

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Анисимова Мария Андреевна

**Цервикальная интраэпителиальная неоплазия и рак шейки матки
у женщин с выявлением 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

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 *CADM1*, *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 *CADM1*, *MAL* и *PAX1* ранее не применялась [14], что подчёркивает необходимость проведения настоящего исследования.

Проведение исследования метилирования генов *CADM1*, *MAL* и *PAX1* 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 *CADM1*, *MAL* и *PAX1* 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 *CADM1*, *MAL* и *PAX1* с использованием высокочувствительных технологий, таких как цк-ПЦР, в отечественной литературе отсутствуют.

Цель исследования – определить диагностическую ценность клинико-анамнестических данных, вирусной нагрузки и метилирования генов *CADM1*, *MAL* и *PAX1* у женщин с цервикальными интрапителиальными неоплазиями высокой степени и раком шейки матки, ассоциированными с ВПЧ высокого онкогенного риска.

Задачи исследования:

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

высокого онкогенного риска, а также с уровнем метилирования генов *CADM1*, *MAL* и *PAX1*.

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

3. Установить ассоциации степени метилирования генов *CADM1*, *MAL* и *PAX1* с морфологическими характеристиками поражений шейки матки.

4. Определить диагностическую ценность метилирования генов *CADM1*, *MAL* и *PAX1* в отношении выявления ЦИН 2+ и РШМ для повышения эффективности алгоритмов вторичной диагностики у ВПЧ-положительных женщин.

Объектом исследования являются цервикальные интрапителиальные 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 *CADM1*, *MAL* и *PAX1*, 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 *CADM1*, *MAL* и *PAX1* 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 *CADM1*, *MAL* и *PAX1* 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 *CADM1*, *MAL* и *PAX1* 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 *CADM1*, *MAL* и *PAX1* в клинических образцах шейки матки. Наибольшую диагностическую ценность для выявления ЦИН 2+ и РШМ продемонстрировали гены *CADM1* 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 *CADM1*, *MAL* и *PAX1* 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 наименование, 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 *CADM1*, *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 °С. 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 *CADM1*, *MAL* и *PAX1* 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 ~10-15 % 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 - χ^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 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 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.

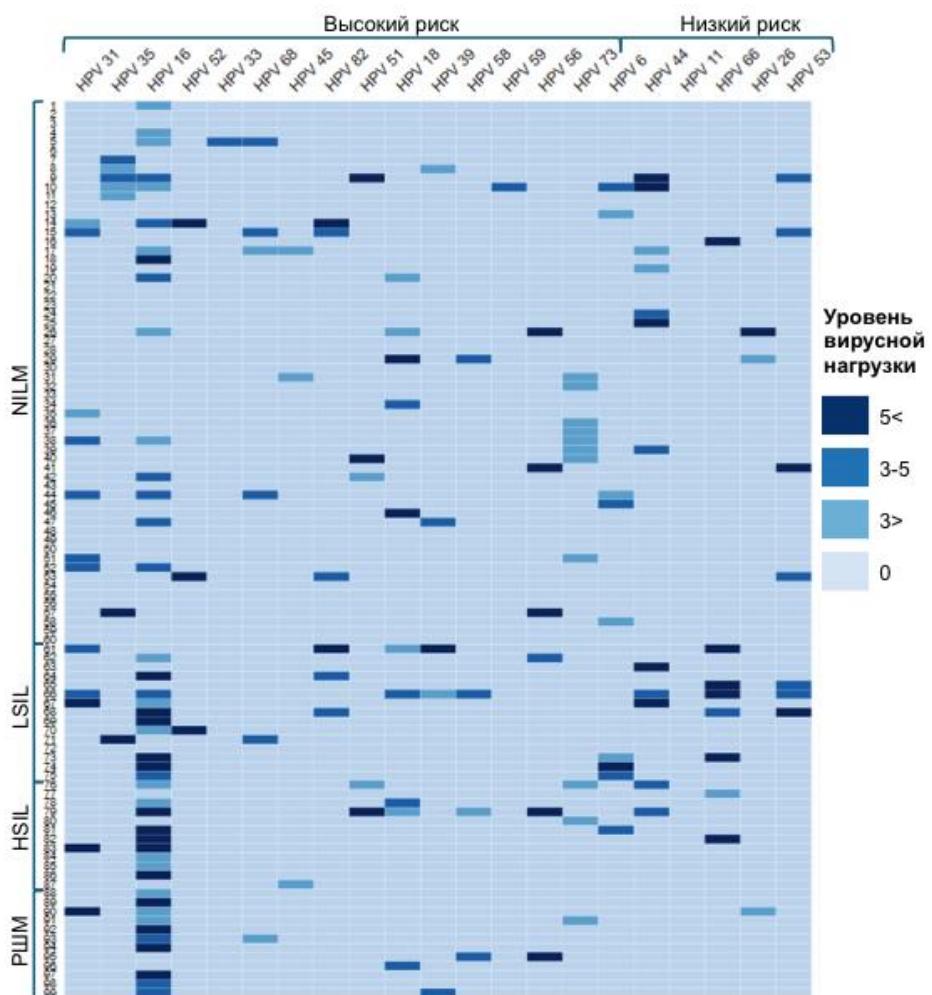


Рисунок 1. Вирусная нагрузка ВПЧ у пациенток с NILM, LSIL, HSIL, РШМ (тепловая карта).

Анализ вирусной нагрузки показал, что при сравнении между группами NILM, LSIL, HSIL и РШМ 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 РШМ по сравнению с другими группами (Рисунок 2).

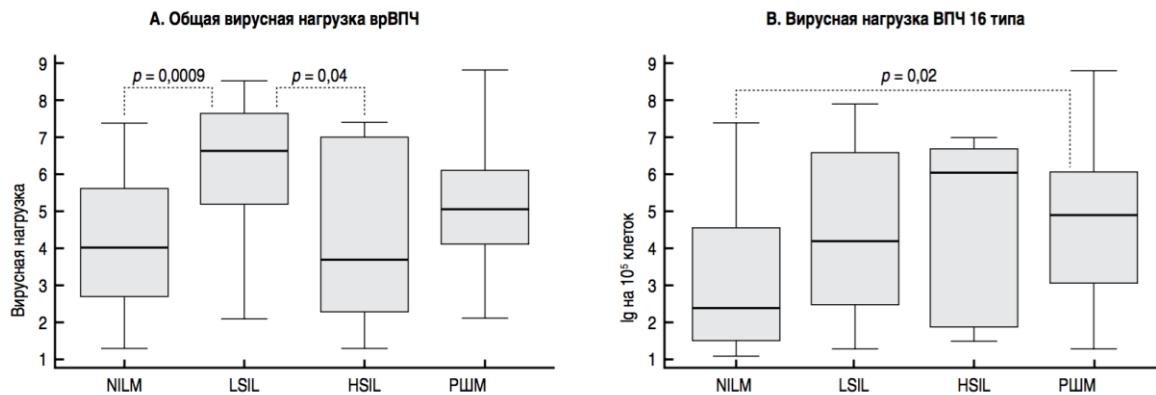


Рисунок 2. Вирусная нагрузка ВПЧ ($lg 10^5$ копий/клетку) у пациенток с NILM, LSIL, HSIL, PHSIL (А - данные для ВПЧ в целом, Б - для ВПЧ 16 типа).

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 PHSIL - в 42%. В возрастной группе до 30 лет она чаще наблюдалась при LSIL, тогда как у женщин старше 30 лет - при HSIL и PHSIL. Анализ ROC-кривых продемонстрировал, что прогностическая значимость общей вирусной нагрузки ВПЧ для выявления LSIL/HSIL/PHSIL 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).

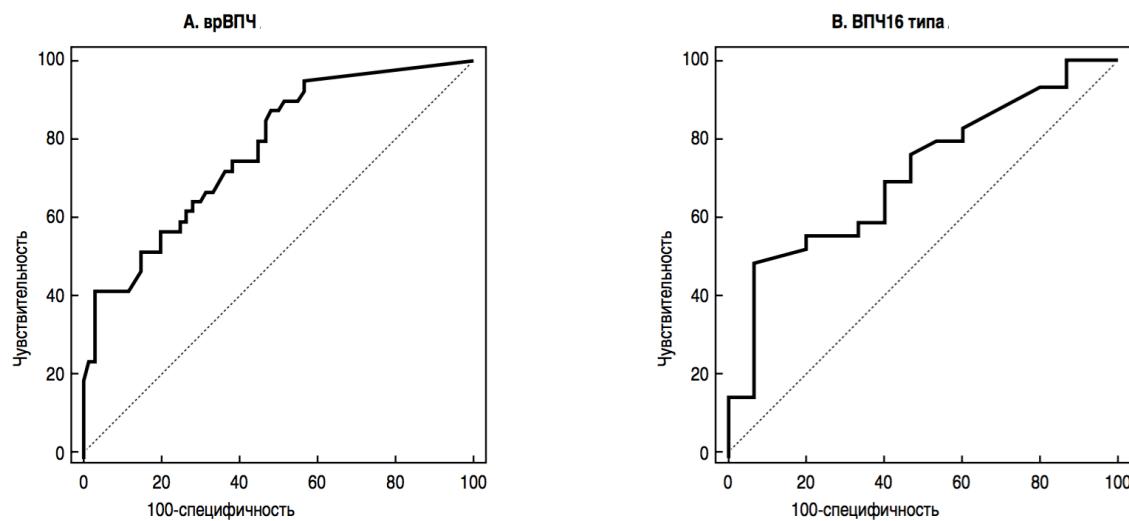


Рисунок 3. Оценка прогностической значимости вирусной нагрузки при заболеваниях шейки матки (А - совокупные данные по ВПЧ высокого онкогенного риска; Б - данные по ВПЧ 16 типа).

Анализ уровней метилирования генов *CADM1*, *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 β -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).

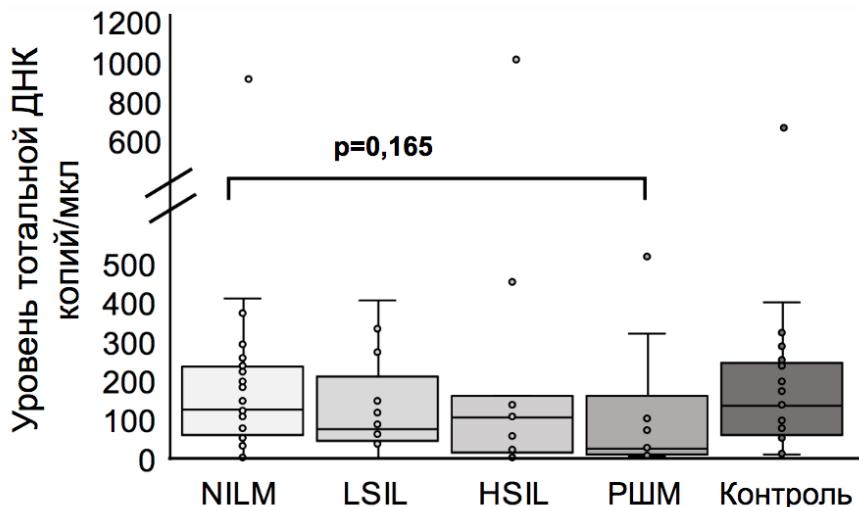


Рисунок 4. Уровень общей ДНК в образцах цервикальных мазков у пациенток контрольной группы и групп NILM, LSIL, HSIL и РШМ. Оценка проведена по неметилированному фрагменту гена *ACTB* методом цк-ПЦР (тест Крускала-Уоллиса).

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

метилирование 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

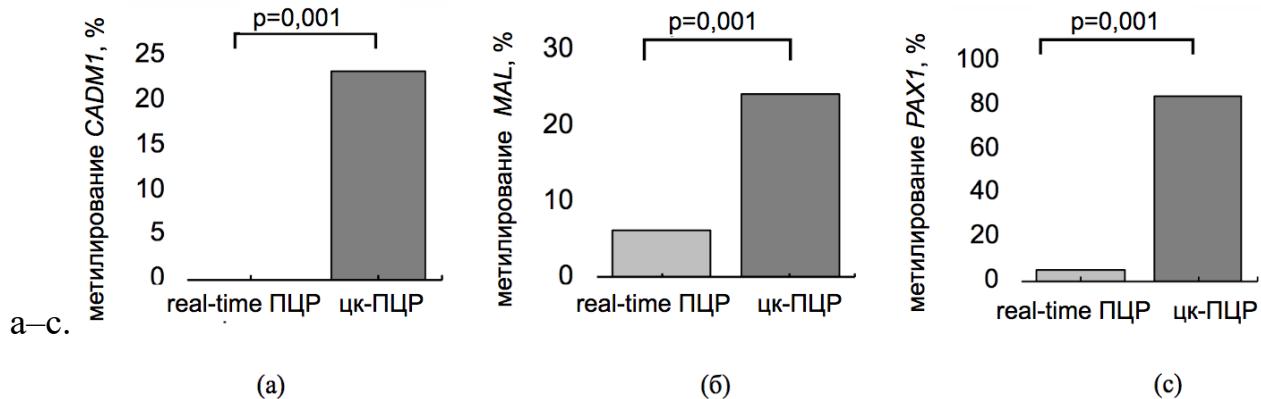


Рисунок 5. Сравнение частоты метилирования генов *CADM1* (а), *MAL* (б) и *PAX1* (с) с использованием методов real-time ПЦР и цк-ПЦР.

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* - $p=0,008$.

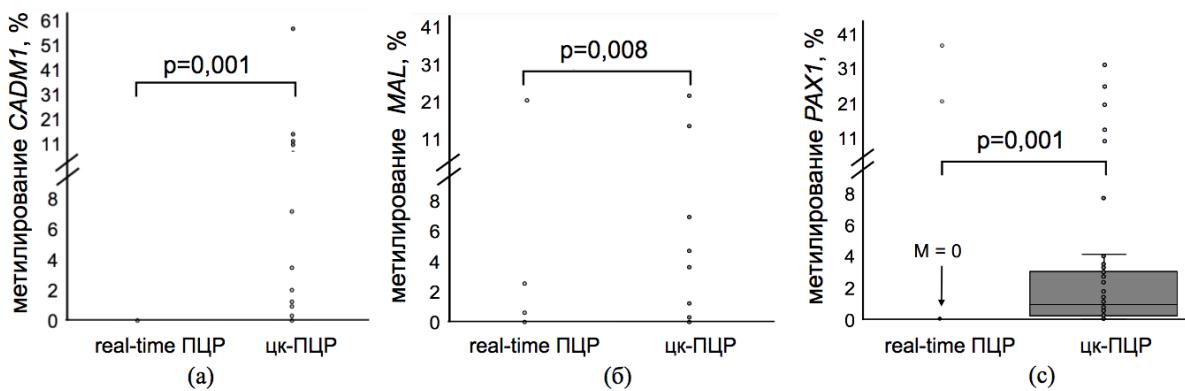


Рисунок 6. Сравнение уровней метилирования генов, выполненное с помощью методов real-time ПЦР и цк-ПЦР: (а) метилирование *CADM1*; (б) метилирование *MAL*; (с) метилирование *PAX1*.

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 *CADM1*, тогда как *MAL* и *PAX1* не сохранили значимости в многофакторной модели.

Эти результаты указывают на то, что метилирование *CADM1* является самостоятельным звеном патогенеза цервикальных неоплазий и может рассматриваться как независимый диагностический маркер.

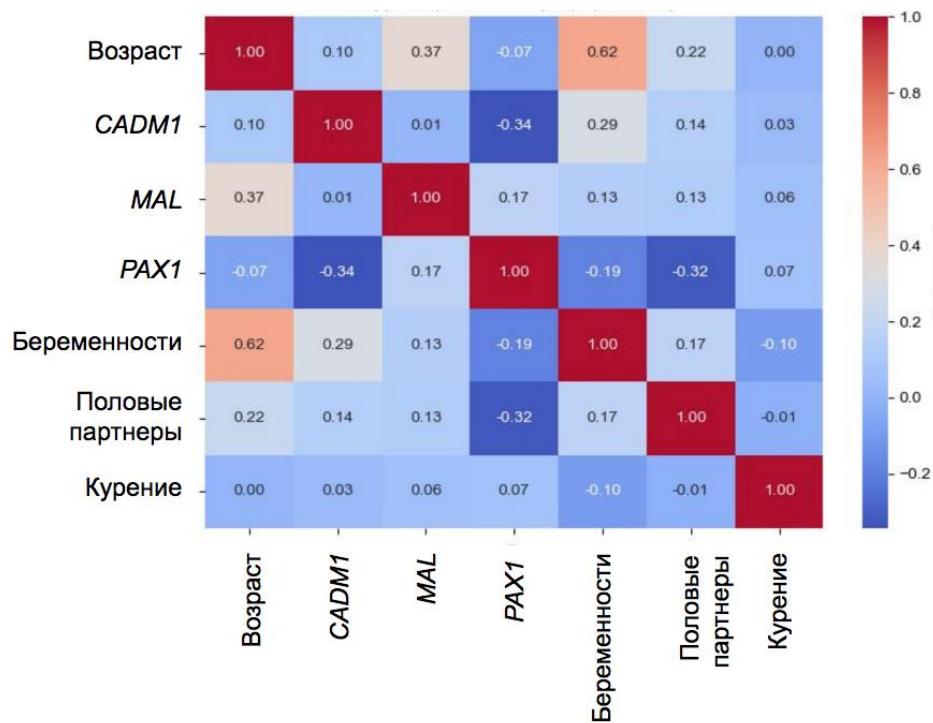
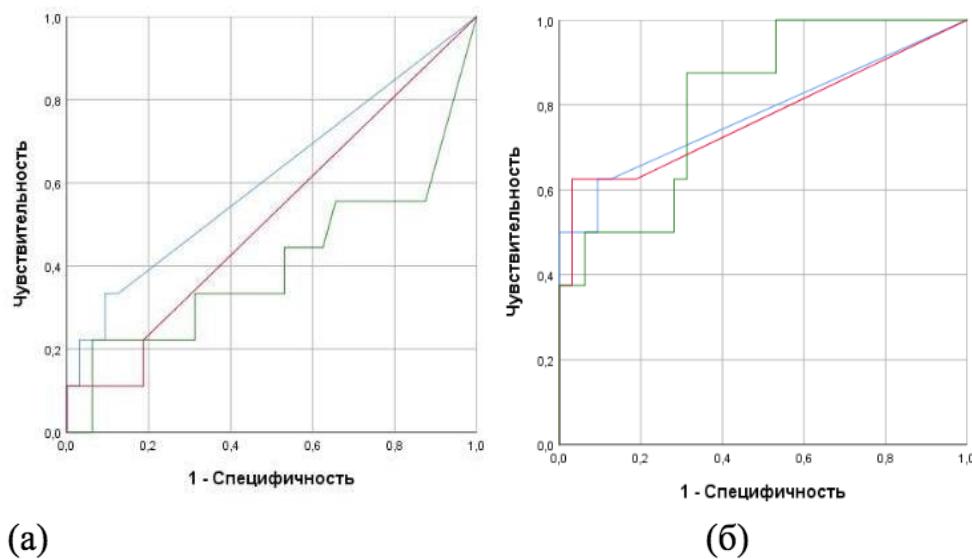


Рисунок 7. Цветовая матрица корреляций между уровнями метилирования генов и клиническими параметрами.

Анализ метилирования показал, что *CADM1* 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 *CADM1*,

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 возрастили 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%.



(a)

(б)

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+MA</i> <i>L</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>CADM1</i>	<i>MAL</i>	<i>PAX1</i>	<i>CADM1+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. *CADM1+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 *CADM1* и *MAL*, при которой диагностическая точность значительно возрастила. 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.

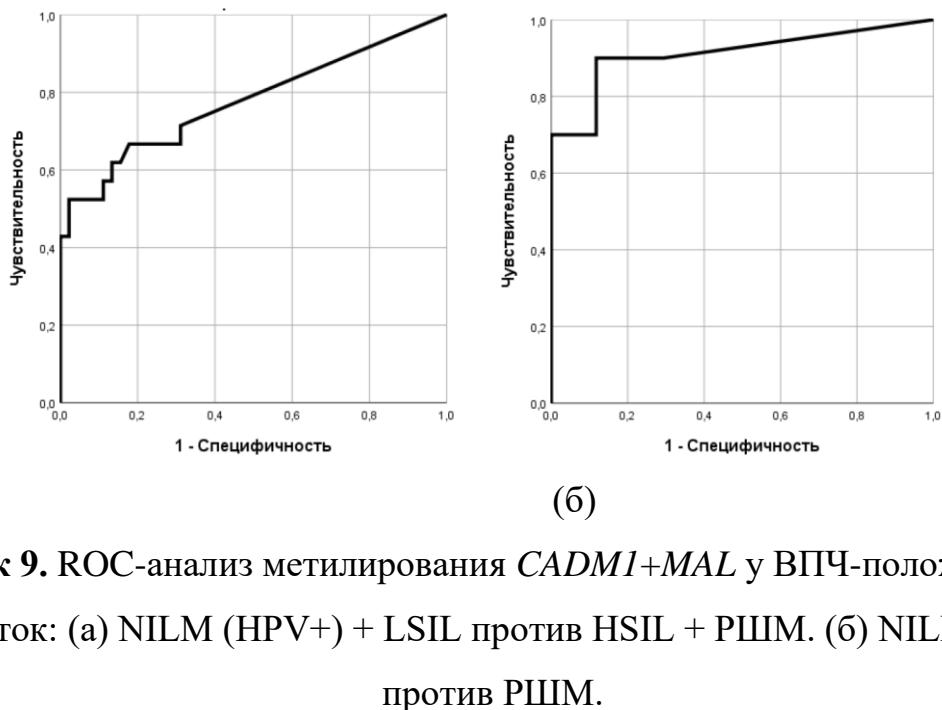


Рисунок 9. ROC-анализ метилирования *CADM1+MAL* у ВПЧ-положительных пациенток: (а) NILM (HPV+) + LSIL против HSIL + HSIL. (б) NILM (HPV+) против HSIL.

Таким образом, определение уровня метилирования генов *CADM1*, *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 *CADM1*, *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 *CADM1* является независимым предиктором ЦИН 2+ и РШМ, тогда как *MAL* и *PAX1* сохраняли значимость лишь в однофакторных моделях. Этот результат подтверждает ведущую роль *CADM1* в цервикальном канцерогенезе, что согласуется с данными литературы [9]. Таким образом, *CADM1* может рассматриваться как самостоятельный диагностический маркёр, а *MAL* и *PAX1* - как компоненты комбинированных панелей.

По данным ROC-анализа, наибольшая диагностика достигается при сочетании *CADM1* и *MAL*: AUC=0,912 (чувствительность 70,0%, специфичность 100%). Для отдельных генов значения AUC были ниже (*CADM1* - 0,770; *MAL* - 0,770; *PAX1* - 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 *CADM1*, *MAL* и *PAX1* 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 *CADM1*, *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 *CADM1*, 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 *CADM1* 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 *CADM1* 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 *CADM1* 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 *CADM1* 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., Bugerenko 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)

χ^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., Сафонова 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. Сафонова 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.