

УДК 616-076.5+618.146-002.446+616-022.6

ІМУНОГІСТОХІМІЯ В ДІАГНОСТИЦІ ІНТРАЕПІТЕЛІАЛЬНИХ УРАЖЕНЬ ШИЙКИ МАТКИ ВІРУСНОГО ГЕНЕЗУ

КРАВЧУК І.В.

м. Івано-Франківськ

Генітальна папіломавірусна інфекція (ГПВІ) відіграє вирішальну роль у виникненні фонних та передпухлинних захворювань шийки матки (ШМ) серед жінок репродуктивного віку [4]. На сьогодні доведений вплив високоонкогенних типів вірусу папіломи людини (ВПЛ) у розвитку пухлинної трансформації клітин та її подальшої прогресії в цервікальну інтраепітеліальну неоплазію і рак шийки матки [1,7]. Повільний, але невпинний ріст захворюваності на цервікальну онкопатологію змушує постійно шукати нові діагностичні підходи для ранньої та ефективної верифікації передпухлинних процесів ШМ. Водночас, діагностика неоплазій значно залежить від суб'єктивних факторів, що сприяє хибній інтерпретації цитологічних та гістологічних заключень. Вагоме значення в таких випадках має аналіз експресії імуногістохімічних маркерів, які є індикаторами процесів проліферації та онкотрансформації і дають змогу об'єктивізувати отримані патоморфологічні дані, що дозволяє уникнути помилкових результатів [2].

Антиген Ki-67 представляє собою універсальний маркер проліферації і відіграє роль своєрідного "таймера" в циклі поділу клітин нормальної та патологічно зміненої тканини. Оскільки він володіє властивістю експресуватись у фракції проліферуючих клітин, це зумовлює можливість його використання з прогностичною метою перебігу неопластичних процесів в ШМ [8].

Основний момент в теорії канцерогенезу належить теорії активації та інактивації генів, що відповідають за пухлинний ріст. Ключовим у цьому процесі є ген p53, який виконує супресорну роль, перешкоджаючи розвитку раку. Нещодавно виявлений ген p63 має високу ступінь гомології з вищезгаданим білком в ділянках трансактиваційного ДНК-зв'язуючого домену. Дослідження багатьох науковців вказують на підвищення експресії гену p63 при новоутвореннях, в зв'язку з чим набула актуальності гіпотеза, згідно якої білок p63 функціонує як природний інгібітор p53, подавляючи його функцію по домінантно-негативному механізмі [10]. Транскрипційно-неактивні тетраметри гену p63 можуть конкурувати з p53 за місце посадки на ДНК генів мішеней, а мономери – секвеструвати p53 шляхом зв'язування його молекул і утворення неактивних комплексів. Високі рівні білка p63 характерні для злоякісних клітин різних локалізацій.

Завдяки впровадженню в практику імуногістохімічного визначення інгібітора циклін-залежних кіназ p16INK4a, виявилось можливим вивчення патогенезу патології ШМ вірусної етіології [9]. Даний білок, беручи участь у регуляції клітинного циклу, в нормальних епітеліальних клітинах ШМ експресується в дуже малій кількості і вказує на активацію онкопротеїнів E6 і E7. Розлади регуляції p16INK4a більшість авторів пов'язують із пригніченням функції білка-супресора пухлинного росту pRb, в результаті формування інактивуючих комплексів з онкопротеїном E7. При цервікальних пренео- і неопластичних процесах на тлі інфікування ВПЛ, має місце функціональна інактивація pRb білком E7 ВПЛ. Це призводить до накопичення білку p16, тому його розглядають як непрямий маркер активної онкогенної експресії ВПЛ високого канцерогенного ризику.

Метою дослідження було визначення експресії білків p16INK4A, Ki67 та p63 в цервікобіоптатах жінок з патологією шийки матки при персистуючій папіломавірусній інфекції високого канцерогенного ризику на етапі морфологічної діагностики і в процесі лікування.

Матеріали і методи дослідження

До та після лікування обстежено 130 жінок репродуктивного віку (віком 22 – 45 років), які склали 3 групи: I – 52 жінки з патологією ШМ на тлі ГПВІ, що отримували розроблену нами комплексну методику лікування; II – 48 жінок з патологією ШМ на тлі ГПВІ, що отримували загальноприйняте лікування та III (група контролю) – 30 практично здорових жінок. Основою запропонованої нами методики лікування були препарат кагоцел та озонотерапія [5].

Поліклональний індуктор інтерферону "Кагоцел", створений на основі синтезу високомолекулярної целюлози та госиполу, володіє високою хіміотерапевтичною активністю у відношенні вірусів та бактерій. Кагоцел стимулює утворення ендogenous інтерферону практично у всіх клітинах імунної системи та здатний формувати стійку резистентність організму до вірусів протягом тривалого часу після його введення за рахунок тривалої індукції і циркуляції інтерферону. В результаті описаного механізму дії індуктора інтерферонів підвищується ефективність імунного розпізнавання антигенів та посилюється фагоцитарна й цитолітична функції, які спрямовані на елімінацію збудника. Препарат застосовували перорально за схемою 2 таблетки (0,024г активної речовини) 3 рази в день протягом 5 днів (всього на курс 30 таблеток).

Одночасно з противірусною метою застосовували озонотерапію, яка володіє бактерицидним, імуномодуючим та потужним вірусцидним ефектами [3]. Вірицидний вплив озону реалізується через окислення поверхневих рецепторів віріону та порушення синтезу вірусних білків. Пацієнтки з діагностованою вірусною інфекцією отримували озонований фізіологічний розчин в кількості 200 мл з концентрацією озону 1,5-3 мг/л та місцеве інтрацервікальне підслизове введення 1мл розчину з концентрацією озону 3-10 мг/л. Курс лікування складав 10-14 процедур.

З метою верифікації діагнозу використовували загальноклінічний, кольпоскопічний, цитологічний, морфологічний, молекулярно-біологічний, імунологічний та імуногістохімічний методи обстеження.

Клініко-анатомічний матеріал був розподілений на 4 групи: 25 випадків ендocerвікозу; 26 – кондиллом; 28 – ЦІН-I (неоплазія легкого ступеня); 21 – ЦІН-II (неоплазія помірно-го ступеня).

Для проведення імуногістохімічного дослідження зрізи товщиною 4-5 мкм наносились на предметне скло, попередньо оброблене адгезивною рідиною. Після стандартної депарафінізації проводили нагрівання на водяній бані в цитратному буфері з рН=6,0 і автоклавування. Як первинні використовували моноклональні антитіла до p63 (клон 4A4, DakoCytomation), Ki-67 (клон MIB-1, DakoCytomation), p16INK4A (kit для гістологічних препаратів, №K5334, DakoCytomation). Подальшу обробку проводили з використанням системи візуалізації LSAB2 та EnVision (DakoCytomation). Клітини, позитивні у відношенні експресії маркерів, вивчали на 4-6 випадково обраних полях зору мікроскопа. Після підрахунку 300 гістологічно ідентифікованих клітин обчислювали показники експресії за результатами всіх вивчених ділянок, враховуючи реакції у нормальних і неопластично змінених клітинах епітеліального шару.

Результати дослідження та їх обговорення

В результаті проведеного дослідження встановлені певні особливості процесів проліферативної активності епітелію слизової оболонки ШМ (Ki-67), рівня експресії маркера неопластичної трансформації (p63) та p16 INK4a при гіперпластичних і неопластичних процесах, що асоційовані з ВПЛ високого канцерогенного ризику.

Згідно отриманих даних імунопозитивні реакції з антитілами до Ki-67 виявляли при всіх випадках гіпер- та неопластичних процесів, причому, з наростанням ступеню неопластичного процесу кількість клітин, які позитивно реагують на даний білок, вірогідно збільшувалась в порівнянні з нормою. Оскільки антиген Ki-67 здатний експресуватись у фракції проліферуючих клітин, ми виявляли Ki-67 позитивні клітин в нашому дослідженні при фонових гіперпластичних захворюваннях ШМ та в жінок з групи контролю. Індекс проліферації в практично здорових жінок склав $3,22 \pm 0,21$, що було достовірно нижчим від показників жінок I та II групи ($p < 0,001$). Гіперекспресію Ki-67 вважали прогностично несприятливою ознакою в перебігу хвороби. При ЦІН-I індекс проліферативної активності ектоцервіксу складав $9,30 \pm 0,55$ та $9,10 \pm 1,0\%$ для I та II групи. При ЦІН-II достовірно збільшувався рівень експресії Ki-67, у порівнянні з контрольною групою та з ЦІН-I, індекс проліферативної активності складав $19,23 \pm 1,17$ і $18,80 \pm 1,13\%$ для I та II групи.

На тлі проведеного лікування за власною методикою індекс проліферації був достовірно нижчим відносно показників до лікування ($p < 0,001$; $p < 0,01$). Загальноприйнята те-

рапія була менш ефективною, про що свідчить недостовірна різниця між показниками до і після лікування ($p_3 > 0,05$) (табл. 1).

Таблиця 1

Індекс проліферації Ki-67 ($M \pm m$), % епітелію ШМ до і в процесі лікування

Гістологічний діагноз	Групи				Контр
	До лікування		Після лікування		
	I	II	I	II	
Ендоцервікоз	12,21±1,35 $p_4 < 0,001$ (n=13)	11,80±1,33 $p_4 < 0,001$ $p_1 > 0,05$ (n=12)	6,70±0,99 $p_2 < 0,005$ (n = 13)	9,62±0,97 $p_1 < 0,05$ $p_3 > 0,05$ (n = 12)	3,22±0,21
Кондиломи	18,53±1,28 $p_4 < 0,001$ (n=14)	18,30±1,37 $p_4 < 0,001$ $p_1 > 0,05$ (n=12)	12,30±1,80 $p_2 < 0,01$ (n = 14)	16,9±1,10 $p_1 < 0,05$ $p_3 > 0,05$ (n = 12)	
ЦІН-I	9,30±0,55 $p_4 < 0,001$ (n=14)	9,10±1,07 $p_4 < 0,001$ $p_1 > 0,05$ (n=14)	5,50±0,49 $p_2 < 0,001$ (n = 14)	7,2±0,65 $p_1 < 0,05$ $p_3 > 0,05$ (n = 14)	
ЦІН-II	19,23±1,17 $p_4 < 0,001$ (n=11)	18,80±1,13 $p_4 < 0,001$ $p_1 > 0,05$ (n=10)	10,10±0,86 $p_2 < 0,005$ (n = 11)	16,7±1,23 $p_1 < 0,001$ $p_3 > 0,05$ (n = 10)	

Примітка: - p_1 – до величини I групи; - p_2 – до величини I групи до лікування; - p_3 – до величини II групи до лікування; - p_4 – до величини контролю.

Динаміку рівнів експресії протоонкогену p63 при використанні загальноприйнятої та запропонованої нами терапії відображає табл. 2. В результаті імуногістохімічних досліджень виявляли, що при різних ступенях нео- та диспластичних процесів кількість клітин, позитивно реагуючих на p63, достовірно збільшувалась в порівнянні з нормою ($p_4 < 0,001$). На тлі проведеного лікування показники I групи були достовірно нижчими відносно показників до лікування ($p_2 < 0,001$), а між показниками до і після лікування в II групі зберігалась недостовірність ($p_3 > 0,05$), що свідчить про недостатній терапевтичний ефект даної терапії (табл. 2).

Таблиця 2

Рівень експресії p63 ($M \pm m$), % епітелію ШМ до і в процесі лікування

Гістологічний діагноз	Групи				Контр
	До лікування		Після лікування		
	I	II	I	II	
Ендоцервікоз	27,80±1,76 $p_4 < 0,001$ (n=13)	26,30±1,73 $p_4 < 0,001$ $p_1 > 0,05$ (n=12)	7,40±0,74 $p_2 < 0,001$ (n = 13)	19,4±1,45 $p_1 < 0,001$ $p_3 < 0,05$ (n = 12)	0,50±0,03
Кондиломи	39,40±1,75 $p_4 < 0,001$ (n=14)	39,80±1,60 $p_4 < 0,001$ $p_1 > 0,05$ (n=12)	25,43±1,65 $p_2 < 0,001$ (n = 14)	35,07±1,87 $p_1 < 0,001$ $p_3 > 0,05$ (n = 12)	
ЦІН-I	19,30±0,83 $p_4 < 0,001$ (n=14)	18,70±0,96 $p_4 < 0,001$ $p_1 > 0,05$ (n=14)	5,14±0,36 $p_2 < 0,001$ (n = 14)	12,30±0,68 $p_1 < 0,001$ $p_3 > 0,05$ (n = 14)	
ЦІН-II	54,70±3,20 $p_4 < 0,001$ (n=11)	53,80±3,07 $p_4 < 0,001$ $p_1 > 0,05$ (n=10)	18,60±1,09 $p_2 < 0,001$ (n = 11)	46,30±2,14 $p_1 < 0,001$ $p_3 > 0,05$ (n = 10)	

Примітка: - p_1 – до величини I групи; - p_2 – до величини I групи до лікування; - p_3 – до величини II групи до лікування; - p_4 – до величини контролю.

Визначення експресії p16 INK4a в тканині ШМ дозволило нам деталізувати аспекти цервікального канцерогенезу. Відомо, що зафарбовування p16 в здоровому цервікальному сквамозному епітелії цілком відсутнє, або, в окремих випадках, фокально позитивне. Зокрема, на мікроскопічному рівні, при плоскоклітинній метаплазії в групі контролю спостерігали фізіологічну експресію p16 внаслідок процесів трансдиференціювання у 3 жінок. Натомість, при ендocerвікозах, кондиломах та неоплазії інтенсивність експресії наростала від слабкої до дифузної у всіх випадках. Аналізуючи показники p16 INK4a епітелію ШМ до лікування, виявляли достовірне зростання клітин, які позитивні до p16 INK4a при дис- і неопластичних процесах ШМ, що суттєво відрізнялось від групи контролю ($p_4 < 0,001$). Проведене лікування засвідчило кращу ефективність запропонованої методики ($p_2 < 0,001$), в порівнянні з загальноприйнятою ($p_3 > 0,05$) (табл. 3).

Таблиця 3

Рівень експресії p16 INK4a ($M \pm m$), % епітелію ШМ до і в процесі лікування

Гістологічний діагноз	Групи				Контр
	До лікування		Після лікування		
	I	II	I	II	
Ендocerвікоз	9,75±1,09 p4<0,001 (n=13)	9,30±1,01 p4<0,001 p1>0,05 (n=12)	2,20±0,22 p2<0,001 (n = 13)	5,20±0,28 p1<0,001 p3<0,005 (n = 12)	0,40±0,04
Кондиломи	20,30±1,03 p4<0,001 (n=14)	20,80±1,04 p4<0,001 p1>0,05 (n=12)	10,30±0,93 p2<0,001 (n = 14)	18,40±1,07 p1<0,001 p3>0,05 (n = 12)	
ЦІН-I	19,60±1,27 p4<0,001 (n=14)	19,20±1,38 p4<0,001 p1>0,05 (n=14)	11,90±1,00 p2<0,001 (n = 14)	17,30±1,21 p1<0,005 p3>0,05 (n = 14)	
ЦІН-II	30,40±1,53 p4<0,001 (n=11)	29,80±1,60 p4<0,001 p1>0,05 (n=10)	17,20±1,18 p2<0,001 (n = 11)	25,20±1,62 p1<0,005 p3>0,05 (n = 10)	

Примітка: - p1 – до величини I групи; - p2 – до величини I групи до лікування; - p3 – до величини II групи до лікування; - p4 – до величини контролю.

Висновки

Таким чином, результати проведеного дослідження засвідчили високу чутливість імуногістохімії у верифікації диспластичних та неопластичних процесів шийки матки. Аналіз експресії імуногістохімічних маркерів дає можливість діагностувати залучення тих чи інших індивідуальних білків в різні патологічні процеси та з'ясувати роль молекулярних структур в перебігу та забезпеченні різних функцій організму. За допомогою імуногістохімічної реакції на Ki-67 можна оцінити число проліферуючих клітин, діагностувавши ступінь проліферації на тлі істинної неоплазії. Імуногістохімічне дослідження p16INK4a дозволило виявити вогнища пухлинного процесу, межі його розповсюдження та встановити зв'язок між його експресією та вираженістю патологічних змін епітелію. Експресія Ki-67, p63 та p16INK4a достовірно збільшується по мірі наростання рівня онкотрансформації епітелію шийки матки. Застосування розробленої комплексної методики дозволяє істотно знизити показники експресії білків p16INK4A, Ki67 та p63 в порівнянні з загальноприйнятими схемами лікування.

ЛІТЕРАТУРА

1. Гончарова Я. А. Патогистология образований, обусловленных папилломавирусной инфекцией / Я. А. Гончарова // Український морфологічний альманах. – 2008. – № 3. – С. 96–98.

2. Дорохова О. В. Діагностичне та прогностичне значення експресії маркерів при диспластичних та неопластичних процесах шийки матки (імуноморфологічні аспекти): автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. мед. наук : спец. 14.03.02 "Патологічна анатомія" / О. В. Дорохова. – Дніпропетровськ, 2007. – 20 с.
3. Застосування озонотерапії в акушерстві і гінекології (методичні рекомендації) // Міністерство охорони здоров'я України, Український центр наукової медичної інформації та патентно-ліцензійної роботи. – Київ. – 2005. – 39с.
4. Кисина В. И. Патологические процессы слизистой оболочки шейки матки, ассоциированные с вирусом папилломы человека / В. И. Кисина, А. А. Кубанов // Вестник дерматологии и венерологии. – 2005. – № 4. – С. 29–32.
5. Пат. 28999 Україна, МПК А 61 Р 31/00. Спосіб лікування патології шийки матки асоційованої з папіломавірусною інфекцією / Кравчук І. В., Дрінь Т. М.; заявл. 27.09.07; опубл. 25.12.07, Бюл. № 21.
6. Burd E. Human papillomavirus and cervical cancer / E. Burd // Clin. Microbiol. Rev. – 2003. – № 16. – Р. 1–17.
7. HPV in the etiology of human cancer / N. Munoz, X. Castellsaque, A. Berrington de Gonzales [et al.] // Vaccine. – 2006. – Vol. 24, № 3. – Р. 1–10.
8. Immunohistochemical analysis of estrogen receptors, progesterone receptors, Ki-67 antigen, and human papillomavirus DNA in normal and neoplastic epithelium of the uterine cervix / K. Ikuo, F. Shingo, N. Hirofumi [et al.] // Cancer. – 2006. – Vol. 68, № 6. – Р. 1340–1350.
9. Overexpression of P 16 ink4a as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri / R. Klaes, T. Friedrich, D. Spitkovsky [et al.] // Int. J. Cancer. – 2001. – № 92. – Р. 276–284.
10. Von Knebel Doeberitz M. New markers for cervical dysplasia to visualise the genomic chaos created by aberrant oncogenic papillomavirus infections / M. Von Knebel Doeberitz // Eur. J. Cancer. – 2002. – № 38. – Р. 2229–2242.

УДК 616-097-018.1:618.39-06

ОСОБЛИВОСТІ СТАНУ КЛІТИННОЇ ЛАНКИ ІМУННОЇ СИСТЕМИ У ВАГІТНИХ З ПЕРЕДЧАСНИМ РОЗРИВОМ ПЛОДОВИХ ОБОЛОНОК В ТЕРМІНАХ ГЕСТАЦІЇ 25-28 ТИЖНІВ

КРУТЬ Ю.Я., ПУЧКОВ В.А., БОНДАРЕНКО С.А., ШЕВЧЕНКО Г.О.

м. Запоріжжя

Серед проблем сучасного акушерства невиношування вагітності займає одне з перших місць, тому що визначає високий рівень перинатальної і малюкової захворюваності та смертності. Незважаючи на певні успіхи, досягнуті в перинатології та фармакотерапії частота передчасних пологів не має стійкої тенденції до зниження і складає від 5 до 9% [3, 5, 6]. Однією з найчастіших причин ранніх передчасних пологів (ПП) є передчасний розрив плодових оболонок (ПРПО), який спостерігається при цій патології у 34,9-56% жінок. Високий ризик розвитку перинатальних інфекцій і гнійно-септичних ускладнень матері, що в більшості випадків виявляються у вигляді хоріоамніоніту, післяпологового ендоміометриту і, рідше, септичних станів на фоні ПРПО обмежує широке поширення тактики активної пролонгації вагітності, вимагає правильної і своєчасної оцінки чинників ризику гнійно-септичних ускладнень і розробки прогностичних і ранніх діагностичних критеріїв реалізації інфекційного процесу [2]. Дослідження останніх років свідчать про важливу роль локальних та системних імунних процесів в регуляції імунної відповіді матері під час