

დავით ტვილდიანის სამედიცინო უნივერსიტეტი

ხელნაწერის უფლებით

სოფიო კაკალიაშვილი-მაგნიძე

**p16^{INK4a}/Ki-67 ორმაგი ბიომარკერების ექსპრესიის
თავისებურებები საშვილოსნოს ყელის
ციტოლოგიურ სადიაგნოსტიკო მასალაში და მათი
როლი საშვილოსნოს ყელის კიბოსწინარე
დაზიანების გამოვლენაში.**

მედიცინის დოქტორის აკადემიური ხარისხის
მოსაპოვებლად წარდგენილი დისერტაციის
ავტორეფერატი

თბილისი 2024

ნაშრომი შესრულდა დავით ტვილდიანი სამედიცინო უნივერსიტეტის, კლინიკა მედიკლაბ ჯორჯიას, მოზრდილთა და ბავშვთა სამეცნიერო-კვლევითი ცენტრის და დიაგნოსტიკური ცენტრ ციტოგენის ბაზაზე.

სამეცნიერო ხელმძღვანელები:

1. **ომარ ხარბეიშვილი** - მედიცინის მეცნიერებათა დოქტორი, პროფესორი, თბილისის სახელმწიფო სამედიცინო უნივერსიტეტი.
2. **სერგო თაბაგარი** - მედიცინის მეცნიერებათა დოქტორი, პროფესორი, დავით ტვილდიანის სამედიცინო უნივერსიტეტი.

ოფიციალური ოპონენტები:

დინარა კასრაძე - მედიცინის მეცნიერებათა დოქტორი, პროფესორი, დავით ტვილდიანის სამედიცინო უნივერსიტეტი.

ალექსანდრე თავართქილაძე - მედიცინის მეცნიერებათა დოქტორი, ასოცირებული პროფესორი, თბილისის სახელმწიფო სამედიცინო უნივერსიტეტი.

თინათინ გაგუა - მედიცინის მეცნიერებათა დოქტორი, ასოცირებული პროფესორი, დავით ტვილდიანის სამედიცინო უნივერსიტეტი.

დისერტაციის გაცნობა შესაძლებელია დავით ტვილდიანის სამედიცინო უნივერსიტეტის დეფნი ჰეარის სახელობის ბიბლიოთეკაში.

დისერტაციის დაცვა შედგება 2024 წლის _____ საათზე დავით ტვილდიანის სახელობის სამედიცინო უნივერსიტეტის (მისამართი: 0159, თბილისი, ლუბლიანას 13/ მიხეილ ჭიაურელის ქუჩა 6) საკონფერენციო დარბაზში.

ავტორეფერატი დაიგზავნა 2024 წლის _____

სწავლული მდივანი
მედიცინის დოქტორი **მარიამ ვაჩნაძე**

ნაშრომის ზოგადი მდგომარეობა

პრობლემის აქტუალურობა

კიბოსწინარე დაზიანებების ადრეულმა გამოვლენამ შეიძლება მნიშვნელოვნად შეამციროს კიბოთი გამოწვეული ავადობის და სიკვდილობის ტვირთი. საშვილოსნოს ყელის კიბოს სკრინინგისას ციტოლოგიურ სადიაგნოსტიკო მასალაში კიბოსწინარე დაზიანების ობიექტურად აღმოჩენის კუთხით, ლიტერატურაში დღემდე არსებული სამეცნიერო შრომების ანალიზის შედეგად, ამ დრომდე არ არსებობს უჯრედული ბიომარკერების ფართოდ გამოყენების შესახებ მკაფიო რეკომენდაციები, რაც განპირობებულია სკრინინგის პათოლოგიური შედეგების მქონე ქალების ცერვიქსიდან აღებულ ციტოლოგიურ მასალაში ერთდროულად კონვენციური ციტოლოგიის და იმუნოციტოქიმიური შედეგების შესახებ პროსპექტული კვლევების სიმცირით, ციტოლოგიურ მასალაში მორფოლოგიურ მახასიათებლებთან ერთად ბიომარკერების ექსპრესიის მიხედვით პროსპექტული კვლევების სიმცირით, შედეგების არაერთგვაროვანობითა და საკვლევი ჯგუფის მცირე ზომით. შესაბამისად, დასკვნები არ იძლევა საშვილოსნოს ყელის კიბოსწინარე დაზიანების არსებული ციტო-ჰისტოპათოლოგიური კლასიფიკაციის და სკრინინგში ჩართული ქალების მართვის ალგორითმის გაუმჯობესების შესაძლებლობას. ციტომორფოლოგიის დაბალი სენსიტიურობის (Colgan et.al.2001) და HPV ტესტირე-

ბის დაბალი სპეციფიკურობის (Schiffman et.al.2007) გამო, ქვეყნებში, სადაც სკრინინგით მოცვა დაბალია და სკრინინგული მასალის რეფერალის შესაძლებლობა შეზღუდულია საქართველოს მსგავსად, ახალგაზრდა რეპროდუქციული ასაკის ქალებში სკრინინგისას განმეორებითი პათოლოგიური (LSIL/ASC-US, დაბალი ხარისხის ბრტყელუჯრედოვანი ინტრაეპითელიური დაზიანება/ატიპური ბრტყელი ეპითელიოციტები განუსაზღვრელი მნიშვნელობის ატიპიით) შედეგების შემთხვევაში არცთუ იშვიათია საშვილოსნოს ყელზე არასაჭირო ინსტრუმენტული ჩარევა (Habbema et.al.2017), მეორეს მხრივ, ფარული კიბოსწინარე დაზიანების არასა-თანადო შეფასების გამო მაღალია ინვაზიური კიბოს განვითარების რისკი. მიღწეული შედეგების მიუხედავად, საშვილოსნოს ყელის კიბოს სკრინინგის მდგრადი გაიდლაინი ჯერ კიდევ საჭიროებს დახვეწას. აქედან გამომდინარე, გადაწყვიტეთ, საშვილოსნოს ყელის კიბოს სკრინინგისას განმეორებითი ციტოპათოლოგიური შედეგების მქონე ქალების ციტოლოგიურ სადიაგნოსტიკო მასალაში შეგვესწავლა უჯრედული ციკლის მარეგულირებელი p16^{INK4a} (შემდგომში p16) და უჯრედის პროლიფერაციის ინდიკატორი Ki-67 ცილების (ბიომარკერების) (Petry et.al.2011) ექსპრესიის თავისებურებები და მათი როლი კიბოსწინარე დაზიანების გამოვლენაში.

კვლევის მიზანი

ჩვენი კვლევის მიზანია ბიომარკერებზე დაფუძნებული, არაინვაზიური, ობიექტური მეთოდოლოგიით საშვილოსნოს ყელის კიბოსწინარე დაზიანების დროული აღმოჩენის შესაძლებლობის დადგენა და ციტოლოგიური სკრინინგისას შესაძლო ციტომორფოლოგიური შეცდომების პრევენციითა და საშვილოსნოს ყელის კიბოს სკრინინგის ამჟამინდელი გაიდლაინის რეკომენდაციების გაუმჯობესებით, საშვილოსნოს ყელის კიბოთი გამოწვეული სიკვდილობის, ასევე რეპროდუქციული ასაკის ქალებში საშვილოსნოს ყელზე არასაჭირო ინტერვენციების შემცირება.

კვლევის ამოცანები

კვლევის ამოცანებს შეადგენს:

- საშვილოსნოს ყელის კიბოს სკრინინგში ჩართული ქალების საშვილოსნოს ყელის ციტოლოგიური სადიაგნოსტიკო მასალის p16/Ki-67 ორმაგი იმუნოციტოქიმიური მეთოდით შეღებვა და ცერვიკალურ ეპითელურ უჯრედებში ბიომარკერების ექსპრესიის შესწავლა.
- საშვილოსნოს ყელის ციტოლოგიურ სადიაგნოსტიკო მასალაში p16 და Ki-67 ბიომარკერების ექსპრესიასთან ერთად შეღებილი უჯრედების ციტომორფოლოგიური

მახასიათებლებლების შესწავლით, მიღებული შედეგების კატეგორიზაცია.

- საშვილოსნოს ყელის ციტოლოგიურ სადიაგნოსტიკო მასალაში p16 და Ki-67 ბიომარკერების ექსპრესიის ანალიზი და შედეგების შედარება კონვენციური ციტოლოგიის შედეგებთან, დიაგნოზის ოქროს სტანდარტად ჰისტოპათოლოგიის შედეგების გათვალისწინებით.
- ციტოლოგიური სადიაგნოსტიკო მასალის იმუნოციტოქიმიური და ციტოპათოლოგიური შედეგების შესწავლის გათვალისწინებით, სკრინინგის გრძელვადიან შედეგებზე დაკვირვება.

ნაშრომის სამეცნიერო სიახლე

საქართველოში ამ დრომდე არ განხორციელებულა ოპორტუნისტულ სკრინინგში ჩართული ქალების საშვილოსნოს ყელის ციტოლოგიურ სადიაგნოსტიკო მასალაში ბიომარკერების ექსპრესიის შესახებ კვლევა.

პირველად ჩვენს კვლევაში განხორციელდა ოპორტუნისტული სკრინინგის მონაწილე, პათოლოგიური პაპ ტესტის შედეგების მქონე ქალების განმეორებითი სკრინინგისას, საქართველოში არსებულ ცხრა სამედიცინო ცენტრში შეგროვებულ ცერვიკალურ ციტოლოგიურ მასალაში პაპ ტესტის პარალელურად, ორმაგი

იმუნოციტოქიმიური შეღებვა და ბიომარკერების ექსპრესიის შესწავლა სამ ლაბორატორიაში, დამოუკიდებელი ექსპერტების მიერ.

საკვლევი ჯგუფის მცირე ზომის მიუხედავად, ჩვენს კვლევაში გამოვლინდა, რომ ცერვიკალური ციტოლოგიური მასალის ეპითელურ უჯრედებში ორი ბიომარკერის p16/Ki-67 ერთდროული ექსპრესია, შეღებილი უჯრედების მორფოლოგიის მიუხედავად და დიაგნოზის ოქროს სტანდარტად ჰისტოპათოლოგიური შედეგების გათვალისწინებით, მტკიცედ სარწმუნოა და ორმაგი p16/Ki-67 იმუნოციტოქიმიით მაღალი ხარისხის კიბოსწინარე დაზიანების აღმოჩენის მგრძნობელობის მაჩვენებელი უფრო მაღალია, სხვა მსგავსი ტიპის კვლევებთან შედარებით.

პირველად ჩვენს კვლევაში განხორციელდა ორმაგი იმუნოციტოქიმიით შეღებილ საშვილოსნოს ციტოლოგიური სადიაგნოსტიკო მასალის ეპითელურ უჯრედებში სხვადასხვა შეღებვის გამოვლენის (p16 და/ან Ki-67) და მორფოლოგიური მახასიათებლების (უჯრედებში ბირთვ/ციტოპლაზმის ფარდობის) შედეგების გათვალისწინებით კატეგორიების შექმნა და მათ შორის კორელაციის შესწავლა, ასევე ეპითელურ უჯრედებში სხვადასხვა შეღებვის გამოვლენის და ანთებითი ინფილტრატის შედეგების

გათვალისწინებით შექმნილ კატეგორიებს შორის კორელაციის შესწავლა.

პირველად ჩვენს კვლევაში განხორციელდა ოპორტუნისტულ სკრინინგში ჩართული ქალების ცერვიკალური ციტოლოგიური სადიაგნოსტიკო მასალის იმუნოციტოქიმიური მეთოდით გამოკვლევიდან 3-10 წლის შემდეგ, კვლევაში ჩართული ქალების ციტოლოგიური სკრინინგის შედეგების შეფასება.

ნაშრომის თეორიული და პრაქტიკული ღირებულება

რისკის მქონე პოპულაციაში, ობიექტური დიაგნოსტიკური მეთოდით ინვაზიური ჩარევის გარეშე საშვილოსნოს ყელის კიბოს კლინიკამდელი დაზიანების ნაადრევი გამოვლენა ერთის მხრივ კიბოს თავიდან აცილების, მეორეს მხრივ რეპროდუქციული ჯანმრთელობის შენარჩუნებისთვის უმნიშვნელოვანესი სტრატეგიაა. ვფიქრობთ, ჩვენი კვლევის შედეგები შეავსებს მოლეკულური ბიოლოგიისა და ციტოლოგიის ურთიერთკავშირის შესახებ არსებულ ფუნდამენტურ ცოდნას და გააუმჯობესებს საშვილოსნოს ყელის სკრინინგისას ციტოლოგიის დიაგნოსტიკურ ღირებულებას. ვფიქრობთ, რომ ჩვენი კვლევის შედეგები, საშვილოსნოს ყელის ციტოლოგიურ სადიაგნოსტიკო მასალაში უჯრედის ციკლის მარეგულირებელი და პროლიფერაციის ინდიკატორი ცილების ექსპრესიის თვისებებების შესწავლით,

წვლილს შეიტანს კიბოსწინარე დაზიანების მექანიზმების შესახებ ფუნდამენტური ცოდნის გაღრმავებაში.

ჩვენი კვლევის შედეგებს შესაძლოა პრაქტიკული ღირებულება ჰქონდეს ობიექტურ კრიტერიუმზე დაფუძნებული საშვილოსნოს ყელის კიბოსწინარე დაზიანების დროული გამოვლენის, და ასევე, სკრინინგ პოპულაციის ეფექტური ტრიაჟისა და მართვის კუთხით. ჩვენი კვლევის შედეგები შესაძლოა საფუძვლად დაედოს საშვილოსნოს ყელის კიბოსწინარე დაზიანების ციტო-ჰისტოპათოლოგიური კლასიფიკაციის და სკრინინგში ჩართული ქალების მართვის ალგორითმის გაუმჯობესებას, შედეგად ახალგაზრდა ქალებში რეპროდუქციული ჯანმრთელობის რისკების და საშვილოსნოს ყელის კიბოთი გამოწვეული ტვირთის შემცირებას.

ნაშრომის აპრობაცია

დისერტაციის აპრობაცია შედგა დავით ტვილდიანის სამედიცინო უნივერსიტეტში 2023 წლის 7 დეკემბერს.

სადისერტაციო ნაშრომის მასალები და შედეგები ეტაპობრივად მოხსენებულ იქნა:

1. საქართველოს პათოლოგთა ასოციაციის სიმპოზიუმზე, თბილისი, საქართველო 2011წ.

2. ცენტრალური ევროპის რეგიონალურ კონგრესზე, „ქალთა ჯანმრთელობის თანამედროვე საკითხები“, ბათუმი, საქართველო, 2012.
3. First International conference of “women’s rehabilitation association” (WRA), Healthy family, healthy pregnant woman, healthy child.” Tbilisi, Georgia. 2012.
4. დავით ტვილდიანის სამედიცინო უნივერსიტეტის სტუდენტთა და ახალგაზრდა მეცნიერთა ასოციაციის პირველ სამეცნიერო კონფერენციაზე, საქართველო. 2013.
5. დავით ტვილდიანის სამედიცინო უნივერსიტეტის სტუდენტთა და ახალგაზრდა მეცნიერთა ასოციაციის მეორე სამეცნიერო კონფერენციაზე, თბილისი, საქართველო. 2014.
6. საქართველოს ექიმ ქალთა ასოციაციის სიმპოზიუმზე, თბილისი, საქართველო, 2015.
7. დავით ტვილდიანის სამედიცინო უნივერსიტეტის სტუდენტთა და ახალგაზრდა მეცნიერთა ასოციაციის მეთერთმეტე სამეცნიერო კონფერენციაზე „ნობელის დღე“, თბილისი, საქართველო. 2022.
8. GAU International Scientific Conference ‘Build a Better Future Today with Science’, თბილისი, საქართველო. 2022.
9. 2nd International Conference on Global Advanced Nursing and Healthcare August 11-12, 2023 | London, UK.

10. TMA International Scientific Conference -Medicine: Innovations and Challenges 2023, (Conference has been accredited by EACCME ® with 15 European CME credits). თბილისი, საქართველო. 30.11.2023

თემაზე მუშაობის პერიოდში ჩატარებული აქტივობები:

1. p16/Ki-67 ორმაგი იმუნოციტოქიმიური მეთოდოლოგიის შესწავლა, სერტიფიცირებული სპეციალისტი, 2011 mtm Laboriatories AG, Heidelberg, Germany.
2. 2011-2013 წლებში ორმაგი იმუნოციტოქიმიური მეთოდოლოგიის დანერგვა პირველად საქართველოში შემდეგ სამედიცინო ცენტრებში: 1) კლინიკა მედიკლბ ჯორჯია; 2) მოზრდილთა და ბავშვთა სამეცნიერო-კვლევითი ცენტრი; 3) დიაგნოსტიკური ცენტრი ციტოგენი.
3. ქსოვილოვან და ციტოლოგიურ სადიაგნოსტიკო მასალაზე დაყრდნობით მორფოლოგიური, იმუნოციტო/ჰისტოქიმიური, მათ შორის ორმაგი იმუნოციტოქიმიის დიაგნოსტიკის პრაქტიკული უნარ-ჩვევების სწავლების დანერგვა, ქართულ-ამერიკული უნივერსიტეტის მედიცინის სკოლა, პათოლოგიის ლაბორატორია; 2022.

4. American Society for Colposcopy and Cervical Pathology (ASCCP)-ის სამუშაო ჯგუფის მიერ შემუშავებული “Enduring Consensus Cervical Cancer Screening and Management Guidelines with use of *of p16/ki-67 Dual Stain*” ფარგლებში p16/Ki-67 ორმაგი იმუნოციტოქიმიის გამოყენების რეკომენდაციების განხილვაში მონაწილეობა. June 1, 2023.

<https://www.asccp.org/PublicComments2023>

სადისერტაციო თემის ირგვლივ გამოქვეყნებულია 5 სამეცნიერო სტატია და ერთი აბსტრაქტი.

დისერტაციის სტრუქტურა და მოცულობა

დისერტაცია შედგება 7 ნაწილისგან: შესავალი, სამეცნიერო ლიტერატურის მიმოხილვა, კვლევის მასალა და მეთოდები, საკუთარი კვლევის შედეგები, საკუთარი კვლევის შედეგების განსჯა, დასკვნები, პრაქტიკული რეკომენდაციები. ნაშრომს თან ახლავს გამოყენებული ლიტერატურის ნუსხა და დანართები.

ნაშრომი მოიცავს 100 ნაბეჭდ გვერდს, ილუსტრირებულია 18 სურათით, 14 დიაგრამით და 15 ცხრილით. ნაშრომს თან ახლავს 9 დანართი. ლიტერატურული ნუსხის ჩამონათვალი მოიცავს 97 წყაროს.

კვლევის მასალა და მეთოდები

ჩვენს მიერ ჩატარებული კვლევა ჯვარედინ-სექციური დიზაინისაა. შვეისწავლეთ 21-დან 65 წლის ჩათვლით იმ ქალების ცერვიკალური მასალა, რომელთაც პაპ ტესტის პათოლოგიური შედეგების გამო, საშვილოსნოს ყელის კიბოს სკრინინგ-პროგრამის ფარგლებში, განმეორებითი ტესტირებისთვის მიმართეს გინეკოლოგიური სერვისის განმახორციელებელ კლინიკებს.

საშვილოსნოს ყელის ციტოლოგიური სადიაგნოსტიკო მასალა შვეისწავლეთ p16/Ki-67 ორმაგი იმუნოციტოქიმიით (პირველად საქართველოში), მოვახდინეთ მიღებული შედეგების და ასევე რუტინული ცერვიკალური სკრინინგის პათომორფოლოგიური კვლევების შედეგების ანალიზი. რეფერენს სტანდარტს წარმოადგენდა ცერვიკალური ბიოფსიური მასალის H&E ჰისტოპათოლოგიის შედეგები. კვლევის ფარგლებში შვეისწავლეთ 162 შემთხვევის (ქალის) პაპ ტესტის, 29 შემთხვევის ჰისტოპათოლოგიის და 33 შემთხვევის HPV-PCR ტესტის შედეგი. ბიომარკერების ექსპრესიაზე შეფასება განხორციელდა სამ სამედიცინო ცენტრში, დამოუკიდებელი პათოლოგების მიერ.

ცერვიკალური მასალის აღებისას გათვალისწინებული იყო იმუნოციტოქიმიური კვლევისთვის ნაცხის აღების ყველა სათანადო მეთოდოლოგია. საშვილოსნოს ყელის ციტოლოგიური მასალის ორმაგ p16/Ki-67 ბიომარკერებზე იმუნოციტოქიმიური გამოკვლევა განხორციელდა CINtec PLUS Kit-ის გამოყენებით (REF

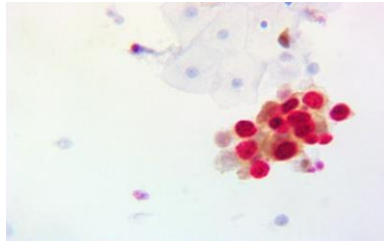
9531, mtm laboratories, Heidelberg, Germany) მწარმოებლის ინსტრუქციის მიხედვით. სლაიდების შეღებვისას გამოყენებული იქნა Shandon Coverplate TM სისტემა. საშვილოსნოს ყელის ბიოფსიური ნიმუშების p16 იმუნოჰისტოქიმიური გამოკვლევა ჩატარდა CINtec ჰისტოლოგიური ნაკრების გამოყენებით (REF 9511, mtm laboratories, Heidelberg, Germany) მწარმოებლის ინსტრუქციის მიხედვით. ცერვიკალური მასალის შეგროვებისას გათვალისწინებული იყო კვლევაში ჩართვის კრიტერიუმები. საშვილოსნოს ყელის კიბოს სკრინინგის შედეგებზე მეთვალყურეობა განხორციელდა 2014-2023 წლების განმავლობაში. კვლევა განხორციელდა დავით ტვილდიანის სამედიცინო უნივერსიტეტის 2011 წლის ბიოეთიკური კომისიის დასკვნის საფუძველზე. პაციენტთა საშვილოსნოს ყელის პათომორფოლოგიური დიაგნოზების, ასევე სხვა კლინიკური მონაცემების შეგროვება განხორციელდა კლინიკებში სამედიცინო ისტორიების საფუძველზე, შესაბამისი კლინიკების ბიოეთიკური კომისიების გადაწყვეტილების გათვალისწინებით.

საკუთარი კვლევის შედეგები

იმუნოშეღებვის შედეგები და შედეგების კატეგორიზაცია

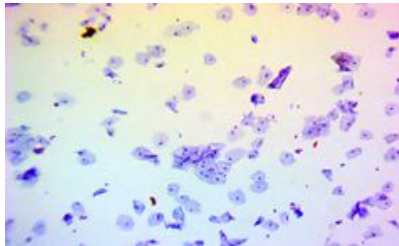
მწარმოებლის ინსტრუქციის მიხედვით, ჩვენს მიერ p16/Ki-67 DS იმუნოციტოქიმიური მეთოდით შეღებილი სლაიდების სინათლის მიკროსკოპული გამოკვლევით ინტერპრეტაციისას,

ეპითელური უჯრედში ციტოპლაზმის ყავისფერი(p16) და ამავედროულად ბირთვის წითელი (Ki-67) შეღებვა ერთზე მეტ უჯრედულ კლასტერში შეფასებული იქნა როგორც p16/Ki-67 DS დადებითი, ხოლო სლაიდზე უჯრედის ციტოპლაზმის და ბირთვის ერთდროულად სხვადასხვა შეღებვის არარსებობა შეფასებული იქნა როგორც p16/Ki-67 DS უარყოფითი შედეგი.



სურათი N1.

p16/Ki-67 DS დადებითი, უჯრედული ატიპიით; x 400 გადიდება



სურათი N2.

p16/Ki-67 DS უარყოფითი, უჯრედული ატიპიის გარეშე; x 100 გადიდება

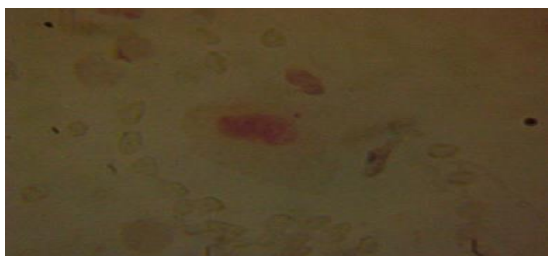
იმუნოციტოშელეზასთან ერთად, ჩვენ მოვახდინეთ შეღებილი ეპითელური უჯრედების შეფასება უჯრედის ბირთვის მიხედვით ქულობრივი შეფასებით Wentzensen-ის და კოლეგების მიერ შემუშავებული კრიტერიუმების გათვალისწინებით (90). ეს მახასიათებლებია Increased nuclear/cytoplasmic ratio, Chromatin granule, Irregular nuclear shape, and Anisonucleosis (გაზრდილი ბირთვულ/ციტოპლაზმური თანაფარდობა, ქრომატინის გრანულები, ბირთვის არარეგულარული ფორმა და ანიზონუკლეოზი). ბირთვის მახასიათებლის მიხედვით, ზემოთ ჩამოთვლილი ერთი და მეტი მახასიათებლის არსებობა შეესაბამებოდა დისპლაზიისთვის დამახასიათებელი უჯრედის ატიპურ კატეგორიას, ხოლო არც ერთი კატეგორიის არსებობა შეესაბამებოდა ატიპიის გარეშე კატეგორიას. იმუნოციტოშელეზის შედეგებთან ერთად ეპითელური უჯრედების ზემოთ აღნიშნული მორფოლოგიური მახასიათებლების გათვალისწინებით, ციტოლოგიური სლაიდების შემდეგი კატეგორიები შევქმენით:

- p16/Ki-67 DS დადებითი, შეღებილი უჯრედები ატიპიით ან მის გარეშე კატეგორია;
- p16/Ki-67 DS უარყოფითი: ა) p16 შეღებვის გამოვლენით (p16 დადებითი), შეღებილი უჯრედები ატიპიით ან მის გარეშე კატეგორია; ბ) Ki-67 შეღებვის გამოვლენით (Ki-67 დადებითი), შეღებილი უჯრედები ატიპიით ან მის

გარეშე კატეგორია; გ) ცალ-ცალკე p16 და Ki-67 შეღებვის გამოვლენით (ორმაგი შეღებვის გარეშე), ატიპიით ან მის გარეშე კატეგორია; დ) უჯრედები შეღებვის გამოვლენის გარეშე, ატიპიით ან მის გარეშე კატეგორია.

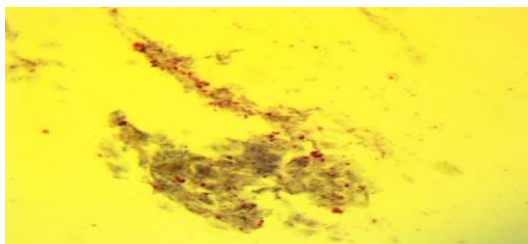
თითოეულ კატეგორიაში შევისწავლეთ ანთებითი ინფილტრატის არსებობა.

კატეგორიები წარმოდგენილია დიაგრამაზე N1, სურათებზე N1-7.



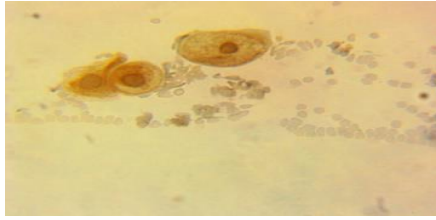
სურათი N3.

p16/Ki-67 DS დადებითი, უჯრედული ატიპიის გარეშე. x 400 გადიდება



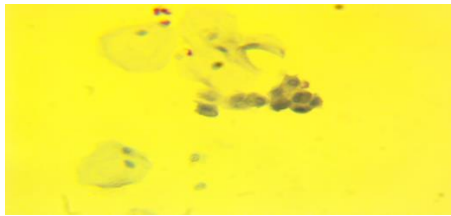
სურათი N4.

p16/Ki-67 DS უარყოფითი, ცალ-ცალკე p16 და Ki-67 შეღებვა.
x 100 გადიდება



სურათი N6.

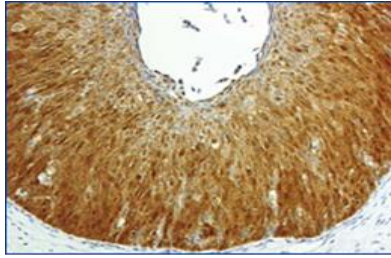
p16/Ki-67 DS უარყოფითი, p16 შეღებვა უჯრედული ატიპიით. x 400
გადიდება



სურათი N7.

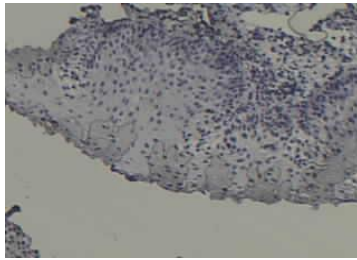
p16/Ki-67 DS უარყოფითი, უჯრედული ატიპიით. x 400 გადიდება

საშვილოსნოს ყელის ორაზროვანი ჰისტოპათოლოგიის დიაგნოზის შემთხვევაში, შესაბამისი პარაფინის ბლოკიდან მიღებული ჰისტოლოგიური მასალის p16 იმუნოჰისტოქიმიით (IHC) შეღებვისას შედეგების ინტერპრეტაცია გავნახორციელეთ LAST კვლევის შედეგების შესაბამისად (Darragh et.al.2012), სადაც p16 IHC დადებითი შედეგი (სურათი N12) შეესაბამებოდა HSIL-ს (მაღალი ხარისხის ბრტყელუჯრედოვანი ინტრაეპითელური დაზიანება), ხოლო უარყოფითი p16 IHC შედეგი (სურათი N12) შეესაბამებოდა <CIN1-ს.



სურათი N11.

p16 IHC დადებითი. x 100 გადიდება



სურათი N12.

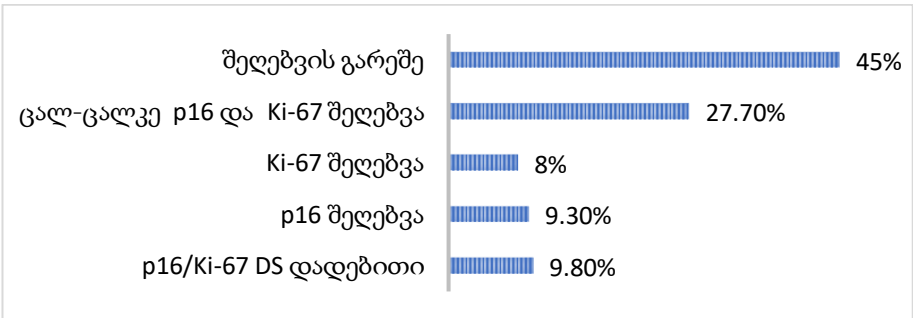
p16 IHC უარყოფითი. x 100 გადიდება

კვლევის შედეგების სტატისტიკური ანალიზი

კვლევაში ჩართვის კრიტერიუმების გათვალისწინებით, მიღებული მონაცემები შეტანილი იქნა მონაცემთა ბაზაში და ჩატარდა სტატისტიკური ანალიზი. მონაცემები გაანალიზებულია SPSS პროგრამით (IBM Corp. Released 2011. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0. Armonk, NY: IBM Corp.). კატეგორიულ ცვლადებს შორის შედარებისთვის გამოყენებული იქნა χ^2 ტესტი, ფიშერის ზუსტი ტესტი, Cohen's kappa (κ) სტატისტიკა,

მონაცემებთან შესაფერისობის გათვალისწინებით. საშვილოსნოს ყელის ციტოლოგიური სადიაგნოსტიკო მასალის იმუნოციტოქიმიური და ციტომორფოლოგიური მეთოდოლოგიებით შესწავლისას მაღალი ხარისხის დისპლაზიის (CIN2+) აღმოჩენის სიზუსტე შეფასდა დიაგნოსტიკური ტესტების მგრძობელობის, სპეციფიკურობის, დადებითი (PPV) და უარყოფითი (NPV) პრედიქტული სიდიდეების და სიზუსტის (Accuracy) გაზომვით, დიაგნოზის ოქროს სტანდარტად ჰისტოპათოლოგიური შედეგის გათვალისწინებით.

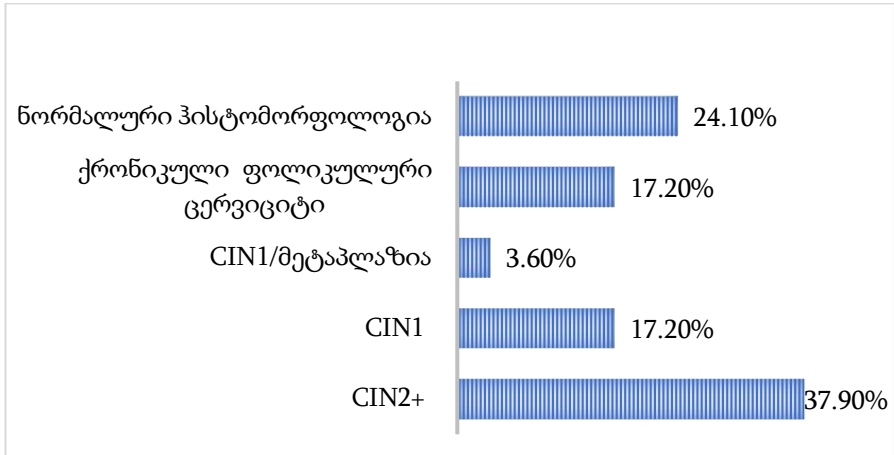
ჩვენს კვლევაში ცერვიკალური ციტოლოგიური მასალის p16/Ki-67 DS იმუნოციტოქიმიური მეთოდით სლaidების შეღებვის კატეგორიები მოცემულია დიაგრამაზე N1. სამ დამოუკიდებელ პათოლოგს შორის, ციტოლოგიური სლaidების p16/Ki-67 ორმაგი იმუნოციტოქიმიური შეღებვის შეფასებისას, დიაგნოზის კონსენსუსი იყო 100%.



დიაგრამა N1.

ცერვიკალური ციტოლოგიური მასალის p16/Ki-67 იმუნოციტოქიმიით შეღებვის სხვადასხვა კატეგორიები

საშვილოსნოს ყელის ბიოფსიური მასალის H&E ჰისტოპათოლოგიური შედეგები მოცემულია დიაგრამაზე N2;



დიაგრამა N2.

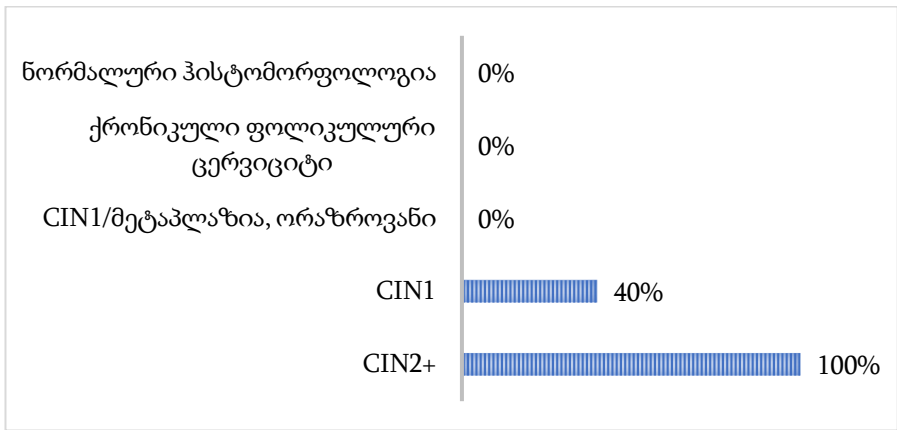
H&E ჰისტოპათოლოგიის შედეგების განაწილება.

საშვილოსნოს ყელის ციტოლოგიურ მასალაში, განურჩევლად შეღებილი უჯრედების მორფოლოგიისა, p16/Ki-67 DS დადებითი შედეგები და შესაბამისი ცერვიკალური ბიოფსიური მასალის H&E ჰისტოპათოლოგიური შედეგები მოცემულია ცხრილში N1, დიაგრამაზე N3.

H&E ჰისტოპათოლოგია	H&E ჰისტოპათოლოგია, რაოდენობა	განურჩევლად შეღებილი უჯრედების მორფოლოგიისა p16/Ki-67 DS დადებითი იმუნოციტოქიმიის შედეგების რაოდენობა	დადებითი ორმაგი შეღების პროცენტული განაწილება
CIN2+	11	11	100%
CIN1	5	2	40%
CIN1/მეტაპლაზია (ორაზროვანი)	1	0	0%
ქრონიკული ფოლიკულური ცერვიციტი	5	0	0%
ნორმალური ჰისტოლოგია	7	0	0%
სულ	29	13	

ცხრილი N1.

განურჩევლად შეღებილი უჯრედების მორფოლოგიისა, p16/Ki-67 DS დადებითი იმუნოციტოქიმიის და H&E ჰისტოპათოლოგიის შედეგები



დიაგრამა N3.

განურჩევლად შეღებილი უჯრედების მორფოლოგიისა, p16/Ki-67 DS დადებითი იმუნოციტოქიმიის შედეგებისას H&E ჰისტოპათოლოგიის შედეგების პროცენტული განაწილება

ჩვენი კვლევის შედეგების ანალიზით, ცერვიკალურ ციტოლოგიურ სადიაგნოსტიკო მასალაში ეპითელური უჯრედების მორფოლოგიური მახასიათებლების განურჩევლად, p16/Ki-67 ორმაგი ბიომარკერების ექსპრესიასა და ჰისტოპათო-ლოგიურად CIN2+ დაზიანებას შორის სარწმუნო კორელაცია გამოვლინდა, $p < 0,001$, ცხრილი N2.

	<i>p</i> სიდიდე
განურჩევლად შეღებილი უჯრედების მორფოლოგიისა, p16/Ki-67DS იმუნოციტოქიმიის და H&E CIN2+ შორის კორელაცია	$p=2,5 \times 10^{-6} \ll 0,001$
უჯრედული ატიპიით p16/Ki-67DS იმუნოციტოქიმიის და H&E CIN2+ შორის კორელაცია	$p=5,75 \times 10^{-6} \ll 0,001$

ცხრილი N2.

p16/Ki-67DS იმუნოციტოქიმიის და H&E CIN2+ შორის კორელაცია, *p* სიდიდე

უჯრედული ატიპიით დადებითი p16/Ki-67 DS იმუნოციტოქიმიის და შესაბამისი ბიოფსიური მასალის H&E ჰისტოპათოლოგიის შედეგები მოცემულია ცხრილში N3.

ჰისტოპათოლოგია, n	p16/Ki-67 DS დადებითი იმუნოციტოქიმიის, უჯრედული ატიპიით
CIN1 n=5	1
CIN1/მეტაპლაზია n=1	0
CIN2+ n=11	10
ქრონიკული ფოლიკულური ცერვიციტი n=5	0

ცხრილი N3.

H&E ჰისტოპათოლოგიის და უჯრედული ატიპიით p16/Ki-67 DS დადებითი იმუნოციტოქიმიის შედეგების დისტრიბუცია

ცერვიკალურ ციტოლოგიურ სადიაგნოსტიკო მასალაში იმუნოციტოქიმიით შეღებილი უჯრედების ატიპურობის გათვალისწინებით, p16/Ki-67 ორმაგი მარკერების ექსპრესიასა და ჰისტოპათოლოგიურად CIN2+ დაზიანებას შორის სარწმუნო კორელაცია გამოვლინდა, $p < 0,001$, ცხრილი N2.

ჩვენს კვლევაში, საშვილოსნოს ციტოლოგიურ სადიაგნოსტიკო მასალაში p16/Ki-67 DS იმუნოციტოქიმიით მაღალი ხარისხის დისპლაზიის (CIN2+) გამოვლენის მგრძობელობა, სპეციფიკურობა, PPV, NPV და სიზუსტე (Accuracy), დიაგნოზის ოქროს სტანდარტად ჰისტოპათოლოგიის გათვალისწინებით მოცემულია ცხრილში N4.

ჰისტოპათოლოგიის მიხედვით CIN2+ აღმოჩენის შესაძლებლობა	სენსიტიურობა % (95% CI)	სპეციფიკურობა % (95% CI)	PPV %	NPV %	სიზუსტე (Accuracy)
განურჩევლად შეღებილი უჯრედების მორფოლოგიისა p16/Ki67DS დადებითი იმუნოციტოქიმი	100	89	85	100	93
უჯრედული ატიპიით p16/Ki67DS დადებითი იმუნოციტოქიმი	91	94	91	94	93
პაპ ტესტი	9	100	85	64	66

ცხრილი N4.

p16/Ki67DS იმუნოციტოქიმიით CIN2+ აღმოჩენის სენსიტიურობა, სპეციფიკურობა, PPV, NPV და სიზუსტე(Accuracy)

ჩვენი კვლევისას, ცერვიკალურ ციტოლოგიურ მასალაში იმუნოციტოქიმიურ მახასიათებელთან ერთად შეღებილი უჯრედის მორფოლოგიური მახასიათებლის გათვალისწინებით შედეგების შეფასებისას, გაუმჯობესდა საშვილოსნოს ყელის მაღალი ხარისხის დისპლაზიის აღმოჩენის სპეციფიკურობა, PPV და NPV, თუმცა შემცირდა სენსიტიურობა, ხოლო სიზუსტე (Accuracy) დარჩა უცვლელი. მორფოლოგიური მახასიათებლების გათვალისწინებით შედეგების შეფასებისას გამოვლინდა „შეცდომა ტიპი 1“ (Type 1 error). აღსანიშნავია, რომ ციტოტექნოლოგსა და პათოლოგებს შორის p16/Ki-67 DS იმუნოციტოშეღებვის შედეგების შეფასებისას ინტერპრეტაციის ვარიაბელობა არ გამოვლენილა, თუმცა შედეგების ვარიაბელობა გამოვლინდა მარკერების ექსპრესიასთან ერთად მორფოლოგიური შეფასების კომპონენტის დამატების შემთხვევაში.

ერთი შემთხვევის გარდა, p16/Ki-67 DS დადებითი იმუნოციტოქიმიის ყველა შემთხვევაში, სადაც შესაბამისი ბიოფსიური მასალის H&E ჰისტოპათოლოგიის შედეგი CIN2+ იყო, ციტოლოგიური მასალის ორმაგად შეღებილ უჯრედებში გამოვლინდა უჯრედული ატიპია. ამავე დროს, დადებითი p16/Ki-67 DS იმუნო-ციტოლოგიური სლაიდის ორ შემთხვევაში, რომელშიც შესაბამისი ქსოვილოვანი მასალის H&E ჰისტოპათოლოგიის შედეგი CIN1 იყო, ერთ შემთხვევაში უჯრე-

დული ატიპიით p16/Ki-67 DS დადებითი იმუნოციტოქიმიის შედეგი, ხოლო მეორე შემთხვევაში უჯრედული ატიპიის გარეშე p16/Ki-67 DS დადებითი იმუნოციტოქიმიის შედეგი გამოვლინდა, ცხრილი N5.

ჰისტოპათოლოგია	p16/Ki-67 DS იმუნოციტოქიმია დადებითი, უჯრედული ატიპიის გარეშე
CIN1 n=5	1
CIN1/მეტაპლაზია n=1	0
CIN2+ n=11	1
ქრონიკული ფოლიკულური ცერვიციტი n=5	0

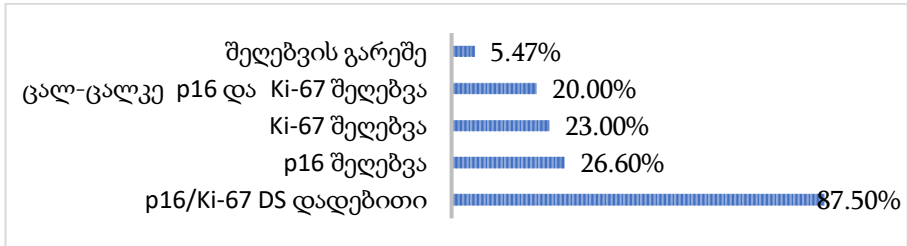
ცხრილი N5.

H&E ჰისტოპათოლოგიის და უჯრედული ატიპიის გარეშე p16/Ki-67 DS დადებითი იმუნოციტოქიმიის შედეგების დისტრიბუცია

კვლევაში ჩართული ქალების ასაკობრივ კატეგორიებად დაჯგუფებით, საშვილოსნოს ყელის ციტოლოგიურ სადიაგნოსტიკო მასალაში p16/Ki-67 DS დადებითი შედეგი 28-50 წლის ასაკობრივ შუალედში გამოვლინდა. ცერვიკალურ სადიაგნოსტიკო მასალაში p16/Ki-67 ორმაგი ბიომარკერების ექსპრესიის ცვლადზე ქალის ასაკის ზეგვლენა არ გამოვლინდა ($p>0,05$). თუმცა p16/Ki-67 DS დადებითი შედეგების პრევალირება გამოვლინდა 40 წლის ასაკის ზემოთ ქალებში.

ციტოლოგიური სლაიდების კატეგორიები ეპითელური უჯრედების იმუნოშეღებვასთან ერთად მორფოლოგიური

მახასიათებლის მიხედვით მოცემულია დიაგრამაზე N4. ატიპურობის ყველაზე მაღალი მაჩვენებელი ორმაგი შეღებვის კატეგორიაში გამოვლინდა.



დიაგრამა N4.

იმუნოციტოქიმიით შეღებვის სხვადასხვა კატეგორიებში უჯრედული ატიპიის სიხშირე

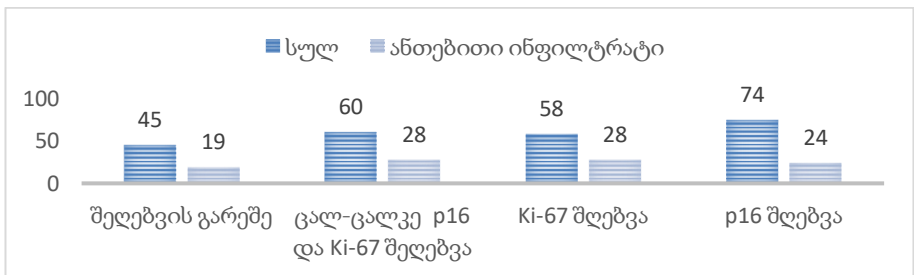
იმუნოციტოქიმიით p16/Ki-67 ორმაგი შეღებვის უარყოფით, მაგრამ შეღებვის მიხედვით სხვადასხვა კატეგორიებში (p16 შეღებვა, Ki-67 შეღებვა, ცალ-ცალკე p16 და Ki-67 შეღებვა), შეღებილი უჯრედების მორფოლოგიური მახასიათებლების მიხედვით სხვადასხვა კატეგორიების (უჯრედული ატიპია, ატიპიის გარეშე) გავრცელების შესწავლით, ბიომარკერების ექსპრესიის გავლენა უჯრედული მორფოლოგიის ცვლილებაზე არ გამოვლინდა, $p > 0.57$, $p > 0.73$, $p > 0.81$, შესაბამისად. ცხრილი N6. თუმცა მიღებული შედეგების არსებობა არ გამორიცხავს ბიომარკერების ექსპრესიასა და უჯრედულ მორფოლოგიას შორის დამოკიდებულებას.

	შეღებილი უჯრედები ატიპიით	ანთებითი ინფილტრატი
p16 შეღებვის კატეგორია	$p > 0.57$	$p > 0,29$
Ki-67 შეღებვის კატეგორია	$p > 0.73$	$p > 0,18$
ცალ-ცალკე p16 და Ki-67 შეღებვის კატეგორია	$p > 0.81$	$p > 0,89$

ცხრილი N6.

იმუნოშეღებვით სხვადასხვა კატეგორიებში უჯრედული მორფოლოგიის მიხედვით უჯრედული ატიპიის და ანთებითი ინფილტრატების გავრცელებას შორის კორელაცია, p სიდიდე

p16/Ki-67DS იმუნოციტოშეღებვისას ციტოლოგიური სლაიდების კატეგორიები ეპითელური უჯრედების იმუნოშეღებვის და ანთებითი ინფილტრატების გამოვლენის მიხედვით მოცემულია დიაგრამაზე N5.



დიაგრამა N5.

ანთებითი ინფილტრატების გავრცელების სიხშირე იმუნოციტოქიმიით შეღებვის სხვადასხვა კატეგორიებში

იმუნოციტოშელეზისას p16/Ki-67 DS უარყოფით, მაგრამ იმუნოშელეზის მიხედვით სხვადასხვა კატეგორიებში (p16 შელეზა, Ki-67 შელეზა, ცალ-ცალკე p16 და Ki-67 შელეზა) ანთებითი ინფილტრატების გამოვლენის შესწავლისას, ორ მაჩვენებელს შორის სარწმუნო კორელაცია არ დადგინდა, $p > 0,29$, $p > 0,18$, $p > 0,89$, შესაბამისად (ცხრილი N6). თუმცა მიღებული შედეგების არსებობა არ გამორიცხავს ბიომარკერების ექსპრესიასა და უჯრედულ მორფოლოგიას შორის დამოკიდებულებას (ცხრილი N6).

29 შემთხვევიდან, ცერვიკალური ბიოფსიური მასალის ორი შემთხვევა იყო CIN2/CIN3 შედეგი, ხოლო ერთი შემთხვევა CIN1/მეტაპლაზია იყო. აღნიშნული ორაზროვანი ჰისტოლოგიური მასალის p16 IHC შელეზის და შესაბამისი ციტოლოგიური სლაიდების p16/Ki-67 DS იუნოციტოქიმიის შედეგები მოცემულია ცხრილში N 7.

ორაზროვანი H&E ჰისტოპათოლოგია	p16/Ki-67 DS დადებითი	p16 IHC დადებითი	p16 IHC უარყოფითი
CIN1/მეტაპლაზია, n=1	0	0	1
CIN2/3, n=2	2	2	0

ცხრილი N7.

ჰისტოპათოლოგიის და იმუნოშელეზის შედეგების განაწილება ცერვიკალურ სადიაგნოსტიკო მასალაში

საშვილოსნოს ყელის ციტოლოგიურ სადიაგნოსტიკო მასალაში p16/Ki-67 DS იმუნოციტოქიმიით ბიომარკერების ექსპრესიის შესწავლიდან გრძელვადიანი პერიოდის (3-10 წლის) შემდეგ ციტოლოგიური სკრინინგის შედეგები მოცემულია ცხრილში N8

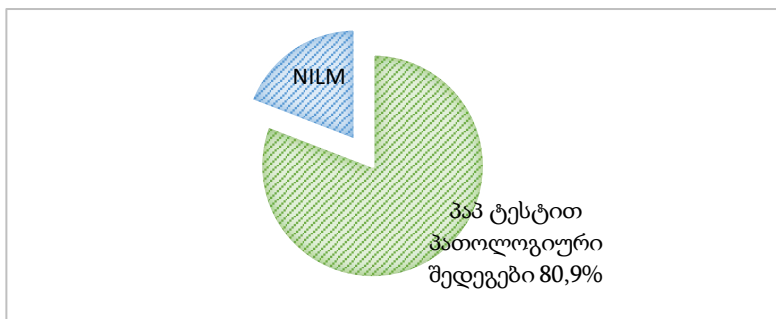
საწყისი სკრინინგის პერიოდი	ასაკი საწყისი სკრინინგისას	p16/Ki-67 DS შედეგები საწყისი სკრინინგისას	პაპ ტესტის შედეგები საწყისი სკრინინგისას	სკრინინგის მეთვალყურეობის პერიოდი	პაპ სკრინინგის მეთვალყურეობის შედეგები
2011	30	უარყოფითი	LSIL	2014	NILM*
2011	34	უარყოფითი	LSIL	2015	NILM
2012	40	უარყოფითი	NILM	2016	NILM
2011	60	უარყოფითი	NILM	2017	NILM
2011	39	უარყოფითი	LSIL	2018	NILM
2012	40	უარყოფითი	LSIL	2018	NILM
2011	41	უარყოფითი	LSIL	2019	NILM
2012	42	უარყოფითი	LSIL	2020	NILM
2011	50	უარყოფითი	LSIL	2021	NILM
2011	63	უარყოფითი	LSIL	2021	NILM

* უარყოფითი ინტრაეპითელურ დაზიანებასა და ავთვისებიანობაზე

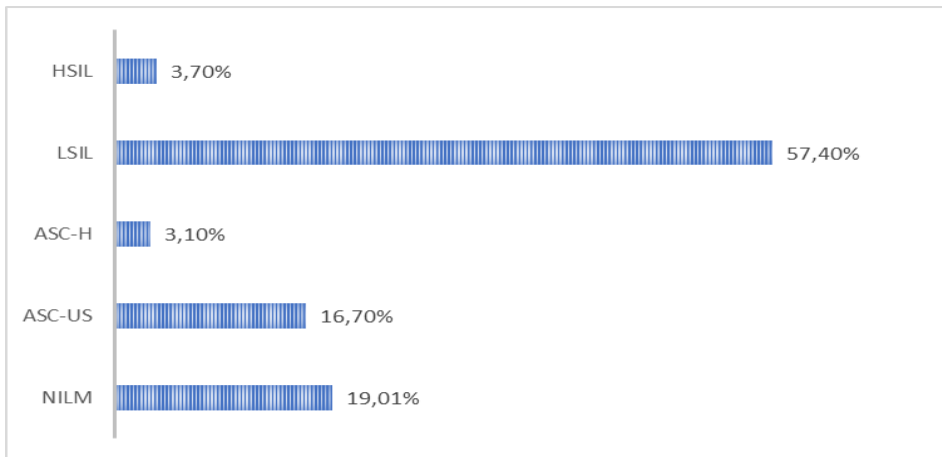
ცხრილი N8.

p16/Ki-67DS უარყოფითი იმუნოციტოქიმიის შედეგების მქონე ქალებში სკრინინგის გრძელვადიანი დაკვირვების (3-10 წელი) შედეგები

ჩვენს კვლევაში ჩართული ქალების სამედიცინო ისტორიების მიხედვით, პაპ ციტოლოგიის საერთო შედეგებიდან, 80.9% შემთხვევაში, ბეტეზდა კატეგორიებით სხვადასხვა პათოლოგიები (SIL - ბრტყელუჯრედოვანი ინტრაეპითელიური დაზიანება, ASC - ატიპური ბრტყელი ეპითელიოციტები) გამოვლინდა (დიაგრამა N6.ა), მათ შორის ყველაზე ხშირი და ყველაზე იშვიათი პაპ ციტოლოგიური შედეგები იყო LSIL და ASC-H, შესაბამისად (დიაგრამა N6.ბ).



ა.

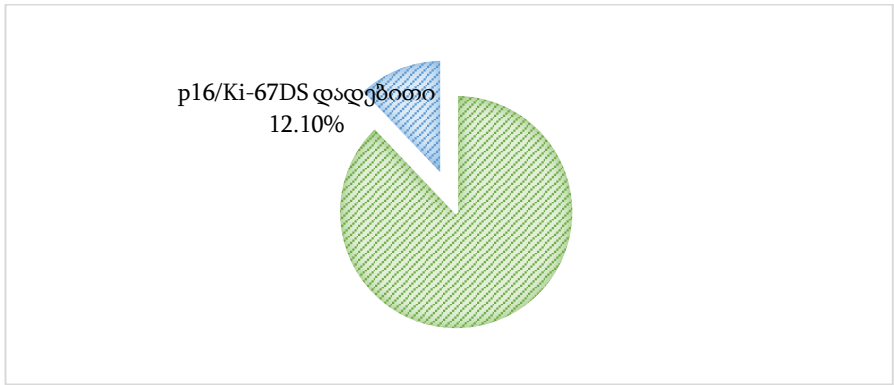


ბ.

დიაგრამა N6.

ა. პ ა პ ტ ე ს ტ ი თ პ ა თოლო გ ი უ რ ი შედეგების ს ა ე რთო ს ი ხ შ ი რ ე
 ბ. პ ა პ ტ ე ს ტ ის შედეგების განაწილება

ბეტეზდა კატეგორიებით პ ა პ ტ ე ს ტ ის პათოლოგიური შედეგების პროცენტული განაწილება შემდეგი იყო: ASC-US 27 (20,6%); ASC-H 5 (3,8%); LSIL 93 (70,9 %); HSIL 6 (4,6 %). პ ა პ ტ ე ს ტ ის მიხედვით პათოლოგიური შედეგების მქონე ქალების მხოლოდ 12,2% შემთხვევის ცერვიკალურ ციტოლოგიურ მასალაში გამოვლინდა p16/Ki-67 DS დადებითი შედეგი, დიაგრამა N7;



დიაგრამა N7.

პაპ ტესტით პათოლოგიური შედეგების მქონე ქალებში p16/Ki-67 DS დადებითი შედეგების სიხშირე

პაპ ტესტით ერთი და იმავე პათოლოგიური შედეგების მქონე ქალების ცერვიკალური ციტოლოგიური მასალის p16/Ki-67 DS იმუნოციტოქიმიით შეღებვისას, ბიომარკერების ექსპრესიის სხვადასხვა შედეგები გამოვლინდა, ცხრილი N9.

	პაპ ტესტი NILM (31)	პაპ ტესტი ASC-US (27)	პაპ ტესტი ASC-H (5)	პაპ ტესტი LSIL(93)	პაპ ტესტი HSIL (6)	სულ
p16/Ki-67 DS დადებითი	0	1	2	11	2	16
p16 შედეგა	4	3	0	6	2	15
Ki-67 შედეგა	3	0	0	10	0	13
ცალ-ცალკე p16 და Ki-67 შედეგა	7	13	1	23	1	45
შედეგის გარეშე	17	10	2	43	1	73
სულ	31	27	5	93	6	162

ცხრილი N9.

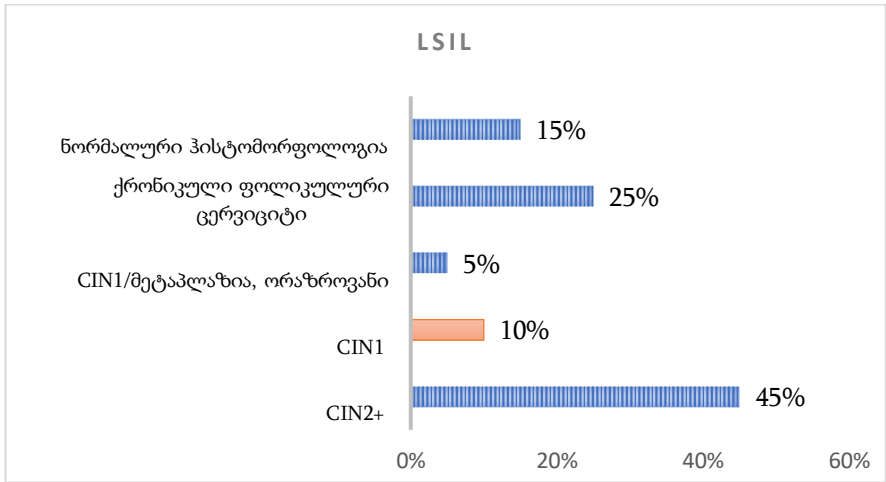
ცერვიკალური ციტოლოგიური სადიაგნოსტიკო მასალის p16/Ki-67 DS იმუნოციტოქიმიის და პაპ ტესტის შედეგების განაწილება

ჩვენს კვლევაში ჩართული ქალების ჰისტოპათოლოგიის და პაპ ტესტის შედეგების განაწილება მოცემულია ცხრილი N10, დიაგრამა N8 და დიაგრამა N9-ში.

	NILM	ASC-US	ASC-H	LSIL	HSIL	Total
CIN2+		1		9	1	11(37,9%)
CIN1			3	2		5(17,2%)
CIN1/მეტაპლაზია				1		1(3,6%)
ქრონიკული ფოლიკულური ცერვიციტი				5		5(17,2%)
ნორმალური ჰისტომორფოლოგია		4		3		7(24,1%)
სულ	0	5(17,2%)	3(10%)	20(69%)	1(3,4%)	29

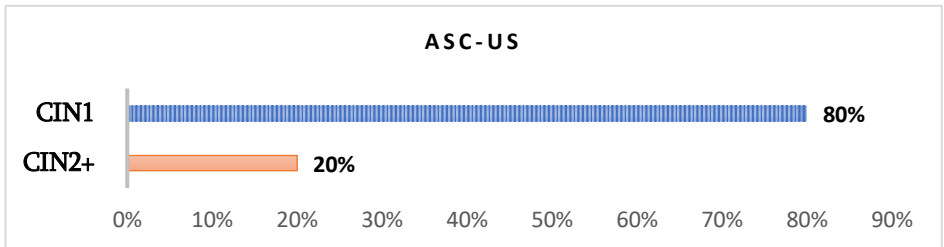
ცხრილი N10.

პაპ ტესტის და H&E ჰისტოპათოლოგიის შედეგების განაწილება



დიაგრამა N8.

H&E ჰისტოპათოლოგიის შედეგების განაწილება პაპ ტესტით LSIL შედეგების მქონე ქალებში



დიაგრამა N9.

H&E ჰისტოპათოლოგიის შედეგების განაწილება პაპ ტესტით ASC-US შედეგების მქონე ქალებში

ჩვენი კვლევის მონაცემების მიხედვით, პაპ ტესტისთვის CIN2+-ის აღმოჩენის მგრძობელობა, სპეციფიკურობა, PPV, NPV და სიზუსტე (Accuracy) მოცემულია ცხრილში N4.

საშვილოსნოს ყელის მაღალი ხარისხის დისპლაზიის აღმოსაჩენად p16/Ki-67 DS იმუნოციტოქიმიური და პაპ ციტოლოგიური მეთოდებით შედეგების შედარებისას, კონკორდანტობის დაბალი მაჩვენებელი გამოვლინდა მონაცემების Cohen's kappa (κ) სტატისტიკური ანალიზის მიხედვით (ცხრილი N11).

p16/Ki-67/Pap test	Total 162
Negative/negative	144(88%0
Positive/positive	2(1,23%)
Positive /negative	12(7,4%)
Negative/positive	4(2,46%)
Agreement, %	% of agreement:90,12
Cohen's kappa (κ)	0,15 Slight agreement

ცხრილი N11.

p16/Ki-67DS იმუნოციტოქიმიის და პაპ ტესტის შედეგების Cohen's kappa (κ) ანალიზი

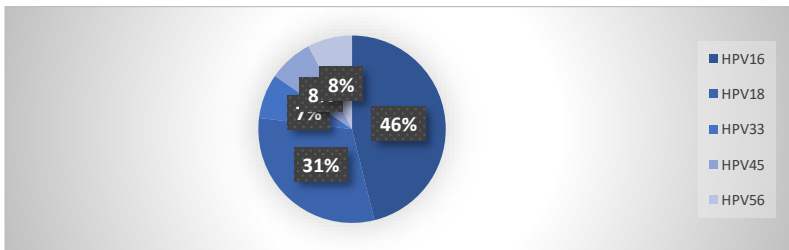
ჩვენი კვლევის ფარგლებში 162 ქალიდან 33 შემთხვევაში იყო ხელმისწვდომი HPV-PCR ტესტის შედეგი. p16/Ki-67 DS, HPV PCR, პაპ ტესტის და და ჰისტოპათოლოგიური შედეგების დისტრიბუცია მოცემულია ცხრილში N12.

HPV PCR	H&E CIN2+	H&E ქრონიკული ფოლიკულური ცერვიციტი	H&E N	პაპ ტესტი LSIL	პაპ ტესტი ASC-US	P16/Ki67 DS დადებითი
HPV უარყოფითი		3		18		
LR-HPV		1	1		4	
HR-HPV	1			4	2	1

ცხრილი N12.

p16/Ki-67 DS, HPV PCR, პაპ ტესტის და და H&E ჰისტოპათოლოგიური შედეგების დისტრიბუცია

პაპილომა ვირუსული ინფექციის კუთხით, HR-HPV ინფექციის პრევალირებამ ჩვენს კვლევაში შეადგინა 24%. 16,18,33,45 და 56 HR-HPV გენოტიპების პრევალირება მოცემულია დიაგრამა N10.



დიაგრამა N10.

HR-HPV გენოტიპების პრევალირება.

საკუთარი კვლევის შედეგების განსჯა

პაპ ციტოლოგიაზე დაფუძნებული სკრინინგი საქართველოში ნახევარ საუკუნით გვიან დაინერგა ამერიკის და ევროპის წამყვან ქვეყნებთან შედარებით. ამიტომ აღნიშნული ქვეყნებში სკრინინგის გრძელვადიან შედეგებზე დაკვირვების შესაძლებლობის გათვალისწინებით, სკრინინგის არსებული გამოწვევების პირობებში, ჩვენი მიზანი კიბოსწინარე დაზიანების ადრეულად აღმოჩენის ალტერნატიული, გაუმჯობესებული შესაძლებლობის დადგენა იყო. კვლევის დაწყების პერიოდში, საქართველოში პაპ ციტოლოგიაზე დაფუძნებული სკრინინგის სამწლიანი გამოცდილების ფონზე, ქვეყნის მოსახლეობის სიმცირის და ამასთან ერთად სკრინინგით ქვეყნის დაბალი მოცვის გათვალისწინებით, კვლევის განხორციელებისთვის ჩვენთვის რთულ ამოცანას მიუკერძოებელი საკვლევი ნიმუშის შერჩევა წარმოადგენდა. მასალის შერჩევასთან ერთად, ჩვენთვის უმნიშვნელოვანესი იყო შესაძლებლობა გვქონოდა საშვილოსნოს ციტოლოგიურ მასალაში ბიომარკერების ექსპრესია შეეფასებინა დამოუკიდებელ ექსპერტებს, მეორეს მხრივ ბიომარკერების ექსპრესიის შედეგების შედარება მომხდარიყო დამოუკიდებელი პათოლოგების მიერ შეფასებული ცერვიქსის მორფოლოგიური (ციტო-ჰისტოპათოლოგიური) კვლევის შედეგებთან. განსაკუთრებულ ინტერესს იწვევდა სხვადასხვა ლაბორატორიის მიერ განსხვავებული პაპ

ციტოლოგიური კვლევის შედეგების არსებობა ერთსა და იმავე ქალის შემთხვევაში. აღნიშნული ამოცანის გადასაჭრელად, იმუნოციტოქიმიური დიაგნოსტიკის შესახებ ცოდნისა და უნარების გაზიარება მოხდა სხვადასხვა სამედიცინო ცენტრების ციტოტექნოლოგებთან, პათოლოგებთან, გინეკოლო-გებთან. საბოლოოდ, შესაძლებელი გახდა, რომ ცხრა სამედიცინო დაწესებულებაში იქნა აღებული ცერვიკალური მასალა, ხოლო შემდეგ დამუშავებული და გამოკვლეული იქნა დამოუკიდებელი გინეკოლოგების, ციტოტექნოლოგების და პათოლოგების მიერ, შესაბამისად. ჩვენი კვლევა წარმოადგენს მიღებული შედეგების ანალიზს.

ჩვენი კვლევის შედეგების მიხედვით, ცერვიკალურ ციტოლოგიურ მასალაში p16/Ki-67 ორმაგი ბიომარკერების ექსპრესიასა და საშვილოსნოს ყელის მაღალი ხარისხის კიბოსწინარე დაზიანებას (CIN2+) შორის სარწმუნო დამოკიდებულება გამოვლინდა. ჩვენი კვლევის შედეგების თანახმად, ცერვიკალურ სადიაგნოსტიკო მასალაში ორმაგი ბიომარკერების p16/Ki-67 ექსპრესიას, უჯრედების მორფოლოგიური მახასიათებლების მიუხედავად, მაღალი მგრძნობელობა და დიაგნოსტიკური ღირებულება აქვს სკრინინგისას საშვილოსნოს ყელის კიბოსწინარე დაზიანების CIN2+(HSIL) აღმოსაჩენად. სხვადასხვა ავტორების მიხედვით p16/ Ki-67 DS კვლევის შედეგები განსხვავებულია, ავტორთა ერთი ჯგუფის (Schmidt et.al.2011)

კვლევის მიხედვით ცერვიქსის ციტოლოგიურ დიაგნოსტიკურ მასალაში p16/ Ki-67 DS იმუნოციტოქიმიას CIN2+ დაზიანების აღმოსაჩენად მაღალი სენსიტიურობა ახასიათებს შეღებილი უჯრედების მორფოლოგიის მიუხედავად, ხოლო ავტორთა მეორე ჯგუფის (Prevodnik et.al.2019) კვლევის მიხედვით, p16/ Ki-67 DS-ის მაღალი სენსიტიურობა უჯრედების ატიპიის არსებობასთან ერთად ვლინდება. სხვადასხვა ავტორების მიერ p16/ Ki-67 DS და საშვილოსნოს მაღალი ხარისხის დისპლაზიის შესახებ კვლევების შედეგები ჩვენი კვლევის შედეგებთან ერთად მოცემულია ცხრილში N13.

	კვლევები	სენსიტიურობა % (95% CI)	სპეციფიკურობა % (95% CI)	PPV %	NPV %
p16/Ki-67 DS	ჩვენი კვლევა	100,0%	89,0%	85,0%	100,0%
	Gajsek et. al.2021	88,1%	65,2%	44,6%	94,5%
	Ikenberg et. al.2013	86,7%	95,2%	15,6%	99,9%
	Luttmer et. al.2016	93,8%	51,2%	29,9%	2,6%
პაპ ტესტი	ჩვენი კვლევა	9,0%	100,0%	85,0%	64,0%
	Nkwabong et. al.2019	55,5%	75,0%	88,2%	33,3%
	Ikenberg et. al.2013	68,5%	95,4%	13,3%	99,7%

ცხრილი N13.

CIN2+ აღმოჩენის სენსიტიურობა, სპეციფიკურობა, PPV და NPV სხვადასხვა კვლევების მიხედვით

ჩვენი კვლევისას ცერვიკალურ ციტოლოგიურ მასალაში ორმაგი p16/Ki-67 ბიომარკერების ექსპრესიაზე ქალის ასაკის

გავლენა არ გამოვლინდა ($p>0,05$). თუმცა ჩვენი კვლევის ფარგლებში ორმაგი ბიომარკერების ექსპრესიის სიხშირე 40 წელზე მეტი ასაკის ქალებში უფრო ხშირი იყო. ცერვიკალური ციტოლოგიაში ორმაგი p16/Ki-67 ბიომარკერების ექსპრესიის მაჩვენებლებზე ქალის ასაკის გავლენა ასევე არ გამოვლინდა Luttmmer-ის და კოლეგების (Luttmer et.al. 2016) კვლევაში.

ჩვენი კვლევის ფარგლებში, ორმაგი იმუნოციტოქიმიით ცერვიკალური ციტოლოგიური მასალის შესწავლისას გამოვლინდა, რომ უჯრედებში ცალკეული p16 ან Ki-67 ცილების ექსპრესია უჯრედული ატიპიის არსებობაზე გავლენას არ ახდენს ($p>0,05$). ორმაგი შედეგისას ციტოლოგიურ მასალაში სხვადასხვა იმუნოშედგენის კატეგორიების და მორფოლოგიის შესახებ კვლევების შედეგები მწირია. სხვადასხვა კვლევების მიხედვით, p16 იმუნოციტოქიმია მორფოლოგიურ მახასიათებლებთან ერთად აუმჯობესებს მაღალი ხარისხის ცერვიკალური დისპლაზიის აღმოჩენის შესაძლებლობას (Wentzensen et al 2005).

ჩვენი კვლევის შედეგებით გამოვლინდა, რომ უჯრედში ორი ცილის, უჯრედის ციკლის მაინჰიბირებელი p16 ცილის და უჯრედის პროლიფერაციის ინდიკატორის, Ki-67 ცილის, ერთდროულად ექსპრესია, უჯრედის ონკოტრანსფორმაციას უკავშირდება. ხოლო ორმაგი შედეგის პირობებში, უჯრედებში მხოლოდ ერთ-ერთი ცილის ჭარბი ექსპრესია უჯრედის ბირთვის

მიხედვით მორფოლოგიური ცვლილების არსებობაზე არ ახდენს გავლენას.

იმუნოციტოქიმიური შედეგისას, ეპითელური უჯრედების იმუნოშედეგის მაჩვენებლების და ციტოლოგიურ სლაიდზე ანთებითი ინფილტრატების კორელაციის შესწავლით გამოვლინდა, რომ ამ ორ მაჩვენებელს შორის სტატისტიკურად მნიშვნელოვანი დამოკიდებულება არ არის ($p > 0,05$). ცერვიკალურ სადიაგნოსტიკო მასალაში ანთებით ინფილტრატებთან ერთად p16 და Ki-67 ბიომარკერების ექსპრესიაზე გავლენის შესახებ მწირია კვლევები, თუმცა სხვადასხვა ავტორების მიხედვით (Regauer et.al. 2007; Sobacki et.al. 2017) p16 დადებითი უჯრედების და Ki-67 დადებითი უჯრედების ექსპრესია საშვილოსნოს ყელის ეპითელური უჯრედების მეტაპლაზიის და რეგენერაციის დროს ვლინდება, შესაბამისად.

ჩვენს კვლევაში, საშვილოსნოს ყელის ციტოლოგიური მასალის p16/Ki-67 ბიომარკერების ექსპრესიაზე შესწავლისას გამოვლინდა, რომ ორი ცილის, უჯრედის ციკლის მაინჰიბირებელი p16 ცილის და უჯრედის პროლიფერაციის ინდიკატორის, Ki-67 ცილის, ერთდროულად ექსპრესია, ჰისტოპათოლოგიურად დადასტურებულ საშვილოსნოს ყელის მაღალი ხარისხის დისპლაზიის არსებობას უკავშირდება. ასევე გამოვლინდა, რომ უჯრედებში შედეგის სხვადასხვა კატეგორიების არსებობაზე გავლენას არ

ახდენს ქალის ასაკი და ანთებითი ინფილტრატების არსებობა. ასევე გამოვლინდა, რომ ციტოლოგიურ მასალაში უჯრედის ბირთვის მორფოლოგიური ცვლილება გავლენას არ ახდენს ცალკე p16 და Ki-67 ცილის ჭარბ ექსპრესიაზე. სხვადასხვა ავტორების მიხედვით, p16 და Ki-67 ცილების ექსპრესიასთან დაკავშირებით: ცილა p16 აჩერებს უჯრედის გაყოფას და მონაწილეობს უჯრედის ფიზიოლოგიური დაბერების პროცესში (Selvam et.al.2018); p16 ცილის ჭარბი ექსპრესია ვლინდება უჯრედში HR-HPV პერსისტული ინფექციისას ვირუსული E7 ონკოპროტეინით უჯრედული ცილა Rb-ის დაინჰიბირების გზით (Duncan et.al. 2013); ეპითელურ უჯრედებში p16 ცილის ქრონიკულად ჭარბი ექსპრესია Wnt სასიგნალო კასკადის პარაკრინული სტიმულაციით ააქტიურებს უჯრედების პროლიფერაციას და ხელს უწყობს სიმსივნის განვითარებას (Azazmeh et.al.2020); გინეკოლოგიური ტრაქტის სიმსივნეებს შორის, p16 ცილის ჭარბი ექსპრესია ვლინდება ენდომეტრიუმის მაღალი გრეიდის სეროზული სიმსივნის (Yemelyanova et.al. 2009), ასევე საკვერცხის მაღალი გრეიდის სეროზული სიმსივნის დროს (Vang et.al. 2009); Ki-67 ექსპრესია უჯრედის ბირთვში ვლინდება მიტოზურად აქტიურ როგორც ნორმალურ ასევე ნეოპლაზურ უჯრედებში (Gerdes et.al. 1983); საშვილოსნოს ყელის ციტოლოგიურ სადიაგნოსტიკო მასალაში ერთდროულად ორი

ცილის p16 და Ki-67 ექსპრესია გამოვლინდა Pap ნეგატიურ HPV პოზიტიურ ქალებში ჰისტოლოგიურად მაღალი ხარისხის დისპლაზიის დროს (Petry et.al. 2011). ჩვენი კვლევის ფარგლებში, ცილა p16 და ცილა Ki-67 ჭარბი ექსპრესია ერთობლივად გამოვლინდა პაპ ტესტით განმეორებითი პათოლოგიური შედეგების მქონე ქალების ცერვიკალურ ციტოლოგიურ მასალაში. არსებული კვლევების შედეგების მიუხედავად, შემდგომი შესწავლის საკითხია, მოლეკულური მექანიზმების დადგენა, რაც ორივე ცილის ჭარბ ექსპრესიას იწვევს ერთდროულად უჯრედში, მათ შორის, უკავშირდება თუ არა უჯრედის პროლიფერაციის ინდიკატორის, Ki-67 ცილის ჭარბი ექსპრესია უჯრედის ციკლის მაინციბიტორებელი p16 ცილის ჭარბ ექსპრესიას.

ჩვენს კვლევაში პაპ ციტოლოგიით საშვილოსნოს ყელის კიბოსწინარე დაზიანების (CIN2+) აღმოჩენის დაბალი მგრძნობელობა გამოვლინდა (ცხრილი N3). ყველა შემთხვევის ციტომორფოლოგიური შედეგების 80,9%-ში პათოლოგიური ცვლილებები გამოვლინდა, მათგან LSIL, ASC-US, ASC-H და HSIL შედეგები შემდეგნაირად გადანაწილდა: 71%, 20,7%, 3.8% და 4,5%, შესაბამისად. პაპ ტესტის სხვადასხვა შედეგის პრევალირების შესახებ მონაცემები სამეცნიერო წყაროების მიხედვით განსხვავებულია. ავტორთა ერთი ჯგუფის კვლევის მიხედვით, პაპ ტესტის პათოლოგიური შედეგების პრევალირება არის 4,7% ხოლო,

LSIL, ASC-US, ASC-H, HSIL კატეგორიების პრევალირება არის 27%, 65% 3.4%, 2.4%, 1.9% and 0.3%, შესაბამისად (Arslan et.al.2018).

ჩვენს კვლევაში, ორმაგი ბიომარკერების p16/Ki-67 ექსპრესიის შესწავლით ქალების საშვილოსნოს ყელის ციტოლოგიურ მასალაში, განმეორებითი პათოლოგიური SIL და ASC შედეგებით ციტოლოგიური სკრინინგის დროს, გამოვლინდა მაღალი ხარისხის დისპლაზიის გამოვლენის შესაძლებლობა მაღალი საიმედოობით. ჩვენი კვლევის მიხედვით CIN2+-ის გამოვლენის მგრძობელობა და სპეციფიკურობა p16/Ki-67 DS-ით LSIL კატეგორიაში არის 100% და 91%, შესაბამისად, ხოლო ASC (ASC-US და ASC-H) კატეგორიაში არის 100% და 86% შესაბამისად. მეცნიერთა ერთი ჯგუფის კვლევის შედეგების მიხედვით CIN2+ -ის p16/Ki-67 DS-ით გამოვლენის მგრძობელობა და სპეციფიკურობა LSIL კატეგორიაში არის 94.2% და 68.0%, შესაბამისად, ხოლო ASC ჯგუფში სენსიტიურობა და სპეციფიკურობა არის 92.2% და 80.6%, შესაბამისად(Schmidt et al. 2011).

ჩვენს კვლევაში, საშვილოსნოს ყელის ციტოლოგიური მასალაში საშვილოსნოს ყელის მაღალი ხარისხის დისპლაზიის აღმოსაჩენად ორმაგი ბიომარკერების p16/Ki-67 ექსპრესიის და პაპ ციტოლოგიის შედეგების შედარებისას კონკორდანტობის დაბალი სიდიდე გამოვლინდა(ცხრილი N11).

ცერვიკალური ციტოლოგიური მასალის მიხედვით p16/Ki-67 DS უარყოფითი შედეგების მქონე ქალების საშვილოსნოს ციტომორფოლოგიურ შედეგებზე გრძელვადიანი დაკვირვებით, არც ერთ შემთხვევაში არ გამოვლინდა SIL/ASC ციტოპათოლოგიური შედეგი 3-10 წლის განმავლობაში. მონაცემების სიმცირისა და ციტოლოგიური სკრინინგის დაბალი რეპროდუქციულობის გათვალისწინებით, შეუძლებელია p16 /Ki-67 DS -ით უარყოფითი ქალების შემთხვევაში კორელაციის დადგენა სკრინინგის გრძელვადიან შედეგებზე. თუმცა ცერვიკალური ნაცხის უარყოფითი p16 /Ki-67 DS შედეგების შემთხვევაში, ჩვენს მიერ შესწავლილი მონაცემები შესაძლოა დამამედებელი იყოს სკრინინგის ინტერვალის გაზრდის თვალსაზრისით. სკრინინგის თანამედროვე გაიდლაინის მიხედვით, სკრინინგის ინტერვალის ნორმალური შედეგის შემთხვევაში 5 წელიწადს შეადგენს. შემდგომი რანდომიზებული კვლევების შედეგები საინტერესოა ამ კუთხით. ავტორთა ერთი ჯგუფის კვლევის მიხედვით (Clarke et. al.2019), ქალებს, საშვილოსნოს ყელის ციტოლოგიური მასალის უარყოფითი p16/Ki-67 DS შედეგის შემთხვევაში, CIN2+ ის განვითარების მნიშვნელოვნად დაბალი რისკი აქვთ მომდევნო 5 წლის განმავლობაში.

ჩვენს კვლევაში განსაკუთრებული ყურადღება მიიქცია იმუნოციტოქიმიის p16/Ki-67 DS დადებითი შედეგის ორმა შემთხვევამ, რომლის დროსაც შესაბამისი ქსოვილოვანი მასალის H&E ჰისტოპათოლოგიის შედეგები CIN1 იყო. მათგან ერთი შემთხვევაში ორმაგად შეღებილი უჯრედები ატიპიით, მეორე შემთხვევაში ატიპიის გარეშე იყო (ცხრილი N5). არასაკმარისი მონაცემების გამო, ჩვენს კვლევაში ვერ მოხდა დადგენა, არის თუ არა p16/Ki-67 DS დადებითი იმუნოციტოქიმიის შედეგი ჰისტოლოგიით CIN1 შედეგის მქონე ქალებში მაღალი ხარისხის დისპლაზიის განვითარების პრედიქტორი. ამ ეტაპზე მწირია ინფორმაცია აღნიშნულთან დაკავშირებით, რაც იძლევა იმის მოტივაციას რომ გაგრძელდეს მსგავსი ტიპის კვლევები.

საშვილოსნოს ყელის ჰისტოპათოლოგიის ორაზროვანი დიაგნოზის შემთხვევაში p16 IHC გამოყენება რეკომენდებულია ჯერ კიდევ 2012 წლიდან, შესაბამისი გაიდლაინის მიხედვით (Darragh et.al. 2012). ჩვენი კვლევის ფარგლებში, საშვილოსნოს ყელის ჰისტოპათოლოგიის სამი ორაზროვანი შედეგისას, შესაბამისი პარაფინის ბლოკებიდან მიღებული მასალის p16 იმუნოჰისტოქიმიით შეღებვამ შესაძლებელი გახადა მკაფიოდ მომხდარიყო კიბოსწინა დაზიანების დიფერენცირება არანეოპლაზიური პროცესებისაგან. აქვე აღსანიშნავია, რომ დადებითი p16 IHC შედეგის შემთხვევაში, შესაბამისი

ციტოლოგიური სადიაგნოსტიკო მასალა p16/Ki-67 DS დადებითი იყო, ხოლო p16 IHC უარყოფითი შედეგისას, p16/Ki-67 DS შედეგი უარყოფითი იყო. ვფიქრობთ, რომ ჰისტოლოგიურ სადიაგნოსტიკო მასალაში მარკერების ინტეგრაციით დიაგნოსტიკის გაუმჯობესების მსგავსად, ცერვიკალურ ციტოლოგიურ მასალაში ბიომარკერების ინტეგრაცია ქმნის შესაძლებლობას, რომ მკაფიოდ, ობიექტური კრიტერიუმებით მოხდეს ნეოპლაზური უჯრედული ცვლილებების არანეოპლაზური უჯრედული ცვლილებებისგან დიფერენცირება და ამ შესაძლებლობას უჯრედებში ერთდროულად p16/Ki-67 ბიომარკერების ექსპრესიის გამოვლენა იძლევა.

ჩვენი კვლევის მიმდინარეობის პერიოდში, სკრინინგის ოპორტუნისტული ბუნების და HPV PCR ტესტირების ხელმისაწვდომობაზე შეზღუდვის გათვლისწინებით, მხოლოდ 33 შემთხვევაში იყო HPV-PCR ტესტის შედეგის შესწავლა შესაძლებელი (ცხრილი N12, დიაგრამა N10). HR-HPV პრევალირება არის 24%, საიდანაც HPV16 და 18 გენოტიპებმა შემთხვევთა უმრავლესობა (>50%) შეადგინა. ჩვენს მონაცემებს შორის, საშვილოსნოს ყელის ჰისტოპათოლოგიით CIN3 დიაგნოზის და შესაბამისი ციტოლოგიის დადებითი p16/ Ki-67 DS შედეგის მხოლოდ ერთი შემთხვევისას (პაპ ციტოლოგიით LSIL) გამოვლინდა HR-HPV PCR დადებითი შედეგი. ჩვენი

მონაცემებიდან სხვა არც ერთ HR-HPV PCR დადებითი შედეგის შემთხვევაში ცერვიკალური ციტოლოგია p16/Ki-67 DS დადებითი არ იყო. მასალის სიმცირის გამო ვერ მოხერხდა ორმაგი იმუნოციტოქიმიის და HR-HPV შედეგების სტატისტიკურად შედარება, თუმცა ჩვენს კვლევაში გამოვლინდა, რომ HR-HPV PCR დადებითი 8 შემთხვევიდან მხოლოდ ერთ შემთხვევაში იყო შესაბამისი ცერვიკალური ციტოლოგიური სლაიდი ორმაგი p16/Ki-67 იმუნოციტოქიმიით დადებითი. იმის გათვალისწინებით, რომ ჩვენს კვლევაში ორმაგი p16/Ki-67 შედეგის იმუნოციტოქიმიით კიბოსწინა დაზიანების აღმოჩენის მაღალი მგრძობელობა გამოვლინდა, შესაძლებელია ვივარაუდოთ HR-HPV ინფექციას მაღალი პრევალირება ხოლო HR-HPV PCR ტესტირებას კიბოსწინა დაზიანების აღმოჩენის დაბალი სპეციფიურობა ახასიათებს, თუმცა რანდომიზებული კვლევების შედეგები ამ კუთხით მნიშვნელოვანია. HPV გენოტიპების გამოვლენა მნიშვნელოვანია ქვეყნებში შესაბამისი ვაქცინების დანერგვით პრევენციული ღონისძიებების უკეთ დაგეგმვისათვის. სხვადასხვა ავტორების მიხედვით HR-HPV გენოტიპების განსაკუთრებით მაღალი პრევალირება ვლინდება განვითარებად ქვეყნებში (Sung et.al.2021).

ჩვენს კვლევაში ჩართული ქალების სამედიცინო ისტორიების შესწავლის საფუძველზე გამოვლინდა სხვადასხვა კომორბიდული

მდგომარეობები, თუმცა მონაცემების სიმცირის გამო კორელაციის დადგენა ვერ მოხერხდა.

ჩვენი კვლევის შეზღუდვები იყო საკვლევი ჯგუფის მოცულობა და შესაძლო შერჩევის ბიაზი. საკვლევი ჯგუფი შედგებოდა საშვილოსნოს ყელის კიბოს ოპორტუნისტული სკრინინგის მონაწილეებისგან, რომლებსაც პაპ ტესტით პათოლოგიური შედეგების ისტორია ჰქონდათ. საშვილოსნოს ყელის ციტოლოგიური მასალის p16/Ki-67 DS იმუნოციტოქიმიური ტესტირება საქართველოში ჩატარდა სამ ლაბორატორიაში 2011 წლის მარტიდან 2013 წლის დეკემბრამდე. საკვლევი მასალის მოცულობასა და შერჩევის ბიაზზე შესაძლოა შემდეგმა ფაქტორებმა იქონია გავლენა: 1) იმუნოციტოქიმიური გამოკვლევა შესთავაზეს ყველა ზემოთ ნახსენებ ქალს. თუმცა პაპ ციტოლოგიის განმეორებითი პათოლოგიური შედეგების ან სხვადასხვა სამედიცინო ცენტრიდან არაიდენტური ციტოლოგიის შედეგების მიუხედავად, ყველას არ ჰქონდა p16/Ki-67 DS იმუნოციტოქიმიური გამოკვლევის ჩატარების ხელმისაწვდომობა. 2,5 წლის განმავლობაში ჩვენ შევძელით შეგვესწავლა მხოლოდ 169 ქალის ციტოლოგიური მასალა ორმაგ იმუნოციტოქიმიურ კვლევაზე, აქედან შვიდი ციტოლოგიური სლაიდი არადამაკმაყოფილებელი იყო შესასწავლად; 2) საშვილოსნოს ყელის ბიოფსია ჩატარდა გინეკოლოგების რეკომენდაციით. ყველა ქალს არ ჰქონდა შეთავაზება ბიოფსიის ჩატარებაზე საშვილოსნოს ყელის კიბოს

სკრინინგის პროტოკოლის გათვალისწინებით და ასევე რეკომენდაციის მიუხედავად, ყველა ქალს არ გაუკეთებია ბიოფსია. ზოგიერთ შემთხვევაში, საშვილოსნოს ყელის დაზიანებების კრიოდესტრუქცია ხდებოდა ჰისტოლოგიური მასალის შეგროვების გარეშე. ამიტომ, ჩვენთვის ხელმისაწვდომი იყო მხოლოდ 29 ბიოფსიური მასალის 29 H&E ჰისტოპათოლოგიის შედეგი, საიდანაც სამ შემთხვევაში არსებული პარაფინის ბლოკის მასალაზე დაყრდნობით ჩვენ განვახორციელეთ p16 IHC გამოკვლევა. HPV ტესტირებაზე ხელმისაწვდომობა დაბალი იყო. სამწუხაროდ, აღნიშნული პერიოდის შემდეგ საქართველოში დამატებითი მონაცემების შეგროვების საშუალება არ გვქონდა. მიუხედავად ზემოთ განხილული შეზღუდვებისა, გადაწყვიტეთ შეგროვებული მასალა დაგვემუშავენა, შეგვესწავლა და ანალიზი გამოგვექვეყნებინა.

ჩვენი კვლევის სიძლიერე მდგომარეობს იმაში, რომ პათომორფოლოგიური და იმუნოშეღებვის მეთოდოლოგიებით გამოკვლევა ჩატარდა ერთდროულად აღებულ ცერვიკალურ ციტოლოგიურ სადიაგნოსტიკო მასალაში. იმუნოშეღებვა და პათომორფოლოგიური შედეგების შეგროვება განხორციელდა სხვადასხვა სამედიცინო ცენტრებიდან შეგროვებულ ცერვიკალურ მასალაზე, ხოლო დიაგნოსტირებას ახორციელებდნენ კლინიკური პათოლოგიის მიმართულების დამოუკიდებელი ექსპერტები.

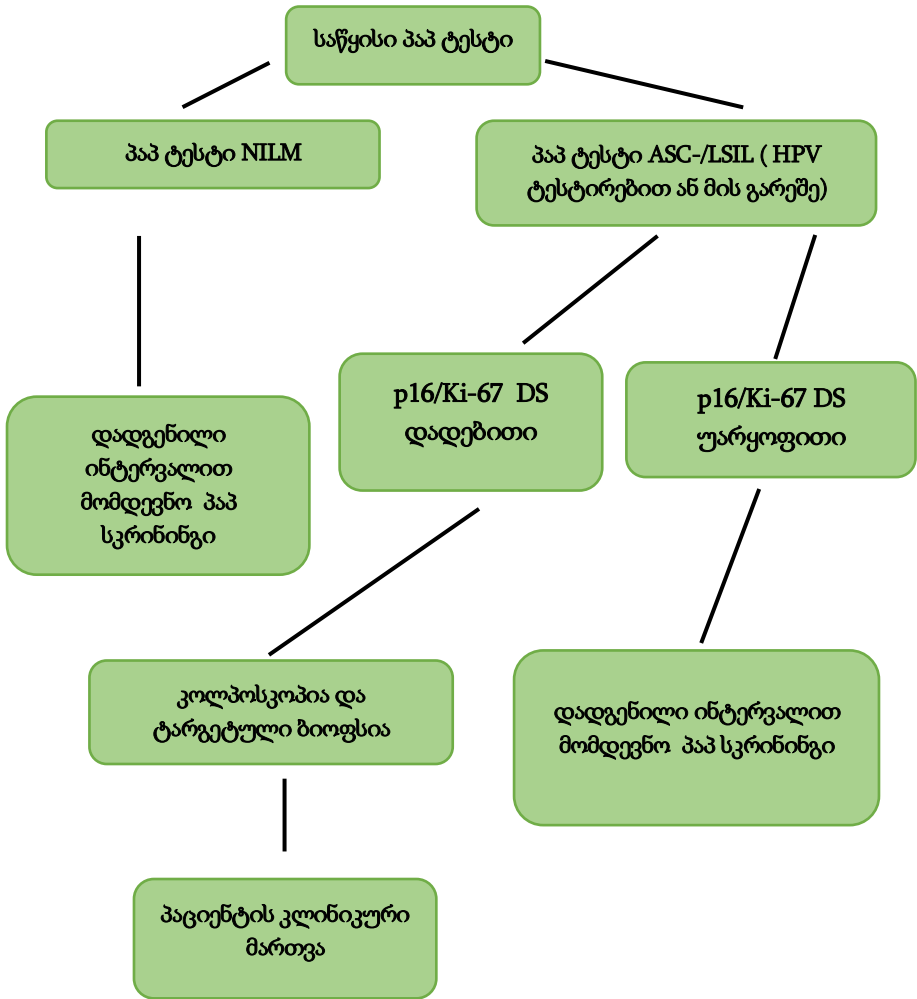
ჩვენი კვლევის შედეგები გვადლევს იმის მტკიცების შესაძლებლობას, რომ ბიოქიმიური ცვლილებები წინ უსწრებს ციტო-მორფოლოგიურ ცვლილებებს და მათი აღმოჩენა ობიექტურად შეიძლება ბიომარკერების ექსპრესიის შესწავლით. მეორეს მხრივ, ციტო-მორფოლოგიური ცვლილებები ყოველთვის ნეოპლაზიურ პროცესებს არ უკავშირდება. გამომდინარე აქედან შეგვიძლია დავასკნათ, რომ უჯრედში რელევანტური ბიომარკერების ინტეგრაცია აუმჯობესებს ციტოლოგიის დიაგნოსტიკურ შესაძლებლობას. აღნიშნული მიგნება, სხვა ფაქტორებთან ერთად, შესაძლოა იყოს ახსნა, თუ რატომ შეიძლება განმეორებითი ციტოლოგიური სკრინინგისას იყოს LSIL ან ASC-US-ის მაღალი შედეგები ან სპეციალისტებს შორის აზრთა სხვაობა, მაშინ როცა ბიოფსიური მასალის შეფასებისას SIL არ დასტურდება.

ჩვენი კვლევის შედეგები, სხვა ავტორების მგავსი ტიპის კვლევების შედარებით მცირე ნიმუშის ზომის და შემთხვევათა რაოდენობის მიუხედავად, შესაძლოა საფუძვლად დაედოს საშვილოსნოს ყელის კიბოსწინარე დაზიანების ეტიოპათოგენეზის და იმუნოფენოტიპის გათვალისწინებით არსებული კლასიფიკაციის დახვეწას (ცხრილი N14), ასევე სკრინინგის გაიდლაინში პაციენტის მართვის ალგორითმის ცვლილებას (დიაგრამა N11), რაც ვფიქრობთ რომ გააუმჯობესებს ციტოლოგიური სკრინინგის გამოსავლებს, განსაკუთრებით პაპ ტესტით ASC/LSIL კატეგორიის ტრიაჟის დროს.

ეტოპათოგენეზი	HR-HPVინფექცია		პერისტული HR- HPVინფექციით გამოწვეული უჯრედული დისრეგულაცია	ინვაზიური კარცინომა
პაპ ციტოლოგია	NILM	ASC/LSIL	HSIL	ინვაზიური კარცინომა
p16/Ki-67DS იმუნოციტოქიმა	p16/Ki-67DS უარყოფითი		p16/Ki-67DS დადებითი	ინვაზიური კარცინომა
H&E ჰისტოპათოლოგია	N	LSIL (CIN 1)	HSIL (CIN 2+)	ინვაზიური კარცინომა
P16 იმუნოჰისტოქიმა	p16 IHC უარყოფითი		p16 IHC დადებითი	ინვაზიური კარცინომა

ცხრილი N14.

საშვილოსნოს ყელის კიბოსწინარე დაზიანების კლასიფიკაცია
ეტოპათოგენეზის და მორფოლოგიურ/იმუნოფენოტიკური
მახასიათებლების გათვალისწინებით



დიაგრამა N11.

p16 და Ki-67 ბიომარკერების გამოყენებით საშვილოსნოს ყელის კიბოს სკრინინგის მართვის შესაძლო ალგორითმი

ჩვენი კვლევების შედეგებზე დაყრდნობით შეგვიძლია დავასკვნათ, რომ საშვილოსნოს ყელის კიბოს სკრინინგისას, მაღალი ხარისხის დისპლაზიის აღმოსაჩენად, საშვილოსნოს ყელის ციტოლოგიურ მასალაში p16/Ki-67 ორმაგი ბიომარკერების ექსპრესიის დიაგნოსტიკური ღირებულება მნიშვნელოვანად მაღალია ციტოლოგიურ სკრინინგთან შედარებით. საშვილოსნოს ყელის კიბოს არსებულმა სკრინინგმა მნიშვნელოვანი წვლილი შეიტანა კიბოს პრევენციაში, თუმცა პაპ ტესტის დაბალი სენსიტიურობა, არსებული ციტო-ჰისტოლოგიური კლასიფიკაციის სირთულე და ნაკლები შესაბამისობა, ასევე PCR-HPV დაბალი სპეციფიკურობა და HPV ინფექციის მაღალი პრევალირება კვლავ გამოწვევად რჩება როგორც კლინიცისტებისთვის, ასევე პაციენტებისთვის. ციტოლოგიურ სადიაგნოსტიკო მასალაში ბიომარკერების ინტეგრაცია შეიძლება იყოს მნიშვნელოვანი ციტოლოგიის დიაგნოსტიკური როლის გაუმჯობესების კუთხით, რათა გადაიჭრას ის სირთულეები, რაც დაკავშირებულია ნეოპლაზური და არანეოპლაზურ პროცესების დიფერენცირებასთან. საშვილოსნოს ყელის კიბოს სკრინინგში p16/Ki-67 DS იმუნოციტოქიმიის გამოყენებით შესაძლებელია სკრინინგში ჩართული ქალების კლინიკური მართვის გაუმჯობესება, რაც ერთის მხრივ კიბოსწინარე დაზიანების დროული აღმოჩენით და სათანადო მკურნალობით შეამცირებს კიბოთი გამოწვეულ

ტვირთს, მეორეს მხრივ შეზღუდავს ახალგაზრდა ქალებში საშვილოსნოს ყელზე არასაკმარის ინტერვენციების სიხშირეს და მასთან დაკავშირებულ რეპროდუქციული ჯანმრთელობის პრობლემებს. ერთი ტესტის მაღალი ღირებულების მიუხედავად, p16/Ki-67 DS იმუნოციტოქიმია შეიძლება იყოს ეფექტური გრძელვადიან პერსპექტივაში, განსაკუთრებით პაპ ციტოლოგიური სკრინინგით ASC/LSIL კატეგორიების ტრიაჟის დროს. დაბალი შემოსავლის მქონე ქვეყნებში, სადაც სკრინინგი ოპორტუნისტულია და პათომორფოლოგიური დიაგნოსტიკის რეფერალური ცენტრების სიმცირეა, p16/Ki-67 ბიომარკერების ექსპრესიაზე გამოკვლევა შეიძლება ჩაითვალოს ციტოლოგიური სკრინინგის ხარისხის კონტროლის ინსტრუმენტად.

დასკვნები

1. ქართულ პოპულაციაში, საშვილოსნოს ყელის SIL და ASC დიაგნოზის მქონე ქალების განმეორებითი სკრინინგისას, ცერვიკალური ციტოლოგიური სადიაგნოსტიკო მასალის ორმაგი შეღებვის იმუნოციტოქიმიური მეთოდით p16 და Ki-67 უჯრედული ბიომარკერების ექსპრესიის შესწავლით, შეღებვის შემდეგი კატეგორიები გამოვლინდა: 1) p16 დადებითი, 2) Ki-67 დადებითი, 3) ცალ-ცალკე p16 დადებითი და Ki-67 დადებითი, 4) p16/Ki-67 ორმაგი დადებითი და 5) p16 და/ან Ki-67 უარყოფითი. მათგან ყველაზე ხშირი p16 და/ან Ki-67 უარყოფითი, ხოლო ყველაზე იშვიათი Ki-67 დადებითი შეღებვის კატეგორიები იყო. პარალელურად, ქალების ამავე ჯგუფში ცერვიკალური ციტოლოგიური სადიაგნოსტიკო მასალის პაპ ტესტის შედეგების მიხედვით, ბეტეზდა სისტემის კლასიფიკაციის შემდეგი კატეგორიები გამოვლინდა: NILM, LSIL, HSIL, ASC-US(H); მათგან ყველაზე ხშირი LSIL, ხოლო ყველაზე იშვიათი ASC-H კატეგორია იყო; ქალების ამავე ჯგუფის ცერვიკალური ბიოფსიური მასალის ჰისტოპათოლოგიური შედეგის (საკონტროლო ჯგუფი) მიხედვით N, LISL და HSIL (WHO კლასიფიკაცია) კატეგორიები გამოვლინდა, (N, CIN1 და CIN2+ Koss კლასიფიკაციით, შესაბამისად), მათგან ყველაზე ხშირი HSIL(CIN2+) კატეგორია იყო.

2. ორმაგი შეღებვის იმუნოციტოქიმიური მეთოდით შესწავლილი p16 და Ki-67 ბიომარკერების ექსპრესიის მახასიათებლების ანალიზი აჩვენებს, რომ ცერვიკალურ ციტოლოგიურ სადიაგნოსტიკო მასალაში, განურჩევლად შეღებილი უჯრედების მორფოლოგიური მახასიათებლისა, ერთდროულად ორმაგი ბიომარკერების p16/Ki-67 ექსპრესია სტატისტიკურად სარწმუნოა საშვილოსნოს ყელის კიბოსწინარე დაზიანების (მაღალი ხარისხის ინტრაეპითელური დაზიანების) აღმოსაჩენად, დიაგნოზის ოქროს სტანდარტად ცერვიქსის ბიოფსიური მასალის ჰისტოპათოლოგიური შედეგების გათვალისწინებით.

3. ცერვიკალური ციტოლოგიური სადიაგნოსტიკო მასალის ეპითელურ უჯრედებში p16/Ki-67 ორმაგი ბიომარკერების ერთდროული ექსპრესიისას ვლინდება კიბოსწინარე დაზიანების აღმოჩენის მნიშვნელოვნად გაუმჯობესებული მგრძნობელობა, სიზუსტე (Accuracy) და სპეციალიტებს შორის შეფასებისას ნაკლები ვარიაბელობა, ვაპ ტესტის შედეგების ანალოგიურ მახასიათებლებთან შედარებით.

4. საშვილოსნოს ყელის კიბოს სკინინგისას ქალის ასაკი არ ახდენს გავლენას p16/Ki-67 ორმაგი ბიომარკერების ექსპრესიაზე, თუმცა p16/Ki-67 ორმაგი ბიომარკერების ექსპრესია 40 წელზე ზემოთ ასაკის ქალებში უფრო ხშირია.

5. ორმაგი იმუნოციტომელებვისას, ციტოლოგიური სადიაგნოსტიკო მასალის ეპითელურ უჯრედებში ცალ-ცალკე p16 და/ან Ki-67 ბიომარკერების ექსპრესია არ ახდენს გავლენას უჯრედული ატიპიის არსებობაზე (ბიომარკერების ექსპრესია vs უჯრედის მორფოლოგია).

6. ცერვიკალურ ციტოლოგიურ მასალაში ანთებითი ინფილტრატების არსებობა არ ახდენს გავლენას ეპითელურ უჯრედებში p16 და/ან Ki-67 ბიომარკერების ექსპრესიაზე (ბიომარკერების ექსპრესია vs ანთებითი ინფილტრაცია).

7. ცერვიკალური ციტოლოგიური მასალის მიხედვით p16/Ki-67 DS უარყოფითი შედეგების მქონე ქალების საშვილოსნოს ციტომორფოლოგიურ შედეგებზე გრძელვადიანი დაკვირვებით, არც ერთ შემთხვევაში არ გამოვლინდა SIL/ASC ციტოპათოლოგიური შედეგი საშუალოდ 6,5 წლის განმავლობაში.

8. საშვილოსნოს ყელის ციტოლოგიურ დიაგნოსტიკურ მასალაში p16/Ki-67 ბიომარკერების ინტეგრაცია ავსებს მოლეკულურ ბიოლოგიასა და უჯრედულ მორფოლოგიას შორის ნაპრალს და აუმჯობესებს ციტოპათოლოგიის დიაგნოსტიკურ ღირებულებას.

პრაქტიკული რეკომენდაციები

დარგის ექსპერტებისთვის:

ცერვიკალურ ციტოლოგიურ სადიაგნოსტიკო მასალაში p16 და Ki-67 ბიომარკერების ინტეგრაციით ვლინდება საშვილოსნოს ყელის კიბოსწინარე დაზიანების ციტო-ჰისტოლოგიური კლასიფიკაციის და საშვილოსნოს ყელის კიბოს სკრინინგის და მართვის გაიდლაინის (გზამკვლევის) რეკომენდაციების დახვეწის შესაძლებლობა.

კლინიკური პათოლოგიის სპეციალისტებისთვის:

საშვილოსნოს ყელის ციტოლოგიურ სადიაგნოსტიკო მასალაში p16 /Ki-67 ბიომარკერების ინტეგრაცია აუმჯობესებს მაღალი ხარისხის დისლაზიის ობიექტურად აღმოჩენის და კიბოსწინარე და არადისპლაზიური ციტოპათოლოგიების ობიექტურად დიფერენცირების შესაძლებლობას.

კლინიცისტებისთვის:

სკრინინგ-პოპულაციაში, განსაკუთრებით ASC-US/LSIL ჯგუფში, მაღალი ხარისხის დისპლაზიის იდენტიფიცირება წარმოადგენს უმნიშვნელოვანეს საკითხს, რაც სკრინინგის კლინიკური და ეკონომიური გამოსავლების ეფექტურობას განსაზღვრავს, ამიტომ p16/Ki-67 ორმაგი ბიომარკერების ექსპრესიის მაჩვენებლის, როგორც მაღალი ხარისხის კიბოსწინარე დაზიანების ინდიკატორის გათვალისწინება, გინეკოლოგებს

დაეხმარება ეფექტური გადაწყვეტილებების მიღებაში კლინიკური მართვის დროს.

სკრინინგში ჩართული ქალებისთვის:

საშვილოსნოს ყელის კიბოს სკრინინგისას ცერვიკალური ნაცხის იმუნოციტოქიმიური p16/Ki-67 DS გამოკვლევა, შეამცირებს პაციენტისთვის პაპ ციტოლოგიის მიხედვით განმორებით დამაბნეველი შედეგებით (ASC, LSIL) გამოწვეულ სტრესს და არა საჭირო სამედიცინო ჩარევებს, მეორეს მხრივ გაზრდის სკრინინგის მიმართ ნდობას და სკრინინგში ჩართული ქალების რაოდენობას, რაც თავის მხრივ ხელს შეუწყობს კიბოსწინარე დაზიანების დროულ გამოვლენას და კიბოთი გაწვეული ზიანის შემცირებას.

ქვეყანაში ჯანდაცვის სისტემის ორგანიზატორებისთვის:

პათომორფოლოგიური რეფერალური ცენტრების არარსებობის და ლაბორატორიებს შორის პათომორფოლოგიის შედეგების ინფორმაციის გაცვლის დეფიციტის პირობებში, განსაკუთრებით საშვილოსნოს ყელის სკრინინგისას ორაზროვან შემთხვევებთან დაკავშირებული პრობლემის არსებობის შემთხვევაში, ხარისხის კონტროლის უზრუნველყოფის ინსტრუმენტად მხარდაჭერილი უნდა იყოს ბიომარკერებზე დაფუძნებული დიაგნოსტიკური შესაძლებლობის გამოყენება.

მკვლევარებისთვის:

ციტოლოგიურ სადიაგნოსტიკო მასალაში დისპლაზიურ ცვლილებებთან დაკავშირებული ფუნდამენტური ცოდნის გაღრმავება ხელს შეუწყობს მაღალი ხარისხის დისპლაზიური დაზიანებებიდან ინვაზიური კარცინომის განვითარების მოლეკულური მექანიზმების შესახებ ახალი კვლევების დაგეგმვას და განხორციელებას.

სადისერტაციო თემის ორგვლივ გამოქვეყნებული
სამეცნიერო სტატიები:

1. S. Kakaliashvili, Kharzeishvili, G, Didava, T.Saluqvadze, I.Getzadze, N.Lomtadze. „p16/Ki-67 double staining results in women with different types of dysplasia Based on pap-test results in Georgia“ Actual Topics on Women Health, 2012 vol. 1; p.65-69.
2. Sopio Kakaliashvili-Dzagnidze, Omar Khardzeishvili, Giorgi Didava. "Expression of p16/Ki-67 biomarkers during atypical Pap test results." First SYSSA Conference. Tbilisi. Georgia. 2013, p. 4-7.
3. S. Kakaliashvili-Dzagnidze, A. Dzagnidze. "Prevalence of HPV infection among Woman Enrolled in Cervical cancer screening in Georgia". GAU International Scientific Conference. Georgian American University Annual Scientific Journal. 2022, p.90-94.
4. Sopio Kakaliashvili-Dzagnidze, Omar Khardzeishvili, Sergo Tabagari. "The role of dual p16^{INK4a}/ Ki-67 biomarkers integration in cytology". Journal of the Georgian Critical Care Medicine Institute, Georgian Academy of Medical Sciences, Georgian Association of Catastrophe & Critical Care Medicine, N7, 2023.
5. Kakaliashvili-Dzagnidze S, Khardzeishvili O, Tabagari S. Diagnostic Accuracy of p16 INK4a/Ki-67 Dual Immunostaining for Detection of High-Grade Cervical Intraepithelial Neoplasia in Women Involved in Cervical Cancer Screening in Georgia. Analytical Cellular Pathology. 2023 Jun 5; 2023.

6. Kakaliashvili-Dzagnidze S. The role of the morphologic categorization of p16INK4a/Ki-67 dual stained cytology in detecting of high grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN2+). Translational and Clinical Medicine-Georgian Medical Journal. 2023 Dec 21;8(2).

David Tvildiani Medical University

Copyright reserved

Sopio Kakaliashvili-Dzagnidze

**Characteristics of expression p16^{INK4a} /Ki-67 dual
biomarkers in
cervical cytology material and their role in detection of
cervical precancerous lesion**

Thesis

of Dissertation for the Academic Degree of PhD in Medicine

Tbilisi 2024

The PhD research was performed at David Tvildiani Medical University,
Clinic Mediclub Georgia, Scientific Research Center for Adults and
Children and Diagnostic Center Cytogen.

Research Supervisos:

Omar Khardzeishvili – MD, PhD, Professor, Tbilisi State Medical
University.

Sergo Tabagari – MD, PhD, Professor, David Tvildian Medical University.

Official Experts/ Opponents:

Dinara Kasradze – MD, PhD, Professor, David Tvildian Medical
University.

Aleksandre Tavartkiladze – MD, PhD, Associate Professor, Tbilisi State
Medical University

Tinatini Gagua – MD, PhD, Associate Professor, David Tvildian Medical
University

The dissertation defense will be held on _____PM_____of 2024

At the David Tvildiani Medical University Conference Hall (13 lubliana st./
6 Mikheil Chiaureli s., 0159 Tbilisi, Georgia)

The dissertation could be obtained from the Daphne Hare Medical Library,
David Tvildiani Medical University

The Thesis will be distributed on _____ 2024

Scientific Secretary

MD, PhD **Mariam Vachnadze**

General description of the study

Relevance of the problem

Early detection of precancerous lesions can reduce cancer morbidity and mortality. In terms of objective detection of precancerous lesions in cytological diagnostic material during cervical cancer screening, there are no clear recommendations for the widespread use of cellular biomarkers, based of existing literature. It is mostly due to the paucity of prospective studies, heterogeneity of results, and the small size of the study group on the conventional cytology and immunocytochemical results based on cytological material taken from the cervix of women with pathological screening results. Therefore, the findings do not provide an opportunity to improve the current cyto-histopathological classification and management algorithm for women involved in cervical cancer screening. In countries where screening coverage is low, like in Georgia country, and the possibility of referral for screening materials is limited, due to the low sensitivity of cytomorphology (Colgan et.al. 2001) and the low specificity of HPV testing (Schiffman et.al. 2007), it is not uncommon, that women of young reproductive age with repeated pathological screening (LSIL/ASC-US) results have conducted unnecessary instrumental intervention on the cervix (Habbema et.al. 2017), on the other hand, due to improper assessment of underling precancerous lesions, the risk of developing invasive cancer is high. Despite the achieved results, a enduring cervical cancer screening guideline still needs

to be refined. Therefore, we decided to study the features of the expression of the cell cycle regulatory proteins -p16INK4a (hereafter p16) and Ki-67 biomarkers (Petry et.al. 2011) in the cervical cytological diagnostic material of women with repeated cytopathological results during cervical cancer screening and their role in early detection of cervical precancerous lesions.

Aim of the study

The aim of our study is to determine the possibility of timely detection of precancerous lesion of the cervix with a biomarker-based, non-invasive, objective methodology and by preventing possible cytomorphological errors in cytological screening and improving the current guidelines for cervical cancer screening & management, to decrease morbidity and mortality caused by cervical cancer as well as unnecessary interventions on the cervix in women of reproductive age.

Objectives

- Stain the cervical cytological diagnostic material of women involved in cervical cancer screening with p16/Ki-67 double immunocytochemical method, studying the expression of

biomarkers in cervical epithelial cells and determining immunocytochemical staining categories.

- Study expression of p16 and Ki-67 markers in cytological diagnostic material of the cervix together with the cytomorphological characteristics of the cells.
- Analyse expression of p16 and Ki-67 markers in cervical cytological diagnostic material along with Pap test and histomorphological results.
- Observe the long-term results of the cervical cancer screening.

Scientific Novelty of the Research

For the first time, during our research was conducted p16/Ki-67 dual immunocytostaining of cervical smear in parallel to the pap test, cervical cytologic material collected during opportunistic cervical cancer screening, from different diagnostic center, of women with abnormal previous pap test results.

Despite small size of study group, our results show that expression of p16/Ki-67 dual biomarkers in cervical cytology is statistically significant irrespective to the morphology of stained cell, and sensitivity

to detect high grade cervical intraepithelial neoplasia is much high that it was described by other authors.

For the first time during our research was conducted categorization and analysis of results based on immunostaining and morphology criteria of the stained cells as well according presence of inflammatory infiltrates in cytology diagnostic material.

For the first time during our research was conducted description of screening follow-up results of woman with negative p16/Ki-67 DS results during opportunistic cervical cancer screening

Theoretical and Practical Value of Expected Results

The results of our research on the expression of cell cycle control proteins in the cervical cytological diagnostic material along with the morphological features of the cells during high grade cervical dysplasia, will contribute to the deepening of fundamental knowledge on the mechanisms of precancerous lesions. The results of our study may help in the filling of the gap existing between cell biology and cytopathology and will improve the diagnostic value of cytology in cervical screening. The results of our study may have practical value for early detection of cervical precancerous lesion based on objective criteria and for effective triage and management

of the screening population. The results will be the basis for the development of sustainable guidelines for cervical cancer screening and management, in order to reduce cervical cancer morbidity and mortality and unnecessary interventions on the cervix in women of reproductive age.

Approbation of the Research Work

Dissertation approval took place at David Tvildiani Medical University on December 7, 2023.

Dissertation data and results were presented step by step:

1. Symposium of the Association of Pathologists of Georgia. Tbilisi, Georgia. 2011წ.
2. Regional Congress of Central Europe, “Actual Topics on Woman Health”. Batumi, Georgia. 2012
3. First International conference of “women’s rehabilitation association” (WRA), Healthy family, healthy pregnant woman, healthy child.” Tbilisi, Georgia. 2012
4. Students and Young Scientists Association of Davit Tvildiani Medical University, First Scientific Conference. Tbilisi, Georgia. 2013

5. Students and Young Scientists Association of Davit Tvildiani Medical University, Second Scientific Conference. Tbilisi, Georgia.2014
6. Symposium of Georgian Medical Women's Association. Tbilisi, Georgia.2015
7. Students and Young Scientists Association of Davit Tvildiani Medical University, Eleventh Scientific Conference "Nobel Day" Tbilisi, Georgia. 2022.
8. GAU International Scientific Conference 'Build a Better Future Today with Science'. Tbilisi, Georgia. 2022.
9. [2nd International Conference on Global Advanced Nursing and Healthcare](#)
August 11-12, 2023 | London, UK. (virtual)
10. TMA International Scientific Conference -Medicine: Innovations and Challenges 2023, (Conference has been accredited by EACCME ® with 15 European CME credits). Tbilisi, Georgia. 30.11.2023

The following Activities were Conducted During Working on the Research:

1. p16/Ki-67 Dual Immunocytochemistry training course, Certified Specialist, 2011 mtm Laboratories AG, Heidelberg, Germany.

2. Implementing Dual immunocytochemistry methodology in first Georgia during 2011-2013.
3. Introduction of teaching practical skills of morphological, immunocyto/histochemical, including double immunocytochemistry diagnosis based on tissue and cytological diagnostic material, Georgian-American University School of Medicine, Pathology Laboratory; 2022 წ.
4. Participation in the discussion of recommendations of “Enduring Consensus Cervical Cancer Screening and Management Guidelines with use of *p16/ki-67 Dual Stain*” for use of p16/Ki-67 Dual stain, developed by the working group of American Society for Colposcopy and Cervical Pathology (ASCCP). June 1,2023.
5. <https://www.asccp.org/PublicComments2023>

Five articles and one abstract have been published around the dissertation.

Structure and volume of Dissertation

The dissertation consists of 7 parts: introduction, literature review, research material and methods, statistical analysis of the

results, discussion, conclusions, practical recommendations. The work is accompanied by a list of used literature.

The work includes 100 printed pages, illustrated with 18 micrographs, 12 diagrams and 15 tables. The work is accompanied by 9 appendices. The bibliography includes 97 sources.

Materials and methods of the study

Our study is a cross-sectional design. We studied the cervical material of women between 21 and 65 years of age who, due to the pathological results of the Pap test, were referred for repeated screening. We studied the cytological diagnostic material of the cervix with p16/Ki-67 double immunocytochemistry (for the first time in Georgia), analyzed the obtained results as well as the results of routine cervical screening pathomorphological studies. The reference standard was the results of cervical biopsy H&E histopathology. Within the scope of the study, we studied the results of the Pap test of 162 cases (women), histopathology of 29 cases and HPV-PCR test of 33 cases. Assessment of biomarker expression was performed at three medical centers by independent pathologists. All appropriate smear collection methods for immunocytochemical study were taken into account when collecting cervical material. Immunocytochemical examination of cervical cytological material for dual p16/Ki-67 biomarkers was performed using the CINtec PLUS Kit (REF 9531, mtm laboratories, Heidelberg, Germany) according to the manufacturer's instructions. The Shandon Coverplate TM system was used for staining the slides. p16 immunohistochemical examination of cervical biopsy specimens was performed using the CINtec histology kit (REF 9511, mtm laboratories, Heidelberg, Germany) according to the manufacturer's instructions. The criteria for inclusion in the study were taken into account during the collection of cervical material. Follow-up of screening results after the study was carried out

during the years 2014-2023. The study was carried out based on the conclusion of the 2011 bioethical commission of Davit Tvildian Medical University. The collection of pathomorphological diagnoses of the cervix of the patients, as well as other clinical data, was carried out in the clinics on the basis of medical histories, taking into account the decision of the bioethical commissions of the respective clinics.

The results of our study

Immunostaining results and categorization of results

According to the manufacturer's instructions, when we interpreted the slides stained by double p16/Ki-67 immunocytochemistry by light microscopy, the presence of more than one epithelial cell with brown cytoplasmic and red nuclear staining in a cell cluster was rated as double p16/Ki-67 positive immunostaining (p16/Ki-67 DS), Figure N1; Cases without expression of p16/Ki-67 DS were rated as negative for staining, Figure N2.

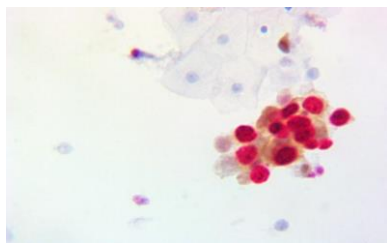


Figure N1.

Positive p16/Ki-67DS, with atypia x 400 magnification

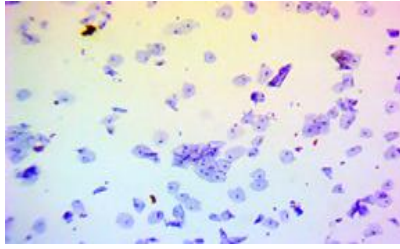


Figure N2.

Negative p16/Ki-67DS, without atypia x 100 magnification

Along with the results of immunocytochemical staining, taking into account the criteria developed by Wentzensen and colleagues (Wentzensen et al 2005) scoring according to the nucleus (Increased nuclear/cytoplasmic ratio, Chromatin granule, Irregular nuclear shape, and Anisonucleosis), we create additional categories, where according to the characteristic of the nucleus. The presence of one or more of the above nuclear features corresponded to the atypical cell category characteristic of dysplasia: 1) p16/Ki-67 DS positive category, stained cells with or without atypia. 2) p16/Ki-67 DS negative:

- a) p16 staining category, stained cells with or without atypia.
- b) Ki-67 staining category, stained cells with or without atypia.
- c) separate p16 and Ki-67 staining category (without double staining), with or without atypia.
- d) cells without staining category, with or without atypia.

In each category we studied presence of the inflammatory infiltrates. Different staining categories are presented in the Figures N3-7 and Diagram N1.

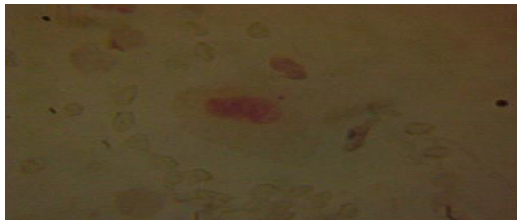


Figure N3.

Positive p16/Ki-67 DS, without atypia; x 400 magnification

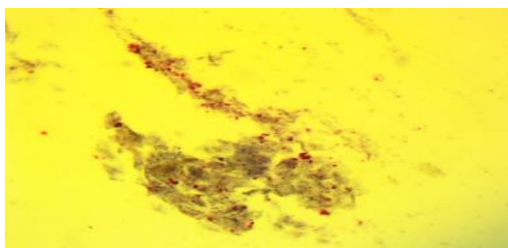


Figure N4.

Negative p16/Ki-67 DS, separate p16 and Ki-67 staining. x 100 magnification

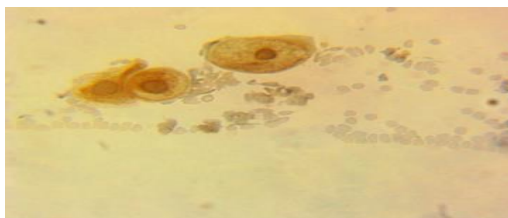


Figure N6.

Negative p16/Ki-67 DS, p16 staining with atypia. x 400 magnification

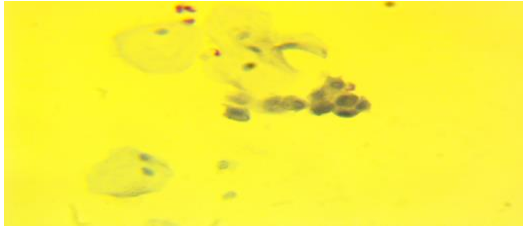


Figure N7.

Negative p16/Ki-67 DS, without atypia. x 400 magnification

We interpreted the p16 IHC staining results of the histological material according to the results of the LAST study (Darragh et.al. 2012), where the p16 IHC positive category corresponded to HSIL, and the p16 IHC negative category corresponded to <CIN1, (Figures N8-9).

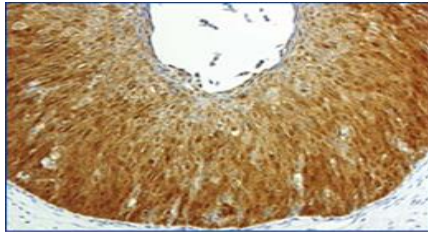


Figure N8.

Positive p16 IHC x 100 magnification.

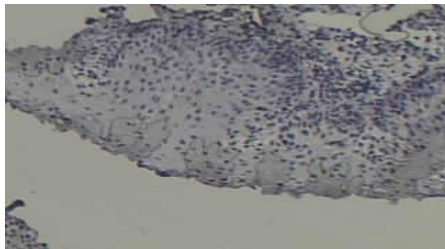


Figure N9.

Negative p16 IHC x 100 magnification.

Statistical analysis of the results

Taking into account the criteria for inclusion in the study, the obtained data were entered into the database and statistical analysis was performed. Data were analyzed with SPSS software (IBM Corp. Released 2011. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0. Armonk, NY: IBM Corp.). For comparison between categorical variables, χ^2 test, Fisher's exact test, Cohen's kappa (κ) statistic were used, considering the fit to the data. The accuracy of detection of high-grade dysplasia (CIN2+) in the study of cervical cytological diagnostic material by immunocytochemical and cytomorphological methodologies was evaluated by measuring the sensitivity, specificity, positive (PPV) and negative (NPV) predictive values and accuracy of the diagnostic tests. The gold standard of diagnosis was histomorphological result.

In our study, the categories of p16/Ki-67 DS immunocytochemical staining of slides of the cervical cytological material are given in chart N1. The consensus of the diagnosis was 100% in the assessment of p16/Ki-67 double immunocytochemical staining of cytology slides among three independent pathologists.

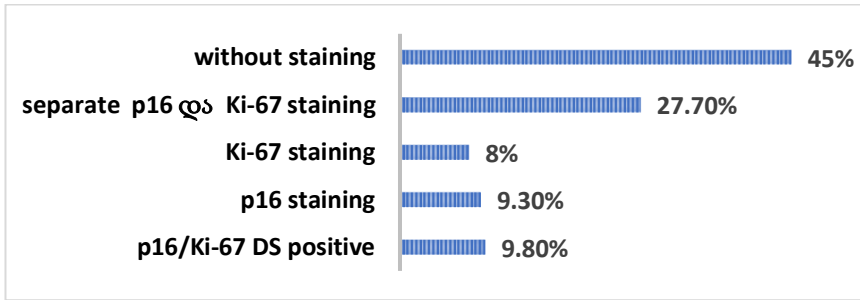


Diagram N1.

Categories of slides of p16/Ki-67 DS immunocytochemical staining.

H&E histopathological results of cervical biopsy material are given in the Diagram N2;

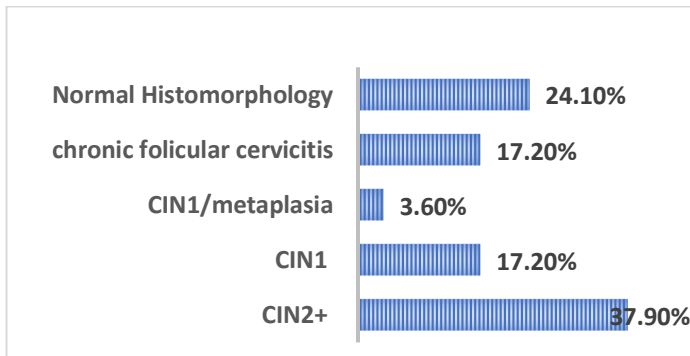


Diagram N2.

Distribution of histopathology results .

The results of positive p16/Ki-67 DS immunocytochemistry of cervical smear and H&E histopathology of corresponding cervical biopsy material are shown in Table N1. Diagram N3.

H&E Histopathology	Histopathology, n	p16/Ki-67DS immunocytochemistry, irrespective to the morphology of stained cells	Percentage of positive dual staining
CIN2+	11	11	100%
CIN1	5	2	40%
CIN1/metaplasia equivocal	1	0	0%
Chronic follicular cervicitis	5	0	0%
Normal histopathology	7	0	0%
Total	29	13	

Table N1.

Results of p16/Ki-67 DS immunocytochemistry and H&E histopathology

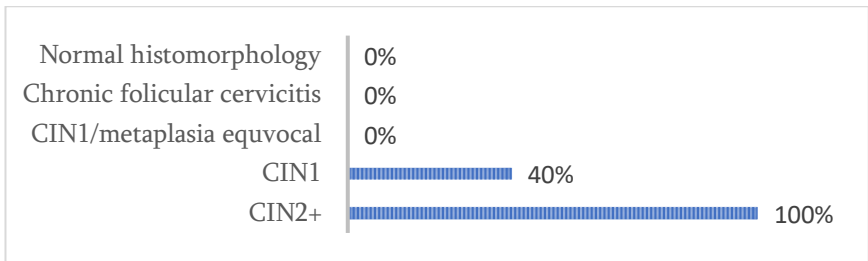


Diagram N3.

Distribution of H&E histopathological findings in cervical smear with positive p16/Ki-67 DS

Statistical analysis based our data revealed, that correlation between p16/Ki-67 dual biomarker expression, irrespective of morphologic features of stained cells, in cervical cytological diagnostic material and histopathological CIN2+ lesions is statistical significant, $p=2,5 \times 10^{-6}$, Table N2.

	<i>p</i> value, correlation between p16/Ki-67DS and H&E CIN2+
p16/Ki-67DS immunocytochemistry, irrespective to the morphology of stained cells	$p=2,5 \times 10^{-6} \ll 0,001$
p16/Ki-67DS immunocytochemistry with cellular atypia	$p=5,75 \times 10^{-6} \ll 0,001$

Table N2.

Correlation of high-grade uterine dysplasia and p16/Ki-67DS positive results

The results of positive p16/Ki-67 DS immunocytochemistry with cellular atypia and H&E histopathology of the corresponding biopsy material are given in Table N3.

Histopathology n	p16/Ki-67 DS immunocytochemistry positive , with cellular atypia
CIN1 n=5	1
CIN1/metaplasia n=1	0
CIN2+ n=11	10
Cronic follicular cervicitis n=5	0

Table N3.

Distribution of H&E histopathology and p16/Ki-67 DS immunocytochemistry results with atypia

Statistical analysis of our data revealed, that considering cellular atypia of p16/Ki-67 DS positive results of cervical cytological diagnostic material and histopathological CIN2+ lesions is statistically significant,

$p=5,75 \times 10^{-6} \ll 0,01$, Table N2.

In our study, the sensitivity, specificity, PPV, NPV and accuracy of detection of high-grade dysplasia (CIN2+) by p16/Ki-67 DS immunocytochemistry in uterine cytological material, considering histopathology as the gold standard of diagnosis, are given in Table N4.

Test to detect CIN2+ in cervical smear	Sensitivity % (95% CI)	Specificity % (95% CI)	PPV %	NPV %	Accuracy%
p16/Ki-67 DS positive, irrespective to the morphology of stained cells	100	89	85	100	93
p16/Ki-67 DS positive with cellular atypia	91	94	91	94	93
Pap test	9	100	85	64	66

Table N4.

Sensitivity, Specificity, PPV, NPV and Accuracy of CIN2+ Detection

Considering the atypia of cells stained by immunocytochemistry in the cytological diagnostic material, the specificity, PPV and NPV of detection of high-grade dysplasia of the cervix was improved, although the sensitivity decreased, while the accuracy remained unchanged. Taking into account the morphological characteristics, Type 1 error was detected. It is worth noting, that there was no variability in interpretation between cytotechnologists and pathologists when evaluating the results of p16/Ki-67 DS immunocytostaining, although variability was detected

when adding a component of morphological evaluation along with marker expression. All but one case of positive p16/Ki-67 DS cervical cytology, where the H&E histopathology result of the corresponding biopsy material was CIN2+, showed cellular atypia of the double-stained cells in the cytological material. At the same time, in two cases of a positive p16/Ki-67 DS cytology slide, in which the result of H&E histopathology of the corresponding tissue material was CIN1, in one case, cellular atypia was detected during immunocytochemistry staining, and in the other case, double staining without atypia, Table N5.

Histopathology	p16/Ki-67 DS positive, without cellular atypia
CIN1 n=5	1
CIN1/metaplasia n=1	0
CIN2+ n=11	1
Chronic follicular cervicitis n=5	0

Table N5.

Distribution of H&E histopathology and p16/Ki-67 DS immunocytochemistry results without atypia

Based age grouping of the woman, a positive result of p16/Ki67 DS was detected in the cytological smear of the cervix in the age range of 28-50 years. No influence of female age on the expression variable of double biomarkers p16/Ki67 in cervical diagnostic material was detected ($p>0.05$). However, p16/Ki67 DS positive results were more prevalent in women over 40 years of age.

Categories of cytological slides with immunostaining of epithelial cells and morphological features are given in diagram N4. The highest rate of atypia was found in the category of positive double staining.

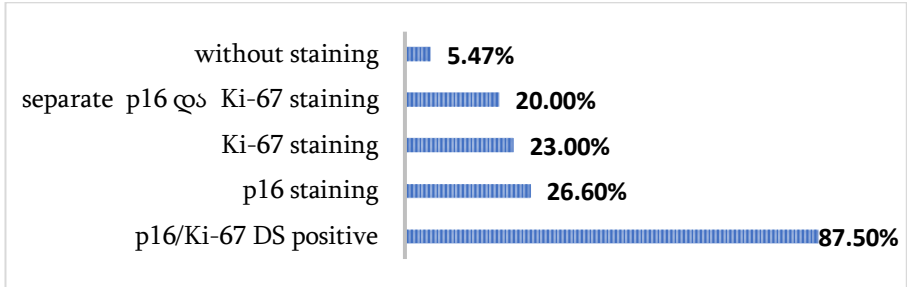


Diagram N4.

Frequency of atypical cells in different categories during p16/Ki-67 DS immunocytochemistry

When comparing different categories according to immunostaining and cellular atypia, in p16/Ki-67 DS negative category, no significant correlation was revealed, $p > 0.57$, $p > 0.73$, $p > 0.81$, Table N6.

	Cellular atypia of stained cells	Inflammatory infiltrates
P 16 staining category	$p > 0.57$	$p > 0,29$
Ki-67 staining category	$p > 0.73$	$p > 0,18$
Separate staining category	$p > 0.81$	$p > 0,89$

Table N6.

Correlation of cellular atypia and inflammatory infiltrates in different immunostaining categories

The categories of cytological slides according to different immunostaining of epithelial cells and the presence of inflammatory infiltrates are given in diagram N5.

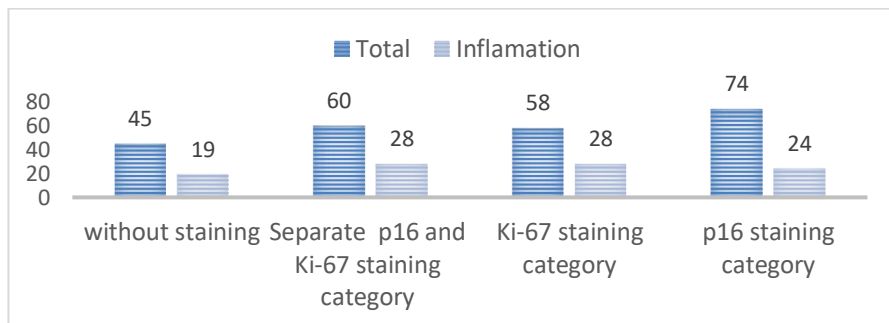


Diagram N5

Frequency of inflammatory infiltrates in different staining categories with p16/Ki-67 DS negative slides

Statistical analysis between inflammatory infiltrates and different staining groups (p16 positive, Ki-67 positive, separate p16 positive and Ki-67 positive) of p16/Ki-67 DS negative category, doesn't reveal statistically significant correlation, $p > 0.29$, $p > 0.18$, $p > 0.89$, Table N6.

Out of the 29 histopathology results of cervical biopsy, two cases was CIN2/CIN3, and one case was CIN1/metaplasia. On p16 IHC staining of the equivocal histological material, the cytology slides corresponding to the p16 IHC positive cases were immunocytochemically p16/Ki-67 DS positive. The results are given in Table N 7.

Equivocal H&E histopathology	p16/Ki-67 DS positive	p16 IHC positive	p16 IHC negative
CIN1/metaplasia, n=1	0	0	1
CIN2/3, n=2	2	2	0

Table N7.

Distribution of H&E histopathological and immunostaining results in cervical diagnostic material

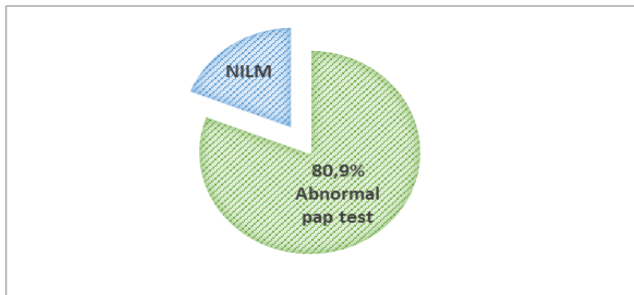
The Pap cytology results of 10 women with DS-negative cervical cytology, who had a mean age of 41,5 years at enrollment, were assessed after a median follow-up time of 6,5 years (ranging from 3 to 10 years). The results are provided in Table N8.

Time of Initial screening	Age at Initial screening	Results of p16/Ki-67 DS at initial screening	Results of Pap test at initial screening	Time of follow up screening	Results of follow up Pap test screening
2011	30	Negative	LSIL	2014	NILM
2011	34	Negative	LSIL	2015	NILM
2012	40	Negative	NILM	2016	NILM
2011	60	Negative	NILM	2017	NILM
2011	39	Negative	LSIL	2018	NILM
2012	40	Negative	LSIL	2018	NILM
2011	41	Negative	LSIL	2019	NILM
2012	42	Negative	LSIL	2020	NILM
2011	50	Negative	LSIL	2021	NILM
2011	63	Negative	LSIL	2021	NILM

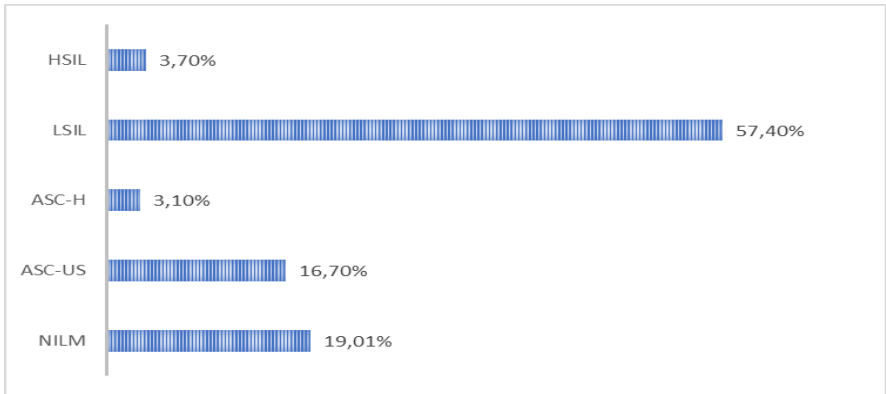
Table N8.

Median 6,5 years follow-up cytology results in p16/Ki-67 DS negative women.

Out of all Pap cytology results, various pathologies (SIL, ASC) were detected in 80.9% cases, based on the medical histories of the women of our study (Diagram N6.a). The most frequent and the rarest Pap cytology results were LSIL and ASC- H, respectively (Diagram N6.b).



a.



b.

Diagram N6.

A. The overall incidence of an abnormal Pap test.

b. Distribution of Pap test results.

The percentage distribution of abnormal Pap test results based Bethesda categories was as follows: ASC-US 27 (20.6%); ASC-H 5 (3.8%); LSIL 93 (70.9%); HSIL 6 (4.6 %). p16/Ki-67 DS positive result was in 12,2 % out of all woman with abnormal Pap test results, Diagram N7.

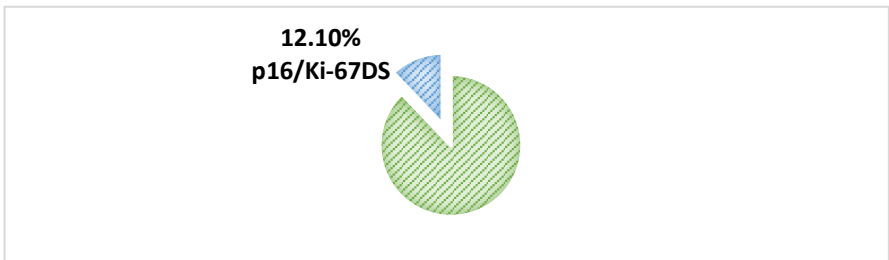


Diagram N7.

Incidence of dual p16/Ki-67 staining in women with abnormal Pap test results.

p16/Ki-67 DS immunocytochemistry staining of cervical cytology material of women with the same pathological results by Pap test, revealed different categories based on biomarker expression, Table N9.

	Pap test NILM (31)	Pap test ASC-US (27)	Pap test ASC-H (5)	Pap test LSIL (93)	Pap test HSIL (6)	Total
p16/Ki-67 DS positive	0	1	2	11	2	16
p16 staining	4	3	0	6	2	15
Ki-67 staining	3	0	0	10	0	13
Separate p16 and Ki-67 staining	7	13	1	23	1	45
Without staining	17	10	2	43	1	73
Total	31	27	5	93	6	162

Table N9.

Distribution of p16/Ki-67 DS immunocytochemical staining and Pap test results of cervical cytology diagnostic material.

The distribution of histopathology and Pap test results of the women included in our study is shown in Table N10, Diagrams N8 and N9.

	NILM	ASC-US	ASC-H	LSIL	HSIL	Total
CIN2+		1		9	1	11(37,9%)
CIN1			3	2		5(17,2%)
CIN1/metaplasia				1		1(3,6%)
chronoc follicular cervicitis				5		5(17,2%)
Normal histomorphology		4		3		7(24,1%)
Total	0	5(17,2%)	3(10%)	20(69%)	1(3,4%)	29

Table N10.

Distribution of Pap test and H&E histopathology results.

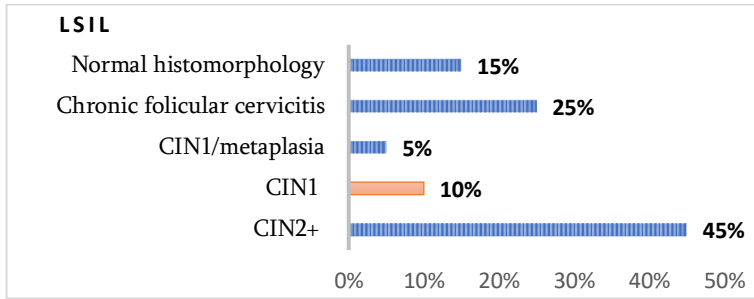


Diagram N8.

Distribution of H&E histopathological results
in LSIL group with Pap test

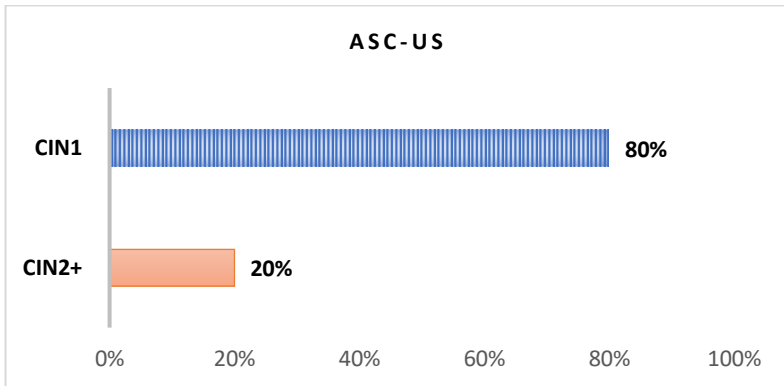


Diagram N9.

Distribution of H&E histopathological results
in ASC-US group with Pap test

According to the data of our study, the sensitivity, specificity, PPV, NPV and accuracy for Pap test in detection of CIN2+ are given in Table N4.

In order to detect high-grade dysplasia of the cervix, when comparing the results obtained from the examination of cervical cytological material by p16/Ki-67 DS immunocytochemical and Pap cytological methods, a low rate of concordance was revealed, according to Cohen's kappa (κ) statistical analysis of the data (Table N11).

p16/Ki-67/Pap test	Total 162
Negative/negative	144(88%0
Positive/positive	2(1,23%)
Positive /negative	12(7,4%)
Negative/positive	4(2,46%)
Agreement, %	% of agreement:90,12
Cohen's kappa (κ)	0,15 Slight agreement

Table N11.

Cohen's kappa (κ) analysis of p16/Ki-67 DS and Pap test results

HPV-PCR test results were available in 33 cases out of 162 women in our study. Of these, 7 cases had LR-HPV and 8 HR-HPV positive PCR results, while 18 cases were negative for HPV infection. From the mentioned 33 cases, the relevant histopathology results were available in 7 cases. The distribution of p16/Ki-67 DS, HPV PCR, Pap test, and histopathological results is given in Table N12.

HPV PCR	H&E CIN2+	Chronic follicular cervicitis	H&E N	Pap test LSIL	Pap test ASC- US	P16/Ki67
HPV negative		3		18		
LR-HPV		1	1		4	
HR-HPV	1			4	2	1

Table N12.

Distribution of p16/Ki-67 DS, HPV PCR, Pap test and histopathological results.

The prevalence of HR-HPV infection in our study was 24%. The prevalence of HR-HPV 16,18,33,45 and 56 genotypes is given in the Diagram N10.

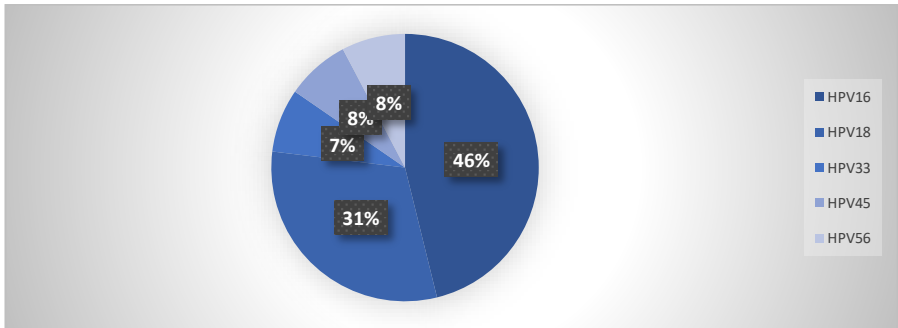


Diagram N10.

Prevalence of HR-HPV genotypes.

Discussion

Pap cytology based screening was introduced half a century later in Georgia compared to USA and the leading countries of Europe.

Therefore, taking into account the possibility of observing long-term outcomes in these countries, our aim was to identify an alternative, improved possibility of early detection of cervical precancerous lesions. At the beginning of our study, in the background of three years of experience of pap cytology-based screening in Georgia, taking into account the country's small population and low screening coverage at country level, selecting an unbiased study sample was a main task for us. First of all, it was important for us to have the opportunity to evaluate the expression of biomarkers in the cytological material of the uterus by independent experts, on the other hand, the results of the expression of biomarkers should be compared with the results of the morphological (cyto/pathological) examination of the cervix evaluated by independent pathologists. Of particular interest was the presence of different Pap cytology results by different laboratories of the same woman. In order to solve the mentioned task, knowledge and skills about immunocytochemical diagnostics were shared with cytotechnologists, pathologists, gynecologists of different medical centers. Finally, it was possible that collected cervical material from nine medical institutions was processed and studied by independent gynecologists, cytotechnologists and pathologists, respectively, and a statistical analysis of the results was carried out.

Our study revealed a statistically significant correlation between p16/Ki-67 DS positive results in cervical cytological diagnostic material and the diagnosis of precancerous lesion (CIN2+) in cervical tissue material by H&E histopathology. According to the results of our study, the expression of dual p16/Ki-67 biomarkers in cervical diagnostic material has high sensitivity and diagnostic role in screening for CIN2+(HSIL) cervical precancerous lesions, regardless of the morphological characteristics of the cells. The results of the p16/ Ki-67 DS studies varies, according to one group of authors (Schmidt et.al.2011), in the cytological diagnostic material of the cervix, p16/ Ki-67 DS immunocytochemistry for detecting CIN2+ lesions is characterized by high sensitivity, irrespective of the morphology of the stained cells. According to the study of the second group of authors (Prevodnik et.al. 2019), the high sensitivity of detecting high-grade dysplasia is manifested along with the presence of p16/Ki-67 DS along with cell atypia of stained cells. The results of studies on p16/ Ki-67 DS and high-grade cervical dysplasia by various authors together with the results of our study are shown in Table N13.

	Study	Sensitivity % (95% CI)	Specificity % (95% CI)	PPV %	NPV %
p16/Ki-67 DS	Results of our study	100,0%	89,0%	85,0%	100%
	Gajsek, Ursula Salobir et al.	88,1%	65,2%	44,6%	94,5%
	Ikenberg, Hans et al.	86,7%	95,2%	15,6%	99,9%
	Luttmer, R., Dijkstra, M., Snijders, P. et al.	93,8%	51,2%	29,9%	2,6%
Pap test	Results of our study	9,0%	100,0%	85,0%	64,0%
	Nkwabong, Elie et al.	55,5%	75,0%	88,2%	33,3%
	Ikenberg, Hans et al.	68,5%	95,4%	13,3%	99,7%

Table N13.

Sensitivity, specificity, PPV and NPV of CIN2+ detection according to different studies.

In our study, the influence of female age on the expression of double p16/Ki-67 biomarker in cervical cytological material was not revealed ($p>0.05$). However, within our study, the frequency of expression of dual biomarkers was more frequent in women over 40 years of age. The correlation of female age and the expression rates of double p16/Ki-67 biomarkers in cervical cytology was also not revealed in the study of Luttmer and colleagues (Luttmer et.al. 2016).

In our study, when examining cervical cytological material by double immunocytochemistry, correlation between overexpression of individual p16 or Ki-67 proteins in cells and the presence of cellular

atypia doesn't revealed ($p>0.05$). Results of studies on different immunostaining categories and morphology in double-stained cytological material are scarce. In this direction, the results of large sized randomized studies are interesting. According to various studies, p16 immunocytochemistry in combination with morphological markers improves the ability to detect high-grade cervical dysplasia (Wentzensen et al 2005).

Studying the correlation between immunostaining indicators of epithelial cells and inflammatory infiltrates on a cytological slide during immunocytochemical staining revealed that there is no statistically significant relationship between these two indicators ($p > 0.05$). Studies on the effect of inflammatory infiltrates on the expression of p16 and Ki67 biomarkers in cervical diagnostic material are scarce, however, according to different authors (Regauer et.al. 2007;Sobecki et.al. 2017) the expression of p16 positive cells and Ki-67 positive cells occurs during metaplasia and regeneration of cervical epithelial cells, respectively.

In our study, while studying the expression of p16/Ki-67 biomarkers in the cytological material of the cervix, it was revealed that the simultaneous expression of two proteins, the cell cycle inhibitor p16 protein and the cell proliferation indicator, Ki-67 protein, is associated with the presence of histopathologically confirmed high-grade dysplasia of the cervix. It was also revealed that the presence of different categories

of staining in the cells is not affected by the age of the woman and the presence of inflammatory infiltrates. It was also revealed that the morphological change of the cell nucleus in the cytological material does not affect the overexpression of p16 and Ki-67 protein separately. According to different authors, regarding the expression of p16 and Ki-67 proteins: protein p16 stops cell division and participates in the physiological aging process of the cell (Selvam et.al. 2018); Overexpression of p16 protein occurs in cells with persistent HR-HPV infection by viral E7 oncoprotein through inhibition of cellular protein Rb (Duncan et.al. 2013); Chronic overexpression of p16 protein in epithelial cells activates cell proliferation and promotes tumor development by paracrine stimulation of Wnt signaling cascade (Azazmeh et.al. 2020); Among gynecological malignancies, overexpression of p16 protein is observed in high-grade serous tumors of the endometrium (Yemelyanova et.al. 2009), as well as in high-grade serous tumors of the ovary (Vang et.al. 2009); Ki-67 expression is observed in mitotically active both normal and neoplastic cells (Gerdes et.al. 1983); Simultaneous expression of two proteins p16 and Ki-67 in cervical cytological diagnostic material was detected in Pap negative HPV positive women with histologically high grade dysplasia (Petry et.al. 2011). In our study, overexpression of p16 and Ki-67 biomarkers appear in cervical cytological material of women with repeated pathological

results by Pap test. Despite the results of the existing studies, it is a matter of further study to determine the molecular mechanisms that cause the overexpression of both proteins simultaneously in the cell, including whether the overexpression of the cell proliferation indicator Ki-67 protein is related to the overexpression of the cell cycle inhibitor p16 protein.

In our study, sensitivity of Pap cytology to detect high grade cervical precancerous lesions (CIN2+) was low (Table N3). Out of all cytology diagnosis, abnormal pap test results were detected in 80.9% of cases, from which LSIL, ASC-US, ASC-H and HSIL results were distributed as follows: 71%, 20.7%, 3.8% and 4.5%, respectively. Data on the prevalence of Pap test results vary according to the scientific literature. According to the research of one group of authors (Arslan et.al. 2018), the prevalence of pathological Pap test results is 4.7%, while the prevalence of ASC-US, LSIL, ASC-H and HSIL categories are 65%, 27%, 3.4%, 2.4%, respectively.

In our study, by studying the expression of dual biomarkers p16/Ki-67 in the cervical cytological material of women with repeated pathological SIL and ASC results during cytological screening, the possibility of detecting underlying high-grade dysplasia was revealed with high reliability. The sensitivity and specificity of detecting CIN2+ by p16/Ki-67 DS in the LSIL category are 100% and 91%, respectively, and

in ASC (ASC-US and ASC-H) category it is 100% and 86% respectively. According to the research results of one group of scientists (Schmidt et al. 2011), the sensitivity and specificity of detecting CIN2+ with p16/Ki-67 DS in the LSIL category are 94.2% and 68.0%, respectively, and in the ASC group, the sensitivity and specificity are 92.2% and 80.6%, respectively.

In our study, a low level of concordance was revealed between p16/Ki-67 DS immunocytochemistry and Pap cytological results to detect high-grade cervical dysplasia in cervical smear (Table N11).

long-term observation of screening results among woman with p16 /Ki-67 DS negative results, doesn't reveal any pathologic results after 3-10 years of follow-up. Due to the small amount of data and low reproducibility of cytological screening, it is impossible to establish a correlation with the long-term results of negative cervical cytology with p16 /Ki-67 DS. However, according to our results, negative p16 /Ki-67 DS results of the cervical smear, may be encouraging in terms of increasing the screening interval. According to modern screening guidelines, the screening interval is 5 years if the screening result is normal. The results of subsequent randomized trials are interesting in this regard. According to a study by one group of authors (Clarke et. al. 2019), women with negative p16/Ki-67 DS on cervical cytology have a significantly lower risk of developing CIN2+ within the next 5 years.

In our study, two cases of p16/Ki-67 DS positive immunocytochemistry results, which corresponding H&E histopathology results CIN1, were of particular interest. In one case, double-stained cells were with atypia, in the other case without atypia (Table N5). Due to insufficient data, our study could not determine whether a positive p16/Ki-67 DS immunocytology result is a predictor of the development of high-grade dysplasia in women with CIN1 histology. At this stage, there is little information regarding this, which gives motivation to continue similar type of research.

The use of p16 IHC has been recommended since 2012 for ambiguous histopathological diagnosis of the cervical precancerous lesion, according to the relevant guideline (Darragh et.al. 2012). In our study, the use of p16IHC in the case of 3 equivocal histopathological samples, made it possible to differentiate cervical precancerous lesions from non-neoplastic lesion. We think that, similar to the improvement of diagnostics by the integration of markers in the histological diagnostic material, the integration of biomarkers in the cervical cytological material creates an opportunity to differentiate neoplastic cellular changes from non-neoplastic cellular changes by clear, objective criteria, and this possibility is provided by the simultaneous detection of the expression of p16/Ki-67 biomarkers in cytology material.

During our study period, given the opportunistic nature of screening and the limited availability of HPV PCR testing, only 33 case of HPV PCR test results could be retrieved (Table N12, Diagram N10). In our study the prevalence of HR-HPV is 24%, of which HPV16 and 18 genotypes accounted for the majority of cases (>50%). Among our data, only for one case (LSIL by Pap cytology) with a diagnosis of CIN3 histopathology and corresponding p16/Ki-67 DS positive result, HR-HPV PCR result was positive. Due to the small amount of data, it was not possible statistically to compare the results of double immunocytochemistry and HR-HPV, although in our study it was revealed that, out of 8 HR-HPV PCR positive cases only in one case p16/Ki-67DS was positive. Taking into account, that p16/Ki-67 DS has high sensitivity of detection of cervical high grade interepithelial neoplasia, it is possible to assume high prevalence of HR-HPV infection and low specificity of HR-HPV PCR in detecting of precancerous lesions in screening population. although the results of randomized studies are important in this regard. Detection of HPV genotypes is important for better planning of preventive measures by adopting corresponding vaccines in the country. According to various authors, a particularly high prevalence of HR HPV genotypes is observed in developing countries.

Based on the study of the medical histories of the women involved in our study, various comorbid conditions were identified, although the

relationship between the mentioned conditions and cervical pathologies could not be studied.

Limitations of our study were the size of the study group and possible selection bias. The study group consisted of opportunistic cervical cancer screening participants with a history of abnormal Pap test results. p16/Ki-67 DS immunocytochemical testing of cervical material was performed in Georgia in three laboratories from March 2011 to December 2013. The following factors may have influenced the size of the study material and the selection bias: 1) Immunocytochemical examination was offered to all the women mentioned above. However, despite repeated abnormal Pap cytology results or non-identical cytology results from different medical centers, not all had access to p16/Ki-67 DS testing. During 2.5 years, we were able to study the cytological material of only 169 women on a double immunocytochemical study, of which 7 were unsatisfactory for study. 2) Cervical biopsy was performed on the recommendation of gynecologists. Not all women were offered a biopsy in accordance with the cervical cancer screening protocol, and despite the recommendation, not all women underwent a biopsy. In some cases, cryodestruction of cervical lesions was performed without collection of histological material. Therefore, only 29 H&E histopathology results of 29 biopsy materials were available to us, of which we performed p16 IHC examination based on available paraffin block material in 3 cases. Unfortunately, after the

mentioned period, we did not have the opportunity to extend study group further in Georgia. Despite the limitations discussed above, we decided to process the collected material, study it and publish the analysis.

The strength of our study lies in the fact, that cervical material collection and examination were performed simultaneously with pathomorphological and immunostaining methodologies. Immunostaining and collection of pathomorphological results were performed on cervical material collected from different medical centers, and diagnosis was performed by independent experts in the field of clinical pathology.

The results of our research revealed, that the simultaneous overexpression of two proteins, the cell cycle inhibitor p16 protein and the cell proliferation indicator Ki-67 protein, is associated with cell oncotransformation. Overexpression of only one of the proteins in the cells does not affect the presence of dysplastic changes in the cells. The obtained results give us the opportunity to prove that biochemical changes precede cyto-morphological changes. On the other hand, cyto-morphological changes are not always related to neoplastic processes. Therefore, we can conclude, that the integration of relevant biomarkers in the cell improves the diagnostic value of cytology. This finding, among other factors, may explain why there may be high rate of LSIL or ASC-US

during screening or low reproducibility of the results, while SIL is not confirmed during histopathology examination of biopsy material at all.

Despite the relatively small size of a sample in our and others' studies, an important benefit lies in the fact, that the results give opportunities to make revision of the existing classification of precancerous lesions of the cervix, based on etiopathogenesis and immunophenotype of the lesions, by the integrating of dual p16/Ki-67 biomarkers in cytology (Table N14). The results of our study may give opportunities to make revision of an screening algorithm to build up enduring cervical cancer screening guideline (Diagram N12), which may improve outcomes of cytological screening, especially during triage of ASC/LSIL category.

Etiopathogenesis	HR-HPV infection		Cell cycle dysregulation related to the persistent HR-HPV infection	Invasive carcinoma
Pap test	NILM	ASC-US/LSIL	HSIL	Invasive carcinoma
p16/Ki-67DS immunocytochemistry	p16/Ki67DS negative		p16/Ki-67 DS positive	Invasive carcinoma
H&E histopathology	N	LSIL (CIN 1)	HSIL (CIN 2+)	Invasive carcinoma
P16 IHC	p16 IHC negative		p16 IHC positive	Invasive carcinoma

Table N14.

Classification of cervical precancerous lesions based on etiopathogenesis and morphological/immunophenotypic characteristics.

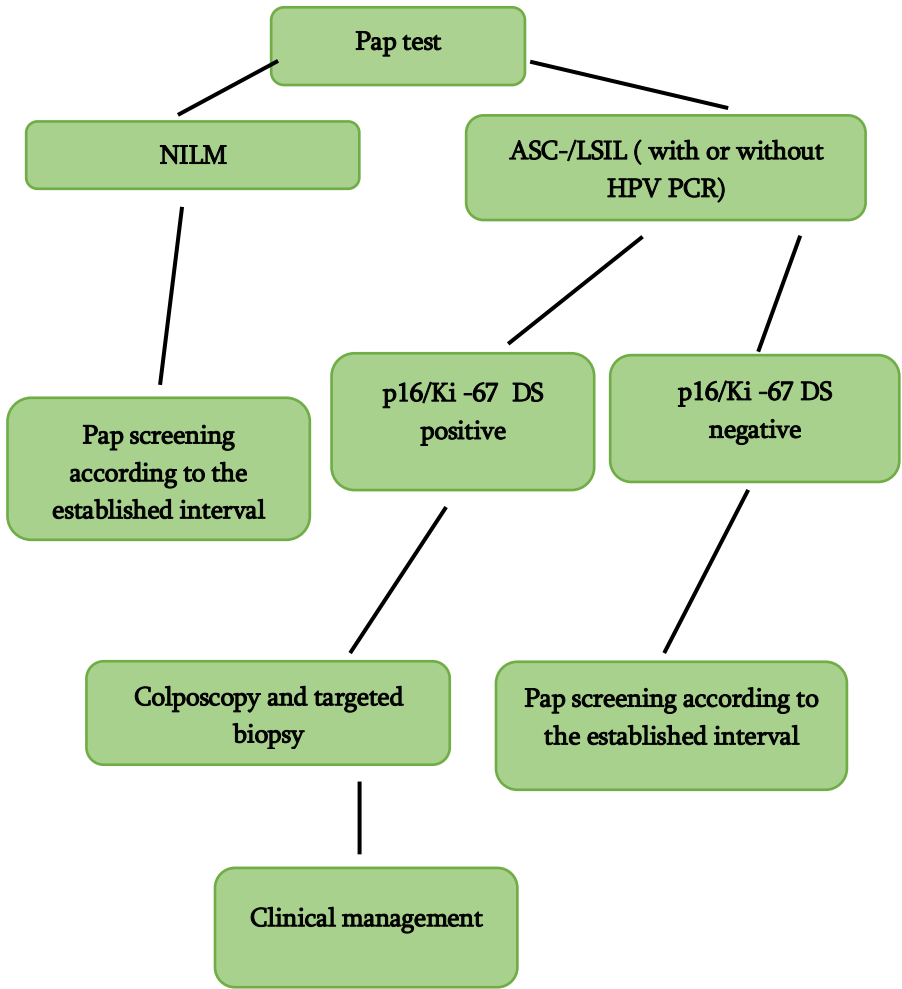


Diagram N11.

A possible management algorithm for cervical cancer screening with the use p16/Ki-67 DS.

Based on the results of our research, we can conclude, that the of integration of p16/Ki-67 dual biomarkers in cervical cytological material has greater diagnostic value during cervical cancer screening compared to cytological screening alone. Current methodologies of cervical cancer screening significantly decrease cancer burden, however, the low sensitivity of the pap test, the complexity and less compliance of the existing cyto-histological classification, as well as the low specificity of PCR HPV and the high prevalence of HPV infection remain challenges for both clinicians and patients. The integration of biomarkers in cytology may be important in improving the diagnostic role of cytology to overcome the difficulties associated with differentiating between neoplastic and non-neoplastic processes in cytology. The use of p16/Ki-67 DS in cervical cancer screening can improve the clinical management of women involved in screening, which, on the one hand, by early detection and subsequent appropriate treatment of precancerous lesions will reduce the burden caused by cancer, on the other hand, it will reduce reproductive health problems related to the unnecessary cervical interventions in young women. Despite the high cost of per test, p16/Ki-67 DS may be effective in the long term, especially in the triage of ASC/LSIL categories of pap cytology screening. In low-income countries, where screening is opportunistic and there is a paucity of pathological diagnostic referral centers, p16/Ki-67 DS can be considered as a quality control tool for cytological screening.

Conclusions

1. In the Georgian cervical cancer screening population, study of p16 and Ki67 biomarker in cervical cytology material of woman with previous SIL or ASC pap test results, revealed the following staining categories: 1) p16 staining, 2) Ki-67 staining, 3) p16 and/or Ki-67 staining 4) p16/Ki-67 dual positive 5) negative for staining. According to the expression of biomarkers, the most frequent categories was p16 and/or Ki-67 negative cytology category and the rarest was Ki-67 positive cytology category. In parallel mode, in the same group of women, when studying the cervical cytological diagnostic material by Pap test, according to the Bethesda system classification, the following categories were identified: NILM, LSIL, HSIL, ASC-US(H); LSIL was the most common, and ASC-H was the rarest category; According to the histopathological results (control group) of the cervical biopsy material of the same group of women N, LISL and HSIL (WHO classification) categories were identified (N, CIN1 and CIN2+ by Koss classification, respectively), of which the HSIL(CIN2+) category was the most frequent.

2. Expression of p16/Ki-67 dual biomarkers in epithelial cells of cervical cytology material, irrespective of morphology of stained

cells, is statistically significant to detect high grade cervical intraepithelial lesion, with considering histopathology as a gold standard of diagnosis.

3. Simultaneous expression of p16/Ki-67 dual biomarkers in epithelial cells of cervical cytological diagnostic material, shows significantly improved sensitivity, accuracy and reproducibility of detection of precancerous lesions compared to Pap cytology.

4. The age of woman does not affect the expression of p16/Ki-67 dual biomarkers in cervical cytology material during cervical cancer screening, although the expression of p16/Ki-67 dual biomarkers is more common in women older than 40 years of age.

5. Overexpression of individual p16 or Ki-67 proteins during dual immunostaining of cervical cytology material does not affect the morphology of stained epithelial cells (biomarker expression vs cell morphology).

6. The presence of inflammatory infiltrates in cervical cytological material does not affect the overexpression of p16 and/or Ki-67 proteins in epithelial cells (biomarker expression vs inflammatory infiltration).

7. Observation of the long-term, an average 6,5 years, follow-up of cervical cytology-based screening of the woman with negative p16/Ki-67DS, revealed no abnormal screening results.

8. Integration of p16/Ki-67 biomarkers in cervical cytology diagnostic material fills the gap between molecular biology and cytopathology and improves the diagnostic value of cytology.

Practical recommendations

For experts:

The integration of p16 and Ki-67 biomarkers in cervical cytological diagnostic material reveals the possibility of improving cyto-histological classification of cervical precancerous lesions and recommendations in cervical cancer screening and management guidelines.

For clinical pathologists:

Integration of p16/Ki-67 biomarkers in cervical cytological diagnostic material improves the ability of objective detection high-grade dysplasia and objective differentiate precancerous from non-dysplastic cytology.

For clinicians:

Identification of high-grade dysplasia is the most important issue in the screening population, especially in the ASC-US/LSIL group, that determines the effectiveness of the clinical and economic outcomes of screening, therefore, considering the expression rate of dual biomarkers p16/Ki-67 as an indicator of high-grade precancerous lesion, will help gynecologists in making effective decisions during clinical management.

For women involved in screening:

Use of p16/Ki-67 DS during cervical cancer screening will reduce stress related to the repeated confusing pap cytology results (ASC, SIL) and unnecessary medical interventions. Objective methodology will increase confidence during screening, the number of women involved in the screening may rise, which in turn will contribute to the early detection of pre-cancer and reduction of cervical cancer related burden.

For health system organizers:

lack of reference medical centers for pathology diagnostics and restriction in sharing of pathomorphological results between laboratories, especially in the case of ambiguous results of cervical cancer screening, advocates the use biomarker-based diagnostic capacity as a tool of quality control, and therefore very important to promote this process.

For researchers:

Improving the fundamental knowledge related to dysplastic changes in cytological diagnostic material, will help to plan and develop molecular research on the development of invasive carcinoma from the high-grade dysplasia.

List of Publications:

1. S. Kakaliashvili, Kharzeishvili, G, Didava, T.Saluqvadze, I.Getzadze, N.Lomtadze. „p16/Ki-67 double staining results in women with different types of dysplasia Based on pap-test results in Georgia“ Actual Topics on Women Health, 2012 vol. 1; p.65-69.
2. Sopio Kakaliashvili-Dzagnidze, Omar Khardzeishvili, Giorgi Didava. "Expression of p16/Ki-67 biomarkers during atypical Pap test results." First SYSSA Conference. D. Tvildiani Medical University Press; Tbilisi. Georgia. 2013, p. 4-7.
3. S. Kakaliashvili-Dzagnidze, A. Dzagnidze. "Prevalence of HPV infection among Woman Enrolled in Cervical cancer screening in Georgia". GAU International Scientific Conference. 2022, p.90-94.
4. Sopio Kakaliashvili-Dzagnidze, Omar Khardzeishvili, Sergo Tabagari. "The role of dual p16^{INK4a}/ Ki-67 biomarkers integration in cytology". Journal of the Georgian Critical Care Medicine Institute, Georgian Academy of Medical Sciences, Georgian Association of Catastrophe & Critical Care Medicine, N7, 2023.
5. Kakaliashvili-Dzagnidze S, Khardzeishvili O, Tabagari S. Diagnostic Accuracy of p16 INK4a/Ki-67 Dual Immunostaining for

Detection of High-Grade Cervical Intraepithelial Neoplasia in Women Involved in Cervical Cancer Screening in Georgia. Analytical Cellular Pathology. 2023 Jun 5; 2023.

6. Kakaliashvili-Dzagnidze S. The role of the morphologic categorization of p16INK4a/Ki-67 dual stained cytology in detecting of high grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN2+). Translational and Clinical Medicine-Georgian Medical Journal. 2023 Dec 21;8(2).