

A p16/Ki-67 coexpresszió a méhnyakbiopsziás minták kórszövettani diagnózisának megbízható markere

Chira Liliana¹, Horváth Emőke¹, Turcu Mihai¹, Pávai Zoltán², Mezei Tibor¹, Jung János¹

Marosvásárhelyi Orvosi és Gyógyszerészeti Egyetem, ¹Patológia Tanszék, ²Anatómia és Fejlődéstan Tanszék

Coexpresia p16/Ki-67 este markerul fidel al diagnosticului histopatologic în biopsiile cervicale

Și actualmente, în ciuda progreselor mari făcute în ultimul timp în prevenirea și recunoașterea sa, carcinomul de col uterin și leziunile sale precursore continuă să rămână o problemă importantă în patologia cervicală. În studiul nostru, efectuat pe 120 cazuri, am urmărit coexpresia p16/Ki-67 în leziunile precanceroase și maligne cervicale, cu scopul precizării diagnosticului de certitudine. Rezultatele astfel obținute le-am comparat cu diagnosticul histopatologic din colorația uzuală HE. În urma calculării specificității și sensibilității reacției, am constatat o corelație strânsă între gradul displaziei și coexpresia p16/Ki-67, astfel reacția fiind utilă în diagnosticul diferențial dintre atipie reactivă și displazie precum și în gradarea corectă a unei displazii. Absența marcajului p16/Ki-67 caracterizează modificări reactive, un marcaj imunohistochimic focal sau în bandă localizată în grosimea epiteliului definește cu exactitate gradul displaziei. Expresia intensă nucleară a proteinei p16 indică prezența virusului HPV cu risc înalt.

Cuvinte cheie: displazie cervicală, carcinom cervical, p16, Ki67

p16/Ki-67 coexpression is a reliable marker of histopathological diagnosis in cervical biopsies

Actually, despite of the serious progress achieved in prevention and recognition, cervical cancer and its precursor lesions remain an important diagnostic quizz in gynecopathology. In our study we assessed the coexpression of p16/Ki-67 in precancerous and malignant epithelial lesions in order to establish a correct diagnosis. We compared our immunohistochemistry results with those obtained with standard HE stain. Calculating the reaction specificity and sensitivity we have observed a strong correlation between the grade of dysplasia and p16/Ki-67 coexpression, which proved to be useful in differentiation of reactive atypia and dysplasia and correct grading of the dysplasia. Lack of p16/Ki67 immunostaining characterizes reactive changes, the focal or band-like staining present in cervical epithelia defines precisely the grade of dysplasia. Intense nuclear expression of p16 protein indicates the presence of high-risk HPV infection.

Keywords: p16, Ki-67, cervical intraepithelial neoplasia (CIN), human papilloma virus (HPV)

Orvostudományi Értesítő, 2008, 81 (4): 253-262

www.orvtudert.ro

Az utóbbi évtizedben a méhnyakrák felismerése, megelőzése és kezelése terén világviszonylatban jelentős előrelépés történt, de a magas morbiditási és mortalitási ráta miatt jelen pillanatban is a nőgyógyászati patológia központi problémáját képezi.

A diagnosztikai algoritmus fontos lépése a biopsziás minta értékelése, melynek pozitív eredménye alapján műtéti beavatkozás/onkológiai kezelés indokolt.

A biopsziás minták sajátosságaiból adódóan (kis méret, hiányos szövetstruktúra, heveny gyulladás, metaplazias laphám jelenléte, a minta helytelen beagyazása valamint szubjektív kritériumok) számos diagnosztikai és differenciáldiagnosztikai nehézség merül fel a patológus számára.

Jelen tanulmányunk célja olyan terápiás és prognosztikai jelentőségű összefüggések keresése a morfológiai és az immunfenotípusos jegyek között, amelyek a precancerosus elváltozások fokozatait valamint az infiltratív carcinoma differenciáltsági fokát pontosan jellemzik, ugyanakkor segítenek a reaktív és a precancerosus elváltozások elkülönítésében.

Anyag és módszer

2007-2008-as évek kazuisztikájából 210 szövetmintát dolgoztunk fel, amelyek különböző súlyosságú elváltozásokat mutató endocervicális kaparekból valamint méhnyakbiopsziából származtak.

A morfológiai elváltozásokat a hematoxilin-eozin festés alapján cervicitis reaktív atípiával, displasiás hámelváltozások, invazív carcinoma, valamint nem besorol-

ható dysplasiák (hiányos hámvastagság+stróma hiánya a biopsziás mintában) kategóriájába soroltuk. A kóros hámfolyamatok súlyossági fokának pontos jellemzésére immunhisztokémiai eljárással vizsgáltuk a p16 (Lab Vision, clone Ab7) és a Ki-67 protein (Lab Vision, clone SP6) expresszióját a hámszövetben. Vizualizáló rendszerként Ultravision LP Large Volum Detection System HRP Polimert (Lab Vision) és 3,3'-diaminobenzidin kromogént használtunk a Ki-67 reakció pozitív endogén kontrolljaként a vizsgált hámszövet szolgált, míg a p 16 pozitív kontrollját bizonyítottan HPV (Human Papilloma Virus) pozitív méhnyak laphámcarcinoma képezte, az irodalmi ajánlásoknak megfelelően [1,6,7].

A reakciókvantifikálását egymástól függetlenül két patológus végezte részben a sejtsztruktúrákhoz kötött lokalizáció (mag/citoplazma), részben a hámszövet arhitekturájához kötött lokalizáció függvényében Ugyanakkor követtük a p16 expressziót az atípusosnak diagnosztizált hám teljes hosszában. Ennek függvényében megkülönböztettünk gócos, illetve sávos arhitekturális mintázatot (band-like pattern).

A szakirodalmi ajánlásokat figyelembe véve a p16 értékelése esetén egyaránt pozitívnak tekintettük a mag, valamint a mag és citoplazma (kombinált kifejeződés) szintjén megjelenő reakcióterméket, amelyek az atípusos sejtek legalább 25%-át érintették [2, 5]. A csak citoplazmára lokalizálódó expressziót nonspecifikus reakcióként értékeltük. A Ki-67 esetében csak a magfestődést vettük figyelembe, és kiszámítottuk a Ki-67 proliferációs indexet (100 atípusos sejthez viszonyítva a pozitív sejtmagok számát). Küszöbértéknek az 50%-ot tekintettük [12]. A dysplasia súlyossági fokának (CIN I-CIN III) a meghatározásában diagnosztikus érté-



kúnek a hám vastagságát különböző mértékben érintő két antigén együttes expresszióját tekintettük, figyelembe véve a mintázat gócos vagy sávos jellegét is [7]. Az eredményeket összehasonlítottuk a standard feldolgozás (HE festés) alapján felállított súlyossági fokozatokkal és kiszámítottuk a reakció szenzitivitását és specifitását a dysplasiák diagnózisában.

Eredmények

A feldolgozott 210 biopsziás mintát a szövettani és immunhisztokémiai eredményeink alapján 3 nagy csoportba (gyulladás, dysplasia és carcinoma) és 10 alcsoportba soroltuk (1. táblázat).

Nem találtunk p16 fehérje expressziót a benignus léziók hámsejtjeiben. Precancerosus elváltozásokban az expresszió lokalizációja és intenzitása a dysplasia függvénye (2. táblázat).

1. táblázat. A vizsgált elváltozások megoszlása a standard festési eljárás (HE) és az immunfenotipizálás alapján

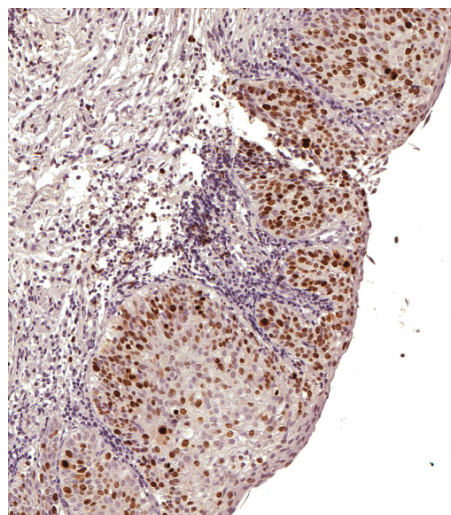
Kórszövettani diagnózis	Elváltozás típusa	Esetszám / HE festés	Esetszám / immunfenotip.
Cervicitis	Reaktiv atípiával	31	35
	Hám atrófiával	7	7
Dysplasia	CIN1	37	33
	CIN2	43	52
	CIN3	48	43
	Nem besorolható dysplasia	4	0
	Cervix carcinoma		
Cervix carcinoma	El nemszarusodó epidermoid carcinoma	22	22
	Elszarusodó epidermoid carcinoma	10	10
	Adenocarcinoma	6	6
	Adenosquamosus carcinoma	2	2
Össz esetszám		210	210

2. táblázat. A p16 antigén lokalizációja a dysplasia súlyossága szerint

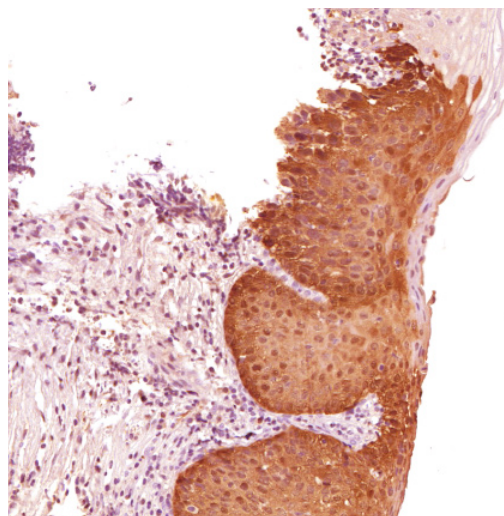
Dysplasia foka (HE festés)	Esetszám	A p16 antigénexpresszió lokalizációja			
		mag	mag + cytoplasma	gócos	sávos
CIN I	37	+(15) / -(22)	változó	33	4
CIN II	43	++	++	5	38
CIN III	48	+++	+++	0	48
Nem besorolható dysplasia	4	++/ +++	++/ +++	0	4
Össz esetszám	132			38	94

Enyhe dysplasiában (CIN I) a p16 antigén gyenge magreakciót mutat, sok esetben nem is expresszálódik, ellenben megjelenhet diffúz mintázat formájában a cytoplasma szintjén. A dysplasia súlyosságának fokozódásával (CIN II, CIN III) a kombinált (mag+cytoplasma) expresszió a jellemző a magfestődés dominanciájával, ez utóbbi jól korrelál a dysplasia fokával: enyhe dysplasiában a mag szintjén a p16 expresszió az esetek többségében (33 eset) gócos arhitekturális mintázatot mutat a hámréteg alsó harmadára korlátozódva (nem érintve az atípusos hám teljes kiterjedtségét). A dysplasia fokának súlyosbodásával a sáv-szerű arhitekturális mintázat kerül előtérbe, amely a hám alsó kétharmadát, vagy teljes vastagságát érinti (1. ábra). A méhnyakrák daganatsejtjeire a kevert lokalizáció jellemző, függetlenül a carcinoma típusától.

A Ki-67 proliferációs index alacsony volt (<5%) a benignus elváltozásokban, a reakció (a normális hámhoz hasonlóan) csak a hám parabazális sejtjeire lokalizálódott.



1. ábra. p 16 expresszió mérsékelt dysplasiában (CIN II) sávos mintázattal és a magfestődés dominanciájával (p16 immunhisztokémia, DAB, 10 ob.)



2. ábra. Ki-67 expresszió mérsékelt dysplasiában (Ki-67 immunhisztokémia, DAB, 20 ob.)

3. táblázat. A Ki-67 proliferációs index benignus, precancerosus és malignus cervixléziókban.

Kórszövettani diagnózis	Ki-67 proliferációs index		
Cervicitis	Negatív (<5%)		
Dysplasia	Enyhe pozitívítás (5-10%)	Pozitív (10-50%)	Kifejezett pozitívítás (>50%)
Carcinoma	Kifejezett pozitívítás (>50%)		

Enyhe dysplasiában (CIN I) a proliferációs index nem haladta meg a 10%-ot, ellenben nőtt az értéke (50% fölött) CIN II és CIN III esetén, anélkül, hogy összefüggést mutatna a dysplasia súlyossági fokával (3. táblázat, 2. ábra).

Összehasonlítva a standard feldolgozás során nyert felsorolt kórszövettani diagnózisok számát a p16/Ki-67 meghatározásból adódó újraértékelt esetszámmal, különbséget találtunk az enyhe dysplasia és a reaktív atípiával jellemzett cervicitis (31 versus 35), valamint a mérsékelt és a súlyos dysplasia között, a mérsékelt dysplasia javára (52 versus 43) (1. táblázat). A 4 nem besorolható dysplasiát a p16/Ki-67 expressziós mintázat alapján legkevesebb CIN-II-nek minősítettük a felszíni hámrétegek hiánya miatt. Az invazív carcinomák esetében a p16/Ki-67 coexpressziós mintázat a diagnózist nem módosította, ellenben a Ki-67 proliferációs index növekedését észleltük a carcinoma differenciálódási fokának csökkenésével.

Összehasonlítva a HE festés alapján dysplasiának minősített esetszámot a p16/Ki-67 expressziós mintázat alapján diagnosztizált esetszámmal, 96,9%-os szenzitivitási valamint 90,45%-os specificitási értéket találtunk az immunreakcióra vonatkoztatva. A százalékok különbségének valószínűségi tesztjével a CIN II diagnózisában relatív különbséget mutatott az összesetekhez viszonyítva ($p=0,17$).

Megbeszélés

A méhnyakrák a legjobban tanulmányozott humán daganatok közé tartozik, amely keletkezésében a HPV vírusnak a szerepe vitathatatlan. Az epidemiológiai tanulmányok szerint a HPV fertőzőképessége igen magas, de a fertőzött betegek csak kis hányadában (20%), elsősorban a perszisztáló, magas kópiaszámú, magas kockázatú vírussal fertőzött betegekben következik be a többlépcsős malignus transzformáció. Átlagosan 7-11 év alatt alakul ki az invazív carcinoma precancerosus (CIN I-CIN III) elváltozások talaján.

A legtöbb, progresszióra hajlamos intraepiteliális hámfolyamatban és carcinomában a cirkuláris, epizomális HPV helyett lineárisan inszertálódott vírusgenom mutatható ki, ennek a folyamatnak fontos láncszeme a p16 (ciklinfüggő kinázgátló, a CDKN2A produktuma), melynek a sejten

belüli felhalmozódását az eddigi ismeretek szerint kizárólag a magas kockázatú vírusok okozzák [4].

A normális exo-, és endocervikális hám, valamint az érett metaplaziás laphám szintjén nem észleltünk p16 fehérje expressziót, ellenben dysplasiában mag és citoplazma szintjére lokalizálódó festődést észleltünk, amelynek intenzitása egyenes arányban változott a dysplasia súlyossági fokával. Az irodalomban a citoplazmára lokalizálódó expresszió sokat vitatott probléma. Egyes szerzők csak a magra lokalizálódó reakciót tekintik pozitívnak [13, 3]. Ezért negatívnak tekintettük a csak citoplazmára korlátozódó reakciót és csak mag /citoplazma szintjén megjelenő együttes expressziót vettük figyelembe. Az erős magreakció (a pozitív kontrollhoz hasonló) a magas kockázatú HPV vírus jelenlétét valószínűsíti [11, 15]. Az invazív exo/endocervicalis daganatszövetben a reakció intenzitása főleg a magra lokalizálódik, coexpressziót mutatva a Ki-67 fehérjével, amely kizárólag a mag szerkezetéhez kötött, és a sejtciklusnak csak a G1, S, G2 és M fázisában jelenik meg. Az antigén kimutatása az ellene termelt antitest segítségével meghatározható az aktívan osztódó tumorsejt populáció (Ki-67 index), ezért prognosztikai jelentőségű [4].

A reakció magas szenzitivitása és specificitása indokolta teszi a módszer alkalmazását a dysplasiák és a reaktív atípiák elkülönítésében [9, 8, 10]. A mérsékelt dysplasiák diagnózisát megerősíti, ezáltal biztosítva a cervikális hámváltozások optimális kezelését (conisatio versus utánkötetés), mivel a jól elvégzett conisatio a precancerosus állapotokban nemcsak diagnosztikai, hanem terápiás eljárást is jelent [14].

Következtetések

Eredményeink alátámasztják a p16/Ki-67 expresszió vizsgálatának jelentőségét a méhnyak dysplasiák súlyossági fokának meghatározásában biopsziás minták esetében, ahol a műtéti anyaggal ellentétben kis mennyiségű szövet áll a rendelkezésünkre.

A p16/Ki-67 negativitás reaktív hámváltozásra jellemző. Ezzel ellentétben a p16/Ki-67 pozitívítás göcos vagy sávós mintázatú megjelenése dysplasiára jellemző. A p16 erős magfestődése magas kockázatú vírussal való fertőzésre utal.

A p16 és Ki-67 antigén expressziója külön-külön nem utal a dysplasia súlyossági fokára, annak ellenére, hogy az expresszió intenzitása mindkét antigén esetében a CIN I-től a CIN II és CIN III keresztül az invazív carcinomáig fokozódik. Invazív carcinomában a Ki-67-el jól jellemezhető proliferációs indexnek prognosztikai jelentősége van.

A két antigén együttes meghatározása pontosan jelöli a dysplasia fokát. Gyakorlati jelentőségét a terápiás vetülete hangsúlyozza, elkülönítve ezáltal az alacsony intraepiteliális léziót (L-SIL) a magas intraepiteliális léziótól (H-SIL), illetve a reaktív atípiától.

Irodalom

1. Dray M., Russell P., Dalrymple C. et al. – *p16^{INK4a} as a complementary marker of high-grade intraepithelial lesions of the uterine cervix*. Experience with squamous lesions in 189 consecutive cervical biopsies, *Pathology*, 2005, 37(2):112-24.
2. Focchi G.R., Silva I.D., Nogueira-de Souza N.C. et al. – *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.
3. Franco Lambert A.P., Anschau F., Minghelli Schmitt M. – *P16^{INK4A} expression in cervical premalignant and malignant lesions*, 2006, *Experimental and Molecular Pathology*, 80(2):192-196.
4. Galmiche L., Coste-Burel M., Lopes P. et al. – *The expression of p16 is not correlated with HPV status in CIN I*. *Histopathology*, 2006, 48(6):767-767.
5. Hariri J., Oster A. – *The negative predictive value of p16^{INK4a} to assess the outcome of cervical intraepithelial neoplasia 1 in the uterine cervix*. *Int J Gynecol Pathol*, 2007, 26(3):223-228.
6. Iaconis L., Hyjek E., Elleson L. H. et al. – *P16 and Ki 67 immunostaining in atypical immature squamous metaplasia of the uterine cervix: correlation with human papillomavirus detection*. *Arch Pathol Lab Med*, 2007, 131(9):1343-1349.
7. Keating J. T., Cviko A., Riethdorf S. et al. – *Ki 67, cyclin E and p16^{INK4a} are complimentary surrogate biomarkers for human papillomavirus-related cervical neoplasia*. *Am J Pathol*, 2001, 25(7):884-891.
8. Klaes R., Friedrich T., Spitkovsky D. et al. – *Overexpression of p16^{INK4A} as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri*. 2001, *Int. J. Cancer*, 92: 276-284.
9. Niamh M., Heffron C., Ring M. et al. – *pP16 as a marker of cervical dyskariosis* – Article originally printed in *DAKOfacts* magazine, November 2003.
10. O'Neill C. J., McCluggage W. G. – *P16 expression in the female genital tract and its value diagnosis*. *Adv Anat Pathol*, 2006, 13(1):8-15.
11. Sano T., Oyama T., Kashiwabara K. et al. – *Expression status of p16 protein is associated with human papillomavirus oncogenic potential in cervical and genital lesions*, 1998, *Am J Pathol*; 153:1741-1748.
12. Queiroz C., Silva T. C., Alves V. A. et al. – *Comparative study of the expression of cellular cycle proteins in cervical intraepithelial lesions*, *Pathol Res Pract*. 2006, 202(10):731-737.
13. Volgareva G., Zavalishina L., Andreeva Y. et al. – *Protein p16 as a marker of dysplastic and neoplastic alterations in cervical epithelial cells*. *BMC Cancer* 2004, 4:58.
14. Walts A. E, Bose S. – *P16/Ki67 immunostaining is useful in stratification of atypical metaplastic epithelium of the cervix*, *Clinical Medicine: Pathology* 2008: I 35-42.
15. Wang S.S., Trunk M., Schiffman M. et al. – *Validation of p16^{INK4a} as a marker of oncogenic human papillomavirus infection in cervical biopsies from a population-based cohort in Costa Rica*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2004, 13(8):1335-1360.