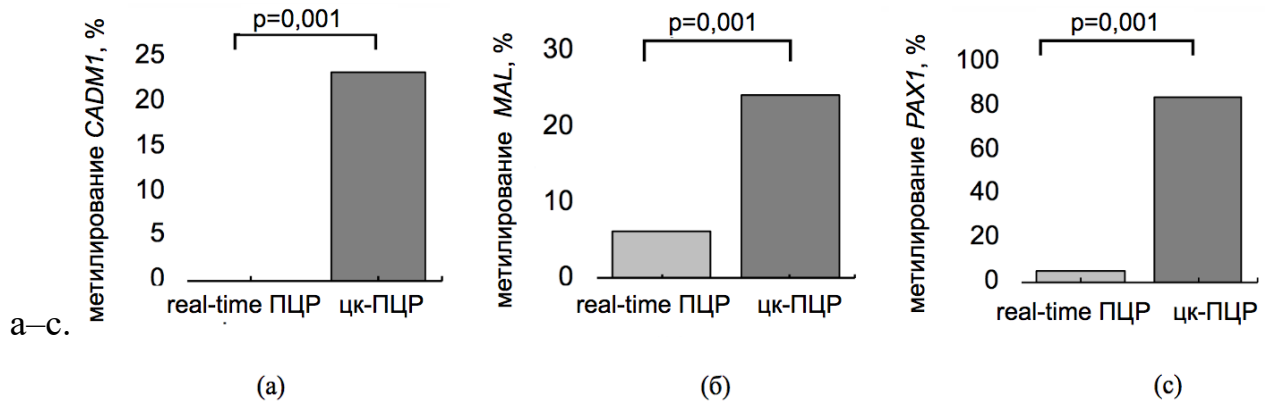
**шейки матки.** В рамках молекулярно-биологического этапа исследования была проведена сравнительная оценка эффективности двух методов количественного анализа метилирования промоторных областей генов *CADM1*, *MAL* и *PAX1* в цервикальном материале: цк-ПЦР и real-time ПЦР. Для оценки исходного уровня ДНК в реакционной смеси использовался количественный анализ копий гена  $\beta$ -актина (*ACTB*). В совокупности уровень общего ДНК, измеренный как число копий *ACTB* на мкл, варьировал от 0,31 до 1009,93 копий/мкл, медианное значение составило 165,99 копий/мкл. Сравнение общего количества ДНК между группами NILM, LSIL, HSIL и РШМ не выявило статистически значимых различий ( $p>0,05$ ), что указывает на сопоставимость качества и концентрации образцов для молекулярного анализа (Рисунок 4).



**Рисунок 4.** Уровень общей ДНК в образцах цервикальных мазков у пациенток контрольной группы и групп NILM, LSIL, HSIL и РШМ. Оценка проведена по неметилированному фрагменту гена *ACTB* методом цк-ПЦР (тест Крускала-Уоллиса).

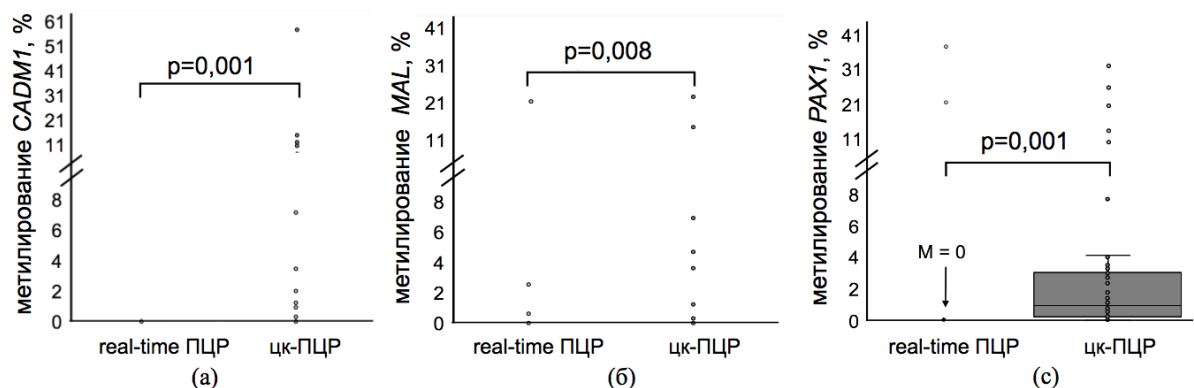
Сравнительный анализ частоты выявления метилирования показал достоверное преимущество цк-ПЦР по всем исследуемым генам. Так, метилирование гена *CADM1* было выявлено у 22,2% пациенток методом цк-ПЦР, тогда как с помощью real-time ПЦР - ни в одном случае (0,0%;  $p=0,001$ ). Аналогично, для гена *MAL* частота метилирования составила 11,1% по цк-ПЦР против 5,6% по real-time ПЦР ( $p=0,001$ ). По гену *PAX1* цк-ПЦР зафиксировал

метилование в 77,8% образцов, тогда как real-time ПЦР вновь не выявил ни одного случая (0,0%;  $p=0,001$ ). Полученные данные представлены на рисунке 5



**Рисунок 5.** Сравнение частоты метилирования генов *CADM1* (а), *MAL* (б) и *PAX1* (с) с использованием методов real-time ПЦР и цк-ПЦР.

Более того, при сравнении методов цк-ПЦР и real-time ПЦР уровни метилирования по всем исследуемым генам (*CADM1*, *MAL*, *PAX1*) оказались достоверно выше при использовании цк-ПЦР (Рисунок 6 а–с), что подтверждает более высокую чувствительность метода при количественном определении метилированной ДНК. Тест Мак-Немара подтвердил статистически значимые различия между методами: для *CADM1* и *PAX1*  $p=0,001$ ; для *MAL* -  $p=0,008$ .



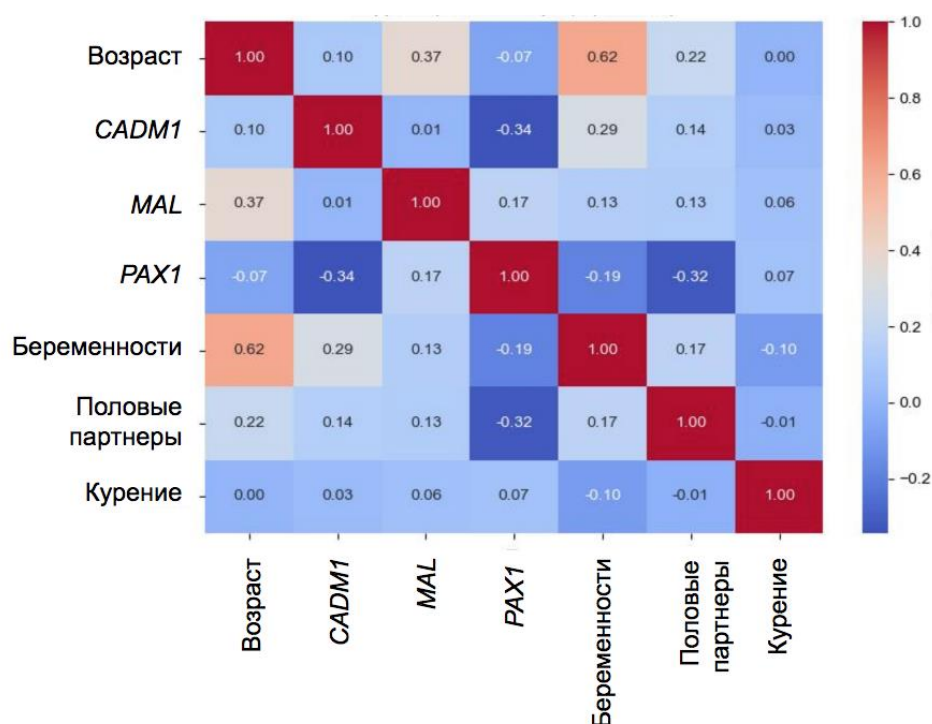
**Рисунок 6.** Сравнение уровней метилирования генов, выполненное с помощью методов real-time ПЦР и цк-ПЦР: (а) метилирование *CADM1*; (б) метилирование *MAL*; (с) метилирование *PAX1*.

С целью оценки взаимосвязи между уровнями метилирования генов *CADM1*, *MAL* и *PAX1* и клинико-демографическими характеристиками пациенток был проведён корреляционный и многофакторный анализ (Рисунок 7). В модель включались показатели возраста, количества беременностей и



родов, числа половых партнёров, наличия курения, использования барьерной контрацепции, а также вирусной нагрузки ВПЧ высокого онкогенного риска, в том числе ВПЧ 16 типа. Анализ показал отсутствие статистически значимой связи между метилированием исследуемых генов и репродуктивно-поведенческими факторами или уровнем вирусной нагрузки. Независимым предиктором наличия ЦИН 2+ и РШМ оказалось только метилирование гена *CADMI*, тогда как *MAL* и *PAX1* не сохранили значимости в многофакторной модели.

Эти результаты указывают на то, что метилирование *CADMI* является самостоятельным звеном патогенеза цервикальных неоплазий и может рассматриваться как независимый диагностический маркер.

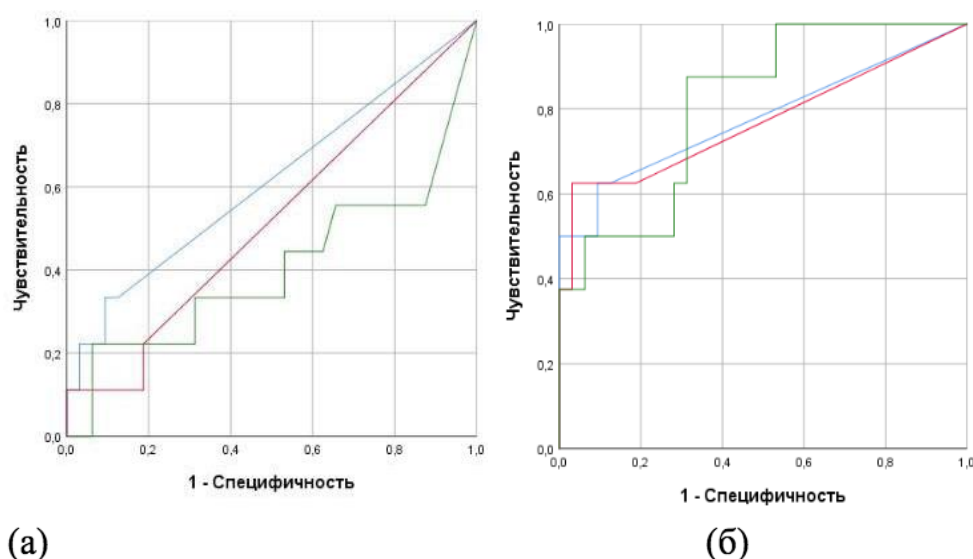


**Рисунок 7.** Цветовая матрица корреляций между уровнями метилирования генов и клиническими параметрами.

Анализ метилирования показал, что *CADI* был метилирован у 50% пациенток с ЦИН 2+ и РШМ; *MAL* - у 62,5%; *PAX1* - у 87,5%. В контрольной группе и у большинства женщин с NILM частота метилирования была минимальной, что подтверждает специфичность изменений для предраковых и злокачественных процессов. Сравнение уровней метилирования генов *CADI*,

*MAL* и *PAX1* между диагностическими группами (NILM, LSIL, HSIL, РШМ) показало наличие статистически значимых различий. По критерию Краскела–Уоллиса установлены достоверные различия: для *CADM1* ( $p<0,001$ ), *MAL* ( $p<0,001$ ) и *PAX1* ( $p=0,010$ ). При попарном сравнении выявлено, что уровень метилирования *CADM1* в группе рака был выше, чем в группах NILM ( $p=0,042$ ), LSIL ( $p=0,010$ ) и HSIL ( $p<0,001$ ). Для *MAL* аналогично зафиксировано достоверное повышение в группе рака по сравнению с NILM ( $p=0,049$ ), LSIL ( $p=0,006$ ) и HSIL ( $p=0,010$ ). Уровень метилирования *PAX1* также был выше у пациенток с раком шейки матки, чем у женщин с NILM ( $p=0,003$ ), LSIL ( $p=0,003$ ) и HSIL ( $p=0,015$ ). Статистически значимых различий между группами NILM, LSIL и HSIL по всем исследуемым генам выявлено не было.

Определение метилирования генов *CADM1*, *MAL* и *PAX1* методом цк-ПЦР показало различную диагностическую ценность для выявления ЦИН 2+ и РШМ. Для ЦИН 2+ (HSIL и РШМ) значения площади под ROC-кривой (AUC) составили: *CADM1* - 0,671; *MAL* - 0,643; *PAX1* - 0,610 (Рисунок 8, Таблица 3). При анализе только РШМ AUC значительно возрастали и составили: *CADM1* - 0,777; *MAL* - 0,770; *PAX1* - 0,813 (Рисунок 8, Таблица 4). Наибольшая диагностическая точность отмечена при комбинированной оценке метилирования *CADM1* и *MAL* (AUC=0,912), что превосходило показатели каждого маркера по отдельности. Для *CADM1* специфичность составила 100% при чувствительности 50%; для *MAL* - 96,9% и 62,5% соответственно; для *PAX1* - 68,7% и 87,5%.



**Рисунок 8.** Оценка прогностической значимости уровней метилирования *CADM1*, *MAL* и *PAX1*: (а) NILM (ВПЧ+) против HSIL; (б) NILM (ВПЧ+) против РШМ.

**Таблица 3**

**Диагностическая информативность метилирования генов при NILM+LSIL**

|                         | <i>CADM1</i> | <i>MAL</i> | <i>PAX1</i> | <i>CADM1+MAL</i> |
|-------------------------|--------------|------------|-------------|------------------|
| AUC                     | 0,671        | 0,643      | 0,610       | 0,776            |
| Чувствительность, (%)   | 47,1         | 47,2       | 58,8        | 42,9             |
| Специфичность, (%)      | 88,1         | 83,3       | 71,4        | 100              |
| Пороговое значение, (%) | 0,09         | 0,01       | 1,67        | 2,785            |

**и HSIL+РШМ у ВПЧ-положительных женщин**

*Примечание: Пороговое значение представлено в виде доли метилирования в процентах. AUC менее 0,5 статистически не значима. CADM1+MAL – наибольшее значение по одному из двух эпигенетических маркеров; данный параметр был добавлен, потому что давал значительный прирост площади под ROC-кривой.*

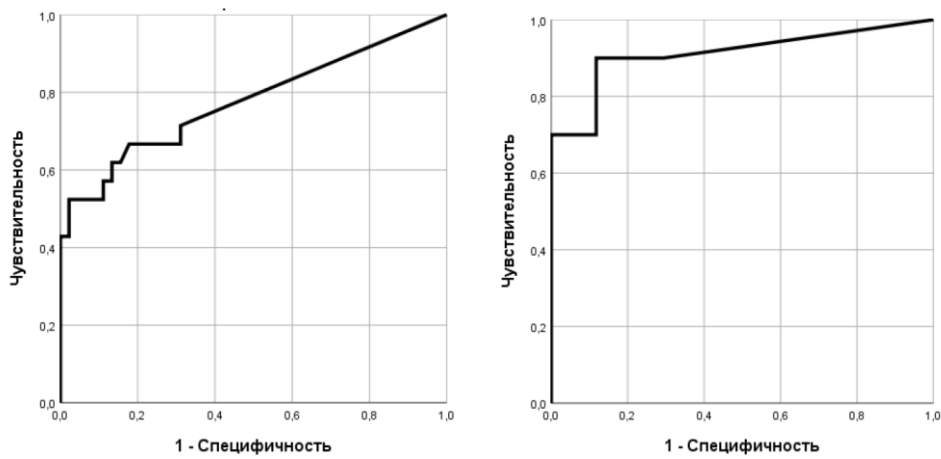
Таблица 4

**Диагностическая информативность метилирования генов при NILM и РШМ у ВПЧ-положительных женщин**

|                         | <i>CADMI</i> | <i>MAL</i> | <i>PAX1</i> | <i>CADMI+MAL</i> |
|-------------------------|--------------|------------|-------------|------------------|
| AUC                     | 0,777        | 0,770      | 0,813       | 0,912            |
| Чувствительность, (%)   | 50           | 62,5       | 87,5        | 70               |
| Специфичность, (%)      | 100          | 96,9       | 68,7        | 100              |
| Пороговое значение, (%) | 4,57         | 0,085      | 1,745       | 2,785            |

*Примечание: Пороговое значение представлено в виде доли метилирования в процентах. AUC менее 0,5 статистически не значима. CADMI+MAL – наибольшее значение по одному из двух эпигенетических маркеров; данный параметр был добавлен, потому что давал значительный прирост площади под ROC-кривой.*

Особый интерес представляет комбинированная оценка метилирования *CADMI* и *MAL*, при которой диагностическая точность значительно возростала. При выявлении ЦИН 2+ значение AUC составило 0,741, а для диагностики РШМ - 0,912, что превышает показатели каждого отдельного маркера (Рисунок 9 а-б). При использовании комбинированного порогового значения (2,785%) была достигнута специфичность 100% при чувствительности 70%, что подчёркивает потенциальную клиническую значимость данного подхода.



(а)

(б)

**Рисунок 9.** ROC-анализ метилирования *CADMI*+*MAL* у ВПЧ-положительных пациенток: (а) NILM (HPV+) + LSIL против HSIL + РШМ. (б) NILM (HPV+) против РШМ.

Таким образом, определение уровня метилирования генов *CADMI*, *MAL* и *PAX1* методом цК-ПЦР у женщин с ВПЧ высокого онкогенного риска позволяет повысить эффективность диагностики ЦИН 2+ и РШМ, снизить количество необоснованных инвазивных процедур и сформировать основу для внедрения эпигенетических маркеров в алгоритмы вторичной диагностики.

## ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ ДАННЫХ

Комплексный анализ клинико-эпидемиологических данных подтвердил значимость традиционных факторов риска цервикальной неоплазии, включая возраст старше 30 лет, курение, длительную половую активность, множественных половых партнёров и отсутствие барьерной контрацепции. Эти данные соответствуют результатам крупных международных и российских исследований, указывающих на влияние социально-демографических и поведенческих факторов на прогрессирование ВПЧ-ассоциированных поражений [18,19]. Учитывая полученные результаты, комплексная оценка факторов риска может рассматриваться как дополнительный инструмент стратификации пациенток для повышения эффективности профилактических и скрининговых программ.

Проведённый анализ ВПЧ-типирования подтвердил ведущую роль генотипов 16 и 18 в цервикальном канцерогенезе, что согласуется с данными международных и российских исследований [20,21]. Установлено, что вирусная нагрузка изменяется в зависимости от степени цервикальных поражений: наиболее высокие значения отмечаются при LSIL, снижаются на стадии HSIL и вновь увеличиваются при РШМ, особенно в случае ВПЧ 16 типа. Прогностическая информативность составила  $AUC=0,77$  для общей вирусной нагрузки и  $AUC=0,71$  для ВПЧ 16 типа. Подобные закономерности отражают известные механизмы прогрессии ВПЧ-инфекции: высокая нагрузка на ранних этапах способствует интеграции вирусного генома, снижению полной вирусной репликации, а последующее повышение на стадии инвазивного рака связано с активной экспрессией онкогенов [22–27].

Метилирование генов *CADMI*, *MAL* статистически значимо ассоциировано с наличием ЦИН 2+ и РШМ, тогда как у пациенток с NILM и LSIL частота метилирования минимальна. Это подтверждает роль эпигенетических изменений как маркёров прогрессии неоплазии, что ранее было показано в зарубежных и отечественных исследованиях [16,28,29].

Сравнительный анализ показал преимущества цк-ПЦР перед традиционной ПЦР: более высокая чувствительность, воспроизводимость и точность количественной оценки метилирования. Полученные данные соответствуют результатам зарубежных работ [30,31], что подтверждает целесообразность внедрения цк-ПЦР в клиническую диагностику ВПЧ-ассоциированных заболеваний шейки матки.

Особое значение имеет проведённый многофакторный логистический анализ, показавший, что метилирование гена *CADMI* является независимым предиктором ЦИН 2+ и РШМ, тогда как *MAL* и *PAXI* сохраняли значимость лишь в однофакторных моделях. Этот результат подтверждает ведущую роль *CADMI* в цервикальном канцерогенезе, что согласуется с данными литературы [9]. Таким образом, *CADMI* может рассматриваться как самостоятельный диагностический маркёр, а *MAL* и *PAXI* - как компоненты комбинированных панелей.

По данным ROC-анализа, наибольшая диагностика достигается при сочетании *CADMI* и *MAL*: AUC=0,912 (чувствительность 70,0%, специфичность 100%). Для отдельных генов значения AUC были ниже (*CADMI* - 0,770; *MAL* - 0,770; *PAXI* - 0,813), что сопоставимо с результатами зарубежных исследований, демонстрирующих преимущество панелей метилированных генов перед одиночными маркёрами [32].

Таким образом, настоящее исследование впервые в отечественной практике показало высокую диагностическую значимость анализа метилирования генов *CADMI*, *MAL* и *PAXI* методом цк-ПЦР. Эти маркёры могут быть использованы в составе алгоритмов вторичной диагностики ВПЧ-ассоциированных поражений для повышения точности отбора на дообследование и снижения числа необоснованных инвазивных вмешательств.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведённое исследование включало комплексный клинико-эпидемиологический и молекулярно-биологический анализ ЦИН и РШМ у женщин с выявленным ВПЧ высокого онкогенного риска. Изучена прогностическая значимость вирусной нагрузки и метилирования генов *CADMI*, *MAL* и *PAX1*, выполнена сравнительная оценка методов количественного определения метилирования (цк-ПЦР и real-time ПЦР). Результаты исследования позволили уточнить взаимосвязь между молекулярными изменениями и степенью поражения эпителия, подтвердив значимость метилирования ДНК как дополнительного диагностического критерия при ВПЧ-ассоциированных заболеваниях шейки матки.

Полученные данные могут быть использованы при совершенствовании алгоритмов вторичной диагностики и разработке подходов к стратификации риска у женщин с выявленным ВПЧ высокого онкогенного риска.

По результатам работы были сформулированы следующие **выводы**:

1. Риск развития ЦИН 2+ у пациенток старше 30 лет повышается в 5,4 раза, у курящих пациенток - в 3,4 раза, у пациенток, ведущих половую жизнь более 10 лет, - в 9,9 раз, у пациенток, имеющих четырех и более половых партнёров, - в 6,3 раза, у пациенток, использующих в качестве контрацепции прерванный половой акт, - в 4,1 раза, у пациенток с ВПЧ-инфекцией - в 4,7 раза, в частности с ВПЧ 16 - в 4,3 раза. Выявлена связь указанных факторов с метилированием гена *CADMI*, отражающая участие эпигенетических механизмов в развитии ЦИН 2+.

2. Показатели вирусной нагрузки ВПЧ демонстрируют различия в зависимости от морфологических изменений: повышение при LSIL по сравнению с NILM, снижение при HSIL по сравнению с LSIL, максимальные значения ВПЧ 16 типа при РШМ; прогностическая информативность составила  $AUC=0,77$  для общей вирусной нагрузки и  $AUC=0,71$  для ВПЧ 16 типа.



3. Метилирование гена *CADMI* является независимым предиктором ЦИН 2+ и РШМ, тогда как *MAL* и *PAX1* сохраняют значимость только в однофакторных моделях и имеют вспомогательную роль.

4. Комбинированная оценка метилирования *CADMI* и *MAL* обеспечивает наибольшую диагностическую эффективность ( $AUC=0,912$ ; чувствительность 70%, специфичность 100%), превосходит показатели отдельных маркеров и обладает практической ценностью для вторичной диагностики ЦИН 2+ и РШМ у ВПЧ-положительных женщин.

По результатам работы были предложены следующие **практические рекомендации:**

1. При обследовании женщин с ВПЧ высокого онкогенного риска учитывать социально-демографические и поведенческие факторы (возраст старше 30 лет, курение, длительная половая жизнь, большое количество половых партнёров, отсутствие барьерной контрацепции, три и более беременности в анамнезе) как дополнительные предикторы риска развития ЦИН и РШМ.
2. Определение уровня метилирования гена *CADMI* возможно использовать в качестве независимого молекулярного маркера выявления ЦИН 2+ у женщин с ВПЧ высокого онкогенного риска; метилирование *MAL* и *PAX1* нецелесообразно рассматривать как вспомогательные диагностические показатели.
3. Комбинированный анализ метилирования генов *CADMI* и *MAL* методом цк-ПЦР включать в алгоритмы вторичной диагностики ЦИН 2+ у ВПЧ-положительных женщин для повышения точности отбора на дообследование и снижения числа необоснованных инвазивных вмешательств.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ АВТОРОМ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Основные результаты, положения и выводы диссертации опубликованы в 4 научных работах автора общим объемом 2,51 п.л. (доля соискателя – 0,36 п.л.).

***Статьи в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базе ядра  
Российского индекса научного цитирования "eLibrary Science Index",  
необходимые для защиты в диссертационном совете МГУ:***

1. Anisimova M. (в соавторстве). Detection of CADM1, MAL, and PAX1 Methylation by ddPCR for Triage of HPV-Positive Cervical Lesions / Anisimova M., Jain M., Shcherbakova L., Aminova L., Bугеренко A., Novitskaya N., Samokhodskaya L., Kokarev V., Inokenteva V., Panina O. // Biomedicines. 2025. Vol. 13, No. 6. Article 1450. (0,94 п.л. / авторский вклад – 0,09 п.л.) SJR – 1,114.

2. Анисимова М.А. (в соавторстве). Метилирование ДНК при цервикальной интраэпителиальной неоплазии и раке шейки матки (обзор) / М.А. Анисимова, Л.Н. Щербакова, О.Б. Панина // Акушерство и гинекология. 2025. № 7. С. 161–166. (0,38 п.л. / авторский вклад – 0,13 п.л.) SJR – 0,155.

3. Анисимова М.А. (в соавторстве). Прогностическое значение вирусной нагрузки ВПЧ высокого онкогенного риска в развитии цервикальной интраэпителиальной неоплазии шейки матки / Л.Н. Щербакова, К.И. Кириллова, П.В. Залепаев, М.А. Анисимова, А.Е. Бугеренко, А.Н. Гайфуллина, М. Джайн, Н.А. Новицкая, Д.С. Огай, Л.М. Самоходская, О.Б. Панина // Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. 2025. Т. 24, № 2. С. 44–52. (0,56 п.л. / авторский вклад – 0,05 п.л.) SJR – 0,222.

***Статьи в изданиях, входящих в Перечень ВАК:***

4. Анисимова М.А. (в соавторстве). Факторы риска развития интраэпителиальных неоплазий шейки матки / М.А. Анисимова, Л.Н. Щербакова, А.Е. Бугеренко, М. Джайн, К.И. Кириллова, Л.М. Самоходская, О.Б. Панина // Архив акушерства и гинекологии им. В. Ф. Снегирёва. 2024. Т. 11, № 4. С. 480–489. (0,63 п.л. / авторский вклад – 0,09 п.л.) ИФ РИНЦ – 0,283.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

AUC - площадь под ROC-кривой

CADM1 - Cell Adhesion Molecule 1

Ct - пороговый цикл

DNA - дезоксирибонуклеиновая кислота

HPV - вирус папилломы человека

HSIL - плоскоклеточная интраэпителиальная неоплазия высокой степени

LSIL - плоскоклеточная интраэпителиальная неоплазия низкой степени

MAL - Myelin and Lymphocyte Protein

NILM - отсутствие интраэпителиальных поражений и признаков злокачественности

PAX1 - Paired Box 1

p - уровень статистической значимости

real-time ПЦР - полимеразная цепная реакция в режиме реального времени (Real-Time Polymerase Chain Reaction)

ROC - характеристическая кривая «чувствительность / специфичность»

SPSS - Statistical Package for the Social Sciences

WHO - Всемирная организация здравоохранения

95 % CI - 95-й доверительный интервал

ДИ (CI) - доверительный интервал (confidence interval)

МНОИ - Медицинский научно-образовательный институт

ОШ (OR) - отношение шансов (odds ratio)

РШМ - рак шейки матки

ФКР - Федеральные клинические рекомендации

ЦИН - цервикальная интраэпителиальная неоплазия

ЦИН 2+ - цервикальная интраэпителиальная неоплазия тяжёлой степени

цк-ПЦР - цифровая капельная полимеразная цепная реакция (Droplet Digital Polymerase Chain Reaction)

$\chi^2$  - критерий хи-квадрат

**СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ:**

1. Ferlay J., Colombet M., Soerjomataram I. et al. Global cancer observatory: cancer today // *CA Cancer Journal for Clinicians*. – 2020. – Т. 70, № 4. – С. 313–336.
2. Bray F., Laversanne M., Sung H. et al. Global cancer statistics 2024: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries // *CA Cancer Journal for Clinicians*. – 2024. – Т. 74, № 3. – С. 229–263.
3. Каприн Д.А., Старинский В.В., Шахзадова А.О. Злокачественные новообразования в России в 2022 году (заболеваемость и смертность). – М.: ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2024. – 260 с.
4. Stanley M. Immunobiology of human papillomavirus infection and vaccination implications // *Nature Reviews Immunology*. – 2012. – Т. 12, № 10. – С. 681–692.
5. Gravitt P.E. The known unknowns of HPV natural history // *Journal of Clinical Investigation*. – 2017. – Т. 127, № 9. – С. 3173–3181.
6. Кулешова Е.М., Семенова Н.В., Сафронова В.М. и др. Современные подходы к вторичной диагностике ВПЧ-ассоциированных поражений шейки матки // *Акушерство и гинекология*. – 2024. – № 4. – С. 52–58.
7. Ronco G., Giorgi-Rossi P., Carozzi F. et al. Efficacy of HPV-based screening for prevention of invasive cervical cancer in randomised European trials // *Lancet*. – 2014. – Т. 383, № 9916. – С. 524–532.
8. Leffers D., Herbst J., Kropidlowski J. et al. Combined liquid biopsy methylation analysis of CADM1 and MAL in cervical cancer patients // *Cancers*. – 2022. – Т. 14, № 16. – С. 3954–3962.
9. De Strooper L.M.A., Hesselink A.T., Berkhof J. et al. Combined CADM1/MAL methylation and cytology testing for colposcopy triage of high-risk HPV-positive women // *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. – 2014. – Т. 23, № 9. – С. 1933–1937.
10. Luttmer R., Meijer C.J., Snijders P.J. et al. CADM1, MAL and miR124-2 methylation in cervical scrapes as a triage tool for high-risk HPV-positive women // *Clinical Cancer Research*. – 2016. – Т. 22, № 4. – С. 888–896.

11. Molano M., Vallely A., Tabrizi S. et al. Performance of CADM1, MAL and miR124-2 methylation as triage markers for early detection of cervical cancer in self-collected and clinician-collected samples in Papua New Guinea // *BMJ Open*. – 2024. – Т. 14. – С. e081282.
12. Yang R., Li Z., Chen Y. et al. DNA methylation profiling for cervical intraepithelial neoplasia detection using ddPCR // *BMC Cancer*. – 2023. – Т. 23, № 1. – С. 112–120.
13. Miotke L., Nassif N.A., Wang K. et al. Highly sensitive quantification of DNA molecules using droplet digital PCR // *Nucleic Acids Research*. – 2014. – Т. 42, № 11. – С. e123.
14. Naegele S., Ruiz-Torres D.A., Zhao Y. et al. Comparing diagnostic performance of qPCR, ddPCR and NGS liquid biopsies for HPV-associated cancers // *Journal of Molecular Diagnostics*. – 2024. – Т. 26, № 2. – С. 179–190.
15. Wentzensen N., Sherman M.E., Schiffman M., Wang S.S. et al. Utility of methylation markers in cervical cancer early detection // *Gynecologic Oncology*. – 2009. – Т. 112, № 2. – С. 293–299.
16. Overmeer R.M., Henken F.E., Snijders P.J. et al. Combined CADM1 and MAL promoter methylation analysis in cervical lesions // *International Journal of Cancer*. – 2011. – Т. 129, № 9. – С. 2218–2225.
17. Зыбина Е.Н., Фролова О.Г. Диагностическая ценность молекулярных маркеров при предраковых заболеваниях шейки матки // *Акушерство и гинекология*. – 2021. – № 10. – С. 84–90.
18. Vaccarella S., Franceschi S., Herrero R. et al. Smoking and HPV infection: pooled analysis of the IARC HPV prevalence surveys // *Vaccine*. – 2006. – Т. 24, № 1. – С. 11–23.
19. Шахова О.В., Кириллова И.В., Муратова Л.М. и др. Современные представления о патогенезе ВПЧ-ассоциированных неоплазий шейки матки // *Акушерство и гинекология*. – 2021. – № 7. – С. 45–50.

20. Walboomers J.M., Jacobs M.V., Manos M.M. et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide // *Journal of Pathology*. – 1999. – Т. 189, № 1. – С. 12–19.
21. Arbyn M., Snijders P.J.F., Meijer C.J.L.M. et al. Detecting cervical precancer and reaching underscreened women by using HPV testing on self samples: updated meta-analyses // *BMJ*. – 2020. – Т. 370. – С. m3495.
22. Oyervides-Muñoz M.A., Pérez-Maya A.A., Rodríguez-Gutiérrez H.F. et al. Understanding the epigenetic mechanism of HPV-associated carcinogenesis: a review // *Frontiers in Oncology*. – 2020. – Т. 10. – С. 616.
23. Ибрагимова М.К., Кривонос О.В., Григорьева Е.В. и др. Метилирование генов-супрессоров опухолевого роста при цервикальной интраэпителиальной неоплазии // *Онкоцитология*. – 2016. – № 1. – С. 12–18.
24. Khouadri S., Castelnau C., Chelbi S. et al. Detection of human papillomavirus DNA by PCR in Tunisian women with cervical lesions // *Pathologie Biologie*. – 2007. – Т. 55, № 8–9. – С. 480–485.
25. Cricca M., Venturoli S., Leo E. et al. Viral DNA methylation and integration in high-grade cervical lesions // *Virology Journal*. – 2007. – Т. 4. – С. 116.
26. Long W., Cai H., Kuang R. et al. CADM1, MAL and miR-124-2 methylation in cervical cancer: correlation with clinicopathologic features // *Journal of Cancer*. – 2018. – Т. 9, № 21. – С. 3872–3879.
27. Sundström K., Ploner A., Dahlström L.A. et al. Prospective study of HPV DNA methylation and risk of cervical intraepithelial neoplasia // *International Journal of Cancer*. – 2013. – Т. 132, № 4. – С. 879–889.
28. Steenbergen R.D.M., Snijders P.J.F., Heideman D.A.M., Meijer C.J.L.M. Clinical implications of (epi)genetic changes in HPV-induced cervical precancerous lesions // *Nature Reviews Cancer*. – 2014. – Т. 14, № 6. – С. 395–405.
29. Сафронова В.М., Кулешова Е.М., Семёнова Н.В. и др. Роль эпигенетических изменений при ВПЧ-ассоциированных заболеваниях шейки матки // *Акушерство и гинекология*. – 2022. – № 12. – С. 88–93.

30. Hindson B.J., Ness K.D., Masquelier D.A. et al. High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number // *Analytical Chemistry*. – 2011. – T. 83, № 22. – C. 8604–8610.
31. Milbury C.A., Zhong Q., Lin J. et al. Determining lower limits of detection of digital PCR assays for cancer-related gene mutations // *Clinical Chemistry*. – 2014. – T. 60, № 9. – C. 1192–1201.
32. Verhoef V.M., Bosgraaf R.P., van Kemenade F.J. et al. Triage strategies for HPV-positive women in primary HPV-based cervical screening // *International Journal of Cancer*. – 2014. – T. 136, № 1. – C. 119–128.