

2016. – Vol.37, №1. – P.791-798.
22. Stachelscheid J., Jiang Q., Bloehdorn J. et al. The proto-oncogene *TCL1A* deregulates cell cycle and genomic stability in CLL // *Blood*. – 2023. – Vol.141, №12. – P.1425-1438.
23. Sung H., Ferlay J., Siegel R.L. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries // *CA Cancer J. Clin.* – 2021. – Vol.71, №3. – P.209-249. doi: 10.3322/caac.21660.
24. Tanaka K., Oshikawa G., Akiyama H. et al. AML with t(3;21) developing following low-dose methotrexate therapy for rheumatoid arthritis // *Oncol. Lett.* – 2017. – Vol.14, №1. – P.97-102.
25. Wang H.Y., Rashidi H.H. New Findings in Myeloid Neoplasms With inv(3)(q21q26)/t(3;3) // *Arch. Pathol. Lab. Med.* – 2016. – Vol.140, №12. – P.1404-1410.

УДК 618.146 - 006.6:616.9:578.827.1

## ВОЗМОЖНОСТИ МЕТОДА FISH В ВЫЯВЛЕНИИ РАННЕЙ НЕОПЛАСТИЧЕСКОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ ЭПИТЕЛИЯ ШЕЙКИ МАТКИ

Ахмедова К.А., Надырханова Н.С., Алиева Д.А.

Республиканский специализированный научно-практический медицинский центр охраны здоровья матери и ребёнка, г. Ташкент

### XULOSA

*Bachadon bo'yni epiteliyasida neoplastik transformatsiyani erta aniqlash zamonaviy ginekologiya va onkoprofilaktikaning muhim muammolaridan biridir.*

*Ushbu tadqiqotning maqsadi bachadon bo'yni intraepithelial neoplaziyasi (CIN) bo'lgan bemorlarda epiteliy hujayralarida erta molekulyar-genetik o'zgarishlarni aniqlashda fluoressan in situ gibridizatsiya (FISH) usulining diagnostic va prognostic imkoniyatlarini baholashdan iborat.*

*Materiallar va usullar. Tadqiqotga 30-65 yoshdagi 70 nafar ayol (CIN I-II va invaziv bachadon bo'yni saratoni bilan og'rigan) kiritildi. Barcha bemorlarda suyuq asosli sitologiya, yuqori kanserogen xavfli inson papilloma virusi (YuKX OPV) testlari hamda p16 (CDKN2A), TP53 va ATM genlariga yo'naltirilgan lokus-spetsifik DNK-zondlar yordamida FISH-tahlil o'tkazildi. Statistik tahlil p-qiymatlar, 95% ishonch oralig'i, korrelyatsion va logistic regressiya tahlillarini o'z ichiga oldi. FISH yordamida aniqlangan genetik aberratsiyalar chastotasi CIN darajasi oshishi bilan sezilarli ravishda ortdi: CIN I da – 44,0%, CIN II da – 58,3%, bachadon bo'yni saratonida – 57,1% (p= 0,03). CIN darajasi va FISH-pozitivlik o'rtasida o'rtacha musbat korrelyatsiya aniqlandi (r= 0,46; p= 0,002). ATM geni amplifikatsiyasi holatlarning 36% ida aniqlanib, neoplastik jarayonning progressiyasi xavfi bilan bog'liq ekanligi ko'rsatildi. Klinik ahamiyatli FISH-pozitivlik chegarasi epithelial hujayralarning  $\geq 10\%$  ida patologik signallar aniqlanishi sifatida belgilandi.*

*Natijalar. FISH usuli yuqori diagnostic va prognostic ahamiyatga ega bo'lib, CIN bilan og'rigan bemorlarni individual boshqarish va xavfni stratifikatsiya qilishda qo'shimcha metod sifatida tavsiya etilishi mumkin.*

### SUMMARY

*Early detection of neoplastic transformation of the cervical epithelium remains one of the key challenges in modern gynecology and cancer prevention.*

*The aim of this study was to evaluate the diagnostic and prognostic potential of fluorescence in situ hybridization (FISH) for the detection of early molecular genetic alterations in cervical epithelium in patients with cervical intraepithelial neoplasia (CIN).*

*Materials and methods. The study included 70 women aged 30-65 years with CIN I-II and invasive cervical cancer. All patients underwent comprehensive examination including liquid-based cytology, high-risk human papillomavirus (HR-HPV) testing, and FISH analysis using locus-specific DNA probes targeting the p16 (CDKN2A), TP53, and ATM genes. Statistical analysis included calculation of p-values, 95% confidence intervals, correlation analysis, and binary logistic regression. The frequency of genetic aberrations detected by FISH increased significantly with CIN progression: 44.0% in CIN I, 58.3% in CIN II, and 57.1% in cervical cancer (p = 0.03). A moderate positive correlation was found between CIN grade and FISH positivity (r = 0.46; p = 0.002). ATM gene amplification was identified in 36% of cases and was associated with an increased risk of neoplastic progression. A threshold of  $\geq 10\%$  of epithelial cells with abnormal FISH signals was considered clinically significant.*

*Results. FISH demonstrated high diagnostic and prognostic value and may be recommended as an adjunct method for risk stratification and individualized management of patients with CIN.*

*Keywords: human papillomavirus, cervical intraepithelial neoplasia, FISH, liquid-based cytology, p16,*

*Kalit so'zlar: inson papilloma virusi, bachadon bo'yni intraepithelial neoplaziyasi, FISH, suyuq asosli sitologiya, p16, TP53, ATM, genetic aberratsiyalar.*

Рак шейки матки (РШМ) – одна из наиболее распространённых форм злокачественных опухолей репродуктивных органов у женщин, особенно часто встречающаяся в развивающихся странах, главным образом из-за ограниченного доступа к эффективным диагностическим тестам [8].

Известно, что цервикальный канцерогенез, ассоциированный с ВПЧ, является многофакторным прогрессирующим заболеванием и обычно проходит через несколько стадий интраэпителиальных предраковых изменений шейки матки. В 10% случаев цервикальная интраэпителиальная неоплазия лёгкой степени (CINI) может прогрессировать до цервикальной интраэпителиальной неоплазии тяжёлой степени (CINII и CINIII) и РШМ, поэтому важно выявлять случаи потенциального развития раковых и предраковых поражений цервикального эпителия на ранней стадии заболевания.

Для диагностики РШМ широко используются программы цитологического скрининга. Цитологический анализ клеток с поверхности шейки матки (ПАП-мазки, жидкостная цитология) позволяет выявить ранние диспластические нарушения, что даёт возможность предпринять определённые действия для предотвращения развития злокачественной опухоли. Однако рядом исследователей показано, что около 50% предраковых изменений шейки матки может быть пропущено в результате ложноотрицательной оценки по тесту Папаниколау [5,6]. Кроме того, цитологическое исследование не оценивает риск прогрессии заболевания и элиминацию ВПЧ-инфекции, приводящей к регрессу патологического процесса. В связи с этим особый интерес представляют молекулярно-генетические методы, в том числе FISH, позволяющие выявлять ранние структурные геномные нарушения и обеспечивать биологически обоснованную стратификацию риска прогрессии CIN в клинической практике [11,13].

Известно, что в основе канцерогенеза лежат генетические модификации. Изменения в структуре протоонкогенов или генов-супрессоров опухолевого роста приводят к нарушению их экспрессии и, соответственно, изменению количества функционально активных белковых молекул. Итогом данных генетических нарушений является расстройство процессов дифференцировки и созревания клеток многослойного плоского эпителия шейки матки, а также утрата контроля клеточного цикла и развитие неограниченной пролиферации клеток [1,7].

К настоящему времени идентифицирован ряд генов, демонстрирующих различный уровень экспрессии в нормальных клетках, при интраэпителиальных дисплазиях различной степени и инвазивном раке шейки матки. Так, M. Del Pino и соавт. показали

*TP53, ATM, genetic aberrations.*

связь уровня экспрессии гена Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (CDKN2A, p16) со степенью тяжести поражения шейки матки, при этом чувствительность метода при HSIL (CIN III) достигала 81% [2]. Среди генетических перестроек, выявляемых в эпителиальных клетках при дисплазиях шейки матки и РШМ, была подтверждена ключевая роль хромосомного региона 9p21.3, в котором локализован ген CDKN2A (p16) [4].

Продукт экспрессии гена p16 участвует в регуляции клеточного цикла, вызывая его остановку в контрольных точках фаз G1 и G2/M, и выступает в качестве негативного регулятора клеточной пролиферации [3,12]. Генетические нарушения p16 приводят к снижению экспрессии белка CDKN2A. При неопластических процессах инактивация гена p16 может быть обусловлена метилированием промотора, точечными мутациями или гомозиготной делецией [14].

Одним из методов детекции генетических изменений, ассоциированных с трансформацией клеток цервикального эпителия, является флуоресцентная гибридизация in situ (FISH), выполняемая на цитологических или гистологических препаратах. FISH-анализ с использованием локус-специфических ДНК-зондов позволяет выявлять структурные перестройки генов, а также делеции и амплификации хромосомных регионов, содержащих клинически значимые маркеры, включая 9p21.3 (p16) и 17p13.1 (TP53). Вместе с тем оценка экспрессии p16, TP53, ATM и других молекулярных маркеров развития цервикальной неоплазии сопряжена с рядом ограничений, обусловленных гетерогенностью опухолевых тканей, необходимостью инвазивной биопсии и различиями в чувствительности и специфичности применяемых методов [9,14]. В связи с этим сохраняется потребность в диагностических подходах, сочетающих высокую точность с практической применимостью в клинических условиях.

#### ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценить возможности метода FISH в выявлении ранних генетических перестроек эпителия шейки матки и их клиническую значимость при прогрессировании CIN.

#### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В исследование включены 70 пациенток в возрасте 30–65 лет. Сформированы следующие группы:

- CIN I – 25 пациенток (14 ВПЧ-положительных, 11 ВПЧ-негативных);
- CIN II – 24 пациентки (14 ВПЧ-положительных, 10 ВПЧ-негативных);
- Сравнительная группа (РШМ) – 21 пациентка (19 ВПЧ-положительных, 2 ВПЧ-негативных), включённых до начала специализированного лечения.

В группе CIN I медиана возраста составила 36 (34-38) лет, в группе CIN II – 42 (40-44) года, тогда как у пациенток с инвазивным раком шейки матки данный показатель был достоверно выше и составил 52 (50-54) года. Различия возраста между группами носили статистически значимый характер ( $p < 0,001$ ), что отражает возраст-ассоциированное нарастание тяжести неопластического процесса.

*Критерии включения (основные группы CIN I–II)*

1. Женщины в возрасте 30-65 лет;
2. Наличие или отсутствие ВПЧ высокого канцерогенного риска (учитывалось при анализе);
3. Цитологическое заключение LSIL или ASC-H, HSIL по системе Bethesda;
4. Регулярный менструальный цикл;
5. Способность соблюдать требования протокола исследования;
6. Подписанное информированное добровольное согласие на участие в исследовании.

*Критерии включения для сравнительной группы (РШМ)*

1. Инвазивный рак шейки матки, подтверждённый гистологически;
2. Отсутствие ранее проведённого специализированного лечения;
3. Подписанное информированное добровольное согласие на участие в исследовании.

*Критерии исключения*

1. Беременность;
2. Послеродовый период и лактация;
3. Приём гормональных препаратов;
4. Острые воспалительные заболевания специфической и неспецифической этиологии;
5. Декомпенсированные заболевания почек, печени или лёгких;
6. Психоневрологические заболевания;
7. Невозможность соблюдения протокола исследования.

*Критерии формирования подгрупп CIN*

Группа CIN I

На начальном этапе исследования (до цитологической верификации) включение осуществлялось на основании цитологического заключения LSIL (Low-grade Squamous Intraepithelial Lesion) по системе Bethesda.

Группа CIN II

Критерием включения служило цитологическое заключение ASC-H (Atypical Squamous Cells, cannot exclude HSIL) или HSIL (High-grade Squamous Intraepithelial Lesion) по системе Bethesda.

**Особенности формирования групп**

В связи с поэтапным характером диагностики и динамического наблюдения формирование исследуемых групп носило динамический характер. Так, пациентки с первичным цитологическим заключением ASC-H, у которых при выполнении прицельной биопсии шейки матки гистологически подтвержда-

лась CIN I, относились к группе CIN I.

Окончательное распределение пациенток по исследуемым группам осуществлялось на основании результатов гистологического исследования.

**Динамическое наблюдение**

Пациентки с CIN I находились под динамическим наблюдением в течение 24 месяцев. Контрольные обследования, включавшие жидкостную цитологию, ВПЧ-тестирование и расширенную кольпоскопию, проводились каждые 6 месяцев. При ухудшении клинических, цитологических или кольпоскопических показателей выполнялась прицельная биопсия шейки матки с последующим гистологическим исследованием.

Пациенткам с CIN II прицельная биопсия шейки матки проводилась по показаниям в рамках стандартного диагностического алгоритма с целью морфологической верификации диагноза и определения дальнейшей тактики ведения.

**Этические аспекты**

Все пациентки, включённые в исследование, подписали добровольное информированное согласие. Проведение исследования было одобрено Комиссией по биоэтике (протокол от 12 июня 2024 г.).

**Статистическая обработка данных**

Статистический анализ выполняли с использованием пакета программ SPSS / Statistica / R (указать фактически использованный пакет). Количественные показатели представлены в виде медианы и межквартильного размаха Me (Q1–Q3). Для сравнения количественных показателей между группами применяли непараметрический критерий Манна–Уитни.

Для анализа категориальных переменных использовали точный критерий Фишера. Частоты событий представлены с расчётом 95 % доверительных интервалов (95 % ДИ).

Связь между степенью цервикальной интраэпителиальной неоплазии (CIN I, CIN II, РШМ) и наличием генетических aberrаций по данным FISH оценивали с использованием коэффициента ранговой корреляции Спирмена.

Для оценки влияния степени CIN и ВПЧ-статуса на вероятность выявления генетических aberrаций применяли бинарный логистический регрессионный анализ. Различия считались статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

**МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Жидкостная цитология выполнялась до биопсии шейки матки. FISH-анализ проводился с использованием ДНК-зондов LSP p16/Cep9 и LSP TP53/ATM. Анализировали не менее 100 интерфазных ядер в каждом образце. Интерпретация сигналов осуществлялась в соответствии с Международной системой цитогеномной номенклатуры человека (ISCN).

**Контроль качества, воспроизводимость и валидация**

Для обеспечения надёжности FISH-анализа использовалась многоуровневая система контроля ка-

чества. В качестве внутреннего контроля применялись центромерные зонды (Cep9). Отрицательным контролем служили морфологически неизменённые эпителиальные клетки, положительным – препараты с ранее подтверждёнными генетическими абберациями.

Воспроизводимость метода оценивалась путём повторного анализа части препаратов независимыми исследователями; расхождения не влияли на итоговую классификацию образцов. Валидация результатов осуществлялась путём сопоставления данных FISH с результатами цитологического и гистологического исследований.

#### Порог клинической значимости

Клинически значимым порогом FISH-позитивности считался уровень  $\geq 10\%$  эпителиальных клеток с аномальными сигналами. Значения ниже 10 % расценивались как пограничные и не использовались для принятия клинических решений.

Техника пробоподготовки для проведения флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) интерфазных ядер эпителиальных клеток шейки матки была разработана на основе метода прямой фиксации биоматериала, применяемого в цитогенетических исследованиях. Гибридизацию и анализ флуоресцентных сигналов ДНК-зондов к генам p16, TP53 и ATM проводили у 70 пациенток с различными стадиями цервикальной интраэпителиальной неоплазии (CIN I, CIN II) и инвазивным раком шейки матки.

В качестве биоматериала использовались клетки, полученные из многослойного плоского эпителия шейки матки и цервикального канала, перенесённые в фиксирующий раствор для жидкостной цитологии (YES PATHN LBC Solution, Gyn 17 ml, Республика Корея). Для оценки качества и пригодности разработанной методики пробоподготовки для FISH-анализа дополнительно были исследованы цитологические препараты, приготовленные из клеточного фиксата, полученного указанным методом, с последующим окрашиванием красителем Гимза. После этого выполнялся анализ флуоресцентных сигналов ДНК-зондов к генам p16, TP53 и ATM. Микроскопический анализ

показал, что в результате пробоподготовки клеточные мембраны подвергались частичной деструкции, а цитоплазма приобретала более рыхлую структуру, что способствовало снижению плотности внутриклеточных компонентов. Данное обстоятельство обеспечивало потенциальное уменьшение количества негибридизованных ДНК-зондов и, соответственно, снижение фоновой флуоресценции, затрудняющей визуализацию специфических сигналов. При этом клеточные ядра сохраняли структурную целостность, чёткие контуры равномерно распределялись на препарате без пространственного наложения. Такое расположение ядер минимизировало риск ошибочной интерпретации FISH-сигналов и обеспечивало корректную оценку копийности анализируемых генетических локусов. Для повышения воспроизводимости результатов анализ проводился не менее чем в 100 интерфазных ядрах каждого образца в соответствии с рекомендациями Международной системы цитогеномной номенклатуры человека (ISCN).

ДНК-зонд LSP p16/Cep9 предназначен для детекции гена CDKN2A (он же – p16), а также для определения количества копий хромосомы 9. Сигнал, маркирующий хромосому 9 и имеющий зеленное свечение комплементарен к локусу 9p13.2. Локус гена p16 (9p21.3) маркирован красным флуоресцентным сигналом. В норме в геноме клетки присутствуют 2 копии хромосомы 9, а следовательно – 2 зелёных сигнала (локус 9p13.2) и 2 красных сигнала (локус 9p21.3) (рис. 2). Увеличение количества зелёных сигналов до трёх может свидетельствовать о появлении дополнительной копии хромосомы 9 (трисомии 9), а уменьшение количества зелёных сигналов до одного – о потере одной из двух копий хромосомы 9 (моносомии 9). Уменьшение количества красных сигналов до одного (при сохранении двух зелёных) может говорить о потере хромосомного фрагмента, содержащего локус гена p16 на одной из хромосом 9 – то есть о делеции одного из аллелей гена p16. Потеря обоих красных (при сохранении двух зелёных) является результатом биаллельной делеции гена p16 – на обеих копиях хромосомы. (рис. 1).

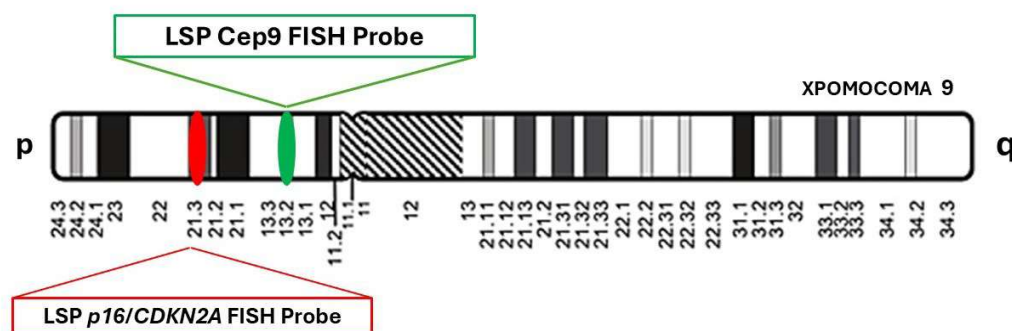


Рис. 1. Маркировка флуоресцентными сигналами локусов 9p13.2 (зелёный) и 9p21.3 (красный) при использовании ДНК-зонда LSP p16/Cep9.

Увеличение количества красных сигналов до трёх или более (при сохранении двух зелёных) может свидетельствовать как о появлении дополнительных копий гена p16 (амплификации гена), так и о перестройке гена с разрывом двух цепочной ДНК и формированием в дальнейшем либо транслокации, либо инверсии, либо инсерции. Появление дополнительной хромосомы 9, несущей дополнительную копию гена p16, либо амплификация только генетического локуса 9p21.3 приводят к увеличению экспрессии CDKN2A, тогда как делеция или перестройка гена – к снижению экспрессии CDKN2A.

ДНК-зонд LSP TP53/ATM предназначен для обнаружения перестроек с участием генов TP53 и ATM, расположенных в хромосомных бэндах 17p13.1 и 11q22.3 соответственно. Аномалии обоих генов выявляются при различных типах лейкоза и других злокачественных новообразованиях. Сигнал, маркирующий ген TP53, имеет красное свечение и комплементарен к локусу 17p13.1. Локус гена ATM (11q22.3) маркирован зелёным флуоресцентным сигналом. В норме в геноме клетки присутствуют 2 копии хромосомы 17, а следовательно – 2 красных сигнала (локус 17p13.1) и 2 зелёных сигнала (локус 11q22.3) (рис. 2).

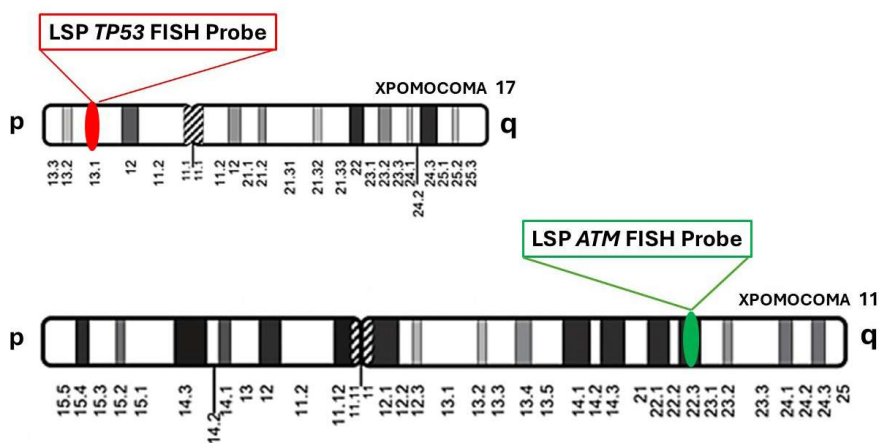


Рис. 2. Маркировка флуоресцентными сигналами локусов 17p13.1 (красный) и 11q22.3 (зелёный) при использовании ДНК-зонда LSP TP53/ATM

Уменьшение количества красных сигналов до одного может говорить о потере хромосомного фрагмента, содержащего локус гена TP53 на одной из хромосом 17 – то есть о делеции одного из аллелей гена TP53. Потеря обоих красных сигналов является результатом биаллельной делеции гена TP53 – на обеих копиях хромосомы 17. Увеличение количества красных сигналов до трёх или более может свидетельствовать как о появлении дополнительных копий TP53 (амплификации), так и о перестройке гена с разрывом двухцепочной ДНК и формированием в дальнейшем либо транслокации, либо инверсии, либо инсерции. Также увеличение количества красных сигналов может свидетельствовать о появлении дополнительной копии хромосомы 17 (трисомии 17), а уменьшение количества сигналов – о потере одной из двух копий хромосомы 17 (моносомии 17).

Появление дополнительной хромосомы 17, несущей дополнительную копию TP53, либо амплификация только генетического локуса 17p13.1 приводят к увеличению экспрессии гена, тогда как делеция или перестройка гена – к снижению экспрессии TP53.

Уменьшение количества зелёных до одного может говорить о потере хромосомного фрагмента, содержащего локус гена ATM на одной из хромосом 11 – то есть о делеции одного из аллелей гена ATM.

Потеря обоих зелёных сигналов является результатом биаллельной делеции гена ATM – на обеих копиях хромосомы 11. Увеличение количества зелёных сигналов до трёх или более может свидетельствовать как о появлении дополнительных копий ATM (амплификации), так и о перестройке гена с разрывом двухцепочной ДНК и формированием в дальнейшем либо транслокации, либо инверсии, либо инсерции. Также увеличение количества зелёных сигналов может свидетельствовать о появлении дополнительной копии хромосомы 11 (трисомии 11), а уменьшение количества сигналов – о потере одной из двух копий хромосомы 11 (моносомии 11).

#### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

После гибридизации ядер клеток цервикального эпителия 70 обследуемых пациентов с ДНК-зондами LSP p16/Сер9 и LSP TP53/ATM был проведён анализ флуоресцентных сигналов. Поскольку при FISH-микроскопии могут просматриваться только ядра – без визуализации структуры хроматина и цитоплазмы, установить тип клеток цервикального эпителия (базальные, парабазальные, промежуточные, поверхностные, атипичные) не представляется возможным. В связи с этим флуоресцентные сигналы оценивались не менее чем в 100 ядрах.

Большое количество анализируемых ядер позволяет минимизировать пропуск мутационных изменений и выявить генетическую патологию в одной клетке из 100. Однако необходимо учитывать, что при онкогенезе изначально способность к патологической пролиферации с неопределённым потенциалом приобретает только одна из клеток цервикального эпителия, но впоследствии формируется генетически обособленная субпопуляция клеток, формирующая опухолевый клон. Эта субпопуляция характеризуется общей уникальной мутацией, являющейся триггер-

ной точкой в инициации процесса онкотрансформации. Количество первично-онкотрансформированных клеток по сравнению с нормальными поначалу минимально. Поэтому при необходимости, количество клеток, анализируемых с использованием технологии флуоресцентной гибридизации *in situ*, может быть кратно увеличено, что повышает чувствительность метода. Примеры визуализации клеточных ядер с флуоресцентными сигналами представлены на рисунках 3 и 4.

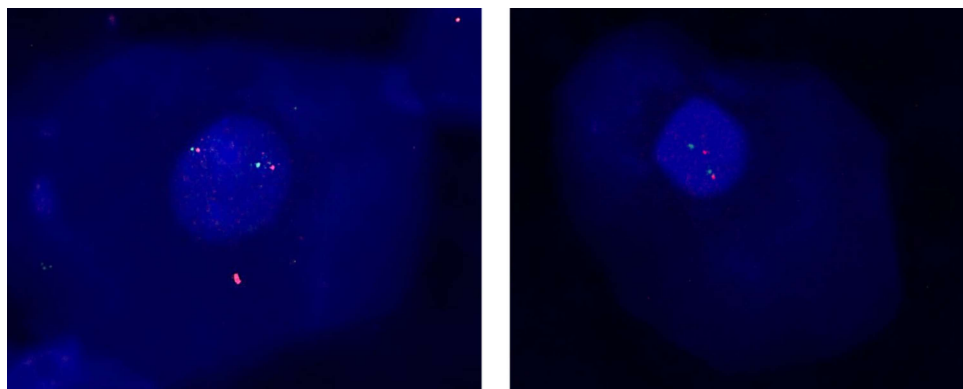


Рис. 3. Примеры визуализации клеточных ядер с флуоресцентными сигналами при использовании ДНК-зонда LSP p16/Сер9. Два красных сигнала – 2 аллеля гена p16 (норма), два зелёных сигнала – центромеры двух хромосом 9 (норма). (При микроскопическом анализе ядра окружены гипотонизированной цитоплазмой, но свечения сигналов в ядре хорошо видны). Увеличение  $\times 1000$ .

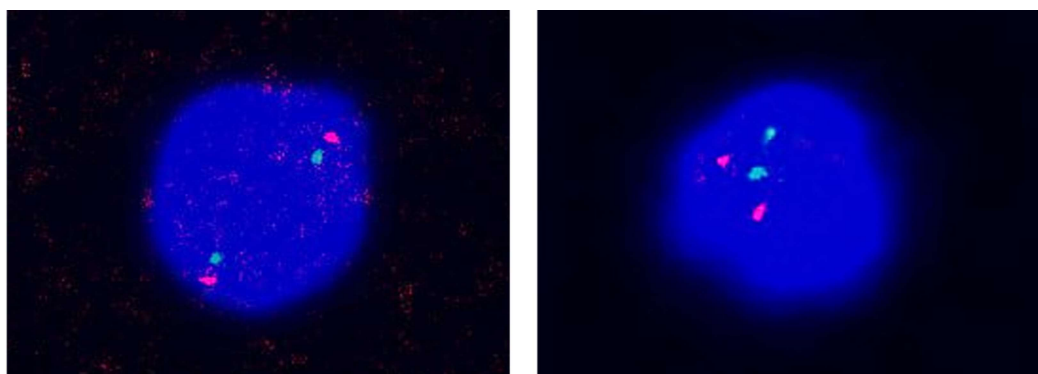


Рис. 4. Примеры визуализации клеточных ядер с флуоресцентными сигналами при использовании ДНК-зонда LSP TP53/ATM. Два красных сигнала – локус двух аллелей гена TP53 (17p13.1) (норма), два зелёных сигнала – локус двух аллелей гена ATM (11q22.3). (При микроскопическом анализе ядра цитоплазма не просматривается, свечения сигналов видны отчётливо). Увеличение  $\times 1000$ .

Таблица 1

Частота FISH-положительных случаев в зависимости от степени CIN

Группа	FISH+ n (%)	95% ДИ	p-value
CIN I	11/25 (44%)	25,8–63,9%	
CIN II	14/24 (58,3%)	36,6–77,9%	
РШМ	12/21 (57,1%)	34,0–78,2%	
Всего	37/70 (52,8%)	40,5–64,9%	

\* p-value рассчитано с использованием точного критерия Фишера при сравнении распределения FISH-положительных случаев между группами.

Генетические aberrации по данным FISH выявлены у 37 из 70 пациенток (52,8%; 95% ДИ: 40,5–

64,9). Частота FISH-положительных случаев достоверно увеличивалась с прогрессированием CIN ( $p = 0,03$ ).

Амплификация гена ATM выявлена у 36% пациенток, преимущественно при CIN II и РШМ. Установлена умеренная положительная корреляция

между степенью CIN и частотой генетических аберраций ( $r = 0,46$ ;  $p = 0,002$ ).

Таблица 2

**Частота выявления генетических аберраций методом FISH в зависимости от степени CIN и ВПЧ-статуса**

Исследуемая группа	n	FISH+, n (%)	95% ДИ	p-value*
CIN I (всего)	25	11 (44,0)	25,8–63,9	
• CIN I / ВПЧ (+)	14	9 (64,3)	35,1–87,2	
• CIN I / ВПЧ (–)	11	2 (18,2)	2,3–51,8	0,02
CIN II (всего)	24	14 (58,3)	36,6–77,9	
• CIN II / ВПЧ (+)	14	14 (100)	76,8–100	
• CIN II / ВПЧ (–)	10	0	0–30,8	<0,001
РШМ (всего)	21	12 (57,1)	34,0–78,2	
• РШМ / ВПЧ (+)	19	12 (63,2)	38,4–83,7	
• РШМ / ВПЧ (–)	2	0	0–84,2	
ВСЯ КОГОРТА	70	37 (52,8)	40,5–64,9	0,03

\* p-value рассчитано с использованием точного критерия Фишера.

По данным логистического регрессионного анализа степень CIN ( $OR = 2,1$ ;  $p = 0,01$ ) и наличие ВПЧ высокого канцерогенного риска ( $OR = 2,8$ ;  $p = 0,004$ ) являлись независимыми предикторами FISH-позитивности.

Исследование показало, что среди клеток цервикального эпителия с помощью метода FISH локус специфических ДНК зондов обнаруживаются клетки с генетическими изменениями. Данные клетки могут быть трансформированными, но также могут быть первичными предшественниками субпопуляции клеток, которые впоследствии сформируют опухолевый клон. Доля генетически изменённых клеток у различных больных с разной степенью дисплазии поначалу минимальна, но в дальнейшем, при отсутствии адекватных медицинских мер, будет нарастать.

**ОБСУЖДЕНИЕ**

Выявление амплификации гена ATM отражает активацию механизмов ответа на повреждение ДНК и свидетельствует о выраженной геномной нестабильности. Наличие данной аномалии может рассматриваться как маркер неблагоприятного прогноза и повышенного риска прогрессии CIN.

Использование FISH с оценкой доли генетически изменённых клеток позволяет перейти от морфологического подхода к биологически ориентированной стратификации риска. При выявлении  $\geq 10\%$  клеток с аномальными сигналами целесообразно сокращение интервалов наблюдения и более раннее применение инвазивных диагностических или лечебных вмешательств.

**ВЫВОДЫ**

1. Частота генетических аберраций, выявляемых методом FISH, возрастает по мере прогрессирования CIN.
2. Амплификация гена ATM может рассматриваться как маркер повышенного риска прогрессии неопластического процесса.
3. Клинически значимый порог FISH-позитивности составляет  $\geq 10\%$  клеток с аномальными сиг-

налами.

4. Метод FISH целесообразно использовать для индивидуализации тактики ведения пациенток с CIN.

5. При диагностическом исследовании пациенток с CIN скрининг шейки матки, включающий цитологическое исследование мазка с шейки по Папаниколау, жидкостную цитологию и ПЦР-тест на ВПЧ высокого канцерогенного риска, должен быть дополнен FISH-анализом с использованием LSP-зондов к генетическим маркерам онкогенного риска, включая перестройки генов TP53, P16 и ATM.

**ЛИТЕРАТУРА**

1. Arbyn M., Weiderpass E., Bruni L., et al. Estimates of incidence and mortality of cervical cancer worldwide. *Lancet Global Health*. 2020;8(2):e191–e203. doi:10.1016/S2214-109X(19)30482-6
2. Del Pino M., Garcia S., Fusté V., et al. Value of p16INK4a expression in cervical lesions. *International Journal of Gynecological Pathology*. 2020;39(3):284–291. doi:10.1097/PGP.0000000000000607
3. Feng W., Xiao J., Zhang Z., et al. Senescence and apoptosis in carcinogenesis of cervical squamous carcinoma. *Modern Pathology*. 2007;20(9):961–966. doi:10.1038/modpathol.3800927
4. García-Tamayo J., Molina J., Blasco-Olaetxea E. Importancia de los estudios de inmunohistoquímica en el diagnóstico y la evaluación pronóstica de la neoplasia intraepitelial y el cáncer cervical. *Investigación Clínica*. 2009;50(2):241–250. PMID:19662819
5. Kinney W.K., Manos M.M., Hurley L.B., Ransley J.E. Where’s the high-grade cervical neoplasia? *Obstetrics & Gynecology*. 1998;91:973–976. doi:10.1016/S0029-7844(98)00080-5
6. Macgregor J.E., Campbell M.K., Mann E.M., Swanson K.Y. Screening for cervical intraepithelial neoplasia. *BMJ*. 1994;308:1407–1411. doi:10.1136/bmj.308.6941.1407
7. Mittal S., Banks L. Molecular mechanisms un-

- derlying human papillomavirus E6 and E7 oncoprotein-induced cell transformation. *Mutation Research Reviews*. 2017;772:23–35. doi:10.1016/j.mrrev.2016.08.002
8. Parkin D.M., Bray F., Ferlay J., Pisani P. Estimating the world cancer burden. *International Journal of Cancer*. 2001;94(2):153–156. doi:10.1002/ijc.1440
  9. Perkins R.B., Guido R.S., Castle P.E., et al. 2019 ASCCP risk-based management consensus guidelines. *Journal of Lower Genital Tract Disease*. 2020;24(2):102–131. doi:10.1097/LGT.0000000000000525
  10. Schiffman M., Wentzensen N. From human papillomavirus to cervical cancer. *Lancet*. 2020;395:152–164. doi:10.1016/S0140-6736(19)32590-4
  11. Solomon D., Schiffman M., Tarone R. Comparison of management strategies for patients with atypical squamous cells of undetermined significance. *Journal of the National Cancer Institute*. 2001;93(4):293–299. doi:10.1093/jnci/93.4.293
  12. Wang Y., Zhang L., Wang Z., et al. Relevance research between the expression of p16INK4a and hTERT genes in HPV16-positive cervical cancer. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 2020;34(5):e23207. doi:10.1002/jcla.23207
  13. WHO Classification of Female Genital Tumours. 5th ed. Lyon: IARC; 2020.
  14. Yamaguchi K., Iwata T. DNA damage response and genomic instability in cervical cancer. *Cancers (Basel)*. 2021;13(5):1150. doi:10.3390/cancers13051150

УДК 616.441-006.6-085

## РОЛЬ НЕКОТОРЫХ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ РАКА ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В ДИАГНОСТИКЕ И ПРОГНОЗИРОВАНИИ ЗАБОЛЕВАНИЯ

Сангинов Д.Р.<sup>1</sup>, Салимов Ф.И.<sup>2</sup>, Исмаилова А.А.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> ГОУ «Таджикский государственный медицинский университет им. Абуали ибни Сино», Душанбе, Таджикистан,

<sup>2</sup> ГУ «Республиканский онкологический научный центр» Министерства здравоохранения и социальной защиты населения Республики Таджикистан,

<sup>3</sup> Институт иммунологии и геномики человека АН РУз

### XULOSA

**Tadqiqot maqsadi.** Qalqonsimon bezi saratoni bilan ogʻrigan bemorlarda sitokinlarning xatti-harakatlarini dinamik ravishda oʻrganish, tashhis qoʻyish va prognoz qilish uchun muhim klinik va immunologic mezonlarni aniqlash.

**Materiallar va usullar.** Tatariston Respublikasi Sogʻliqni saqlash va ijtimoiy rivojlanish vazirligining Rossiya saraton tadqiqotlari markazida davolangan jami 192 nafar qalqonsimon bezi saratoni bemorlari tekshirildi. Zardobdagi interleykinlar IL-4, IL-6 va TNF-alfa davolanishdan oldin va darhol, shuningdek, kuzatuv paytida (davolanishdan 3 oyoʻlgach) Vector-Best test tizimlari (Rossiya) yordamida ELISA yordamida oʻlchandi.

**Natijalar.** IL-4, IL-6 va TNF-alfa darajalari barcha bemorlarda tuzalganlarga nisbatan sezilarli darajada oshdi, bu terapiya va kuzatuv paytida immune javobining gumoral komponentining jaollashishini aks ettirishi mumkin. Davolashdan oldin va keyin, shuningdek, kuzatuv paytida sitokin darajasini tahlil qilish quyidagi nisbatlarni aniqladi: IL-4 uchun 3:2.6:3.8, IL-6 uchun 3.6:4.4:5.5 va TNF-alfa uchun 1:1.3:2. Eng sezilarli oʻzgarishlar 3 oydan keyin kuzatildi, bu yalligʻlanish

### SUMMARY

**Objective.** Dynamic evaluation of cytokine behavior in patients with thyroid cancer in order to identify significant clinical and immunological criteria for diagnosis and prognosis.

**Material and methods.** A total of 192 thyroid cancer patients treated at the the State Research Oncology Center of the Ministry of Health and Social Development of the Republic of Tatarstan were examined. Serum interleukins IL-4, IL-6, and TNF-alpha were measured before and immediately after treatment, as well as during follow-up (3 months after treatment) using ELISA using the Vector-Best test systems (Russia).

**Results.** IL-4, IL-6, and TNF-alpha levels were significantly elevated in all patients compared to those who recovered, which may reflect activation of the humoral component of the immune response during therapy and follow-up. Analysis of cytokine levels before and after treatment, as well as during follow-up, revealed the following ratios: 3:2.6:3.8 for IL-4, 3.6:4.4:5.5 for IL-6, and 1:1.3:2 for TNF-alpha. The most pronounced changes were noted after 3 months, reflecting the activation of the inflammatory and antitumor immune response. These preliminary results require a more thorough understand-