

УДК: 618.146

ПИЛОТНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЭКСПРЕССИИ P16 И KI-67 У ВПЧ-ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ И ВПЧ-ОТРИЦАТЕЛЬНЫХ ПАЦИЕНТОК С ИНТРАЭПИТЕЛИАЛЬНЫМИ ПОРАЖЕНИЯМИ ШЕЙКИ МАТКИ РАЗЛИЧНОЙ СТЕПЕНИ ТЯЖЕСТИ

Насырова Алина Азатовна¹, Петровских Арина Андреевна¹, Зорников Данила Леонидович^{1,2}, Ворошилина Екатерина Сергеевна^{1,3}

¹Кафедра медицинской микробиологии и клинической лабораторной диагностики

²Лаборатория генетических и эпигенетических основ прогнозирования нарушений онтогенеза и старения человека

ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России

³ООО «Медицинский Центр «Гармония»

Екатеринбург, Россия

Аннотация

Введение. В последнее время в клиническую практику внедряется метод иммуноцитохимического определения (ИЦХ) маркеров рака шейки матки: p16 и Ki-67. p16 представляет собой супрессор опухолевого роста, белок Ki-67 является маркером пролиферации. Определение их экспрессии - потенциальный инструмент для выявления пациенток с повышенным риском развития РШМ, так как данные белки экспрессируются на ранних стадиях канцерогенеза. **Цель исследования** – оценить взаимосвязь между одновременной экспрессией онкогенных маркеров p16 и Ki-67, наличием цитологических признаков CIN и инфицированием ВПЧ. **Материал и методы.** В исследование включены 88 пациенток, проходивших лечение в Медицинском центре «Гармония» (г. Екатеринбург) в 2019-2024 гг. Пациенткам была проведена жидкостная цитология, ПЦР-исследование на 21 генотип ВПЧ, ИЦХ на экспрессию p16/Ki-67. **Результаты.** По результатам цитологического исследования NILM выявлен у 8% пациенток, LSIL – у 51%, HSIL – у 41%; по результатам ПЦР ВПЧ-инфекция диагностирована у 64% женщин. Коэкспрессию p16/Ki-67 не обнаруживали у женщин с NILM, но обнаруживали у 5 (11,1%) пациенток с LSIL и у 24 (66,7%) пациенток с HSIL. Не было выявлено связи между частотой коэкспрессии p16/Ki-67 и ВПЧ-статусом пациенток. Наличие коэкспрессии p16/Ki-67 у ВПЧ-положительных пациенток в группе HSIL не зависело от генотипа ВПЧ, количества одновременно присутствующих генотипов и вирусной нагрузки. В среднем пациентки были инфицированы 2 генотипами ВПЧ, чаще обнаруживали ВПЧ 16/39/31. **Выводы.** Совместная экспрессия p16 и Ki-67 почти исключительно выявлялась у пациенток с HSIL и не зависела от ВПЧ-статуса: среди ВПЧ-положительных пациенток с HSIL коэкспрессию p16 и Ki-67 отмечали в 70,4% случаев, среди ВПЧ-отрицательных - в 55,6%.

Ключевые слова: p16, Ki-67, HSIL, LSIL, CIN, HPV.

PILOT STUDY OF P16 AND KI-67 EXPRESSION IN HPV-POSITIVE AND HPV-NEGATIVE PATIENTS WITH CERVICAL INTRAEPITHELIAL LESIONS OF DIFFERENT DEGREES OF SEVERITY

Nasyrova Alina Azatovna¹, Petrovskikh Arina Andreevna¹, Zornikov Danila Leonidovich^{1,2}, Voroshilina Ekaterina Sergeevna^{1,3}

¹Department of Medical Microbiology and Clinical Laboratory Diagnostics

²Laboratory of Genetic and Epigenetic Bases of the Human Ontogenesis Abnormalities and Human Senescence

Ural State Medical University

³Medical Center «Garmonia»

Yekaterinburg, Russia

Abstract

Introduction. Recently, the method of immunocytochemical determination (ICC) of cervical cancer markers: p16 and Ki-67 has been introduced into clinical practice. p16 is a tumor suppressor, the Ki-67 protein is a proliferation marker. Determination of their expression is a potential tool for identifying patients with an increased risk of developing cervical cancer, since these proteins are expressed at the early stages of carcinogenesis. **The aim of this study** was to evaluate the relationship between the co-expression of oncogenic markers p16 and Ki-67, the presence of cytological features of CIN and HPV-infection. **Material and methods.** The study included 88 patients who were treated at the Medical center "Garmonia" (Yekaterinburg) in 2019-2024. The cervical samples from the patients were tested by liquid-based cytology, PCR testing for 21 HPV genotypes, and ICC testing for p16/Ki-67 expression. **Results.** According to the results of liquid-based cytology, NILM was detected in 8% of patients, LSIL – in 51%, HSIL – in 41%. Co-expression of p16/Ki-67 was not detected in women with NILM, but was detected in 5 (11.1%) patients with LSIL and 24 (66.7%) patients with HSIL. There was no relationship between the frequency of p16/Ki-67 co-expression and the HPV status of the patients. The

presence of p16/Ki-67 co-expression in HSIL HPV-positive patients did not depend on the HPV genotype, the number of simultaneously detected genotypes, or viral load. On average, patients were infected with 2 HPV genotypes; HPV 16/39/31 were the most common genotypes. **Conclusion.** Co-expression of p16 and Ki-67 was almost exclusively detected in patients with HSIL and did not depend on HPV status: among HPV-positive patients with HSIL, co-expression of p16 and Ki-67 was detected in 70.4% of cases, among HPV-negative patients - in 55.6%.
Keywords: p16, Ki-67, HSIL, LSIL, CIN, HPV.

ВВЕДЕНИЕ

Вирус папилломы человека (ВПЧ) высокого канцерогенного риска (ВКР) является основной причиной рака шейки матки (РШМ). В качестве скрининговой диагностики РШМ в Российской Федерации на сегодняшний день применяется жидкостная цитология, позволяющая выявлять предшествующие раку цервикальные интраэпителиальные неоплазии (ЦИН, Cervical Intraepithelial Neoplasia - CIN) [1]. В последнее время в клиническую практику внедряется метод иммуноцитохимического определения специфических молекулярных маркеров РШМ: p16 и Ki-67.

p16 представляет собой супрессор опухолевого роста и ингибирует циклин-зависимые киназы (CDK) 4 и 6, регулирующие переход клетки от S фазы клеточного цикла к G1 фазе [2]. Ряд исследователей пришли к выводу, что уровень экспрессии p16 зависит от группы онкогенности ВПЧ, и случаи CIN I с положительным результатом p16 с большей вероятностью переходят в CIN II/III [3]. Однако некоторые нормальные ткани шейки матки также экспрессируют p16, что ограничивает изолированное использование p16 как маркера поражений шейки матки [2].

Ядерно-локализованный белок Ki-67 является маркером пролиферации, который экспрессируется на стадиях G1, S, G2 и M клеточного цикла [2]. Иммуноположительность к Ki-67 линейно возрастает по мере повышения степени CIN. Кантия и др. обнаружили, что Ki-67 экспрессируется в 100% случаев инвазивного рака, в 75% случаев CIN2/3, только в 22% случаев CIN1, а в отсутствии дисплазии только в 11% случаев [3].

Одновременная экспрессия Ki-67 и p16 является прогностически неблагоприятным фактором с точки зрения развития РШМ, так как эти белки начинают экспрессироваться на ранних стадиях канцерогенеза. Для определения диагностической ценности данных маркеров требуются исследования по их связи со степенью поражения эпителия шейки матки и с инфицированием определенными генотипами ВПЧ.

Цель исследования – оценить взаимосвязь между коэкспрессией онкогенных маркеров p16 и Ki-67, наличием цитологических признаков CIN и инфицированием ВПЧ.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В исследование включены 88 пациенток, проходивших лечение в Медицинском центре “Гармония” (г. Екатеринбург) в 2019-2024 гг. Всем пациенткам была проведена жидкостная цитология по технологии BDCSurePath (Becton, ПЦР-исследование на наличие 21 генотипа ВПЧ (тест Квант-21, ДНК-технология, Россия), иммуноцитохимическое исследование на экспрессию p16 и Ki-67 (CINtec PLUS CITOTOLOGY, Roche, Швейцария).

Материалом для исследования являлся соскоб эпителиальных клеток цервикального канала. Выделение ДНК для ПЦР осуществляли с помощью набора Проба-НК (ДНК-технология, Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Реакцию амплификации осуществляли в амплификаторах ДТ-96 и ДТ-Прайм с использованием лицензионного программного обеспечения того же производителя.

Статистическую обработку и визуализацию данных проводили с помощью R версии 4.3.2 (сборка 2023-10-31). Нормальность распределения признаков проверяли тестом Шапиро-Уилка. В качестве средних величин при описании переменных указывали медиану с 0,25 и 0,75 перцентилями. Достоверность различий между частотными показателями оценивали двусторонним точным тестом Фишера, между количественными показателями - U тестом Манна-Уитни (тестом Уилкоксона для независимых выборок). Все различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

По результатам цитологического исследования все женщины были разделены на 3 группы. В первую группу вошли 7 женщин с нормальной цитологической картиной (NILM), во вторую группу вошли 45 пациенток с CIN низкой степени тяжести (LSIL), в третью группу - 36 женщин с CIN высокой степени тяжести (HSIL).

Результаты иммуноцитохимического исследования на p16 и Ki-67 различались в зависимости от цитологической картины. В группе NILM p16/Ki-67-негативные результаты отмечали у 1 (14,3%) из 7 женщин, p16-позитивные – у 5 (71,4%), Ki-67-позитивные – у 1 (14,3%); коэкспрессия p16/Ki-67 у пациенток данной группы не выявлена.

В группе LSIL экспрессия как минимум одного из белков была выявлена во всех пробах. Изолированную экспрессию p16 выявили у 3 (6,7%) пациенток, Ki-67 – у 37 (82,2%). Коэкспрессия p16/Ki-67 выявлена у 5 (11,1%) из 45 пациенток.

В группе HSIL достоверно чаще выявляли коэкспрессию p16/Ki-67 (24 (66,7%) из 36, $p < 0,001$). В то же время у 1 (2,8%) пациентки экспрессия p16/Ki-67 отсутствовала, у 11 (30,6%) выявили экспрессию Ki-67. Примечательно, что изолированной экспрессии p16 в данной группе не отмечали.

Для выявления связи между ВПЧ-статусом и экспрессией онкогенных маркеров в каждой из групп выделили подгруппы в зависимости от результатов ПЦР-теста на ВПЧ: NILM/ВПЧ- (n=6), NILM/ВПЧ+ (n=1), LSIL/ВПЧ- (n=17), LSIL/ВПЧ+ (n=28), HSIL/ВПЧ- (n=9), HSIL/ВПЧ+ (n=27) (рис. 1).

Достоверных различий в частоте коэкспрессии p16/Ki-67 для всех выделенных групп (NILM, LSIL или HSIL) в зависимости от наличия/отсутствия ВПЧ не выявили.

Одновременная экспрессия p16/Ki67 была связана со степенью тяжести CIN, но не связана с ВПЧ-статусом

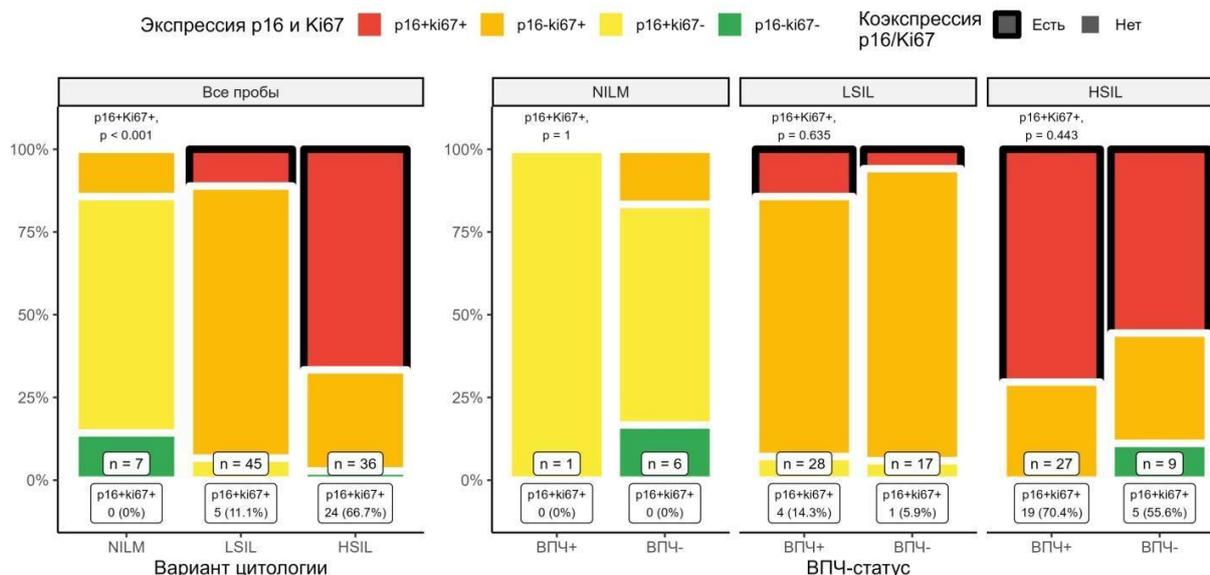


Рис. 1 Зависимость экспрессии биомаркеров p16 и Ki-67 от степени поражения эпителия шейки матки и ВПЧ-статуса (n = 88)

Далее мы предприняли попытку установить причину, по которой у части ВПЧ-положительных женщин с HSIL выявляли коэкспрессию p16/Ki-67, а у других - нет. Для проверки гипотезы о наличии связи между числом одновременно детектируемых типов вируса у ВПЧ-положительных пациенток с HSIL и коэкспрессией p16/Ki-67 провели сравнение по этому признаку (рис. 2), однако статистически значимых различий не выявили.

Количество одновременно выявляемых генотипов ВПЧ не отличалось в исследуемых группах: в среднем пациентки были одновременно инфицированы 2 генотипами ВПЧ (рис.2А). Уровень вирусной нагрузки также не отличался между исследуемыми группами. Средние показатели суммарной вирусной нагрузки составили 10^6 ($10^{4.6} - 10^{6.9}$) ГЭ/10⁵ клеток для пациенток с HSIL и коэкспрессией p16/Ki-67 и $10^{6.1}$ ($10^{5.3} - 10^{7.1}$) ГЭ/10⁵ клеток для пациенток с HSIL и отсутствием коэкспрессии p16/Ki-67 (рис. 2Б-Г).

Общая вирусная нагрузка почти исключительно определялась ВПЧ ВКР и не отличалась у p16+Ki67+ и не-p16+Ki67+ пациенток

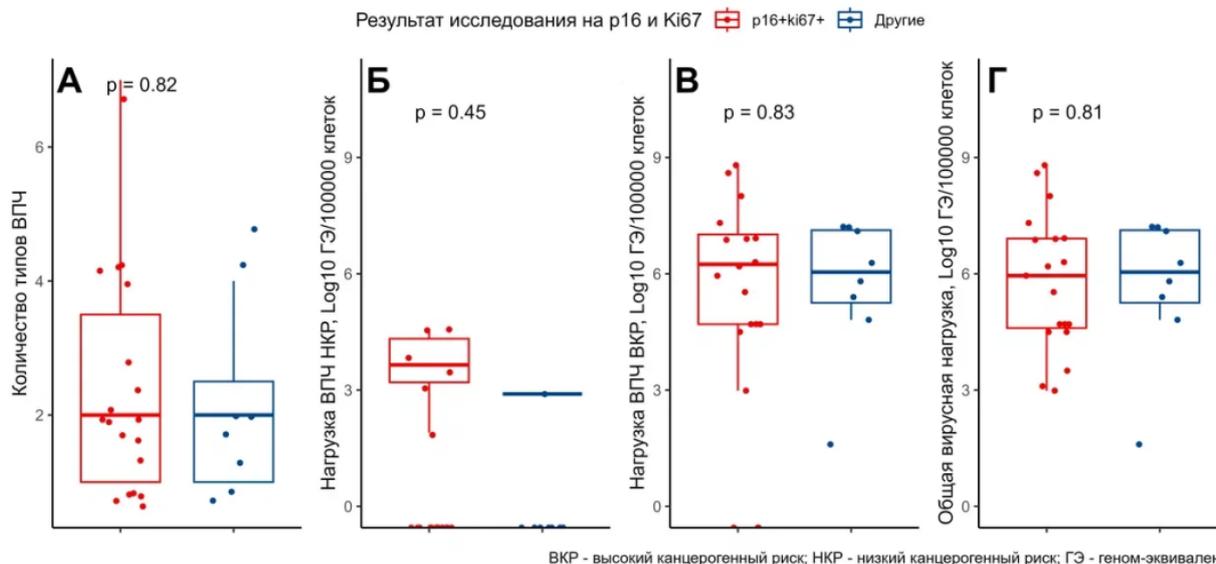


Рис.2 Количество выявляемых генотипов ВПЧ и вирусная нагрузка у ВПЧ-положительных пациенток с HSIL в зависимости от экспрессии p16 и Ki-67. А. количество типов ВПЧ; Б. нагрузка ВПЧ НКР; В. нагрузка ВПЧ ВКР; Г. общая вирусная нагрузка.

Для проверки гипотезы о наличии связи между определенными типами вируса у ВПЧ-положительных пациенток с HSIL и коэкспрессией p16/Ki-67 провели сравнение по этому признаку (рис.3), однако достоверных различий также не выявили.

Статистически значимых различий по частоте выявления отдельных генотипов ВПЧ получено не было

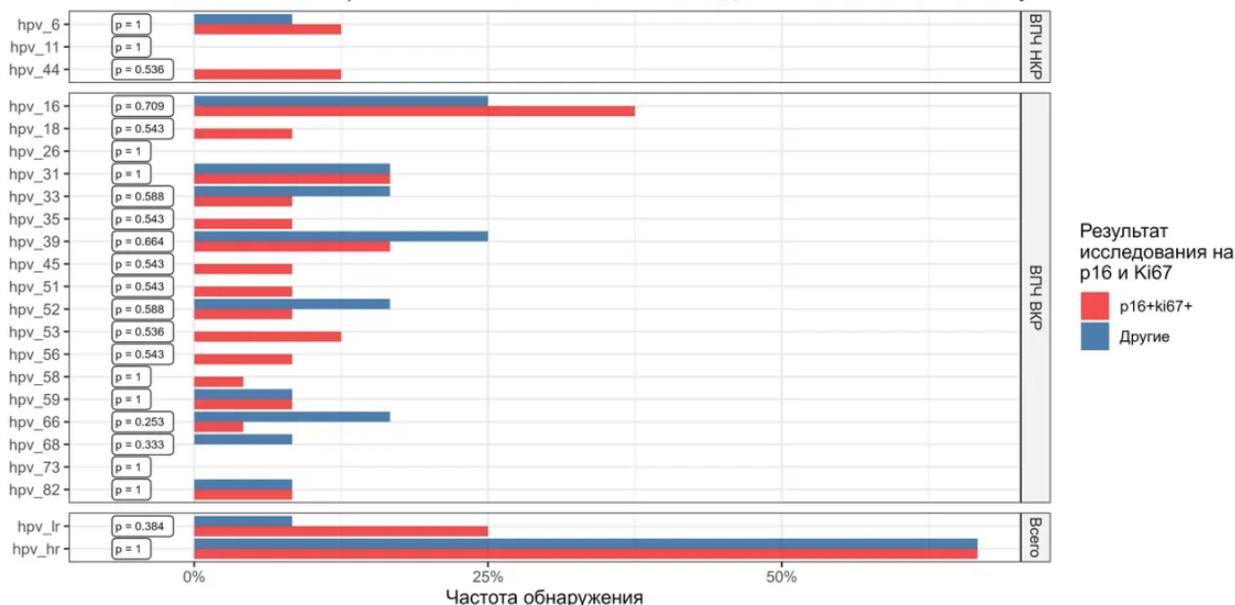


Рис.3 Частота обнаружения отдельных генотипов вируса у ВПЧ-положительных пациенток с HSIL в зависимости от экспрессии p16 и Ki-67

ОБСУЖДЕНИЕ

Выявление коэкспрессии белков p16 и Ki-67 при иммуноцитохимическом исследовании считают клинически значимым положительным результатом, который указывает на нарушения клеточного цикла и может привести к активному канцерогенезу [4]. В проведенном нами исследовании коэкспрессию p16/Ki-67 определяли преимущественно у пациенток с HSIL, среди которых доля положительных результатов составила 66,7% против 11,1% для пациенток с LSIL. У женщин с NILM коэкспрессии p16/Ki-67 не обнаруживали даже в случае наличия ВПЧ.

Наличие коэкспрессии p16/Ki-67 у пациенток с HSIL не зависела от их ВПЧ-статуса: у ВПЧ-положительных доля женщин с выявленной коэкспрессией составила 70,4%, у ВПЧ-отрицательных - 55,6% (рис.1). Полученные результаты согласуются с ранее проведенным исследованием Li с соавторами, отметившими, что высокая экспрессия Ki-67 связана с тяжестью поражения шейки матки, но не связана с ВПЧ-статусом пациентки [2].

Примечательно, что в зависимости от морфологического состояния эпителия шейки матки, каждая группа пациенток характеризовалась своим “типичным профилем” экспрессии p16 и Ki-67. Так у большинства пациенток с NILM отмечали изолированную экспрессию p16 (71,4%), с LSIL - изолированную экспрессию Ki-67 (82,2%), с HSIL - совместную экспрессию p16 и Ki-67 (66,7%). Можно предположить, что маркер p16, чаще выявляемый на стадии NILM, оказывает протективное действие за счет блокирования деления клеток и стимуляции апоптоза в поврежденных клетках. Преимущественное обнаружение Ki-67 в LSIL, возможно, отражает внезапное начало активной, несдерживаемой пролиферации клеток шейки матки в условиях инактивации p16. Так как белки p16 и Ki-67 являются антагонистами, их совместная экспрессия подразумевает значительное нарушение регуляции клеточного цикла и зачастую соответствует поражению CIN высокой степени (HSIL). Не исключено, что экспрессия p16 у пациенток с HSIL обусловлена компенсаторной реакцией на неконтролируемую пролиферацию эпителиальных клеток. Детальное изучение роли различных онкомаркеров в развитии интраэпителиальных неоплазий и РШМ возможно только в рамках лонгитюдных исследований.

Отмечено, что у 20,8% обследованных женщин при наличии HSIL и коэкспрессии p16/Ki-67 не обнаруживали ДНК ВПЧ. Аналогичные результаты отражены в исследовании P. Zhong с соавторами, которые установили, что иммуногистохимическое выявление p16 и Ki-67 не зависело от инфицирования ВПЧ ВКР [5].

Отсутствие ДНК ВПЧ в пробах от пациенток с HSIL и коэкспрессией p16/Ki-67 можно объяснить особенностями проводимого лабораторного исследования на наличие ВПЧ-инфекции. Отрицательные результаты могут быть обусловлены наличием других генотипов ВПЧ, не входящих в набор Квант-21, использованный для проведения настоящего исследования. Для некоторых генотипов ВПЧ критическим является способ взятия биоматериала: так опухоли, ассоциированные с ВПЧ 18 типа, чаще расположены в проксимальной части цервикального канала, что затрудняет получение вирусосодержащего материала [6].

Кроме особенностей преаналитики, аналитической чувствительности и компоновки используемой тест-системы необходимо понимать, что ДНК ВПЧ могла отсутствовать в образцах и по объективным причинам. Не исключено, что у пациенток произошла элиминация ВПЧ до момента проведения исследования, но при этом вирус выполнил роль триггера наблюдаемых патологических изменений. Либо изменения в эпителии вообще не были связаны с ВПЧ-инфекцией. Так, было показано, что ВПЧ-отрицательный РШМ может возникнуть вследствие инактивации гена *TP53*, кодирующего супрессор опухолевого роста p53 [7].

ВЫВОДЫ

1. Коэкспрессия p16 и Ki-67 статистически значимо чаще была выявлена у пациенток с HSIL и не зависела от их ВПЧ-статуса: в группе HSIL положительными результатами иммуногистохимии были получены у 70,4% ВПЧ-положительных пациенток и 55,6% ВПЧ-отрицательных.

2. В случае LSIL частота коэкспрессии p16/Ki-67 составила 14,3% среди ВПЧ-положительных и 5,9% - среди ВПЧ-отрицательных женщин; случаев коэкспрессии p16/Ki-67 у женщин с NILM не зафиксировано.

3. Наличие коэкспрессии p16/Ki-67 у ВПЧ-положительных пациенток в группе HSIL не зависело от генотипа ВПЧ, количества одновременно присутствующих генотипов и вирусной нагрузки.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Министерство здравоохранения Российской Федерации. Клинические рекомендации «Цервикальная интраэпителиальная неоплазия, эрозия и эктропион шейки матки». – 2020. – 59 с. – URL: http://zdrav.spb.ru/media/filebrowser/цервикальная_интраэпителиальная_неоплазия%2C_эрозия_и_эктропион_шейки_матки.pdf (дата обращения: 29.03.2024). Текст: электронный.
2. Li, Y. Combining HPV DNA load with p16/Ki-67 staining to detect cervical precancerous lesions and predict the progression of CIN1–2 lesions / Y. Li, J. Liu, L. Gong [et al.] // *Journal of Virology* / – 2019. – Vol. 16, № 117.
3. Hosseini, M.S. Comparison of Ki-67 index and P16 expression in different grades of cervical squamous intraepithelial lesions / M.S. Hosseini, M. Talayeh [et al.] // *Caspian Journal of Internal Medicine*. – 2023. – Vol. 14, № 1.
4. Yu, L. Significance of Triple Detection of p16/ki-67 Dual-Staining, Liquid-Based Cytology and HR HPV Testing in Screening of Cervical Cancer: A Retrospective Study / L. Yu, X. Chen, X. Liu [et al.] // *Frontiers in Oncology*. – 2022. – № 12.
5. Zhong, P. P16 and Ki-67 expression improves the diagnostic accuracy of cervical lesions but not predict persistent high risk human papillomavirus infection with CIN1 / P. Zhong, J. Li [et al.] // *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*. – 2015. – Vol. 8, № 3.
6. Skinner, S.R. Progression of HPV infection to detectable cervical lesions or clearance in adult women: Analysis of the control arm of the VIVIANE study / S.R. Skinner, C.M. Wheeler, B. Romanowski [et al.] // *International Journal of Cancer*. – 2016. – Vol. 138, № 10. – P. 2428-38.
7. Lee, J.E. Untold story of human cervical cancers: HPV-negative cervical cancer / J.E. Lee, Y. Chung [et al.] // *BMB Reports*. – 2022. – Vol. 55, № 9.

Сведения об авторах

А.А. Петровских* – студент лечебно-профилактического факультета
 А.А. Насырова – студент лечебно-профилактического факультета
 Д.Л. Зорников – кандидат медицинских наук, доцент, зав. лабораторией
 Е.С. Ворошилина – доктор медицинских наук, доцент, и.о. заведующего кафедрой

Information about the authors

A.A. Petrovskikh* – student of the Faculty of Treatment and Prevention
 A.A. Nasyrova – student of the Faculty of Treatment and Prevention
 D.L. Zornikov – Candidate of Sciences (Medicine), the Lab Head
 E.S. Voroshilina – Doctor of Sciences (Medicine), the Department Head

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):

arinapetrovskish@gmail.com

УДК: 616-093/-098

СРАВНЕНИЕ РАЗЛИЧНЫХ СПОСОБОВ ВЗЯТИЯ И ПРОБОПОДГОТОВКИ ОБРАЗЦОВ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ МИКРОБИОТЫ КОЖИ

Нечаева Диана Мирзозоновна¹, Мещерякова Виолетта Вадимовна¹, Симарзина Вероника Михайловна², Корнилов Даниил Олегович², Тряпицын Михаил Андреевич², Савченко Наталья Викторовна^{2,3}, Зорников Данила Леонидович^{1,2}

¹Кафедра медицинской микробиологии и клинической лабораторной диагностики

²Лаборатория генетических и эпигенетических основ прогнозирования нарушений онтогенеза и старения человека

³Кафедра дерматовенерологии и безопасности жизнедеятельности

ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России
 Екатеринбург, Россия

Аннотация

Введение. Значительная часть всех лабораторных ошибок приходится на преаналитический этап. Это может быть связано с отсутствием регламентированных правил взятия биоматериала для определенного исследования. С такой проблемой сталкиваются при анализе микробиоты кожи. Исследование микробного состава кожи методом ПЦР является перспективным методом для выявления условно-патогенных микроорганизмов на поверхности кожи. Однако не существует регламентированной методики взятия биоматериала для проведения данного типа исследования. **Цель исследования** – сравнить эффективность различных способов взятия и пробоподготовки образцов с поверхности кожи для исследования кожной микробиоты методом полимеразной цепной реакции. **Материал и методы.** От 5 пациентов были взяты образцы с кожи внутренней поверхности предплечья 3 разными способами. Для одного из способов в дальнейшем применяли 2 модификации пробоподготовки. Состав кожной микробиоты определяли методом ПЦР с помощью наборов реагентов БакСкрин УПМ и МикозоСкрин. **Результаты.** Были определены 2 оптимальных и наименее эффективный способы взятия биоматериала с последующей пробоподготовкой для исследования микробиоты методом ПЦР. **Выводы.** Вне зависимости от пола и кожи пациента не рекомендуется оставлять использованный зонд в пробирке после переноса биоматериала; в случае наличия зонда в пробирке необходимо провести центрифугирование образца в течение 10 минут на 16000g перед удалением зонда.

Ключевые слова: микробиота кожи, полимеразная цепная реакция, способ взятия биоматериала