

DOI: <https://doi.org/10.17650/1994-4098-2025-21-2-91-99>

Эффективность иммуноцитохимического метода оценки коэкспрессии p16/Ki-67 в диагностике патологии шейки матки

Е.А. Артемьева¹, И.С. Южакова², М.И. Пахарукова^{2, 3}, Ю.В. Цуканова², Н.В. Топоркова², И.А. Трухина², Г.В. Лёшкина⁴, Е.Е. Лысак², Ю.Г. Лагерева²

¹Институт естественных наук и математики ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет им. первого Президента России Б.Н. Ельцина»; Россия, 620026 Екатеринбург, ул. Куйбышева, 48;

²ГАОУ СО «Клинико-диагностический центр им. Я.Б. Бейкина»; Россия, 620144 Екатеринбург, ул. 8 Марта, 78В;

³ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской академии наук»; Россия, 620049 Екатеринбург, ул. Первомайская, 106;

⁴ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; Россия, 111123 Москва, ул. Новогиревская, 3А

Контакты: Екатерина Алексеевна Артемьева artemjeva.cat@mail.ru

Введение. Интраэпителиальное поражение шейки матки вирусом папилломы человека (ВПЧ) является одним из наиболее распространенных заболеваний, связанных с ВПЧ. В последние годы иммуноцитохимическое выявление коэкспрессии p16/Ki-67 рассматривается как дополнительный метод подтверждения предракового и ракового поражения шейки матки, обладающий высокими показателями чувствительности и специфичности.

Цель исследования – определить частоту выявления коэкспрессии p16/Ki-67 в зависимости от степени интраэпителиального поражения, генотипа ВПЧ, вирусной нагрузки, а также наличия коинфекции. Рассчитать показатели эффективности иммуноцитохимического метода и метода полимеразной цепной реакции выявления ДНК ВПЧ для диагностики выраженных интраэпителиальных поражений и карциномы шейки матки (цервикальная интраэпителиальная неоплазия (cervical intraepithelial neoplasia, CIN) 2+).

Материалы и методы. В исследование включен материал 129 пациенток. В зависимости от степени поражения шейки матки сформированы группы: плоскоклеточное интраэпителиальное поражение низкой степени (CIN 1), плоскоклеточное интраэпителиальное поражение высокой степени (CIN 2–3), карцинома. В группы сравнения включены пациентки без интраэпителиальных изменений и с отрицательными/положительными результатами на ДНК ВПЧ. Коэкспрессия p16/Ki-67 была оценена с помощью иммуноцитохимического анализа, ДНК ВПЧ определялась методом полимеразной цепной реакции в реальном времени. Оценка результатов осуществлялась при сопоставлении с результатами гистологического исследования.

Результаты. Частота обнаружения положительной иммуноцитохимии p16/Ki-67 в зависимости от степени дисплазии и карциномы шейки матки: CIN 1 – 26,5 % ($n = 9$), CIN 2 – 59,3 % ($n = 16$), CIN 3 – 88,2 % ($n = 15$), плоскоклеточная карцинома – 88,9 % ($n = 8$). Коэкспрессия чаще обнаруживалась при наличии ВПЧ 16, 18 и 31-го генотипов. Медиана вирусной нагрузки была выше при наличии двойного окрашивания p16/Ki-67 и составила 6,21 lg, при отсутствии коэкспрессии – 5,02 lg. Не было выявлено статистически значимых различий в частоте обнаружения совместной экспрессии p16/Ki-67 в зависимости от количества генотипов ВПЧ в материале. Показатели эффективности метода для диагностики CIN 2+ составили: чувствительность – 73,58 %, специфичность – 82,35 %.

Выводы. Положительная коэкспрессия p16/Ki-67 чаще выявляется при выраженных интраэпителиальных поражениях шейки матки и наличии ВПЧ 16, 18 и 31-го генотипов. Иммуноцитохимический метод оценки коэкспрессии p16/Ki-67 является более специфичным в диагностике предраковых и раковых заболеваний шейки матки по сравнению с обнаружением ДНК ВПЧ.

Ключевые слова: полимеразная цепная реакция, иммуноцитохимический анализ, коэкспрессия p16/Ki-67, вирус папилломы человека, плоскоклеточная карцинома шейки матки

Для цитирования: Артемьева Е.А., Южакова И.С., Пахарукова М.И. и др. Эффективность иммуноцитохимического метода оценки коэкспрессии p16/Ki-67 в диагностике патологии шейки матки. Опухоли женской репродуктивной системы 2025;21(2):91–9.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1994-4098-2025-21-2-91-99>

Efficiency of the immunocytochemical method for assessing p16/Ki-67 coexpression in the diagnosis of cervical pathology

E.A. Artemyeva¹, I.S. Yuzhakova², M.I. Pakharukova^{2,3}, Yu.V. Tsukanova², N.V. Toporkova², I.A. Trukhina², G.V. Lyoshkina⁴, E.E. Lysak², Yu.G. Lagereva²

¹Institute of Natural Sciences and Mathematics, Ural Federal University named after the First President of Russia B.N. Yeltsin; 48 Kuybysheva St., Ekaterinburg 620026, Russia;

²Clinical and Diagnostic Center named after Ya.B. Beikin; 78B 8 Marta St., Ekaterinburg 620144, Russia;

³Institute of Immunology and Physiology of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences; 106 Pervomayskaya St., Ekaterinburg 620049, Russia;

⁴Central Research Institute of Epidemiology of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing; 3A Novogireevskaya St., Moscow 111123, Russia

Contacts: Ekaterina Alekseevna Artemyeva artemjeva.cat@mail.ru

Background. Cervical intraepithelial lesion with human papillomavirus (HPV) is one of the most common HPV-associated diseases. In recent years, immunocytochemical detection of p16/Ki-67 coexpression has been considered as an additional method for confirming precancerous and cancerous cervical lesions, with high sensitivity and specificity.

Aim. To determine the detection rate of p16/Ki-67 coexpression depending on the degree of intraepithelial lesion, human papillomavirus genotype, viral load, and the presence of coinfection. To calculate the performance indicators of the immunocytochemical method and the polymerase chain reaction method for detecting HPV DNA for the diagnosis of severe intraepithelial lesions and cervical carcinoma (cervical intraepithelial neoplasia, CIN 2+).

Materials and methods. The study included material from 129 patients. Depending on the degree of cervical lesion, the following groups were formed: low-grade squamous intraepithelial lesion (CIN 1), high-grade squamous intraepithelial lesion (2–3), carcinoma. The comparison groups included patients without intraepithelial changes and with negative/positive results for HPV DNA. Coexpression of p16/Ki-67 was assessed using immunocytochemistry, HPV DNA was determined by real-time polymerase chain reaction. The results were evaluated in comparison with histology.

Results. The frequency of detection of positive p16/Ki-67 immunocytochemistry depending on the degree of dysplasia and carcinoma of the cervix: CIN 1 – 26.5 % ($n = 9$), CIN 2 – 59.3 % ($n = 16$), CIN 3 – 88.2 % ($n = 15$), squamous cell carcinoma – 88.9 % ($n = 8$). Co-expression was more often detected in the presence of HPV infection of genotypes 16, 18 and 31. The median viral load was higher in the presence of double staining p16/Ki-67 and amounted to 6.21 lg, in the absence of coexpression – 5.02 lg. No statistically significant differences were found in the frequency of detection of co-expression of p16/Ki-67 depending on the number of HPV genotypes in the material. The efficiency indicators of the method for diagnosing CIN 2+ were: sensitivity 73.58 %, specificity 82.35 %.

Conclusion. A positive coexpression of p16/Ki-67 is more often detected in severe intraepithelial lesions of the cervix and the presence of HPV genotypes 16, 18 and 31. Immunocytochemical method of assessing p16/Ki-67 coexpression is more specific in the diagnosis of precancerous and cancerous diseases of the cervix compared to the detection of HPV DNA.

Keywords: polymerase chain reaction, immunocytochemical analysis, p16/Ki-67 coexpression, human papillomavirus, squamous cell carcinoma of the cervix

For citation: Artemyeva E.A., Yuzhakova I.S., Pakharukova M.I. et al. Efficiency of the immunocytochemical method for assessing p16/Ki-67 coexpression in the diagnosis of cervical pathology. *Opuholi zhenskoy reproduktivnoy sistemy = Tumors of Female Reproductive System* 2025;21(2):91–9. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.17650/1994-4098-2025-21-2-91-99>

Введение

В 2020 г. команда Всемирной организации здравоохранения представила глобальную стратегию по ускорению ликвидации рака шейки матки, который является 4-м по распространенности видом карциномы у женщин [1]. Вирус папилломы человека (ВПЧ) считается главным фактором канцерогенеза шейки матки. Однако в большинстве случаев инфекция является транзиторной, а вызываемые ею интраэпителиальные неоплазии шейки матки легкой степени (cervical intraepithelial neoplasia, CIN) (CIN 1) и часть поражений тяжелой степени (CIN 2) не прогрессируют [2, 3].

В последнее десятилетие обсуждается комбинирование ВПЧ-тестирования с методом двойного иммуноокрашивания p16/Ki-67 как биомаркера нарушения клеточного цикла, вызванного онкопротеинами ВПЧ для выявления неоплазий тяжелой степени в программах скрининга и мониторинга рецидивов заболевания [4–6].

В нормальных клетках шейки матки коэкспрессия p16/Ki-67 является взаимоисключающей, поскольку p16 – это белок-супрессор, тормозящий размножение клеток, а Ki-67 – ядерный белок и маркер клеточной пролиферации. При персистирующей инфекции,

вызванной ВПЧ высокого онкогенного риска, онкобелок E7 нарушает экспрессию p16, что приводит к потере контроля над клеточным циклом, пролиферации и, соответственно, накоплению как p16, так и Ki-67 в клетках. Таким образом, одновременное обнаружение биомаркеров p16 и Ki-67 хотя бы в 1 эпителиальной клетке шейки матки служит показателем онкогенной трансформации, опосредованной ВПЧ, и предиктором риска развития рака шейки матки [7]. Согласно проведенным исследованиям, чувствительность теста обнаружения двойного окрашивания p16/Ki-67 для диагностики интраэпителиальных поражений высокой степени (high-grade squamous intraepithelial lesion, HSIL) (CIN 2+) сопоставима с тестированием на ДНК ВПЧ (85–98 % против 75–100 %), однако специфичность несколько выше (51–82 % против 16–57 %) [8–11]. Стоит отметить, что чувствительность тестирования на ДНК ВПЧ повышается с увеличением количества выявляемых генотипов в панели.

Доминирующие генотипы ВПЧ, участвующие в развитии дисплазий и рака шейки матки, могут иметь разный онкогенный потенциал, а частота их распространенности может различаться в зависимости от популяции [11–13]. Вопрос взаимосвязи обнаружения коэкспрессии p16/Ki-67 в зависимости от генотипа ВПЧ остается малоизученным. В исследовании М.-Y. Jiang и соавт. было показано наличие двойного окрашивания p16/Ki-67 у 90,1–90,2 % пациенток с верифицированными поражениями CIN 2+, инфицированных 16/18 и 31/33/52/58 генотипами ВПЧ соответственно. У пациенток с CIN 2+ и выявленными генотипами 45/59/56/66 и 51/39/68/35 коэкспрессия p16/Ki-67 обнаружена в 85,5 и 82,8 % случаев соответственно [14].

Получены данные, что инфицирование 2 и более генотипами ВПЧ приводит к повышенной вирусной нагрузке, что чаще обуславливает прогрессирование заболевания. Риск развития HSIL и инвазивного рака значительно возрастал с увеличением количества типов ВПЧ [15, 16]. Однако неизученным остается вопрос зависимости коэкспрессии p16/Ki-67 от инфицирования несколькими генотипами вируса.

Цель исследования — определить частоту выявления коэкспрессии p16/Ki-67 в зависимости от степени интраэпителиального поражения, генотипа ВПЧ, вирусной нагрузки, а также наличия коинфекции. Рассчитать показатели эффективности метода полимеразной цепной реакции и иммуноцитохимического метода выявления ДНК ВПЧ для диагностики выраженных интраэпителиальных поражений и карциномы шейки матки (CIN 2+).

Материалы и методы

Ретроспективно были проанализированы результаты лабораторных исследований 129 пациенток,

обследованных в Клинико-диагностическом центре им. Я.Б. Бейкина в 2022–2023 гг. Медиана возраста пациенток составила 37 (28–47) лет. Критерии включения в исследование: интраэпителиальное поражение шейки матки, выявленное впервые и верифицированное гистологически; наличие результатов тестирования на ДНК ВПЧ высокого канцерогенного риска и цитологического исследования; наличие виал с клеточным биоматериалом. Критерии исключения: беременность; инфекция, вызванная вирусом иммунодефицита человека, и ее лечение в анамнезе; значительные расхождения результатов цитологического и гистологического методов.

В зависимости от степени поражения шейки матки были сформированы группы: 1) интраэпителиальное поражение низкой степени (low-grade squamous intraepithelial lesion, LSIL) (CIN 1) – 34 пациентки; 2) HSIL и карцинома шейки матки (CIN 2+) – 53 пациентки: CIN 2 ($n = 27$), CIN 3 ($n = 17$), карцинома ($n = 9$). В группы сравнения включены пациентки без интраэпителиальных изменений эпителия (negative for intraepithelial lesion or malignancy, NILM) с отрицательными ($n = 21$) и положительными ($n = 21$) результатами исследований на ДНК ВПЧ. Цитологическое исследование проводилось по методике BD SurePath с окрашиванием препаратов по Папаниколау. Выполнялось параллельное тестирование методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (набор реагентов «АмплиСенс® ВПЧ ВКР генотип-титр-FL») для выявления 14 генотипов ВПЧ. Для выявления и дифференциации ДНК ВПЧ 6-го и 11-го типов использовался набор «АмплиСенс ВПЧ 6/11-FL». Вирусная нагрузка выражалась в lg (ДНК ВПЧ на 100 тыс. клеток). Для оценки коэкспрессии p16/Ki-67 иммуноцитохимическим методом использовался набор реагентов CINtec® Plus в соответствии с инструкцией производителя. Коэкспрессия p16/Ki-67 определялась с помощью антител против p16/Ki-67 и хромогенов Dab и Fast Red. Положительный контроль на p16 в нормальных клетках определялся как коричневое окрашивание цитоплазмы, на Ki-67 – как красное ядерное окрашивание. Коэкспрессия p16/Ki-67 в клетках характеризовалась одновременно окрашиванием цитоплазмы в коричневый цвет и окрашиванием ядра в цвет от темно-красного до красно-коричневого (рис. 1).

Результаты лабораторных исследований расценивались как истинно положительные, истинно отрицательные, ложноотрицательные и ложноположительные при сопоставлении с данными гистологического метода исследования. Расчет показателей эффективности иммуноцитохимического метода и полимеразной цепной реакции для диагностики HSIL и карциномы шейки матки (CIN 2+) был проведен с помощью Diagnostic Test Evaluation Calculator v.22.023 (MedCalc Software

Ltd., США) (доступен в Интернете по ссылке: https://www.medcalc.org/calc/diagnostic_test.php).

Статистический анализ проводился с использованием программы StatTech v.4.1.2 (ООО «Статтех», Россия). Категориальные данные описывались с указанием абсолютных значений и процентных долей. Сравнение процентных долей при анализе четырехпольных таблиц сопряженности выполнялось с помощью критерия χ^2 Пирсона (при значениях ожидаемого явления >10), точного критерия Фишера (при значениях ожидаемого явления <10). Сравнение 2 групп по количественному показателю, распределение которого отличалось от нормального, выполнялось с помощью U-критерия Манна–Уитни, сравнение процентных долей при анализе многопольных таблиц сопряженности – с помощью критерия χ^2 Пирсона.

Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Анализ частоты выявления коэкспрессии p16/Ki-67 в зависимости от степени интраэпителиального поражения показал статистически значимые различия между группами ($p < 0,001$). Коэкспрессия p16/Ki-67 в 73,6 % случаев выявлялась у пациенток с HSIL и карциномой шейки матки (CIN 2+) и у 26,5 % пациенток с LSIL ($p < 0,001$). Получены статистически значимые различия в частоте обнаружения двойного окрашивания p16/Ki-67 в зависимости от степени цервикальной неоплазии. В группах контроля коэкспрессия не была обнаружена (рис. 2).

Обнаружены статистически значимые отличия в частоте положительного двойного окрашивания p16/Ki-67

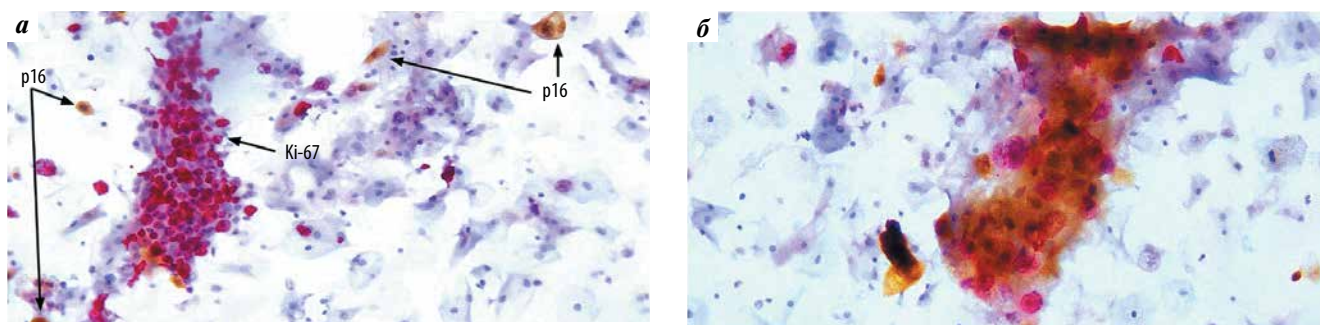


Рис. 1. Определение коэкспрессии p16/Ki-67: а – внутренний контроль, стрелками указаны клетки, отрицательные в отношении коэкспрессии p16/Ki-67; б – коэкспрессия онкомаркеров p16 и Ki-67. Иммуноцитохимическое окрашивание на онкобелки p16/Ki-67 набором реагентов CINtec® Plus, $\times 20$

Fig. 1. Determination of the coexpression of p16/Ki-67: а – internal control, cells negative for coexpression of p16/Ki-67 (arrows); б – coexpression of oncomarkers p16 and Ki-67. p16/Ki-67 dual immunocytochemical staining with a set of reagents CINtec® Plus, $\times 20$

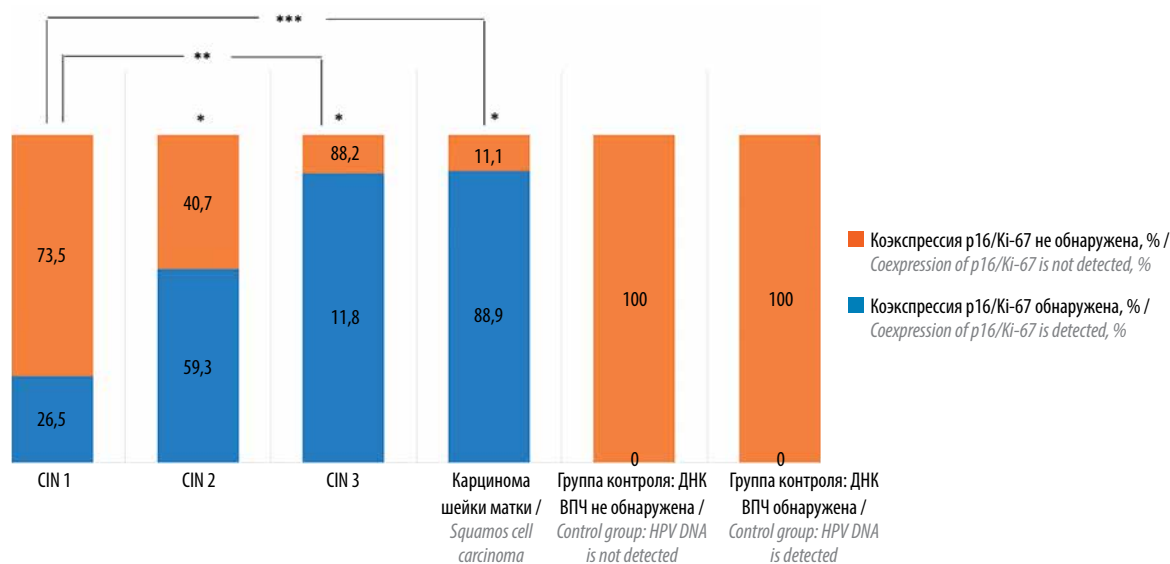


Рис. 2. Частота обнаружения коэкспрессии p16/Ki-67 в анализируемых группах. *Различия с группами контроля: * $p < 0,001$; ** $p < 0,001$; *** $p = 0,005$. ВПЧ – вирус папилломы человека

Fig. 2. Frequency of detection of p16/Ki-67 coexpression in the analyzed groups. *Differences with control groups: * $p < 0.001$; ** $p < 0.001$; *** $p = 0.005$. HPV – human papillomavirus

Таблица 1. Сравнительная характеристика частоты выявления генотипов вируса папилломы человека в зависимости от обнаружения коэкспрессии p16/Ki-67**Table 1.** Comparative characteristics of the frequency of detection of human papillomavirus genotypes depending on the detection of p16/Ki-67 coexpression

Генотип вируса папилломы человека Human papillomavirus genotype		Коэкспрессия p16/Ki-67 p16/Ki-67 coexpression		p
		не обнаружена, n (%) not detected, n (%)	обнаружена, n (%) detected, n (%)	
16	Не обнаружен Not detected	58 (70,7)	24 (29,3)	0,014
	Обнаружен Detected	23 (48,9)	24 (51,1)	
18	Не обнаружен Not detected	78 (65,5)	41 (34,5)	0,039
	Обнаружен Detected	3 (30,0)	7 (70,0)	
31	Не обнаружен Not detected	77 (65,8)	40 (34,2)	0,055
	Обнаружен Detected	4 (33,3)	8 (66,7)	
33	Не обнаружен Not detected	76 (64,4)	42 (35,6)	0,328
	Обнаружен Detected	5 (45,5)	6 (54,5)	
35	Не обнаружен Not detected	80 (64,0)	45 (36,0)	0,145
	Обнаружен Detected	1 (25,0)	3 (75,0)	
39	Не обнаружен Not detected	71 (61,2)	45 (38,8)	0,369
	Обнаружен Detected	10 (76,9)	3 (23,1)	
45	Не обнаружен Not detected	77 (63,1)	45 (36,9)	0,711
	Обнаружен Detected	4 (57,1)	3 (42,9)	
51	Не обнаружен Not detected	75 (62,0)	46 (38,0)	0,709
	Обнаружен Detected	6 (75,0)	2 (25,0)	
52	Не обнаружен Not detected	74 (62,2)	45 (37,8)	0,743
	Обнаружен Detected	7 (70,0)	3 (30,0)	
56	Не обнаружен Not detected	75 (63,6)	43 (36,4)	0,537
	Обнаружен Detected	6 (54,5)	5 (45,5)	

Окончание табл. 1
End of the table 1

Генотип вируса папилломы человека Human papillomavirus genotype		Коэкспрессия p16/Ki-67 p16/Ki-67 coexpression		p
		не обнаружена, n (%) not detected, n (%)	обнаружена, n (%) detected, n (%)	
58	Не обнаружен Not detected	75 (62,5)	45 (37,5)	1,000
	Обнаружен Detected	6 (66,7)	3 (33,3)	
59	Не обнаружен Not detected	78 (61,9)	48 (38,1)	0,294
	Обнаружен Detected	3 (100,0)	0 (0,0)	
66	Не обнаружен Not detected	80 (63,5)	46 (36,5)	0,555
	Обнаружен Detected	1 (33,3)	2 (66,7)	
68	Не обнаружен Not detected	78 (63,4)	45 (36,6)	0,670
	Обнаружен Detected	3 (50,0)	3 (50,0)	
6	Не обнаружен Not detected	80 (63,5)	46 (36,5)	0,555
	Обнаружен Detected	1 (33,3)	2 (66,7)	
11	Не обнаружен Not detected	78 (61,9)	48 (38,1)	0,294
	Обнаружен Detected	3 (100,0)	0 (0,0)	

Таблица 2. Оценка зависимости обнаружения коэкспрессии p16/Ki-67 при моно- и полиинфицировании вирусом папилломы человека
Table 2. Evaluation of the dependence of the detection of p16/Ki-67 expression in human papillomavirus mono- and polyinfection

Инфицирование вирусом папилломы человека Human papillomavirus infection	Коэкспрессия p16/Ki-67 p16/Ki-67 coexpression		p
	не обнаружена, n (%) not detected, n (%)	обнаружена, n (%) detected, n (%)	
Моноинфекция Monoinfection	36 (53,7)	31 (46,3)	0,837
Полиинфекция Polyinfection	19 (55,9)	15 (44,1)	

в зависимости от типа ВПЧ (табл. 1). Коэкспрессия p16/Ki-67 присутствовала в 70 и 66,7 % случаев при выявлении 18-го ($p = 0,039$) и 31-го генотипов ($p = 0,055$). В случаях инфицирования не 16-м генотипом ВПЧ отсутствие двойного окрашивания p16/Ki-67 обнаружено в 70,7 % случаев ($p = 0,014$). Шансы выявления коэкспрессии p16/Ki-67 при наличии 16-го генотипа выше в 2,522 раза по сравнению с образцами, где он не был выявлен (различия шансов статистически значимые, 95 % доверительный интервал (ДИ) 1,198–5,306). Шансы выявления двойного окрашивания p16/Ki-67 при наличии 18-го и 31-го генотипов выше в 4,439 и 3,850 раза соответственно (различия шансов статистически значимые, 95 % ДИ 1,090–18,080 и 1,093–13,567).

Не обнаружено статистически значимых отличий в частоте выявления коэкспрессии p16/Ki-67

в зависимости от моно- или коинфекции несколькими генотипами вируса (табл. 2).

Медиана вирусной нагрузки была выше при обнаружении двойного окрашивания p16/Ki-67 и составила 6,21 (5,62–6,88) lg по сравнению с медианой при отсутствии коэкспрессии – 5,02 (3,13–6,08) lg. Различия статистически значимы ($p < 0,001$).

В группе CIN 2+ истинно положительный результат иммуноцитохимического метода обнаружен в 39 случаях, в 14 случаях результат являлся ложноотрицательным. В группах контроля коэкспрессия p16/Ki-67 не была выявлена (42 случая истинно отрицательного результата). К ложноположительным результатам отнесены случаи определения коэкспрессии в группе LSIL ($n = 9$). Таким образом, показатели эффективности метода для диагностики CIN 2+ составили: чувствительность – 73,58 % (95 % ДИ 59,67–84,74), специфичность – 82,35 % (95 % ДИ 69,13–91,60), положительная прогностическая ценность результата – 81,25 % (95 % ДИ 70,10–88,90), отрицательная прогностическая ценность результата – 75,00 % (95 % ДИ 65,29–82,72).

В группе CIN 2+ истинно положительный результат выявления ДНК ВПЧ методом полимеразной цепной реакции обнаружен в 50 случаях, в 3 случаях результат являлся ложноотрицательным. В 21 случае результаты являлись истинно отрицательными и в 53 случаях – ложноположительными (группа контроля и CIN 1). Таким образом, показатели эффективности метода для диагностики CIN 2+ составили: чувствительность – 94,34 % (95 % ДИ 84,34–98,82), специфичность – 28,38 % (95 % ДИ 18,50–40,05), положительная прогностическая ценность результата – 48,54 % (95 % ДИ 44,62–52,49), отрицательная прогностическая ценность результата – 87,50 (95 % ДИ 68,76–95,70).

Обсуждение

Согласно клиническим рекомендациям «Цервикальная интраэпителиальная неоплазия, эрозия и эктропион шейки матки», пациенткам с цитологическими заключениями ASC-US (атипичные клетки неясного значения) и LSIL с целью уточнения поражения назначается ВПЧ-тестирование [17]. Данная тактика может приводить к получению ложноположительных результатов в связи с высокой частотой распространенности ВПЧ-инфекции. Результаты исследований показывают, что иммуноцитохимический метод определения коэкспрессии p16/Ki-67 имеет высокие показатели чувствительности и специфичности и может быть использован как дополнительный метод подтверждения предракового и ракового поражения шейки матки с целью сокращения числа направлений на биопсию, а также для дифференциальной диагностики степени поражения [18, 19].

Согласно результатам нашего исследования, коэкспрессия p16/Ki-67 обнаружена в 26,5 % ($n = 9$) и 73,6 % ($n = 39$) случаев LSIL и HSIL+, верифицированных гистологически. Результаты других исследований показывают, что положительная коэкспрессия p16/Ki-67 прямо пропорционально коррелирует с цитологическими и гистологическими заключениями о наличии диспластических процессов в шейке матки и преимущественно связана с поражением высокой степени. В 3-летнем когортном исследовании L. L. Yu и соавт. коэкспрессия p16/Ki-67 для группы LSIL составила 56,5 %, для группы HSIL+ – 80 % [20]. Результаты работ других авторов показывают, что при LSIL и HSIL+ коэкспрессия p16/Ki-67 обнаруживается в 23,9–33,3 и 87,5–100 % соответственно, что согласуется с результатами нашего исследования [21, 22]. Вариабельность в частоте обнаружения двойного окрашивания p16/Ki-67 может быть связана с объемом выборки и возрастом обследуемых пациенток.

Частота обнаружения коэкспрессии p16/Ki-67 различалась в зависимости от степени поражения: при CIN 1 коэкспрессия p16/Ki-67 имела место в 26,5 % ($n = 9$) случаев, при CIN 2 – в 59,3 % ($n = 16$), при CIN 3 – в 88,2 % ($n = 15$), при плоскоклеточной карциноме – в 88,9 % ($n = 8$). В исследованиях других авторов коэкспрессия p16/Ki-67 в образцах CIN 2 составила от 70,8 до 100 %, в образцах CIN 3 – от 86,5 до 100 %, у пациенток с карциномой шейки матки – от 87,5 до 100 % [4, 21, 23–25]. Расхождения в результатах обнаружения положительного двойного окрашивания p16/Ki-67 у пациенток с CIN 2 могут быть связаны с потенциалом регресса данного поражения. Согласно проведенному рандомизированному исследованию, 44,1 % поражений CIN 2 регрессировали без лечения в течение 12 мес [26]. При отсутствии коэкспрессии p16/Ki-67 у пациенток с CIN 2 в возрасте до 25 лет может быть применимо динамическое наблюдение с использованием цитологического контроля, ВПЧ-тестирования и кольпоскопии 1 раз в 6 мес в течение 2 лет [17].

В нашей работе обнаружены статистически значимые отличия в частоте положительного двойного окрашивания p16/Ki-67 в зависимости от типа ВПЧ. Коэкспрессия чаще выявлялась при наличии ВПЧ 16, 18 и 31-го генотипов, что согласуется с результатами предыдущих исследований. Другие авторы также отмечают, что двойное окрашивание p16/Ki-67 чаще определяется у пациенток с ВПЧ высокого канцерогенного риска – ВПЧ 16-го и 18-го типа – по сравнению со случаями инфицирования другими генотипами ВПЧ [4, 27]. Это может быть связано с более высоким канцерогенным потенциалом онкопротеинов ВПЧ 16/18 [28]. При этом не выявлено разницы в обнаружении коэкспрессии p16/Ki-67 в зависимости от количества выявляемых генотипов вируса.

Медиана вирусной нагрузки была выше при обнаружении двойного окрашивания p16/Ki-67 (6,21 lg ДНК ВПЧ на 100 тыс. клеток) по сравнению с медианой при отсутствии коэкспрессии (5,02 lg ДНК ВПЧ на 100 тыс. клеток). Такая корреляция отмечалась и в исследовании Т.Н. Бебневой и Г.Б. Дикке, где более высокое значение вирусной нагрузки, равное 6,13 lg ДНК ВПЧ на 100 тыс. клеток, выявлялось при обнаружении онкомаркеров p16 и Ki-67 по сравнению с их отсутствием [29].

Согласно расчетам, в нашем исследовании чувствительность и специфичность иммуноцитохимической оценки коэкспрессии p16/Ki-67 в диагностике HSIL и карциномы шейки матки составили 73,58 и 82,35 % соответственно. В работах других авторов чувствительность метода составила от 74,9 до 92 %, специфичность — от 58 до 95,2 % [16, 18, 19]. Показатель чувствительности выявления ДНК ВПЧ методом полимеразной цепной реакции для диагностики поражений CIN 2+ был выше по сравнению с оценкой коэкспрессии p16/Ki-67 и составил 94,34 %, однако специфичность — значительно ниже (28,38 %). Низкие показатели специфичности метода обнаружения ДНК ВПЧ показаны и в других исследованиях и составили 32 и 35 % [18]. Стоит отметить, что вариабельность

показателей эффективности методов может быть обусловлена эпидемиологическими особенностями распространенности ВПЧ-инфекции, методиками проведения иммуноцитохимического исследования и ВПЧ-тестирования, а также исследуемого количества генотипов вируса.

Наше исследование имеет ограничения, поскольку является одноцентровым, а также ввиду его ретроспективного дизайна и небольшой выборки пациенток. Тем не менее длительное хранение клеточного материала в соответствии с рекомендациями, предоставленными производителями консервирующей среды для жидкостной цитологии, позволило сохранить его целостность и провести иммуноцитохимическое исследование без потери качества анализируемых образцов.

Выводы

Положительная коэкспрессия p16/Ki-67 чаще встречается при выраженных интраэпителиальных поражениях шейки матки и наличии ВПЧ 16, 18 и 31-го генотипов. Иммуноцитохимический метод оценки коэкспрессии p16/Ki-67 более специфичен в диагностике предраковых и раковых заболеваний шейки матки по сравнению с обнаружением ДНК ВПЧ.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Global strategy to accelerate the elimination of cervical cancer as a public health problem. Geneva: World Health Organization, 2020. Available at: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240014107>.
2. Hashimoto K., Kumagai T., Nomura K. et al. Validation of an on-chip p16ink4a/Ki-67 dual immunostaining cervical cytology system using microfluidic device technology. *Sci Rep* 2023;13(1):17052. DOI: 10.1038/s41598-023-44273-6
3. Gameiro S.F., Mymryk J.S. Special issue "Human papillomavirus clinical research: From infection to cancer". *J Clin Med* 2022;11(14):4225. DOI: 10.3390/jcm11144225
4. Yu L., Fei L., Liu X. et al. Application of p16/Ki-67 dual-staining cytology in cervical cancers. *J Cancer* 2019;10(12):2654–60. DOI: 10.7150/jca.32743
5. Zhang R., Ge X., You K. et al. p16/Ki-67 dual staining improves the detection specificity of high-grade cervical lesions. *J Obstet Gynaecol Res* 2018;44(11):2077–84. DOI: 10.1111/jog.13760
6. Sun H., Shen K., Cao D. Progress in immunocytochemical staining for cervical cancer screening. *Cancer Manag Res* 2019;11:1817–27. DOI: 10.2147/CMAR.S195349
7. Peeters E., Wentzensen N., Bergeron C. et al. Meta-analysis of the accuracy of p16 or p16/Ki-67 immunocytochemistry versus HPV testing for the detection of CIN 2+/CIN 3+ in triage of women with minor abnormal cytology. *Cancer Cytopathol* 2019;127(3):169–80. DOI: 10.1002/cncy.22103
8. Qian Q.P., Zhang X., Ding B. et al. Performance of P16/Ki-67 dual staining in triaging hr-HPV-positive population during cervical cancer screening in the younger women. *Clin Chim Acta* 2018;483:281–5. DOI: 10.1016/j.cca.2018.05.023
9. Zhu Y., Ren C., Yang L. et al. Performance of p16/Ki-67 immunostaining, HPV E6/E7 mRNA testing, and HPV DNA assay to detect high-grade cervical dysplasia in women with ASCUS. *BMC Cancer* 2019;19(1):271. DOI: 10.1186/s12885-019-5492-9
10. Wu Y., Zhao J., Hu J. et al. Significance of p16/Ki-67 double immunocytochemical staining in cervical cytology ASCUS, LSIL, and ASC-H. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi* 2017;52(11):734–9. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0529-567X.2017.11.004
11. Zhao S., Zhao X., Hu S. et al. Distribution of high-risk human papillomavirus genotype prevalence and attribution to cervical precancerous lesions in rural North China. *Chin J Cancer Res* 2019;31(4):663–72. DOI: 10.21147/j.issn.1000-9604.2019.04.10
12. Sakamoto J., Kamiura S., Okayama K. et al. Single type infection of human papillomavirus as a cause for high-grade cervical intraepithelial neoplasia and invasive cancer in Japan. *Papillomavirus Res* 2018;6:46–51. DOI: 10.1016/j.pvr.2018.10.001
13. Karuri A.R., Kashyap V.K., Yallapu M.M. et al. Disparity in rates of HPV infection and cervical cancer in underserved US populations. *Front Biosci (Schol Ed)* 2017;9(2):254–69. DOI: 10.2741/s486
14. Jiang M.Y., Wu Z., Li T. et al. Performance of HPV genotyping combined with p16/Ki-67 in detection of cervical precancer and cancer among HPV-positive Chinese women. *Cancer Prev Res (Phila)* 2020;13(2):163–72. DOI: 10.1158/1940-6207.CAPR-19-0144
15. Xu H.H., Lin A., Chen Y.H. et al. Prevalence characteristics of cervical human papillomavirus (HPV) genotypes in the Taizhou area, China: A cross-sectional study of 37,967 women from the general population. *BMJ Open* 2017;7(6):e014135. DOI: 10.1136/bmjopen-2016-014135

16. Li Y., Wang H., Zhang Y. et al. Correlation between multi-type human papillomavirus infections and viral loads and the cervical pathological grade. *Int J Gynaecol Obstet* 2021;152(1):96–102. DOI: 10.1002/ijgo.13406
17. Цервикальная интраэпителиальная неоплазия, эрозия и эктропион шейки матки. Клинические рекомендации Минздрава России, 2024. Cervical intraepithelial neoplasia, erosion and ectropion of the cervix. Clinical guidelines of the Ministry of Health of Russia, 2024. (In Russ.).
18. Sun M., Shen Y., Ren M.-L. et al. Meta-analysis on the performance of p16/Ki-67 dual immunostaining in detecting high-grade cervical intraepithelial neoplasm. *J Cancer Res Ther* 2018;14(Suppl):S587–93. DOI: 10.4103/0973-1482.183216
19. Ebisch R.M., van der Horst J., Hermesen M. et al. Evaluation of p16/Ki-67 dual-stained cytology as triage test for high-risk human papillomavirus-positive women. *Mod Pathol* 2017;30(7):1021–31. DOI: 10.1038/modpathol.2017.16
20. Yu L.L., Guo H.Q., Lei X.Q. et al. p16/Ki-67 co-expression associates high risk human papillomavirus persistence and cervical histopathology: A 3-year cohort study in China. *Oncotarget* 2016;7(40):64810–9. DOI: 10.18632/oncotarget.11705
21. Gothwal M., Nalwa A., Singh P. et al. Role of cervical cancer biomarkers p16 and Ki-67 in abnormal cervical cytological smear. *J Obstet Gynaecol India* 2021;71(1):72–7. DOI: 10.1007/s13224-020-01380-y
22. Han Q., Guo H., Geng L. et al. p16/Ki-67 dual-stained cytology used for triage in cervical cancer opportunistic screening. *Chin J Cancer Res* 2020;32(2):208–17. DOI: 10.21147/j.issn.1000-9604.2020.02.08
23. Das D., Sengupta M., Basu K. et al. Role of p16/Ki-67 dual immunostaining in detection of cervical cancer precursors. *J Cytol* 2018;35(3):153–8. DOI: 10.4103/JOC.JOC_4_17
24. Zhang S.K., Jia M.M., Zhao D.M. et al. Evaluation of p16/Ki-67 dual staining in the detection of cervical precancer and cancer in China. *Cancer Epidemiol* 2019;59:123–8. DOI: 10.1016/j.canep.2018.12.013
25. El-Zein M., Gotlieb W., Gilbert L. et al. Dual staining for p16/Ki-67 to detect high-grade cervical lesions: Results from the Screening Triage Ascertain Intraepithelial Neoplasia by Immunostain Testing study. *Int J Cancer* 2021;148(2):492–501. DOI: 10.1002/ijc.33250
26. Guedes A.C., Zeferino L.C., Syrjänen K.J. et al. Short-term outcome of cervical intraepithelial neoplasia grade 2: Considerations for management strategies and reproducibility of diagnosis. *Anticancer Res* 2010;30(6):2319–23.
27. Prigenzi K.C.K., Heinke T., Salim R.C. et al. Dual p16 and Ki-67 expression in liquid-based cervical cytological samples compared to pap cytology findings, biopsies, and HPV testing in cervical cancer screening: A diagnostic accuracy study. *Acta Cytol* 2018;62(2):104–14. DOI: 10.1159/000487504
28. Bonde J.H., Sandri M.-T., Gary D.S. et al. Clinical utility of human papillomavirus genotyping in cervical cancer screening: A systematic review. *J Low Genit Tract Dis* 2020;24(1):1–13. DOI: 10.1097/LGT.0000000000000494
29. Бебнева Т.Н., Дикке Г.Б. Прогностическое значение экспрессии белков Ki-67 и p16 у беременных женщин, инфицированных ВПЧ, в оценке течения интраэпителиальных поражений шейки матки. *Практическая медицина* 2020;18(6):24–9. Bebneva T.N., Dikke G.B. Prognostic value of Ki-67 and p16 protein expression in pregnant women infected with HPV in assessing the course of intraepithelial lesions of the cervix. *Practicheskaya meditsina = Practical Medicine* 2020;18(6):24–9. (In Russ.).

Вклад авторов

Е.А. Артемьева, И.С. Южакова: сбор и анализ полученных данных, написание статьи;
 М.И. Пахарукова: концепция и дизайн исследования, сбор и анализ полученных данных, написание статьи;
 Ю.В. Цуканова, Н.В. Топоркова, И.А. Трухина, Г.В. Лёшкина, Е.Е. Лысак: сбор и анализ полученных данных;
 Ю.Г. Лагерева: редактирование статьи.

Authors' contributions

E.A. Artemyeva, I.S. Yuzhakova: data collection and analysis, writing the article;
 M.I. Pakharukova: conception and design of the study, data collection and analysis, writing the article;
 Yu.V. Tsukanova, N.V. Toporkova, I.A. Trukhina, G.V. Lyoshkina, E.E. Lysak: data collection and analysis;
 Yu.G. Lagereva: editing the article.

ORCID авторов / ORCID of authors

Е.А. Артемьева / E.A. Artemyeva: <https://orcid.org/0009-0004-1917-7241>
 И.С. Южакова / I.S. Yuzhakova: <https://orcid.org/0000-0002-6184-1028>
 М.И. Пахарукова / M.I. Pakharukova: <https://orcid.org/0000-0001-6019-3463>
 Ю.В. Цуканова / Yu.V. Tsukanova: <https://orcid.org/0009-0007-9438-7646>
 Ю.Г. Лагерева / Yu.G. Lagereva: <https://orcid.org/0000-0001-8211-0753>
 Г.В. Лёшкина / G.V. Lyoshkina: <https://orcid.org/0000-0002-7999-5148>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Funding. The study was performed without external funding.

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики. Пациентки подписывали добровольное информированное согласие на обследование. Исследование носило ретроспективный характер.

Compliance with patient rights and principles of bioethics. The patients signed voluntary informed consent for the examination. The study was retrospective.

Статья поступила: 01.04.2025. Принята к публикации: 28.04.2025. Опубликовано онлайн: 31.07.2025.

Article submitted: 01.04.2025. Accepted for publication: 28.04.2025. Published online: 31.07.2025.