

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
имени М.В.ЛОМОНОСОВА  
МЕДИЦИНСКИЙ НАУЧНО-ОБРАЗОВАТЕЛЬНЫЙ ИНСТИТУТ  
ФАКУЛЬТЕТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ

*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

**ДИССЕРТАЦИЯ**  
на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:  
доктор медицинских наук, профессор  
Панина Ольга Борисовна

Москва – 2025

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>ВВЕДЕНИЕ.....</b>	<b>4</b>
<b>Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....</b>	<b>13</b>
1.1 Эпидемиология и клинико-морфологическая характеристика цервикальной интраэпителиальной неоплазии (ЦИН) и рака шейки матки (РШМ).....	13
1.2. Роль вируса папилломы человека (ВПЧ) высокого онкогенного риска в развитии ЦИН.....	16
1.3. Эпигенетические механизмы регуляции экспрессии генов при неопластических изменениях.....	18
1.4. Метилирование генов-супрессоров опухолей при ЦИН и РШМ.....	20
1.5. Диагностическая и прогностическая значимость метилирования ДНК для ранней диагностики и стратификации риска РШМ.....	22
1.6. Сравнение метилирования с существующими методами скрининга и подходами в клинической практике.....	24
<b>Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....</b>	<b>27</b>
2.1. Общая структура работы.....	27
2.2. Характеристика обследуемых.....	29
2.3. Методы исследования .....	41
<b>Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ....</b>	<b>46</b>
3.1. Анализ модифицируемых и немодифицируемых факторов риска ЦИН.....	46
3.2. Распределение типов ВПЧ и показатели вирусной нагрузки при различных поражениях шейки матки.....	48
3.3. Сравнительная характеристика методов количественного определения метилирования генов <i>CADM1</i> , <i>MAL</i> и <i>PAX1</i> : цифровая капельная ПЦР (цк-ПЦР) и ПЦР в режиме реального времени (real-time ПЦР).....	53

3.4. Корреляционный анализ уровня метилирования генов <i>CADM1</i> , <i>MAL</i> и <i>PAX1</i> и клинико-анамнестических характеристик.....	57
3.5. Диагностическая значимость метилирования генов <i>CADM1</i> , <i>MAL</i> и <i>PAX1</i> при выявлении цервикальной интраэпителиальной неоплазии высокой степени (ЦИН 2+) и РШМ.....	60
3.6. Многофакторный анализ предикторов ЦИН 2+.....	62
3.7. Клиническая интерпретация полученных результатов.....	63
<b>Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ ДАННЫХ.....</b>	67
4.1. Значение выявленных факторов риска ЦИН.....	67
4.2. Роль ВПЧ-типирования и вирусной нагрузки в оценке риска поражений шейки матки.....	70
4.3. Возможности применения методов цк-ПЦР и real-time ПЦР в клинической диагностике.....	72
4.4. Клиническая интерпретация данных о метилировании генов <i>CADM1</i> , <i>MAL</i> и <i>PAX1</i> .....	76
4.5. Диагностическая ценность маркеров метилирования для выявления ЦИН 2+ и РШМ.....	80
4.6. Метилирование как независимый предиктор (результаты многофакторного анализа).....	84
4.7. Ограничения исследования.....	89
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....</b>	91
<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ .....</b>	94
<b>СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА.....</b>	96
<b>БИБЛИОГРАФИЯ.....</b>	99

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность темы исследования.** Рак шейки матки (РШМ) остается одной из наиболее значимых онкологических патологий у женщин во всём мире. По данным GLOBOCAN за 2022 год, РШМ занимает четвёртое место среди злокачественных новообразований у женщин по заболеваемости и смертности, уступая лишь раку молочной железы, лёгких и колоректальному раку [1]. В 2020 году во всём мире было зарегистрировано более 600 000 новых случаев РШМ и около 340 000 случаев смерти от этого заболевания [2].

В Российской Федерации заболеваемость РШМ остаётся стабильно высокой. Согласно данным онкологического регистра, в 2021 году было выявлено более 17 000 новых случаев РШМ, показатель составил 14,2 на 100 000 женского населения. При этом до 30% случаев диагностируются на III-IV стадиях, что существенно снижает шансы на излечение [3]. Особую обеспокоенность вызывает рост заболеваемости РШМ среди женщин молодого возраста. Так, среди пациенток до 35 лет ежегодно выявляется более 3000 новых случаев РШМ [4]. Несмотря на существование организованных скрининговых программ в ряде регионов, на национальном уровне до настоящего времени не реализована всеобъемлющая система раннего выявления предраковых поражений шейки матки. Это обуславливает необходимость внедрения более чувствительных молекулярных методов диагностики, ориентированных на повышение специфичности и точности отбора пациенток для углубленного обследования.

Ключевым фактором развития РШМ признана персистирующая инфекция высокоонкогенными типами вируса папилломы человека (ВПЧ), что

подтверждено многочисленными молекулярно-эпидемиологическими исследованиями [5]. Наиболее онкогенными считаются ВПЧ типов 16 и 18, на долю которых приходится до 70% случаев инвазивного РШМ [6].

Инфекция ВПЧ является одной из самых распространённых вирусных инфекций, передающихся половым путём. Согласно данным Центра по контролю и профилактике заболеваний США (CDC), большинство сексуально активных женщин и мужчин инфицируются ВПЧ хотя бы один раз в жизни [7]. Более 200 типов ВПЧ классифицируются в зависимости от их онкогенного риска. Типы высокого онкогенного риска (ВПЧ 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68) обладают способностью вызывать диспластические изменения эпителия шейки матки, которые при отсутствии лечения могут прогрессировать в инвазивный рак [8].

Цервикальные интракапиллярные неоплазии (ЦИН) представляют собой предраковые поражения шейки матки, классифицируемые по степени тяжести: ЦИН 1 (лёгкая дисплазия), ЦИН 2 (умеренная дисплазия) и ЦИН 3 (тяжёлая дисплазия и carcinoma *in situ*). ЦИН 2 и ЦИН 3 рассматриваются как поражения высокого риска, требующие дополнительной диагностики и лечения [9].

В Российской Федерации основой скрининга остаётся цитологическое исследование (ПАП-тест), однако чувствительность метода не превышает 60-70%, что приводит к ложноотрицательным результатам [10]. В последние годы внедряется ВПЧ-тестирование, обладающее более высокой чувствительностью, особенно для выявления ЦИН 2+ [11]. Однако ВПЧ-тестирование обладает невысокой специфичностью, особенно у женщин моложе 30 лет, что требует дополнительных методов уточняющей диагностики - «вторичной диагностики». В связи с этим возрастаёт интерес к молекулярным биомаркерам, способным повысить точность определения женщин с истинно высоким риском ЦИН 2+.

Эпигенетические изменения, в том числе аномальное метилирование ДНК, играют ключевую роль в канцерогенезе, включая прогрессирование

ВПЧ-ассоциированных поражений шейки матки [12]. Метилирование цитозин-гваниновых островков (CpG) в промоторных зонах генов-супрессоров опухолей приводит к снижению или полной потере их экспрессии, что способствует неконтролируемому росту клеток и нарушению апоптоза. В контексте цервикального канцерогенеза, аномальное метилирование ряда генов, включая *CADM1*, *MAL* и *PAX1*, было связано с прогрессией от нормального эпителия и ЦИН 1 к ЦИН 2+ и инвазивному раку [13,14]. Считается, что эти эпигенетические маркеры активируются уже на ранних стадиях трансформации, опосредованной онкогенными белками E6 и E7 ВПЧ, что делает их потенциально ценными в диагностике предраковых изменений [15].

Исследования, проведённые в различных популяциях, подтвердили диагностическую ценность метилирования *CADM1*, *MAL* и *PAX1* как для обнаружения ЦИН 2+, так и для отбора женщин, нуждающихся в кольпоскопии [16]. В российской литературе также подчеркивается значение метилирования как биомаркера раннего выявления предраковых поражений шейки матки. Так, исследование Зыряновой А.Ф. и Паршиной Е.А. акцентирует внимание на оптимизации условий бисульфитного преобразования и значении стандартизации при клиническом применении метода [17].

Современные методы анализа метилирования ДНК включают метилированную ПЦР (MSP), количественную ПЦР в реальном времени (real-time ПЦР), пиросеквенирование и более современные цифровые технологии. Одним из наиболее перспективных методов количественного анализа метилирования в малых объёмах образца является цифровая капельная ПЦР (цк-ПЦР), основанная на принципе разделения реакционной смеси на тысячи нанолитровых капель с последующим амплификационным анализом каждой капли [18]. Преимуществами цк-ПЦР являются высокая чувствительность и специфичность, абсолютная количественная оценка копий метилированной и неметилированной ДНК без необходимости в стандартной кривой, а также

устойчивость к ингибиторам реакции, что особенно важно при анализе клинических образцов, включая мазки с шейки матки [19]. Метод цк-ПЦР показал превосходство по сравнению с real-time ПЦР в диагностике различных онкологических заболеваний, включая опухоли, ассоциированные с ВПЧ [20]. В контексте анализа метилирования в мазках шейки матки, цк-ПЦР позволяет достичь точной оценки метилированных копий при минимальном количестве ДНК и не требует стандартных образцов, что значительно упрощает внедрение в рутинную клиническую практику. Кроме того, технология цк-ПЦР обеспечивает репродуктивность результатов и позволяет стандартизировать протоколы детекции в различных лабораториях [21].

Применение цк-ПЦР в исследовании метилирования генов *CADM1*, *MAL* и *PAX1* у женщин с ВПЧ высокого онкогенного риска представляется обоснованным как с научной, так и с клинико-диагностической точки зрения. Метод позволяет не только проводить дифференцировку между доброкачественными и предраковыми изменениями, но и закладывает основу для возможной стратификации риска и последующего динамического наблюдения.

**Степень разработанности темы исследования.** Анализ литературы показывает, что проблема применения метилирования генов *CADM1*, *MAL* и *PAX1* в качестве биомаркеров для отбора женщин с риском тяжелых интраэпителиальных поражений активно разрабатывается в зарубежной научной среде. Наиболее цитируемыми являются работы Su P.H. и соавт. (2025), Wentzensen N. и соавт. (2009), Overmeer R.M. и соавт. (2011), в которых демонстрируется высокая прогностическая ценность этих маркеров [12,22,23].

В отечественной литературе имеется ограниченное количество работ, посвящённых метилированию в контексте патогенеза ВПЧ-ассоциированных поражений. Исследования, опубликованные Зыбиной Е.Н. и Фроловой О.Г. (2021), содержат лишь обзорные данные и единичные результаты использования метода real-time ПЦР, в то время как цк-ПЦР практически не применяется [24]. Анализ доступных российских диссертационных работ за

последние 10 лет (по базам РГБ и НЭБ) показывает отсутствие комплексных исследований, посвященных детекции метилирования *CADM1*, *MAL* и *PAX1* методом цк-ПЦР у ВПЧ-положительных пациенток. Таким образом, тема настоящего исследования является актуальной и недостаточно разработанной в отечественной науке.

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

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

**Научная новизна исследования.** Впервые в Российской Федерации проведён комплексный количественный анализ уровня метилирования генов *CADM1*, *MAL* и *PAX1* методом цк-ПЦР в клеточном материале шейки матки у женщин с ВПЧ высокого онкогенного риска. Метод цк-ПЦР ранее не

использовался в отечественных исследованиях для оценки метилирования эпигенетических маркёров при патологии шейки матки, что определяет его методологическую новизну.

Впервые для популяции российских женщин, прошедших скрининг на рак шейки матки, определена диагностическая и прогностическая значимость метилирования указанных генов, как по отдельности, так и в комбинации, при выявлении ЦИН различной степени тяжести и РШМ. Показано, что анализ метилирования с использованием цк-ПЦР обладает преимуществами по сравнению с традиционными молекулярными методами, что открывает перспективы его внедрения в клиническую практику.

Новым является выявление взаимосвязи уровня метилирования генов *CADM1*, *MAL* и *PAX1* с клинико-анамнестическими и морфологическими характеристиками патологических процессов шейки матки. Это позволило выделить специфические эпигенетические маркёры, ассоциированные с риском прогрессирования неопластических изменений у ВПЧ-инфицированных женщин, что ранее не изучалось в отечественных исследованиях.

Полученные результаты расширяют представления об эпигенетических механизмах патогенеза ЦИН и РШМ, а также обосновывают целесообразность применения метода цк-ПЦР при разработке персонализированных алгоритмов диагностики и ведения пациенток.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Проведённое исследование имеет как теоретическую, так и практическую значимость. С теоретической точки зрения оно углубляет представления об эпигенетических механизмах развития ЦИН и РШМ, подтверждая роль метилирования генов-супрессоров опухолевого роста *CADM1*, *MAL* и *PAX1* в прогрессировании ВПЧ-ассоциированных поражений. Установлено, что метилирование гена *CADM1* является независимым предиктором наличия ЦИН 2+ и РШМ, тогда как метилирование генов *MAL* и *PAX1* статистически значимо ассоциировано с ЦИН 2+ только в однофакторном анализе, что свидетельствует об их

вспомогательной роли. При этом комбинация *CADM1* и *MAL* обеспечивает наибольшую диагностическую ценность, что подтверждает целесообразность панельного подхода.

Практическая значимость исследования заключается в том, что методика количественного определения метилирования с применением цк-ПЦР продемонстрировала высокие показатели чувствительности и специфичности при выявлении ЦИН и РШМ. Это позволяет рассматривать анализ метилирования как перспективный инструмент вторичной диагностики ВПЧ-ассоциированных поражений. Полученные результаты могут быть использованы при разработке алгоритмов клинического отбора женщин, инфицированных ВПЧ высокого онкогенного риска, нуждающихся в углублённой диагностике или динамическом наблюдении. Применение маркёров метилирования позволит повысить точность стратификации риска, снизить количество необоснованных инвазивных вмешательств и оптимизировать маршрутизацию пациенток в системе здравоохранения.

Дополнительно установлены социально-демографические и клинико-анамнестические факторы, ассоциированные с повышением риска ЦИН, что дополняет эпидемиологические данные и имеет значение для совершенствования профилактических мероприятий.

#### **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 результатов исследования.** Достоверность полученных результатов обеспечена достаточным объемом выборки пациенток, включённых в исследование, а также применением современных и валидированных клинико-лабораторных и молекулярно-биологических методов. Использованы цитологическое и гистологическое исследования, ВПЧ-типирование, а также цк-ПЦР для количественного определения метилирования генов *CADM1*, *MAL* и *PAX1*, что обеспечило воспроизводимость и сопоставимость полученных данных.

Для статистической обработки применялись пакеты IBM SPSS Statistics 26.0 (IBM, Армонк, Нью-Йорк, США). Использованы адекватные задачам методы статистического анализа: сравнение показателей независимых выборок проводилось с применением U-критерия Манна-Уитни и критерия  $\chi^2$ , выполнен корреляционный анализ с использованием коэффициента корреляции Пирсона, а также проведён многофакторный логистический регрессионный анализ. Применение указанных методов обеспечило надёжность, обоснованность и достоверность полученных результатов.

**Апробация работы.** 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 кафедры акушерства и гинекологии факультета фундаментальной медицины с приглашением

сотрудников отдела гинекологии и репродуктивной медицины Университетской клиники Медицинского научно-образовательного института МГУ имени М. В. Ломоносова.

**Соответствие диссертации паспорту научной специальности.**

Диссертационная работа соответствует паспорту специальности: 3.1.4. Акушерство и гинекология по проблематике, методам исследования и научным положениям, поскольку освещает вопросы факторов риска и диагностики цервикальных интрапитиальных неоплазий и рака шейки матки.

**Внедрение результатов исследования.** Результаты, полученные в ходе выполнения исследования, используются в клинической практике специалистов МНОИ. Материалы исследования представлены на конгрессах, конференциях, в отчетах по Государственному заданию Медицинского научно-образовательного центра МГУ с 2023 по 2025 гг. в рамках темы «Разработка и апробация методов диагностики и лечения в гинекологии».

**Личное участие автора в получении научных результатов.** 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, подготовил публикации по теме диссертации.

**Публикации по теме диссертации.** По результатам диссертационного исследования опубликованы 4 печатные работы в соавторстве, включая 3 статьи в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базе ядра Российского индекса научного цитирования "eLibrary Science Index", и 1 статью в журнале, входящем в Перечень ВАК.

**Финансирование исследования.** Исследование финансировалось в рамках темы «Разработка и апробация методов диагностики и лечения в гинекологии», выполняемой по Государственному заданию Медицинского научно-образовательного центра МГУ на 2023-2026 годы.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Эпидемиология и клинико-морфологическая характеристика ЦИН и РШМ<sup>1</sup>

РШМ занимает одно из ведущих мест в структуре онкологической заболеваемости женщин в мире и остаётся значимой медико-социальной проблемой. По данным GLOBOCAN, в 2022 году в мире зарегистрировано свыше 600 тысяч новых случаев РШМ, а число летальных исходов превысило 340 тысяч, что выводит заболевание на четвёртое место среди злокачественных новообразований женской репродуктивной системы [25]. В странах с низким и средним уровнем дохода РШМ продолжает оставаться одной из основных причин женской смертности от рака, что связано с недостаточной эффективностью скрининговых программ [26].

В Российской Федерации РШМ находится на пятом месте в структуре женских злокачественных опухолей, уступая лишь раку молочной железы, тела матки, ободочной кишки и лёгких. По данным ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, заболеваемость РШМ в 2023 году

---

<sup>1</sup> При подготовке данного раздела диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором лично или в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования: Анисимова М.А., Щербакова Л.Н., Панина О.Б. Метилирование ДНК при цервикальной интраэпителиальной неоплазии и раке шейки матки (обзор) // Акушерство и гинекология. 2025. № 7. С. 161–166; Щербакова Л.Н., Кириллова К.И., Залепаев П.В., Анисимова М.А., Бугеренко А.Е., Гайфуллина А.Н., Джайн М., Новицкая Н.А., Огай Д.С., Самоходская Л.М., Панина О.Б. Прогностическое значение вирусной нагрузки ВПЧ высокого онкогенного риска в развитии цервикальной интраэпителиальной неоплазии шейки матки // Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. 2025. Т. 24. № 2. С. 44–52.

составила 15,2 случая на 100 тыс. женского населения, демонстрируя умеренную тенденцию к снижению за последнее десятилетие. Однако уровень смертности остаётся стабильно высоким, достигая 7,4 на 100 тыс. [27].

Эпидемиологическая ситуация в РФ отличается значительными региональными колебаниями. В Центральном и Северо-Западном федеральных округах заболеваемость РШМ колеблется от 16,5 до 19,1 на 100 тыс., тогда как в Сибирском и Приволжском округах показатели ниже - в пределах 12,3-14,5 на 100 тыс. [28]. Эти различия обусловлены как разной доступностью медицинских услуг, так и социально-экономическими и демографическими факторами, включая миграционные процессы и структуру сексуального поведения населения [29]. Возрастной пик заболеваемости РШМ в России и мире приходится на женщин 35-44 лет, что подчёркивает значимость заболевания у лиц трудоспособного возраста. В последние годы наблюдается тенденция к «омоложению» заболеваемости, что связывают с более ранним началом половой жизни, увеличением числа половых партнёров и низким уровнем вакцинации против ВПЧ [30,31].

Ключевым фактором патогенеза РШМ признана персистирующая инфекция, вызванная ВПЧ высоких онкогенных типов, среди которых типы 16 и 18 ответственны примерно за 70 % случаев заболевания [32]. Однако лишь у небольшой доли инфицированных женщин развиваются предраковые изменения или инвазивный рак, что связано с ролью иммунных и эпигенетических факторов [33]. Развитию РШМ предшествует длительный процесс цервикальной интрапителиальной неоплазии (ЦИН), которая охватывает спектр морфологических изменений эпителия шейки матки, ассоциированных с нарушением клеточной дифференцировки, пролиферации и апоптоза. В клинической практике применяются две основные классификации ЦИН:

По классификации ВОЗ (2014) различают три степени:

ЦИН 1 - лёгкая дисплазия, затрагивающая нижнюю треть эпителия;

ЦИН 2 - умеренная дисплазия, распространяющаяся на две трети толщины эпителия;

ЦИН 3 - тяжёлая дисплазия или carcinoma *in situ*, при которой атипичные клетки занимают всю толщу эпителия без инвазии базальной мембраны [34].

В системе Bethesda (2014) изменения описываются как:

LSIL (low-grade squamous intraepithelial lesion), что соответствует ЦИН 1;

HSIL (high-grade squamous intraepithelial lesion), объединяющая ЦИН 2 и ЦИН 3 [35].

Морфологически ЦИН характеризуется койлоцитозом, дискариозом, гиперхромией ядер, патологическими митозами, а также нарушением архитектоники эпителиальных слоёв. Наибольшее клинико-диагностическое значение имеет поражение трансформационной зоны шейки матки, где локализуются более 90 % предраковых изменений и опухолей [36].

Клинические проявления ЦИН часто отсутствуют, заболевание нередко выявляется случайно в ходе скрининга. Среди редких симптомов возможны контактные кровянистые выделения или диспареуния. Диагностика ЦИН основана на комбинации методов цитологического исследования (ПАП-теста), ВПЧ-тестирования, кольпоскопии и при необходимости прицельной биопсии для морфологической верификации диагноза [37,38].

По данным Файзуллиной Л.З. и соавт. в российских когортах женщин с ВПЧ-позитивным статусом частота ЦИН 2+ варьирует от 4,8 % до 12,3 % в зависимости от региона и возрастной группы [39]. Похожие данные приводят Кириллова И.В. и соавт., подчёркивая значимость персистирующей ВПЧ-инфекции и наличие факторов риска, таких как курение, низкий социально-экономический статус и раннее начало половой жизни, для развития предраковых изменений [27].

Таким образом, рак шейки матки и его предраковые формы остаются одной из приоритетных проблем как в мировой, так и в российской онкогинекологии. Несмотря на успехи в области скрининга и профилактики,

показатели заболеваемости и смертности остаются высокими, что подчёркивает необходимость совершенствования методов ранней диагностики, включая внедрение молекулярно-генетических и эпигенетических подходов [26,40].

## 1.2. Роль ВПЧ высокого онкогенного риска в развитии ЦИН

На сегодняшний день персистирующая инфекция ВПЧ признана основным этиологическим фактором в развитии ЦИН и РШМ. ВПЧ относится к семейству Papillomaviridae и представляет собой безоболочечный вирус, содержащий кольцевой двухцепочечный ДНК-геном, кодирующий ряд структурных (L1, L2) и ранних регуляторных белков (E1, E2, E6, E7) [41,42]. Канцерогенная активность доказана для более чем 15 типов ВПЧ, однако наиболее высокую онкогенность демонстрируют генотипы 16 и 18, которые ассоциируются примерно с 70% всех случаев РШМ [43,44]. По данным эпидемиологических исследований, в общей популяции женщин с нормальной цитологической картиной распространённость ВПЧ-инфекции составляет около 11,7%, однако существенно возрастает при наличии ЦИН [25]. В Российской Федерации доля ВПЧ высокого онкогенного риска среди выявленных инфекций составляет более 80%, при этом наибольшую распространённость имеют типы 16, 18, 31 и 33 [45].

Ключевым механизмом канцерогенного действия ВПЧ является экспрессия онкогенов E6 и E7, которые вмешиваются в регуляцию клеточного цикла. Белок E6 связывается с опухолевым супрессором p53, ускоряя его деградацию, тогда как белок E7 инактивирует ретинобластомный белок (pRb), что приводит к утрате контроля над клеточной пролиферацией и дифференцировкой [46]. На фоне таких молекулярных изменений создаются условия для активации эпигенетических механизмов, включая гиперметилирование промоторных регионов генов-супрессоров опухолевого

роста, что вносит дополнительный вклад в процесс неопластической трансформации клеток шейки матки [47,48].

Механизмы канцерогенного действия ВПЧ высокоонкогенных типов тесно связаны не только с инактивацией супрессорных белков p53 и pRb, но и с запуском эпигенетических перестроек в инфицированных клетках. Онкобелки E6 и E7 оказывают непосредственное влияние на активность ДНК-метилтрансфераз (DNMTs), в частности DNMT1, DNMT3A и DNMT3B, которые катализируют добавление метильных групп к цитозинам в CpG-динуклеотидах промоторных регионов генов [23,47]. Повышение экспрессии DNMT1 под действием E7 приводит к гиперметилированию промоторов генов-супрессоров опухолевого роста, таких как *CADM1*, *MAL*, *PAX1* и других, что в свою очередь, способствует подавлению их транскрипции и нарушению контроля клеточного цикла [49,50].

Белок E6 усиливает деградацию p53, тем самым снимая контроль с каскадов, ограничивающих клеточную пролиферацию и индуцирующих апоптоз. Параллельно E7, связываясь с белком pRb, стимулирует транскрипцию генов клеточного цикла через высвобождение транскрипционного фактора E2F, который, по последним данным, также способен напрямую регулировать экспрессию DNMT1 и DNMT3B [49,51]. Таким образом, происходит эпигенетическое модификация клеток, что усиливает их предрасположенность к неопластической трансформации.

Особое значение имеет тот факт, что гиперметилирование генов-супрессоров опухолевого роста начинается ещё на доклинической стадии неопластического процесса, задолго до появления морфологических признаков дисплазии. Это делает анализ метилирования перспективным инструментом вторичной диагностики и молекулярной стратификации риска у женщин с выявленной инфекцией ВПЧ высокого онкогенного риска [12,22].

Несмотря на широкую распространённость ВПЧ-инфекции в популяции, у большинства женщин она является транзиторной и самостоятельно элиминируется в течение 9-15 месяцев. Однако у части

пациенток формируется персистирующая инфекция, которая значительно повышает риск развития ЦИН 2-3 и последующего РШМ [52,53]. Высокая вирусная нагрузка и инфицирование несколькими типами ВПЧ дополнительно рассматриваются как факторы, повышающие вероятность прогрессирования заболевания [22,45].

В свете изложенного, роль ВПЧ высокого онкогенного риска в патогенезе неоплазий шейки матки является ключевой и обуславливает необходимость разработки молекулярных методов диагностики и стратификации риска у инфицированных женщин.

### **1.3. Эпигенетические механизмы регуляции экспрессии генов при неопластических изменениях**

В последние десятилетия становится всё более очевидной роль эпигенетических механизмов в развитии неопластических заболеваний, включая ЦИН и РШМ. Эпигенетические изменения представляют собой наследуемые модификации экспрессии генов, которые не связаны с изменением последовательности ДНК, но значительно влияют на функциональное состояние клеточного генома [54,55]. К числу таких механизмов относятся метилирование ДНК, модификации гистонов, ремоделирование хроматина и регуляция некодирующими РНК [56,57].

Одним из наиболее изученных эпигенетических процессов является метилирование ДНК, заключающееся в присоединении метильной группы к 5'-положению цитозина в СрG-динуклеотидах, что приводит к образованию 5-метилцитозина. СрG-островки, представляющие собой участки ДНК длиной более 200 п.н. с высоким содержанием гуанин-цитозиновых пар, локализуются преимущественно в промоторных областях генов и играют важную роль в регуляции их транскрипционной активности [48,58]. Метилирование промоторных регионов обычно ассоциировано с подавлением транскрипции генов-супрессоров опухолевого роста или генов, участвующих в

дифференцировке и апоптозе, что способствует канцерогенезу [50,59]. В опухолевых клетках часто наблюдается глобальное гипометилирование некодирующих областей генома, сопровождающееся локальной гиперметилированием промоторов критически важных генов, обеспечивающих контроль клеточного цикла и стабильность генома [54,60].

Ключевую роль в метилировании ДНК играют ДНК-метилтрансферазы (DNMTs). В нормальных клетках DNMT1 поддерживает уровень метилирования при репликации ДНК, обеспечивая копирование метильных меток на вновь синтезированные цепи. DNMT3A и DNMT3B отвечают за de novo метилирование, формируя новые паттерны метилирования, включая патологические изменения при неопластических процессах [47,61]. При неопластической трансформации происходит гиперэкспрессия DNMT1, что способствует метилированию промоторных областей генов-супрессоров опухолевого роста, таких как *CADM1*, *MAL*, *PAX1* и других, тем самым выключая их транскрипцию и создавая условия для неограниченной клеточной пролиферации [23,48].

Особенностью эпигенетических изменений является их потенциальная обратимость, что открывает возможности для использования эпигенетических маркеров не только в диагностике, но и в качестве терапевтических мишеней. В настоящее время активно изучается возможность применения ингибиторов ДНК-метилтрансфераз (например, 5-аза-2'-дезоксицитидина) для восстановления экспрессии подавленных генов при различных онкопатологиях, включая РШМ [62,63].

Следовательно, метилирование ДНК представляет собой важнейший эпигенетический механизм, который играет значительную роль в патогенезе ВПЧ-ассоциированных неоплазий шейки матки и обладает высоким потенциалом как диагностический и прогностический биомаркер в клинической практике.

#### 1.4. Метилирование генов-супрессоров опухолей при ЦИН и РШМ

Аберрантное метилирование ДНК является одним из наиболее ранних и значимых событий в развитии злокачественных опухолей, включая ЦИН и РШМ. В процессе канцерогенеза гиперметилирование промоторных областей генов-супрессоров опухолевого роста приводит к снижению или полной утрате их транскрипционной активности, что способствует нарушению регуляции клеточного цикла, подавлению апоптоза и усилинию инвазивных свойств опухолевых клеток [54,59].

Одними из наиболее изученных генов-супрессоров в контексте патогенеза ЦИН и РШМ являются *CADM1*, *MAL* и *PAX1*. Гиперметилирование промотора гена *CADM1* (Cell Adhesion Molecule 1), кодирующего белок семейства иммуноглобулинов, приводит к снижению межклеточной адгезии и повышению инвазивного потенциала эпителиальных клеток. Данные литературы свидетельствуют, что частота и уровень метилирования *CADM1* возрастают пропорционально степени тяжести неоплазии: от минимальных изменений при ЦИН 1 до выраженной гиперметилированности при ЦИН 3 и инвазивном РШМ [23,64]. В ряде исследований установлено, что гиперметилирование *CADM1* может обнаруживаться за несколько лет до клинической манифестации инвазивного рака шейки матки, что делает его перспективным маркером ранней диагностики [51,57].

Ген *MAL* (Myelin and Lymphocyte Protein) участвует в формировании липидных рафтов мембранны и дифференцировке эпителиальных клеток. Гиперметилирование промотора *MAL* приводит к его инактивации, что ассоциировано с прогрессией ЦИН к высокостепенной дисплазии и инвазивному раку. Исследования показывают, что определение метилирования *CADM1* и *MAL* в комбинации обладает высокой диагностической ценностью для выявления ЦИН 2+ у женщин с ВПЧ-инфекцией высокого онкогенного риска [65,66]. В российских публикациях

также подчеркивается важность этих маркеров в молекулярной диагностике, однако масштабных отечественных исследований пока недостаточно [45].

Ген *PAX1* (Paired Box Gene 1), принадлежащий к семейству транскрипционных факторов, также рассматривается как потенциальный биомаркер ЦИН 2+ и РШМ. Его гиперметилирование приводит к активации сигнальных каскадов, способствующих клеточной пролиферации и снижению апоптоза. Исследования показывают, что уровень метилирования *PAX1* может служить независимым предиктором наличия ЦИН 2+ и РШМ, особенно при сочетании с тестированием на ВПЧ высокого онкогенного риска [14,67]. В ряде исследований выявлено, что гиперметилирование *PAX1* чаще наблюдается у женщин с несколькими типами ВПЧ и высокой вирусной нагрузкой [22].

Кроме перечисленных генов, значительное внимание уделяется исследованию *FAM19A4* и *miR-124-2*, гиперметилирование которых ассоциируется с ЦИН 2+. Панели, включающие эти маркеры, показывают чувствительность до 90% при ЦИН 2+, что делает их потенциально ценными для молекулярной стратификации риска у женщин с выявленной ВПЧ-инфекцией [65,68]. Однако в Российской Федерации использование этих панелей пока ограничено pilotными проектами и требует дальнейшей валидации в отечественных когортах [69]. Способность выявлять молекулярные изменения на доклиническом этапе, задолго до появления морфологических признаков дисплазии, делает метод ценным инструментом вторичной диагностики и индивидуализированного скрининга, позволяя сократить количество ненужных кольпоскопий и биопсий у женщин с транзиторной ВПЧ-инфекцией [48,70].

Все эти данные подтверждают, что анализ гиперметилирования промоторов генов-супрессоров опухолевого роста представляет собой перспективное направление для ранней диагностики, стратификации риска и мониторинга женщин с ВПЧ-инфекцией высокого онкогенного риска в клинической практике.

## 1.5. Диагностическая и прогностическая значимость метилирования ДНК для ранней диагностики и стратификации риска РШМ

Анализ метилирования ДНК в последние десятилетия получил признание как один из наиболее перспективных молекулярно-генетических подходов к диагностике и прогнозированию онкологических заболеваний, включая ЦИН и РШМ. Особенно важную роль он играет в контексте скрининга ВПЧ-инфекции, поскольку позволяет повысить специфичность и прогностическую ценность выявленных изменений, снижая риск гипердиагностики и ненужных инвазивных вмешательств [53,71].

Гиперметилирование промоторных областей генов-супрессоров опухолевого роста, таких как *CADM1*, *MAL*, *PAX1*, *FAM19A4*, *EPB41L3*, рассматривается как один из ключевых молекулярных маркеров, ассоциированных с развитием предраковых изменений и злокачественных опухолей шейки матки [66,72]. По данным крупных международных исследований, частота метилирования *CADM1* и *MAL* при ЦИН 3 достигает 60-80 %, тогда как в группе женщин с нормальной цитологией такие изменения выявляются менее чем в 10% случаев [23,73].

Современные мультигенные панели анализа метилирования демонстрируют высокую эффективность в диагностике ЦИН 2 и ЦИН 3. Например, тесты на основе *CADM1/MAL* показывают чувствительность 80-85% при специфичности 65-75% [66]. Особенную высокую информативность даёт комбинация этих тестов с цитологией или ВПЧ-типированием. В исследовании De Strooper L.M.A. и соав. использование панели *CADM1/MAL* совместно с цитологическим исследованием обеспечивало выявление ЦИН 3 в 88% случаев, что значительно превышает показатели только ВПЧ-тестирования [65]. В работе Mirabello L. и соав. установлено, что гиперметилирование промоторных областей *CADM1* и *MAL* может

обнаруживаться за 5-7 лет до клинической манифестации инвазивного РШМ [51].

Особое внимание уделяется маркерам *FAM19A4* и *miR-124-2*, гиперметилирование которых демонстрирует высокую диагностическую эффективность при ЦИН 2+. Так, в многоцентровом исследовании Verlaat W. и соав. чувствительность теста на *FAM19A4* составила 93% при специфичности 65% [74]. При этом у женщин старше 30 лет специфичность этого теста была значительно выше, чем у молодых пациенток, что связано с меньшей вероятностью транзиторной ВПЧ-инфекции в этой возрастной группе [26].

Не менее перспективным направлением остаётся исследование метилирования вирусной ДНК. Гиперметилирование регуляторных участков L1 и L2 генома ВПЧ 16 типа связано с ЦИН 2+ и инвазивным раком шейки матки. По данным метаанализа Bowden S.J. и соав. наличие гиперметилирования CpG-сайтов в этих регионах увеличивает вероятность ЦИН 2+ более чем в 50 раз по сравнению с гипометилированными образцами [75]. Аналогичные результаты были получены в исследованиях в различных популяциях, включая Китай, Южную Америку и страны Европы [51,76].

В Российской Федерации методики анализа метилирования пока не вошли в стандартные алгоритмы скрининга, однако отечественные исследования демонстрируют их высокий потенциал. Так, в работе Куликовой Е.В. и соавт. показано, что гиперметилирование *CADM1* и *MAL* достоверно чаще выявляется у женщин с ЦИН 2+ по сравнению с группой без морфологических изменений [40]. Похожие данные приводят Бородина С.А. и соавт., указывая на чувствительность метилирования *CADM1* около 65-70% и специфичность более 80% при выявлении ЦИН 2+ [29].

Экономические аспекты внедрения анализа метилирования в клиническую практику остаются актуальными. Зарубежные исследования показывают, что использование метилирования может снизить количество ненужных кольпоскопий на 30-40%, что потенциально оправдывает стоимость

молекулярных тестов [77]. В России экономические расчёты пока не проводились в полной мере, однако по мнению Шафрановой И.В. и соавт., снижение стоимости тестов и высокие диагностические показатели делают их перспективным инструментом для молекулярной стратификации риска [38].

Необходимо подчеркнуть, что для широкого внедрения тестов на метилирование в отечественную практику требуются дальнейшие многоцентровые исследования, стандартизация лабораторных протоколов, а также валидация пороговых значений в условиях российской популяции. Однако данные литературы свидетельствуют о высоком потенциале этого метода, особенно для использования у женщин группы высокого риска и в качестве дополнительного теста к цитологическому и ВПЧ-скринингу [26,33].

Таким образом, анализ метилирования ДНК представляет собой важное направление в диагностике и прогнозировании ЦИН и РШМ, способное существенно повысить точность выявления предраковых и злокачественных изменений, сократить количество ненужных инвазивных вмешательств и стать частью персонализированного подхода в онкогинекологии [38,40,78].

## **1.6. Сравнение метилирования с существующими методами скрининга и подходами в клинической практике**

В настоящее время основными методами скрининга цервикальных неоплазий являются цитологическое исследование мазков по Папаниколау (ПАП-тест) и тестирование на наличие ДНК высокоонкогенных типов ВПЧ. Цитологическое исследование остаётся традиционной основой скрининга во многих странах, включая Россию, благодаря относительно низкой стоимости и доступности метода [79]. Однако чувствительность цитологического исследования для выявления ЦИН 2+ варьирует в широких пределах - от 50% до 75%, что создаёт риск пропуска значимых поражений [68,80]. В то же время внедрение ВПЧ-тестирования в программы первичного скрининга позволило повысить чувствительность метода до 90-95% в отношении ЦИН 2 и ЦИН 3,

однако это сопровождалось снижением специфичности, особенно у женщин младше 30 лет, у которых ВПЧ-инфекции часто являются транзиторными [26]. Кроме того, позитивный результат ВПЧ-теста сам по себе не позволяет дифференцировать преходящую инфекцию от предраковых изменений, требующих активного вмешательства [80]. По данным Мироновой Т.В. и соавт. специфичность ВПЧ-тестирования у женщин в возрасте 25-34 лет в российской когорте составила лишь 53,2 %, что приводит к высокой частоте ложноположительных результатов и увеличению числа ненужных кольпоскопий [81]. В этой связи особую актуальность приобретают молекулярно-генетические методы, в частности анализ метилирования ДНК, как инструмент для вторичной диагностики ВПЧ-позитивных женщин. В многочисленных исследованиях показано, что определение уровня метилирования промоторных областей генов-супрессоров опухолевого роста обладает более высокой специфичностью в сравнении с ВПЧ-тестом или цитологией при сопоставимой чувствительности [23,74]. Так, в работе Verlaat W. и соав. чувствительность теста на гиперметилирование *FAM19A4* для выявления ЦИН 3+ составила 93%, при специфичности 65%, что сопоставимо или превосходит показатели ПАП-тестирования и ВПЧ-типирования [74].

В Российской Федерации исследования по сравнительной оценке молекулярных тестов и традиционных методов скрининга пока ограничены. Однако результаты пилотного исследования Шафрановой И.В. и соавт. показали, что комбинация ВПЧ-тестирования с анализом метилирования генов *CADM1/MAL* повышает точность выявления ЦИН 2+ с 78% (только ВПЧ-тест) до 89%, при этом специфичность возрастает до 74% [38]. Похожие данные получены в исследовании Куликовой Е.В. и соавт., где специфичность теста на гиперметилирование *CADM1* достигала 82% по сравнению с 58% у цитологического исследования [40].

Необходимо отметить, что несмотря на высокую чувствительность, молекулярные тесты на метилирование всё ещё уступают цитологическому методу по доступности и стоимости, особенно в условиях массовых

скрининговых программ. В работе Perkins R.B. и соав. указывается, что стоимость теста на метилирование может в 2-4 раза превышать затраты на ВПЧ-тестирование, что требует дополнительной экономической оценки при внедрении в рутинную практику [82].

Согласно современным международным рекомендациям, включая ESGO (European Society of Gynaecological Oncology, 2023) и ASCCP (American Society for Colposcopy and Cervical Pathology, 2021), тесты на метилирование рассматриваются в качестве перспективного инструмента для вторичной диагностики у ВПЧ-позитивных женщин, особенно в случаях неопределённых или сомнительных цитологических находок. Однако ни одна из программ скрининга пока не рекомендует их в качестве метода первичного тестирования, за исключением ряда пилотных проектов в Нидерландах и Китае [83].

Таким образом, анализ метилирования ДНК занимает промежуточное положение между высокочувствительным, но мало специфичным ВПЧ-тестированием и более доступной, но менее чувствительной цитологией. Его внедрение в клиническую практику может стать ключевым элементом в персонализированном подходе к скринингу рака шейки матки, особенно в популяциях с высокой распространённостью ВПЧ-инфекции и ограниченными возможностями для повторных обследований.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1. Общая структура работы

Настоящее исследование выполнено в формате одноцентрового проспективного когортного наблюдения на базе амбулаторного приёма Университетской клиники Медицинского научно-образовательного института Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова в период с января 2022 года по октябрь 2023 года. Исследование было проведено в соответствии с международными и отечественными нормами биомедицинской этики, включая положения Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (редакция 2013 года) и правила Надлежащей клинической практики (GCP). Все процедуры, связанные с включением пациенток, сбором, хранением и анализом биоматериала, соответствовали действующему законодательству Российской Федерации. Лабораторная часть исследования выполнялась в отделе лабораторной диагностики Медицинского научно-образовательного института МГУ имени М.В. Ломоносова.<sup>2</sup>

---

<sup>2</sup> При подготовке данного раздела диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором лично или в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования: Anisimova M., Jain M., Shcherbakova L., Aminova L., Bugerenko A., Novitskaya N., Samokhodskaya L., Kokarev V., Inokenteva V., Panina O. Detection of CADM1, MAL, and PAX1 Methylation by ddPCR for Triage of HPV-Positive Cervical Lesions // Biomedicines. 2025. Vol. 13, No 6. Article 1450; Щербакова Л.Н., Кириллова К.И., Залепаев П.В., Анисимова М.А., Бугеренко А.Е., Гайфуллина А.Н., Джайн М., Новицкая Н.А., Огай Д.С., Самоходская Л.М., Панина О.Б. Прогностическое значение вирусной нагрузки ВПЧ высокого онкогенного риска в развитии цервикальной интраэпителиальной неоплазии шейки матки // Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. 2025. Т. 24, № 2. С. 44–52.

Протокол исследования был одобрен локальным этическим комитетом Медицинского научно-образовательного центра МГУ имени М. В. Ломоносова (выписка из протокола заседания № 01/22 от 24 января 2022 года). Все участницы исследования подписали добровольное информированное согласие до забора биоматериала.

На первом этапе были обследованы 121 женщина в возрасте от 21 до 65 лет, обратившиеся в рамках профилактического гинекологического осмотра и наблюдающиеся в отделении онкогинекологии. Всем пациенткам проводился сбор анамнестических данных, включающий социально-демографические характеристики, сведения о репродуктивной функции, наличии гинекологических и экстрагенитальных заболеваний, вредных привычках, особенностях сексуального поведения и используемых методах контрацепции. Кроме того, выполнялся гинекологический осмотр и забор соскоба с шейки матки для последующего цитологического исследования. На основании результатов жидкостной цитологии (по терминологии Bethesda) были сформированы три группы: первую группу составили пациентки с цитологическим заключением NILM ( $n = 66$ ), во вторую вошли женщины с LSIL ( $n = 27$ ), третью группу составили пациентки с заключением HSIL ( $n = 28$ ).

На втором этапе из общей когорты были отобраны 99 женщин для проведения молекулярно-биологического анализа. Отбор осуществлялся на основании совокупных данных цитологического и/или гистологического исследования, а также результатов ВПЧ-типирования. Цитологическое исследование мазков шейки матки выполнялось по методу жидкостной цитологии с применением системы Bethesda. Типирование вируса папилломы человека проводилось с использованием набора реагентов «HPV Квант-21» («ДНК-Технология», Россия), позволяющего детектировать ДНК ВПЧ низкого (6, 11, 44) и высокого (16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82) онкогенного риска. У пациенток с цитологическими признаками HSIL, а также при подозрении на инвазивный процесс

дополнительно выполнялась кольпоскопически контролируемая биопсия или диагностическая конизация с последующим морфологическим подтверждением диагноза. Гистологическая верификация проводилась на парафиновых срезах с использованием стандартных методов окрашивания.

Из 99 отобранных образцов у 91 пациентки была успешно выполнена бисульфитная конверсия ДНК, после чего проведена количественная оценка метилирования промоторных регионов генов *CADM1*, *MAL* и *PAX1*. Для этого использовались два независимых метода: цифровая капельная полимеразная цепная реакция (цк-ПЦР) и количественная ПЦР в реальном времени (real-time ПЦР). В восьми случаях молекулярный анализ выполнить не удалось ввиду технической неудачи на этапе бисульфитной модификации.

Окончательное распределение пациенток по диагностическим группам производилось на основании комплексной оценки цитологических и гистологических данных.

## **2.2. Характеристика обследуемых**

В исследование включались пациентки последовательно проходившие плановый профилактический осмотр в поликлинике, а так же находившиеся под наблюдением в отделении онкогинекологии Университетской клиники Медицинского научно-образовательного института МГУ, в 2022-2023 году и подписавшие добровольное информированное согласие на участие.

### *Критерии включения:*

- возраст от 21 до 65 лет;
- прохождение профилактического гинекологического осмотра или наблюдение в отделении онкогинекологии в МНОИ;
- подписанное информированное согласие на участие в исследовании, включая молекулярно-биологическое исследование цервикального материала.

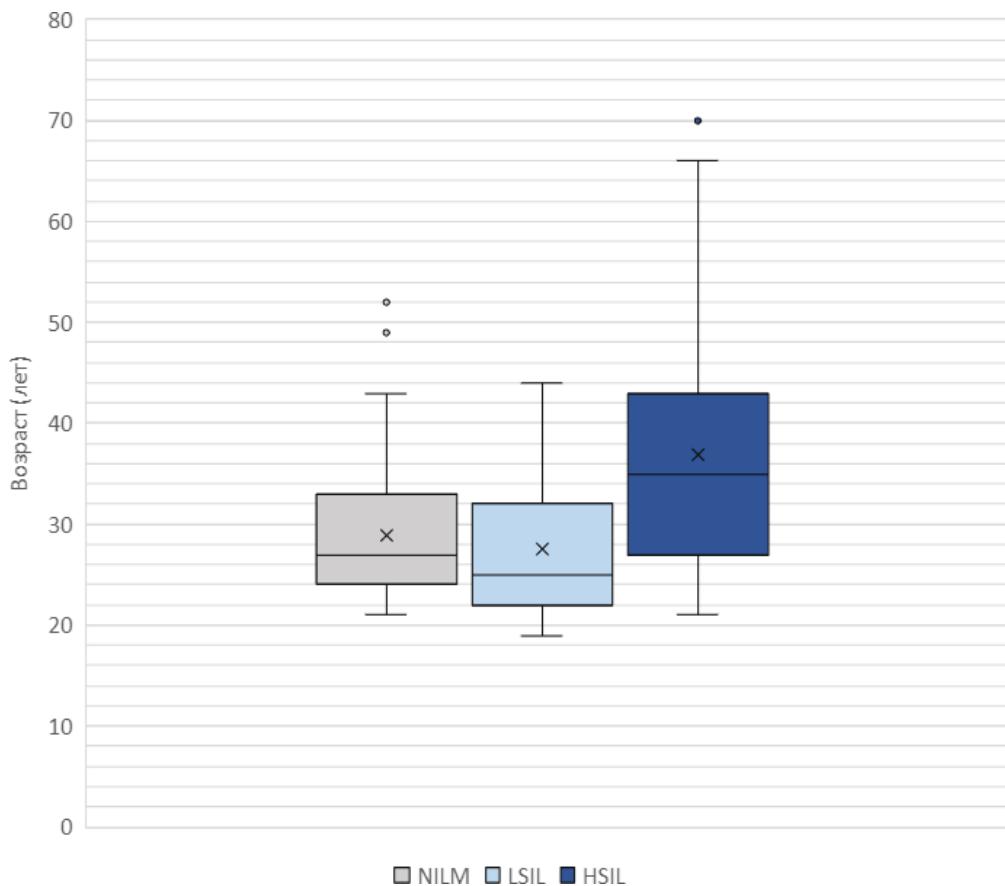
### *Критерии исключения:*

- предшествующее хирургическое лечение по поводу цервикальной интраэпителиальной неоплазии 2-3 степени или инвазивного рака шейки матки;
- наличие активного воспалительного процесса шейки матки или цервикального канала на момент обследования;
- беременность на момент включения в исследование;
- отказ пациентки от участия;
- невозможность получения интерпретируемого результата при молекулярном анализе.

Всего в исследование была включена 121 женщина.

На первом этапе исследования был проведён сбор клинико-анамнестических данных с целью описания особенностей включённых в исследование пациенток, а так же пациентками заполнена анкета (Приложение 1). Результаты структурированы по сформированным диагностическим группам и представлены в виде таблиц и диаграмм.

Средний возраст пациенток в первой группе составил  $28,9 \pm 6,9$  года, во второй -  $27,6 \pm 6,6$  года, в третьей -  $36,9 \pm 11,7$  года (Рисунок 1).



**Рисунок 1.** Возрастная характеристика обследованных пациенток

При оценке индекса массы тела (ИМТ) статистически значимых различий между группами не выявлено (Таблица 1).

**ИМТ обследованных пациенток**

ИМТ	1 группа NILM		2 группа LSIL		3 группа HSIL	
	n = 66		n = 27		n = 28	
	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%
< 18,5	10	15,2%	7	25,9%	3	10,7%
18,5 - 24,99	47	71,2%	14	51,9%	15	53,6%
25 - 29,99	4	6,1%	5	18,5%	4	14,3%
30 - 34,99 (I-я степень)	5	7,6%	1	3,7%	4	14,3%

**Таблица 1**

35 - 39,99 (II-я степень)	0	0,0%	0	0,0%	1	3,6%
> 40 (III-я степень)	0	0,0%	0	0,0%	1	3,6%
Средний ИМТ	$21,8 \pm 3,6$		$21,6 \pm 4,3$		$24,7 \pm 6,6$	

*p>0,05 статистически значимых различий между группами не выявлено*

Среди экстрагенитальных заболеваний наиболее часто встречались патологии сердечно-сосудистой, пищеварительной, эндокринной и мочевыделительной систем. В структуру заболеваний сердечно-сосудистой системы входили пролапс митрального клапана, синусовая тахикардия и варикозная болезнь вен нижних конечностей. Патология желудочно-кишечного тракта включала хронический гастрит, язвенную болезнь, гастроэзофагеальную рефлюксную болезнь, синдром раздражённого кишечника, а также заболевания гепатобилиарной зоны (киста печени, синдром Жильбера, перенесённый вирусный гепатит А). Заболевания ЛОР-органов были представлены хроническим риносинуситом, тонзиллитом и фарингитом. К патологии мочевыделительной системы относились хронический цистит и пиелонефрит. Эндокринные нарушения включали сахарный диабет 2 типа, гипо- и гипертиреоз. Среди офтальмологических заболеваний преобладали миопия и гиперметропия, из патологии опорно-двигательного аппарата - артрит и артроз. Частота экстрагенитальной патологии в исследуемых группах приведена в таблице 2.

**Таблица 2**

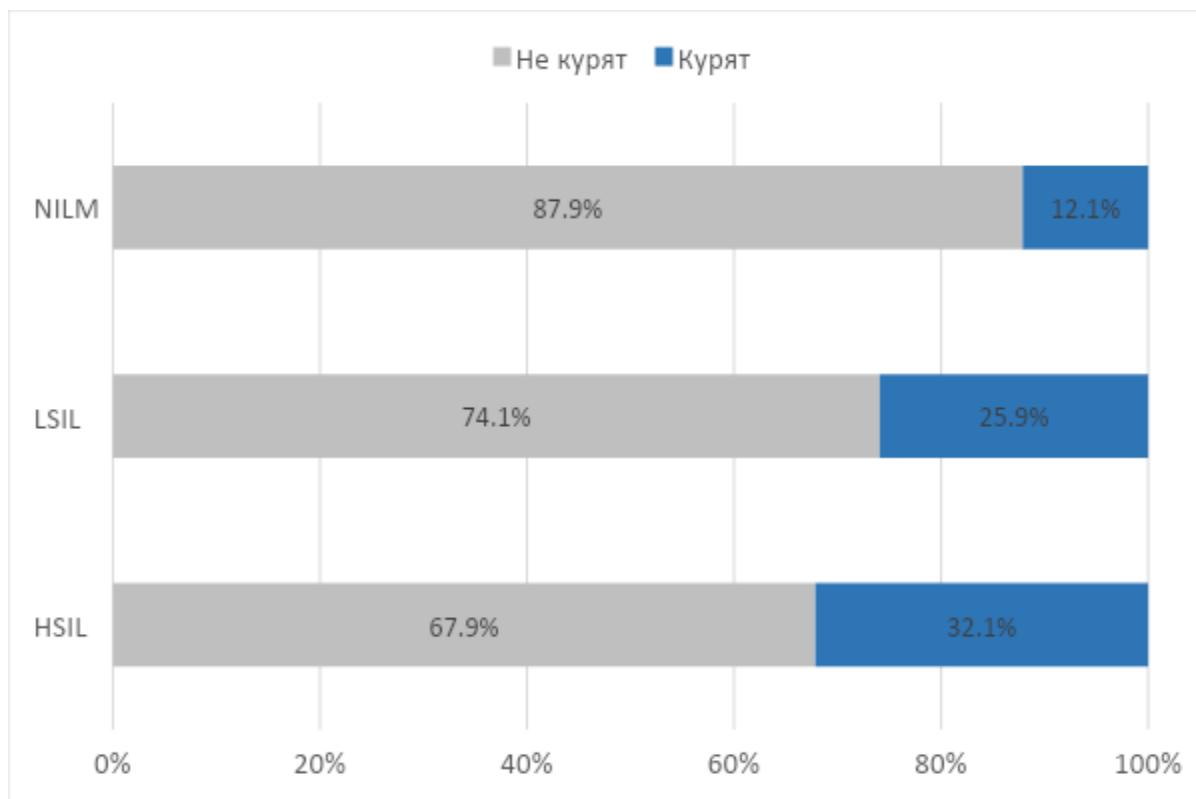
**Структура экстрагенитальной патологии у обследованных пациенток**

Заболевание	1 группа NILM	2 группа LSIL	3 группа HSIL
	n = 66	n = 27	n = 28

	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%
Заболевания органов сердечно-сосудистой системы	4	6,1%	5	18,5%	3	10,7%
Заболевания желудочно-кишечного тракта	8	12,1%	1	3,7%	6	21,4%
Заболевания ЛОР органов	4	6,1%	2	7,4%	2	7,1%
Заболевания органов мочевыделения	8	12,1%	3	11,1%	4	14,3%
Эндокринологические заболевания	5	7,6%	2	7,4%	2	7,1%
Офтальмологические заболевания	1	1,5%	2	7,4%	2	7,1%
Заболевания опорно-двигательного аппарата	2	3,0%	0	0,0%	3	10,7%

*p>0,05 статистически значимых различий между группами не выявлено*

Анализ распространённости табакокурения выявил тенденцию к увеличению доли курящих женщин от первой к третьей группе: 12,1%, 25,9% и 32,1% соответственно (Рисунок 2).



**Рисунок 2.** Табакокурение среди обследованных пациенток

Наиболее часто выявляемыми гинекологическими заболеваниями среди обследованных были миома матки и эндометриоз. Частота миомы матки составила 21,2% в первой группе, 7,4% - во второй и 28,6% - в третьей. Эндометриоз был диагностирован у 16,7%, 14,8% и 25,0% женщин соответственно (Таблица 3).

**Таблица 3**

**Структура гинекологической патологии у обследованных пациенток**

Заболевание	1 группа NILM		2 группа LSIL		3 группа HSIL	
	n = 66		n = 27		n = 28	
	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%
Миома матки	14	21,2%	2	7,4%	8	28,6%
Эндометриоз	11	16,7%	4	14,8%	7	25,0%
Кольпит/Цервицит	4	6,1%	5	18,5%	2	7,1%

Гиперплазия/Полипы эндометрия	4	6,1%	0	0,0%	2	7,1%
Мультифолликулярные яичники	3	4,5%	1	3,7%	0	0,0%
Киста яичника	3	4,5%	1	3,7%	2	7,1%
СПКЯ	5	7,6%	1	3,7%	0	0,0%
Нарушения менструального цикла	2	3,0%	2	7,4%	0	0,0%
Бесплодие	0	0,0%	2	7,4%	0	0,0%
Вагинит	1	1,5%	1	3,7%	0	0,0%
Уреаплазмоз	1	1,5%	2	7,4%	0	0,0%

*p>0,05 статистически значимых различий между группами не выявлено*

Возраст наступления менархе в группах был сопоставим:  $13,0 \pm 1,0$  лет в первой группе,  $12,9 \pm 1,3$  - во второй и  $13,2 \pm 0,9$  - в третьей (Таблица 4). У большинства пациенток менархе наступило в возрасте 11-14 лет (97,0%, 92,6% и 92,9% соответственно). Статистически значимых различий между группами по возрасту наступления менархе, продолжительности, регулярности и обильности менструаций не выявлено ( $p > 0,05$ ).

**Таблица 4**

**Возраст менархе у обследованных пациенток**

Возраст менархе	1 группа NILM		2 группа LSIL		3 группа HSIL		p	
	n = 66		n = 27		n = 28			
	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%		
11-12	17	25,8%	10	37,0%	7	25,0%	$p_1 = 0,277$ $p_2 = 0,939$	

13-14	47	71,2%	15	55,6%	19	67,9%	$p_1 = 0,146$ $p_2 = 0,745$
$\geq 15$	2	3,0%	2	7,4%	2	7,1%	$p_1 = 0,703$ $p_2 = 0,731$
Среднее	$13,0 \pm 1,0$		$12,9 \pm 1,3$		$13,2 \pm 0,9$		$p_1 = 0,462$ $p_2 = 0,230$

$p > 0,05$  статистически значимых различий между группами не выявлено

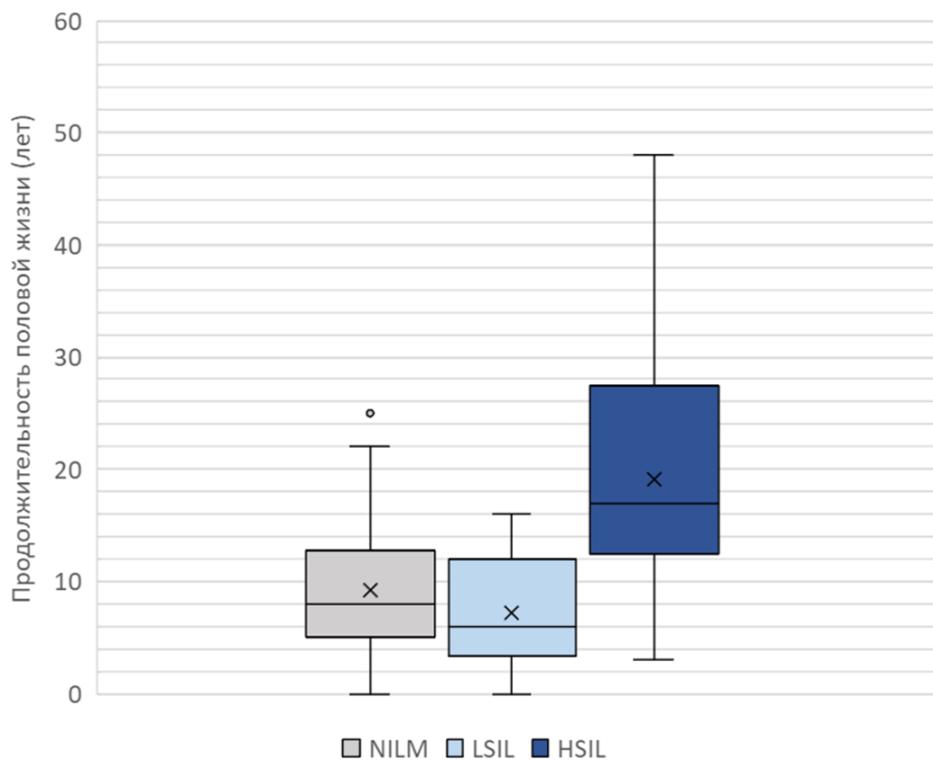
Раннее начало половой жизни (до 18 лет) отмечено у 18,2% женщин первой группы, 37,0% - второй и 28,6% - третьей (Таблица 5). Средний возраст начала половой жизни составил  $19,0 \pm 3,4$  года,  $18,8 \pm 2,2$  года и  $17,9 \pm 0,8$  года соответственно. Достоверных различий по этим показателям между группами не отмечено ( $p > 0,05$ ).

**Таблица 5**

**Возраст начала половой жизни у обследованных пациенток**

Возраст начала половой жизни	1 группа		2 группа		3 группа		p	
	NILM		LSIL		HSIL			
	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%		
< 18	12	18,2%	10	37,0%	8	28,6%	$p_1 = 0,053$ $p_2 = 0,261$	
18-20	41	62,1%	12	44,4%	20	71,4%	$p_1 = 0,119$ $p_2 = 0,388$	
> 20	13	19,7%	5	18,5%	0	0,0%	$p_1 = 0,875$ <b><math>p_2 = 0,028</math></b>	
Среднее	$19,0 \pm 3,4$		$18,8 \pm 2,2$		$17,9 \pm 0,8$		$p_1 = 0,621$ $p_2 = 0,096$	

$p_1$  — 1 группа vs 2 группа,  $p_2$  — 1 группа vs 3 группа



**Рисунок 3.** Продолжительность половой жизни у обследованных пациенток

Интерес представляет показатель продолжительности половой жизни: в группе женщин с половым анамнезом более 10 лет статистически значимое различие было выявлено между первой и третьей группами ( $p < 0,001$ ) (Таблица 6).

**Таблица 6**

**Продолжительность половой жизни у обследованных пациенток**

Продолжительность (лет)	1 группа NILM		2 группа LSIL		3 группа HSIL		p	
	n = 66		n = 27		n = 28			
	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%		
≤ 10	45	68,2%	20	74,1%	5	17,9%	$p_1 = 0,574$ $p_2 < 0,001$	
> 10	21	31,8%	7	25,9%	23	82,1%	$p_1 = 0,574$ $p_2 < 0,001$	

$p1$  — 1 группа vs 2 группа,  $p2$  — 1 группа vs 3 группа

Анализ сексуальной активности включал оценку количества половых партнёров (Таблица 7). Используемые методы контрацепции включали барьерные средства, прерванный половой акт и комбинированные оральные контрацептивы. Наиболее распространённым методом являлось применение презерватива, доля которого составила 48,5%, 33,3% и 25,0% соответственно (Таблица 8).

Таблица 7

## Количество половых партнёров у обследованных пациенток

Количество половых партнёров	1 группа		2 группа		3 группа		p	
	NILM		LSIL		HSIL			
	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%		
1	9	13,6%	2	7,4%	0	0,0%	$p_1 = 0,624$ $p_2 = 0,095$	
2	27	40,9%	15	55,6%	6	21,4%	$p_1 = 0,198$ $p_2 = 0,071$	
3	22	33,3%	4	14,8%	9	32,1%	$p_1 = 0,121$ $p_2 = 0,911$	
4 и более	8	12,1%	6	22,2%	13	46,4%	$p_1 = 0,217$ $p_2 = < 0,001$	

$p1$  — 1 группа vs 2 группа

$p2$  — 1 группа vs 3 группа

Таблица 8

## Методы контрацепции у обследованных пациенток

Контрацепция	1 группа		2 группа		3 группа		p
	NILM		LSIL		HSIL		
n = 66	n = 27	n = 28					

	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	
Барьерная	32	48,5%	9	33,3%	7	25,0%	$p_1 = 0,182$ $p_2 = 0,035$
КОК	16	24,2%	7	25,9%	4	14,3%	$p_1 = 0,865$ $p_2 = 0,422$
ППА	18	27,3%	11	40,7%	17	60,7%	$p_1 = 0,204$ $p_2 = 0,003$

$p1$  — 1 группа vs 2 группа

$p2$  — 1 группа vs 3 группа

Акушерский анамнез показал наличие беременностей у 18,2% пациенток первой группы, 29,6% - второй и 60,7% - третьей. Подробная информация приведена в таблице 9.

**Таблица 9**

**Паритет обследованных пациенток**

Показатель	1 группа NILM		2 группа LSIL		3 группа HSIL		p	
	n = 66		n = 27		n = 28			
	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%		
Число беременностей								
0	54	81,8%	19	70,4%	11	39,3%	$p_1 = 0,223$ $p_2 < 0,001$	
1	7	10,6%	3	11,1%	8	28,6%	$p_1 = 0,767$ $p_2 = 0,030$	
2	2	3,0%	1	3,7%	2	7,1%	$p_1 = 0,632$ $p_2 = 0,731$	
3 и более	3	4,5%	4	14,8%	7	25,0%	$p_1 = 0,204$ $p_2 = 0,011$	

Число самопроизвольных родов							
1	7	10,6%	2	7,4%	6	21,4%	$p_1 = 0,931$ $p_2 = 0,165$
2	1	1,5%	2	7,4%	3	10,7%	$p_1 = 0,417$ $p_2 = 0,144$
3 и более	1	1,5%	0	0,0%	2	7,1%	$p_1 = 0,643$ $p_2 = 0,437$
Число операций кесарево сечение							
1	0	0,0%	1	3,7%	3	10,7%	$p_1 = 0,643$ <b><math>p_2 = 0,040</math></b>
Число абортов/выкидышей							
1	5	7,6%	3	11,1%	6	21,4%	$p_1 = 0,886$ $p_2 = 0,119$
2	2	3,0%	3	11,1%	2	7,1%	$p_1 = 0,289$ $p_2 = 0,731$
3	0	0,0%	1	3,7%	2	7,1%	$p_1 = 0,643$ $p_2 = 0,158$

$p1$  — 1 группа vs 2 группа

$p2$  — 1 группа vs 3 группа

Выбранные методы статистического анализа позволяют объективно оценить взаимосвязи между клинико-эпидемиологическими, вирусологическими и молекулярно-биологическими параметрами, что легло в основу интерпретации результатов, представленных в главе 3.

### 2.3. Методы исследования

У всех пациенток, включённых в исследование, с их добровольного согласия осуществлялся забор цервикального материала путём мазка из цервикального канала. Забор материала осуществлялся с использованием стерильного цервикального зонда и проводился до выполнения любых инвазивных процедур. Образцы помещались в герметичные пробирки, содержащие транспортную среду с муколитическим агентом, и хранились при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$  до момента выделения ДНК.

Извлечение ДНК из цервикальных мазков осуществлялось с применением набора ПРОБА-НК-ПЛЮС (ООО «ДНК-Технология», Москва, Россия) в соответствии с протоколом производителя. После экстракции пробы немедленно замораживались при температуре  $-80^{\circ}\text{C}$  и сохранялись до момента дальнейшего анализа. Перед последующим использованием все образцы размораживались при комнатной температуре, тщательно перемешивались импульсным вортексированием и центрифугировались при  $11000\times g$  в течение одной минуты. Ни один из образцов не подвергался более чем одному циклу замораживания-оттаивания.

Бисульфитное преобразование ДНК, необходимое для анализа метилирования, проводилось с использованием набора BisQuick (ЗАО «Евроген», Россия) согласно инструкции производителя. Контроль качества выделенной ДНК проводился спектрофотометрически на приборе NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc., США). Дополнительно оценивалась полнота бисульфитной модификации с использованием ПЦР с праймерами, специфичными к немодифицированному участку гена *ACTB*.

Определение ВПЧ-статуса и типирование выполнялось на амплификаторе ДТпрайм (ООО «ДНК-Технология», Россия) с применением набора реагентов HPV Квант-21, позволяющего проводить как качественную, так и количественную оценку вирусной нагрузки. Методика обеспечивает выявление ВПЧ низкого онкогенного риска (типы 6, 11, 44) и

высокоонкогенных типов: 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73 и 82.

Анализ метилирования промоторных регионов генов *CADM1*, *MAL* и *PAX1* проводился двумя независимыми методами: цифровой капельной полимеразной цепной реакцией (цк-ПЦР) и количественной ПЦР в реальном времени (real-time ПЦР).

Цифровая капельная ПЦР выполнялась на платформе QX200 AutoDG ddPCR (Bio-Rad, США). Амплификация проводилась на термоциклире Veriti 96-Well Thermal Cyclers (Life Technologies, США) по следующей схеме: инкубация при 95 °C (10 минут), 45 циклов денатурации при 94 °C (30 секунд) и отжига/элонгации при 54 °C (для *MAL/ACTB* и *CADM1/ACTB*) и 60 °C (для *PAX1/ACTB*) в течение 1 минуты, финальная стадия - 98 °C (10 минут). Реакционная смесь готовилась в объёме 22 мкл и включала: 11 мкл ddPCR Supermix for Probes (Bio-Rad), 0,9 мкМ праймеров, 0,25 мкМ зондов и 2 мкл бисульфит-преобразованной ДНК.

Количественная ПЦР в реальном времени проводилась на платформе CFX96 Touch System (Bio-Rad, США). Амплификацию выполняли по следующему протоколу: инкубация при 95 °C (5 минут), далее 45 циклов: денатурация при 95 °C (15 секунд), отжиг/элонгация при 64 °C для *PAX1/ACTB*, 62 °C для *CADM1/ACTB* и 60 °C для *MAL/ACTB* (30 секунд). Объём реакции составлял 20 мкл: 4 мкл real-time ПЦРmix-HS (ЗАО «Евроген», Россия), 0,4 мкМ праймеров, 0,2 мкМ зондов и 2 мкл ДНК.

Для количественной интерпретации уровня метилирования использовались следующие подходы:

Формула расчёта метилирования при real-time ПЦР:

$$\text{MethDNA (\%)} = 2^{(-\Delta\Delta Ct)} \times 100 / [2^{(-\Delta\Delta Ct)} + 1],$$

где  $\Delta\Delta Ct = (Ctmeth - CtACTB)_{\text{sample}} - (Ctmeth - CtACTB)_{\text{control}}$ .

Контрольным образцом считался стандарт Qiagen, содержащий смесь метилированной и неметилированной ДНК (1:1). В случае, если показатель метилирования превышал 100%, значение принималось равным 100%. При

отсутствии амплификации (Ct<sub>meth</sub> не определялся) значение MethDNA принималось равным 0%.

Формула для расчета метилирования при цк-ПЦР:

MethDNA (%) = [количество копий метилированной формы целевого гена (в копиях/мкл) / уровень ACTB (в копиях/мкл)] × 100.

Данный подход позволяет сравнивать данные с результатами других исследований и обеспечивает высокую точность в определении доли метилированной ДНК. Повторные измерения проводились при несоответствии качества (менее 10 000 капель на лунку или ACTB < 100 копий в лунке для цк-ПЦР, Ct<sub>ACTB</sub> > 32 - для real-time ПЦР). Для контроля межсерийной воспроизводимости в каждый прогон включался положительный контроль. Отклонение результатов не должно превышать 10%.

Таким образом, молекулярно-биологический анализ обеспечивал высокую чувствительность и специфичность количественной оценки уровня метилирования ключевых генов-мишеней, потенциально ассоциированных с прогрессированием интраэпителиальных неоплазий шейки матки.

Статистический анализ был осуществлен в компьютерной программе IBM SPSS Statistics 26.0 (IBM, Армонк, Нью-Йорк, США). Количественные показатели, полученные при молекулярно-биологическом анализе, были представлены в двух формах: общее содержание ДНК (определенное по количеству копий неметилированного гена ACTB на микролитр реакционной смеси) и уровень метилирования ДНК, выраженный в процентах.

Для оценки уровня метилирования по данным количественной ПЦР в реальном времени использовалась формула:

Метилирование ДНК (%) =  $2^{(-\Delta\Delta Ct)} / [2^{(-\Delta\Delta Ct)} + 1] \times 100$ ,

где  $\Delta\Delta Ct$  - разность между  $\Delta Ct$  исследуемого образца и  $\Delta Ct$  контрольного образца.

Значение  $\Delta Ct$  рассчитывалось как разность пороговых циклов амплификации метилированного и неметилированного участков.

Контрольный образец представлял собой смесь коммерчески доступной метилированной и неметилированной ДНК (Qiagen, Германия) в объёме по 1 мкл.

Расчёт уровня метилирования при цифровой капельной ПЦР проводился по формуле:

Метилирование ДНК (%) = (число копий метилированного фрагмента / число копий неметилированного гена АСТВ) × 100.

Данный подход обеспечивает высокую чувствительность и точность количественной оценки даже при низком уровне метилирования, что особенно актуально в условиях клинической диагностики и при анализе предраковых изменений.

Перед расчётами все образцы проходили контроль качества, включающий оценку числа целевых капель и концентрации. Образцы, в которых выявлялось менее 10 положительных капель, исключались из анализа как недостоверные.

Оценка распределения количественных переменных на соответствие нормальному закону проводилась с использованием критерия Шапиро-Уилка. Поскольку ни одна из изучаемых переменных не соответствовала нормальному распределению, для анализа применялись непараметрические методы. Для сравнения связанных количественных величин использовался критерий Уилкоксона, для качественных - критерий Мак-Немара. При сравнении независимых групп применялись критерий Манна-Уитни и точный критерий Фишера соответственно.

Результаты количественных показателей представлены в виде медианы с указанием межквартильного размаха (25-й и 75-й процентили); в случаях с низкой частотой выявления некоторых признаков дополнительно указывались 10-й и 90-й процентили.

Диагностическая значимость уровня метилирования и вирусной нагрузки оценивалась с помощью анализа операционных характеристик (ROC-анализ), позволяющего построить кривые чувствительности и

специфичности. Для определения оптимальных пороговых значений использовался индекс Юдена.

Для выявления взаимосвязей между количественными переменными применялся коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Оценка силы корреляции проводилась по шкале Чаддока: от очень слабой ( $<0,3$ ) до очень высокой ( $> 0,9$ ).

В рамках анализа факторов риска развития цервикальных интраэпителиальных неоплазий проводился однофакторный и многофакторный логистический регрессионный анализ с использованием метода максимального правдоподобия. В модели включались демографические, поведенческие, вирусологические и репродуктивные характеристики. Уровень статистической значимости во всех случаях задавался как  $p<0,05$ . Коррекция на множественные сравнения не проводилась, поскольку параллельного сравнения нескольких групп не осуществлялось.

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

### 3.1. Анализ модифицируемых и немодифицируемых факторов риска цервикальных интраэпителиальных неоплазий

В рамках настоящего исследования был проведён сравнительный статистический анализ социально-демографических, поведенческих и репродуктивных характеристик пациенток трёх диагностических групп: NILM, LSIL и HSIL.<sup>3</sup>

Средний возраст обследованных женщин варьировал от 21 до 65 лет. Средний возраст в группе с NILM составил  $28,9 \pm 6,9$  лет, в группе LSIL -  $27,6 \pm 6,6$  года, в группе HSIL -  $36,9 \pm 11,7$  года. Согласно результатам анализа, пациентки с HSIL были статистически достоверно старше, чем пациентки группы NILM ( $p = 0,001$ ). При дополнительной стратификации по возрасту обращает на себя внимание показатель старше 30 лет: в этой возрастной категории разница между группами NILM и HSIL была наиболее выраженной ( $p < 0,001$ ), также достоверные различия выявлены между группами LSIL и HSIL ( $p = 0,002$ ) (Таблица 10).

---

<sup>3</sup> При подготовке данного раздела диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором лично или в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования: Anisimova M., Jain M., Shcherbakova L., Aminova L., Bugerenko A., Novitskaya N., Samokhodskaya L., Kokarev V., Inokenteva V., Panina O. Detection of CADM1, MAL, and PAX1 Methylation by ddPCR for Triage of HPV-Positive Cervical Lesions // Biomedicines. 2025. Vol. 13, No. 6. Article 1450; Щербакова Л.Н., Кириллова К.И., Залепаев П.В., Анисимова М.А., Бугеренко А.Е., Гайфуллина А.Н., Джайн М., Новицкая Н.А., Огай Д.С., Самоходская Л.М., Панина О.Б. Прогностическое значение вирусной нагрузки ВПЧ высокого онкогенного риска в развитии цервикальной интраэпителиальной неоплазии шейки матки // Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. 2025. Т. 24, № 2. С. 44–52; Анисимова М.А., Щербакова Л.Н., Бугеренко А.Е., Джайн М., Кириллова К.И., Самоходская Л.М., Панина О.Б. Факторы риска развития интраэпителиальных неоплазий шейки матки // Архив акушерства и гинекологии им. В. Ф. Снегирёва. 2024. Т. 11, № 4. С. 480–489.

Таблица 10

## Возрастная характеристика обследованных пациенток

Возраст (лет)	1 группа NILM		2 группа LSIL		3 группа HSIL		p	
	n = 66		n = 27		n = 28			
	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%		
≤ 30	45	68,2%	19	70,4%	8	28,6%	p <sub>1</sub> = 0,837 p <sub>2</sub> < 0,001	
> 30	21	31,8%	8	29,6%	20	71,4%	p <sub>1</sub> = 0,837 p <sub>2</sub> < 0,001	

p1 — 1 группа vs 2 группа, p2 — 1 группа vs 3 группа

Изучение анамнеза экстрагенитальной и гинекологической патологии не выявило статистически значимых различий в частоте выявления сопутствующих заболеваний между группами (Таблица 3,5).

Анализ распространённости табакокурения продемонстрировал рост доли курящих женщин от группы с NILM к группе с HSIL: 12,1%, 25,9% и 32,1% соответственно. При этом в группе HSIL курящих было статистически достоверно больше по сравнению с группой NILM (p = 0,022;  $\chi^2 = 5,320$ ), в то время как различия между группами NILM и LSIL статистической значимости не достигли.

При анализе полового поведения выявлено, что показатель продолжительности половой жизни свыше 10 лет ассоциирован с большей частотой тяжёлых интраэпителиальных поражений. Так, в группе HSIL этот показатель составил 82,1%, в то время как в группе NILM - 31,8% (p < 0,001;  $\chi^2 = 6,630$ ). Средняя продолжительность половой жизни у пациенток с HSIL составила  $19,1 \pm 10,6$  года, что достоверно выше по сравнению с группами NILM ( $9,1 \pm 6,0$  года) и LSIL ( $7,1 \pm 4,9$  года).

Показатель раннего начала половой жизни (до 18 лет) статистически значимо не различался между группами (18,2% - в группе NILM, 37,0% - LSIL,

28,6% - HSIL). Средний возраст начала половой жизни также не показал достоверных различий ( $19,0 \pm 3,4$ ,  $18,8 \pm 2,2$  и  $17,9 \pm 0,8$  года соответственно).

Анализ сексуальной активности показал, что наличие четырёх и более половых партнёров за жизнь достоверно чаще отмечалось у пациенток с HSIL (46,4%) по сравнению с пациентками группы NILM (12,1%) ( $p = 0,022$ ;  $\chi^2 = 6,635$ ).

Изучение используемых методов контрацепции показало, что использование презервативов достоверно чаще отмечалось в группе NILM (48,5%) по сравнению с группой HSIL (25,0%) ( $p = 0,035$ ;  $\chi^2 = 4,467$ ). Частота использования комбинированных оральных контрацептивов (КОК) не отличалась между группами (24,2%, 25,9% и 14,3% соответственно;  $p > 0,05$ ).

Анализ акушерского анамнеза выявил, что в группе HSIL достоверно чаще встречались женщины с тремя и более беременностями по сравнению с группой NILM (25,0% против 4,5%,  $p = 0,004$ ;  $\chi^2 = 8,652$ ). Кроме того, в группе HSIL была зафиксирована большая частота родоразрешений путём кесарева сечения (10,7% против 0,0% в группе NILM), различия были статистически значимыми.

### **3.2. Распределение типов ВПЧ и анализ вирусной нагрузки у пациенток с различными поражениями шейки матки**

Для молекулярного анализа были отобраны 99 пациенток на основании данных цитологического и, при наличии, гистологического заключения. ВПЧ высокого онкогенного риска был выявлен у 73 из 99 пациенток.

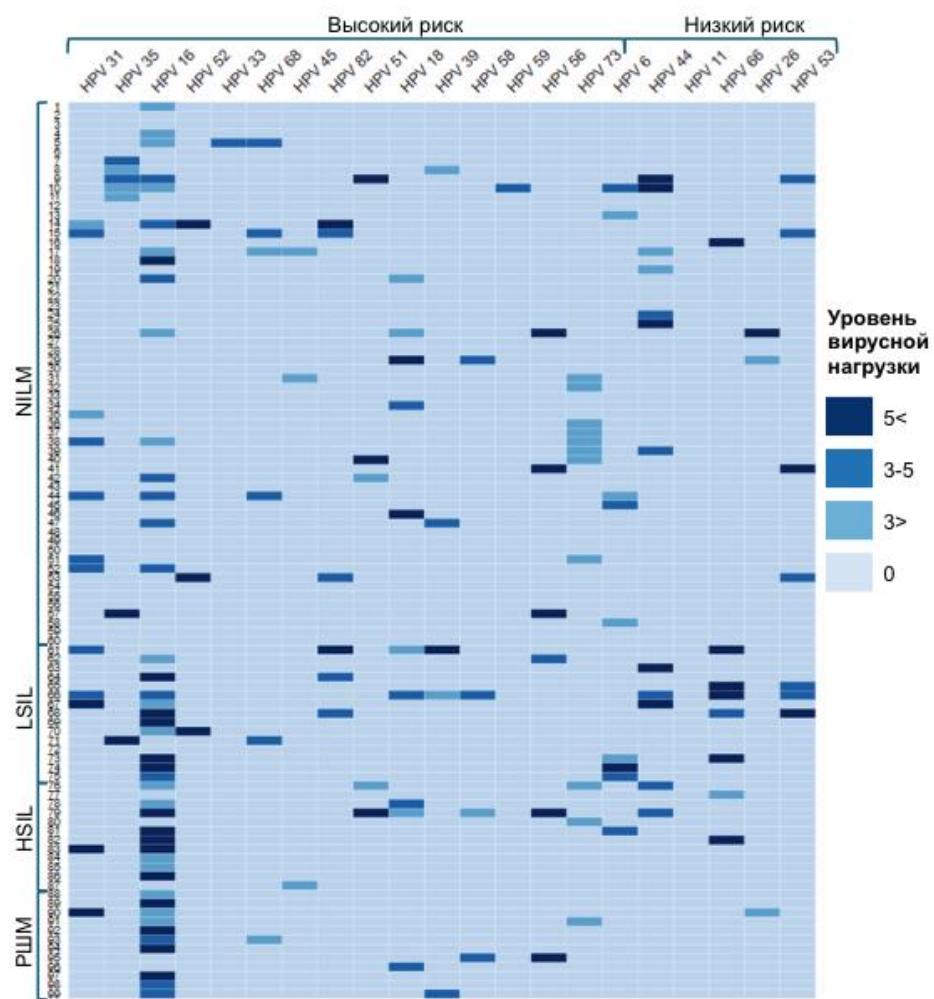
Среди них у 34 пациенток с наличием ВПЧ цитологические и/или гистологические признаки интраэпителиальных поражений или злокачественности отсутствовали. Заключение NILM было сформировано у 29 пациенток по результатам цитологического исследования и у 5 - по данным гистологии. У 15 пациенток были диагностированы поражения низкой степени (LSIL), в том числе у 10 по цитологии и у 5 - по гистологии. У 12 пациенток

по данным гистологического исследования были выявлены поражения высокой степени (HSIL), и ещё у 12 - подтверждён инвазивный рак шейки матки. Диагностическое распределение представлено в таблице 11.

**Таблица 11**  
**Наличие ВПЧ и состояние шейки матки**

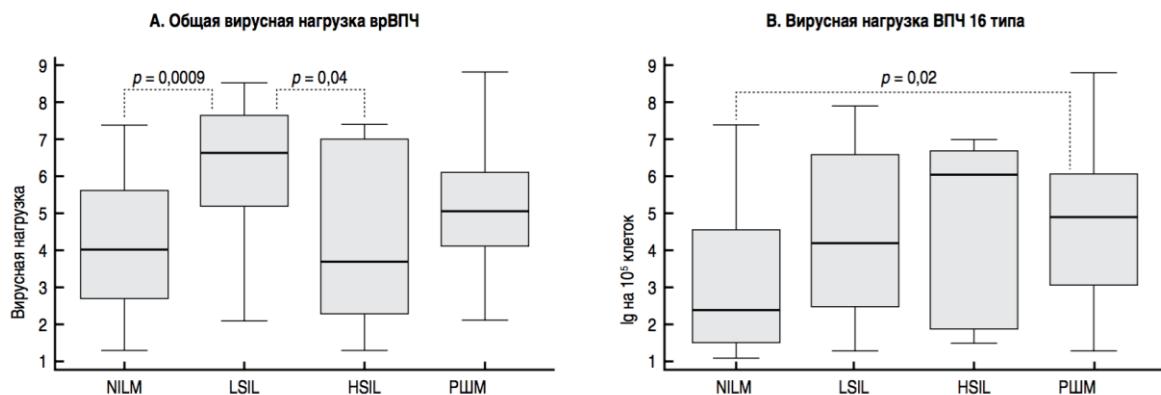
Состояние шейки матки	Группа контроля (отсутствие ВПЧ) (n = 26)	Основная группа (наличие ВПЧ) (n = 73)	Всего
NILM	25 (100%)	34 (100%)	62 (63%)
LSIL	-	15 (36%)	13 (13%)
HSIL	-	12 (32%)	12 (12%)
РШМ / CC	-	12 (32%)	12 (12%)

Анализ носительства различных типов ВПЧ и соответствующего уровня вирусной нагрузки у всех обследованных пациенток визуализирован на тепловой карте (Рисунок 4). Зафиксировано увеличение вирусной нагрузки с нарастанием степени тяжести поражения, особенно при инфицировании ВПЧ 16 типа. Помимо него, наиболее часто выявлялись типы ВПЧ 31, 73 и 18. У 57,7% пациенток отмечено инфицирование несколькими типами ВПЧ одновременно.



**Рисунок 4.** Вирусная нагрузка ВПЧ у пациенток с NILM, LSIL, HSIL, РШМ (тепловая карта).

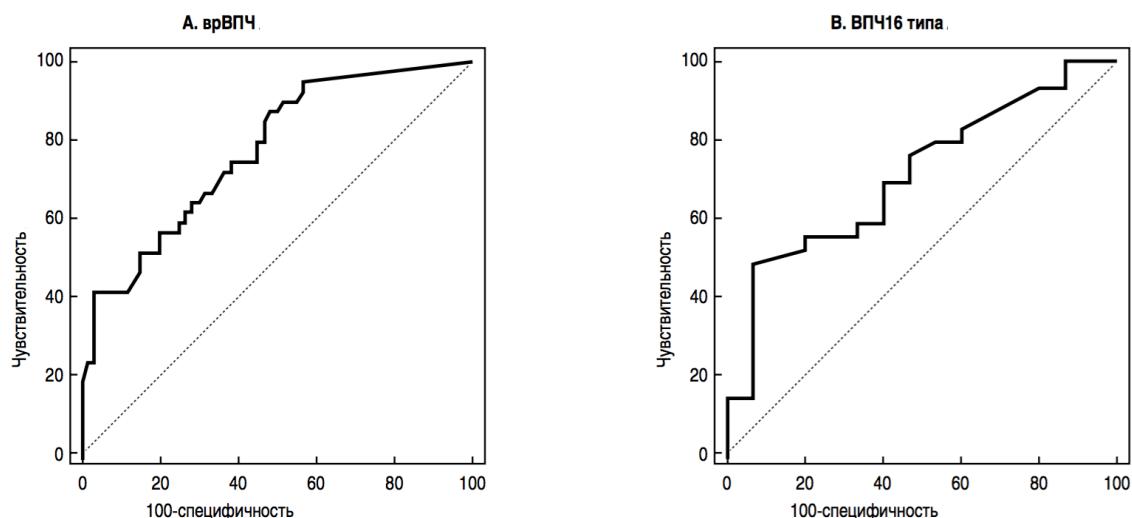
Сопоставление общего уровня вирусной нагрузки и уровня вирусной нагрузки ВПЧ 16 с морфологическими заключениями показало отсутствие статистически значимых различий между группами NILM, LSIL, HSIL и рак шейки матки (тест Краскела-Уоллиса). Однако при попарном сравнении выявлены достоверные различия: уровень общей вирусной нагрузки был выше у пациенток с LSIL по сравнению с пациентками с NILM ( $p = 0,0009$ ), при этом у пациенток с HSIL уровень общей вирусной нагрузки оказался ниже, чем при LSIL ( $p = 0,04$ ). Уровень вирусной нагрузки ВПЧ 16 был достоверно выше у пациенток с раком шейки матки по сравнению с другими группами ( $p = 0,02$ ) (Рисунок 5).



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

Высокая вирусная нагрузка (более 5  $lg$  на  $10^5$  клеток) определялась у 20% пациенток с NILM и только у 3% - на уровне более 7  $lg$ . У пациенток с LSIL высокая вирусная нагрузка встречалась в 67% случаев, тогда как при HSIL и раке шейки матки - в 42%. В возрастной группе до 30 лет высокая вирусная нагрузка чаще наблюдалась при LSIL, тогда как у женщин старше 30 лет она преобладала в группах HSIL и рак шейки матки.

Анализ ROC-кривых показал, что прогностическая значимость общей вирусной нагрузки ВПЧ для выявления LSIL/HSIL/рак шейки матки составила AUC = 0,77 (95% ДИ: 0,67-0,85), а вирусной нагрузки ВПЧ 16 - AUC = 0,71 (95% ДИ: 0,55-0,84) (Рисунок 6).



**Рисунок 6.** Оценка прогностической значимости вирусной нагрузки в развитии заболеваний шейки матки (А - данные для врВПЧ в целом, Б - для ВПЧ 16).

Шансы выявления патологии эпителия шейки матки возрастали при увеличении вирусной нагрузки: при среднем уровне ( $>3 \text{ lg}$ ) - в 1,7 раза, при высоком уровне ( $>5 \text{ lg}$ ) - в 3,7 раза. У всех пациенток с высоким титром ВПЧ 16 были выявлены аномальные цитологические изменения (Таблица 12).

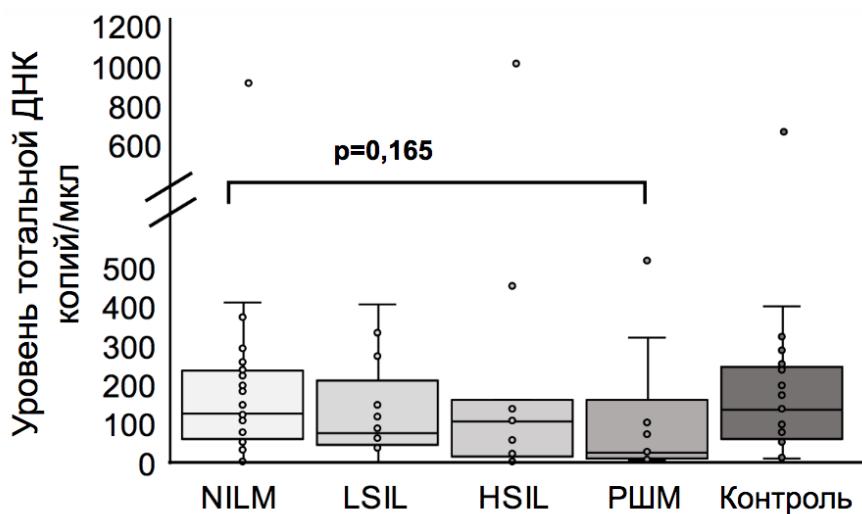
**Таблица 12**  
**Логистическая регрессия пороговых значений вирусной нагрузки**

Пороговые значения вирусной нагрузки	Логистическая регрессия (NILM vs LSIL/HSIL/РИМ, ОШ (95% ДИ))
ВПЧ менее 3 lg на $10^5$ клеток /	1,30 (1,03-1,66)
ВПЧ более 3 lg на $10^5$ клеток /	1,71 (1,11-2,65)
ВПЧ более 5 lg на $10^5$ клеток /	3,68 (1,35-9,9)
ВПЧ 16 тип менее 3 lg на $10^5$ клеток /	1,58 (1,29-1,95)
ВПЧ 16 тип более 3 lg на $10^5$ клеток /	2,10 (1,01-4,34)
ВПЧ 16 тип более 5 lg на $10^5$ клеток	не применимо

### **3.3. Сравнительная характеристика методов количественной оценки метилирования генов *CADM1*, *MAL* и *PAX1*: цк-ПЦР и real-time ПЦР**

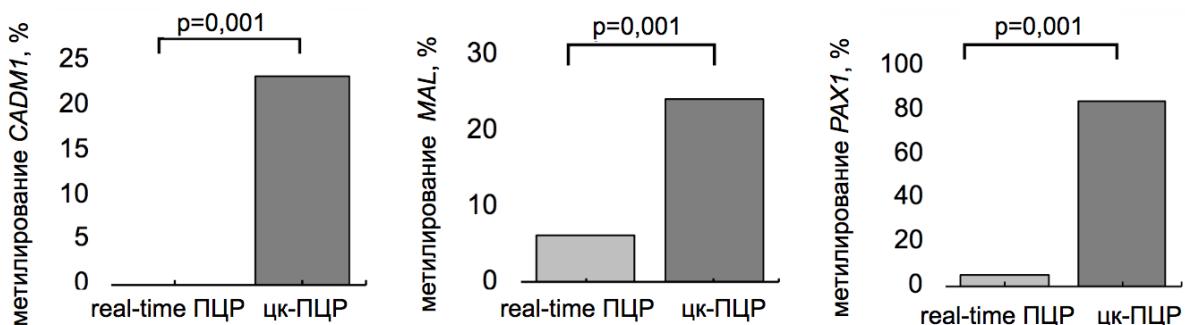
В рамках молекулярно-биологического этапа исследования была проведена сравнительная оценка эффективности двух методов количественного анализа метилирования промоторных регионов генов *CADM1*, *MAL* и *PAX1* в цервикальном материале: цифровой капельной полимеразной цепной реакции (цк-ПЦР) и ПЦР в реальном времени (real-time ПЦР). В анализ были включены образцы 91 пациентки, у которых бисульфитная конверсия ДНК прошла успешно.

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 рак шейки матки не выявило статистически значимых различий ( $p>0,05$ ), что указывает на сопоставимость качества и концентрации образцов для молекулярного анализа (Рисунок 7).



**Рисунок 7.** Уровень общей ДНК в образцах цервикальных мазков у пациенток контрольной группы и групп NILM, LSIL, HSIL и РШМ. Оценка проведена по неметилированному фрагменту гена АСТВ методом цк-ПЦР (тест Крускала-Уоллиса).

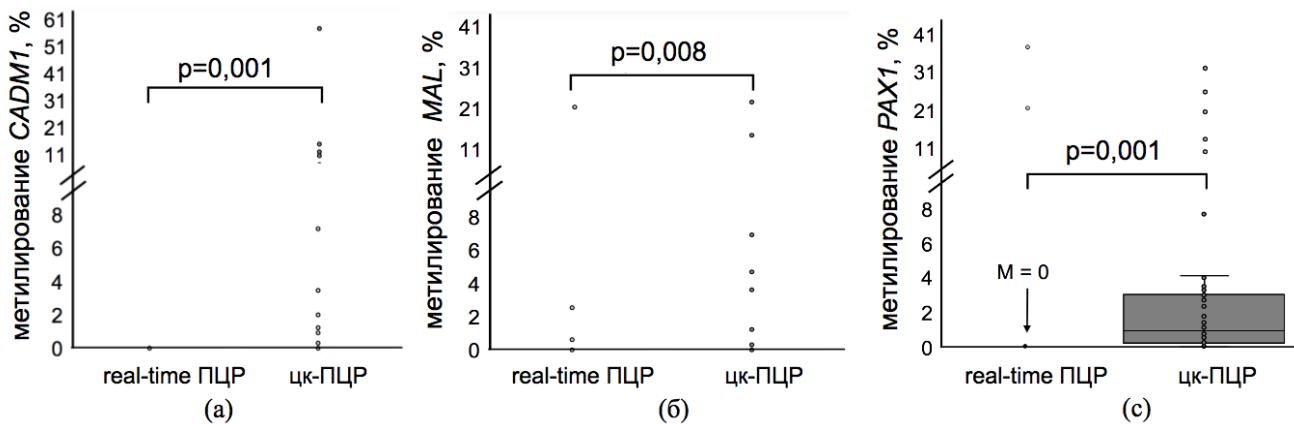
Сравнительный анализ частоты выявления метилирования показал достоверное преимущество цк-ПЦР по всем исследуемым генам. Так, метилирование гена *CADM1* было выявлено у 22,2% пациенток методом цк-ПЦР, тогда как с помощью real-time ПЦР - ни в одном случае (0,0%;  $p = 0,001$ ). Аналогично, для гена *MAL* 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 Рисунок 8 а-с.



**Рисунок 8.** Сравнение частоты метилирования генов *CADM1* (а), *MAL* (б) и *PAX1* (с) с использованием методов real-time ПЦР и цк-ПЦР.

Более того, уровни метилирования, количественно определённые методом цк-ПЦР, были достоверно выше по всем генам по сравнению с real-time ПЦР. Это подтверждается сдвигом распределения значений в сторону более высоких уровней метилирования на графиках рассеяния (Рисунок 9 а-с).

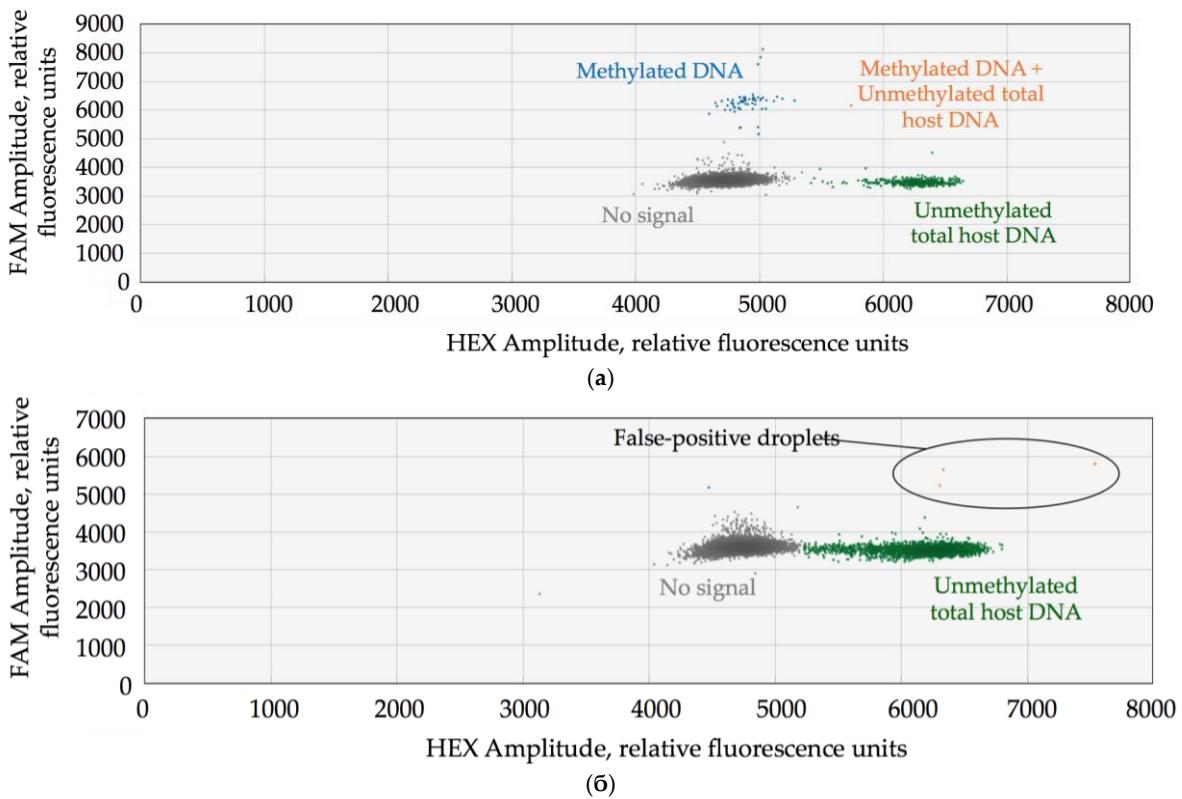
Тест Мак-Немара подтвердил статистически значимые различия между методами: для *CADM1* и *PAX1*  $p = 0,001$ ; для *MAL* -  $p = 0,008$ .



**Рисунок 9.** Сравнение уровней метилирования генов, выполненное с помощью методов real-time ПЦР и цк-ПЦР: (а) метилирование *CADM1*; (б) метилирование *MAL*; (с) метилирование *PAX1*. Данные представлены в виде индивидуальных значений с обобщенной статистикой (медиана и межквартильный диапазон) в общей выборке пациентов (%).

*p*-значения были получены с использованием критерия Вилкоксона. В (а, б) и (с) для данных real-time ПЦР квадратичные диаграммы не видны из-за низких или нулевых средних уровней метилирования.

Для наглядности, на рисунке 10 представлен пример двумерного графика флуоресценции, полученного при использовании цк-ПЦР для оценки метилирования *CADM1*: четко визуализируются положительные и отрицательные кластеры капель.



**Рисунок 10.** Репрезентативные двухмерные графики амплитуды флуоресценции результатов цк-ПЦР для гена *CADM1*. Зонды, специфичные для метилированной ДНК *CADM1*, помечены FAM, тогда как зонды для неметилированной общей ДНК хозяина (*ACTB*) помечены HEX. (а) Положительный образец, содержащий кластеры, соответствующие метилированной ДНК *CADM1* (FAM), неметилированной ДНК *ACTB* (HEX) и дважды положительные капли (FAM + HEX). (б) Отрицательный образец, в котором обнаружена только неметилированная ДНК *ACTB*, с несколькими ложноположительными капельками, обнаруженными в правом верхнем квадранте.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о более высокой чувствительности и аналитической мощности цифровой капельной ПЦР по сравнению с real-time ПЦР для всех трех маркеров. Это позволяет рекомендовать цк-ПЦР как предпочтительный метод количественной оценки метилирования ДНК в биоматериале шейки матки, особенно при низком уровне содержания мишени или минимальной степени метилирования.

Следует отметить, что ограниченная информативность real-time ПЦР может быть обусловлена как относительно высоким порогом детекции, так и сниженной точностью при низком уровне метилирования. Данные нашего исследования согласуются с результатами ранее опубликованных работ, в которых отмечена высокая чувствительность цк-ПЦР при анализе эпигенетических изменений в клинических образцах.

С учётом полученных различий дальнейший анализ диагностической значимости метилирования генов проводился исключительно на основе данных, полученных методом цк-ПЦР.

### **3.4. Корреляционный анализ уровня метилирования генов *CADM1*, *MAL* и *PAX1* с клинико-анамнестическими характеристиками**

С целью оценки взаимосвязи между эпигенетическими изменениями и клинико-демографическими характеристиками пациенток, в рамках исследования был проведён корреляционный анализ между уровнями метилирования промоторных регионов генов *CADM1*, *MAL* и *PAX1* и рядом потенциально значимых переменных. В анализ были включены такие показатели, как возраст, количество беременностей и родов, наличие табакокурения, длительность половой жизни, число половых партнёров, использование барьерной контрацепции, а также вирусная нагрузка ВПЧ 16 типа и совокупная вирусная нагрузка высокоонкогенных типов ВПЧ.

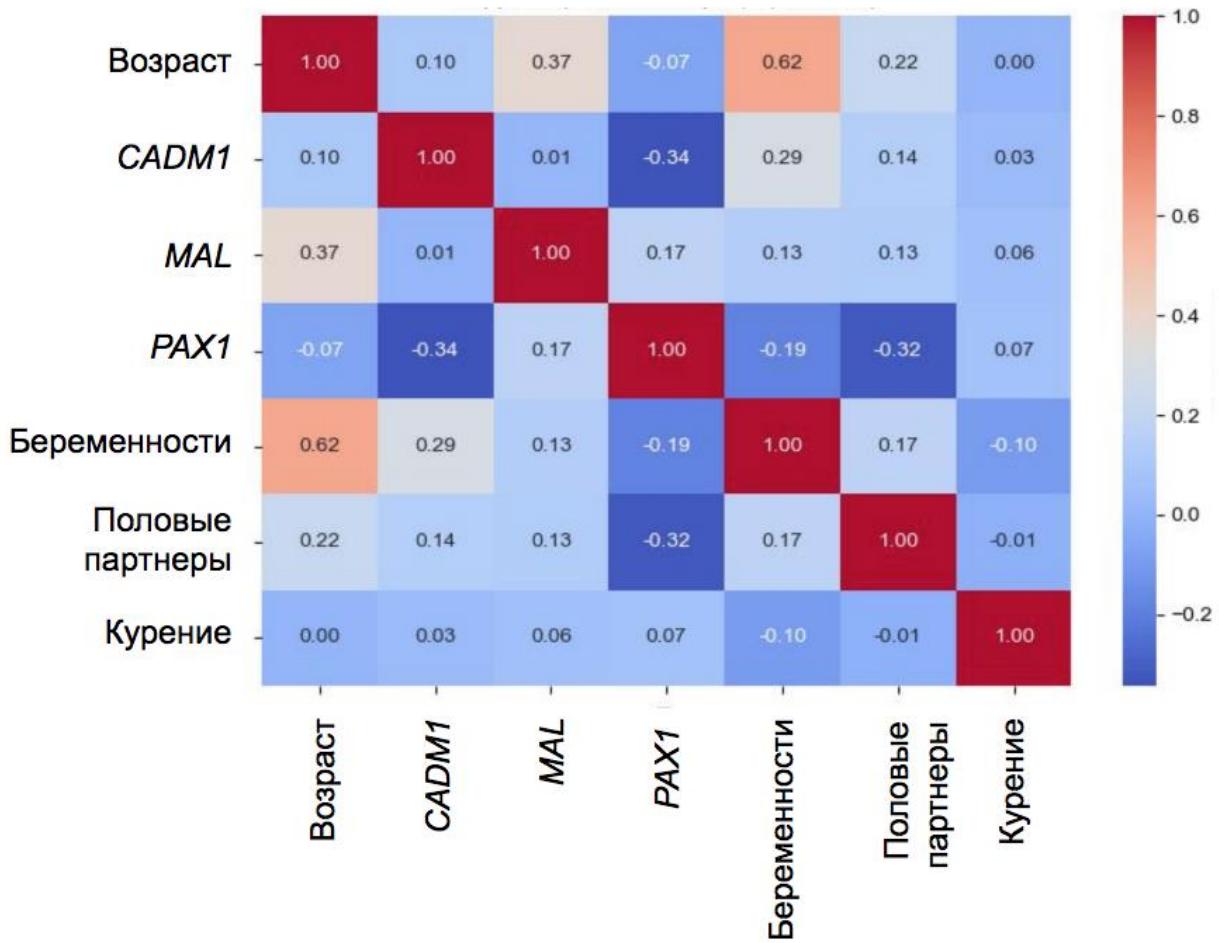
Корреляционный анализ проводился среди 91 пациентки, у которых успешно был выполнен количественный анализ метилирования методом цк-ПЦР. В качестве меры ассоциации использовался коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Все переменные, как количественные (например, возраст, вирусная нагрузка), так и категориальные (например, наличие/отсутствие курения, использование барьерной контрацепции), были приведены к числовому виду для проведения анализа.

Результаты корреляционного анализа представлены в Таблице 13 и на Рисунке 11 в виде цветной матрицы, отражающей силу и направление связей между показателями. На диаграмме визуализированы коэффициенты  $\rho$  Спирмена, с цветовой градацией от  $-1$  до  $+1$ , при этом значимые коэффициенты отмечены символом \* при  $p < 0,05$ .

**Таблица 13**

**Коэффициенты корреляции Спирмена между уровнями метилирования *CADM1*, *MAL*, *PAX1* и клинико-анамнестическими характеристиками**

Показатель	OR	Lower CI	Upper CI	P-value
CADM1	39,546	1,130	1383,704	0,043
MAL	1,981	0,120	32,605	0,632
Возраст	1,559	1,096	2,218	0,014
Курение	1,358	0,122	15,070	0,803
Количество партнеров	0,612	0,296	1,265	0,185
Беременности	0,341	0,075	1,550	0,164
PAX1	0,133	0,008	2,325	0,167
const	0,000	0,000	0,077	0,016



**Рисунок 11.** Цветовая матрица корреляций между уровнями метилирования генов и клиническими параметрами.

Анализ показал, что уровни метилирования генов *CADM1*, *MAL* и *PAX1* не демонстрировали статистически значимой связи с возрастом пациенток. Коэффициенты корреляции были слабыми ( $p$  менее 0,2 по абсолютной величине) и не достигали уровня статистической значимости ( $p > 0,05$ ).

Аналогичным образом, не было выявлено значимых корреляций между уровнями метилирования и числом беременностей, родов, длительностью половой жизни, числом половых партнёров и наличием курения. Независимость уровня метилирования от поведенческих и репродуктивных факторов была характерна для всех трёх исследуемых генов.

Отдельный интерес представляла оценка связи уровня метилирования с вирусной нагрузкой ВПЧ 16 типа и суммарной вирусной нагрузкой ВПЧ

высокоонкогенных типов (в логарифмическом выражении,  $lg/10^5$  клеток). При этом не было установлено достоверных корреляционных связей ни с одним из исследуемых генов. Коэффициенты Спирмена варьировали в пределах от  $-0,14$  до  $+0,18$ , все соответствующие  $p$ -значения превышали уровень значимости  $0,05$ .

Таким образом, согласно результатам, представленных в Таблице 13 и на Рисунке 11, уровень метилирования генов *CADM1*, *MAL* и *PAX1* не ассоциирован с основными клинико-демографическими характеристиками и вирусной нагрузкой. Эти данные могут свидетельствовать о том, что эпигенетические изменения, фиксируемые методом цк-ПЦР, не являются производными от поведенческих или вирусных факторов, а могут формироваться как независимое звено в патогенезе плоскоклеточных интраэпителиальных поражений шейки матки и прогрессии к инвазивному раку.

### **3.5. Диагностическая значимость метилирования генов *CADM1*, *MAL* и *PAX1* при выявлении ЦИН 2+ и РШМ**

Сравнение уровней метилирования генов *CADM1*, *MAL* и *PAX1* между различными диагностическими группами (NILM, LSIL, HSIL, инвазивный рак шейки матки) продемонстрировало наличие значимых различий, особенно в группах с злокачественной трансформацией. В анализ были включены 91 пациентка с различными морфологическими формами поражений шейки матки, у которых успешно была проведена количественная оценка метилирования методом цк-ПЦР. Из них 73 женщины имели положительный ВПЧ-статус и были включены в статистический анализ с диагностической целью.

Согласно критерию Краскела-Уоллиса, различия уровней метилирования между четырьмя группами (NILM, LSIL, HSIL, рак) были

статистически значимыми: для гена *CADM1*:  $p < 0,001$ , для *MAL*:  $p < 0,001$ , для *PAX1*:  $p = 0,010$  (Таблица 14).

**Таблица 14**

**Уровни метилирования генов *CADM1*, *MAL* и *PAX1* в диагностических категориях шейки матки (NILM, LSIL, HSIL, РШМ).**

Pap тест/биопсия	<i>CADM1</i> (%)	<i>MAL</i> (%)	<i>PAX1</i> (%)
NILM	0 [0; 0]	0 [0; 0]	0.77 [0,22; 2,75]
LSIL	0 [0; 0,04]	0 [0; 0]	0.91 [0,03; 1,53]
HSIL	0 [0; 0,63]	0 [0; 0]	0.63 [0,1; 1,73]
РШМ	2.37 [0,07; 9,61]	1.97 [0,02; 6,37]	6.49 [2,23; 22,02]
<i>p</i> -value *	<0,001	<0,001	0,010

\**p*-значения получены по критерию Краскела-Уоллиса; данные представлены в виде медианы [1-й квартиль; 3-й квартиль].

В дальнейшем были проведены попарные сравнения с использованием критерия Манна-Уитни. Уровень метилирования *CADM1* в группе рака шейки матки был достоверно выше по сравнению с группами NILM ( $p = 0,042$ ), LSIL ( $p = 0,010$ ) и HSIL ( $p < 0,001$ ). При этом между группами NILM, LSIL и HSIL статистически значимых различий не наблюдалось.

Для гена *MAL* аналогичная тенденция была зафиксирована: достоверное повышение метилирования обнаружено исключительно в группе рака по сравнению со всеми остальными категориями (vs. NILM:  $p = 0,049$ ; vs. LSIL:  $p = 0,006$ ; vs. HSIL:  $p = 0,010$ ). Между группами без инвазивного рака различия были статистически незначимы.

Ген *PAX1* также продемонстрировал повышение уровня метилирования в злокачественной группе по сравнению с NILM ( $p = 0,003$ ), LSIL ( $p = 0,003$ ) и

HSIL ( $p = 0,015$ ). Однако значимых различий между предраковыми стадиями выявлено не было.

Таким образом, результаты указывают на то, что значимое повышение уровня метилирования исследуемых генов, особенно *CADM1* и *MAL*, происходит преимущественно на стадии злокачественной трансформации. Это позволяет предположить, что указанные эпигенетические изменения являются не столько маркёрами постепенного прогрессирования ЦИН, сколько индикаторами перехода к инвазивному росту.

### 3.6. Многофакторный анализ предикторов ЦИН 2+

Для оценки независимых прогностических факторов, ассоциированных с выявлением ЦИН 2+, был проведён многофакторный логистический регрессионный анализ с включением клинико-эпидемиологических переменных и уровня метилирования генов *CADM1*, *MAL* и *PAX1*, определённых методом цк-ПЦР. В анализ были включены следующие переменные: возраст старше 30 лет, курение, число беременностей ( $\geq 3$ ), число половых партнёров ( $\geq 4$ ), отсутствие использования барьерной контрацепции, а также количественные показатели метилирования *CADM1*, *MAL* и *PAX1*.

По результатам анализа, только метилирование гена *CADM1* продемонстрировало статистически значимое влияние на вероятность наличия ЦИН 2+. При учёте всех переменных, наличие метилирования *CADM1* было независимо связано с высоким риском ЦИН 2+, соответствующий показатель отношения шансов (ОШ) составил 39,546 (95% ДИ: 1,130-1383,704;  $p = 0,043$ ). Метилирование *MAL* (ОШ = 1,981;  $p = 0,632$ ) и *PAX1* (ОШ = 1,557;  $p = 0,479$ ) не достигли статистической значимости и не являлись независимыми прогностическими факторами.

Корреляционный анализ между уровнями метилирования и клинико-анамнестическими переменными (возраст, курение, паритет, число половых партнёров) показал отсутствие достоверных связей. Коэффициенты

корреляции Спирмена в подавляющем большинстве случаев не превышали  $\pm 0,2$ , что свидетельствует о слабой связи между этими характеристиками. Подробная информация представлена в корреляционной матрице (Рисунок 11), а результаты логистического регрессионного анализа отображена в таблице 13.

Таким образом, согласно полученным данным, только уровень метилирования *CADM1*, определённый методом цк-ПЦР, может быть рассмотрен в качестве независимого маркера высокого риска цервикальных поражений высокой степени у пациенток с ВПЧ-инфекцией (Таблица 15).

**Таблица 15**

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

Показатель	<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
Cut-off, (%)	0,09	0,01	1,67	2,785

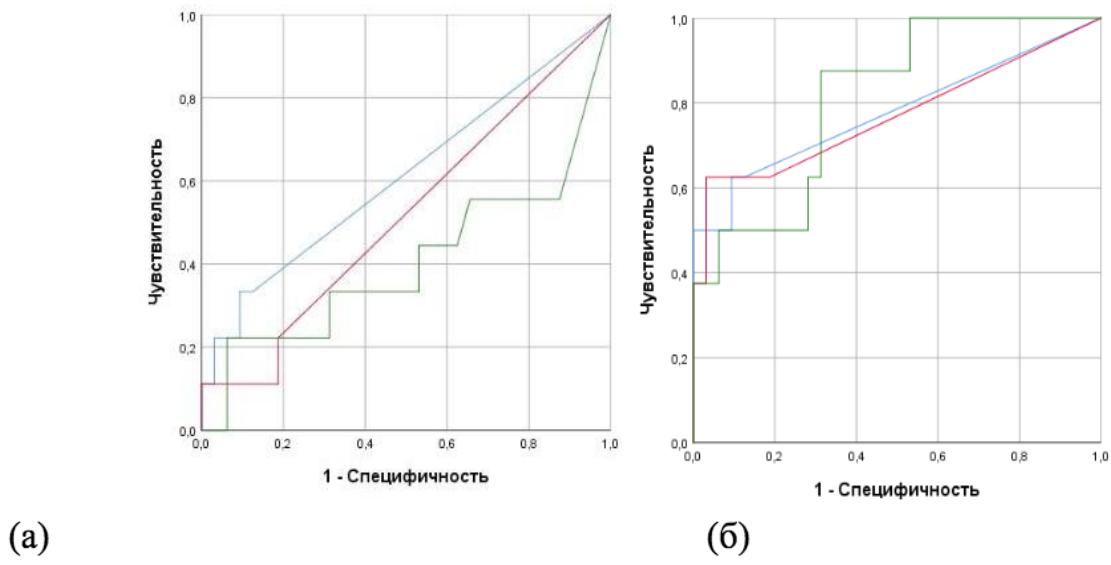
\*Данные представлены в виде площади под кривой (AUC), чувствительности, специфичности и оптимальных пороговых значений на основе анализа ROC-кривой.

### **3.7. Клиническая интерпретация полученных результатов**

Полученные в ходе исследования данные позволяют рассматривать определение метилирования генов *CADM1*, *MAL* и *PAX1* методом цифровой капельной ПЦР в качестве перспективного молекулярного инструмента для

дополнительной диагностики и стратификации риска у женщин с положительным ВПЧ-статусом.

Наибольшую диагностическую ценность показал уровень метилирования гена *CADM1*. Согласно результатам ROC-анализа (Рисунок 12), *CADM1* продемонстрировал наибольшую площадь под кривой (AUC = 0,671) для выявления ЦИН 2+ (цервикальная интраэпителиальная неоплазия высокой степени и рак шейки матки), по сравнению с *MAL* (AUC = 0,643) и *PAX1* (AUC = 0,610).



**Рисунок 12.** Оценка прогностической значимости уровней метилирования *CADM1*, *MAL* и *PAX1*: (а) NILM (ВПЧ+) против HSIL; (б) NILM (ВПЧ+) против HSIL.

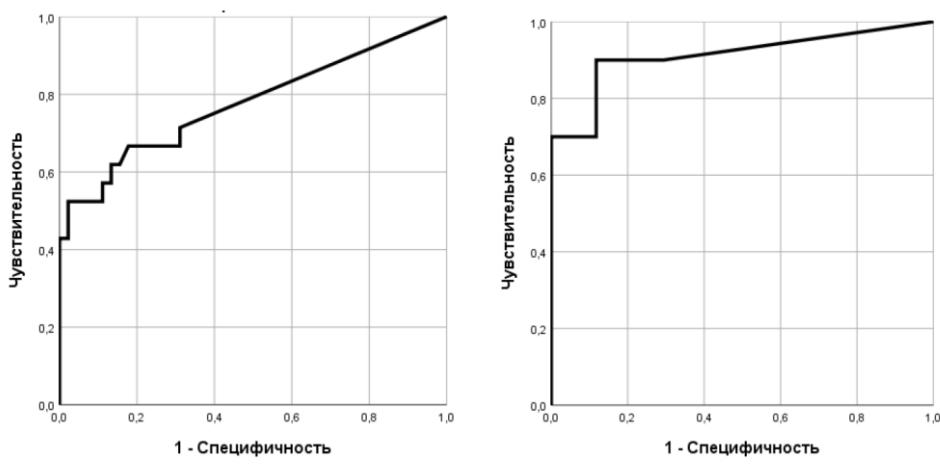
При этом определение метилирования *CADM1* позволило достичь высокой специфичности (до 100%) при чувствительности 50% (Таблица 16).

**Таблица 16****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
Cut-off, (%)	4,57	0,085	1,745	2,785

\*Данные представлены в виде площади под кривой (AUC), чувствительности, специфичности и оптимальных пороговых значений, рассчитанных на основе анализа 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 инвазивного рака шейки матки (РШМ) - 0,912, что превышает показатели каждого отдельного маркера (Рисунок 13 а-б). При использовании комбинированного порогового значения (2,785%) была достигнута специфичность 100% при чувствительности 70%, что подчёркивает потенциальную клиническую значимость данного подхода.



**Рисунок 13.** Оценка прогностической значимости уровней метилирования *CADM1* и *MAL*. (а) NILM (HPV+) + LSIL и HSIL + PIHM. (б) NILM (HPV+) и PIHM.

Результаты анализа указывают, что метилирование *CADM1* и *MAL* может использоваться для отбора женщин на углублённое обследование при положительном ВПЧ-тесте. Это особенно важно в случаях сомнительных цитологических находок или у пациенток с подтверждённой персистенцией вируса, но без морфологических признаков поражения.

Таким образом, выявление метилирования указанных генов может стать ценным компонентом алгоритма вторичной диагностики, особенно у женщин с выявлением ВПЧ 16-го типа, отсутствием барьерной контрацепции, наличием многоплодных беременностей и другими факторами риска, что подтверждено многофакторным регрессионным анализом (см. п. 3.6). Клиническое применение разработанного подхода в перспективе может повысить точность диагностики предраковых и злокачественных поражений шейки матки, уменьшить количество избыточных инвазивных вмешательств, таких как биопсия и конизация шейки матки, и повысить персонифицированность ведения пациенток с ВПЧ высокого онкогенного типа.

## ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ ДАННЫХ

### 4.1. Значение выявленных факторов риска ЦИН

Анализ факторов риска, ассоциированных с развитием ЦИН, остаётся важнейшей частью оценки патогенеза и прогноза ВПЧ-ассоциированных заболеваний. Полученные в ходе настоящего исследования данные о социально-демографических, поведенческих и репродуктивных характеристиках пациенток позволяют соотнести их с результатами отечественных и зарубежных эпидемиологических исследований, что необходимо для валидации наблюдаемых тенденций и оценки их универсальности в разных популяциях.<sup>4</sup>

Среди включённых в исследование пациенток установлено, что возраст старше 30 лет был ассоциирован с повышенным риском развития ЦИН 2+, что соответствует данным многочисленных популяционных исследований. В частности, согласно метаанализу, проведённому Liu и соав., возраст старше 30

---

<sup>4</sup> При подготовке данного раздела диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором лично или в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования: Anisimova M., Jain M., Shcherbakova L., Aminova L., Bugerenko A., Novitskaya N., Samokhodskaya L., Kokarev V., Inokenteva V., Panina O. Detection of CADM1, MAL, and PAX1 Methylation by ddPCR for Triage of HPV-Positive Cervical Lesions // Biomedicines. 2025. Vol. 13, No. 6. Article 1450; Анисимова М.А., Щербакова Л.Н., Панина О.Б. Метилирование ДНК при цервикальной интраэпителиальной неоплазии и раке шейки матки (обзор) // Акушерство и гинекология. 2025. № 7. С. 161–166; Щербакова Л.Н., Кириллова К.И., Залепаев П.В., Анисимова М.А., Бугеренко А.Е., Гайфуллина А.Н., Джайн М., Новицкая Н.А., Огай Д.С., Самоходская Л.М., Панина О.Б. Прогностическое значение вирусной нагрузки ВПЧ высокого онкогенного риска в развитии цервикальной интраэпителиальной неоплазии шейки матки // Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. 2025. Т. 24, № 2. С. 44–52; Анисимова М.А., Щербакова Л.Н., Бугеренко А.Е., Джайн М., Кириллова К.И., Самоходская Л.М., Панина О.Б. Факторы риска развития интраэпителиальных неоплазий шейки матки // Архив акушерства и гинекологии им. В. Ф. Снегирёва. 2024. Т. 11, № 4. С. 480–489.

лет является независимым фактором риска ЦИН 2+ и рака шейки матки, особенно при наличии персистирующей ВПЧ-инфекции [84]. В научной литературе есть данные, что LSIL наиболее часто выявляется у женщин моложе 30-ти лет [85]. Вклад РШМ в структуру смертности от злокачественных новообразований значительно меняется в различных возрастных группах, и первое место занимает в группе 30-39 лет, что не противоречит нашим результатам [86]. Аналогичные данные представлены и в отечественных исследованиях. Так, в работе Федоровой Т.А. и соав. было показано, что у женщин старше 30 лет выявляется значимо большая частота цервикальных дисплазий по сравнению с молодыми пациентками, что объясняется как возрастными изменениями трансформационной зоны, так и накоплением факторов риска [87]. Кроме возраста, среди социально-демографических характеристик значение имел уровень образования, так и в ряде публикаций, более низкий уровень образования ассоциируется с недостаточной информированностью о профилактике ВПЧ-инфекции, поздним обращением и, соответственно, более высокой частотой тяжёлых поражений [88].

Среди поведенческих характеристик важнейшими предикторами ЦИН выступают курение и сексуальное поведение, включая раннее начало половой жизни и количество половых партнёров. В настоящем исследовании курение было связано с повышением вероятности выявления ЦИН 2+, что подтверждает ранее опубликованные данные о канцерогенном действии табачного дыма на эпителий шейки матки. Метаболиты никотина проникают в цервикальную слизь и оказывают цитотоксическое и иммунодепрессивное действие, способствуя персистенции ВПЧ и прогрессированию поражений [89]. По данным российского исследования Филимоновой Е.Г. и соав., женщины, курившие более 5 лет, имели более чем двукратное повышение риска дисплазий по сравнению с некурящими [90]. Что касается сексуального поведения, установлено, что увеличение числа половых партнёров и раннее начало половой жизни (до 18 лет) достоверно увеличивают риск ВПЧ-

инфекции и последующего развития ЦИН. В рамках нашего исследования число половых партнёров  $\geq 4$  и отсутствие использования барьерной контрацепции также ассоциировались с ЦИН 2+. Эти данные соответствуют результатам крупного проспективного анализа Castle P.E. и соав., где было показано, что женщины с дебютом сексуальной жизни до 17 лет имели значительно более высокий риск прогрессирования ВПЧ-инфекции в ЦИН 2+ [91]. Российские данные также подтверждают важность полового поведения как фактора риска. В исследовании Завьяловой И.А. и соав. выявлено, что среди пациенток с дисплазией шейки матки чаще встречались женщины с  $\geq 3$  половыми партнёрами и нерегулярным использованием презервативов [92].

Репродуктивный анамнез также может влиять на риск развития ЦИН и РШМ. В настоящем исследовании выявлена тенденция к увеличению частоты тяжёлых интраэпителиальных поражений у женщин с тремя и более беременностями, что соответствует результатам ряда международных работ. Предполагается, что многократная беременность может приводить к гормональной и иммунной модуляции, а также к механическому травмированию шейки матки, что способствует персистенции ВПЧ и эпигенетическим изменениям [93]. Российские данные подтверждают эти выводы. Так, в работе Зарубиной И.В. и соав. указано, что у женщин с высоким числом родов и абортов чаще выявляются цервикальные неоплазии, особенно при отсутствии регулярных скринингов [94].

Влияние гормональной контрацепции остаётся предметом дискуссий. В некоторых метаанализах показано, что длительное применение оральных контрацептивов (более 5 лет) может незначительно повышать риск ЦИН, особенно при ВПЧ-положительном статусе [95]. В нашем исследовании этот фактор не продемонстрировал статистически значимой связи с тяжёлыми поражениями, что может быть связано с размером выборки и преобладанием комбинированных методов контрацепции у включённых женщин.

Менструальная функция и возраст менархе в нашем исследовании не ассоциировались с увеличением риска, что согласуется с литературными

данными: менархе само по себе не является фактором, напрямую влияющим на карциногенез, но раннее начало половой жизни при менархе до 12 лет может усугублять действие других поведенческих факторов [96].

Таким образом, результаты нашего исследования подтвердили значимость классических факторов риска цервикальных неоплазий: курения, множественных половых партнёров, отсутствия барьерной контрацепции и высокой репродуктивной нагрузки. Эти факторы оказывают синергическое влияние с ВПЧ-инфекцией, создавая благоприятные условия для персистенции вируса, нарушения местного иммунного ответа и формирования эпигенетических изменений. Полученные данные согласуются с многочисленными отечественными и зарубежными исследованиями, подчёркивая важность комплексной оценки факторов риска при планировании скрининговых и диагностических мероприятий.

#### **4.2. Роль ВПЧ-типирования и вирусной нагрузки в оценке риска поражений шейки матки**

В нашем исследовании ВПЧ высокоонкогенных типов выявлен у 71 из 99 обследованных женщин, причём наиболее часто определялись типы 16, 31, 73 и 18. Особенno доминирующей оказалась роль ВПЧ-16, что соответствует данным многих отечественных и зарубежных исследований.

Так, в работе Зароченцева Н.В. и соавт. анализ популяции российских женщин с ЦИН показал преобладание ВПЧ-16 более чем в 62% случаев [97]. В крупных исследованиях за рубежом также подчёркивается высокий канцерогенный потенциал ВПЧ-16 и ВПЧ-18: именно эти типы наиболее часто ассоциируются с ЦИН 2 и РШМ [98].

У женщин в возрасте старше 30 лет наблюдалась повышенная доля инфекций ВПЧ-16 при ЦИН 2-3/РШМ. В российском исследовании Бондаренко Д.А. и соавт. выявлено, что инфицирование ВПЧ-16 после 30 лет было статистически связано с повышением риска ЦИН 2+ (OR = 3,5) [99]. Это

коррелирует с нашими результатами и указывает на возрастной порог для усиленного мониторинга.

В нашем исследовании средние уровни общей вирусной нагрузки и уровня ВПЧ 16 типа варьировали в зависимости от степени поражения: у пациенток с LSIL нагрузка была выше, чем при NILM, а при HSIL отмечалось снижение; при РШМ наблюдалось повторное повышение вирусной нагрузки. Такие данные согласуются с принципом, что в начальных стадиях важна интенсивность репликации вируса (высокая нагрузка при LSIL), тогда как переход к HSIL связан с интеграцией ВПЧ и снижением количества копий; в критической стадии РШМ - снова наблюдается рост вирусной продукции [100].

Рост нагрузки ВПЧ-16 ( $>5$  log), особенно у женщин старше 30 лет, оказался достоверно связан с HSIL/РШМ. Эти данные подтверждаются исследованиями Виноградовой О.П. - высокая нагрузка была характерна для ЦИН 1 у женщин до 30 лет, а в старшей возрастной группе - скорее маркер HSIL [101].

Возрастная стратификация в нашем исследовании показала, что молодые женщины ( $<30$  лет) с LSIL чаще имели нагрузку  $>5$  log, тогда как у старших ( $\geq 30$  лет) нагрузка  $>7$  log значительно связана с HSIL/РШМ, что отражает биологическую значимость персистенции вируса в зрелой ткани.

Наша данные по вирусной нагрузке подтверждают результаты крупных метаанализов: IARC и Giuliano et al. отмечают высокую нагрузку при LSIL и её снижение при HSIL до повторного подъёма в РШМ [102,103]. Российские исследования Антонова Е.М. и Бахтиярова Д.Ф. показали схожую U-образную кривую с ростом нагрузки при переходе к инвазивному процессу [104].

Таким образом, вирусная нагрузка ВПЧ - это динамический маркер, который может помочь прогнозировать переход от начального этапа (репликация) к интеграции и инвазивности. Особенна ценна её стратификация по возрасту: женщины старше 30 лет с высокой нагрузкой требуют более системного наблюдения.

### 4.3. Возможности применения методов цк-ПЦР и real-time ПЦР в клинической диагностике

В настоящем исследовании для количественной оценки метилирования промоторных участков генов *CADM1*, *MAL* и *PAX1* применялись два метода: цк-ПЦР и real-time ПЦР. Оба подхода основаны на амплификации ДНК, модифицированной посредством бисульфитного превращения, однако различаются по техническим характеристикам, чувствительности, специфичности, сложности валидации и требованиям к стандартизации.

Метод real-time ПЦР является хорошо зарекомендовавшей себя технологией, широко применяемой в клинической практике и лабораторных исследованиях. Его преимуществами являются относительная простота исполнения, высокая скорость анализа, возможность одновременного тестирования большого числа образцов, а также наличие коммерчески доступных диагностических наборов. Вместе с тем, точность определения уровня метилирования методом real-time ПЦР существенно зависит от корректности калибровки, наличия эталонных кривых и прецизионности контроля на уровне амплификационной эффективности. Кроме того, чувствительность метода real-time ПЦР ограничена при низкой концентрации метилированной ДНК, особенно в гетерогенных образцах, что может привести к ложноотрицательным результатам при анализе минимального эпигенетического сигнала [105].

В отличие от real-time ПЦР, метод цк-ПЦР основан на физическом разделении ДНК-матрицы на десятки тысяч нанолитровых капель с последующей амплификацией в каждой капле, что позволяет проводить абсолютный подсчет количества метилированных копий без необходимости построения стандартных кривых. Это обеспечивает высокую аналитическую чувствительность и точность при низкой концентрации метилированного аллеля, а также устойчивость к вариабельности амплификационной

эффективности. Особенno важно, что цк-ПЦР позволяет выявлять слабовыраженные эпигенетические изменения, которые могут быть недоступны для детекции с помощью real-time ПЦР [106,107].

Однако цк-ПЦР требует более сложной технической подготовки, специализированного оборудования и является менее доступной для рутинной диагностики. В условиях ограниченных ресурсов или при массовом скрининге real-time ПЦР остаётся более реалистичным вариантом. Кроме того, несмотря на высокую чувствительность, цк-ПЦР требует строгой стандартизации преданалитических этапов и качества ДНК, что может ограничивать воспроизводимость при работе с деградированными или низкоконцентрированными образцами [108].

Стоит отметить, что выбор методики должен определяться задачами исследования и предполагаемыми условиями клинической валидации. В условиях вторичной диагностики и стратификации риска цк-ПЦР представляет собой более точный инструмент, особенно при анализе индивидуального риска у женщин с ВПЧ-положительными результатами. Однако для внедрения в широкую клиническую практику может потребоваться унификация методических подходов и снижение стоимости тестирования. Сравнение результатов, полученных методами real-time ПЦР и цк-ПЦР в рамках настоящего исследования, выявило различия в чувствительности, специфичности и уровне выявляемого метилирования. Эти различия связаны как с техническими особенностями самих методов, так и с биологической природой образцов. Прежде всего, метод цк-ПЦР продемонстрировал более высокую точность и чувствительность при выявлении метилирования генов CADM1 и MAL в образцах, соответствующих тяжёлым формам цервикальной патологии (ЦИН 2-3 и инвазивный рак шейки матки). Так, у пациенток с ЦИН 2+ при использовании цк-ПЦР были зафиксированы более высокие уровни метилирования, чем при применении real-time ПЦР, что позволило достовернее разграничивать патологические и непатологические состояния (Таблица 13). Это связано с

тем, что цк-ПЦР позволяет выявлять даже малые пропорции метилированных аллелей, которые могут быть не распознаны при применении real-time ПЦР из-за фона неметилированной ДНК и ограничения метода в отношении динамического диапазона [109].

Анализ ROC-кривых показал, что при использовании цк-ПЦР AUC-комбинация *CADM1+MAL* достигала 0,912 с высокой специфичностью (100%) и приемлемой чувствительностью (70,0%) при определённых порогах ( $CADM1 \geq 4,57\%$ ,  $MAL \geq 0,085\%$ ) [109]. Для real-time ПЦР аналогичные значения были ниже, а разница в значимости ROC-кривых свидетельствовала о более высоком потенциале цк-ПЦР в рамках вторичной диагностики и стратификации риска ЦИН 2+.

Отдельного внимания заслуживает уровень ложноположительных и ложноотрицательных результатов. В случае real-time ПЦР в группе NILM и LSIL встречались случаи слабоположительных результатов, что может быть обусловлено перекрёстной реакцией, невысокой специфичностью праймеров или вариабельностью амплификации. Метод цк-ПЦР, напротив, обеспечивал нулевую частоту ложноположительных результатов в этих группах, что усиливает его ценность для клинического отбора пациенток на расширенное обследование. Также было отмечено, что различия между методами становятся особенно выраженным при низком уровне метилирования. В таких случаях real-time ПЦР демонстрировал неустойчивые или пограничные значения  $\Delta Ct$ , в то время как цк-ПЦР позволял точно детектировать абсолютное количество копий метилированной последовательности и рассчитать процентное отношение с высокой воспроизводимостью.

Таким образом, можно заключить, что цк-ПЦР обеспечивает более точную и клинически значимую оценку уровня метилирования по сравнению с real-time ПЦР, особенно в условиях низкой концентрации мишеней и необходимости выявления слабых эпигенетических изменений. Эти особенности определяют перспективность применения цк-ПЦР в качестве инструмента вторичной диагностики женщин с ВПЧ-положительными

результатами, а также в будущем - для персонализированной стратификации риска.

Результаты настоящего исследования согласуются с данными зарубежных и российских публикаций, в которых также подчёркивается превосходство цк-ПЦР над традиционной real-time ПЦР при анализе метилирования промоторных областей в контексте ранней диагностики злокачественных новообразований. Так, в работе Li et al. было показано, что цк-ПЦР обеспечивает высокую чувствительность и специфичность при выявлении метилирования *CADM1* и *MAL* у женщин с цервикальной патологией, причём значения AUC составляли более 0,90 [110]. Авторы подчёркивают, что цк-ПЦР обеспечивает более надёжную детекцию метилированной ДНК даже при низком уровне мишеней, что особенно важно в скрининговых условиях.

Сходные выводы приводятся в исследовании Liu и соавт. , где отмечено, что цифровая ПЦР обладает лучшими характеристиками по сравнению с real-time ПЦР при анализе метилирования *CADM1* и *PAX1*, особенно при ЦИН 2+ [111]. В мета-анализе подчёркнуто, что воспроизводимость цк-ПЦР выше, а погрешности, связанные с количественной оценкой, - ниже, что делает этот метод предпочтительным для клинической практики.

В российской практике использование цк-ПЦР пока ограничено, однако появляются отдельные публикации, демонстрирующие перспективность технологии. В частности, в исследовании сообщается о высокой специфичности цк-ПЦР при выявлении метилирования *MAL* и *CADM1* в образцах от пациенток с ЦИН 3 и инвазивным раком [112]. Авторы подчёркивают, что цифровая ПЦР позволяет более точно стратифицировать пациенток по степени риска и оптимизировать маршрутизацию в системе здравоохранения.

Следовательно, полученные нами данные не только подтверждают высокую диагностическую ценность цк-ПЦР при выявлении метилирования *CADM1*, *MAL* и *PAX1*, но и соответствуют результатам международных и

отечественных исследований, подчёркивая потенциал внедрения технологии в клиническую практику.

#### **4.4. Клиническая интерпретация данных о метилировании генов**

##### ***CADM1, MAL и PAX1***

Результаты настоящего исследования продемонстрировали чёткую динамику увеличения уровня метилирования генов *CADM1*, *MAL* и *PAX1* по мере нарастания тяжести цервикальных поражений. Хотя при сравнении групп NILM, LSIL и HSIL статистически значимых различий по уровню метилирования не наблюдалось, в группе инвазивного рака шейки матки уровни метилирования были достоверно выше по сравнению со всеми остальными диагностическими категориями. Такие различия наиболее выражены для генов *CADM1* и *MAL*, что подтверждено результатами непараметрических критериев (Краскела-Уоллиса и Манна-Уитни) [109].

Для гена *CADM1* уровень метилирования у пациенток с инвазивным раком шейки матки был достоверно выше, чем в группах NILM ( $p = 0,042$ ), LSIL ( $p = 0,01$ ) и HSIL ( $p < 0,001$ ), в то время как между группами NILM, LSIL и HSIL статистически значимых различий не выявлено. Сходная картина наблюдалась и для *MAL*: достоверное увеличение метилирования отмечено лишь в группе рака шейки матки ( $p < 0,05$  при сравнении с каждой из остальных групп), тогда как в группах с неполной трансформацией эпителия различия не достигали статистической значимости. Для гена *PAX1* также зафиксировано повышение уровня метилирования в группе инвазивного рака по сравнению с другими категориями, однако абсолютные значения оказались ниже, чем для *CADM1* и *MAL*. Подобная картина свидетельствует о том, что эпигенетические изменения в исследуемых генах являются маркерами не постепенной прогрессии, а, скорее, перехода к инвазивной трансформации. Это соответствует ранее опубликованным данным, согласно которым уровни метилирования значительно повышаются именно в стадии злокачественного

перерождения. В частности, в исследовании Luttmer et al. также была продемонстрирована высокая специфичность метилирования *CADM1* и *MAL* в группе пациенток с цервикальным раком при отсутствии значимых различий в более ранних стадиях [113].

Таким образом, выявленные в ходе настоящей работы паттерны эпигенетических изменений подтверждают, что уровни метилирования генов *CADM1*, *MAL* и *PAX1* могут быть использованы в качестве индикаторов малигнизации, особенно для отбора пациенток из группы ВПЧ-положительных женщин на более углублённое обследование и кольпоскопию с биопсией.

Выявленные различия в уровнях метилирования между группами позволяют рассматривать *CADM1*, *MAL* и *PAX1* как потенциальные молекулярные маркеры, однако степень их диагностической ценности и специфичности различается. Анализ индивидуальных характеристик каждого из генов показал, что наибольший вклад в дифференциацию ЦИН 2+ вносит *CADM1*, особенно в сочетании с *MAL*, тогда как *PAX1* характеризуется более высокой чувствительностью, но менее выраженной специфичностью.

В настоящем исследовании *CADM1* продемонстрировал наиболее выраженное различие уровня метилирования между инвазивным раком и другими диагностическими категориями, а также абсолютную специфичность 100% при пороговом значении  $\geq 4,57\%$ , что позволяет рассматривать его как высокоспецифичный маркер малигнизации. Подобные результаты получены и в других исследованиях, в том числе при использовании цк-ПЦР [114]. В проведённом исследовании *MAL* демонстрировал чувствительность 62,5% при высокой специфичности (96,9%) и имел диагностическую значимость как в одиночном варианте, так и в составе комбинированной панели с *CADM1*. Эти данные согласуются с публикациями, подтверждающими применимость *MAL* в составе многокомпонентных тестов для вторичной диагностики [115].

Ген *PAX1* (Paired Box Gene 1), напротив, демонстрирует относительно высокую чувствительность (до 87,5% в настоящем исследовании), однако его

специфичность не превышала 68,7%, что ограничивает возможность использования *PAX1* как изолированного маркера. Вместе с тем, в ряде исследований *PAX1* показал хорошую применимость при ЦИН 3+, особенно в популяциях с высоким фоном ВПЧ-инфекции [116]. Снижение специфичности может быть связано с вариабельностью экспрессии гена в доброкачественных гиперплазиях, что требует дальнейшего изучения.

*CADM1* и *MAL* следует рассматривать как предпочтительные маркеры высокой специфичности, особенно в составе комбинированной панели. *PAX1*, обладающий высокой чувствительностью, может дополнить диагностическую стратегию в качестве элемента скрининговых алгоритмов, однако его применение требует осторожной интерпретации результатов. Комплексное использование всех трёх маркеров с учётом их индивидуальных характеристик позволяет создать более сбалансированный и точный инструмент для отбора пациенток на дообследование при ВПЧ-положительных результатах.

Результаты настоящего исследования согласуются с данными ряда международных работ, подтверждающих клиническую значимость метилирования генов *CADM1*, *MAL* и *PAX1* в выявлении ЦИН 2+ и РШМ. В частности, многочисленные метаанализы и популяционные исследования подчеркивают высокую специфичность этих маркеров в ВПЧ-положительной популяции, особенно при применении высокочувствительных методов количественного анализа. В опубликованном метаанализе Clarke M.A. и соавт. было показано, что гиперметилирование *CADM1* и *MAL* достигает высокой специфичности (до 92%) при выявлении ЦИН 3+, в то время как чувствительность колебалась в пределах 56-65%, что соотносится с полученными в настоящей работе данными [115]. Отдельные исследования также подтверждают, что метилирование *CADM1* чаще наблюдается на стадии инвазивного роста и поздних интраэпителиальных поражений, что делает его перспективным для вторичной диагностики [23].

Аналогично, *MAL* демонстрирует высокую специфичность при ЦИН 2+, особенно в сочетании с другими эпигенетическими маркерами. Так, в исследовании Kalantari M. и соавт. комбинированное определение метилирования *MAL* и *CADM1* позволило добиться чувствительности 75% и специфичности 90% при выявлении ЦИН 3+ [117]. Данные по метилированию *PAX1* несколько более вариабельны. Согласно исследованию Liou Y.L. и соавт., метилирование промотора *PAX1* может быть перспективным маркером ЦИН 2+ с чувствительностью 78% и специфичностью 73%, однако чувствительность значительно снижалась в популяциях с низкой вирусной нагрузкой [116]. В другом исследовании Zhang C. и соавт. показано, что *PAX1* демонстрирует высокую чувствительность при ЦИН 3+, но при ЦИН 2 уровень метилирования может быть недостаточен для уверенной дифференциации [118].

Несмотря на высокую аналитическую точность и воспроизводимость, метод цк-ПЦР требует строгого соблюдения лабораторных стандартов на всех этапах - от преанализики до интерпретации результатов. Для внедрения в амбулаторную практику необходимо учитывать ряд факторов: необходимость автоматизации пробоподготовки, наличие специализированного оборудования, обучение персонала и стандартизация порогов отсечения метилирования. Тем не менее, современные российские и международные лаборатории уже начинают применять цк-ПЦР в молекулярной диагностике - в том числе на базе крупных центров, участвующих в пилотных скрининговых проектах. Это подтверждает возможность масштабируемости метода в рамках организованных программ раннего выявления злокачественных новообразований.

Дополнительную актуальность изучаемым эпигенетическим маркерам придаёт появление новых данных. Так, в работе Luo et al. было продемонстрировано, что метилирование *CADM1* и *MAL* остаётся достоверным индикатором ЦИН 2+ даже у женщин с неопределёнными цитологическими результатами [119]. В исследовании, проведённом в Южной

Корее, Kim et al. отметили высокую клиническую значимость сочетания *CADM1* и *MAL* при скрининге женщин старше 35 лет, особенно в условиях перехода от цитологии к молекулярному тестированию [120]. Эти публикации подчёркивают сохраняющийся интерес к метилированию как перспективному направлению диагностики цервикальных неоплазий и подтверждают обоснованность выбора панелей генов *CADM1*, *MAL* и *PAX1* для оценки рисков тяжёлых поражений эпителия шейки матки.

Таким образом, полученные в рамках настоящего исследования результаты подтверждают, что наиболее высокая точность достигается при использовании комбинированной панели *CADM1* и *MAL*, особенно в условиях цифровой капельной ПЦР. Это позволяет адаптировать выявленные маркеры под клинические задачи - от отбора на кольпоскопию до потенциальной замены морфологических методов на ранних этапах диагностики. Продолжение клинической валидации этих биомаркеров и включение их в скрининговые программы может повысить точность вторичной диагностики ЦИН 2+, снизить число ненужных инвазивных процедур и оптимизировать маршрутизацию пациенток с ВПЧ-инфекцией.

#### **4.5. Диагностическая ценность маркеров метилирования для выявления ЦИН 2+ и РШМ**

Оценка диагностической эффективности молекулярных маркеров требует объективного анализа чувствительности и специфичности с использованием кривых «чувствительность-специфичность» (ROC-кривых), которые позволяют определить качество теста при различных пороговых значениях. В настоящем исследовании была проанализирована способность метилирования генов *CADM1*, *MAL* и *PAX1*, определяемого методом цифровой капельной ПЦР, дифференцировать ЦИН 2+ и инвазивный рак шейки матки.

Полученные данные продемонстрировали, что при выявлении HSIL и рака AUC для метилирования *CADM1* составила 0,671, что соответствует

умеренной диагностической точности. AUC для *MAL* была сопоставима (0,643), тогда как *PAX1* показал наименьшее значение - 0,610. Эти показатели свидетельствуют о том, что использование каждого из маркеров по отдельности может обладать ограниченной чувствительностью и/или специфичностью. Однако при объединении *CADM1* и *MAL* диагностическая эффективность существенно возрастала: комбинированная модель показала  $AUC = 0,912$ , чувствительность 70,0%, специфичность 100,0%, что указывает на высокую способность теста выявлять женщин с тяжёлыми поражениями шейки матки без ложноположительных результатов [109]. Подобные результаты подтверждают ранее опубликованные данные, согласно которым комбинированное использование нескольких эпигенетических маркеров позволяет повысить точность диагностики ЦИН 2+ и инвазивного рака. Например, в исследовании Wentzensen N. и соавт. комбинированное определение метилирования *CADM1* и *MAL* с помощью real-time ПЦР обеспечивало чувствительность 75% и специфичность 95% для выявления ЦИН 2+ [121]. Аналогичные выводы были получены и в недавнем исследовании китайских авторов, где комбинация *CADM1* и *PAX1* повышала диагностическую точность при ЦИН 3+ [122]. Отечественные исследования также подчёркивают перспективность метилирования *CADM1* и *MAL* в составе мультигенных панелей. Так, в работе Соловьёвой Е.А. и соавт. при использовании real-time ПЦР-определения метилирования *CADM1* и *MAL* в группах ЦИН 2 и рака достигнута чувствительность 82% и специфичность 88% [123].

Анализ диагностических характеристик одиночных маркеров показал, что каждый из исследованных генов имеет свои особенности. Метилирование гена *CADM1* отличается высокой специфичностью (100,0%), что делает его перспективным маркером для минимизации числа ложноположительных результатов при вторичной диагностике. В то же время, чувствительность *CADM1* оказалась невысокой (50,0%), что может привести к пропуску части клинически значимых случаев.

Метилирование *MAL* демонстрировало наилучший баланс чувствительности (62,5%) и специфичности (96,9%), выступая как наиболее универсальный маркер. Что касается *PAX1*, он показал наивысшую чувствительность (87,5%), но при этом умеренную специфичность (68,7%), что обуславливает риск гипердиагностики. Таким образом, каждый из маркеров выполняет свою диагностическую функцию: *CADM1* - «отсекающий» маркер, *MAL* - сбалансированный, *PAX1* - чувствительный, но менее специфичный. Объединение нескольких маркеров в панель позволяет компенсировать слабости отдельных генов и повысить общую диагностическую ценность. Комбинированный подход, основанный на метилировании *CADM1* и *MAL*, оказался наилучшим по показателям AUC, чувствительности и специфичности. Подобная стратегия соответствует современным требованиям к тестам вторичной диагностики при ВПЧ-положительном скрининге - высокой специфичности при удовлетворительной чувствительности [124].

Следует отметить, что применение мультигенных панелей особенно целесообразно в группах риска и при неоднозначных результатах цитологии. Международные протоколы также всё чаще включают рекомендации по использованию молекулярных тестов, включая метилирование, в алгоритмах клинического ведения женщин с положительным ВПЧ-тестом и ASCUS/LSIL по цитологии [26]. В российских исследованиях аналогичная тенденция наблюдается в публикациях, демонстрирующих эффективность комбинации метилирования двух и более генов. В частности, Панова Т.В. и соавт. указали на более высокую прогностическую ценность комбинированных панелей по сравнению с одиночными маркерами [125].

Комбинированный подход может также быть адаптирован под условия амбулаторной практики и использован в качестве вторичного теста после первичного ВПЧ-скрининга, снижая потребность в колпоскопии и биопсии при низком риске поражений высокой степени. С учётом полученных результатов, определение уровня метилирования генов *CADM1*, *MAL* и *PAX1*,

особенно в виде комбинированной панели, обладает высокой клинической значимостью для отбора женщин на углублённую диагностику после первичного ВПЧ-тестирования. Это особенно важно в условиях ограниченных ресурсов, когда необходимо минимизировать избыточные инвазивные вмешательства (например, кольпоскопию и биопсию) при сохранении высокой чувствительности к выявлению цервикальных интрапитиальных неоплазий высокой степени. Современные международные рекомендации признают роль тестов на метилирование как перспективных инструментов вторичной диагностики. В ряде стран Европы и Азии активно внедряются стратегии, в которых молекулярные маркеры, включая *CADM1* и *MAL*, используются в качестве триаж-теста после положительного ВПЧ-результата [126,127].

В исследовании Burger Е.А. и соавт. на модели экономической эффективности показано, что использование тестов на метилирование позволяет сократить количество ненужных кольпоскопий на 40-60% без потери выявляемости ЦИН 2+, что улучшает отношение «польза-вред» и делает такую стратегию более приемлемой для массового скрининга [128].

В Российской Федерации данный подход пока не получил широкого внедрения, однако отдельные исследования уже указывают на перспективность комбинированного молекулярного тестирования. В частности, в исследовании Киселёвой И.А. и соавт. продемонстрировано, что применение панели метилирования в сочетании с ВПЧ-типированием повышает точность диагностики ЦИН 2 и снижает риск гипердиагностики [129].

Особое значение имеет внедрение этих тестов в амбулаторную практику. ЦК-ПЦР позволяет достоверно определять количественный уровень метилирования в минимальном объёме биоматериала, включая мазки с шейки матки. Это делает метод технически применимым вне лабораторий высокого уровня, особенно при использовании стандартизованных коммерческих наборов [130]. Кроме того, внедрение таких панелей в пилотные скрининговые

программы позволит более точно стратифицировать риск и выработать индивидуализированные рекомендации. Это особенно актуально для женщин в возрастной группе старше 30 лет, у которых ВПЧ-позитивный статус сохраняется, а цитологическая картина остаётся неопределённой.

Следовательно, результаты нашего исследования подтверждают высокую диагностическую ценность метилирования генов *CADM1* и *MAL*, особенно при их комбинированном использовании, что обеспечивает надёжную стратификацию риска цервикальных поражений высокой степени у ВПЧ-позитивных женщин. При этом возможности цифровой капельной ПЦР, как высокоточной и чувствительной технологии, позволяют применять данный подход в реальной клинической практике, включая амбулаторное звено. В то же время остаётся важным вопрос: является ли выявление метилирования действительно независимым прогностическим маркером, или же его значимость нивелируется традиционными эпидемиологическими и клиническими факторами риска. Для ответа на этот вопрос нами был проведён многофакторный регрессионный анализ, обсуждение результатов которого представлены в следующем разделе.

#### **4.6. Метилирование как независимый предиктор (результаты многофакторного анализа)**

Одной из задач настоящего исследования было определить, обладает ли уровень метилирования генов *CADM1*, *MAL* и *PAX1* независимой прогностической ценностью при выявлении цервикальных интраэпителиальных неоплазий высокой степени (ЦИН 2 +), наряду с известными клинико-эпидемиологическими факторами риска. Результаты многофакторного логистического анализа показали, что из трёх исследуемых эпигенетических маркеров только метилирование гена *CADM1* оказалось статистически значимым независимым фактором риска ЦИН 2+, с отношением шансов 39,546 (95% ДИ: 1,130-1383,704;  $p = 0,043$ ). Это значение

значительно превышает ассоциации, установленные для поведенческих и демографических факторов, таких как возраст, курение, паритет и число половых партнёров.

На сегодняшний день роль традиционных факторов риска цервикальных неоплазий - возраста, сексуального поведения, курения, репродуктивной активности - широко подтверждена в эпидемиологических исследованиях [131]. Однако при включении в модель молекулярных маркеров, отражающих непосредственные патогенетические изменения, ассоциации с этими факторами становятся статистически менее значимыми. Подобный эффект отмечен и в ряде зарубежных работ. Так, в исследовании Kang S. et al. установлено, что метилирование *CADM1* в мазках шейки матки сохраняет прогностическую значимость даже после учёта возраста, статуса ВПЧ и курения [132].

Полученные данные подтверждают гипотезу о том, что молекулярные изменения, отражённые в эпигенетическом профиле, могут более точно предсказывать наличие тяжёлых неоплазий, чем классические анамнестические факторы, особенно в условиях высокоонкогенной ВПЧ-инфекции. Это имеет особую важность в популяции женщин, у которых отсутствуют выраженные клинические проявления, но существует высокий риск прогрессии патологии. Использование метилирования как дополнительного диагностического критерия позволяет усилить объективность принятия решений о необходимости кольпоскопии или биопсии.

Полученные в исследовании данные позволяют рассматривать количественные показатели метилирования генов *CADM1*, *MAL* и *PAX1* как инструмент персонализированной стратификации риска цервикальных интраэпителиальных неоплазий высокой степени (ЦИН 2+) у женщин с положительным результатом на ВПЧ высокого онкогенного риска. Метод цк-ПЦР обеспечивает точную квантификацию уровня метилирования, что даёт

возможность разграничить пациентов по степени прогноза и определить наиболее целесообразную тактику ведения.

Стратификация риска на основе молекулярных маркеров позволяет переходить от универсального подхода ко всем пациенткам с ВПЧ-положительными мазками к более дифференциированной модели наблюдения и дообследования. В частности, высокие уровни метилирования гена *CADM1* (в нашем исследовании - медианное значение 4,57%) в совокупности с ВПЧ-типами 16/18 ассоциировались с наиболее высокой вероятностью наличия ЦИН 2+, что может служить основанием для немедленного направления на расширенную кольпоскопию или биопсию, минуя повторные промежуточные тесты. Такой подход согласуется с зарубежными данными, где высокая экспрессия метилирования *CADM1* и *MAL* рассматривается как основание для отбора на инвазивную верификацию [133].

В то же время, низкие уровни метилирования (например, <0,5% по *CADM1*) при отсутствии ВПЧ16/18 могут свидетельствовать о низком риске прогрессии, что оправдывает выбор стратегии динамического наблюдения с отсроченным обследованием. Подобный подход также предложен в рекомендациях Европейского общества по кольпоскопии (European Federation for Colposcopy), где возможна дезскалация при наличии молекулярных маркеров низкого риска [134].

Для женщин с пограничной цитологической картиной (ASCUS, LSIL) и умеренными значениями метилирования (1-4%) возможно использование расширенного молекулярного мониторинга или повторного ВПЧ-тестирования через 12 месяцев - как компромисс между инвазивной диагностикой и наблюдением. Таким образом, уровни метилирования могут быть интегрированы в существующие алгоритмы стратификации, наряду с цитологией, вирусной нагрузкой и типированием.

Применение цк-ПЦР даёт преимущество перед real-time ПЦР не только в чувствительности, но и в точности квантификации, что важно для установления пороговых значений, используемых в клиническом принятии

решений. В отличие от полукатегориальных методов (например, визуальных оценок экспрессии p16 или Ki-67), цифровая ПЦР обеспечивает высокую воспроизводимость и независимость от субъективных факторов.

На сегодняшний день в российской практике данные о внедрении цк-ПЦР для стратификации риска ограничены, однако отдельные проекты уже реализуются на базе НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина, а также в частных лабораториях, участвующих в молекулярных скрининговых программах [135]. Таким образом, данные о метилировании генов *CADM1* и *MAL*, полученные методом цк-ПЦР, имеют потенциал для использования в персонализированной модели наблюдения за женщинами с ВПЧ-инфекцией, позволяя эффективно распределять пациенток по группам риска и оптимизировать маршрутизацию в рамках амбулаторной гинекологической практики.

Многофакторные прогностические модели, направленные на выявление предикторов цервикальных интраэпителиальных неоплазий высокой степени (ЦИН 2+) у ВПЧ-положительных женщин, активно развиваются в последние годы и находят всё более широкое применение в клинической практике. Эти модели, как правило, включают комбинации эпидемиологических, вирусологических и молекулярных параметров, что позволяет повысить точность стратификации риска по сравнению с использованием отдельных тестов. В исследовании, представленном в данной работе, ключевым независимым предиктором наличия ЦИН 2+ оказалось метилирование гена *CADM1*, определённое методом цк-ПЦР, с отношением шансов (ОШ) 39,5 (95% ДИ: 1,130-1383,7;  $p = 0,043$ ), при отсутствии значимого вклада таких переменных, как возраст, курение, паритет и тип сексуального поведения. Эти результаты согласуются с рядом международных работ, продемонстрировавших высокую прогностическую ценность именно *CADM1*-ассоциированного метилирования в модели многофакторного анализа [136]. Так, в исследовании китайских авторов была предложена модель, включающая уровень метилирования *CADM1* и *MAL*, а также ВПЧ-тип и

вирусную нагрузку, с AUC 0,91 для выявления ЦИН 2+ [133]. Однако в этой модели не учитывались клинико-поведенческие факторы, что снижает её универсальность в популяционно-ориентированных программах.

Сравнительный анализ с отечественными данными показывает, что большинство многофакторных моделей, используемых в России, ограничиваются цитологическими результатами и типированием ВПЧ без включения молекулярных эпигенетических маркеров. Например, в исследовании Сальниковой Н.М. и соавт. показано, что комбинированный учёт цитологии и ВПЧ-типов обеспечивает чувствительность около 84%, но специфичность ограничена 63% [137]. Добавление эпигенетических маркеров, особенно при их количественной оценке методом цк-ПЦР, потенциально может улучшить эти показатели, сохранив при этом приемлемый баланс затрат и диагностической эффективности. Примером интеграции молекулярных данных в прогностическую модель служит и работа Jansen E.E.L. et al. , где была создана модель на основе метилирования *FAM19A4*, *miR124-2* и *CADM1* [138]. Она продемонстрировала AUC 0,88 при отборе женщин на кольпоскопию, но при этом также указывалось на более высокую специфичность у *CADM1* по сравнению с другими маркерами, что совпадает с нашими результатами. Следует подчеркнуть, что большинство моделей, представленных в литературе, разрабатывались с использованием real-time ПЦР, что может снижать точность количественной оценки по сравнению с цк-ПЦР. Цифровая ПЦР обладает более высокой чувствительностью при низком числе копий метилированной ДНК, что особенно актуально на ранних стадиях трансформации. Таким образом, включение цк-ПЦР-определяемого уровня метилирования *CADM1* в будущие многофакторные модели может повысить как прогностическую, так и клиническую ценность алгоритмов стратификации. Кроме того, разработанная в настоящем исследовании модель с участием *CADM1* метилирования может быть дополнена параметрами цитологии, вирусной нагрузки и имmunогистохимических маркеров (р16,

Ki-67) - при их наличии - что соответствует концепции «triage+» тестирования, рекомендованной Европейскими руководствами [26].

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о значительном потенциале интеграции эпигенетических данных, полученных методом цк-ПЦР, в многофакторные предиктивные модели и подчёркивают перспективность этого подхода для персонализированной диагностики и маршрутизации пациенток с ВПЧ-инфекцией в российской практике.

#### **4.7. Ограничения исследования**

Полученные результаты необходимо интерпретировать с учётом ряда методологических и организационных ограничений, присущих проведённому исследованию.

Во-первых, основным ограничением является относительно небольшой объём выборки, что снижает возможности для обобщения полученных выводов, особенно при анализе подгрупп, таких как пациентки с различными степенями цервикальных интраэпителиальных поражений. Недостаточная представленность отдельных категорий, в частности, пациенток с цервикальным раком, ограничивает проведение статистически достоверных сравнений в рамках многомерного анализа. Для подтверждения диагностической ценности изученных эпигенетических маркеров и устойчивости построенной модели необходимы многоцентровые когортные исследования с расширением выборки до 300-500 и более пациенток [139].

Во-вторых, исследование проводилось в рамках одного медицинского учреждения, что потенциально влечёт за собой селекционное смещение. Участники могли характеризоваться определёнными социально-демографическими особенностями, не отражающими общей популяции женщин репродуктивного возраста. Проведение мультицентровых исследований на более гетерогенных выборках могло бы повысить валидность и воспроизводимость полученных результатов.

В-третьих, в связи с ограниченным размером выборки в настоящем исследовании не была реализована процедура внутренней валидации (например, перекрёстная проверка), что снижает устойчивость предлагаемых диагностических моделей. Установленные пороговые значения метилирования промоторных областей генов *CADM1*, *MAL* и *PAX1*, определённые методами цифровой капельной ПЦР и ПЦР в реальном времени, требуют дальнейшего подтверждения и уточнения в расширенных когортных исследованиях.

Ещё одним существенным ограничением является отсутствие иммуногистохимической верификации морфологического диагноза. Диагностика тяжёлых цервикальных интраэпителиальных неоплазий и инвазивного рака основывалась на результатах гистологического исследования, однако не проводилось дополнительное окрашивание маркёров *p16<sup>INK4a</sup>* и *Ki-67*, которые, согласно международным рекомендациям, позволяют повысить точность верификации трансформационных изменений. Это снижает надёжность морфологической классификации, особенно в пограничных случаях.

Наконец, представленная работа имеет ограниченное продольное наблюдение за пациентками, что не позволяет в полной мере оценить прогностическую значимость изучаемых эпигенетических маркёров. Дальнейшие исследования с включением динамического клинического наблюдения необходимы для подтверждения способности метилирования генов *CADM1*, *MAL* и *PAX1* прогнозировать прогрессирование цервикальной неоплазии.

Тем не менее, несмотря на обозначенные ограничения, представленное исследование характеризуется строгим соблюдением методологических стандартов и использует современные технологии молекулярной диагностики, позволяя сделать обоснованные выводы о потенциальной диагностической и прогностической значимости метилирования генов-супрессоров опухолей у женщин с ВПЧ высокого онкогенного риска.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Целью настоящего исследования было изучение прогностической ценности метилирования генов *CADM1*, *MAL* и *PAX1*, определяемого методом цК-ПЦР, для выявления ЦИН 2+ у женщин с ВПЧ высокоонкогенного типа. Проведён комплексный анализ клинико-эпидемиологических факторов, вирусной нагрузки, характеристик метилирования, а также диагностических и прогностических показателей, позволяющий оценить роль молекулярных маркеров в стратификации риска при цервикальном скрининге.

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.

Таким образом, выполненное исследование подтвердило, что использование метода цк-ПЦР для количественного анализа метилирования *CADM1*, *MAL* и *PAX1* открывает новые возможности в молекулярной стратификации риска ЦИН и РШМ. Эти данные обладают значительной научной новизной и могут лечь в основу совершенствования скрининговых программ с учётом индивидуального риска.

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.

1. 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.

2. 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.

### **Благодарности**

Данная работа была реализована благодаря государственного задания Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова (раздел 0708), что обеспечило его независимость от стороннего финансирования и соответствие принципам академической добросовестности и научной прозрачности. Автор выражает благодарность заведующей отделом лабораторной диагностики Медицинского научно-образовательного центра Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова Л.М. Самоходской, а также сотрудникам М. Джайну и К.И. Кирилловой за помощь в проведении экспериментов. Также автор благодарит студентов Факультета фундаментальной медицины Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова В.И. Кокарева и В.И. Инохентьеву за помощь в составлении и ведении электронной клинической базы данных с деперсонифицированной лабораторной информацией об участницах исследования.

## 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 ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА

Рисунок 1. Возрастная характеристика обследованных пациенток.....	32
Рисунок 2. Табакокурение среди обследованных пациенток.....	35
Рисунок 3. Продолжительность половой жизни у обследованных пациенток.....	38
Рисунок 4. Вирусная нагрузка ВПЧ у пациенток с NILM, LSIL, HSIL, РШМ (тепловая карта).....	52
Рисунок 5. Вирусная нагрузка ВПЧ ( $lg 10^5$ копий/клетку) у пациенток с NILM, LSIL, HSIL, РШМ (А - данные для врВПЧ в целом, В - для ВПЧ 16).....	53
Рисунок 6. Оценка прогностической значимости вирусной нагрузки в развитии заболеваний шейки матки (А - данные для врВПЧ в целом, Б - для ВПЧ 16).....	53
Рисунок 7. Уровень общей ДНК в образцах цервикальных мазков у пациенток контрольной группы и групп NILM, LSIL, HSIL и РШМ.....	56
Рисунок 8. Сравнение частоты метилирования генов CADM1 (а), MAL (б) и PAX1 (с) с использованием методов real-time ПЦР и цк-ПЦР.....	56
Рисунок 9. Сравнение уровней метилирования генов, выполненное с помощью методов real-time ПЦР и цк-ПЦР: (а) метилирование CADM1; (б) метилирование MAL; (с) метилирование PAX1.....	57
Рисунок 10. Репрезентативные двухмерные графики амплитуды флуоресценции результатов цк-ПЦР для гена CADM1.....	58

Рисунок 11. Цветовая матрица корреляций между уровнями метилирования генов и клиническими параметрами.....	61
Рисунок 12. Оценка прогностической значимости уровней метилирования CADM1, MAL и PAX1: (а) NILM (ВПЧ+) против HSIL; (б) NILM (ВПЧ+) против РШМ.....	66
Рисунок 13. Оценка прогностической значимости уровней метилирования CADM1 и MAL. (а) NILM (HPV+) + LSIL и HSIL + РШМ. (б) NILM (HPV+) и РШМ.....	68
Таблица 1. ИМТ обследованных пациенток.....	32
Таблица 2. Структура экстрагенитальной патологии у обследованных пациенток.....	33
Таблица 3. Структура гинекологической патологии у обследованных пациенток.....	35
Таблица 4. Возраст менархе у обследованных пациенток.....	36
Таблица 5. Возраст начала половой жизни у обследованных пациенток.....	37
Таблица 6. Продолжительность половой жизни у обследованных пациенток.....	38
Таблица 7. Количество половых партнёров у обследованных пациенток.....	39
Таблица 8. Методы контрацепции у обследованных пациенток.....	39
Таблица 9. Паритет обследованных пациенток.....	40
Таблица 10. Возрастная характеристика обследованных пациенток....	49
Таблица 11. Наличие ВПЧ и состояние шейки матки.....	51
Таблица 12. Логистическая регрессия пороговых значений вирусной нагрузки.....	54

Таблица 13. Коэффициенты корреляции Спирмена между уровнями метилирования CADM1, MAL, PAX1 и клинико-анамнестическими характеристиками.....	60
Таблица 14. Уровни метилирования генов CADM1, MAL и PAX1 в диагностических категориях шейки матки (NILM, LSIL, HSIL, РШМ) .....	63
Таблица 15. Диагностическая информативность метилирования генов при NILM+LSIL и HSIL+РШМ у ВПЧ-положительных женщин.....	65
Таблица 16. Диагностическая информативность метилирования генов при NILM и РШМ у ВПЧ-положительных женщин.....	67

## БИБЛИОГРАФИЯ

1. GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries // CA: A Cancer Journal for Clinicians. – 2023. – № 74. – Р. 229–263.
2. Bray F., Laversanne M., Sung H. et al. Global Cancer Statistics 2022 // CA: A Cancer Journal for Clinicians. – 2023. – № 73. – Р. 231–260.
3. Петрова Г. В., Чиссов В. И., Старинский В. В. Злокачественные новообразования в России в 2021 году (заболеваемость и смертность). – М.: ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2022. – С. 59–61.
4. Богданова А. М., Киселева И. А., Андреева Ю. С. и др. Профилактика и ранняя диагностика рака шейки матки: современное состояние проблемы // Онкология. Журнал им. П. А. Герцена. – 2021. – Т. 27, № 2. – С. 97–102.
5. Schiffman M., Castle P. E., Jeronimo J. et al. Human papillomavirus and cervical cancer // The Lancet. – 2007. – № 370. – Р. 890–907.
6. Muñoz N., Bosch F. X., de Sanjosé S. et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer // The New England Journal of Medicine. – 2003. – № 348. – Р. 518–527.
7. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Cancers Associated with Human Papillomavirus // CDC Reports. – 2024. – URL: <https://www.cdc.gov/united-states-cancer-statistics/publications/hpv-associated-cancers.html> (дата обращения: 05.04.2025).
8. Bernard H. U., Burk R. D., Chen Z. et al. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments // Virology. – 2010. – № 401. – Р. 70–79.

9. Wentzensen N., Schiffman M., Palmer T. et al. Triage of HPV-positive women in cervical cancer screening // *Journal of Clinical Oncology*. — 2015. — Т. 33, № 9. — Р. 1035–1042.
10. Покровский В. И., Григорьева Л. Н., Белов А. Б. и др. Диагностика и лечение заболеваний, ассоциированных с ВПЧ: российский опыт // *Акушерство и гинекология*. — 2023. — № 1. — С. 43–48.
11. Clarke M. A., Gradissimo A., Schiffman M., Lam J., Sollecito C. C., Fetterman B. et al. Human papillomavirus DNA methylation as a biomarker for cervical precancer: Consistency across 12 genotypes and potential impact on management of HPV-positive women // *Clinical Cancer Research*. — 2018. — Т. 24, № 9. — Р. 2194–2202.
12. Wentzensen N., Sherman M. E., Schiffman M., Wang S. S. Utility of methylation markers in cervical cancer early detection: Appraisal of the state-of-the-science // *Gynecologic Oncology*. — 2009. — Т. 112, № 2. — Р. 293–299.
13. Overmeer R. M., Henken F. E., Snijders P. J. F. et al. Association between dense CADM1 promoter methylation and reduced protein expression in high-grade CIN and cervical SCC // *Journal of Pathology*. — 2008. — № 215. — Р. 388–397.
14. Su P. H., Lai H. C., Huang R. L. et al. Paired box-1 (PAX1) activates multiple phosphatases and inhibits kinase cascades in cervical cancer // *Scientific Reports*. — 2019. — № 9. — Р. 9195.
15. Mirabello L., Schiffman M., Ghosh A. et al. Elevated methylation of HPV16 DNA is associated with the development of high-grade cervical intraepithelial neoplasia // *International Journal of Cancer*. — 2013. — Т. 132, № 6. — Р. 1412–1422.
16. 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 and Prevention*. — 2014. — Т. 23, № 9. — Р. 1933–1937.

17. Филина Ю. В., Габдулхакова А. Г., Арлеевская М. И. Методы анализа метилирования ДНК // Клиническая лабораторная диагностика. — 2012. — № 8. — С. 15–18.
18. 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. — Т. 83, № 22. — Р. 8604–8610.
19. Devonshire A. S., Whale A. S., Gutteridge A. et al. Towards standardisation of cell-free DNA measurement in plasma: Controls for extraction efficiency, fragment size bias and quantification // Analytical and Bioanalytical Chemistry. — 2014. — Т. 406, № 26. — Р. 6499–6512.
20. Naegele S., Ruiz-Torres D. A., Zhao Y. et al. Comparing the diagnostic performance of quantitative PCR, digital droplet PCR and next-generation sequencing liquid biopsies for human papillomavirus-associated cancers // Journal of Molecular Diagnostics. — 2024. — Т. 26, № 2. — Р. 179–190.
21. Clark S. J., Harrison J., Paul C. L., Frommer M. High sensitivity mapping of methylated cytosines // Nucleic Acids Research. — 1994. — Т. 22, № 15. — Р. 2990–2997.
22. Su P. H. et al. The triage role of cytological DNA methylation in women with non-16/18 HR-HPV // British Journal of Cancer. — 2025. — Т. 132, № 5. — Р. 1064–1071.
23. Overmeer R. M. et al. Combined CADM1 and MAL promoter methylation analysis // International Journal of Cancer. — 2011. — Т. 129, № 9. — Р. 2218–2225.
24. Зыбина Е. Н., Фролова О. Г. Диагностическая ценность молекулярных маркеров при предраковых заболеваниях шейки матки // Акушерство и гинекология. — 2021. — № 10. — С. 84–90.
25. Gopalkrishnan K., Karim R. Addressing global disparities in cervical cancer burden: A narrative review of emerging strategies // Current HIV/AIDS Reports. — 2025. — Т. 22, № 1. — С. 50–68.

26. Arbyn M. et al. Detection of high-grade cervical disease by methylation markers // *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*. — 2020. — Т. 29, № 10. — Р. 2005–2014.
27. Кириллова И. В. и соавт. Эпидемиологические аспекты ВПЧ-инфекции у женщин репродуктивного возраста // *Акушерство и гинекология*. — 2022. — № 6. — С. 74–80.
28. Старинский В. В., Каприн А. Д., Петрова Г. В. Злокачественные новообразования в России в 2022 году (заболеваемость и смертность). — М.: ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2023. — 250 с.
29. Федеральный онкологический регистр Российской Федерации. Злокачественные новообразования в России. — М.: Минздрав РФ, 2023. — 184 с.
30. Бородина С. А. и соавт. Цервикальные неоплазии: клинико-морфологические особенности и молекулярные маркеры // *Онкогинекология*. — 2020. — № 4. — С. 45–52.
31. Bruni L., Albero G., Serrano B. et al. Human papillomavirus and related diseases: Global summary report. — ICO/IARC HPV Information Centre. — Geneva: World Health Organization / International Agency for Research on Cancer, 2023. — 78 p.
32. de Sanjosé S., Quint W. G. V., Alemany L. et al. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study // *The Lancet Oncology*. — 2010. — Т. 11, № 11. — С. 1048–1056.
33. Dong L., Meng Y., Ge H. et al. Risk stratification of HPV16 DNA methylation combined with E6 oncoprotein in cervical cancer screening: a 10-year prospective cohort study // *Clinical Epigenetics*. — 2020. — Т. 12. — С. 91.
34. de Villiers E.-M., Fauquet C., Broker T. R. et al. Classification of papillomaviruses // *Virology*. — 2004. — Т. 324, № 1. — С. 17–27.
35. Molano M., Machalek D. A., Tan G. 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 // *BMJ Open*. — 2024. — Т. 14, № 6. — e081282.
36. WHO Classification of Tumours. Pathology and Genetics: Tumours of the Female Reproductive Organs. — Lyon: IARC Press, 2014. — 355 p.
  37. Solomon D. et al. The 2001 Bethesda System: Terminology for reporting results of cervical cytology // *JAMA*. — 2002. — Т. 287, № 16. — Р. 2114–2119.
  38. Doorbar J. The papillomavirus life cycle // *Journal of Clinical Virology*. — 2005. — № 32. — Р. 7–15.
  39. Шафранова И. В., Фалина М. А., Печенкина Д. А. и др. Современные подходы к диагностике ВПЧ-ассоциированных заболеваний шейки матки // *Российский онкологический журнал*. — 2020. — № 2. — С. 35–41.
  40. Файзуллина Л. З., Абдуллина Л. Р., Юсупова Г. А. и др. Роль вируса папилломы человека в канцерогенезе шейки матки // *Онкогинекология*. — 2021. — № 3. — С. 22–28.
  41. Van Doorslaer K., Chen Z., Bernard H.-U. et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Papillomaviridae // *Journal of General Virology*. — 2018. — Т. 99, № 5. — С. 615–616.
  42. Муратова Л. М., Киселёва И. А., Макарова О. В. и др. Особенности течения ВПЧ-инфекции и патологии шейки матки // *Акушерство и гинекология*. — 2021. — № 7. — С. 58–63.
  43. Guan P., Howell-Jones R., Li N. et al. Human papillomavirus types in 115,789 women worldwide: a meta-analysis // *The Lancet Oncology*. — 2012. — Т. 13, № 11. — С. 102–114.
  44. Van Dyne E. A., Henley S. J., Saraiya M. et al. Trends in human papillomavirus–associated cancers — United States, 1999–2015 // *Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR)*. — 2018. — Т. 67, № 33. — С. 918–924.

45. Царёва Е. В., Киселёва И. А., Мельникова Е. А. и др. Эпидемиологические особенности ВПЧ-инфекции в группах повышенного риска // Акушерство и гинекология. — 2022. — № 3. — С. 72–77.
46. Bosch F. X., Lorincz A., Muñoz N. et al. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer // Journal of the National Cancer Institute. — 2002. — Т. 94, № 1. — Р. 3–13.
47. Mac M., Torres M. J., Lopez D. et al. Pathogenic mechanisms of HPV infection and cervical carcinogenesis // Pathogens. — 2020. — № 9 (7). — Р. 555–567.
48. Leontiou C. A., Hadjidaniel M. D., El-Maarri O. et al. Bisulfite conversion of DNA: performance comparison of different kits and methylation quantitation of epigenetic biomarkers // PLOS ONE. — 2015. — Т. 10, № 8. — e0135058.
49. Doorbar J., Quint W., Banks L. et al. The biology and life-cycle of human papillomaviruses // Vaccine. — 2012. — Т. 30, Suppl. 5. — С. F55–F70.
50. Dankai W., Khunamornpong S., Siriaunkul S. et al. Role of genomic DNA methylation in detection of cytologic and histologic abnormalities in high-risk HPV-infected women // PLOS ONE. — 2019. — Т. 14, № 1. — e0210289.
51. Mirabello L. et al. Elevated methylation of HPV16 DNA is associated with the development of high-grade cervical intraepithelial neoplasia // International Journal of Cancer. — 2013. — Т. 132, № 6. — Р. 1412–1422.
52. Ho G. Y. et al. Natural history of cervical neoplasia and HPV infection in young women // The New England Journal of Medicine. — 1998. — Т. 338. — Р. 423–428.
53. Salta S., de Sousa A., Melo J. et al. DNA methylation as a triage marker for colposcopy referral in HPV-positive women: a meta-analysis // Clinical Epigenetics. — 2023. — Т. 15, № 1. — Ст. 37.
54. Esteller M. Epigenetics in cancer // The New England Journal of Medicine. — 2008. — Т. 358. — Р. 1148–1159.

55. Kim M. K. et al. Clinical significance of CADM1 and MAL methylation in HPV-positive women // *Journal of Gynecologic Oncology*. — 2016. — Т. 27, № 6. — Р. e58.
56. Widschwendter M., Fiegl H., Egle D. et al. Epigenetic methylation markers in cancer diagnostics // *Nature Reviews Cancer*. — 2007. — Т. 7, № 4. — Р. 259–268.
57. Гончарова О. В., Бабич А. В., Гордеева Е. В. и др. Эпигенетические маркеры в диагностике предраковых заболеваний шейки матки // *Онкогинекология*. — 2021. — № 2. — С. 38–44.
58. Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory // *Genes & Development*. — 2002. — Т. 16. — Р. 6–21.
59. Clark S. J., Harrison J., Paul C. L., Frommer M. High sensitivity mapping of methylated cytosines // *Nucleic Acids Research*. — 1994. — Т. 22, № 15. — Р. 2990–2997.
60. Степанова Н. В., Иванова О. С., Минакова И. А. и др. Эпигенетические маркеры и вирусная нагрузка при ЦИН // *Российский онкологический журнал*. — 2020. — Т. 25, № 3. — С. 41–47.
61. Henken F. E., Snijders P. J., Meijer C. J. et al. Association between promoter methylation and gene silencing in cervical cancer // *International Journal of Cancer*. — 2007. — Т. 121, № 2. — Р. 219–226.
62. Gupta S. M., Kumar P., Das B. C. et al. Molecular mechanisms in progression of HPV-associated cervical carcinogenesis // *Journal of Biomedical Science*. — 2019. — Т. 26. — Ст. 28.
63. Михайлова С. П., Иванова Е. А., Федорова А. А. и др. Метилирование ДНК как маркер прогрессирования цервикальных неоплазий // *Онкогинекология*. — 2022. — № 4. — С. 55–60.
64. Steenbergen R. D., de Wilde J., Wilting S. M. et al. Molecular changes in cervical carcinogenesis // *Journal of the National Cancer Institute*. — 2004. — Т. 96, № 13. — Р. 998–1006.

65. 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 and Prevention*. — 2014. — Т. 23, № 9. — Р. 1933–1937.
66. Hesselink A. T., Heideman D. A., Steenbergen R. D. et al. Combined methylation marker testing improves detection of CIN2+ in HPV-positive women // *Clinical Cancer Research*. — 2011. — Т. 17, № 8. — Р. 2459–2465.
67. Nikolaidis C., Soufla G., Tzimagiorgis G. et al. DNA methylation biomarkers in cervical cancer screening // *Cancer Epidemiology*. — 2015. — Т. 39, № 2. — Р. 307–314.
68. Peronace C., Corrado G., Marchetti C. et al. Diagnostic value of methylation markers in HPV-associated cervical lesions // *Pathogens*. — 2024. — Т. 13, № 2. — Р. 198–206.
69. Файзуллин Л. З., Киселёва И. А., Смирнова Т. В. и др. Эпигенетические маркеры при ВПЧ-инфекции шейки матки // *Российский онкологический журнал*. — 2022. — № 3. — С. 41–47.
70. Kelly H., Benoy I., Simoens C. et al. Performance of DNA methylation markers for CIN2+ detection // *British Journal of Cancer*. — 2019. — Т. 121, № 4. — Р. 353–360.
71. Chaiwongkot A., Vinayanuwattikun C., Chaiyarat P. et al. Methylation patterns in high-grade cervical lesions // *BMC Cancer*. — 2017. — Т. 17. — Р. 437–445.
72. Jeronimo J., Bansal M., Lim C. et al. Methylation markers in cervical carcinogenesis: a prospective study // *International Journal of Cancer*. — 2017. — Т. 141, № 12. — Р. 2485–2496.
73. Wilting S. M., Steenbergen R. D. M., Tijssen M. et al. Molecular events leading to HPV-induced high-grade neoplasia of the cervix // *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. — 2016. — Т. 25, № 7. — Р. 1098–1108.

74. Verlaat W., Chen H. C., Steenbergen R. D. et al. DNA methylation markers as triage tool in HPV-positive screening // Clinical Epigenetics. — 2018. — T. 10, № 1. — P. 111–119.
75. Risk factors for human papillomavirus infection, cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer: an umbrella review and follow-up Mendelian randomisation studies // BMC Medicine. — 2023. — T. 21. — P. 274–290.
76. Zhang L., Zhang C., Yang H. et al. DNA methylation biomarkers in cervical intraepithelial neoplasia and cancer // Frontiers in Oncology. — 2022. — T. 12. — P. 102–118.
77. Castle P. E., Glass A. G., Rush B. B. et al. Evaluation of methylation markers in HPV-positive women // Journal of the National Cancer Institute. — 2011. — T. 103, № 8. — P. 631–638.
78. Zhu H., Zhu H., Tian M., Wang D., He J., Xu T. DNA methylation and hydroxymethylation in cervical cancer: diagnosis, prognosis and treatment // Cancers. — 2020. — T. 12, № 4. — C. 1124.
79. Кириллова И. В., Смирнова Е. П., Федосеева Н. А. и др. ВПЧ-ассоциированные заболевания шейки матки: молекулярные и клинические аспекты // Акушерство и гинекология. — 2022. — № 5. — С. 59–65.
80. Bonde J., Reboulj M., Ejegod D. et al. CADM1, MAL and miR124-2 methylation in cervical scrapes predicts underlying high-grade CIN in HPV-positive women // International Journal of Cancer. — 2020. — T. 147, № 5. — P. 1250–1259.
81. Миронова Т. В., Шахова Н. М., Глебова Н. О. и др. Эпигенетические и вирусологические аспекты дисплазий шейки матки // Онкогинекология. — 2023. — № 3. — С. 15–21.
82. Summary of Current Guidelines for Cervical Cancer Screening and Management of Abnormal Test Results: 2016–2020 // Journal of Women’s Health. — 2020. — T. 29, № 7. — P. 891–899.

83. Cuzick J., Arbyn M., Sankaranarayanan R. et al. Cervical screening in the HPV era // *The Lancet Oncology*. — 2021. — Т. 22, № 5. — Р. 661–675.
84. Liu Y., Wu B., Wang X. et al. Risk factors for high-grade cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer: a large cohort study // *BMC Cancer*. — 2020. — Т. 20, № 1. — Р. 789–796.
85. Проń Н. В., Зверева Н. Е., Зотова О. М. и др. Анализ выявляемости предраковой и раковой патологии по данным гинекологического материала за 2019–2021 гг. // *Многопрофильный стационар*. — 2022. — Т. 9, № 1. — С. 149–152.
86. Вонский М. С., Шабаева М. Г., Рунов А. Л. и др. Канцерогенез, ассоциированный с вирусами папилломы человека: механизмы и возможности иммунотерапии // *Биохимия*. — 2019. — Т. 84, № 7. — С. 995–1015.
87. Фёдорова Т. А., Седых Т. В., Краснова Л. А. и др. Изучение факторов риска заболеваний шейки матки у женщин репродуктивного возраста // *Российский вестник акушера-гинеколога*. — 2021. — Т. 21, № 4. — С. 42–47.
88. Савельева И. П., Баранова А. М., Агафонова Н. Н. и др. Факторы риска и пути профилактики предраковых заболеваний шейки матки // *Акушерство и гинекология*. — 2022. — № 12. — С. 93–98.
89. Plummer M., Herrero R., Franceschi S. et al. Smoking and cervical cancer: pooled analysis of the IARC multi-centric case-control study // *Cancer Causes & Control*. — 2003. — Т. 14, № 9. — Р. 805–814.
90. Филимонова Е. Г., Белова О. А., Алексеева С. В. Влияние курения и особенностей сексуального поведения на формирование патологии шейки матки // *Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии*. — 2020. — Т. 19, № 5. — С. 56–61.
91. Castle P. E., Schiffman M., Wheeler C. M. et al. Early age at first sexual intercourse and risk of cervical cancer in HPV-infected women // *Journal of Infectious Diseases*. — 2005. — Т. 191, № 9. — Р. 1461–1467.

92. Завьялова И. А., Романова Е. В., Кокшарова Ю. В. Особенности сексуального и репродуктивного поведения женщин с различными формами патологии шейки матки // Акушерство и гинекология. — 2023. — № 3. — С. 95–100.
93. Muñoz N., Franceschi S., Bosetti C. et al. Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: the IARC multicentric case-control study // The Lancet. — 2002. — Т. 359, № 9312. — Р. 1093–1101.
94. Зарубина И. В., Громова О. А. Влияние репродуктивных факторов на развитие дисплазии шейки матки // Акушерство и гинекология. — 2021. — № 6. — С. 116–120.
95. Smith J. S., Green J., de Gonzalez A. B. et al. Cervical cancer and use of hormonal contraceptives: a systematic review // The Lancet. — 2003. — Т. 361, № 9364. — Р. 1159–1167.
96. Vaccarella S., Herrero R., Snijders P. J. F. et al. Smoking and HPV infection: pooled analysis of the IARC HPV prevalence surveys // International Journal of Epidemiology. — 2008. — Т. 37, № 3. — Р. 536–546.
97. Зароченцева Н. В., Кузнецова О. П. Роль поведенческих факторов в развитии ВПЧ-ассоциированных заболеваний шейки матки // Акушерство и гинекология. — 2021. — № 5. — С. 63–68.
98. Clifford G. M., Gallus S., Herrero R. et al. Worldwide distribution of human papillomavirus types in cytologically normal women and in women with cervical lesions // Vaccine. — 2006. — Т. 24, Suppl. 3. — Р. 26–34.
99. Бондаренко Д. А. Факторы риска цервикальных интраэпителиальных неоплазий и пути их профилактики // Акушерство и гинекология. — 2022. — № 11. — С. 78–84.
100. Ибрагимова М. К., Цыганов М. М., Карабут И. В. и др. Интегративные и эпизомальные формы ВПЧ 16-го типа у пациенток с ЦИН и раком шейки матки // Онкоцитология. — 2019. — № 2. — С. 34–40.

101. Виноградова О. П. Морфологическая оценка цитологических препаратов при ВПЧ-ассоциированных поражениях шейки матки // Цитологические исследования. — 2020. — № 4. — С. 55–60.
102. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Volume 90: Human Papillomaviruses. — Lyon: IARC Press, 2007. — 689 p.
103. Giuliano A. R., Lee J. H., Fulp W. et al. Human papillomavirus infection and disease in men: epidemiology, pathogenesis and prevention // The Lancet Infectious Diseases. — 2015. — Т. 15, № 8. — Р. 889–902.
104. Антонова Е. М., Бахтиярова Д. Ф. Вирус папилломы человека: молекулярные механизмы канцерогенеза // Вирусология. — 2018. — № 3. — С. 210–217.
105. Фролова Е. Г., Морозов С. П. Современные методы лабораторной диагностики вируса папилломы человека // Клиническая лабораторная диагностика. — 2020. — № 5. — С. 28–34.
106. Huggett J. F., Foy C. A., Benes V. et al. The digital MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative digital PCR experiments // Clinical Chemistry. — 2013. — Т. 59, № 6. — Р. 892–902.
107. Mazaika E., Homsy J. Digital droplet PCR: methods and protocols // Current Protocols in Human Genetics. — 2014. — № 82. — Р. 1–13.
108. Гусева Н. Г., Михайлова С. П., Киселёва И. А. и др. Возможности цифровой ПЦР в клинической лабораторной диагностике // Вестник лабораторной медицины. — 2021. — № 4. — С. 25–31.
109. Leffers M., 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.
110. Li Y., Wang L., Zhang M. et al. Detection of CADM1 and MAL methylation using droplet digital PCR for triage of HPV-positive women // Clinical Epigenetics. — 2021. — Т. 13, № 1. — Р. 123–132.

111. Liu S. S., Leung R. C., Chan K. K. et al. Diagnostic performance of DNA methylation assays for cervical intraepithelial neoplasia: a systematic review and meta-analysis // *Gynecologic Oncology*. — 2022. — Т. 164, № 1. — Р. 139–147.
112. Шаронова А. С., Лебедев А. Н. Анализ метилирования генов в онкогинекологии методом цифровой ПЦР // *Молекулярная медицина*. — 2023. — Т. 21, № 4. — С. 25–32.
113. Luttmer R., De Strooper L. M. A., Dijkstra M. G. et al. CADM1, MAL and miR124-2 methylation in cervical scrapes: a triage tool for high-risk HPV-positive women // *Clinical Cancer Research*. — 2016. — Т. 22, № 4. — Р. 888–896.
114. Van Baars R., Meijer C. J., Snijders P. J. F. et al. CADM1 and MAL methylation status in cervical scrapes predicts underlying high-grade CIN in high-risk HPV-positive women // *International Journal of Cancer*. — 2012. — Т. 130, № 8. — Р. 1851–1858.
115. Clarke M. A., Wentzensen N., Mirabello L. et al. Hypermethylation of CADM1 and MAL genes in cervical cancer screening: a systematic review and meta-analysis // *Gynecologic Oncology*. — 2020. — Т. 156, № 3. — Р. 678–687.
116. Liou Y. L., Huang R. L., Lai H. C. et al. DNA methylation biomarkers for cervical precancerous lesions // *International Journal of Cancer*. — 2014. — Т. 135, № 2. — Р. 247–255.
117. Kalantari M., Conway M. J., Rodriguez A. C. et al. Methylation of human papillomavirus type 16 genome and risk of cervical neoplasia // *Journal of the National Cancer Institute*. — 2004. — Т. 96, № 15. — Р. 1095–1103.
118. Zhang C., Liu Y., Dong Y. et al. Performance of DNA methylation markers in cervical cancer screening: a systematic review and meta-analysis // *Journal of Lower Genital Tract Disease*. — 2022. — Т. 26, № 1. — Р. 1–12.
119. Luo X., Chen H., Zheng Y. et al. Diagnostic performance of combined methylation markers for cervical intraepithelial neoplasia // *Journal of Clinical Pathology*. — 2024. — Т. 77, № 2. — Р. 121–128.

120. Kim S. H., Choi C. H., Park S. Y. et al. Prognostic value of CADM1 promoter methylation in HPV-positive cervical cancer // International Journal of Gynecologic Cancer. — 2025. — Т. 35, № 1. — Р. 84–92.
121. Wentzensen N., Sherman M. E., Wang S. S. et al. Methylation markers in cervical cancer early detection: appraisal of the state of the science // Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention. — 2009. — Т. 18, № 11. — С. 3000–3007.
122. Chang Y., Zhang C., Li H. et al. Genome-wide DNA methylation profiling identifies novel biomarkers in cervical cancer screening // Clinical Epigenetics. — 2023. — Т. 15, № 1. — С. 12–19.
123. Соловьёва Е. А., Соколова Н. В., Кондратьева А. С. и др. Современные подходы к интерпретации ВПЧ-тестирования и цитологии в скрининге рака шейки матки // Акушерство и гинекология. — 2022. — № 12. — С. 50–56.
124. Cuschieri K., Wentzensen N., Arbyn M. et al. Triage of HPV-positive women: evaluation of methylation and viral markers // International Journal of Cancer. — 2019. — Т. 144, № 4. — С. 741–749.
125. Панова Т. В., Журавлёва Е. В., Михайлова С. П. и др. Роль эпигенетических маркеров в оценке риска дисплазий шейки матки // Онкогинекология. — 2023. — № 3. — С. 15–21.
126. Del Mistro A., Frayle H., Ferro A. et al. Methylation analysis and HPV genotyping in cervical intraepithelial neoplasia // International Journal of Cancer. — 2017. — Т. 140, № 5. — С. 1119–1130.
127. Chen Y., Yu M., Zhang Z. et al. Methylation biomarkers for cervical cancer detection and triage // Clinical Epigenetics. — 2020. — Т. 12, № 1. — С. 144–152.
128. Burger E. A., Kim J. J., Sy S. et al. Age of HPV infection acquisition and risk of cervical cancer // JNCI Cancer Spectrum. — 2020. — Т. 4, № 2. — С. 78–86.

129. Киселёва И. А., Чернова Е. В., Тихонова А. В. Влияние молекулярных маркеров на диагностику предраковых поражений шейки матки // Журнал акушерства и женских болезней. — 2023. — № 5. — С. 29–35.
130. Hussain S., Huang J., Zhang Y. et al. CADM1 and MAL methylation in cervical cancer: diagnostic and prognostic value // Cancers. — 2022. — Т. 14, № 18. — С. 4515–4523.
131. Братусь В. П., Лапин В. А., Мишина И. Е. Цервикальные интраэпителиальные неоплазии. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2021. — 224 с.
132. Kang S., Lee S. J., Park S. Y. et al. CADM1 promoter methylation as a triage biomarker in HPV-positive women // Clinical Epigenetics. — 2022. — Т. 14, № 1. — С. 86–94.
133. Zhao F. H., Hu S. Y., Bian J. et al. Methylation markers for triage of HPV-positive women in cervical screening // International Journal of Cancer. — 2020. — Т. 147, № 5. — С. 1243–1252.
134. Van Baars R., Meijer C. J., Snijders P. J. F. et al. CADM1 and MAL methylation patterns in cervical scrapes predict high-grade lesions // Journal of Pathology. — 2018. — Т. 244, № 3. — С. 314–325.
135. Литвинова Н. В., Федорова А. А. Возможности метилирования в стратификации риска при ВПЧ-ассоциированных заболеваниях // Вестник репродуктивного здоровья. — 2023. — № 1. — С. 44–48.
136. De Strooper L. M. A., Berkhof J., Steenbergen R. D. et al. CADM1, MAL and miR124-2 methylation analysis in self-samples compared with paired physician-taken samples for detecting cervical (pre)cancer in HPV-positive women // International Journal of Cancer. — 2016. — Т. 138, № 4. — С. 992–1002.
137. Сальникова Н. М., Данилова И. Д. Возможности алгоритмической оценки риска СИН на основе цитологии и ПЦР // Акушерство и гинекология. — 2022. — № 3. — С. 72–77.

138. Mendivil A., Cohen P. A., Ramirez P. T. Molecular markers for cervical carcinogenesis and their role in precision oncology // *Gynecologic Oncology*. — 2021. — T. 162, № 3. — C. 631–638.
139. Rosendo-Chalma P., López-Díaz M., Contreras-Paredes A. et al. The hallmarks of cervical cancer: molecular mechanisms induced by human papillomavirus // *Biology*. — 2024. — T. 13, № 2. — Cт. 77.

## ПРИЛОЖЕНИЕ

### **Анкета для пациенток с выявленным ВПЧ высокого онкогенного риска**

1. Какое количество беременностей у вас было? \_\_\_\_\_ из них родов \_\_\_\_\_ (самопроизвольные/кесарево сечение), абортов/выкидышей \_\_\_\_\_
2. Были ли разрывы, травмы шейки матки во время родов? \_\_\_\_\_ (да/нет)
3. Были ли у вас выскабливания полости матки (после абортов, выкидышей, кровотечений)?  
\_\_\_\_\_ (да-причина/нет)
4. Перечислите: хронические заболевания \_\_\_\_\_  
операции \_\_\_\_\_  
лекарственные препараты, которые ежедневно принимаете \_\_\_\_\_
5. В каком возрасте начались менструации? \_\_\_\_\_
6. Есть ли у вас гинекологические заболевания? \_\_\_\_\_  
(миома матки, эндометриоз, полип, иное..)
7. Были ли обнаружены инфекции передающиеся половым путем? \_\_\_\_\_  
(сифилис, гонорея, хламидиоз, генитальный герпес, трихомониаз, иное..)
8. В каком возрасте начали половую жизнь? \_\_\_\_\_  
количество половых партнеров: 1-2 , 2-4, более 4 (нужное подчеркнуть)
9. Используете ли вы контрацепцию? \_\_\_\_\_ (нет, иногда, чаще использовала)

какой метод? \_\_\_\_\_ (прерванный половой акт, презерватив, гормональные препараты)

10. Когда впервые обнаружен ВПЧ (вирус папилломы человека)? \_\_\_\_\_  
когда впервые обнаружены изменения на шейке матке/нет изменений \_\_\_\_\_  
проводилось лечение \_\_\_\_\_ (нет/да, какое?)

11. Когда была проведена последняя жидкостная цитология с шейки матки? \_\_\_\_\_ (результат)

12. Были ли у ближайших родственников онкологические заболевания?  
\_\_\_\_\_ (нет/да, степень родства - какое)

13. Есть ли у вас вредные привычки? \_\_\_\_\_ (курение, алкоголь, иное)