ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«РОССИЙСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ДРУЖБЫ НАРОДОВ»

МИНИСТЕРСТВА НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ

РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

ДАМИРОВА

Кемер Фирудин кызы

ИММУНОЦИТОХИМИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ПРИВЫЧНОГО НЕВЫНАШИВАНИЯ БЕРЕМЕННОСТИ

3.1.4. Акушерство и гинекология

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научный руководитель

Заслуженный деятель науки РФ
Член-корреспондент РАН, Доктор медицинских наук
Профессор Радзинский Виктор Евсеевич

Москва - 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

	ОГЛАВЛЕНИЕ	2
	ВВЕДЕНИЕ	3
	ГЛАВА 1. Современные представления об иммунологических, гормональных и микробиологических основах привычного невынашивания беременности. Взаимосвязь цитологических и иммуноцитохимических особенностей эндоцервикса с неблагоприятными репродуктивными исходами. Обзор литературы.	13
1.1	Роль системного и локального иммунного ответа в генезе привычного невынашивания беременности	14
1.2	Роль прогестерона в развитии физиологической и осложненной беременности	17
1.3	Роль дисбиотических и воспалительных изменений во влагалище и эндоцервиксе в генезе привычного невынашивании беременности	20
1.4	Возможности современных методов диагностики заболеваний шейки матки, ассоциированных с вирусом папилломы человека	24
	Глава 2. Материал и методы исследования	32
	Глава 3. Клиническая характеристика обследованных женщин	44
	Глава 4. Результаты лабораторных и инструментальных методов исследований	54
	Глава 5. Прогнозирование вероятности повторых репродуктивных потерь и выбор персонифициронной тактики оздоровления	72
	Глава 6. Обсуждение полученных результатов	86
	Заключение	99
	Выводы	100
	Практические рекомендации	102
	Список сокращений	104
	Список литературы	106

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Привычное невынашивание беременности (ПНБ) – медико-социальная проблема, признанная современной эпидемией с тенденцией к росту потерь во всем мире ежегодно на 15,0-20,0%, в том числе – в развитых странах. Распространенность привычного выкидыша среди пар, планирующих беременность, составляет от 0,6 до 2,3% [1].

В Российской Федерации (РФ) диагноз ПНБ устанавливается после двух самопроизвольных потерь беременности [2], в европейской системе – трёх [5]. В 2015 г. Международная Ассоциация акушеров-гинекологов (FIGO) признала российскую точку зрения в верификации ПНБ более эффективной [1,2].

Сложившиеся представления о причинах привычного выкидыша – хромосомные аномалии, возраст супружеских пар, семейная предрасположенность, иммунологические факторы; инфекции, передаваемые половым путем; наследственные и приобретенные нарушения в системе гемостаза не отражают всех аспектов генеза этой многофакторной проблемы.

Неразвивающуюся беременность (НБ), составляющую более половины случаев ПНБ, по рекомендации FIGO (2006) полагают следствием хронического эндометрита (ХЭ).

Решение проблемы снижения повторных репродуктивных потерь, причины которых практически в половине случаев остаются неясными [3,4], представляется в изучении ключевых механизмов нарушения взаимодействия матери и эмбриона с позиций достижений цитогенетики и иммуногенетики.

Формирование иммунотолерантности матери и плода вероятно только при физиологическом иммунном ответе, позволяющем избегать повреждения тканей.

Эпидемиологические и генетические исследования приводят данные о взаимосвязи иммунологических нарушений с привычным выкидышем, однако роль аберрантной индукции pTreg малоизучена [160].

Микроокружение шейки матки состоит из иммунных клеток и специфической микробиоты, модулирующей локальные иммунные реакции [42,49,95].

Анализ концепций взаимодействия микробиоты и иммунной системы, открывающий новые возможности для профилактики повторных потерь беременности, представляется наиболее актуальным при персистенции высокоонкогенных штаммов ВПЧ. Мета-анализ показал повышенный риск заражения ВПЧ среди беременных женщин [147], однако реализации онкогенного эффекта вируса способствуют микробиологические и иммунные эффекты.

Степень разработанности темы исследования

Доказательства передачи ВПЧ через плаценту неоднозначны; ДНК ВПЧ выявлена в 4,0-75,0% женщин с выкидышем и 20-24% - абортами [98].

Данные о выкидышах, плацентарных аномалиях и самопроизвольных родах при персистенции ВПЧ [63,82] позволяют предположить дисрегуляцию иммунных механизмов, обеспечивающих пролонгацию беременности.

Связь привычного выкидыша с повышением провоспалительных цитокинов в периферической крови подтверждена в ряде исследований [14], однако особенности локального иммунного профиля практически не представлены [8].

Выявление ДНК ВПЧ в шейке женщин с невынашиванием требует уточнения характеристик эндо- и экзоцервикса при различных репродуктивных исходах. Определение молекулярно-биологических предикторов CIN позволило расширить представления об особенностях шейки женщин с ПВИ, однако их влияние на исходы беременности малоизучено.

Иммунные причины, отторжение или развитие микросреды, неблагоприятной для развития эмбриона/плода, вероятны как механизмы идиопатического ПНБ. Влияние на исходы беременности последствий

персистенции ВПЧ малоизучено, определение генотипа и вирусной нагрузки недостаточно специфично: возможна элиминация вируса в 85,0-90,0% за счет адаптивных иммунных реакций.

Связь ВПЧ с цервико-влагалищным микробиомом, предраком и раком шейки матки [21,63] показана во многих исследованиях [29,90,126]: бактериальный вагиноз (БВ) отмечают чаще при высокой вирусной нагрузке, чем элиминации (11,0% против 5,0%) [34], персистенцию вируса – доминировании L. iners в сравнении с L. crispatus [151].

Механизмы влияния вагинальной микробиоты на исходы беременности изучены недостаточно, однако данные об изменении локальных иммунных параметров под влиянием БВ и вагиноз-ассоциированных бактерий, включая цитокины/хемокины, антимикробные белки и иммунокомпетентные клетки подтверждают сложность биологических взаимодействий в системе «микробиом-ВПЧ-исходы беременности».

Сообщения об интенсивности апоптоза и низкой способности к инвазии трофобласта под влиянием вирусной инфекции [24] подтверждают ценность молекулярных биомаркеров, отражающих риск пролиферативных процессов с переходом в неоплазии.

Перспективность внедрения в алгоритм обследования женщин с ПНБ неясного генеза, помимо традиционных при цервикальном скрининге методик (ПЦР-РВ с типированием и определением количества геномных эквивалентов ВПЧ или реакции гибридизации вирусной ДНК с РНК-зондом (Digene-тест)) [131], оценки продукции вирусных онкогенов и онкобелков инфицированной эпителиальной вирусной клеткой требует детальных исследований.

Гиперэкспрессия белка p16ink4-α и Ki67 расценивается как маркер CINII/CINIII и рак шейки матки, однако их роль в генезе привычного выкидыша малоизучена [55,135]. Данные неоправданного радикального лечения шейки матки на основании положительного иммуноцитохимического двойного p16INK4a/Ki-67-окрашивания [89,116,152,161] требуют поиска

новых молекулярно-генетических маркеров риска неопластической трансформации [74,135]. Для диагностики, течения и прогнозирования ВПЧ-ассоциированных поражений эпителия шейки матки изучаются микро-РНК (miR), эпигенетические биомаркеры, отражающие функциональные изменения [91].

Выявление в эндоцервиксе miR-375 связывают с прогрессированием заболевания до рака шейки матки, влияние экспрессии микроРНК на исходы беременности не изучено.

Прогресс в понимании биологии иммунных нарушений, способствующих привычному выкидышу, может быть основан на данных о неконтролируемой пролиферации зараженных ВПЧ клеток и гиперэкспрессии белка Е7.

Эффективность микронизированного прогестерона на прегравидарном этапе и в ранние сроки гестации при привычном выкидыше доказана [18,60,99,119], однако причины прерывания беременности при гормональной терапии остаются неясными. Выяснение особенностей гормонорецепции в клетках эндоцервикса в патогенезе ПНБ с позиций различной вирусной нагрузки ВПЧ, экспрессии онкобелков и микроРНК диктует необходимость оптимизации лечебных мероприятий.

Уточнение молекулярно-биологических маркеров (экспрессии онкопротеинов и мРНК), гормонорецепции, взаимосвязи вагинальной микробиоты с особенностями локального иммунного статуса позволит осуществлять персонифицированную реабилитацию женщин с привычным выкидышем.

Цель исследования

Улучшить прогнозирование, раннюю диагностику и повысить эффективность лечения привычного невынашивания беременности.

Задачи исследования

1. Выявить цитологические особенности состояния эндоцервикса женщин с ПНБ.

2. Установить наличие цитологических изменений в эндоцервиксе после неразвивающейся беременности.

3. Представить концепцию взаимосвязи клеточного состава эндоцервикса и микробиоценоза влагалища.

4. Выявить роль изменений гормонорецепции в клетках эндоцервикса в патогенезе ПНБ.

5. Оценить эффективность прогнозирования и лечения доброкачественных болезней шейки матки, воздействия на локальный иммунный статус и микробиоту влагалища на исходы следующей беременности женщин с ПНБ.

Научная новизна исследования

Расширены представления о патогенетических звеньях ПНБ неясного генеза, связанных с молекулярно-клеточными изменениями эндоцервикса.

Научно обоснована целесообразность введения в алгоритм обследования женщин с привычным невынашиванием высокотехнологичных методов (жидкостная цитология, иммуноцитохимическое исследование) для выявления ВПЧ-ассоциированных особенностей эндоцервикса.

Установлены механизмы нарушения клеточной пролиферации эндоцервикса женщин с ПНБ на основании комплексной оценки ВПЧ-статуса, экспрессии маркеров p15/Ki-67, BCL-2 и противоонкогенных миРНК-145, -34a. Выявленные нарушения гормонорецепции эндоцервикса обосновывают исследование у женщин с ПНБ экспрессии мРНК прогестеронового рецептора PGR-A.

Определены особенности вагинального микробиоценоза при различном клеточном составе эндоцервикса женщин с ПНБ, наличии ВПЧ-инфекции. Установлена роль нарушений локального иммунного статуса (преобладание

активности провоспалительных Т-лимфоцитов Th17/Th1 и снижение уровня регуляторных CD4+ Treg) в генезе НБ.

Впервые методом логистической регрессии разработана модель прогнозирования повторного невынашивания на основании комплексной оценки молекулярно-биологических маркеров, позволяющая осуществлять персонифицированную прегравидарную подготовку и стратификацию беременных в зависимости от степени риска.

Научно доказана эффективность персонифицированной оценки риска повторных потерь беременности и прогрессирования ВПЧ-ассоциированных цервикальных интраэпителиальных неоплазий.

Научно-практическая значимость работы

Представлены характеристики вагинальной микробиоты женщин с ПНБ и клеточного состава эндоцервикса, наиболее выраженные при ВПЧ-ассоциированных изменениях.

Обоснована целесообразность комплексного использования молекулярно-биологических методов для оценки активности клеточной пролиферации и противоонкогенного потенциала эндоцервикса, дисбаланс которых повышает риск повторного невынашивания и неопластической трансформации шейки матки.

Представлена необходимость исследования локального иммунного профиля эндоцервикса женщин с НБ, позволяющего судить об объеме лечебно-реабилитационных мероприятий.

Разработанный алгоритм ведения женщин с ПНБ предусматривает оценку пролиферативной активности эндоцервикса (жидкостная цитология, иммуноцитохимическое исследование экспрессии мРНК и ми-РНК), особенно при ВПЧ-ассоциированных цервикальных изменениях, локального иммунного статуса (Th17/Th1, CD4+ Treg) и гормонорецепции (мРНК).

Разработанная математическая модель определяет выбор персонифицированной тактики при различном риске (высокий, низкий) повторного выкидыша.

Методология и методы исследования

Методология исследования включала сравнительную оценку эффективности лечебно-диагностических подходов при привычном невынашивании во время беременности и вне и проводилась с соблюдением принципов доказательной медицины (группы сформированы с учетом критериев включения и исключения, информированного согласия, современных методов).

Дизайн исследования – открытое сравнительное проспективное в параллельных группах с использованием современных лабораторно-инструментальных методов.

Этапы исследования: на I-м проводили клинико-анамнестическую оценку факторов риска ПНБ, цервикальный скрининг с использованием молекулярно-биологических методов у беременных с рецидивирующим выкидышем (n=59) и здоровых беременных, не имеющих в анамнезе неблагополучных репродуктивных исходов (n=57); на II этапе оценивали эффективность лечения женщин с ПНБ на основании частоты ее наступления и исходов беременности после реабилитации на прегравидарном этапе. Исследование одобрено локальным этическим комитетом ФГБОУ РУДН до начала исследования (протокол №2 от 18.10.2018г).

Основные положения, выносимые на защиту

1. Цитологические особенности эндоцервикса женщин с ПНБ неясного генеза (ASC-US/LSIL), ассоциированные с ВПЧ-инфицированием, и нарушением цервико-вагинальной микробиоты (воспалительные, дисбиотические изменения), срывом локального иммунного статуса

(преобладание провоспалительных Т-лимфоцитов Th17/Th1 и снижение уровня регуляторных CD4+ Treg) при НБ подтверждает необходимость прегравидарного обследования и оздоровления для улучшения исходов беременности.

2. Иммуноцитохимическая презентация повышения пролиферативного потенциала клеток эндоцервикса (гиперэкспрессия p16/Ki-67, регулятора апоптоза BCL-2, мРНК-34 и -145) при аномальных цитограммах (ASC-US, LSIL) подтверждает общность молекулярно-биологических механизмов ПНБ и ВПЧ-ассоциированных поражений шейки матки, сопровождаемых повреждением рецепторного аппарата (снижение экспрессии мРНК гена, кодирующего PGR-A) и развитием прогестеронрезистентности.

3. Разработанный алгоритм ведения женщин с ПНБ, предусматривающий оценку эндоцервикса инновационными методами (жидкостная цитология, иммуноцитохимический, проточная цитометрия) и персонифицированного риска по прогностической модели, позволяет предотвратить прогрессию ВПЧ-ассоциированных цервикальных интраэпителиальных поражений (у 14,0% беременных и 52,2% с ПНБ) и способствуют благоприятным исходам текущей и планируемой беременности (отказ от неэффективной гестагенной терапии; срочные роды в 80,4%, повторный выкидыш – 8,5%).

Апробация диссертации

Апробация диссертационной работы проведена на кафедре акушерства и гинекологии с курсом перинатологии Медицинского института ФГБОУ ВО МЗ РФ РУДН (Протокол №16 от 08.06 2022 года).

Результаты, полученные в ходе диссертационного исследования, внедрены в практическую работу гинекологического отделения и отделения патологии беременных ГКБ им. С.С. Юдина (главный врач – Папышева О.В.), Женской Консультации №1 ГБУЗ «ММКЦ «Коммунарка» ДЗМ», а также в

учебный процесс кафедры акушерства, гинекологии и перинатологии Медицинского института РУДН.

Личный вклад соискателя заключается в участии во всех этапах диссертационного исследования: анализе современной литературы, посвященной анализируемой проблеме, курации 116 пациенток, обработке и интерпретации полученных результатов, подготовке основных публикаций по результатам работы, отражающих научные положения диссертации. Сформулированы положения, выносимые на защиту, сделаны обоснованные выводы.

Степень достоверности результатов

Достоверность диссертационной работы подтверждает достаточное количество наблюдений, современные методы исследования, отвечающие поставленной цели и задачам. Выводы и практические рекомендации отражают суть полученных результатов, обоснованы статистическими данными, наглядно представленными в таблицах и рисунках.

Математическая обработка материала осуществлялась с применением корректных современных методов статистики, с использованием программы Statistica 10» (StatSoft, США) и критериев доказательной медицины.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 5 научных работ в отечественной и зарубежной печати, из них 4 – в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ.

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 124 страницах, состоит из введения, включающего методологию обследования, обзора литературы, трех глав,

содержащих результаты собственных исследований, обсуждения полученных результатов, заключения, включающего выводы и практические рекомендации, указателя литературы.

Работа содержит 28 таблиц, иллюстрирована 18 рисунками. Список литературы включает 161 источников, из них 17 на русском и 144 на иностранном языках.

ГЛАВА 1.
СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ ОБ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ, ГОРМОНАЛЬНЫХ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ОСНОВАХ ПРИВЫЧНОГО НЕВЫНАШИВАНИЯ БЕРЕМЕННОСТИ

Взаимосвязь цитологических и иммуноцитохимических особенностей эндоцервикса с неблагоприятными репродуктивными исходами
Обзор литературы

ПНБ признают современной эпидемией с тенденцией к росту потерь на 15–20,0% ежегодно во всем мире, в том числе и в развитых странах [14]. Распространенность ПНБ среди пар, планирующих беременность, по разным данным составляет от 0,6% до 2,3% [4,10,14].

В Российской Федерации (РФ) диагноз ПНБ выставляют после двух эпизодов самопроизвольного прерывания беременности, в европейской системе – трех спонтанных выкидышей [14]. В 2015 г. FIGO признала российскую позицию в верификации ПНБ более эффективной [14].

Вероятными причинами ПНБ считают: хромосомные аномалии; поздний возраст супружеских пар; генетическую предрасположенность; иммунологические факторы; образ жизни; инфекции, передаваемые половым путем (ИППП); наследственные и приобретенные нарушения в системе гемостаза, однако этиология более 50% случаев остается неясной [1,4,14]. Генез НБ, составляющей более половины случаев ПНБ [4], в соответствии с заключением секции FIGO (2006) следует рассматривать как исход не леченного хронического эндометрита [14].

Репродуктивные потери на ранних сроках беременности во многих случаях происходят по причине генетической неполноценности эмбриона [4,5]. Масштабное исследование 1119 образцов биопсии хорионических ворсин с кариотипированием абортусов в I триместре, проведенное испанскими учеными, выявило высокую частоту хромосомных аномалий плода – 70,3%. Одиночная аутосомная трисомия была наиболее часто встречающейся патологией развития – 64,6%, триплоидия – 13,1% и

моносомия X – 10,4%. В ряде работ подтверждена корреляционная связь хромосомных аномалий с материнским возрастом. В группе пациенток ≥35 и <35 лет соотношение аномалий развития составило 76,8% и 61,3% соответственно (p <0,05), частота трисомий 21 хромосомы – 6,87% против 3,77% (p=0,038) [115]. Японскими исследователями в 82,4% образцов абортусов в I триместре женщин с ПНБ в анаинезе (300 из 364) выявлены хромосомные аномалии; доказана корреляция с возрастом пациенток [101].

Пролонгацию беременности при генетической неполноценности эмбриона следует признать бессмысленной [1].

1.1 Роль системного и локального иммунного ответа в генезе привычного невынашивания беременности

Считается, что эмбрион ввиду наличия отцовских молекул главного комплекса гистосовместимости MHC (англ. Major Histocompatibility) класса-I человеческих лейкоцитарных антигенов HLA-C (англ. HLA, Human Leukocyte Antigens) напоминает полуаллогенный трансплантат [105]. В период беременности иммунная система женщины должна претерпевать ряд изменений, чтобы не отторгнуть полуаллогенный эмбрион [14]. Присутствие иммунных маркеров «отторжения» плода как в периферической крови, так и в мазке/биоптате эндоцервикса имеет весомый прогностический и диагностический потенциал [1,4].

Материнские эффекторные Т-лимфоциты, Т-хелперы (англ. to help - помогать) с уникальным комплексом антигенов CD4+ (англ. cluster of differentation), активированные отцовскими антигенами и экспрессируемые трофобластом, могут секретировать различные агрессивные цитокины. Эффекторные CD4+ Т-хелперы человека были классифицированы как класс Th1 (участвуют в развитии клеточного иммунного ответа) и Th2 (играют важную роль в развитии аллергической реакции), а позднее клетки Th17 (участвуют в развитии аутоиммунных процессов) [42] и Th22 [57]. Клетки

CD4+ Th1, которые продуцируют интерлейкин-2 и интерферон (INF-γ), обладают высокой противоинфекционной защитной функцией [57].

Клетки Th17 продуцируют цитокины IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-26, IL-22 и экспрессируют связанные с ретиноевой кислотой орфанные рецепторы (RORC), роль которых - защита от внеклеточных бактерий путем активации нейтрофилов, способствующих хроническому воспалению.

Предшественники лимфоцитов Th17 могут дифференцироваться в Th17/Th1, продуцируя IL-17 и IFN-γ, и, наконец, в клетки Th1 в ответ на присутствие IL-12. Микроокружение, богатое IL-4, может индуцировать смещение клеток Th17 памяти в клетки Th17/Th2, продуцируя как IL-17, так и IL-4 [57].

Клетки Th22 в основном секретируют IL-22 и фактор некроза опухоли (TNF-α) и могут экспрессировать Гранзим-В и IL-13 — факторы, связанные с защитой организма и ремоделированием ткани [142]. Повышение продукции IL-22 клеткой, вероятнее всего, регулируется транскрипционным фактором арилуглеводородного рецептора, хотя для Th17 также необходимы дополнительные внутриклеточные молекулы, участвующие в дифференцировке Th22 как сигнальный протеин и активатор транскрипции - STAT3 (англ. signal transducer and activator of transcription 3) [138].

Экспрессия хемокиновых рецепторов типа 4 (CCR4) и типа 10 (CCR10) в клетках Th22 позволяет сделать выводы, что эти клетки рекрутируются в эпидермис [71]. In vitro клетки Th22 могут развиваться независимо от линии Th17, демонстрируя пластичность по отношению к клеткам типа Th1 и Th2 [79,123]. При беременности клетки Th1 (в частности, INF-γ), по-видимому, участвуют в остром процессе отторжения эмбриона и, следовательно, могут быть причиной рецидивирующих самопроизвольных выкидышей (СВ) [60], тогда как клетки Th2 (продуцирующие IL-4 и IL-10), CD4+, CD25+, а также экспрессирующие транскрипционный фактор (Foxp3+) Treg клетки (IL-10 и

TGF-β) ингибируют продукцию INF-γ, повышая толерантность к плоду и влияя на благоприятный исход беременности.

Lombardelli L. et al. описывали более высокую концентрацию Th17/Th2, продуцирующих IL-17 и IL-4 у пациенток с физиологическим течением беременности. Наличие Th17, продуцирующих IL-17, и Th17/Th1, вырабатывающих IL-17 и INF-γ, были обнаружены в децидуальной ткани женщин с ПНБ неясной этиологии [87].

Зону имплантации эмбриона отличает присутствие пула Th17/Th2 наряду с концентрацией IL-4, матричной рибонуклеиновой кислоты (мРНК), транскрипционного фактора (GATA-3), IL-17A и RORC, за пределами таковой выявлены клетки Th17, Th17/Th1 и Th1 [87]. Ряд авторов обнаружили, что HLA-G5, растворимая молекула класса Ib, вырабатываемая эмбрионом и экстравиллярным трофобластом, может быть ответственна за развитие клеток иммунного ответа Th17/Th2 [86,87]. Показано, что IL-22 участвует в гибели эмбриона, путем увеличения продукции INF-γ Th1 и клеток Tc1, наряду со снижением уровня IL-10 клетками Treg и Th2, которые ответственны за толерантность в системе «мать-плод» [88]. Уровень IL-22 CD4+ Т-клеток, продуцируемого децидуальной тканью матери, может быть ключевым в патогенезе прерывания беременности. Более высокий показатель маркера иммунного ответа представлен при физиологической беременности (ФБ), снижение мРНК выявлено при рецидивирующих репродуктивных потерях [52,88].

Сообщается, что на ранних сроках гестации в клетках децидуальной ткани группа врожденных лимфоидных клеток 3 (ILC-3) выделяет IL-22 [71,88] и может частично дифференцироваться в маточные NK-клетки (натуральные киллеры). В исследовании группы ученых во главе с Logiodice F. показатель CD4+ Т-клеток, вырабатывающих IL-22 (Th/IL-22) в децидуальной ткани, оказался значимо выше в группе женщин с ФБ (62,9%),

чем с ПНБ в анамнезе (21,6%, p=0,002), что несомненно свидетельствует о важной роли Т-хелперов в благоприятных репродуктивных исходах [57].

Модификации Т-клеток, в частности, CD4+, CD25+, FoxP3+, Treg необходимы для поддержания иммунной толерантности между матерью и плодом [57,160]. Сенсибилизацию Treg-клеток от родительских антигенов на «границе» между матерью и плодом расценивают как способ избежать алло-отторжения плода путем создания «толерантного» микроокружения, особенно при экспрессии IL-10, трансформирующего фактора роста-β и индоламина 2–3 дезоксигеназы [130].

Способность к адаптации материнской иммунной толерантности к эмбрионально-отцовским антигенам прогестероном (Пг), хорионическим гонадотропином и гормоном роста плаценты человека возможна ввиду значительного снижения активности маточных натуральных киллеров (NK) и/или повышения Treg-клеток [130]. В литературе можно найти данные о роли различных рецепторов NK, в частности, иммуноглобулиноподобных рецепторов клеток-киллеров и взаимосвязи с человеческим лейкоцитарным антигеном-С и толерантностью матери к плоду, их перспективной фармакологической модуляции [73].

1.2 Роль прогестерона в развитии физиологической и осложненной беременности

Эндокринные причины рецидивирующего выкидыша отмечают в 20,0% случаев [1]. Прогестерон имеет ключевое значение в развитии механизма материнской иммунной толерантности к полуаллогенному эмбриону. Прогестагены, стимулирующие прогестероновые рецепторы, активно используются с целью поддержки лютеиновой фазы, профилактики развития СВ и преждевременных родов [38]. Пг является 21-углеродным стероидным женским гормоном, который продуцируется преимущественно тека-клетками желтого тела в лютеиновую фазу менструального цикла и синцитиотрофобластом в период беременности. Пг оказывает как иммунное,

так и эндокринное воздействие на репродуктивный тракт – влияет на имплантацию, регулирует цитокиновый баланс, активность NK, высвобождение арахидоновой кислоты и меняет сократительную активность миометрия. Иммуномодулирующее действие Пг проявляется в активной регуляции баланса между Th-1 и Th-2 цитокинами. Клетки Th-2 и Treg имеют положительную корреляционную связь с прогестероном, т.е. их количество возрастает при физиологическом течении беременности [128].

Известно, что активируемые прогестагенами клетки синтезируют прогестерон-индуцированный блокирующий фактор (progesterone-induced blocking factor (PIBF), который оказывает модулирующее дейсвтие NK на трофобласт [67], а также подавляет выработку цитокинов Th-1 (таких, как TNF-α, вызывающий цитотоксические и воспалительные реакции), и способствует синтезу цитокинов Th-2 (например, IL-10, который ингибирует тромбообразование). Снижение уровня PIBF полагают предвестником спонтанного выкидыша [104].

Прогестагены ингибируют высвобождение арахидоновой кислоты и способствуют выработке асимметричных, «защищающих» от беременности антител. Показана способность прогестерона к восстановлению физиологического уровня растворимых рецепторов TNF-α у женщин с привычным невынашиванием в анамнезе [153].

В ряде исследований установлено, что оксид азота, синтезирующийся в матке в период физиологической гестации, способствует снижению тонуса за счет воздействия Пг [112,127].

Пг активно противодействует влиянию эстрадиола на развитие «щелевого» соединения, подавляя сократительную активность миометрия и дилатацию шейки матки, а также значительно снижает резистентность в спиральных артериях, увеличивая циркуляцию крови в маточно-плацентарном комплексе [38]. Пг действует на клетки опосредованно через ядерный рецептор PGR, который экспрессируется в виде двух практически идентичных

изоформ – PGR-A и PGR-B, за исключением отсутствия в PGR-A164 аминокислоты. Данные in vitro позволяют предположить их функциональное различие, причем тканеспецифические паттерны распределения могут объяснять разнообразие эффектов Пг. У человека PGR-A и PGR-B эквивалентно экспрессируются в большинстве клеток-мишеней, что указывает на существование альтернативных механизмов контроля действий прогестерона.

Активация PGR при непосредственном участии лигандов в норме приводит к перераспределению в дискретные субъядерные очаги, которые выявляются с помощью иммунофлуоресценции, вероятно, представляющие собой агрегаты множественных транскрипционно активных комплексов корегуляторов PGR. При тяжелых диспластических изменениях шейки матки очаги PGR являются аберрантными, что позволяет предположить изменение состава корегулятора и количества комплексов. В современной литературе показано большое семейство корегуляторов и диапазон белков, которые, как полагают, через тканеспецифическую экспрессию отвечают за модуляцию ответа Пг [56].

Многочисленными исследованиями доказана эффективность прогестагенов при коррекции недостаточности лютеиновой фазы (НЛФ), прегравидарной подготовке и в ранние сроки гестации при привычном выкидыше. Вопрос о целесообразности назначения прогестагенов с целью профилактики спонтанного выкидыша и лечения ПНБ остается контрверсионным.

Приведены данные о большем количестве беременностей свыше 20 недель и показателе рождаемости в выборке с применением микронизированного Пг на преконцепционном этапе и при беременности (n=350) у женщин с ПНБ в сравнении с группой плацебо (n=350) (87,6% против 76,7% и 91,6% против 77,4% соответственно, $p<0,05$) [119]. Показатель самопроизвольных выкидышей в отсутствие прогестеронотерапии оказался

вдвое выше (12,4% против 23,3%, p=0,001). Рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое исследование Ismail A.M. et al. с участием 700 женщин показало противоположные результаты эффективности вагинального прогестерона в лечении ПНБ. Частота выкидышей в группе с прогестероном была значительно ниже – 12,4%, чем в плацебо (23,3%, p=0,001), наряду с различиями в продолжительности гестации более 20 недель и уровня живорождаемости (p<0,05) [119]. Протективную роль микронизированного прогестерона подтверждают данные мета-анализа: снижение повторных выкидышей неясной этиологии (ОР 0,72, 95% ДИ: 0,5–30,97), возрастание количества родов (ОР 1,07, 95% ДИ: 1,02–1,15) и показателя живорождаемости (ОР 1,07, 95% ДИ: 1,02–1,15) в сравнении с группой плацебо (n=802 и n=784) [139]. Основополагающую роль прогестерона в пролонгации беременности отрицают авторы, показавшие сопоставимые показатели живорождаемости в группах с использованием прогестерона (n=203) и плацебо (n=203) до 20 недель включительно (81,3% и 83,3% соответственно, p=0,697) [155].

В масштабном исследовании (n=4038) исходов беременности частота живорождения в группах с применением Пг и плацебо достоверно не отличалась – 75,0% (n=1513, p=0,08). Частота нежелательных явлений (врожденные заболевания младенцев) была сопоставима [107].

Начало терапии микронизированным Пг после клинического подтверждения наступления беременности менее эффективно, что также продемонстрировало международное исследование PROMISE [18].

1.3 Роль дисбиотических и воспалительных изменений во влагалище и эндоцервиксе в генезе привычного невынашивании беременности

Накоплены данные об активации условно-патогенных и патогенных микроорганизмов, неблагоприятно влияющих на течение и исход беременности при изменении гормонального баланса и физиологической иммуносупрессии. Благоприятное влияние прогестерона на формирование

лактобациллярной вагинальной среды при беременности обеспечивает утолщение эпителия влагалища, повышение эластичности клеток промежуточного слоя, смещение pH в кислую сторону [38].

По мнению ряда авторов, частота вагинального дисбиоза при беременности у пациенток с ПНБ в анамнезе составляет 50,0–65,0% [38,128].

Приведены данные о взаимосвязи нарушений микробиома влагалища и цервикального канала с неблагоприятными репродуктивными исходами у 355 пациенток [122]. Частота преждевременных родов и послеродовых гнойно-септических осложнений у женщин с рецидивирующими СВ оказалась выше в присутствие условно-патогенных микроорганизмов и вирусных возбудителей. В группе с персистирующими инфекциями частота рецидивирующих СВ составила 49,8%.

Приведены данные о большей частоте нарушений микробиоценоза в группе 89 женщин с ПНБ (критерий включения – три и более СВ на сроках до 20 недель гестации), чем в контроле (n=20) (p=0,01) [30]. В крупном проспективном исследовании Baqui A.H. (n=4221) беременных на сроке до 19 недель нарушения вагинальной микрофлоры выявлены у 16,5%, у трети из них (6,8%) рост патогенной микрофлоры носил стойкий характер и не поддавался медикаментозной коррекции.

Таким образом, у пациенток с выявленным дисбиозом влагалища достоверно чаще регистрировались неблагоприятные репродуктивные исходы: преждевременные роды, в т.ч. мертворождение, спонтанные выкидыши [123].

Спорные результаты об отсутствии различий в микробиоме влагалища и шейки матки более 90 тыс. женщин в Китайской Республике (Тайване) за период 2000-2013гг в группе с ПНБ и контроле могут объясняться неоднородной выборкой [132]. Исследование микробиоты 500 корейских беременных женщин позволило установить прямую корреляцию вагинального дисбиоза и СВ, а также высокую частоту преждевременных родов [159]. Hosny

Alaa El-Dien M. S. et al. показали значимые нарушения микробиоты влагалища (Tr. vaginalis, M. hominis, грамотрицательные бациллы) (p=0,04) 117 женщин (45 – без жалоб в группе контроля и 72 – с угрозой прерывания беременности и СВ в анамнезе [133]. Другие авторы отрицают различия в биоценозе влагалища 336 пациенток с ПНБ и 138 – физиологической беременностью [33]. Отсутствие достоверной связи неблагоприятных исходов беременности с нарушением микробиоценоза влагалища, несмотря на высокий уровень выкидышей и мертворождений (p>0,05), выявлено у 269 индийских женщин [137].

Связь между ВПЧ и вагинальным дисбиозом показана в исследованиях многих авторов, особенно при выявлении высоко онкогенных генотипов. Три мета-анализа подтвердили связь между вагинальной микробиотой без преобладания *лактобацилл* и заболеванием шейки матки через влияние микробиома на вероятность инфицирования ВПЧ, персистенции и развития CIN [31,151,156].

Данные, что при БВ частота CIN или рака шейки матки выше, чем в его отсутствие (36,7% против 7,8% и 3,7% против 0,7% соответственно, p<0,001) [44] подтверждают концепцию микробного разнообразия при CST III и IV (классы вагинальной микробиоты, community state types) в генезе преинвазивных заболеваний шейки матки [9,41]. Сообщается о большей частоте при ВПЧ вульво-вагинального кандидоза и аэробного вагинита, однако отсутствии взаимного влияния [35]; о сочетании вируса с другими инфектами более чем в 70,0% [6]. Другие авторы отмечают, что у женщин без ВПЧ с нормальными цитограммами грибы выявляют в 0,8%, ВПЧ-позитивных – 57,8 – 88,6% [46]. Kone E.S. et al. установлена связь между CIN1, ВПЧ и ко-инфекциями у небеременных женщин: кандидозный вульвовагинит обнаружен у 57,8%, БВ – 23,0%, смешанная флора – 8,0%. Среди них 19% имели CIN, в т.ч. CIN I – 9,0% [155].

Взаимосвязь между инфекцией ВПЧ и исходами беременности неясна [64]. Влияние, по мнению Basonidis A. et al., непосредственно, либо иммуноопосредованно провоцирующее привычный выкидыш подвергается сомнению [80]. В крупномасштабном исследовании шотландских ученых установлена взаимосвязь различного ВПЧ-статуса (положительный (носительство без заболеваний шейки матки; ВПЧ-ассоциированные заболевания шейки матки), отрицательный и после вакцинации) 5598 пациенток за период 1999-2015 гг. с исходами беременности (срочные самопроизвольные роды – n=4942, преждевременные роды – n=386, СВ – n=270). Неблагоприятное влияние ВПЧ-инфекции выявлено только при морфологических изменениях шейки матки (p=0,02) [78].

Роль инфекции в развитии осложнений беременности подтверждают результаты морфологических исследований плаценты [81,82]. При мертворождаемости инфекция в плаценте цитологически подтверждена в 100%, бактериально-вирусного характера (преимущественно герпетического) – в 52,3% [12]. Chisanga C. et al. продемонстрировали присутствие ВПЧ в трофобластах при использовании методов полимеразной цепной реакции и иммуногистохимического [66]. Группа исследователей с de Freitas L.B. при изучении образцов децидуальной ткани и ворсин хориона 118 пациенток со спонтанным выкидышем в 65,0% образцов обнаруживали ВПЧ [81]. Другие авторы выявили ВПЧ в ворсинах хориона женщин с СВ в 16,0% [102]. Большую частоту ВПЧ (p=0,03) и следы инфекции в трофобласте (n=84) женщин с СВ в I триместре беременности отмечали в сравнении с благоприятным течением (p=0,02) [84].

Инфицирование ВПЧ связывают с осложнениями беременности: самопроизвольным абортом, преждевременными родами, аномалиями плаценты, задержкой роста плода, несвоевременным излитием околоплодных вод, преэклампсией [78,150]. В крупном систематическом обзоре, резюмирующем результаты 36 исследований, Niyibizi J. et al. показали

достоверную связь персистирующей вирусной инфекции и неблагоприятных репродуктивных исходов (преждевременные роды и мертворождение, задержка роста плода), однако не выявлено повышения риска ПНБ [24,25]. Полагают, что инфицированию ВПЧ и/или ее персистенции способствуют модифицированные иммунологические адаптации, направленные на поддержание иммунной толерантности к полуаллогенным плодам [103]. При заражении клеток трофобласта ВПЧ вызывает плацентарный дистресс и риск преждевременных родов [37].

По данным отечественных и зарубежных исследователей, патология шейки матки в 83,0% сопровождается развитием дисбиоза влагалища и иммунными дисфункциями [8]. Так, снижение концентрации палочковой флоры по результатам обзора итальянских ученых достоверно чаще приводило к повышению провоспалительных лимфоцитов Th1/Th2, риску преждевременных родов и спонтанных выкидышей [143]. Негативное влияние инфекций связывают с длительным воздействием на иммунную систему, местным и генерализованным. В исследовании Xu L. et al. причиной рецидивирующего выкидыша полагают нарушения микробиоценоза влагалища и повышение продукции цитокинов со сдвигом Th1/Th2 [85].

1.4 Возможности современных методов диагностики заболеваний шейки матки, ассоциированных с вирусом папилломы человека

В 2008 г. немецкому ученому Харальду цур Хаузену была присуждена Нобелевская премия в области медицины и физиологии за определение ключевой роли ВПЧ высокого онкогенного риска в развитии неопластических заболеваний и рака шейки матки [146]. Папилломавирусная инфекция (ПВИ) признана одной из распространенных инфекций – эпидемиология составляет более 600 млн человек в мире [19], преимущественно в возрасте моложе 30-35 лет [40,124]. Более 80,0% женщин инфицируются спустя два года после полового дебюта. Среди пациенток старше 30–35 лет риск персистенции ВПЧ возрастает в 10 раз [124].

Согласно мета-анализу 28 исследований беременных (n=13 640), инфицированность ВПЧ составляет 13,4-16,8% и более, небеременных – 12,3%, по другим данным – в два раза выше (25,0% против 13,0% соответственно [83,140], с максимальным показателем 60,0 – 65,0%.

По онкогенности выделяют типы ВПЧ [113,149]:

- высокого онкогенного риска (16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82), участвуют в патогенезе неопластических процессов и приводят к развитию рака шейки матки;
- низкого онкогенного риска (6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 72, 81), чаще всего не проявляются, либо приводят к развитию кондилом, папиллом, аногенитальных бородавок.

Сообщается о высокой инфицированности беременных женщин 16 типом ВПЧ [134]. Факторы риска – ранний сексуальный дебют, большое количество партнеров при отказе от барьерной контрацепции, сниженный иммунный статус, вредные привычки [149].

Исследование на ВПЧ с помощью ПЦР-РВ с типированием и определением геномных эквивалентов вируса или реакции гибридизации вирусной ДНК с РНК-зондом (рибонуклеиновой кислотой) (Digene-тест) регламентировано клиническим протоколом прегравидарной подготовки МАРС 2021 г. [13]. Метод Digene-тест позволяет прогнозировать и выработать тактику ведения с учетом выявленной концентрации ДНК ВПЧ [58]. Практически до 90,0% случаев ВПЧ-инфицирования полагают неопасными в связи с вероятностью элиминации при адекватном иммунном ответе в течение двух-трех лет после инфицирования [149]. По другим данным, элиминация 16 генотипа ВПЧ в послеродовом периоде происходит у 9,5% женщин, других типов – в 52,2%, регресс цитологических аномалий – в 32,5%.

Вероятность CIN при персистенции ВПЧ в 10,0% указывает на необходимость комплексной диагностики, динамического наблюдения и

адекватной терапии [149]. CIN были обнаружены у каждой четвертой пациентки, ASC-US (atypical squamous cells of undetermined significance) встречалась в 12,6%, LSIL (low-grade squamous intraepitelial lesions) – 11,8%, HSIL (high-grade squamous intraepitelial lesions) – 0,8%. В выборке 11 906 беременных женщин с ВПЧ без указания на сопутствующие инфекции выявлены изменения цитограмм: ASC-US у 9,5%, LSIL – у 1,9% и HSIL – 0,6% [3]. По данным мета-анализа риск CIN III у пациенток с ВПЧ 16/18 типов и цитологических результатах ASC-US составляет 17,0%, LSIL – 19,0%, при наличии других типов ВПЧ ВР – 5,0% [74]. Достоверность сообщения об отсутствии интраэпителиальных поражений шейки матки у 73,9% женщин с ВПЧ оспаривает отсутствие данных об исходах беременности [125].

Трудности прогнозирования прогрессии предраковых заболеваний обусловлены неоднородными данными: сообщается о спонтанной регрессии большинства гистологически верифицированных случаев LSIL у небеременных и развитии инвазивной карциномы менее чем в 1,0% [16]. У трети женщин вариант ASC-US в отсутствие ВПЧ высокого риска (ВР) полагают связанным с воспалительными и реактивными изменениями [51]; вероятность пре- и инвазивных заболеваний шейки матки низкая.

Расширенную кольпоскопическую визуализацию полагают необходимой для ранней диагностики заболеваний шейки матки, ассоциированных с ВПЧ, мониторинг в послеродовом периоде – при выявлении LSIL при беременности [1]. Жидкостная цитология в сравнении с традиционным методом обеспечивает полную сохранность клеточного состава, возможность автоматизированной оценки материала эндо- и экзоцервикса, выявления ВПЧ высокого онкогенного риска, определения онкомаркеров p16/Ki67 иммуноцитохимическим методом [17, 92].

Исследование молекулярных биомаркеров рассматривают с позиций оценки риска развития пролиферативных процессов с переходом в неоплазии.

p16INK4a (p16) - протеин представляет собой ингибитор циклин-зависимой киназы, который играет ведущую роль в регуляции клеточного цикла (митоза). Инактивация гена-супрессора митотического деления ретинобластомы (pRb) опосредованно вирусной мРНК E6/E7 приводит к значительному повышению уровня p16 в клетках, что свидетельствует о нарушении регуляции клеточного деления. Сверхэкспрессия p16 при CIN II и CIN III и раке шейки матки довольно хорошо изучены [23,39,93,100,118].

Один из них – онкобелок E7, воздействуя на клеточный цикл, вызывает неконтролируемую пролиферацию зараженных ВПЧ клеток и гиперэкспрессию белка p16ink4-α, накопление которого в цитоплазме позволяет на доклиническом этапе выявить предраковые состояния и самые ранние формы рака шейки матки [79,123,138,153].

Онкогенный потенциал ВПЧ реализуется при высокой вирусной нагрузке, а также интеграции ВПЧ в геном клетки хозяина и вызван гиперэкспрессией онкобелков E6/E7, которые изменяют клеточный цикл. Взаимодействие E6/E7 с опухоль-супрессорным белком p53 и белком ретинобластомы (pRb) приводит к снижению клеточного апоптоза, активации патологической пролиферации, неоангиогенеза и опухолевой трансформации [36,77]. Полагают, что повышение экспрессии онкобелков E6/E7 у ВПЧ-позитивных женщин с цитологическим заключением ASC-US/LSIL свидетельствует о нарушении регуляции клеточного цикла и прогрессировании процесса [55].

Ki-67, «*маркер бесконечности*» – негистонный протеин и признанный маркер клеточной пролиферации и репликации ДНК. В нормальном плоском эпителии белок экспрессируется в базальных и парабазальных клетках нижней трети эпителия. Сверхэкспрессия Ki-67 связана с воспалением и более реактивными или атипичными поражениями [75]. Незрелая плоскоклеточная метаплазия связана с гиперплазией парабазальных Ki-67-позитивных клеток. Известно, что более 25,0% незрелых метапластических поражений при

исследовании являются Ki-67-положительными, но всегда отрицательными для p16 [53,117].

Гистологическое исследование биоптата считают «золотым стандартом» при выборе тактики лечения, однако следует учитывать элемент субъективизма при исследовании одного и того же материала разными специалистами, особенно при диагностике CIN I и CIN II в отличие от CIN III [78]. Комбинация интенсивного окрашивания p16/Ki-67 помогает дифференцировать истинные предраковые неоплазии высокой степени от доброкачественных поражений (реактивной атипии, атрофии и незрелой плоской метаплазии) [48,54,68,121,148]. Метод полагают эффективным [46,106], однако дорогостоящим [78]. ВПЧ-положительные пациентки при отрицательном окрашивании p16/Ki-67 имеют низкий риск развития тяжелых дисплазий [63]. Двойное окрашивание p16/Ki-67 может иметь важное прогностическое значение для оценки вероятности рецидивов цервикальных неоплазий после хирургического лечения [59,75].

Сравнительный анализ эффективности методов диагностики заболеваний шейки матки показал вероятность ошибочных заключений в отсутствие комплексного обследования [7]. Вероятность диагностики доброкачественных заболеваний шейки матки женщин с персистирующей вирусной инфекцией (койлоцитоз, дискератоциты) на основании цитологического метода ограничена его низкой прогностической ценностью (58,0%) при высокой специфичности (92,0%). Чувствительность цитологии с двойным окрашиванием p16/Ki-67 для ≥CIN III (93,8%) не отличалась существенно от цитологического исследования по Папаниколау (87,7%) и его сочетания с 16/18 генотипами ВПЧ (95,1%). Однако специфичность иммуногистохимического исследования (51,2%) оказалась значительно выше, чем цитологии по Папаниколау (44,9%) и ее сочетания с 16/18 генотипами ВПЧ (25,8%) [121].

Сообщается о сопоставимом риске дисплазий у женщин с ВПЧ-отрицательным/ASC-US и отрицательным мазком по Папаниколау, однако более высоком, чем в отсутствие ВПЧ и отрицательного цервикального теста [70].

BCL-2. Механизм апоптоза регулируется балансом про- и антиапоптотических групп-белков В-клеточной лимфомы-2 (Apoptosis regulator BCL-2) и приводит к изменению проницаемости внешней митохондриальной мембраны, высвобождению цитохрома С из митохондрий в цитозоль, сборке APAF-1, содержащей апоптосомы, и активации каскада реакций через каспазу-9 [110,114]. Члены семейства BCL-2, имеющие участки коротких консервативных последовательностей, подразделяются на три подгруппы: антиапоптотические белки - белки «выживания», включая BCL-2, BCL-xL MCL-1, BCL-w, BCL-B и A1/BFL-1; проапоптотические белки, содержащие только BH-3, такие как BIM, BID, BAD, NOXA, PUMA и BMF; и мультидоменные проапоптотические белки, такие как BAX и BAK [61]. Подгруппа белков антиапоптотического действия характеризуется наличием N-концевого домена BH-4 [101]. Домен BH-4 BCL-2 и BCL-xL способен связывать другие белки, которые не принадлежат к семейству белков BCL-2, что позволяет им играть роль, выходящую за рамки их классической функции ингибирования апоптоза. Участвуют в других важных клеточных функциях, таких как пролиферация, аутофагия, дифференцировка, репарация ДНК, прогрессирование опухоли и ангиогенез [72]. Антиапоптотические белки семейства BCL-2 выполняют функцию обеспечения жизнедеятельности клетки, связывая и ингибируя проапоптотические белки, сенсоры клеточного стресса (белки, содержащие только BH-3) и эффекторы апоптоза (BAX и BAK). С биохимической точки зрения взаимодействие между про- и антиапоптотическими белками происходит через связывание гидрофобной стороны амфипатической α-спирали BH-3 проапоптотического белка с гидрофобным карманом в антиапоптотическом белке, образованном

доменами BH-1, BH-2 и BH-3 [101]. С момента открытия BCL-2 опубликовано множество статей, касающихся роли, которую антиапоптотические члены данного семейства белков играют в развитии дисплазии и рака.

Для диагностики, течения и прогнозирования ВПЧ-ассоциированных поражений эпителия шейки матки изучаются микро-РНК (miR).

МикроРНК (миРНК, miR) – класс небольших одноцепочечных некодирующих РНК длиной около 18-25 нуклеотидов, которые негативно регулируют экспрессию генов в посттранскрипции путем связывания с 3'-нетранслируемой областью (3'UTR) молекул мРНК-мишени [72]. Установлены функции miR в биологическом поведении клеток – процессах пролиферации, апоптоза и дифференцировки стволовых клеток [50]. Показана взаимосвязь аномальной экспрессии miR с различными злокачественными новообразованиями человека, включая рак шейки матки.

Впервые сообщалось, что **miR-145** активируется при колоректальной неоплазии [144]. Недавние исследования показали, что miR-145 может играть важную роль в регуляции прогрессирования опухолевых клеток, миграции, инвазии и апоптоза некоторых типов рака, воздействуя на c-Myc, Mucin-1, p70S6 киназу и субстрат рецептора инсулина [96,108,154].

Профиль экспрессии **miR-34a**, участвующего в процессах пролиферации, полагают перспективным для ранней диагностики, классификации или прогнозирования исходов неопластических процессов.

В ряде исследований обнаружены miR в сыворотке или плазме [45], моче [129] и слюне [80], которые являются неинвазивными образцами для диагностики рака. Дисфункция miR-34a связана с неопластическим механизмом, который активируется онкобелком E6 и p53 при персистенции ВПЧ [109]. Отслоенные клетки шейки матки рассматривают в качестве неинвазивных образцов для оценки экспрессии miR.

Отсутствие четких представлений о роли в генезе ПНБ нарушений вагинальной микробиоты или воспалительных процессов нижних отделов

репродуктивной системы, изменений локального иммунитета, вирусной инфекции (ВПЧ ВР), кофакторного воздействия на эндоцервикс, повышения пролиферативного потенциала препятствует осуществлению персонифицированной профилактики и лечения. Весомым аргументом необходимости поиска информативных молекулярно-генетических маркеров ПНБ и неопластической трансформации выступает неоправданный радикализм в лечении «малых» форм поражения шейки матки, использование неэффективной прогестероновой терапии.

Резюме. Улучшение исходов беременности женщин с ПНБ представляется возможным после уточнения ключевых механизмов нарушения взаимодействия матери и эмбриона с позиций оценки:

- состояния эндо- и экзоцервикса при различных репродуктивных исходах;
- воспалительных и дисбиотических нарушений влагалища, особенно при ПВИ; взаимосвязи клеточного состава эндоцервикса и микробиоценоза влагалища; локального иммунного профиля и гормонорецепции клеток эндоцервикса; молекулярно-биологических факторов (экспрессия онкопротеинов p16ink4-α и Ki67 и миРНК-145 и -134), отражающих риск перехода в неоплазию под влиянием вирусной инфекции;
- перспективности внедрения в алгоритм обследования, помимо традиционного цервикального скрининга, методик оценки наличия и степени тяжести ВПЧ-ассоциированных поражений эпителия шейки матки (продукции вирусных онкогенов и онкобелков инфицированой эпителиальной вирусной клеткой);
- эффективности лечения доброкачественных болезней шейки матки и коррекции воспалительных и дисбиотических состояний в практике сокращения повторных репродуктивных потерь.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Настоящее когортное, проспективное, сравнительное исследование выполнено в 2018-2019 гг. на базах кафедры акушерства и гинекологии с курсом перинатологии (заведующий кафедрой — член-корр. РАН, заслуженный деятель науки РФ, д.м.н., проф. В.Е. Радзинский) Медицинского института Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов», гинекологическом отделении и отделении патологии беременных ГКБ им. С.С. Юдина (главный врач - Проценко Д.Н.), Женской Консультации №1 ГКБ им. Н.И. Пирогова “Филиал Родильный дом №25” (заместитель главного врача по акушерству и гинекологии, заведующая родильным домом - Оленева М.А.).

Исследование выполнено в рамках основной научно-исследовательской деятельности «Репродуктивное здоровье населения Московского мегаполиса и пути его улучшения в современных экологических и социально-экономических условиях» (номер гос. регистрации 01.9.70 007346, шифр темы 317712).

Контингент исследования составили 1348 женщин, обратившихся в гинекологическое отделение и отделение патологии беременных ГКБ им. С.С. Юдина, 389 беременных, находившихся на учете в Женской Консультации №1 ГКБ им. Н.И. Пирогова «Филиал Родильный дом №25».

В диссертационное исследование были включены женщины (n=59) с двумя и более выкидышами в анамнезе, отобранные из всей выборки по критериям включения/исключения. Контрольную группу составили 57 женщин с физиологической беременностью и благополучными репродуктивными исходами в анамнезе.

Критерии включения в группу ПНБ: возраст от 18 до 45 лет, два и более выкидыша в анамнезе; неясная этиология ПНБ, визуально неизмененная

шейка матки при осмотре в зеркалах и кольпоскопии, добровольное информированное согласие на участие в исследовании и забор биологического материала, возможность следовать протоколу.

Критерии исключения: морфологически измененная шейка матки (рубцы, дисплазии, кисты), наличие соматических заболеваний (острые инфекционные заболевания, в т.ч. ВИЧ, гепатиты В и С, сопутствующие экстрагенитальные заболевания в стадии суб- и декомпенсации), кесарево сечение и миомэктомия в анамнезе, отказ следовать протоколу.

Для определения соответствия критериям включения было проведено комплексное клинико-лабораторное обследование.

Научно-статистическая программа исследования включала сбор материала и регистрацию данных медицинской документации, разработку критериев включения и исключения из исследования, математико-статистическую обработку, анализ и обобщение полученных результатов.

Дизайн исследования

Методы исследования: стандартный клинический осмотр (сбор анамнеза, жалобы, данные объективного и влагалищного исследования), расширенная кольпоскопия, жидкостная цитология, ПЦР-диагностика ИППП, ВПЧ-типирование, иммуноцитохимическое (ИЦХ) исследование отделяемого эндоцервикса (экспрессии мРНК маркеров p16/Ki67, BCL-2, PGR-A и миРНК miR-145, miR-34a).

Обследование всех пациенток осуществляли согласно Приказу Минздрава России «Порядок оказания медицинской помощи по профилю «акушерство и гинекология» № 572н от 12.11.2012 г.

Схема дизайна исследования женщин с привычным выкидышем представлена на рисунке 1.

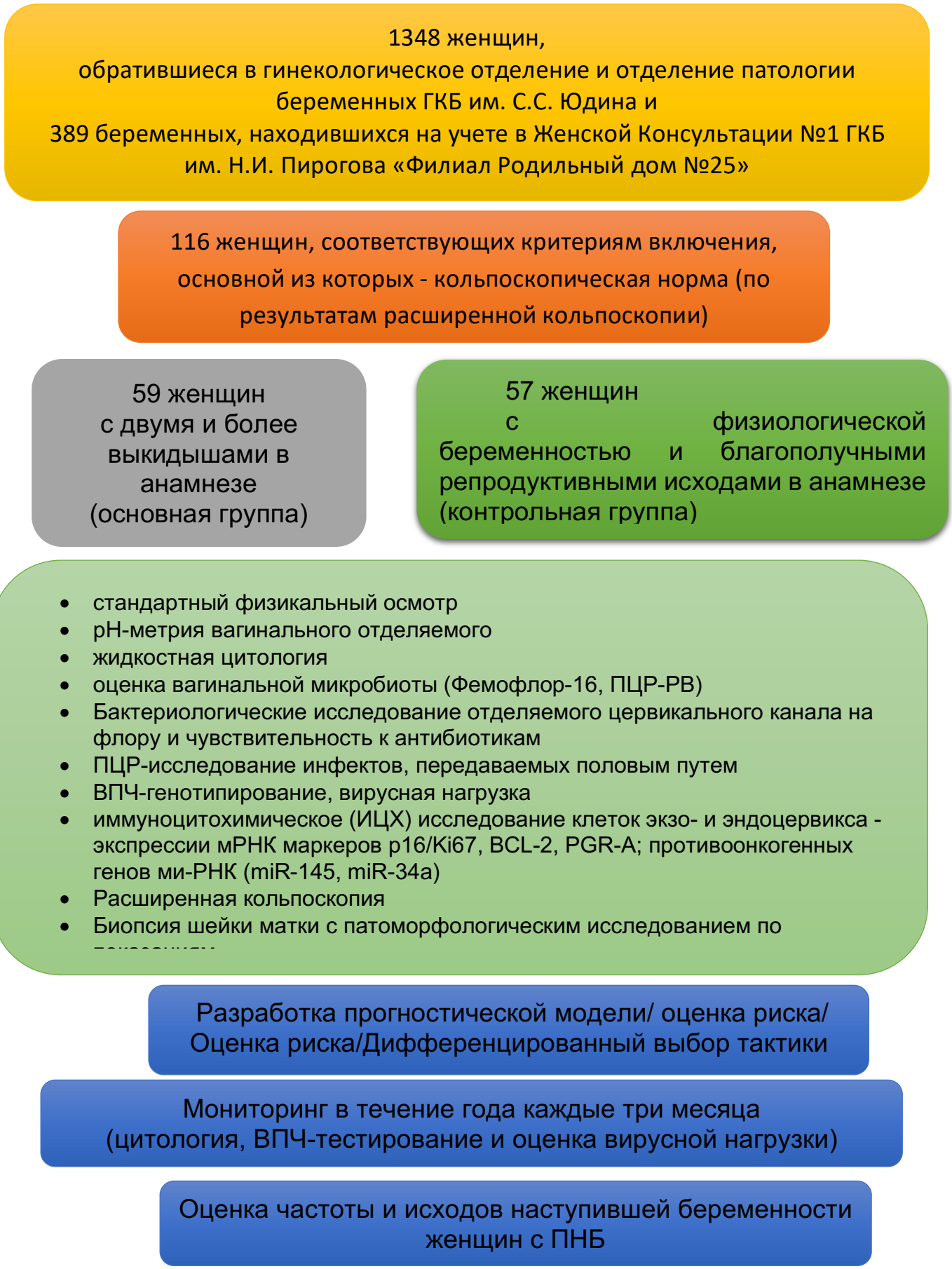


Рисунок 1 – Дизайн исследования (женщины с ПНБ и здоровые беременные)

Клиническое обследование

При сборе анамнеза изучались следующие данные: возраст; образование; занятость; вредные привычки; особенности менструального цикла (возраст менархе, регулярность, продолжительность, объем и длительность менструального кровотечения, болезненность); возраст сексуального дебюта; семейное положение; метод контрацепции; акушерский анамнез (количество беременностей и исходы: аборты, выкидыши, роды); перенесенные заболевания и оперативные вмешательства; травмы.

Объективное исследование включало: антропометрические данные, в т.ч. индекс массы тела (ИМТ), оценку состояния органов дыхательной, мочевыделительной, сердечно-сосудистой, пищеварительной систем.

Расчет ИМТ осуществляли по формуле Кетле (кг/рост, м2): ИМТ <25,0 нормальная масса тела; 25,0-30,0 – избыточная; 30,0-34,9 –ожирение I степени, 35,0-39,9 – II степени, >40,0 кг/м2 – III степени.

Динамическое наблюдение за беременными осуществляли в рамках рекомендуемых стандартов (приказ Министерства здравоохранения РФ от 1 ноября 2012 г. №572н – Об утверждении Порядка оказания медицинской помощи по профилю «акушерство и гинекология».

Гинекологическое исследование

Были проанализированы следующие данные: состояние наружных половых органов, тип и характер оволосения, наличие дисплазий, образований, дефектов; цвет слизистой влагалища и шейки матки, длина, консистенция, состояние наружного зева, характер выделений, размер, подвижность и чувствительность тела матки, состояние придатков матки.

РН-метрия отделяемого влагалища

Всем пациенткам, включенным в исследование, проводилась рН-метрия отделяемого половых путей при помощи индикаторных тест-полосок «Кольпо-тест» производства “Биосенсор АН”, РФ. Забор материала осуществлялся вне менструальных выделений, также пациентки были

предупреждены о воздержании от мочеиспускания и гигиенических процедур за три часа до исследования. Индивидуальная тест полоска извлекалась из упаковки непосредственно перед исследованием, далее отделяемое наносилось на индикаторную часть полоски до её полного увлажнения, при необходимости удалялась излишняя жидкость поворотом ребра на чистое бумажное полотенце. Через 15 секунд в условиях хорошего освещения сравнивали цвет индикаторной части тест-полоски с цветовой палитрой на упаковке.

Лабораторные и инструментальные методы исследования

Оценку состава нижних половых путей осуществляли с помощью микроскопии мазков отделяемого заднего свода влагалища и цервикального канала, с окраской гематотоксилином и эозином. Для оценки биоценоза влагалища осуществлялось ПЦР-тестирование с детекцией продуктов реакции в режиме РВ с расчетом соотношений логарифмов концентраций ДНК Lactobacillus spp. и других бактерий с выявлением вариантов:

- бактериального вагиноза, с преобладанием ДНК G. vaginalis, A. vaginae (трех из четырех критериев Amsel);
- кандидозного вульвовагинита на основании ДНК одного из пяти видов грибов рода Candida в концентрации выше 10^2 ГЭ/мл;
- «АВ» на основании преобладания ДНК аэробных микроорганизмов Enterobacteriaceae, Streptococcus spp., Staphylococcus spp.) в сравнении с ДНК Lactobacillus spp.;
- ИППП (ДНК C. trachomatis, N.gonorrhoeae, T. vaginalis, M. genitalium).

Бактериологическое исследование предусматривало оценку вида и чувствительности выделенных из отделяемого цервикального канала микроорганизмов к антибиотикам, согласно рекомендациям, изложенным в Приказе № 535 «Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинико-диагностических лабораториях ЛПУ».

Расширенная кольпоскопия позволяла оценивать шейку матки методом микроскопического исследования особенностей эпителия и реакции нормальных и пораженных тканей на обработку диагностическими реагентами. Согласно критериям включения, выборку составили женщины с нормальной кольпоскопической картиной.

Для исследования в условиях женской консультации и гинекологического отделения использовали кольпоскоп КС-01 (РФ) с 2,5-31-кратным увеличением. Исследование проводили по общепринятым нормативам в три этапа: обзорный осмотр, обработка 3% раствором уксусной кислоты и проба Шиллера (обработка раствором Люголя). На первом этапе определяли: форму, размер и цвет слизистой шейки матки; наличие рубцовых деформаций; форму наружного зева; особенности сосудистого рисунка; наличие новообразований; характер выделений. Второй этап предусматривал пробу с 3% раствором уксусной кислоты с последующей оценкой сосудистой реакции и рельефа слизистой оболочки шейки матки через одну минуту после нанесения раствора. Суть второго этапа заключалась в определении цвета многослойного плоского эпителия (МПЭ), описании поверхности шейки, цилиндрического эпителия (ЦЭ) на экзоцервиксе, зоны трансформации (ЗТ), открытых и закрытых желез, типа ЗТ, ацетобелого эпителия (АЭ), мозаики, пунктации. На третьем этапе шейку матки обрабатывали раствором Люголя, позволяющим выявлять пораженные участки эпителия (йоднегативный участок) при слабой окраске измененных клеток.

При описании результатов кольпоскопии использовали международную терминологию, принятую на 14-м Всемирном конгрессе IFCPC 2011 г. в Рио-де-Жанейро с выделением категорий: нормальная кольпоскопическая картина, аномальная, подозрение на инвазию и прочие (таблица 1).

Таблица 1 - Международная кольпоскопическая терминология, 2011 г.

<table>
<tr><td colspan="4">МЕЖДУНАРОДНАЯ КЛАССИФИКАЦИЯ КОЛЬПОСКОПИЧЕСКИХ ТЕРМИНОВ (Рио-де-Жайнеро, 2011)</td></tr>
<tr><td colspan="2">Общие положения</td><td colspan="2">Адекватная/неадекватная картина с указанием причины: воспаление; рубцовые деформации; кровотечение; зона трансформации</td></tr>
<tr><td colspan="2">Нормальная кольпоскопическая картина</td><td colspan="2">Многослойный плоский эпителий: зрелый; атрофический
Цилиндрический эпителий: эктопия
Метапластический эпителий: Наботовы кисты, открытые железы
Децидуоз (в период гестации)</td></tr>
<tr><td rowspan="5">Аномальная картина</td><td>Общие принципы</td><td colspan="2">Локализация пораженного участка: в пределах/вне ЗТ
Размеры измененной области: в процентах от общей площади цервикса</td></tr>
<tr><td>Степень I
слабовыраженные изменения
LSIL</td><td>Тонкий ацетобелый эпителий с нечеткими контурами</td><td>нежная мозаика
нежная пунктация</td></tr>
<tr><td>Степень II
выраженные изменения
HSIL</td><td>-плотный ацетобелый эпителий с четкими краями
-быстрое побеление
-ацетобелый плотный ободок вокруг открытых желез</td><td>-грубая мозаика
-грубая пунктация
-внутри участка поражения контуры более плотного ацетобелого участка
-признак бугристости (гребня)</td></tr>
<tr><td>Неспецифические признаки</td><td colspan="2">-лейкоплакия
-эрозия
-окрашивание раствором Люголя: йод- позитивное/-негативное</td></tr>
<tr><td>Подозрение на инвазию</td><td colspan="2">атипические сосуды</td></tr>
<tr><td colspan="2">Другие кольпоскопические картины</td><td colspan="2">врожденная ЗТ, кондиломы, эндометриоз, воспаление, полипы, кисты, стеноз</td></tr>
</table>

Жидкостная цитология с применением молекулярно-биологических методов ПЦР и ВПЧ-генотипирования проводилась до бимануального исследования. Перед взятием материала тщательно и атравматично очищали шейку от слизи с целью повышения информативности иммуноцитохимического окрашивания. После удаления слизи в эндоцервикс вводили конус щетки и слегка прижимали, далее производили три полных вращения по часовой стрелке и два - против. Отделяемое эндоцервикса с

помощью щетки Cervix Brush (Suyun, Китайская Народная Республика) целиком помещали в специальную стабилизирующую жидкость, что позволяло сохранить клетки в большом количестве и информативном качестве. В исследовании использовали виалы с консервирующим раствором SurePath (США), в которые помещалась щетка с биоматериалом на 30-45 сек. Исследование проводили на базе клинико-диагностической лаборатории Федерального бюджетного учреждения науки «Центрального научно-исследовательского института эпидемиологии Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Роспотребнадзора (ФБУН «ЦНИИ» Эпидемиологии Роспотребнадзора) г. Москвы.

В лабораторных условиях виалы проходили 3 этапа: встряхивание в шейкере, фильтрация клеток от элементов крови и слизи, центрифугирование, нанесение тонкого слоя клеток на предметные стекла. Полученные микропрепараты окрашивались автоматом АФОМК-13, ЭМКОСТЕЙНЕР («ЭМКО», РФ). Далее совместно с цитологом просматривали окрашенные микропрепараты под микроскопом.

Цитологическая оценка проводилась согласно общепринятой в 1988 г классификации Бетесда с выделением трех основных видов цитограмм: нормальная цитограмма, без изменений; «непонятные мазки», не позволяющие оценить характер изменений, но не являющиеся нормой ASC-US и предрак: LSIL – низкой и высокой степени – HSIL.

При цитологическом исследовании материалов оценивали инфильтрацию лейкоцитами, проводили ПЦР ДНК соскобов цервикального канала на ИППП (хламидии, уреаплазмы, микоплазмы, гарднереллы, ВПГ 2 типа) и ВПЧ-типирование.

Мазок подвергали иммуноцитохимическому исследованию с целью определения экспрессии мРНК p16, Ki-67, BCL-2, PGR. С целью секвенирования мРНК генов использовали RNeasy наборы для коммерческого

использования производства «QIAGEN», Федеративная Республика Германия (ФРГ). Согласно инструкции производителя, выполняли обработку полученного биоматериала с конечным объемом раствора 70 мкл, где средняя концентрация миРНК достигала 40 мкг/мл. Незамедлительно полученный раствор ставили для реакции обратной транскрипции при помощи набора реактивов “ДНК Технология”, РФ при 40°С в течение 20 мин. Далее материал проходил ПЦР в режиме реального времени. Уровень экспрессии миРНК в растворе фактически приравнивается к единице как минимальный. В прочих образцах уровень экспрессии показывает кратность превышения показателя данного образца.

Определение миРНК – miR-145, miR-34a

Из материала жидкостной цитологии удалось получить до 50 мкг тотальной РНК удовлетворительного качества и в достаточной для количественных измерений концентрации. Экспрессию miR анализировали с помощью ПЦР в режиме реального времени (таблица 2).

Для каждого образца содержание каждой маркерной молекулы измеряли в однократном повторении. Результаты, соответствующие Cq>40, считались отрицательными.

Таблица 2 - Последовательность нуклеотидов для ПЦР

миРНК	**Тип реагента (ПЦР)**	**Нуклеотидная последовательность**
miR-145	Основной	`50 -CGTGTCGCCTTGTAGCACGACCTTATTCGCACCCTCGACACGACAGGGATTC-30`
	Проба	5’- (R6G)-TTCGCACCC(T-BHQ1)CGACACGACAGGGATTC-p-30
miR-34a	Основной	`50 -AGGGAGAGGGTAACCAGAAGCACACAATCCCACCTCCTCTCCCTACAACCAG-30`
	Проба	5’- (R6G)-TC(C-LNA)CACCTCC(T-BHQ1)CTCCCTACAACCAG-p-30

Проточная цитометрия

Для точного измерения оптических свойств клеток с помощью проточного цитометра клетки должны проходить через равномерно яркий центр сфокусированных лазерных лучей. Оптика для сбора света фокусируется на точке пересечения клеток с лазерными лучами, чтобы улавливать флуоресценцию и рассеянный свет от клеток. Это чувствительная зона проточного цитометра для измерения параметров клеток. В сепараторах клеток с потоком в воздухе чувствительная зона расположена примерно на 0,3 мм ниже кончика сопла, в других цитометрах - внутри кюветы.

Для окрашивания образцов жидкостной цитологии использовали антитела CD4-PerCP Cy5.5 (клон OKT4, eBioscience, США), HLA-DR-APC (cloneG46-6 BD-Pharmingen, США) только для образцов цитощетки, α4β7-FITC (клон FIB504, Biolegend, США) и CCR5-PEcy7 (клон 2D7 / CCR5, BD). Клетки инкубировали с коктейлем антител при 4 ° C в течение 30 мин. в темноте, промывали промывочным буфером FACS (PBS с 1% бычьим сывороточным альбумином и 0,05% азидом натрия) и собирали на FACS Canto II (BD) после фиксации с 2% параформальдегидом в воде. В анализ были включены только образцы цервикальной цитощетки без видимых эритроцитов, удовлетворительного качества окрашивания и количества Т-лимфоцитов выше 150.

Ведение женщин с ПНБ и аномальными цитограммами при беременности осуществлялась в соответствии с Клиническими рекомендациями («Доброкачественные и предраковые заболевания шейки матки с позиции профилактики рака», 2017) с контролем излеченности. Оценка эффективности терапии осуществлялась с помощью лабораторных (цитологическое, молекулярно-биологическое) и инструментальных (кольпоскопия) данных через три, шесть месяцев и один год.

Гистологическое исследование биопсийного материала

По показаниям (аномальная цитограмма в сочетании с положительным ВПЧ тестированием) проводилась биопсия шейки матки с применением радиоволнового метода аппаратом «Фотек ЕА142М» («ООО ФОТЕК, Россия) в режиме «Смесь», избегая сдавливания или разминания. Полученные биоптаты толщиной не более 3-5 мм помещались в емкость с фиксирующим раствором - 10% нейтральным формалином в соотношении объема взятого материала и объема фиксатора 1:10. Далее полученный материал подвергался процессингу – обезвоживался, обезжиривался и пропитывался парафином, после чего изготавливались парафиновые блоки. На следующем этапе при помощи специального инструмента (микротома) изготавливались срезы толщиной 4-6 мм Окраска полученного материала проводилась стандартными методами – гематоксилином и эозином. Исследование полученного материала проводилось световым микроскопом.

Статистические методы анализа полученных данных

Весь полученный клинический материал был подвергнут статистическому анализу на основе принципов и методик программы «Statistica 10» ((StatSoft, США). Статистический анализ проводили с использованием непараметрических методов ввиду несоответствия данных нормальному распределению (критерий Шапиро-Уилка).

При обработке данных использовали статистические методы:

а) для количественных данных описательной статистики с расчетом интерквартильного размаха медианы (Me) (Q1; Q3), при значении Q1=25 процентиль; Q3=75 процентиль, 95% доверительного интервала, Me (95% CI);

Статистическую значимость различий рассчитывали с помощью критерия Манна-Уитни (U) для сравнения двух независимых выборок.

б) для качественных показателей указывали абсолютные значения и определяли показатели частоты (абс.); проверку значимости связи между

двумя качественными переменными проводили в таблицах сопряженности 2х2 с помощью критерия хи-квадрат (χ^2) с поправкой Йетса на непрерывность;

г) шансы возникновения изучаемого события в группах оценивали по отношению шансов (ОШ) с 95% доверительным интервалом (95% ДИ); ОШ Me (95% ДИ);

д) прогностическую значимость изучаемых переменных оценивали методом пошагового логистического регрессионного анализа, для анализа клинической информативности и выбора пороговых значений использовался ROC анализ (receiver operating characteristic). Расчет осуществляли по формуле:

$p = \frac{1}{1+e^{-z}}$, z = a0 + a1x1 + a2x2 + a3x3 + … + anxn,

где p – вероятность наступления исхода,

x1…xn – значения предикторов, измеренные в номинальной, порядковой или количественной шкале,

a1…an – коэффициенты регрессии.

Статистическую значимость модели определяли с помощью критерия χ2, вычисляли чувствительность, специфичность и диагностическую эффективность модели. Данные ROC-анализа представлены в виде площади под кривой AUC (Area under ROC curve).

Уровень статистической значимости (p) принимали равным при $p<0,05$.

ГЛАВА 3.
КЛИНИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ОБСЛЕДОВАННЫХ ЖЕНЩИН

С целью поиска медико-социальных и клинико-анамнестических факторов риска привычного выкидыша выполнен сравнительный анализ женщин с визуально неизмененной (при гинекологическом осмотре и кольпоскопически) шейкой матки – с ПНБ и здоровых беременных без неблагоприятных репродуктивных исходов.

Средний возраст обследованных женщин составил 31,4 (26,7;36,1) года в группе с ПНБ и 31,8 (26,0; 37,6) года – контрольной (p=0,67), возрастные выборки представлены на рисунке 2.

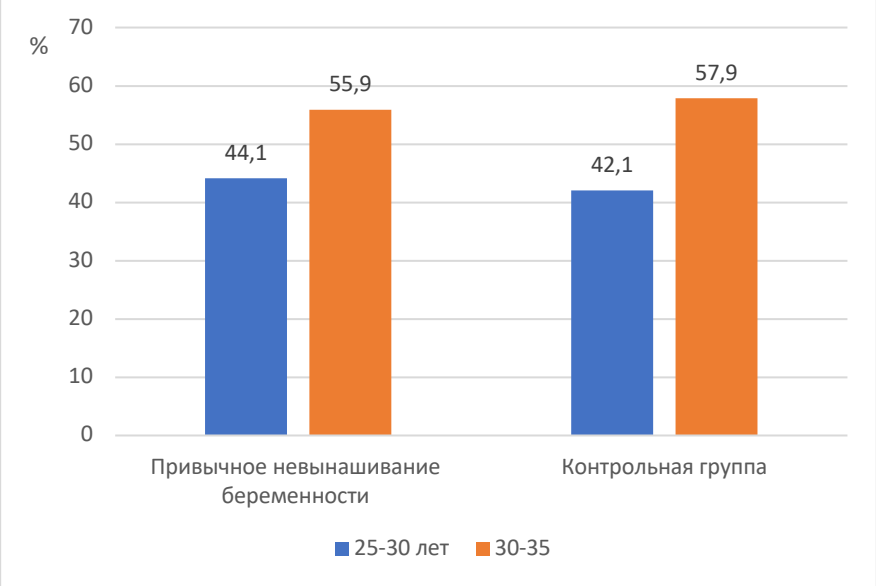


Рисунок 2. Возрастные категории женщин с ПНБ и контрольной группы

Следует отметить сопоставимое количество респонденток в группах с некоторым превалированием категории 30-летних (56,9% против 43,1% в среднем), однако без статистически значимых различий (p>0,05).

Анализ антропометрических данных не выявил статистически значимых различий в группах (таблица 3).

Таблица 3 – Антропометрические параметры обследованных женщин, Me (Q1; Q3), n (%)

Группы	Привычное невынашивание беременности (n=59)	Контроль (n=57)	p
Рост (см)	165,8(158,7;172,9)	165,6(159,1;172,1)	>0,05
Вес (кг)	69,8(57,9;81,7)	69,0(58,5;79,5)	>0,05
Индекс массы тела (кг/м^2):	25,3(21,5;29,1)	25,1(21,7;28,5)	>0,05
18,5-24,9	29(49,1)	31(54,4)	>0,05
25-29,9	25(42,3)	26(45,6)	>0,05
30-34,9	5(8,5)	0	>0,05

Сравнение массо-ростовых показателей женщин обеих групп с расчетом ИМТ (при вариабельности от 18,4 до 33,8) не выявило межгрупповых различий. В группе с ПНБ количество женщин с нормальной и избыточной массой тела не отличалось (45,7%), как и среди здоровых беременных (50,0%). Малая доля респонденток с ПНБ имели ожирение I степени (8,5%).

Данные о медико-социальном статусе женщин представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Социальные характеристики и вредные привычки обследованных женщин, n (%)

Группы	Привычное невынашивание беременности (n=59)	Контроль (n=57)	p
Образование высшее	46 (77,9)	47 (82,4)	>0,05
Образование среднее	13 (21,1)	10 (17,6)	>0,05
Вредные привычки (табакокурение)	17 (28,8)	12 (21,0)	>0,05
Длительность курения более 5 лет и более 5 сигарет в день	11(19,6)	4(7,0)	>0,05
В браке	54 (91,5)	55 (96,4)	>0,05
В гражданском браке	3 (5,1)	0	>0,05
Не замужем	2 (3,4)	2 (3,5)	>0,05

Анализ категорий образования, семейного статуса не выявил межгрупповых отличий, как и частота табакокурения.

Оценка наследственного риска показала сопоставимую предрасположенность респонденток с ПНБ к онкологическим заболеваниям женской репродуктивной системы и молочных желез (25,4% в среднем) (таблица 5).

Таблица 5 – Наследственная отягощенность обследованных женщин, n (%)

Наследственная отягощенность	Привычное невынашивание беременности (n=59)	Контроль (n=57)	p(χ2)
Онкологические заболевания женских половых органов и молочных желез	13(22,0)	9(15,8)	>0,05
Онкологические заболевания другой локализации	17(28,8)	10(17,5)	>0,05
Отсутствие наследственной отягощенности	29(49,1)	38(66,7)	>0,05

Показатели исследуемых параметров в выборке здоровых беременных статистически значимо не отличались (16,6% в среднем). В контрольной группе факт онкологической настороженности у ближайших родственниц при сборе анамнеза отмечали реже, чем с ПНБ, однако межгрупповых отличий не выявлено.

Средний возраст менархе в группах достоверно не отличался, как и длительность менструального цикла (с диапазоном 26–33 дня) (таблица 6).

Таблица 6 – Характеристики менструальной функции обследованных женщин, Me (Q1; Q3), n (%)

Группы	Привычное невынашивание беременности (n=59)	Контроль (n=57)	P
Возраст менархе (лет)	12,8(11,4;14,2)	12,6(11,2;14,0)	>0,05
Длительность менструального цикла (дней)	27,3(24,9;29,7)	27,3(25,1;29,5)	>0,05
Длительность менструальных выделений	5,8(4,7;6,9)	5,7(4,8;6,6)	>0,05
Умеренный объем менструальной кровопотери	5(86,4)	50(87,7)	>0,05
Скудные менструации	3(5,1)	2(3,5)	>0,05
Обильные менструации	5(8,5)	4(7,0)	>0,05
Возраст начала половой жизни	17,0(15,1;18,9)	17,1(15,3;18,9)	>0,05

Длительность и средний объем менструальной кровопотери (в среднем, 40-60 мл) у женщин обеих групп статистически значимо не отличались (в среднем, 4–5 дней). Обильные менструальные выделения выявлены у 7,7% женщин, скудные – малой доли женщин обеих групп. Умеренные менструальные выделения имели 87,0% респонденток. Возраст полового дебюта обследованных женщин не отличался, составив в среднем 17–18 лет.

При осмотре шейки матки в зеркалах всех женщин отсутствовали визуально измененные участки, что было критерием включения в данное исследование.

Контрацептивная активность респонденток с ПНБ и контрольной группы представлена в таблице 7.

Таблица 7 – Контрацептивный выбор обследованных женщин, n (%)

Группы	Привычное невынашивание беременности (n=59)	Контроль (n=57)	p (χ2)
Барьерный	6 (10,2)	23 (40,4)	<0,001 (14,1)
Прерванный половой акт	29 (49,2)	5 (8,8)	<0,001 (22,8)
Комбинированные оральные контрацептивы	12 (20,3)	14 (24,6)	>0,05
Внутриматочная контрацепция	4 (6,8)	5 (8,8)	>0,05
Гормональные пластыри	3 (5,1)	6 (10,5)	>0,05
Посткоитальный метод	3 (5,1)	3 (5,3)	>0,05
Спермициды	2 (3,4)	1 (1,8)	>0,05

В контрольной группе приоритетным методом предохранения от нежелательной беременности оказался барьерный – в четыре раза чаще, чем у респонденток с невынашиванием ($p<0,001$, $\chi2=14,1$). Практически половина женщин с ПНБ практиковали прерванный половой акт – в 5,6 раз чаще, чем здоровые ($p<0,001$, $\chi2=22,8$). Комбинированные оральные контрацептивы предпочитали 22,4% всех обследованных респонденток, внутриматочный девайс – 7,8% в среднем.

Длительность приема комбинированных оральных контрацептивов в группах варьировала от шести месяцев до нескольких лет, в среднем – 24,8±12,4 мес. Спермициды и посткоитальный метод использовала малая часть обследованных. Предпочтение гормональным пластырям чаще отдавали женщины контрольной группы, однако без статистически значимых отличий между группами.

Общее количество беременностей в группе с ПНБ составило 211, контрольной – 130, что отразилось на среднем показателе ($p<0,0001$) (таблица 8).

Таблица 8 – Особенности репродуктивного анамнеза, Me (Q1; Q3)

Группы	Привычное невынашивание беременности (n=59)	Контроль (n=57)	p
Беременности всего	3,6(2,3;4,9)	2,3(1,6;3,0)	<0,0001
Роды в срок	0,5(0,35;0,65)	2,3(1,6;3,0)	<0,0001
Преждевременные роды	0,6(0,43;0,77)	0	<0,0001
Репродуктивные неудачи	2,5(2,42;2,58)	0	<0,0001

Неблагоприятный анамнез женщин с ПНБ в сравнении с контролем определяли репродуктивные потери (самопроизвольные выкидыши, неразвивающиеся беременности) и преждевременные роды (p<0,0001). Этих респонденток отличал низкий показатель родов в срок (p<0,0001). Наличие рубца на матке после кесарева сечения при формировании групп с ПНБ входило в критерии исключения, поэтому вариант абдоминального родоразрешения целенаправленно не выделен.

Женщины с ПНБ составили несколько групп в соответствии с критериями Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ): первичным (два и более выкидыша без эпизода благополучного исхода беременности) – 55,9%; вторичным (две и более репродуктивные потери после живорождения) – 37,3% и третичным (случай успешного родоразрешения после ряда потерь и дальнейших выкидышей) – 6,8%. Все пациентки с привычным невынашиванием с целью пролонгации беременности получали терапию гестагенами: пероральные формы (дидрогестерон) – 59,3%, 40,7% – вагинальные. Различий в исходах беременности в зависимости от типа используемых гестагенов выявлено не было (p >0,05).

Анализ экстрагенитальной заболеваемости женщин с ПНБ показал высокую частоту перенесенных инфекционных болезней в детском и

подростковом возрасте и острых респираторных вирусных инфекций (ОРВИ) (более шести эпизодов в год) (50,9% против 28,1%, p=0,01, χ2=6,3) (таблица 9).

Таблица 9 – Соматическая заболеваемость обследованных женщин, n (%)

Группы	Привычное невынашивание беременности (n=59)	Контроль (n=57)	p(χ2)
Хронический тонзиллит	29 (49,2)	16 (28,1)	0,02 (5,4)
Частые острые респираторные вирусные заболевания (более 6 раз в год)	30 (50,9)	16 (28,1)	0,01 (6,3)
Болезни органов дыхания	26 (44,1)	10 (17,5)	0,003 (9,5)
Хроническая венозная недостаточность нижних конечностей	22 (37,3)	25 (43,9)	>0,05
Хронический холецистит	14 (23,7)	17 (29,8)	>0,05
Миопия	21 (35,6)	25 (43,9)	>0,05
Нарушения жирового обмена	24 (40,7)	17 (29,8)	>0,05
Хронический гастрит	31 (52,5)	27 (47,4)	>0,05
Хронический пиелонефрит	18 (30,5)	12 (21,1)	>0,05
Артериальная гипертензия	6(10,2)	3(5,3)	>0,05

Частота хронического тонзиллита в группе с ПНБ оказалась практически в полтора раза выше, чем в контрольной группе (p=0,02, χ2=5,4). Хронические бронхолегочные заболевания (бронхиальная астма, бронхит) выявлены у 44,1% респонденток с ПНБ, что в 1,8 раза чаще, чем у здоровых (p=0,003, χ2=9,5).

Хроническая венозная недостаточность нижних конечностей встречалась у 40,6% всех обследованных женщин, нарушения жирового обмена – практически у трети, миопия различной степени – 39,7%.

Среди болезней мочевыделительной системы чаще отмечали хронический пиелонефрит – у 30,5% женщин с ПНБ и 21,1% – в контроле, однако статистически значимых отличий выявлено не было. Практически половина обследованных женщин (49,9%) имели хронический гастрит, четверть – хронический холецистит (26,7%). Артериальная гипертензия выявлена у 7,7% всех респонденток выборки старше 30 лет.

Анализ гинекологической заболеваемости показал, что частота урогенитальных инфекций в группе с ПНБ оказалась практически в три раза выше, чем в анамнезе здоровых беременных (p=0,002, $\chi 2$=10,3) (таблица 10).

Таблица 10 – Перенесенные гинекологические заболевания, n (%)

Параметры	Привычное невынашивание беременности (n=59)	Контроль (n=57)	p($\chi 2$)
Урогенитальные инфекции (всего)	24(40,7)	8(14,0)	0,002(10,3)
Рецидивы бактериального вагиноза	46(77,9)	36(63,1)	>0,05
Цервицит	25(42,3)	18(31,5)	>0,05
Кандидозный вагинит	32(54,2)	9(15,8)	<0,001(18,7)
Рецидивы бактериальных вагинитов	40(67,8)	15(26,3)	<0,001(20,2)
Полип цервикального канала	3(5,1)	2(3,5)	>0,05
Полипэктомия (эндометрия)	4(6,8)	2(3,5)	>0,05
Хронический сальпингоофорит	7(11,9)	4(7,0)	>0,05
Фиброзно-кистозная болезнь	13(22,0%)	10(17,5)	>0,05

Рецидивы бактериального вагиноза до текущей беременности отмечали 70,5% всех обследованных респонденток. Практически две трети женщин с

ПНБ отмечали рецидивирующие неспецифические вагиниты, что в 2,6 раза выше, чем в контрольной группе ($p<0,001$, $\chi2=20,2$). Кандидозный вагинит указывали более половины респонденток с ПНБ и в 3,4 раза меньше – женщины с благоприятным репродуктивным анамнезом ($p<0,001$, $\chi2=18,7$). Частота цервицитов в группах составила 36,9%, хронического сальпингоофорита – 9,4%. Полипэктомия эндометрия производилась в 5,1%, в единичных случаях (4,3%) – удаление полипа цервикального канала. Фиброзно-кистозная мастопатия была диагностирована у 22,0% пациенток с невынашиванием и 17,5% – в контрольной группе ($p>0,05$).

Среди перенесенных урогенитальных инфекций, согласно проведенному анкетированию, в группе с ПНБ чаще всего отмечали хламидийную инфекцию и генитальный герпес (таблица 11).

Таблица 11 – Урогенитальные инфекции, n (%)

Группы	Привычное невынашивание беременности (n=59)	Контроль (n=57)	p($\chi2$)
Chlamydia trachomatis	8 (13,6)	2 (3,5)	>0,05
Candida albicans в сочетании с указанными инфекциями (миксты)	11 (18,6)	10 (17,5)	>0,05
Herpes virus simplex (ВПГ) II типа	12 (20,3)	3 (5,3)	0,02 (5,8)
Trichomonas vaginalis	4 (6,8)	3 (5,3)	>0,05

Межгрупповые отличия оказались статистически значимыми только в отношении ВПГ 2 типа, показатель которого оказался выше в четыре раза, чем в группе контроля ($p=0,02$, $\chi2=5,8$). Трихомонадную инфекцию перенесли 6,0% обследованных женщин. Рост грибков рода Candida в сочетании с одной из урогенитальных инфекций встречался в группах с равной частотой (18,0%).

Резюме

Выявлена сопоставимость групп по основным клинико-анамнестическим параметрам.

- Средний возраст обследованных женщин обеих групп значимо не отличался, варьируя в пределах 26–37 лет;
- сравнительный анализ клинико-анамнестических характеристик женщин обеих групп (с ПНБ и здоровых) показал преимущественную сопоставимость по основным анализируемым признакам;
- низкий индекс соматического здоровья женщин с ПНБ определяла большая частота хронических инфекционно-воспалительных заболеваний органов дыхательной системы (хронический тонзиллит, частые ОРВИ, бронхиты, пневмонии);
- вероятность инфицирования шейки матки определяла высокая частота рецидивирующих вагинитов, урогенитальных инфекций, особенно – генитального герпеса, низкой приверженности барьерной контрацепции.

ГЛАВА 4.
РЕЗУЛЬТАТЫ ЛАБОРАТОРНЫХ И ИНСТРУМЕНТАЛЬНЫХ МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследование pH вагинальной среды осуществлялось при помощи индикаторных “Кольпо-тест-pH” полосок в комплексе с гинекологическим осмотром (таблица 12).

Таблица 12. – Результаты pH-метрии отделяемого влагалища, Me (Q1; Q3)

Параметр	Привычное невынашивание беременности (n=59)	Контроль (n=57)	ОШ (95% ДИ)	p(χ2)
pH	5,1 (4,5; 5,7)	4,8(4,2; 5,4)	1,67(1,16;2,42)	0,005 (7,9)

Данные pH-метрии в группе с ПНБ указывают на статистически значимое повышение показателя более 5,0 в сравнении с контролем (p=0,005).

Сдвиг pH вагинального отделяемого подтверждает ощелачивание вагинальной среды и снижение пула лактобактерий. Достоверность метода доказывает чувствительность – 59,3%, специфичность – 66,7%, эффективность – 62,9%, площадь под ROC-кривой – 0,58.

Согласно критериям включения в исследование, все женщины имели нормальную кольпоскопическую картину (рисунок 3, 4).

Рисунок 3 – Нормальная кольпоскопическая картина, группа с ПНБ.

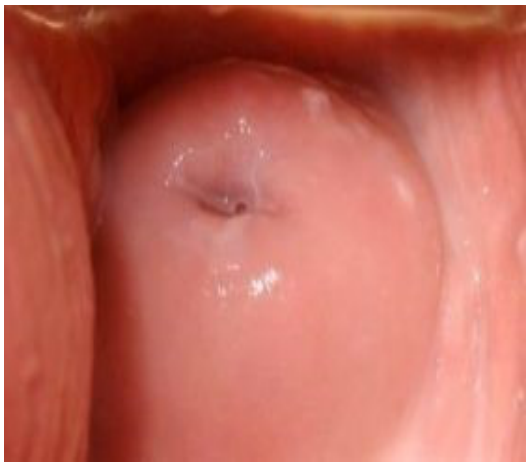


Рисунок 4 – Нормальная кольпоскопическая картина, контрольная группа.

Стоит отметить, что не у всех обследуемых женщин кольпоскопическая картина была удовлетворительной. Ниже приведены результаты кольпоскопии в обеих группах (таблица 13, 14).

Таблица 13 – Данные кольпоскопии пациенток в группе с ПНБ, n(%)

	ВПЧ-положительные (n=28)	ВПЧ-отрицательные (n=31)	Всего
Многослойный ПЭ	28 (100)	31 (100)	59 (100)
ЗТ 2 типа	23 (82,1)	27 (87,1)	50 (84,7)
ЗТ 3 типа	5 (17,9)	4 (12,1)	9 (15,3)

В группе с ПНБ у 15,3% женщин при кольпоскопии отмечалась зона трарнсформации 3 типа, а у 84,7%–2 типа.

Таблица 14 – Данные кольпоскопии пациенток в группе контроля, n(%)

	ВПЧ-положительные (n=9)	ВПЧ-отрицательные (n=48)	Всего
Многослойный ПЭ	9 (100)	48 (100)	57 (100)
ЗТ 2 типа	7 (77,7)	39 (81,3)	46 (80,7)
ЗТ 3 типа	2 (22,2)	9 (18,7)	11 (19,3)

По результатам кольпоскопического исследования у 19,3% пациенток результат был неудовлетворительным (ЗТ 3), а у 80,7% зоны трансформации оказались 2 типа. Стоит подчеркнуть, что у всех женщин, включенных в исследование, при кольпоскопии отмечалась нормальная эпителизация экзоцервикса.

Результаты микроскопического исследования позволили установить особенности биоценоза влагалища женщин с ПНБ: картина умеренного воспаления с количеством лейкоцитов более 10 в поле зрения встречалась вдвое чаще, чем у здоровых ($p<0,001$, ОШ 6,0 (2,59; 13,90), чувствительность исследования – 81,4%, специфичность – 57,9%, эффективность – 69,6%, Хи-квадрат – 19,0) (таблица 15).

Таблица 15 – Результаты патологических заключений бактериоскопического исследования соскобов из цервикального канала и влагалища обследованных женщин, n (%)

Параметры	Привычное невынашивание беременности (n=59)	Контроль (n=57)	p(χ2)
Лейкоциты более 10 в поле зрения	48 (81,4)	24 (42,1)	<0,001 (19,0)
Смешанная кокко-бациллярная флора	14 (23,7)	5 (8,8)	0,005(4,7)
Смешанная, преимущественно кокковая флора	11 (18,7)	5 (8,8)	>0,05
Дрожжеподобные грибы (споры и мицелий)	12(20,3)	5(8,8)	>0,05
«Ключевые клетки»	13(22,0)	11(19,3)	>0,05
Мобилункус/ Лептотрикс	5(8,5)	2(3,5)	>0,05

Сочетание умеренного количества лейкоцитов (15-25 в поле зрения), эпителиальных клеток и обильной дрожжеподобной флоры в группе с ПНБ выявляли чаще, чем в контроле. С одинаковой частотой при бактериоскопии обнаруживали «ключевые клетки» (20,6% в среднем) и ассоциированные с БВ микроорганизмы (мобилункус и лептотрикс) (6,0% в среднем). Нарушения микробиоценоза влагалища заключались в преобладании кокко-бациллярной флоры у четверти респонденток основной группы – практически в три раза в сравнении с контролем (p=0,005 (χ2=4,7), ОШ 3,24 (1,08; 9,7)). Образцы соскобов с преимущественно кокковой влагалищной флорой у женщин с ПНБ встречались в два раза чаще, чем здоровых беременных, однако без статистически значимых отличий.

Характеристики вагинальной микробиоты женщин с ПНБ и здоровых беременных представлены в таблице 16.

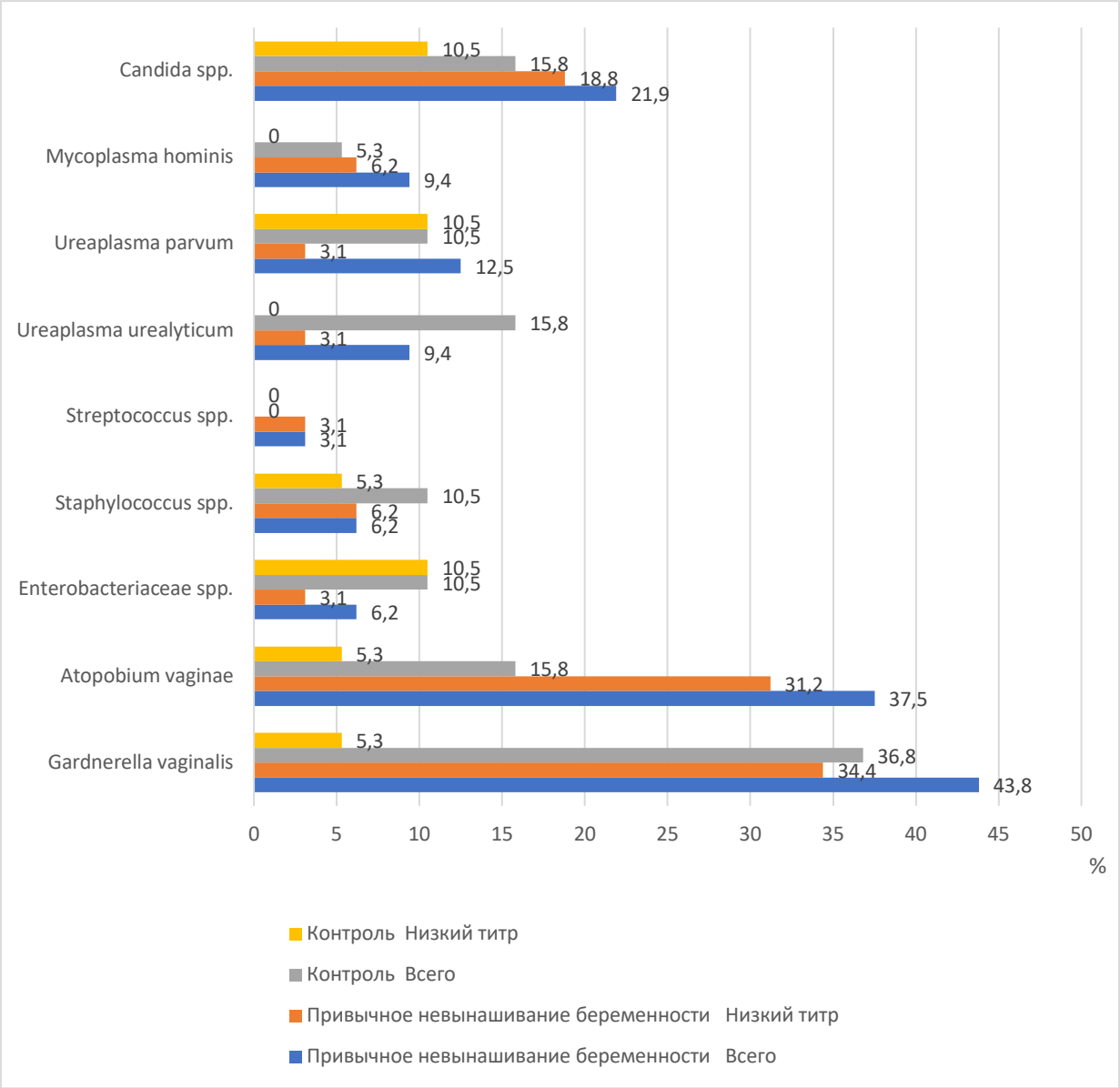
Таблица 16 – Особенности вагинальной флоры женщин обследованных групп, n (%)

Параметры	Привычное невынашивание беременности (n=59)	Контроль (n=57)	p(χ2)
Нормоценоз	11(18,6)	33(57,9)	<0,001(19,0)
Неспецифический вагинит	20(33,9)	7(12,3)	0,006(7,6)
Бактериальный вагиноз	16(27,1)	12(21,0)	>0,05
Кандидозный вагинит	12(20,3)	5(8,8)	>0,05

Картина вагинального нормоценоза у представительниц с благополучными исходами беременности встречалась чаще, чем с ПНБ в три раза (p=0,0001; χ2=19,0). Нарушения состава микробиоты вдвое чаще отмечали у женщин с ПНБ (81,4% против 42,1%, p=0,000; χ2=19,0).

Неспецифический вагинит выявляли у трети женщин с ПНБ, что практически в три раза чаще, чем в контрольной группе (p=0,006; χ2=7,6). Бактериальный вагиноз имели 24,0% всех женщин. Кандидозный вагинит выявлен у каждой пятой женщины с рецидивирующим выкидышем, практически вдвое реже – в контроле, однако межгрупповых отличий выявлено не было.

В группе с ПНБ в вагинальном отделяемом чаще выявляли Gardnerella vaginalis и Atopobium vaginae, преимущественно в высоком титре (от 10^6 до 10^8 ГЭ/мл) (рисунок 5).



Статистически значимых различий между группами не выявлено

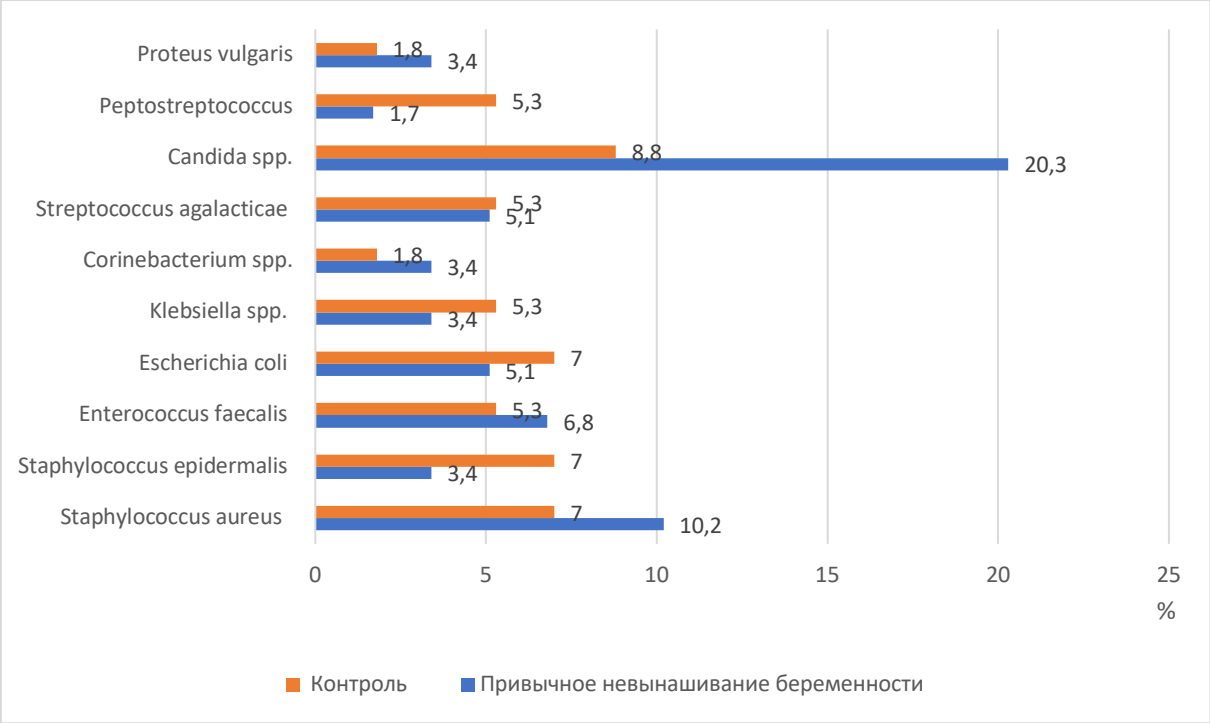
Рисунок 5 – Особенности вагинальной микробиоты женщин с ПНБ и здоровых беременных по результатам Фемофлор-16 (ПЦР в реальном времени)

У каждой пятой респондентки с ПНБ выявляли Candida spp., однако в низкой концентрации (от 10^4до 10^5 ГЭ/мл).

Вагинальный биотоп женщин контрольной группы отличался более низкой концентрацией бактерий, ассоциированных с БВ, чем с невынашиванием (32,3% против 5,3%). Представители Enterobacteriaceae spp. и Staphylococcus spp. в группах встречались одинаково часто в высоких титрах. Только у одной женщины с ПНБ был выделен Streptococcus spp. в 10^7. Среди условно-патогенных микроорганизмов в группе с ПНБ чаще фигурировали

Ureaplasma urealyticum и Mycoplasma hominis (по 9,4%). В контроле их выявляли только в низком титре. Ureaplasma parvum в контроле отмечали только в низкой концентрации, в основной группе – преобладали пробы с титром $10^{5\text{-}6}$ степени.

По результатам бактериологического посева отделяемого цервикального канала на флору и чувствительность к антибиотикам спектр микроорганизмов в группах не отличался (рисунок 6).

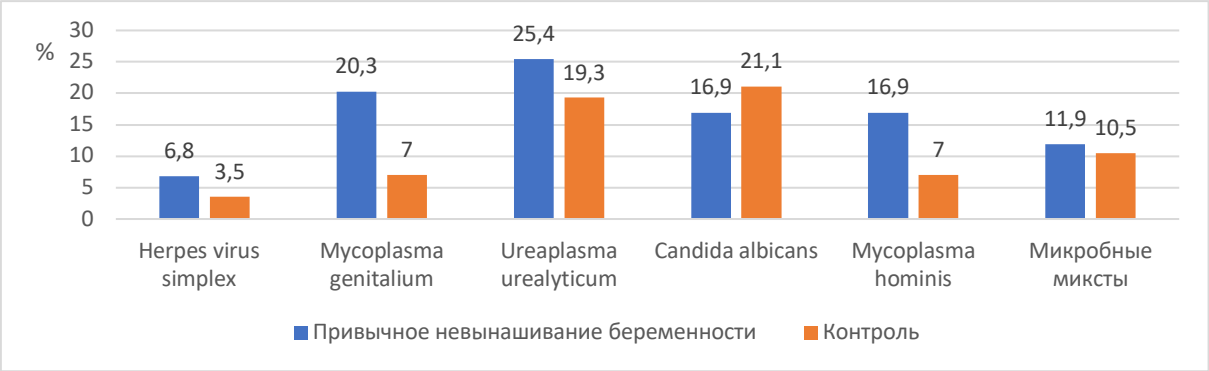


Статистически значимых различий между группами не выявлено

Рисунок 6 – Результаты культурального исследования отделяемого цервикального канала женщин исследуемых групп

В основной группе чаще всего выявляли Candida albikans (20,3% против 8,8%), однако статистически значимых различий с контролем выявлено не было.

Исследование отделяемого цервикального канала показало сопоставимую частоту условно-патогенных микроорганизмов в диагностически значимом титре (больше 10^4 степени) (рисунок 7).



Статистически значимых различий между группами не выявлено

Рисунок 7 – Результаты ПЦР-диагностики отделяемого цервикального канала женщин исследуемых групп

Среди возбудителей ИППП чаще всего в обеих группах выявляли Ureaplasma urealyticum (22,3% в среднем), Candida albicans (19,0%). В группе с ПНБ Mycoplasma genitalium отмечали практически втрое чаще, чем в контрольной, однако статистически значимых различий не выявлено.

Mycoplasma hominis в группе с повторными репродуктивными потерями отмечали вдвое чаще, чем у здоровых женщин (16,9% против 7,0%). Микробные миксты выявляли практически у 11,2% женщин, ВПГ 2 типа – 5,1%.

Данные об инфицированности цервикального канала обследованных женщин ВПЧ ВР, оцениваемых при жидкостной цитологии, представлены в таблице 17.

Таблица 17 – Результаты ПЦР-диагностики обследованных женщин на ВПЧ высокого онкогенного риска, n (%)

Тип ВПЧ	Привычное невынашивание беременности (n=59)	Контроль (n=57)	p(χ2)
16	11 (18,6)	3 (5,3)	0,03(4,8)
18	7 (11,9)	3 (5,3)	>0,05
16, 18	2 (3,4)	0 (0,0)	>0,05
16, 31	1 (1,7)	0 (0,0)	>0,05
31	4 (6,8)	2 (3,5)	>0,05
33	1 (1,7)	0 (0,0)	>0,05
35	1 (1,7)	0 (0,0)	>0,05
39	2 (3,4)	1 (1,8)	>0,05
Всего	28 (47,4)	9(15,8)	0,0001(13,4)

Удельный вес ВПЧ 16 типа в группе с ПНБ оказался выше, чем в контрольной (p=0,03; χ2=4,8). Респонденток основной группы также отличала тенденция преобладания ВПЧ других типов. Носительство ВПЧ 18 типа у женщин основной группы встречалось вдвое чаще, чем у здоровых беременных, однако различия не были статистически значимыми. Сочетание двух типов ВПЧ было единичным (5,1%).

Выявлено, что совокупная частота ВПЧ при ПНБ в три раза превышала показатель женщин с благоприятными исходами беременности в анамнезе (p=0,0001; χ2=13,4, ОР 2,39 (1,6;3,5), ОШ 6,8 (2,9; 15,6), специфичность исследования – 78,9%).

Показатель высокой вирусной нагрузки ВПЧ ВР (более 10^5 ДНК ВПЧ в 1 мл) выявлен у 17 женщин с ПНБ (60,7%) против двух (22,2%) в контроле (p>0,05). Нарушения вагинального биотопа, обусловленные преобладанием вагиноз-ассоциированных бактерий, были выявлены у 75,0% женщин (21 из 28) с ВПЧ ВР.

Варианты цитологических заключений состояния экзо- и эндоцервикса шейки матки в соответствии с классификацией по системе Бетесда (2001г) женщин с ПНБ и здоровых беременных представлены в таблице 18.

Таблица 18 – Результаты жидкостной цитологии соскобов с экзо- и эндоцервикса женщин обследованных групп, n (%)

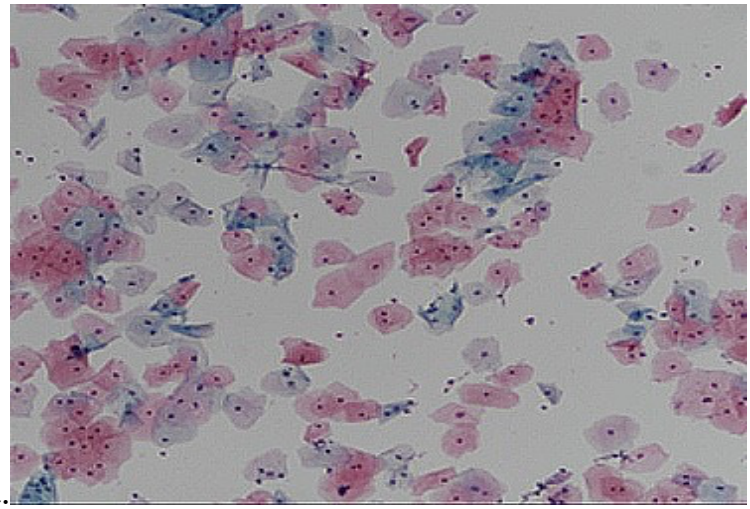
Заключение цитограммы (Бетесда)	Привычное невынашивание беременности (n=59)	Контроль (n=57)	p(χ2)
NILM	28(47,5)	46(80,7)	<0,001(13,9)
ASC-US	15(25,4)	6(10,5)	<0,001(13,9)
LSIL (CIN I)	16(27,1)	5(8,8)	0,009 (13,9)
Косвенные признаки ВПЧ (койлоцитоз)	30 (50,9)	12 (21,1)	0,0008 (11,1)

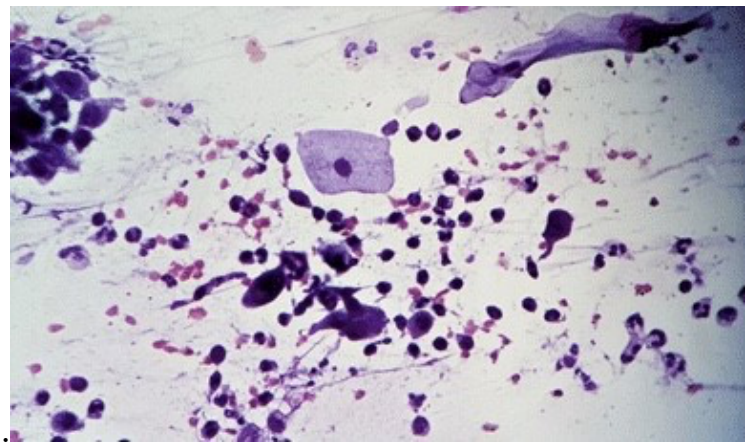
Частота выявления атипичных клеток плоского эпителия неясного значения (ASC-US) в цитограмме женщин с ПНБ оказалась в 2,5 раза выше, чем в контрольной (p<0,001, χ2=13,9, ОШ 2,9 (1,04; 8,12)). Соответствие мазков цитологической норме в 1,7 раза чаще встречалось в группе здоровых беременных (p<0,001, χ2=13,9, ОШ 0,22 (0,1; 0,51)).

Косвенные признаки ВПЧ (койлоцитоз) отмечены практически у половины женщин с ПНБ – в 2,5 раза чаще, чем в группе контроля (p=0,0008, χ2=11,1, ОР 1,8 (1,3; 2,6), ОШ 3,9 (1,7;8,8), специфичность – 78,9%).

Варианты LSIL, соответствующие плоскоклеточным интраэпителиальным поражениям низкой степени тяжести, выявлены практически у четверти респонденток с ПНБ, что втрое чаще, чем в контрольной группе (p<0,001, χ2=13,9, ОШ 3,82 (1,31; 11,42)). Совокупная встречаемость аномальных цитограмм (ASC-US, LSIL) в группе с ПНБ оказалась практически в три раза выше (52,5% против 19,3%, p<0,001, χ2=13,8).

Заключения цитограмм шейки матки женщин с привычным выкидышем представлены на рисунке 8.

a.


b.


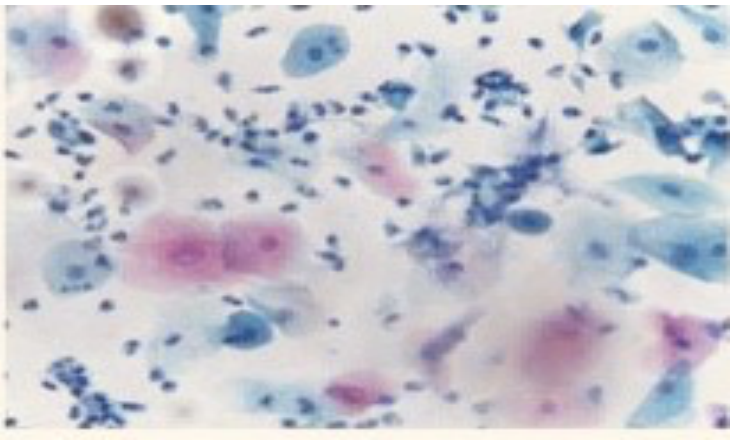
c.


Рисунок 8 – Результаты жидкостной цитологии:
A – Нормальная цитограмма (NILM), b – изменения неопределенного генеза (ASC-US), c – интраэпителильные изменения легкой степени (LSIL).

Результаты анализа иммунорегуляторного индекса иммунокомпетентных клеток эндоцервикса обследованных женщин приведены в таблице 19.

Таблица 19 – Особенности лимфоцитарного баланса в эндоцервиксе обследованных женщин, n (%)

Параметры	Привычное невынашивание беременности (n=59)	Контроль (n=57)	p(χ2)
Th17/Th1	33(55,9)	9(15,8)	0,0001(20,2)
CD4+ Treg	12(20,3)	40(70,2)	0,0008(29,1)

Методом проточной цитометрии в эндоцервикальном содержимом пациенток с рецидивирующим выкидышем выявлен выраженный дисбаланс соотношения Th17/Th1, указывающий на «агрессивный» иммунный ответ при воспалительных реакциях. Уровень провоспалительных лимфоцитов в эндоцервиксе женщин оказался практически втрое выше (p=0,0001), чем в контрольной группе (ОР 2,2 (1,58; 3,17), ОШ 6,8 (2,8; 16,3), специфичность – 84,2%). Показатель регуляторных Т-лимфоцитов у женщин с благополучными исходами беременности в анамнезе составил 70,2%, что статистически значимо выше, чем в группе с ПНБ (p=0,0008, χ2=29,1, ОШ 9,22 (3,94; 21,58)). Протекторные CD4+ в эндоцервиксе женщин основной группы встречались только в 20,3%.

Таким образом, более высокий показатель в эндоцервиксе Th17/Th1 лимфоцитов со снижением выработки защитных CD4+ Т-лимфоцитов в группе женщин с ПНБ может свидетельствовать об иммунорегуляторных нарушениях толерантности к полуаллогенному плоду (рисунок 9).

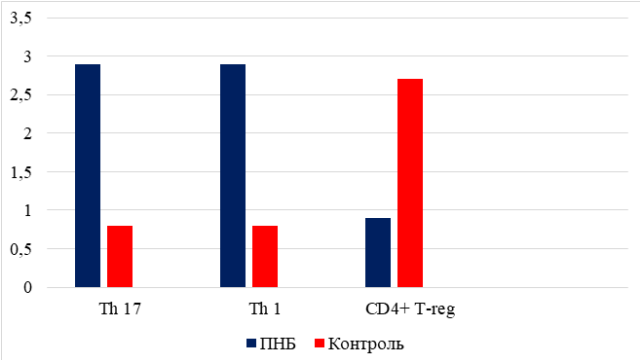


Рисунок 9 – Особенности иммунорегуляторного цервикального статуса женщин с ПНБ и контрольной группы

При сдвиге лимфоцитов в сторону Th17/Th1 и снижении толерантных к плоду CD4+ Treg существует вероятность прерывания беременности.

Результаты определения экспрессии мРНК

Образцы цервикального эпителия использовали для оценки экспрессии методом ПЦР в режиме реального времени мРНК генов-регуляторов клеточной пролиферации и митотического цикла (p16, Ki-67) и BCL-2, обладающего антиапоптотическим действием (таблица 20).

Таблица 20 – Частота гиперэкспрессии маркеров p16, Ki-67, BCL-2 в образцах эндоцервикса, n (%)

Маркеры	Привычное невынашивание беременности (n=59)	Контроль (n=57)	p(χ2)
p16	31 (52,2)	9 (15,8)	0,0001(17,3)
Ki-67	31 (52,2)	9 (15,8)	0,0001(17,3)
BCL-2	32 (54,2)	8 (14,0)	0,0001(20,7)

Согласно данным, представленным в Таблице, двойную гиперэкспрессию маркеров нарушения клеточной пролиферации p16/Ki-67 практически в три раза чаще отмечали в группе с ПНБ в сравнении с женщинами, имеющие благоприятные исходы беременности в анамнезе (p=0,0001, χ2=17,3, ОШ 5,9 (2,46; 14,17), ОШ 2,1 (1,50; 2,95) соответственно, специфичность метода для обоих показателей – 84,21%, чувствительность –

52,5%, эффективность – 68,4%). Обращает внимание факт избыточной экспрессии маркеров не только у 52,5% пациенток с невынашиванием при нормальной кольпоскопической картине, но и 15,8% здоровых женщин с благополучными репродуктивными исходами в анамнезе.

Экспрессия BCL-2 значимо преобладала в группе с ПНБ – у половины женщин, что практически в четыре раза выше, чем в контроле (p=0,0001, $\chi 2$=20,7, ОР 2,25 (1,60; 3,16), ОШ 7,26 (2,93; 17,96), специфичность исследования – 85,9%, эффективность – 70,1%, чувствительность – 54,2%).

Средняя экспрессия p16/Ki-67 в группе с невынашиванием составила 0,65, в контрольной – 0,045 (рисунок 10).

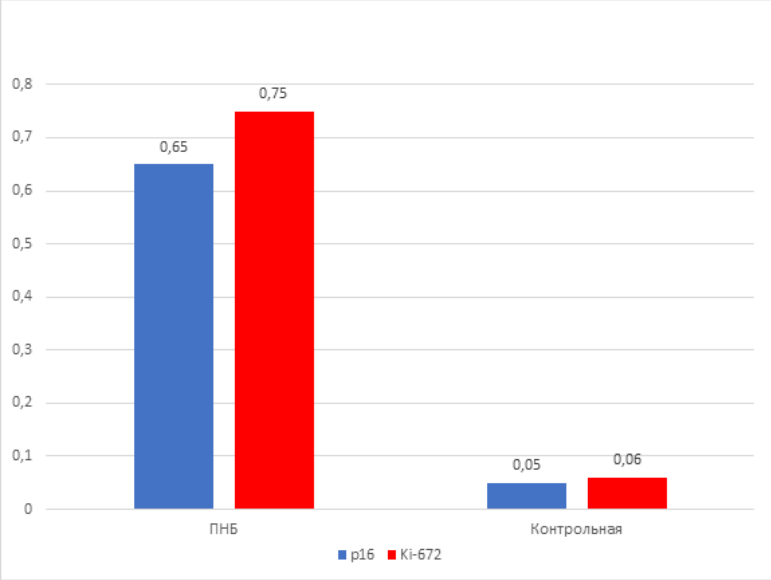


Рисунок 10 – Экспрессия маркеров p16/Ki-67

Окрашивание клеток при двойной гиперэкспресии маркеров p16/Ki-67 показано ниже (рисунок 11).

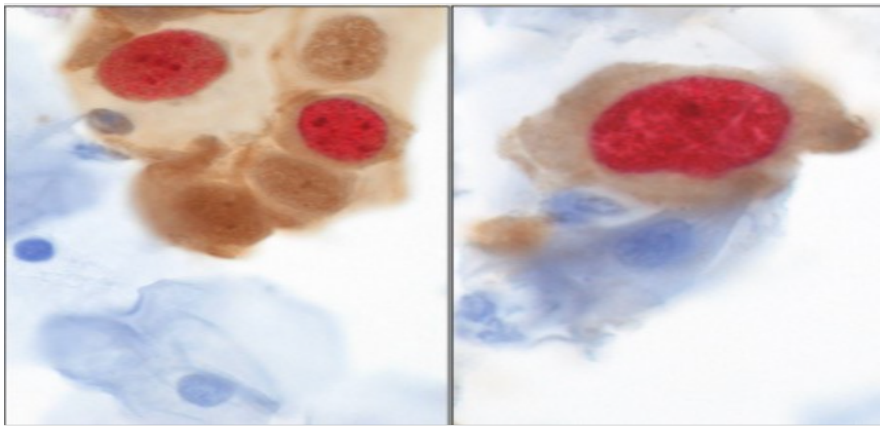


Рисунок 11 – Двойное окрашивание клеток при коэкспрессии p16/Ki-67
(Ув. 1000, иммуноцитохимическое исследование)

Характер гормонорецепции в клетках эндоцервикса оценивали на основании экспрессии мРНК гена, кодирующего PGR-A (таблица 21).

Таблица 21 – Частота сниженной экспрессии мРНК PGR-A, n (%)

Параметры	Привычное невынашивание беременности (n=59)	Контроль (n=57)	p(χ2)
PGR-A	30(50,8)	0	0,0001(37,3)

Нарушение рецепторной активности к PGR-A в клетках эндоцервикса наблюдали исключительно у женщин с ПНБ (50,8%), чувствительность метода составила 49,1%, специфичность – 100,0%, диагностическая эффективность – 74,6%.

Подобные заключения позволяют включить маркер в комплекс исследований у женщин с ПНБ неясного генеза. Снижение экспрессии мРНК рецепторов прогестерона PGR-A указывает на изменение клеточной структуры эндоцервикса под влиянием персистирующей ВПЧ-инфекции. Эту категорию пациенток с уменьшением воспроизводства рецепторов прогестерона и снижением рецепторной чувствительности отличала резистентность к препаратам прогестерона.

Результат исследования противоонкогенных миРНК

Методом ПЦР в режиме реального времени с обратной транскрипцией в эндоцервиксе обследованных женщин оценивали уровень экспрессии миРНК-145 и мРНК-34а (таблица 22).

Таблица 22 – Нарушение экспрессии миРНК, n (%)

Параметры	Привычное невынашивание беременности (n=59)	Контроль (n=57)	p(χ2)
miR-145	24 (41,4)	7 (12,5%)	0,0005 (11,9)
miR-34a	25 (49,4%)	6 (10,5)	0,0002 (15,0)

Выявлено достоверное снижение экспрессии миРНК-145 и -34а в эндоцервиксе пациенток с ASC-US и LSIL в группе с ПНБ, как и здоровых беременных, что является результатом нарушенной клеточной пролиферации.

Снижение экспрессии противоонкогенного миРНК-145 в эндоцервиксе женщин основной группы встречалось втрое чаще (p=0,0005, χ2=11,9, ОШ 4,94 (1,91; 12,76), ОР 1,89 (1,37; 2,60)). Нарушение экспрессии миРНК-34а также преобладало в группе с ПНБ – в четыре раза чаще, чем у здоровых беременных (p=0,0002, χ2=15,0, ОШ 5,83 (2,16; 15,73), ОР 1,97 (1,44; 2,68)).

Уровень экспрессии противоонкогенных маркеров у женщин с ПНБ и здоровых беременных представлен на рисунке 12.

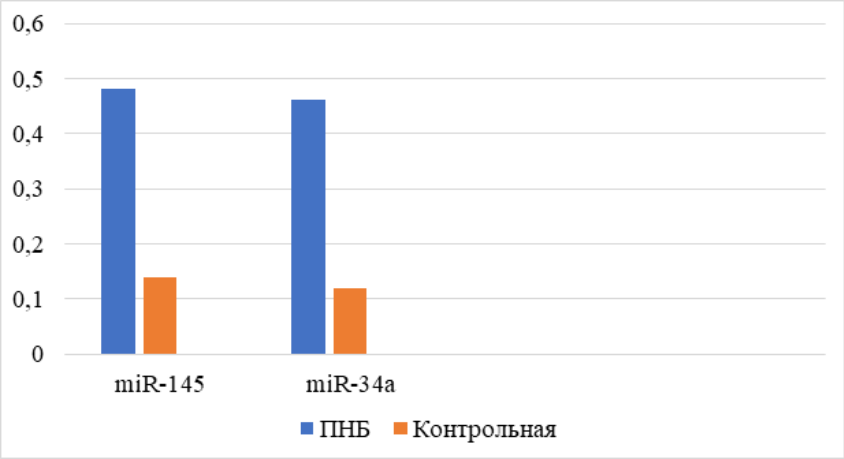


Рисунок 12 – Уровень экспрессии миРНК в эндоцервиксе обследованных женщин

Результаты морфологического исследования

Учитывая сохранившиеся в течение 6 месяцев после репродуктивных исходов аномальные результаты цитограмм, ВПЧ-персистенцию, а также особенности проведенной кольпоскопии (ЗТ 2 и 3 типов), была произведена биопсия радиоволновым методом 31 пациентке из группы с ПНБ и 8 в группе контроля. Биопсия шейки матки выполнялась при помощи радиохирургического метода («Фотек») с применением насадки типа петля в режиме «разрез и коагуляция». В результате проведенного гистологического исследования 31 пациентки с ПНБ у 16 с аналогичной цитограммой подтвердилась низкая степень интраэпителиального поражения – LSIL (CIN I) (таблица 23).

Таблица 23 - Результаты гистологического исследования в обеих группах, n:

Гистологическое заключение	ПНБ (n=31)	Контроль (n=8)
LSIL (CIN I)	22	5
Цервицит	9	3

Гистологическое исследование 15 биоптатов пациенток с ASC-US выявило умеренную дисплазию - LSIL в 6 случаях, в остальных 9 - NILM, воспалительные изменения. В группе контроля также у 5 пациенток подтвердилась дисплазия умеренной степени – LSIL, у троих – биоптат без атипии с признаками воспаления.

Резюме

Достоверными отличиями женщин с ПНБ от контрольной группы (здоровых беременных, имеющих благоприятный репродуктивный анамнез) оказались:

- повышенный уровень pH отделяемого влагалища (p=0,005);
- нарушения микробиоценоза (преобладание кокково-бациллярной флоры – в три раза чаще (23,7% против 8,8%, p=0,005) и лейкоцитоза – в два раза (81,4% против 42,1%, p<0,001);

- персистенция ВПЧ ВР – в три раза чаще (p=0,0001);
- аномальные заключения цитограмм шейки матки (ASC-US, LSIL) – практически в три раза чаще (52,5% против 19,3%, p<0,001);
- иммунорегуляторный дисбаланс в эндоцервиксе со сдвигом лимфоцитов в сторону провоспалительных Th17/Th1 – практически в три раза (55,9% против 15,8%, p=0,0001) и снижением толерантных к плоду CD4+ Treg – в 3,5 раза (20,3% против 70,2%, p=0,0008);
- нарушение процесса клеточной пролиферации – гиперэкспрессия в эндоцервиксе мРНК p16, Ki-67, BCL-2 (по 52,2%) – в три раза чаще (p=0,0001);
- снижение в эндоцервиксе экспрессии генов, кодирующих PGR-A (только в группе с привычным выкидышем (50,8%)), и противоонкогенных миРНК-145, -34a (в 41,4% и 49,4%, соответственно, в три и четыре раза соответственно).

ГЛАВА 5.
ПРОГНОЗИРОВАНИЕ ВЕРОЯТНОСТИ ПОВТОРНОГО ВЫКИДЫША И ВЫБОР ПЕРСОНИФИЦИРОННОЙ ТАКТИКИ ОЗДОРОВЛЕНИЯ

В таблице 24 представлены результаты сравнительного анализа встречаемости факторов, влияющих на состояние эндоцервикса обследованных женщин с аномальными цитограммами.

Таблица 24 – Клинико-анамнестические и лабораторные факторы риска прерывания беременности у женщин с ПНБ и цитологическим заключением ASC-US и LSIL, n (%)

Параметры	ASC-US (n=15)	LSIL (n=16)	Всего
Наследственная отягощенность по ракам органов репродуктивной системы	3(20,0)	10(62,5)	13(41,9)
Высокий инфекционный индекс	6(40,0)	11(68,7)	17(54,8)
Длительность табакокурения более 5 лет и более 5 сигарет в день	2(13,3)	9(56,2)	11(35,5)
Рецидивы бактериального вагиноза	15(100,0)	16(100,0)	31(100,0)
Миксты урогенитальной инфекции	8(53,3)	16(100)	24(77,4)
Отсутствие барьерной контрацепции	15(100,0)	16(100,0)	31(100,0)
ВПЧ	12(80,0)	16(100,0)	28(90,3)
Высокая вирусная нагрузка (больше 10^5)	3(20,0)	16(100,0)	19(61,3)
Снижение экспрессии miR-145	8(53,3)	16(100,0)	24(77,4)
Снижение экспрессии miR-34a	10(66,7)	15(93,7)	29(93,5)
Избыток Th17/Th1	14(93,3)	15(93,7)	29(93,5)
Гиперэкспрессия P16	15(100,0)	16(100,0)	31(100,0)
Гиперэкспрессия Ki-67	15(100,0)	16(100,0)	31(100,0)
Гиперэкспрессия BCL-2	15(100,0)	16(100,0)	31(100,0)
Снижение экспрессии PGR-A	14(93,3)	16(100,0)	30(96,8)

При сравнительном анализе влияния различных факторов на встречаемость цитологических заключений ASC-US и LSIL при ПНБ

установлена одинаково высокая частота отсутствия барьерной контрацепции (100,0%) и рецидивы БВ (100,0%).

Женщин с ПНБ отличала избыточная экспрессия в цервикальном эпителии маркеров пролиферации p16, Ki-67, маркера апоптоза BCL-2 (100,0%).

Среди анамнестических факторов обращает внимание некоторое преобладание у женщин с LSIL в сравнении с группой с ASC-US:

- наследственной отягощенности по злокачественным заболеваниям репродуктивной системы – практически в три раза; высокого инфекционного индекса – в полтора раза; длительности табакокурения более 5 лет и более 5 сигарет в сутки – в четыре раза, микстов урогенитальных инфекций в анамнезе (100,0% против 53,3%), однако статистически значимых межгрупповых различий в частоте указанных параметров выявлено не было.

Достоверных различий в частоте *лабораторных маркеров* поражения эндо- и экзоцервикса женщин *с плоскоклеточными поражениями низкой степени в сравнении с ASC-US* с выявлено не было.

Совокупность факторов, неблагоприятно влияющих на вынашивание беременности женщинами с аномальными заключениями цитограмм (ASC-US и LSIL), составила:

- наследственной предрасположенности к опухолевым образованиям органов репродуктивной системы и молочных желез – 41,9%;
- высокого инфекционного индекса (ОРВИ более 6 раз в год) – 54,8%;
- длительности табакокурения более 5 лет и более 5 сигарет в день – 35,5%;
- микстов урогенитальной инфекции – 77,4%.

Вероятность нарушения локального иммунного статуса с повреждающим влиянием на экзо- и эндоцервикс у женщин с ПНБ и аномальными заключениями цитограмм определяли факторы:

- рецидивы БВ (100,0%); отсутствие барьерной контрацепции (100,0%); инфицированность ВПЧ (90,3%); высокая вирусная нагрузка (больше 10^5) (61,3%);

- гиперэкспрессия маркеров клеточной пролиферации мРНК p16, Ki-67 (100,0%), антиапоптозного фактора BCL-2 (100,0%);
- повышение уровня Th17/Th1 (93,5%);
- снижение экспрессии противоонкогенных миРНК-145, -34a (77,4% и 93,5% соответственно); генов, кодирующих рецепторы PGR-A (96,8%).

Анализ факторов риска у женщин с аномальными заключениями цитограмм показал преобладание в группе с ПНБ следующих признаков в сравнении со здоровыми (таблица 25):

- микcты урогенитальной инфекции – практически в три раза (9,1(1,9–44,0)); инфицированность ВПЧ высокого онкогенного риска – в два раза (11,2(2,1–60,2)); высокая вирусная нагрузка ВПЧ (больше 10^5) – в 3,4 раза (7,1(1,3–38,8)); снижение экспрессии противоонкогенных миРНК miR-145 и miR-34a – практически в два и три раза соответственно, 9,1(1,9–44,0) и 11,1(2,2–54,9)); повышение уровня Th17/Th1 – в два раза (17,4(2,7–111,8)).

Таблица 25 – Клинико-анамнестические и лабораторные факторы риска прерывания беременности у женщин с ПНБ и здоровых женщин, имеющих аномальные заключения цитограммы (ASC-US и LSIL), n (%)

Параметры	Группа с привычным невынашиванием беременности ASC-US (n=15) +LSIL (n=16), всего (n=31)	Контрольная группа ASC-US (n=6) +LSIL (n=5), всего (n=11)	ОШ (отношение шансов)
Наследственная отягощенность по ракам органов репродуктивной системы	13(41,9)	4(36,4)	
Высокий инфекционный индекс	17(54,8)	6(54,5)	
Длительность табакокурения более 5 лет и более 5 сигарет в день	11(35,5)	4(36,4)	
Рецидивы бактериального вагиноза	31(100,0)	11(100,0)	
Миксты урогенитальной инфекции	24(77,4)	3(27,3)	9,1(1,9-44,0)
Отсутствие барьерной контрацепции	31(100,0)	4(36,4)	
ВПЧ	28(90,3)	5(45,4)	11,2(2,1–60,2)
Высокая вирусная нагрузка (больше 10^5)	19(61,3)	2(18,2)	7,1(1,3–38,8)
miR-145	24(77,4)	3(27,3)	9,1(1,9–44,0)
miR-34a	29(93,5)	3(27,3)	11,1(2,2–54,9)
Th17/Th1	29(93,5)	5(45,4)	17,4(2, – 7111,8)
p16	31(100,0)	0	
Ki-67	31(100,0)	0	
BCL-2	31(100,0)	5(45,4)	
PGR-A	30(96,8)	0	

Методом логистической регрессии построена математическая модель прогноза повторного выкидыша на основании лабораторных параметров с определением β-стандартизированного коэффициента регрессии и его доверительной вероятности p.

На первоначальном этапе построения модели отсечены факторы, не имеющие прогностической ценности, втором – выбраны статистически значимые, частота которых у женщин с ПНБ оказалась выше, чем в контроле (молекулярно-биологические маркеры) (таблица 26).

Таблица 26 – Значения коэффициентов регрессии β и факторов риска ПНБ (В)

		B	Стд.Ошибка	Вальд	Значение	Exp(B)
Шаг 1[a]	mir145	2,856	1,357	4,426	0,035	17,387
	mir34a	4,112	1,217	11,418	0,001	61,058
	Th17Th1	3,287	1,188	7,651	0,006	26,761
	p16inkKi67	3,377	1,265	7,128	0,008	29,275
	Константа	-6,982	1,949	12,833	0,000	0,001

Расчет прогнозирования повторных репродуктивных потерь осуществлялся по формуле: $P = \frac{1}{1+e^{-z}}$, z = a0 + a1x1 + a2x2 + a3x3 + … + anxn,

где p – вероятность наступления исхода,

x1…xn – значения предикторов в номинальной, порядковой или количественной шкале,

a1…an – коэффициенты регрессии.

Базовые параметры прогностической модели: коэффициент регрессии B (–6,9); статистика Вальда χ^2 – 12,8; p <0,000; Exp B – 0,001, показатель Нэйджелкерка – 0,91.

Эффективность прогностической модели оценивали с помощью построения ROC-кривой (рисунок 13).

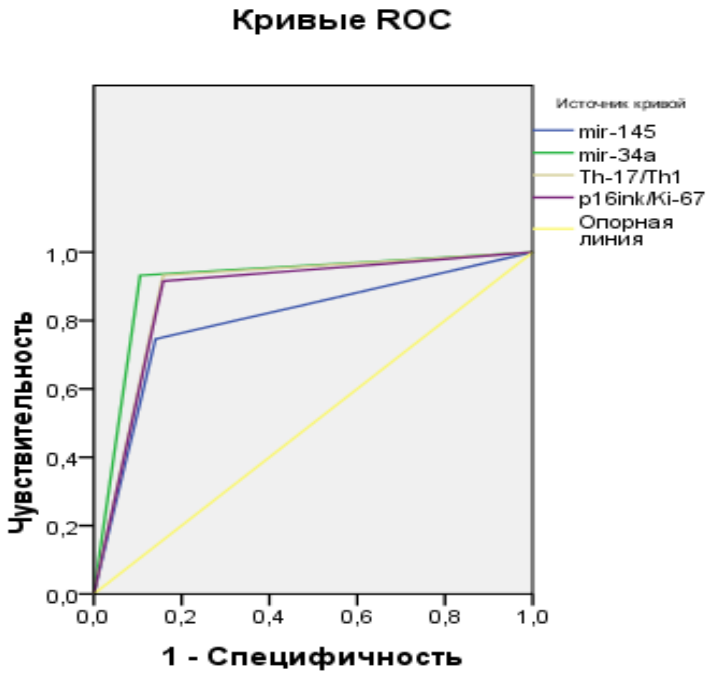


Рисунок 13 – ROC-кривая прогностической модели привычного невынашивания беременности

Диапазон площади под кривой для каждой переменной позволяет расценивать ее как статистически значимую (таблица 27).

Таблица 27 – Площадь под ROC-кривой

Тестовая переменная(ые)	Площадь
mir-145	0,803
mir-34a	0,913
Th-17/Th1	0,887
p16ink/Ki-67	0,879

Показатели AUC (площади под кривой) указывают на очень хорошее и отличное качество модели. Для переменной mir-145 чувствительность и специфичность составила 74,6% и 86,0% соответственно, mir-34a – 93,2% и 89,5% соответственно, Th-17/Th1 – 93,2% и 84,2% соответственно, p16ink/Ki-67–91,5% и 84,2% соответственно.

Значение cut-off – 0,5 показывает положительную прогностическую значимость модели при превышении данной величины (порогового значения).

Выявленные после комплексного обследования женщин с ПНБ (ВПЧ-типирование; расширенная кольпоскопия; жидкостная цитология; микробиологическое исследование, ИЦХ исследование экспрессии мРНК p16/Ki67, BCL-2, PGR-A, miR-145, miR-34a) молекулярно-биологические характеристики шейки матки позволяют осуществлять расчет риска повторных репродуктивных потерь и прогрессирования повреждений эндоцервикса (до HSIL).

Определение степени риска (высокая, низкая) подводит к персонифицированной тактике ведения женщин с ПНБ:

- **при высокой (cut off>0,5)** – планировали хирургическое лечение шейки матки (биопсию, эксцизию и/или конизацию радиоволновым методом аппаратом «Фотек ЕА142М» в режиме «Смесь», выскабливание цервикального канала). При высокой вирусной нагрузке (ДНК ВПЧ более 10^4), нарушении гормонорецепции (снижение продукции противоонкогенных миРНК) комплекс реабилитации женщин с ПНБ включал противовирусную (Инозин пранобекс), иммуномодулирующую, антиоксидантную терапию, двухэтапную коррекцию дисбиотических и воспалительных состояний нижних половых путей.
- У беременных женщин с высоким риском прогрессирования повреждений эндоцервикса, ассоциированных с ПВИ, на первом этапе проводили лечение воспалительных и дисбиотических состояний нижних отделов репродуктивной системы с восстановлением нормоценоза.

Мониторинг вагинального биотопа методом ПЦР-РВ после лечения показал достоверное уменьшение спектра и титра (10^4-10^5) выделяемых микроорганизмов (рисунок 14, 15).

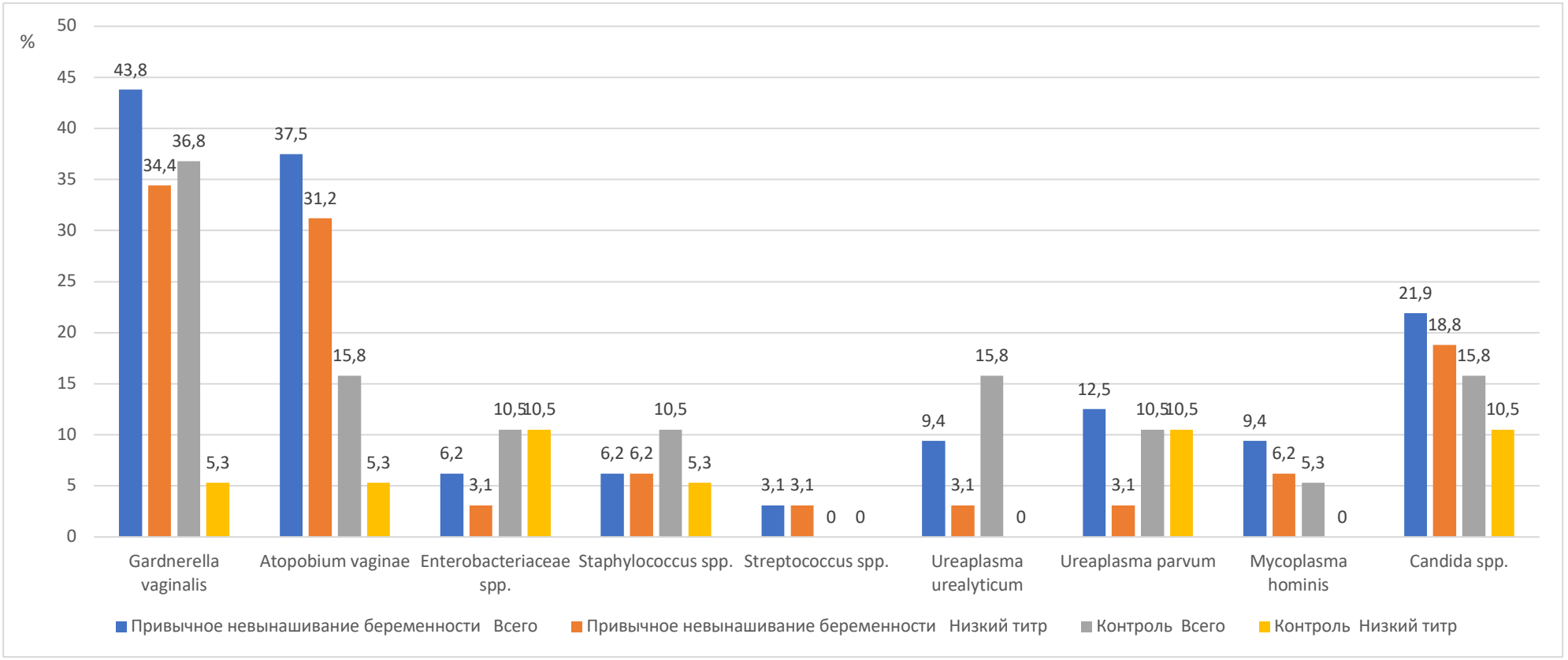


Рисунок 14 – Особенности вагинальной микробиоты женщин с ПНБ и здоровых беременных по результатам Фемофлор-16 (ПЦР в реальном времени) до лечения

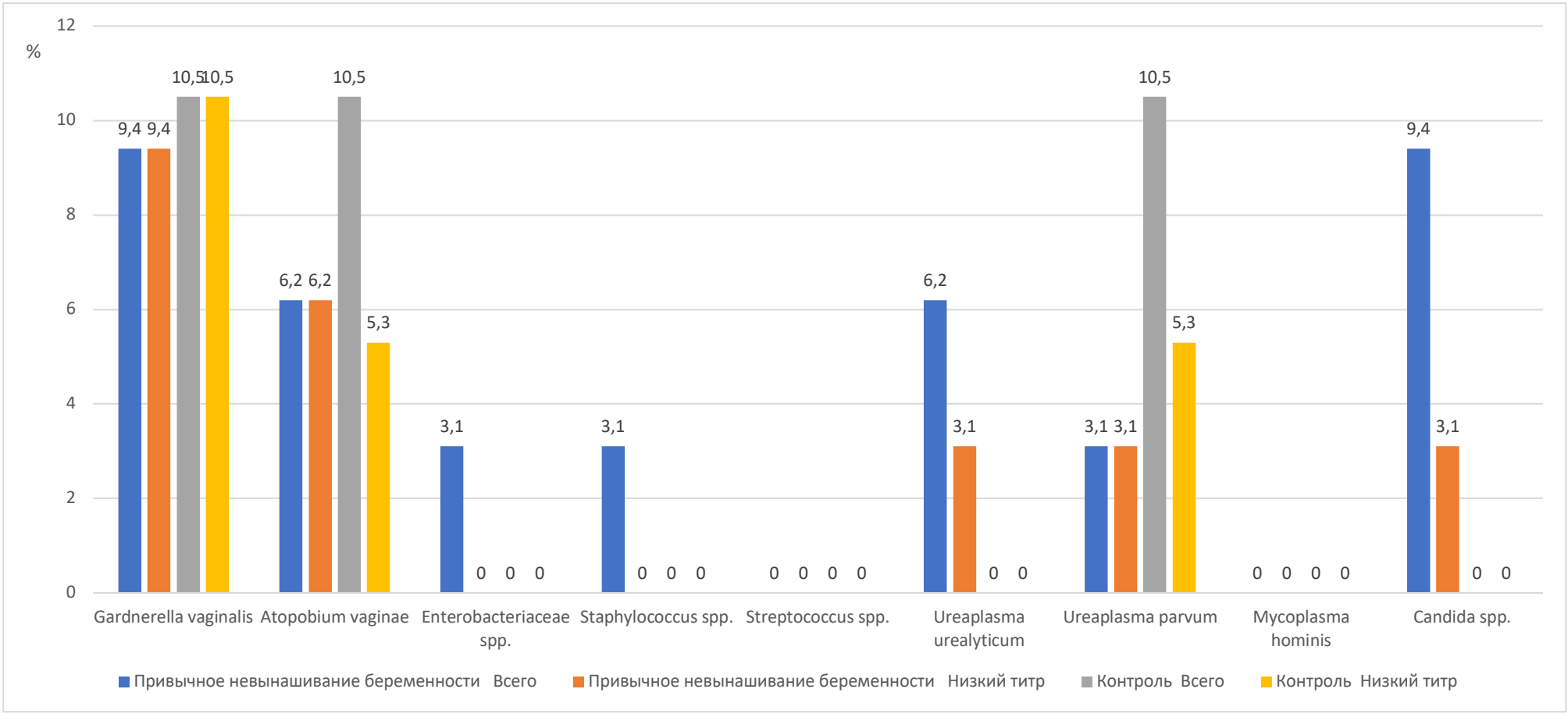


Рисунок 15 – Особенности вагинальной микробиоты женщин с ПНБ и здоровых беременных по результатам Фемофлор-16 (ПЦР в реальном времени) после лечения

Эффективность противомикробной терапии подтверждала элиминация отдельных микроорганизмов (Streptococcus spp. и Mycoplasma hominis), представленных в низких титрах (Staphylococcus spp., Enterobacteriaceae spp.).

Содержание Candida spp. в высокой концентрации снизилось вдвое, в низкой – в пять раз. Элиминация Ureaplasma urealyticum состоялась в контроле, в основной группе прослеживалась сохранность инфекта в низкой концентрации. Динамика снижения микроорганизмов, выделенных в высоком диагностическом титре (больше 10^4), оказалась незначительна.

Выявлена низкая эффективность лечения Gardnerella vaginalis в сравнении с другими условно-патогенными штаммами, однако ее встречаемость в группах варьировала в пределах 9,4–10,5%, независимо от диагностических титров. Уровень Atopobium vaginae в группе с ПНБ сократился в 5–6 раз до 6,2%, в контроле – достоверно не изменился, несмотря на некоторое снижение при высокой концентрации (с 15,8% до 10,5%).

Содержание Ureaplasma parvum, выделенной в основной группе в высоком диагностическом титре снизилось в четыре раза (с 12,5% до 3,1%), в контрольной – только при низком (с 10,5% до 5,3%).

Согласно мониторингу образцов бактериологического исследования вагинальной микробиоты после лечения, сокращение условно-патогенной флоры вплоть до элиминации чаще наблюдалось в контрольной группе (рисунок 16).

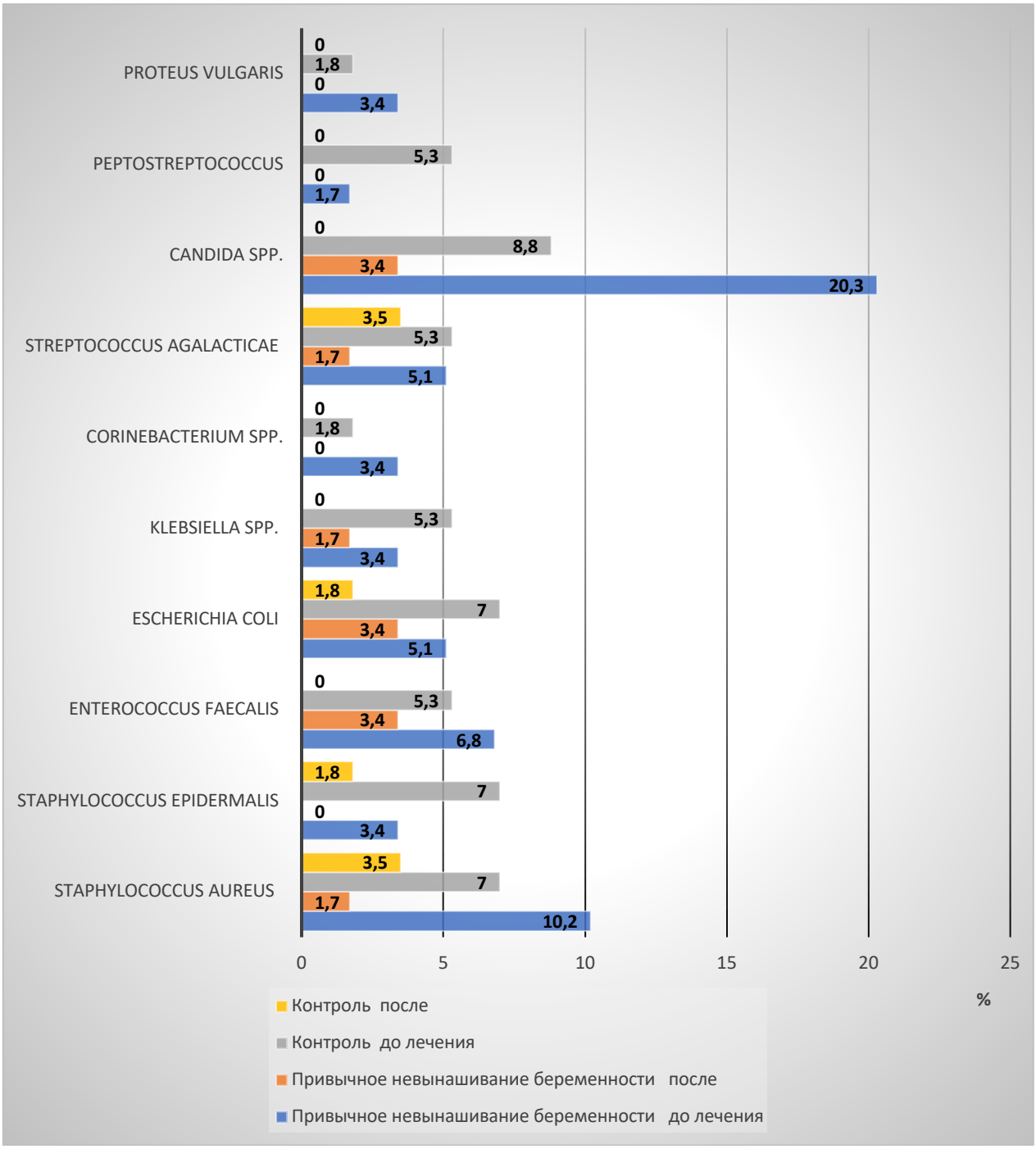


Рисунок 16 – Данные культурального исследования отделяемого влагалища в динамике до и после лечения

Случаев микробного роста после лечения выявлено не было. Эффективность терапии в группах была сопоставима; образцы с Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Streptococcus agalacticae встречались с одинаковой частотой.

После снижения обсемененности вагинального биотопа условно-патогенной флорой с целью повышения концентрации лактобактерий рекомендовали топические пробиотики (в том числе, эстрогенсодержащие).

В результате элиминационной и противовоспалительной терапии восстановление вагинального нормоценоза было достигнуто в 35,1% при исходном нарушении микробиоты у 42,1% здоровых беременных. Остальных женщин отличала картина субнормоценоза и потребность в более длительной терапии пробиотиками – системно и локально.

По результатам кольпоскопического и цитологического мониторинга, проведенного после двухэтапной коррекции нарушений цервико-вагинальной микробиоты, регресс цитологических изменений и элиминация ВПЧ произошли у троих женщин в группе контроля с ASC-US (5,3%). У остальных 8 женщин с аномальными цитограммами (всех с LSIL и троих – с ASC-US) в течение беременности по результатам мониторинга (раз в три месяца) признаков прогрессии заболеваний шейки не наблюдалось.

После деторождения и комплексной противовирусной и иммуномодулирующей терапии биопсию шейки матки выполнили у 8 женщин (14,0%) ввиду сохранности маркеров пролиферативных изменений эндоцервикса, по результатам гистологического исследования биоптатов – петлевую эксцизию.

В группе с ПНБ двухэтапная коррекция нарушений цервико-вагинальной микробиоты с достижением нормоценоза оказалась эффективна в 67,8% из 81,4%; рецидивы, потребовавшие дополнительной терапии, имели место в 13,6%. Биопсия и радиоволновое лечение патологии шейки матки выполнены у 31 женщины с ПНБ, гистологическое подтверждение LSIL (CIN I) при аналогичной цитологической картине у 16 (27,1%)) и 10,2% женщин с ASC-US из 25,4%.

На втором этапе обследования выполнен анализ репродуктивных исходов – в группе с текущей беременностью и у планирующих с ПНБ. В группе

беременных исходы были благополучными в 100,0% и завершились рождением здоровых детей.

Диагностика и лечение заболеваний шейки матки на прегравидарном этапе позволили улучшить исходы последующих беременностей (таблица 28).

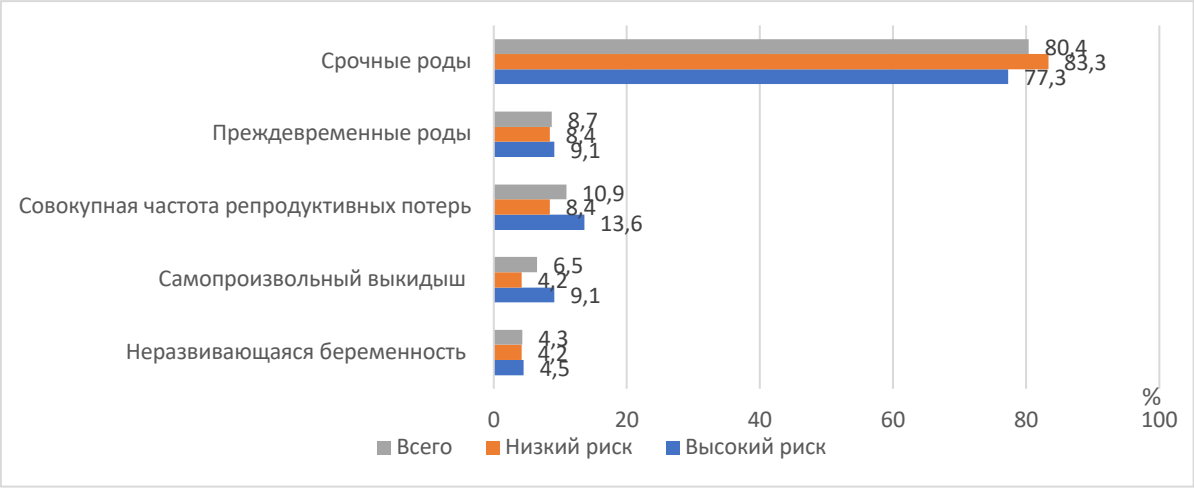
Таблица 28 – Репродуктивные исходы в группах различного риска привычного выкидыша, n (%)

Параметры	Высокий риск (n=31)	Низкий риск (n=28)	Всего (n=59)	p(χ2)
Беременность наступила	22 (70,9)	24(85,7)	46(77,9)	p>0,05
Срочные роды	17(54,8)	20(71,4)	37(62,7)	p>0,05
Преждевременные роды	2(6,4)	2(7,1)	4(6,8)	p>0,05
Совокупная частота репродуктивных потерь	3(9,7)	2(7,1)	5(8,5)	p>0,05
Неразвивающаяся беременность	1(3,2)	1(3,6)	2(3,4)	p>0,05
Самопроизвольный выкидыш	2(6,5)	1(3,6)	3(5,1)	p>0,05

Эффективность тактики ведения (реабилитации) женщин с различной степенью риска повторных репродуктивных потерь, рассчитанной по прогностической модели (высокая, низкая), подтверждает сопоставимо высокий показатель наступления беременности (70,9% и 85,7% соответственно).

Срочные роды произошли у 62,7% женщин, преждевременные – 6,8%. Показатель повторных репродуктивных потерь (НБ и выкидыша) составил 8,5%, без статистически значимых межгрупповых различий.

При анализе исходов на показатель наступившей после лечебного курса беременности, случаи репродуктивных потерь (НБ и СВ) были единичны (рисунок 17).



Статистически значимых различий между группами не выявлено

Рисунок 17 – Структура репродуктивных исходов в группах с различным риском ПНБ (низким, высоким)

Анализ структуры исходов беременности, наступившей у женщин с различным риском репродуктивных потерь после персонифицированного курса реабилитации, не выявил статистически значимых различий по группам. Показатель повторных выкидышей – у трех женщин в группе с высоким риском повторного выкидыша (13,6%) и двух – с низким (8,4%) указывает на необходимость расширенного обследования контингента.

Резюме

Разработка математической модели персонифицированного риска повторного выкидыша и прогрессирования заболеваний шейки матки позволяет определить тактику ведения женщин с ПНБ.

ГЛАВА 6.
ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Нерешенные проблемы ПНБ подтверждают необходимость поиска причин и механизмов развития данной нозологии с целью повышения вероятности прогнозирования и разработки лечебно-диагностических подходов. Противоречивость и фрагментарность фактов о причинах и механизмах развития привычного выкидыша неясного генеза затрудняет выбор патогенетически обоснованного лечения.

Роль количественного и качественного состава цервико-вагинальной микробиоты в обеспечении физиологического течения гестационного процесса полностью не выяснена. Сведения об особенностях микробного пейзажа после опорожнения матки при потерях беременности противоречивы, кроме случаев, завершившихся острым воспалительным процессом [20]. Доказана вероятность инвазии других микроорганизмов при инфекционной среде нижних отделов репродуктивной системы, как и активной репликации ВПЧ в условиях гестационной иммуносупрессии.

Дефицит данных об условиях реализации неблагоприятных для прогрессирования беременности патогенных свойств микроорганизмов объясняет интерес к оценке эндоцервикса при вагинальном дисбиозе, особенно при персистирующей вирусной инфекции (ВПЧ ВР) женщин с рецидивирующим выкидышем [26,49,95]. Малоизучена взаимосвязь характеристик вагинального биотопа и локального иммунного ответа.

Вероятность развития CIN при ВПЧ ВР, ко-инфекциях доказана [157], однако роль аномальных изменений цитограммы ASC-US или LSIL в генезе привычного выкидыша практически не изучена. Сообщается о прогнозировании CIN с помощью современных молекулярно-биологических маркеров для дифференциации подходов у женщин с ASC-US или LSIL (повторное цитологическое исследование или кольпоскопия), исключения гипердиагностики и необоснованного хирургического лечения [136].

Эффективность иммуноцитохимических маркеров (экспрессия мРНК и ми-РНК) и факторов локального иммунного статуса в прогнозировании привычного выкидыша, особенно при ВПЧ-ассоциированных цервикальных изменениях практически не исследована.

Доказана сопряженность персистирующей вирусной инфекции с нарушением сигнальных механизмов на фоне повреждения ДНК, пролиферацией клонов клеток с измененным генетическим материалом, склонных к неопластической трансформации [28]. Сообщается о связи плацентарной дисфункции и неблагоприятных исходов беременности с высокой скоростью апоптоза и сниженной способностью к инвазии цитотрофобласта [65,120], однако триггеры этих механизмов остаются предметом научных дискуссий.

Разрозненность и противоречивость данных о причинах рецидивирующего выкидыша, недостаточная эффективность традиционных лабораторных методов оценки шейки матки (тест по Папаниколау, кольпоскопия) объясняют интерес к иммуноцитохимической диагностике молекулярно-биологических маркеров.

Целью исследования являлось улучшение исхода лечения привычного невынашивания во время беременности и вне.

В задачи исследования входило изучение особенностей эндоцервикса у женщин с ПНБ и НБ; взаимосвязи его клеточного состава и микробиоценоза влагалища; изменений гормонорецепции в клетках эндоцервикса в генезе ПНБ; эффективность лечения доброкачественных заболеваний шейки матки, включая эндоцервикс.

Для клинического исследования из 1348 пациенток были отобраны 116 в возрасте от 18 до 37 лет: в основную группу (n=59) – с двумя и более выкидышами в анамнезе по критериям включения/исключения, контрольную (n=59) – с физиологической гестацией и благополучными репродуктивными исходами в анамнезе.

Методология научного исследования включала жидкостную цитологию, кольпоскопию, ВПЧ-тестирование, иммуноцитохимическую оценку экспрессии молекулярных маркеров (мРНК онкопротеинов p16ink4-α с экзо- и эндоцервикса, Ki-67, антиапоптотического фактора BCL-2, прогестеронового рецептора PGR-A, противоонкогенных miR-145, miR-34a).

Средний возраст обследованных женщин варьировал от 26 до 37 лет, без значимых межгрупповых различий. Высокий показатель хронических инфекционно-воспалительных заболеваний органов дыхательной системы (хронический тонзиллит, частые ОРВИ, бронхиты, пневмонии) женщин с ПНБ представляет интерес с позиций опосредованного негативного влияния на микроэкологию влагалищного биотопа.

Качественный и количественный состав цервико-вагинальной микробиоты женщин с ПНБ определяли не только рецидивирующие вагиниты и перенесенные урогенитальные инфекции, особенно – генитальный герпес, но и контрацептивное поведение. Низкую приверженность барьерному методу полагают сопряженной с риском канцерогенного воздействия на цервикальный эпителий белков инфицированной семенной жидкости.

В выборке с аномальными цитограммами (ASC-US, LSIL) чаще, чем в нормальной цитограммой фигурировал ряд признаков: наследственная отягощенность по ракам органов репродуктивной системы, высокий инфекционный индекс (ОРВИ и бронхолегочные заболевания), интенсивное и длительное табакокурение (более пяти лет и пяти сигарет в день), отсутствие барьерной контрацепции. Совокупность этих анамнестических признаков формировала неблагоприятный преморбидный фон со снижением активности адаптационно-защитных механизмов [76,111,145].

Влияние наследственного фактора следует рассматривать с позиций «поломок» локальных иммунных механизмов, неспособности противодействия защитных факторов репродуктивной системы экзогенным канцерогенным влияния. Риск привычного выкидыша при длительной никотиновой

интоксикации полагают следствием повреждающего воздействия компонентов табачного дыма на эпителий шейки матки. Таким образом, поиск факторов риска ПНБ более информативен при градации женщин по результатам жидкостной цитологии.

Нарушения микроэкологии влагалища женщин с ПНБ подтверждались возрастанием pH секрета (слабощелочные и щелочные реакции), частотой неспецифического вагинита (лейкоцитоз более 10 в поле зрения (81,4%), кокко-бациллярная флора (23,7%)). Снижение *Lactobacillus* spp., протективная роль которых в пролонгации беременности и подавлении колонизации вагиноз-ассоциированными бактериями доказана [94], определяло низкий показатель нормоценоза по данным ПЦР РВ – только у 18,6% женщин с ПНБ, что втрое реже, чем у здоровых. Преобладание G. vaginalis и A. vaginae полагают ключевым отличием биоценоза женщин с невынашиванием; отсутствие *Lactobacillus* spp. в первом триместре связывают с 2,4 кратным увеличением риска преждевременных родов [20,30]. Сопоставимый показатель кандидозного вагинита у женщин с ПНБ и здоровых беременных (20,3% против 8,8%, $p>0,05$) указывает на иммунодефицитный фон, формирующий условия для ко-инфекций влагалища и шейки матки. Частота урогенитальных инфекций в группах была сопоставима, воспалительный потенциал Ureaplasma urealyticum, Mycoplasma hominis и микробных микстов определяла персистенция ВПЧ ВР практически у половины женщин с ПНБ (47,4%). Наличие у 30,5% женщин с ПНБ 16 и 18 типов высокого онкогенного риска подтверждает ранее опубликованные данные о вирусном инфицировании практически трети беременных [3].

Микробиом женщин с вирусной инфекцией был дисбиотическим (100,0%), что несколько превосходит данные [2] о доминантности анаэробно-аэробной флоры в 44,1%. Разнообразие вагинальной микробиоты у ВПЧ-положительных женщин за счет преобладания Gardnerella vaginalis, Atopobium vaginae и Prevotella spp. [90], воспалительной реакции в мазках по Папаниколау

[27] подтверждают сообщения о БВ как кофакторе предраковых заболеваний шейки матки.

Аномальная цитологическая картина (ASC-US и LSIL) у женщин с ПНБ встречалась практически в три раза чаще, чем здоровых беременных (52,5% против 19,3%). Обусловленность предраковых изменений эндоцервикса (CIN2) персистенцией ВПЧ 16 типа согласуется с данными других исследований (33,3% против 1,8% при отрицательном результате тестирования) [47]. Нормальная кольпоскопическая картина, выбранная критерием включения в выборку с ПНБ, позволяет оспаривать мнение о развитии CIN исключительно на фоне послеродовой и послеабортной травмы, приводящей к снижению локального иммунитета.

Преобладание у ВПЧ-позитивных беременных с ПНБ дисбиотических нарушений и интраэпителиальных поражений шейки матки позволяет утверждать о континууме изменений: вагинального биотопа – цервикального эпителия – эмбрио-трофобластных взаимодействий.

Очевидно, разнообразие вагинальной микробиоты женщин с ПНБ (БВ и дефицит *Lactobacillus* spp.) определяет благоприятный для жизненного цикла вируса фон, наиболее диссоциативный при аномальных цитограммах. Наши данные подтверждают взаимосвязь цервико-вагинального микробиома и ВПЧ-инфекции, ВПЧ ВР и БВ [62], CIN и рака шейки матки [21,63].

Полученные нами результаты позволяют утверждать, что формирование патологического микробного сообщества сопряжено с дистрофическими изменениями шеечного эпителия, нарушением межклеточных контактов, воспалительной инфильтрацией стромы. Разнообразие видового спектра вагинальной микробиоты, бактериально-вирусная нагрузка эндоцервикса женщин с ПНБ указывают на поломку филогенетически сформированных защитных механизмов, снижающих риск инфицирования [15]. Нарушение колонизационной резистентности цервико-вагинального биотопа с

преобразованием иммунологической среды наиболее выражено при персистенции вирусной инфекции.

Изменение лимфоцитарного баланса с доминантой провоспалительных Th17/Th1 в эндоцервиксе женщин с НБ позволяет рассуждать о взаимосвязи иммунных клеток и специфической микробиоты, модулирующей локальные иммунные реакции. Полученные нами данные совпадают с мнением Wang S. et al. [141], сообщивших о вероятности благополучных репродуктивных исходов при коррекции соотношения Th17/Treg введением иммунодепрессанта циклоспорина-А.

Анализ цервико-вагинального состава женщин с ПНБ с позиций поиска условий реализации патогенных свойств микроорганизмов [49,95], неблагоприятных для пролонгации беременности, подтверждает вовлеченность местных иммунных механизмов. Подобные заключения представлены Xu L. et al., показавших рост соотношения Th1/Th2 одновременно со снижением палочковой флоры у 80,0% женщин с ПНБ [158]. Повышение провоспалительных и хемотаксических медиаторов с подавлением продукции муцинов цервикальной слизи при БВ [43,97] подтверждает решающую роль факторов локального иммунитета в определении тяжести заболеваний шейки матки и повреждения эндоцервикса. Выявленное по результатам проточной цитометрии снижение CD4+ Treg лимфоцитов женщин с НБ можно полагать одним из механизмов нарушения материнской иммунной толерантности к плоду.

Таким образом, инфицирование онкогенными типами ВПЧ практически половины беременных с ПНБ сопровождалось изменением клеточного состава эндоцервикса, дисбалансом иммунных ресурсов, подавлением реакций врожденного и приобретенного иммунитета. Вероятность рецидивирующих выкидышей определяет совокупность иммуновоспалительных реакций с изменением вагинальной микробиоты, особенно – персистенцией ВПЧ.

Аналогичные наблюдения сделаны в отношении частоты преждевременных родов и мертворождения [32,69].

Инфицирование ВПЧ половины женщин основной группы делает логичной оценку риска неопластической трансформации шейки матки, как и поиск механизмов повторного прерывания беременности. С этой целью в образцах цервикального эпителия выполнен анализ экспрессии регуляторов клеточной пролиферации мРНК (p16, Ki-67) и BCL-2, обладающего антиапоптотическим эффектом, противоонкогенных miR-145 и miR-34a.

Избыточная экспрессия молекулярно-биологических маркеров контроля митотического цикла (p16, Ki-67) и апоптоза BCL-2 выявлена у 52,5% женщин с ПНБ, имеющих цитограмму ASC-US/LSIL, средний показатель p16/Ki-67 которых оказался втрое выше, чем в контрольной группе (52,2% против 15,8%). Гиперэкспрессия маркеров пролиферации наряду с ВПЧ-типированием повышает качество диагностики истинных дисплазий – у всех женщин в группе с ПНБ и аномальными цитограммами (52,2%) и 15,8% из 19,3% здоровых беременных. Исследование Frega A. et al. подтверждает возможность выявления доли ложноотрицательных заключений при скрининге [37], с объективной оценкой степени поражения шейки матки. Так, в ходе исследования на коэкспрессиию p16/Ki-67 и ВПЧ-типирования возросло количество пациенток с дисплазией различной тяжести: 11 женщинам из 118 с заключением ASC-US диагноз был изменен на CIN II, 8 – на CIN III; в группе с LSIL у 42 пациенток выставлен CIN II, 17 – изменен на CIN III.

Вероятно, персистенция онкогенных типов ВПЧ сопряжена с развитием не только диспластических изменений эндоцервикса, но и срыва эмбриогенеза, повреждения синцитиотрофобласта. Роль онкогенных белков ВПЧ в развитии репродуктивных потерь подтверждена также датскими учеными [79]. Механизмы повторных выкидышей могут быть обусловлены продукцией онкобелков Е6 и Е7, подавлением апоптоза и усилением клеточной пролиферации, ростом анеуплоидий и аномалий хроматина.

Провоспалительные интерферон-индуцированные реакции после вирусной репликации в трофобласте женщин с прерыванием беременности подтверждают негативное влияние срыва локального иммунитета на вынашивание беременности. Следует отметить отсутствие повышения воспалительных интерлейкинов в материале абортусов после добровольного прерывания в отличие от спонтанного выкидыша у ВПЧ-инфицированных [11].

Выявленное нами снижение экспрессии мРНК гена PGR-A и противоонкогенных miR-145 и miR-34a указывает на изменение митотического цикла клеток эндоцервикса, дисбаланс процессов пролиферации и апоптоза у женщин с ПНБ. Способность миРНК к эпигенетической регуляции клеточной пролиферации делает их маркерами неопластической трансформации шеечного эпителия.

Изменение уровня миРНК у пациенток с ПНБ и аномальными заключениями цитограмм (CIN) подтверждает общность молекулярно-биологических механизмов заболеваний наряду с нарушениями иммунного ответа организма и состава цервико-вагинальной микробиоты. Данные наблюдения согласуются с выводами Okoye J.O. et al., показавших связь гиперэкспрессии miR-145 со степенью тяжести дисплазии [50].

Полагаем, что механизмом ПНБ неясного генеза является нарушение маточно-эмбриотрофобластного взаимодействия, вызванное избыточной пролиферацией клеток эндоцервикса и развитием прогестеронрезистентности. Вероятно, персистенция ВПЧ ВР запускает каскад молекулярно-клеточных «поломок», в том числе рецепторного аппарата эндоцервикса с нарушением передачи внутри- и межклеточных сигналов. Полученные данные позволяют рассматривать концепцию иммунорегуляторного повреждения экспрессии ключевых молекул, контролирующих инвазию трофобласта, ремоделирование спиральных артерий и нормальное развитие плацентарного ложа.

Возрастание при ПНБ пула рецептивно измененных клеток в присутствие активации условно-патогенных микроорганизмов подтверждают важную роль

вагинальной микробиоты для нормального течения беременности. Очевидно влияние микробных микстов как кофакторов изменения иммунологической среды при персистенции ВПЧ ВР, выступающего индуктором повреждений клеток эндоцервикса. Нарушение нормального иммунного ответа при повреждении эндоцервикса заключается в снижении не только Treg-ответов, но и способности к подавлению микробной и вирусной агрессии, препятствии реализации прогестероновых эффектов. Участие гормона в пролонгации беременности эндокринными и иммунологическими механизмами осуществляется через влияние на синтез цитокинов и функцию натуральных киллеров, поддержание толерантности иммунитета между матерью и плодом. Полученные нами данные позволяют утверждать о множественности молекулярно-биологических поломок при ПНБ неясного генеза, формирующих срыв эндокринно-иммунных взаимодействий. Выявленное у половины женщин с ПНБ снижение экспрессии мРНК гена PGR-A (50,8%) можно рассматривать как один из патогенетических механизмов неэффективной профилактики и лечения рецидивирующего выкидыша, угрозы прерывания беременности и преждевременных родов препаратами прогестерона. Аналогичные заключения приведены Devall A.J. et al. в Кохрейновском мета-анализе с участием более 5682 женщин с ПНБ о неэффективности как микронизированного прогестерона, так и орального дидрогестерона [60]. Авторы также отмечают неоднородность включенных в мета-анализ работ, что требует дальнейших тщательных исследований.

Поиск факторов, влияющих на вероятность привычного выкидыша, показал преобладание в выборках с аномальными цитограммами и ПНБ в сравнении со здоровыми микстов урогенитальной инфекции (практически в три раза); инфицированности ВПЧ ВР (в два раза), высокой вирусной нагрузки ВПЧ (больше 10^5)(в 3,4 раза); снижение уровня противоонкогенных miR-145 и miR-34a (практически в два и три раза соответственно); возрастание уровня Th17/Th1 (в два раза).

С одинаковой частотой (100,0%) в группах с ПНБ и аномальными цитограммами (LSIL или ASC-US) выявляли: рецидивы БВ, отсутствие барьерной контрацепции, молекулярно-биологические маркеры (p16, Ki-67, BCL-2, PGR-A). Полагаем, что НБ, как и прогрессирующее повреждение клеток эндоцервикса (LSIL) обусловлена иммунным дисбалансом, сопряженным с нарушением цервико-вагинальной микробиоты.

С помощью метода логистической регрессии нами разработана прогностическая модель привычного невынашивания. Инновационная методика обследования (иммуноцитохимический метод оценки экспрессии в эндоцервиксе мРНК и ми-РНК) позволила выявить группы риска повторных репродуктивных потерь и развития/прогрессирования CIN. Эффективность разработанной прогностической модели подтверждает значимость факторов как рисковых, наряду с высоким качеством AUC под ROC-кривой.

Таким образом, срыв локальных факторов иммунитета и повышение пролиферативного потенциала клеток эндоцервикса при изменении цитологии, преимущественно, инфицировании ВПЧ ВР (гиперэкспрессия p16/Ki-67, BCL-2, миРНК-34 и -145, мРНК гена, кодирующего PGR) представляются патогенетическими звеньями повторных потерь беременности. Повышение экспрессии маркеров клеточной пролиферации p16, Ki-67, регулятора апоптоза BCL-2 у 52,2% женщин с цитограммой ASC-US/LSIL подтверждают ассоциацию онкогенных генотипов ВПЧ с цервикальной неоплазией и вероятностью привычного выкидыша.

Выявление молекулярно-биологических характеристик эндоцервикса (клеточной рецепции, пролиферативной активности и локальных иммунокомпетентных клеток) обосновывает необходимость пересмотра протоколов ведения женщин с ПНБ и заболеваниями шейки матки в пользу комплексного обследования и лечения на прегравидарном этапе.

Расширенное обследование женщин с привычным выкидышем позволяет улучшить диагностику заболеваний шейки матки на основании верификации

истинной дисплазии от реактивных процессов, при комплексном подходе предотвратить LSIL и повторные репродуктивные потери.

Эффективность молекулярно-биологических маркеров повреждения эндоцервикса подтверждена морфологическими заключениями. После деторождения биопсию шейки матки выполнили у 8 (14,0%) женщин, в трех случаях из 11 с аномальными цитограммами и экспрессией иммуноцитохимических маркеров состоялась элиминация ВПЧ и регресс изменений. В группе женщин с ПНБ гистологическое подтверждение LSIL (CIN I) у 10,2% из 25,4% женщин с ASC-US подтверждает целесообразность оценки исследуемых иммуноцитохимических маркеров.

Категорию здоровых беременных с кольпоскопической нормой и гиперэкспрессией в эндоцервиксе маркеров пролиферации (15,8%) следует рассматривать как группу риска репродуктивных потерь и при соответствующей тактике – резерв их снижения. Вероятно, имеет место латентная стадия ПВИ, требующая цитологического и кольпоскопического мониторинга.

Выявление воспалительных и дисбиотических состояний нижних отделов половых путей требует этиотропной терапии и микробиологического мониторинга. Скрининг на генитальные инфекции, особенно у ВПЧ-позитивных пациенток позволит снизить кумулятивное микробное воздействие на активность иммунокомпетентных клеток. Полученные нами данные позволяют не согласиться с отрицанием улучшений исходов беременности при коррекции нарушений вагинальной флоры во второй половине беременности [22]. Эффективность коррекции нарушений цервико-вагинальной микробиоты и восстановления нормоценоза как стратегии снижения ложноположительных цитологических заключений представлены у беременных, с регрессом изменений эндоцервикса и элиминацией ВПЧ у 5,3%.

Прегравидарная диагностика и лечение диспластических изменений шейки матки женщин с ПНБ в соответствии с рассчитанным по

прогностической модели риском способствует благоприятным репродуктивным исходам (наступление беременности – 77,9%, срочные роды – 62,7%). Показатель повторных репродуктивных потерь оказался невысоким (8,5% в среднем), однако указывает на необходимость углубленного обследования женщин.

Схема алгоритма ведения женщин с ПНБ представлена на рисунке 18.

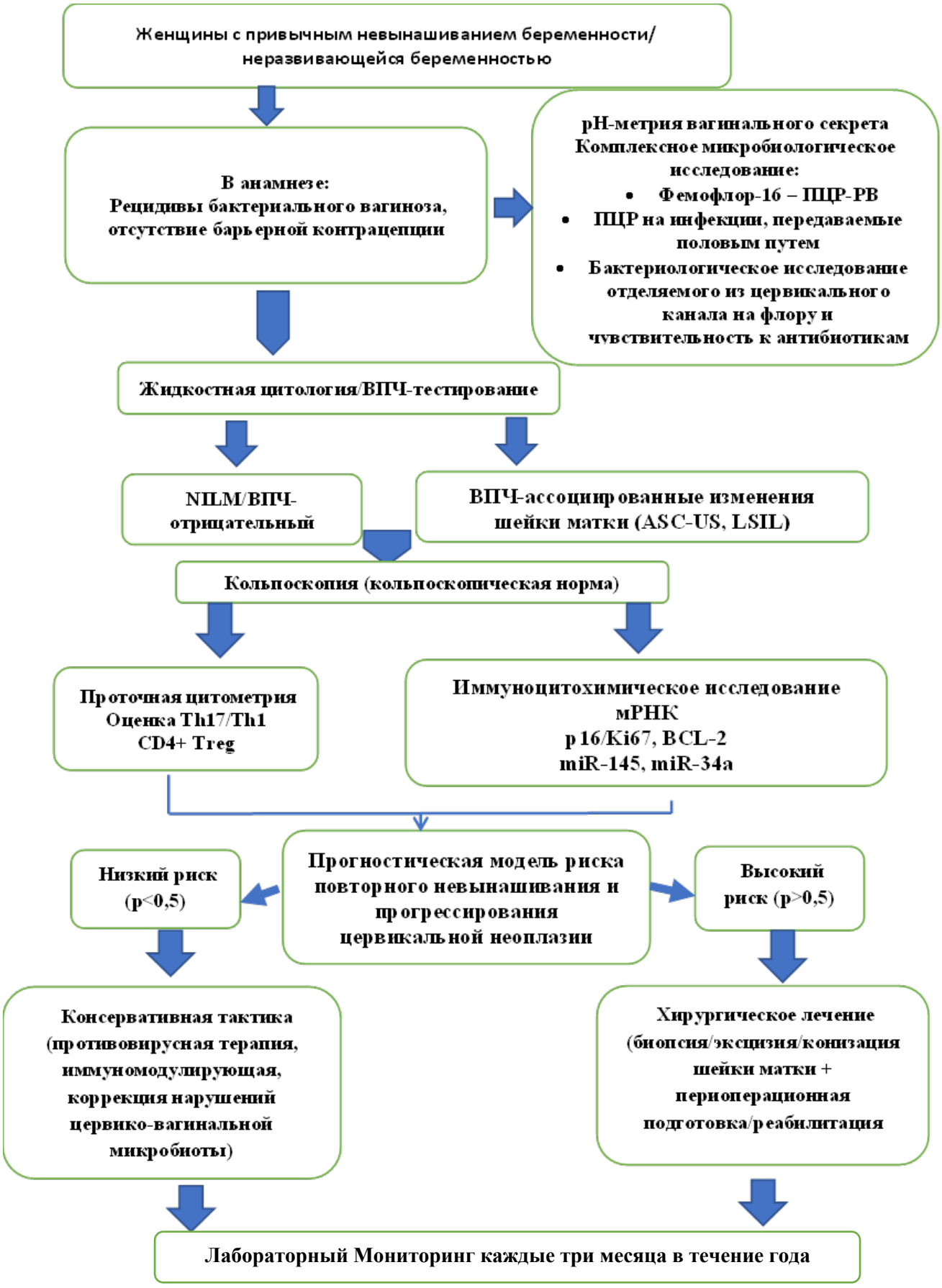


Рисунок 18 - Схема алгоритма ведения женщин с ПНБ

Заключение

Полученные нами данные представлены на основании инновационной методики обследования женщин с ПНБ неясного генеза, что позволило расширить представления о патогенезе заболевания.

В основе привычного невынашивания определена совокупность ВПЧ-ассоциированных характеристик эндоцервикса (ASC-US, LSIL): нарушение соотношения процессов клеточной пролиферации и апоптоза, гормонорецепции.

Потенциальной причиной НБ выступает дисбаланс локального иммунитета, сочетанный с цервико-вагинальным дисбиозом и нарушением механизмов толерантности, имеющей решающее значение для плода.

Представленные инновационные методы исследования эндоцервикса позволяют прогнозировать повторное невынашивание у женщин с аномальными цитограммами. Анализ экспрессии молекулярно-биологических маркеров повышает диагностическую точность при верификации ВПЧ-ассоциированных диспластических изменений эндоцервикса. Интерпретация молекулярных показателей как предикторов ПНБ и прогрессирования повреждений шейки матки формирует предпосылки расчета персонифицированных рисков заболеваний по разработанной прогностической модели с последующей реализацией лечебно-профилактических мероприятий.

Избыточная экспрессия маркеров клеточной пролиферации у 15,8% здоровых женщин с нормальными цитограммами указывает на необходимость мониторинга состояния эндоцервикса, вагинальной микробиоты, локального иммунитета и адекватной комплексной терапии.

Восстановление рецепторного профиля к прогестерону после курса лечебно-реабилитационной терапии представляется перспективным научным направлением.

Выводы

1. Современные методы исследования эндоцервикса (жидкостная цитология, проточная цитометрия, иммуноцитохимические методы) позволяют диагностировать особенности, сочетанные с риском повторных репродуктивных потерь: гиперэкспрессия маркеров пролиферативного потенциала клеток (ASC-US, LSIL – 52,5% против 15,0% в контроле) p15/Ki-67 (52,5%), регулятора апоптоза BCL-2 (54,2%) и снижением противоонкогенных миРНК-145 (41,4%), -34a (49,4%) на фоне персистенции высокоонкогенных штаммов ВПЧ (47,4%).

2. Механизмы повреждения эндоцервикса при персистенции высоко онкогенных штаммов ВПЧ (избыточная пролиферация клеток (гиперэкспрессия p16/Ki-67, BCL-2) при снижении мРНК-34 и -145) составляют единую патогенетическую основу неопластической трансформации шейки матки и повторного выкидыша.

Гиперэкспрессия маркеров p15/Ki-67 у 52,2% женщин с ПНБ и 15,8% здоровых беременных повышает вероятность верификации истинного неопластического процесса от реактивно измененных клеток при кольпоскопической норме и аномальных цитограммах в 52,2% и 19,3% соответственно (ASC-US и LSIL).

3. Особенностью цитограмм после неразвивающейся беременности выступает иммунный дисбаланс: повышение провоспалительных Т-лимфоцитов (Th17/Th1) (55,9%) и снижение регуляторных CD4+ Treg (20,3%) эндоцервикса, контролирующих развитие толерантной реакции к полуаллогенному плоду. Предикторами локального иммунодефицита женщин с ПНБ выступают рецидивирующие вагиниты (67,8% против 26,3% в контроле), перенесенные урогенитальные инфекции (40,7% против 14,0%), особенно – генитальный герпес (20,3% против 5,3%) на фоне низкой приверженности к барьерной контрацепции (10,2% против 40,4%).

4. Нарушение клеточного состава эндоцервикса сопровождается дисбиотическими (81,4% против 42,1%) и воспалительными (81,4% против

42,1%) процессами, с выраженным срывом цервико-вагинальной микробиоты при ВПЧ-ассоциированных повреждениях (100,0%) и преобладанием анаэробной флоры G. vaginalis (43,8%) и A. vaginae (37,5%).

5. Повреждение рецепторного аппарата клеток эндоцервикса, подтверждаемое снижением экспрессии мРНК гена, кодирующего рецепторы прогестерона (PGR-A) (50,8%) только у женщин с ПНБ, детерминирует неэффективность гестагенной профилактики и лечения привычного невынашивания.

6. Дифференцированный выбор способа коррекции нарушений вагинально-цервикального биотопа и воздействия на воспалительный компонент способствует восстановлению нормоценоза в 86,4% и снижению микробной контаминации в 13,6%, предотвращает прогрессию ВПЧ-ассоциированных пролиферативных изменений эндоцервикса (ASC-US и LSIL) и необоснованное хирургическое лечение при беременности в 5,3%, приводит к эффективному лечению доброкачественных заболеваний шейки матки при ПНБ в 100,0% (без рецидивов в течение двух лет).

7. Предложенный алгоритм обследования и расчета персонифицированного риска по разработанной прогностической модели позволяет улучшить исходы лечения женщин с ПНБ за счет последующей реализации репродуктивной функции (срочные роды в 62,7% при наступившей беременности в 77,9%; повторные выкидыши – 8,5%).

Практические рекомендации

- В обследование женщин с ПНБ неясного генеза целесообразно включать тестирование на ВПЧ ВР, при выявлении которого рекомендуется цитологическое исследование (предпочтительна жидкостная цитология), комплексное исследование микробиоты нижних отделов репродуктивной системы (бактериоскопия, Фемофлор-16 (ПЦР РВ) для оценки биоценоза влагалища, бактериологическое исследование отделяемого цервикального канала на флору и чувствительность к антибиотикам, исследование на ИППП);
- При выявлении аномальных цитограмм (ASC-US, LSIL) целесообразно иммуноцитохимическое исследование соскоба эндоцервикса для оценки экспрессии маркеров p16, Ki67, BCL-2, miR-145, miR-34a с целью верификации истинного неопластического процесса или реактивных изменений;
- При повышении уровней маркеров клеточной пролиферации рекомендуется исследование экспрессии PGR-A; снижение рецептивности прогнозирует неэффективность терапии препаратами прогестерона;
- Оценка локального иммунитета методом проточной цитометрии при НБ (интерлейкины Th17/Th1 и CD4+Treg) и коррекция сочетанных с иммунным дисбалансом нарушений цервико-вагинальной микробиоты позволяет улучшить исходы лечения и реабилитации пациенток с ПНБ.

Оптимизация ведения женщин с ПНБ неясного генеза и аномальными цитограммами предполагает расчет персонифицированного риска повторных репродуктивных потерь и развития/прогрессии CIN по разработанной прогностической модели:

- принадлежность к группе низкого риска обосновывает необходимость цитологического и кольпоскопического мониторинга (раз в три месяца), поддержания нормобиоценоза влагалища.
- при высоком риске (p>0,5) необходима активная врачебная тактика:
  - на прегравидарном этапе – противовирусная, иммуномодулирующая

терапия, коррекция нарушений микробиоты, биопсия шейки матки/эксцизия/конизация, с контролем излеченности (жидкостная цитология, ВПЧ-типирование, определение экспрессии p16/Ki-67) каждые три месяца в течение года;

- при беременности – двухэтапная терапия нарушений микробиоты с восстановлением нормобиоценоза, контролем излеченности (микробиологический мониторинг); оценкой цитограмм в динамике и хирургическим лечением этапа после деторождения.

Список сокращений

АБЭ – ацетобелый эпителий

БВ – бактериальный вагиноз

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения

ВПГ 2 – вирус простого герпеса

ВПЧ (ВР) – вирус папилломы человека (высокого онкогенного риска)

ДИ – доверительный интервал

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ЗТ – зона трансформации

ИМТ – индекс массы тела

ИППП – инфекции, передаваемые половым путем

ИЦХ – иммуноцитохимическое исследование

МПЭ – многослойный плоский эпителий

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота

миРНК – малые декодирующие молекулы рибонуклеиновой кислоты

НБ – неразвивающаяся беременность

НЛФ – недостаточность лютеиновой фазы

ОРВИ – острая респираторная вирусная инфе́кция

ОШ – отношение шансов

ПВИ – папилломавирусная инфекция

Пг – прогестерон

ПНБ – привычное невынашивание беременности

ПЦР (РВ) – полимеразно-цепная реакция (в реальном времени)

СВ – самопроизвольный выкидыш

ФБ – физиологическая беременность

ЦЭ – цилиндрический эпителий

ЧНБ – частота наступления беременности

ASC-US – atypical squamous cells of undetermined significance

AUC – Area under ROC curve, площадь под ROC-кривой

Bcl-2 – регулятор апоптоза, apoptosis regulator

CD4+ – cluster of differentiation, регуляторные Т-лимфоциты

CD4+ Treg – эффекторные Т-лимфоциты

CIN – цервикальная интраэпителиальная неоплазия

HSIL – high-grade squamous intraepitelial lesions, плоскоклеточные интраэпителиальные поражения высокой степени тяжести

Ki-67 – маркер клеточной пролиферации

LSIL – low-grade squamous intraepitelial lesions, плоскоклеточные интраэпителиальные поражения низкой степени тяжести

NILM – negative for intraepithelial lesion or malignancy, отрицательный результат на внутриэпителиальное поражение или злокачественность (нормальная цитограмма)

NK – клетки натуральные киллеры

p16INK4a (p16) – онкопротеин, ингибитор циклин-зависимой киназы

PIBF – progesterone-induced blocking factor, прогестерон-индуцированный блокирующий фактор

PGR-A – прогестероновый рецептор А

pRb – белок ретинобластомы

ROC-анализ – receiver operator characteristic, кривая для представления результатов логистической регрессии

УКАЗАТЕЛЬ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Акушерство. Национальное руководство / Э.К. Айламазян, В.И. Кулаков, В.Е. Радзинский, Г.М. Савельева. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2014. – 1200 с.
2. Бебнева Т.Н. Цитологические и кольпоскопические особенности шейки матки у беременных с персистирующей папилломавирусной инфекцией / Т.Н. Бебнева // Доктор.Ру. – 2015. – Приложение 2. – С. 10 – 3.
3. Бебнева Т.Н. Рецидивирующие нарушения биоценоза влагалища, ассоциированные с бактериальным вагинозом, у беременных женщин с ВПЧ-инфекцией / Т.Н. Бебнева, Г.Б. Дикке // Акушерство и гинекология. – 2018. – № 9. – С. 52 – 8.
4. Генетические аспекты идиопатической формы привычного невынашивания беременности. Обзор литературы / Г.С. Святова, Г.М. Березина, Д.Н. Салимбаева и соавт. // Наука и здравоохранение. – 2019. – № 4. –Т.21. – С. 37– 49.
5. Генетические факторы в развитии привычного невынашивания беременности: обзор данных мета-анализов / Е.А. Трифонова, О.А. Ганьжа, Т.В. Габидулина и соавт. // Акушерство и гинекология. – 2017. – № 4. – С. 14 –20.
6. Дикке Г.Б. Полимикробные ассоциации в этиологии воспалительных заболеваний половых органов у женщин / Г.Б. Дикке // Акушерство и гинекология. –2017. – №6. – С. 151– 8.
7. Индукторы интерферонов в комплексной терапии заболеваний шейки матки при персистирующей HPV / В.Е. Радзинский, И.М. Ордиянц, Н.В. Буянова и соавт. // Акушерство и гинекология. – 2018. – № 1. – С. 121–6.
8. Кононова И.Н. Особенности местного иммунитета при цервикальных интраэпителиальных неоплазиях, ассоциированных с папилломавирусной инфекцией / И.Н. Кононова, Е.С. Ворошилина // Российский иммунологический журнал. – 2014. – №8(3). – С. 809 –11.

9. Ордиянц И.М. Неразвивающаяся беременность: взгляд на проблему / И.М. Ордиянц, С.С. Барабашева // Акушерство и гинекология: новости, мнения, обучение. – 2018. –Т. 6. – № 3. – С. 92 – 96.
10. Особенности эндометриальной экспрессии лейкемия-ингибирующего фактора у женщин с различным эстроген-прогестерон-рецепторным статусом эндометрия / С.С. Аганезов, В.Н. Эллиниди, А.В. Мороцкая и соавт. // Акушерство, Гинекология и Репродукция. – 2019. – № 13(2). – С. 85–94.
11. Петров С.В. Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека // С.В. Петров, Н.Т. Райхлин, – 4-е изд., – Казань. – Татмедиа, 2012. – 624 с.
12. Плацентарные факторы мертворождаемости: возможности профилактики / Л.В. Посисеева, Л.П. Перетятко, Л.В. Кулида и соавт. // Российский вестник акушера-гинеколога. – 2014. – № 14(5). – С. 83 – 6.
13. Прегравидарная подготовка: клинический протокол. авт.- разраб. / В.Е. Радзинский и соавт. - М.: Редакция журнала StatusPraesens. – 2016. – 80с.
14. Привычное невынашивание беременности: причины, версии и контраверсии, лечение / под ред. Говарда Дж. А. Карпа; пер. с англ. под ред. В.Е. Радзинского. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2017. – 592 с.
15. Результаты исследования цервико-вагинальной микробиоты методом ПЦР в реальном времени у беременных с угрожающими преждевременными родами / Ю.Э. Доброхотова, К.Р. Бондаренко, А.Е. Гущин и соавт. // Акушерство и гинекология. – 2018. – № 1. – С. 50 – 9.
16. Ушакова С.В. Особенности заболеваний шейки матки у женщин с привычным невынашиванием беременности. : дисс. ... канд. мед. наук : 14.01.01 / Ушакова Серафима Валерьевна. - Москва, 2019. - 121с.
17. Шейка матки, влагалище, вульва / С.И. Роговская, Е.В. Липова. – М.: Status Presens. – 2014. – 832 с.

18. A randomized trial of progesterone in women with recurrent miscarriages / A. Coomarasamy, H. Williams, E. Truchanowicz et al. // N. Engl. J. Med. – 2015. – Vol.373(22). – P. 2141– 8.
19. A systematic literature review to examine the potential for social media to impact HPV vaccine uptake and awareness, knowledge, and attitudes about HPV and HPV vaccination / R.R. Ortiz, A. Smith, T.A. Coyne-Beasley // Human vaccines & immunotherapeutics. – 2019. – Vol. 15(7 – 8). – P.1465–1475.
20. Alteration of vaginal microbiota in patients with recurrent miscarriage / X. Jiao, L. Zhang, D. Du. et al. // J Obstet Gynaecol. – 2022. – Vol. 42(2). – P. 248 – 255.
21. Analysis of the cervical microbiome and potential biomarkers from postpartum HIV-positive women displaying cervical intraepithelial lesions / G. Curty, R.L. Costa, J.D. Siqueira et al. // Sci. Rep. – 2017. – Vol. 7. – P.17364.
22. Antibiotics for treating bacterial vaginosis in pregnancy / P. Brocklehurst, A. Gordon, E. Heatley et al. // Cochrane Database Syst. Rev. – 2013. – Vol. (1). – P. CD000262.
23. Application of p16/Ki-67 dual-staining cytology in cervical cancers / L. Yu, L. Fei, X. Liu et al. // Journal of Cancer. – 2019. – Vol. 10(12). – P. 2654 – 2660.
24. Association Between Human Papillomavirus Infection Among Pregnant Women and Preterm Birth / J. Niyibizi, M.H. Mayrand, F. Audibert et al. // JAMA Netw Open. – 2021. – Vol. 4(9). – P. e2125308.
25. Association Between Maternal Human Papillomavirus Infection and Adverse Pregnancy Outcomes: Systematic Review and Meta-Analysis / J. Niyibizi, N. Zanré, M.H. Mayrand et al. // The Journal of infectious diseases. - 2020. – Vol. 221(12). – P. 1925 –1937.
26. Association between vaginal microbiota and risk of early pregnancy miscarriage / X. Liu, Y. Cao, X. Xie et al. // Comparative immunology, microbiology and infectious diseases. – 2021. – Vol. 77. – P. 101669.

27. Association of asymptomatic bacterial vaginosis with persistence of female genital human papillomavirus infection / K. Kero, J. Rautava, K Syrjänen. et al. // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. – 2017. – Vol. 36(11). – P. 2215 –19.
28. Association of genital infections other than human papillomavirus with pre-invasive and invasive cervical neoplasia / I.Ghosh, R. Mandal, P. Kundu, J.J. Biswas // Clin. Diagn. Res. – 2016. – Vol.10(2). – P. XE01–XE06.
29. Association of HPV infection and clearance with cervicovaginal immunology and the vaginal microbiota / B. Shannon, T.J. Yi, S. Perusini et al. // Mucosal Immunol. – 2017. – Vol.10(5). – P.1310 – 9.
30. Association of spontaneous abortion and Ureaplasma parvum detected in placental tissue / C.N.T. Oliveira, M.T.S. Oliveira, H.B.M. Oliveira et al. // Epidemiology and infection. – 2020. – Vol.148. – P.126.
31. Associations of cervicovaginal lactobacilli with high-risk human papillomavirus infection, cervical intraepithelial neoplasia, and cancer: a systematic review and meta-analysis / H. Wang, Y. Ma, R. Li et al. // J Infect Dis. – 2019. – Vol.220. – P.243–54.
32. Associations of treated and untreated human papillomavirus infection with preterm delivery and neonatal mortality: A Swedish population-based study // J. Wiik, S. Nilsson, C. Kärrberg et al. // PLoS Med. – 2021. – Vol.18. – P.003641.
33. Bacterial vaginosis and the risk of early miscarriage in women undergoing intracytoplasmic sperm injection cycles: a prospective cohort study / A. Moini, L. Mohammadi Yeganeh, M. Shiva et al. // Human fertility (Cambridge, England). – 2018. – Vol.21(4). – P.263 – 268.
34. Bacterial vaginosis is conducive to the persistence of HPV infection / Y.L. Guo, K.You, J. Qiao et al. // Int. J. STD AIDS. – 2012. – Vol.23(8). – P.581–4.
35. Bacterial vaginosis, aerobic vaginitis, vaginal inflammation and major Pap smear abnormalities / P. Vieira-Baptista, J. Lima-Silva, C. Pinto et al. // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. – 2016. – Vol.35(4). – P.657 – 64.

36. Burd E.M. Human papillomavirus laboratory testing: the changing paradigm / E.M. Burd // Clin. Microbiol. Rev. – 2016. – Vol.29(2). – P.291–319.

37. Can HPV vaccine have other health benefits more than cancer prevention? A systematic review of association between cervical HPV infection and preterm birth / Q.T. Huang, M. Zhong, Y. F. Gao et al. // J. Clin. Virol. 2014. – Vol.6. – P.321–328.

38. Carp H.J.A. Progestogens and pregnancy loss / H.J.A. Carp // Climacteric. 2018. – Vol.1(4). – P.380 – 384.

39. CDKN2A/p16INK4a suppresses hepatic fatty acid oxidation through the AMPKα2-SIRT1-PPARα signaling pathway / Y. Deleye, A.K. Cotte, S.A. Hannou et al. // The Journal of biological chemistry. – 2020. – Vol. 295(50). –P. 17310 – 17322.

40. Cervical Cancer / J.R. Fowler, E.V. Maani, B.W. Jack et al. // 2021 In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. – PMID: 28613745.

41. Cervical intraepithelial neoplasia disease progression is associated with increased vaginal microbiome diversity / A. Mitra, D.A. Mac Intyre, Y.S. Lee et al. // Sci. Rep. – 2015. – Vol.5. – P.16865.

42. Cervical microbiome and cytokine profile at various stages of cervical cancer: a pilot study / A. Audirac-Chalifour, K. Torres-Poveda, M. Bahena-Roman et al. // PLoS One. – 2016. – Vol.11(4). – P.e0153274.

43. Cervicovaginal microbiome dysbiosis is associated with proteome changes related to alterations of the cervicovaginal mucosal barrier / H. Borgdorff, R. Gautam, S.D. Armstrong et al. // Mucosal Immunol. – 2015. – Vol.9(3). – P.621–33.

44. Characteristics of bacterial vaginosis infection in cervical lesions with high risk human papillomavirus infection / H. Lu, P.C. Jiang, X.D. Zhang et al. // Int. J. Clin. Exp. Med. – 2015. – Vol.8(11). – P.21080 – 8.

45. Circulating miR-34a and miR-125b as promising non-invasive biomarkers in Egyptian locally advanced breast Cancer patients / N.M. Kassem, W.S. Makar,

H.A. Kassem et al. // Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP. – 2019. – Vol.20(9). – P.2749 – 2755.

46. Clinical efficacy of p16/Ki-67 dual-stained cervical cytology in secondary prevention of cervical cancer / A. Celewicz, M. Celewicz, M. Wężowska et al. // Polish journal of pathology: official journal of the Polish Society of Pathologists. – 2018. – Vol.69(1). – P.42 – 47.
47. Clinical progress of human papillomavirus genotypes and their persistent infection in subjects with atypical squamous cells of undetermined significance cytology: Statistical and latent Dirichlet allocation analysis / Y.S. Kim, S. Lee, N. Zong et al. // Exp. Ther. Med. – 2017. – Vol.13(6). – P.3032 – 8.
48. Combining HPV DNA load with p16/Ki-67 staining to detect cervical precancerous lesions and predict the progression of CIN1-2 lesions / Y. Li, J. Liu, L. Gong et al. // Virology journal – 2019. – Vol.16(1). – P.117.
49. Commensal bacteria modulate innae immune responses of vaginal epithelial cell multilayer cultures / W.A. 2nd. Rose, C.L. McGowin, R.A. Spagnuolo et al. // PLoS One. – 2012. – Vol.7(3). – P.32728.
50. Comparable expression of miR-let-7b, miR-21, miR-182, miR-145, and p53 in serum and cervical cells: Diagnostic implications for early detection of cervical lesions / J.O. Okoye, A.A. Ngokere, C.C. Onyenekwe et al. // International journal of health sciences. – 2019. – Vol.13(4). – P.29 – 38.
51. Comparative effectiveness study on human papillomavirus detection methods used in the cervical cancer screening programme / M. Nygård, K. Røysland, S. Campbell et al. // BMJ Open. – 2014. – Vol.4(1). – P.003460.
52. Comparing Serum Levels of Th17 and Treg Cytokines in Women with Unexplained Recurrent Spontaneous Abortion and Fertile Women / N. Roomandeh, A. Saremi, J. Arasteh et al. // Iran. J. Immunol. – 2018. – Vol. - 15(1) – P.59 – 67.
53. Correlation Between p16/Ki-67 Expression and the Grade of Cervical Intraepithelial Neoplasias / R. Mandal, I. Ghosh, D. Banerjee et al. // International

journal of gynecological pathology: official journal of the International Society of Gynecological Pathologists. – 2020. – Vol.39(4). – P.384 – 390.

54. Correlative analysis of the expression of IL-10 and Ki-67 in human cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasias and human papillomavirus infection / Z. Min, X. Pu, Z. Gu et al. // Oncology letters. – 2018. – Vol.16(6). – P.7189 – 7194.

55. Cytology and human papillomavirus testing 6 to 12 months after ASCUS or LSIL cytology in organized screening to predict high-grade cervical neoplasia between screening rounds / A. Tropé, K. D. Sjøborg, M. Nygård et al. // J. Clin. Microbiol. – 2012. – Vol.50(6). – P.1927 – 35.

56. Data on RT-qPCR assay of nuclear progesterone receptors (nPR), membrane progesterone receptors (mPR) and progesterone receptor membrane components (PGRMC) from human uterine endometrial tissue and cancer cells of the Uterine Cervix / N. Smaglyukova, E.T. Sletten, A. Ørbo et al. // Data Brief. – 2020. – Vol.31. – P.105923.

57. Decidual Interleukin-22-Producing CD4+ T Cells (Th17/Th0/IL-22+ and Th17/Th2/IL-22+, Th2/IL-22+, Th0/IL-22+), Which Also Produce IL-4, Are Involved in the Success of Pregnancy / F. Logiodice, L. Lombardelli, O. Kullolli et al. // International Journal of Molecular Sciences. – 2019. – Vol.20(2). – P.428.

58. Detection of human papilloma virus in chronic cervicitis, cervical adenocarcinoma, intraepithelial neoplasia and squamus cell carcinoma / E. Mirzaie-Kashani, M. Bouzari, A. Talebi et al. // Jundishapur J. Microbiol. – 2014. – Vol.7(5). – P.9930.

59. Detection of pagetoid urothelial intraepithelial neoplasia extending to the vagina by cervical screening cytology: a case report with renewed immunochemical summary / Y. Koyanagi, C. Kubo, S. Nagata et al. // Diagnostic pathology. – 2019. – Vol.14(1). – P.9.

60. Devall A.J. Sporadic pregnancy loss and recurrent miscarriage / A.J. Devall, A. Coomarasamy // Best practice & research. Clinical obstetrics & gynaecology. – 2020. – Vol.69. – P.30 – 39.
61. Distinct BAG-1 isoforms have different anti-apoptotic functions in BAG-1-transfected C33A human cervical carcinoma cell line / J. Chen, J. Xiong, H. Liu et al. // Oncogene. – 2002. – Vol.21(46). – P.7050 – 9.
62. Distribution of human papillomavirus (HPV) genotypes and bacterial vaginosis presence in cervical samples from Paraguayan indigenous / P. Mongelos, L.P. Mendoza, I. Rodriguez-Riveros et al. // Int. J. Infect. Dis. 2015. – Vol.39. – P.44 – 9.
63. Distribution of maternal and infant human papillomavirus: risk factors associated with vertical transmission. / H.S. Hahn, M.K. Kee, H.J. Kim et al. // European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology. – 2013. – Vol.169(2). – P.202 – 206.
64. Evaluation of Human Papillomavirus as a Risk Factor for Preterm Birth or Pregnancy-Related Hypertension / A. Subramaniam, B.F. Lees, D.A. Becker et al. // Obstet. Gynecol. – 2016. – Vol.127. – P.233 – 240.
65. Evidence for HPV DNA in the placenta of women who resorted to elective abortion / M.T. Bruno, S. Caruso, F. Bica et al. // BMC Pregnancy Childbirth. – 2021. – Vol.21(1). – P.485.
66. Evidence of placental HPV infection in HIV positive and negative women / C. Chisanga, D. Eggert, C.D. Mitchell et al. // Cancer Ther. – 2015. – Vol.6(15). – P.1276 – 1289.
67. Evidence that exposure to progesterone alone is a sufficient stimulus to cause a precipitous rise in the immunomodulatory protein the progesterone induced blocking factor (PIBF) / R.A. Cohen, J.H. Check, M.P. Dougherty et al. // Journal of Assisted Reproduction and Genetics. – 2016. – Vol.33(2). – P. 221 – 9.

68. Expression of p63, p53 and Ki-67 in patients with cervical intraepithelial neoplasia / A. Mitildzans, A. Arechvo, D. Rezeberga et al. // Turk patoloji dergisi. – 2017. – Vol.33(1). – P.9 – 16.
69. Farsimadan M. The effects of human immunodeficiency virus, human papillomavirus, herpes simplex virus-1 and -2, human herpesvirus-6 and -8, cytomegalovirus, and hepatitis B and C virus on female fertility and pregnancy / M. Farsimadan, M. Motamedifar // British journal of biomedical science. – 2021. – Vol.78(1). – P.1 – 11.
70. Five-year risk of CIN 3+ and cervical cancer among women with HPV testing of ASC-US Pap results / H.A. Katki, M. Schiffman, P.E. Castle et al. // J. Low. Genit. Tract Dis. – 2013. – Vol.17(5, Suppl. 1). – P.36 – 42.
71. Fujita H. The role of IL-22 and Th22 cells in human skin diseases / H. Fujita // J Dermatol Sci. – 2013. – Vol.72(1). – P.3 – 8.
72. Functional implications of miR-145/RCAN3 axis in the progression of cervical cancer / X.Y. Zhang, H. Ma, J. Li et al. // Reproductive biology. – 2020. – Vol.20(2). – P.140 –146.
73. Garrido-Gimenez C. Recurrent miscarriage: causes, evaluation and management / C. Garrido-Gimenez, J. Alijotas-Reig // Postgrad Med J. – 2015. – Vol.91(1073). – P.151– 62.
74. Genotyping for human papillomavirus types 16 and 18 in women with minor cervical lesions: a systematic review and meta-analysis / M. Arbyn, L. Xu, F. Verdoodt et al. // Ann. Intern. Med. – 2017. – Vol.166(2). – P.118 – 27.
75. Good performance of p16/Ki-67 dual-stain cytology for detection and post-treatment surveillance of high-grade CIN/VAIN in a prospective, cross-sectional study / W. Liu, J. Gong, H. Xu et al. // Diagnostic cytopathology. – 2020. – Vol.48(7). – P.635 – 644.
76. Gravitt P.E. Natural history of HPV infection across the lifespan: role of viral latency / P.E. Gravitt, R.L. Winer // Viruses. – 2017. – Vol.9. – P.267.

77. Hepatitis B Virus-Like Particle: Targeted Delivery of Plasmid Expressing Short Hairpin RNA for Silencing the Bcl-2 Gene in Cervical Cancer Cells / M.A. Akwiditya, C.Y. Yong, M.T. Yusof et al. // International journal of molecular sciences. – 2021. – Vol.22(5). – P.2320.
78. HPV infection and pre-term birth: A data-linkage study using Scottish Health Data. / M.C. Aldhous, R. Bhatia, R. Pollock et al. // Wellcome Open Res. – 2019. – Vol.4. – P.48.
79. HPV16 E6 and E7 Upregulate Interferon-Induced Antiviral Response Genes ISG15 and IFIT1 in Human Trophoblast Cells / L. M.M. Ambühl, A.B. Villadsen, U. Baandrup et al. // Pathogens (Basel, Switzerland). – 2017. – Vol.6(3). – P.40.
80. Human papilloma virus infection and miscarriage: is there an association? / A. Basonidis, A. Liberis, A. Daniilidis et al. // Taiwanese journal of obstetrics & gynecology. – 2020. – Vol.59(5). – P.656 – 659.
81. Human papillomavirus in foetal and maternal tissues from miscarriage cases / L.B. de Freitas, C.C. Pereira, P.R. Merçon-de-Vargas et al. // J. Obstet. Gynaecol. – 2018. – Vol.38. – P.1083 –1087.
82. Human Papillomavirus Infection as a Possible Cause of Spontaneous Abortion and Spontaneous Preterm Delivery / L.M.M. Ambühl, U. Baandrup, K. Dybkær et al. // Infect. Dis. Obstet. Gynecol. – 2016. – Vol.87. – P.1181–1188.
83. Human papillomavirus infection in pregnant women / G. Domža, Z. Gudlevičienė, J. Didžiapetrienė et al. // Arch. Gynecol. Obstet. – 2011. – Vol.284(5). – P.1105 –12.
84. Influence of human Papilloma Virus (hPV) infection on early pregnancy / L. Bober, G. Guzowski, H. Moczulska et al. // Ginekologia polska Ginekol Pol. – 2019. – Vol.90(2). – P.72 – 75.
85. Inonotus obliquus polysaccharide protects against adverse pregnancy caused by Toxoplasma gondii infection through regulating Th17/Treg balance via TLR4/NF-κB pathway / L. Xu, Y. Yu, R. Sang et al. // Int J Biol Macromol. – 2020. – Vol.146. – P.832 – 840.

86. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. / L.E. Harrington, R.D. Hatton, P.R. Mangan et al. // Nat Immunol. – 2005. – Vol.6(11). – P.1123 – 32.
87. Interleukin-17-producing decidual CD4+ T cells are not deleterious for human pregnancy when they also produce interleukin-4 / L. Lombardelli, F. Logiodice, M. Aguerre-Girr et al. // Clin. Mol. Allergy. – 2016. – Vol.14. – P.1.
88. Interleukin-22 aggravates murine acute graft-versus-host disease by expanding effector T cell and reducing regulatory T cell / K. Zhao, D. Zhao, D. Huang // J. Interferon. Cytokine Res. – 2014. – Vol.34(9). – P.707 – 15.
89. Interobserver reproducibility of cytologic p16INK4a/Ki-67 dual immunostaining in human papillomavirus positive women / M. Benevolo, E. Allia, D. Gustinucci et al. // Cancer Cytopathol. – 2017. – Vol.125(3). – P.212 – 20.
90. Interplay between the temporal dynamics of the vaginal microbiota and human papillomavirus detection / R.M. Brotman, M.D. Shardell, P. Gajer et al. // J. Infect. Dis. – 2014. – Vol.210(11). – P.1723 – 33.
91. Involvement of plasma miRNAs, muscle miRNAs and mitochondrial miRNAs in the pathophysiology of frailty / I. Rusanova, J. Fernández-Martínez, M. Fernández-Ortiz et al. // Experimental gerontology. – 2019. –Vol.124. – P.110637.
92. Jahic M. The diagnostic approach to patients with atypical squamous cells of undetermined significance Pap on the cervix / M. Jahic, E. Jahic // Med. Arch. – 2016. – Vol.70(4). – P. 296 – 8.
93. Kishore V. Expression of p16INK4A Protein in Cervical Intraepithelial Neoplasia and Invasive Carcinoma of Uterine Cervix / V. Kishore, A.G. Patil // Journal of clinical and diagnostic research: JCDR. – 2017. – Vol.11(9). –P.EC17 – EC20.
94. Lactobacillus crispatus inhibits growth of Gardnerella vaginalis and Neisseria gonorrhoeae on a porcine vaginal mucosa model / L. M. Breshears, V.L. Edwards, J. Ravel et al. // BMC Microbiol. – 2015. – Vol.15. – P.276.

95. Lactobacillus-Deficient Cervicovaginal Bacterial Communities Are Associated with Increased HIV Acquisition in Young South African Women / C. Gosmann, M.N. Anahtar, S.A. Handley et al. // Immunity. – 2017. – Vol.46. – P.29 – 37.

96. Lan S. Regulation of IRS-1, insulin signaling and glucose uptake by miR-143/145 in vascular smooth muscle cells / S. Lan, S. Albinsson // Biochemical and biophysical research communications. – 2020. – Vol.529(1). – P.119 – 125.

97. Linking cervicovaginal immune signatures, HPV and microbiota composition in cervical carcinogenesis in non-Hispanic and Hispanic women / P. Łaniewski, D. Barnes, A. Goulder et al. // Scientific Reports. – 2018. – Vol.8. – P.7593.

98. The prevalence and risk of human papillomavirus infection in pregnant women / P. Liu, L. Xu, Y. Sun et al. // Epidemiol. Infect. – 2014. – Vol.142. – P.1567 – 1578.

99. Luteal start vaginal micronized progesterone improves pregnancy success in women with recurrent pregnancy loss / M.D. Stephenson, D. McQueen, M. Winter et al. // Fertil. Steril. – 2016. – Vol.107(3). – P.684 – 90.

100. Management of HPV-related cervical disease: role of p16INK4a immunochemistry / D. Savone, A. Carrone, L. Riganelli et al. // Review of the literature Tumori. – 2016. – Vol.102(5). – P.450 – 458.

101. Maternal age, history of miscarriage, and embryonic/fetal size are associated with cytogenetic results of spontaneous early miscarriages / N. Ozawa, K. Ogawa, A. Sasaki et al. // J Assist Reprod Genet. – 2019. – Vol.36(4). – P.749 – 757.

102. Maternal HPV Infection: Effects on Pregnancy Outcome / C.E. Condrat, L. Filip, M. Gherghe et al. // Viruses. – 2021. – Vol.13(12). – P.2455.

103. Maternal Immunological Adaptation During Normal Pregnancy / B. Abu-Raya, C. Michalski, M. Sadarangani et al. // Front. Immunol. – 2020. – Vol.11. – P.2627.

104. Maternal serum progesterone-induced blocking factor (PIBF) in the prediction of preterm birth / I. Hudić, B. Stray-Pedersen, J. Szekeres-Bartho et al. // J Reprod Immunol. – 2015. – Vol.109. – P.36 – 40.

105. Medawar and the immunological paradox of pregnancy: 60 years on / F. Colucci, A. Moffett, J. Trowsdale // Eur. J. Immunol. – 2014. – Vol.44(7). – P.1883 – 5.

106. Meta-analysis on the performance of p16/Ki-67 dual immunostaining in detecting high-grade cervical intraepithelial neoplasm / M. Sun, Y. Shen, M.L. Ren et al. // Journal of cancer research and therapeutics. – 2018. – Vol.14(Supplement). – P.S587 – S593.

107. Micronized vaginal progesterone to prevent miscarriage: a critical evaluation of randomized evidence / A. Coomarasamy, A.J. Devall, J.J. Brosens et al. // American journal of obstetrics and gynecology. – 2020. – Vol. 223(2). – P.167 – 176.

108. miR-145 inhibits glutamine metabolism through c-myc/GLS1 pathways in ovarian cancer cells / J. Li, X. Li, L. Wu et al. // Cell biology international. – 2019. – Vol.43(8). – P.921– 930.

109. miR-9, miR-21, miR-27b, and miR-34a Expression in HPV16/58/52-Infected Cervical Cancer / M. Liu, W. Wang, H. Chen et al. // BioMed research international. – 2020. – Vol.2020. – P.2474235.

110. MiRNA-211 triggers an autophagy-dependent apoptosis in cervical cancer cells: regulation of Bcl-2 / S. Liu, H. Wang, J. Mu et al. // Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology. – 2020. – Vol.393(3). – P.359 – 370.

111. Modeling of US human papillomavirus (HPV) seroprevalence by age and sexual behavior indicates an increasing trend of HPV infection following the sexual revolution / M.D. Ryser, A. Rositch, P.E. Gravitt et al. // J Infect Dis. – 2017. – Vol.216. – P.604 –11.

112. Nitric oxide and the biology of pregnancy / S. Zullino, F. Buzzella, T. Simoncini // Vascul Pharmacol. – 2018. – Vol.110. – P.71 – 74.

113. Okunade K.S. Human papillomavirus and cervical cancer. Journal of obstetrics and gynaecology: the journal of the Institute of Obstetrics and Gynaecology. – 2020. – Vol.40(5). – P.602 – 608.

114. Overexpression of MicroRNA-34a-5p Inhibits Proliferation and Promotes Apoptosis of Human Cervical Cancer Cells by Downregulation of Bcl-2 / X. Wang, Y. Xie, J. Wang // Oncol Res. – 2018. – Vol.26(6). – P.977 – 985.

115. Overview of Chromosome Abnormalities in First Trimester Miscarriages: A Series of 1,011 Consecutive Chorionic Villi Sample Karyotypes / A. Soler, C. Morales, I. Mademont-Soler et al. // Cytogenetic and Genome Research. – 2017. – Vol.152(2). – P.81– 89.

116. p16/Ki-67 dual-stained cytology for detecting cervical (pre)cancer in a HPV-positive gynecologic outpatient population / R. Luttmer, M.G. Dijkstra, P.J. Snijders et al. // Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology. – 2016. – Vol.29(8). – P.870 – 8.

117. p16/Ki-67 dual-stained cytology used for triage in cervical cancer opportunistic screening / Q. Han, H. Guo, L. Geng et al. // Chin J Cancer Res. - 2020. – Vol.32(2). – P.208 – 217.

118. P16INK4A Immunohistochemistry as a Gold Standard for Cervical Cancer and Precursor Lesions Screening / M. Farzanehpour, A. Muhammadnejad, S. Akhavan et al. // Iranian journal of public health. – 2020. – Vol.49(2). – P.312 – 322.

119. Peri-conceptional progesterone treatment in women with unexplained recurrent miscarriage: a randomized double-blind placebo-controlled trial / A.M. Ismail, A.M. Abbas, M.K. Ali et al. // J Matern Fetal Neonatal Med. - 2018. – Vol.31(3). – P.388 – 394.

120. Placental infection with human papillomavirus is associated with spontaneous preterm delivery / L.M. Gomez, Y. Ma, C. Ho et al. // Human Reproduction. – 2008. – Vol.23(3). – P.709–715.

121. Predictive value of p16/Ki-67 immunocytochemistry for triage of women with abnormal Papanicolaou test in cervical cancer screening: a systematic review and meta-analysis / C.C. Chen, L.W. Huang, C.H. Bai et al. // Annals of Saudi medicine. – 2016. – Vol.36(4). – P.245 – 51.

122. Pregnancy and delivery in women with a high risk of infection in pregnancy / S.V. Barinov, Y.I. Tirskaya, T.V. Kadsyna et al. // The journal of maternal-fetal & neonatal medicine: the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstetricians. – 2020. – P.1 – 6.

123. Prevalence of and risk factors for abnormal vaginal flora and its association with adverse pregnancy outcomes in a rural district in north-east Bangladesh / A.H. Baqui, A.C.C. Lee, A.K. Koffi et al. // Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica. – 2019. –Vol.98(3). – P.309 – 319.

124. Prevalence of high-risk HPV and its distribution in cervical precancerous lesions among 35-64 years old women who received cervical cancer screening in Beijing / J. Shen, L.L. Gao, Y. Zhang et al. // Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi. – 2018. – Vol.52(5). – P.493 – 497.

125. Prevalence of human papillomavirus infection in pregnant versus non-pregnant women in Brazil / M.M. Salcedo, A.P. Damin, G. Agnes et al. // Arch. Gynecol. Obstet. - 2015. – Vol.292(6). – P.1273 – 8.

126. Prevalent high-risk HPV infection and vaginal microbiota in Nigerian women / E.O. Dareng, B. Ma, A.O. Famooto et al. // Epidemiol. Infect. – 2016. – Vol.144(1). – P.123 – 37.

127. Progesterone modulates the LPS-induced nitric oxide production by a progesterone-receptor independent mechanism / M.L. Wolfson, J.A. Schander, M.V. Bariani et al. // Eur J Pharmacol. – 2015. – Vol.769. – P.110 – 6.

128. Progesterone-driven local regulatory T cell induction does not prevent fetal loss in the CBA/J×DBA/2J abortion-prone model / A. Schumacher, D. Dauven, A.C. Zenclussen // Am J Reprod Immunol. – 2017. – Vol.77(3).

129. Prognostic Stratification of Bladder Cancer Patients with a MicroRNA-based Approach / I. Cavallari, A. Grassi, P. Del Bianco et al. // Cancers. – 2020. – Vol.12(11). – P.31– 33.

130. Regulatory T cells in embryo implantation and the immune response to pregnancy / S.A. Robertson, A.S. Care, L.M. Moldenhauer // J Clin Invest. – 2018. – Vol.128(10). – P.4224 – 4235.

131. Relationship of human papillomavirus subtypes and multiple infection with different cervical precancerous diseases in Sichuan Province / Y.K. Feng, Y. Peng, L. Zhu et al. // Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban. – 2015. –Vol 46(3). – P.422 – 5, 462.

132. Relationships between female infertility and female genital infections and pelvic inflammatory disease: a population-based nested controlled study / X. Tao, S.Q. Ge, L. Chen et al. // Clinics (Sao Paulo, Brazil). – 2018. – Vol.73. – P.364.

133. Risk factors associated with preterm labor, with special emphasis on preterm premature rupture of membranes and severe preterm labor / A.E.M.S. Hosny, M.N. Fakhry, W. El-Khayat et al. // J Chin Med Assoc. – 2020. – Vol.83(3). – P.280 – 287.

134. Risk factors for progression or persistence of squamous intraepithelial lesions diagnosed during pregnancy / M. Cubo-Abert, C. Centeno-Mediavilla, P. Franco-Zabala et al. // J. Low. Genit. Tract Dis. – 2012. – Vol.16(1). – P.34 – 8.

135. Risk stratification using human papillomavirus testing among women with equivocally abnormal cytology: results from a state-wide surveillance program / J.C. Gagea, W.C. Hunt, M. Schiffmana et al. // Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. – 2016. – Vol.25(1). – P.36 – 42.

136. Sensitivity and specificity values of high-risk HPV DNA, p16/ki-67 and HPV mRNA in young women with atypical squamous cells of undetermined significance (ASCUS) or low-grade squamous intraepithelial lesion (LSIL) / A. Frega, M. Pavone, F. Sesti et al. // European review for medical and pharmacological sciences Eur Rev Med Pharmacol Sci. – 2019. – Vol.23(24). – P.10672 –10677.

137. Sexually Transmitted Infections and Behavioral Determinants of Sexual and Reproductive Health in the Allahabad District (India) Based on Data from the

ChlamIndia Study / P.P.M. Thomas, J. Yadav, R. Kant et al. // Microorganisms. – 2019. – Vol.7(11). – P.557.

138. STAT3 activation in Th17 and Th22 cells controls IL-22-mediated epithelial host defense during infectious colitis / I. Backert, S.B. Koralov, S. Wirtz et al. // J. Immunol. – 2014. – Vol.193. – P.3779 – 3791.

139. Supplementation with progestogens in the first trimester of pregnancy to prevent miscarriage in women with unexplained recurrent miscarriage: a systematic review and meta-analysis of randomized, controlled trials / G. Saccone, C. Schoen, J.M. Franasiak et al. // Fertility and Sterility. – 2017. – Vol.107(2). – P.430 – 438.e3.

140. Survey of human papillomavirus types and their vertical transmission in pregnant women / Y. Hong, S.Q. Li, Y.L. Hu et al. // BMC Infect. Dis. – 2013. – Vol.13. – P.109.

141. Th17/Treg-cell balance in the peripheral blood of pregnant females with a history of recurrent spontaneous abortion receiving progesterone or cyclosporine A / S. Wang, M. Li, F. Sun et al. // Experimental and therapeutic medicine. – 2021. – Vol.21(1). – P.37.

142. Th22 Cells Form a Distinct Th Lineage from Th17 Cells In Vitro with Unique Transcriptional Properties and Tbet-Dependent Th1 Plasticity / M.W. Plank, G.E. Kaiko, S. Maltby et al. // J. Immunol. – 2017. – Vol.198(5). – P.2182 – 2190.

143. The interplay between immune system and microbiota in gynecological diseases: a narrative review / P. Villa, C. Cipolla, S. D'Ippolito et al. // European review for medical and pharmacological sciences. – 2020. – Vol.24(10). – P.5676 – 5690.

144. The lncRNA TUG1 promotes cell growth and migration in colorectal cancer via the TUG1-miR-145-5p-TRPC6 pathway / X. Wang, X. Bai, Z. Yan et al. // Biochem Cell Biol. – 2021. – Vol.99(2). – P.249 – 260.

145. The microbiome and gynaecological cancer development, prevention and therapy / P. Łaniewski, Z.E. Ilhan, M.M. Herbst-Kralovetz et al. // Nat Rev Urol. – 2020. – Vol.17. – P.19 – 22.

146. The paediatric story of human papillomavirus (Review) / I.N. Mammas, G. Sourvinos, D.A. Spandidos et al. // Oncology letters. – 2014. – Vol.8(2). – P.502 – 506.

147. The prevalence and risk of human papillomavirus infection in pregnant women / P. Liu, L. Xu, Y. Sun et al. // Epidemiol. Infect. – 2014. – Vol.142(8). – P.1567–78.

148. The prognostic role of Ki-67/MIB-1 in cervical cancer: a systematic review with meta-analysis / D. Pan, K. Wei, Y. Ling et al. // Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research. – 2015. – Vol.21. – P.882 – 9.

149. The risk factors of residual lesions and recurrence of the high-grade cervical intraepithelial lesions (HSIL) patients with positive-margin after conization / J.Y. Chen, Z.L. Wang, Z.Y. Wang et al. // Medicine. – 2018. –Vol. 97(41). – P.e12792.

150. The Risk of Human Papillomavirus Infection for Spontaneous Abortion, Spontaneous Preterm Birth, and Pregnancy Rate of Assisted Reproductive Technologies: A Systematic Review and Meta-Analysis / Y.Q. Xiong, Y. Mo, Q.M. Luo et al. // Gynecol. Obstet. Investig. – 2018. – Vol.83. – P.417– 427.

151. The vaginal microbiota, human papillomavirus and cervical dysplasia: a systematic review and network meta-analysis / J. Norenhag, J. Du, M. Olovsson et al. // BJOG. – 2020. – Vol.127. – P.171– 80.

152. Triaging HPV-positive women with normal cytology by p16/Ki-67 dual-stained cytology testing: baseline and longitudinal data / M.H. Uijterwaal, N.J. Polman, B.I. Witte et al. // Int. J. Cancer. – 2015. – Vol.136(10). – P.236 – 8.

153. Tumor Necrosis Factor-Alpha and Pregnancy: Focus on Biologics. An Updated and Comprehensive Review / J. Alijotas-Reig, E. Esteve-Valverde, R.

Ferrer-Oliveras et al. // Clin Rev Allergy Immunol. – 2017. – Vol.53(1). – P.40 – 53.

154. Type I Interferon Dependent hsa-miR-145-5p Downregulation Modulates MUC1 and TLR4 Overexpression in Salivary Glands From Sjögren's Syndrome Patients / D. Jara, P. Carvajal, I. Castro et al. // Frontiers in immunology. – 2021. – Vol.12. – P.685837.

155. Use of oral progestogen in women with threatened miscarriage in the first trimester: a randomized double-blind controlled trial / D.M.K. Chan, K.W. Cheung, J.K.Y. Ko et al. // Human reproduction (Oxford, England). – 2021. – Vol.36(3). – P.587– 595.

156. Vaginal dysbiosis and the risk of human papillomavirus and cervical cancer: systematic review and meta-analysis / N. Brusselaers, S. Shrestha, J. van de Wijgert et al. // Am J Obstet Gynecol. – 2019. – Vol.221. – P.9 –18.e8.

157. Vaginal infections of Albanian women Infected with HPV and their impact in intraepithelial cervical lesions evidenced by Pap test / E.S. Kone, A.D. Balili, P.D. Paparisto et al. // J. Cytol. – 2017. – Vol.34. – P.16 –21.

158. Vaginal Microbiota Diversity of Patients with Embryonic Miscarriage by Using 16S rDNA High-Throughput Sequencing" / L. Xu, L. Huang, C. Lian et al. // International journal of genomics. – 2020. – Vol.2020. – P.1764959.

159. Vaginal Microbiota Profiles of Native Korean Women and Associations with High-Risk Pregnancy / D.H. Chang, J. Shin, M.S. Rhee et al. // Journal of microbiology and biotechnology. – 2020. – Vol.30(2). – P.248 – 258.

160. Williams Z. Inducing tolerance to pregnancy / Z. Williams // N Engl J Med. – 2012. – Vol.367(12). – P.1159 – 61.

161. Ziemke P. p16-/Ki-67 in der Zervix-Zytologie: Indikationen [Indications for p16/Ki-67 in cervical cytology] / P. Ziemke, H. Griesser // Pathologe. – 2017. – Vol.38(1). – P.38 – 44.