

**Е.О.Кіндратів**

Івано-Франківський  
національний медич-  
ний університет

**Ключові слова:** клі-  
тинне оновлення, цер-  
вікальна інтраепітеліа-  
льна неоплазія, вто-  
ринне безпліддя.

Надійшла: 28.07.2011

Прийнята: 23.08.2011

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2011.3.49-53>

УДК 618.146+578.27+618.177

## **КЛІТИННЕ ОНОВЛЕННЯ ШИЙКИ МАТКИ ПРИ ЦЕРВІКАЛЬНІЙ ІНТРАЕПІТЕЛІАЛЬ- НІЙ НЕОПЛАЗІЇ, АСОЦІЙОВАНІЙ З ПАПЛОМАВІРУСНОЮ ІНФЕКЦІЄЮ У ЖІНОК З ВТОРИННИМ БЕЗПЛІДДЯМ**

*Робота виконана в рамках науково-дослідної роботи «Патоморфологія серцево-судинної системи, плаценти, жирової тканини, нирок, головного мозку, регуляторних систем (APUD, імунної) при метаболічному синдромі, гострій ішемії міокарда, облітеруючих захворюваннях судин нижніх кінцівок, хворобах легень, пухлинних процесах і внутрішньоутробних інфекціях у клініці й експерименті» (номер державної реєстрації 0107U002769).*

**Резюме.** В статті викладені результати імуногістохімічного дослідження процесів клітинного оновлення ектоцервіксу при цервікальній інтраепітеліальній неоплазії з використанням моноклональних антитіл Ki-67 та p63 (DakoCytomation). В роботі використали біопсійний матеріал 56-ти жінок з вторинним безпліддям, в яких, методом ПЛР, в цервікальних мазках ідентифіковані типи вірусів папіломи людини високого онкогенного ризику. Встановлено, що при цервікальній інтраепітеліальній неоплазії у жінок з вторинним безпліддям спостерігається активація процесу клітинної проліферації. Індекс проліферативної активності при ЦІН – I становить  $9,3 \pm 4,2\%$ , при ЦІН – II –  $39,23 \pm 4,3\%$  та при ЦІН – III –  $64,9 \pm 4,5\%$ . Спрямованість процесів клітинного оновлення характеризується зростанням індексу співвідношення процесів клітинної проліферації і проаптозу (Ki-67/p63). Проведені дослідження, свідчать про те, що при прогресуванні диспластичних змін шийки матки, крім зростаючої проліферативної активності, відбувається активація проаптозних програм.

**Морфологія.** – 2011. – Т. V, № 3. – С. 49-53.

© Е.О.Кіндратів, 2011

**Kindrativ E.O. Cellular renovation of cervix uteri under cervical intraepithelial neoplasia unit with human papilloma virus has to women with secondary infertility.**

**Summary.** In article expound results of immunohistochemical research ectocervix cellular renovation processes under cervical intraepithelial neoplasia with used of monoclonal antibodies Ki-67 & p63 (DakoCytomation). In research used a cervix uteri biopsy material from 56 women with secondary infertility. Preliminarily were identifying high oncogenous risk human papilloma viruses (HPV). For women with secondary infertility under cervical intraepithelial neoplasia (CIN) we observed activation of cellular proliferation processes. Index of proliferation activity about CIN-I is  $9,3 \pm 4,2\%$ , about CIN-II -  $39,23 \pm 4,3\%$ , about CIN-III -  $64,9 \pm 4,5\%$ . Cellular renovation processes going to increase correlation index of cellular proliferation and proapoptosis processes (Ki-67/p63). Thereby we establish that according with rapidity of cervix uteri dysplastic change occurred increase proliferate activity together activation processes of proapoptosis programs.

**Key words:** cellular renovation, cervical intraepithelial neoplasia, secondary infertility.

### **Вступ**

Стан репродуктивного здоров'я жінки впливає особливе занепокоєння, оскільки в останні десятиріччя відмічається зростання кількості жінок, в яких діагностують безпліддя. Серед різноманітних процесів, що впливають на генеративну функцію жінки є цервікальна інтраепітеліальна неоплазія (ЦІН), яка являється морфологічним субстратом передракових станів шийки матки являється (Волошина Н.Н., 2007).

Аналіз останніх досліджень, показує широке використання молекулярно-біологічних маркерів, спрямованих на удосконалення діагностики

цервікальної патології, оскільки можуть допомогти в прогнозуванні перебігу диспластичних змін. Особливої уваги заслуговують локальні маркери клітинного оновлення: маркер проліферації Ki-67 та білок p63 (Carrillo C. et al., 2003; Kruse A.J. et al., 2004; Дорохова О.В., 2007).

Ki-67 є універсальним маркером, оскільки виявляє проліферативні клітини, які знаходяться на різних фазах клітинного циклу. Тому дозволяє визначати проліферативну спроможність пухлин і виступати прогностичним показником перебігу диспластичних та непластичних процесів.

Ген p63 має достатню високу ступінь гомо-

логії з білком p53. Встановлено, що p63 експресується переважно в ембріональній тканині та в недиференційованих клітинах дорослої людини. В пухлинних клітинах p63 виступає як протоонкоген та маркер проапоптозу. Таким чином, дослідження білка p63 при ЦПН може виступати як маркер прогресії диспластичних змін (Мальшкін І.Н., 1997; Keating J.T. et al., 2001; Oliveira L. et al., 2003; Горбоконь Н.М., 2006).

#### Мета

Встановити особливості проліферативних процесів епітелію шийки матки при ЦПН, в залежності від рівнів експресії Ki-67, p63 з персистою папіломавірусною інфекцією на тлі вторинного безпліддя.

#### Матеріал та методи

Досліджено біоптати шийки матки 56 жінок, віком від 23 до 37 років, з перитонеально-трубним безпліддям. Клініко-анатомічний матеріал був розподілений на 3 групи: I – 23 пацієнток з ЦПН-I (дисплазія легкого ступеня); II – 19 з ЦПН-II (дисплазія помірного ступеня); III група – ЦПН-III (14 пацієнток з дисплазією важкого ступеня). У всіх жінок клінічно у цервікальному мазку, шляхом полімеразно-ланцюгової реакції, виявлений вірус папіломи людини високого онкогенного ризику (16HPV та 18HPV). В якості контрольної групи використали біопсійний матеріал 5-ти жінок, які звернулись в Центр планування сім'ї. При гістологічному дослідженні біоптату шийки матки жінок контрольної групи не виявлена ЦПН, а спостерігалися помірні ознаки цервіциту.

Для проведення морфологічного дослідження біопсійний матеріал фіксували в 10% нейтральному забуференому формаліні протягом 12 годин і заливали у парафін. Зрізи забарвлювали гематоксиліном – еозином та проводили загальну морфологічну діагностику.

Для імуногістохімічного дослідження зрізи товщиною 4-5 мкм наносились на предметне скло, попередньо обробленого адгезивною рідиною. Після стандартної депарафінізації використовували нагрівання на водяній бані в цитратному буфері з рН=6,0 (протягом 30 хв після досягнення температури 980) і автоклавування (5 хв при температурі +1210°C). як первинні використовували моноклональні антитіла Ki-67 та p63 (DakoCytomation). Для контролю специфічності

імуногістохімічного забарвлення для кожного маркера виконували контрольні реакції. Подальшу обробку проводили з використанням системи візуалізації LSAB2 та EnVision (DakoCytomation) протягом 10 хвилин з кожним реагентом з промиванням у ТРИС-буферному розчині. Після цього проводили реакцію з хромогеном (DAB (DakoCytomation)), оцінюючи якість взаємодії під контролем мікроскопу протягом від 20 секунд до 3 хвилин. Для диференціювання структур тканин зрізи додатково забарвлювали гематоксиліном Майєра протягом 3 хвилин. Позитивною експресією є коричневе забарвлення ядер та цитоплазми різного ступеня вираженості. Клітини з позитивною експресією вивчали у 4-6 випадкових полях зору мікроскопа.

Інтенсивність експресії Ki-67 оцінювали в залежності від кількості клітин з міченими ядрами до загального числа клітин епітелію і від поширеності клітин з інтрануклеарною експресією по шарах ектоцервікса. Виділені три варіанти експресії – слабка (+), помірна (++), виражена (+++). Аналіз проліферативної активності здійснювали за допомогою моноклонального маркера Ki-67 з визначенням індексу проліферації (ІП). Проліферативну активність оцінювали як низьку при діапазоні ІП 0-10%, помірна при 11-50% і висока більше ніж 50%. Для оцінки рівня експресії p63, використовували наступний діапазон: низький рівень – менше 30% клітин з позитивною інтрануклеарною реакцією; помірний – 30-75% позитивно забарвлених клітин; високий рівень – більше 75% клітин з позитивною інтрануклеарною міткою. Визначали індекс Ki-67/p63 (співвідношення процесів клітинної проліферації та проапоптозу).

Варіаційно-статистичну обробку одержаних морфометричних та імуноморфологічних даних здійснювали з використанням параметричних методів (t-критерію Стьюдента). Відмінності вважались статистично достовірними при рівні надійності 0,05 і вище.

#### Результати та їх обговорення

В результаті проведеного дослідження встановлені певні особливості процесів проліферативної активності епітелію слизової оболонки шийки матки при ЦПН, асоційованою з папіломавірусною інфекцією, у жінок з перитонеально-трубним безпліддям. (табл. 1).

Таблиця 1  
Напівкількісний аналіз білків Ki-67, p63 ектоцервіксу при ЦПН, асоційованої з ПВІ у жінок з вторинним безпліддям

Групи дослідження	n	Інтенсивність забарвлення	
		Ki-67	P63
ЦПН – I	23	++	+
ЦПН – II	19	+++	++
ЦПН – III	14	+++	+++
Контроль	5	+	-

В цервікальних біоптатах пацієнток з ЦІН-1 відмічалась позитивна експресія маркерів проліферації Ki-67. Інтрануклеарне забарвлення виявляли в базальних та парабазальних епітеліальних клітин ектоцервіксу. В ряді випадків спостерігалась негативна реакція в ядрах клітин базального шару. При ЦІН-І кількість клітин з позитивною

реакцією Ki-67 визначалась у 5-20% клітин та відмічалась у 82,6% випадках, у 4 випадках (17,4%) Ki-67 позитивних ядер виявляли у 10-50% клітин ектоцервіксу (табл. 2). Причому вагома їх частка локалізувалась у проміжному шарі.

Таблиця 2  
Рівень експресії Ki-67 ектоцервіксом при ЦІН, асоційованої з ПВІ у жінок з вторинним безпліддям (абс, %)

Групи дослідження	n	Рівень експресії Ki-67					
		<10%		10-50%		>50%	
		абс	%	абс	%	абс	%
ЦІН – І	23	19	82,6	4	17,4	0	0,0
ЦІН – ІІ	19	2	10,5	14	73,7	3	15,8
ЦІН – ІІІ	14	0	0,0	3	21,4	11	78,6
Контроль	5	5	100,0	0	0,0	0	0,0

Індекс проліферативної активності ектоцервіксу характеризувався неоднорідністю показників та коливався від 2,4% до 13,7% (рис. 1). Такий діапазон показників залежав від поширеності диспластичного процесу багаточарового плоскокого епітелію шийки матки (вогнищево чи дифуз-

но). Спостерігалась тенденція до збільшення частки проліферативних клітин у випадках поєднання ЦІН-І та ектоцервікозу з ділянками плоскоклітинної метаплазії. Середня значення ІІ при ЦІН- І становить  $9,3 \pm 4,2\%$  (рис. 1).

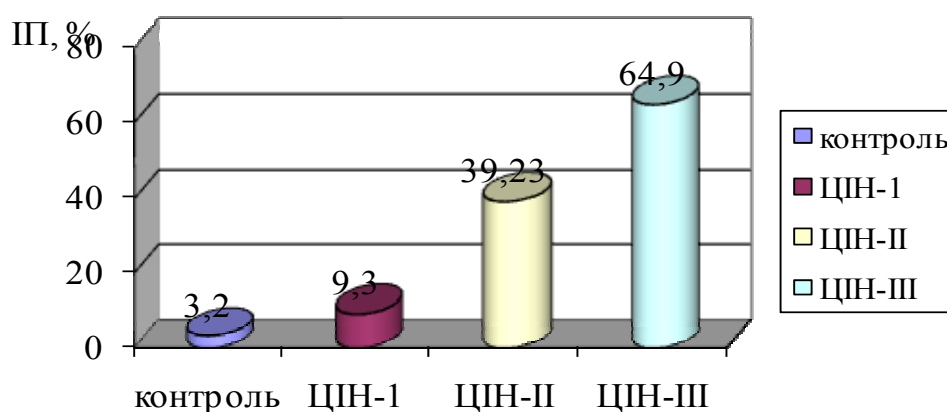


Рис. 1. Динаміка індексу проліферації (ІІ, %) при ЦІН, асоційованої з ПВІ у жінок з вторинним безпліддям.

При ЦІН-2 достовірно збільшувався рівень експресії Ki-67 (10-50%), у порівнянні з контрольною групою та при ЦІН-1, при чому клітини з позитивною експресією виявлялись також в проміжному шарі ектоцервіксу. У трьох випадках, що становить 15,8% рівень Ki-67 позитивних клітин перевищував 50%. В окремих зразках шийки матки спостерігали чергування інтрануклеарною реакцією Ki-67 з Ki-67-негативними епітеліальними клітинами. Індекс проліферативної активності коливався від 12,3% до 47,6%. Середній показник ІІ при ЦІН – ІІ становить  $39,23 \pm 4,3\%$  і є вірогідно вищим від показників

нормального ектоцервіксу та при ЦІН – 1.

При ЦІН – ІІІ експресія Ki-67 виявлялась практично у ядрах всієї товщі ектоцервіксу (> 50%) у 78,6% зразках шийки матки. Індекс проліферативної активності коливався від 20,4% до 74,9%, середнє значення становить  $64,9 \pm 4,5\%$ .

При імуногістохімічному дослідженні протоонкогену p63 спостерігалась негативна реакція у всіх зразках шийки матки контрольної групи. Епітеліальні клітини з p63 позитивними ядрами виявлялися у вогнищах диспластичного епітелію та характеризувались світло-коричневим забарвленням. Слід відмітити, що при негативній реак-

ції Ki-67 в межах базального шару при ЦН - I, у 2 випадках, що становить 8,7%, спостерігалась непластична проліферація епітеліальних клітин, яка досягала проміжного шару ектоцервіксу

(табл.3). При ЦН-I у 21 випадку (91,3%) виявлялись <30% клітин з позитивною інтрануклеарною міткою. Медіана експресії в даній групі становила 24,6±3,9%.

Таблиця 3  
Рівень експресії p63 ектоцервіксом при ЦН, асоційованої з ПВІ у жінок з вторинним безпліддям (абс, %)

Групи дослідження	n	Рівень експресії p63					
		<30%		30-75%		>75%	
		абс	%	абс	%	абс	%
ЦН – I	23	21	91,3	2	8,7	0	0,0
ЦН – II	19	1	5,2	18	94,7	0	0,0
ЦН – III	14	0	0	3	21,4%	11	78,6%
Контроль	5	5	100,0	0	0,0	0	0,0

При ЦН – II значно зростає ступінь позитивної реакції p63. У 18-ти випадках спостерігали помірний рівень експресії p 63 у багатошаровому плоскому епітелії шийки матки (в середньому – 59,3±3,7%). В зразках тканини шийки матки з наявністю ектоцервікозу позитивні мітки p63 спостерігали і в залозистому епітелії. Крім цього, такі ж клітини зустрічали і в стромі шийки матки.

При ЦН-III спостерігали надмірну експре-

сію протонкогену p63, в окремих випадках досягаючи сквамозного епітелію ектоцервіксу. Медіана позитивної інтрануклеарної реакції p63 становила 81,4±3,5%

З метою встановлення спрямованості процесів клітинного оновлення в клітинах багатошарового плоского епітелію шийки матки, визначений індекс Ki-67/p63 (співвідношення процесів клітинної проліферації та проапоптозу) (табл.4).

Таблиця 4  
Індекс оцінки процесу клітинного оновлення ектоцервіксу при ЦН, асоційованої з ПВІ (M±m)

Індекс	Групи дослідження			
	Контроль	ЦН – I	ЦН – II	ЦН – III
Ki-67/p63	0,83 ± 0,25	0,97 ± 0,13 °	1,64 ± 0,23*	1,73±0,21•

Примітка: ° -  $p \geq 0,05$  між показниками контрольної групи та показниками ЦН-I; \* –  $p < 0,05$  при порівнянні з показниками контрольної групи та показниками при ЦН-II; • -  $p < 0,01$  між показниками контрольної групи та показниками ЦН-III.

З прогресуванням непластичних змін, нами зареєстровано вірогідно посилена експресія маркеру Ki-67 у порівнянні з показниками контрольної групи. Однак, спрямованість процесів клітинного оновлення при ЦН – I, характеризується збереженням індексу співвідношення процесів клітинної проліферації і проапоптозу Ki-67 та p63 близькими до показників контрольної групи ( $p \geq 0,05$ ). При неопластичній трансформації багатошарового плоского епітелію шийки матки показники цього індексу збільшуються в 1,7 та 2,0 рази при ЦН-II ( $p < 0,05$ ) та ЦН – III ( $p < 0,01$ ) відповідно з показниками контрольної групи та ЦН – I. Отримані дані свідчать про те що на процеси клітинного оновлення як в нормі так і при ЦН – I ст. впливають процеси проліферації та апоптозу.

Таким чином, встановлено, що в міру прогресування непластичних змін шийки матки крім зростаючої проліферативної активності, відбувається активація проапоптозних програм.

#### Висновки

1. При цервікальній інтраепітеліальній неопла-

стазії у жінок з вторинним безпліддям спостерігається активація процесу клітинної проліферації. Індекс проліферативної активності при ЦН – I становить 9,3±4,2%, при ЦН – II – 39,23±4,3% та при ЦН – III – 64,9±4,5%

2. Показники p63, маркеру непластичних клітин, дозволяють об'єктивізувати верифікацію діагнозу цервікальної інтраепітеліальної неоплазії та встановлення ступеня диспластичного процесу багатошарового плоского епітелію шийки матки.

3. У жінок з ЦН – II та ЦН – III має місце збільшення індексу, що відображає співвідношення процесів клітинної проліферації та проапоптозу (Ki-67/p63) до 2-ох разів, що вказує на активацію проапоптозних програм, у порівнянні з контролем та ЦН – I.

**Перспективи подальших досліджень** полягають у вивченні додаткових імуногістохімічних аспектів, а саме інгібітора цикліназалежної кінрази p16 INK4a ектоцервіксу при цервікальній інтраепітеліальній неоплазії, асоційованою з папіломавірусною інфекцією у жінок з вторинним

### Літературні джерела

Волошина Н. Н. Цервикальные интраэпителиальные неоплазии [Метод. рекомендации ЗМАПО] / Н. Н. Волошина. – К., 2007 – 36 с.

Горбоконь Н. М. Проліферативна активність епітеліальних клітин дисплазії тяжкого ступеня, початкового та інвазивного раків шийки матки / Н. М. Горбоконь // Вестник неотложной и восстановительной медицины. – 2006. – Т. 7, № 4. – С. 639-642

Далленбах-Хеллвег Г. Традиционные и новые молекулярные методы для ранней детекции рака шейки матки / Гизела Далленбах-Хеллвег, Маркус Й. Трунк, Магнус фон Кнебель Деберец // Архив патологии. – 2004. - №5. – С. 35 – 40.

Дорохова О. В. Експресія Ki67, p<sup>16INK4A</sup> та p53 як показники онкогенної трансформації та ймовірності прогресії цервікальних інтраепітеліальних неоплазій / О. В. Дорохова // Морфологія. – 2007. – Том 1, №1. – С. 45-55.

Зотиков Л. О. Клініко-морфологічні особливості ураження шийки матки при папіломавірусній інфекції/ Л. О. Зотиков, І. Б. Вовк, А. О. Калюта // Репродуктивное здоровье женщины. – 2007. - № 3. – С. 104-109.

Малышкин И. Н. Патогенез бесплодия у женщин / И. Н. Малышкин // Лікувальна справа. – 1997. - № 6. – С. 96-100.

Овсянникова Т. В. Бесплодный брак / Т. В.

Овсянникова, И. Е. Корнеева // Акушерство и гинекология. – 1998. - № 1. – С. 32-36.

Characterization of human papillomavirus infection, p53 and Ki-67 expression in cervix cancer of Mozambican women / Carrillo C., Gouveia P., Cantel M. [et al.] // Pathol. Res. Pract. – 2003. – Vol.199, №5. – P. 303 – 311.

G2 checkpoint sn unerine cervical cancer with HPV 16 E6 according to p53 polymorphism and its screening value / N. H. Cho, S. Y. Lim, Y. T. Kim [et al.] // Gynecol. Oncol. – 2003. – Vol. 90, № 1. – P. 15 -22.

Ki-67, cydin E, and P 16 ink4a are complimentary surrogate biomarkers for human papilloma virus-related cervical neoplasia / J. T. Keating, A. Cviko, S. Riethdorf [et al.] // Am. J. Surg. Pathol. – 2001. – Vol. 25. – P. 884-891.

Oliveira L. HPV 16 detection in cervical lesions, physical state of viral DNA and changes in p53 gene / L. Do Horto dos Santos Oliveira, E.V. Rodrigues, A.P. Salles Lopes // San Paulo Med. J. – 2003. – Vol. 121, № 2. – P. 67-71.

Quantitative molecular parameters to identify low-risk and high-risk early CIN lesions: role of markers of proliferative activity and differentiation and Rb availability / A. J. Kruse, I. Skaland, E. A. Janssen [et al.] // Int. J. Gynecol. Pathol. – 2004. – Vol. 23, № 2. – P. 100 - 109.

### **Киндратив Э.О. Клеточное обновление шейки матки при цервикальной интраэпителиальной неоплазии, асоциированной с папилломавирусной инфекцией у женщин с вторичным бесплодием.**

**Резюме.** В статье представлены результаты иммуногистохимического исследования процессов клеточного обновления эктоцервикса при цервикальной интраэпителиальной неоплазии с использованием моноклональных антител Ki-67 и p63 (DakoCytomation). В работе использовали биопсийный материал шейки матки 56 женщин при вторичном бесплодии, у которых в цервикальных мазках идентифицировали вирус папилломы человека высокого онкогенного риска. При цервикальной интраэпителиальной неоплазии у женщин с вторичным бесплодием наблюдается активация процессов клеточной пролиферации. Индекс пролиферативной активности при ЦИН – I составляет 9,3±4,2%, при ЦИН – II – 39,23±4,3% та при ЦИН – III – 64,9±4,5%. Направленность процессов клеточного обновления характеризуется возрастанием индекса соотношения процессов клеточной пролиферации и проапоптоза (Ki-67/p63). Таким образом, установлено, что с прогрессированием диспластических изменений шейки матки кроме возрастающей пролиферативной активности происходит активация процессов проапоптозных программ.

**Ключевые слова:** клеточное обновление, цервикальная интраэпителиальная неоплазия, вторичное бесплодие.