



Pouzdanost CINtec™ p16^{INK4a} citološkog imunohistochemijskog testa u skriningu prekanceroznih lezija grlića materice

Reliability of the CINtec™ p16^{INK4a} immunocytochemical test in screening cervical precancerous lesions

Milena Jović*, Dane Nenadić‡, Zvonko Magić†, Lidija Zoltarevski*, Biserka Durdević-Vukomanović*, Željka Tatomirović*, Nataša Strelčić†, Danilo Vojvodić†

Vojnomedicinska akademija, *Centar za patologiju i sudsku medicinu, †Institut za medicinska istraživanja, ‡Ginekološko odeljenje, Beograd

Apstrakt

Uvod/cilj. Utvrđeno je da prekomerna ekspresija p16^{INK4a} proteina ukazuje na genomsku integraciju visoko rizičnih humanih papiloma virusa (HPV) i razvoj premalignih intraepitelnih lezija grlića materice. Cilj rada bio je da se utvrdi da li kod bolesnica sa premalignim lezijama grlića materice postoji značajnija pozitivna korelacija stepena ekspresije p16^{INK4a} proteina u razmazu citološkog brisa grlića materice sa stepenom histološke displazije, u odnosu na nalaz Papanikolau testa. Osim toga, upoređivana je HPV tipizacija sa nalazom p16^{INK4a} proteina i Papanikolau nalazom. **Metode.** Ispitivanjem je obuhvaćeno 48 bolesnica sa prekanceroznim promenama grlića materice i HPV cervicitisom i 10 zdravih žena. Svakoj bolesnici urađen je Papanikolau test, CINtec™ p16^{INK4a} citološki imunohistochemijski test, HPV tipizacija lančanim reakcijom polimeraze na HPV tipove 16, 18, 31 i 33 i biopsija promene. **Rezultati.** Poređenjem rezultata Papanikolau testa sa patohistološkim (PH) nalazom potvrđen je nalaz skvamozne interepitelne lezije niskog stepena (LSIL) kod 38% ispitanica i nalaz skvamozne intraepitelne lezije visokog stepena (HSIL) kod 69,2% ($p > 0,05$). Korelacijom p16 testa sa PH nalazom utvrđena je statistička značajna pozitivna korelacija između pozitivnosti p16 testa i stepena lezije ($p = 0,000$). Nalaz p16 bio je pozitivan kod 70% bolesnica sa LSIL i 94,4% sa HSIL promenama. Analizom vrednosti p16 testa prema Papanikolau testu utvrđeno je postojanje pozitivne korelacije između pozitivnosti p16 testa i stepena lezije ($p = 0,011$). Nalaz p16 bio je negativan kod 38% bolesnica sa LSIL i 15% sa HSIL promenama. Tipizacijom HPV utvrđen je kao najzastupljeniji pozitivan nalaz na HPV 16. Analizom rezultata p16 testa prema HPV statusu i Papanikolau testa prema HPV statusu dobijeni su heterogeni rezultati. **Zaključak.** Kod bolesnica sa premalignim lezijama grlića materice postoji značajnija pozitivna korelacija stepena ekspresije p16^{INK4a} proteina u razmazu citološkog brisa grlića materice sa stepenom histološke displazije, u odnosu na nalaz Papanikolau testa.

Ključne reči:

grlić materice, displazija; prekancerska stanja; infekcije, papiloma virus; dijagnoza; vaginalni brisevi; citološke tehnike; imunohistochemija.

Abstract

Background/Aim. Overexpression of p16^{INK4a} has been found to be linked with genomic integration of high-risk human papillomavirus (HPV) and the development of precancerous cervical intraepithelial lesions. The aim of this study was to examine if there is a higher positive level of correlation between grade of histological dysplasia and p16^{INK4a} level of expression in cervical smear, compared to results of Papanicolaou test. We also examined the correlation between HPV type, p16^{INK4a} expression and Papanicolaou test results. **Methods.** A total of 48 women with precancerous cervical lesions and HPV cervicitis and 10 healthy women were enrolled in the study. Papanicolaou test, CINtec™ p16^{INK4a} cytological immunohistochemical test, polymerase chain reaction (PCR) HPV 16, 18, 31, 33 analysis and histopathology of the lesion were performed in all the patients. **Results.** Comparing the results of Papanicolaou test and the grade of histological dysplasia, low-grade squamous intraepithelial lesion (LSIL) was confirmed in 38%, and high-grade squamous intraepithelial lesion (HSIL) in 69.2% of the patients ($p > 0.05$). Significant positive correlation was found between p16 overexpression and grade of histological dysplasia ($p = 0.000$). Overexpression p16 was found in 70% of LSIL and 94.4% of HSIL. Positive correlation was found between p16 overexpression and grade of dysplasia in Papanicolaou test ($p = 0.011$). In 38% of LSIL and 15% of HSIL cases p16 was not expressed. The most frequently found HPV type in PCR analysis was HPV16. Analysing the results of p16 test according to HPV status and Papanicolaou test rather heterogeneous results were obtained. **Conclusion.** In the patients with precancerous cervical lesions a higher level of correlation was found between the grade of histological dysplasia and p16^{INK4a} level of expression in the cervical smear, compared to the results of Papanicolaou test.

Key words:

uterine cervical dysplasia; precancerous conditions; papilloma virus infections; diagnosis; vaginal smears; cytological techniques; immunohistochemistry.

Uvod

Nastanku karcinoma grlića materice prethode različite forme premalignih lezija koje obuhvataju niz progresivnih morfoloških promena, od najblažih oblika displazije do karcinoma *in situ*¹.

Te promene karakterišu nekontrolisana ćelijska proliferacija i sazrevanje, kao i ćelijska atipija koja se ogleda prisustvom hiperhromatičnih jedara, neobičnom distribucijom hromatina, jedarnim pleomorfizmom i povećanim količnikom jedro/citoplazma. Procena stepena displazije bazirana je na proceni zastupljenosti u izmenjenom epitelu grlića materice bazaloidnih, nediferentovanih ćelija uz progresivni gubitak sazrevanja epitelnih ćelija.

Kod većine lezija blažeg stepena dolazi do spontane regresije. Utvrđeno je, takođe, da kod žena inficiranih visoko rizičnim sojevima humanog papiloma virusa (HPV) (*high-risk human papilloma virus* – HR-HPV), koje nisu imale kolposkopski vidljive promene na grliću materice, može doći do direktnog razvoja premalignih lezija težeg stepena u toku samo dve godine².

Uvođenje Papanikolau citološkog skrining testa za otkrivanje karcinoma grlića materice i prekursorskih lezija smanjilo je incidenciju i mortalitet za oko 60%³. Iako je ovaj test jeftin i primenljiv za široki skrining populacije, pokazano je da ima ograničenja i da je specifičan (specifičnost mu je oko 98%), ali ne i osetljiv test (75%)². Osetljivost testa je niska jer se morfološki identične ili vrlo slične promene ćelija javljaju u zapaljenskim procesima, procesima regeneracije, metaplazije, atrofije epitela i infekcijama visoko rizičnim HPV tipovima.

Utvrđeno je da u rutinskoj primeni Papanikolau testa ima do 30% lažno pozitivnih i 15–50% lažno negativnih rezultata⁴.

Posledica lažno pozitivnih rezultata je ponavljanje Papanikolau testa, u određenim slučajevima i biopsija promene na grliću materice, pa čak i hirurška intervencija (konizacija). To je veoma izraženo kod lezija blažeg stepena i običnih infekcija grlića materice procenjenih kao premaligna lezija. Najveći problem u proceni citologa predstavlja granica između atipičnih skvamoznih ćelija neodređenog značaja (*atypical squamous cells of undetermined significance* – ASCUS) i atipičnih skvamoznih ćelija kod kojih se ne može isključiti skvamozna intraepitelna lezija visokog stepena (*high-grade squamous intraepithelial lesion* – HSIL), (*atypical squamous cells, cannot exclude HSIL* – ASC-H) i skvamoznih intraepitelnih lezija niskog stepena (*low-grade squamous intraepithelial lesion* – LSIL) (Papanikolau II/Papanikolau III grupa) i granica između LSIL i HSIL (Papanikolau IIIa/IIIb)⁵.

Lažno negativni rezultati nastaju neadekvatnim uzimanjem briseva grlića materice, zatim zbog prepokrivanja izmenjenih epitelnih ćelija eritrocitima, inflamacijskim ćelijama ili mukuzom, greškama u bojenju razmaza i neadekvatnim procenama citologa⁵.

Obimna epidemiološka istraživanja identifikovala su kao faktore rizika od nastanka karcinoma grlića materice i prekursorskih lezija HPV infekcije, promiskuitet, rani početak aktivnog seksualnog života, upotrebu oralnih kontracep-

tiva, pušenje cigareta, porodično opterećenje i udružene genitalne infekcije.

Smatra se da perzistentne HR-HPV infekcije predstavljaju glavni etiološki agens za nastanak premalignih lezija i karcinoma grlića materice⁶. Oko 20% žena inficirano je jednim ili više HPV sojeva. Infekcija najčešće spontano prolazi za nekoliko meseci. Samo 1% tih bolesnica razvije klinički relevantne displastične lezije ili karcinom.

Različiti HPV imaju različiti onkogeni potencijal pa su zbog toga svrstani u tri grupe: HR-HPV tipovi (16, 18, 31, 45, 56), nisko rizični (*low risk* – LR-HPV) tipovi (6, 11, 42, 43, 44) i intermedijarni HPV tipovi (*intermediate-risk HPV*) (33, 35, 39, 51, 52).

Deoksiribonukleinska kiselina (DNK) HR-HPV tipova detektovana je u skoro svim HSIL grlića materice i kod preko 99% karcinoma grlića materice⁷.

Genom HPV javlja se u ćelijama domaćina u cirkularnom epizomnom obliku ili integrisan u genom domaćina. U LSIL promenama epizomalna forma dominantna je, dok je integracija u genom prisutna kod karcinoma grlića materice. Otkrićem značaja HR-HPV sojeva u nastanku karcinoma grlića materice razvijene su i različite virusološke metode za HPV tipizaciju i molekularno-biološke metode za detekciju HPV-DNK *Hybrid Capture II test*, *polymerase chain reaction* (PCR) HPV identifikacija, *in situ* hibridizacija^{8–11}.

Testovi za detekciju HPV-DNK su vrlo senzitivni, daju informaciju o prisustvu virusne DNK u ćelijama domaćina i mogu poboljšati tačnost Papanikolau testa. Međutim, oni ne daju podatke o tome da li je virusni genom integrisan u genom domaćina, pa je njihova pozitivna prediktivna vrednost mala. Ovi testovi mogu identifikovati žene sa potencijalnim rizikom razvoja premaligne lezije ili karcinoma grlića materice, ali ne mogu dati informaciju da li je do promena već došlo¹².

Utvrđeno je da se za vreme akutne HPV infekcije produkti virusnih onkogeno javljaju u već diferentovanim epitelnim ćelijama grlića materice koje su izgubile sposobnost replikacije. Nasuprot tome, perzistentne infekcije HR-HPV tipovima dovode do integrisanja virusne DNK i ekspresije produkata virusnih onkogeno E6 i E7 u replikujućim epitelnim ćelijama grlića materice. Onkogeni E6 i E7 transformišu ćelije u kontinualno rastuće ćelijske klonove koje karakterišu veliki stepen genetske nestabilnosti i gubitak mehanizma ćelijske kontrole nad regulatornim genima^{13, 14}. Posledica je povećana ekspresija proteinskog produkta gena za ciklin-zavisni kinazni inhibitor p16^{INK4a}^{13, 14}.

Onkoprotein E7 se vezuje za *retinoblastoma* protein (pRB) i dovodi do njegove funkcijske inaktivacije. Kako je ispoljavanje proteinskog produkta gena za ciklin-zavisni kinazni inhibitor p16^{INK4a} pod negativnom *feedback* kontrolom funkcionalnog pRB, HR-HPV infekcija u kojoj je virus integrisao svoj genom u domaćinov dovodi do prekomernog ispoljavanja p16^{INK4a} proteina. S obzirom da je p16^{INK4a} protein moguće detektovati imunohistohemijski, on se nameće kao logični surogat marker za ćelije sa aktivnim ispoljavanjem virusnog onkogeno E7. U normalnom skvamoznom epitelu grlića materice ne može se detektovati p16^{INK4a}¹⁰.

Utvrđeno je da je kod skvamoznih karcinoma, adenokarcinoma i HSIL prekanceroznih promena grlića materice prisutna jaka citoplazmatska i jedarna imunohistoheksijska reakcija na p16^{INK4a} protein¹⁵⁻¹⁸. Prisustvo p16^{INK4a} proteina pokazano je i u razmazima briseva displastičnih promena grlića materice kao i u HPV negativnim ćelijskim linijama karcinoma grlića materice (C33A), što sugerise i postojanje HPV nezavisne putanje aktivacije p16^{INK4a} proteina¹⁹⁻²³.

Cilj rada bio je da se utvrdi da li je kod bolesnica sa premalignim lezijama grlića materice pozitivna korelacija stepena ekspresije p16^{INK4a} proteina u razmazu citološkog brisa grlića materice sa stepenom histološke displazije značajnija u odnosu na korelaciju sa nalazom Papanikolau testa. Osim toga, cilj ovog rada bio je da se analizira korelacija HPV tipizacije sa nalazom p16^{INK4a} proteina i sa nalazom Papanikolau testa.

Metode

Studijom preseka obuhvaćeno je 58 žena upućenih u službu za rano otkrivanje karcinoma grlića materice Ginekološkog odeljenja Vojnomedicinske akademije. Ispitanice su bile podeljene u dve grupe.

U prvoj grupi ispitano je 48 bolesnica sa prekanceroznim promenama grlića materice i HPV cervicitisom, a u drugoj kontrolnoj grupi, 10 zdravih žena koje su se javile ginekologu radi rutinskog pregleda.

Svakoju bolesnici je zbog kolposkopskih promena sumnjivih na premaligne promene grlića materice, urađen kolposkopski pregled na osnovu koga su tri različita ispitivača postavila indikaciju za biopsiju grlića materice.

Pre biopsije grlića materice svakoj bolesnici uzeti su brisevi za Papanikolau test, tipizaciju HPV tipova 16, 18, 31 i 33 i detekciju ekspresije p16^{INK4a} proteina.

Definitivan patohistološki (PH) nalaz određen je na hematoksilin-eozin (HE) obojenim presecima biopsija po Bethesda sistemu. Biopsije cerviksa fiksirane su 5% puferisanim neutralnim formalinom, dehidrisane, prosvetljene i prožete parafinom u aparatu Leica ASP 300 i ukalupljene u parafin. Parafinski kalupi su isečeni na automatskom rotacionom mikrotomu LKB Historange na rezove debljine 4 μm.

Razmazi cerviksnih briseva obojeni su metodom po Papanikolau, analizirani svetlosnim mikroskopom i interpretirani po Bethesda sistemu.

Za analizu prisustva genoma HPV tipova 16, 18, 31 i 33 DNK izolovana je iz cerviksnih briseva ispitnica fenol-hloroformskom ekstrakcijom. Za umnožavanje fragmenata korišćeni su specifični prajmeri za odgovarajući HPV tip²⁴. Umnoženi fragmenti razdvojeni su elektroforetski i analizirani na 2% agaroznom gelu i 10% PAGE (poliakrilamidnom) gelu. Kao hromogeni korišćeni su etidijum bromid za agarozni gel i srebro nitrat za poliakrilamidni gel.

Razmazi cerviksnih briseva fiksirani su 4% puferisanim neutralnim formalinom. Demaskiranje epitopa urađeno je u 0,05 M Tris-EDTA puferu pH 9,0 u mikrotalasnoj pećnici. Za imunohistoheksijsku analizu korišćen je CINtecTM p16^{INK4a} citološki imunohistoheksijski komplet kataloški broj K 5339 firme Dako, a kao hromogen DAB+. Preparati su

analizirani svetlosnim mikroskopom. Pozitivnom reakcijom smatrana je nuklearna i citoplazmatska reakcija u više od deset abnormalnih ćelija. Prema intenzitetu obojenosti, imunohistoheksijska reakcija vrednovana je semikvantitativno kao: 0 (negativna reakcija), 1+ (slaba reakcija), 2+ (umerena reakcija) i 3+ (intenzivna reakcija)²¹.

Rezultati

Zbirni rezultati Papanikolau testa, HPV tipizacije, p16 testa i PH nalaza za sve ispitanice prikazani su u tabeli 1. Kod 21 od 48 bolesnica Papanikolau testom utvrđen je LSIL nalaz. Taj nalaz odgovarao je definitivnom PH nalazu cervicitisa kod četiri bolesnice (19%), nalazu LSIL kod osam bolesnica (38%) i nalazu HSIL kod osam bolesnica (38%) (tabela 2). Kod jedne bolesnice LSIL nalaz Papanikolau testa odgovarao je nalazu kondiloma u definitivnom PH nalazu (5%).

Kod 13 od 48 bolesnica Papanikolau testom utvrđen je HSIL nalaz. Taj nalaz odgovarao je definitivnom PH nalazu HSIL kod devet bolesnica (69,2%), nalazu cervicitisa kod jedne bolesnice (7,7%), nalazu metaplazije u uzorku jedne (7,7%) i nalazu *carcinoma in situ* u uzorku jedne bolesnice (7,7%).

Analiza vrednosti Papanikolau testa prema nalazu definitivnog PH testa u uzorcima bolesnica sa premalignim lezijama grlića materice pokazala je da ne postoji značajna međusobna zavisnost (Pearson, $R = 0,303$, $p > 0,05$, test linearne korelacije).

Po učinjenoj biopsiji u uzorcima ispitivanih bolesnica utvrđen je definitivni PH nalaz. Prema PH nalazu kod 16 bolesnica nađeni su znaci cervicitisa i kod po jedne bolesnice kondilomi i metaplazija epitela. U materijalu biopsije kod deset bolesnica nađeni su znaci LSIL, a u uzorcima osamnaest bolesnica znaci HSIL.

U grupi u kojoj je PH potvrđen cervicitis, sve bolesnice imale su negativne vrednosti imunohistoheksijskog nalaza p16^{INK4a} proteina u razmazu citološkog brisa, osim jedne koja je imala vrednost 1+.

U grupi u kojoj je PH verifikovan LSIL, kod tri bolesnice p16^{INK4a} bio je negativan, a kod preostalih 7 vrednost p16^{INK4a} iznosila je 1+.

U grupi u kojoj je PH verifikovan HSIL, u uzorku jedne bolesnice p16^{INK4a} bio je negativan, kod 6 bolesnica vrednost p16^{INK4a} bila je 1+, a kod jedanaest bolesnica 2+ (tabela 3).

Slika 1 prikazuje pozitivnu imunohistoheksijsku reakciju na p16^{INK4a} protein u displastičnim ćelijama cerviksno- brisa koja je ocenjena kao 3+, a slika 2 pozitivnu reakciju koja je ocenjena kao 2+.

Analizom dobijenih vrednosti utvrđeno je da postoji statistički značajna pozitivna korelacija vrednosti imunohistoheksijskog nalaza p16^{INK4a} proteina i definitivnog PH nalaza (Pearson, $R = +0,866$, $p = 0,000$, test linearne korelacije).

Analiza samo onih uzoraka u kojima je nađena pozitivna vrednost imunohistoheksijskog nalaza p16^{INK4a} proteina prema definitivnom PH nalazu, takode je pokazala postojanje značajne međusobne zavisnosti (Pearson, $R = -0,676$, $p = 0,000$, test linearne korelacije).

Tabela 1

Rezultati Papanikolau testa, tipizacije humanog papiloma virusa, p16 testa i patohistološkog nalaza za sve ispitanice (48 bolesnica i 10 zdravih žena)

Bolesnica	Papanikolau test	Tipovi papiloma virusa				P16 razmazi			Patohistološki nalaz
		16	18	31	33	0	1+	2+ 3+	
1	LSIL*	+					+	HSIL†	
2	LSIL			+			+	LSIL	
3	ASCUS‡				+	+		cervicitis	
4	LSIL		+			+		cervicitis	
5	HSIL	+					+	HSIL	
6	HSIL		+	+			+	LSIL	
7	NN§	-	-	-	-	+		cervicitis	
8	LSIL			+			+	LSIL	
9	NN			+		+		cervicitis	
10	HSIL			+		+		metaplasia	
11	NN			+		+		cervicitis	
12	NN	+				+		cervicitis	
13	HSIL	+					+	HSIL	
14	HSIL			+		+		cervicitis	
15	Ca in situ		+				+	HSIL	
16	NN	-	-	-	-	+		cervicitis	
17	HSIL	+	-	+	+		+	HSIL	
18	LSIL	+					+	HSIL	
19	HSIL		+	+			+	HSIL	
20	NN	-	-	-	-		+	cervicitis	
21	Ca in situ	+						+ ca in situ	
22	LSIL		+	+		+		LSIL	
23	LSIL	+		+		+		LSIL	
24	LSIL	+				+		HSIL	
25	HSIL	+					+	HSIL	
26	LSIL	-	-	-	-	+		cervicitis	
27	NN			+		+		cervicitis	
28	LSIL	+					+	HSIL	
29	LSIL		+				+	HSIL	
30	LSIL		+	+			+	LSIL	
31	LSIL	+					+	HSIL	
32	LSIL	+	+				+	HSIL	
33	HSIL			+			+	ca in situ	
34	NN	-	-	-	-	+		cervicitis	
35	LSIL	+	+				+	HSIL	
36	LSIL	+	+				+	LSIL	
37	NN		+	+		+		cervicitis	
38	HSIL	-	-	-	-		+	HSIL	
39	ASCUS		+	+		+		LSIL	
40	LSIL	+	+			+		cervicitis	
41	LSIL	+	+				+	LSIL	
42	NN	+	+			+		cervicitis	
43	HSIL	+					+	HSIL	
44	LSIL	+	+			+		cervicitis	
45	HSIL	+					+	HSIL	
46	LSIL	-	-	-	-	+		kondilomi	
47	HSIL	+					+	HSIL	
48	LSIL			+			+	LSIL	
49	NN					+			
50	NN		+			+			
51	NN	+				+			
52	NN					+			
53	NN					+			
54	NN					+			
55	NN					+			
56	NN					+			
57	NN					+			
58	NN					+			

* skvamozna intraepitelna lezija niskog stepena – *low-grade squamous intraepithelial lesion*; † skvamozna intraepitelna lezija visokog stepena – *high-grade squamous intraepithelial lesion*; ‡ atipične skvamozne ćelije neodređenog značaja – *atypical squamous cells of undetermined significance*; § normalan nalaz; || *carcinoma in situ*

Tabela 2

Distribucija vrednosti nalaza Papanikolau testa prema patohistološkom (PH) nalazu premalignih lezija grlića materice bolesnica

Papanikolau test	PH nalaz											
	kondilomi		cervicitis		metaplasia		LSIL*		HSIL†		carcinoma in situ	
	broj	%	broj	%	broj	%	broj	%	broj	%	broj	%
LSIL (n = 21)	1	5	4	19	0	0	8	38	8	38	0	0
HSIL (n = 13)	0	0	1	7,7	1	7,7	1	7,7	9	69,2	1	7,7

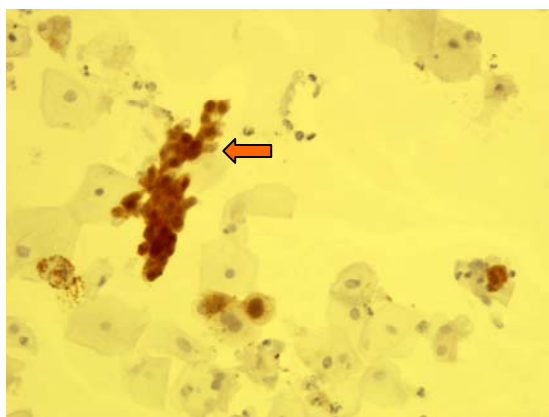
* skvamozna intraepitelna lezija niskog stepena; † skvamozna intraepitelna lezija visokog stepena

Tabela 3

Distribucija vrednosti imunohistohemijskog nalaza p16^{INK4a} proteina u razmazu citološkog brisa prema patohistološkom (PH) nalazu

PH nalaz	p16 ^{INK4a}							
	0		1+		2+		3+	
	broj	%	broj	%	broj	%	broj	%
Kondilomi (n = 1)	1	100						
Metaplazija (n = 1)	1	100						
Cervicitis (n = 16)	15	94	1	6	0	0	0	0
LSIL* (n = 10)	3	30	7	70	0	0	0	0
HSIL† (n = 18)	1	5,5	6	33,3	11	61,1	0	0
Carcinoma in situ (n = 2)					1	50	1	50

* skvamozna intraepitelna lezija niskog stepena; † skvamozna intraepitelna lezija visokog stepena



Sl. 1 – Intenzivna citoplazmatska i nuklearna pozitivna reakcija na p16^{INK4a} protein u displastičnim ćelijama cerviksnog brisa (3+) (HE; × 200)



Sl. 2 – Intenzivna nuklearna i blaža citoplazmatska pozitivna reakcija na p16^{INK4a} proteina u displastičnim ćelijama cerviksnog brisa (2+) (HE; × 200)

Analizom vrednosti Papanikolau nalaza u odnosu na p16^{INK4a} protein ustanovljeno je da je u grupi sa LSIL nalazima najveći broj ispitivanih bolesnica (48%) imao vrednost 1+ imunohistohemijskog nalaza p16^{INK4a} proteina, potom negativan nalaz (38%), a najmanji broj (14%) imao je vrednost 2+ imunohistohemijskog nalaza p16^{INK4a} proteina (tabela 4).

U grupi sa HSIL nalazima najveći broj ispitivanih bolesnica imao je vrednost 2+ imunohistohemijskog nalaza p16^{INK4a} proteina (62%), potom vrednost 1+ (23%), a najmanji broj negativnu vrednost imunohistohemijskog nalaza p16^{INK4a} proteina (15%) (tabela 4).

Tabela 4

Distribucija vrednosti imunohistohemijskog nalaza p16^{INK4a} proteina u razmazu citološkog brisa prema nalazu Papanikolau testa ispitivanih bolesnica

Papanikolau test	p16 ^{INK4a}							
	0		1+		2+		3+	
	broj	%	broj	%	broj	%	broj	%
LSIL* (n = 21)	8	38	10	48	3	14	0	0
HSIL† (n = 13)	2	15	3	23	8	62	0	0
ASCUS‡ (n = 2)	2	100	0	0	0	0	0	0
Carcinoma in situ (n = 2)	0	0	0	0	1	50	1	50
NN§ (n = 20)	19	95	1	5	0	0	0	0

* skvamozna intraepitelna lezija niskog stepena; † skvamozna intraepitelna lezija visokog stepena; ‡ atipične skvamozne ćelije neodređenog značaja; § normalan nalaz

Obe bolesnice sa ASCUS nalazom imale su negativnu vrednost imunohistohemijskog nalaza p16^{INK4a} proteina.

Od dve bolesnice sa nalazom *carcinoma in situ*, u citološkom razmazu jedne nađena je vrednost 2+, a kod druge vrednost 3+ imunohistohemijskog nalaza p16^{INK4a} proteina.

Konačno, u citološkim razmazima zdravih osoba, sa normalnim Papanikolau nalazom, kod 95% nađene su negativne vrednosti imunohistohemijskog nalaza p16^{INK4a} proteina i kod jedne ispitanice pozitivan nalaz 1+.

Analiza vrednosti imunohistohemijskog nalaza p16^{INK4a} proteina prema nalazu Papanikolau testa svih ispitanica pokazala je postojanje visoko značajne međusobne zavisnosti (Pearson, $R = +0,686$, $p = 0,000$, test linearne korelacije).

Analiza vrednosti imunohistohemijskog nalaza p16^{INK4a} proteina prema nalazu Papanikolau testa u grupi bolesnica pokazala je postojanje visoko značajne međusobne zavisnosti (Pearson, $R = +0,433$, $p = 0,011$, test linearne korelacije).

U uzorcima svih ispitanica umnožavanjem genetskog materijala metodom PCR identifikovano je prisustvo onkogenih tipova virusa HPV (16, 18, 31 i 33) (tabela 5).

sa frekvencijom od 24% detektovan je negativan nalaz onkogenih HPV sa 5% nalazom genoma HPV tipa 18, i tipa 33. Istovremeno prisustvo HPV tipova 16 i 31 nađeno je kod 19%, a istovremeno prisustvo HPV tipova 18 i 31 kod 14% bolesnica.

U grupi sa pozitivnim imunohistohemijskim nalazom p16^{INK4a} proteina (vrednost 1+), najčešće je detektovano prisustvo izolovanog HPV tipa 16 kod 29% ispitivanih bolesnica. Sledi nalaz HPV tipa 31 sa 21%, pa nalaz HPV tipova 18 i 31 koji su detektovani kod 21% ispitivanih bolesnica. Sa frekvencijom od 14% u ovoj grupi detektovan je nalaz HPV tipova 16 i 31, a najređe, kod 7% bolesnica detektovan je nalaz HPV tipova 16 i 18 i negativan nalaz na HPV tipove.

U grupi u kojoj smo detektovali imunohistohemijskim nalazom p16^{INK4a} proteina vrednosti 2+, najčešće je detektovano prisustvo izolovanog HPV tipa 16, kod polovine ispitivanih bolesnica. Sledi nalaz HPV tipa 18, koji smo detektovali kod 17% ispitivanih bolesnica. Sa istom frekvencijom (po 8%) u ovoj grupi detektovan je negativan nalaz onkoge-

Tabela 5

Distribucija vrednosti imunohistohemijskog nalaza p16^{INK4a} proteina u razmazu citološkog brisa prema nalazu prisustva onkogenih humanih papiloma virusa (HPV) bolesnice

Onkogeni HPV	p16 ^{INK4a}							
	0		1+		2+		3+	
	br	%	br	%	br	%	br	%
Negativan	5	24	1	7	1	8	0	0
16	2	9	4	29	6	50	1	100
18	1	5	0	0	2	17	0	0
31	5	24	3	21	1	8	0	0
33	1	5	0	0	0	0	0	0
16, 18	0	0	1	7	1	8	0	0
16, 31	4	19	2	14	0	0	0	0
16, 33	0	0	0	0	0	0	0	0
18, 31	3	14	3	21	0	0	0	0
18, 33	0	0	0	0	0	0	0	0
31, 33	0	0	0	0	0	0	0	0
16, 18, 31	0	0	0	0	0	0	0	0
16, 18, 33	0	0	0	0	0	0	0	0
16, 31, 33	0	0	0	0	1	8	0	0
18, 31, 33	0	0	0	0	0	0	0	0
Ukupno	21	100	14	100	12	100	1	100

Kada je analizirana distribucija različitih onkogenih tipova HPV u grupi sa negativnim imunohistohemijskim nalazom p16^{INK4a} proteina, najčešće je detektovano prisustvo HPV tipova 16 i 31 kod trećine ispitivanih bolesnica. Dalje,

nih HPV, kao i pozitivni nalazi HPV tipa 31 i HPV tipova 16 i 18, i HPV tipova 16 i 31 i 33.

Najveću vrednost imunohistohemijskog nalaza p16^{INK4a} proteina (3+) detektovali smo u uzorku samo jedne bolesni-

ce, tako da nije bilo moguće praviti poređenja sa nalazom onkogenih HPV.

Analizom dobijenih vrednosti utvrđeno je da ne postoji statistički značajna korelacija imunohistohemijskog nalaza p16^{INK4A} proteina sa nalazom onkogenih HPV (Pearson, $R = -0,122$, $p > 0,05$, test linearne korelacije).

Kada se analiziraju samo oni uzorci u kojima je nađena pozitivna vrednost imunohistohemijskog nalaza p16^{INK4A} proteina prema nalazu onkogenih HPV korelacija ne postoji (Pearson, $R = -0,241$, $p > 0,05$, test linearne korelacije).

Kod 21 bolesnica Papanikolau testom utvrđen je LSIL nalaz. U uzorcima pet bolesnica ove grupe nađeno je prisustvo HPV tipa 16 (24%), kao i istovremeno prisustvo HPV tipova 16 i 31 u uzorcima drugih pet bolesnica (24%) (tabela 6). U uzorcima tri bolesnice ove grupe nađeno je prisustvo

HPV tipa 31 (14%), dok je u uzorcima po dve bolesnice nađeno prisustvo HPV tipa 18 (9,5%), prisustvo HPV tipova 16 i 18 (9,5%) i prisustvo HPV tipova 18 i 31 (9,5%). U uzorcima dve bolesnice nije detektovano prisustvo patogenih tipova HPV (9,5%).

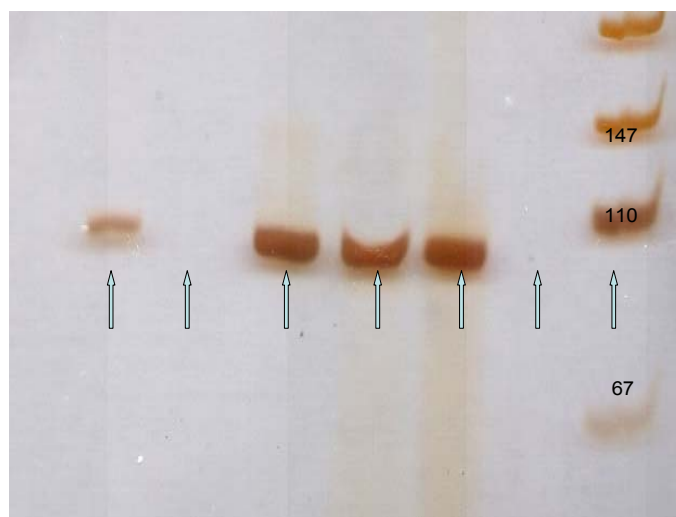
Kod 13 bolesnica Papanikolau testom utvrđen je HSIL nalaz. U uzorcima šest bolesnica ove grupe nađeno je prisustvo HPV tipa 16 (46%), u uzorcima tri bolesnice nađeno je prisustvo HPV tipa 31 (23%), u uzorcima dve bolesnice nađeno je prisustvo HPV tipova 18 i 31 (15%) i u uzorku jedne bolesnice prisustvo HPV tipova 16, 31, 33 (8%). U uzorku jedne bolesnice nije detektovano prisustvo patogenih tipova HPV (8%).

Poređenjem vrednosti Papanikolau testa sa nalazom prisustva onkogenih tipova HPV, u grupi bolesnica sa premali-

Tabela 6
Distribucija vrednosti nalaza Papanikolau testa prema nalazu prisustva onkogenih humanih papiloma virusa (HPV) u uzorcima premalignih lezija grlića materice bolesnica

HPV tip	LSIL* (n = 21)		HSIL† (n = 13)		ASCUS‡ (n = 2)		Carcinoma in situ (n = 2)	
	broj	%	broj	%	broj	%	broj	%
Negativan	2	9,5	1	8	0	0	0	0
16	5	24	6	46	0	0	1	50
18	2	9,5	0	0	0	0	1	50
31	3	14	3	23	0	0	0	0
33	0	0	0	0	1	50	0	0
16, 18	2	9,5	0	0	0	0	0	0
16, 31	5	24	0	0	0	0	0	0
16, 33	0	0	0	0	0	0	0	0
18, 31	2	9,5	2	15	1	50	0	0
18, 33	0	0	0	0	0	0	0	0
31, 33	0	0	0	0	0	0	0	0
16, 18, 31	0	0	0	0	0	0	0	0
16, 18, 33	0	0	0	0	0	0	0	0
16, 31, 33	0	0	1	8	0	0	0	0
18, 31, 33	0	0	0	0	0	0	0	0

* skvamozna intraepitelna lezija niskog stepena; † skvamozna intraepitelna lezija visokog stepena; ‡ atipične skvamozne ćelije neodređenog značaja



Sl. 3 – 10% poliakril amidni elektroforetski gel (PAGE) sa razdvojenim PCR (polymerase chain reaction) umnožcima uzoraka humanog papiloma virusa (HPV) 16 pozitivnih bolesnica. Trake 1, 3, 4 su uzorci HPV 16 pozitivnih bolesnica, 2 je uzorak HPV 16 negativne bolesnica. Traka 5 je pozitivna kontrola, traka 6 negativna kontrola, a 7 su markeri deoksiribonukleinske kiseline

gnim lezijama grlića materice pokazano je da ne postoji značajna međusobna zavisnost (Pearson $R = -0,042$, $p > 0,05$, test linearne korelacije).

Diskusija

U radu su poređeni rezultati Papanikolau testa, CINtec™ p16^{INK4a} citološkog imunohistohemijskog testa, PCR HPV tipizacije na HPV tipove 16, 18, 31 i 33 i biopstat promena kod 48 bolesnica sa premalignim lezijama grlića materice i HPV cervicitisom i kod deset zdravih žena. Cilj je bio da se utvrdi da li primena CINtec™ p16^{INK4a} citološkog imunohistohemijskog testa može i u kojoj meri da poboljša preciznost konvencionalnih skrining testova premalignih lezija grlića materice.

Poređenjem rezultata Papanikolau testa sa PH nalazom utvrdili smo 18,7% lažno pozitivnih Papanikolau nalaza, a 20,8% lažno negativnih, što je u saglasnosti sa rezultatima nekih autora koji su utvrdili da u rutinskoj primeni Papanikolau testa ima do 30% lažno pozitivnih i 15–50% lažno negativnih rezultata⁴.

U našoj studiji sve zdrave žene, kao i žene sa reaktivnim promenama i 30% žena iz grupe sa LSIL promenama, imale su negativnu vrednost imunohistohemijskog nalaza p16^{INK4a} proteina. Murphy i sar.²² su nasuprot tome utvrdili kod svih žena sa LSIL promenama pozitivan imunohistoemijski nalaz p16^{INK4a} proteina. Moguće objašnjenje za ovu razliku u dobijenim rezultatima je činjenica da su autori koristili ThinPrep preparate za Papanikolau test i za p16^{INK4a} test, dok smo mi navedene analize radili na konvencionalnim citološkim razmazima cerviksnih briseva. Međutim Guo i sar.²⁵ su, koristeći SurePath preparate, a Holladay i sar.²⁶ koristeći ThinPrep preparate, kod 42% žena iz grupe sa LSIL promenama našli negativnu vrednost imunohistoemijskog nalaza p16^{INK4a} proteina, a Meyer i sar.²⁷ su imali čak 61% bolesnica sa LSIL promenama takođe negativnih na p16^{INK4a} protein. Analizirajući bolesnice sa HSIL promenama utvrdili smo da je 5,5% tih slučajeva imalo negativnu vrednost imunohistoemijskog nalaza p16^{INK4a} proteina. Murphy i sar.²² imali su 2% negativnih HSIL slučajeva, Guo i sar.²⁵ 2,9%, Holladay i sar.²⁶ 22% i Meyer i sar.²⁷ 4%.

Razlog za ovakva odstupanja mogu biti nestandardizovane procedure za demaskiranje fiksativom umreženih epitopa. Formaldehid korišćen kao fiksativ za imunocitohemijske analize daje odličnu očuvanost morfologije, ali je neophodno primeniti adekvatnu proceduru za mikrotalasno demaskiranje epitopa, zbog toga što aldehidni fiksativi umrežavaju proteine. Ukoliko procedura za demaskiranje epitopa nije standardizovana (optimalno vreme izlaganja mikrotalasima, jačina mikrotalasa, vrsta pufera) moguće su lažno negativne imunohistoemijске reakcije²⁸.

Bose i sar.²⁹ su, poredeći rezultate p16 testa prema Papanikolau testu, dobili 20% negativnih HSIL slučajeva i 79% negativnih LSIL, dok smo mi imali 15% negativnih HSIL i

38% negativnih LSIL slučajeva. Razlog za manju ekspresiju p16 u LSIL nego u HSIL lezijama može biti i to što je određeni procenat LSIL lezija izazvan nisko rizičnim HPV tipovima. Afinitet E7 proteina LR-HPV tipova za Rb je mnogo manji od afiniteta HR-HPV tipova³⁰. Bose i sar.²⁹ smatraju da mali broj LSIL slučajeva pozitivan na p16, kao i činjenica da samo mali broj LSIL lezija progredira u HSIL, možda ukazuje na interesantnu mogućnost da se ovaj test može iskoristiti za trijažiranje bolesnica kod kojih je neophodno dalje i detaljnije praćenje. Focchi i sar.³¹ čak smatraju da se stepen pozitivnosti p16 u LSIL lezijama može smatrati prediktivnim faktorom. Osim toga, dobijene vrednosti p16 testa u odnosu na Papanikolau test treba svakako posmatrati i u kontekstu veze sa prisustvom i tipom HR-HPV.

U grupi HPV pozitivnih žena 60% imalo je pozitivnu imunohistoemijšku reakciju na p16^{INK4a} protein, za razliku od 40% koliko je utvrđeno u studiji Bosea i sar.²⁹. U grupi HPV negativnih bolesnica 71,4% bilo je negativno i na p16 testu, dok su Evans i sar.³² imali 96% takvih bolesnica.

Kod jedne HPV negativne bolesnice utvrdili smo vrednost p16 testa 1+, a kod druge vrednost 2+. Kako je naše ispitivanje obuhvatilo samo ispitivanje četiri tipa HPV, ne može se isključiti mogućnost infekcije i nekim drugim HPV tipovima. Osim toga u literaturi je opisano i postojanje HPV nezavisne putanje aktivacije p16^{INK4a} proteina^{19–23}.

Poređenjem rezultata Papanikolau testa sa HPV nalazima utvrdili smo da je i kod bolesnica sa LSIL (24%) i onih sa HSIL (46%) promenama najzastupljeniji bio pozitivan nalaz HPV tipa 16. Evans i sar.³² su u velikoj studiji koja je obuhvatila 1 100 bolesnica analizirali prisustvo HPV tipova 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 i 68 i utvrdili su da je HPV tip 16 bio prisutan kod 15,5% LSIL i kod 49% HSIL slučajeva.

Kako je u literaturi potvrđeno da je HPV tipa 16 (uz HPV tipa 18 i HPV tipa 31) najčešće detektovan tip HR-HPV u HSIL lezijama i invazivnim karcinomima anogenitalne regije³³, neophodno je detaljnije praćenje bolesnica koje su HPV tipova 16 i 18 pozitivne.

Zaključak

Kod bolesnica sa premalignim lezijama grlića materice postoji značajnija pozitivna korelacija stepena ekspresije p16^{INK4a} proteina u razmazu citološkog brisa grlića materice sa stepenom histološke displazije, u odnosu na nalaz Papanikolau testa. Osim toga, ne postoji statistički značajna korelacija vrednosti imunohistoemijskog nalaza p16^{INK4a} proteina i nalaza onkogenih HPV tipova.

Takođe, između vrednosti Papanikolau testa i nalaza prisustva onkogenih tipova HPV ne postoji značajna međusobna zavisnost.

Upotreba CINtec™ p16^{INK4a} citološkog imunohistoemijskog testa može značajno poboljšati preciznost konvencionalnih skrining testova premalignih lezija grlića materice.

L I T E R A T U R A

1. *Wright T, Kurman R, Ferenczy A.* Precancerous lesions of the cervix. In: *Kurman R*, editor. *Blausten's pathology of the female genital tract.* 4th ed. New York: Springer-Verlag; 1994. p. 229–77.
2. *zur Hausen H.* Papillomavirus infections – a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1288(2): F55–78.
3. *Papanicolaou GN, Traut HF.* The diagnostic value of vaginal smears in carcinoma of the uterus. 1941. *Arch Pathol Lab Med* 1997; 121(3): 211–24.
4. *Jacobs MV, Snijders PJ, Voorhorst FJ, Dillner J, Forslund O, Jobansson B*, et al. Reliable high risk HPV DNA testing by polymerase chain reaction: an intermethod and intramethod comparison. *J Clin Pathol* 1999; 52(7): 498–503.
5. *Fabey MT, Irwig L, Macaskill P.* Meta-analysis of Pap test accuracy. *Am J Epidemiol* 1995; 141(7): 680–9.
6. *Nanda K, McCrory DC, Myers ER, Bastian LA, Hasselblad V, Hickey JD*, et al. Accuracy of the Papanicolaou test in screening for and follow-up of cervical cytologic abnormalities: a systematic review. *Ann Intern Med* 2000; 132(10): 810–9.
7. *Muñoz N.* Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence. *J Clin Virol* 2000; 19(1–2): 1–5.
8. *Dell G, Gaston K.* Human papillomaviruses and their role in cervical cancer. *Cell Mol Life Sci* 2001; 58(12–13): 1923–42.
9. *zur Hausen H.* Papillomaviruses in human cancers. *Proc Assoc Am Physicians* 1999; 111(6): 581–7.
10. *Cuzick J.* Human papillomavirus testing for primary cervical cancer screening. *JAMA* 2000; 283(1): 108–9.
11. *Lörincz AT, Richart RM.* Human papillomavirus DNA testing as an adjunct to cytology in cervical screening programs. *Arch Pathol Lab Med* 2003; 127(8): 959–68.
12. *von Knebel Doeberitz M.* New markers for cervical dysplasia to visualise the genomic chaos created by aberrant oncogenic papillomavirus infections. *Eur J Cancer* 2002; 38(17): 2229–42.
13. *White AE, Livanos EM, Tlsty TD.* Differential disruption of genomic integrity and cell cycle regulation in normal human fibroblasts by the HPV oncoproteins. *Genes Dev* 1994; 8(6): 666–77.
14. *Duensing S, Münger K.* Centrosome abnormalities, genomic instability and carcinogenic progression. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1471(2): M81–8.
15. *Sano T, Oyama T, Kashivabara K, Fukuda T, Nakajima T.* Expression status of p16 protein is associated with human papillomavirus oncogenic potential in cervical and genital lesions. *Am J Pathol* 1998; 153(6): 1741–8.
16. *Klaes R, Friedrich T, Spitkovsky D, Ridder R, Rudy W, Petry U*, et al. Overexpression of p16(INK4A) as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int J Cancer* 2001; 92(2): 276–84.
17. *Negri G, Egarter-Vigl E, Kasal A, Romano F, Haitel A, Mian C.* p16INK4a is a useful marker for the diagnosis of adenocarcinoma of the cervix uteri and its precursors: an immunohistochemical study with immunocytochemical correlations. *Am J Surg Pathol* 2003; 27(2): 187–93.
18. *Agoff SN, Lin P, Morihara J, Mao C, Kiviat NB, Koutsky LA.* p16(INK4a) expression correlates with degree of cervical neoplasia: a comparison with Ki-67 expression and detection of high-risk HPV types. *Mod Pathol* 2003; 16(7): 665–73.
19. *Bibbo M, Klump WJ, DeCocco J, Kovatich AJ.* Procedure for immunocytochemical detection of P16INK4a antigen in thin-layer, liquid-based specimens. *Acta Cytol* 2002; 46(1): 25–9.
20. *Saqi A, Pasha TL, McGrath CM, Yu GH, Zhang P, Gupta P.* Overexpression of p16INK4a in liquid-based specimens (SurePath) as marker of cervical dysplasia and neoplasia. *Diagn Cytopathol* 2002; 27(6): 365–70.
21. *Nieh S, Chen SF, Chu TY, Lai HC, Fu E.* Expression of p16 INK4A in Papanicolaou smears containing atypical squamous cells of undetermined significance from the uterine cervix. *Gynecol Oncol* 2003; 91(1): 201–8.
22. *Murphy N, Ring M, Killalea AG, Uhlmann V, O'Donovan M, Mulcahy F*, et al. p16INK4a as a marker for cervical dyskaryosis: CIN and cGIN in cervical biopsies and ThinPrep smears. *J Clin Pathol* 2003; 56(1): 56–63.
23. *Milde-Langosch K, Riethdorf S, Kraus-Pöppinghaus A, Riethdorf L, Löning T.* Expression of cyclin-dependent kinase inhibitors p16MTS1, p21WAF1, and p27KIP1 in HPV-positive and HPV-negative cervical adenocarcinomas. *Virchows Arch* 2001; 439(1): 55–61.
24. *Baay MF, Quint WG, Koudstaal J, Hollema H, Duk JM, Burger MP*, et al. Comprehensive study of several general and type-specific primer pairs for detection of human papillomavirus DNA by PCR in paraffin-embedded cervical carcinomas. *J Clin Microbiol* 1996; 34(3): 745–7.
25. *Guo M, Hu L, Baliga M, He Z, Hughson MD.* The predictive value of p16(INK4a) and hybrid capture 2 human papillomavirus testing for high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Clin Pathol* 2004; 122(6): 894–901.
26. *Holladay EB, Logan S, Arnold J, Knesel B, Smith GD.* A comparison of the clinical utility of p16(INK4a) immunolocalization with the presence of human papillomavirus by hybrid capture 2 for the detection of cervical dysplasia/neoplasia. *Cancer* 2006; 108(6): 451–61.
27. *Meyer JL, Hanlon DW, Andersen BT, Rasmussen OF, Bisgaard K.* Evaluation of p16INK4a expression in ThinPrep cervical specimens with the CINtec p16INK4a assay: correlation with biopsy follow-up results. *Cancer* 2007; 111(2): 83–92.
28. *Pileri SA, Roncador G, Ceccarelli C, Piccioli M, Briskomatis A, Sabbatini E*, et al. Antigen retrieval techniques in immunohistochemistry: comparison of different methods. *J Pathol* 1997; 183(1): 116–23.
29. *Bose S, Evans H, Lantzy L, Scharre K, Youssef E.* p16(INK4A) is a surrogate biomarker for a subset of human papilloma virus-associated dysplasias of the uterine cervix as determined on the Pap smear. *Diagn Cytopathol* 2005; 32(1): 21–4.
30. *Keating JT, Cvikro A, Riethdorf S, Riethdorf L, Quade BJ, Sun D*, et al. Ki-67, cyclin E, and p16INK4 are complimentary surrogate biomarkers for human papilloma virus-related cervical neoplasia. *Am J Surg Pathol* 2001; 25(7): 884–91.
31. *Focchi GR, Silva ID, Nogueira-de-Souza NC, Dobo C, Oshima CT, Stavale JN.* Immunohistochemical expression of p16(INK4A) in normal uterine cervix, nonneoplastic epithelial lesions, and low-grade squamous intraepithelial lesions. *J Low Genit Tract Dis* 2007; 11(2): 98–104.
32. *Evans MF, Adamson CS, Papillo JL, St John TL, Leiman G, Cooper K.* Distribution of human papillomavirus types in ThinPrep Papanicolaou tests classified according to the Bethesda 2001 terminology and correlations with patient age and biopsy outcomes. *Cancer* 2006; 106(5): 1054–64.
33. *Hausen H.* Papillomaviruses and cancer: From basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2002; 2(5): 342–50.

Rad je primljen 22. X 2007.