

Е. О. Кіндратів

**Імуноморфологічні особливості цервікальної інтраепітеліальної неоплазії, що асоційована з папіломавірусною інфекцією, залежно від виду безпліддя**

ДВНЗ «Івано-Франківський національний медичний університет», Україна

**Ключові слова:** цервікальна інтраепітеліальна неоплазія, папіломавірусна інфекція, безпліддя.

**Мета роботи** – встановлення особливостей експресії маркерів рецептивності, проліферації, апоптозу та ангиогенезу шийки матки при ЦІН, що асоційована з ПВІ, при різних формах жіночого безпліддя.

**Матеріали та методи.** Дослідили біопсійний матеріал шийки матки 157 жінок при ЦІН, що асоційована з папіломавірусною інфекцією при безплідді. Залежно від ступеня ЦІН усі випадки розділені на три групи: 1 – 62 жінки з легким ступенем ЦІН (ЦІН-I), 2 – 53 жінки з помірним ступенем ЦІН (ЦІН-II), 3 група – 42 пацієнтки з важким ступенем ЦІН (ЦІН-III). Група контролю – 15 зразків шийки матки жінок із безпліддям без патології шийки матки. Для імуногістохімічного (ІГХ) дослідження використовували первинні моноклональні антитіла до Ki-67 (клон MIB-1, DakoCytomation), p63 (клон 4A4, DakoCytomation), VEGF (клон VG1, DakoCytomation), p16<sup>ink4a</sup> (Kit для гістологічних препаратів, № K5334), естрогенових (ER) (клон 6F11, Novocastra) та прогестеронових рецепторів (PR) (клон 1A6, Novocastra).

**Результати.** Встановили, що диспластичні процеси шийки матки в умовах інфікування вірусом папіломи людини характеризуються складними структурними змінами у вигляді порушення клітинного оновлення, перерозподілом гормональної рецепції та експресією багатозаровим плоским епітелієм фактора росту ендотелію судин особливо при трубному, гормональному, поєднаному безплідді.

**Висновки.** При безплідді ЦІН, що асоційована з ПВІ, характеризується різним індивідуальним потенціалом щодо розвитку цервікальної карциноми. Для ранньої діагностики, верифікації ступеня тяжкості та прогнозування перебігу ЦІН (особливо при трубній, гормональній та поєднаній формах безпліддя) доцільно включити в алгоритм комплексного обстеження ІГХ дослідження тканини шийки матки з використанням моноклональних антитіл (Ki-67, p63, p16<sup>ink4a</sup>, ER, PR, VEGF).

*Патологія. – 2016. – №3 (38). – С. 52–58***Иммунорфологические особенности цервикальной интраэпителиальной неоплазии, ассоциированной с папилломавирусной инфекцией, в зависимости от вида бесплодия**

Э. А. Киндратив

**Цель работы** – установление особенностей экспрессии маркеров рецептивности, пролиферации, апоптоза и ангиогенеза шейки матки при ЦИН, ассоциированной с ПВИ, при различных формах женского бесплодия.

**Материалы и методы.** Исследован биопсийный материал шейки матки 157 женщин при ЦИН, ассоциированной с папилломавирусной инфекцией, при бесплодии. В зависимости от степени ЦИН все случаи разделены на три группы: 1 – 62 женщины с лёгкой степенью ЦИН (ЦИН-I), 2 – 53 женщины с умеренной степенью ЦИН (ЦИН-II), 3 – 42 пациентки с тяжёлой степенью ЦИН (ЦИН-III). Группу контроля составили 15 образцов шейки матки женщин с бесплодием без патологии шейки матки. Для иммуногистохимического (ИГХ) исследования использовали первичные моноклональные антитела к Ki-67 (клон MIB-1, DakoCytomation), p63 (клон 4A4, DakoCytomation), VEGF (клон VG1, DakoCytomation), p16<sup>ink4a</sup> (Kit для гистологических препаратов, № K5334), эстрогеновых (ER) (клон 6F11, Novocastra) и прогестероновых (PR) рецепторов (клон 1A6, Novocastra).

**Результаты.** Установлено, что диспластические процессы шейки матки в условиях инфицирования вирусом папилломы человека характеризуются сложными структурными изменениями в виде нарушения клеточного обновления, перераспределением гормональной рецепции и экспрессией многоослойным плоским эпителием фактора роста эндотелия сосудов особенно при трубном, гормональном и сочетанном бесплодии.

**Выводы.** Установлено, что при бесплодии ЦИН, ассоциированная с ПВИ, характеризуется разным индивидуальным потенциалом относительно развития цервикальной карциномы. Для ранней диагностики, верификации степени тяжести и прогнозирования течения ЦИН (особенно при трубной, гормональной и сочетанной формах бесплодия) целесообразно включить в алгоритм комплексного обследования ИГХ исследования ткани шейки матки с использованием моноклональных антител (Ki-67, p63, p16<sup>ink4a</sup>, ER, PR, VEGF).

*Ключевые слова:* цервикальная интраэпителиальная неоплазия, папилломавирусная инфекция, бесплодие.*Патология. – 2016. – №3 (38). – С. 52–58***The immunomorphological features of cervical intraepithelial neoplasia associated with HPV infection depending on the type of infertility**

E. O. Kindrativ

**Aim.** Objective was to establish the features of markers expression of receptivity, proliferation, apoptosis and angiogenesis of cervix with CIN associated with HPV infection in various forms of female infertility.

**Materials and methods.** Cervical biopsy material of 157 women with CIN associated with HPV infection in infertility was investigated. Depending on the degree of CIN all cases are divided into three groups: 1<sup>st</sup> group – 62 women with mild CIN (CIN-I), 2<sup>nd</sup> group – 53 women with moderate CIN (CIN-II), 3<sup>rd</sup> group – 42 patients with severe CIN (CIN-III). The control group consisted of 15 cervical samples from infertile women without cervical pathology. For immunohistochemical (IHC) studies the primary monoclonal antibodies

Ki-67 (Clone MIB-1, DakoCytomation) r63 (clone 4A4, DakoCytomation), VEGF (clone VG1, DakoCytomation), p16<sup>ink4a</sup> (kit for histological preparations, number K5334), estrogen (ER) (clone 6F11, Novocastra) and progesterone receptors (PR) (clone 1A6, Novocastra) were used.

**Results.** As a result of studies it was found that dysplastic cervical processes in terms of human papilloma virus infection are characterized by severe structural changes in the form of cell renewal violation, redistribution of hormonal reception and expression of vascular endothelial growth factor by stratified squamous epithelium especially in the tubular, hormonal and combined infertility.

**Conclusions.** It was established that for infertility the cervical intraepithelial neoplasia (CIN) associated with HPV infection (PVI) is characterized by different individual potential for the development of cervical carcinoma. For early detection, verification of the severity degree and prognosis of CIN, especially during the tubular, hormonal and combined forms of infertility it is advisable to include the immunomorphological study of tissue of the cervix using monoclonal antibodies (Ki-67, r63, p16<sup>ink4a</sup>, ER, PR, VEGF) in the algorithm of complex inspection.

**Key words:** *Cervical Intraepithelial Neoplasia, Papillomavirus Infection, Infertility.*

*Pathologia 2016; №3 (38): 52–58*

За останні десятиріччя накопичено великий фактичний матеріал щодо діагностики, лікування патології шийки матки в жінок репродуктивного віку [5–8]. Однак рівень фонові та передпухлинної цервікальної патології у цього контингенту жінок залишається високим, а це потребує постійного вдосконалення відомих методів діагностики, лікування та пошуку нових ефективних рішень. Чималий відсоток поширення сексуально-трансмісивних вірусних захворювань, до яких належить генітальна папіломавірусна інфекція серед жінок репродуктивного віку, відіграє вирішальну роль у виникненні цервікальних уражень і в пухлинній трансформації клітин [3,4].

З появою концепції цервікального канцерогенезу, що зумовлений вірусом папіломи людини, змінилась стратегія профілактики та тактика лікування диспластичних процесів шийки матки [2]. Сьогодні на перший план виходить етіопатогенетичне лікування цервікальної інтраепітеліальної неоплазії (ЦІН), оскільки використання тільки хірургічного методу лікування зумовило високий процент рецидивів [1,9]. Крім того, лікування генітальної папіломавірусної інфекції жінок із безпліддям розглядають як один з етапів лікування порушеної фертильності [10].

Застосування нових скринінгових технологій, комплексу морфо-функціональних досліджень, зокрема використання імуногістохімії, відкриває нові можливості у своєчасному виявленні ЦІН, дає змогу спрогнозувати їхній перебіг, виділити групи ризику, що є суттєвою ланкою у профілактиці раку шийки матки, а також збереження та/або відновлення репродуктивної функції жінки.

### Мета роботи

Встановити особливості експресії маркерів рецептивності, проліферації, апоптозу та ангиогенезу шийки матки при ЦІН, що асоційована з ППВІ, при різних формах жіночого безпліддя.

### Матеріали і методи дослідження

Досліджено біопсійний матеріал шийки матки 157 жінок із ЦІН, що асоційована з папіломавірусною інфекцією, при безплідді. Залежно від ступеня ЦІН усі випадки розділені на три групи: 1 – 62 жінки з легким ступенем ЦІН (ЦІН-I), 2 – 53 жінки з помірним ступенем ЦІН (ЦІН-II), 3 група – 42 пацієнтки з важким ступенем

ЦІН (ЦІН-III). Група контролю – 15 зразків шийки матки жінок із безпліддям без патології шийки матки. Критерії включення в імуногістохімічне дослідження: вік пацієнток (19–40 років), наявність генітальної папіломавірусної інфекції. Критерії виключення з імуногістохімічного дослідження: вік жінок старше за 40 років, наявність генітального ендометріозу, відсутність генітальної папіломавірусної інфекції.

Для імуногістохімічного дослідження використовували первинні моноклональні антитіла до Ki-67 (клон MIB-1, DakoCytomation), p63 (клон 4A4, DakoCytomation), VEGF (клон VG1, DakoCytomation), p 16<sup>ink4a</sup> (Kit для гістологічних препаратів, № K5334), естрогенових (ER) (клон 6F11, Novocastra) та прогестеронових рецепторів (PR) (клон 1A6, Novocastra).

Титр антитіл підбирали індивідуально для кожного маркера з використанням як розчинника спеціального розчину antibody diluent (Lab Vision). Наступний етап імуногістохімічного дослідження здійснили з використанням системи візуалізації останнього покоління UltraVision LP (Lab Vision). Вторинні антитіла, що містили велику кількість молекул пероксидази хрому, наносили на зрізи та інкубували у вологих камерах протягом 30 хвилин із промиванням у ТРИС-буферному розчині між кожним етапом протягом 10 хвилин. Ідентифікація реакції виконувалась завдяки нанесенню хромогену (DAB (Lab Vision)) під контролем мікроскопа терміном від 20 секунд до 3 хвилин, з проявом у вигляді темно-коричневого забарвлення специфічних структур залежно від маркера (ядерна, цитоплазматична, мембранна реакція). Для диференціювання структур тканин зрізи додатково забарвлювали гематоксиліном Майєра протягом 1–3 хвилин. Наступна дегідратація та включення в бальзам здійснювались згідно із поширеними методиками. Клітини з позитивною експресією вивчали у 4–6 випадкових полях зору мікроскопа. Після підрахунку 300 гістологічно ідентифікованих клітин обчислювали показники експресії за результатами всіх вивчених ділянок, враховуючи реакції в нормальних, а також диспластично та неопластично змінених клітинах епітеліального шару. Експресію рецепторів стероїдних гормонів, VEGF оцінювали також у стромальному компоненті.

Під час оцінювання імуногістохімічного забарвлення позитивна імуногістохімічна реакція з антитілами до

Ki-67, p53, p63, естрогенових і прогестеронових рецепторів проявлялася коричневим забарвленням ядер клітин різного ступеня інтенсивності. Найпоширенішою формою позитивної реакції на p16INK4A та VEGF було коричневе одночасне забарвлення ядер і цитоплазми, так звана змішана позитивна реакція (D. J. Dabbs, 2006). Ступінь інтенсивності визначали за загальноприйнятою шкалою: 0 – відсутність експресії; + – слабка експресія; ++ – помірна експресія; +++ – інтенсивна експресія.

Рівень експресії Ki-67 оцінювали за поширеністю в епітеліальному пласті: низький – позитивно забарвлені клітини становлять <1/3 епітеліального пласта; середній – 1/3–2/3 епітеліального пласта та високий – >2/3 епітеліального пласта.

Проліферативну активність Ki-67 оцінювали залежно від кількості клітин із міченими ядрами до загального числа клітин епітелію та поширеності клітин з інтрануклеарною експресією по шарах ектоцервікса. Проліферативну активність розцінювали як високу при фарбуванні більше ніж 50 % клітин, низькою – при фарбуванні менше ніж 10 %, значення 10–50 % розглядали як проміжну зону.

Експресію VEGF оцінювали і у стромальному компоненті. Оцінюючи імуногістохімічне забарвлення з VEGF, використовували напівкількісний метод із 4 категоріями: 0 – негативна реакція (еквівалентно нормальному епітелію), 1 – слабке забарвлення (позитивно забарвлені окремі клітини або поширена на весь епітелій, але слабо-виражена експресія); 2 – помірно виражене забарвлення (більша кількість позитивно-забарвлених клітин); 3 – інтенсивне забарвлення (практично всі клітини епітелію) (M. Vranca, 2006).

Для оцінювання рівня експресії p16<sup>ink4a</sup> використовували таку шкалу: негативна реакція – до 5 % позитивно забарвлених клітин, фокальна/розкидана – до 80 % клітин із позитивним забарвленням, дифузна – більше ніж 80 % клітин із позитивною імуногістохімічною міткою (Takaaki S., 1998).

Для оцінювання експресії стероїдних рецепторів використовували шкалу: негативна реакція – 0–10 % позитивно забарвлених клітин; позитивна реакція – більше ніж 10 % позитивно забарвлених клітин.

Для оцінювання рівня експресії p63 використовували наступний діапазон: низький рівень – менше ніж 30 % клітин із позитивною інтрануклеарною реакцією; помір-

ний – 30–75 % позитивно забарвлених клітин; високий рівень – більше ніж 75 % клітин із позитивною інтрануклеарною міткою.

Морфологічне дослідження виконали на мікроскопі Axioscop 40 (Carl Zeiss) при різних збільшеннях (окуляр – 10, об'єктив – 10–20–40).

Результати статистично опрацьовані та проаналізовані на ЕОМ Pentium III з електронними таблицями «Statistica 6» згідно з рекомендаціями О. П. Мінцера. При значущості  $p < 0,05$  (5 %), тобто при ймовірності різниці не менше ніж 0,95 (95 %) дані вважались вірогідними.

### Результати та їх обговорення

Зі 157 жінок із ЦІН, що асоційована з ПВІ, виявлені такі форми безпліддя: найбільше випадків – 77 (49,0 %) припадало на трубне безпліддя, серед них жінок із ЦІН-I було 26 (41,9 %), із ЦІН-II – 28 (52,8 %), ЦІН-III – 20 (47,6 %), на другому місці – перитонеальне безпліддя, котре встановлене у 39 жінок (24,8 %) від загальної кількості. У цій групі жінок із ЦІН-I – 17 (27,4 %), з ЦІН-II – 12 (22,6 %), із ЦІН-III – 8 (19,0 %). На гормональне безпліддя припало 14 випадків (8,9 %), із них жінок із ЦІН-I – 8 (12,9 %), із ЦІН-II – 3 (5,7 %), із ЦІН-III – 7 (16,7 %). Найменша кількість – 2 випадки (1,3 %) – маткове безпліддя, що спостерігається у двох жінок із ЦІН-I. Поєднана форма розладів репродуктивної функції встановлена у 25 пацієток (15,9 %), серед них жінок із ЦІН-I – 9 (14,5 %), із ЦІН-II – 10 (18,9 %) та з ЦІН-III – 7 (16,7 %) (табл. 1).

При ЦІН-I із низьким рівнем експресії Ki-67 переважали пацієтки з перитонеальним (34,4 %) та трубним (31,3 %) безпліддям. З цим рівнем експресії маркера найменшу частку становили пацієтки з матковим безпліддям (6,3 %). Значно домінували пацієтки з середнім рівнем позитивної реакції з Ki-67 при трубному безплідді (48,1 %) (рис. 1). Високий рівень експресії Ki-67 спостерігався у трьох пацієток із трубним безпліддям, які відповідно становили 100,0 %.

При ЦІН-I найвищі показники проліферативної активності встановлені при трубному ( $9,8 \pm 1,2$  %,  $p < 0,05$ ), гормональному ( $9,6 \pm 1,2$  %,  $p < 0,05$ ) і поєднаному видах безпліддя ( $9,5 \pm 1,2$  %,  $p < 0,05$ ). При перитонеальному та матковому безпліддях цей показник становив відповідно  $8,9 \pm 1,2$  %,  $p < 0,05$  і  $8,7 \pm 1,2$  %,  $p < 0,05$ .

Таблиця 1

Поділ жінок із ЦІН, що асоційована з ПВІ, за формами безпліддя (абс. ч., %)

Форми безпліддя	Групи дослідження							
	ЦІН-I (n=62)		ЦІН-II (n=53)		ЦІН-III (n=42)		Всього (n=157)	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
Гормональне	8	12,9	3	5,7	7	16,7	14	8,9
Трубне	26	41,9	28	52,8	20	47,6	77	49,0
Перитонеальне	17	27,4	12	22,6	8	19,0	39	24,8
Маткове	2	3,2	0	0,0	0	0,0	2	1,3
Поєднане	9	14,5	10	18,9	7	16,7	25	15,9



Низький рівень експресії Ki-67 при ЦІН-II з найбільшою часткою (42,9 %) належить пацієнткам із перитонеальним безпліддям. Середній і високий рівень імуногістохімічної реакції виявляється при трубному безплідді й відповідно становить 58,3 % та 63,6 %. Крім того, високий рівень експресії Ki-67 з однаковою частотою (18,2 %) спостерігається в пацієнток із перитонеальним і поєднаним безпліддям.

Середній показник проліферативної активності при ЦІН помірного ступеня важкості становив  $39,22 \pm 1,3$  % і є вірогідно вищим ( $p < 0,05$ ) від показників нормальної зовнішньої СО шийки матки та при ЦІН-I. Залежно від форми порушеної фертильності встановлена наступна проліферативна активність: при гормональному безплідді  $42,4 \pm 1,2$  % ( $p < 0,05$ ), при трубному –  $46,7 \pm 1,3$  % ( $p < 0,05$ ), при перитонеальному –  $32,5 \pm 1,2$  % ( $p < 0,05$ ), при матковому –  $36,2 \pm 1,2$  % ( $p < 0,05$ ) і при поєднаному –  $38,3 \pm 1,3$  % ( $p < 0,05$ ).

Зіставляючи рівень експресії Ki-67 і вид безпліддя пацієнток із важким ступенем ЦІН, відзначали чимале переважання трубного безпліддя.

Цей вид безпліддя спостерігається в 52,6 % пацієнток, у яких встановлений високий рівень експресії Ki-67 і 100 % серед пацієнток із ЦІН-III за наявності трубного безпліддя. У випадках середнього рівня експресії 50 % становлять жінки з гормональним безпліддям і по 25 % – пацієнтки з перитонеальною і поєднаною формами безпліддя. При важкій неоплазії середнє значення проліферативної активності становить  $64,98 \pm 1,3$  % ( $p < 0,05$ ). Найвищий відсоток Ki-67 позитивних клітин виявлений у пацієнток із трубним ( $74,8 \pm 1,3$  %,  $p < 0,05$ ) і гормональним ( $67,2 \pm 1,2$  %,  $p < 0,05$ ) безпліддям. Проліферативна активність при поєднаному безплідді становить  $63,2 \pm 1,2$  % ( $p < 0,05$ ), при матковому –  $60,5 \pm 1,3$  % ( $p < 0,05$ ). Для перитонеального безпліддя характерне найменше середнє значення проліферативної активності, що становило  $59,2 \pm 1,2$  % ( $p < 0,05$ ).

Аналіз зіставлення виду безпліддя з рівнем експресії p63 при ЦІН-I показав, що переважає трубне безпліддя. За наявності  $< 30$  % p63 позитивних клітин ці пацієнтки становлять 42,1 %, пацієнтки з перитонеальним безпліддям – 28,1 %, з поєднаним безпліддям – 14,0 %. Гормональне безпліддя фіксується у 12,3 % та у двох пацієнток із матковим безпліддям, частка яких найменша (3,5 %). При рівні експресії 30–75 % трубне безпліддя є в 40,0 %, однакова частка по 20,0 % у пацієнток із гормональною, перитонеальною і поєднаною формами безпліддя. У жінок із безпліддям при ЦІН легкого ступеня медіана інтрануклеарної експресії p63 становить  $29,95 \pm 1,2$  % клітин: при гормональному –  $30,4 \pm 1,3$  % ( $p < 0,05$ ), трубному –  $35,2 \pm 1,2$  % ( $p < 0,05$ ), перитонеальному –  $26,4 \pm 1,2$  % ( $p < 0,05$ ), матковому –  $25,2 \pm 1,2$  % ( $p < 0,05$ ) і при поєднаній формі інфертильності –  $32,6 \pm 1,2$  % ( $p < 0,05$ ).

При ЦІН-II низький рівень експресії p63 спостерігали в єдиному випадку в жінки з перитонеальним безпліддям. За помірної імуногістохімічної реакції маркера переважну частку (56,9 %) становлять жінки з трубним

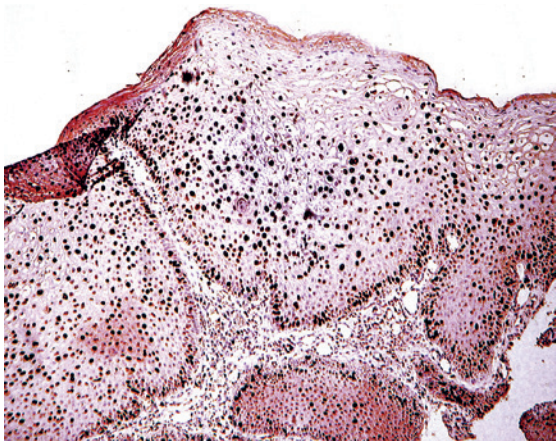
безпліддям, на другому місці – пацієнтки з перитонеальним безпліддям (21,6 %). Найменший відсоток (5,9 %) припадає на жінки з гормональним безпліддям. Високий рівень експресії був в одній жінки з трубним безпліддям (100,0 %). Медіана експресії p63 у жінок із помірним ступенем ЦІН –  $59,3 \pm 3,7$  %. Відповідно до видів безпліддя цей показник становив: при гормональному безплідді –  $60,2 \pm 1,2$  %,  $p < 0,05$ , трубному –  $64,7 \pm 1,2$  %,  $p < 0,05$ , перитонеальному –  $54,2 \pm 1,3$  %,  $p < 0,05$ , поєднаному –  $58,2 \pm 1,23$  %,  $p < 0,05$ .

Поділ пацієнток із ЦІН-III за рівнем експресії p63 та видом безпліддя вказує рівні експресії. При високій експресії панівною є трубна форма безпліддя (54,5 %). При цій самій імуногістохімічній реакції p63 однакову частку (18,2 %) становлять пацієнтки з гормональною та поєднаною формами безпліддя (рис. 2), найменший відсоток (9,1 %) припадає на перитонеальне безпліддя. При ЦІН-III медіана позитивної інтрануклеарної реакції p63 становить  $81,4 \pm 1,8$  %, що вірогідно відрізняється від показників у групах із ЦІН-I і ЦІН-II. Найвище середнє значення рівня експресії p63 при важкому ступені цервікальної неоплазії відзначається в пацієнток із трубним ( $85,3 \pm 2,5$  %,  $p < 0,05$ ), гормональним ( $81,6 \pm 1,2$  %,  $p < 0,05$ ) і поєднаним ( $80,4 \pm 2,2$  %,  $p < 0,05$ ) безпліддям. Найменший показник рівня експресії p63 – в пацієнток із перитонеальною формою безпліддя ( $78,2 \pm 1,2$  %,  $p < 0,05$ ).

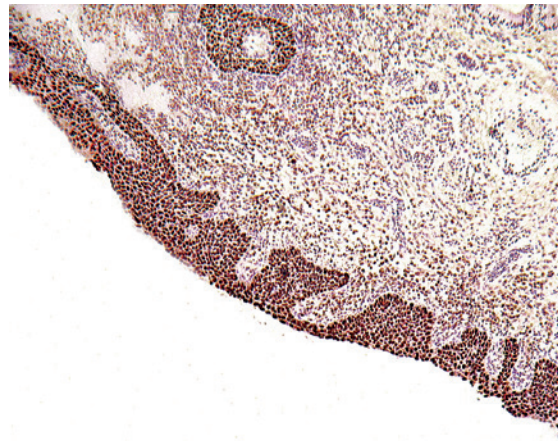
При ЦІН-I серед пацієнток із негативною експресією ER ( $< 10$  %) найбільше у хворих (59,0 %) з трубним безпліддям ( $3,2 \pm 0,3$  %). Цей тип реакції спостерігається в 15,4 % пацієнток із гормональним безпліддям ( $5,2 \pm 0,2$  %,  $p < 0,05$ ). Позитивна експресія ( $> 10$  %) – у 52,2 % жінок, із них у 26,1 % з перитонеальною формою безпліддя ( $57,3 \pm 1,4$  %,  $p < 0,05$ ), 13,0 % – з трубним безпліддям ( $59,7 \pm 1,3$  %,  $p < 0,05$ ), 8,7 % становлять пацієнтки з гормональним безпліддям ( $58,3 \pm 1,2$  %,  $p < 0,05$ ). У двох жінок при ЦІН-I із матковим безпліддям фіксується негативний тип експресії. Але в цих пацієнток відзначається перерозподіл експресії стероїдних гормонів із наявністю негативної реакції щодо PR у власній пластинці шийки матки. Серед усіх жінок із таким типом експресії рецепторів до прогестерону вони становлять 4,8 %. Переважають у цій групі жінок пацієнтки з трубним безпліддям, частка котрих – 45,2 %.

При ЦІН-II позитивна експресія ER виявляється у 28,3 % пацієнток, серед них переважають (53,3 %) пацієнтки з перитонеальним безпліддям ( $48,5 \pm 1,3$  %,  $p < 0,05$ ). Негативний тип експресії рецепторів до естрогену виявляється у трьох жінок із гормональним безпліддям ( $9,6 \pm 0,2$  %,  $p < 0,05$ ), що становить серед інших форм неплідності 7,9 %, найвищий відсоток (68,4 %) належить жінкам із трубним безпліддям ( $9,3 \pm 0,3$  %,  $p < 0,05$ ). Позитивна реакція ER зберігається у 26,7 % пацієнток із трубним безпліддям ( $46,7 \pm 1,2$  %,  $p < 0,05$ ), у 20,0 % – з поєднаним безпліддям ( $45,3 \pm 1,2$  %,  $p < 0,05$ ). Щодо експресії рецепторів до прогестерону спостерігається тенденція до зростання кількості спостережень, в яких відзначається негативна імуногістохімічна реакція

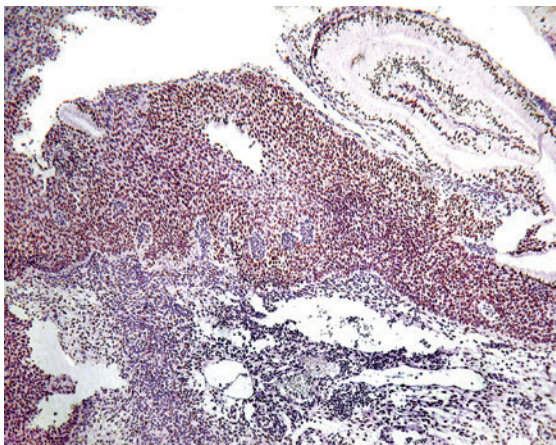




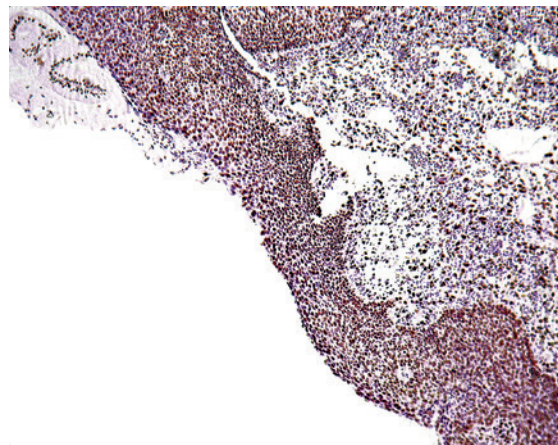
*Рис. 1.* Середній рівень експресії Ki-67 із чергуванням епітеліальних клітин із негативною реакцією при ЦІН-I (↑). Заб.: імуногістохімічний метод із первинними антитілами Ki-67. Зб.: ок. 10, об. 20. Жінка 26 років, первинне трубне безпліддя (3,5 року). Вірусне навантаження >5Ig ВПЛ/10<sup>5</sup>. Група дослідження I. Протокол дослідження № 134/10.



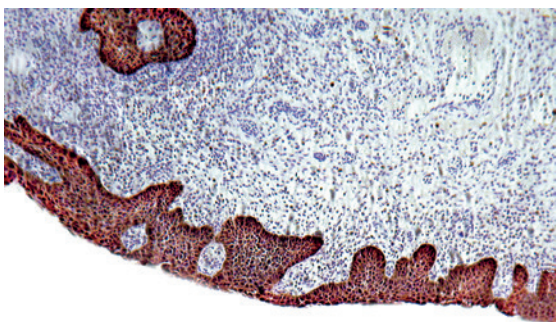
*Рис. 2.* Гіперекспресія p63 з позитивною реакцією груп клітин у стромі шийки матки при ЦІН-III. Заб.: імуногістохімічний метод із первинними антитілами p63. Зб.: ок. 10, об. 40. Жінка 25 років, первинне трубно-перитонеальне безпліддя (3,5 року). Вірусне навантаження >5Ig ВПЛ/10<sup>5</sup>. Група дослідження III. Протокол дослідження № 69/09.



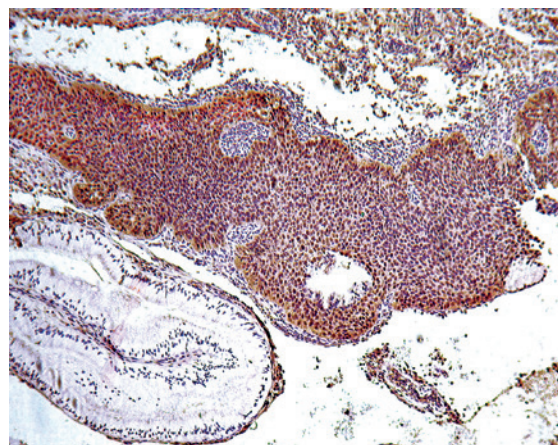
*Рис. 3.* Негативна експресія ER БПНЕ при ЦІН-III. Заб.: імуногістохімічний метод із первинними антитілами ER. Зб.: ок. 10, об. 20. Жінка 28 років, первинне гормональне безпліддя (7,5 року). Вірусне навантаження 3–5 Ig ВПЛ/10<sup>5</sup>. Група дослідження III. Протокол дослідження № 149/10.



*Рис. 4.* Експресія PR у ділянках плоскоклітинної метаплазії прогресуючого ендочервікозу при ЦІН-III (↑). Заб.: імуногістохімічний метод із первинними антитілами PR. Зб.: ок. 10, об. 20. Жінка 26 років, первинне трубне безпліддя (6,5 року). Вірусне навантаження >5Ig ВПЛ/10<sup>5</sup>. Група дослідження III. Протокол дослідження № 161/10.



*Рис. 5.* Інтенсивна дифузна реакція p16<sup>ink4a</sup> в ділянках завершеної плоскоклітинної метаплазії при ЦІН-III. Заб.: імуногістохімічний метод із первинними антитілами p16<sup>ink4a</sup>. Зб.: ок. 10, об. 40. Жінка 25 років, первинне трубно-перитонеальне безпліддя (3,5 року). Вірусне навантаження >5Ig ВПЛ/10<sup>5</sup>. Група дослідження III. Протокол дослідження № 69/09.



*Рис. 6.* Гіперекспресія VEGF БПНЕ шийки матки при ЦІН-III (↑). Заб.: імуногістохімічний метод із первинними антитілами VEGF. Зб.: ок. 10, об. 40. Жінка 28 років, первинне гормональне безпліддя (7,5 року). Вірусне навантаження 3–5 Ig ВПЛ/10<sup>5</sup>. Група дослідження III. Протокол дослідження № 149/10.



з найвищою часткою (58,8 %) пацієток із трубним безпліддям (рис. 4). При цьому відзначається  $5,3 \pm 0,2$  % ( $p < 0,05$ ) естроген позитивних клітин. Привертають увагу пацієтки з гормональною формою безпліддя, в яких у 100,0 % фіксується негативна експресія PR (середня мітка  $-4,2 \pm 0,2$  %,  $p < 0,05$ ), і становить 8,8 % серед інших форм інфертильності. При ЦІН-III серед пацієток із негативною експресією ER переважають жінки з трубним безпліддям, які становлять 51,5 % ( $p < 0,05$ ) з медіаною експресії  $4,8 \pm 0,2$  % ( $p < 0,05$ ). Однакову частку (18,2 %) становлять пацієтки з гормональним ( $3,9 \pm 0,2$  %,  $p < 0,05$ ) і перитонеальним безпліддям ( $4,7 \pm 0,2$  %,  $p < 0,05$ ), 12,1 % – з поєднаним безпліддям ( $4,6 \pm 0,2$  %,  $p < 0,05$ ) (рис. 3). Дещо різняться значення показників експресії PR при ЦІН-III. Більша частка зразків шийки матки (64,3 %) характеризується позитивною експресією PR.

Отже, в усіх випадках груп, що досліджували, при ЦІН на тлі ПВІ відзначається перерозподіл експресії стероїдних рецепторів. Так, ER характеризується зниженням епітеліальної та появою стромальної позитивної реакції, натомість експресія PGR відрізняється появою позитивної епітеліальної експресії при вираженій неспецифічній реакції у стромі шийки матки.

Найбільш застосованим маркером у діагностиці диспластичних процесів шийки матки є визначення експресії  $p16^{ink4a}$  (рис. 5). Аналіз розподілу рівнів експресії  $p16^{ink4a}$  до видів безпліддя показує переважання в усіх групах дослідження при дифузній реакції трубного безпліддя: при ЦІН-I – 52,9 %, ЦІН-II – 50,0 %, ЦІН-III – 58,3 % пацієток. Відповідно до зростання ступеня неопластичного процесу вірогідно ( $p < 0,05$ ) збільшується середня кількість позитивних клітин  $p16^{ink4a}$ : при ЦІН-I –  $78,4 \pm 3,5$  %, ЦІН-II –  $84,3 \pm 3,2$  %, ЦІН-III –  $95,7 \pm 3,2$  %. Відзначимо вагомому частку пацієток із гормональним безпліддям, в яких встановлена позитивна експресія  $p16^{ink4a}$  з середнім показником експресії маркера при ЦІН-I –  $56,9 \pm 3,2$  %, ЦІН-II –  $76,2 \pm 3,2$  %, ЦІН-III –  $89,2 \pm 3,5$  % ( $p < 0,05$ ), що може вказувати на інфекційний чинник, зокрема ПВІ, розвитку у цієї групи пацієток неопластичного процесу в шийці матки.

Особливої уваги заслуговує фактор росту ендотелію судин (VEGF) як один із найсуттєвіших активаторів ангіогенезу, що бере участь у регуляції всіх етапів цього

процесу. У групі хворих із ЦІН-I, у котрих спостерігалась слабка та помірна експресія, відзначалось вагоме переважання пацієток із трубним безпліддям (45,5 % та 33,3 %). Рівномірний розподіл спостерігався в пацієток із перитонеальною формою безпліддя, які при вказаних типах реакцій VEGF становлять 27,3 % та 27,8 % відповідно. При гормональному безплідді переважають жінки з помірною експресією цього маркера (22,2 % проти 9,1 %) зі слабкою імуногістохімічною реакцією. При ЦІН-II спостерігаються два випадки з інтенсивною імуногістохімічною реакцією VEGF, що належать до пацієток із трубним безпліддям. Пацієтки з цієї формою неплідності переважають також при слабкій (50,0 %) та помірній (59,3 %) експресії фактора росту ендотелію судин. При ЦІН-III спостерігається особливість розподілу рівнів експресії VEGF та видів безпліддя. Так, відзначається переважання пацієток із трубним безпліддям, частка яких у випадках помірної експресії становить 31,6 %, у випадках інтенсивної – 60,9 %. Крім цього, відзначали пацієток з іншими видами неплідності, в яких встановлена інтенсивна експресія VEGF: 21,7 % становлять жінки з перитонеальним безпліддям, по 8,7 % – жінки з гормональним і поєднаним безпліддям (рис. 6).

#### Висновки

При безплідді цервікальна інтраепітеліальна неоплазія, що асоційована з папіломавірусною інфекцією, характеризується різним індивідуальним потенціалом щодо розвитку цервікальної карциноми. Для ранньої діагностики, верифікації ступеня тяжкості та прогнозування перебігу ЦІН (особливо при трубній, гормональній та поєднаній формах безпліддя) доцільно включити в алгоритм комплексного обстеження імуногістохімічне дослідження тканини шийки матки з використанням моноклональних антитіл (Ki-67, p63,  $p16^{ink4a}$ , ER, PR, VEGF).

**Перспективи подальших досліджень** полягають в зіставленні результатів імуногістохімічного дослідження тканини шийки при цервікальній інтраепітеліальній неоплазії з вірусним навантаженням (Ig ВПЛ/10<sup>5</sup> клітин) залежно від виду безпліддя.

**Конфлікт інтересів:** відсутній.

#### Список літератури

- Берая Д.Ю. Эффективность иммунокорректирующей терапии при дисплазиях шейки матки, вызванных папилломавирусом человека / Д.Ю. Берая // Здоровье женщины. – 2012. – №3(69). – С. 83–84.
- Воробйова Л.І. Папіломавірусна інфекція: актуальна проблема сучасної гінекології / Л.І. Воробйова // Здоровье женщины. – 2015. – №3. – С. 21–24.
- Вплив вірусної інфекції на розвиток і підтримання передракових захворювань шийки матки / О.В. Кабаченко, Н.В. Шкроботько, А.Г. Панченко та ін. // Здоровье женщины. – 2011. – №10(66). – С. 122–124.
- Генітальна та папіломавірусна інфекції як фактор ризику цервіцитів, ерозій і дисплазій шийки матки / Н.Г. Шпікула, С.А. Деркач, І.А. Воронкіна та ін. // Інфекційні хвороби. – 2014. – №3. – С. 71–76.
- Данилова Н.В. Предраковые изменения эпителия шейки матки: терминология и принципы дифференциальной диагностики / Н.В. Данилова, Ю.Ю. Андреева, П.Г. Мальков // Архив патологии. – 2010. – Т. 72. – №4. – С. 12–16.
- Дисплазія шийки матки: етіологія, патогенез, діагностика та лікування / В.К. Кондратюк, Н.Е. Горбань, А.І. Нарольська та ін. // Репродуктивная эндокринология. – 2014. – №3. – С. 105–109.
- Епідеміологія та чинники ризику дисплазії й раку шийки матки / В.О. Потапов, О.В. Шпонька, Л.П. Гавриш та ін. // Медико-соціальні проблеми сім'ї. – 2013. – Т. 18. – №3. – С. 55–62.

8. Єгоров О.О. Комплексна діагностика передпухлинних захворювань шийки матки / О.О. Єгоров // Жіночий лікар. – 2010. – №5. – С. 37–43.
  9. Дифференцированный подход к ведению больных с цервикальной интраэпителиальной неоплазией с позиции прогнозирования / Т.В. Клинышкова, Т.И. Каратюк, Д.В. Турчанников, И.Б. Самосудова // Гинекология. – 2011. – Т. 13. – №4. – С. 6–40.
  10. Human papillomavirus infection and fertility alteration: a systematic review / T. Souho, M. Benlemlih, B. Bennani et al. // *PLoS ONE*. – 2015. – Vol. 10(5). – e0126936.
- References**
1. Beraya, D. Y. (2012). E'fektivnost' immunokorregiruyushchej terapii pri displaziyakh shejki матки, vyzvannykh papillomavirusom cheloveka [The effectiveness of therapy immune corrective against dysplasia of the uterine cervix caused by human papillomavirus]. *Zdorov'e zhenshhiny*, 3(69), 83–84. [in Ukrainian].
  2. Vorobiova, L. I. (2015). Papilomavirusna infektsiia: aktualna problema suchasnoi hinekologii [HPV infection: actual problem of modern gynecology]. *Zdorov'e zhenshhiny*, 3, 21–24. [in Ukrainian].
  3. Kabachenko, O. V., Shkrobotko, N. V., Panchenko, A. H., et al. (2011). Vplyv virusnoi infektsii na rozvytok i pidtrymannya peredrakovykh zakhvoriuvan shyiky матки [The impact of viral infection on the development and maintenance of cervical precancer]. *Zdorov'e zhenshhiny*, 10(66), 122–124. [in Ukrainian].
  4. Shpikula, N. H., Derkach, S. A., Voronkina, I. A., & Bido-vanets, O. Yu. (2014). Henitalna ta papilomavirusna infektsii yak faktor ryzyku tservitsytiv, erozii i displazii shyiky матки [Genital HPV infection and as a risk factor cervicitis, cervical ectopia and cervical dysplasia]. *Infektsiini khvoroby*, 3, 71–76. [in Ukrainian].
  5. Danilova, N. V., Andreeva, Yu. Yu., & Mal'kov, P. G. (2010). Predrakovye izmeneniya e'piteliya shejki матки: terminologiya i principy differencial'noj diagnostiki [Precancerous changes in the epithelium of the cervix: the terminology and principles of differential diagnosis]. *Arhiv patologii*, 72(4), 12–16. [in Russian].
  6. Kondratuk, V. K., Gorban, N. E., Narolskaya, A. I., Kalyuta, A. A. (2014). Dysplaziia shyiky матки: etiologhiia, patohenez, diahnostyka ta likuvannia [Cervical dysplasia: etiology, pathogenesis, diagnosis and treatment]. *Reproduktivnaya e'ndokrinologiya*, 3, 105–109. [in Ukrainian].
  7. Potapov, V. A., Shponka, A. V., Havrysh, L. P., & Bilodid, O. O. (2013). Epidemiologhiia ta chynnyky ryzyku displazii i raku shyiky матки [Epidemiology and risk factors for dysplasia and cervical cancer]. *Medyko-sotsialni problemy simi*, 18(3), 55–62. [in Ukrainian].
  8. Yehorov, A. A. (2010). Kompleksna diahnostyka pered-pukhlynykh zakhvoriuvan shyiky матки [Comprehensive diagnosis of precancerous cervical disease]. *Zhinochyi likar*, 5, 37–43. [in Ukrainian].
  9. Klinyshkova, T. V., Karatyuk, T. I., Turchannikov, D. V., & Samosudova, I. B. (2011). Differencirovannyj podkhod k vedeniyu bol'nykh s cervikal'noj intrae'pitelial'noj neoplaziej s pozicii prognozirovaniya [Differentiated approach to the management of patients with cervical intraepithelial neoplasia with the position of the prediction]. *Ginekologiya*, 13(4), 6–40. [in Russian].
  10. Souho, T., Benlemlih, M. Bennani, B., et al. (2015). Human papillomavirus infection and fertility alteration: a systematic review. *PLoS ONE*, 10(5), e0126936. doi: 10.1371/journal.pone.0126936. doi: 10.1371/journal.pone.0126936.

**Відомості про автора:**

Кіндратів Е. О., канд. мед. наук, доцент каф. патоморфології та судової медицини, ДВНЗ «Івано-Франківський національний медичний університет», Україна, E-mail: Kindrativ@mail.ru.

**Сведения об авторе:**

Киндратив Э. А., канд. мед. наук, доцент каф. патоморфологии и судебной медицины, ГВУЗ «Ивано-Франковский национальный медицинский университет», Украина, E-mail: Kindrativ@mail.ru.

**Information about author:**

Kindrativ E. O., MD, PhD, Associate Professor of the Department of Pathomorphology and Forensic Medicine, SHEE "Ivano-Frankivsk National Medical University", Ukraine, E-mail: Kindrativ@mail.ru.

Надійшла в редакцію 07.10.2016 р.