

ЕКСПРЕСИЈА ПРОТЕИНА P16 INK4A У ПРОМИЈЕЊЕНИМ ЂЕЛИЈАМА ЕПИТЕЛА ГРЛИЋА МАТЕРИЦЕ КОД ЖЕНА

¹Наташа Војиновић, ¹Смиљана Параш, ²Радослав Гајанин, ¹Живојин Ерић

¹Природно-математички факултет Универзитета у Бањој Луци

²Завод за патологију Клиничко болничког центра Бања Лука

Abstract

VOJINOVIĆ, Nataša, Smiljana PARAŠ, R. GAJANIN, Ž. ERIC : EXPRESSION OF PROTEIN p16 INK4a IN THE CHANGED CERVICAL EPITHELIUM CELLS IN UTERUS WOMEN. [Faculty of Natural Sciences and Mathematics of Banja Luka University, Clinical Hospital Centre, Department of Pathology Banja Luka]

Protein p16 is the product of the INK4a gene, which binds to CDK4 competitive and prevents the realization of complexes of cyclin D and thus controls phosphorylation Rb protein and DNA replication. This inhibitor of cyclin-dependent kinase shows an expressed expression in cervical cancerous and making it an ideal candidate to be used as a marker for the disease. Purpose of this study was to analyze and compare the p16 protein expression in changes squamous epithelium in uterus CIN II, CIN III and CIS degree. Increased expression of p16 protein may indicate the existence of the potential progression and recurrently, and facilitate the planning of optimal diagnostic and therapeutic protocols, and later follow-up patients.

Key words: cervix, carcinoma, p16 protein

Сажетак

Протеин p16 је продукт INK4a гена који се компетитивно везује за CDK4 и онемогућава остваривање комплекса са циклином D и на тај начин контролише фосфорилацију Rb протеина и репликацију ДНК. Овај инхибитор циклин-зависне киназе показује изражену експресију у преканцерогеним и канцерогеним стањима грлића материце, чинећи га идеалним кандидатом који би се користио као маркер за ту болест. У раду је извршена анализа и поређење експресије p16 протеина у сквамозном епителу глића материце са промјенама CIN II, CIN III и CIS степена. Повећана експресија p16 протеина може да укаже на постојање потенцијала прогресије и рекуренције, и омогући планирање оптималног дијагностичког и терапијског протокола, као и касније праћење пацијенкиња.

Кључне ријечи: грлић материце, карцином, p16 протеин

УВОД

Карцином грлића материце био је донедавно водећи узрок смрти од карцинома код жена, док је данас на другом мјесту последице карцинома дојке. Тачних података о обољелим и умрлим женама у Босни и Херцеговини нема, али се сврстава међу најугроженије европске земље са стопом од осам умрлих на 100 000 жена (Младеновић и сар., 2005).

Карцином грлића материце настаје прогресијом серије пролиферативних неопластичних промјена сквамозног цервикалног епитела које су назване цервикална

интраепителијална неоплазија (CIN). Термин карцином грлића материце заправо подразумева широк низ лезија које иду од карцинома *in situ*, што значи локализован, преко микрокарцинома, до инвазивног карцинома (Анђелковић и сар., 2001). Карцином *in situ* чини добро издвојен морфолошки и клинички ентитет, па га треба посматрати одвојено од инвазивног карцинома. Процес карциногенезе може да се заустави у преинвазивној фази, тако да патохистолошка дијагноза карцинома *in situ* значи само морфолошки карцином, који би могао да постане и стварни, биолошки карцином, ако пређе у фазу инвазивног раста (Савјак, 2007; Милин, 2000).

Карцином *in situ* грлића материце има највећу учесталост у трећој декади живота са максимумом све до четврте декаде. Пада прогресивно након 40. године и заправо не постоји након 60. године. Инвазивни карцином има максималну инциденцију у четвртој и петој деценији живота, а пада након 65. године (Медина, 2005).

Узрок смањене инциденције и смртности лежи у успјешној раној дијагностици примјеном *skrinin* Рараниколау цитолошког теста, познатијег као PAPA тест. Упркос евидентном успјеху, овај тест даје у одређеном проценту лажно позитивне или лажно негативне резултате, па је због тога пожељно допуњавати дијагностичке процедуре. Из тог разлога се данас све више у дијагностичке сврхе користе имуноцитохемијске методе. Могућност коришћења специфичних моноклоналних антитјела (At) која су усмјерена ка идентификацији ћелија, њихових површинских маркера или ћелијских продуката, у знатној мјери могу да помогну у дијагностици малигнух тумора (Атанацковић и сар., 2003).

Карцином је генетска болест јер представља оштећење једног или више гена, а ова оштећења гена су код карцинома увек присутна, било да се ради о онкогенима или тумор-супресор генима. Њихова активација настала је као резултат тачкастих мутација, повећаног броја генских копија, делеција или прекида хромозома доводи до перманентне ћелијске диобе (Анђелковић и сар., 2002). Откриће улоге коју играју онкогени и тумор-супресор гени у настанку и прогресији бројних малигнух тумора отворили су могућност за испитивање њиховог коришћења као фактора прогнозе туморског понашања. Потребно је напоменути да у овом тренутку већина ових анализа има ограничену употребну вриједност у дијагностичке сврхе и да се многе посматрају као истраживачке процедуре. Бројни нови туморски маркери су испитивани и дају различите и квалитетне резултате тако да је њихова рутинска примјена све већа (Миленковић, 2003; Атанацковић и сар., 2003).

Када је у питању дијагностичка процедура преканцерогених и канцерогених стања грлића материце код жена, посебан акценат ставља се на изражену експресију p16 протеина као идеалног кандидата који би се користрио као тумор маркер. Протеин p16 је продукт INK4a (inhibitor of CDK4-INK4) тумор-супресор гена који испољава негативну контролу на ћелијску пролиферацију (Миленковић, 2003).

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

Испитивање је обухватило 59 пацијенткиња старосне доби од 20 до 62 године које су се у току 2007. године јавиле по препоруци гинеколога на Гинеколошку клинику Клинички болничког центра (КБЦ) Бања Лука да би им се извршила биопсија грлића материце. Биоптички узорци су послати на Завод за Патологију исте установе на патохистолошки преглед како би се утврдило постојање и ниво промјена у плочастослојевитом епителу цервикалног ткива. С обзиром на познату чињеницу да се експресија протеина p16 повећава у неопластичним-преканцерогеним стањима сви биоптички узорци су подвргнути анализи у односу на његову експресију. У ту сврху је у Заводу за Патологију КБЦ Бања Лука спроведена стандардна обрада материјала за рутинску патохистолошку дијагностику, а потом и методом имуноцитохемијске

детекције антигена детерминације протеина p16. Биоптички узорци су узимани из зоне трансформације и егзоцервикса. У цјелини су фиксирани у 10% формалину, процесирани по стандардном протоколу у аутоматском процесору и калупљени у парафину. Парафински калупи су сјечени на клизном микротону на танке резове дебљине 4-6 μm и лијепљени на стаклене плочице. Резови су депарафинисани, дехидрирани и бојени стандардном бојом хематоксилин еозин (ХЕ).

Свјетлосномикроскопским прегледом ХЕ препарата дијагностиковане су упалне промјене и цервикалне интраепителијалне неоплазије. Након тога исти узорци су подвргнути имунохистохемијском протоколу идентификације експресије p16. На крају истраживања сви резултати су статистички (ANOVA програм) обрађени и представљени. Процјена нивоа експресије p16 протеина у ткиву цервикса вршена је свјетлосно-микроскопски семиквантитативном методом одређивања процената позитивних ћелија према укупном броју ћелија на 10 видних поља великог увећања. За позитивност ћелија узета је у обзир велика јачина једарног и цитоплазматског бојења, односно веће присуство специфичне смеђе боје као и њен интензитет у посматраним ћелијама. Остале ћелије које нису узимане у обзир и нису одређиване имале су плавољубичасту боју. На основу овога специјалиста патолог извршио је бодовање тј. одређивање скорa (збира) позитивних, смеђих ћелија и према њему узорке подјелио у четири групе:

1. скор 0 : мање од 1% позитивних ћелија, које су интезивно смеђе обојене,
2. скор 1 : 1-50% позитивних ћелија,
3. скор 2 : 50-90% позитивних ћелија и
4. скор 3 : више од 90% позитивних ћелија.

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

Базирајући се на морфолошким критеријумима, специјалиста патолог је дијагностиковао ткива са значајним запаљенског процеса (Cervicitis chronica) и ткива са неопластичним епителом (CIN II, CIN III или CIS). Термин цервикална интраепителијална неоплазија уведен је у клиничку праксу са циљем да обједини континуитет процеса који се одвијају у епителу од најблажег до најтежег степена. Неоплазија грлића материце може да се јави у три степена у зависности од дебљине епитела који захватају атипичне ћелије (хиперхроматична јера, повећање односа једро цитоплазма ћелије). Ови степени означавају се као: CIN I- цервикалана интраепителијална неоплазија првог степена, кад је захваћена доња трећина епитела грлића материце (Миленковић, 2003); CIN II- цервикалана интраепителијална неоплазија другог степена, кад су захваћене доње 2/3 епитела грлића материце; CIN III- цервикалана интраепителијална неоплазија трећег степена, кад је захваћена читава дебљина епитела грлића материце, и CIS- *carcinoma in situ* стадијум. Резултати су били сљедећи: тридесет пацијенткиња је имало дијагнозу хроничног запаљенског процеса, осам пацијенткиња CIN II, десет пацијенткиња CIN III и 11 пацијенткиња CIS. Послије тога је извршена процјена нивоа експресије p16 протеина на основу скорa позитивних ћелија.

На графику 1 се уочава да су највећи проценат (63%) чиниле пацијенткиње старосне доби од 30 до 50 година, што је и било за очекивати с обзиром да жене те старосне доби спадају у најризичнију групу када је реч о канцерогеним обољењима. У табели 1 су приказани упоредо скор експресија p16 у односу на степен цервикалне неоплазије. У узорцима ткива од осам пацијенткиња са промјенама CIN II степена код пет пацијенткиња нађена је позитивна реакција на p16, и то двије пацијенткиње скор 1, код три скор 2, док у три случаја резултат је био негативан.

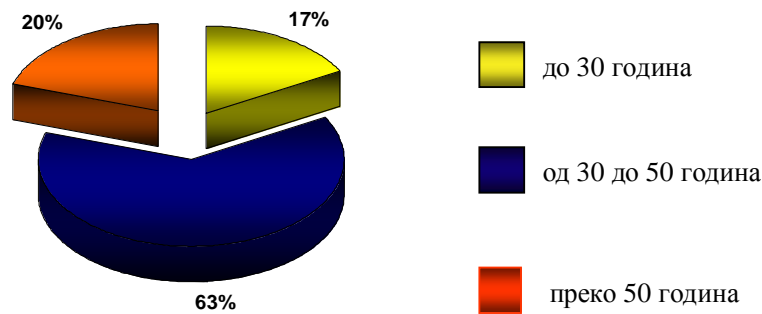


График 1. Дистрибуција пацијенткиња по старосним групама

Од десет пацијенткиња са диспластичним промјенама цервикса степена CIN III у њих осам нађена је повећана експресија испитиваног протеина p16: код по двије пацијенткиње скор 1 и скор 3, а код четири пацијенткиње утврђен је скор 2. Код двије пацијенткиње из ове групе анализа је показала негативну реакцију на p16. У групи од једанаест пацијенткиња са промјенама CIS степена повећана је експресија p16 протеина у девет случајева. Код једне пацијенткиње из ове групе нађен је скор 1, код двије скор 2, а код њих шест скор 3. У два случаја добијена је негативна реакција на p16.

Табела 1. Скор позитивности експресије p16 у односу на степен неопластичне промјене епитела

Степен цервикалне интраепителијалне неоплазије (CIN)	ПОЗИТИВАН			НЕГАТИВАН
	скор 3	скор 2	скор 1	скор 0
CIN II	0	3	2	3
CIN III	2	4	2	2
CIS	6	2	1	2

Из табеле 1 може се јасно уочити повезаност између експресије p16 протеина и степена цервикалне интраепителијалне неоплазије. Експресија протеина је већа са већим степеном CIN-а. За разлику од стадијума CIN II гдје није било експресије p16 протеина у скору 3, код CIN III степена јавља се експресија овог протеина у скору 3. Код CIS степена доста је повећана експресија p16 протеина у скору 3, гдје је и највећа и захвата више од пола пацијенткиња, а заступљеност у скору 2 и скору 1, иако смањена, такође је значајна. Овај раст броја случајева са повећаном експресијом p16 протеина као и већи број позитивних ћелија са порастом тежине неопластичних промјена сквамозног епитела грлића материце само указује на релативно рани поремећај функције регулаторних гена још у преинвазивним фазама канцерогенезе цервикса и могао би имати прогностички значај (Лешин, 2006; O'Leary и сар., 2004). Волгерова и сарадници (2004) из Института за онкологију у Москви, те Босић (2005) анализирали су p16 протеин као маркер неопластичних промјена грлића материце код жена. Њихови резултати указују на линеарно повећање експресије p16 протеина са степеном CIN-а, што се поклапа са нашим резултатима.

ЗАКЉУЧЦИ

На основу резултата добијених овим истраживањем узорака ткива грлића материце може се закључити следеће:

1. у лезијама типа цервикалне интраепителијалне неоплазије нађена је повећана експресија p16 протеина,

- учесталост појаве повећане експресије p16 протеина расте са порастом степена цервикалне интраепителијалне неоплазије,
- пораст експресије p16 протеина указује на рани поремећај у функцији регулаторних гена још у преинвазивним фазама карциногенезе цервикса и могао би имати прогностички значај,
- прогностички значај појављивања карцинома грлића материце битан је за одабир оптималног дијагностичког и терапијског протокола као и касније праћење пацијенткиња,
- превентиву карцинома грлића материце и очување општег здравља жена је могуће обавити на задовољавајућем нивоу у КБЦ Бања Лука.

ЛИТЕРАТУРА

- Анђелковић, З., Љ. Сомер, М. Матавуљ, В. Лачковић, Д. Лалошевић, И. Николић, З. Милосављевић, В. Даниловић (2002): Ћелија и ткива. БонаФидес, Ниш.
- Анђелковић, З., Љ. Сомер, М. Петровић, В. Аврамовић, Љ. Миленкова, Н. Коставска, А. Петровић (2001): Хистолошка грађа органа. БонаФидес.
- Атанацковић, М., Д. Бацетић, Г. Баста-Јовановић, А. Бегић-Јанева, И. Боричић, Д. Брашанац, Д. Цветковић-Дожић, С. Дижих, М. Хавелка-Ђуковић, В. Кањух, А. Лабан, С. Ластић-Малетић, Ј. Марковић-Липковски, С. Нешић, М. Оклобција, М. Опрић, М. Скендер-Газибара, З. Стојшић, С. Татић, Г. Туцаковић, Ј. Васиљевић, Д. Велимировић (2003): Патологија. Катедра за патолошку анатомију, Медицински факултет Универзитет у Београду.
- Босић, М. (2005): Експресија протеина p16 ћелијског циклуса у *in situ* и инвазивном планоцелуларном карциному коже. Медицински факултет, Универзитет у Београду.
- Волгерева, Г. (2004): Protein p16 as a marker of dysplastic and neoplastic alterations in cervical epithelial cells. Institute of Carcinogenesis, N. N. Blokhin Cancer Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russia.
- Лешин, Ј. (2006): Значење ангиогенезе и типа HPV-а за терапију и прогнезу инавазивног карцинома врата материце. Свеучилиште у Зребу, Медицински факултет, Загреб.
- Миленковић, П. (2003): Патолошка физиологија малигног раста ћелија. Медицински факултет, Универзитет у Београду.
- Медина, Ф. (2005): Медицински лексикон. Завод за издавање књига и уџбеника Земун.
- Младеновић, Д., З. Младеновић-Богдановић, А. Михајловић (2005): Гинекологија и акушерство. Завод за уџбенике и наставна средства, Београд.
- Милин, Ј., Г. Грубор-Лајшин, В. Тодоровић, Г. Ранчић, Г. Микаћ, И. Николић (2000): Хистологија. Ортомедикс, Нови Сад.
- O'Leary, J., N. Murphy, M. Ring, B. C. Heffron, B. King, C. Killalea, C. Higgs, C. M. Martin, E. McGuinness, O. Sheils (2004): p16 INK 4a, CDC6 and MCM5 predictive biomarkers in cervical preinvasive neoplasia and cervical cancer. Department of Pathology Coombe Women's Hospital, Dublin 8, Ireland.
- Савјак, Д. (2007): Појмовник клиничке патоморфологије. Обод, Цетиње.

Примљено: 29. 12. 2010.

Одобрено: 19. 07. 2011.