

Статья поступила в редакцию 04.04.2020 г.

Клинышкова Т.В., Миронова О.Н.  
Омский государственный медицинский университет,  
БУЗОО «Клинический диагностический центр»,  
г. Омск, Россия

## СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ ПРИ CIN, АССОЦИИРОВАННЫХ С ВПЧ

**Цель исследования** – определить частоту коэкспрессии p16/Ki-67 в цервикальном эпителии больных с ВПЧ-ассоциированными CIN различной степени в сравнении с пациентками без цервикальной патологии по данным иммуноцитохимического исследования.

**Материалы и методы.** В исследование включены 62 женщины с цервикальной ВПЧ-инфекцией и 13 женщин группы контроля. Пациентки с CIN1 составили 1-ю основную группу (n = 21), женщины с CIN2-CIN3 – 2-ю основную группу (n = 26), группу сравнения составили пациентки с латентной ВПЧ-инфекцией (n = 15). Методы исследования: жидкостная цитология, кольпоскопическое, гистологическое исследование; методы определения ДНК ВПЧ ВР; иммуноцитохимическое исследование для определения двойного окрашивания маркеров p16/Ki-67, статистический анализ.

**Результаты.** На фоне ВПЧ-инфекции, как в 1-й основной группе пациенток с CIN1, так и в группе сравнения пациенток с NILM, зафиксированы единичные случаи двойного окрашивания маркеров p16 и Ki-67 без существенных различий между группами (p = 0,44). Во 2-й основной группе пациенток с CIN2, CIN3 коэкспрессия p16 и Ki-67 была отмечена у каждой второй женщины, она доминировала относительно 1-й группы и группы сравнения (p = 0,003, p = 0,005 соответственно). При отсутствии ВПЧ в группе контроля установлено отсутствие двойного окрашивания маркеров.

**Заключение.** Не установлено различий коэкспрессии при CIN1 в сравнении с латентной ВПЧ-инфекцией и группой контроля. При CIN 2+, ассоциированной с ВПЧ ВР, в два раза повышена частота иммуноцитохимического подтверждения экспрессии p16/Ki-67 в сравнении с CIN1, что повышает риск прогрессирования предрака. При выборе дифференцированной тактики ведения пациенток с CIN на фоне ВПЧ необходимо учитывать данные пролиферативного потенциала цервикального эпителия.

**Ключевые слова:** CIN; ВПЧ; CINtec PLUS; p16ink4α; Ki-67

**Klinyshkova T.V., Mironova O.N.**

Omsk State Medical University,  
Clinical Diagnostic Center, Omsk, Russia

### CURRENT APPROACHES FOR HPV-ASSOCIATED CIN

**The aim of the study** was to determine the frequency of expression of p16/Ki-67 in the cervical epithelium of patients with HPV-associated CIN of various degrees according to immunocytochemical studies in comparison with patients without cervical pathology.

**Materials and methods.** The study included 62 women with cervical HPV infection and 13 women in the control group. Patients with CIN 1 formed the 1st main group (n = 21), women with CIN2-CIN3 – the 2nd main group (n = 26), and the comparison group consisted of patients with latent HPV infection (n = 15). Research methods: liquid cytology, colposcopic, histological research; methods for determining HPV BP DNA; immunocytochemical research to determine the double staining of p16/Ki-67 markers, statistical analysis.

**Results.** Against the background of HPV infection, both in the 1st main group of patients with CIN1 and in the comparison group of patients with NILM, isolated cases of double staining of P16 and Ki-67 markers were recorded without significant differences between the groups (p = 0.44). In the 2nd main group of patients with CIN2, CIN3, co-expression of p16 and Ki-67 was observed in every second woman, it dominated relative to the 1st group and the comparison group (p = 0.003, p = 0.005, respectively). In the absence of HPV, the control group found that there was no double staining of markers.

**Conclusion.** There were no differences in coexpression in CIN1 compared to latent HPV infection and the control group. When CIN 2+ is associated with HPV BP, the frequency of immunocytochemical confirmation of P16/Ki-67 expression is increased compared to CIN1, which increases the risk of precancerous progression. When choosing a differentiated management strategy for patients with CIN on the background of HPV, it is necessary to take into account the data of the proliferative potential of the cervical epithelium.

**Key words:** CIN; HPV; CINtec PLUS; p16ink4α; Ki-67

Несмотря на достижения цервикологии, отмечается ежегодное увеличение пациенток, страдающих раком шейки матки (РШМ) [1]. Распространенность РШМ выросла с 110,3 в 2008 г.

до 123,7 на 100 тыс. населения в 2018 г. в масштабах России. Заболеваемость РШМ находится на второй позиции в структуре раков гениталий в стране [2].

#### Корреспонденцию адресовать:

КЛИНЫШКОВА Татьяна Владимировна,  
644099, г. Омск, ул. Ленина, д. 12,  
ФГБОУ ВО ОмГМУ Минздрава России.

Тел: 8 (3812) 23-02-93, E-mail: klin\_tatyana@mail.ru

#### Информация для цитирования:

Клинышкова Т.В., Миронова О.Н. Современные подходы при CIN, ассоциированных с ВПЧ //Мать и Дитя в Кузбассе. 2020. №2(81). С. 15-19.

DOI: 10.24411/2686-7338-2020-10016

В рамках вторичной профилактики РШМ существенную роль играет совершенствование методов диагностики папилломавирусной инфекции, правильная клиническая интерпретация результатов обследования и своевременное адекватное лечение пациенток с цервикальным предраком. Активная разработка профилактических стратегий, основанная на ВПЧ-детекции, углубленное изучение ВПЧ-генотипирования, маркеров пролиферации, метилирования при цервикальной ВПЧ-инфекции, их внедрение в практику побуждают к анализу клинических данных [3-5].

Среди прогностических маркеров риска большое внимание уделяется p16ink4a (или p16) и Ki-67 [6, 7]. Белок p16 осуществляет контроль клеточного цикла, относится к ингибиторам циклинзависимых киназ, которые тормозят пролиферацию. Ki-67 является белком клеточной пролиферации и экспрессируется в течение всех активных фаз клеточного цикла. При персистирующем течении инфекции, вызванной ВПЧ ВР, уровень экспрессии p16 возрастает, способствуя усилению пролиферации цервикального эпителия. Признано, что p16/Ki67 – надежный инструмент стратификации риска среди ВПЧ-положительных женщин. В пользу информативности p16 и Ki-67 свидетельствуют следующие факты. При обследовании на p16 (без Ki-67) женщин 35-60 лет риск CIN3+ в течение 3 лет был 4,7 % среди ВПЧ+/p16-положительных в сравнении с 0,8 % ВПЧ+/p16-негативных женщин в рамках NTCC-исследования [6]. Кроме того, 83,7 % женщин с последующим развитием CIN3+ были исходно p16-положительными. Гиперэкспрессию p16 называют маркером CIN2 и связывают с высоким риском CIN3+ в течение 3 лет у ВПЧ-положительных женщин, особенно в возрасте 35-60 лет.

Диагностическое значение в последние годы имеет не только изолированное определение p16 или Ki-67, а одновременное обнаружение p16, Ki-67 (коэкспрессия), что проявляется двойным окрашиванием (dual stain): коричневой цитоплазмой (p16) и красным ядром (Ki-67). Так, в крупномасштабном исследовании ATHENA (n = 7727) было показано, что для выявления CIN3+ чувствительность метода p16/Ki-67 была значительно выше Pap-цитологии (74,9 % против 51,9 %) [8]. Учитывая опыт предыдущих исследований, оценка коэкспрессии биомаркеров в сравнительном контексте представляет интерес.

**Цель исследования** – определить частоту коэкспрессии p16/Ki-67 в цервикальном эпителии больных с ВПЧ-ассоциированными CIN различной степени в сравнении с пациентками без цервикальной патологии по данным иммуноцитохимического исследования.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование включены 62 женщины с цервикальной ВПЧ-инфекцией (средний возраст – 26,4 ± 6,13 лет), среди которых основную группу составили 47 пациенток с верифицированной CIN, ассоциированной с ВПЧ ВР. Пациентки с CIN1 составили 1-ю основную группу (n = 21), женщины с CIN2-CIN3 составили 2-ю основную группу (n = 26). Выделены группа сравнения, которую составили пациентки с латентной ВПЧ-инфекцией (n = 15), и группа контроля (n = 13).

Критериями включения в 1-ю основную группу явились: репродуктивный возраст, наличие положительного цервикального ВПЧ-теста, LSIL по данным цитологического исследования, гистологическая верификация CIN1, иммуноцитохимическое исследование цервикального материала на p16/Ki-67. Критериями включения во 2-ю основную группу явились: репродуктивный возраст, наличие положительного цервикального ВПЧ-теста, наличие SIL по данным цитологического исследования, гистологическая верификация CIN2, CIN3, иммуноцитохимическое исследование цервикального материала на p16/Ki-67. Критерии включения в группу сравнения: репродуктивный возраст, положительный ВПЧ-тест с типированием на 14 типов, NILM по данным цитологического исследования и отсутствие аномальных кольпоскопических картин, иммуноцитохимическое исследование цервикального материала на p16/Ki-67. Критерии включения в группу контроля: репродуктивный возраст, наличие отрицательного ВПЧ-теста, NILM по данным цитологического исследования, отсутствие цервикальной патологии. Информированное согласие пациенток являлось обязательным условием для участия в исследовании. Критерии исключения: несоответствующий возраст больных, беременность и лактация, рак шейки матки, отказ от участия в исследовании.

Комплексная диагностика включала традиционные методы [цитологическое исследование (жидкостная цитология – Sure Path), кольпоскопическое исследование; гистологическое исследование цервикальных биоптатов и эндоцервикальных образцов] и дополнительные методы [метод ПЦР с гибридно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени использовался для дифференцированного выявления и количественного определения ДНК ВПЧ 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 и 59]. Иммуноцитохимическое исследование для определения двойного окрашивания маркеров p16/Ki-67 (тест-система «CINtec® PLUS Kit»).

Статистический анализ данных проводился с применением пакета STATISTICA-6, пакета EpiInfo

### Сведения об авторах:

КЛИНИШКОВА Татьяна Владимировна, доктор мед. наук, профессор, профессор кафедры акушерства и гинекологии ДПО, ФГБОУ ВО ОмГМУ Минздрава России, г. Омск, Россия. E-mail: klin\_tatyana@mail.ru

МИРОНОВА Ольга Николаевна, врач клинической лабораторной диагностики, патоморфологический отдел, БУЗОО КДЦ, г. Омск, Россия. E-mail: mironova63@gmail.com

(версия 3.3), возможностей MS Excel. Проверка нормальности распределения количественных признаков проводилась по критерию Шапиро-Уилки. Во всех процедурах статистического анализа критический уровень значимости  $p$  принимался равным 0,05. Данные в тексте представлены в виде  $M \pm SD$ , где  $M$  – средняя арифметическая,  $SD$  – стандартное отклонение средней. Для сравнения качественных показателей в группах использовался точный критерий Фишера.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

В соответствии с критериями включения, дана оценка экспрессии биомаркеров p16ink4 $\alpha$  и Ki-67 цервикальных образцов 75 пациенток: с CIN1 (средний возраст –  $24,9 \pm 3,77$  лет), CIN2-3 (средний возраст –  $29,1 \pm 7,22$  лет), с латентной формой ВПЧ-инфекции (средний возраст –  $25,7 \pm 5,63$  лет) и группы контроля (средний возраст –  $25,9 \pm 6,97$  лет).

Позитивный тест двойного окрашивания биомаркеров посредством иммуноцитохимического исследования материала отражал факт коэкспрессии p16/Ki-67 (табл.).

В группе контроля у пациенток без цервикальной патологии, негативным ВПЧ-тестом и NILM, по данным цитологического исследования, установлено отсутствие двойного окрашивания маркеров. В группе сравнения у женщин с NILM и отсутствием аномальных кольпоскопических картин на фоне ВПЧ тест явился положительным в одном случае.

В 1-й основной группе и группе сравнения зафиксированы единичные случаи двойного окрашивания маркеров ( $p = 0,44$ ). Во 2-й основной группе коэкспрессия p16 и Ki-67 была отмечена у каждой второй женщины, она доминировала относительно 1-й группы (10 %) и группы сравнения (6,7 %). Сравнительный анализ позволил установить отсутствие различий в коэкспрессии p16/Ki-67 при ВПЧ-ассоциированной CIN1 относительно латентной ВПЧ-инфекции и женщин без ВПЧ и

цервикальной патологии. CIN2-3 характеризовалась статистически значимым преобладанием уровня биомаркеров не только в сравнении с латентной инфекцией, но и с CIN1 ( $p = 0,005$ ,  $p = 0,003$  соответственно).

Если ВПЧ-тест отражает факт наличия вируса, цитологическое изучение – состояние эпителиальных клеток на момент исследования, то оценка уровня p16/Ki-67 детализирует уровень пролиферативной активности эпителия шейки матки. Уровень биомаркеров можно оценивать не только в эпителиальных клетках при проведении иммуноцитохимии, но и в ткани экзоцервикса биоптата посредством иммуногистохимии. По нашим данным предыдущего иммуногистохимического исследования экспрессии одного маркера – p16ink4 $\alpha$  – среди пациенток с ВПЧ-ассоциированными поражениями высокой степени (CIN2-CIN3) выявлено трехкратное повышение величины иммуногистохимического индекса p16ink4 $\alpha$  в эпителии экзоцервикса (по интенсивности реакции, протяженности экспрессии и наличию ядерной метки) в сравнении с поражениями низкой степени (CIN1) [5]. Одновременное определение двух маркеров имеет преимущества как с позиции более высокой информативности, так и неинвазивности забора материала для иммуноцитохимического исследования.

Оценка уровня пролиферативного потенциала эпителия шейки матки на основании одновременно изученной экспрессии двух маркеров p16/Ki-67 позволяет прогнозировать течение папилломавирусной инфекции. Даже при CIN1, как мы видим по результатам данного исследования, могут встречаться случаи (около 10 %) более активного течения заболевания. Соответственно и тактика ведения таких пациенток должна быть более активной и возможность выжидательной тактики в течение 24 месяцев представляет риск ввиду трансформации в CIN2 еще до отведенного срока обследования по алгоритмам. Аналогично для пациенток с CIN2, допустимость консервативного ведения которых остается дискуссионной. Возможность консервативной тактики должна быть оценена с учетом

Таблица  
Сравнительная характеристика коэкспрессии p16/Ki-67 у пациенток с ВПЧ-ассоциированной CIN  
Table  
Comparative characteristics of coexpression of p16/Ki-67 in patients with HPV-associated CIN

Показатели	1-я основная группа (n = 21) (1)	2-я основная группа (n = 26) (2)	Группа сравнения (n = 15) (3)	Группа контроля (n = 13) (4)	$\phi$ 1,2	$\phi$ 1,3	$\phi$ 2,3	$\phi$ 2,4
					$p$ 1,2	$p$ 1,3	$p$ 2,3	$p$ 2,4
Экспрессия p16/Ki-67	2	13	1	0	0,186 <b>0,003</b>	0,014 0,44	0,193 <b>0,005</b>	0,250 <b>0,001</b>

### Information about authors:

KLINYSHKOVA Tatyana Vladimirovna, doctor of medical sciences, professor, professor of the department of obstetrics and gynecology of further professional education, Omsk State Medical University, Omsk, Russia. E-mail: klin\_tatyana@mail.ru

MIRONOVA Olga Nikolaevna, doctor of clinical laboratory diagnostics, pathomorphological department, Clinical Diagnostic Center, Omsk, Russia. E-mail: mironova63@mail.com

состояния биомаркеров. При положительном тесте двойного окрашивания рациональной является тактика комплексного хирургического лечения. При отрицательном тесте двойного окрашивания допустим консервативный подход с учетом возраста, отсутствия персистирующей формы папилломавирусной инфекции, кольпоскопической картины, включая тип зоны трансформации, а также регулярного наблюдения и отсутствия рецидива CIN.

Данный метод оценки биомаркеров может применяться не только у пациенток с CIN с целью выбора тактики ведения, но и на этапе цервикального скрининга. По мнению ряда авторов, при первичном ВПЧ-скрининге цитологический метод двойного окрашивания рекомендуется использовать для отбора/дообследования (triage) ВПЧ-положительных пациенток, поскольку он повышает чувствительность цитологии [7-9]. ВПЧ+/p16-положительным женщинам показана немедленная кольпоскопия. Так, направление на кольпоскопию всех ВПЧ 16/18-положительных женщин, а также p16/Ki67-положительных при других генотипах ВПЧ ВР (non-16/18) позволило достичь повышения чувствительности для CIN3+, составившую 86,8 %. Учитывая очевидные преимущества, цитологический метод двойного окрашивания предлагается к внедрению в программы цервикального скрининга [10]. Мета-анализ E. Peeters и др. подтвердил, что p16 и окрашивание p16/Ki-67 более специфичны для детекции CIN2+/CIN3+ в сравнении с ВПЧ ВР тестом даже среди пациенток с начальными признаками аномальных цитологических мазков — ASC-US или LSIL [11]. Все вышесказанное свидетельствует о рациональности внедрения данного метода в клиническую практику. Внедрение новых диагностиче-

ских технологий раскрывает перспективы усовершенствования цервикального скрининга, а также лечебных подходов при CIN.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При ВПЧ-ассоциированной CIN1 отмечаются единичные случаи коэкспрессии p16/Ki-67 в цервикальном эпителии по данным позитивного иммуноцитохимического теста двойного окрашивания. Не установлено различий коэкспрессии при CIN1 в сравнении с латентной ВПЧ-инфекцией и группой контроля, что допускает возможность наблюдательной тактики в условиях противовирусного лечения. Наличие признаков коэкспрессии p16/Ki-67 диктует нецелесообразность наблюдательной тактики при CIN1.

Среди пациенток с CIN2+, ассоциированной с ВПЧ ВР, в два раза повышена частота иммуноцитохимического подтверждения экспрессии p16/Ki-67 в сравнении с пациентками с CIN1, что повышает риск прогрессирования предрака и требует активной тактики ведения с применением комплексного лечения. При отсутствии противовирусного компонента лечения и с учетом пролиферативного потенциала цервикального эпителия (по данным позитивного теста) существует риск рецидивирования CIN.

## Информация о финансировании и конфликте интересов

Исследование не имело спонсорской поддержки. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES:

1. State of cancer care in Russia in 2018 /Ed. by AD. Kaprin, VV Starinsky, and GV Petrova. M.: 2019. 236 p. Russian (Состояние онкологической помощи населению России в 2018 году /Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2019. 236 с.)
2. Klinyshkova TV, Turchaninov DV, Buyan MS. Cervical cancer in the Omsk Region: epidemiological aspects. *Obstetrics and Gynecology*. 2018; 3: 102-108. Russian (Клинышкова Т.В., Турчанинов Д.В., Буйан М.С. Эпидемиологические аспекты рака шейки матки в Омской области //Акушерство и гинекология. 2018. № 3. С. 102-108.)
3. Wentzensen N, Arbyn M, Berkhof J, Bower M, Canfell K, Einstein M et al. Eurogin 2016 Roadmap: how HPV knowledge is changing screening practice. *Int J Cancer*. 2017; 140(10): 2192-2200.
4. Pilepskaya VN. HPV-associated cervical diseases: screening, methods of examination, principles of treatment. *Gynecology*. 2019; 21(3): 6-8. Russian (Прилепская В.Н. ВПЧ-ассоциированные заболевания шейки матки: скрининг, методы обследования, принципы лечения //Гинекология. 2019. Т. 21, № 3. С. 6-8.)
5. Klinishkova TV, Karatyuk TI, Mozgovoy SI, Pritykina TV. Features of expression of P16ink4 $\alpha$  and metabolites of estradiol in HPV-associated squamous lesions of the cervix. *Questions of gynecology, obstetrics and perinatology*. 2011; 10 (2): 45-49. Russian (Клинышкова Т.В., Каратюк Т.И., Мозговой С.И., Притыкина Т.В. Особенности экспрессии p16 ink4 $\alpha$  и метаболитов эстрадиола при ВПЧ-ассоциированных плоскоклеточных поражениях шейки матки //Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. 2011. Т. 10, № 2. С. 45-49.)
6. Carozzi F, Gillio-Tos A, Confortini M, Mistro AD, Sani C, Marco LD et al. Risk of high-grade cervical intraepithelial neoplasia during follow-up in HPV-positive women according to baseline p16-INK4A results: a prospective analysis of a nested sub-study of the NTCC randomised controlled trial. *Lancet Oncol*. 2013; 14(2): 168-76.
7. Wright TC Jr, Behrens CM, Ranger-Moore J, Rehm S, Sharma A, Stoler MH, Ridder R. Triage of HPV-positive women with p16/Ki-67 dual-stained cytology: Results from a sub-study nested into the ATHENA trial. *Gynecol Oncol*. 2017; 144(1): 51-56.

8. Wentzensen N, Fetterman B, Castle PhE, Schiffman M, Wood ShN, Stiemerling E et al. p16/Ki-67 Dual Stain Cytology for Detection of Cervical Precancer in HPV-Positive Women. *Journal of the National Cancer Institute*. 2015; 107(12): djv257.
9. Gustinucci D, Giorgi Rossi P, Cesarini E, Broccolini M, Bulletti S, Carlini A et al. Use of Cytology, E6/E7 mRNA, and p16<sup>INK4a</sup>-Ki-67 to Define the Management of Human Papillomavirus (HPV)-Positive Women in Cervical Cancer Screening. *Am J Clin Pathol*. 2016; 145(1): 35-45.
10. Benevolo M, Allia E, Gustinucci D, Rollo F, Bulletti S, Cesarini E et al. Interobserver reproducibility of cytologic p16<sup>INK4a</sup> / Ki-67 dual immunostaining in human papillomavirus-positive women. *Cancer Cytopathol*. 2017; 125(3): 212-220.
11. Peeters E, Wentzensen N, Bergeron C, Arbyn M. Meta-analysis of the accuracy of p16 or p16/Ki-67 immunocytochemistry versus HPV testing for the detection of CIN2+/CIN3+ in triage of women with minor abnormal cytology. *Cancer Cytopathol*. 2019; 127(3): 169-180.

\* \* \*