

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

ННЦ «Інститут біології та медицини»
Кафедра цитології, гістології та
репродуктивної медицини

Завідувач кафедри _____
проф. Микола ДЗЕРЖИНСЬКИЙ
Протокол № ____ засідання кафедри
від “ ____ ” _____ 2023 р.

**МОРФОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ЕПТЕЛЮ ШИЙКИ МАТКИ
ТА ЦЕРВІКАЛЬНОГО КАНАЛУ У ЖІНОК З АЛКОГОЛІЗМОМ,
ТЮТЮНОКУРІННЯМ ТА НАРКОМАНІЄЮ**

Випускна кваліфікаційна робота магістра
денної форми навчання
за спеціальністю 091 «Біологія»
Дмитерчука Богдана Володимировича
Науковий керівник від кафедри
канд. біол. наук, доц. Пустовалов А.С.

Робота виконана на базі ДУ “Інституту педіатрії, акушерства і гінекології
імені академіка О.М. Лук’янової НАМН України” під керівництвом
кандидата медичних наук, провідного наукового співробітника Пустовалової
Ольги Іванівни.

Оцінка захисту роботи

Київ – 2023 р.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ВПГ-2	– вірус простого герпеса другого типу
ВПЛ	– вірус папіломи людини
ГГІ	– генітальна герпесна інфекція
ДНК	– дезоксирибонуклеїнова кислота
ЕР	– рецептор до естрогенів
ПЛР	– полімеразна ланцюгова реакція
ПР	– рецептор до прогестерону
РШМ	– рак шийки матки
СІН	– цервікальна інтраепітеліальна неоплазія
hrHPV	– вірус папіломи людини типів високого онкогенного ризику

ЗМІСТ

ВСТУП	5
РОЗДІЛ 1. Огляд літератури.....	6
1.1 Історія та характеристика класифікації системи Bethesda.....	7
1.2 Вірус папіломи людини як етіологічний фактором розвитку раку шийки матки та його передвісників.....	11
1.3 Особливості складу вагінального мікробіому.....	12
1.4 Взаємодія мікробіому з місцевим мікрооточенням та захист від інфекційних агентів.....	14
1.5 Захисні механізми жіночої репродуктивної системи пов'язані з Lactobacillus.....	16
1.6 Зв'язок модифікації цервіко-вагінальної мікробіоти та рівня прозапальних цитокінів.....	17
1.7 Оксидативний стрес та зміни шийки матки.....	20
1.8 Вплив на репродуктивну систему тютюнокуріння та ризикованої поведінки, зловживання алкоголем та іншими наркотичними речовинами...	23
РОЗДІЛ 2. Матеріали та методи дослідження.....	26
2.1. Розподіл пацієнток за групами для проведення дослідження.....	26
2.2. Загальноцитологічні та морфометричні методи дослідження.....	27
2.3. Оцінка диспластичних процесів згідно з класифікацією «Bethesda system»	28
2.4. Бактеріоскопія мазків виділень, пофарбованих по Граму та за методикою Романовського-Гімзе.....	29
2.5. Метод ПЛР для тестування досліджуваного матеріалу - цервікального слизу.....	30
2.5. Статистична обробка та одержання мікрофото.....	30

РОЗДІЛ 3. Результати досліджень та обговорення	32
3.1. Цитологічні особливості епітелію шийки матки та цервікального каналу у жінок групи контролю репродуктивного віку без шкідливих звичок та без проявів запальних процесів репродуктивних органів	32
3.2. Цитологічні особливості епітелію шийки матки та цервікального каналу жінок репродуктивного віку групи, що зловживають наркотиками	42
3.3. Цитологічні особливості епітелію шийки матки та цервікального каналу жінок репродуктивного віку, що зловживають алкоголем	Error! Bookmark not defined.
3.4. Цитологічні особливості епітелію шийки матки та цервікального каналу жінок репродуктивного віку з тютюнокурінням	61
3.5. Результати досліджень інфекційних агентів, що відіграють роль в патогенезі захворювань шийки матки.....	70
ВИСНОВКИ	77
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	78

ВСТУП

У деяких жінок шлях до народження дітей проходить без хвилювань за наслідки своїх шкідливих звичок, але в інших цей процес може бути ускладнений проблемами. Жінка може взагалі відмовитися від народження дітей або відкласти цей період на потім. Однак, в будь-якому випадку жінкам репродуктивного віку важливо стежити за своїм здоров'ям.

Тому **актуальним** є провести комплексне дослідження із застосовувати сукупність доступних інструментів для визначення інфекційних агентів та типу цитологічних мазків від жінок, що постійно зловживають етиловим спиртом, нікотинном, метадоном.

Метою нашої роботи було виявити морфологічні особливості епітелію шийки матки та цервікального каналу жінок жінок, що постійно зловживають етиловим спиртом, нікотинном, метадоном.

Для досягнення мети поставлено наступні **завдання**:

1. На підставі загальноцитологічних методів дослідження виявити особливості клітин епітелію піхвової поверхні і цервікального каналу шийки матки

2. На підставі загальноцитологічних методів дослідження провести морфометричний аналіз клітинного складу мазків з піхвової поверхні та цервікального каналу шийки матки з урахуванням клітин запальної інфільтрації (нейтрофілів, лімфоцитів) та макрофагальної реакції у порівняльному аспекті.

3. Визначити морфологічні зміни епітелію шийки матки жінок репродуктивного віку із шкідливими звичками.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

Серед злоякісних новоутворень у жінок рак шийки матки посідає четверте місце у всьому світі – це є серйозною проблемою для охорони здоров'я. В 2020 році було зафіксовано в межах 590 000 нових випадків та 327 000 смертей, основну частину складають розвиваючі країни [23]. Одним з основних факторів розвитку раку шийки матки є вірус папіломи людини типів високого онкогенного ризику [45]. Серед сексуально активних жінок дуже поширена інфекція папіломи людини типів високого онкогенного ризику. 90% інфекцій папіломи людини типів високого онкогенного ризику являються транзиторними та спонтанно регресують [38]. Приблизно 80% становить ризик інфікування жінки будь-яким типом ВПЛ протягом життя, тоді як ризик розвитку раку шийки матки – 0,6% [19]. Інфікування hrHPV є фактором, але недостатнім для розвитку раку шийки матки, і додаткові фактори беруть участь у розвитку, прогресуванні або регресії захворювання. Деякі з цих факторів, наприклад не тільки тип залученого вірусу, а такі як: індивідуальний імунітет, куріння, вживання алкоголю та наркотичних речовин, використання гормональних контрацептивів і сексуальна поведінка [78].

Дослідження, проведені протягом останнього десятиліття, засвідчили мінливий і складний склад вагінального мікробіому. Персистуюча ВПЛ-інфекція типів hrHPV є основним фактором ризику розвитку майже всіх типів геніального раку. Останні дані свідчать про те, що наявність і чисельність деяких видів бактерій може запобігти зараженню ВПЛ і сприяти виведенню вірусу, знизити ризик розвитку попередників раку в цих анатомічних ділянках. І навпаки, інші типи бактерій можуть сприяти розвитку патологічного стану. Таким чином, розуміння впливу складу вагінального мікробіому та його змін на персистенцію ВПЛ може сприяти

кращому прогнозуванню результатів. Крім того, чітка ідентифікація бактеріальних компонентів, пов'язаних із патологіями, спричиненими ВПЛ, може мати клінічне значення та надати можливість для альтернативних терапевтичних стратегій. Наявні на даний момент технології дозволяють проводити швидкий високопродуктивний аналіз. Тому варто застосовувати інструменти в дослідженнях для визначення типу цитологічних мазків від жінок для комплексу профілактики, лікування, розуміння прогресування або регресії пов'язаних з ВПЛ патологій шийки матки, піхви та вульви [47].

1.1 Історія та характеристика системи Bethesda

Папаніколау відкрив світові цервікальну цитологію. Його знакова публікація у співпраці з HF Traut «Діагностика раку матки за допомогою вагінального мазка» у 1943 році проклала шлях до діагностики уражень шийки матки за допомогою простого та ефективного методу. Згодом, у 1951 році, Ейр вперше описав і проілюстрував клітини плоского епітелію з перинуклеарним «ореолом» у мазках із шийки матки. Тоді Річарт у 1966 році ввів класифікацію цервікальної інтраепітеліальної неоплазії (CIN) з CIN I, CIN II та CIN III на основі архітектури тканини [38].

В грудні 1988 року невелика група експертів з досвідом в цитології, гістопатології та клінічній гінекології взяла участь у зустрічі, яку підтримав Національний інститут раку в місті Бетесда, штат Меріленд, з метою розробки системи для обліку ПАП-тестів, яка б чітко допомагала клініцистам в цитологічній інтерпретації. Результатом першої зустрічі стала Система 1988. Нова термінологія відображала три фундаментальні принципи [6]:

1. Номенклатура повинна відображати релевантну лабораторну інформацію для замовника медичних послуг.

2. Номенклатура повинна бути однаковою та відтворюваною у різних патологів та в різних лабораторіях, а також гнучкою для адаптування в лабораторіях по всьому світу.

3. Номенклатура повинна відображати найновітніше розуміння цервікальної неоплазії.

Спочатку, багато хто зустрів нову номенклатуру зі скептицизмом, не тільки через те, що вона мала замінити класифікації, прийняті десятиліття тому, але й тому, що вона прибирала діагностичну категорію помірної дисплазії або цервікальної інтраепітеліальної неоплазії 2 (CIN2). Традиційно, клітинні зміни, спричинені вірусом папіломи людини вважалися окремими від клітин-попередників цервікального раку, які ділилися за двома варіаціями класифікації: в одній виділяли легку, помірну, важку дисплазію та карциному *in situ*; в іншій цервікальну інтраепітеліальна неоплазія 1, 2, 3 категорій. Дане розділення в класифікацій орієнтувалося на відображення того, що сприймалося як біологічний континуум. Система Бетесда запропонувала двостороннє розділення, сквамозні інтраепітеліальні порушення низького та високого ступеню вираженості. Ключовою причиною зменшення (або консолідування) більшості категорій наслідків дії вірусу папіломи людини, ступенів дисплазії або карциноми *in situ* до 2 видів сквамозних інтраепітеліальних порушень низького та високого ступеню вираженості була основана на принципах системи Бетесда [38] :

А) LSIL/HSIL мали чіткий критерій відмінності: LSIL часто минали самі по собі, тоді як HSIL супроводжувалися кольпоскопічними змінами.

Б) Скорочена кількість діагностичних категорій покращила варіативність та відтворюваність спостережень.

В) Дослідження передбачало, що біологія цервікальних аномалій може бути не такою лінійною та безперервною як може припускати спектр морфологічних змін.

Система Бетесда 2001 включає зміни, що ґрунтуються на клінічній ввідній інформації та прогресі в розумінні біології цервікального раку.

Термін «діагноз» замінюється на «інтерпретацію» або «результат» в заголовку заключення по цервікальній цитології. Учасники конференції Бетесда 2001 погодилися, що цервікальну цитологію слід, перш за все, розглядати як «скрінінг-тест, який в деяких випадках може слугувати медичною консультацією, надаючи інтерпретацію, яка сприяє встановленню діагнозу». Кінцевий діагноз пацієнта та план догляду включають не тільки результат цервікальної цитології, але й історію, клінічні дослідження та інші лабораторні результати, за потреби. Така зміна в номенклатурі підкреслює те, що результат цитології представляє один компонент (але не завжди може відображати) діагнозу пацієнта [6].

Останній перегляд системи Бетесда було зроблено в 2014 році, тоді група відомих цитопатологів провела опитування за участю міжнародної спільноти цитопатологів. Система містить п'ять компонентів звіту про мазок Папаніколау – тип зразка, адекватність, загальна категорія, інтерпретація та додаткове тестування. У разі необхідності можна додати два додаткові компоненти – комп'ютерну інтерпретацію мазка Папаніколау, навчальні примітки та коментарі, які додаються до звіту про цитологічних дослідженнях. Тип зразка – це звичайний мазок (мазок Папаніколау), препарат на основі рідинної цитології. Далі зразок оцінюють на наявність/відсутність компонентів ендocerвіксу, зони трансформації та будь-які інші показники якості – часткове перекриття препарату елементами крові, запалення. Якщо ж зразки не правильно оброблені або неадекватно набрано матеріал, то вони є не задовільними для оцінки [17].

Якщо у зразку немає клітин з неопластичними змінами, то в розділі загальної категоризації або в розділі інтерпретації звіту вказують термін NILM (негативний щодо інтраепітеліальних уражень та злоякісних новоутворень). Також вказують про не пухлинні зміни, такі як плоскоклітинна метаплазія, кератоз, метаплазія, атрофія, реактивні зміни пов'язані з запаленням, внутрішньоматковим контрацептивом. Також вказують про наявність вагінальних трихомонад, грибкових організмів таких

як *Candida* spp., про зміни флори, а саме вказують на бактеріальний вагіноз, також про бактерії *Actinomyces* spp., про клітинні зміни, що відповідають вірусу простого герпесу або цитомегаловірус тощо. Якщо в клітинах багат шарового плоского епітелію виявлено зміни, то в залежності від них розрізняють атипові клітини плоского епітелію невизначеного значення (ASC-US), атипові клітини плоского епітелію, що не дозволяють виключити плоскоклітинного епітеліального ураження високого ступеню (ASC-H). LSIL (плоскоклітинні епітеліальні ураження низького ступеня, слабка дисплазія CIN 1). HSIL (плоскоклітинні епітеліальні ураження високого ступеня, охоплює помірну та важку дисплазію: CIN 2 та CIN 3) та плоскоклітинний рак [6].

Якщо в клітинах залозистого епітелію ендочервікса виявляються зміни, то в залежності від їх вираженості розрізняють: атипові клітини залозистого епітелію (залозиста гіперплазія з атипією за типом слабкої дисплазії), атипові клітини залозистого епітелію, підозрілі на пухлинні, аденокарциному [108].

Діагноз ASC-US ставлять в тих випадках, коли знайдені зміни в клітинах плоского епітелію важко диференціювати між реактивними змінами та дисплазією. Найбільш частою причиною цього діагнозу є наявність запальних процесів в шийці матки. Чітко визначених критеріїв для ASC-US не встановлено. В більшості випадків спостерігається спонтанна регресія змін, особливо після проведеного протизапального лікування. Тому жінки з таким діагнозом потребують обов'язкового контрольного цитологічного обстеження через 3-4 місяця після лікування для корекції діагнозу [86].

ASC-H використовують у випадках коли клітинні зміни важко діагностувати між реактивною (незрілою) метаплазією та HSIL через якісні або кількісні обмеження. Виявлення випадків ASC-H є важливим для своєчасної діагностики неопластичних процесів у шийці матки [37].

Однією з основних цитоморфологічних ознак LSIL, яку легко ідентифікувати, є койлоцитоз. Койлоцити – клітини проміжного шару багат шарового плоского епітелію з пікнотичними ядрами та чітко

окресленим перинуклеарним просвітом цитоплазми. Спостерігається збільшення ядер, гіперхромазія та порушення ядерної мембрани [22].

HSIL включає як CIN 2, так і CIN 3. HSIL має здатність до швидкого прогресування до раку шийки матки та дуже низьку здатність до регресії. Клітини при HSIL мають високе ядерно-цитоплазматичне співвідношення, порівняно з LSIL, характеризуються нерівними контурами ядра з частими поглибленнями та поздовжніми ядерними борознами. Ядра зазвичай гіперхроматичні, хроматин розподілений рівномірно, грубий. Ядерця, як правило, відсутні, але їх можна побачити по периферії груп клітин HSIL у випадках ендцервікального розширення залоз. Цитоплазма варіює від «незрілої» щільної «метапластичної» з вогнищевою вакуолізацією до щільно ороговілої. Також характерна наявність парабазальних клітин, пов'язаних з атрофічними клітинними змінами. Ядра парабазальних клітин малі з гладкими контурами і тонким малюнком хроматину, мають нечіткі ядерця [34].

При презентації ще першого атласу системи Бетесда, стверджувалося, що вона була розроблена гнучкою для її подальшого розвитку відповідно до нових потреб скрінінгу цервікального раку, а також нових знань в сфері цервікальної патології. Таким чином, система Бетесда відіграє життєво важливу роль в стимулюванні біологічних досліджень раку шийки матки, в пошуку нових підходів та стратегій в веденні пацієнтів, а також у залученні нових технологій до скрінінгу цервікального раку [17].

1.2. Вірус папіломи людини як етіологічний фактором розвитку раку шийки матки та його передвісників

Персистуюча інфекція деякими типами вірусу папіломи людини слизової оболонки є етіологічним фактором розвитку раку шийки матки та

його передвісників. Крім того, відомо, що кілька суміжних факторів відіграють важливу роль у виникненні та прогресуванні захворювання шийки матки, сприяючи або запобігаючи ВПЛ-інфекції та персистенції. Мікробіом здорової жіночої статеві системи характеризується наявністю 1 або кількох різновидів лактобактерій [42]. Однак результативні дослідження, присвячені різноманітності бактерій та їх кількості в жіночих статевих шляхах, показали, що кілька факторів, включаючи гормональний рівень, гігієнічні звички та інфекції, що передаються статевим шляхом, можуть порушити природний баланс, сприяючи росту деяких груп бактерій, які у свою чергу може сприяти деяким патологічним станам. Нещодавно вагінальний мікробіом став об'єктом розгляду, який може значно вплинути на ВПЛ-інфекції та їх клінічний вплив. У цьому контексті зміни у вагінальному мікробіомі були виявлені у жінок, інфікованих ВПЛ, жінок з ураженнями та раком, асоційованими з ВПЛ. Однак роль конкретних груп бактерій у розвитку/прогресуванні або запобіганні/регресії патологій, пов'язаних з ВПЛ, недостатньо вивчена. Варто обговорювати потенційну функціональну взаємодію між конкретними бактеріальними групами та результатами інфекції ВПЛ. Недавні дослідження оцінили потенційний зв'язок між вагінальним мікробіомом і гінекологічним раком [10]. Профіль вагінального мікробіому може впливати на місцеву імунну відповідь і брати участь у онкогенезі шийки матки та виведенні ВПЛ. Вагінальний мікробіомом з переважанням певних видів лактобацил може відігравати захисну роль проти опортуністичних інфекцій і може представляти нову терапевтичну мішень [11].

1.3. Особливості складу вагінального мікробіому

Організм людини містить трильйони мікроорганізмів, які співіснують один з одним і взаємодіють з господарем [12, 13]. Концепція мікробіому

вперше була використана Ледербергом і Маккреєм [14] для позначення набору комменсальних, симбіотичних або патогенних мікроорганізмів, які ділять той самий життєвий простір і розвивають складну взаємодію з певними тканинами людини [42].

Першим великим дослідженням, присвячений різноманітності мікроорганізмів, присутніх у різних органах людського тіла, був проект мікробіома людини, який розпочався в 2008 році. У цьому дослідженні мікробіомний склад різних частин тіла, включаючи нижні статеві органи тракту 242 здорових осіб [35]. У кишечнику велика різноманітність мікроорганізмів пов'язана зі здоровим середовищем. Однак у здорових жіночих статевих шляхах зазвичай є лише 1 або кілька різновидів лактобацил [67]. Після вивчення вагінальної флори 396 жінок різної етнічної приналежності було ідентифіковано 5 типів спільного стану вагінальної мікробіоми [28]. I, II, III і V типи спільного стану складаються з низького мікробного різноманіття, в якому переважають *Lactobacillus (L) crispatus*, *L. gasseri*, *L. iners* і *L. jensenii*, відповідно. Навпаки, IV тип спільного стану утворюється шляхом зменшення кількості лактобацил і великої різноманітності бактерій, пов'язаних з бактеріальним вагінозом, які є переважно анаеробними бактеріями. Найбільш часто виявляються бактерії *Gardnerella vaginalis*, *Megasphaera*, *Sneathia* і *Prevotella*. Склад вагінальної мікробіоми є динамічним і спостерігається частий перехід від одного мікробіому до іншого в однієї жінки протягом її життя, головним чином від III до IV типів спільного стану [112].

На склад вагінальної мікробіоми впливають різні фактори, такі як етнічна приналежність, гормональні зміни, статева активність і гігієнічні звички, а також лактація, цукровий діабет, стрес і дієтичні фактори [102]. Деякі дослідження показали, що вагінальна мікробіома відрізняється у жінок різних етнічних груп. Ці дані важливі, враховуючи, що середовища, де домінують бактерії, пов'язані з бактеріальним вагінозом, більше пов'язані з інфекціями, що передаються статевим шляхом [94].

Інші дослідження показали, що афроамериканські та латиноамериканські жінки демонструють вагінальний мікробіом, у якому бактерії, відмінні від *Lactobacillus* spp. переважають [86]. Бактеріальний вагіноз може вражати понад 50 % жінок у країнах Африки на південь від Сахари. Це стало найпоширенішою зміною у жінок репродуктивного віку. Такі дослідження вказують на те, що відмінності у вагінальній мікробіомі жінок різних рас можуть частково пояснити різний рівень захворюваності бактеріальним вагінозом та інфекціями, що передаються статевим шляхом, серед представників різних етнічних груп [78].

Така різноманітність може бути пов'язана з генетичними відмінностями між расами, включаючи кілька гаплотипів мітохондріальної ДНК. Це показує важливість генетичних факторів у визначенні мікробіому індивідів, що робить їх більш чи менш схильними до захворювань [26].

1.4. Взаємодія мікробіому з місцевим мікрооточенням та захист від інфекційних агентів

У жінок цервіко-вагінальний мікробіом взаємодіє з місцевим мікрооточенням, підтримуючи гомеостаз тканин [45]. Коли цей баланс порушується, що призводить до стану, відомого як дисбактеріоз, можуть бути запущені кілька патологічних процесів, включаючи порушення епітеліального бар'єру, аномальну проліферацію клітин, нестабільність геному, ангиогенез, хронічне запалення та метаболічну дисрегуляцію [17].

Декілька захисних механізмів діють для захисту жіночих статевих шляхів від інфекційних агентів. До них відносяться епітеліальний бар'єр слизової оболонки, слиз, секретія молочної кислоти та імунна відповідь. З цієї точки зору слизова оболонка піхви є бар'єром, який забезпечує захист від

вторгнення патогенів внаслідок взаємодії між її епітеліальними клітинами, імунною системою та колонізуючими мікроорганізмами [47].

Основним захисним механізмом, пов'язаним з лактобактеріями, є їх здатність виробляти молочну кислоту та підтримувати місцевий рН нижче 4,5, що небезпечно для більшості патогенів, а також виробляти бактеріоцини, які пригнічують або знищують патогени, що передаються статевим шляхом [48].

Крім того, лактобацили можуть утворювати мікроколонії, які прилипають до епітеліальних клітин, перешкоджаючи адгезії патогенів і їх здатності запускати захисні механізми господаря [99]. Здорова вагінальна мікробіота також була пов'язана з підвищеною експресією дефензинів, які є вагінальними антимікробними пептидами, які перешкоджають зв'язуванню специфічних білків патогенів з клітинами жіночих статевих шляхів. Таким чином, було виявлено зниження рівня аутокринних факторів рухливості клітин у жінок із бактеріальним вагінозом [57]. Вважається, що експресія інших типів аутокринних факторів рухливості клітин, таких як інгібітор секреторної протеази лейкоцитів, корелює з бактеріями, пов'язаними з бактеріальним вагінозом [93]. Повідомлялося про підвищені концентрації інгібітору секреторної протеази лейкоцитів у здорових жінок, тоді як у жінок з бактеріальним вагінозом спостерігалися нижчі концентрації [54].

Крім того, можливим механізмом розвитку вагінального дисбактеріозу є збільшення продукції прозапальних цитокінів і хемокінів, пов'язане зі збільшенням різноманітності патогенних мікроорганізмів, що сприяє додатковому рекрутуванню імунних клітин і посиленню запальної відповіді [30].

1.5. Захисні механізми жіночої репродуктивної системи пов'язані з *Lactobacillus*

Lactobacillus spp. переважає в середовищах з низьким рН. Кислотність піхви запобігає колонізації анаеробами, підтримує епітеліальний бар'єр шийки матки шляхом вироблення бактеріоцинів і діє проти деградації муцину, запобігаючи опортуністичним інфекціям [21]. Вироблення молочної кислоти пригнічує ріст кількох анаеробних агентів, пов'язаних із захворюваннями, що передаються статевим шляхом, які можуть сприяти прогресуванню уражень шийки матки, якщо це пов'язано з персистенцією hrHPV [93]. Інфекція *C. trachomatis*, підвищує ризик інфікування гінекологічного раку hrHPV через запальну реакцію, яка збільшує активних форм кисню і вільних радикалів [38].

Ді П'єтро з колегами [80] оцінювали одночасну інфекцію шийки матки *C. trachomatis* і ВПЛ та різновиди асоційованих мікробіомів шийки матки. Жінки з обома інфекціями продемонстрували більшу бактеріальну різноманітність, головним чином пов'язану з наявністю анаеробів, таких як *G. vaginalis*, *A. vaginae* та, у меншій кількості, *Lactobacillus*, таким чином пов'язуючи дисбактеріоз із появою інфекцій. З іншого боку, здорові жінки продемонстрували домінування *Lactobacillus*, а анаеробні бактерії становили <2% флори шийки матки. Подібним чином жінки, інфіковані лише *C. trachomatis*, мали різноманітну цервікальну флору, але низький рівень *Lactobacillus*. *L. iners* частіше виявляли в інфікованих жінок порівняно зі здоровими. Крім того, було встановлено, що склад флори ВПЛ-позитивних і в жінок з хламідіями суттєво не відрізнявся від складу здорових жінок. Тим не менш, у цьому дослідженні *L. gasseri* не було виявлено у ВПЛ-позитивних жінок, що підтверджує висновки інших авторів, які пов'язували наявність *L. gasseri* з кліренсом ВПЛ-інфекції [97].

Види лактобацил можуть продукувати 2 ізомери молочної кислоти, тобто L- і D-молочну кислоту. Останній має більшу захисну дію проти дисбактеріозу піхви [21]. Окрім виробництва молочної кислоти, види *Lactobacillus* виробляють пептиди з антимікробною дією, такі як бактеріоцини та біосурфактанти. *L. iners* можуть синтезувати лише L-молочну кислоту і не можуть виробляти перекис водню, який також виявляє інгібіторну дію проти росту бактерій [21, 98]. Крім того, *L. iners* здатний продукувати інеролізін, пороутворюючий цитотоксин, подібний до білка вагінолізину, що виділяється *Gardnerella spp.*, який утворює пори у вагінальному епітелії, сприяючи інфекціям [98]. Таким чином, вагінальний мікробіом з домінуванням *L. crispatus* пов'язаний із підтримкою цілісності захисного поверхневого шару слизової оболонки та створює менший ризик опортуністичних бактеріальних та вірусних урогенітальних інфекцій, у тому числі ВПЛ. З іншого боку, вагінальний мікробіом з домінуванням *L. iners* асоціюється з більшим ризиком вірусних інфекцій і розвитком генітального раку [21].

1.6. Зв'язок модифікації цервіко-вагінальної мікробіоти та рівня прозапальних цитокінів

Бактеріальний вагіноз асоціюється з індукцією місцевого запалення [25, 55]. Одним з важливих факторів є виснаження молочної кислоти і, як наслідок, зниження її протизапальної дії. Було показано, що молочна кислота індукує протизапальний стан і пригнічує запалення, викликане агоністами толл-подібних рецепторів (TLR). Крім того, молочна кислота запускає шлях інтерлейкіну (IL)-1 через виробництво його антагоніста, антагоніста рецептора IL-1 (IL1Ra) [56]. Навпаки, лікування сумішшю метаболітів вагінальної мікробіоти, що відповідає бактеріальному вагінозу, збільшило TLR-індуковане виробництво прозапальних цитокінів,

таких як фактору некрозу пухлини (TNF- α), і зменшило виробництво RANTES (регулює активацію, нормальну експресію та секрецію Т-клітин) та інтерферон- γ -індукованого протеїну 10 (IP-10) [57].

Припускають, що пов'язане з бактеріальним вагінозом запалення в основному зумовлене високими рівнями прозапальних цитокінів, а не залученням імунних клітин шийки матки. Дослідження, у якому порівнювали жінок із раком шийки матки або дисплазією та жінок без неоплазії, показало, що середовище з домінуванням нелактобацил характеризується прозапальною (IL3 β), хемотаксичною (IP10, MIP1 β та RANTES), гемопоетичною (ліганд FLT3) та адаптивною імунною відповіддю (IL -2, IL-4 та розчинний ліганд CD40) цитокінів, отже, корелюють дисбактеріоз, запалення та гінекологічний рак [25].

Когортне дослідження за участю безсимптомних молодих жінок показало, що модифікація цервіко-вагінального середовища, включаючи зміни вагінальної кислотності та цитокінового профілю, може бути пов'язана з місцевою мікробною структурою, і що різноманітні бактеріальні мікробіоми без домінування лактобацил пов'язані з вищими рівнями прозапальних цитокінів. Група жінок, у яких бактеріальна флора складалася з великого різноманіття видів (*Sneathia sanguinigena*, *S. amnii*, *Mobiluncus mulieris*, *Prevotella amnii*, *Aerococcus* і *Fusobacterium*), продемонструвала вищі рівні прозапальних генітальних цитокінів [17].

Індукція IL-1 α , IL-1 β та IL-8 цими бактеріями також була продемонстрована *in vitro* [58]. Крім того, *in vivo* було продемонстровано важливе підвищення рівнів IL-1 β та фактора некрозу пухлини (TNF- α) у стійких аномальних зразках вагінальної мікробіоти [59].

Було припущено, що мембранний ліпополісахарид грамнегативних бактерій може сприйматися цервікальними антигенпрезентуючими клітинами, індукуючи передачу сигналу толл-подібним рецепторам (TLR4), активацію транскрипційного фактору "каппа-бі" (NF κ B) і продукцію прозапальних цитокінів і хемоатрактантів Т-клітин. У жінок із високим

вмістом *Prevotella* спостерігалася виражена відповідь на ліпополісахариди, IFN- γ та IL-1 β , що, ймовірно, відображає імунну відповідь проти грамнегативних бактерій. IV загальний стан клітин антигенпрезентуючих клітин також продемонстрував вищу експресію CD80, молекула міжклітинної адгезії 1 (ICAM-1) та молекула головного комплексу гістосумісності II (ГКГС класу II), сприяючи праймінгу Т-клітин і ефektorній функції [66].

З іншого боку, зміни цервіко-вагінального середовища можуть діяти разом з ВПЛ-інфекцією, сприяючи ранній стадії генітального раку і створювати, наприклад, стан місцевої імуносупресії [60]. Деякі дослідження показали, що певні види цервіко-вагінальної мікробіоти можуть модулювати місцеву запальну імунну відповідь, можливо, сприяючи експресії імуносупресивних цитокінів, і що аномальна вагінальна мікробіота пов'язана з ВПЛ-інфекцією та персистенцією [71].

Одірак-Шаліфур з командою. [40] провели дослідження для аналізу мікробіому шийки матки та профілів цитокінів на різних стадіях генітального раку. Вони припустили, що після інфікування цервікального епітелію hrHPV композиція мікробіому змінюється з *L. crispatus* на *L. iners*. Коли інфекція прогресує до плоскоклітинного інтраепітеліального ураження (SIL), відбувається збільшення різноманітності мікробіоти, що відзначається *Sneathia* та *Fusobacterium* spp. У генітального раку також була присутня *Fusobacterium necrophorum*, що збільшувало різноманітність мікробіомів. У цій запропонованій моделі інфекція ВПЛ відповідає за створення імуносупресивного мікрооточення (через експресію IL-10 та індукцію макрофагів типу 2), яке посилюється трансформуючий фактор росту (TGF β -1), отриманим із мікробіоти, створюючи позитивний зворотний зв'язок між мікробіотою та профілем цитокінів [39].

Загальний тип клітин з домінуванням *Fusobacterium* spp. пов'язаний з імуносупресивним мікрооточенням, що характеризується вищими рівнями IL-4 і трансформуючого фактору росту (TGF β -1) і зрушенням від імунної

відповіді Т-хелперів 1 до Т-хелперів 2. Крім того, існує пряме втручання в сигнальний шлях Е-кадгерину/ β -катеніну на ВПЛ-трансформованих клітин шийки матки [60]. Проте було показано, що в кишечнику *F. nucleatum* справляє прозапальну та пухлиногенну дію [62].

1.7. Оксидативний стрес та зміни шийки матки

Оксидативний стрес, який відображає дисбаланс внутрішньоклітинного окисно-відновного стану внаслідок надлишку виробництва активних форм кисню над антиоксидантною системою, також може бути наслідком дисбактеріозу [63–65]. Активні форми кисню, включаючи аніон супероксидного радикалу ($O_2^{\bullet-}$), гідроксильний радикал (OH^{\bullet}) і перекис водню (H_2O_2), можуть відігравати як корисну, так і шкідливу роль у біологічних системах. Ці види можуть виконувати важливі функції в регуляції клітинних сигнальних шляхів, таких як апоптоз та імунний захист від інфекційних агентів. Однак накопичення активних форм кисню може призвести до окисного пошкодження клітинних структур і біомолекул, таких як білки, ліпіди та ДНК [65, 66].

Таким чином, окислювальний стрес пов'язаний із сприянням і прогресуванням кількох типів пухлин, включаючи рак шийки матки [27]. Активні форми кисню та активні види азоту відіграють значну роль у опосередкованому ВПЛ канцерогенезі шийки матки, оскільки накопичення цих видів може підвищити рівень пошкодження ДНК, що може сприяти інтеграції генома ВПЛ і подальшій трансформації клітин [75]. Інтеграція ДНК вірусу в геном господаря часто сприяє блокуванню гена Е2, який пригнічував експресію онкогенів Е6 і Е7. Результатом є неконтрольована експресія білків Е6/Е7 ВПЛ, що призводить до збільшення клітинної проліферації та зниження апоптозу [9, 20, 69].

Хоча існують дослідження, які пов'язують окислювальний стрес [64, 67] і вагінальним мікробіомом [11, 20, 70, 71] з раком шийки матки, зв'язок між окисним стресом і вагінальним мікробіомом обговорюється в літературі. Чен та ін. [27] спостерігали, що рівні H_2O_2 у жінок з бактеріальним вагінозом були майже в 10 разів вищими, ніж у здорових пацієнтів, що свідчить про те, що у цих пацієнтів сформувався окислювальний стрес. Навпаки, Riyathilake et al. [63], аналізуючи жінок із ВПЛ-позитивним цервікальною інтраепітеліальною неоплазією, висунули гіпотезу, що цервіковагінальний мікробіом може викликати окисне пошкодження ДНК. Однак не спостерігалось зв'язку між різноманітністю мікробіомів та окисним пошкодженням ДНК, що вимірюється наявністю 8-гідрокси-2'-дезоксигуанозину (8-OHdG), біомаркера пошкодження ДНК, спричиненого окислювальним стресом [49].

Здоров'я піхви пояснюється наявністю видів/штамів, що продукують *Lactobacillus H₂O₂*, оскільки деякі епідеміологічні дослідження повідомляють про можливий захисний ефект H_2O_2 проти бактеріального вагінозу та інших інфекцій, що передаються статевим шляхом, таких як ВІЛ-1 [74–80]. Крім *Lactobacillus spp.* (за винятком *Lactobacillus iners*), лейкоцити та ендотеліальні та трансформовані клітини шийки матки, серед іншого, також можуть генерувати перекис водню. Одним із механізмів утворення H_2O_2 є дисмутація $O_2^{\bullet-}$ (утворюється НАДФН-оксидазою) у H_2O_2 , яка може відбуватися спонтанно, оптимально при рН 4,8, або каталізуватися ферментами СОД (супероксиддисмутаза) [80, 81].

Крім того, мієлопероксидаза (МРО), фермент, який експресується поліморфно-ядерними нейтрофілами та макрофагами, відповідає за реакцію галогенідів (наприклад, Cl^-) і H_2O_2 , утворюючи гіпохлоритну кислоту (НОСІ), тип активних форм кисню, який бере участь у окислювальній, коли необхідна імунна відповідь. Таким чином, було продемонстровано, що антимікробна роль лактобацил, що продукують H_2O_2 , значно вища в присутності пероксидази та галогенідів [77, 81–83]. Отже, вважається, що

НОСІ є потужною протимікробною сполукою, що виробляється системою H_2O_2 /пероксидаза/галоїд, присутньою у фагоцитах і тканинних рідинах [53, 94]. Цікаво, що Klebanoff та колеги [77] повідомили про підвищені концентрації пероксидази у вагінальних рідинах майже всіх проаналізованих пацієнтів (і достатнє виробництво НОСІ). Крім того, автори не тільки спостерігали антимікробну дію лактобацил, що продукують H_2O_2 , але також припустили протипухлинну дію цих бактерій. Крюгер і Бауер [83] припустили, що H_2O_2 , що виробляється *Lactobacillus spp.*, сам по собі несприятливий для вагінальних епітеліальних клітин, оскільки він індукує неселективний апоптоз у трансформованих і нетрансформованих клітинах. З іншого боку, додавання пероксидази забезпечує захист нетрансформованих клітин від апоптозу, опосередкованого H_2O_2 , отриманим з лактобацил. Враховуючи, що НОСІ реагує з $\text{O}_2^{\bullet-}$, отриманим із трансформованих клітин, що призводить до виробництва OH^{\bullet} , що індукує апоптоз [82], було припущено, що існує зв'язок між наявністю H_2O_2 -продукуючих лактобацил у вагінальному мікробіомі та підвищеною активністю мієлопероксидази, яка викликає кліренс ВПЛ-інфікованих клітин і індукує апоптоз трансформованих клітин [64, 95].

Однак немає єдиної думки щодо захисної ролі H_2O_2 для цервіко-вагінального мікробіому. Деякі дослідники вважають малоімовірним, що H_2O_2 може мати антимікробну дію на вагінальний мікробіом, оскільки цервіко-вагінальне середовище більшу частину часу є гіпоксичним, а лактобацилам потрібна велика кількість O_2 для утворення перекису водню [80, 86]. Відповідно до цього аргументу H_2O_2 , що продукується лактобактеріями, не було виявлено в умовах гіпоксії в цервіко-вагінальній рідині [87] і супернатанті штамів *Lactobacillus* [88]. Крім того, H_2O_2 , що утворюється лактобактеріями, у фізіологічних концентраціях не інактивує вірус простого герпесу типу 2 (HSV-2) або будь-які бактерії, асоційовані з бактеріальним вагінозом, проаналізовані *in vitro*, навіть якщо мієлопероксидаза було додано [57]. У цьому ж дослідженні також було

виявлено, що цервіко-вагінальна рідина та сперма блокують антимікробну активність H_2O_2 [22].

В аеробних умовах, які використовуються в більшості досліджень, які спостерігають протимікробну дію лактобацил, що продукують H_2O_2 , перевага надається утворенню перекису водню, а не утворення молочної кислоти. Однак, коли лактобацили ростуть за відсутності кисню, ферментація може бути кращою [89]. Таким чином, було виявлено, що молочна кислота виробляється у більш високих концентраціях в умовах гіпоксії [86]. Крім того, молочна кислота може інактивувати асоційовані бактерії з бактеріальним вагінозом та *Chlamydia trachomatis*, які не спостерігалися в присутності H_2O_2 [102].

Крім того, H_2O_2 може представляти корисну характеристику лактобацил або це може бути просто маркером для штамів лактобацил, які захищають цервіко-вагінальне середовище [86].

1.8. Вплив на репродуктивну систему тютюнокуріння та ризикованої поведінки, зловживання алкоголем та іншими наркотичними речовинами

В цервікальному слизу жінок і в спермі чоловіків з тютюнопалінням містяться нікотин та його метаболіт – котинін [36]. Було показано, що в клітинах, інфікованих hrHPV, тютюновий дим індукує збільшення транскрипції онкогену E6, що призводить до зниження активності та рівня p53 [65], що може сприяти розвитку плоскоклітинного раку [89]. Варто зазначити, що IV тип спільного стану був підвищений у жінок, що курили [40].

Функцію епітелію, що вистилає маткові труби пригнічують також ароматичні вуглеводні, що потрапляють з тютюновим димом в легені. Це

може призвести до розвитку позаматкової вагітності, оскільки запліднена яйцеклітина не може потрапити в матку і гине [67].

З огляду літературних джерел можна визначити підтверджену інформацію про вплив алкоголю на нейроендокринну регуляцію гомеостатичних процесів в організмі - гіпоталамо-гіпофізарну регуляцію. При системному вживанні алкоголю відбувається порушення гормонального балансу в організмі жінки, відповідно починає домінувати тестостерон і це в свою чергу веде до яскраво-виражених змін – маскулізацію, зменшення та перерозподіл жирової тканини, зміни висоти та тембру голосу [16]

Жінки репродуктивного віку з алкогольною залежністю мають розлади репродуктивного здоров'я, серед яких хронічні запальні захворювання статевих органів, що становить 82,5%. Зафіксовані порушення менструальної функції, такі як менометрорагія у 60% випадків та олігоменорея у 40,8% випадків. Серед жінок, які страждають на гостру та хронічну алкогольну інтоксикацію, кожна друга має високу частоту викиднів: 35,3% та 47,1% відповідно [21].

У людини суттєво знижуються показники статевих гормонів в плазмі крові при постійному вживанні наркотиків. Порушується функція яєчників у жінок. Наркотичні речовини вкрай негативно впливають на внутрішньоутробний розвиток, наносять шкоди внутрішньоклітинним структурам зиготи, ембріона і плода. Вони вносять порушення гормонального стану вагітної, опосередковано впливають на властивості слизової оболонки матки. Особливо небезпечно, коли це проходить у доімплантаційний, імплантаційний та період плацентації — важливий час проходження вагітності. Так, відбувається порушення процесу імплантації, утворення плаценти і розвиток ембріона [75].

Крім того, статеві активність є фактором, який сприяє зменшенню популяції лактобацил, сприяючи бактеріальному різноманіттю [54]. Важливо розуміти, що навіть спринцювання піхви підвищує ризик бактеріального

вагінозу, тим самим демонструючи вплив спринцювання на мікробіом піхви [35].

Бактеріальний вагіноз характеризується змінами у вагінальній флорі, включаючи зменшення кількості лактобактерій і високу різноманітність бактерій [41]. Бактеріальний вагіноз асоціюється із запальними захворюваннями органів малого таза, вищим ризиком викидня, передчасними пологами та вищим ризиком зараження захворюваннями, що передаються статевим шляхом, включаючи ВІЛ [9]. Діагноз можна поставити на основі клінічних критеріїв відповідно до класифікації Амсея. Відповідно до цього діагноз бактеріальний вагіноз вимагає виконання 3 з наступних 4 критеріїв: рідкі або бульозні білі виділення, наявність “ключових клітин”, встановлених безпосередньо під мікроскопом або за допомогою мікроскопічного дослідження мазка із статевих виділень, пофарбованого за Грамом, вагінального рН понад 4,5, а також позитивний амінний тест (рибний запах, який виникає при додаванні 2 крапель 10% гідроксиду калію до вагінальних виділень) [26, 42].

Іншим поширеним діагностичним методом є мікроскопічна класифікація, яка аналізує різні типи бактеріальної морфології за допомогою фарбування за Грамом *Lactobacillus* spp., *Gardnerella* spp. і *Mobiluncus* spp. Якщо пофарбовані виділення отримують оцінку від 0 до 3, вагінальна флора нормальна; якщо бал 4–6 — проміжний; а якщо 7–10 – відповідно бактеріальний вагіноз [26, 43]. Незважаючи на те, що визнано переваги таких класифікацій, вони суб’єктивні та можуть призвести до гіпердіагностики бактеріального вагінозу в значної кількості безсимптомних жінок. Дослідження з використанням молекулярних методів, таких як ПЛР, для виявлення змогли ідентифікувати інші агенти, пов’язані з бактеріальним вагінозом, такі як види *Atopobium vaginae*, *Clostridiales* і *Megasphaera* [26].

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Розподіл пацієнток за групами для проведення дослідження

Нами вивчалися цитологічні мазки (ПАП-тести) з піхвової поверхні та цервікального каналу шийки матки 57 жінок репродуктивного віку зі шкідливими звичками. Групу контролю спостережень становили цитологічні мазки від 10-ти жінок репродуктивного віку без шкідливих звичок та без проявів запальних процесів репродуктивних органів. Матеріал набрано від жінок, які знаходились на обстеженні у відділенні “Охорони здоров’я жінки” ДУ “Інституту педіатрії, акушерства і гінекології імені академіка О.М. Лук’янової НАМН України”.

Досліджений матеріал було розподілено на наступні групи:

1 група (контроль) – 10 жінок без шкідливих звичок та без проявів запальних процесів репродуктивних органів;

2 група (наркотики) – 30 жінок, що зловживають наркотиками (наявний абстинентний синдром). Проведено анонімне анкетування про наркотичні речовини, що вживають жінки даної групи. Більшість вживає метадон та кокаїн, додатково серед психотропних вживали МДМА (метилендіоксиметамфетамін), ДОБ (бромамфетамін), амфетамін, ЛСД (діетиламін лізергінова кислота);

3 група (алкоголь) – 15 жінок, що зловживають алкоголем (доза не визначено, стале вживання хоча б раз за три дні протягом 6 місяців);

4 група (тютюн) – 12 жінок з тютюнопалінням (більше 20 сигарет щодня, звичка палити протягом 30 хвилин після пробудження, при спробі кинути палити – відчуває сильний потяг до паління або синдром відміни).

Таблиця 2.1.

Чисельність дослідженого матеріалу по групам та методи дослідження

Групи дослідження	Методи дослідження	
	Загальноцитологічні	Морфометричні
Група 1 (контроль)	10	10
Група 2 (наркотики)	30	10
Група 3 (алкоголь)	15	10
Група 4 (тютюн)	12	10
Всього	67	40

2.2. Загальноцитологічні та морфометричні методи дослідження

Цитологічні мазки були взяті із піхвової поверхні шийки матки шпателем Ейрата із цервікального каналу спеціальною щіточкою «Cervex-Brush» для отримання матеріалу із зони трансформації. Після забору матеріал наносили тонким шаром на скельце, висушували на повітрі, фіксували у суміші Нікіфорова 10-20 хв. і потім фарбували.

Для вирішення поставлених завдань у дослідженні були використані наступні методи:

- 1) загальноцитологічні – забарвлення за Романовським–Гімзе та Папаніколау (за описом методик в книзі Г.У. Гілла “Клінічна цитологія. Теорія і практика цитотехнології”, 2015 рік);
- 2) морфометричні:
 - а) підрахунок клітин, які характеризують запальну інфільтрацію (нейтрофілів, лімфоцитів та макрофагів) у перерахунку на 500 клітин;

б) підрахунок клітин, які характеризують диспластичні зміни в епітелії під впливом бактеріальних та вірусних агентів (дискаріоз, паракератоз, койлоцитоз, двоядерність та багатоядерність, дезагрегація хроматину та ін.) в перерахунку на 500 клітин.

Цитологічні дослідження препаратів проведено на базі лабораторії “Цитології, ендокринології та біохімії” ДУ “Інституту педіатрії, акушерства і гінекології імені академіка О.М. Лук’янової НАМН України”.

2.3. Оцінка диспластичних процесів згідно з класифікацією «Bethesda system»

Оцінка диспластичних процесів в шийці матки проводилась згідно з класифікацією «Bethesda system» (2014). Класифікація за системою Bethesda є крайній оновленням та найактуальнішим, вона враховує вплив папіломавірусу на розвиток диспластичних змін, і відповідно за нею проводиться оцінка якості мазків (за описом в книзі Р. Найяр, Д. Вілбур “Цитологія за системою Бетесда”, 2017 рік).

За типом цитологічних мазків матеріал від жінок досліджуваних груп розподілено наступним чином:

- NILM – без проявів атипії;
- ASC-US – запальний тип з атипією окремих клітин;
- LSIL – слабкі диспластичні зміни багатошарового плоского епітелію;
- HSIL – помірні диспластичні зміни багатошарового плоского епітелію.

Даний розподіл типів мазків засноване на передовому розумінні виникнення передракових процесів шийки матки. Відповідно: LSIL - це наслідок впливу папіломовірусу на епітелій шийки матки, а HSIL - це істинний передраковий стан.

2.4. Бактеріоскопія мазків виділень, пофарбованих по Граму та за методикою Романовського-Гімзе

Бактеріоскопію здійснювали по мазкам виділень, пофарбованим по Граму (за описом методики в книзі В.В. Євшан, Л.В. Газзаві-Рогозіна, А.С. Бикова, О.В. Циганков “Технічна мікробіологія”, 2020 рік), а також за методикою Романовського-Гімзе із трьох досліджуваних ділянок (сечовивідний канал, канал шийки матки і піхва). Визначали наявність патогенної флори: трихомонад, гарднерел, коків.

Мікроскопічна класифікація аналізує різні типи бактеріальної морфології за допомогою фарбування за Грамом *Lactobacillus* spp., *Gardnerella* spp. і *Mobiluncus* spp. Якщо пофарбовані виділення отримують оцінку від 0 до 3, вагінальна флора нормальна; якщо бал 4–6 — проміжний; а якщо 7–10 – відповідно бактеріальний вагіноз. Незважаючи на те, що визнано переваги такої класифікацій, вони суб’єктивні та можуть призвести до гіпердіагностики бактеріального вагінозу в значній кількості безсимптомних жінок. Відповідно, додатково проводили дослідження з використанням молекулярних методів, в нашому випадку для діагностики проводили ПЛР.

Бактеріологічні посіви виділень із статевих шляхів проводились на кров’яному агарі, ґрунті Етта, цукровому бульйоні для виявлення *St. aureus*, *St. Epidermal*, *Str. Agalact*, *Klebsiella*, *E. Colli*, *Enterococcus* та грибів роду *Candida* (за описом методик в книзі В.В. Євшан, Л.В. Газзаві-Рогозіна, А.С. Бикова, О.В. Циганков “Технічна мікробіологія”, 2020 рік).

Бактеріологічні дослідження виконували на базі лабораторії бактеріології ДУ “Інституту педіатрії, акушерства і гінекології імені академіка О.М. Лук’янової НАМН України”.

2.5. Метод ПЛР для тестування досліджуваного матеріалу - цервікального слизу

Для тестування в досліджуваному матеріалі - цервікального слизу мікоплазми та уреоплазми, виявлення ДНК онкогенних типів вірусу папіломи людини (16, 18), ДНК вірусу простого герпесу 2 типу та *Trichomonas Vaginalis* використовували метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Часто інфекційні агенти в статевих шляхах перебувають без симптомно, тому варто використовувати для діагностики полімеразну ланцюгову реакцію. Вірус папіломи людини, як і багато інших, які містять ДНК, є біологічним агентом, який здатний змінювати ріст, диференціювання та морфологію клітин. Проникаючи до клітини, вірус викликає зміни її структури, біохімічної і генетичної організації, вносить до клітини чужорідну генетичну інформацію. Утворення двоядерних та багатоядерних клітин є характерною особливістю прояву цитодеструктивної дії вірусу. В основі їх утворення зазвичай лежать механізми злиття плазматичних мембран клітин, оскільки деякі віруси мають ферменти, які здатні лізувати клітинні оболонки.

Дослідження ПЛР виконували на базі лабораторії бактеріології ДУ “Інституту педіатрії, акушерства і гінекології імені академіка О.М. Лук’янової НАМН України”.

2.6. Статистична обробка та одержання мікрофото

Дослідження препаратів у прохідному світлі та зйомку мікрофото проводили на дослідницькому мікроскопі «Olympus BH-2» з камерою (Японія). Для одержання мікрофото використовували мікроскоп із спеціальною фотонасадкою; отримали зображення та досліджували їх морфометрією, яку ми провели за допомогою програмного комплексу

QuickPHOTO MICRO 2.3. Загалом програма призначена для отримання цифрових зображень з мікроскопів, оснащених цифровими камерами, редагування, анотування та збереження отриманих зображень і вимірювань.

Статистичну обробку даних проводили з використанням Microsoft Excel, достовірність даних встановлюються стандартними похибками за допомогою “Statistica 7”. Результати представляються у вигляді середніх значень \pm стандартне відхилення. Відмінності вважали достовірними при $p < 0,05$.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Цитологічні особливості епітелію шийки матки та цервікального каналу у жінок групи контролю репродуктивного віку без шкідливих звичок та без проявів запальних процесів репродуктивних органів

Піхвова поверхня шийки матки вкрита багат шаровим плоским епітелієм товщиною 150-200 мкм. Протягом менструального циклу під впливом гормонів багат шаровий плоский епітелій піхвової поверхні шийки матки та слизова оболонка піхви підлягає циклічним змінам. Відбувається посилення проліферативних процесів, дозрівання клітин з накопиченням у них глікогену в проміжному шарі та кератину в поверхневому шарі під впливом естрогенів. Приблизно 4 доби складає тривалість циклу дозрівання клітин плоского епітелію ектоцервікса, тобто слизової оболонки піхвової поверхні шийки матки [50, 61, 98].

У багат шаровому плоскому епітелії слизової оболонки піхвової поверхні шийки матки виділяють 4 шари клітин: базальний, парабазальний, проміжний та поверхневий. Базальний шар розміщений на базальній мембрані і являє базальними, чи гермінативними клітинами, розташованими в один-два ряди. Клітини діаметром 7-12 мкм, еліпсоїдної форми. Базофільні ядра перпендикулярно розташовані до базальної мембрани з великою кількістю хроматину і займають більшу частину клітини. Наявність мітозів свідчить про активність клітинного росту. Реагують на концентрацію естрогенів та гестагенів у крові специфічні білкові рецептори, що знаходяться в мембрані; глікогену цитоплазма не містить. Джерелом регенеративних процесів є базальний шар, він же ще називається камбіальним шаром. З парабазальних клітин з великою кількістю цитоплазми

утворена нижня третина. Двома-трьома рядами більших за розмірами клітин представлений парабазальний шар. В парабазальних клітинах відбувається синтез ДНК та глікогену. Їм властива досить висока мітотична активність і це в свою чергу дає можливість забезпечувати ріст, регенерацію багатошарового плоского епітелію, приймати участь у його диференціюванні та дозріванні. Проміжними клітинами з великим обсягом цитоплазми, розміром ядер ідентичним розміру ядер парабазальних клітин представлена верхня третина. Між проміжними клітинами розташовані шарами, оскільки вони мають міжклітинні з'єднання. Від ступеня естрогенів в організмі залежить концентрація глікогену в цитоплазмі. В проліферативній фазі менструального циклу можливо добре виявити поверхневий шар, що складається з 12-18 рядів, розташованих поодинокі або невеликими групами більших розмірів плоских клітин. В даних клітинах ядра з відсутністю хроматину є піктонічні та маленькі, а цитоплазма містить велику кількість глікогену та кератину. Кожні 4-5 діб верхній епітелій шийки матки поновлюється. Диференціювання та клітинний ріст є процесами залежними від рівня гормонів [84].

Вплив на епітеліальне оновлення та зрілість клітин контролює і рівень естрогенів, це загалом є важливим моментом в оцінці мазку із піхви. Порушення процесів дозрівання цитоплазми клітин верхньої частини середнього шару епітелію та сприяння злуценню відбувається під дією прогестерону. В I фазу менструального циклу в мазках шийки матки переважають поверхневі клітини. Максимальна кількість поверхневих клітин спостерігається з 10 по 14 день циклу, самостійне злуцення верхніх рядів відмічається в овуляторній фазі менструального циклу. В клітинах верхнього шару багатошарового плоского епітелію під час менопаузи виникають зміни: в цитоплазмі присутньо мало глікогену, епітелій потоншується [25, 29].

Під багатошаровим плоским епітелієм знаходиться сполучна тканина, що складається з еластичних волокон та пухкої сітки колагенових волокон, серед яких розташовані кровоносні та лімфатичні судини, фібробласти,

лімфоцити, гістіоцити. Базальна мембрана здійснює демаркацію сполучної тканини та багат шарового плоского епітелію [11, 100, 106].

Захисна функція багат шарового плоского епітелію ектоцервіксу, визначена його знаходженням та контактом із зовнішнім середовищем [57]. Наявність кератину та глікогену в клітинах забезпечує міцність слизової оболонки, і відповідно функціонує для захисту. В нормі у період менопаузи та після пологової аменореї зустрічаються базальні клітини. Завжди пов'язана з наявністю ендокринних або запальних порушень виявлення базальних клітин у мазках в молодих жінок. Підкислення рН в піхві, обумовлене розщепленням глікогену за участю лактобактерій. У виділеннях з піхви в нормі склад клітин багат шарового плоского епітелію ектоцервіксу демонструє функціонування яєчників. Про підвищений рівень естрогену вказує велика чисельність поверхневих клітин. Вони зустрічаються у фолікулярній фазі, але їх показники досягають максимуму на 14 день менструального циклу та при станах гіперпродукції естрогену. Спостерігається виявлення проміжних клітин спочатку фолікулярної фази та спостерігається значний пік в лютеїновій фазі циклу [29, 57, 68].

В наших дослідженнях контрольну групу спостережень становили цитологічні мазки від жінок, які проходили профілактичний огляд, без шкідливих звичок та без проявів запальних процесів репродуктивних органів (ВПЛ-негативні).

В результаті цитологічних досліджень мазків з поверхні шийки матки жінок контрольної групи було встановлено, що основну клітинну популяцію становили поверхневі та проміжні клітини багат шарового плоского епітелію, які розташовувалися невеликими групами та шарами (рис. 3.1). Епітеліоцити мали нормальну структуру ядер та цитоплазми, в окремих клітинах визначались ознаки вакуолізації цитоплазми.

Мікрофлора в мазках жінок контрольної групи представлена в основному лактобацилами (*Doderleinbacillus*), які належать до нормальної мікрофлори геніталій. Значна їх кількість виявляється в пізній лютеїновій

фазі менструального циклу, під час вагітності, в ранньому постменопаузальному періоді. Лактобацили забезпечують підтримку кислого середовища в піхві, яке попереджує розвиток патогенної мікрофлори (рис.3.1).

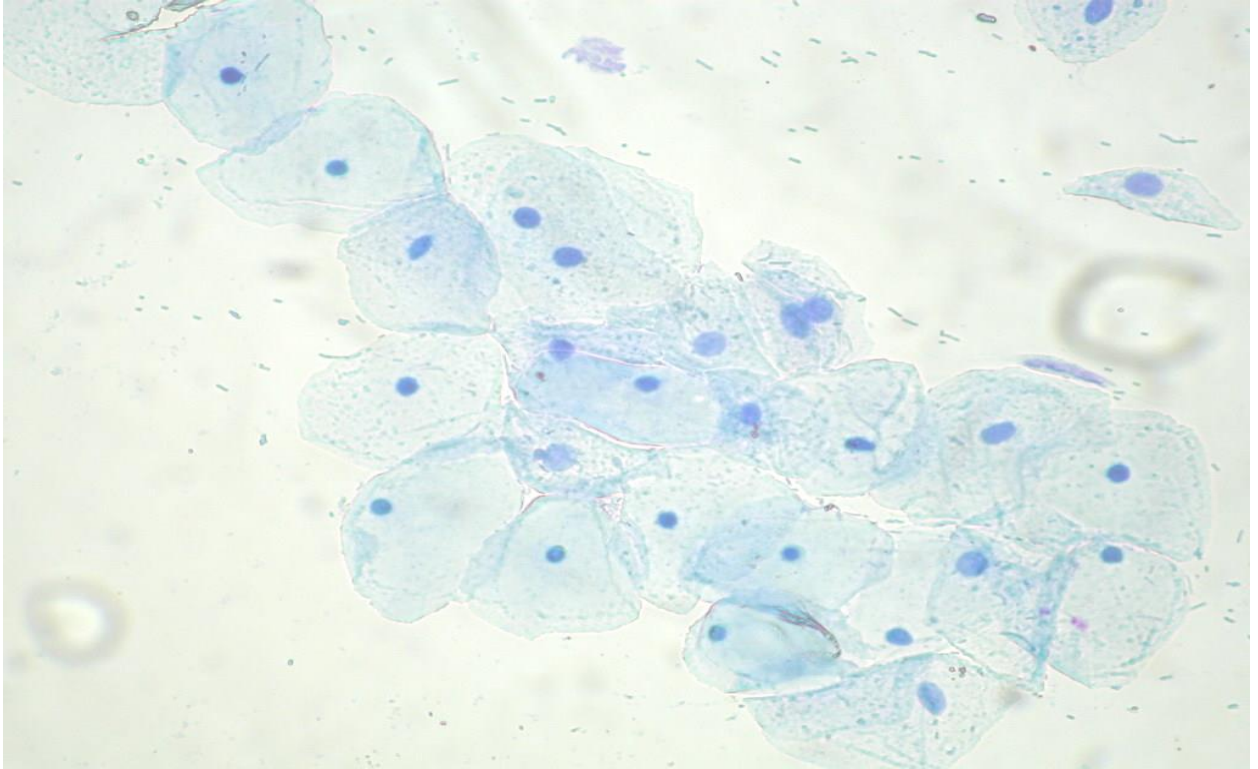


Рис. 3.1. Мазок з шийки матки жінки 1 групи (контроль). Поверхневі та проміжні клітини плоского епітелію. Запальна інфільтрація відсутня (зabarвлення за Романовським-Гімзе; Об.х40, Ок.х10)

Ядра епітеліальних клітинах здебільшого були округлої форми, з чітко окресленою ядерною мембраною (рис. 3.2).

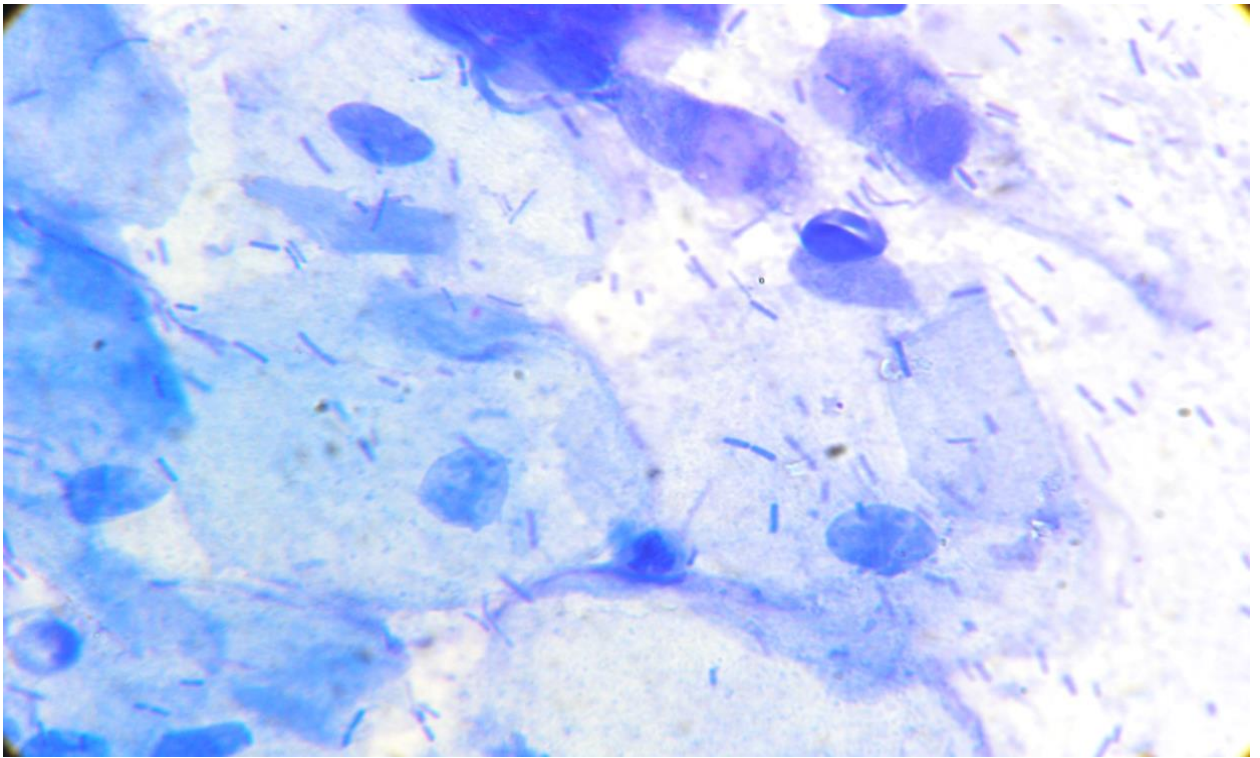


Рис. 3.2. Мазок з шийки матки жінки 1 групи (контроль). Шар проміжних клітин багат шарового плоского епітелію без особливостей на фоні лактобактерій, запальна інфільтрація відсутня (зabarвлення за Романовським-Гімза; Об.х100, Ок.х10)

Однорядний високим циліндричний епітелій з ексцентричними ядрами та дрібними вакуолями в цитоплазмі вкриває слизова оболонку цервікального каналу. Залози ендocerвіксу відрізняються від реальних залоз матки, бо мають неоднакову будову секретуючої та вивідної частин. Розвиток залоз носить індивідуальний характер, тому необхідно з обережністю оцінювати їх стан, особливо це важливо з урахуванням можливих змін при постановці діагнозу гіперплазії залозистого епітелію у шийці матки. Від синтетичних процесів в циліндричного епітелію залежать розміри клітин, форма та морфологія. За формою клітини можуть бути циліндричні та нагадувати кубічний епітелій. Від площини, в якій продивляються клітини у цитологічному препараті залежить оцінка морфології епітелію ендocerвіксу. Вони мають вигляд циліндричного епітелію в горизонтальній площині. При мікроскопії можна спостерігати

збереженість війок на апікальному кінці клітин з вираженими ядрами округлої або овальної форми. Цитоплазма може бути різного ступеню вакуолізації в залежності від кількості секрету. З центрально розташованими ядрами з дрібнозернистим рівномірно розташованим хроматином у вертикальному положенні клітини цервікального каналу округлої форми [11, 30].

Недиференційовані кубічні клітин і субциліндричні (субепітеліальні або камбіальні клітини) можуть розташовуватися на базальній мембрані під циліндричним епітелієм. З чіткими рівними контурами та округлої форми, відносно великих розмірів ядра з рівномірно розподіленим хроматином в субциліндричних клітинах. Камбіальні клітини забезпечують процес регенерації циліндричного епітелію в фізіологічних умовах менструального циклу. Від ступеня зрілості камбіальних клітин залежить їх кількість, їх кількість не є сталою. Оскільки при певних умовах вони можуть диференціювати в бік призматичного, або багат шарового плоского епітелію, що являє собою унікальну властивість цих клітин – біпотентність [42, 69].

Циклічні зміни виражені помірно в епітелії ендocerвікса. Спостерігається гелі слизового секрету, що продукують клітини ендocerвікального епітелію. Особливо в передовулярний період відзначається надмірна лужна секреція слизу під час фолікулярної фази. Секрет є бар'єром для інфекції, тому має важливе значення для запліднення [55, 93].

В результаті цитологічних досліджень мазків з цервікального каналу жінок 1 групи було встановлено, що клітинну популяцію склали переважно проміжні клітини багат шарового плоского епітелію та клітини залозистого епітелію, представлені в основному високими циліндричними секреторними клітинами та вогнищевими скупченнями циліндричних війкуватих клітин (рис.3.3.).

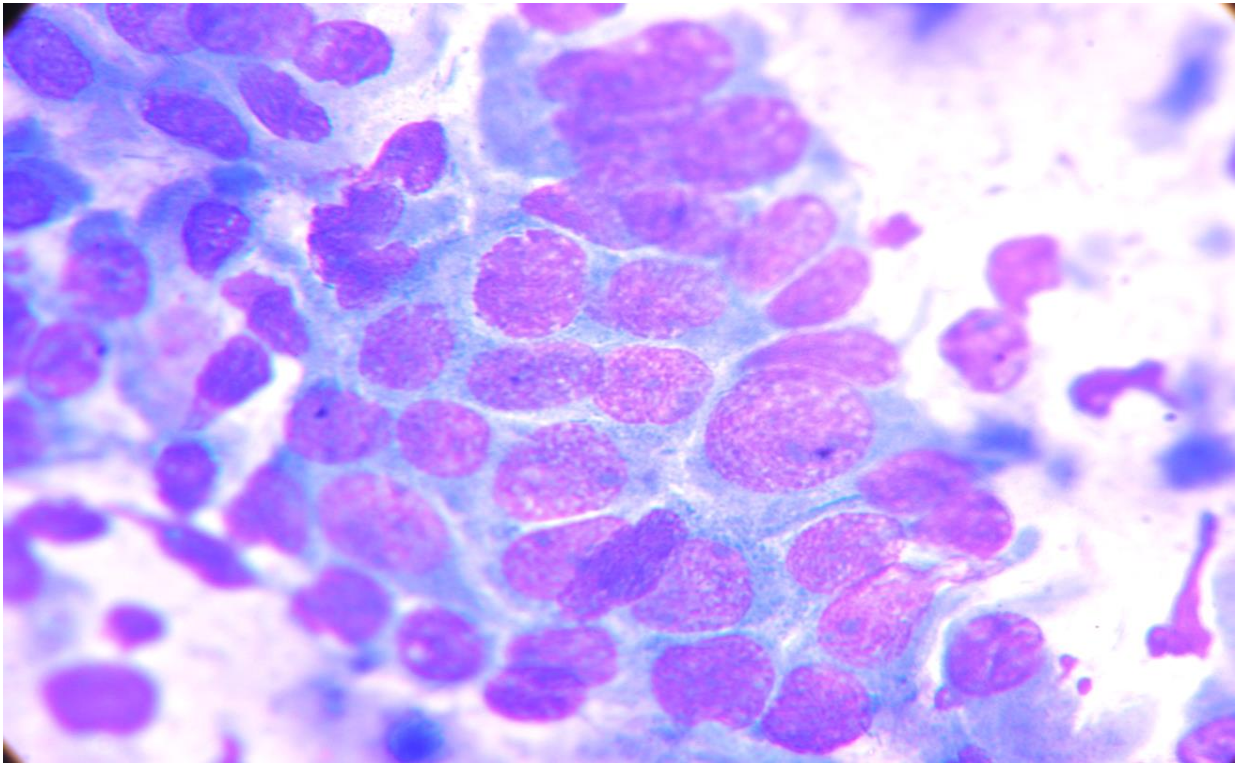


Рис. 3.3. Мазок з цервікального каналу жінки 1 групи (контроль). Шар клітин залозистого епітелію без особливостей, запальна інфільтрація відсутня (зabarвлення за Романовським-Гімза; Об.х100, Ок.х10)

За типом цитологічних мазків матеріалу від жінок досліджуваної 1 групи (контроль) згідно з класифікацією «Bethesda system» (2014) розподілено наступним чином (табл. 3.1). Варто розглянути також дані «Скринінгового дослідження мазків шийки матки популяції жінок фертильного віку в місті Київ», виконане в 2020 році на базі відділення «Реабілітації репродуктивної функції жінок з науковою групою з питань впливу екології на репродуктивне здоров'я жінок» ДУ «Інституту педіатрії, акушерства і гінекології імені академіка О.М. Лук'янової НАМН України»; за типом цитологічних мазків матеріалу від жінок згідно з класифікацією «Bethesda system» (2014) розподілено за 4 типами мазків: NILM, ASC-US, LSIL, HSIL (сумарна кількість залучених до дослідження жінок становить – 250 осіб) (табл. 3.1). З цього дослідження маємо інформацію щодо поширеності вірусу папіломи людини в популяції жінок фертильного віку в

місті Київ – показник становить 11,7 %, що за значенням відповідає глобальному показнику у всьому світі.

Таблиця 3.1.

Тип цитологічних мазків згідно з класифікацією «Bethesda system» матеріалу від жінок 1 групи (контроль) та популяції жінок м.Києва

Група	NILM – без проявів атипії	ASC-US – запальний тип з атипією окремих клітин	LSIL – слабкі дисплатичні зміни багат шарового плоского епітелію	HSIL – помірні дисплатичні зміни багат шарового плоского епітелію
1 (контроль)	10 жінок – 100 %	Не виявлено	Не виявлено	Не виявлено
Популяція жінок м. Києва	218 жінок – 87,2 %*	18 жінок – 7,2 %*	9 жінок – 3,6 %*	5 жінок – 2 %*

Примітка: * – достовірність різниці з групою контролю ($p < 0,05$).

Клітини запальної інфільтрації в мазках з шийки матки та цервікального каналу були представлені, в основному, поодинокими нейтрофілами. В середньому в мазках з шийки матки нейтрофіли становили $(6,0 \pm 0,18)$ %, в мазках з цервікального каналу - $(3,6 \pm 0,12)$ %, а лімфоцити $(0,35 \pm 0,01)$ % та $(1,4 \pm 0,04)$ % відповідно (табл. 3.2), що свідчить про відсутність гострого та хронічного запального процесу. В досліджених мазках макрофаги, у вигляді великих клітин з виразною цитоплазмою, були в незначній кількості і становили в середньому $(2,95 \pm 0,08)$ % та $(2,65 \pm 0,09)$ % відповідно (табл. 3.2).

Таблиця 3.2.

Клітинний склад запальної інфільтрації в мазках з цервікального каналу жінок 1 групи (контроль)

Клітинний склад запальної інфільтрації (%)		1 група (контроль)
Лімфоцити	Шийка матки	0,35±0,01
	Цервікальний канал	1,40±0,04
Нейтрофіли	Шийка матки.	6,00±0,18
	Цервікальний канал	3,60±0,12
Макрофаги	Шийка матки	2,95±0,08
	Цервікальний канал	2,65±0,09

Клітини запальної інфільтрації в мазках з шийки матки та цервікального каналу були представлені, в основному, поодинокими нейтрофілами (рис. 3.4).

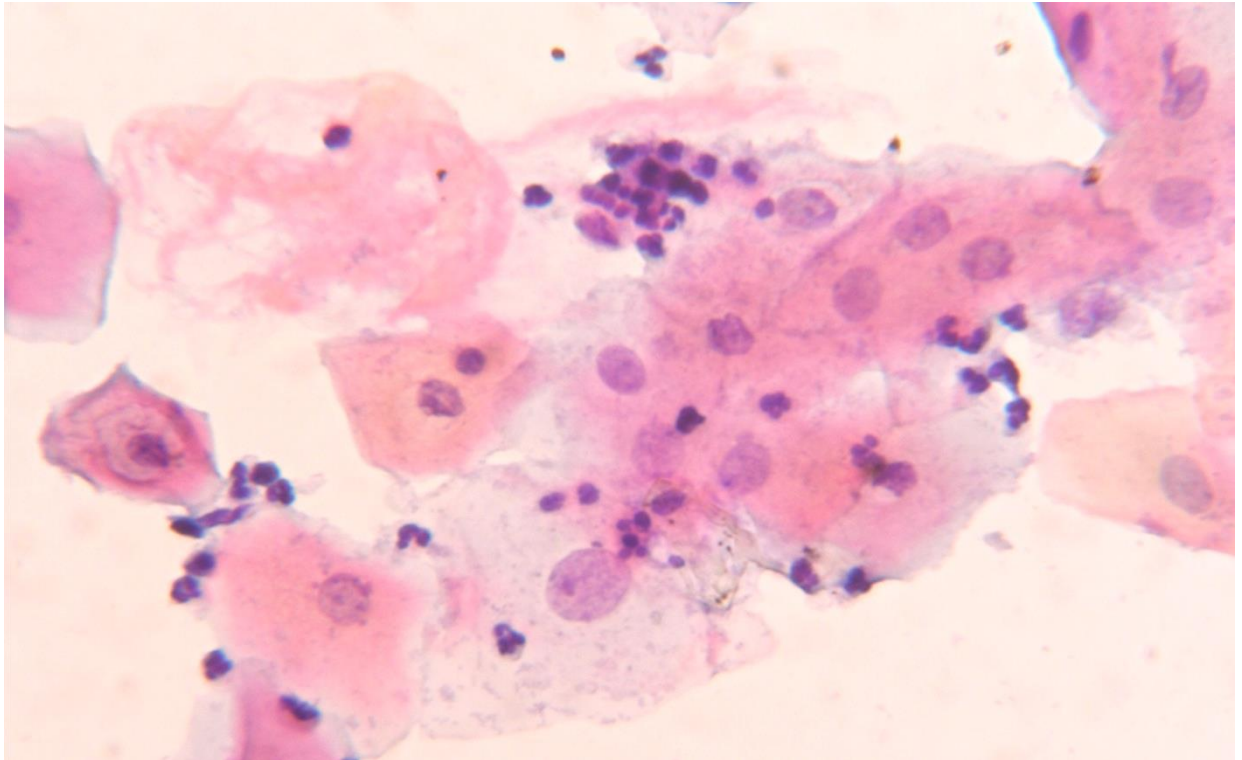


Рис. 3.4. Мазок з цервікального каналу жінки 1 групи (контроль). Проміжні клітини багат шарового плоского епітелію, поодинокі нейтрофіли (забарвлення за Папаніколау; Об.х40,Ок.х10)

Таблиця 3.3.

Середні показники морфологічних змін в клітинах епітелію шийки матки жінок 1 групи (контроль)

Дані морфометричного дослідження (%)		1 група (контроль)
Вакуолізація	Ядро	0,00
	Цитоплазма	2,15±0,001
Койлоцитоз		0,00
Дискаріоз		0,00
Двоядерність		0,00
Макронуклеоз		0,00
Паракератоз		0,00
Багатоядерність		0,00

Таким чином, в мазках з шийки матки та цервікального каналу жінок репродуктивного віку контрольної групи запальної інфільтрації не виявлено (незначні вогнищеві скупчення нейтрофілів), бактеріальна флора представлена лактобацилами, які забезпечують функціональну підтримку біоценоза в піхві. Округлої форми ядра епітеліальних клітинах, з виразно окресленою ядерною мембраною, хроматин рівномірно розподілений, не відмічався клітинно-ядерний поліморфізм.

3.2. Цитологічні особливості епітелію шийки матки та цервікального каналу жінок репродуктивного віку, що зловживають наркотиками

В нашому дослідженні жінок 2 групи (наркотики) відмічались виразні реактивні зміни клітин плоского та залозистого епітелію, які проявлялись пікнозом та збільшенням розмірів ядер, розрихлюванням хроматину, базофілією цитоплазми. Тобто з перчисленних ознак можна стверджувати, що була наявна «запальна атипія», яку доволі тяжко відрізнити від змін епітеліальних клітин при дисплазії шийки матки. А також відмічались тяжкі дистрофічні та некробіотичні зміни клітин епітелію.

Дистрофічні зміни клітин проявлялись у вигляді цитолізу, каріолізису, каріопікнозу, оголеності ядер. Цитоплазма більшості клітин мала слабе еозинофільне забарвлення, зустрічались клітини із зовсім світлою, оптично порожньою цитоплазмою (табл. 3.4).

Таблиця 3.4.

Середні показники морфологічних змін в клітинах епітелію шийки матки у жінок 2 групи (наркотики) в порівнянні з групою контролю

Дані морфометричного дослідження (%)		1 група (контроль)	2 група (наркотики)
Вакуолізація	Ядро	0,00	55,50±0,017*
	Цитоплазма	2,15±0,0014	9,50±0,015*
Койлоцитоз		0,00	41,00±0,012*
Дискаріоз		0,00	62,25±0,019*
Двоядерність		0,00	22,25±0,008*
Макронуклеоз		0,00	28,80±0,0010*
Паракератоз		0,00	33,54±0,012*
Багатоядерність		0,00	25,80±0,009*

Примітка: * – достовірність різниці з групою контролю ($p < 0,05$).

Від збудника, що вплинув на трансформацію клітин та часу тривалості запального процесу залежать цитологічні особливості мазків при різних цервікальних інфекціях. Присутність значної кількості бактерій в цитологічних мазках не є однозначною ознакою інфікування, тому що вони завжди є компонентами піхвового та шийкового біоценозу. Неспецифічні та специфічні характерні зміни епітелію спостерігаються за різких умов зміщення складу вагінального мікробіому, в результаті може виникнути запальна реакція [27, 36].

За типом цитологічних мазків матеріалу від жінок 2 групи (наркотики) згідно з класифікацією «Bethesda system» (2014) розподілено наступним чином (таб. 3.5).

Таблиця 3.5.

**Тип цитологічних мазків згідно класифікації «Bethesda system»
матеріалу від жінок 2 групи (наркотики) у порівнянні з популяцією
жінок м. Києва та групою контролю**

Група	NILM – без проявів атипії.	ASC-US – запальний тип з атипією окремих клітин	LSIL – слабкі дисплатичні зміни багатошарового плоского епітелію	HSIL – помірні дисплатичні зміни багатошарового плоского епітелію
1 (контроль)	10 жінок – 100%	Не виявлено	Не виявлено	Не виявлено
Популяція жінок м. Києва	218 жінок – 87,2 % *	18 жінок – 7,2 % *	9 жінок – 3,6 % *	5 жінок – 2 % *
2 (наркотики)	19 жінок – 63,3% * ^{&}	6 жінок – 20% * ^{&}	5 жінок – 16,6% * ^{&}	Не виявлено

Примітка: * – достовірність різниці з групою контролю ($p < 0,05$).

Примітка: [&] – достовірність різниці з популяцією жінок м. Києва ($p < 0,05$).

Вакуолізація цитоплазми з утворенням особливо виразного перинуклеарного гала, однозначні зміни з боку ядра, появу чітко виражених ядерць, базофілія цитоплазми, каріорексис – ці морфологічні зміни епітелію спостерігаються при запаленні. Може перебігати в гострій та хронічній формах запальна реакція при бактеріальному інфікуванні. При гострій формі вона проявляється наявністю великої кількості поліморфноядерних лейкоцитів, продуктів розпаду клітин, значною кількістю мікрофлори, зі зміною забарвлення з більш вираженою еозинофілією цитоплазми епітеліальних клітин. Визначають, що при хронічних цервіцитах запальна реакція може також супроводжуватися гіперкератозом та імунологічними реакціями з боку сполучної тканини –

присутність великої кількості лімфоцитів з гермінативних центрів, гістіоцитів різного ступеня зрілості та наявність лімфоцитів, інфільтрація плазматичними клітинами [29, 71, 87].

Таблиця 3.6.

Клітинний склад запальної інфільтрації в мазках з цервікального каналу у жінок 2 групи (наркотики) у порівнянні з групою контролю

Клітинний склад запальної інфільтрації (%)		1 група (контрольна)	2 група (наркотики)
Лімфоцити	Шийка матки	0,35±0,01	18,90±0,07*
	Цервікальний канал	1,40±0,04	12,90±0,09*
Нейтрофіли	Шийка матки	6,00±0,18	41,05±0,86*
	Цервікальний канал	3,60±0,12	35,00±0,50*
Макрофаги	Шийка матки	2,95±0,08	8,10±0,09*
	Цервікальний канал	2,65±0,09	10,95±0,08*

Примітка: * – достовірність різниці з групою контролю ($p < 0,05$).

В шести препаратах жінок з діагнозом ASC-US відмічались морфологічні ознаки вірусної трансформації клітин, а саме, наявність койлоцитів (рис. 3.5). Койлоцити - клітини проміжного шару багат шарового плоского епітелію з пікнотичними ядрами та чітко окресленим перинуклеарним просвітом цитоплазми. Спостерігається збільшення ядер, гіперхромазія та порушення ядерної мембрани.

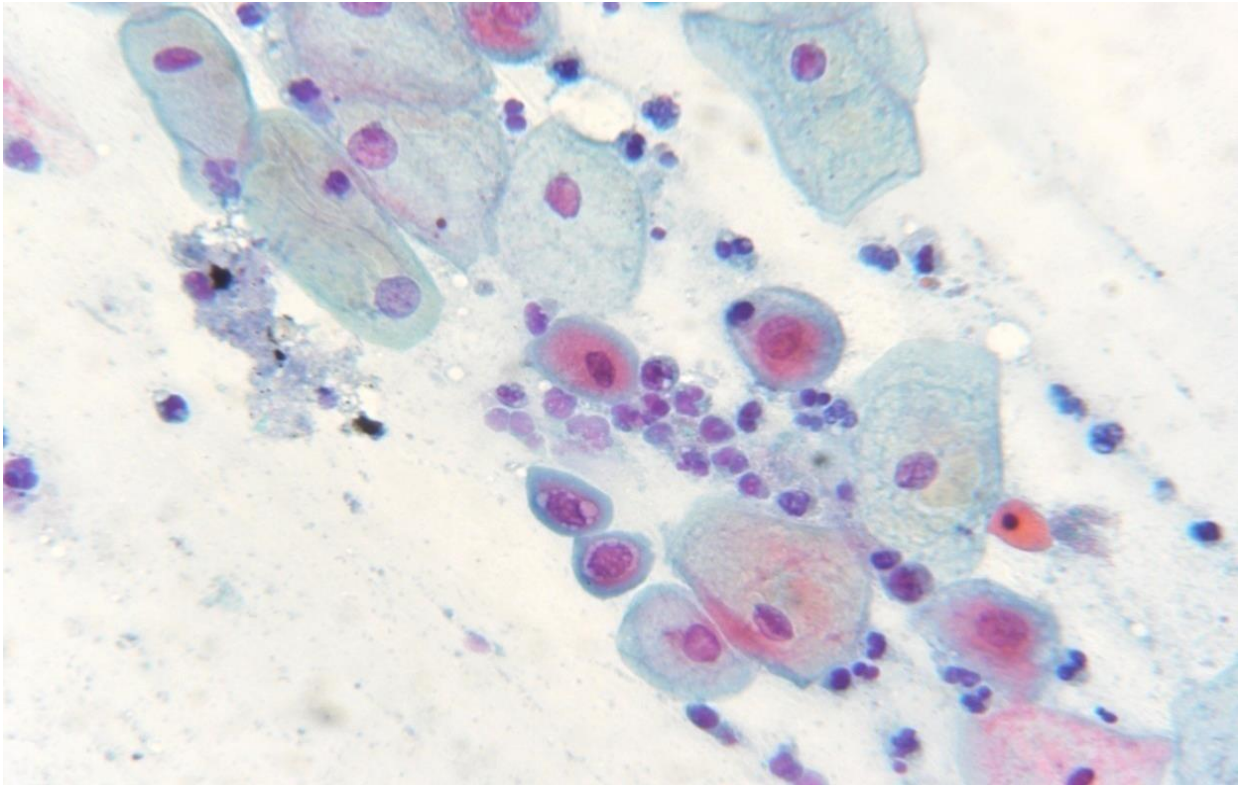


Рис. 3.5. Мазок з цервікального каналу жінки 2 групи (наркотики) з типом ASC-US. Койлоцити, запальна інфільтрація (зabarвлення за Папаніколау; Об.х40, Ок.х10)

В частині випадків в проміжному та парабазальному шарах плоского епітелію зустрічались клітини з гіперхромними ядрами, в яких можна було побачити одне чи два центрально розташованих ядерця, двоядерні та багатоядерні клітини хронічного запалення (рис.3.6, рис.3.7).

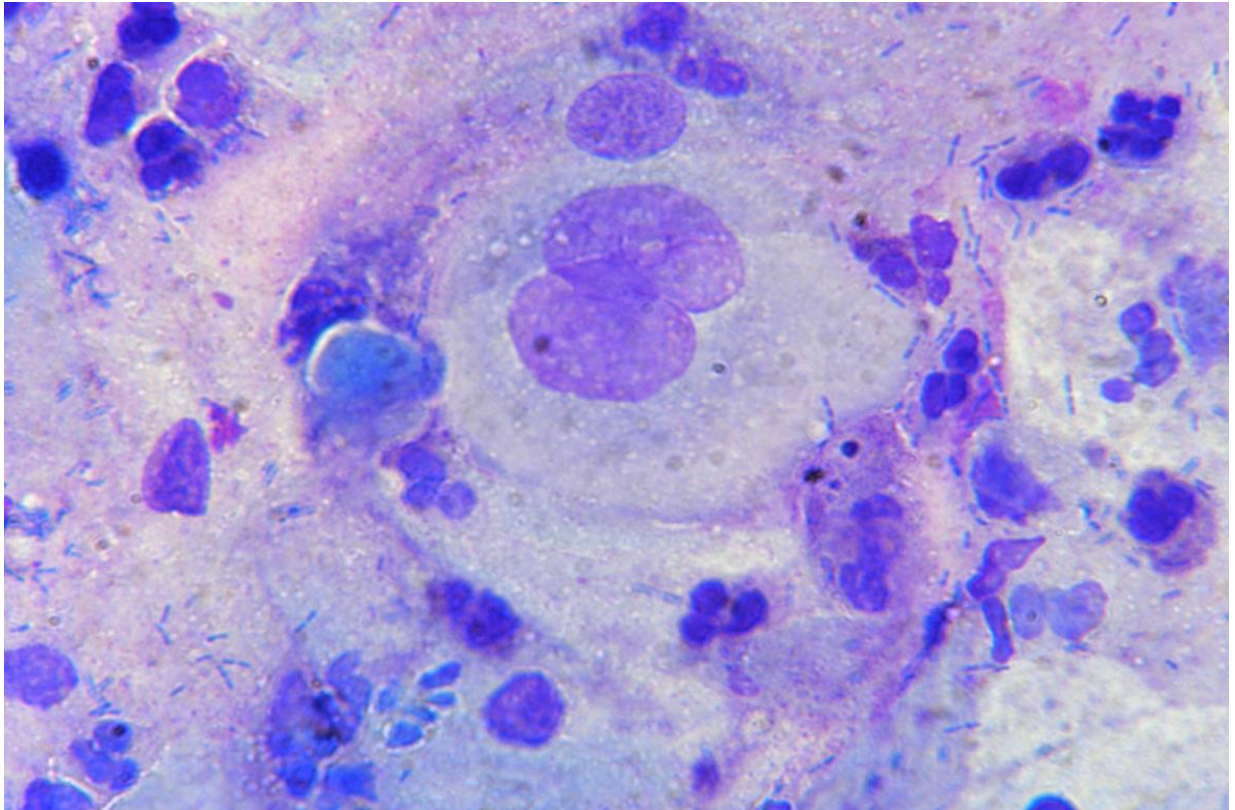


Рис. 3.6. Мазок з шийки матки жінки 2 групи (наркотики) з типом LSIL. Двоядерна клітина багатоядерного плоского епітелію на фоні запальної інфільтрації (зabarвлення за Романовським-Гімза; Об.х100, Ок.х10)

В наших дослідженнях, у всіх жінок з цитологічним діагнозом слабка дисплазія за типом мазка LSIL методом ПЛР було підтверджено наявність папіломовірусного інфікування. Вірус папіломи людини, як і багато інших, які містять ДНК, є біологічним агентом, який здатний змінювати ріст, диференціювання та морфологію клітин. Проникаючи до клітини, вірус викликає зміни її структури, біохімічної і генетичної організації, вносить до клітини чужорідну генетичну інформацію. Відмічається, що утворення двоядерних та багатоядерних клітин є характерною особливістю прояву цитодегенеративної дії вірусу. В основі їх утворення зазвичай лежать механізми злиття плазматичних мембран клітин, оскільки деякі віруси мають ферменти, які здатні лізувати клітинні оболонки [61, 82, 117].

Характерним для значної кількості ДНК вмістних вірусів є формування цитоплазматичних, внутрішньоядерних включень та вакуолей. З результатів

досліджень встановлено, що збільшується кількість епітеліальних клітин з вакуолізацією ядра та цитоплазми. Негативне зміщення процесу водного та енергетичного обміну клітин полягає в основі механізму утворення вакуолізованих клітин.

З результатів було встановлено наявність значної кількості епітеліальних клітин з вакуолізацією ядра та цитоплазми (рис. 3.7).

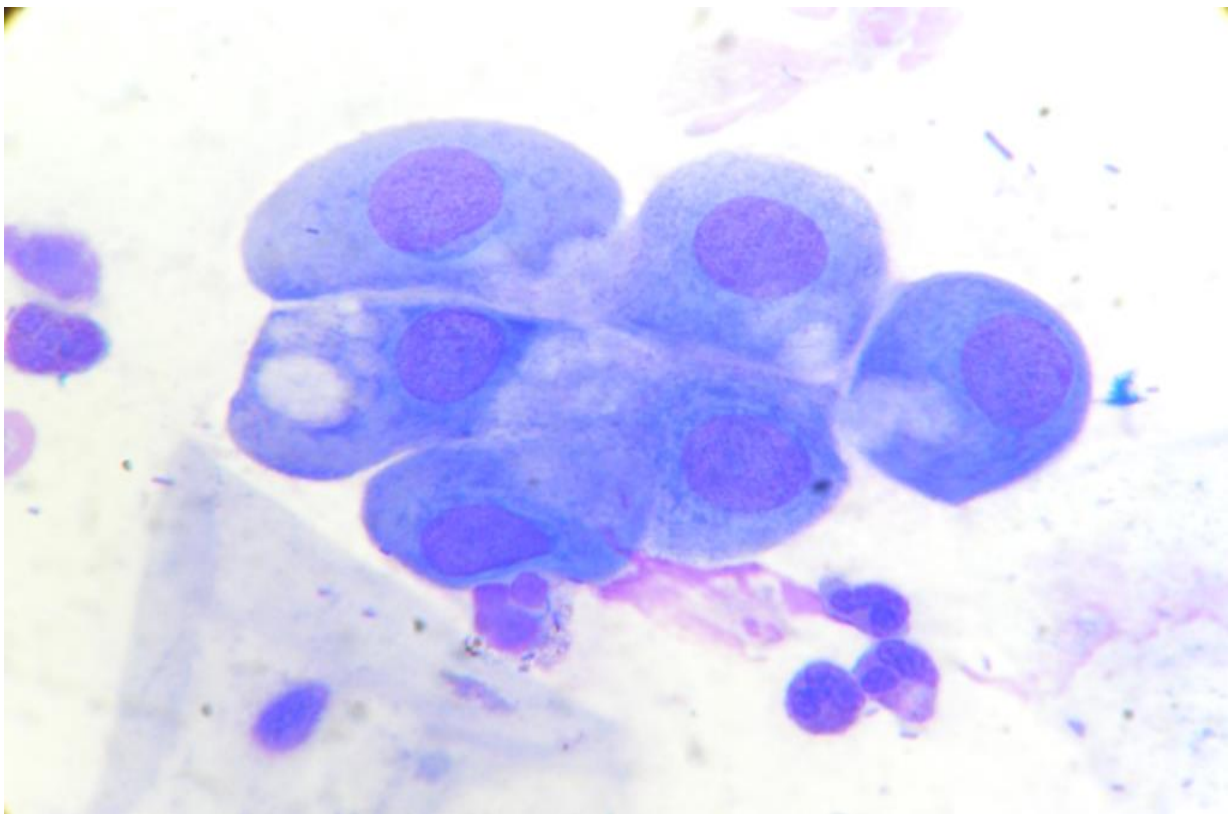


Рис. 3.7. Мазок з цервікального каналу жінки 2 групи (наркотики) з типом LSIL, ВПЛ-позитивна. Пласт диспластично змінених клітин плоского епітелію (слабка дисплазія), частина клітин з великими вакуолями в цитоплазмі (забарвлення за Романовським-Гімза; Об.х100, Ок.х10)

Являється характерною особливістю прояву цитодегенеративної дії вірусів утворення багатоядерних і двоядерних клітин (рис. 3.8). Як правило, механізм злиття плазматичних мембран двох клітин лежить в основі утворення двоядерних клітин, оскільки віруси мають ферменти, які можуть лізувати клітинну оболонку.

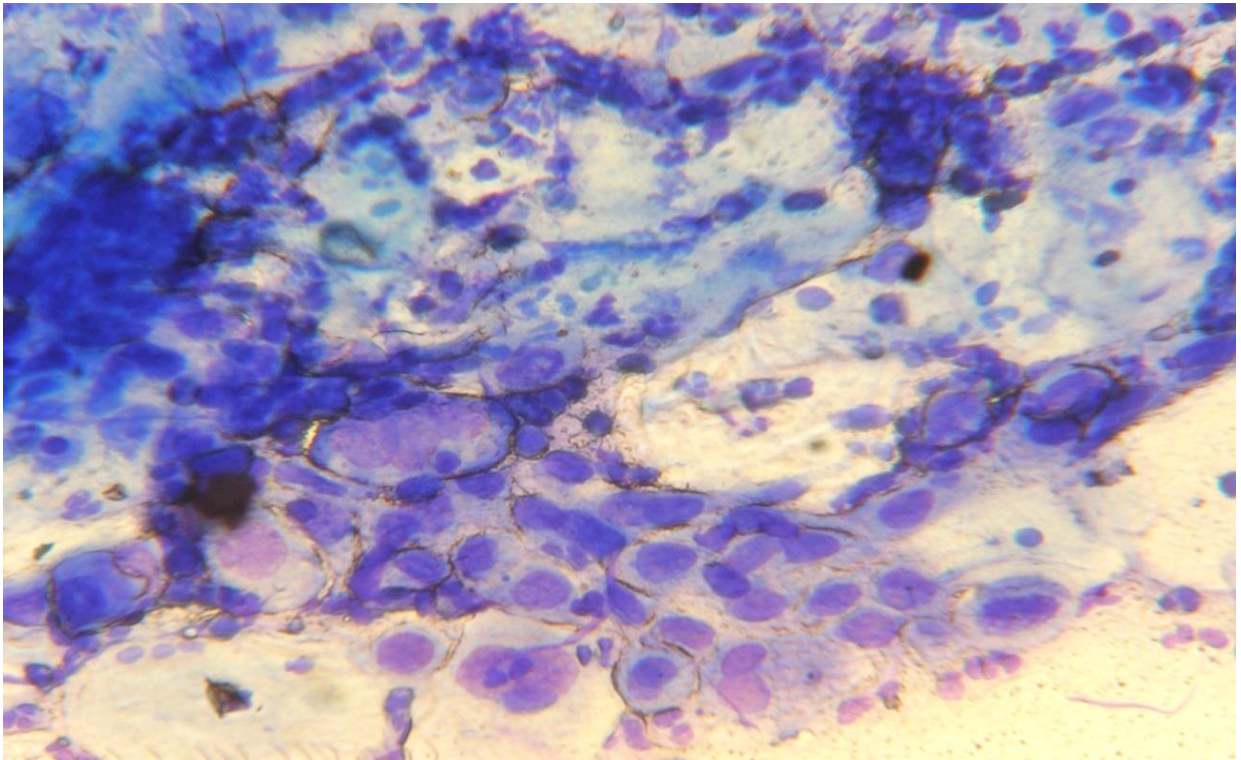


Рис. 3.8. Мазок з шийки матки жінки 2 групи (наркотики) з типом LSIL. Багатоядерна клітина багатошарового плоского епітелію, запальна інфільтрація (зabarвлення за Романовським –Гімза; Об.х40, Ок.х10)

Койлоцити, в мазках з шийки матки та цервікального каналу були представлені клітинами проміжного або поверхневого шарів багатошарового плоского епітелію, які розташовувались окремо або невеликими групами. Останні були з вираженою зоною просвітлення навколо ядра – «перенуклеарне гало», яке виникає як результат часткового некрозу цитоплазми від цитопатогенної дії ВПЛ (рис. 3.9).

У 25 % мазках жінок 2 групи (наркотики) були виявлені атипові клітини в цитологічних препаратах – типи мазків ASC-US та LSIL (рис. 3.10, рис. 3.11).

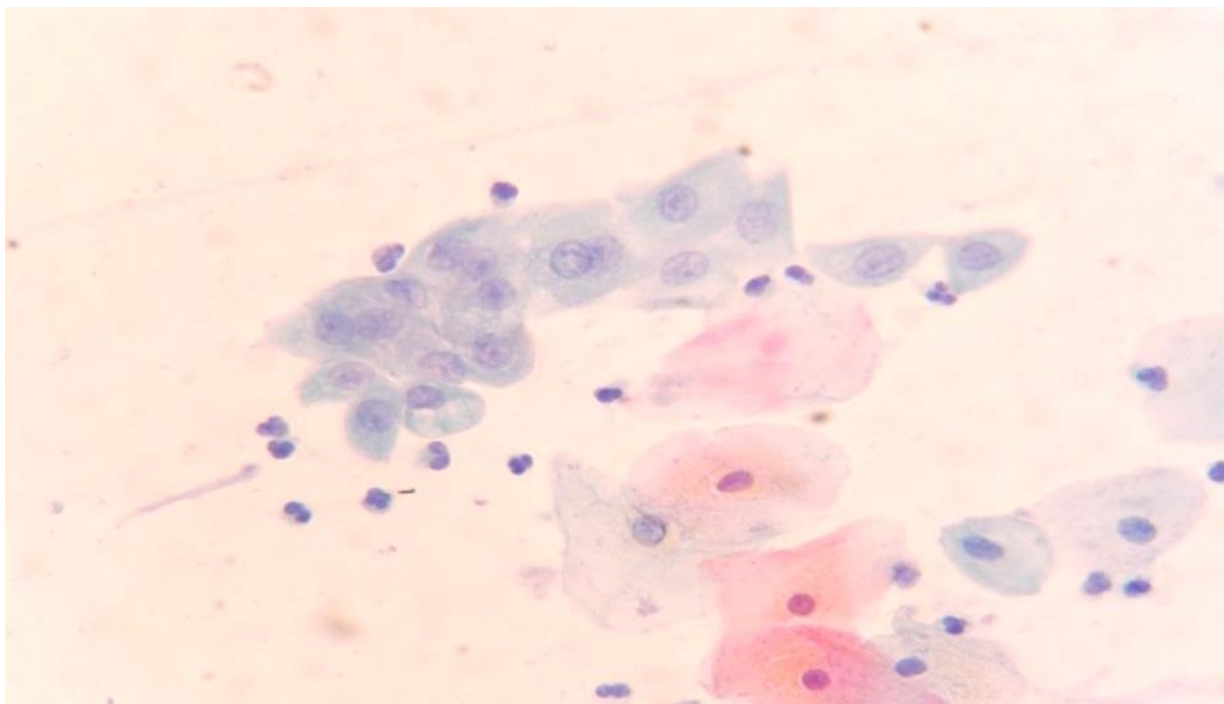


Рис. 3.9. Мазок з шийки матки жінки 2 групи (наркотики) з типом LSIL, ВПЛ-інфікована. Пласт диспластично змінених клітин багатошарового плоского епітелію з ознаками койлоцитоза (зabarвлення за Папаніколау; Об.х40, Ок.х10)

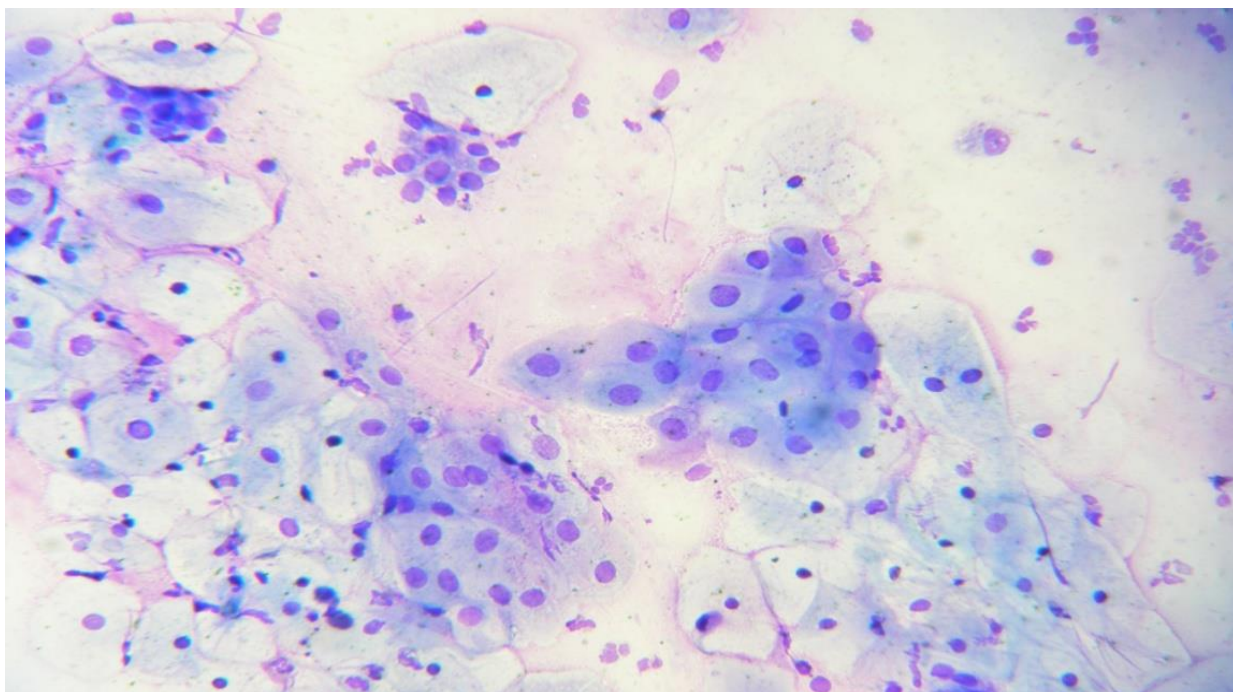


Рис. 3.10. Мазок з цервікального каналу жінки 2 групи (наркотики) з легкою дисплазією, ВПЛ-інфікована. Групи диспластично змінених клітин багатошарового плоского епітелію (зabarвлення за Романовським-Гімза; Об.х40, Ок.х10)

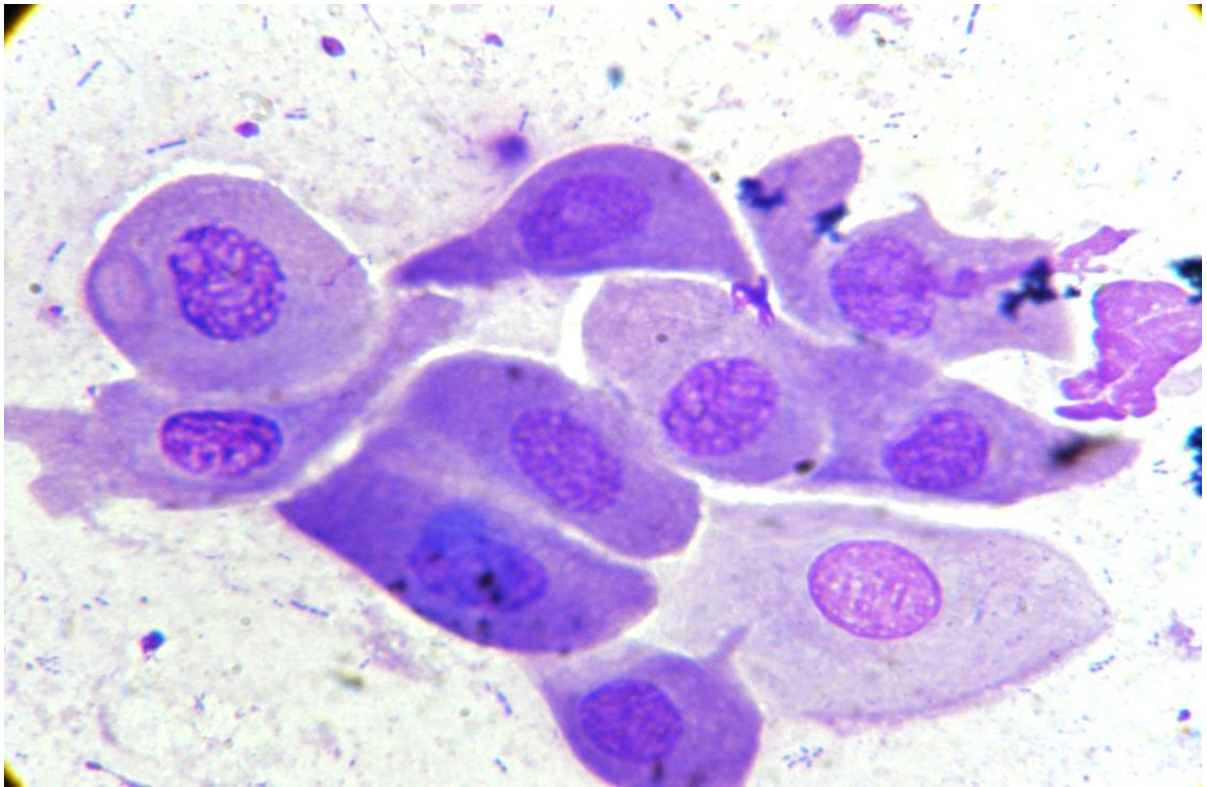


Рис. 3.11. Мазок з шийки матки жінки 2 групи (наркотики) з типом LSIL, ВПЛ-інфікована. Група клітин багатошарового плоского епітелію з вираженим ядерним поліморфізмом, паракератозом (зabarвлення за Романовським-Гімза; Об.х100, Ок.х10)

У шести обстежених жінок з типом мазка ASC-US та у всіх обстежених жінок з типом мазка LSIL (слабка дисплазія) виявлялись морфологічні ознаки папіломовірусного інфікування, що було підтверджено методом ПЛР і свідчить про здатність вірусів папіломи людини викликати порушення метаболічних процесів та структурні зміни в індукованому епітелії, які приводять до непластичних змін клітин (рис. 3.12)

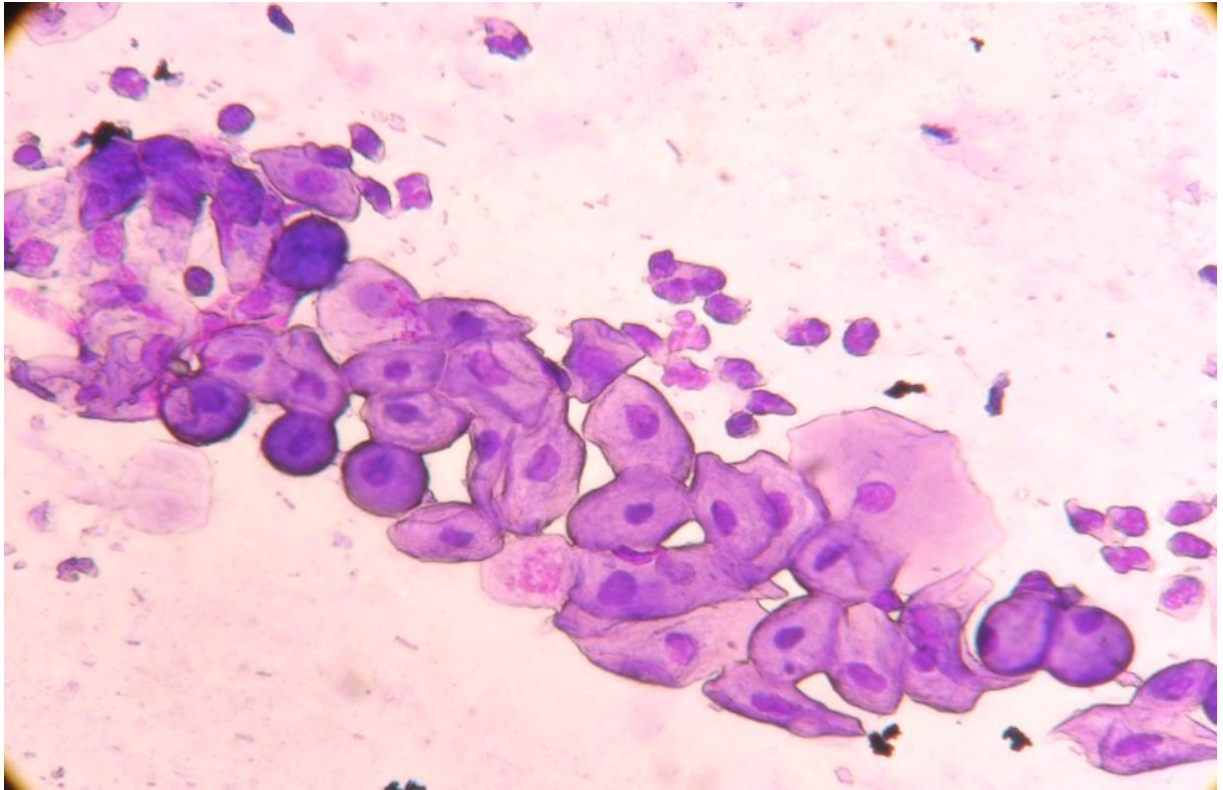


Рис. 3.12. Мазок з шийки матки жінки 2 групи (наркотики) з типом LSIL, ВПЛ-інфікована. Пласт клітин багатошарового плоского епітелію з ознаками вірусного інфікування – паракератоз, койлоцитоз (забарвлення за Романовським-Гімза; Об.х40, Ок.х10)

3.3. Цитологічні особливості епітелію шийки матки та цервікального каналу жінок репродуктивного віку, що зловживають алкоголем

У жінок досліджуваної 3 групи (алкоголь) суттєво виражено показники мазків типів ASC-US та LSIL (табл. 3.7). В цитологічних препаратах основну клітинну популяцію склали поверхневі та проміжні клітини багатошарового плоского епітелію, які розташовувалися невеликими групами і шарами з ознаками дистрофічних змін та пласти клітин залозистого епітелію. Відмічалась виражена запальна інфільтрація та значне перекриття препарату бактеріальною флорою у всіх обстежених жінок з цим цитологічним діагнозом (рис. 3.13).

Таблиця 3.7.

**Тип цитологічних мазків згідно з класифікацією “Bethesda system”
матеріалу від жінок 3 групи (алкоголь) в порівнянні з популяцією жінок
м. Києва, групами контроль та наркотики**

Група	NILM – без проявів атипії.	ASC-US – запальний тип з атипією окремих клітин	LSIL – слабкі дисплатичні зміни багатошарового плоского епітелію	HSIL – помірні дисплатичні зміни багатошарового плоского епітелію
1 (контроль)	10 жінок – 100%	Не виявлено	Не виявлено	Не виявлено
Популяція жінок м. Києва	218 жінок – 87,2 %*	18 жінок – 7,2 %*	9 жінок – 3,6 %*	5 жінок – 2 %*
2 (наркотики)	19 жінок – 63,3%*&	6 жінок – 20%*&	5 жінок – 16,6%*&	Не виявлено
3 (алкоголь)	12 жінок – 80%*&#	1 жінка – 6,6%*&#	2 жінок – 13,3%*&#	Не виявлено

Примітка: * – достовірність різниці з групою контролю ($p < 0,05$).

Примітка: & – достовірність різниці з популяцією жінок м. Києва ($p < 0,05$).

Примітка: # – достовірність різниці з групою наркотики ($p < 0,05$).

Залозистий епітелій ендоцервікса з вираженими дистрофічними змінами та ознаками проліферації (Рис. 3.14).

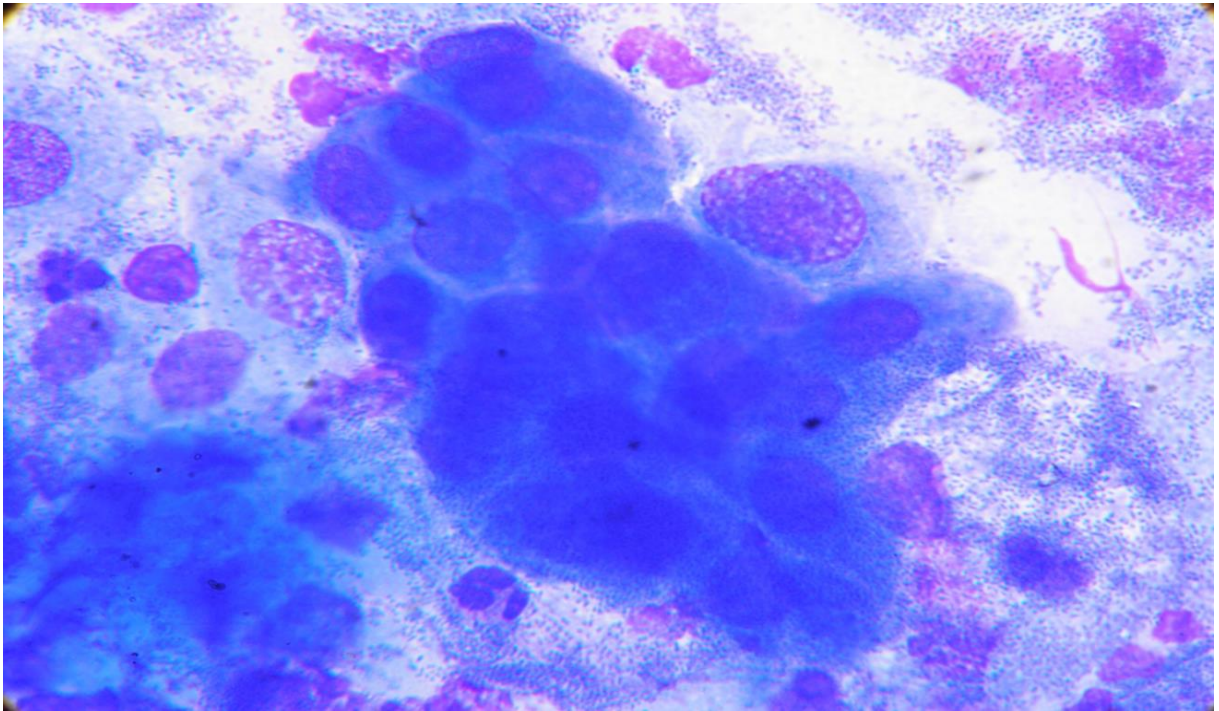


Рис. 3.13. Мазок з цервікального каналу жінки 3 групи (алкоголь) з типом ASC-US. Клітини багатошарового плоского епітелію та пласт клітин залозистого епітелію з виразним ядерним поліморфізмом, нерівномірним розподілом хроматину та коко-бацилярна флора (зabarвлення за Романовським-Гімза; Об.х100, Ок.х10)

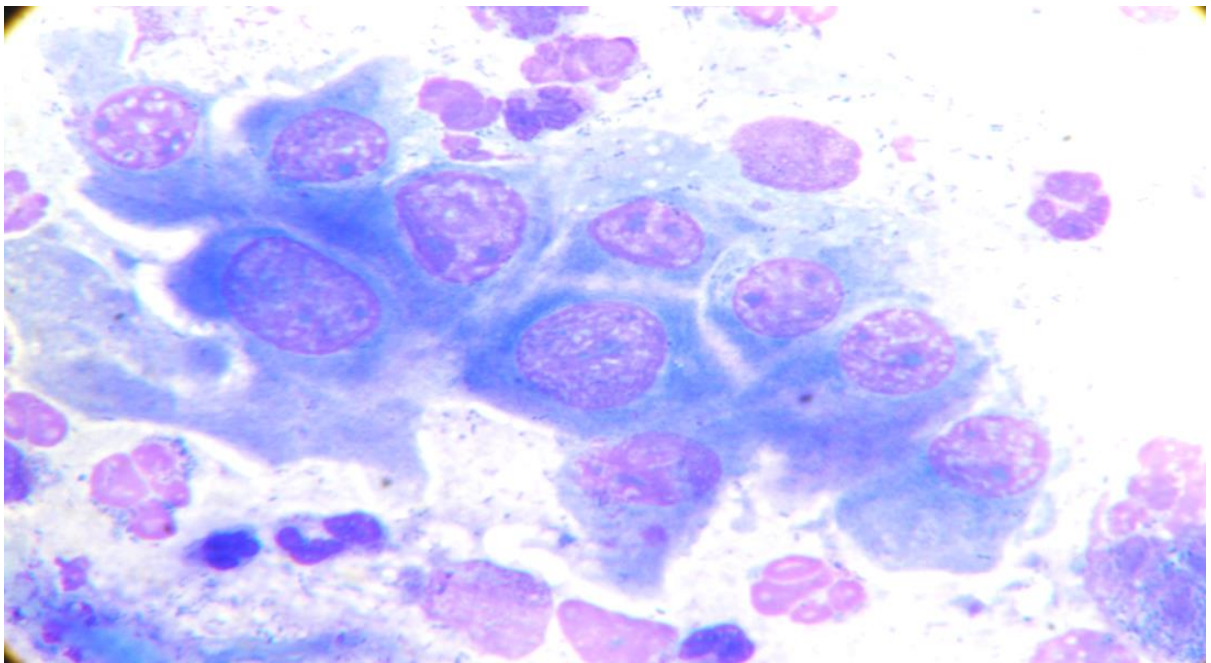


Рис. 3.14. Мазок з цервікального каналу жінки 3 групи (алкоголь) з типом LSIL. Пласт клітин залозистого епітелію ендocerвікса з вираженими дистрофічними змінами та ознаками проліферації, ініціація ядерців в ядрах (зabarвлення за Романовським-Гімза; Об.х100, Ок.х10)

Запальні зміни шийки матки при її інфекційному ушкодженні можна умовно розділити на захисні, деструктивні та регенеративні у відповідності до цитологічної картини [100].

За даними літератури встановлено, що захисні механізми включають кератинізацію плоского епітелію, а саме наявність гіперкератозу та паракератозу, плоскоклітинної метаплазії ендocerвікса. Наявністю гіперезинофільних поверхневих клітин з пікнотичними ядрами та без'ядерної луски проявляється цитологічна кератинізація. Ознакою суттєвих морфологічних змін внаслідок вірусного ушкодження епітелію та й загалом приховувати вміщенні глибше диспластичні зміни клітин в можливостях характеру паракератозу. Плоскоклітинна метаплазія є наслідком процесів відновлення ендocerвікального епітелію з резервних клітин. Варто відмітити, що плоскоклітинна метаплазія не представляє як таким проявом специфічних запальних процесів або інфекції [29, 97, 100, 108].

Характерними ознаками дегенеративного типу запальної реакції є прояв цитолізу, каріорексису, нерівномірного розподілу хроматину. Відповідні зміни демонструють запальні реакції клітини з інфікуванням та дегенеративними порушенням епітелію шийки матки. Відновлювальний тип запальних процесів в клітині проявляється ущільненням клітин епітелію, еозинофілією цитоплазми, змінами ядерного хроматину, виразним ступенем анізоцитоза, значною кількістю клітин в стадії мітозу. В порівнянні з процесами при раку, репаративні зміни не супроводжуються некрозом, групування клітин з атипією ядер відбувається без цілісних шарів та нерівномірних структур [36, 47, 100].

Бактеріальний вагіноз є специфічною інфекцією, що зустрічаються в мазках із піхви та цервікального каналу, причинами виникнення її можуть бути:

– різновиди грампозитивних коків (найпоширенішими при виявленні є стафілококи, стрептококи або їх міксти);

– піхвову гарднерелу (*Gardnerella vaginalis*) – це грам-варіабельні палички, що прикріплюються до поверхні епітеліальних клітин – називаються “ключовими” клітинами. При мікроскопії спостерігається поодинокі лейкоцити та „ключові” клітини. Важливо відмітити, що лактобацили та цитоліз не виявляється. В популяції з цервікальною інфекцією 5% хворих;

– хламідії, які є облігатними паразитами розвиваються як клітинні включення господаря. Характеру дегенеративній дії хламідій на епітелій відповідає утворення пухирців у цитоплазмі з подальшою фрагментацією оболонки клітин та лізисом, в мазках, забарвлених за Папаніколау. Часто при мікроскопії спостерігаються великі багатоядерні клітини з тільцями серповидних включень хламідій біля ядра;

– трихомоноз – сексуально-трансмісійне захворювання. Серед жінок із запальною уrogenітальною патологією захворюваність сечостатевим трихомонозом досягає 75%. В загальній кількості вони складають 10-30% захворювань, що передаються статевим шляхом. Екстрагенітальні стани такі, як ерозія шийки матки часто виникають у жінок як ускладнення з боку статевої системи [60, 93].

В цитологічних препаратах відмічалась наявність атипових клітин на тлі вираженої запальної інфільтрації (рис. 3.15, рис. 3.16), (Табл.3.8).

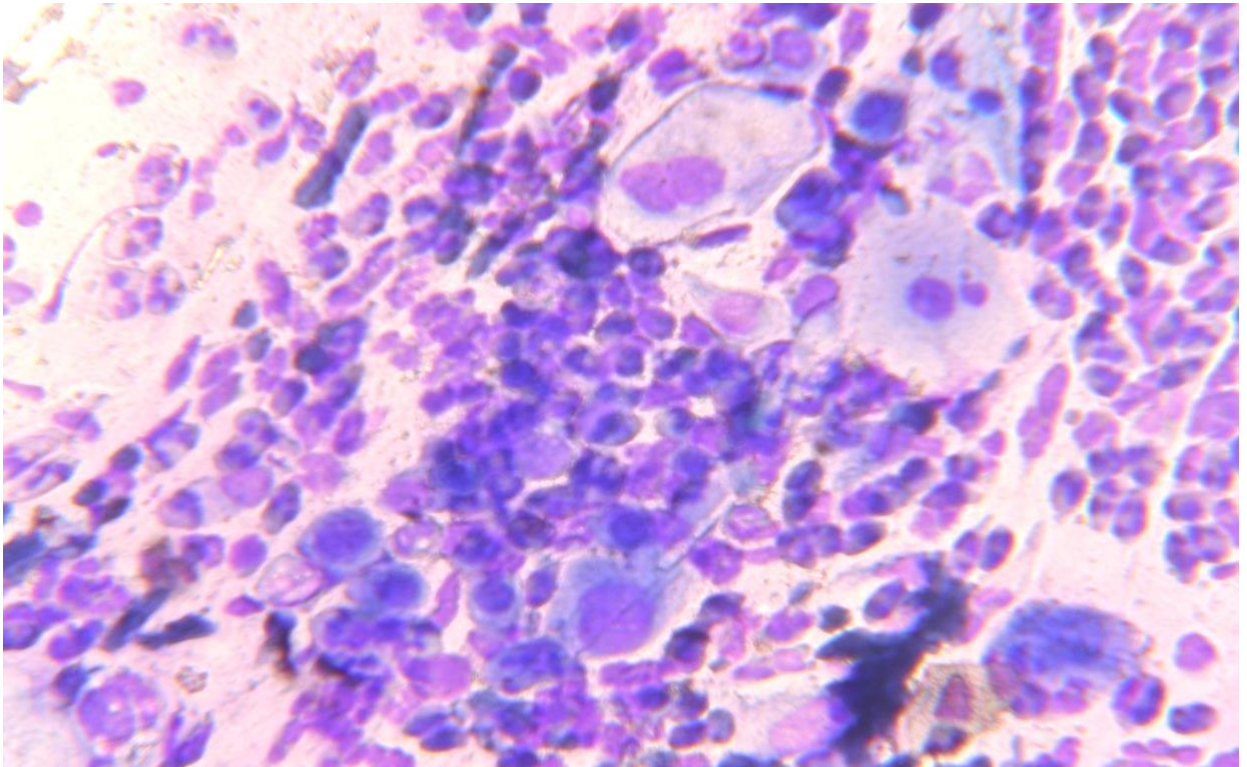


Рис. 3.15. Мазок з шийки матки жінки 3 групи (алкоголь) з типом ASC-US. Поодинокі атипові клітини багатошарового плоского епітелію на тлі запальної інфільтрації (зabarвлення за Романовським –Гімза; Об.х40, Ок.х10)

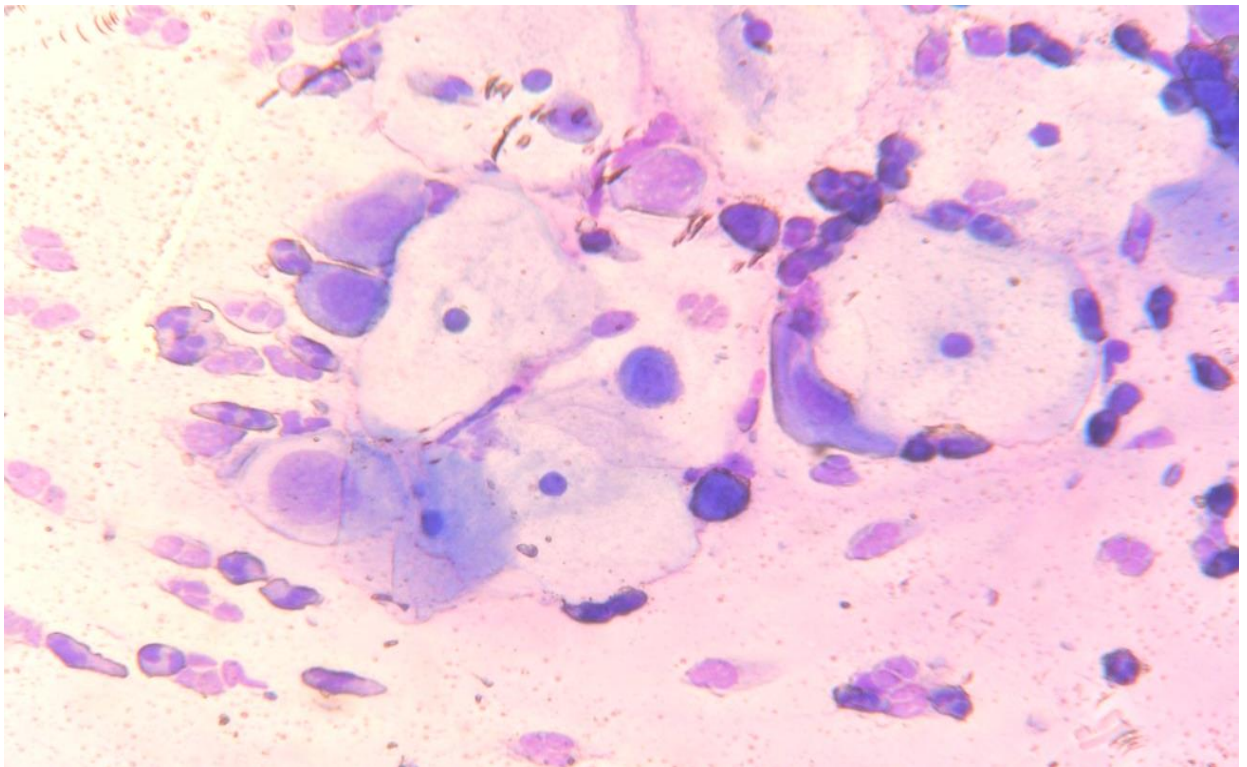


Рис. 3.16. Мазок з шийки матки жінки 3 групи (алкоголь) з типом ASC-US. Група атипових клітин багатошарового плоского епітелію на тлі запальної інфільтрації (зabarвлення за Романовським –Гімза; Об.х40, Ок.х10)

Таблиця 3.8.

Клітинний склад запальної інфільтрації в мазках з цервікального каналу жінок 3 групи (алкоголь) в порівнянні з групами контроль та наркотики

Клітинний склад запальної інфільтрації (%)		Групи дослідження		
		1 (контроль)	2 (наркотики)	3 (алкоголь)
Лімфоцити	Шийка матки	0,35±0,01	18,90±0,07*	21,30±0,07*#
	Цервікальний канал	1,40±0,04	12,90±0,09*	10,97±0,09*#
Нейтрофіли	Шийка матки	6,00±0,18	41,05±0,86*	36,00±0,50*#
	Цервікальний канал	3,60±0,10	35,00±0,50*	33,00±0,40*#
Макрофаги	Шийка матки	2,95±0,09	8,10±0,09*	10,70±0,08*#
	Цервікальний канал	1,95±0,06	10,95±0,08*	12,60±0,79*#

Примітка: * – достовірність різниці з групою контролю ($p < 0,05$).

Примітка: # – достовірність різниці з групою наркотики ($p < 0,05$).

З результатів було встановлено наявність значної кількості епітеліальних клітин з вакуолізацією ядра та цитоплазми (рис. 3.17).

Також нами були виявлені клітини з деструкцією ядер. В ядрах клітин розвивалась пульверизація хромосом, каріолізіс, каріорексис, пікноз, ядра зміщувались до периферії клітини, відмічався виражений паракератоз (рис. 3.18), (табл. 3.9). Ці цитологічні зміни були більш виразні в мазках з цервікального каналу і прямо пов'язані з цитопатогенною дією вірусів, а саме проникненням і функціонуванням в ній геному вірусу.

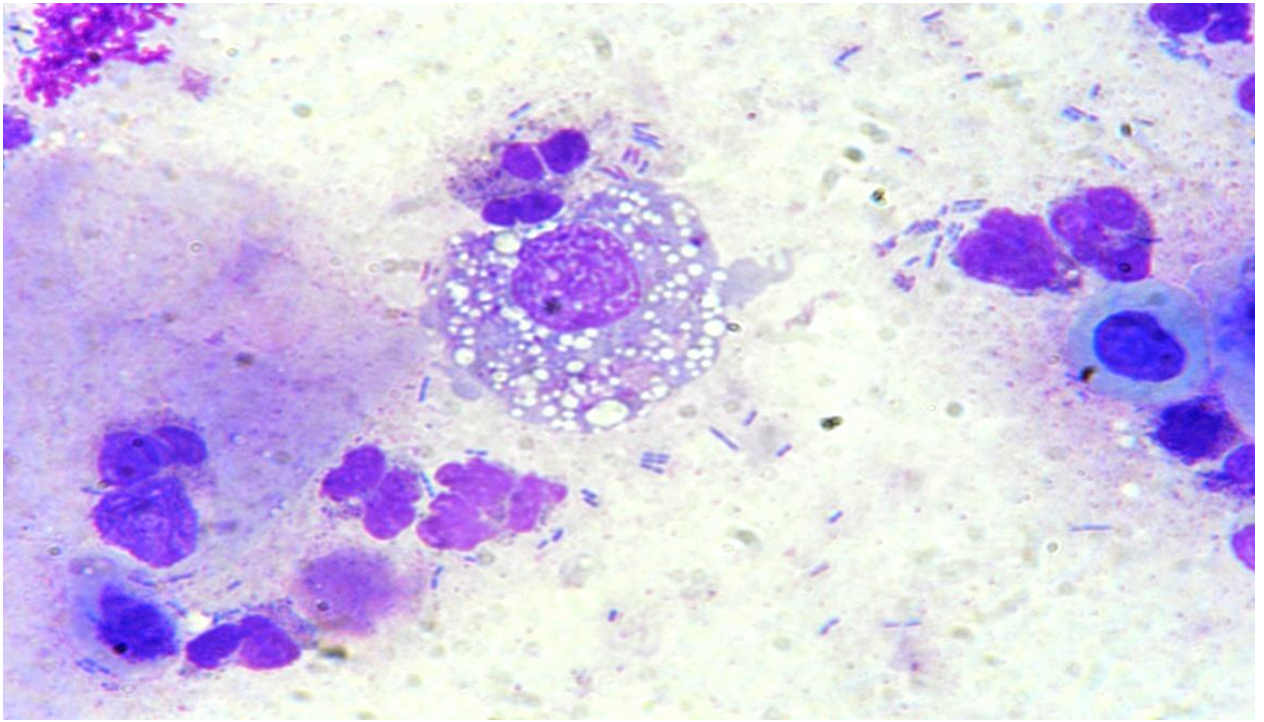


Рис. 3.17. Мазок з шийки матки жінки 3 групи (алкоголь) з типом LSIL, ВПЛ-позитивна. Проміжна клітина багатошарового плоского епітелію з дрібнокрапельною дистрофією цитоплазми, нейтрофільна інфільтрація (зabarвлення за Романовським-Гімза; Об.х40, Ок.х10)

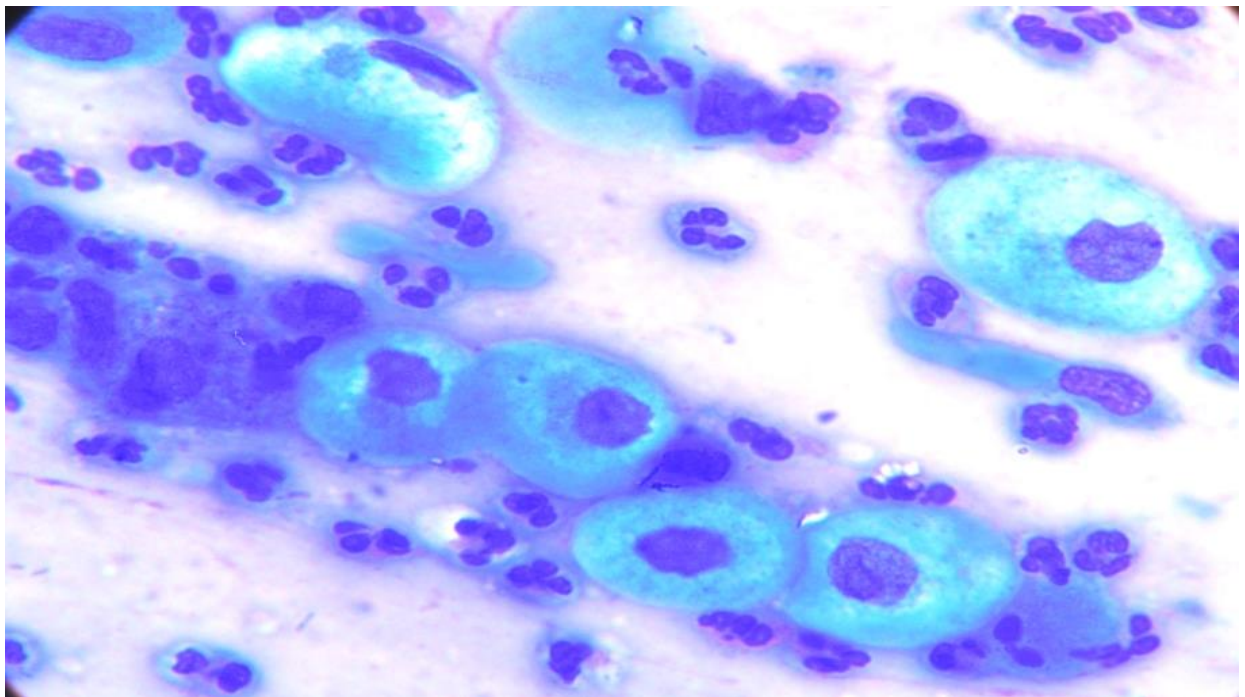


Рис. 3.18. Мазок з шийки матки жінки 3 групи (алкоголь) з типом LSIL, ВПЛ-інфікована. Група клітин багатошарового плоского епітелію з вираженим паракератозом, запальна інфільтрація (зabarвлення за Романовським-Гімза; Об.х40, Ок.х10)

Таблиця 3.9.

Середні показники морфологічних змін в клітинах епітелію шийки матки жінок з 3 групи (алкоголь) в порівнянні з групами контроль та наркотики

Дані морфометричного дослідження (%)		Групи дослідження		
		1 (контроль)	2 (наркотики)	3 (алкоголь)
Вакуолізація	ядро	0,00	55,50±0,017*	37,72±0,014*#
	цитоплазма	2,15±0,001	49,50±0,015*	41,81±0,013*#
Койлоцитоз		0,00	41,00±0,012*	30,50±0,009*#
Дискаріоз		0,00	62,25±0,019*	31,18±0,009*#
Двоядерність		0,00	22,25±0,008*	29,60±0,010*#
Макронуклеоз		0,00	28,80±0,0010*	20,05±0,008*#
Паракератоз		0,00	33,54±0,012*	40,75±0,012*#
Багатоядерність		0,00	25,80±0,009*	18,20±0,007*#

Примітка: * – достовірність різниці з групою контролю ($p < 0,05$).

Примітка: # – достовірність різниці з групою наркотики ($p < 0,05$).

Койлоцити, в мазках з шийки матки та цервікального каналу були представлені клітинами проміжного або поверхневого шарів багатошарового плоского епітелію, які розташовувались окремо або невеликими групами. Останні були з вираженою зоною просвітлення навколо ядра – «перенуклеарне гало», яке виникає як наслідок часткового некрозу цитоплазми від цитопатогенної дії вірусу папіломи людини (рис. 3.19).

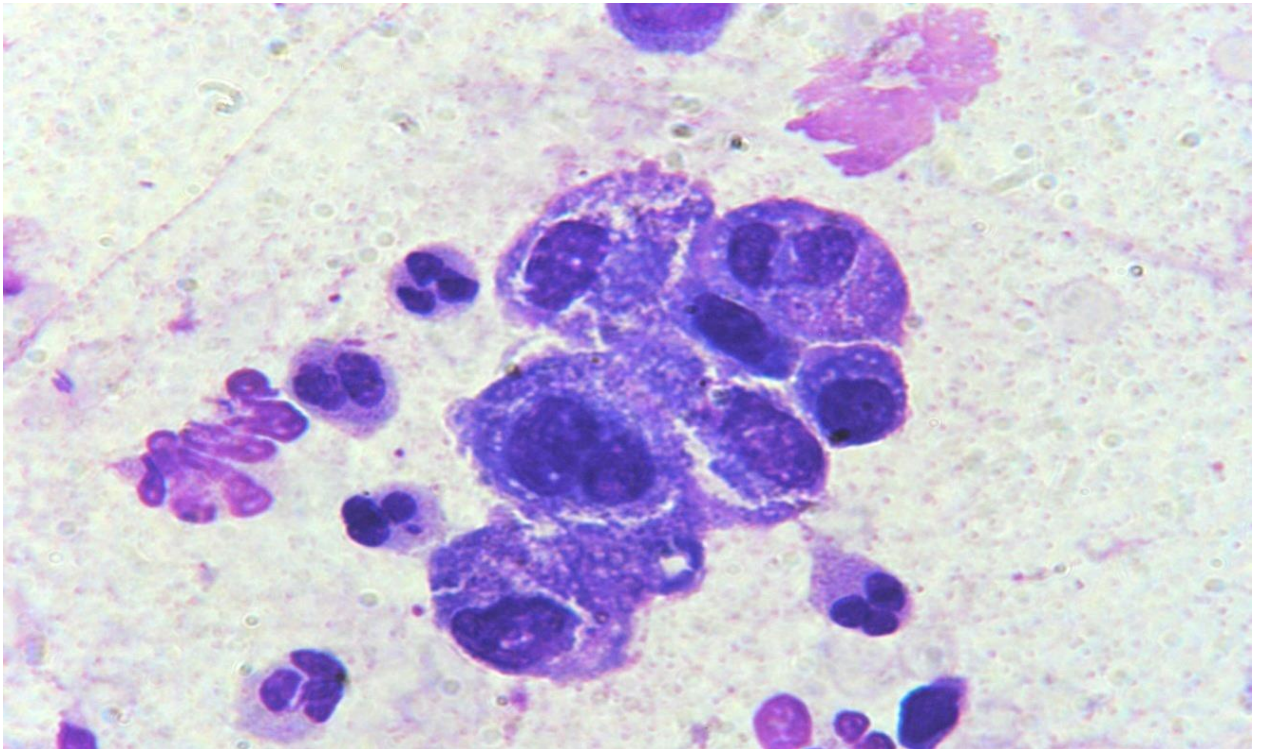


Рис. 3.19. Мазок з цервікального каналу жінки 3 групи (алкоголь) з легкою дисплазією та ознаками ВПЛ-інфікування. Група диспластично змінених клітин багат шарового плоского епітелію, койлоцити (зabarвлення за Романовським-Гімза; Об.х100, Ок.х10)

Таким чином, проведене цитологічне дослідження мазків з шийки матки та цервікального каналу жінок репродуктивного віку зі зловживанням алкоголю виявило виражені запальні процеси з наявністю клітин хронічного запалення – гістіоцитів та багатоядерних клітин, наявності значної бактеріальної флори у порівнянні з групою контролю. Мазки запального типу без проявів атипових змін епітелію становили більшу частину – 80%.

3.4. Цитологічні особливості епітелію шийки матки та цервікального каналу жінок репродуктивного віку з тютюнокурінням

В дослідженні 4 групи (тютюн) відмічались виразні реактивні зміни клітин плоского та залозистого епітелію за типом мазка ASC-US. Діагноз

ASC-US ставлять в тих випадках, коли знайдені зміни в клітинах плоского епітелію важко диференціювати між реактивними змінами та дисплазією. Найбільш частою причиною цього діагнозу є наявність запальних процесів в шийці матки. В цитологічних препаратах відмічалась наявність атипівих клітин на тлі вираженої запальної інфільтрації (рис.3.20), (табл.3.11).

Таблиця 3.10.

Тип цитологічних мазків згідно з класифікацією «Bethesda system» матеріалу від жінок 4 групи (тютюн) у порівнянні з популяцією жінок м.Києва, групами контроль, наркоти та алкоголь

Група	NILM – без проявів атипії.	ASC-US – запальний тип з атипією окремих клітин	LSIL – слабкі дисплатичні зміни багат шарового плоского епітелію	HSIL – помірні дисплатичні зміни багат шарового плоского епітелію
1 (контроль)	10 жінок – 100%	Не виявлено	Не виявлено	Не виявлено
Популяція жінок м. Києва	218 жінок – 87,2 %*	18 жінок – 7,2 %*	9 жінок – 3,6 %*	5 жінок – 2 %*
2 (наркотики)	19 жінок – 63,3%* ^{&}	6 жінок – 20%* ^{&}	5 жінок – 16,6%* ^{&}	Не виявлено
3 (алкоголь)	12 жінок – 80%* ^{&#}	1 жінка – 6,6%* ^{&#}	2 жінки – 13,3%* ^{&#}	Не виявлено
4 (тютюн)	9 жінок – 75%* ^{&#^}	3 жінки – 25%* ^{&#^}	Не виявлено	Не виявлено

Примітка: * – достовірність різниці з групою контролю ($p < 0,05$).

Примітка: [&] – достовірність різниці з популяцією жінок м. Києва ($p < 0,05$).

Примітка: [#] – достовірність різниці з групою наркотики ($p < 0,05$). Примітка: [^]

– достовірність різниці з групою алкоголь ($p < 0,05$)

Таблиця 3.11.

Клітинний склад запальної інфільтрації в мазках з цервікального каналу жінок 4 групи (тютюн) в порівнянні з групами контроль, наркотики, алкоголь

Клітинний склад запальної інфільтрації (%)		Групи дослідження			
		1 (контроль)	2 (наркотики)	3 (алкоголь)	4 (тютюн)
Лімфоцити	Шийка матки	0,35±0,01	18,90±0,07*	21,30±0,07*#	16,11±0,30*#^
	Цервікальний канал	1,40±0,04	12,90±0,09*	10,97±0,09*#	11,90±0,11*#^
Нейтрофіли	Шийка матки	6,00±0,18	41,05±0,86*	36,00±0,50*#	31,05±0,95*#^
	Цервікальний канал	3,60±0,10	35,00±0,50*	33,00±0,40*#	24,90±0,74*#^
Макрофаги	Шийка матки	2,95±0,09	8,10±0,09*	10,70±0,08*#	13,27±0,10*#^
	Цервікальний канал	1,95±0,06	10,95±0,08*	12,60±0,79*#	8,00±0,08*#^

Примітка: * – достовірність різниці з групою контролю ($p < 0,05$).

Примітка: # – достовірність різниці з групою наркотики ($p < 0,05$). Примітка: ^ – достовірність різниці з групою алкоголь ($p < 0,05$).

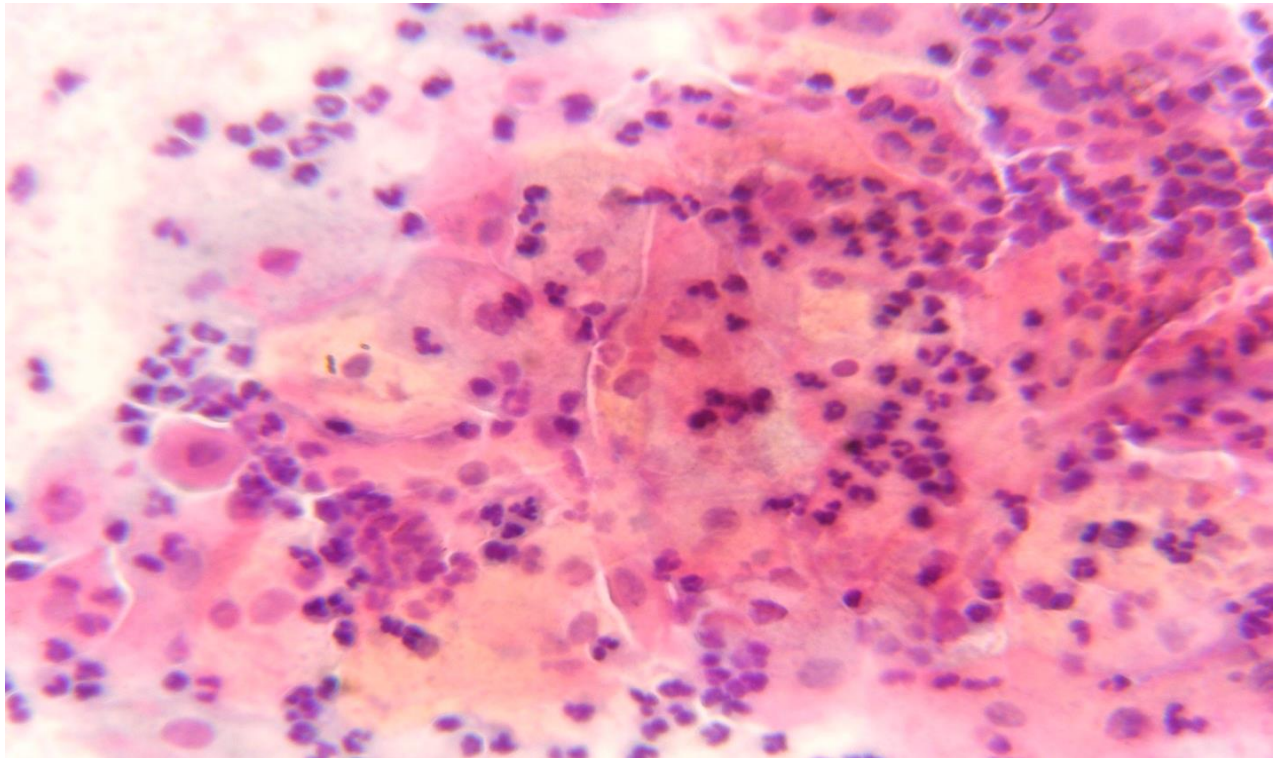


Рис. 3.20. Мазок з цервікального каналу жінки 4 групи (тютюн) з типом ASC-US. Клітини багатошарового плоского епітелію з дистрофічними змінами, ядерним поліморфізмом, виразна запальна інфільтрація (зabarвлення за Папаніколау; Об.х40, Ок.х10)

Інфекційний агент при запальних процесах в шийці матки спричиняє розпадання клітин епітелію, клітинна інфільтрація з підвищенням рівню лейкоцитів, підпадають морфологічним змінам оголені клітини більш глибоких шарів. Відповідно це проявляється ознаками, такими як зміщення ядерно-цитоплазматичного співвідношення в бік ядра, ядерна амфотілія, вакуолі в цитоплазмі та загалом дегенеративні морфологічні зміни. Зміна рівнів гормонів впливає на активацію інфекційних агентів, тобто являються факторами запуску цитопатогенної їх дії. Найбільший вплив здійснює естроген: при підвищенні або зниженні показників відбувається стимулювання вірулентних властивостей умовно патогенної мікрофлори [4, 67].

Запальний процес – це відповідна захисна реакція організму на дію різних деструктивних агентів біологічного, хімічного чи фізіологічного походження. Комплекс захисту складається з реакції організму на пошкодження тканини-об'єкта, що проявляється в ексудації рідини і

клітинній реакції [42]. Якщо імунологічно організм не може справитися з вогнищем хронічного запалення, то це може призвести до використання інших захисних механізмів: апоптоз, активація діяльності фагоцитів, гіперкератоз, десквамація. Відповідно при хронічному запаленні проявляється цілий комплекс зі збільшення кількості лейкоцитів, нейтрофілів, гістіоцитарних елементів, макрофагів та появою багатоядерних клітин [26, 36, 67, 76].

Дистрофічні зміни клітин проявлялись у вигляді цитолізу, каріолізису, каріопікнозу, оголеності ядер. Цитоплазма більшості клітин мала слабе еозинофільне забарвлення, спостерігались клітини із зовсім світлою цитоплазмою.

В нашому дослідженню в клітинах багат шарового плоского епітелію спостерігались дрібні та досить великі, округлі світлі цитоплазматичні вакуолі (рис. 3.21).

Таблиця 3.12.

**Середні показники морфологічних змін в клітинах епітелію шийки
матки жінок 4 групи (тютюн) в порівнянні з групами контроль,
наркотики, алкоголь**

Дані морфометричного дослідження (%)		Групи дослідження			
		1 (контроль)	2 (наркотики)	3 (алкоголь)	4 (тютюн)
Вакуолізація	ядро	0,00	55,50±0,017*	37,72±0,014* [#]	25,50±0,017* ^{#^}
	цитоплазма	2,15±0,001	49,50±0,015*	41,81±0,013* [#]	19,00±0,009* ^{#^}
Койлоцитоз		0,00	41,00±0,012*	30,50±0,009* [#]	21,00±0,009* ^{#^}
Дискаріоз		0,00	62,25±0,019*	31,18±0,009* [#]	22,25±0,009* ^{#^}
Двоядерність		0,00	22,25±0,008*	29,60±0,010* [#]	12,25±0,006* ^{#^}
Макронуклеоз		0,00	28,80±0,0010*	20,05±0,008* [#]	18,06±0,007* ^{#^}
Паракератоз		0,00	33,54±0,012*	40,75±0,012* [#]	13,80±0,006* ^{#^}
Багатоядерність		0,00	25,80±0,009*	18,20±0,007* [#]	15,50±0,006* ^{#^}

Примітка: * – достовірність різниці з групою контролю (p<0,05).

Примітка: [#] – достовірність різниці з групою наркотики (p<0,05).

Примітка: [^] – достовірність різниці з групою алкоголь (p<0,05).

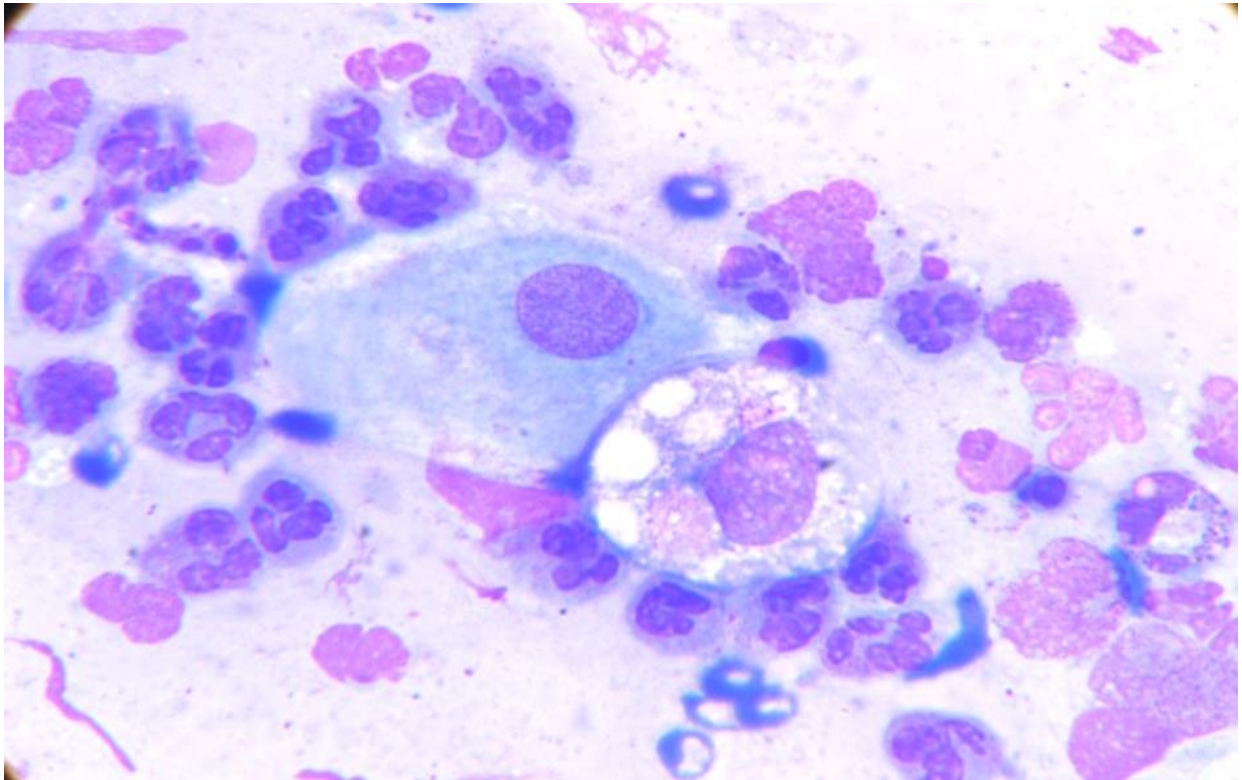


Рис. 3.21. Мазок з цервікального каналу жінки 4 групи (тютюн) з типом ASC-US. Реактивно змінені клітини багатошарового плоского епітелію з вакуалізацією цитоплазми на фоні запальної інфільтрації (зabarвлення за Романовським –Гімза; Об.х100, Ок.х10)

В частині випадків в проміжному та парабазальному шарах плоского епітелію зустрічались клітини з гіперхромними ядрами, в яких можна було побачити одне чи два центрально розташованих ядерця, двоядерні та багатоядерні клітини хронічного запалення (рис. 3.22).

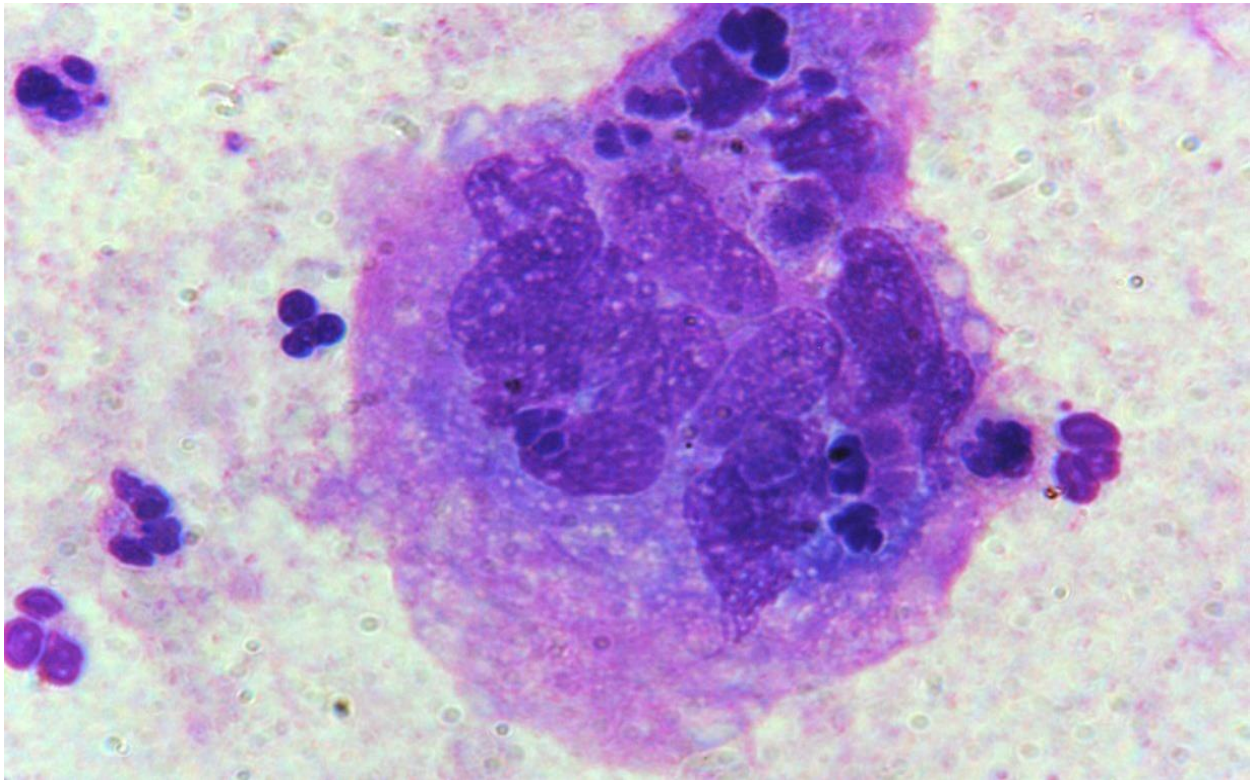


Рис. 3.22. Мазок з шийки матки жінки 4 групи (тютюн) з типом ASC-US. Багатоядерна клітина хронічного запалення (зabarвлення за Романовським – Гімза; Об.х100, Ок.х10).

Мікрофлора була представлена масивними скупченнями кокової, паличкової флори при наявності великої кількості «ключових» клітин, всіяних короткими паличками, що є характерним проявом інфікування гарднерелою.

Було встановлено наявність значної кількості епітеліальних клітин з вакуолізацією ядра та цитоплазми (рис. 3.23, рис. 3.24). Цитопатогенна дія вірусу папіломи людини характеризувалася дегенеративними ознаками: койлоцитоз, двоядерність, багатоядерними симпластами, кератиноцитами (рис. 3.23, рис. 3.24)

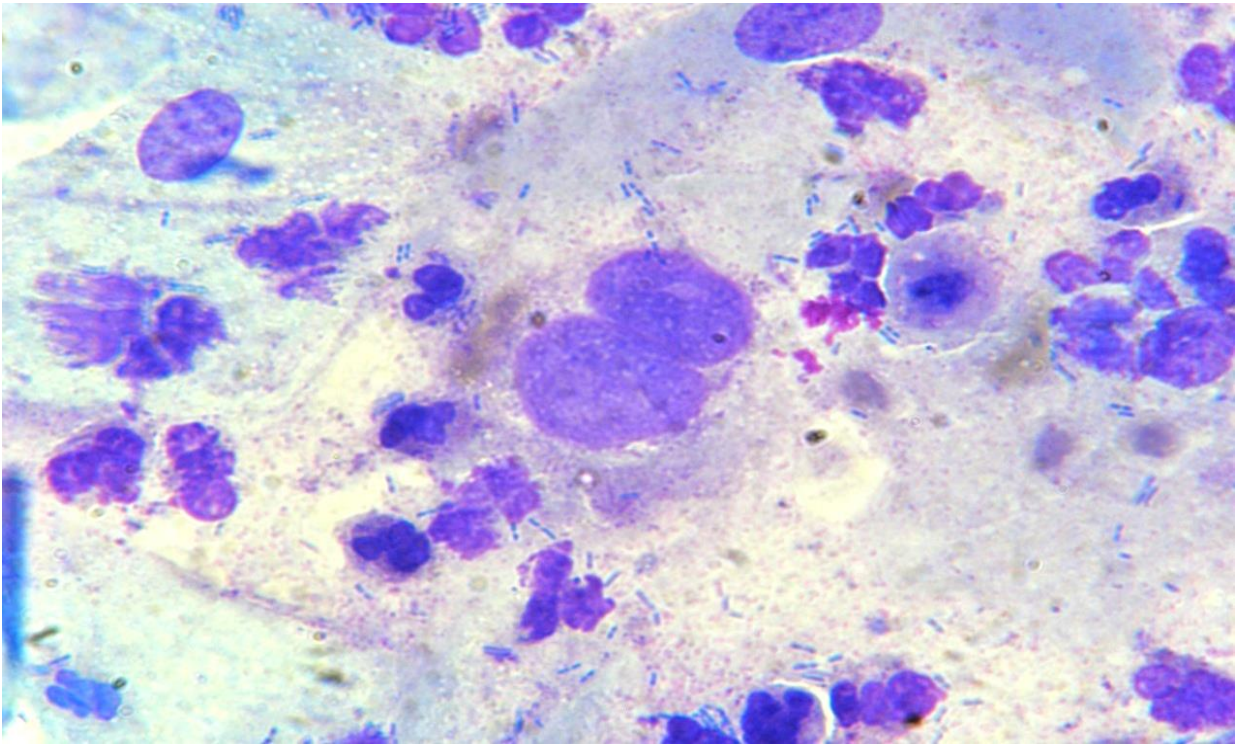


Рис. 3.23. Мазок з шийки матки жінки 4 групи (тютюн) з типом LSIL, ВПЛ-позитивна. Група проміжних клітин багатошарового плоского епітелію з атипією та вакуолями в ядрах (зabarвлення за Романовським-Гімза; Об.х100, Ок.х10)

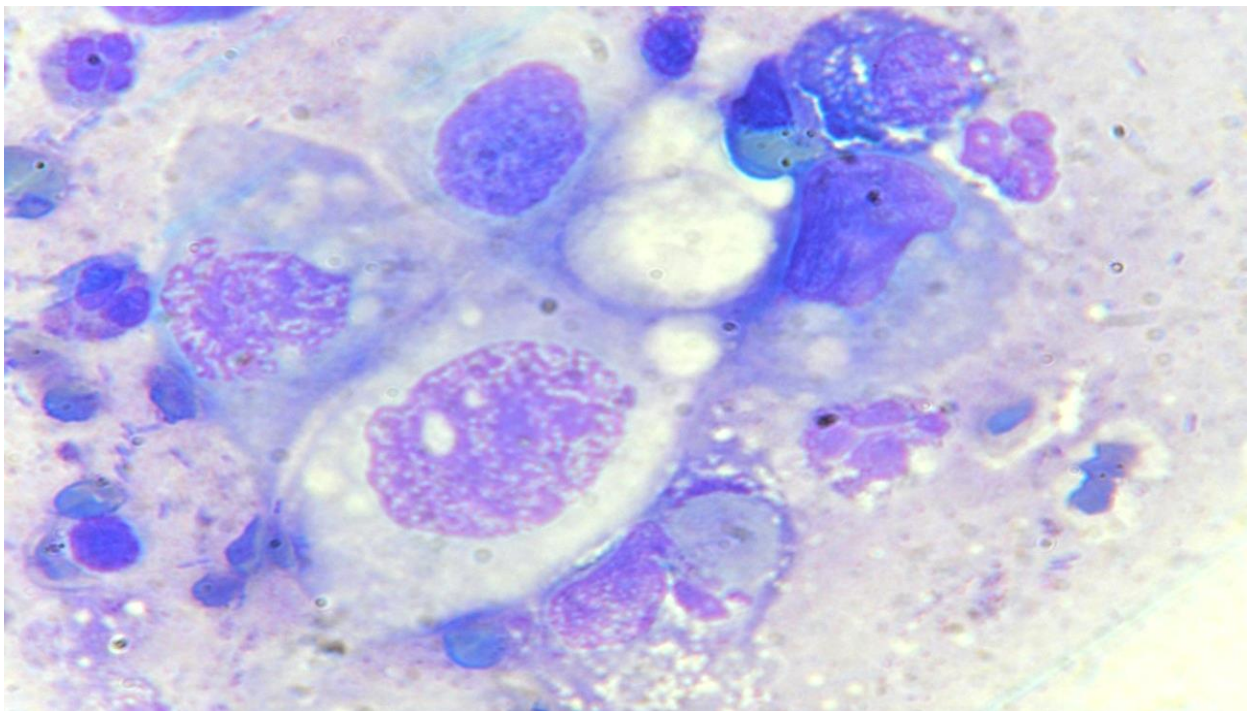


Рис. 3.24. Мазок з шийки матки жінки 4 групи (тютюн) з типом LSIL. Двоядерна клітина багатошарового плоского епітелію, нейтрофільна інфільтрація (зabarвлення за Романовським –Гімза; Об.х100, Ок.х10)

3.5. Результати досліджень інфекційних агентів, що відіграють роль в патогенезі захворювань шийки матки

Результати клінічних, епідеміологічних, вірусологічних та молекулярно-біологічних досліджень свідчать про те, що в патогенезі захворювань шийки матки основне значення мають екзогенні фактори, серед яких особливу роль відіграє вірусна інфекція, а саме вірус папіломи людини (ВПЛ), який досить поширений і має високу епітеліотропність [10,13, 14, 31, 114].

Нині не викликає сумніву роль вірусу папіломи людини (ВПЛ) в патогенезі захворювань шийки матки [64, 83, 95]. Чисельні дослідження показали, що носіями папіломавірусної інфекції є майже 95% жінок з дисплазією епітелію шийки матки, 12-50% – з фоновою цервікальною патологією, 10-38% – із здоровою шийкою матки [66].

Генітальна папіломавірусна інфекція має особливості, які відрізняють її від інших інфекцій, що передаються статевим шляхом, оскільки ці віруси здатні викликати доброякісні, а деякі типи – злоякісні пухлини [31, 53].

Згідно з даними літератури, 10-30% абсолютно здорових жінок інфіковані вірусом папіломи людини онкогенного ризику. Незважаючи на підвищену потенційну загрозу, ці віруси є умовно-патогенними, тобто носійство їх свідчить не про злоякісність процесу, а про зростаючий онкогенний ризик [78].

Завдяки застосуванню сучасних методів дослідження (метод гібридизації *in situ*, ПЛР) доведено, що інфікування ВПЛ прискорює прогресування дисплазії шийки матки в рак, а ступінь агресивності раку багато в чому залежить від онкогенного потенціалу різноманітних типів ВПЛ [37].

У 1996 році на семінарі, проведеному ВОЗ і Європейською дослідницькою організацією з генітальних інфекцій та неоплазій (EUROGIN) у Женеві, прийнято рішення про те, що ВПЛ типів 16 і 18 слід вважати

канцерогенними для людини – «високого ризику»; ВПЛ типів 31, 33, 35, 51, 52, 59 – «середнього ступеню ризику»; ВПЛ типів 6, 11, 42,43, 44 – «низького ризику» [76].

Серед різних варіантів ВПЛ при раку шийки матки превалюють ВПЛ типу 16, цей вірус виявляється у 50-70% позитивних випадків, на ВПЛ типу 18 припадає 10-20% [98].

Вірус папіломи людини – епітеліотропний вірус, що не має зовнішньої оболонки, здатний інфікувати базальні клітини багат шарового плоского епітелію, чинити онкогенну трансформацію шляхом порушення регуляції клітинного циклу, росту та диференціювання клітин. За генетичною структурою всі відомі ВПЛ досить схожі. Генетичний матеріал вірусу представлений ДНК, що містить 9 генів, з яких 2 кодують структурні білки вібріонів L1 і L2, решта генів (E1-E7) належать до так званих ранніх і кодують білки, необхідні для виконання характерних для даного вірусу функцій. Два гени (E6 і E7) є ключовими при перетворенні нормальних клітин в пухлинні, тому що, по-перше, вони здатні трансформувати клітини в культурі і, по-друге, вони завжди присутні і експресують в пухлинних клітинах [66, 113]. Як правило, на ранніх стадіях інфекції вірусна ДНК персистує у епісомальній формі, а на пізніх стадіях – в інтегрованій. Проте ця закономірність не абсолютна, тому що в злоякісних пухлинах досить часто виявляється й епісомальна форма. Особливо цікаві багатофункціональні вірусні гени E6 та E7. Доведено, що вони здатні викликати інактивацію генів p53 та Rb105, які відіграють ключову роль в регуляції поділу клітин. Тому порушення генами E6 та E7 регуляторної функції вказаних генів може бути вирішальним фактором трансформації клітин [11, 42]. Слід особливо підкреслити, що у складі гена є ще одна ділянка, яка здатна взаємодіяти з гормонами і позитивно регулювати активність вірусних генів. Це має принципове значення, оскільки велика кількість оральних контрацептивів містить гормональні добавки, використання яких може бути одним з факторів ризику за наявності латентної папіломовірусної інфекції [64, 66].

Доведено, що багат шаровий плоский епітелій шийки матки, зокрема, найбільш вразлива його ділянка для малігнізації – зона трансформації, є унікальною моделлю для вивчення вірусу асоційованого канцерогенезу. Інвазія ВПЛ відбувається на рівні незрілих базальних або резервних клітин перехідної зони епітелію, а реплікація – в поверхневих шарах. Постійні мікротравми і злущування клітин епітеліального покриву шийки матки спричиняють проникненню вірусу в глибинні шари, де він може довгий час знаходитися в латентному стані. При виснаженій імунній системі організму, коли порушується рівновага між вірусом та імунним захистом, а також при участі факторів регуляції клітинного циклу та диференціювання клітин відбувається активація вірусу з наступною індукцією ВПЛ-залежного канцерогенезу [40, 41, 56, 58].

За результатами дослідження було встановлено значне збільшення кількості епітеліальних клітин з виразною вакуолізацією цитоплазми та ядра. Також відзначались диспластичні зміни цитоплазми епітеліальних клітин шийки матки і відображались в показниках в середньому $(76,35 \pm 1,33)$ %, дистрофія ядер – $(26,70 \pm 0,85)$ %, в епітеліальних клітинах цервікального каналу відповідно - $(73,9 \pm 1,30)$ %, $(31,2 \pm 0,93)$ %.

В наших дослідженнях, у всіх жінок з цитологічним діагнозом слабка дисплазія (LSIL) методом ПЛР було підтверджено наявність папіломовірусного інфікування. Вірус папіломи людини, як і багато інших, які містять ДНК, є біологічним агентом, який здатний змінювати ріст, диференціювання та морфологію клітин. Проникаючи до клітини, вірус викликає зміни її структури, біохімічної і генетичної організації, вносить до клітини чужорідну генетичну інформацію. Утворення двоядерних та багатоядерних клітин є характерною особливістю прояву цитодегенеративної дії вірусу. В основі їх утворення зазвичай лежать механізми злиття плазматичних мембран клітин, оскільки деякі віруси мають ферменти, які здатні лізувати клітинні оболонки [61, 82].

Характерним для багатьох вірусів, що містять ДНК є формування внутрішньоядерних і цитоплазматичних включень та вакуолей. З результатів досліджень встановлено, що збільшується кількість епітеліальних клітин з вакуолізацією ядра та цитоплазми. В основі механізму утворення вакуолізованих клітин лежать процеси порушення водного та енергетичного обміну клітин.

В нашій роботі ВПЛ вірус-позитивними були всі жінки з діагнозом ASC-US та LSIL. Алкоголь - 11 жінок, тютюнопаління -3 жінки, наркотики - 3 жінки. Достовірно більш виражена дистрофія клітин відмічалась в епітелії цервікального каналу вірус-позитивних жінок у порівнянні з вірус-негативними, показники якої збільшувались у відповідності наявності дисплазії шийки матки і мали найвищі показники у жінок з типом мазків LSIL, що свідчить про здатність вірусів папіломи людини викликати порушення метаболічних процесів та структурні зміни в інфікованому епітелії, які приводять до розвитку неопластичних процесів.

При виснаженні імунній системі організму, як у жінок зі шкідливими звичками, коли порушується рівновага між вірусом та імунним захистом, а також при участі співчинників регуляції клітинного циклу та диференціювання клітин відбувається активація вірусу з наступною індукцією ВПЛ-залежного канцерогенезу. Тобто таких жінок необхідно віднести до групи ризику щодо виникнення раку шийки матки.

З огляду кількох досліджень, що корелювали різному вагінальному мікробіому з ВПЛ-інфекцією, різними ступенями цервікальної інтраепітеліальної неоплазії та генітального раку. Так, в одному дослідженні [70] оцінили групу з 169 жінок, направлених на кольпоскопію, і виявили збільшення різноманітності бактерій у поєднанні зі зменшенням лактобактерій, пов'язаних із тяжкістю цитологічного ураження. LSIL тип був присутній у 40 % жінок з раку шийки матки і лише у 10 % з нормальною цитологією. З іншого боку, ASC-US тип був присутній у 50 % цитологічних

досліджень і лише в 20% випадків раку шийки матки; низькі рівні *L. jensenii* були пов'язані з серйозними ураженнями [70].

Відомо, що деякі дисбіотичні бактеріальні спільноти викликають імунну дисрегуляцію, сприяючи мікросередовищу, що провокує розвиток пухлин [99, 100]. Вірус папіломи людини є важливим, але не пусковим фактором виникнення генітального раку. У більшості інфікованих жінок імунна відповідь здатна контролювати інфекцію та запобігати ураженням і пухлинам високого ступеня [101]. Порушення у складі вагінального мікробіому відіграє важливу роль у патогенезі виникнення генітального раку [44, 102].

Бактеріальний вагіноз був пов'язаний із вищим рівнем інфікування ВПЛ, що свідчить про те, що збільшення різноманітності вагінальних бактерій разом із зменшенням кількості лактобацил може сприяти персистенції інфекції ВПЛ [44]. *G. vaginalis* здатний виділяти фермент сіалідазу, який розріджує вагінальний слиз, розщеплюючи його глікопротеїни. Одним із таких білків є муцин, який забезпечує фізичний бар'єр для поверхні вагінального слизу [21]. Крім того, бактерії, присутні в LSIL типі, також здатні виробляти масляну кислоту, яка може регулювати ацетилювання гістонів. Тим не менш, жінки з LSIL типом демонструють збільшення продукування прозапальних цитокінів і рекрутування клітин CD4+ і CCR5+, активованих у вагінальному слизу, що сприяє інфікуванню ВІЛ [28].

Так і іншому вже дослідженні [44] оцінили вагінальну флору 250 жінок, у тому числі 70 здорових контрольних, 95 жінок з низькою ступенем плоскоклітинного епітелію та ВПЛ-позитивністю та 85 жінок з високою ступенем плоскоклітинного епітелію та ВПЛ-позитивністю. У контрольній групі виявлено високі рівні *L. crispatus*, *L. iners* і *L. taiwanensis* та відсутність *G. vaginalis* і *L. acidophilus*. У групі низького рівня плоскоклітинного епітелію *L. crispatus* зустрічався рідше, ніж у контрольній групі, а *L. acidophilus* і *Liners* переважали. З іншого боку, у групі високого рівня

плоскоклітинного епітелію *G. vaginalis* і *L. acidophilus* були збільшені, тоді як частоти *L. iners*, *L. crispatus* і *L. taiwanensis* були нижчими, ніж у контрольній групі.

Ці результати показують можливий зв'язок між вагінальним мікробіомом, ВПЛ-інфекцією та розвитком цервікальної інтраепітеліальної неоплазії. Мікробіом, в якому домінує *G. vaginalis* та бідний на *L. iners*, *L. crispatus* і *L. taiwanensis*, може бути фактором для персистенції ВПЛ, розвитку цервікальної інтраепітеліальної неоплазії і раку шийки матки [44]. В дослідженні, де оцінили вагінальний мікробіом жінок, позитивних на ВПЛ, і після 1 року лікування вони повторно оцінили їх за допомогою нового обстеження. Цікаво, що дослідження проводили за двома типами як LSIL та HSIL. LSIL складався переважно з анаеробних бактерій, таких як *Gardnerella*, *Prevotella*, *Atopobium*, *Sneathia* та (незначна кількість) *Lactobacillus*. З іншого боку, група HSIL складалася з аеробних і анаеробних бактерій, таких як *Pseudomonas*, *Brevibacterium*, *Peptostreptococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Propionibacterium*, *Bifidobacterium* і *Shigella*. У жінок із персистуючою ВПЛ-інфекцією домінуючий вагінальний мікробіом утворювався анаеробами і дефіцитними лактобактеріями, а у жінок із ВПЛ-інфекцією переважав LSIL. Контроль мав домінування лактобацил [104]. Ці дані співвідносять флору з дефіцитом лактобактерій з більшим ризиком зараження ВПЛ, а наявність бактеріального вагінозу з меншою ймовірністю очищення від вірусної інфекції [104, 105]. Отже, різні лактобацили відіграють різні ролі. Вагінальний мікробіом, у якому домінує *L. crispatus*, пов'язаний із меншим ризиком інфікування ВПЛ, цервікальною інтраепітеліальною неоплазією та раком шийки матки, тоді як вагінальний мікробіом, у якому домінує *L. iners*, асоціюється з вищим ризиком інфікування такими агентами [106].

Передракові ураження шийки матки, які регресують, порівняно з тими, що прогресують до раку, містять інше імунне мікрооточення [107]. Специфічні бактерії, такі як *Gardnerella*, і зростання мікробіологічного різноманіття можуть бути використані як біомаркери змін шийки матки для

ідентифікації жінок із високим ризиком розвитку персистуючої інфекції ВПЛ, цервікальної інтраепітеліальної неоплазії та раку [108].

Таким чином, ми прийшли до висновку, що одночасне впровадження цитологічного дослідження і тестування на виявлення ВПЛ підвищує ефективність цервікального скринінгу у жінок зі шкідливими звичками і має провідне значення у збереженні репродуктивного здоров'я.

ВИСНОВКИ

1. В жінок, що зловживають наркотиками, алкоголем та з тютюнокурінням показники виявлення мазків типу ASC-US та LSIL вищі ніж загалом по популяції жінок м. Києва та групи контролю і становили: у жінок з 2 групи (наркотики) загалом 36,67%, з 3 групи (алкоголь) – 20% та з 4 групи (тютюн) – 25%.

2. Частота зустріваності ВПЛ-позитивних жінок становила: 36,37% у жінок 2 групи (наркотики), 20% у жінок 3 групи (алкоголь) та 25% у жінок 4 групи (тютюн), що вище ніж загалом по популяції жінок м. Києва.

3. Цитологічні дослідження мазків з шийки матки та цервікального каналу жінок, що зловживали наркотиками, алкоголем та з тютюнокурінням виявили виражену нейтрофільно-лімфоцитарну інфільтрацію з наявністю клітин хронічного запалення гістіоцитів, багатоядерних клітин та інших ознак гострого запального процесу на відміну від контрольної групи.

4. Морфологічні зміни, насамперед, вакуолізація ядра та цитоплазми, койлоцитоз в багатошаровому плоскому епітелії були достовірно більш виражені у жінок, що зловживали наркотиками, алкоголем та з тютюнокуріння у порівнянні з контрольною групою. Варто відмітити, що в групі жінок з вживанням наркотиків достовірно вищі показники дискаріозу, а у групі жінок з тютюнопалінням достовірно вищі показники паракератоза ніж в інших досліджувальних групах.

5. В груп жінок, що зловживають наркотиками, алкоголем та з тютюнокурінням достовірно вищі показники типів мазків з неопластичними змінами, ВПЛ-позитивним статусом, ознаками запальної інфільтрації, морфологічними змінами клітин епітелію на відміну від контрольної групи. Це свідчить, що жінок даних груп можна віднести до пацієнток з ознаками змін предракового стану.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Абдумаліком, Р., Васильчук, М. (2021). *Актуальні проблеми наукової та практичної дерматології та венерології*. Дніпро: ЛІРА.
2. Авраменко, Г. (2016). *Основи кількісної патологічної анатомії*. Чернівці: МНВ.
3. Азаренко, Л., Петрова, Д., Ремізова, Т. (2020). Клінічне виявлення дисплазії епітелію шийки матки при профілактичних оглядах жінок. *Медичний вісник*, 4 (1), сс.165-166.
4. Олександрова, Ю., Лищев, А. (2020). Папіломавірусна інфекція у здорових жінок . *Онкології*, 4(6), сс.175-179.
5. Алкеєва, А. (2019). Особливості імунологічних порушень при рецидивуючій інфекції Herpes simplex та порівняльна оцінка ефективності різних методів терапії. *Імунологія*, 7(1), сс. 26-28с.
6. Алраял, А. (2021). Плоскоклітинні інтраепітеліальні ураження (SIL: LSIL, HSIL, Ascus, ASC-H, LSIL-H) шийки матки та системи Bethesda, *Цитологічний журнал*, 18, сс. 16.
7. Анішин, М. (2022). Віддалені результати лікування фонових захворювань шийки матки. *Проблеми репродукції*, 8(4), сс.48-50.
8. Аруїн, Л. (2018). Апоптоз та патологія печінки. *Вісцеральна хірургія*, 3(5), сс.6-10.
9. Баришніков, О., Шишкін, Ю. (2017). Програмована клітинна смерть (апоптоз). *Онкологічний журнал*, 1(3), сс.58-61.
10. Баррассо, Р. (1995). *Кольпоскопічна діагностика патології шийки матк*. Миколаїв: Чорноморець.
11. Бахутова, Г., Тамразова, Л. (2022). Можливості цитологічного методу досліджень при профілактичному огляді матеріалу шийки матки. *Клінічна лабораторна діагностика*, 3(6), сс. 38-40.
12. Башмаков, А., Савченко, М. (2019). Віруси папіломи людини та їх роль в утворенні пухлин. *Медичне товариство*, 4, сс. 1-15.

13. Бохман Я., Лютра, У. (2019). Рак шийки матки. *Онкологія*, 3(2), сс. 90-95.
14. Бутенко, О. (1994). Онкогени – регулятори апоптозу у механізмах лімфогенезу та канцерогенезу. *Онкологія*, 6(2), сс.164-167.
15. Вакуленко, А. (2018). Аналіз методів лікування початкових форм раку шийки матки. *Вісник асоціації акушер-гінекологів України*, 6(1), сс.12-15.
16. Василевська, Л., Винокур, М., Нікітіна, І. (2018). Передракові захворювання та початкові форми раку шийки матки. *Медицина*, 3(5), сс. 158
17. Володько, Н. (2020) Молекулярні основи цервікального канцерогенезу. *Злоякісні новоутворення*, 2(5), сс. 29-31.
18. Горобець, Л., Лігінда, Н., Федоренко, З. Рак шийки матки: міжнародний досвід скринінгу та можливості його реалізації в Україні. *Злоякісні новоутворення*, 3(2), сс. 11-13.
19. Грищенко, В., Щербина, І. (2021). Ектопія – патогенез, діагностика, лікування. *Міжнародний медичний журнал*, 4(1), сс. 77-81.
20. Громова, А., Крутікова, Є. (2020). Патоморфологічна характеристика фонових та передракових захворювань шийки матки, асоційованих з папіломовірусною інфекцією. *Педіатрія, акушерство та гінекологія*, 6(2), сс. 91-94.
21. Деркач, І. (2017). Організація цервікального скринінгу з використанням сучасних інформаційних технологій. *Онкологія*, 3(2), сс. 45-51.
22. Запорожан, В., Рожковська, Н., Шевчук, О. (2019). Генітальна папілома-вірусна інфекція у жінок. *Педіатрія, акушерство та гінекологія*, 6(2), сс.119-122.
23. Зарідзе, Д. (2019). Епідеміологія, механізми канцерогенезу та профілактики раку. *Патології*, 6(4), сс. 53-57.

24. Ісакова, Л., Ганіна, К., Іванова, І., Вакуленко, Г. (2019). Цитологічні особливості клітин багатошарового плоского епітелію шийки матки залежно від асоціації патологічних процесів із ВПЛ. *Цитологія та генетика*, 6, сс. 3-11.
25. Ісакова, Л. (1999). Сучасні аспекти діагностики та лікування патологічних процесів шийки матки, асоційованих із ВПЛ інфекцією. *Вісник асоціації акушерів-гінекологів України*, 6 (4), сс.12-15.
26. Ісакова, Л. (1996). Сучасні уявлення про етіологію та патогенез раку шийки матки. *Журнал практичного лікаря*, 3(1), сс.35-39.
27. Каверіна, В. (2020). Профілактика та лікування ендометріозу вагінальної частини шийки матки у жінок репродуктивного віку з бактеріальним вагінітом. *Жіноче здоров'я*, 1(2), сс.8-14.
28. Кайстриюкова, Д., Томич, М. (1997). Ефективність скринінгу в діагностиці ранніх стадій раку шийки матки. *Діагностика та лікування генітального раку у жінок*, 4(2), сс.3-4.
29. Карташов, С., Білодід, О., Шальчук, М. (2018). Дослідження апоптозу у хворих на рак шийки матки в залежності від поширеності процесу та виду лікування. *Український радіологічний журнал*, 3(3), сс. 282-284.
30. Каюк, В., Побережна, Т., Попова, Т. (1997). Можливості збільшення виявлення раку шийки матки в першій стадії при застосуванні цитологічного методу дослідження при профоглядах жінок. *Діагностика та лікування генітального раку у жінок*, 4(3), сс. 17-18.
31. Кісіна, В., Міхалко, О. (2021). Роль бактерій та вірусів у патогенезі фонових та диспластичних процесів слизової оболонки шийки матки та піхви. *Вісник дерматолога та венеролога*, 2(1), сс. 40-45.
32. Козаченко, В., Бичков, В., Кисельова, О. (2018). Фонові та передракові захворювання шийки матки. *Медицина*, 12(2), сс. 316-320.
33. Кулаков, В., Аполіхіна, І., Прилепська, В. (2016). Сучасні підходи до діагностики папіломавірусної інфекції геніталій у жінок та їх значення для скринінгу раку шийки матки. *Практична гінекологія*, 1(2), сс. 123-126.

34. Лакатош, В., Лазаренко, Л., Співак, Н., Ляненко, Л. (2018). Імунна відповідь при ВПЛІ – інфекції та асоційованих з нею захворювань статевих органів жінок. *Лікарська справа*, 7(2), сс. 25-36.
35. Кісіна, В., Міхалко, О. (2021). Роль бактерій та вірусів у патогенезі фонових та диспластичних процесів слизової оболонки шийки матки та піхви. *Вісник дерматолога та венеролога*, 2(2), сс. 40-45.
36. Лісник, І., Лістратова, О. (2002). Зв'язок рівня фактора зростання ендотеліальних клітин з поширеністю опухолевого процесу у хворих на рак тіла або шийки матки. *Онкологія*, 3(6), сс. 188-190.
37. Маянський, А., Маянський, Н., Абаджиді, М., Заславська, М. (2018). Апоптоз: початок майбутнього. *Мікробіологія*, 2(1), сс. 88-94.
38. Пангаркар, А. (2022). Система Bethesda для звітності про цервікальну цитологію. *Цитологічний журнал*, 19(2), сс. 28.
39. Пішель, І., Утко, Н., Мозжухіна, Т. (2017). Вплив та нгібітора апоптозу на розвиток аутоімунних процесів у мишей. *Імунологія та алергологія*, 1(3), сс. 26.
40. Райхлін, Н., Райхлін, А. (2020). Регуляція та прояви апоптозу у фізіологічних умовах та в пухлинах. *Питання онкології*, 48(2), сс. 159-170.
41. Робінсон, М., Труфакін, В. (2019). Апоптоз клітин імунної системи. *Успіхи сучасної біології*, 11(2), сс. 246-259.
42. Сидорова, І., Леваков, С. (2017). Фонові та передракові процеси шийки матки. *Медичне інформаційне агентство*, 3(2), сс. 87-91.
43. Собко, Н. (2021). Цитологічна діагностика у виявленні фонових, передракових захворювань та раку шийки матки при проведенні скринінгу в Києві. *Вісник асоціації акушер-гінекологів України*, 2(4), сс. 48-51.
44. Суханова, О. (2019). Особливості гормонального статусу та можливості його корекції при дисплазії епітелію шийки матки. *Вісник асоціації акушерів-гінекологів України*, 6(2), сс. 45-48.
45. Ткачук, Т., Воробйова Л. (2019). Роль вірусної інфекції у патогенезі захворювань піхви. *Лікарська справа*, 2(1), сс. 71-74.

46. Фролова, І., Радзінський, В. (2020). Імунногістохімічне дослідження дискератозу та неопластичних змін екзоцервіксу при генітальній патології. *Паталогія*, 6(2), сс. 23-26.
47. Харченко, П. (2021). Латентна папіломовірусна інфекція, обумовлена ВПЛ 16 та 18 типами. *Проблеми репродукції*, 2(3), сс. 31-34.
48. Хмельницький, О. (2020). *Цитологічна та гістологічна діагностика захворювань шийки та тіла матки*. Вінниця: ВУМ.
49. Цикупій, А. (2021). Генітальні інфекції у хворих, які отримували радикальне лікування щодо раку шийки матки. *Клінічна лабораторна діагностика*, 6(1), сс. 52-53.
50. Ярилін, А. (2021). Апоптоз та її місце в імунних процесах. *Імунологія*, 6(4), сс. 10-22.
51. Agol, V., Sarrat, S. (1998). Two types of death of poliovirus – infectid cells: caspase involvement in the apoptosis but not cytopathic effect. *Virology*, 25(2), pp. 343-353.
52. Baak, J. (2014). Quantitative histopathological analysis of CIN sections. *Cell Oncology*, 28 (1-2), pp. 63-65.
53. Bamberger, A., Schulte, H., Thuneke, I. (2020). Expression of the apoptosis-inducing Fas ligand (FasL) in human first and third trimester placenta and choriocarcinoma cells. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 82(9), pp. 3173-3175.
54. Bu, S., Yin, D., Ren, X. (2020). Progesterone induces apoptosis and up-regulation of p53 expression in human ovarian carcinoma cell lines. *Cancer*, 9(10), pp. 1944-1950.
55. Critchlow, C., Koutsky L. (2021). *Epidemiology of human papillomavirus infection*. London: BookS.
56. De Villiers, E. (2018). Human pathogenic papillomavirus types: an update. *Topics in Microbiology and Immunology*, 17(5), pp.1-13.
57. Diebold, J., Baretton, G., Felchner, M. (2020). bcl-2 expression, p53 accumulation, and apoptosis in ovarian carcinomas. *Oncogene*, 10(3), pp. 341-349.

58. Di Maio, D., Liao, J. (2017). Human papillomaviruses and cervical cancer. *Virusology Result*, 66(5), pp. 125-159.
59. Eliopoulos, A., Kerr, D., Herod, J. (1995). The control of apoptosis and drug resistance in ovarian cancer: influence of p53 and bcl-2. *Oncogene*, 11(7), pp. 1217-1228.
60. Ferrara, L., Marchino, G., Piacentino, R. (2018). Ruolomaschile nella genesi del carcinoma della cervice uterine. *Minerva Gynecology*, 7(8), pp. 431-343.
61. Formigli, L. (2000). Aponecrosis: morphological and biochemical exploration of a syncretic process of cell death sharing apoptosis and necrosis. *Journal Cell Physiology*, 12 (1), pp. 41-49.
62. Franco, E., Villa, L., Richardson, H., Rohan, T., Ferenczy, A. (2018). Epidemiology of Cervical Human papillomavirus Infection. *New Developments in Cervical Cancer*, 3(1), pp. 14-22.
63. Friis, K., Preben, J. (1987). Prevalence of condylomatous atypia and HPV antigen in cervical biopsies in 1972 and 1983. *Gynecology*, 4(6), pp. 111-115.
64. Furuya, H., Yabushita, H., Noguchi, M., Nakanishi, M. (2019). Apoptosis and cell growth fraction in normal, dysplastic and neoplastic squamous epithelium of uterine cervix. *Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi*, 7(2), pp. 141-148.
65. Garzetti, G., Ciavattini, A., Provinciali, M. (2019). Expression of p53 and apoptosis of tumor cells in locally advanced cervical carcinoma after cisplatin based neoadjuvant chemotherapy. *Anticancer*, 6(5), pp. 3229-3234.
66. Gibb, R., Taylor, D., Wan, T. (2018). Apoptosis as a measure of chemosensitivity to cisplatin and taxol therapy in ovarian cancer cell lines. *Gynecological Oncology*, 6(5), pp. 13-22.
67. Gross, G., Barrasso, R. (2019). Human Papillomavirus Infection. *A Clinical Atlas*, 11(5), pp. 94.
68. Hall, A., Smith, C., Sutherland, L., Stoneman, V. (2022). Apoptosis: molecular regulation of cell death. *Biochemical*, 2(1), pp. 26-31.

69. Havrilesky, L., Elbendary, A., Hurteau, J. (2018). Chemotherapy-induced apoptosis in epithelial ovarian cancers. *Gynecology*, 8(6), pp. 1007-1010.
70. Havrilesky, L., Hurteau, J., Whitaker, R. (2021). Regulation of apoptosis in normal and malignant ovarian epithelial cells by transforming growth factor beta. *Cancer*, 55(4), pp. 944- 948.
71. Heatley, M. (1997). A high apoptotic index occurs in subtypes of endometrial adenocarcinoma associated with a poor prognosis. *Pathology*, 29(3), pp. 272-275.
72. Hunt, K., Deng, J., Liu, T. (2017). Adenovirus-mediated overexpression of the transcription factor E₂F-1 induces apoptosis in human breast and ovarian carcinoma cell lines and does not require p53. *Cancer*, 57(21), pp. 4722-4726.
73. Huppert, B., Kaufman, P. (2020). The apoptosis cascade in human villous trophoblast. *Cell*, 13(2), pp. 215-242.
74. Inouce, T., Morita, K. (2019). The prognostic significance of number of positive nodes in cervical carcinoma stages Ib, Lia, and Lib. *Cancer*, 62(5), pp. 1923-1927.
75. Isacson, C., Kessis, T., Hedrick, L., Cho, K. (2019). Both cell proliferation and apoptosis increase with lesion grade in cervical neoplasia but do not correlate with human papillomavirus type. *Cancer*, 56(4), pp. 669-674.
76. Izadi, M., Mozaffari, H. (2022). Endocervical and metaplastic cells: comparison of cervical and metaplastic cell number in Papanicolaou smears with and without squamous intraepithelial lesion. *Cytology*, 50(2), pp. 178-180.
77. Kerr, Y., Wyllie, A., Currie, A. (2017). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Cancer*, 26(2), pp. 239-257.
78. Koutsky, L. (2019). Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Medicine*, 4(5), pp. 3-8.

79. Krehnak, V., Vaguer, J., Suchankova, A. (2018). Synthetic peptide derived from E7 region of human papillomavirus type 16 used as antigens in ELISA. *Genetics*, 71(9), pp. 2719-24.
80. Kreder, J., Pickel, M., Patrik, S. (2019). Intralesional chemotherapy with Accusite injectable gel for treatment of human condilomata asuminata inhubits latent viral infection and induces regression of shope papillomas. *Papillomavirus*, 8(12), pp. 46.
81. Kuwano, K., Kunitake, R., Kawasaki, M. (2016). P21/Cip/Sdi1 and p53 expression in association with DNA strand breaks in idiopathic pulnony fibrosis. *Medicine*, 15(4), pp. 477-483.
82. Kuwashima, Y., Kobayashi, Y., Kawarai A. (2018). Expression of bcl-2 and apoptotic DNA fragmentation in human endometrial adenocarcinoma cells. *Anticancer*, 16(5), pp. 3221- 3224.
83. Kuwashima, Y., Kobayashi, Y., Kawarai, A. (2019). Occurrence of apoptotic DNA fragmentation in quiescent and proliferating cells in human endometrial adenocarcinoma tissues and the influence of apoptosis-suppressing effects of bcl-2 products. *Anticancer*, 17(5), pp. 3737-3741.
84. Lafon, C., Mathieu, C., Guerrin, M. (2019). Transforming growth factor beta 1-induced apoptosis in human ovarian carcinoma cells: protection by the antioxidant N-acetylcysteine and bcl-2. *Cell Growth & Differentiation*, 7(8), pp. 1095-1104.
85. Lazarenko, L., Spivak, M., Lakotosh, V. (2020). Production of interferon and change the lymphocytes subpopulation phenotype in peripheral blood at cervical papillomavirus infection. *Folia Microbiologica*, 47(6), pp. 746-752.
86. Levine, E., Renehan, A., Gossiel, R. (1995). Apoptosis, intrinsic radiosensitivity and prediction of radiotherapy response in cervical carcinoma. *Radiother Oncology*, 37(1), pp. 1-9.
87. Lowy, D., Kirnbauer, R., Schiller, J. (2020). Genital human papillomavirus infection. *Anticancer*, 33(8), pp. 436-440.

88. Maiman, M., Fruchter, R., Guy, L. (2020). Human immunodeficiency virus infection and invasive cervical carcinoma. *Cancer*, 13(10), pp. 402-406.
89. Mark, H. (2016). Integration of human papillomavirus sequences in cervical tumor cell lines. *Laboratory*, 3, pp. 147.
90. Mathieu, C., Jozan, S., Mazars, P. (2017). Density-dependent induction of apoptosis by transforming growth factor-beta 1 in a human ovarian carcinoma cell line. *Cell*, 21(5), pp.13-20.
91. Meisels, A., Morin, C. (2018). Human immunodeficiency virus infection and invasive cervical carcinoma. *Gynecological Oncology*, 12(1), pp. 111-123.
92. Miyawaki, T., Uehara, T., Nibu, R. (2010). Differential expression of apoptosis-related Fas antigen on lymphocyte subpopulations in human peripheral blood. *Immunology*, 15(9), pp. 3753-3758.
93. Mochizuki, K., Hiramatsu, N. (2019). Fas antigen expression in liver tissues of patient with chronic hepatitis B. *Hepatology*, 24(7), pp. 1-7.
94. Monsonego, J. (2019). Cervical cancer prevention: the impact of HPV vaccination. *Gynecological*, 34(3), pp. 189-201.
95. Munger, K., Prelops, W., Bubb, V. (2019). The E6 and E7 gene of human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocyte. *Virology*, 11(2), pp. 21-47.
96. Munoz, N. (2021). Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *The New England Journal of Medicine*, 16, pp. 518-527.
97. Nakagawa, S., Yoshikawa, U., Ouda, T. (2019). Type of HPV is related to clinical features of cervical carcinoma. *Cancer*, 29(2), pp. 1935-1941.
98. Onda, T., Kaiida, T., Zanma, S. (2020). Association of the antibodies against human papillomavirus 16 E4 and E7 protein with cervical cancer positive for human papillomavirus DNA. *Cancer*, 54(3), pp. 624-648.

99. Oridate, N., Lotan, D., Mitchell, M. (1995). Inhibition of proliferation and induction of apoptosis in cervical carcinoma cells by retinoids: implications for chemoprevention. *Cell*, 23(10), pp. 80-86.
100. Ormerod, M., O'Neill, C., Robertson, D. (2019). cis-Diamminedichloroplatinum(II)-induced cell death through apoptosis in sensitive and resistant human ovarian carcinoma cell lines. *Cancer Chemotherapy Pharmacology*, 37(5), pp. 463-471.
101. Paper, M, Parer, A. (2019). Human papillomavirus type 16 and 18 sequences in carcinoma cell lines of the cervix. *Virology*, 14(5), pp. 313-318.
102. Patel, Y., McHugh, N. (2018). Apoptosis-neu clues to the pathogenesis of Sjogren's syndrome? *Rheumatology*, 39(10), pp. 119-121.
103. Peter, J., Snijder, Adrian, J. (2020). The use of general in the polymerase chain reaction primers the detection of a broad spectrum of human papillomavirus genotypes. *Virology*, 71(4), pp. 178-81.
104. Reich, O. (2021). Microinvasive carcinoma of the cervix of first foces of invasion. *Obstetrics and Gynecology*, 6(2), pp. 890-892.
105. Saegusa, M., Kamata, Y., Isono, M., Okayasu, I. (1996). Bcl-2 expression is correlated with a low apoptotic index and associated with progesterone receptor immunoreactivity in endometrial carcinomas. *Pathology*, 18(3), pp. 275-282.
106. Sanchez-Perez, A., Soriano, S., Clarke, A., Gaston, K. (2022). Disruption of the human papillomavirus type 16 E₂ gene protects cervical carcinoma cells from E₂F-induced apoptosis. *Virology*, 78(11), pp. 3009-3018.
107. Sheets, E., Crum, C., Yeh, J. (2021). Association between cervical neoplasia and apoptosis as detected by in situ nuclear labeling. *Gynecological Oncology*, 61(1), pp.. – 2021; 63: 1: P.94-100.
108. Shoji, Y., Saegusa, M., Takano, Y. (2022). Correlation of apoptosis with tumour cell differentiation, progression, and HPV infection in cervical carcinoma. *Clinical Pathology*, 49(2), pp. 134-138.

109. Soini, Y., Paakko, P. (1996). Extent of apoptosis in relation to p53 and bcl-2 expression in germ cell tumors. *Human Pathology*, 27(11), pp. 1221-1226.
110. Spirzbart, H. (2018). Immunotherapy of gynaecological high risk human papillomavirus infection with human leukocyte ultrafiltrate. *Papillomavirus*, 8(1), pp. 274-278.
111. Stron, P.L. (2018). Immunity to human papillomavirus associated cervical neoplasia. *Cancer*, 69(2), pp. 175-211.
112. Takehara, K. (1996). Local immune responses in cervical cancirogenesis. *Nippon Sanka Fujinka Gakkal Zasshi*, 48(11), pp. 1063-1070.
113. Tarac, I., Marin, J., Gorisek, B. (1998). Human papilomavirus 16 and 18 infaction on the uterine cervix in woman with different grades of cervical intra epithelial neopazia. *Gyneacology*, 61(7), pp. 269-270.
114. Tseng, C., Chang, C., Tseng, C. (2006). Loop conizatoin for the treadment of microinvasive carcinoma of the cervix. *Gynecological Cancer*, 16(4), pp. 1574-1578.
115. Ueda, M., Kumagai, K., Ueki, K. (2019). Growth inhibition and apoptotic cell death in uterine cervical carcinoma cells induced by 5-fluorouracil. *Cancer*, 71(4), pp. 668-674.
116. Uslu, R., Jewett, A., Bonavida, B. (2019). Sensitization of human ovarian tumor cells by subtoxic CDDP to antifas antibody-mediated cytotoxicity and apoptosis. *Gynecological Oncology*, 62(2), pp. 282-291.
117. Villa, I. (2022). Human papillomavirus and cervical carner. *Cervix*, 44(2), pp. 331-341.
118. Virtej, P., Matei, M., Badea, M., Popa, J. (2020). Cervical intraepithelial neoplasia and HPV infaction. *Gynecological Oncology*, 19(2), pp. 179-181.
119. Wheeler, J., Stephens, L., Tornos, C. (2020). ASTRO Research Fellowship: apoptosis as a predictor of tumor response to radiation in stage IB cervical carcinoma. American Society for Therapeutic Radiology and Oncology. *Oncological Biology*, 32(5), pp. 1487-1493.

120. Yamasaki, F., Tokunaga, O., Sugimori, H. (2021). Apoptotic index in ovarian carcinoma: correlation with clinicopathologic factors and prognosis. *Gynecological Oncology*, 66(3), pp. 439-448.
121. Yunehara, S., Nishimura, Y., Kishi, S., Ishii, A. (1993). Expression and function of apoptosis antigen Fas on T cells in thymus and peryphery. *Tiss antigens*, 42(4), pp. 253-254.
122. Zabbo, A., Stein, B. (2021). Penile intraepithelial neoplasia in patients examined for exposure to HPV. *Urology*, 22(3), pp. 24-26.
123. Zanotti, S., Fisseler-Eckhoff, A., Mannherz, H. (2022). Changel in the topological expression of markers of differentiation and apoptosis in stages of human cervical dysplasia and carcinoma. *Gynecological Oncology*, 83(4), pp. 37-46.
124. Zinke, P. (2005). Immunocytochemistry (p16INK4a) as an additional examination for cytological specimens Class III D (Munich Classification II). *Zentralbl Gynakol*, 127(3), pp. 140-145.
125. Hausen H. (1994). *Human pathogenic papillomaviruses topics in microbiology and immunology*. Berlin: BER.