VÝZNAM IMUNOHISTOCHEMICKÉHO VYŠETŘENÍ U PREKANCERÓZ DĚLOŽNÍHO ČÍPKU

Importance of immunohistochemical examination in cervical precanceroses

Jana Vaculová, Jaroslav Horáček, Petra Bystroňová

IX: 1 - 211, 2007
ISSN 1212-4117

Ostravská univerzita, Zdravotně sociální fakulta, Ústav patologické anatomie

Summary

Problems of cervical dysplasias and neoplasias are a frequently discussed topic at health and social levels. Cervical carcinoma is the second most important cause of the death due to cancer diseases in women next to the mammary carcinoma throughout the world and the main cause of the death for cancer diseases in women living in developing countries. The origination of cervical carcinoma is a complex multi-step process preceded by a many-year stage of precanceroses of different degrees of their severity. The precancerous cervical lesions are mostly asymptomatic and their presence can be revealed by the cytological or histological examination only. The purpose of the present work was to contribute to the diagnostics of cervical precancerous lesions with the help of the application of immunohistochemical methods to bioptic material. A group of 60 women with diagnosis of cervical precancerosis was monitored (dysplasia, carcinoma in situ). The histopathological diagnosis was established after standard processing of bioptic material through the histological technique based on histological mounts stained by basic histological methods of staining. Selected samples were subjected to immunohistochemical methods with following and comparing the expression of protein p16, protein p53 and proliferation markers Ki-67 and PCNA. We expected a correlation of the proliferation activity with the degree of dysplastic changes. The dysplastic changes exert deviations in the structure of the nucleus and cytoplasm and cellular restlessness (elevated proliferation activity), visible even in basic histological staining. The immunohistochemical detection of proliferation markers corresponded to the degree of precancerosis in almost all the cases. The intensity of the protein p16 expression also correlated with the degree of the dysplasia and the detection of protein p53 was not statistically significant. The results indicate that the immunohistochemical examination of proliferation markers and protein p16 can help refine the diagnostics of precursor lesions of cervical carcinoma. The use of at least one of the proliferation markers and protein p16 can be helpful in the diagnostics of minor punch biopsies and mainly in the assessment of resection margins of conizates, which can encounter difficulties in basic histological staining.

Key words: Cervix – dysplasia – diagnostics – immunohistochemistry

Souhrn

Problematika dysplazií a neoplazií děložního čípku je často diskutovaným tématem na úrovni zdravotní i společenské. Karcinom děložního čípku je celosvětově druhou nejdůležitější příčinou úmrtí na nádorová onemocnění u žen po karcinomu prsu a hlavní příčinou úmrtí na nádorová onemocnění u žen v rozvojových zemích. Vznik karcinomu děložního čípku je komplexní víceetapový proces, kterému předchází dlouholeté stadium prekancerózy s různým stupněm závažnosti. Prekancerózní léze děložního čípku jsou ve většině případů bezpříznakové a jejich přítomnost lze odhalit pouze cytologickým či histologickým vyšetřením. Cílem této práce bylo přispět k diagnostice cervikálních prekancerózních lézí pomocí aplikace imunohistochemických metod v bioptickém materiálu. Byl sledován soubor 60 žen s diagnózou prekancerózy děložního čípku (dysplazie, carcinoma in situ). Histopatologická diagnóza byla stanovena po standardním zpracování bioptického materiálu histologickou technikou z preparátů, barvených základním histologickým barvením. Na vybrané vzorky

byly aplikovány imunohistochemické metody se sledováním a srovnáním exprese proteinu p16, proteinu p53 a proliferačních markerů Ki-67 a PCNA. Očekávali jsme, že proliferační aktivita bude korelovat se stupněm dysplastických změn. Dysplastické změny vykazují odchylky struktury jádra, cytoplazmy a buněčný neklid (zvýšená proliferační aktivita) viditelné i v základním histologickém barvení. Imunohistochemická detekce proliferačních markerů odpovídala téměř ve všech případech stanovenému stupni prekancerózy. Síla exprese proteinu p16 také korelovala se stupněm dysplazie a detekce proteinu p53 se neprojevila jako statisticky významná. Z výsledků vyplývá, že imunohistochemická vyšetření proliferačních markerů a proteinu p16 mohou upřesnit diagnostiku prekursorových lézí karcinomu děložního čípku. Aplikace alespoň jednoho z proliferačních markerů a proteinu p16 může pomoci při diagnostice drobných punch biopsií a především při hodnocení resekčních okrajů konizátů, které mohou být v základním histologickém barvení obtížně hodnotitelné.

Klíčová slova: děložní čípek – dysplazie – diagnostika – imunohistochemie

ÚVOD

Podle WHO je ve světě diagnostikováno téměř 500 000 nových případů, z nichž více než 270 000 končí smrtelně. Incidence karcinomu děložního čípku v České republice představuje čtyřnásobek incidence ve skandinávských zemích a dvojnásobek incidence v zemích EU. U nás je toto onemocnění každoročně diagnostikováno u více než 1000 žen, z nichž asi 400 této nemoci podlehnou. Nejvyšší incidence karcinomu děložního čípku se zjišťuje v rozvojových zemích. Důvodem je nedostupnost cytologického screeningu v těchto zemích. Úspěšné provádění této formy sekundární prevence vede k poklesu incidence (o 80 %) i mortality (Kohl, 2006). I přes efektivní realizaci screeningu může dojít k infekci vysoce rizikovými typy lidských papilomavirů (HPV). Perzistence onkogenních typů HPV je rozhodujícím momentem cervikální kancerogeneze. Úspěch v prevenci se očekává od zavedení vakcíny Silgard, která je nejlepší možností primární prevence proti HPV infekci (Zdravotnické noviny, 2007). Vzniku karcinomu děložního čípku předchází dlouholeté stadium prekancerózy, která může být efektivním screeningem včas odhalena. Samotná kancerogeneze, vázaná na zdravý epitel, je složitý mnohastupňový proces, zahrnující řadu genetických změn buněčné struktury. Prognóza onemocnění závisí na mnoha faktorech, z nichž důležitou skupinu tvoří imunohistochemická detekce onkogenů, tumor-supresorových genů a proliferačních markerů. Za fyziologických podmínek existuje ve tkáních dospělého jedince kontrolovaná rovnováha mezi apoptózou a proliferací. Při ztrátě kontroly buněčného dělení může docházet k dysplastickým změnám vedoucím ke vzniku karcinomu. Hlavními příčinami poruch buněč-

ného cyklu jsou změny buněčných genů, onkogenů a antionkogenů odpovídající mutaci či inaktivaci (Kolář, 2004). Stanovení vybraných markerů v biotickém materiálu přispívá ke snížení obtížnosti diagnostiky prekancerózních lézí na děložním čípku.

MATERIÁL A METODIKA

Soubor tvořilo 60 pacientek ve věkovém rozmezí 23-75 let s histopatologickou diagnózou dysplazie (I., II., III. stupeň) a preinvasivního karcinomu (carcinoma in situ). Věkové rozmezí vybraných pacientek udává tab. 1. Studované vzorky byly získány z diagnostických excizi a konizátů děložního čípku. Tkáňový materiál byl zpracován standardní histologickou technikou a všechny vzorky nabarveny základním histologickým barvením hematoxylin – eozin (HE). Na vybraných parafrinových blocích bylo po stanovení diagnózy u každého případu provedeno vyšetření proliferačních markerů Ki-67, PCNA, proteinu p16 a proteinu p53. Detekce vybraných markerů byla provedena standardní dvojstupňovou imunohistochemickou metodou s použitím protilátek fy DAKO.

Charakteristika použitých imunomarkerů

Protilátka Ki-67 je dobrým nástrojem k identifikaci proliferující subpopulace buněk. Ve fyziologicky proliferujících buňkách bývá protilátka proti Ki-67 přítomna vždy (např. nezralé hemopoetické prekursorové buňky kostní dřeně, bazální dlaždicový epitel, lymfocyty zárodečného centra, kortikální lymfocyty). U řady maligních onemocnění je imunohistochemická detekce protilátky Ki-67 používána k hodnocení proliferační aktivity tumoru (Dabbs, 2001; Scholzen, 2000).

PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) je jaderný protein, jehož exprese závisí na mitotické aktivitě buňky. Jeho hladina je v klidových buňkách prakticky zanedbatelná, ale v průběhu buněčného cyklu narůstá. Protilátka reaguje s proliferujícími buňkami celé řady normálních, aktivně proliferujících tkání. Pozitivní reakce je pozorována např. v bazální vrstvě vrstevnatého dlaždicového epitelu, u většiny buněk vlasové cibulky, v proliferujících úsecích sliznice žaludku, tenkého a tlustého střeva a buněk zárodečných center lymfatické tkáně. Pozitivní výsledky přispívají také v hodnocení proliferací aktivity nádorových lézí (Dabbs, 2001).

Protein p16 je produktem tumor supresorového genu a uplatňuje se při regulaci buněčného cyklu. Jeho nadprodukce se objevuje zvláště v souvislosti s high-risk HPV infekcí. Zvýšená exprese proteinu p16 je pravděpodobně zahájena produkcí virových onkoproteinů E6 a E7, které deaktivují tumor supresorický gen p53 a pRB v hostitelských buňkách. Tyto změny jsou zodpovědné za transformaci a mortalitu keratinocytů (Masumoto, 2003; Mikýšková, 2003; Tripathi, 2003). Kvantita exprese proteinu p16 stupňovitě koreluje se stupněm dysplazie malignity děložního čípku. V normální tkáni dosud nebyla přítomnost proteinu p16 zjištěna, z čehož vyplývá význam v diferenciální diagnostice (Rotterová, 2003; Rotterová, 2005). K výrazné expresi p16 dochází zejména ve skvamózních karcinomech. U karcinomu děložního čípku byla popsána jeho výrazná jaderná i cytoplazmatická exprese (Negri, 20003). Stanovení exprese proteinu p16 vede k lepší identifikaci malých lézí prekancerózního charakteru nebo karcinomů. Negativitu nebo částečnou pozitivitu lze očekávat v případech reaktivních změn epitelu, v regeneračních a metaplastických změnách, v mikroglandulární hyperplazii, ale i v normálním epitelu (Horáček, 2004).

Protein p53 patří mezi typické nádorové supresory – antionkogeny, jejichž základní funkcí je udržování integrity genetické informace a potlačování vzniku maligního fenotypu buňky. Ztráta a inaktivace tohoto proteinu přispívá ke vzniku nádorového onemocnění. Vzhledem k širokému spektru protinádorových účinků proteinu p53 v různých tkáních tak existuje celá řada mechanismů vedoucích k jeho inaktivaci. Vysoká hladina proteinu p53 v buňce je známkou jeho inaktivace a stabilizace nebo důsled-

kem jeho nefunkčnosti (Müller, 2004). V normálních buňkách lidské tkáně (kůže, mozek, ledviny, plíce, žaludek, mléčná žláza) je hladina proteinu p53 zanedbatelná. Zvýšenou expresi proteinu p53 lze očekávat ve 22-78 % malignit, např. karcinom tlustého střeva, žaludku, močového měchýře, prsu, plic, varlete, melanom a sarkom (Rejthar, 2003).

VÝSLEDKY

Z vyšetřovaného materiálu bylo zpracováno a zhodnoceno celkem 60 preparátů v základním barvení hematoxylin-eozin a 240 imunohistochemických preparátů s metodami průkazu Ki-67, PCNA, p16 a p53.

U skupiny 18 žen s lehkou dysplazií nebyla ani v jednom případě prokázána exprese proteinu p53. Pozitivita proteinu p16 jako nepřímého ukazatele HPV infekce byla sledována ve 4 případech s různým stupněm exprese. Pozitivita proliferčních markerů byla shledána v 16 případech v rozsahu 1/3 bazální epitelové vrstvy (obr. 1). Pouze ve 2 případech dosahovala pozitivita PCNA až do 2/3 epitelové vrstvy.

U 16 případů střední dysplazie byla ve 2 případech zjištěna pozitivita proteinu p53. Vzhledem k literárním údajům a charakteru léze však nelze vyloučit, že šlo o falešně pozitivní výsledek. Proliferační markery Ki-67 (obr. 2), PCNA a protein p16 vykazovaly pozitivitu ve většině případů až do 2/3 epitelové vrstvy. Ve 2 případech byla exprese proteinu p16 prokázána v celé šíři epitelu.

Z vyšetřených 15 případů těžké dysplazie byla ve 2 preparátech zjištěna přítomnost proteinu p53 (v 1/3 a 2/3 epitelové vrstvy). Expres proteinu p16 byla ve většině případů přítomna ve 2/3 epitelové vrstvy (obr. 3), pouze ve 2 případech nebyla přítomnost proteinu p16 zjištěna. Proliferační markery vykazovaly pozitivní zbarvení ve všech případech, v 7 z nich byla proliferací aktivita nalezena v celé šíři epitelu (obr. 4).

V 9 případech carcinoma in situ byl protein p53 hodnocen jedenkrát jako pozitivní. Proliferační markery byly pozitivní v místech fyziologické růstové aktivity v bazální vrstvě epitelu. V 5 případech byla proliferace zjištěna v celé šíři epitelu, v 1 případě byla pozitivita proliferčních markerů prokázána pouze v 1/3 epitelové vrstvy. Protein p16 byl pozitivní u všech případů carcinoma in situ.

HODNOCENÍ VÝSLEDKŮ

Pro běžné hodnocení dysplastických, případně neoplastických změn se používá základní histologické barvení hematoxylin-eozin (HE), kde je stupeň dysplazie vyjádřen odchylkami vázanými na strukturu jádra a cytoplazmy s užitím cytologických kritérií. Z literárních údajů je známo, že v mnohých případech může být toto hodnocení nepřesné. Z tohoto důvodu jsou zaváděny citlivější metody zpracování tkáně, které mohou významně zpřesnit biologickou povahu lézí. K bližšímu vyjádření potencionálních neoplastických změn jsou v praxi používány metody molekulárně biologické a imunochemické.

Námi použité imunohistochemické metody vyjadřují strukturální změny v souvislosti se změnami fázi buněčného cyklu a jejich povaha koreluje s biologickou aktivitou dysplastických změn.

Hodnocení stupně dysplastické léze vycházelo z celulárních změn, včetně mitóz, které jsou u dysplazie I. stupně přítomny v bazální třetině epitelu, v bazální a střední vrstvě epitelu u dysplazie II. stupně a ve všech třech vrstvách u dysplazie III. stupně. U carcinoma in situ, vedle mitóz, dochází ke ztrátě stratifikace epitelu v povrchové vrstvě. Podle výše uvedených změn byly hodnoceny preparáty barvené HE.

Ve většině případů s lehkou dysplazií byla shledána korelace preparátů barvených HE a imunohistochemickými metodami. Pouze ve 2 případech při stanovení markeru PCNA přesahovala jeho pozitivita obraz lehké dysplazie. Expres proteinu p16 výrazněji překročila normu obvyklou pro lehký stupeň dysplazie. Obdobné korelace v základním a imunohistochemickém barvení přicházely ve skupině s dysplazií střední. Přínos imunohistochemického vyšetření byl zvláště významný u dysplazie těžké a carcinoma in situ. V těchto skupinách byly shledány odchylky použitých imunohistochemických markerů s barvením HE. Expres proteinu p16 převažovala ve středním i těžkém stupni dysplazie a u carcinoma in situ. Expres proteinu p53 byla statisticky nevýznamná.

ZÁVĚR

Práce ukázala, že v případech hodnocení nálezů zkušeným histopatologem je možno určit stupeň dysplazie v základním barvení hematoxylin-eozin. V případech, které jsou tvořeny drobnými odběry (punch biopsie), a při hodnocení resekč-

ních okrajů konizátu, je pro obtížnost interpretace žádoucí použít vedle základního barvení také výše uvedené imunohistochemické metody. Z praxe dále vyplývá význam použití imunohistochemických metod v případech, kde dysplazie vychází z nezralých metaplastických změn a hyperplastických procesů vázaných na rezervní buňky.

LITERATURA

- DABBS D, J.: *Diagnostic Immunohistochemistry*. Churchill Livingstone: Philadelphia, 2001.
- HORÁČEK, J. et al.: Hodnocení exprese p16 v diagnostice neoplazií děložního čípku. In: *Sborník, 12. sjezd Slovenské a České společnosti patológů s mezinárodní účastí*, Bratislava, 2004.
- KOHL, I.: Lidský papilomavirus a karcinom čípku děložního: „Vakcíny proti lidskému papilomaviru – příslib účinné prevence“. *Klin mikrobiol inf lék*, 2006. Vol. 12, s. 91-97.
- KOLÁŘ, Z.: Základní poznatky o molekulárních mechanismech vývoje některých epitelových solidních mesenchymových a neuroektodermových nádorů. *Klinická onkologie*, 2004. Vol 3, s. 77-84.
- MASUMOTO, N. et al.: P16^{INK4a} Overexpression and Human Papillomavirus Infection in Small Cell Carcinoma of the Uterine Cervix. *Hum Pathol*, 2003. Vol. 34, s. 778-783.
- MIKYŠKOVÁ, I. et al.: Lidské papilomaviry jako příčina vzniku gynekologických onemocnění. *Praktická gynekologie*, 2003. Vol. 4, s. 33-35.
- MÜLLER, P. et al.: Význam strategie p53 a jeho mutací pro nové strategie léčby nádorových onemocnění. *Casopis českých lékařů*, 2004. Vol. 143, s. 313-317.
- NEGRI, G. et al.: P16 INK4a is Useful Marker for the Diagnosis of Adenocarcinoma of the Cervix Uteri and its Precursors. *Am J Surg Pathol*, 2003. Vol. 2, s. 187-193.
- REJTHAR, A. et al.: P53 homologní proteiny: jedna genová rodina – rozdílné funkce? Jejich exprese je alterována při přechodu z prekancerózy do invazivního spinocelulárního karcinomu. *Klinická onkologie*, 2003. Vol. 16, s. 54-59.
- ROTTEROVÁ, P. et al.: Expres p16^{INK4A} v dysplaziích a nádorech děložního čípku. *Klinická onkologie*, 2003. Vol. 16, s. 249-252.
- ROTTEROVÁ, P. et al.: Stanovení proteinu p16 u lézí děložního hrdla. *Čes. Gynek*, 2005. Vol. 70, s. 295-298.
- SCHOLZEN, T., GERDES, J.: The Ki-67 Protein: from the Known and the Unknown. *J Cell Physiol*, 2000. Vol. 182, s. 311-322.
- TRIPATHI, A. et al.: Alterations of the P16 Gene in Uterine Cervical Carcinoma from Indian Patients. *Int J gynecol cancer*, 2003. Vol. 13, s. 472-479.
- VÁŇOVÁ, J.: *Diagnostika prekanceróz děložního čípku ve vztahu k HPV infekci*. Diplomová práce, 2006, Ostrava.
- Zdravotnické noviny 2007: Souhrn údajů o přípravku Silgard. *Zdravotnické noviny*. Vol. 9, s. 8-9.

- Tato práce vznikla za podpory grantového projektu IGS OU č. 1061/2007.

(Příloha na další str.)

PŘÍLOHY

Tab. 1: Věkové rozložení pacientek

Věková skupina	Počet případů			
	Lehká dysplazie	Střední dysplazie	Těžká dysplazie	CIS
20 – 30	4	7	6	4
31 – 40	6	6	6	2
41 – 50	6	2	0	2
51 – 60	0	1	3	0
61 – 70	2	0	0	0
71 - 80	0	0	0	1
	18	16	15	9

Obr. 1: Lehká dysplazie, pozitivita Ki-67, 200x

Obr. 2: Střední dysplazie, pozitivita Ki-67, 200x

Obr. 3: Těžká dysplazie, pozitivita p16, 200x

Obr. 4: Těžká dysplazie, pozitivita Ki-67, 200x

Jana Vaculová, Jaroslav Horáček, Petra Bystroňová
jana.vaculova@osu.cz