

ОЦЕНКА СТЕПЕНИ ТЯЖЕСТИ ЦЕРВИКАЛЬНОЙ ДИСПЛАЗИИ ПУТЕМ АНАЛИЗА МИКРОРНК В МАТЕРИАЛЕ ЦЕРВИКАЛЬНОГО МАЗКА

**М. С. Князева¹, Л. М. Забегина¹, О. М. Конева², В. В. Лютынский²,
О. А. Смирнова¹, В. И. Жамойдик³, И. Д. Куприна⁴, Е. С. Козорезова⁴,
С. Л. Воробьев⁴, Е. Л. Якубо¹, А. С. Артемьева¹, И. В. Берлев^{1,5}, А. В. Малек¹**

¹ ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Петрова» Минздрава России, Санкт-Петербург

² ООО «Альгимед Техно», Минск (Беларусь)

³ ГБУЗ ЛО «Тосненская клиническая межрайонная больница», г. Тосно, Ленинградская область

⁴ ООО «Национальный центр клинической морфологической диагностики», Санкт-Петербург

⁵ ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И. И. Мечникова Минздрава России, Санкт-Петербург

Цель исследования. Анализ технологических характеристик и показателей диагностической значимости набора для оценки степени тяжести цервикальной дисплазии «NOVAprep-miR-CERVIX».

Материалы и методы. Образцы цервикального эпителия 226 женщин (NILM — n. 114, HSIL — n. 103, CIS — n. 9). Методы анализа: цитологическое, гистологическое исследования (для образцов HSIL/CIS), ВПЧ-тестирование, анализ профиля экспрессии шести молекул микроРНК методом обратной транскрипции и ПЦП с помощью набора «NOVAprep-miR-CERVIX».

Результаты. С учетом критериев качества биологического материала успешный анализ экспрессии шести маркерных молекул микроРНК был проведен для 188 из 226 образцов. Для этих образцов был проведен расчет значения параметра miR-CERVIX в диапазоне от 0 до 1. С учетом порогового значения показателя miR-CERVIX ≥ 0.49 , набор NOVAprep-miR-CERVIX может быть использован для скрининга цервикальных дисплазий (чувствительность 79 %, специфичность 79 %). С учетом порогового значения показателя miR-CERVIX ≥ 0.77 , набор NOVAprep-miR-CERVIX может быть использован для уточняющей диагностики цервикальной неоплазии тяжелой степени (чувствительность 51 %, специфичность 98 %).

Заключение. Набор NOVAprep-miR-CERVIX может быть рекомендован для клинического применения как инструмент оценки степени тяжести цервикальной дисплазии. Дополнительные исследования необходимы для определения (а) места технологии NOVAprep-miR-CERVIX в структуре программ скрининга РШМ и (б) целесообразности использования этой технологии для динамической оценки степени тяжести цервикальной дисплазии в процессе консервативной терапии.

Ключевые слова: микроРНК, цервикальная дисплазия, диагностика, рак шейки матки, NOVAprep-miR-CERVIX.

ASSESSMENT OF CERVICAL DYSPLASIA SEVERITY USING MICRORNA ANALYSIS OF CERVICAL SMEAR CYTOLOGY MATERIAL

**M. S. Knyazeva¹, L. M. Zabegina¹, O. M. Koneva², V. V. Lyutynskiy², O. A. Smirnova¹,
V. I. Zhamoydik³, I. D. Kuprina⁴, E. S. Kozorezova⁴, S. L. Vorobyov⁴, E. L. Yakubo¹,
A. S. Artemyeva¹, I. V. Berlev^{1,5}, A. V. Malek¹**

¹ Federal State Budgetary Institution "N. N. Petrov National Medical Research Center of Oncology" of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Saint Petersburg

² Limited Liability Company "Algimed Techno", Minsk

³ State Budgetary Healthcare Institution of Leningrad Region "Tosno Clinical Interregional Hospital"

⁴ Limited Liability Company "National Center of Clinical and Morphological Diagnostics", Saint Petersburg

⁵ Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education I. M. Mechnikov North-Western State Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Saint Petersburg

Objective of the study is an analysis of technical and operational characteristics and indicators of diagnostic significance of "NOVAprep-miR-CERVIX" cervical dysplasia severity assessment kit.

Materials and Methods: Cervical epithelium specimens obtained from 226 women (NILM — n.114, HSIL — n.103, CIS — n.9). Methods of the analysis: cytologic examination, histologic examination (for HSIL/CIS specimens), HPV testing, analysis of the expression profile of six microRNA molecules by reverse transcription technique and polymerase chain reaction (PCR) using “NOVAprep-miR-CERVIX” kit.

Results. Based on biological material quality criteria, a successful analysis of the expression of six microRNA marker molecules was performed in 188 of 226 samples. The value of the miR-CERVIX parameter was calculated for these samples in a range from zero to one. Considering miR-CERVIX threshold value $\geq 0,49$, NOVAprep-miR-CERVIX kit can be used for the screening of cervical dysplasia (sensitivity 79%, specificity 79%). Based on miR-CERVIX threshold value $\geq 0,77$, NOVAprep-miR-CERVIX kit can be used for the clarifying diagnosis of severe cervical neoplasia (sensitivity 51%, specificity 98%).

Conclusion. NOVAprep-miR-CERVIX kit can be recommended for the clinical use as a tool for the assessment of cervical dysplasia severity. Further research is required to determine (a) the rank of NOVAprep-miR-CERVIX technology in the structure of cervical cancer screening programs and (b) the feasibility of the use of this technology for dynamic assessment of cervical dysplasia severity in the process of conservative therapy.

Keywords: micro-RNA, cervical dysplasia, diagnosis, cervical cancer, NOVAprep-miR-CERVIX.

Введение

Рак шейки матки (РШМ) стабильно находится на пятом месте (5,2 %) в структуре онкологической заболеваемости женщин в России. В структуре причин онкологической смертности женщин РШМ занимает десятое место (4,7 %) [1]. Очевидно, что изменить эти показатели можно путем повышения эффективности скрининговых программ, методов диагностики и лечения предопухолевых заболеваний цервикального эпителия (т.н. интраэпителиальных неоплазий/squamous intraepithelial lesion).

Основным методом скрининга и диагностики цервикальных неоплазий является цитологическое исследование (ЦИ). Эффективность этого метода при использовании технологии жидкостной цитологии достигает относительно высоких показателей диагностической чувствительности (78,3 %), специфичности (95,9 %) и точности (85 %) [2]. С учетом этиологической роли вируса папилломы человека (ВПЧ) и высокой аналитической точности метода ПЦР-детекции вирусной ДНК в материале цервикального мазка ВПЧ-тестирование также является важным элементом скрининга РШМ [3]. Сравнительный анализ различных методов лабораторной и инструментальной диагностики цервикальных неоплазий, проведенный R. A. Mustafa и соавторами, не показал впечатляющих результатов [4]. Так, диагностическая чувствительность возростала в ряду «ЦИ < ВПЧ-тест < кольпоскопия» от 70 до 95 %, а диагностическая специфичность — в ряду «кольпоскопия < ВПЧ-тест < ЦИ» от 42

до 96 % [4]. Оценка точности стандартных подходов диагностики предраковых заболеваний и РШМ, которая была проведена Т. В. Сушинской и соавторами на материале 410 пациенток, прошедших все этапы диагностического процесса (от первичного обращения в поликлинику до хирургического стадирования), также не показала удовлетворительных результатов [5]. Интересно, что в группе пациенток с предраковыми заболеваниями на этапе первичного обращения был характерен феномен «гиподиагностики», почти в трети случаев диагноз был изменен после окончания обследования [5]. Результаты представленных аналитических исследований указывают на необходимость разработки и внедрения в практику новых диагностических подходов.

В течение последних лет ведутся активные разработки методов анализа эпигенетических изменений, ассоциированных с процессом малигнизации цервикального эпителия. Активно исследуются особенности профиля метилирования геномной ДНК [6] экспрессии мРНК [7] и микроРНК [8] клеток РШМ, которые могут иметь патогенетическое значение и диагностический потенциал. Так, микроРНК — малые регуляторные молекулы, контролирующие стабильность белок-кодирующих РНК в цитоплазме, расцениваются как перспективные маркеры неопластической трансформации цервикального эпителия. Патогномичный характер изменения профиля (состава) молекул микроРНК в клетках эпителия цервикального канала был продемонстрирован многими

исследованиями [9], но по ряду технических причин эти результаты пока не реализованы в виде метода клиничко-лабораторной диагностики.

Трудности разработки диагностических методов на основе анализа микроРНК сопряжены с (а) проблематичностью ПЦР анализа коротких молекул, (б) отсутствием надежных технологий нормализации полученных ПЦР данных и (в) сложностью клинически адекватной интерпретации результатов. Набор NOVAprep-miR-CERVIX является примером комплексного решения этих проблем. В данной статье представлена информация о структуре набора и результаты клиничко-лабораторного испытания, проведенного на базе ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Петрова» МЗ РФ (договор № 52/22 от 21.04.2022) при участии ООО «Национальный центр клинической морфологической диагностики».

Материалы и методы

Биологический материал. Исследование было одобрено локальным этическим комитетом ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Петрова» (протокол заседания № 1 от 28.01.2021). Все пациентки, материал которых был использован в работе, подписали информированное согласие, а клинические данные были депersonализованы. В исследование был включен материал от 226 женщин, проходивших гинекологическое обследование в течение 2021 года. Всем участницам было проведено цитологическое исследование клеточного материала цервикального мазка, для оценки цитологического материала использовалась классификация The Bethesda System for Reporting Cervical Cytology [10]. Всем пациенткам с цитологическим диагнозом «плоскоклеточная неоплазия церви-

кального эпителия тяжелой степени» (HSIL) или «карцинома in situ» (CIS) была проведена либо диагностическая биопсия, либо оперативное лечение заболевания шейки с последующим гистологическим исследованием операционного материала. Случаи расхождения цитологического и гистологического диагнозов были исключены из исследования. Пациентки с цитологическим диагнозом плоскоклеточной неоплазии легкой степени (LSIL) в исследование не включались. Пациентки с гинекологическими заболеваниями, измененной анатомией шейки матки, хроническими метаболическими нарушениями или аутоиммунными заболеваниями в исследование не включались. Число участниц, включенных в исследование, и возрастные параметры групп представлены в таблице 1.

Лабораторные исследования. В качестве материала для выделения и анализа микроРНК были использованы суспензии клеток цервикального эпителия в транспортной среде, оставшиеся после формирования препарата методом жидкостной цитологии. Взвесь клеток (1.8 мл) центрифугировали для получения клеточного осадка, который содержал от двух до десяти тысяч клеток. Твердофазная экстракция нуклеиновых кислот из клеток цервикального эпителия проводилась, согласно инструкции NOVAprep-miR-CERVIX, путем разрушения клеточной мембраны и комплексов микроРНК с молекулами цитоплазматических белков лизирующим раствором, сорбции молекул нуклеиновых кислот на поверхности магнитных частиц, удаления (отмывки) клеточных компонентов. Обработка магнитных частиц раствором для элюции (50 мкл) приводила к диссоциации молекул РНК/ДНК от поверхности частиц в элюирующий раствор.

Таблица 1

Характеристики биологического материала

Группа	Цитологический диагноз	Число образцов	Средний возраст
1	Цитограмма без интраэпителиальных поражений (NILM, negative for intraepithelial lesion or malignancy)	114	38 (21–52)
2	Плоскоклеточная неоплазия цервикального эпителия тяжелой степени (HSIL, high-grade squamous intraepithelial lesion)	103	41 (22–48)
3	Карцинома in situ (CIS, carcinoma in situ)	9	43 (38–51)

Полученный раствор нуклеиновых кислот был использован для анализа микроРНК и тестирования ВПЧ. В первом случае реакции обратной транскрипции и полимеразной реакции для количественного анализа восьми молекул проводили с использованием набора реагентов NOVAprep-miR-CERVIX в соответствии с протоколом производителя. Оценку статуса инфицирования ВПЧ выполняли с помощью набора «РеалБест ДНК ВПЧ ВКР скрин» (14 серотипов, включая 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 и 68, без дифференцирования) производства компании «Вектор Бест» (Россия). Все исследования были проведены на аппарате CFX96 Touch™ Real-TimePCR Detection System (Bio-Rad, США). Для анализа результатов были использованы программное обеспечение и соответствующие инструкции производителей. В случае анализа профиля маркерных микроРНК результаты каждого исследования были представлены в виде параметра miR-CERVIX и отметки на цветной шкале, визуализирующей значение этого параметра; в случае ВПЧ-теста результат предполагал позитивный либо негативный статус.

Статистика. Результаты цитологического исследования (в случаях HSIL/CIS, подтвержденных результатами гистологического исследования) были использованы в качестве референсных значений при оценке результатов, полученных с помощью диагностических

наборов (NOVAprep-miR-CERVIX и РеалБест ДНК ВПЧ ВКР скрин). Для оценки статистической значимости разницы значений параметра miR-CERVIX в сравниваемых группах проводили расчет критерия Mann-Withney. Для оценки диагностической значимости методов (NOVAprep-miR-CERVIX и РеалБест ДНК ВПЧ ВКР скрин) проводили расчет числа истинно-положительных прогнозов (ИП) — случаи, при которых результат теста показывает наличие заболевания у пациенток группы HSIL/CIS; числа ложноположительных прогнозов (ЛП) — случаи, при которых результат теста показывает наличие заболевания у женщин с цитологическим диагнозом NILM; числа ложноотрицательных прогнозов (ЛН) — случаи, при которых результат теста показывает отсутствие заболевания у пациенток группы HSIL/CIS, и числа истинно-отрицательных прогнозов (ИО) — случаи, при которых результат теста показывает отсутствие заболевания у женщин с цитологическим диагнозом NILM. Полученные значения использовали для расчета стандартных параметров диагностической значимости по формулам, представленным в таблице 2.

Результаты

Дизайн набора NOVAprep-miR-CERVIX

Принцип технологии, лежащей в основе набора NOVAprep-miR-CERVIX, представлен на рисунке 1. Набор предполагал выделение

Таблица 2

Формулы для расчета параметров диагностической значимости

Чувствительность / Sensitivity (Se)	$Se = \frac{TP}{TP + FN}$
Специфичность / Specificity (Sp)	$Sp = \frac{TN}{TN + FP}$
Позитивное предиктивное значение (ППЗ) / Positive predictive value (PPV)	$PPV = \frac{Se + DP}{Se \times DP + (1 - Se) \times (1 - DP)}$
Негативное предиктивное значение (НПЗ) / Negative predictive value (NPV)	$NPV = \frac{Sp \times (1 - DP)}{(1 - Se) \times DP + Sp \times (1 - DP)}$
Точность / Accuracy (A)	$A = Se \times DP + Sp \times (1 - DP)$
Распространенность заболевания / Disease Prevalence (DP)	$DP = \frac{TP + FN}{TP + FP + FN + TN}$

нуклеиновых кислот из клеток цервикального эпителия (рис. 1, шаг 1) и полуколичественный анализ концентраций шести молекул малых регуляторных РНК (микроРНК):

- hsa-miR-21-5p (MIMAT0000076);
- hsa-miR-29b-3p (MIMAT0000100);
- hsa-miR-145-5p (MIMAT0000437);
- hsa-miR-451a-5p (MIMAT0001631);
- hsa-miR-1246-5p (MIMAT0005898);
- hsa-miR-1290-3p (MIMAT0005880) (рис. 1, шаг 2).

Выбор молекул был сделан на основе ранее проведенных исследований. Технология анализа была разработана на основе метода двухфланговой обратной транскрипции и последующей ПЦР (two-tailed RT-PCR, [11]) с незначительными, ранее описанными модификациями [12].

Для контроля качества и количества каждого образца анализируемого материала набор NOVAprep-miR-CERVIX предполагал выполнение ПЦР анализа некодирующего региона гена beta-actin (ACTB, МИМ 102630), т.н. внутренний контрольный образец (ВКО). Для контроля эффективности ферментативных реакций в каждый образец нуклеиновых кислот добавлялся синтетический аналог молекулы cel-miR-39-3p (MIMAT0000010), экспрессия

которой нехарактерна для клеток человеческого организма. Эффективная детекция этой молекулы отражала отсутствие ингибирующих компонентов в составе образца, т.н. экзогенный контроль (ЭК). В целом в ходе анализа одного биологического образца проводилось параллельно семь реакций ОТ-ПЦР и одна ПЦР, полученные результаты представляли собой восемь значений пороговых циклов (Ct).

Алгоритм анализа результатов ПЦР

Первым этапом анализа результатов ОТ-ПЦР являлась оценка результата контрольных реакций путем сравнения с пороговыми значениями. Это сравнение проводилось автоматически с помощью программного обеспечения NOVAprep-miR-CERVIX. Следующим этапом анализа был расчет соотношений относительных концентраций молекул, формирующих так называемые реципрокные пары или пары молекул с разнонаправленными изменениями экспрессионной активности, ассоциированными с развитием цервикальной дисплазии и РШМ. Из шести маркерных молекул микроРНК, включенных в состав набора NOVAprep-miR-CERVIX, для трех (miR-145-5p, miR-1246-5p, miR-1290-3p) характерно повышение, а для трех (miR-21-5p,

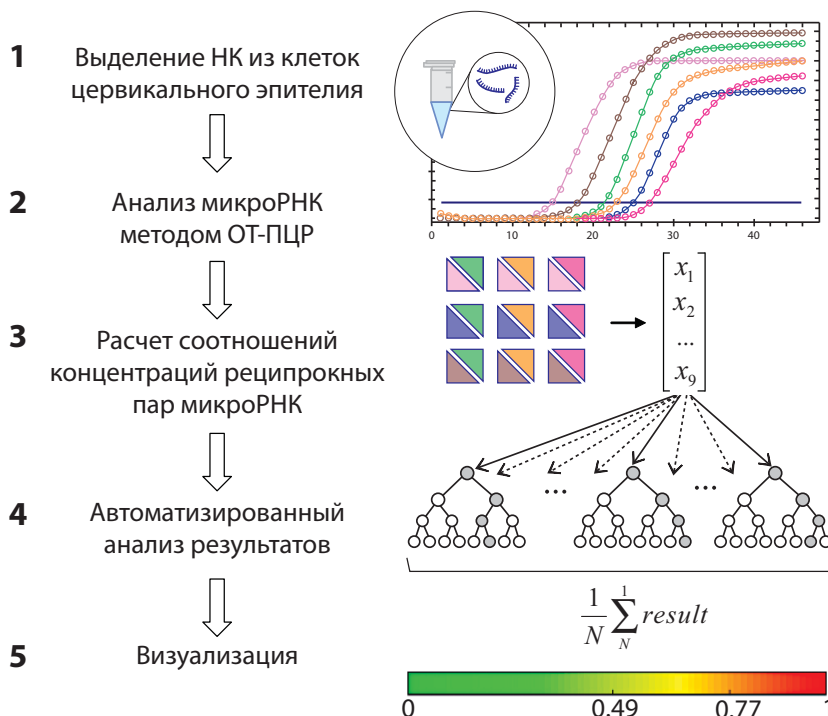


Рис. 1. Принцип работы набора NOVAprep-miR-CERVIX

miR-29b-3p, miR-451a-5p) снижение уровня экспрессии в клетках трансформированного эпителия (HSIL/CIS) по сравнению с клетками нормального эпителия. Таким образом, анализ результатов ПЦР шести маркерных молекул позволил получить девять расчетных значений — $X_1, X_2 \dots X_9$ (рис. 1, шаг 3). Для оценки вклада каждого из девяти значений и вычисления результирующего значения параметра miR-CERVIX был использован автоматизированный алгоритм, созданный с помощью технологии машинного обучения «random forest» (рис. 1, шаг 4) [13]. Исполненный алгоритм вычислял значение параметра miR-CERVIX в диапазоне от 0 до 1, при этом диапазон значений от 0 до 0,49 соответствовал нормальному состоянию цервикального эпителия (NILM), а диапазон значений от 0,77 до 1 соответствовал состоянию тяжелой дисплазии (HSIL/CIS). Для удобства интерпретации результат каждого анализа был представлен путем указания позиции на цветной шкале.

Оценка чувствительности метода к качеству материала

По результатам контрольных реакций из 226 биологических образцов, включенных в исследование, были исключены 38 образцов (17,8 %), в 35 случаях имели место недостаток количества или плохое качество нуклеиновых кислот, выделенных из клеток цервикального эпителия (неэффективная амплификация ВКО).

В девяти образцах наблюдалась недостаточно эффективная амплификация cel-miR-39-3p (ЭК), что могло отражать присутствие в образце примесей, ингибирующих ферментативные реакции. Шесть образцов были признаны непригодными для анализа по результатам обеих контрольных реакций. Следует отметить, что ВПЧ-тестирование (качественный анализ наличия вирусной ДНК) удалось провести для всех образцов. Таким образом, технология анализа микроРНК, реализованная в наборе NOVAprep-miR-CERVIX, оказалась более чувствительна к качеству анализируемого материала, чем технология ВПЧ-тестирования.

Распределение значений параметра miR-CERVIX в группе анализируемых образцов

Значение параметра miR-CERVIX было определено для 188 образцов в соответствии с описанным выше алгоритмом анализа с помощью программного обеспечения NOVAprep-miR-CERVIX. В группе образцов неизмененного цервикального эпителия /NILM (n. 87) среднее значение параметра miR-CERVIX составило 0,34. Образцы цервикального эпителия с гистологически подтвержденным диагнозом HSIL (n. 94) и карциномы in situ/CIS (n. 7) были объединены в одну группу, среднее значение параметра miR-CERVIX в этой группе составило 0,72. Наблюдаемая разница была статистически значима ($p < 0.005$). Результаты представлены на рисунке 2А.

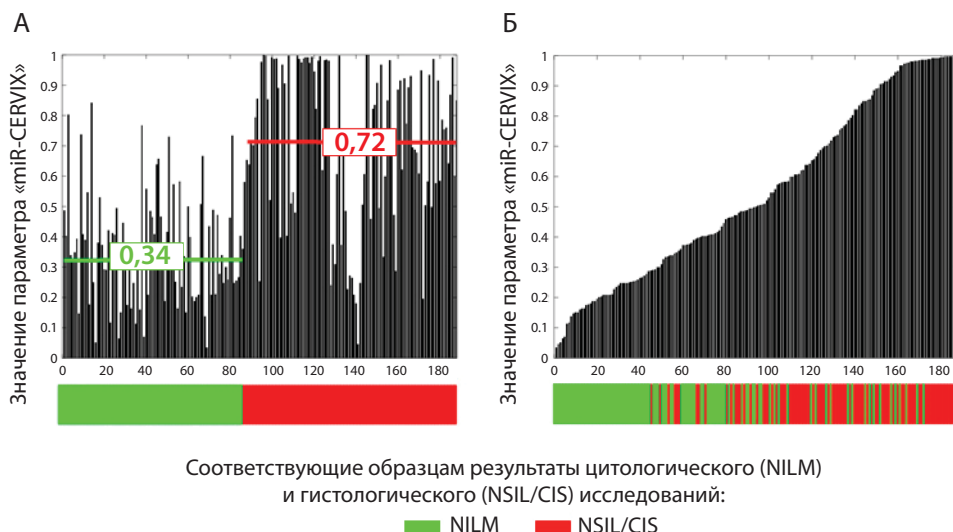


Рис. 2А, Б. Распределение результатов анализа микроРНК (параметра miR-CERVIX) среди исследуемых образцов

Распределение образцов по принципу возрастания значения miR-CERVIX и сопоставление с результатами методов стандартной цитологической и гистологической диагностики представлены на рисунке 2Б. Данный способ представления результатов также отражает отчетливую корреляцию между значением параметра miR-CERVIX и результатами традиционных методов диагностики. При этом результаты цито-/гистологических исследований носят бинарный характер, а значение параметра miR-CERVIX изменяется постепенно в группе образцов, включенных в исследование, что, вероятно, отражает известную этапность цервикального канцерогенеза.

Оценка параметров диагностической значимости

Расчет параметров диагностической значимости результатов, полученных с помощью набора NOVAprep-miR-CERVIX, был проведен для двух возможных ситуаций.

Во-первых, в случае использования технологии NOVAprep-miR-CERVIX в качестве метода скрининга, который решает задачу стратификации здоровых женщин с нормальным (неизменным) эпителием цервикального канала и пациенток с дисплазией любой степени, требующей наблюдения или лечения. В этом случае в качестве порогового значения параметра miR-CERVIX принималось значение 0,49. Разработанный метод позволял распределять

образцы на две группы, параметры диагностической значимости такого распределения, подсчитанные с учетом результатов цитологического/гистологического исследования в качестве референсных диагнозов, представлены на рисунке 3А.

Во-вторых, в случае использования технологии NOVAprep-miR-CERVIX в качестве метода уточняющей диагностики (верификации) диагноза выраженной дисплазии цервикального эпителия перед использованием методов хирургического лечения. В этом случае в качестве порогового значения параметра miR-CERVIX принималось значение 0,77. Разработанный метод позволял распределять образцы на две группы, параметры диагностической значимости такого распределения, подсчитанные с учетом результатов цитологического/гистологического исследования в качестве референсных диагнозов, представлены на рисунке 3 Б.

Сравнение с результатами ВПЧ-тестирования

Принято считать, что персистенция ВПЧ в клетках цервикального эпителия является одним из основных этиологических факторов развития РШМ. Поэтому ВПЧ-тестирование активно используется в качестве метода оценки состояния цервикального эпителия и риска развития РШМ. В рамках исследования стояла задача сопоставить точность решения одних и тех же клинических задач с помощью

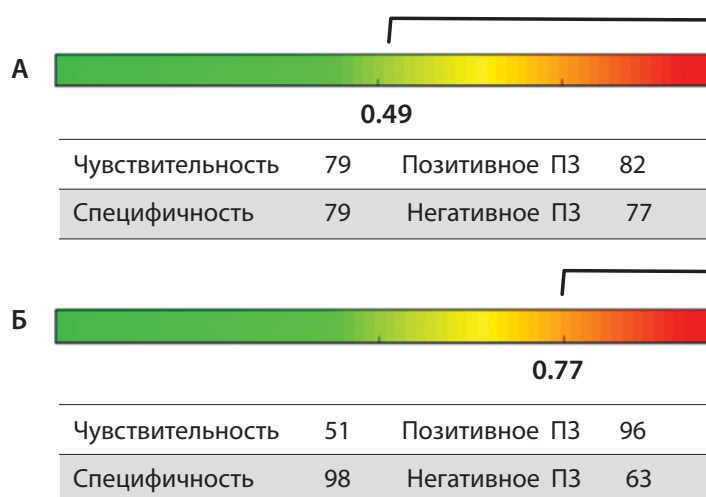


Рис. 3 А, Б. Результаты оценки показателей диагностической значимости технологии NOVAprep-miR-CERVIX при различных пороговых значениях параметра miR-CERVIX

технологии NOVAprep-miR-CERVIX и ВПЧ-тестирования, используя в качестве референсного метода традиционные морфологические исследования (цитология/гистология). Результаты оценки параметров диагностической значимости двух методов представлены в таблице 3.

Проведенное сравнение в целом показало сопоставимые результаты. ВПЧ-тестирование является более специфичной технологией, особенно при сравнении двух методов (NOVAprep-miR-CERVIX и ВПЧ-тестирование) в рамках решения задачи скрининга цервикальных дисплазий. Эти результаты отражают ситуацию практически полного отсутствия случаев инфицирования ВПЧ среди цитологически нормальных образцов (ЛП = 1). В то же время среди образцов группы HSIL/CIS было 36 случаев отсутствия признаков инфекции (ЛН = 36), что подтверждает возможность развития цервикальной дисплазии без участия ВПЧ. Чувствительность NOVAprep-miR-CERVIX оказалась выше, чем чувствительность ВПЧ-тестирования, т.е. анализ микроРНК предполагает меньший риск ложно негативных результатов.

Точность диагноза, который предполагает хирургические методы лечения, является важной клинической проблемой. В группе пациентов детородного возраста изменение анатомии шейки матки чревато возникновением акушерских проблем в случае наступления беременности (риск невынашивания). Эта ситуация определяет высокие требования к специфичности диагностических технологий. Два сравниваемых метода (NOVAprep-miR-CERVIX и ВПЧ-тестирование) показали сопоставимо высокие показатели диагностической специфичности 97,7 и 99,1 % соответственно. Обра-

щает на себя внимание высокое число случаев ложно негативных результатов. Так, в группе из 101 случая морфологически измененного эпителия (HSIL/CIS) показатель miR-CERVIX был $\leq 0,77$ в 50 случаях, а из 112 случаев морфологически измененного эпителия (HSIL/CIS) 36 не были инфицированы ВПЧ.

Интересно, что в двадцати случаях морфологические (цитологические и гистологические) признаки тяжелой неоплазии цервикального эпителия не были ассоциированы ни с ВПЧ, ни с характерными изменениями профиля экспрессии шести маркерных молекул микроРНК. Так, для относительно большой группы случаев было обнаружено несоответствие результатов различных аналитических подходов, что диктует необходимость дальнейших исследований молекулярных аспектов цервикального канцерогенеза и целесообразность разработки и внедрения комплексных алгоритмов оценки степени тяжести цервикальной дисплазии.

Обсуждение

В обсуждении представленных результатов авторы отталкиваются от утверждения, что в настоящее время в клинической практике нет методов, достоверно отражающих степень тяжести дисплазии цервикального эпителия, доступных на начальных этапах диагностического поиска, т.е. до проведения гистологического исследования. Цитологическое исследование представляет собой визуальный анализ ограниченной популяции клеток, а точность заключения в существенной степени определяется преаналитическими факторами качества забора материала, его фиксации и окраски. Введение в 2001 году в практику системы

Таблица 3

Показатели диагностической значимости двух методов

	Чувст.	Спец.	ППЗ	НПЗ	Точность	ИП	ЛП	ИН	ЛН	Σ
СКРИНИНГ (miR-CERVIX $\geq 0,49$)	79,21	79,31	81,63	76,67	79,26	80	18	69	21	188
ДИАГНОСТИКА (miR-CERVIX $\geq 0,77$)	50,50	97,70	96,23	62,96	72,34	51	2	85	50	188
ВПЧ-скрин	67,86	99,12	65,98	75,84	98,70	76	1	113	36	226

* Чувст. — чувствительность, Спец. — специфичность, ППЗ — позитивное предиктивное значение, НПЗ — негативное предиктивное значение, ИП — число истинно позитивных результатов, ЛП — число ложно позитивных результатов, ИН — число истинно негативных результатов, ЛН — число ложно негативных результатов. Последний столбец отражает число образцов, включенных в анализ.

унификации описаний результатов цитологического исследования, предполагающей оценку адекватности исследуемого материала и выделение в отдельные группы находок разной клинической значимости, оптимизировали интерпретацию, позволили проводить внутри и межлабораторные сопоставления, но не изменили принципы цитологической диагностики [14, 15]. Так, цитологический диагноз, основанный на комплексном анализе ряда цитологических признаков (атипия клеток, гиперхромия, форма и размеры клеточного ядра, характер хроматина, нарушение ядерно-цитоплазматического соотношения и др. [15]), в ряде случаев (ASC, ASC-US, ASC-H) по объективным причинам позволяет высказать лишь предположительное суждение. Границы между клинически значимыми категориями (LSIL, HSIL, CIS) не всегда однозначны, а итоговая интерпретация изменений цервикального эпителия требует опыта. Данные научной литературы [2–5] позволяют предполагать, что появление участка цервикального эпителия с необратимыми изменениями структуры и биологии клеток не обязательно отражаются в результатах цитологического исследования. Это определяет необходимость использования дополнительных критериев выявления и оценки выраженности предопухолевых изменений цервикального эпителия. Проблема лишь отчасти решается с помощью ВПЧ-тестирования. Этиологическая роль ВПЧ в развитии цервикальной дисплазии установлена, а аналитическая точность технологии ВПЧ-тестирования близка к идеальной. Но известны как возможность естественной элиминации вируса, так и возможность злокачественной трансформации цервикального эпителия без участия ВПЧ [16]. ВПЧ-тестирование является важным методом оценки риска развития РШМ, но не способом оценки степени тяжести цервикальной дисплазии или дифференциальной диагностики этапов ее прогрессии [17].

Развитие цервикальной дисплазии и малигнизации цервикального эпителия неизбежно ассоциировано с комплексным изменением биологии клеток. Эти изменения могут затрагивать последовательность геномной ДНК [18,

19], статус метилирования отдельных регионов [20, 21], профиль экспрессии белок-кодирующих и регуляторных молекул РНК [22]. Современный уровень фундаментальных знаний представляется достаточным для разработки технологий молекулярной диагностики цервикальных дисплазий. Например, на разных стадиях внедрения в клиническую практику находятся диагностические системы для анализа участков генома (промоторных областей отдельных генов), гиперметилирование которых характерно для клеток РШМ [6, 23, 24]: QIASure Methylation test / Qianen GmbH (FAM19A4, hsa-mir124–2), GynTest assay / Oncgnostics GmbH (ASTN1, DLX1, ITGA4, RXFP3, SOX17, ZNF671), PAX1 DNA Detection Kit / iStat Biomedical Co., Ltd. (PAX1). Но место этих методов в современных алгоритмах скрининга и/или диагностики предопухолевых состояний цервикального эпителия пока не определено. Непосредственное сопоставление новых диагностических технологий с традиционными методами не решает этой задачи. В процессе малигнизации цервикального эпителия генетические и/или эпигенетические события, инфекционный процесс и морфологические изменения не происходят строго симметрично. Поэтому «калибровка» одного метода по результатам другого необходима, но не вполне адекватна. Сопоставление результатов анализа разных признаков комплексного и длительного процесса малигнизации цервикального эпителия является неизбежным этапом «валидации» новых методов, но оно недостаточно для оценки их клинической полезности.

Набор NOVAprep-miR-CERVIX является первым примером реализации технологии анализа экспрессии регуляторных молекул микроРНК для оценки степени тяжести цервикальной дисплазии. Полученные результаты продемонстрировали, что изменения экспрессии включенных в набор маркерных молекул отчетливо ассоциировано с предраковыми изменениями цервикального эпителия. Это подтверждает диагностический потенциал технологии. В рамках задачи скрининга цервикальных дисплазий набор NOVAprep-miR-CERVIX продемонстрировал показатели

диагностической значимости, сопоставимые с традиционным ВПЧ-тестированием, несколько уступая по специфичности и выигрывая по чувствительности. Полученные результаты указывают на возможную пользу от совместного использования двух технологий.

Важной особенностью технологии NOVAprep-miR-CERVIX по сравнению с традиционными методами морфологической диагностики является объективность анализа, что исключает его зависимость от квалификации и опыта морфолога. Общим недостатком является зависимость от качества проведения процедуры забора материала и этапа пробоподготовки. Основным и принципиальным отличием от ВПЧ-тестирования является тот факт, что объектом анализа являются эндогенные молекулы, изменение экспрессии (концентрации) которых ассоциировано с развитием дисплазии цервикального эпителия или РШМ. Важность этого аспекта определяется тем, что ВПЧ является этиологическим фактором, но не обязательным признаком болезни. Кроме того, по сравнению с ВПЧ-тестированием и вышеупомянутыми методами оценки статуса метилирования результаты NOVAprep-miR-CERVIX имеют не бинарный характер, а могут быть выражены с помощью численного показателя miR-CERVIX в диапазоне значений (от 0 до 1). Это особенность может быть востребована при использовании технологии NOVAprep-miR-CERVIX в ходе лечения цервикальной дисплазии для динамического наблюдения и оценки эффекта применяемых методов консервативной терапии. Но целесообразность та-

кого применения требует проведения дополнительных клинических исследований.

Заключение

Профиль экспрессии шести маркерных молекул микроРНК:

hsa-miR-21-5p (MIMAT0000076);
hsa-miR-29b-3p (MIMAT0000100);
hsa-miR-145-5p (MIMAT0000437);
hsa-miR-451a-5p (MIMAT0001631);
hsa-miR-1246-5p (MIMAT0005898);
hsa-miR-1290-3p (MIMAT0005880)

отражает состояние цервикального эпителия и имеет диагностический потенциал. Технология анализа и интерпретации результатов, реализованная в наборе NOVAprep-miR-CERVIX, предполагает расчет диагностического показателя miR-CERVIX в диапазоне значений от 0 до 1. С учетом порогового значения показателя miR-CERVIX $\geq 0,49$ набор NOVAprep-miR-CERVIX может быть использован для скрининга цервикальных дисплазий (чувствительность 79 %, специфичностью 79 %). С учетом порогового значения показателя miR-CERVIX $\geq 0,77$, набор NOVAprep-miR-CERVIX может быть использован для уточняющей диагностики цервикальной неоплазии тяжелой степени в рамках оценки целесообразности хирургических методов лечения (чувствительность 51 %, специфичностью 98 %). Для оценки возможности/целесообразности использования набора NOVAprep-miR-CERVIX в рамках динамического наблюдения за состоянием цервикального эпителия необходимо проведение клинических исследований с соответствующим дизайном.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Каприн, А. Д., Старинский, В. В., Шохзадова, А. О. Злокачественные новообразования в России в 2020 году (заболеваемость и смертность). М., 2021; ISBN 978-5-85502-268-1.
2. Kaprin, A. D.; Novikova, E. G.; Trushina, O. I.; Gretzova, O. P. The cervical cancer screening — unsolved problems. *Res. Pract. Med. J.* 2015, 2, 36–41, doi:10.17709/2409-2231-2015-2-1-36-41.
3. Bhatla, N.; Singhal, S. Primary HPV screening for cervical cancer. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* 2020, 65, 98–108, doi:10.1016/j.bpobgyn.2020.02.008.
4. Mustafa, R. A.; Santesso, N.; Khatib, R.; Mustafa, A. A.; Wiercioch, W.; Kehar, R.; Gandhi, S.; Chen, Y.; Cheung, A.; Hopkins, J.; et al. Systematic reviews and meta-analyses of the accuracy of HPV tests, visual inspection with acetic acid, cytology, and colposcopy. *Int. J. Gynecol. Obstet.* 2016, 132, 259–265, doi:10.1016/j.ijgo.2015.07.024.
5. Сушинская Т. В., Етифанова С. В., Щепкина Е. В., Кузнецов А. И., Стуков Н. И. Ошибки диагностики предраковых заплываний и рака шейки матки // Онкогинекология. 2020. С. 49–57.

6. Schmitz, M.; Eichelkraut, K.; Schmidt, D.; Zeiser, I.; Hilal, Z.; Tettenborn, Z.; Hansel, A.; Ikenberg, H. Performance of a DNA methylation marker panel using liquid-based cervical scrapes to detect cervical cancer and its precancerous stages. *BMC Cancer* 2018, 18, 1197, doi:10.1186/s12885-018-5125-8.
7. Jakovac, H.; Stašić, N.; Krašević, M.; Jonjić, N.; Radošević-Stašić, B. Expression profiles of metallothionein-I/II and megalin/LRP-2 in uterine cervical squamous lesions. *Virchows Arch.* 2021, 478, 735–746, doi:10.1007/s00428-020-02947-w.
8. Mitra, T.; Elangovan, S. Cervical cancer development, chemoresistance, and therapy: a snapshot of involvement of microRNA. *Mol. Cell. Biochem.* 2021, 476, 4363–4385, doi:10.1007/s11010-021-04249-4.
9. Causin, R. L.; Freitas, A. J. A. de; Trovo Hidalgo Filho, C. M.; Reis, R. dos; Reis, R. M.; Marques, M. M. C. A Systematic Review of MicroRNAs Involved in Cervical Cancer Progression. *Cells* 2021, 10, 668, doi:10.3390/cells10030668.
10. *The Bethesda System for Reporting Cervical Cytology*; Nayar, R., Wilbur, D. C., Eds.; Springer International Publishing: Cham, 2015; ISBN 978-3-319-11073-8.
11. Andrović, P.; Valihrač, L.; Elling, J.; Sjoback, R.; Kubista, M. Two-tailed RT-qPCR: A novel method for highly accurate miRNA quantification. *Nucleic Acids Res.* 2017, 45, 1–13, doi:10.1093/nar/gkx588.
12. Borisov, E.; Knyazeva, M.; Novak, V.; Zabegina, L.; Prisyazhnaya, T.; Karizkiy, A.; Berlev, I.; Malek, A. Analysis of reciprocally dysregulated miRNAs in eutopic endometrium is a promising approach for low invasive diagnostics of adenomyosis. *Diagnostics* 2020, 10, doi:10.3390/diagnostics10100782.
13. Breiman, L. Random Forests. *Mach. Learn.* 2001, 45, 5–32, doi:https://doi.org/10.1023/A:1010933404324.
14. Solomon, D. The 2001 Bethesda System Terminology for Reporting Results of Cervical Cytology. *JAMA* 2002, 287, 2114, doi:10.1001/jama.287.16.2114.
15. Vanden Bussche, C. J.; Ali, S. Z.; Vang, R. *Atlas of Gynecologic Cytopathology*; DemosMEDICAL An Imprint of Springer Publishing, 2015; ISBN 9781620700440.
16. Xing, B.; Guo, J.; Sheng, Y.; Wu, G.; Zhao, Y. Human Papillomavirus-Negative Cervical Cancer: A Comprehensive Review. *Front. Oncol.* 2021, 10, doi:10.3389/fonc.2020.606335.
17. Yu, T.; Wang, C. Clinical Significance of Detection of Human Papilloma Virus DNA and E6/E7 mRNA for Cervical Cancer Patients. *Cell. Mol. Biol.* 2022, 67, 155–159, doi:10.14715/cmb/2021.67.6.21.
18. Huang, J.; Qian, Z.; Gong, Y.; Wang, Y.; Guan, Y.; Han, Y.; Yi, X.; Huang, W.; Ji, L.; Xu, J.; et al. Comprehensive genomic variation profiling of cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer identifies potential targets for cervical cancer early warning. *J. Med. Genet.* 2019, 56, 186–194, doi:10.1136/jmedgenet-2018-105745.
19. Qiu, L.; Feng, H.; Yu, H.; Li, M.; You, Y.; Zhu, S.; Yang, W.; Jiang, H.; Wu, X. Characterization of the Genomic Landscape in Cervical Cancer by Next Generation Sequencing. *Genes (Basel)*. 2022, 13, 287, doi:10.3390/genes13020287.
20. Xu, W.; Xu, M.; Wang, L.; Zhou, W.; Xiang, R.; Shi, Y.; Zhang, Y.; Piao, Y. Integrative analysis of DNA methylation and gene expression identified cervical cancer-specific diagnostic biomarkers. *Signal Transduct. Target. Ther.* 2019, 4, 55, doi:10.1038/s41392-019-0081-6.
21. Siegel, E. M.; Ajidahun, A.; Berglund, A.; Guerrero, W.; Eschrich, S.; Putney, R. M.; Magliocco, A.; Riggs, B.; Winter, K.; Simko, J. P.; et al. Genome-wide host methylation profiling of anal and cervical carcinoma. *PLoS One* 2021, 16, e0260857, doi:10.1371/journal.pone.0260857.
22. Duda-Simon, M.; Mihu, D.; Pop, L. A.; Ciortea, R.; Malutan, A. M.; Diculescu, D.; Ciocan, C. A.; Cojocneanu, R. M.; Simon, V.; Bucuri, C.; et al. Alteration of Gene and miRNA Expression in Cervical Intraepithelial Neoplasia and Cervical Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 6054, doi:10.3390/ijms23116054.
23. Liu, H.; Meng, X.; Wang, J. Real time quantitative methylation detection of PAX1 gene in cervical cancer screening. *Int. J. Gynecol. Cancer* 2020, 30, 1488–1492, doi:10.1136/ijgc-2019-001144.
24. Floore, A.; Hesselink, A.; Oštrbenk, A.; Alcaniz, E.; Rothe, B.; Pedersen, H.; Torres Hortal, M.; Doorn, S.; Quint, W.; Petry, K. U.; et al. Intra- and inter-laboratory agreement of the FAM19A4/mir124-2 methylation test: Results from an international study. *J. Clin. Lab. Anal.* 2019, 33, e22854, doi:10.1002/jcla.22854.

АВТОРЫ

Князева Маргарита Сергеевна, младший научный сотрудник, ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Петрова» Минздрава России, 197758, Россия, Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, д. 68; margo9793@gmail.com
Knyazeva Margarita S., Junior researcher, N. N. Petrov National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 197758, Russia, St. Petersburg, pos. Pesochny, st. Leningradskaya, house 68; e-mail: margo9793@gmail.com
Забегина Лидия Михайловна, младший научный сотрудник, ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Петрова» Минздрава России, 197758, Россия, Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, д. 68, lidusikza@yandex.ru
Zabegina Lidia M., Junior researcher, N. N. Petrov National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia, 197758, Russia, St. Petersburg, pos. Pesochny, st. Leningradskaya, house 68; e-mail: lidusikza@yandex.ru

Конева Ольга Михайловна, биолог, ООО «Альгимед Техно», 220090 Республика Беларусь, г. Минск, Логойский тракт, 22/1, комната 309, volga.koneva@gmail.com

Koneva Volga M., Biologist, Algimed Techno Ltd. 220090, Republic of Belarus, Minsk, Logoisk tract, 22/1, room 309, e-mail: volga.koneva@gmail.com

Лютынский Владислав Валерианович, директор ООО «Альгимед Техно», 220090 Республика Беларусь, г. Минск, Логойский тракт, 22/1, комната 309, vladislav@algimed.by

Lyutynskiy Vladislav V., Director Algimed Techno Ltd. Republic of Belarus, Minsk, Logoisk tract, 22/1, room 309, e-mail: vladislav@algimed.by

Смирнова Ольга Алексеевна, кандидат медицинских наук, врач-онколог, научный сотрудник отделения онкогинекологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Петрова» Минздрава России 197758, Россия, Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, д. 68, ssmirnova.oa@gmail.com

Smirnova Olga A., MD., PhD, Oncologist N. N. Petrov National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia, 197758, Russia, St. Petersburg, pos. Pesochny, st. Leningradskaya, house 68; e-mail: ssmirnova.oa@gmail.com

Жамойдик Валерия Игоревна, заведующий акушерским отделением ГБУЗ ЛО «Тосненская клиническая межрайонная больница» 187000, г. Тосно Ленинградской области, шоссе Барыбина, д. 29, valerigam@mail.ru

Zhamoydik Valery I., State budgetary institution of health of the leningrad region “Tosno clinical interdistrict hospital”, 187000, Tosno, Leningrad region, Barybina highway, 29, e-mail: valerigam@mail.ru

Куприна Ирина Дмитриевна, врач клинической лабораторной диагностики ООО «Национальный центр клинической морфологической диагностики», 192071, Россия, Санкт-Петербург, пр. Славы, д. 32., idkuprina@yandex.ru

Kuprina Irina D., MD, National Center for Morphological Diagnostics Saint Petersburg, Russian Federation Russia, St. Petersburg, Slavy Ave., 32. e-mail: idkuprina@yandex.ru

Козорезова Евгения Сергеевна, врач клинической лабораторной диагностики, заместитель директора по развитию ООО «Национальный центр клинической морфологической диагностики», 192071, Россия, Санкт-Петербург, пр. Славы, д. 32, kozorezovaes@yandex.ru

Kozorezova Evgeniya S., MD, Deputy Director for Development of the National Center for Morphological Diagnostics National Center for Morphological Diagnostics, Saint Petersburg, Russian Federation, 192071, Russia, St. Petersburg, Slavy Ave., 32; e-mail: kozorezovaes@yandex.ru

Воробьев Сергей Леонидович, кандидат медицинских наук, врач-патологоанатом, директор ООО «Национальный центр клинической морфологической диагностики», 192071, Россия, Санкт-Петербург, пр. Славы, д. 32, slvorob@gmail.ru

Vorobyev Sergey L., MD., PhD, Director of the National Center for Morphological Diagnostics Saint Petersburg, Russian Federation, 192071, Russia, St. Petersburg, Slavy Ave., 32; e-mail: lvorob@gmail.ru

Якубо Екатерина Леонидовна, заведующий лаборатории цитологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Петрова» Минздрава России, 197758, Россия, Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, дом 68, yakuboklim@mail.ru

Yakobo Ekaterina L., Head of Cytology Lab. N. N. Petrov National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 197758, Russia, St. Petersburg, pos. Pesochny, st. Leningradskaya, house 68; e-mail: yakuboklim@mail.ru

Артемяева Анна Сергеевна, кандидат медицинских наук, доцент, заведующий патологоанатомическим отделением, руководитель научной лаборатории морфологии опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Петрова» Минздрава России, 197758, Россия, Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, д. 68, oinochoya@gmail.com

Artemyeva Anna S., MD., PhD, Head of Pathology Department, Head of Laboratory of Tumor Morphology, N. N. Petrov National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 197758, Russia, St. Petersburg, pos. Pesochny, st. Leningradskaya, house 68; e-mail: oinochoya@gmail.com

Берлев Игорь Викторович, доктор медицинских наук, профессор, врач-онколог, заведующий отделением онкогинекологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Петрова» Минздрава России, Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, дом 68; заведующий кафедрой акушерства и гинекологии ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И. И. Мечникова Минздрава России, Санкт-Петербург, Пискаревский проспект, д. 47, iberlev@mail.com

Berlev Igor V., MD, professor, Head of Oncogynecology Department N. N. Petrov National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 197758, Russia, St. Petersburg, pos. Pesochny, st. Leningradskaya, house 68; Head of Obstetrics and Gynecology of the I. Mechnikov North-West National Medical University of the Russian Federation, St. Petersburg, Piskarevsky prospect, 47; Honorable Doctor of the Russian Federation, e-mail: iberlev@mail.com

Малек Анастасия Валерьевна, доктор медицинских наук, врач-онколог, заведующая научной лабораторией субклеточных технологий с группой онкоэндокринологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Петрова» Минздрава России, 197758, Россия, Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, д. 68, anastasia@malek.com.ru

Malek Anastasia V., MD., PhD, Head of Laboratory of Subcellular Technologies with Endocrine Oncology Unit, N. N. Petrov National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 197758, Russia, St. Petersburg, pos. Pesochny, st. Leningradskaya, house 68; e-mail: anastasia@malek.com.ru