

Klinični pomen p16 v cervikalni neoplaziji

Margareta Strojan Fležar, Helena Gutnik

Inštitut za patologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani

Uvod

S citopatološko preiskavo presejalnih brisov materničnega vratu odkrijemo različne stopnje atipije ploščatega in žleznega epitelija, za odločitev o morebitnem zdravljenju s presejanjem odkritih sprememb pa je ključnega pomena histopatološka preiskava biopsijskega vzorca materničnega vratu (1). Čeprav so morfološki kriteriji za histopatološko ocenjevanje CIN dobro opredeljeni, pa nam pri vsakdanjem delu lahko povzroča diagnostične težave razlikovanje med CIN in reaktivnimi ali reparativnimi atipijami ploščatega metaplastičnega epitelija, nezrelo ploščatocelično metaplazijo, težavno je tudi ocenjevanje atipij v atrofičnem ploščatem epiteliju (2). Diagnostično težavno je lahko tudi ocenjevanje intraepitelijske neoplazije v endocervikalnem žlezem epiteliju.

Nadomestni biološki označevalci okužbe z onkogenimi humanimi papiloma virusi (HPV)

Dokaz okužbe s HPV visokega tveganja (HPV-VT) ne zadošča za potrditev predrakavih sprememb. V predrakavih spremembah visoke stopnje in raku materničnega vratu se HPV genom integrira v gostiteljev genom, sledi povečano izražanje virusnih onkoproteinov E6 in E7 (2). Posledica delovanja obeh virusnih onkoproteinov so motnje regulacije celičnega ciklusa in spremenjeno izražanje številnih proteinov celičnega ciklusa.

Največkrat uporabljen nadomestni biološki označevalec okužbe s HPV-VT za opredeljevanje CIN je p16, običajno v kombinaciji s Ki-67 (3-5). Protein p16 je inhibitor kinaze, ki je odvisna od ciklina, in zavira napredovanje celice skozi kontrolno točko prehoda iz faze G1 v fazo S celičnega ciklusa. Povečano izražanje p 16 je odraz motenj v

celičnem ciklusu, ki jih povzročita virusna onkoproteina E6 in E7 in je prisotno v različnih stopnjah CIN. Ki-67 je antigen, ki je izražen v jedrih vseh celic (normalnih in spremenjenih), ki proliferirajo.

Imunohistokemično barvanje na p16 in Ki-67 na biopsijskih vzorcih materničnega vratu

Protein p16 določamo na biopsijskih vzorcih materničnega vratu s standardnimi imunohistokemičnimi barvanji. Uporabljamo komercialno dostopen kit, ki je namenjen in vitro diagnostiki (IVD, CINtec Histology V-Kit, mtm laboratories, Heidelberg, Germany) in vsebuje protitelo proti proteinu p16^{INK4a} (klon E6H4). Ki-67 dokazujemo z monoklonskim protitelesom MIB-1 (klon MIB-1, redčitev 1:20, DakoCytomation, Glostrup, Danska).

Klinični pomen p16 IN Ki-67

1. Razlikovanje med atipično ploščatocelično metaplazijo in CIN ter ocena stopnje CIN

V CIN2 in CIN3 se s protitelesi proti p16 difuzno in intenzivno obarvajo jedra (in citoplazma) celic v celotni debelini epitelija. Reakcija na p16 je lahko manj izrazita v zgornji tretjini v CIN2. Podobno lahko opazamo nekoliko manjši delež Ki-67 pozitivnih celic pri CIN2, čeprav najdemo pozitivne celice v celotni debelini epitelija. Tudi v CIN1 je obarvanost v zgornji tretjini epitelija lahko manj intenzivna pri p16 oz. je pozitiven nekoliko manjši delež celic na Ki-67 (2-5).

Reakcija na p16 je negativna v atipični ploščatocelični metaplaziji, vendar se lahko šibko obarvajo posamezne celice. Podobno opazamo v ploščatoceličnem metaplastičnem epiteliju brez atipij in tudi v posameznih celicah endocervikalnega žleznega epitelija. Takšno obarvanje ne odraža okužbe s HPV-VT (2).

2. Ocenjevanje sprememb v termično poškodovanih resekcijskih robovih LLETZ-a

Imunohistokemična barvanja na p16 delujejo tudi v termično poškodovanem tkivu konusov po metodi LLETZ. Pozitivna reakcija na p16 in Ki-67 lahko razlikuje med »atipijo« zaradi termičnih poškodb in CIN v resekcijskem robu, kar pomembno vpliva na nadaljnje obravnavo bolnice po konizaciji.

3. Ocenjevanje atipije v endocervikalnem žleznem epiteliju

Reakcija na p16 in Ki-67 je močno pozitivna tudi v stratificiranem atipičnem žleznem epiteliju endocervikalnega adenokarcinoma in situ (AIS). Pozitivna reakcija je prisotna tudi v atipiji, ki morfološko ustreza cervikalni glandularni (žlezni) intraepitelijski neoplaziji nizke stopnje (2).

4. Kondilom

V kondilomih je reakcija na p16 negativna, Ki-67 pa je pozitiven le v bazalnem in parabazalnem sloju epitelija, enako kot v normalnem ploščatem epiteliju. Negativni reakciji na oba označevalca posredno potrjujeta, da ne gre za okužbo s HPV-VT. Diagnozo lahko potrdimo tudi s pozitivno reakcijo na HPV 6 in 11, z metodo in situ hibridizacije (2).

Sklep

Biološki označevalec p16, največkrat v kombinaciji s Ki-67, lahko uporabimo kot dodatno, imunohistokemično metodo v rutinski histopatološki preiskavi diagnostično težavnih biopsijskih vzorcev materninega vratu. Predvsem pomembna je uporaba p16 za razlikovanje cervikalne ploščate in žlezne intraepitelijske neoplazije od morfološko podobnih neneoplastičenih sprememb, kar pomembno prispeva k optimalni obravnavi bolnic.

Viri:

1. Uršič-Vrščaj M, Rakar S, Možina A, et al. Smernice za celostno obravnavo žensk s predrakavimi spremembami materničnega vratu. Ljubljana: Onkološki inštitut Ljubljana; 2011.
2. 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.
3. Thrall MJ, Mody DR. Clinical human papillomavirus testing modalities: Established techniques and new directions. Pathology Case Reviews 2011; 16: 55-61.
4. 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.
5. 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.



Zora
Odborniški svet strokovnjakov
za oblikovanje in izvajanje
nacionalnega programa

Klinični pomen p16 v cervikalni neoplaziji

Margareta Strojan Fležar
Inštitut za patologijo, Medicinska fakulteta,
Univerza v Ljubljani

3. izobraževalni dan programa ZORA
Brdo pri Kranju, 20. april 2012

Zora
Odborniški svet strokovnjakov
za oblikovanje in izvajanje
nacionalnega programa

Histopatološka diagnostika cervikalne intraepitelijske neoplazije – HPV/nove metode

- Histopatološki pregled - končna diagnoza za zdravljenje
- = **zlati standard**
- Kontrola kakovosti dela citologije in kolposkopije

3. izobraževalni dan programa ZORA
Brdo pri Kranju, 20. april 2012

Zora
Odborniški svet strokovnjakov
za oblikovanje in izvajanje
nacionalnega programa

Osnovne zahteve histopatološkega pregleda

- Ustrezen vzorec (odščip ali konus MV)
- MAKROskopski opis
- Laboratorijska obdelava vzorcev
- MIKROskopski pregled in OCENA / DIAGNOZA
- Ujemanje CITO/HISTO

↓

DODATNE METODE

3. izobraževalni dan programa ZORA
Brdo pri Kranju, 20. april 2012

Zora
Odborniški svet strokovnjakov
za oblikovanje in izvajanje
nacionalnega programa

Določanje HPV

- In situ hibridizacija
- Določanje tipov HPV?
- Manj občutljiva kot PCR
- Dokaz okužbe
- **NE POTRDI NEOPLAZIJE!**

3. izobraževalni dan programa ZORA
Brdo pri Kranju, 20. april 2012

Zora
Odborniški svet strokovnjakov
za oblikovanje in izvajanje
nacionalnega programa

Nadomestni biološki označevalci HPV-VT okužbe

↑p16
↑Ki-67


© 2006 Elsevier Inc. Chun, CP and Lee, KB. Diagnostic Gynecologic and Obstetric Pathology

Zora
Odborniški svet strokovnjakov
za oblikovanje in izvajanje
nacionalnega programa

Ki-67

- Označevalec celičnega ciklusa
- +Ki-67 v vseh jedrih razen v fazi G0
- Normalen epitelij: +bazalne/parabazalne celice v spodnji tretjini
- HPV efekt: +Ki-67 v zgornjih slojih
- DD: Reaktivno/CIN1
- DD: Atrofija/CIN2 in CIN3

Resnick et al. Hum Pathol 1996
3. izobraževalni dan programa ZORA
Brdo pri Kranju, 20. april 2012




p16

- Od ciklina odvisni inhibitor tirozin-kinaze
- HPV-E7 → Rb → aktivacija p16 → motnje regulacije celičnega ciklusa in displazija
- p16 bolj specifičen, manj občutljiv kot HC2 za dg. CIN2 in CIN3

Klaes et al. Int J Cancer 2001

3. izobraževalni dan programa ZORA
Brdo pri Kranju, 20. april 2012




p16 + Ki-67

- Kombinacija zviša občutljivost in specifičnost za DD: CIN1/CIN2 in CIN3 in neg/reakt

Van Niekerk et al. Gynecol Oncol 2007


3. izobraževalni dan programa ZORA
Brdo pri Kranju, 20. april 2012



1. Atipična ploščatocelična metaplazija ali CIN?

- 52-letna ženska
- Kl. dg.: APC-N, +HPV triažni test
- Odščipi porcije iz jod neg. mest
- Histo/HE: Atipična ploščatocelična metaplazija ali CIN?
- p16: difuzno in intenzivno obarvana jedra (in citoplazma) v celotni debelini epitelija
- Ki-67: + jedra v celotni debelini epitelija
- Histo dg: **CIN3**, kron. cervicitis, hude stopnje


3. izobraževalni dan programa ZORA
Brdo pri Kranju, 20. april 2012



2. Atipična ploščatocelična metaplazija ali CIN?

- 39-letna ženska
- Kl.dg.: Portio suspecta
- Konizacija LLETZ
- Histo/HE: Atipična ploščatocelična metaplazija ali CIN?
- Negativen p16
- Ki-67+ v bazal/parabazal sloju
- Lahko v pos. c. šibko + citopazma
- Histo dg: **Atipična ploščatocelična metaplazija**


3. izobraževalni dan programa ZORA
Brdo pri Kranju, 20. april 2012



3. Ocena stopnje CIN

- 55-letna ženska
- Kl. dg.: CIN2-3
- konizacija
- Histo/HE: CIN2 in CIN3?
- p16: difuzno in intenzivno obarvana jedra (in citoplazma) v celotni debelini epitelija v CIN3, manj intenzivno obarvana zg. tretjina v CIN2
- Histo dg: **CIN2 in CIN3**

3. izobraževalni dan programa ZORA
Brdo pri Kranju, 20. april 2012



4. Ocenjevanje sprememb v termično poškodovanih resekcijskih robovih LLETZ-a

- 35-letna ženska
- Kl.dg.: CIN1, PAP C recid.
- Konizacija LLETZ
- Histo/HE - termične poškodbe: CIN2 ali metaplazija?
- p16: difuzno in intenzivno obarvana jedra (in citoplazma) v celotni debelini epitelija
- Ki-67: + jedra v celotni debelini epitelija
- Histo dg: **CIN2**

3. izobraževalni dan programa ZORA
Brdo pri Kranju, 20. april 2012

5. Ocenjevanje atipije v endocervikalnem žleznem epiteliju



- 34-letna ženska
- Kl.dg.: Portio suspecta, PAP PIL-VS (ZmD)
- Konizacija LLETZ
- Histo/HE: atip. pl. metapl. + fokus AIS?
- p16: difuzno in intenzivno obarvana jedra (in citoplazma) v stratificiranem atipičnem žleznem epiteliju
- Ki-67: + jedra v celotni debelini stratificiranega atipičnega žleznega epitelija
- Histo dg: **endocervikalni AIS (fokus) in atip. pl. metapl.**

3. izobraževalni dan programa ZORA
Brdo pri Kranju, 20. april 2012

6. Kondilom



- 33-letna ženska
- Kl.dg.: Condylomata portionis/tu portionis?
- Konizacija LLETZ
- Histo/HE: kondilom ali CIN1?
- p16 negativen
- +HPV 6 / 11 (ISH)
- Histo dg: kondilom

3. izobraževalni dan programa ZORA
Brdo pri Kranju, 20. april 2012

7. Izvor PC/A-karcinoma materničnega vratu



- 35-letna ženska
- Kl.dg.: PAP PIL-NS, AŽC, +HPV triažni test, kontaktne krvavitve, suspektna porcija
- Odščipi iz sumljivih mest na porciji
- Histo/HE: Slabo diferenciran karcinom, primarni? (Ni N pl epit ali CIN)
- p16+: močno, difuzno pozitiven, CK5/6 +
- Histo dg: Slabo diferenciran ploščatocelični karcinom materničnega vratu

3. izobraževalni dan programa ZORA
Brdo pri Kranju, 20. april 2012

SKLEP



- p16 (+Ki-67) uporabna v rutinski histopatološki diagnostiki
- Razlikovanje med CIN in posnemovalci (neneoplastičnimi spremembami)
- Ocena CGIN/AIS
- Termične poškodbe LLETZ (robovi)
- Izvor PC/A-karcinoma materničnega vratu

**HISTOPATOLOŠKA DIAGNOZA
KLJUČNA ZA ZDRAVLJENJE!**

3. izobraževalni dan programa ZORA
Brdo pri Kranju, 20. april 2012