

Biolška označevalca p16 in Ki-67 za opredelitev cervikalne intraepitelijske neoplazije v biopsijskih vzorcih materničnega vratu

Margareta Strojjan Fležar in Helena Gutnik

IZVLEČEK

Biolška označevalca p16 in Ki-67 sta posredna pokazatelja okužbe s humanimi papiloma virusi z velikim tveganjem (HPV-VT), ki so povezani z nastankom predrakavih sprememb na materničnem vratu. V diagnostično težavnih primerih ju lahko uporabimo za razlikovanje cervikalne intraepitelijske neoplazije od morfološko podobnih neneoplastičnih sprememb. Določamo ju lahko s standardnimi imunohistokemičnimi metodami na tkivnih rezinah biopsijskih vzorcev materničnega vratu. Pri vsakdanjem histopatološkem ocenjevanju biopsijskih vzorcev materničnega vratu z dodatnim imunohistokemičnim barvanjem na p16 in Ki-67 največkrat izključimo cervikalno intraepitelijsko neoplazijo visoke stopnje (CIN2 in CIN3), kar prepreči pretirano zdravljenje sprememb na materničnem vratu. Tak diagnostični pristop je uporaben tudi za histopatološko ocenjevanje intraepitelijskih neoplastičnih sprememb endocervikalnega žleznega epitelijskega tkiva.

UVOD

V Sloveniji smo leta 2003 uvedli državni program za zgodnje odkrivanje predrakavih sprememb na materničnem vratu (Zora), ki je v prvih 7 letih dosegel znaten uspeh, saj se je pojavnost raka na materničnem vratu zmanjšala za več kot tretjino (1). Z vključitvijo žensk, ki prej niso hodile na redne ginekološke preglede z odvzemom brisa materničnega vratu (BMV, test Pap), smo s citopatološko preiskavo odkrili večji delež predrakavih sprememb visoke stopnje. Posledično se je povečal odstotek histopatološko potrjenih cervikalnih intraepitelijskih neoplazij (CIN) visoke stopnje (CIN2 in CIN3), ki jih zdravimo s konizacijo (2).

Histopatološka preiskava biopsijskega vzorca materničnega vratu je glede na Smernice za obravnavo bolnic s predrakavimi spremembami materničnega vratu nujna za odločitev o zdravljenju (3). Čeprav so morfološka merila za histopatološko ocenjevanje CIN dobro opredeljena, so različne študije pokazale, da – podobno kot pri citopatološki oceni brisov materničnega vratu – določeno stopnjo subjektivnosti lahko dokažemo tudi pri histopatološkem ocenjevanju (4, 5). V literaturi navajajo variabilnost med ocenjevalci istega vzorca, po drugi strani pa lahko po določenem časovnem obdobju tudi isti ocenjevalec isti vzorec različno oceni. Najbolj ponovljive so ocene najvišje stopnje predrakavih sprememb – CIN3, najmanj pa ocene CIN1 (4, 5). Še posebno težavno je razlikovanje med reaktivnimi ali reparativnimi atipijami ploščatega metaplastičnega epitelijskega tkiva, nezrelo ploščatocelično metaplazijo in CIN2, pa tudi med atrofičnim ploščatim epitelijem ter CIN2 in CIN3. Te spremembe zato pogosto povzročajo diagnostične težave pri histopatološki interpretaciji biopsijskih vzorcev materničnega vratu (4).

Predrakave spremembe materničnega vratu so povezane z vztrajajočo okužbo z onkogenimi humanimi papiloma virusi

z velikim tveganjem (HPV-VT) za nastanek raka materničnega vratu, vendar dokaz okužbe s HPV-VT v celicah ne opredeli stopnje CIN (6). Pri znatnem deležu CIN1 je HPV v episomni (zunajkromosomski) obliki in večina teh sprememb spontano izgine v 6 do 12 mesecih. Po integraciji onkogenih HPV-VT v gostiteljev genom pa se sprožijo različne molekularno-genetske spremembe (6).

NADOMESTNI BIOLOŠKI OZNAČEVALCI OKUŽBE Z ONKOGENIMI HUMANIMI PAPILOMA VIRUSI

V predrakavih spremembah visoke stopnje in raku materničnega vratu se genom HPV integrira v gostiteljev genom, vendar je mesto integracije povsem naključno. Po integraciji virusnega genoma postanejo celice genetsko nestabilne, čeprav integracija genoma HPV ne vpliva neposredno na izražanje gostiteljevih protoonkogenov. Ob integraciji se prekine virusna DNK znotraj odprtega bralnega okvira E1/E2, sledi izguba virusnega zaviralca E2 in povečano izražanje virusnih onkoproteinov E6 in E7 (4).

Onkogeni potencial HPV je povezan s produkti virusnih genov E6 in E7, ki vplivata na različne proteine, produkte protoonkogenov ali tumor zaviralnih genov, povezanih z uravnavanjem celične rasti. E7 se veže na protein Rb (pRb), kar sprosti transkripcijski faktor E2F in odstrani zavoro za napredovanje celice skozi celični cikel. Pomembno je, da ima protein E7 HPV-VT večjo afiniteto za vezavo na pRb kot protein E7 HPV z majhnim tveganjem. E7 veže in verjetno aktivira tudi nekatere cikline, ki so pomembno povezani s celičnim ciklom (4).

Protein E6 ima dopolnilni učinek proteinu E7, ker zavira apoptozo. E6 se veže na p53 in pospeši njegovo razgradnjo. Posledica delovanja obeh virusnih onkoproteinov je motnja uravnavanja celičnega cikla in spremenjeno izražanje številnih proteinov celičnega cikla. Te proteine so v različnih študijah analizirali kot možne nadomestne biološke označevalce za opredeljevanje stopnje CIN ter za razlikovanje med CIN in spremembami, ki so ji morfološko podobne (4).

Največkrat uporabljen biološki označevalec je p16, navadno v kombinaciji s Ki-67 (7–10). Protein p16 je zaviralec kinaze, ki je odvisna od ciklina, in navadno zavira napredovanje celice skozi kontrolno točko prehoda iz faze G1 v fazo S celičnega cikla. Povečano izražanje p16 je odraz motenj v celičnem ciklu, ki jih povzročita virusna onkoproteina E6 in E7, in se pojavlja v različnih stopnjah CIN. Ki-67 je antigen, ki je izražen v jedrih vseh celic (normalnih in spremenjenih), ki proliferirajo. V različnih raziskavah navajajo, da je občutljivost za histopatološko diagnozo CIN visoke stopnje (CIN2 in CIN3) od 33- do 90-odstotna, specifičnost pa 90- do 93-odstotna; podobno velja za Ki-67. Pri uporabi obeh označevalcev pa sta občutljivost in specifičnost še večji, do 94-odstotni (7, 8).

IMUNOHISTOKEMIČNO DOLOČANJE p16 IN Ki-67 NA TKIVNIH VZORCIH MATERNIČNEGA VRATU

Na Inštitutu za patologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani smo od leta 2010 dalje izvedli imunohistokemično barvanje na nadomestni biološki označevalac p16 na 30 bioptičnih vzorcih materničnega vratu, kar predstavlja 6,4 % vseh tovrstnih tkivnih vzorcev materničnega vratu, pregledanih v istem obdobju. Dodatno smo v polovici primerov, pri katerih smo izvedli imunohistokemično barvanje na p16, določili tudi Ki-67. Med diagnostično težavnimi vzorci materničnega vratu je bilo 16 odščipov, 9 konusov po metodi LLETZ, 3 klasični konusi s skalpelom, en vzorec amputacije materničnega vratu in en vzorec abrazije cervikalnega kanala.

Po histopatološkem pregledu tkivnih rezin, standardno obarvanih s hematoksilinom in eozinom (HE), smo se zaradi diagnostičnih težav odločili za imunohistokemično barvanje. Najpogostejša diagnostična težava je bilo zanesljivo razlikovanje med atipično ploščatocelično metaplazijo in CIN (tabela 1).

Tabela 1. Rezultati imunohistokemičnih barvanj na p16 in Ki-67 v diagnostično težavnih primerih biopsij materničnega vratu in končne histološko-patološke diagnoze.

Histološko-patološka diagnostična dilema	Število primerov	+p16	+Ki-67	Histološko-patološka diagnoza
CIN/atipična metaplazija	23	9/23	4/11	9/23 CIN2 in CIN3
CIN/termične poškodbe	1	1/1	1/1	1/1 CIN2
Stopnja CIN	2	2/2	0/0	2/2 CIN2 in CIN3
AIS	2	2/2	2/2	1/2 AIS, 1/2 CGIN-NS
CIN/kondilom	2	0/2	0*/1	2/2 kondiloma
Skupaj	30	14/30	7/15	

CIN: cervikalna intraepitelijska neoplazija; AIS: endocervikalni adenokarcinom in situ; CGIN-NS: cervikalna glandularna (žlezna) intraepitelijska neoplazija nizke stopnje; +: pozitivna imunohistokemična reakcija; * pozitivna reakcija v bazalnem in parabazalnem sloju epitelijskega, enaka kot v normalnem ploščatem epiteliju

V drugih primerih smo želeli natančneje oceniti atipijo v termično poškodovanem resekcijem robu pri LLETZ, opredeliti stopnjo CIN, potrditi endocervikalni adenokarcinom in situ (AIS) ter razlikovati med CIN in kondilomom.

Na dodatnih tkivnih rezinah smo s standardnimi postopki imunohistokemičnega barvanja ugotavljali prisotnost bioloških označevalcev p16 in Ki-67.

Protein p16 smo ugotavljali z uporabo komercialno dostopnega kita, namenjenega diagnostiki in vitro (IVD, CINtec Histology V-Kit, mtm laboratories, Heidelberg, Nemčija), ki vsebuje pripravljeno in razredčeno protitelo proti proteinu p16INK4a (klon E6H4). Ki-67 smo dokazovali z monoklonskim protitelom MIB-1 (klon MIB-1, redčitev 1 : 20, DakoCytomation, Glostrup, Danska). Vsi postopki imunohistokemičnega barvanja so bili izvedeni po standardnem postopku v aparatu Ventana Benchmark XT z detekcijskim kitom iVIEW (Ventana Medical Systems, Tucson, Arizona, ZDA).

Za potrditev pozitivne imunohistokemične reakcije na p16 in Ki-67 je nujna pozitivna jedrna reakcija, čeprav protitelo za

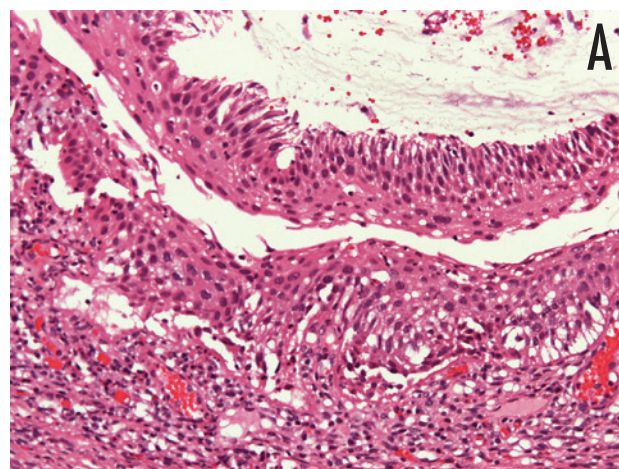
p16 obarva tudi citoplazmo. Pri CIN2 in CIN3 se s protitelom proti p16 difuzno in intenzivno obarvajo celice v celotni debelini epitelijskega, čeprav je jakost reakcije pri p16 lahko manj izrazita v zgornji tretjini epitelijskega pri CIN2. Podobno lahko opažamo nekoliko manjši delež za Ki-67 pozitivnih celic pri CIN2, čeprav najdemo pozitivne celice v celotni debelini epitelijskega. Tudi pri CIN1 je obarvanost v zgornji tretjini epitelijskega lahko šibkejša pri p16 oz. je za Ki-67 pozitiven nekoliko manjši delež celic.

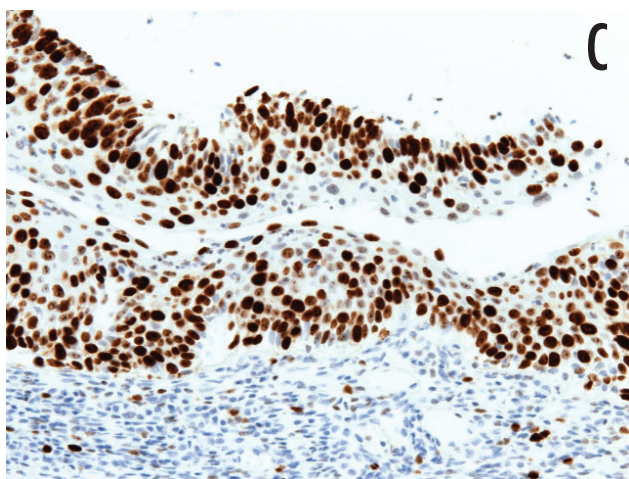
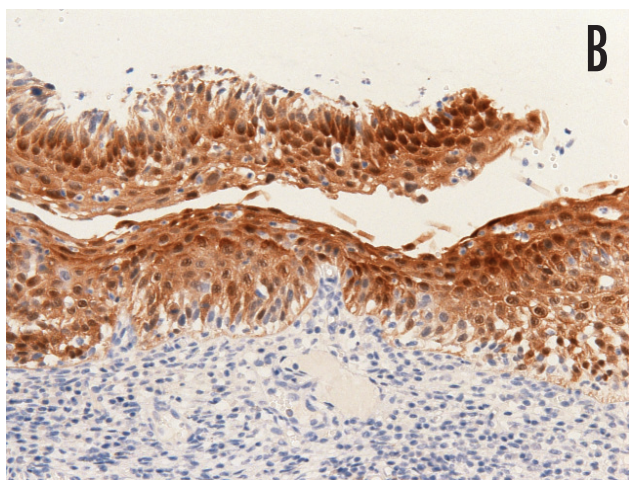
Znano je, da se s p16 lahko šibko obarvajo posamezne celice v ploščatoceličnem metaplastičnem epiteliju in tudi posamezne celice endocervikalnega žleznega epitelijskega, vendar takšno obarvanje ne kaže na okužbo s HPV-VT.

UPORABNOST p16 IN Ki-67 ZA HISTOPATOLOŠKO OPREDELITEV CERVİKALNE INTRAEPITELIJSKE NEOPLAZIJE

Kadar nismo uspeli zanesljivo razlikovati med atipično ploščatocelično metaplazijo in CIN po histopatološkem pregledu preparatov HE, smo z imunohistokemičnim barvanjem ugotovili močno pozitivno reakcijo na p16 in Ki-67 (ki je bila narejena le v polovici primerov) v 9 od 23 (39,1 %) primerov ter potrdili CIN visoke stopnje (CIN2 in CIN3) (tabela 1, slika 1). Po drugi strani je bila reakcija na p16 kar v 14 primerih (60,9 %) negativna, kar je skladno z atipično ploščatocelično metaplazijo. Bolnice torej niso imele predrakavih sprememb (tabela 1, slika 2). Pozitivna reakcija na p16 in Ki-67 je potrdila CIN2 v termično poškodovanem epiteliju resekcijem roba konusa po metodi LLETZ, kar pomeni, da CIN2 ni bil izrezan v zdravem (tabela 1). Takšna histopatološka diagnoza pomembno vpliva na nadaljnje zdravljenje in spremljanje bolnice po konizaciji.

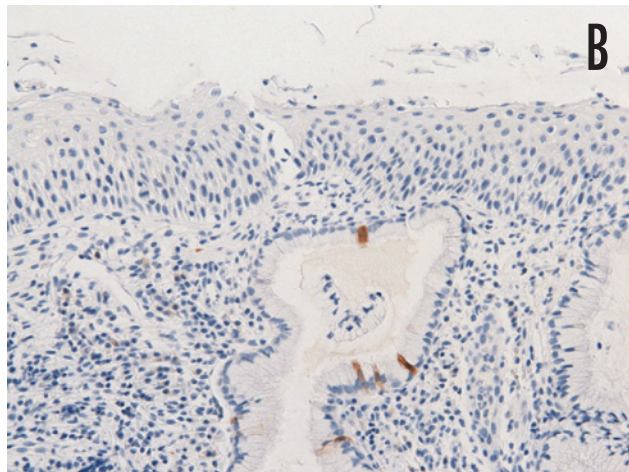
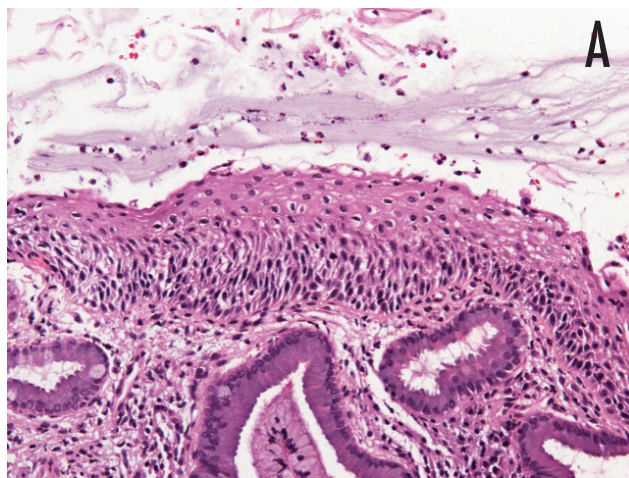
- Slika 1.** A) Cervikalna intraepitelijska neoplazija stopnje 2 (CIN2) ali atipija ploščatoceličnega metaplastičnega epitelijskega (HE, x200)
 B) Močno pozitivna imunohistokemična reakcija na p16 (x200) v celotni debelini epitelijskega.
 C) Močno pozitivne celice za imunohistokemično barvanje Ki-67 (x200) v celotni debelini epitelijskega, potrjujejo CIN2.





Slika 2. A) Cervikalna intraepitelijska neoplazija stopnje 2 (CIN2) ali atipija ploščatoceličnega metaplastičnega epitelijskega (HE, x200)

B) Negativna imunohistokemična reakcija na p16 (x200) ovrže sum, da gre za CIN2. Posamezne celice v normalnem endocervikalnem žleznetem epiteliju se lahko pozitivno obarvajo s p16, kar predstavlja pozitivno notranjo kontrolo.



Pri diagnostičnem dvomu o opredelitvi stopnje CIN smo v obeh primerih potrdili CIN visoke stopnje (CIN2 in CIN3) (tabela 1).

Reakcija na p16 in Ki-67 je bila močno pozitivna tudi v mikroskopskem fokusu endocervikalnega adenokarcinoma in situ (AIS) v vzorcu konusa (tabela 1). V drugem primeru smo ugotovili pozitivno reakcijo v neenakomerno izraženi atipiji epitelijskega v 2 endocervikalnih žleznetih kriptah, vendar strukturalna in celična atipija ni dosegala histomorfoloških meril za AIS (tabela 1). Pozitivna reakcija na oba označevalca je skladna s cervikalno glandularno (žlezno) intraepitelijsko neoplazijo nizke stopnje, konizacija pa do sedaj še ni bila narejena. V obeh kondilomih je bila reakcija na p16 negativna, Ki-67 pa je bil pozitiven le v bazalnem in parabazalnem sloju epitelijskega, kar je sicer običajna najdba v normalnem ploščatem epiteliju (tabela 1). Negativni reakciji na oba označevalca sta potrdili, da ne gre za okužbo s HPV-VT. Napravili smo tudi hibridizacijo in situ za HPV 6 in 11. V obeh primerih je bila prepričljivo pozitivna, kar potrjuje histopatološko diagnozo kondiloma.

SKLEP

Imunohistokemično določanje p16 in Ki-67 – nadomestnih bioloških označevalcev okužbe s HPV z velikim tveganjem – je v pomoč pri razlikovanju med CIN visoke stopnje (CIN2 in CIN3) in posnemovalci predrakavih sprememb, med katerimi

je najpogostejša atipična ploščatocelična metaplazija, pogosto v povezavi z vnetnimi spremembami v ploščatem epiteliju. Oba biološka označevalca sta uporabna tudi za zanesljivejše ocenjevanje predrakavih sprememb na endocervikalnem žleznetem epiteliju (AIS in CGIN).

Glede na naše izkušnje iz vsakdanjega dela se diagnostični dvomi pri histopatološkem ocenjevanju predrakavih sprememb materničnega vratu pojavijo pri majhnem odstotku primerov (pri 6,4 %), vendar je prava histopatološka diagnoza pomembna za vsako bolnico. Skladno z objavljenimi izsledki ugotavljamo, da dodatna diagnostična metoda imunohistokemičnega določanja p16 in Ki-67 omogoča zanesljivejšo histopatološko opredelitev CIN visoke stopnje ter AIS/CGIN in zato pomembno prispeva k načrtovanju zdravljenja, če intraepitelijske neoplastične spremembe visoke stopnje potrdimo, oz. prepreči zdravljenje sprememb, ki nimajo neoplastičnega potenciala.

LITERATURA

1. ZORA. Državni program zgodnjega odkrivanja predrakavih sprememb materničnega vratu [internet]. Ljubljana: Onkološki inštitut Ljubljana [citirano 12. marec 2012]. Dosegljivo na <http://zora.onko-i.si/>.
2. Primic Žakelj M, Ivanuš U, Pogačnik A. Poročilo o rezultatih državnega programa ZORA v letih 2007 in 2008. Ljubljana: Onkološki inštitut Ljubljana; 2009.
3. Uršič-Vrščaj M, Rakar S, Možina A, et al. Smernice za celostno obravnavo žensk s predrakavimi spremembami materničnega vratu. Ljubljana: Onkološki inštitut Ljubljana; 2011.
4. Crum CP, Rose PG. Cervical squamous neoplasia. In: Crum CP, Lee KR. Diagnostic Gynecologic and Obstetric Pathology. 1st ed. Elsevier Inc; 2006. p. 267–354.
5. Stoler HM, Schiffman M. Interobserver reproducibility of cervical and histologic interpretations: realistic estimates from the ASCUS-LSIL Triage Study. *JAMA* 2001; 285: 1500–1505.
6. Thrall MJ, Mody DR. Clinical human papillomavirus testing modalities: Established techniques and new directions. *Pathology Case Reviews* 2011; 16: 55–61.
7. Niekerk DV, Guillaud M, Maticic J, et al. p16 and MIB1 improve the sensitivity and specificity of the diagnosis of high grade squamous intraepithelial lesions: Methodological issues in a report of 447 biopsies with consensus diagnosis and HPV HCII testing. *Gynecol Oncol* 2007; 107: 233–240.
8. Pinto AP, Schlecht NF, Woo TY, et al. Biomarker (ProEx C, p16 and MiB-1) distinction of high-grade squamous intraepithelial lesion from its mimics. *Modern Pathology* 2008; 21: 1067–1074.
9. Zamora PC, Peris AD, Casafo FJO, et al. Effect of human papillomavirus on cell cycle-related proteins p16, Ki67, Cyclin D1, p53, and ProEx C in precursor lesions of cervical carcinoma. *Am J Clin Pathol* 2009; 132: 378–390.
10. Bergeron C, Ordi J, Schmidt D, et al. Conjunctive p16 testing significantly increases accuracy in diagnosing high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Clin Pathol* 2010; 133: 395–406.

