

## P – 16<sup>INK4a</sup> kao pokazatelj cervikalne displazije

*p-16<sup>INK4a</sup> as a marker for cervical dysplasia*

Ana Krvavica, Petar Lozo \*

---

### Sažetak

U razdoblju 2002. – 2004. godine 58 bolesnika Poliklinike "Lozo" testirano je na HPV. 33 testirane osobe bile su negativne, a ostalih 25 pozitivno. 23 bolesnice su nastavile s liječenjem, dok su ostale isključene iz daljnje obrade iz različitih razloga (odlazak u drugu ustanovu na liječenje ili su izgubljene iz sustava praćenja).

Nakon pripreme za imunohistokemijsku analizu s monoklinalnim mišjim protutijelom p-16<sup>INK4a</sup> (DAKO Cytomation, Danska) nakon demaskiranja antigena i vizualizacijskim sustavom EnVision TM retrogradno su pregledana 23 uzorka tkiva. Rezultati imunohistokemijske analize prikazani su semi-kvantitativnom metodom od 0-3.

4 bolesnice su bile p-16<sup>INK4a</sup> negativne (1 je imala cervikalni polip, 3 šiljate kondilome rodnice bez atipija). Od 7 bolesnica s citološki dokazanim CIN I, 3 su pokazale negativnu reakciju na p-16, a ostale 4 fokalno pozitivnu reakciju u citoplazmi i jezgrama epitelnih stanica. Od 6 bolesnica s citološkim CIN II, 3 su bile negativne na bojenje s p-16, jedna je pokazala fokalno pozitivnu reakciju, dok su dvije imale jako izraženu pojavnost p-16<sup>INK4a</sup>. Jedna od 3 bolesnice s citološkim CIN III imala je negativnu reakciju, a ostale dvije pozitivnu reakciju jakog intenziteta. Jedina bolesnica s citološkim CIS imala je difuznu jako pozitivnu reakciju s p-16<sup>INK4a</sup>. Od dvije bolesnice s nepoznatim rezultatom Papa-testa jednoj je patohistološki dijagnosticiran CIN I, a drugoj CIN III na konizatu, dok je reakcija na p-16<sup>INK4a</sup> bila fokalno pozitivna u citoplazmi epitelnih stanica.

Iz rezultata je vidljivo da je p-16<sup>INK4a</sup> bio pozitivan u svim stupnjevima displazije i klinički evidentnog karcinoma (69,5%), a HPV je dokazan u svih bolesnica s citološkim CIN III. Stoga ova dva pokazatelja treba koristiti u preventivnim programima, uz ostale do sada poznate metode, jer omogućuju brzo, jednostavno i sigurno dokazivanje stupnja displazije.

**Ključne riječi:** cervikalna intraepitelna neoplazija, cervikalni karcinom, HPV, p-16

---

### Summary

In the period 2002-2004, 58 patients from Lozo Health Center were tested for HPV, 25 of them were HPV positive, 33 negative. 23 patients continued with medical treatment, while the others were excluded from treatment (went to other institutions or their follow-up forms had been lost).

After being prepared for immunohistochemical examination, all 23 tissue samples underwent retrograde immunohistochemical analysis with monoclonal mouse antibody p-16<sup>INK4a</sup> (DAKO Cytomation, Denmark) after antigen demasking and coupled with the DAKO En Vision TM visualisation system.

The results of immunohistochemical analysis were presented with semiquantitative score system from 0-3. Four patients were p-16<sup>INK4a</sup> negative (1 with cervical polyp and 3 vulvar condylomata without dysplasia.). Three from seven patients with cytologic CIN I were p-16 negative, while the remaining four showed focally positive expression in the cytoplasm and nuclei of epithelial cells. 3 patients out of 6 with cytologically evident CIN II showed negative reaction with -16, 1 focally positive reaction, while two were strongly showing p-16<sup>INK4a</sup>. In 1 case from 3 patients with CIN III p-16 had negative expression, while the other two showed a strongly positive expression. The only case with cytologic CIS had a diffuse and positive reaction with p-16<sup>INK4a</sup>. 1 from 2 patients with an unknown Papa-test result was diagnosed CIN I

---

\* **Opća bolnica Zadar**, Odjel za patologiju i sudsku medicinu (dr. sc. Ana Krvavica, dr. med.); **Poliklinika Lozo**, Zadar (mr. sc. Petar Lozo, dr. med.)

Adresa za dopisivanje / *Correspondence address*: dr. sc. Ana Krvavica, dr. med., Opća bolnica Zadar, Odjel za patologiju i sudsku medicinu, Bože Peričića 5, 23000 Zadar, e-mail: [ana.krvavica@zd.htnet.hr](mailto:ana.krvavica@zd.htnet.hr)

Primljeno / *Received* 2007-09-24; Ispravljeno / *Revised* 2008-02-14; Prihvaćeno / *Accepted* 2008-10-06.

(HPV negative), while the other was diagnosed CIN III on the cervical conus, and p-16<sup>INK4a</sup> expression was focally positive in the cytoplasm of epithelial cells.

From our results it is evident that p-16<sup>INK4a</sup> was positive in all stages of cervical dysplasia and clinically evident carcinoma CIS (69,5%), and HPV was confirmed with patients with CIN III. These two markers can therefore be used in prevention programmes with other currently known methods for they enable quick, simple and secure proof of the degree of dysplasia.

**Key words:** cervical intraepithelial neoplasia, cervical cancer, HPV, Papa-test, p-16

*Med Jad 2009;39(1-2):29-33*

Napomena: Rad je napravljen na Odjelu za patologiju i sudsku medicinu Opće bolnice u Zadru.

Note: The article was made in the Department for Pathology and Forensic Medicine, General Hospital in Zadar

## Uvod

Kao što je poznato HPV virusi, naročito visokorizični tipovi 16 i 18, preko svojih onkoproteina E6, E7, koji interpoliraju s p-53 i WAF koče regulaciju procesa razmnožavanja cervikalnih epitelnih stanica, te se na taj način nesmetano razmnožavaju uzrokujući razvoj preneoplastičnih procesa i invazivnog karcinoma. Jedan od supresijskih staničnih proteina je i p-16<sup>INK4a</sup> koji koči ciklin ovisne kinaze 4 i 6, koje fosforiliraju Rb protein. Prekomjerna ekspresija p-16<sup>INK4a</sup> u cervikalnim karcinomima je, čini se, posljedica inaktivacije Rb preko HPV E7 onkoproteina. No, postoje i drugi mehanizmi ometanja regulacije, neovisni o HPV. Rezultati istraživanja Waalboomersa, Boscha i sur. (1999) kako je 99,7% invazivnih karcinoma cerviksa uzrokovano baš ovim virusima ohrabruje nas i potiče na preventivna i dijagnostička testiranja cervikalnih razmaza, ali i histoloških preparata u cilju odabiranja najboljeg terapijskog pristupa ovog ozbiljnog svjetskog zdravstvenog problema. p-16<sup>INK4a</sup> se pokazao najosjetljivijim i najspecifičnijim markerom za cervikalne skvamozne i glandularne neoplastične promjene, ali i prekanceroze.<sup>1,2,3</sup>

Ipak jedna grupa autora upozorava kako ekspresija p-16<sup>INK4a</sup> nije nezavisni prognostički čimbenik za prognozu cervikalnog karcinoma prema Coxovim multivarijantnim analizama, niti može poslužiti kao pokazatelj izlječenja nakon poduzetih tretmana zbog CIN.<sup>4</sup>

Stoga smo htjeli usporediti rezultate Papa-testa, HPV i p-16<sup>INK4a</sup> testa na našem materijalu s konačnom patohistološkom dijagnozom.

## Ciljevi

Usporediti rezultate HPV-testa, patohistološke dijagnoze i imuno-histokemijske reakcije na bojenje s p-16<sup>INK4a</sup> onkoproteinom. Procijeniti osjetljivost p-16<sup>INK4a</sup> onkoproteina, kao biološkog pokazatelja, u usporedbi s drugim metodama praćenja bolesnica.

## Materijal i metode

U radu je prikazano 19 slučajeva cervikalne intraepitelne neoplazije (CIN) različitih stupnjeva i karcinoma in situ (CIS) kod bolesnica koje su kolposkopski pregledane, testirane na HPV i nakon toga podvrgnute ciljanoj biopsiji porcije i/ili konizaciji, ovisno o nalazu Papa-testa.

U razdoblju 2002. – 2004. u Poliklinici Lozo testirano je ukupno 58 bolesnika na HPV, od čega je 43% imalo pozitivan HPV test, a 56,8% negativan. 17,2% HPV pozitivnih bolesnica je isključeno iz daljnje obrade iz raznih razloga (odlazak u drugu ustanovu na liječenje ili su izgubljene iz sustava praćenja u različitim fazama liječenja), dok su 23 nastavile liječenje (Tablica 1.).

Od 58 testiranih osoba na HPV, 8 je muškaraca, čiji su rezultati testiranja na HPV bili negativni. 50 su žene u dobi 24-42 godine. Zastupljenost muškaraca i žena je 13,8% : 86,2% .

Tablica 1. Prikaz bolesnica testiranih s HPV

Table 1. Patients tested with HPV

	2002.	2003.	2004.	Ukupno – Total
HPV-	10	12	11	33
HPV+	13	8	4	25
Ukupno – Total	23	20	15	58

1 od 23 bolesnica je imala cervikalni polip, 3 bolesnice imale su šiljate kondilome vulve, 7 njih CIN I (Papa-test), 6 CIN II, 3 CIN III, jedna CIS, a za 2 bolesnice rezultat Papa-testa nije bio dostupan.

Nakon što su svi uzorci fiksirani u formalinu i uklopljeni u parafin, podvrgnuti su retrogradno imunohistokemijskoj analizi s monoklonalnim mišjim antitijelom p-16<sup>INK4a</sup> (DAKO Cytomation, Danska) nakon demaskiranja antigena i vizualizacijskim sustavom EnVision TM.

Rezultati imunohistološke analize prikazani su semikvantitativnom metodom od 0-3.

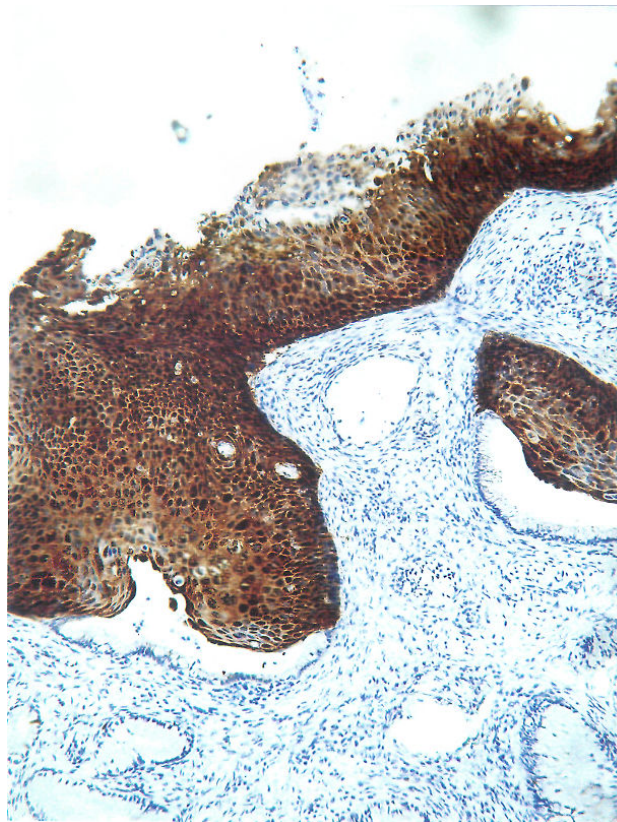
### Rezultati

3 bolesnice s prethodno negativnim HPV i CIN I (citološki) imale su negativnu imunohistokemijsku reakciju na bojenje s p-16<sup>INK4a</sup>, dok su ostale 4 s CIN I, ali pozitivnim HPV imale fokalno pozitivnu reakciju u jezgri i citoplazmi epitelnih stanica, nakon bojanja s p-16. (Slika 1.)

Od 6 bolesnica s cervikalnom displazijom stupnja II, 3 su bile HPV negativne, dok je jedna bolesnica imala fokalno slabu reaktivnost na p-16 u citoplazmi. Preostale 3 bolesnice koje su bile pozitivne na HPV pokazale su pozitivnu imunohistokemijsku reakciju na bojenje s p-16, od čega 2 jakog intenziteta.

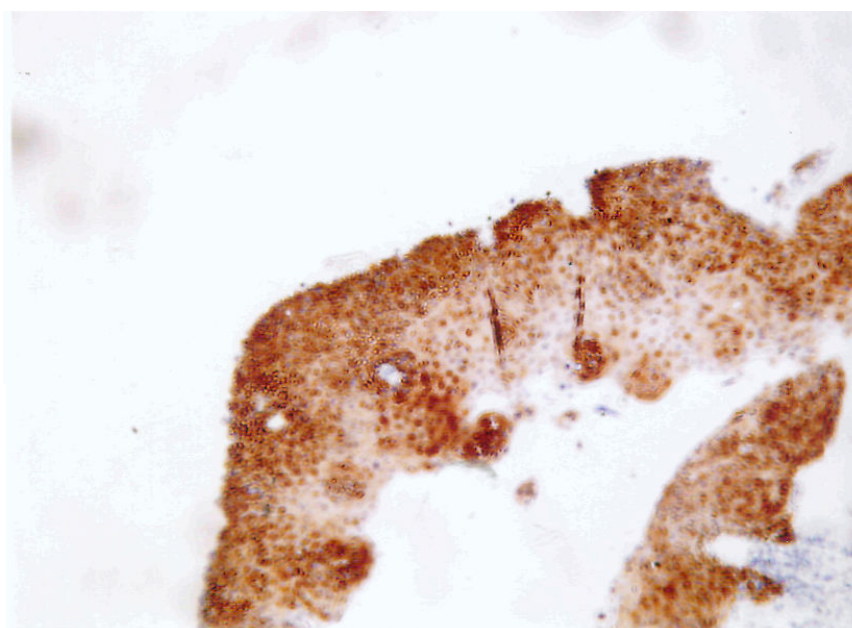
1 od 3 bolesnice s pozitivnim HPV i cervikalnom displazijom stupnja III nije pokazala pozitivnu reakciju na bojenje s p-16, a kod druge dvije bolesnice reakcija je bila ravnomjerno i intenzivno pozitivna.

Bolesnica s cervikalnim intraepitelnim karcinomom (CIS-citološki) i pozitivnim HPV imala je jako pozitivnu imunohistokemijsku reakciju. (Slika 2.)



Slika 1. CIN I (HPV +, p-16<sup>INK4a</sup> fokalno pozitivan u citoplazmi i jezgrama epitelnih stanica; x 200)

*Picture 1. CIN I (HPV +, p-16<sup>INK4a</sup> focally positive in the cytoplasm and nuclei of epithelial cells; x 200 )*



Slika 2. CIS (HPV +, p-16<sup>INK4a</sup> difuzno pozitivan u citoplazmi i jezgrama epitelnih stanica ; x 200)

*Picture 2. CIS (HPV +, p-16<sup>INK4a</sup> diffuse positive reaction in the cytoplasm and nuclei of epithelial cells; x 200 )*

Od dvije bolesnice s nepoznatim rezultatom Papatesta, jednoj je patohistološki dijagnosticirana CIN I (HPV negativan), a drugoj CIN III stupnja na konizatu, dok je reakcija na p-16 bila fokalno pozitivna u citoplazmi epitelnih stanica (Tablica 2. i 3.).

Tablica 2. p-16<sup>INK4a</sup> testirane bolesnice  
Table 2. p-16<sup>INK4a</sup> tested patients

	2002.	2003.	2004.	Ukupno – Total
p-16 <sup>INK4a</sup> -	1	3	6	10
p-16 <sup>INK4a</sup> +	4		3	7
p-16 <sup>INK4a</sup> ++	1			1
p-16 <sup>INK4a</sup> +++	1	6	1	8
Nepoznato – Unknown		1	2	3

Tablica 3 . Usporedni prikaz rezultata HPV, p-16<sup>INK4a</sup> i patohistološke dijagnoze  
Table 3. Comparison of HPV, p-16<sup>INK4a</sup> and PHD

	p-16 -	p-16+	p-16++	p-16+++	PHD
HPV-	1 1 1 1 1 1	1 1	1		Polypus c. CIN I CIN II condyl. CIN II CIN I CIN I CIN I condyl.
HPV+	1 1 1 1 1	1 1 1 1 1		1 1 fokalno – focally 1 fokalno – focally 1	- CIN I CIN II - CIN I CIN III - CIN I CIN I - - condyl. CIN III CIN III - - CIN II CIN II CIN II CIS - - CIN III

## Diskusija

HPV negativne bolesnice imale su dijagnozu: cervikalnog polipa (1), šiljate kondilome bez atipije (3), CIN I (4), te CIN II (3). HPV pozitivne bolesnice imale su patohistološku dijagnozu: CIN I (4), CIN II (3), CIN III (4), te CIS (1).

Među p-16 reaktivnim bolesnicama, fokalnu raspodjelu imunoreaktivnosti pokazale su njih 5 od 7 s CIN I, 4 od 6 s CIN II, od toga 2 fokalnu, 2 jakog intenziteta. Najzanimljiviji su rezultati kod CIN III: 1 od 4 bolesnice pokazala je fokalnu reakciju, 2 od 4 jaku reakciju, a 1 je bila negativna.

Prema očekivanju, bolesnica s CIS je imala i jaku difuznu reakciju u citoplazmi i jezgrama epitelnih stanica.

Iz rezultata je vidljivo da je HPV identificiran u svih bolesnica s CIN III, a p-16<sup>INK4a</sup> u svim stupnjevima displazije i klinički evidentnog karcinoma. Stoga ova dva pokazatelja svakako treba koristiti u preventivnim screening-programima, uz ostale do sada poznate metode (Papa-test), jer omogućuju brzo, jednostavno i sigurno dokazivanje stupnja displazije, kao i u onim slučajevima kada zbog infekcije visokorizičnim tipom virusa treba reagirati promptno adekvatnim odabirom terapijskog protokola liječenja.<sup>5,6,7</sup>

## Literatura

1. Murphy N, Ring M, Killalea AG, Uhlmann V, O'Donovan M, Mulcahy et al. p-16<sup>INK4a</sup> as a marker for cervical dyskariosis: CIN and cGIN in cervical biopsies and ThinPrep smears. *J Clin Pathol.* 2003;56:56-63.
2. Bosch FX, Lorincz A, Munoz N, Meijer CJ, Shah KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol.* 2002;55:244-65
3. Wallboomers JM, Jacobs MVV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathology.* 1999;189:12-19.
4. Branca M, Ciotti M, Santini D, Di Bonito L, Giorgi C, Benedetto A et al. p-16INK4 expression is related to grade of CIN and high-risk human papillomavirus but does not predict virus clearance after conisation or diseases outcome. *International Journal of Gynaecological Pathology.* 2004;23:354-65.
5. Sano T, Oyama T, Kashiwabara K et al. Expression status of p-16 protein is associated with human papillomavirus oncogenetic potential in cervical and genital lesions. *Am J Pathol.* 1998;153:1741-8
6. Klaes R, Benner A, Friedrich T, Friderich T, Herrington S, Jenkins D et al. p-16<sup>INK4a</sup> immunohistochemistry improver interobserver agreement in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Surg Pathol.* 2002, 26:1389-99.
7. Negri G, Egarter-Vigl E, Kasal A, Romano F, Haitel A, Mian C. p-16<sup>INK4a</sup> is a useful marker for the diagnosis of the cervix uteri and its precursors: an immunohistological study with immunocytochemical correlations. *Am J Surg Pathol.* 2003;27:187-93