

УДК 618.146:576.08:576.385.5
DOI: 10.17721/1728.2748.2023.95.24-31

Марина НОВОХАТСЬКА¹, магістр
ORCID ID: 0000-0008-5829-8248
e-mail: nvhtsk.mary@gmail.com

Олеся КАЛМИКОВА¹, д-р філософії, асист.
ORCID ID: 0009-0003-8074-9547
e-mail: olesiakalmukova@knu.ua

Наталія СКРИПНИК¹, канд. біол. наук, доц.
ORCID ID: 0009-0003-8074-9547
e-mail: natalia.skrypnyk@knu.ua

Оксана НЕБИЛЬЦОВА², канд. мед. наук
e-mail: oksana.nebyltsova@synevo.ua

¹Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна
²Медична лабораторія ТОВ "Сінево Україна", Київ, Україна

ДЕТЕКЦІЯ МАРКЕРІВ P16/KI-67 ПРИ ВИЯВЛЕННІ ІНТРАЕПІТЕЛІАЛЬНОЇ НЕОПЛАЗІЇ ШИЙКИ МАТКИ

Вступ. За останні роки в Україні було виявлено несприятливу епідеміологічну ситуацію щодо захворювань, які передаються статевим шляхом. Однією із найпоширеніших є генітальна папіломовірусна інфекція. Наразі отримано переконливі результати досліджень, які підтверджують, що вірус папіломи людини (ВПЛ) є однією із причин виникнення злоякісних трансформацій шийки матки. Вивчення молекулярного патогенезу асоційованих із ВПЛ новоутворень дозволило знайти біомаркери, які допомагають діагностувати інтраепітеліальну неоплазію шийки матки HSIL (High-grade Squamous Intraepithelial Lesion). Включення біомаркерів p16/Ki-67 у дослідження дає можливість підвищити чутливість виявлення HSIL у жінок. Також актуальним є подальший аналіз ефективності використання додаткової напівкількісної шкали для оцінювання результатів імуноцитохімічного виявлення p16/Ki-67.

Методи. Дослідження проводили на мазках із шийки матки, зроблених із використанням методики рідинної цитології з подальшим фарбуванням за Папаніколау, виявленням ВПЛ, імуноцитохімічним фарбуванням антитілами проти p16/Ki-67. Вибірку становили 90 жінок, які були поділені на 3 групи за віком. У кожній групі їх поділяли за такими критеріями: наявність / відсутність ВПЛ, ступінь дисплазії за класифікацією Бетесда й негативний / позитивний результат на p16/Ki-67 з подальшим розподілом інтенсивності фарбування за бальною шкалою у відповідній локалізації позитивної реакції у ядрі або цитоплазмі.

Результати. Виявлення під час дослідження імуноцитохімічних маркерів p16 та Ki-67 дозволило виокремити жінок з інтраепітеліальними ураженнями за позитивного результату ВПЛ і відсутності диспластичних змін у ПАП-тесті, а також при сортуванні спірних результатів ПАП-тесту. Показано, що інтенсивність імуноцитохімічного забарвлення p16 та Ki-67 змінювалась у прямій залежності від виявленого ступеня дисплазії.

Висновки. Виявлено прямий взаємозв'язок ступеня тяжкості дисплазії, установленого за класифікацією Бетесда, та інтенсивністю імуноцитохімічного забарвлення p16 та Ki-67. Отримані результати дають змогу надалі вивчати інтенсивність забарвлення при виявленні імуноцитохімічних маркерів p16 та Ki-67 задля їхнього попереднього застосування у комплексній інтерпретації результатів ПАП-тесту й виявлення точного ступеня дисплазії у неоднозначних діагностичних зразках.

Ключові слова: дисплазія шийки матки, внутрішньоепітеліальний рак, імуноцитохімія, ПАП-тест, p16/Ki-67, класифікація Бетесда, вірус папіломи людини.

Вступ

Одним із найважливіших захворювань жіночої репродуктивної системи є патологія шийки матки (Sung et al., 2021). За статистичними даними щодо раку шийки матки (РШМ) в Україні за 2021 рік воно посідає друге місце за частотою смертності (після раку молочної залози) (Федоренко, 2023).

РШМ дуже рідко виникає на неушкодженому епітелії, йому передують зміни, серед яких диспластичні зміни багаточарового плоского епітелію. Вони характеризуються порушенням нормального диференціювання через гіперплазію парабазальних і базальних клітин, зміною ядерно-цитоплазматичного співвідношення, анеуплоїдією тощо (Вовк, Горбань, & Борисюк, 2016; Pennant, 2008).

Вірус папіломи людини (ВПЛ) є фактором розвитку РШМ, його виявлення в організмі може вказувати на ймовірність цієї онкологічної патології. Через високу розповсюдженість цього вірусу, особливо в молодому віці, тестування на ВПЛ не має високої діагностичної специфічності (Porras et al., 2009; Walboomers et al., 1999). У таких випадках є важливим тестування на маркери проліферації,

що дає змогу відобразити експресію онкобілків. Виявлення у клітині маркерів проліферації вказує на відсутність контролю над клітинним діленням, що призводить до онкогенної трансформації (Roelens et al., 2012).

Аналіз на детекцію p16/Ki-67 призначений для виявлення жінок із цервікальними інтраепітеліальними ураженнями високого ступеня в популяції скринінгового дослідження, а також пацієнток із позитивними результатами тестування на ВПЛ високого ступеня ураження (Kim, & Sharpless, 2006).

У клітинах еукаріотів контроль розвитку циклу клітинного ділення здійснюється за допомогою комплексної моделі контрольованої експресії та посттрансляційних модифікацій білків, що регулюють клітинний цикл. Білок p16 відіграє важливу роль у регуляції клітинного циклу. Він бере участь у контролі переходу між фазами G1-S та є ініціатором зупинки клітинного циклу під час клітинної диференціації. Таким чином, він має антипроліферативний ефект при розвитку клітинного циклу. Експресія білка p16 пригнічується в остаточно диференційованих клітинах, отже, виявлення його за допомогою імуногістохімічного аналізу неможливе (Cuschieri, & Wentzensen, 2008).

Дуже часто буває так, що пухлини не проявляються протягом тривалого часу, оскільки імунна система організму їх виявляє і руйнує, що, своєю чергою, доводить ключову проонкогенну роль клітин імунної системи й запалення. У відповідь на сигнали, отримані з пухлини, організм активно продукує такі клітини, як Т- і В-лімфоцити, нейтрофіли, макрофаги та ін. Можливо, що вони спочатку спрямовані до пухлини як протипухлинна відповідь, але в її мікрооточенні скеровуються на проонкогенну відповідь (Smith et al., 2002).

Загалом запальні процеси грають велику роль у розвитку пухлини. Різновиди цитокінів, що стимулюють проліферацію і виживаність передзлосядісних клітин, визначаються рівнем запалення. Пухлиноасоційовані запалення можуть пригнічувати імунну відповідь, що, своєю чергою, стимулює проонкогенну дію (замість антионкогенної). Запальні процеси стимулюють ангіогенез пухлини й метастазування (Jeon, Allen-Hoffmann, & Lambert, 1995; Karin, 2006; Tesniere et al., 2008).

При цервікальній дисплазії надекспресія p16 є біомаркером трансформувальних ВПЛ-інфекцій, тому спочатку її пропонували розглядати як додатковий маркер при діагностуванні жінок з аномальними результатами ПАП-тесту й позитивними – ВПЛ-тесту. Згодом було виявлено, що p16-специфічне забарвлення може спостерігатися в окремих метапластичних або ендцервікальних клітинах, де експресія p16 виникає для виконання його нормальних клітинних функцій під час пригнічення росту, тому почали виконувати комбінований одночасний пошук p16 і маркера проліферації Ki-67 в одній клітині для ідентифікації диспластичних цервікальних клітин у цитологічних препаратах.

Ki-67 є ядерним і ядерцевим білком, що строго пов'язаний із проліферацією клітин і не виявляється за допомогою стандартних методів імунофарбування у сплячих клітинах у фазі G0. За нормальних фізіологічних умов експресія проліферативного асоційованого білка Ki-67 та антипроліферативного білка p16 взаємовиключні.

Отже, виявлення у цервікальних гістологічних препаратах окремих клітин, що одночасно експресують p16 та Ki-67, може служити незалежним від морфологічного аналізу індикатором клітин із порушенням регулювання клітинного циклу, а також індикатором присутності трансформувальних інфекцій ВПЛ на тлі цервікальної інтраепітеліальної неоплазії.

Інтерпретація предметних скелець із цервікальними цитологічними препаратами при імунофарбуванні на одночасне виявлення експресії регулюючого клітинний цикл білка p16 та маркера проліферації Ki-67 допомагає ідентифікувати жінок із цервікальною інтраепітеліальною неоплазією високого ступеня ураження (Ikenberg et al., 2013; Schmidt et al., 2011; Wentzensen, & von Knebel Doeberitz, 2007).

Проблема ранньої діагностики диспластичних змін шийки матки наразі остаточно не розв'язана. Підвищити чутливість методики імуноцитохімічного виявлення p16/Ki-67 може додатковий аналіз результатів із використанням напівкількісної бальної шкали. Тому метою нашої роботи було порівняти результати подвійної детекції маркерів p16/Ki-67, використовуючи подальший розподіл інтенсивності забарвлення за напівкількісною шкалою, з результатами досліджень забарвлення мазків за Папаніколау й аналізом на ВПЛ для виявлення інтраепітеліальної неоплазії високого ступеня ураження шийки матки та проаналізувати залежність інтенсивності імуноцитохімічного виявлення p16/Ki-67 від ступеня захворюваності при інтраепітеліальній неоплазії шийки матки.

Методи

В експерименті було обстежено 90 жінок віком від 18 до 75 років. Усі пацієнтки проходили гінекологічне й цитологічне дослідження. Стан шийки матки було оцінено за допомогою цитологічного дослідження на базі ТОВ "Сінево-Україна" згідно із клінічними протоколами. Патології шийки матки виявляли центрифугуванням отриманого матеріалу з подальшим його забарвленням методом Папаніколау за допомогою аналізатора "Prep Stain Slide Processor" ("Becton Dickinson", США) і мікроскопії препаратів за допомогою мікроскопа "ZEISS Primo Star" ("Carl Zeiss", Німеччина).

Метод забарвлення за Папаніколау є найкращим для гінекологічних мазків, оскільки дозволяє оцінити ступінь зрілості цитоплазми (від синього кольору в недозрілих клітинах до рожевого у зрілих або помаранчевого у клітинах зі зроговінням) (Raju, 2016). Завдяки вологій фіксації ядра клітинна мембрана та хроматин добре зберігають свою структуру. Для отримання повноцінного матеріалу із шийки матки за технологією "BD Prep Stain" (Becton Dickinson, США) застосовують спеціальний інструмент для забору матеріалу – пластикову цервікальну щіточку. Консервувальна рідина зберігає клітинний матеріал, запобігає його пошкодженню, дозволяє уникнути бактеріального забруднення і в оптимальних умовах доставити клітини до лабораторії. Процедура виготовлення препаратів включає отримання гомогенної суспензії за допомогою шейкера. Пристрій для струшування пробірок струшує клітини зі щіточки. Завдяки пристрою "Prep Mate" (Becton Dickinson, США), який призначений для автоматичного виготовлення клітинної суспензії, виконується її початкове збагачення (очищення суспензії від еритроцитів, детриту й елементів запалення). Пристрій перемішує зразок і витягує його із пробірки з консервантом, потім наносить зразок на щільний реагент у центрифужній пробірці. Проколювання корка дозволяє змішувати й наносити зразок без зняття корка для зниження контамінації зразка. Пристрій "Prep Stain" переносить клітинні зразки із центрифужної пробірки до осадової камери, яка поміщена на предметне скло мікроскопа. Потім цей самий пристрій автоматично забарвлює і промиває кожен мікропрепарат. На кожне скло наноситься біоматеріал із пробірки, розбавляється буфером TRIS buffered, фарбується барвниками OG6 та EA50, по завершенню фіксується розчином BD Alcohol Blend Rinse (Source BioScience, Ноттінгем) (Nishikawa et al., 2022).

Генітальну папіломавірусну інфекцію виявляли за допомогою детектувального ампліфікатора CFX-96 ("BioRad", США) (Schiffman et al., 2011; Gupta et al., 2022), онкомаркерні білки p16/Ki-67 – за допомогою тест-системи "CINtec PLUS" ("Roche", Швейцарія). Під час імуноцитохімічного зафарбовування проводили контроль якості (позитивний і негативний). Позитивне забарвлення свідчить про правильні підготовку зразків і методику фарбування. У кожному циклі фарбування обов'язково має бути один позитивний зразок. Якщо контрольний зразок не давав відповідного позитивного забарвлення, то результати з пофарбованої партії досліджуваних зразків вважали недійсними. Інтерпретація результатів має починатися з оцінювання контрольних позитивних і негативних зразків. Позитивним результатом імуноцитохімічного фарбування p16/Ki-67 є наявність однієї або кількох клітин епітелію шийки матки з одночасно коричневим забарвленням цитоплазми й червоним забарвленням ядра в межах однієї клітини. Присутність клітин, що демонструють імунореактивність тільки до одного із двох

маркерів, не вважають позитивним результатом тесту "CINtec PLUS" (Li et al., 2022).

Діагнози змін стану шийки матки встановлювали згідно із класифікацією Всесвітньої організації охорони здоров'я за системою Бетесда (Frappart et al., 2004) і клінічними протоколами, регламентованими наказами МОЗ України від 15.03.2003 № 582 та від 31.12.2004 № 676. Цитологічні терміни зазвичай засновані на гістологічних класифікаціях. Однак тривалий час у багатьох країнах для формулювання результатів цитологічного дослідження використовували класифікацію Папаніколау: I – норма, II – доброякісна атипія, III – дисплазія, IV – підозра на рак, V – рак (Hoda et al., 2019).

У нашому дослідженні було утворено такі групи: А – 30 жінок віком від 18 до 30 років; Б – 30 жінок віком від 30 до 45 років; С – 30 жінок віком від 45 до 75 років.

Критерії, за якими відбирали досліджуваних: діагноз ураження шийки матки, вік від 18 до 75 років, відсутність протипухлинного ефекту лікування.

Роботи виконували на базі ТОВ "Сінево-Україна" з дотриманням усіх вимог для проведення комплексного дослідження.

Обсяг діагностичних процедур включав:

- онкоцитоморфологічне дослідження мазків шийки матки з ендо- й екзоцервіксу;
- обстеження на ВПЛ із визначенням онкогенного потенціалу вірусу;
- ПАП-тест для виявлення патологій шийки матки;
- проведення імуноцитохімічного фарбування р16/Ki-67.

Підготовка до забору матеріалу включала: утримання сечовипускання впродовж 3 годин; утримання від статевих контактів впродовж 3 днів; виключення антибактеріальних і протимікробних препаратів впродовж 14 днів; уникання вагінальних свічок, тампонів і спринцювання впродовж 3 днів. Проводили забір матеріалу з 10 по 20 день менструального циклу.

Матеріал поміщали в консервувальний розчин на основі етанолу BD SurePath Preservative Fluid ("Becton, Dickinson and Company", США), після чого передавали до лабораторії для постановки діагнозу. З отриманого матеріалу брали проби для аналізу на ВПЛ, ПАП-тесту та імуноцитохімічного фарбування р16/Ki-67. Результати імуногістохімічного зафарбовування р16/Ki-67 оцінювали два незалежні дослідники з використанням світлового мікроскопа за напівкількісною бальною шкалою за інтенсивністю сигналу, який надходив з ядерного або цитоплазматичного компартментів клітин. Оцінювали від 0 до 3 балів із кроком 0,5 бала: 0 – відсутність реакції, 0,5–1 бал – слабка, 1–2 бали – помірна, 2–3 бали – сильна реакція.

На всіх етапах статистичного аналізу для групування ознак використовували стандартні функції програмного пакету Excel 2013 (Microsoft, USA) для оцінювання відмінності відсотків різних груп методом генеральних часток. При аналізі даних потрібно було виявити, як часто зустрічаються показники в заданих інтервалах значень. Функція "частота" робочого аркуша аналізу MS Excel належить до категорії статистичних і повертає розподіл частот у вигляді вертикального масиву. Для зазначеної множини значень і заданої множини кишень (інтервалів) частотний розподіл підраховує, скільки значень потрапляє у кожний інтервал. Масив даних може бути одно- або двомірним. Для частотного аналізу використовували команду "Сервіс/Аналіз даних". Аналізували відносні діагностичні показники – співвідношення істинно позитивних і хибно позитивних фракцій. Відмінності порівняно з нульовою гіпотезою вважали достовірними за $p < 0,05$.

Результати

Рак шийки матки найчастіше розвивається саме в зоні трансформації, до нього виявляється дисплазія. Через те, що дисплазія може утворюватися на невеликих ділянках, дуже важливим є правильний забір матеріалу. Його треба робити з усієї поверхні шийки матки, особливо із зони трансформації. Кількість патологічно змінених клітин у цитологічному препараті може відрізнитися і, якщо їх замало, їх можуть пропустити на скринінгу.

Для того, щоб цитологічне дослідження було ефективним, необхідно дотримуватися усіх правил забору матеріалу: правильної фіксації та забарвлення, ретельного огляду всього клітинного матеріалу й правильною його інтерпретації. Велику роль грає і метод забарвлення, у кожного з них є переваги й недоліки. Мазки для цитологічних досліджень отримують із поверхні слизової оболонки, тому їхній склад становлять зрушені клітини, що містяться на поверхні епітеліального пласта. Чим більша здатність епітелію до дозрівання, тим легше зрілі клітини потрапляють до мазка. При атрофічних змінах на поверхні епітеліального пласта розміщуються менш зрілі клітини (Smith et al., 2002).

Із 90 свіжих цитологічних препаратів 6 належали жінкам із дисплазією важкого ступеня (CIN III – 7 %), 20 – жінкам із дисплазією середнього ступеня (CIN II – 22 %) і 20 – жінкам із дисплазією легкого ступеня (CIN I – 22 %). 44 жінки отримали діагноз "без особливостей". У групі С кількість жінок із виявленим позитивним результатом на ВПЛ була на 36 % більше порівняно із групою А, водночас кількість ВПЛ-негативних – на 36 % менше, ніж у групі С. Кількість виявлених діагнозів CIN II у групі В була на 26 % більше, ніж у групі А, водночас у групі С було виявлено на 20 % більше випадків порівняно із групою А (табл. 1).

Таблиця 1

Клініко-патогістологічна характеристика отриманих зразків шийки матки

Група/ діагноз	А (18–30 років)	В (30–45 років)	С (45–75 років)
ВПЛ (–)	22 (73 %)	14 (47 %)	11 (37 %)*
ВПЛ (+)	8 (27 %)	16 (53 %)	19 (63 %)*
CIN I	6 (20 %)	7 (23 %)	7 (23 %)
CIN II	2 (7 %)	10 (33 %)*	8 (27 %)*
CIN III	-	1 (3 %)	5 (17 %)

Примітка: * – оцінка генеральних часток порівняно із групою А.

Було проведено статистичну обробку щодо залежності інфікування ВПЛ від віку пацієнток. Отримані дані вказують на зв'язок між наявністю захворювання і віком жінок.

Результати імуноцитохімічного фарбування для виявлення р16 та Ki-67 оцінювали під мікроскопом двоє незалежних дослідників. Інтенсивність імуногістохімічної

експресії оцінювали за шкалою від 0 до 3 балів таким чином: 0 – відсутність забарвлення, 1 – слабка інтенсивність, 2 – помірна інтенсивність і 3 – висока інтенсивність. На рис. 1 представлена імуноцитохімічна експресія p16 та

Ki-67 залежно від ступеня дисплазії. Спостерігається більш інтенсивне забарвлення при дисплазії важкого ступеня порівняно із дисплазією легкого ступеня.

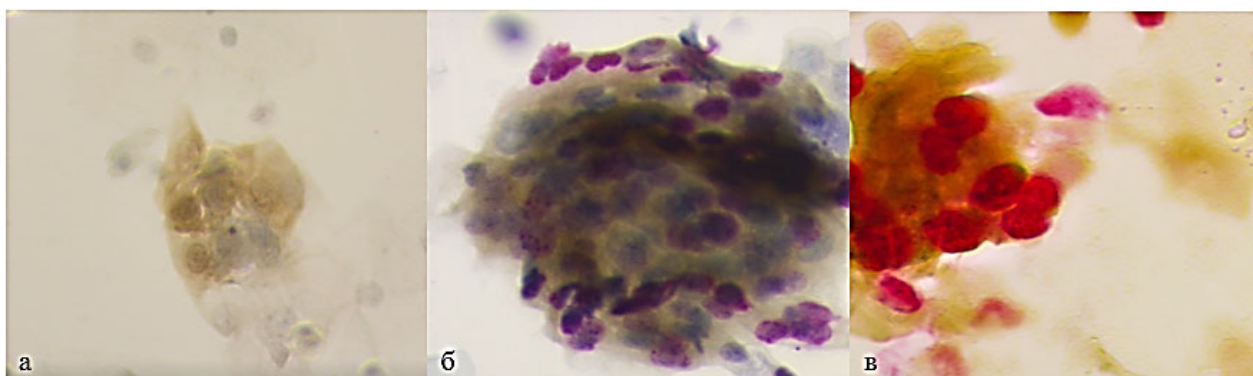


Рис. 1. Мікрофотографія мазка епітелію шийки матки. Інтенсивність імуноцитохімічного забарвлення на виявлення p16 (цитоплазматична локалізація, коричневий колір – позитивна реакція) та Ki-67 (ядерна локалізація, червоний колір – позитивна реакція) відповідно до розподілу за бальною шкалою: а – 1 бал, б – 2 бали, в – 3 бали (Об.х40, Ок.х10)

Паралельно з обстеженням на виявлення p16 та Ki-67 робили стандартний ПАП-тест щодо розподілу дисплазії легкого, середнього або важкого ступеня.

Було проведено статистичну обробку для виявлення p16 та Ki-67 залежно від віку при діагностуванні

дисплазії і ступеня важкості патології. Виявлено, що у групі С кількість позитивних результатів за обома маркерами проліферації була на 37 % більше порівняно із групою А (табл. 2).

Таблиця 2

Виявлення p16/Ki-67 залежно від віку при діагностуванні дисплазії

Група/діагноз	А (18–30 років)	В (30–45 років)	С (45–75 років)
p16	2 (25 %)	2 (18 %)	-
p16 та Ki-67	5 (63 %)	15 (88 %)	19 (100 %)*

Примітка: * – оцінка генеральних часток порівняно із групою А.

Було проведено статистичну обробку щодо інтенсивності забарвлення p16 та Ki-67 залежно від ступеня виявленої дисплазії (табл. 3).

Таблиця 3

Інтенсивність забарвлення p16 та Ki-67 залежно від ступеня дисплазії

Ступінь дисплазії	CIN I	CIN II	CIN III
Інтенсивність результатів виявлення p16/Ki-67	1,5 ± 0,25	2,2 ± 0,02	2,8 ± 0,15*

Примітка: * – достовірна різниця між CIN I та групами CIN II, CIN III, $p \leq 0,05$.

Представлено результат імуноцитохімічного фарбування при діагнозі за ПАП-тестом "CIN I. Дисплазія легкого ступеня" (рис. 2 а, б) і, для порівняння, – негативний контроль (рис. 2 в). Спостерігаємо задовільну кількість матеріалу, позитивний результат на p16 та Ki-67 у різних клітинах на мікрофотографії (рис. 2 а, б). Позитивним

результатом вважаємо наявність однієї або кількох клітин коричневого кольору в цитоплазмі та червоного – у ядрі в одній клітині; негативний результат (рис. 2 в) демонструє клітини плоского епітелію без виявлених маркерів проліферації.

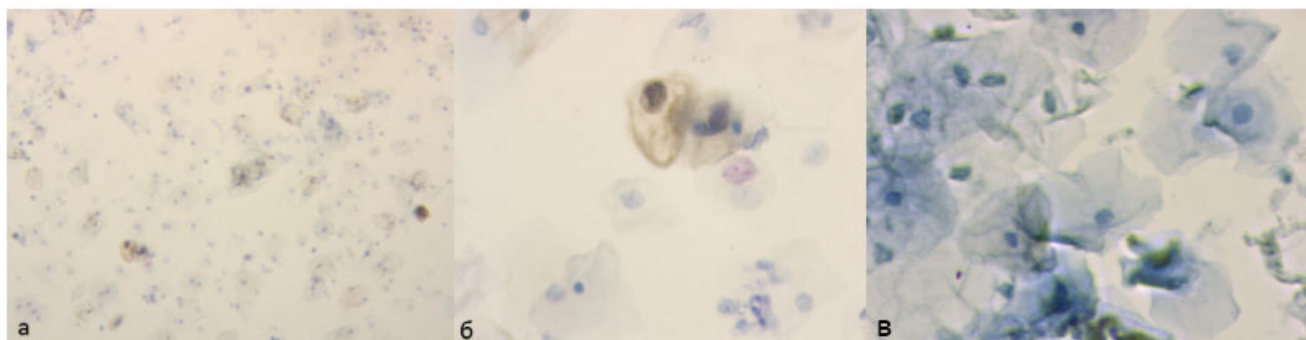


Рис. 2. Мікрофотографія мазка епітелію шийки матки. CIN I (а, б) і негативний контроль (в) (метод імуноцитохімічного фарбування p16/Ki-67, контрастування гематоксиліном: а – Об.х20, Ок.х10; б – Об.х40, Ок.х10; в – Об.х40, Ок.х10)

На рис. 3 представлено результат імуноцитохімічного фарбування при поставленому за ПАП-тестом діагнозі "CIN III. Дисплазія важкого ступеня". Спостерігаємо

задовільну кількість матеріалу, велику кількість клітин з одночасною сильною експресією p16 та Ki-67.

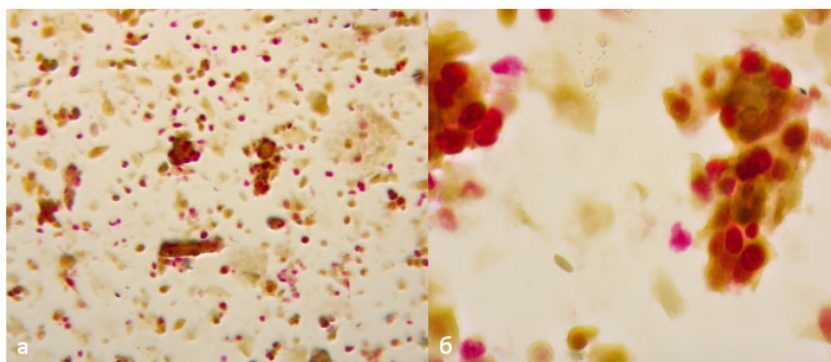


Рис. 3. Мікрофотографія мазка епітелію шийки матки, CIN III (метод імуноцитохімічного фарбування p16/Ki-67: а – Об.х20, Ок.х10; б – Об.х40, Ок.х10)

Дискусія і висновки

Надійний метод скринінгу має вирішальне значення для виявлення жінок із групи ризику. Метод фарбування за Папаніколау є найкращим для гінекологічних мазків, оскільки він дозволяє оцінити ступінь зрілості цитоплазми (від синього кольору в недозрілих клітинах до рожевого у зрілих або помаранчевого у клітинах зі зроговінням): завдяки вологій фіксації ядра клітинна мембрана та хроматин добре зберігають свою структуру (Martinez-Mas et al., 2020). Проблему відносного суб'єктивного оцінювання ПАП-тестування нині пропонують розв'язувати з використанням програм цифрових мікрофотографій і штучного інтелекту, проте вони мають певні недоліки (Maurya, Pandey, & Dutta, 2023). Біомаркери p16 і Ki-67 використовують як допоміжні інструменти в діагностиці дисплазій, асоційованих із ВПЛ високого ризику, щоб доповнити морфологічні характеристики клітин додатковими колориметричними характеристиками (Silva et al., 2017). Це дозволяє з високою чутливістю виявляти атипові клітини в мазках і діагностувати ранні передракові зміни епітелію і раку шийки матки, проте існує безліч підходів до інтерпретації їх імуноцитохімічного виявлення, крім якісної характеристики позитивної та негативної реакції (Wright et al., 2022). Найбільш поширеною шкалою для аналізу імуногістохімічних результатів є напівкількісна, яка може враховувати інтенсивність забарвлення і локалізацію у тканині позитивної реакції (Han et al., 2020). Проте для імуноцитохімічних результатів така

шкала потребує оптимізації для кожного антигена залежно від специфіки зразка (Celewicz et al., 2018).

Скринінг на рак шийки матки є сферою, де наявні технології можуть бути поліпшені для оптимізації точності виявлення неоплазії високого ступеня ураження, наприклад врахування аналізу таких результатів ПАП-тесту, як ASC-US (атилові клітини плоского епітелію неясного значення), LSIL (плоскоклітинне інтраепітеліальне ураження низького ступеня) або жінок старше 30 років, що пройшли ПАП і ВПЛ-тестування, де ПАП-тест показав негативні, а ВПЛ-тест – позитивні результати. У таких випадках тестування на виявлення онкогенних маркерів p16 та Ki-67 є уточнювальним маркером при постановці кінцевого діагнозу (White et al., 2016).

Розглянутий метод можна використовувати для клітинних блоків, що готуються з остаточного матеріалу для рідинної цитології, оскільки він демонструє високу чутливість при виявленні HSIL порівняно з біопсією (Martins et al., 2022). Подвійне фарбування на p16/Ki-67 має таку саму чутливість при виявленні HSIL, як і ВПЛ-тестування та фарбування на p16 окремо, воно більш специфічне порівняно із цитологічним дослідженням (El-ZeinM et al., 2021). Цитологічний скринінг із подвійним фарбуванням можна проводити в молодих жінок, для яких ВПЛ-тестування з якихось причин обмежене. Тестування на ВПЛ на базі ПАП-тесту є загально-визнаним альтернативним підходом до скринінгу на рак шийки матки й попередні ураження. Нині тестування на

ВПЛ застосовується або спільно із ПАП-тестом у жінок 30 років і старше, або як первинний скринінговий тест у жінок від 25 років. Після застосування трьох тестів імовірність невиявлення захворювання майже дорівнює нулю, тому можна оцінити абсолютні показники діагностичної точності (Dovnik, & Repše Fokter, 2023).

Ураження шийки матки були поширенішими у віковій групі 45–75 років, з віком зростає і ступінь важкості захворювання, що узгоджується з іншими дослідженнями (Wentzensen et al., 2019). Позитивні результати на ВПЛ також зустрічалися частіше у пацієнок старшої вікової групи порівняно з молодшими за віком (Lewitowicz et al., 2020). Сильна експресія p16 та Ki-67 була найбільше пов'язана з тяжкістю дисплазії, що визначалась імуногістохімічно на біопсійному матеріалі (Sarma, Sarma, & Rabha, 2023).

Було порівняно результати подвійної детекції маркерів p16 та Ki-67 з результатами досліджень забарвлення мазків за Папаніколау й аналізом на ВПЛ. За результатами порівняння зазначимо, що застосування імуногістохімічного аналізу для одночасного якісного виявлення білків p16 та Ki-67 дозволяє знаходити жінок з інтраепітеліальними ураженнями під час скринінгового дослідження без необхідності у морфологічній інтерпретації, а також при сортуванні діагнозів, якщо відсутні виражені диспластичні зміни у препаратах ПАП-тесту, але наявний позитивний результат на ВПЛ із високими ступенями ризику.

Отже, знайдена залежність інтенсивності імуногістохімічного виявлення p16 та Ki-67 від ступеня захворюваності при інтраепітеліальній неоплазії шийки матки. При дисплазії легкого ступеня забарвлення цитоплазми та ядра було менш інтенсивним порівняно із дисплазією важкого ступеня, де забарвлення спостерігалось в більшості клітин препарату й було більш насиченого кольору.

Отримані результати дають нам змогу вивчати більш детально імуногістохімічне фарбування p16 та Ki-67 для використання не лише при виявленні неопластичних змін у жінок або сортуванні спірних результатів, а також для ранньої діагностики ступеня тяжкості диспластичних змін.

Внесок авторів: Марина Новохатська – формальний аналіз, методологія, обробка результатів, написання (оригінальна чернетка); Олеся Калмикова – концептуалізація, написання (перегляд і редагування); Наталія Скрипник – написання (перегляд і редагування); Оксана Небільцова – програмне забезпечення, написання (перегляд і редагування).

Список використаних джерел

Вовк, І. Б., Горбань, Н. Е., & Борисюк, О. Ю. (2016). Гіперплазія ендометрію (клінічна лекція). ДУ "Інститут педіатрії, акушерства та гінекології НАМН України". *Жіноче здоров'я*, 7(63), 177–181. http://nbuv.gov.ua/UJRN/Zdz_2016_5_3.

Федоренко, З. П., Сумкін, О. В., Зуб, В. О., Горох, Є. Л., Гулак, Л. О., Ригов, А. Ю., & Єфіменко, О. В. (2023). *Бюлетень національного канцер-реєстру України*, № 24 А.Ю., 53. https://www.ncru.inf.ua/publications/BULL_24/PDF/66-shm.pdf

Celewicz, A., Celewicz, M., Węzowska, M., Chudecka-Głaz, A., Menkiszak, J., & Urańska, E. (2018). Clinical efficacy of p16/Ki-67 dual-stained cervical cytology in secondary prevention of cervical cancer. *Polish Journal of Pathology*, 69(1), 42–47. <https://doi.org/10.5114/pjp.2018.75335>

Cuschieri, K., & Wentzensen, N. (2008). Human papillomavirus mRNA and p16 detection as biomarkers for the improved diagnosis of cervical neoplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*, 17(10), 2536–2545. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.epi-08-0306>

Dovnik, A., & Repše Fokter, A. (2023). The Role of p16/Ki67 Dual Staining in Cervical Cancer Screening. *Current Issues in Molecular Biology*, 45(10), 8476–8491. <https://doi.org/10.3390/cimb45100534>

El-Zein, M., Gottlieb, W., Gilbert, L., Hemmings, R., Behr, M. A., & Franco, E. L. (2021). Dual staining for p16/Ki-67 to detect high-grade cervical lesions: Results from the Screening Triage Ascertain Intraepithelial Neoplasia by

Immunostain Testing study. *International Journal of Cancer*, 148(2), 492–501. <https://doi.org/10.1002/ijc.33250>

Franks, I. M., & Teich, N. M. (1997). *Introduction to the Cellular and molecular biology of cancer* (3rd digital ed). Oxford University Press.

Frappart, L., Fontaniere, B., Lucas, E., & Sankaranarayanan, R. (2004). Histopathology and Cytopathology of the Uterine Cervix – Digital Atlas. IARC Cancer Base. <https://screening.iarc.fr/atlascyto.php>

Gupta, S. M., Warke, H., Chaudhari, H., Mavani, P., Katke, R. D., Kerkar, S. C., & Mania-Pramanik, J. (2022). Human Papillomavirus E6/E7 oncogene transcripts as biomarkers for the early detection of cervical cancer. *Journal of Medical Virology*, 94(7), 3368–3375. <https://doi.org/10.1002/jmv.27700>

Han, C., Zhao, F., Wan, C., He, Y., & Chen, Y. (2020). Associations between the expression of SCCA, MTA1, P16, Ki 67 and the infection of high risk HPV in cervical lesions. *Oncology Letters*, 20(1), 884–892. <https://doi.org/10.3892/ol.2020.11634>

Hoda, R. S., Finer, E. B., Arpin III, R. N., Rosenbaum, M., & Pitman, M. B. (2019). Risk of malignancy in the categories of the Papanicolaou Society of Cytopathology system for reporting pancreaticobiliary cytology. *Journal of the American Society of Cytopathology*, 8(3), 120–127. <https://doi.org/10.1016/j.jasc.2019.01.002>

Ikenberg, H., Bergeron, C., Schmidt, D., Griesser, H., Alameda, F., Angeloni, C., Bogers, J., Dachez, R., Denton, K., Hariri, J., Keller, T., von Knebel Doeberitz, M., Neumann, H. H., Puig-Tintore, L. M., Sideri, M., Rehm, S., & Ridder, R. (2013). Screening for cervical cancer precursors with p16/Ki-67 dual-stained cytology: results of the PALMS study. *J. Natl Cancer Inst.*, 105, 1550–7. <https://doi.org/10.1093/jnci/djt235>

Jeon, S., Allen-Hoffmann, B. L., & Lambert, P. F. (1995). Integration of human papillomavirus type 16 into the human genome correlates with a selective growth advantage of cells. *J. Viro*, 69(5). <https://doi.org/10.1128/jvi.69.5.2989-2997.1995>

Karin, M. (2006). NF-κB and cancer: mechanisms and targets. *Mol. Carcinog.*, 355–361. <https://doi.org/10.1128/jvi.69.5.2989-2997.1995>

Kim, W. Y., & Sharpless, N. E. (2006). The regulation of INK4/ARF in cancer and aging. *Cell*, 127(2), 265–275. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.10.003>

Lewitowicz, P., Nasierowska-Guttmejer, A., Rokita, W., Adamczyk-Gruska, O., Gluszek, S., Chrapek, M., & Misiak, M. (2020). HPV genotyping and p16/Ki-67 test significantly improve detection rate of high-grade cervical squamous intraepithelial lesion. *Archives of Medical Science*, 16(1), 87–93. <https://doi.org/10.5114/aoms.2018.80697>

Li, Y., Fu, Y., Cheng, B., Xie, X., & Wang, X. (2022). A comparative study on the accuracy and efficacy between dalton and CINtec® PLUS p16/Ki-67 dual stain in triaging HPV-positive women. *Frontiers in Oncology*, 11, 815213. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.815213>

Martinez-Mas, J., Bueno-Crespo, A., Martinez-Espana, R., Remezal-Solano, M., Ortiz-Gonzalez, A., Ortiz-Reina, S., & Martinez-Cendan, J. P. (2020). Classifying Papanicolaou cervical smears through a cell merger approach by deep learning technique. *Expert Systems with Applications*, 160. <https://doi.org/10.1016/j.eswa.2020.113707>

Martins, D., Schmitt, F., Frattini, M., & Fulcinitti, F. (2022). Molecular Pathology of Endometrial Carcinoma on LBC Samples and Cell Blocks. In: Hirai, Y., Fulcinitti, F. (eds). *The Yokohama System for Reporting Endometrial Cytology*. Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-16-5011-6_16

Maurya, R., Pandey, N. N., & Dutta, M. K. (2023). VisionCervix: Papanicolaou cervical smears classification using novel CNN-Vision ensemble approach. *Biomedical Signal Processing and Control*, 79. <https://doi.org/10.1016/j.bspc.2022.104156>

Nishikawa, T., Suzuki, H., Takeuchi, M., Tatsumi, S., Tachibana, Y., Ohbayashi, C., & Norimatsu, Y. (2022). A study on preserving endometrial glandular architecture during preparation using BD SurePath™ liquid-based cytology reagents: Cellular fixation with preservative fluid requires at least 18 h. *Cytopathology*, 33(3), 357–361. <https://doi.org/10.1111/cyt.13087>

Pennant, S. (2008). Endometrial atypical hyperplasia and subsequent diagnosis of endometrial cancer. *Obstet Gynaecol*, 28 (6), 632–633. <https://doi.org/10.1080/01443610802355817>

Porras, C., Rodriguez, A. C., Hildesheim, A., Herrero, R., González, P., Wacholder, S., & Schiffman, M. (2009). Human papillomavirus types by age in cervical cancer precursors: predominance of human papillomavirus 16 in young women. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 850–863. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.epi-08-0951>

Raju, K. (2016). Evolution of Pap Stain. *Biomed. Res. Ther.*, 3, 6. <https://doi.org/10.7603/s40730-016-0006-8>

Roelens, J., Reuschenbach, M., von Knebel Doeberitz, M., Wentzensen, N., Bergeron, C., & Arbyn, M. (2012). p16INK4a immunocytochemistry versus human papillomavirus testing for triage of women with minor cytologic abnormalities: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Cytopathol*, 120(5), 294–307. <https://doi.org/10.1002/cncy.21205>

Sarma, U., Sarma, P., & Rabha, D. (2023). Staining Intensity of P16INK4a and Ki-67 Determine the Grade of Cervical Lesion: An Experience from Single Tertiary Care Centre. *Asian Pacific Journal of Cancer Biology*, 8(4), 327–333. <https://doi.org/10.31557/apjcb.2023.8.4.327-333>

Schiffman, M., Wentzensen, N., Wacholder, S., Kinney, W., Gage, J. C., & Castle, P. E. (2011). Human papillomavirus testing in prevention of cervical cancer. *Cancer Inst*, 368-83. <https://doi.org/10.1093/jnci/djq562>

Schmidt, D., Bergeron, C., Denton, K. J., & Ridder, R. (2011). p16/ki-67 dual-stain cytology in the triage of ASC-US and LSIL papanicolaou cytology: results from the European equivocal or mildly abnormal Papanicolaou cytology study. *Cancer Cytopathol*, 119(3), 158–166. <https://doi.org/10.1002/cncy.20140>

Silva, D. C., Goncalves, A. K., Cobucci, R. N., Mendonca, R. C., Lima, P. H., & Júnior, G. C. (2017). Immunohistochemical expression of p16, Ki-67 and p53 in cervical lesions-A systematic review. *Pathology-Research and Practice*, 213(7), 723–729. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2017.03.003>

Smith, J. S., Herrero, R., Bosetti, C., Munoz, N., Bosch, F. X., Eluf-Neto, J., & Ashley, R. (2002). Herpes simplex virus-2 as a human papillomavirus cofactor in the etiology of invasive cervical cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 1604–1614. <https://doi.org/10.1093/jnci/94.21.1604>

Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., & Jemal, A. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J. Clin.*, 71, 209–49. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>

Tesniere, A., Panaretakis, T., Kepp, O., Apetoh, L., Ghiringhelli, F., Zitvogel, L., & Kroemer, G. (2008). Molecular characteristics of immunogenic cancer cell death. *Cell Death Differ*, 15(1), 3–12. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402269>

Walboomers, J. M., Jacobs, M. V., Manos, M. M., Bosch, F. X., Kummer, J. A., Shah, K. V., & Muñoz, N. (1999). Human Papillomavirus is a Necessary Cause of Invasive Cervical Cancer Worldwide. *J. Pathol*, 189. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1096-9896\(199909\)189:1%3C12::aid-path431%3E3.0.co;2-f](https://doi.org/10.1002/(sici)1096-9896(199909)189:1%3C12::aid-path431%3E3.0.co;2-f)

Wentzensen, N., & von Knebel Doeberitz, M. (2007). Biomarkers in cervical cancer screening. *Dis Markers*, 23(4), 315–330. <https://doi.org/10.1155/2007/678793>

Wentzensen, N., Clarke, M. A., Bremer, R., Poitras, N., Tokugawa, D., Goldhoff, P. E., & Lorey, T. S. (2019). Clinical evaluation of human papillomavirus screening with p16/Ki-67 dual stain triage in a large organized cervical cancer screening program. *JAMA internal medicine*, 179(7), 881–888. <https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2019.0306>

White, C., Bakhiet, S., Bates, M., Keegan, H., Pilkington, L., Ruttle, C., & Martin, C. M. (2016). Triage of LSIL/ASC-US with p16/Ki-67 dual staining and human papillomavirus testing: a 2-year prospective study. *Cytopathology*, 27(4), 269–276. <https://doi.org/10.1111/cyt.12317>

Wright, Jr. T. C., Stoler, M. H., Ranger-Moore, J., Fang, Q., Volkir, P., Safaian, M., & Ridder, R. (2022). Clinical validation of p16/Ki-67 dual-stained cytology triage of HPV-positive women: Results from the IMPACT trial. *International journal of cancer*, 150(3), 461–471. <https://doi.org/10.1002/ijc.33812>

References

Celewicz, A., Celewicz, M., Węzowska, M., Chudecka-Glaz, A., Menkiszak, J., & Uraśńska, E. (2018). Clinical efficacy of p16/Ki-67 dual-stained cervical cytology in secondary prevention of cervical cancer. *Polish Journal of Pathology*, 69(1), 42–47. <https://doi.org/10.5114/pjp.2018.75335>

Cuschieri, K., & Wentzensen, N. (2008). Human papillomavirus mRNA and p16 detection as biomarkers for the improved diagnosis of cervical neoplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*, 17(10), 2536–2545. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.epi-08-0306>

Dovnik, A., & Repše Fokter, A. (2023). The Role of p16/Ki67 Dual Staining in Cervical Cancer Screening. *Current Issues in Molecular Biology*, 45(10), 8476–8491. <https://doi.org/10.3390/cimb45100534>

El-Zein, M., Gottlieb, W., Gilbert, L., Hemmings, R., Behr, M. A., & Franco, E. L. (2021). Dual staining for p16/Ki-67 to detect high-grade cervical lesions: Results from the Screening Triage Ascertain Intraepithelial Neoplasia by Immunostain Testing study. *International Journal of Cancer*, 148(2), 492–501. <https://doi.org/10.1002/ijc.33250>

Fedorenko, Z. P., Sumkin, O. V., Zub, V. O., Horokh, E. L., Gulak, L. O., Ryzhov, A. Yu., & Yefimenko, O. V. (2023). *Bulletin of the National Cancer Registry of Ukraine*, 24, 53. https://www.ncru.inf.ua/publications/BULL_24/PDF/66-shm.pdf [in Ukrainian].

Franks, I. M., & Teich, N. M. (1997). Introduction to the Cellular and molecular biology of cancer (3rd digital ed.). *Oxford University Press*.

Frappart, L., Fontaniere, B., Lucas, E., & Sankaranarayanan, R. (2004). Histopathology and Cytopathology of the Uterine Cervix – Digital Atlas. IARC Cancer Base. <https://screening.iarc.fr/atlascyto.php>

Gupta, S. M., Warke, H., Chaudhari, H., Mavani, P., Katke, R. D., Kerkar, S. C., & Mania-Pramanik, J. (2022). Human Papillomavirus E6/E7 oncogene transcripts as biomarkers for the early detection of cervical cancer. *Journal of Medical Virology*, 94(7), 3368–3375. <https://doi.org/10.1002/jmv.27700>

Han, C., Zhao, F., Wan, C., He, Y., & Chen, Y. (2020). Associations between the expression of SCCA, MTA1, P16, Ki 67 and the infection of high risk HPV in cervical lesions. *Oncology Letters*, 20(1), 884–892. <https://doi.org/10.3892/ol.2020.11634>

Hoda, R. S., Finer, E. B., Arpin III, R. N., Rosenbaum, M., & Pitman, M. B. (2019). Risk of malignancy in the categories of the Papanicolaou Society of Cytopathology system for reporting pancreaticobiliary cytology. *Journal of the American Society of Cytopathology*, 8(3), 120–127. <https://doi.org/10.1016/j.jasc.2019.01.002>

Ikenberg, H., Bergeron, C., Schmidt, D., Griesser, H., Alameda, F., Angeloni, C., Bogers, J., Dachez, R., Denton, K., Hariri, J., Keller, T., von

Knebel Doeberitz, M., Neumann, H. H., Puig-Tintore, L. M., Sideri, M., Rehm, S., & Ridder, R. (2013). Screening for cervical cancer precursors with p16/Ki-67 dual-stained cytology: results of the PALMS study. *J. Natl Cancer Inst.*, 105, 1550–7. <https://doi.org/10.1093/jnci/djt235>

Jeon, S., Allen-Hoffmann, B. L., & Lambert, P. F. (1995). Integration of human papillomavirus type 16 into the human genome correlates with a selective growth advantage of cells. *J. Viro*, 69(5). <https://doi.org/10.1128/jvi.69.5.2989-2997.1995>

Karin, M. (2006). NF-κB and cancer: mechanisms and targets. *Mol Carcinog*, 355–361. <https://doi.org/10.1128/jvi.69.5.2989-2997.1995>

Kim, W. Y., & Sharpless, N. E. (2006). The regulation of INK4/ARF in cancer and aging. *Cell*, 127(2), 265–275. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.10.003>

Lewitowicz, P., Nasierowska-Guttmejer, A., Rokita, W., Adamczyk-Gruska, O., Gluszek, S., Chrapek, M., & Misiak, M. (2020). HPV genotyping and p16/Ki-67 test significantly improve detection rate of high-grade cervical squamous intraepithelial lesion. *Archives of Medical Science*, 16(1), 87–93. <https://doi.org/10.5114/aoms.2018.80697>

Li, Y., Fu, Y., Cheng, B., Xie, X., & Wang, X. (2022). A comparative study on the accuracy and efficacy between dalton and CINtec® PLUS p16/Ki-67 dual stain in triaging HPV-positive women. *Frontiers in Oncology*, 11, 815213. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.815213>

Martinez-Mas, J., Bueno-Crespo, A., Martinez-Espana, R., Remezal-Solano, M., Ortiz-Gonzalez, A., Ortiz-Reina, S., & Martinez-Cendan, J. P. (2020). Classifying Papanicolaou cervical smears through a cell merger approach by deep learning technique. *Expert Systems with Applications*, 160. <https://doi.org/10.1016/j.eswa.2020.113707>

Martins, D., Schmitt, F., Frattini, M., & Fulcinitti, F. (2022). Molecular Pathology of Endometrial Carcinoma on LBC Samples and Cell Blocks. In: Hirai, Y., Fulcinitti, F. (eds). *The Yokohama System for Reporting Endometrial Cytology*. Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-16-5011-6_16

Maurya, R., Pandey, N. N., & Dutta, M. K. (2023). Vision Cervix: Papanicolaou cervical smears classification using novel CNN-Vision ensemble approach. *Biomedical Signal Processing and Control*, 79. <https://doi.org/10.1016/j.bspc.2022.104156>

Nishikawa, T., Suzuki, H., Takeuchi, M., Tatsumi, S., Tachibana, Y., Ohbayashi, C., & Norimatsu, Y. (2022). A study on preserving endometrial glandular architecture during preparation using BD SurePath™ liquid-based cytology reagents: Cellular fixation with preservative fluid requires at least 18 h. *Cytopathology*, 33(3), 357–361. <https://doi.org/10.1111/cyt.13087>

Pennant, S. (2008). Endometrial atypical hyperplasia and subsequent diagnosis of endometrial cancer. *Obstet Gynaecol*, 28(6), 632–633. <https://doi.org/10.1080/01443610802355817>

Porras, C., Rodriguez, A. C., Hildesheim, A., Herrero, R., González, P., Wacholder, S., & Schiffman, M. (2009). Human papillomavirus types by age in cervical cancer precursors: predominance of human papillomavirus 16 in young women. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 850–863. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.epi-08-0951>

Raju, K. (2016). Evolution of Pap Stain. *Biomed. Res. Ther.*, 3, 6. <https://doi.org/10.7603/s40730-016-0006-8>

Roelens, J., Reuschenbach, M., von Knebel Doeberitz, M., Wentzensen, N., Bergeron, C., & Arbyn, M. (2012) p16INK4a immunocytochemistry versus human papillomavirus testing for triage of women with minor cytologic abnormalities: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Cytopathol.*, 120(5), 294–307. <https://doi.org/10.1002/cncy.21205>

Sarma, U., Sarma, P., & Rabha, D. (2023). Staining Intensity of P16INK4a and Ki-67 Determine the Grade of Cervical Lesion: An Experience from Single Tertiary Care Centre. *Asian Pacific Journal of Cancer Biology*, 8(4), 327–333. <https://doi.org/10.3155/apjcb.2023.8.4.327-333>

Schiffman, M., Wentzensen, N., Wacholder, S., Kinney, W., Gage, J. C., & Castle, P. E. (2011). Human papillomavirus testing in prevention of cervical cancer. *Cancer Inst.*, 368-83. <https://doi.org/10.1093/jnci/djq562>

Schmidt, D., Bergeron, C., Denton, K. J., & Ridder, R. (2011). p16/ki-67 dual-stain cytology in the triage of ASC-US and LSIL papanicolaou cytology: results from the European equivocal or mildly abnormal Papanicolaou cytology study. *Cancer Cytopathol.*, 119(3), 158–166. <https://doi.org/10.1002/cncy.20140>

Silva, D. C., Goncalves, A. K., Cobucci, R. N., Mendonca, R. C., Lima, P. H., & Júnior, G. C. (2017). Immunohistochemical expression of p16, Ki-67 and p53 in cervical lesions-A systematic review. *Pathology-Research and Practice*, 213(7), 723–729. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2017.03.003>

Smith, J. S., Herrero, R., Bosetti, C., Munoz, N., Bosch, F. X., Eluf-Neto, J., & Ashley, R. (2002). Herpes simplex virus-2 as a human papillomavirus cofactor in the etiology of invasive cervical cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 1604–1614. <https://doi.org/10.1093/jnci/94.21.1604>

Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., & Jemal, A. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J. Clin.*, 71, 209–49. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>

Tesniere, A., Panaretakis, T., Kepp, O., Apetoh, L., Ghiringhelli, F., Zitvogel, L., & Kroemer, G. (2008). Molecular characteristics of immunogenic cancer cell death. *Cell Death Differ*, 15(1), 3–12. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402269>

Vovk, I. B., Horban, N. E., & Borysyuk, O. Yu. (2016). Endometrial hyperplasia (clinical lecture). Kyiv: State University "Institute of Pediatrics, Obstetrics and Gynecology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine". *Women's Health*, 7(63), 177–181. http://nbuv.gov.ua/UJRN/Zdzh_2016_5_3 [in Ukrainian].

Walboomers, J. M., Jacobs, M. V., Manos, M. M., Bosch, F. X., Kummer, J. A., Shah, K. V., & Muñoz, N. (1999). Human Papillomavirus is a Necessary Cause of Invasive Cervical Cancer Worldwide. *J. Pathol.*, 189. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1096-9896\(199909\)189:1%3C12::aid-path431%3E3.0.co;2-f](https://doi.org/10.1002/(sici)1096-9896(199909)189:1%3C12::aid-path431%3E3.0.co;2-f)

Wentzensen, N., & von Knebel Doeberitz, M. (2007). Biomarkers in cervical cancer screening. *Dis Markers*. 23(4), 315–330. <https://doi.org/10.1155/2007/678793>

Wentzensen, N., Clarke, M. A., Bremer, R., Poitras, N., Tokugawa, D., Goldhoff, P. E. & Lorey, T. S. (2019). Clinical evaluation of human papillomavirus screening with p16/Ki-67 dual stain triage in a large organized

cervical cancer screening program. *JAMA internal medicine*, 179(7), 881–888. <https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2019.0306>

White, C., Bakhiet, S., Bates, M., Keegan, H., Pilkington, L., Ruttle, C., & Martin, C. M. (2016). Triage of LSIL/ASC-US with p16/Ki-67 dual staining and human papillomavirus testing: a 2-year prospective study. *Cytopathology*, 27(4), 269–276. <https://doi.org/10.1111/cyt.12317>

Wright, Jr., T. C., Stoler, M. H., Ranger-Moore, J., Fang, Q., Volkir, P., Safaeian, M., & Ridder, R. (2022). Clinical validation of p16/Ki-67 dual-stained cytology triage of HPV-positive women: Results from the IMPACT trial. *International journal of cancer*, 150(3), 461–471. <https://doi.org/10.1002/ijc.33812>

Отримано редакцією журналу / Received: 16.10.23

Прорецензовано / Revised: 17.11.23

Схвалено до друку / Accepted: 17.11.23

Maryna NOVOKHATSKA¹, Master's Student

ORCID ID: 0009-0008-5829-8248

e-mail: nvhtsk.mary@gmail.com

Olesia KALMUKOVA¹, PhD (Biol.), Assist.

ORCID ID: 0000-0001-5025-0938

e-mail: olesiakalmukova@knu.ua

Nataliia Skrypnyk¹, PhD (Biol.), Assoc. Prof.

ORCID ID: 0009-0003-8074-9547

e-mail: nataliia.skrypnyk@knu.ua

Oksana NEBYLTSOVA², PhD (Med.)

e-mail: oksana.nebyltsova@synevo.ua

¹Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

²Medical Laboratory LLC "Synevo Ukraine", Kyiv, Ukraine

DETECTION OF P16/KI-67 MARKERS IN THE DETECTION OF CERVICAL INTRAEPITHELIAL NEOPLASIA

Background. In recent years, Ukraine has experienced an unfavorable epidemiological situation concerning sexually transmitted diseases. One rapidly spreading infection is genital human papillomavirus (HPV). Convincing research has identified human papillomavirus (HPV) as a significant factor in the development of malignant transformations in the cervix. The study of the molecular pathogenesis associated with HPV-related neoplasms has led to the discovery of biomarkers aiding in the diagnosis of High-grade Squamous Intraepithelial Lesion (HSIL) of the cervix. Including the biomarkers p16/Ki-67 in the investigation enhances sensitivity in detecting HSIL in women. Additionally, it is pertinent to further analyze the effectiveness of using an additional semi-quantitative scale to assess the results of immunocytochemical detection of p16/Ki-67.

Methods. The research was conducted on biological material from cervical smears using liquid-based cytology. Techniques included Papanicolaou staining, HPV detection, and immunocytochemical staining against p16/Ki-67. The sample comprised 90 women divided into three age groups, each categorized based on criteria such as HPV presence/absence, Bethesda classification of dysplasia, and negative/positive p16/Ki-67 results. Intensity of staining was further scored on a scale in the corresponding location of positive reactions in the nucleus or cytoplasm.

Results. The study revealed that immunocytochemical markers p16 and Ki-67 identified women with intraepithelial lesions, especially in cases with positive HPV results and no dysplastic changes in the Pap test. The intensity of immunocytochemical staining for p16 and Ki-67 varied directly with the detected degree of dysplasia.

Conclusions. A direct correlation was observed between the severity of dysplasia established by Bethesda classification and the intensity of immunocytochemical staining for p16 and Ki-67. These findings provide an opportunity for further exploration of staining intensity in the presence of immunocytochemical markers p16 and Ki-67 for their potential use in the comprehensive interpretation of Pap test results and the precise identification of dysplasia in ambiguous diagnostic samples.

Keywords: cervical dysplasia, intraepithelial cancer, immunocytochemistry, Pap test, p16/Ki-67, Bethesda classification, human papillomavirus.

Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів. Спонсори не брали участі в розробленні дослідження; у зборі, аналізі чи інтерпретації даних; у написанні рукопису; в рішенні про публікацію результатів.

The authors declare no conflicts of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses or interpretation of data; in the writing of the manuscript; in the decision to publish the results.