

УДК 618.146-006.52-07-018:615.281.8

В.О. Потапов, І.С. Гарагуля

## Результати оцінювання клінічної і молекулярно-гістологічної ефективності лікарського засобу ПРОТЕФЛАЗІД® у лікуванні папіломавірусної інфекції в жінок із цервікальною інтраепітеліальною неоплазією

Дніпровський державний медичний університет, Україна

Ukrainian Journal Health of Woman. 2024. 4(173): 5-14; doi: 10.15574/HW.2024. 4(173).514

**For citation:** Potapov VO. (2024). Results of the clinical and molecular-histological assessment of the effectiveness of the drug PROTEFLAZID® in the treatment of papillomavirus infection in women with cervical intraepithelial neoplasia. Ukrainian Journal Health of Woman. 4(173): 5-14; doi: 10.15574/HW.2024. 4(173).514

**Мета** — оцінити клінічну та молекулярно-морфологічну ефективність лікарського засобу ПРОТЕФЛАЗІД® у лікуванні інфекції вірусу папіломи людини (ВПЛ) у жінок із цитологічною койлоцитарною реакцією, а також у поєднанні з легким ступенем цервікальної інтраепітеліальної неоплазії (ЦІН I) епітелію шийки матки.

**Матеріали та методи.** До дослідження за результатами тесту за Папаніколау (ПАП-тесту) і ВПЛ-тесту залучено 90 жінок віком від 20 до 35 років, яких поділено на 3 групи: I група (контрольна) — 30 жінок із негативним ВПЛ-тестом і відсутністю ЦІН, II група — 30 жінок із позитивним ВПЛ-тестом без ЦІН, III група — 30 жінок із ЦІН I на тлі ВПЛ-інфекції.

Наведено **результати** клінічного та молекулярно-гістологічного оцінювання одночасного застосування пероральної та вагінальної форм лікарського засобу ПРОТЕФЛАЗІД® у лікуванні інфекції ВПЛ шийки матки в жінок, що сприяло ерадикації ВПЛ у 76,7–86,7% випадків, а при поєднаних ВПЛ-інфекціях із ЦІН I – у 76,7% пацієнтів до її стійкого регресу, що зумовлено не лише протівірусною дією ПРОТЕФЛАЗІД®, але і його впливом, за результатами імуногістохімічного дослідження, на зниження експресії ядерних білків p16 і Ki-67, які є зворотними регуляторами клітинного циклу і значно посилюються при ураженні ВПЛ епітеліальних клітин шийки матки.

**Висновки.** Препарат ПРОТЕФЛАЗІД® на сьогодні є одним із найефективніших препаратів для лікування ВПЛ-інфекції, який можна рекомендувати для ерадикації папіломавірусів у жінок як із ЦІН I, так і з позитивним ВПЛ-тестом із нормальним ПАП-тестом.

Дослідження проведено відповідно до принципів Гельсінської декларації. Протокол дослідження схвалено місцевим комітетом з етики закладу-учасника. На проведення досліджень отримано інформовану згоду пацієнток.

Автор не заявляє про конфлікт інтересів.

**Ключові слова:** жінки, папіломавірусна інфекція, інтраепітеліальна неоплазія шийки матки, морфологічні дослідження, імуногістохімічні дослідження, білки p16 та Ki-67, ПРОТЕФЛАЗІД®.

### Results of the clinical and molecular-histological assessment of the effectiveness of the drug PROTEFLAZID® in the treatment of papillomavirus infection in women with cervical intraepithelial neoplasia

V.O. Potapov, I.S. Garagulia

Dnipro State Medical University, Ukraine

**Aim** — to evaluate the clinical and molecular-morphological effectiveness of the drug PROTEFLAZID® when used in the treatment of human papilloma virus (HPV) infection in women with a cytological koilocytic reaction, as well as in cervical epithelium combined with a mild degree of cervical intraepithelial neoplasia (CIN).

**Materials and methods.** Based on the results of the Pap test and HPV test, 90 women aged 20 to 35 years were involved in the study, who were divided into 3 groups: the group I (control) — 30 women with a negative HPV test and no CIN, the group II — 30 women with a positive HPV test without CIN, the group III — 30 women with CIN I on the background of HPV infection.

The article presents the **results** of a clinical and molecular-histological assessment of the effectiveness of the simultaneous use of oral and vaginal forms of the drug PROTEFLAZID® in the treatment of cervical HPV infection in women, which contributed to the eradication of HPV in 76.7–86.7% of cases, and in combined HPV-infections with cervical intraepithelial neoplasia of a mild degree (CIN I) — in 76.7% of patients until its persistent regression, which was due not only to the antiviral effect of PROTEFLAZID®, but also to its effect, as shown by the results of an immunohistochemical study, on the reduction of the expression of nuclear proteins p16 and Ki-67, which are reverse regulators of the cell cycle and significantly increase when cervical epithelial cells are affected by HPV.

**Conclusions.** The drug PROTEFLAZID® is currently one of the most effective drugs for the treatment of HPV infection, which can be recommended for the eradication of papillomaviruses in women with both low-risk cervical intraepithelial neoplasia (CIN I) and positive HPV-tests with a normal Pap test.

The research was carried out in accordance with the principles of the Helsinki Declaration. The study protocol was approved by the Local Ethics Committee of the participating institution. The informed consent of the patient was obtained for conducting the studies.

No conflict of interests was declared by the author.

**Keywords:** women, papillomavirus infection, cervical intraepithelial neoplasia, morphological studies, immunohistochemical studies, proteins p16 and Ki-67, PROTEFLAZID®.

## Вступ

Цервікальна інтраепітеліальна неоплазія (ЦІН), або інакше дисплазія шийки матки, є предтечею раку шийки матки (РШМ), який посідає друге місце серед злоякісних новоутворень у жінок. Тенденція до збільшення частоти показників смертності від РШМ, складне і дороговартісне лікування, недостатньо задовільні безпосередні та віддалені результати лікування хворих визначають актуальність своєчасного встановлення діагнозу та лікування передракових захворювань шийки матки [1,19,25,27–29]. Визначення факторів злоякісних новоутворень, раннє діагностування і своєчасне лікування передракових станів стали ключовими пунктами рішення Ради національної безпеки і оборони України від 22 грудня 2023 року «Щодо профілактики, ранньої діагностики та лікування злоякісних новоутворень», яке введено в дію Указом Президента України № 842/2023.

Лауреатом Нобелівської премії Харальдом Хаузенем майже 40 років тому переконливо доведено, що в етіології ЦІН і РШМ провідна роль належить вірусу папіломи людини (ВПЛ), який виявляється практично у всіх (99%) випадках сквамозної малігнізації жіночого статевого тракту. Висока контагіозність ВПЛ і передача статевим шляхом із 65–70-відсотковою ймовірністю зараження партнера дали всі підстави віднести РШМ до захворювань, які передаються статевим шляхом [4,13,14,18].

Рак шийки матки зазвичай асоційований із ВПЛ так званого «високого канцерогенного ризику» (ВПЛ ВКР), до яких належать 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 50, 51, 53, 55, 56, 58, 59, 68-й його серотипи, але на Європейському континенті в жінок із ЦІН і РШМ частіше трапляються папіломавіруси 16 і 18-го типів [4,27]. Відомо, що вірус здатен уражувати лише проліферуючі клітини, частіше в зоні переходу циліндричного епітелію цервікального каналу в багат шаровий плоский епітелій екзоцервіксу, де базальні клітини розташовані близько до поверхні [14]. За тривалої персистенції ВПЛ в епітелії шийки матки відбувається його інтеграція в геном, і за певної сукупності факторів ризику процес онкотрансформації клітин може завершитися за 5–10 років, але іноді і значно швидше [20,27].

Частота ВПЛ-інфікованих жінок у популяції суттєво коливається залежно від віку, соціального статусу, регіону проживання і, за дани-

ми різних авторів, становить від 40% до 87,9% [4,6]. Є свідчення, що в 15–28% жінок із негативним цитологічним тестом за Папаніколау (ПАП-тест), але за наявності ДНК ВПЛ протягом двох років може розвинутиися ЦІН II–III, тоді як у ВПЛ-інтактних — тільки в 1–3% випадках, що дає змогу віднести всіх клінічно здорових жінок, інфікованих ВПЛ, до групи онкоризику [13,25].

Визнання Всесвітньою організацією охорони здоров'я папіломавірусної природи РШМ стало підставою, з одного боку, для розроблення і застосування специфічних вакцин проти ВПЛ у підлітків і здорових жінок для профілактики РШМ, а з іншого — для розроблення рекомендацій щодо проведення в жінок ВПЛ-тесту поряд із ПАП-тестом (котестінг) для підвищення чутливості діагностування і визначення прогнозу перебігу ЦІН, а також вирішення питання вибору засобу лікування ВПЛ-інфекції [20–22,27]. І якщо за результатами ПАП-тесту і гістологічного дослідження біоптатів із шийки матки сьогодні сформована чітка позиція щодо потреби хірургічної ексцизії уражених ділянок шийки матки за наявності цервікальних інтраепітеліальних уражень високого ступеня ризику (HSIL за класифікацією Бетесда), які вважаються справжніми передраковими станами [12,21,27], то досі не визначені конструктивні підходи до ведення жінок із початковими проявами диспластичних уражень шийки матки на тлі ВПЛ-інфікування, до яких належать койлоцитоз і плоскоклітинні інтраепітеліальні ураження низького ступеня ризику (LSIL). Дискусії з цього питання ведуться навколо клінічних спостережень, які доводять, що викликана ВПЛ-інфекцією ЦІН I у жінок часто регресує самостійно, тому до цієї групи хворих найчастіше застосовується пасивна тактика динамічного спостереження, і якщо протягом наступних 12–18 місяців немає цитологічних ознак регресії або відбувається прогресія диспластичних уражень епітелію шийки матки, то таким жінкам рекомендовано вже ексцизійні методи лікування [12,21,27]. За даними літературних джерел, у таких жінок на тлі ВПЛ-інфекції в 40–50% випадках відбувається персистенція LSIL, в 11–25% випадках — прогресія захворювання, в 1% — РШМ [4,6].

Отже, виникає питання, чи має лікар право ризикувати здоров'ям жінок, які мають ВПЛ-інфекцію, пасивно очікуючи на можливі її наслідки?

Слід також враховувати, що пасивне спостереження за ВПЛ-інфікованими жінками призводить до поширення інфекції, оскільки ймовірність зараження статевого партнера при контактуванні становить майже 100%, для цього достатньо лише 10 копій ДНК ВПЛ. Застосування презервативу знижує ризик, але не захищає від інфекції ВПЛ, бо вірус може передаватися від шкіри до шкіри, і для зараження проникнення при статевому акті не обов'язкове [4,6,25].

Логістика підходів до менеджменту будь-якої інфекції полягає або в профілактиці цієї інфекції, що забезпечує вакцинація проти відомих збудників, або, якщо інфекція вже є, то в ерадикації небезпечних її збудників медикаментозними засобами. Отже, слід ще раз звернути увагу на патогенез передракових станів і РШМ, викликаних ВПЛ, який складається з низки послідовних етапів із моменту інфікування здорової жінки, виникнення на тлі ВПЛ-інфекції диспластичних уражень епітелію шийки матки низького ризику (койлоцитоз, LSIL) з наступною прогресією ВПЛ-уражень епітелію шийки матки високого ризику (HSIL) і наступної їхньої пухлинної трансформації з клінічними ознаками інвазивного РШМ [12].

На нашу думку, на ключовий блок патогенезу канцерогенних ВПЛ-уражень шийки матки, представлений первинним епізодом ВПЛ-інфікування і його морфологічними наслідками у вигляді LSIL, сьогодні слід звернути особливу увагу, як із позиції можливості попередження прогресії диспластичних уражень шийки матки завдяки ерадикації ВПЛ противірусними медикаментозними засобами, так і з позиції зменшення подальших матеріальних витрат на діагностування і хірургічне лікування HSIL з іноді небажаними для репродуктивної функції наслідками [23].

У лікуванні ВПЛ-інфекції можна виділити два основні напрями, один із них пов'язаний із застосуванням лікарських засобів, які підвищують місцеву клітинну резистентність і імунітет (інтерферони й індуктори синтезу інтерферонів) [15,16,24], а інший — із застосуванням противірусних препаратів, здатних блокувати реплікацію вірусу і викликали його загибель [3,7–9].

Одним із найперспективніших напрямів у лікуванні ВПЛ є застосування противірусних засобів, до яких належить екстракт фла-

воноїдів із суміші трав *Herba Deschampsia caespitosa L.* та *Herba Calamagrostis epigeios L.* у складі вітчизняного лікарського засобу ПРОТЕФЛАЗІД® [21,27], який входить до фармакологічної групи противірусних препаратів прямої дії (код АТС J05A X) для етіопатогенетичної терапії захворювань, викликаних РНК- і ДНК-вірусами. Вказаний лікарський засіб доступний у двох лікарських формах: ПРОТЕФЛАЗІД® (краплі) для перорального застосування і ПРОТЕФЛАЗІД® (супозиторії) для вагінального застосування, що дає змогу проводити системне і місцеве лікування ВПЛ-інфекції.

За рекомендаціями Національного консенсусу щодо ведення пацієток із ЦІН, викликаних ВПЛ-інфекцією [27], системне і місцеве застосування лікарського засобу ПРОТЕФЛАЗІД® може бути корисним для лікування ВПЛ-інфекції, ЦІН I (LSIL) і навіть ЦІН II (HSIL) у молодих жінок без хірургічного втручання, а також до і після хірургічного лікування ЦІН із метою зниження частоти рецидивів.

На сьогодні доступна інформація щодо результатів понад 20 незалежних доклінічних і клінічних спостережень під час лікування ВПЛ-асоційованих захворювань [3,5,7–9], які свідчать, що флавоноїди лікарського засобу ПРОТЕФЛАЗІД® здатні:

- інгібувати вірусспецифічні ферменти ДНК- і РНК-полімерази, тимідинкіназу, зворотну транскриптазу, що призводить до припинення реплікації ДНК вірусу і його розмноження;
- запобігати інтеграції ДНК вірусу в геном епітеліоцита, що суттєво знижує ризик переродження вірус-уражених клітин у пухлинні, а також сприяє регресу ЦІН;
- зменшувати експресію онкогенних пептидів і стимулювати синтез протипухлинних білків p53 і pRb;
- підвищувати синтез альфа- і гамма-інтерферонів, відновлювати показники місцевого імунітету — лактоферину, секреторного IgA, лізоциму та С3-компонента комплекменту і, таким чином, сприяти відновленню бар'єрної функції епітелію шийки матки;
- підвищувати синтез ключового ензиму апоптозу — каспази 9, чим сприяти елімінації інфікованих клітин.

**Мета** дослідження — оцінити клінічну та молекулярно-морфологічну ефективність лікарського засобу ПРОТЕФЛАЗІД® у лікуванні

ВПЛ-інфекції в жінок із цитологічною койлоцитарною реакцією, а також у поєднанні з легким ступенем ЦІН епітелію шийки матки.

### Матеріали та методи дослідження

До дослідження за результатами ПАП-тесту і ВПЛ-тесту залучено 90 жінок (віком від 20 до 35 років), поділених на три групи. До I групи (контрольної) залучено 30 жінок із негативним ВПЛ-тестом без ЦІН, до II групи – 30 жінок із позитивним ВПЛ-тестом без ЦІН, до III групи – 30 жінок із ЦІН I на тлі ВПЛ-інфекції.

Під час обстеження пацієнток і визначення ступеня тяжкості ЦІН враховано рекомендації низки регламентуючих документів [12,17,21].

ВПЛ-тест виконано в лабораторії «Сінево» методом полімеразної ланцюгової реакції із визначенням ДНК ВПЛ високого канцерогенного ризику 16, 31, 33, 35, 18, 39, 45, 59, 52, 56, 58, 66-го типів у матеріалі з екто- та ендоцервіксу. Повторне обстеження на наявність ДНК ВПЛ (для контролю ефективності лікування) здійснено не раніше ніж через 5–6 тижнів після курсу лікування.

*Гістоморфологічні та імуногістохімічні (ІГХ) дослідження* біоптатів шийки матки виконано на базі відділу патоморфології діагностичного центру Дніпровського державного медичного університету за стандартною методикою [2] у жінок II і III груп для проведення верифікації діагнозу, у жінок I (контрольної) групи – для диференційного діагностування за невизначеного ПАП-тесту і його розбіжностей з результатами кольпоскопії. Гістологічні і ІГХ-дослідження біоптатів шийки матки в жінок II і III груп виконано повторно після закінчення 3-місячного курсу лікування. До цитологічних ознак ВПЛ-інфекції віднесено наявність у клітинах поверхневого і проміжного шарів багатошарового плоского епітелію шийки матки койлоцитарної атипії.

Імуногістохімічні дослідження внутрішньоклітинних біомаркерів із застосуванням моноклональних антитіл дають змогу об'єктивно оцінювати характер перебігу ВПЛ-інфекції і ЦІН, а також ефективність їхнього лікування. Одним із таких біомаркерів є білок p16, роль якого полягає в негативній регуляції клітинної проліферації, через участь у сигнальному шляху Cdk-Rb-E2F, який контролює перехід клітини з фази G<sub>1</sub> у S-фазу клітинного циклу. Діагностична значущість маркера p16 полягає в тому, що він не визначається в нормальних епі-

теліальних клітинах, а експресується лише диспластичними клітинами, які реплікують ВПЛ. Вважають, що p16 є маркером завершеності процесів онкотрансформації, тому його відносять до ранніх ознак передракових змін епітелію екзоцервіксу і РШМ [10,26].

Іншим біомаркером є ядерний протеїн Ki-67, ІГХ-дослідження якого допомагає досить точно визначити клітини, які вийшли з G<sub>0</sub>-фази і вступили на шлях мітозу, що свідчить про важливу роль Ki-67 у діагностуванні, прогнозуванні та визначенні ефекту лікування ВПЛ-асоційованої патології шийки матки [10,11,16].

У процесі підготовки до ІГХ-дослідження парафінові зрізи зразків товщиною 4–6 мкм, отримані на «Microtom HM-340», наносили на адгезивне предметне скло «SuperFrost Plus» та депарафінізували з подальшим проведенням теплової індукції (heat induction of epitope retrieval) у цитратному буфері з рН=6,0 в автоклаві (8 хв за температури +121°C).

Як первинні антитіла використовували моноклональні антитіла до маркера проліферації Ki-67 (клон MIB-1, DAKO; клон SP6, LabVision) і p16 (kit №K5334, DakoCytomation). Титр антитіл підбирали індивідуально для кожного маркера з використанням як розчинника «Antibody diluent» (DakoCytomation). Наступний етап ІГХ-дослідження проводили з використанням системи візуалізації останнього покоління «UltraVision LP» (LabVision) і «LSAB2, EnVision» (DAKO).

Вторинні антитіла, що містили велику кількість молекул пероксидази хрому, наносили на зрізи та інкубували у вологих камерах протягом 30 хв із промиванням у ТРИС-буферному розчині між кожним етапом протягом 10 хв. Ідентифікацію реакції проводили шляхом нанесення хромогену (DAB, LabVision) під контролем мікроскопа протягом від 20 с до 3 хв, проявом якої було забарвлення специфічних структур залежно від маркера (інтрануклеарна або цитоплазматична реакція). Для диференціювання структур тканин зрізи додатково забарвлювали гематоксиліном Маєра протягом 1–3 хв. Наступну їхню дегідратацію і включення в бальзам здійснювали згідно зі стандартом.

Позитивна ІГХ-реакція з антитілами до Ki-67 проявлялася коричневим забарвленням ядер клітин різного ступеня інтенсивності. Найпоширенішою формою позитивної ІГХ-реакції на p16 було коричневе одночасне фарбування ядер і цитоплазми (змішана позитивна реакція).



Клітини, позитивні у відношенні експресії маркерів, вивчали як мінімум на 4–6 випадково обраних полях зору мікроскопа гістологічних зрізів із використанням об'єктивів  $\times 100$ ,  $\times 200$ ,  $\times 400$  та  $\times 1000$  (коли це було потрібно). Після підрахунку 300 гістологічно ідентифікованих об'єктів (ядер або клітин) обчислювали показники експресії за результатами всіх вивчених ділянок. Як позитивну враховували реакцію у нормальних клітинах епітеліального шару, а також диспластично змінених.

Індекс проліферації (ІП) на підставі експресії протеїну Ki-67 обчислювали як відсоток клітин з інтрануклеарною реакцією, незалежно від інтенсивності забарвлення, до загальної кількості клітин у середньому за результатами всіх вивчених ділянок.

Для оцінювання експресії протеїну p16 використовували таку шкалу: негативна реакція — до 5% позитивно забарвлених клітин; фокальна — до 80% клітин із позитивним забарвленням; дифузна — понад 80% клітин з імуногістохімічною міткою.

Статистичну обробку результатів проведено за допомогою програми «Microsoft Excel» (Office Home Business 2KB4Y-6H9DB-VM47K-749PV-PG3KT) і програмного продукту «STATISTICA 6.1» (StatSoft Inc., серійний № AGAR909E415822FA). Аналіз отриманих даних з оцінюванням статистичної вірогідності відмінностей виконано за допомогою параметричних методів статистики. Критичне значення рівня статистичної значущості при перевірці усіх нульових гіпотез прийнято рівним 0,05 (5%).

Для лікування ВПЛ-інфекції у жінок II і III груп за інформованою згодою застосовано лікарський засіб ПРОТЕФЛАЗІД® за такою схемою: по 15 крапель 2 рази на добу безперервно протягом 3 місяців і одночасно по 1 супозиторію інтравагінально 2 рази на добу протягом 14 днів щомісяця протягом 3 місяців.

За даними низки досліджень [7,9], така схема є найоптимальнішою, оскільки за інтравагінального застосування лікарський засіб ПРОТЕФЛАЗІД® (супозиторії) впливає на ВПЛ у поверхневих шарах епітелію шийки матки, а за перорального застосування ПРОТЕФЛАЗІД® (краплі) надходить у базальні клітини з током крові.

Дослідження виконано відповідно до принципів Гельсінської декларації. Протокол дослідження ухвалено Локальним етичним коміте-

том зазначеної в роботі установи. На проведення досліджень отримано інформовану згоду жінок.

## Результати дослідження та їх обговорення

У ВПЛ-інфікованих жінок II і III груп відмінностей у частоті виявлення різних типів ВПЛ не знайдено ( $p > 0,05$ ). Переважними типами вірусу ВПЛ в обстежених були 16 і 18-й, виявлені відповідно у 35 (58,3%) і 8 (13,3%) з 60 пацієнтів (II і III групи разом). Рідше траплялися інші типи ВПЛ: 45-й тип — у 5 (8,3%) обстежених, 31-й тип — у 4 (6,7%), 33-й тип — у 3 (5,0%), 58-й тип — у 2 (3,3%). У поодиноких випадках відмічалися 39, 56, 51-й типи ВПЛ. Інші відомі типи ВПЛ (35, 52, 59, 68, 73, 82-й) у проведеному дослідженні не спостерігалися.

У 7 (23,3%) пацієток III групи під час обстеження відзначалися два і більше типів ВПЛ. Найчастіше поєднувалися 16 і 18-й типи — у 5 (16,7%). Кількісне визначення ВПЛ в I групі становило  $5,1 \pm 0,3$  Lg ВПЛ/10<sup>5</sup> клітин, у II групі —  $6,16 \pm 0,4$  Lg ВПЛ/10<sup>5</sup> клітин.

Вплив лікарського засобу ПРОТЕФЛАЗІД® на ерадикацію ВПЛ оцінювали за результатами ВПЛ-тесту після закінчення лікування жінок II і III груп (табл.). За даними таблиці, лікування ВПЛ-інфекції із застосуванням лікарського засобу ПРОТЕФЛАЗІД® привело до ерадикації ВПЛ у 26 (86,7%) із 30 досліджених жінок II групи і у 23 (76,7%) із 30 жінок III групи, що свідчить про достатньо високий відсоток випадків повного видалення збудника після 3-місячного курсу лікування.

Негативні наслідки лікування ВПЛ-інфекції у 4 (13,3%) пацієток II групи і у 7 (23,3%) жінок III групи фіксувалися переважно в інфікованих 16-м типом ВПЛ, хоча внаслідок перорального та інтравагінального одночасного застосування лікарського засобу ПРОТЕФЛАЗІД® вірусне навантаження в обох групах знизилося з  $5,1 \pm 0,3$  Lg ВПЛ/10<sup>5</sup> клітин до  $4,2 \pm 0,1$  Lg ВПЛ/10<sup>5</sup> у II групі і з  $6,16 \pm 0,4$  Lg ВПЛ/10<sup>5</sup> клітин до  $5,2 \pm 0,3$  Lg ВПЛ/10<sup>5</sup> клітин у III групі жінок.

За результатами цитологічного і морфологічного дослідження матеріалу шийки матки після курсу комбінованого лікування лікарським засобом ПРОТЕФЛАЗІД® за запропонованою схемою, повне одужання відбулося у 23 (76,7%) жінок із ЦІН I (III група) з повним відновленням багатшарового епітелію шийки матки з нівелюванням ознак дисплазії — відсутність койлоцитозу, акантозу, гігантських

Таблиця  
**Результати ВПЛ-тесту і морфологічного дослідження біопатів шийки матки в жінок із ВПЛ-інфекцією після курсу комбінованого лікування лікарським засобом ПРОТЕФЛАЗІД® (абс., %)**

Група	Абс.	ВПЛ-тест після курсу лікування		Результати морфологічного дослідження біоптату шийки матки	
		негативний	позитивний	регрес ЦІН	ЦІН I
II (без ЦІН)	30	26 (86,7)	4 (13,3)	–	–
III (ЦІН I)	30	23 (76,7)	7 (23,3)	23 (76,7)	7 (23,3)

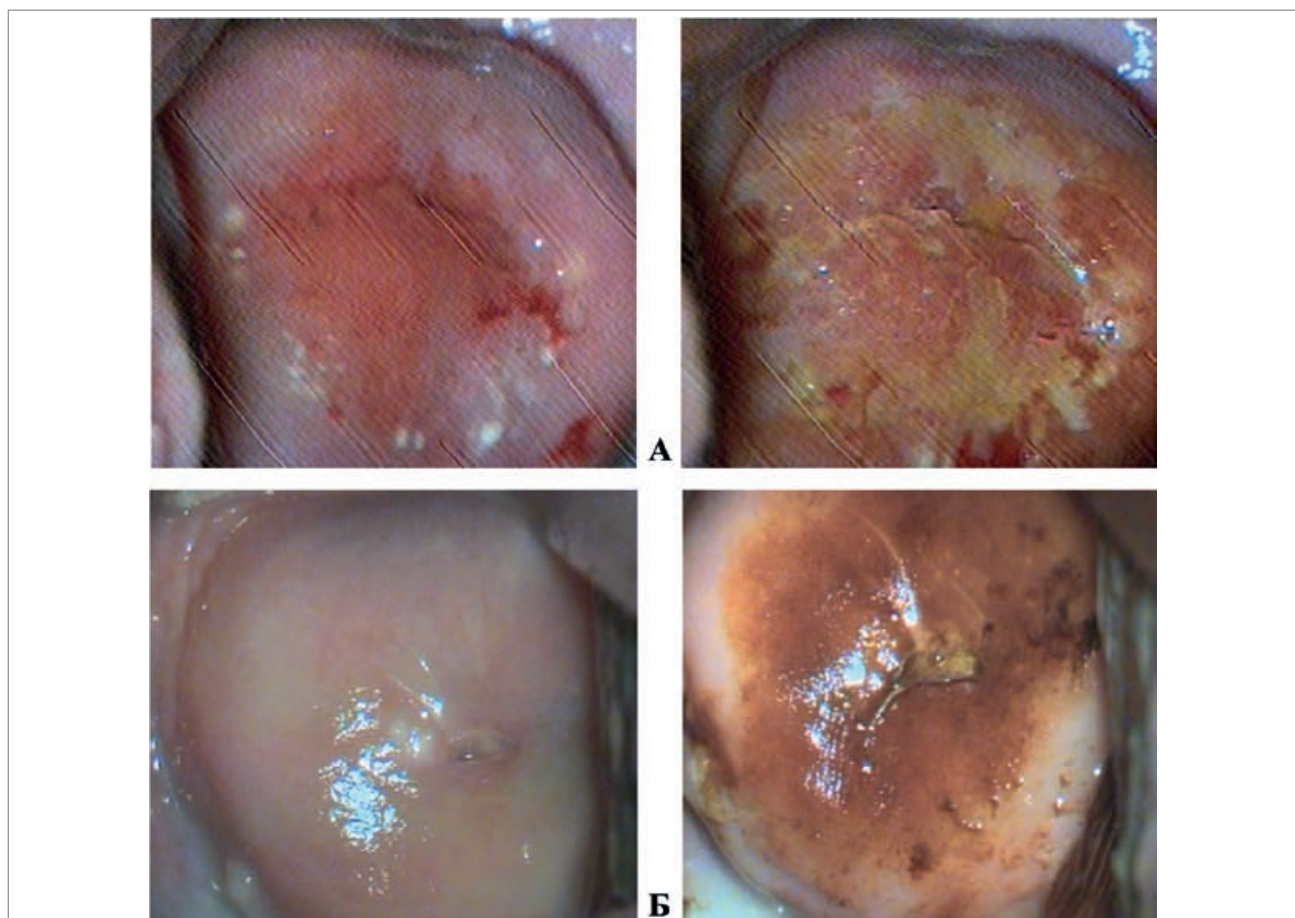
ядер, епітеліоцитів із кількома ядрами. Слід зазначити, що спостереження за цією групою хворих протягом наступних 24 місяців засвідчило відсутність рецидиву захворювання в пролікованих хворих. Зразок позитивного результату лікування ЦІН I на тлі ВПЛ лікарським засобом ПРОТЕФЛАЗІД® за даними огляду шийки матки при кольпоскопії наведено на рисунку 1.

Для визначення молекулярних механізмів впливу лікарського засобу ПРОТЕФЛАЗІД® на перебіг ЦІН на тлі ВПЛ у всіх жінок досліджених груп у біоптатах епітелію шийки матки проведено ІГХ-дослідження з використанням моноклональних антитіл до онкопротеїнів p16 і Ki-67.

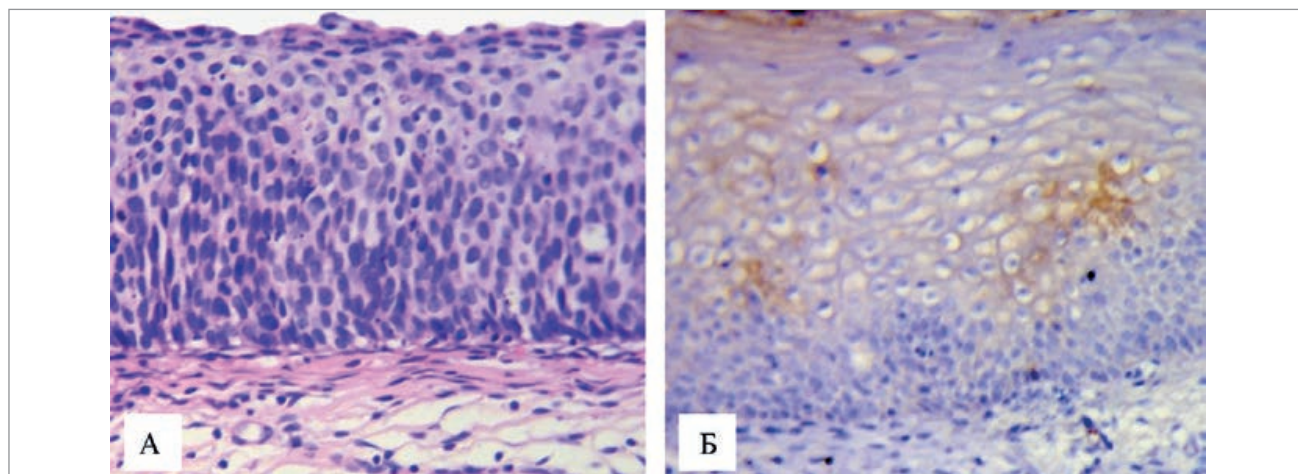
Онкопротеїн p16 є природно ядерним протеїном і в епітелії шийки матки жінок контрольної

(I) групи визначався тільки як один тип ІГХ-забарвлення, зокрема інтрануклеарний, який нами віднесено до негативного статусу щодо експресії цього маркера.

У жінок із ВПЛ без ЦІН (II група) поряд із переважно негативним статусом щодо експресії p16 у 7 (23,3%) зразках епітелію шийки матки спостерігалися випадки фокальної позитивної ІГХ-реакції слабкої інтенсивності одночасно в ядрах і цитоплазмі (змішана позитивна реакція), переважно в клітинах базального та парабазального шарів епітелію шийки матки. Після проведеного курсу терапії лікарським засобом ПРОТЕФЛАЗІД® за визначеною схемою в препаратах шийки матки позитивними до p16 виявлялися лише поодинокі випадки зі слабкою ІГХ-реакцією менш ніж



**Рис. 1.** Нативне зображення шийки матки (ліворуч) і після проби з розчином Люголя (праворуч): А — до лікування; Б — після лікування засобом ПРОТЕФЛАЗІД®



**Рис. 2.** Характер ІГХ-реакції з протеїном p16 в епітелії зразків шийки матки з ЦІН 1: А — до лікування — інтрануклеарна дифузна реакція; Б — після лікування засобом ПРОТЕФЛАЗІД® — інтрануклеарна фокальна реакція (ІГХ, система візуалізації «DAKO EnVision». Зб.  $\times 400$ )

у 5% клітин базального шару, як і у здорових жінок (І група).

У жінок із ЦІН І (ІІІ група) із 30 досліджених зразків епітелію шийки матки в 10 (33,3%) зразках відзначалася дифузна позитивна ІГХ-реакція на антиген p16 (рис. 2 а), у 14 (46,7%) зразках ІГХ-забарвлення мало фокальний характер, а інші 6 (20,0%) — виявилися негативними до маркера p16. Після курсу лікування засобом ПРОТЕФЛАЗІД® кількість зразків із позитивною дифузною ІГХ-реакцією з p16 значно зменшилася. Так, із 10 зразків із дифузним ІГХ-забарвленням з антигеном p16 такий характер його експресії зберігся лише в 4 (40,0%), тобто кількість таких випадків зменшилася у 2,5 раза. В інших 4 зразках біоптату шийки матки ІГХ-забарвлення на протеїн p16 придбало фокальний характер із цитоплазматичною реакцією слабкої інтенсивності, переважно в клітинах базального і парабазального шарів епітелію шийки матки (рис. 2Б), а 2 зразки стали ІГХ-негативними.

З 14 препаратів із фокальним ІГХ-забарвленням у реакції з протеїном p16 більшість контрольних зразків епітелію шийки матки з ЦІН І після лікування стали негативними за результатами ІГХ-реакції (8 (57,1%) випадків), тобто в цієї категорії оцінювання експресії p16 кількість випадків із фокальною реакцією зменшилася в 1,8 раза. Взагалі, враховуючи всі позитивні зразки епітелію шийки матки в ІГХ-реакції з p16, як фокального, так дифузного характеру, після лікування ВПЛ-інфекції у жінок з ЦІН І негативними до експресії цього маркера стали 14 (58,3%) зразків епітелію шийки матки. Отже, комбіноване лікуван-

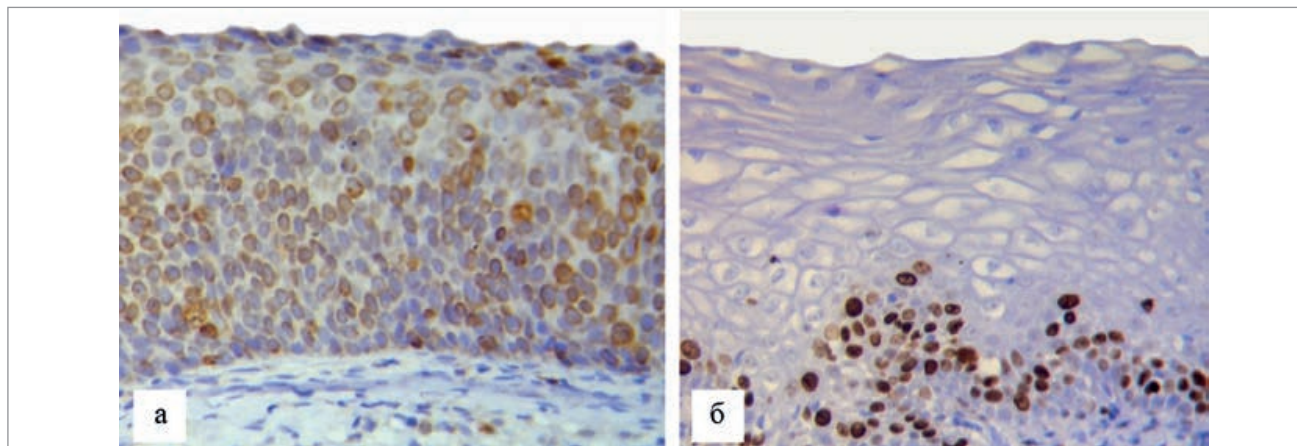
ня ВПЛ-інфекції в жінок із ЦІН І лікарським засобом ПРОТЕФЛАЗІД® сприяло зменшенню кількості випадків позитивних клітин шийки матки з експресією протеїну p16 майже вдвічі.

У зразках епітелію шийки матки здорових жінок (І група) кількість ІГХ-позитивних клітин з експресією протеїну Ki-67 не перевищувала 3%.

За наявності ВПЛ-інфекції, але без ЦІН (ІІ група) кількість позитивних клітин з експресією Ki-67 коливалася від 5% до 12%, а в разі поєднання з ЦІН І (ІІІ група) — від 5% до 20%, розташовувалися вони переважно в парабазальному шарі, окремі клітини з інтрануклеарною реакцією відзначалися і в базальному шарі. При цитологічних ознаках ВПЛ-інфекції (койлоцитоз) спостерігалися клітини з високим рівнем експресії Ki-67 майже у всіх шарах покритого епітелію шийки матки (рис. 3А).

Середнє значення ІІІ за визначенням експресії протеїну Ki-67 у зразках біоптату шийки матки в жінок із ЦІН І (ІІІ група), який, за підрахунком позитивних клітин, становив  $19,7 \pm 0,7\%$ , що достовірно перевищувало відповідне значення ( $3,2 \pm 0,4$ ;  $p < 0,05$ ) у нормальному епітелії (І група). За час лікування засобом ПРОТЕФЛАЗІД® у цих жінок відбулося достовірне зменшення цього показника до  $9,2 \pm 0,5\%$  ( $p < 0,05$ ), тобто майже удвічі, а експресія протеїну Ki-67 визначалася лише як інтрануклеарна фокальна ІГХ-реакція в парабазальному шарі епітелію шийки матки (рис. 3Б). У жінок ІІ групи з ВПЛ-інфекцією і наявністю лише цитологічних ознак койлоцитозу після лікування середнє значення ІІІ, за визначенням ІГХ-маркера Ki-67, зменшилося з  $6,8 \pm 0,2\%$  до





**Рис. 3.** Характер ІГХ-реакції з протеїном Ki-67 в епітелії зразків шийки матки з ЦІН I: А — до лікування — інтрануклеарна реакція у всіх шарах покривного епітелію; Б — після лікування засобом ПРОТЕФЛАЗІД® — інтрануклеарна фокальна реакція в парабазальному шарі (ІГХ, система візуалізації «DAKO EnVision». Зб.  $\times 400$ )

значень у контрольній (I) групі жінок ( $3,2 \pm 0,4$ ;  $p < 0,05$ ).

Таким чином, ІГХ-дослідження внутрішньоклітинних маркерів p16 і Ki-67 довело, що під впливом лікарського засобу ПРОТЕФЛАЗІД® вірогідно зменшується проліферативна активність клітин і блокується інтеграція ДНК ВПЛ у геном епітеліоцитів шийки матки, що опосередковано свідчить про стабілізацію клітинного геному і відновлення контролю протоонкогенів за клітинним циклом.

Незважаючи на те, що на цей час остаточно сформована концепція вірусної природи передракових захворювань і РШМ, місце консервативної противірусної терапії у ВПЛ інфікованих жінок чітко не визначене в регламентуючих документах щодо ведення пацієнток із ВПЛ-асоційованою ЦІН.

### Висновки

Отримані нами результати клінічного і молекулярно-морфологічного досліджень довели, що одночасне застосування вітчизняного лікарського засобу ПРОТЕФЛАЗІД® (краплі) і ПРОТЕФЛАЗІД® (супозиторії) протягом 3 місяців у ВПЛ-інфікованих жінок без ознак морфологічного ушкодження шийки матки сприяло ерадикації ВПЛ у 86,7% випадках, а у жінок із ЦІН I, викликаних ВПЛ, — у 76,7% випадках,

крім цього, лікування сприяло регресу дисплазії шийки матки в 76,7% жінок. Можна констатувати, що терапія ВПЛ-інфекції із застосуванням лікарського засобу ПРОТЕФЛАЗІД® у жінок із ЦІН I веде до стійкого регресу диспластичного ураження епітелію шийки матки, оскільки протягом 24 місяців спостереження після лікування в досліджених жінок усі ПАП-тести і ВПЛ-тести були негативними.

Отримані результати дослідження ще раз вказують на необхідність противірусного лікування в жінок на початковому етапі ВПЛ-інфікування, яке в цитологічних препаратах проявляється койлоцитозом, тобто до того моменту, коли його ВПЛ можуть викликати ЦІН I або більш тяжкі диспластичні ураження шийки матки. Таке лікування можна віднести, як і вакцинацію, до первинної профілактики РШМ, оскільки доведено, що жінки за відсутності ВПЛ-інфекції мають украй низький ризик розвитку цервікального раку.

ПРОТЕФЛАЗІД® є на сьогодні одним із найефективніших лікарських засобів терапії ВПЛ-інфекції, який може бути рекомендований для ерадикації папіломавірусів у жінок як із ЦІН I, так і в разі позитивного ВПЛ-тесту за нормального ПАП-тесту.

*Автор заявляє про відсутність конфлікту інтересів.*

### References/Література

- Allanson ER, Schmeler KM. (2021). Preventing Cervical Cancer Globally: Are We Making Progress? *Cancer Prev Res (Phila)*. 14(12): 1055–1060.
- Bahriy MM, Dibrova VA, Popadynets OH, Hryshchuk MI. (2016). *Metodyky morfolohichnykh doslidzhen*. Vinnytsia: Nova Knyha: 328 [Багрієв ММ, Діброва ВА, Попадинець ОГ, Гришук МІ. (2016). *Методики морфологічних досліджень*. Вінниця: Нова Книга: 328].
- Benyuk VO, Grinevich OI, Usevich IA, Sikachova IS, Shepetko MV. (2016). Therapeutic efficacy of Proteflazid, suppository among the patients with genitourinary viral-bacterial infection. *Health of woman*. 2(108): 162–166.



- [Бенюк ВО, Гриневич ОЙ, Усевич ІА, Сікачова ІС, Шепетько МВ. (2016). Терапевтична ефективність супозиторіїв Протефлазід при змішаній урогенітальній вірусно-бактеріальній інфекції. *Здоров'я жінки*. 2(108): 162–166]. doi: 10.15574/HW.2016.108.162.
4. Bogani G, Chiappa V, Pinelli C et al. (2020). Trends in prevalence in human papillomavirus types and their association with cervical dysplasia: an analysis on 15 138 women over 20 years. *Eur. J. Cancer Prev.* 29(5): 452–457.
  5. Godlevskaya NA, Starover AV. (2017). Clinical efficacy of topical use of vaginal suppositories Proteflazid® in the treatment of cervical intraepithelial neoplasia of mild and moderate degree caused by the human papilloma virus. *Health of woman*. 2(118): 55–60. [Годлевська НА, Стровер АВ. (2017). Клінічна ефективність місцевого застосування вагінальних супозиторіїв Протефлазід у лікуванні цервікальної інтраепітеліальної неоплазії легкого та помірного ступенів, зумовленої вірусом папіломи людини. *Здоров'я жінки*. 2(118): 55–60]. doi: 10.15574/HW.2017.118.55.
  6. Isidean SD, Wang Y, Mayrand MH et al. (2019). Assessing the time dependence of prognostic values of cytology and human papillomavirus testing in cervical cancer screening. *Int. J. Cancer*. 144(10): 2408–2418. doi: 10.1002/ij.c.31970.
  7. Kaminskyi VV, Shalko MH. (2016). Novi terapeutichni pidkhody do likuvannya zhinok z dysplaziieiu epiteliu shyiky matky, zumovlenoiu papilomavirusnoi infektsiieiu. *Informatsiinyi lyst pro novovedennia v systemi okhorony zdorovia*. K.: 49. [Камінський ВВ, Шалько МГ. (2016). Нові терапевтичні підходи до лікування жінок з дисплазією епітелію шийки матки, зумовленою папіломавірусною інфекцією. Інформаційний лист про нововедення в системі охорони здоров'я. K.: 49].
  8. Kaminskyi VV, Shalko MH, Hrynevych OI. (2014). Proteflazid u vahitnykh: systemnyi ohliad rezultativ pislia reiestratsiinykh sposterezhen za bezpechnistiu ta efektyvnistiu zastosuvannya. *Zdorovia zhinky*. 6(92). [Камінський ВВ, Шалько МГ, Гриневич ОЙ. (2014). Протефлазід у вагітних: системний огляд результатів післяреєстраційних спостережень за безпечністю та ефективністю застосування. *Здоров'я жінки*. 6(92)].
  9. Kaminskyi VV, Shalko MH, Vorobiova LI ta insh. (2015). Proteflazid: spetsyfična aktyvnist u doklinichnykh doslidzhenniakh; efektyvnist ta bezpechnist zastosuvannya u klinichnii praktytii pry zakhvoriuvanniakh, sprychynenykh virusom papilomy liudyny (systematychnyi ohliad). *Zdorovia zhinky*. 3(99): 122–132. [Камінський ВВ, Шалько МГ, Воробйова ЛІ та інш. (2015). Протефлазід: специфічна активність у доклінічних дослідженнях; ефективність та безпечність застосування у клінічній практиці при захворюваннях, спричинених вірусом папіломи людини (систематичний огляд). *Здоров'я жінки*. 3(99): 122–132].
  10. Kravchuk IV. (2009). Ekspresia markeriv r16, Ki67 ta r63 u zhinok iz tservikalnoi patolohiieiu na tli infikuvannya virusom papilomy liudyny vysokoho kantserohennoho ryzyku. *Zdorovia zhinky*. 8(44): 233–216. [Кравчук ІВ. (2009). Експресія маркерів r16, Ki67 та r63 у жінок із цервікальною патологією на тлі інфікування вірусом папіломи людини високого канцерогенного ризику. *Здоров'я жінки*. 8(44): 233–216].
  11. Lakatosh VP. (2006). Diahnostyka ta likuvannya tservikalnykh intraepiteliialnykh neoplazii papilomavirusnoi etiologii z vykorystanniam klinichnykh, tsytomorfologichnykh, ultrastrukturnykh ta molekuliarno-biolohichnykh kryteriiv. *Doktor*. 5: 51–55. [Лакатос ВП. (2006). Діагностика та лікування цервікальних інтраепітеліальних неоплазій папіломавірусної етіології з використанням клінічних, цитоморфологічних, ультраструктурних та молекулярно-біологічних критеріїв. *Доктор*. 5: 51–55].
  12. MOZ Ukrainy. (2014). Unifikovanyi klinichniy protokol pervychnoi, vtorynnoi (spetsializovanoi), tretynnoi (vysokospetsializovanoi) medychnoi dopomohy «Dysplaziia shyiky matky. Rak shyiky matky». Nakaz MOZ Ukrainy vid 02.04.2014 r. #236. [МОЗ України. (2014). Уніфікований клінічний протокол первинної, вторинної (спеціалізованої), третинної (високоспеціалізованої) медичної допомоги «Дисплазія шийки матки. Рак шийки матки». Наказ МОЗ України від 02.04.2014 р. №236].
  13. Ntanasis–Stathopoulos I, Kyriazoglou A, Lontos MA et al. (2020). Current trends in the management and prevention of human papillomavirus (HPV) infection. *J. BUON*, 25(3): 1281–1285.
  14. Okunade KS. (2020). Human papillomavirus and cervical cancer. *J. Obstet. Gynaecol.* 40(5): 602–608.
  15. Pitko VA, Huz IA, Demydenko OD ta insh. (2011). Papilomavirusna infektsiia: likuvannya ta profilaktyka. *Tavriiskyi medyko-biolohichnyi visnyk*. 14(3); 2 (55): 158–160. [Пітько ВА, Гузь ІА, Демиденко ОД та інш. (2011). Папіломавірусна інфекція: лікування та профілактика. *Таврійський медико-біологічний вісник*. 14(3); 2 (55): 158–160].
  16. Shponka OV. (2012). Diahnostyka, prohnoz ta likuvannya dysplazii shyiky matky, asotsiirovanoi z papilomavirusnoi infektsiieiu u zhinok reproduktyvnoho viku. *Dys. ... k.med.n.* [Шпонька ОВ. (2012). Діагностика, прогноз та лікування дисплазії шийки матки, асоційованої з папіломавірусною інфекцією у жінок репродуктивного віку. Дис. ... к.мед.н.], [Шпонька ОВ. (2012). Діагностика, прогноз та лікування дисплазії шийки матки, асоційованої з папіломавірусною інфекцією у жінок репродуктивного віку. Дис. ... к.мед.н.],
  17. Shponka IS, Dorokhova OV, Shponka OV. (2005). Prohnostychnie ta diahnostychnie znachennia ekspresii markeriv biolohichnykh vlastyvostei tkanyn pry dysplastychnykh ta neoplastychnykh protsesakh shyiky matky. *Medychni perspektivy*. X; 4: 8–16. [Шпонька ІС, Дорохова ОВ, Шпонька ОВ. (2005). Прогностичне та діагностичне значення експресії маркерів біологічних властивостей тканин при диспластичних та неопластичних процесах шийки матки. *Медичні перспективи*. X; 4: 8–16].
  18. Sukhanova AA. (1999). Suchasni pohliady na roli infektsiinoho faktora u vynyknenni ta rozvytku dysplazii epiteliu shyiky matky. *Visnyk asotsiatsii akusheriv-hinekologiv Ukrainy*. 2: 9–14. [Суханова АА. (1999). Сучасні погляди на роль інфекційного фактора у виникненні та розвитку дисплазії епітелію шийки матки. *Вісник асоціації акушерів-гінекологів України*. 2: 9–14].
  19. Svintsitskyi VS, Pryimak VV, Renkas OP. (2020). Suchasni pidkhody do diahnostyky ta likuvannya raku shyiky matky. *Ukr. med. zhurnal*. 2: 1–7. [Свінцицький ВС, Приймак ВВ, Ренкас ОП. (2020). Сучасні підходи до діагностики та лікування раку шийки матки. *Укр. мед. журнал*. 2: 1–7].
  20. Tatarchuk TF, Silina NK. (2011). Suchasna taktyka vedennia patsiientok iz VPL-asotsiiovanomu neoplaziyamy. *Osnovni rekomendatsii EUROGIN 2011. Hinekologichna endokrynolohiia*. 1: 78–80. [Татарчук ТФ, Сіліна НК. (2011). Сучасна тактика ведення пацієнток із ВПЛ-асоційованими неоплазіями. *Основні рекомендації EUROGIN 2011. Гінекологічна ендокринологія*. 1: 78–80].

21. Ukrainyskiy natsionalnyi konsensus shchodo obstezhennia ta likuvannia zhinok pislia prokhozhennia pervynnoho tservikalnogo skryninhu. (2022). [Український національний консенсус щодо обстеження та лікування жінок після проходження первинного цервікального скринінгу. (2022)].
22. Voloshyna NM, Kuznietsova TP, Pauk OP ta insh. (2011). Likuvannia zakhvoriuvan shyiky matky, shcho asotsiiuetsia z papilomavirusnoi infektsiieiu u patsiientok molodoho viku. Tavriiskiy medyko-biolohichnyi visnyk. 3; 2(55): 56–60. [Волошина НМ, Кузнєцова ТП, Паук ОП та інш. (2011). Лікування захворювань шийки матки, що асоціюються з папіломавірусною інфекцією у пацієнток молодого віку. Таврійський медико-біологічний вісник. 3; 2(55): 56–60].
23. Voloshyna NM, Zvantseva ED. (2017). The ways of reducing diagnostic and therapeutic aggression of the patients with HPV-infection in reproductive age. Health of woman. 9(125): 51–58. [Волошина НМ, Званцева ЄД. (2017). Шляхи зниження діагностичної та лікувальної агресії у пацієнток з ВПЛ-інфекцією у репродуктивному віці. Здоров'я жінки. 9(125): 51–58]. doi: 10.15574/HW.2017.125.51.
24. Vorobiova LI, Lihirda NF. (2010). Porivniannia terapevtychnoi efektyvnosti zastosuvannia riznykh likarskykh form preparatu alfa-2-interferonu u khvorykh na TsIN I ta TsIN II. Zdorovia zhinky. 5(51): 231–236 [Воробійова ЛІ, Лігірда НФ. (2010). Порівняння терапевтичної ефективності застосування різних лікарських форм препарату альфа-2-інтерферону у хворих на ЦІН I та ЦІН II. Здоров'я жінки. 5(51): 231–236].
25. WHO. (2014). Guidelines for Treatment of Cervical Intraepithelial Neoplasia 2–3 and Adenocarcinoma in situ: Cryotherapy, Large Loop Excision of the Transformation Zone, and Cold Knife Conization. Geneva: World Health Organization.
26. Zakhartseva LM, Manzhuра YeP, Vakulenko HV. ta in. (2011). Hiperekspresia bilka r16 v epitelialnykh klitynakh shyiky matky ta yoho znachennia v otsyntsi ryzyku formuvannia raku. Zdorovia zhinky. 4(57): 253–256 [Захарцева ЛМ, Манжура ЄП, Вакуленко ГВ. та ін. (2011). Гіперекспресія білка р16 в епітеліальних клітинах шийки матки та його значення в оцінці ризику формування раку. Здоров'я жінки. 4(57): 253–256].
27. Zaporozhan VM, Kamynskyi VV, Svyntsytskyi VS et al. (2017). National consensus on the management of patients with cervical intraepithelial neoplasia caused by papillomavirus infection. Health of woman. 7(123): 16–24. [Запорожан ВМ, Камінський ВВ, Свинцицький ВС та інш. (2017). Національний консенсус щодо ведення пацієнток з цервікальними інтраепітеліальними неоплазіями, зумовленими папіломавірусною інфекцією. Здоров'я жінки. 7(123): 16–24].
28. Zaporozhan VM, Tatarchuk TF, Dubinina VH ta insh. (2013). Peredpukhlynna patolohiia shyiky matky: obsiah kompetentsii likaria-hinekolooha. Reproduktyvna endokrynolohiia. 7: 7–15. [Запорожан ВМ, Татарчук ТФ, Дубініна ВГ та інш. (2013). Передпукхлинна патологія шийки матки: обсяг компетенції лікаря-гінеколога. Репродуктивна ендокринологія. 7: 7–15].
29. Zhuk SI, Koshmerynska OM, Taran OO. (2012). Tservikalna intraepitelialna neoplaziia – aktualna problema sohodennia (ohliad literatury). Neonatolohiia, khirurgiia ta perynatalna medytsyna. 4(6): 207–213. [Жук СІ, Кошмеринська ОМ, Таран ОО. (2012). Цервікальна інтраепітеліальна неоплазія – актуальна проблема сьогодення (огляд літератури). Неонатологія, хірургія та перинатальна медицина. 4(6): 207–213].

**Відомості про авторів:**

**Потапов Валентин Олександрович** — д.мед.н., проф., зав. каф. акушерства та гінекології ДДМУ, заслужений діяч науки та техніки України.

Адреса: м. Дніпро, вул. В. Вернадського, 9. <https://orcid.org/0000-0001-7498-7416>.

**Гарагуля Ірина Степанівна** — к.мед.н., асистент каф. акушерства і гінекології ДДМУ. Адреса: м. Дніпро, вул. В. Вернадського, 9.

<https://orcid.org/0000-0003-4981-979X>.

Стаття надійшла до редакції 13.07.2024 р.; прийнята до друку 15.09.2024 р.