

SEMMELWEIS EGYETEM
DOKTORI ISKOLA

Ph.D. értekezések

2384.

GALAMB ÁDÁM SÁNDOR

Hormonális szabályozó mechanizmusok
című program

Programvezető: Dr. Igaz Péter, egyetemi tanár
Témavezető: Dr. Sobel Gábor, egyetemi docens

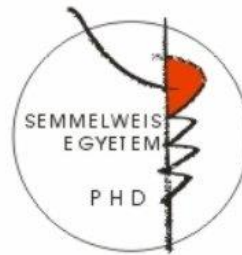
A méhnyakrák és premalignus elváltozásai diagnosztikájának újabb módszerei

Doktori értekezés

Dr. Galamb Ádám Sándor

Semmelweis Egyetem

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Sobel Gábor, Ph.D, egyetemi docens

Hivatalos bírálók: Dr. Novák Zoltán, Ph.D, főorvos
Dr. Szánthó András, Ph.D, egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Kulka Janina, PhD, egyetemi tanár
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Nagy Gyula Richárd, PhD,
egyetemi adjunktus
Dr. Vajda Katalin, PhD, főorvos

Budapest
2020

TARTALOMJEGYZÉK

Rövidítések jegyzéke.....	4
1. Bevezetés.....	7
1.1. A méhnyakrák epidemiológiája, a szűrés jelentősége, a humán papilloma vírus (HPV) szerepe.....	6
1.2. Celluláris biomarkerek a méhnyakrákban és rákmegelőző elváltozásaiban.....	10
1.2.1. p16 ^{INK4a} , Ki67, CINtec [®] , CINtec [®] PLUS.....	10
1.2.2. Sejtkapcsoló struktúrák, a claudin-1.....	12
1.2.3. mikroRNsek.....	16
2. Célkitűzések.....	18
3. Anyag és módszer.....	19
3.1. Betegek, minták.....	19
3.2. Módszerek.....	20
3.2.1. Citológia, folyadékalapú citológia (liquid based cytology - LBC).....	20
3.2.2. Hisztológia, mikrodisszekció.....	21
3.2.3. Immuncitokémia, immunhisztokémia.....	22
3.2.4. Molekuláris vizsgálatok, mikroRNS meghatározás.....	24
3.2.5. HPV meghatározás, HPV tipizálás.....	24
3.2.6. Statisztikai értékelés.....	25
4. Eredmények.....	26
4.1. Az Első Magyarországi HPV Központban vizsgált nők HPV fertőzöttsége, a HPV típusok eloszlása, a 2007-2011 között végzett vizsgálatok eredményei.....	26
4.2. A „hagyományos”(H) és folyadék alapú (liquid based cytology - LBC) minták előkészítésének és értékelési eredményeinek összehasonlítása.....	28
4.3. A sejtkapcsoló fehérje claudin-1 (CLDN1) kimutatás diagnosztikus értékének vizsgálata LBC és hisztológiai mintákon.....	30

4.4. A CLDN1/ Ki67 kettős immunreakció eredményei citológiai és hisztológiai anyagban, összehasonlítása a p16/Ki 67 (CINtec®PLUS) reakció eredményeivel.....	37
4.5. A CINtec®PLUS és CLDN1/Ki67 citológiai és hisztológiai eredmények összehasonlítása.....	41
4.6. A mikroRNS expresszió vizsgálata premalignus (HSIL, CIN2-3) mintákban.....	47
5. Megbeszélés	52
6. Következtetések.....	63
7. Összefoglalás.....	64
8. Summary.....	65
9. Irodalomjegyzék.....	66
10. Saját publikációk jegyzéke.....	79
11. Köszönetnyilvánítás.....	80

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

Rövidítés	angol név	magyar név
AGC	atypical glandular cells	atípusos mirigyhámsejtek
ASCUS	atypical squamous cells of undetermined significance	atípusos laphámsejtek nem meghatározható jelentőséggel
CDK4	cyclin dependent kinase 4	cyclin dependens kináz 4
CIN1	cervical intraepithelial neoplasia grade 1	cervicalis intraepiteliális neoplázia 1. fokozat
CIN2	cervical intraepithelial neoplasia grade 2	cervicalis intraepiteliális neoplázia 2. fokozat
CIN2+	CIN2 or higher grade dysplasia	CIN2 vagy magasabb fokú hámdiszplázia
CIN3	cervical intraepithelial neoplasia grade 3	cervicalis intraepiteliális neoplázia 3. fokozat
CIS	carcinoma in situ	carcinoma in situ
CLDN1	claudin-1	claudin-1
DAB	3'3-diaminobenzidine	3'3-diaminobenzidin
DNS		dezinukleinsav
E	early	korai
2F	transcription factor 2	transzkripciós faktor 2
FFPE	formalin-fixed paraffin-embedded	formalin-fixált, paraffin-beágyazott
FIGO	International Federation of Gynecology and Obstetrics	Nemzetközi Nőgyógyászati és Szülészeti Szövetség
FS-HPV	Full Spectrum HPV	Full Spectrum HPV
HC2	Hybrid Capture 2	Hybrid Capture 2
HE	hematoxylin-eosin staining	hematoxin-eozin festés
H	-	hagyományos
HSIL	high grade squamous intraepithelial lesion	magas fokú laphám intraepiteliális elváltozás
HPV	human papilloma virus	humán papilloma vírus
hrHPV	high risk HPV	magas kockázatú HPV
HRP	horseradish peroxidase	torma peroxidáz
IC	immunocytochemistry	immuncitokémia
IH	immunohistochemistry	immunhisztokémia
kbp	kilo base pair	kiló bázispár
L	late	késői
LBC	liquid based cytology	folyadék alapú citológia
LEETZ	loop electrosurgical excision of the transformation zone	transzformációs zóna elektro-sebészi kivágása
LSIL	low grade squamous intraepithelial lesion	alacsony fokú laphám intraepiteliális elváltozás
lrHPV	low risk HPV	alacsony kockázatú HPV
mRNS	-	messengerRNS

miRNS	-	mikroRNS
MMP9	metalloproteinase 9	metalloproteináz 9
NA	not applicable	nem kezelhető
NA-HPV	-	kockázati csoportba nem sorolt HPV
p16 ^{INK4a}	protein 16 ^{INK4a}	16 ^{INK4a} fehérje
Pap	Papanicolaou	Papanicolaou
PIK3AP1	phosphoinositide-3-kinase adaptor protein 1	foszfoinozítid-3-kináz adapter fehérje 1
pKi67	protein Ki67	Ki67 fehérje
PPV	positive predictive value	pozitív prediktív érték
pRB	protein retinoblastoma	retinoblastoma fehérje
RNS	-	ribonukleinsav
SCC	squamous cell carcinoma	laphámsejtes carcinoma
TJ	tight junction	szoros sejtkapcsoló struktúra
TOP2A	topoisomerase 2 alpha	topoizomeráz 2 alfa
TP63	tumor protein p63	p63 tumor fehérje
ZO fehérje	-	zonula occludens fehérje
U6 snRNS	-	U6 kis nukleáris RNS
UTR	untranslated region	nem transzlatált régió
WHO	World Health Organisation	Egészségügyi Világszervezet
ZNF614	zinc finger protein 614	cink ujj-fehérje 614

1. Bevezetés

1.1. A méhnyakrák epidemiológiája, a szűrés jelentősége, a humán papilloma vírus (HPV) szerepe

A méhnyakrák a Globocan 2018-es adatai szerint mind előfordulásban, mind halálozásban a 4. helyen áll a nők daganatos megbetegedései között, 185 országban végzett felmérés alapján (Bray et al. 2018). A WHO becslése szerint ez 570 000 új beteget és 311 000 méhnyakrák-okozta halálozást jelent évente (Bray et al. 2018). Bár a mortalitás a fejlett országokban az utóbbi években csökkent, az előfordulás világszerte emelkedik, főleg a kevésbé fejlett országokban. A méhnyak citológiai módszerrel történő szűrésének elterjedése, elsősorban a populációs-alapú szűrések, melyek a Papanicolaou-módszert („Pap” teszt) alkalmazzák, jelentősen csökkentették mind a mortalitást, mind az előfordulást (Safaeian and Sherman 2013, Bray et al. 2018, Laengsri et al. 2018). A citológiai kenetek világszerte bevezetett egységes értékelési szempontjainak alkalmazása, melyet a Bethesdában (MD, USA) tartott konferencián fogalmaztak meg először 2001-ben, tovább segítette a méhnyakrák és rák(meg)előző elváltozásainak felismerését és értékelését, valamint egységes nevezéktan alkalmazását, ami a méhnyakrák előfordulásának további csökkenéséhez vezetett (Solomon et al. 2002).

A következő jelentős előrelépést a humán papilloma vírus (HPV), mint kórokozó szerepének a felismerése, valamint a HPV-ellenes populációs szintű vakcináció bevezetése jelentette a világ számos országában, mely jelentős eredményekhez vezetett a méhnyakrák és rákelőtti (pre malignus) elváltozások korai felismerésében, illetve csökkentésében (Stanly 2006, Darragh et al. 2012, Crosbie et al. 2013). Ismertté vált ugyanis, hogy a HPV DNS a méhnyakrák különböző formáiban (laphámrák – carcinoma planocellulare-, valamint adenocarcinomában) 90 % felett megtalálható a tumorszövetben (Nicolas et al. 2020). A HPV szerkezetének, genomjának megismerését követően feltárták azt a mechanizmust is, mely a HPV onkogén hatásáért felelős. A HPV kettős szálú circularis DNS-t tartalmazó genomja különböző régiókra osztható, melyek befolyásolják mind a vírusreplikációt, mind a sejtciklust és felelősek a vírus daganatkeltő – onkogén – hatásáért, melyek között kiemelt szerepet játszanak az E6 és E7 régió által kódolt onkoproteinek. A HPV E6 protein interferál a p53 apoptózist gátló fehérjével, míg

a HPV E7 fehérje a retinoblastoma tumorszuppresszor fehérje degradációját okozza (Scheffner et al. 1990, Boyer et al. 1996.).

Jelenleg több mint 150 emberi fertőzést okozó HPV típus ismert, melyek a DNS szekvencia alapján öt csoportba sorolhatók (Alpha-, Beta-, Gamma-, Nu-, Mu-papilloma vírus). Ezek közül kiemelkedő jelentőségű az Alpha-papilloma vírus csoport, melybe a méhnyakrák szempontjából, az elsősorban a nemi szervi szemölcsökért felelős u.n. „alacsony kockázatú” (low-risk, lr) típusok, és a „nagy kockázatú” (high risk, hr) típusok tartoznak. Az utóbbiak közé jelenleg 12 HPV típust sorolnak (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59), melyek a méhnyak daganatmegelőző, premalignus elváltozásaiért és malignus daganataiért felelősek (Bernard et al. 2010, Parkin and Bray 2016).

Az értekezésnek nem tárgya a HPV-fertőzés mechanizmusának, a vírus életciklusának a tanulmányozása, így csak igen röviden szeretnék szólni a produktív és perzisztáló/abortív HPV fertőzés jelentőségéről. A HPV fertőzés először a differenciálatlan (a laphám bazális sejtrétegében elhelyezkedő) hámsejtekben indul, majd a hám differenciálódásával történik a vírus érése az u.n. „*produktív vírusfertőzés*”, melynek során a vírus a felső hámréteg sejtjeiben lokalizálódik, majd a hámsejtek leválásával kikerül a hámból. Ezen produktív fertőzés nem feltétlenül jár klinikailag tünetekkel, esetleg átmeneti jóindulatú hámproliferációt okozhat. Az állandósult, *perzisztáló HPV fertőzésekben* azonban, elsősorban az E6, E7 onkogén fehérjék nagyobb arányban termelődnek és a vírus életciklusa nem válik kompletté (Boyer et al. 1996, Scheffner et al. 1990). Mindez a sejtproliferáció egyensúlyának felbomlásához vezet, mely végülis premalignus – malignus elváltozást eredményezhet. Ehhez a virális - DNS sejt - DNS-be való integrációja is társul, mely a génexpresszió egyensúlyának további felbomlását eredményezi (deFreitas et al. 2013, Nicolás et al. 2020).

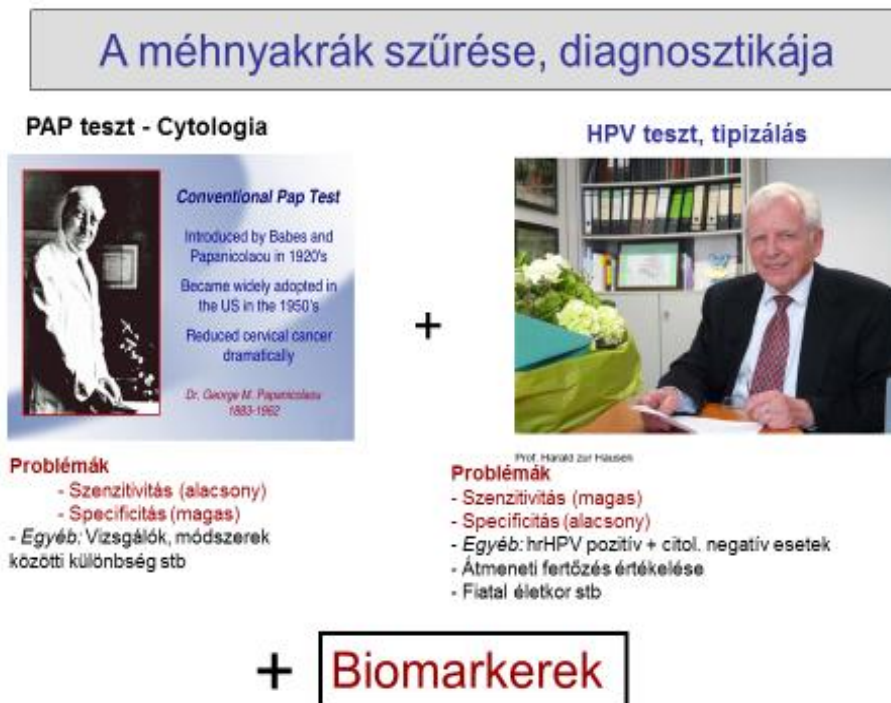
A HPV ezen, rákkeltő szerepének a felismerése szempontjából volt kiemelt fontossága annak, hogy a Semmelweis Egyetem II. Sz. Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikáján megalakult az Első Magyarországi HPV Központ, melynek munkájában magam is kezdettől részt vehettem és értékelhettem a HPV egyes típusainak előfordulását a hazai népességben (Galamb és mtsai 2011). Ennek részleteiről a későbbiekben beszámolok.

A HPV Központban nyert eredmények és megfigyelések azonban újabb kérdéseket, problémákat vetettek fel, elsősorban a korai diagnosztika területén, melyek a nőgyógyászt

gyakran hozták nehéz döntési helyzetbe, és erre világszerte számos kollega is felhívta a figyelmet. A citológiai vizsgálatról bebizonyosodott, hogy bár specifikitása magas, szenzitivitása alacsony (Isidean and Franco 2014). A HPV molekuláris patológiai módszerekkel történő kimutatása ezzel szemben fordított képet mutatott, magas érzékenységgű és alacsony fajlagosságú tesztként épült be a méhnyakrák kórismezésében. Ismertté vált, hogy a hrHPV kimutatása nem bizonyítja a méhnyak premalignus/malignus eltéréseinek jelenlétét, mivel a HPV fertőzés lehet átmeneti, különösen a fiatalabb populációban (Arbyn et al. 2012, Tornesello et al. 2013, Ronco et al. 2014).

Mindezek alapján számos „kiegészítő” teszt, biomarkerek bevezetésével próbálkoztak világszerte, melyek a fenti hiányosságokon javíthatnak és erre magunk is, mások mellett, több közleményünkben és előadásunkban felhívtuk a figyelmet (Arbyn et al. 2012, Benczik és mtsai 2013, de Freitas et al. 2013, Tornesello et al. 2013, Galamb et al. 2015, Varga et al. 2017, Kawai et al. 2018) (1. ábra).

1. ábra



(Sobel G,...Galamb Á és mtsai. I. Interdiszciplinális HPV Kongresszus, 2015. márc. 20-21. Budapest)

Ezen, a méhnyak premalignus és malignus elváltozásaira utaló biomarkerek alapvetően két csoportra oszthatók, *sejtes* (cellularis) és *virális* markerek (1. táblázat). A virális markerek széles csoportjával jelen értekezés keretében nem foglalkozom, mivel munkánk az u.n. sejtes biomarkerek körébe sorolható tesztekkel, az általunk kifejlesztett reakciókkal foglalkozik. A következőkben az ezekkel kapcsolatos ismereteket foglalom össze az általunk végzett munka indoklásaként.

1. táblázat A méhnyak premalignus és malignus elváltozásaira utaló biomarkerek

1. Sejtes (cellularis) biomarkerek

- P16^{ink4a} immunhisztokémia/immuncitokémia (CINtec®, Roche)
- P16^{ink4a}/ Ki67 kettős immunhisztokémia/immuncitokémia (CINtec®Plus, Roche)
- ProEx C (TOP2A/MCM2, Beckton Dickinson)
- Claudin1 (tight junction fehérje)
- Egyéb receptorok és sejtfelszíni markerek

2. Virális markerek

HPV RNS

- APTIMA (15 hrHPV E6/E7 mRNS, GenProbe)
- PreTect Proofer (5 hrHPV E6/E7 mRNS, Norchip)
- NucliSens EasyQ (5 hrHPV, Biomerieux)
- Onco Tect (13 hrHPV E6/E7 mRNS, InCellDx)

HPV DNS

- Cobas 4800 (L1 HPV DNS, Roche)
- Hybrid Capture 2 (L1 HPV DNS, Qiagen)
- Amplicor (L1 HPV DNS, Roche)
- Digene HPV eHC (teljes genom, Qiagen)
- Digene HPV eHC 16, 18, 45 (teljes genom, Qiagen)
- InnoLiPA (L1 DNS, Innogenetics)
- Linear Array (L1 HPV DNS, Roche)
- Genoid Genital HPV Detektáló Rendszer (L1 HPV DNS, Genoid)

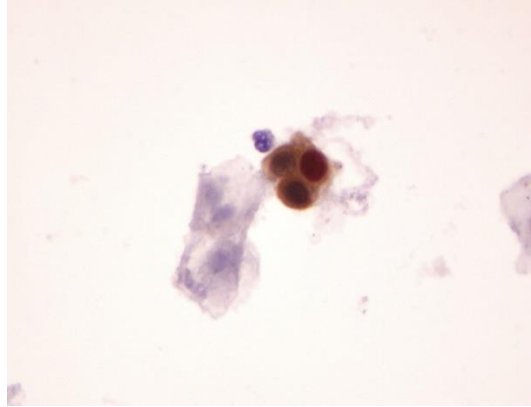
(Benczik M, Galamb Á és mtsai. (2013) *Nőgyógyászati Onkológia*, 18:63-67.)

1.2. Celluláris biomarkerek a méhnyakrákban és rákmegelőző elváltozásaiban

1.2.1. p16^{INK4a}, Ki67 (MIB1), CINtec[®], CINtec[®]PLUS

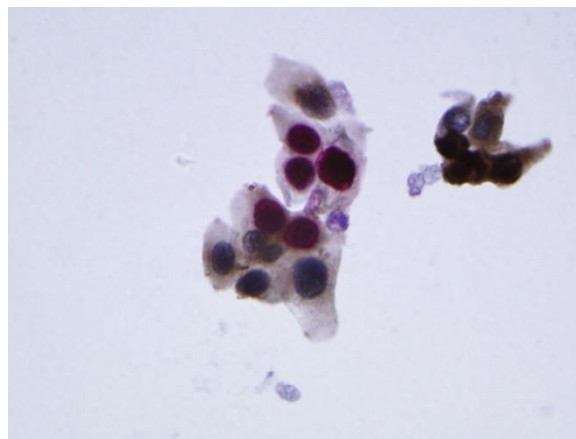
A sejtes biomarkerek között is kiemelendő a közelmúltban széles körben ismertté vált, a Roche cég által fejlesztett CINtec[®], majd ezt követve a CINtec[®]PLUS teszt. Ezen immunhisztokémiai módszerek segítik a citológiai kenetekben és szövettani metszetekben annak meghatározását, hogy a laphámsejtek transzformációja bekövetkezett-e és a cervikális laphámelváltozások milyen fokozatáról, súlyosságáról van szó. Ennek tisztázása különösen a CIN2 elváltozások esetében jelentős. Mindez alapvető a nőgyógyász és természetesen a beteg számára is annak eldöntésében, hogy milyen terápiát határoz meg a továbbiakban, azaz műtéti beavatkozásra sor kerül-e.

A p16^{INK4a} (ciklin-dependens kináz inhibitor 4) celluláris fehérje, mely a normál sejtekben csak igen kis mennyiségben, míg a daganatsejtekben fokozottan termelődik és ez a mennyiségében megnövekedett fehérje immunmódszerrel kimutatható, megfelelő antitestet és másodlagos reakciót használva. A p16^{INK4a} fehérje a sejtciklus progresszióját kontrollálja, a pRB (retinoblastoma fehérje) foszforillációs állapotának a regulációjával. Amikor a pRB funkcionálisan inaktív, a p16^{INK4a} upregulált (Nicolás et al. 2020). A p16^{INK4a} kimutathatóssága immunhisztokémiai módszerrel transzformáló HPV fertőzést jelent, mivel a tumorszuppresszor fehérje pRB inaktiválása a hrHPV hatására (E7 vírus fehérje) szükséges lépés a karcinogenezis folyamatának elindításában (Boyer et al. 1996, Scheffner et al. 1990). Ennek következményeként a transzformált sejtekben a p16^{INK4a} kimutatható, többnyire barna színreakció formájában, amennyiben 3'3-diaminobenzidint (DAB) használnak jelzőanyagként (2. ábra). Ezen módszer alkalmazásával, bár jelentősen emelhető volt a citológiai minták szenzitivitása, a specificitás még mindig nem volt megfelelő (Dahlstrand et al. 2005, Denton et al. 2010).



2. ábra. p16^{INK4a} immunhisztokémiai reakció LBC mintában. A barna színreakció jelzi a pozitív, transzformált sejteket. (Hematoxilin festés, x 250)

A p16^{INK4a} kimutatását célzó immunreakció szerepelt a Roche cég **CINtec**[®] tesztjében. A specificitás növelésére került sor egy másik fehérje, a **Ki67 (MIB1)** beépítésével, kettős immunreakcióban alkalmazva, az u.n. **CINtec**[®]**PLUS** tesztben. A Ki67 sejtproliferációt jelző antigén, mely a sejtciklus minden fázisában expresszálódik és nagyobb arányú jelenléte fokozott sejt szaporodást jelent. A két lépcsőben elvégzett reakció során a **p16^{INK4a} barna** reakcióként, a **Ki67, mint nukleáris piros** reakció (fast-red jelzőanyagot használva) mutatható ki. Pozitívnek az a reakció tekinthető, amelynek során ugyanazon sejtben jelentkezik a barna és a piros színreakció (3. ábra) (Ikenberg et al. 2013, Wentzensen et al. 2012).



3. ábra. CINtec[®]PLUS reakció LBC mintán. A kóros sejtben a Ki67 piros magi, a p16^{INK4a} barna citoplazmatikus reakciót ad a kettős immunhisztokémiai reakciót követően. (Hematoxilin festés, x250)

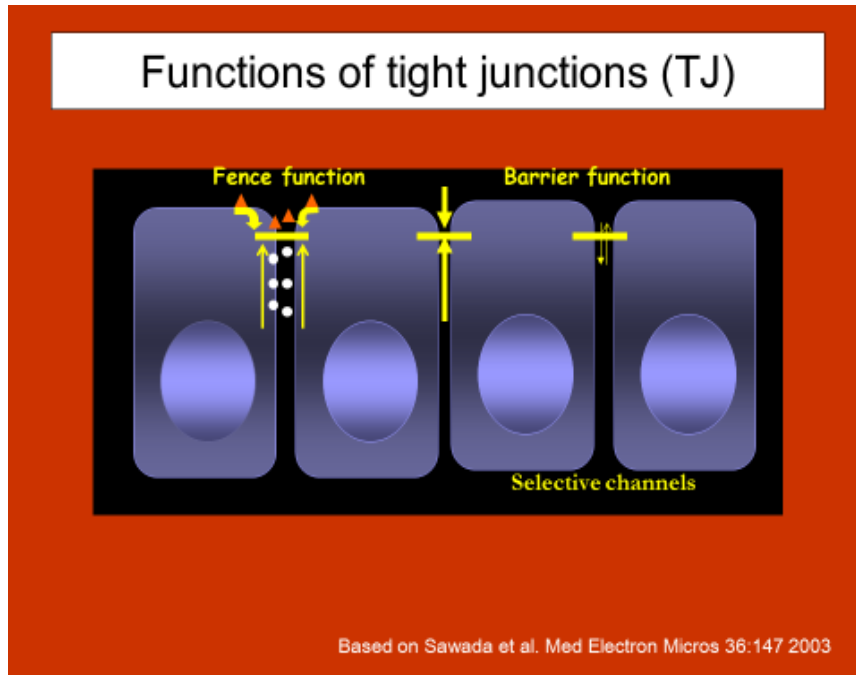
1.2.2. Sejtkapcsoló struktúrák, a claudin-1 (CLDN1)

A fentiek alapján több munkacsoport kiegészítő tesztek kidolgozását tűzte ki célul, hogy segítse a kétséges cervix kenetek és hisztológiai minták diagnosztikáját és ennek alapján a legmegfelelőbb terápia alkalmazását. Magunk is ezen célt szem előtt tartva kezdtük munkánkat.

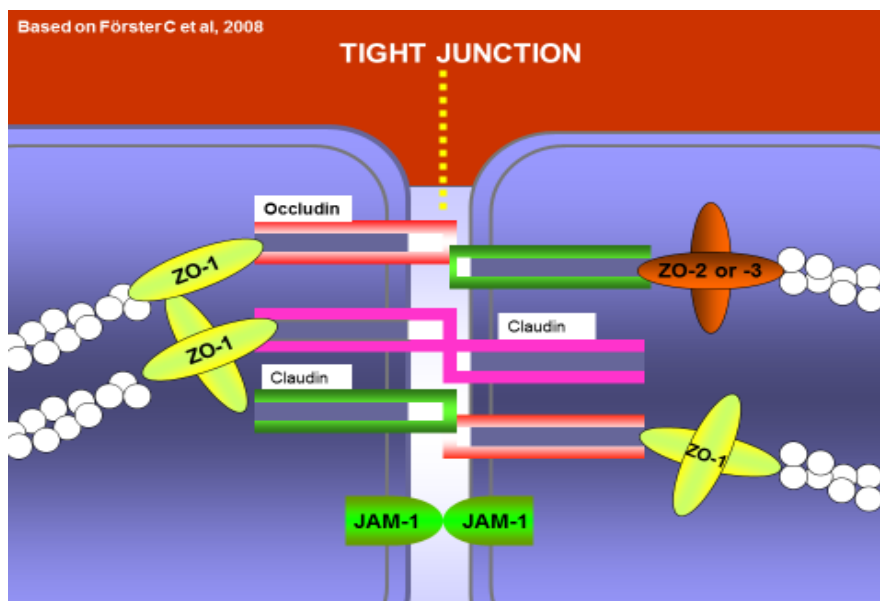
Témavezetőm, Dr. Sobel Gábor és munkatársai (2005) korábbi munkássága alapján bizonyítást nyert, hogy a sejtkapcsoló struktúrákat képező egyes fehérjék, elsősorban a *claudin-1 (CLDN1)* fokozottan termelődik méhnyakrákban és annak premalignus elváltozásaiban. Ennek alapján felvetődött, hogy hisztológiai bizonyítás után, citológiai mintákban, valamint nagyobb számú hisztológiai anyagon is vizsgáljuk a különböző CLDN fehérjék kimutathatóságát, illetve fokozott megjelenését, mely esetleges biomarkerként növelheti a tesztek szenzitivitását és specifitását.

A sejtkapcsoló struktúrák közül az u.n. tight junction (TJ), azaz szoros kapcsolatot létrehozó sejtsztruktúra, azon belül a claudinok expressziója megváltozásának jelentőségét a karcinogenezisben - beleértve a cervikális karcinogenezist - többen vizsgálták, beleértve munkacsoportunkat (Sobel et al. 2006, Szabó et al. 2009).

A TJ az endotél, valamint az epitelsejtek találkozásánál, rés nélküli, „szoros” kapcsolat, mely kontrollálja az ion és folyadékáramlást, elválasztja a bazális-oldalsó és csúcsi membrán felszíneket úgy, hogy a két oldalon lévő fehérjék aszimmetrikus eloszlását alakítja ki (4. ábra). A TJ résztvesz a paracellularis permeabilitás szabályozásában, a sejtpolaritás fenntartásában és szerepet játszik a sejt jelátviteli folyamataiban is. Emellett fontos funkciót tölt be a sejtproliferáció szabályozásában és befolyásolja a jelátviteli folyamatokat. Mindezen funkciók révén a TJ szabályozza a sejt élettani transzportfolyamatait, így a makromolekulák, növekedési faktorok, folyadékok áramlását és biztosítja a sejt polaritás fenntartását. A TJ-t számos fehérje építi fel, melyeket alapvetően két csoportra oszthatunk, így az u.n. *transzmembrán* és a *perifériás membránfehérjék* csoportra. Az utóbbiak segítik a PDZ doménjaik által, hogy a TJ kapcsolatot létesítsen a sejtvázal (5, 6. ábra) (Anderson and Van Itallie 2009, Förster 2008). A TJ egyes fehérjéi olyan extracelluláris doménnel is rendelkeznek amelyek vírus receptorként is szolgálhatnak, pl. az adeno- coxacki- és hepatitis C vírus számára (Förster 2008, Szabó et al. 2009).



4. ábra. A TJ funkciója (Sawada et al. (2003) alapján, Szabó Erzsébet PhD szerkesztése)

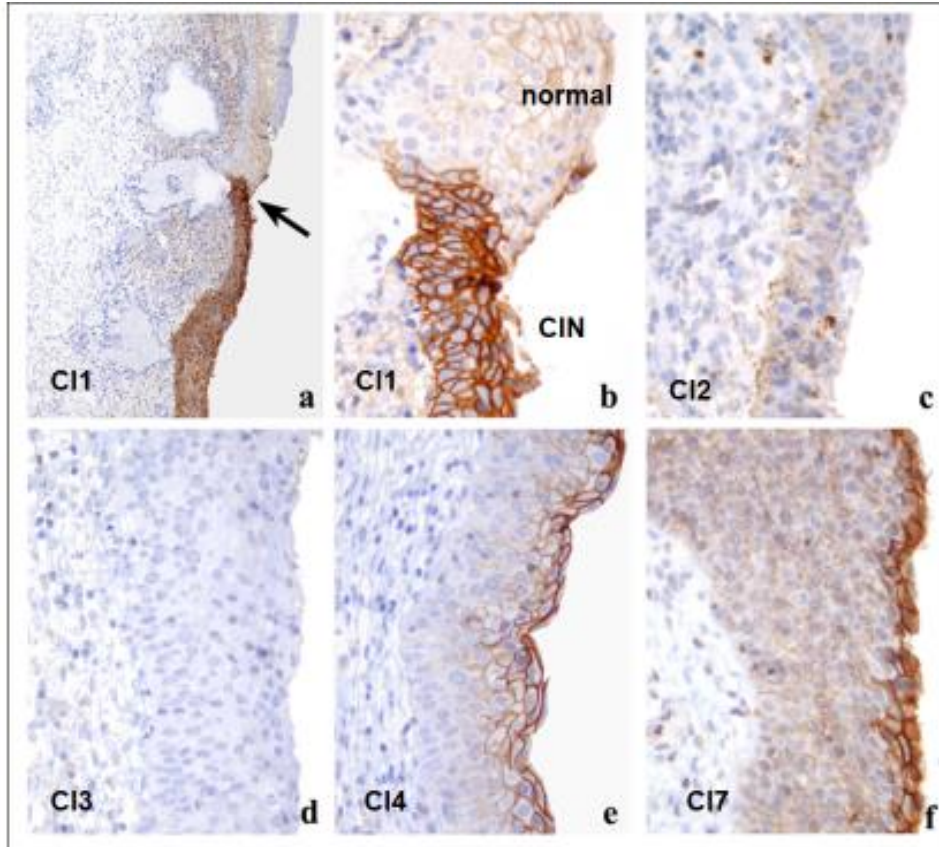


5. ábra. A tight junction (TJ) sémás szerkezete (Förster et al. (2008) alapján, Szabó Erzsébet PhD szerkesztése)

TIGHT JUNCTION FEHÉRJÉK
1. Transzmembrán fehérjék
Claudinok (CLDN-1, ...-27 emlősökben, emberben 26)
TJ-asszociált MARVEL proteinek (TAMPs): occludin, tricellulin, MARVELD3
Immunglobulin szupercsalád: JAM-A, -B, -C; CAR; ESAM
Lipolízis stimulált lipoprotein receptor (LSR)
2. Citoplazmatikus, perifériás fehérjék
a. PDZ doménnel rendelkező fehérjék: zonula occludens (ZO-)-1, 2, 3, MAGI-1, -2; PAR-3, -6; afadin, MUPP-1
b. PDZ doménnel nem rendelkező fehérjék: cingulin, symplekin, Rab fehérjék, merlin, angiominin

6. ábra. A tight junction (TJ) fehérjék csoportosítása (*Sawada et al. (2003) alapján*)

A TJ kulcsfontosságú transzmembrán fehérjéi, a mintegy „gerincet” képező **claudinok (CLDN)**, 20-27 kDa nagyságú fehérjecsaldót képeznek. Tsukita és Furuse írta le elsőként a család első tagját, a CLDN1-t (Tsukita and Furuse 1999). Jelenleg a claudinok expressziós mintázata alapján 27 tag ismert emlősökben, emberben 26 (Mineta et al. 2011). A CLDN molekula négy transzmembrán doménnel rendelkezik, két sejten kívüli hidrofób hurokkal, egy citoplazmatikus N terminális és egy sejten belüli C terminális résszel, amelyet egy PDZ kötő domén alkot. A kötőhelyhez számos PDZ doménnel rendelkező, elsősorban perifériás membránfehérjék képesek kapcsolódni, például a ZO - 1, -2, -3 (Singh et al. 2010; Sobel et al. 2005) (5. ábra). A különböző CLDN-típusok megjelenése az egyes szervekben és szövetekben specifikus, állandó összetételű, így az u.n. „claudin-mintázat” nagy mértékben jellemzi az adott sejtet, szövetet. Ezért is tűnt jelentősnek Sobel és mtsai közlése 2005-ben, akik elsőként több CLDN, kiemelten a CLDN1 fokozott expresszióját mutatták ki CIN-ben és cervix carcinomában (Sobel et al. 2005) (7. ábra). Ennek alapján több onkológiai tumorban vizsgálták a CLDN eloszlást és a kialakult mintázat jelentőségét, melyet a onkológiai tumorokra vonatkozóan Szabó és mtsai foglaltak össze (Szabó et al. 2009) (8. ábra).



7. ábra. Claudinok CIN-ben (Sobel G et al. (2005) *Hum Pathol*, 36:162-169.)

Méhnyakrák : ↑ claudin-1, -7

Endometrium:

Carcinoma: ↑ claudin-3, -4

I.típus: ↑ claudin-2, II.típus: ↑ claudin-1

Endometriosis: ↑ claudin-3

Ovarium carcinoma: ↑ claudin-3, -4

8. ábra. Claudinok a nőgyógyászati daganatokban (Szabó et al. (2009) *Histol Histopathol*, 24:1607-1615.)

1.2.3. mikroRNS-ek

A méhnyakrák és premalignus elváltozásai diagnosztikájának újabb megközelítését, további lehetőségeit vizsgálva, egyes epigenetikai eltérések felé fordultunk. Ismertté vált, hogy az u.n. *mikroRNS*-ek (miRNS), ezen kis méretű, endogén, nem kódoló ribonukleinsav (RNS) molekulák, amelyek a génműködést poszttranszkripciós szinten szabályozzák, expressziója megváltozik számos daganat kialakulása és progressziója során, valamint a HPV fertőzés hatására is. A miR-ek számos típusa ismert, jelenleg már 2500 körüli (miRBase database (www.mirbase.org)). Mivel a miRNS mintázat többnyire jellemző az egyes sejtekre, szövetekre, daganatok esetében is számosan tanulmányozták a miRNS mintázat változását, remélve a tumorok jobb jellemzését. Több szerv daganata esetében már sikerrel alkalmazták a miRNS expresszió változás detektálását mind szövetekből, mind a vérből származó mintákban és diagnosztikus biomarkerként, prediktív és progressziót jelző markerként való felhasználásuk is felmerült, mint csoportunk esetében is (Gyugos et al. 2014, Lendvai et al. 2010, 2019).

A miRNS expressziós profilok eltéréseit a normális és daganatos méhnyakhámban több munkacsoport is vizsgálta, hazai szerzők is (Göcze et al. 2013, 2015), azonban ezen munkák jelentős része nem vezetett egyértelmű következtetésekhöz az irodalomban. Ugyancsak kevesen vizsgálták a premalignus elváltozásokban bekövetkező eltéréseket ugyanazon betegből származó normális cervix hámmal összevetve, melyre magunk is felhívtuk a figyelmet a miRNS-ek nőgyógyászati tumorokban való expresszióját összefoglaló közleményünkben (Galamb et al. 2015).

A fentiek figyelembevételével határoztuk meg célkitűzéseinket, mely a méhnyakrák és rákelőtti („megelőző”, premalignus) elváltozások korai detektálására, új biomarkerek alkalmazására irányult.

A citológiai, hisztológiai, immuncito- és hisztokémiai vizsgálatok a Semmelweis Egyetem II. Sz. Patológiai Intézetében patológusokkal és citológusokkal együttműködve történtek. A statisztikai értékelésben, valamint a molekuláris vizsgálatok végzésében *Szekerczés Tímea biomérnök* PhD hallgató és *Dr. Lendvai Gábor, PhD* biológus, molekuláris laboratóriumvezető segített. A felsorolt munkatársakkal több, az értekezésben szereplő közleményben társszerzőként jelenünk meg. Kollaborációban végeztem egyes vizsgálatokat *Dr. Benczik Márta, PhD* és *dr. Kocsis Adrienn* (GenoID

Molekuláris Diagnosztikai Laboratórium, Neumann Diagnostics) segítségével és együttműködésével, akik a HPV meghatározásokat végezték és részt vettek az eredmények kiértékelésében.

2. Célkitűzések

Munkám során cél volt:

- 2.1. Az Első Magyarországi HPV Központban vizsgált nők HPV fertőzöttsége, a HPV típusok eloszlásának vizsgálata.
- 2.2. A „hagyományos” és folyadék alapú („liquid based cytology” - LBC) minták értékelési eredményeinek összehasonlítása.
- 2.3. A sejtkapcsoló fehérje claudin-1 (CLDN1) kimutatás diagnosztikus értékének vizsgálata folyadék alapú (LBC) cervix mintákon, nagyobb számú hisztológiai mintán és összevetése a p16^{INK4a} immunreakcióval.
- 2.4. A CLDN1 fokozott expresszió diagnosztikus értékének növelése egyéb biomarkerek (Ki67 proliferációs marker) alkalmazásával kettős immunhisztokémiai módszerrel, cervix citológiai és hisztológiai (konizációs) mintákban, célul tűzve ki a módszer szenzitivitásának és specificitásának növelését.
- 2.5. A CLDN1/Ki67 kettős immunmódszer eredményeinek összehasonlítása a p16/Ki67 kettős immunreakció (CINtec[®]PLUS teszt) eredményeivel LBC módszerrel készített citológiai és konizáció útján nyert hisztológiai mintákon.
- 2.6. A miR-expresszió változásainak vizsgálata premalignus cervix elváltozásokban, premalignus konizációs anyagban.

3. Anyag és módszer

3.1. Betegek, minták

A vizsgálatokat a TUKEB 148/2012 sz. etikai engedélye alapján, a KMR_12-1-2012-0032 sz. projekt, valamint OTKA PD105019 sz. pályázat (Dr. Sobel Gábor) támogatása segítségével végeztük.

Betegek: A citológiai és szöveti minták értékelését a különböző vizsgálatokban eltérő számú betegből származó mintákon végeztük, melyre vonatkozó részletes adatok, számok, táblázatok az egyes vizsgálatok ismertetése során kerülnek bemutatásra.

Összefoglalva, az későbbiekben bemutatandó eredmények során részletezendő vizsgálatokban összesen **9847 mintát** vizsgáltunk. A vizsgálatok indulásakor, először a „hagyományos” kenetek és az LBC preparátumok értékelését hasonlítottuk össze, párhuzamos mintákon. Az immunreakciók egy részét párhuzamosan LBC és hisztológiai mintákban, CINtec®PLUS és CLDN1/Ki67 reakcióval. 100-100 minta a reakciók beállítására szolgáló tanulóhalmaz („learning-set”) volt. Az immunhisztokémiai reakciókat konizációs anyagban végeztünk. Ebből 1155 az első, a CLDN1-t kimutató munkában került vizsgálatra, 50 minta a kettős reakció során és 22 mintapár a mikroRNS vizsgálatokban (2. táblázat).

2. táblázat. A különböző vizsgálatokba bevont betegminták száma

HPV Centrum.....	1155 minta
Hagyományos kenetek és LBC minták összehasonlítása.....	687 (2x).....1374 minta
CLDN1 immunreakció LBC keneteken.....	502 minta
P16 ^{INK4a} reakció LBC keneteken.....	502 minta
CLDN1/Ki67 immunreakció LBC keneteken.....	2907 minta
CINtecPLUS reakció LBC keneteken.....	2907 minta
Konizátum.....	352 minta + 22 pár (MIR-hez)
CLDN1/Ki67 immunhisztokémiai vizsgálat.....	63 minta
CINtec®PLUS immunhisztokémia.....	63 minta

Összes citológiai, immunreakció és hisztológiai mintaszám: 9847 minta

3.2. Módszerek

3.2.1. Citológia, folyadék alapú citológia (liquid based cytology – LBC)

A vizsgálatok első lépéseként a betegektől citológiai célra vett mintákat mind „hagyományos”, mind folyadék alapú citológiai (LBC) módszerrel feldolgoztuk és értékeltük, mielőtt az immuncitokémiai reakciókat elvégeztük. A „hagyományos” kenetek a szokott módon, a kefével vett sejtek tárgylemezre való „kenésével”, majd alkoholos fixálás és Pap (Papanicolaou) festés után kerültek értékelésre. Az LBC mintákat PreserveCyt Solution (Hologic™ Inc. Marlborough, MA, USA) folyadékban gyűjtöttük a kefével történő mintavétel során. A továbbiakban a preparátumokat asszisztens készítette a membrán technológián alapuló ThinPrep® 2000 Processor (Hologic Inc.) készülék segítségével, a cég leírása alapján. A készülék több lépésben (diszperzió, gyűjtés, transzport) előre fixált tárgylemezre, egy 20 mm-es átmérőjű kör területre tapasztotta a sejteket (9, 10. ábra).

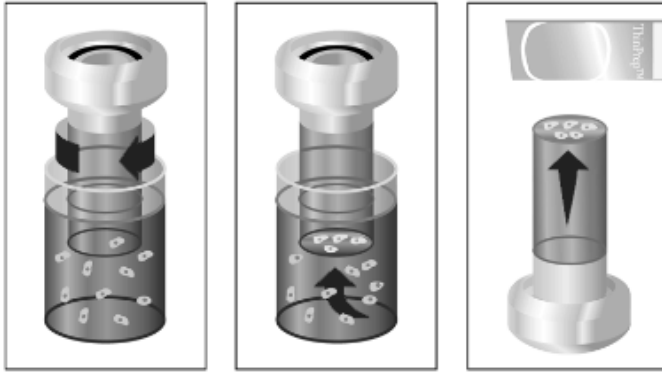


9. ábra. A hagyományos és folyadék alapú preparátumok Papanicolaou festés követően

A mintákat a Semmelweis Egyetem II. Sz. Patológiai Intézetébe szállítottuk további feldolgozásra, majd a GenoID Laboratóriumba HPV meghatározásra. A kenetek

értékelése a Bethesda rendszer szerint történt, amelyet citológus előszűrők és szakorvosok végeztek.

1. *Összekeverés* 2. *Sejtek összegyűjtése* 3. *Transzport*



10. ábra A ThinPrep 2000 processzor folyamatai (*Hologic; ThinPrep®2000 System Operator's Manual, n.d.*)

A mintából származó első lemez szokott technikával Pap-festésre és a diagnózis megállapítására került. A következő lemez - a kettős festéses vizsgálatokban - CINtec®PLUS reakcióra, a harmadik lemez CLDN1/Ki67 reakcióra került felhasználásra. Maximálisan 4-5 lemezt tudunk készíteni egy mintavétel során, ahogy az a cég leírásában is szerepel. Sajnálatosan azonban időnként, különösen amikor a HPV vizsgálat kezdetben megelőzte az LBC preparátum készítését, a sejtszám nem volt elegendő mindhárom lemez elkészítésére. Ennek részleteit, illetve a használható „párhuzamos” minták értékelését a megfelelő fejezetek „eredmény” részében ismertetem.

3.2.2. Hisztológia, mikrodisszekció

A mintákat **hisztológiai vizsgálatra** konizáció útján nyertünk, melyre a klinikai indikáció alapján került sor. A betegekre vonatkozó pontos adatok, számok, illetve eredmények később kerülnek ismertetésre táblázatos formában. A konizátumok formalin fixálás, paraffinba ágyazás (FFPE), majd metszés (3-4 µm vastagságú metszetek) és hematoxilin-eozin (HE) festés után kerültek patológiai értékelésre és a diagnózis megállapítására, illetve további immunhisztokémiai vizsgálatokra a SE II. Sz. Patológiai

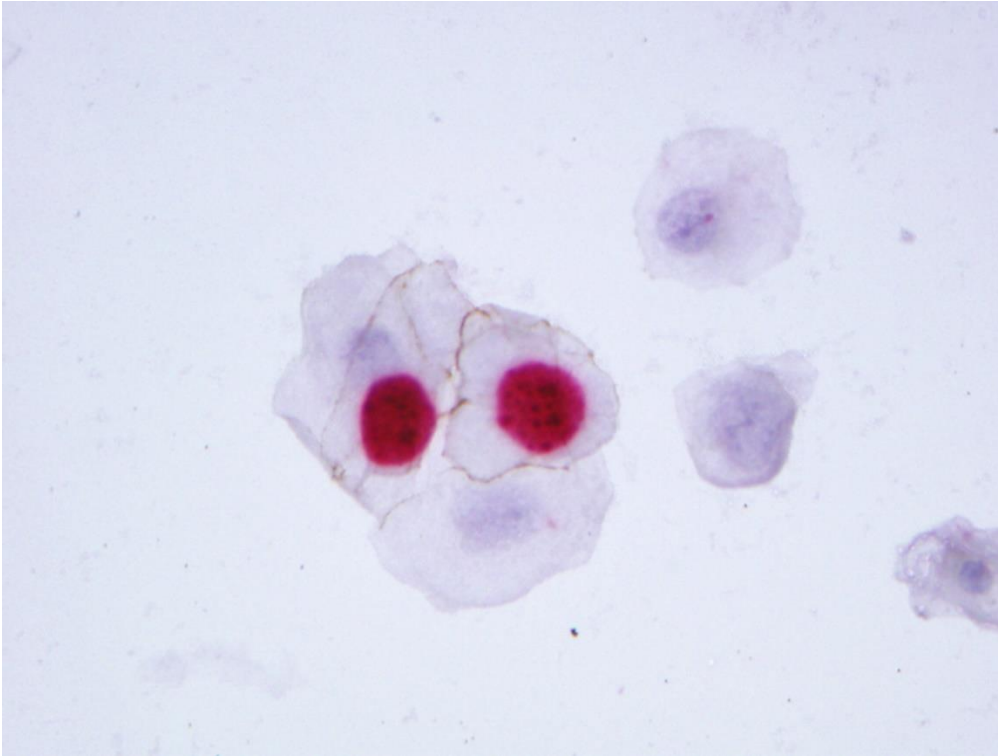
Intézetben. A diagnózis alapján kiválogatott anyagokat patológus szakorvosok (prof. Schaff Zsuzsa, Dr. Schlachter Krisztina) ismételten áttekintették a diagnózis ellenőrzésére és a megfelelő blokkok, területek kiválasztására, mely munkában magam is részt vettem.

A **mikrodisszekció** a mikroRNS vizsgálatok céljára a II. Sz. Patológiai Intézetben történt, az u.n. „laser captured” mikrodisszekció céljára szolgáló műszerrel. Az eljárás során 4-5 µm vastagságú FFPE metszeteket FrameSlides 1,4 µm Pet Membrane (MicroDissect GmbH, Herborn, Germany) lemezekre jutattuk. A mikrodisszekcióra Leica AS LMD (Meyer Instruments, Houston, Texas, USA) készüléket használtunk. Ennek segítségével, mely mikroszkópos kontroll mellett teszi lehetővé a kérdéses terület kiválasztását, került kivágásra a HSIL és a morfológiailag diszpláziát nem mutató, “normális” terület. Mintánként, illetve területenként 10-12 metszetet gyűjtöttünk össze az RNS izoláláshoz a tubusokban (BRAND®PCR-tubes, 0,5 ml, BrandTech® Scientific, Merck KGaA, Darmstadt, Germany).

3.2.3. Immuncitokémia és immunhisztokémia

CLDN1 - ellenes antitesttel végzett immunreakcióhoz az antitestet 1:100x hígításban használtuk (Zymed, San Francisco, CA, USA, valamint a Cell Marque, Roclin, CA, USA) és a Dako (Glostrup, Denmark) cégektől beszerezve. A lemezeket 30 percig, 42 C°-on inkubáltuk a primer antitesttel. A reakció kivitelezése a Ventana ES automata immunfestő készülék segítségével (Ventana Medical System Inc., Tucson, AZ), a SE II. Sz. Patológiai Intézetben történt, immunhisztokémiai szakasszisztens kivitelezésében, peroxidáz (HRP) multimer-alapú, biotin-mentes, 3’3 diaminobenzidint, mint kromogént használva jelzőanyagként. A reagenseket, valamint a másodlagos antitesteket a Ventana cégtől (iView DAB Detection Kit) szereztük be. A **kettős reakcióban** (CLDN1/Ki67) az első immunreakciót manuálisan követte a második, melyben **Ki67**-ellenes primer monoclonalis antitestet (Dako) használtunk (1:100 hígítás, 30 perc, szobahőn). A másodlagos antitesttel való reakciót (ImmPRESS AP Reagent, Vector Lab.) alkalikus foszfatáz (AP) jelöléssel (Vector Red Alkaline Phosphatase Substrate Kit, Vector Lab.) és 25 perces Fast Red kromogénnel vizualizáltuk. Pozitívnak azon sejteket tekintettük, melyek az egy primer antitestet használó reakciókban barna membranózus festődést

mutattak. A kettős reakcióban pozitívnak tekintettük azon sejteket, melyek barna membranózus és piros nukleáris reakciót mutattak (11. ábra).



11. ábra. CLDN1/Ki67 kettős immunreakció. A CLDN1 barna membranózus festés, a Ki67 piros magi festés formájában látható. (Hematoxilin festés, 400x)

A **CINtec®PLUS** reakciót a cég előírásai szerint végeztük (Hoffmann-La Roche, Basel, Svájc), manuálisan, immunhisztológus asszisztens segítségével. Azon mintákat tekintettük pozitívnak, a cég leírása alapján, melyekben ugyanazon sejten tudtuk kimutatni a citoplazmatikus barna színű p16 és a piros nukleáris Ki67 reakciót (3. ábra). A reakciók értékelése multidiszkussziós mikroszkóppal, citológus/patológus és biológus munkatársakkal (prof.Schaff Zsuzsa, Szekerczés Tímea) együttműködve történt. Ugyanazon LBC szuszpenziós mintákból készített párhuzamos lemezekon végeztük el a CLDN1/Ki67 reakciót, hasonló értékelési elv alapján.

Az immuncitológiai vizsgálatokat szemikvantitatíve értékeltük mikroszkóposan, 40x-os objektív nagyítással, 10 látótérben vizsgálva a sejteket. Látóterenként 100 sejtet számolva regisztráltuk a pozitív sejtek számát.

A citológia és a HPV triage összehasonlító vizsgálatokat Dr. Benczik Márta PhD elemezte a citológiaiilag illetve HPV tesztre pozitív (ASCUS+, hrHPV+) mintákon és ezzel vizsgálta a triage-ban alkalmazott tesztek diagnosztikai értékét. Ennek részletei értekezésében kerültek leírásra, így arra magam nem térek ki.

3.2.4. Molekuláris vizsgálatok, mikroRNS meghatározás

A formalinban fixált, paraffinba ágyazott (FFPE) mintákból végeztük a totál RNS, benne a mikroRNS meghatározást a RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) segítségével, a gyártó instrukciója szerint, a SE II. Sz. Patológiai Intézetben. A reverz transzkripció (RT, TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit, mely 10 ng total RNS-t tartalmazott) és kvantitatív PCR reakció (qPCR) megfelelő kittel (TaqMan Universal Master Mix II, no UNG, mely 0.65 µL RT terméket tartalmazott), majd az amplifikáció Light Cycler 480 Instrument II (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) segítségével történt. A tisztított RNS-t -80 C°-on tároltuk a RNS koncentráció meghatározásáig. Ezen munkákat Szekerczés Tímea biomérnök PhD hallgató végezte, Lendvai Gábor, PhD laborvezető ellenőrzésével. A kiválasztott miRNS-ek expressziója TaqMan MicroRNA Assays-vel történt (Life Technologies of Thermo Fisher Scientific Inc. Waldtham, MA, USA). A relative expresszió (Δ CT) az RNU48 és U6, mint két legstabilabb referencia, átlagaként került meghatározásra a NormFinder applikációval (Andersen et al. 2004).

3.2.5. HPV meghatározás, HPV tipizálás

A HPV meghatározás az LBC-ra levett cervix sejtuszuspenzióból történt a GenoID Molekuláris Diagnosztikai Laboratóriumban (Budapest), Dr. Benczik Márta és dr. Kocsis Adrienn irányításával és a laboratórium értékelésével. A cervikális mintát, a laboratórium instrukciója szerint „cytobrush” mintavételi eszköz segítségével vettük le a méhszáj endo- és ectocervikális felszínéről, majd azt a laboratórium által rendelkezésre bocsátott mintatároló edénybe helyeztük. Ezt követően a minta a GenoID laboratóriumba került elszállításra. Dr. Benczik Márta leírása szerint a HPV DNS-t a Genoid Laboratóriumban fejlesztett „Full Spectrum HPV Amplifikációs és Detektáló teszttel” végezték, majd a hrHPV-t tartalmazó mintákat PCR-rel egyedileg genotipizálták a Full Spectrum L1F/L1R-HPV teszttel (Genoid, Hungary, Budapest) (Jeney et al. 2007), ahogy erre Dr. Benczik Márta hivatkozik a dolgozatában. A HPV vizsgálathoz a DNS-t az

AmpliLute Liquid Media Extraction kittel (Hoffmann-La Roche Ltd., Basel, Switzerland) preparálták 4 ml PreservCyt mintából. A Full Spectrum L1F/L1R-HPV tesztet alkalmazták a HPV fertőzés kimutatására és genotipizálásra.

3.2.6. Statisztikai értékelés

A statisztikai elemzést Szekerczés Tímea biomérnök PhD hallgatóval együtt végeztem, akivel több közleményben szereplünk társszerzőként. Az értékelésben két-irányú kontingencia analízist használtunk a Java Statistics (<http://statpages.org/ctab2x2.html>) alapján. A további elemzést a Yates-korrigált chi-square, Mantel-Haenszel chi-square, Fischer Exact Test szolgálta. Emellett a STATISTICA szoftver v 12 (StatSoft: Tulsa, OK, USA) is felhasználásra került. A különbségeket statisztikailag $p < 0.05$ értéknél tekintettük szignifikánsnak.

4. Eredmények

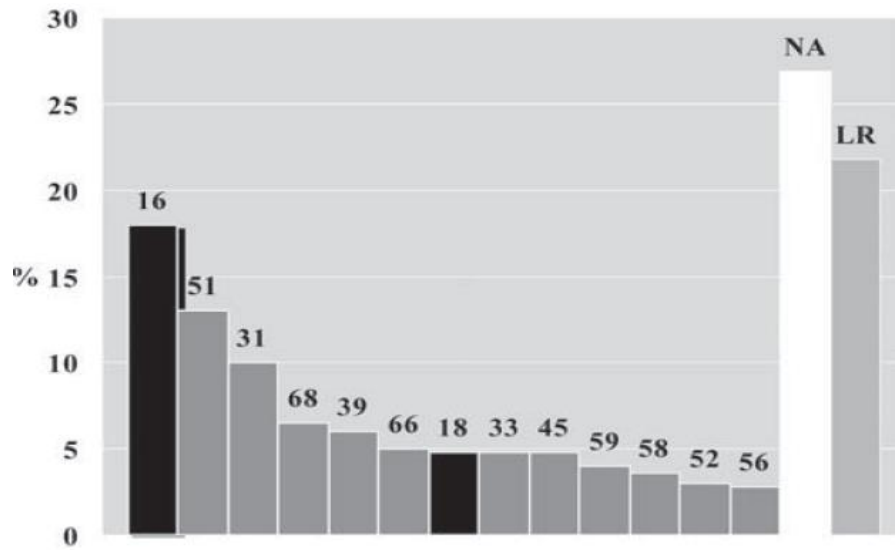
4.1. Az Első Magyarországi HPV Központban vizsgált nők HPV fertőzöttsége, a HPV típusok eloszlása, a 2007-2011 között végzett vizsgálatok eredményei

A HPV Központban 2007-2011 között összesen 1155 páciens esetében került sor HPV meghatározásra, akik kor szerinti megoszlását a 3. táblázat tartalmazza. A HPV DNS PCR módszerrel került meghatározásra az általunk vett mintákból, a GenoID laboratóriumban. A vizsgálat során a hrHPV típusok, mint „NA” („nem azonosítható”) kerültek egy csoportba az egyéb, nem- hrHPV-vel. Az utóbbiak esetében az egyes típusok egyenként kerültek meghatározásra. Minden esetben citológiai vizsgálatra is sor került hagyományos kenetkészítéssel, melyet a Bethesda-rendszer szerint osztályoztak a SE II. Sz. Patológiai Intézetben.

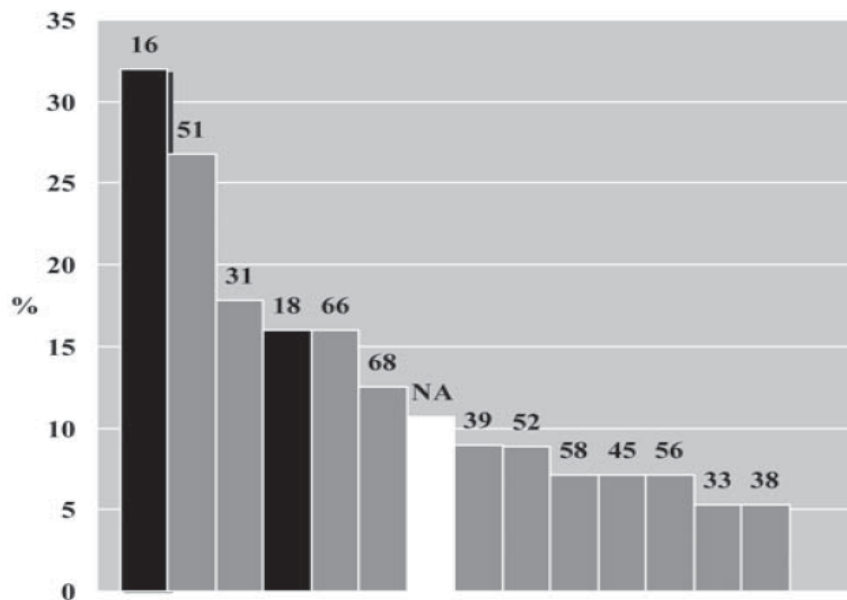
Az eredmények alapján a vizsgálatra kerültek 55,5 %-ában volt HPV DNS kimutatható, ezekből 38,5 %-ban hrHPV, a maradék 17 %-ban lrHPV (12, 13. ábra). Korcsoportok szerinti megoszlásban a legnagyobb arányú HPV-fertőzöttség a 15-25 évesek között, ezt követte a 26-45 év közötti korosztály. Meglepő volt a magas fertőzöttség az 56 év felettiek között. A hrHPV között a HPV16-os volt a leggyakoribb, ezt követte az HPV51-es. A HPV18-as a 7. helyen állt (12. ábra). Azon esetekben (445 minta, 32,1 %), amelyekben citológiai eltérés is volt (ASCUS, CIN1-3, ASC-H), a HPV16 ugyancsak az 1. helyen állt gyakoriságban, melyet az 51-es és 31-es követett. Ezen esetekben a HPV18 a 4. helyen volt, a HPV66-tal együtt (13. ábra).

3. táblázat A HPV pozitívítás korcsoportok szerinti bontásban (Galamb Á és mtsai. (2011) Orv Hetil, 45:1804-1807.)

	Tipizálások száma	HPV-negatív (-)	HPV-pozitív (+)
Összes páciens	1155	44,5%	55,5%
15–25 év	251	37,1% (n = 93)	62,9% (n = 158)
26–45 év	792	43,8% (n = 347)	56,2% (n = 445)
46–55 év	88	70,4% (n = 62)	29,6% (n = 26)
56 év felett	24	50% (n = 12)	50% (n = 12)



12. ábra. HPV genotípusok gyakoriság szerinti megoszlása a HPV pozitív esetek százalékában (*Galamb Á és mtsai. (2011) Orv Hetil, 45:1804-1807.*)



13. ábra. HPV-genotípusok gyakoriság szerinti megoszlása a citológiai eltéréssel járó esetekben (*Galamb Á és mtsai. (2011) Orv Hetil, 45:1804-1807.*)

4.2. A „hagyományos” (H) és folyadék alapú („liquid based cytology” - LBC) minták előkészítésének és értékelési eredményeinek összehasonlítása

Az LBC-t, mint új technikát, egy rendelkezésünkre bocsátott készülékkel végeztük (Hologic). A minták értékelése és a későbbiekben alkalmazott immunreakciók elvégzése előtt összehasonlítottuk a „hagyományos” (H) és a LBC kenetek preparálásának és értékelésének esetleges különbségeit, a jelentkező technikai és értékelési hibákat. A készülék üzembe állítása előtt a projektben résztvevő citológus szakorvosok (prof.Schaff Zsuzsa, Dr. Járay Balázs, Dr. Székely Tamás), valamint asszisztensek (Pekár Magdolna) elvégezték a Hologic cég erre vonatkozó tanfolyamát. A tanfolyam után, a „betanulási fázisban” 687, párhuzamos „hagyományos” cervix mintát vettünk kolposzkópos kontroll mellett, azaz kenetet készítettünk, a korábban leírt módon. Emellett minden esetből párhuzamosan LBC-re is történt mintavétel, az előzővel egyidőben. A „hagyományos” (H) kenetre való mintavétel, megelőzte az LBC-re vett mintavételt (4. táblázat). A párhuzamos kenetek vizsgálatának az összehasonlítása kiterjedt technikai kérdésekre, valamint az értékelésre.

Az értékelés tekintetében, mely a szokott módon, azaz először citológus előszűrők, majd citológus szakorvos által történt, nem volt lényeges különbség a hagyományos és LBC minták között, a diagnózisok mindkét módszerrel preparált mintákban megegyeztek. A hagyományos kenetek közül 11 esetet nem tudtunk értékelni, elsősorban a kenetek sejtszegénysége miatt. Ehhez hasonlóan, 10 eset került LBC esetében a nem értékelhető csoportba (4. táblázat).

A technikai szempontokat értékelve, nem készítettünk számszerű felmérést. Mind az előszűrők, mind a citológus szakorvosok véleménye azonban megegyezett a cég által igazolt adatokkal és felmérésekkel, hogy az LBC mintákban mind a háttér (nyák, sejttörmelék), mind a vörösvértestek csak minimális számban, vagy egyáltalán nem voltak jelen. Ugyancsak előny volt, hogy a sejtek egy jól meghatározható területen (körön) belül helyezkedtek el, így a lemezek áttekintése egyszerűbb volt, ami segítette a diagnosztikus értékelést. Összefoglalva, bár nem „mértük” és elemeztük, azonban az előszűrők és citológusok véleménye szerint az LBC lemezeket lényegesen könnyebb volt értékelni, az említett áttekinthetőség, ami a jól körülhatárolt területből eredt, valamint a „tisztá” háttér miatt.

4. táblázat A konvencionális (hagyományos) és folyadékalapú (LBC) minták értékelési eredményeinek összehasonlítása

Konvencionális citológia (n=687)	Folyadék alapú citológia (n=687)				
	Normál (n=561)	ASCUS (n=15)	LSIL (n=79)	HSIL (n=22)	Nem értékelhető vagy sejtszegény (n=10)
Normál (n=577)	544	3	19	3	8
ASCUS (n=19)	4	12	3	0	0
LSIL (n=64)	7	0	50	6	1
HSIL (n=16)	1	0	2	13	0
Nem értékelhető vagy sejtszegény (n=11)	5	0	5	0	1

4.3. A sejtkapcsoló fehérje claudin-1 (CLDN1) kimutatás diagnosztikus értékének vizsgálata folyadék alapú (LBC) cervix mintákon és nagyobb számú hisztológiai mintán (Benczik M, Galamb Á. et al. (2016) *Pathol Oncol Res*, 22:179-188)

Sobel és munkatársai (2005) korábbi közlése indított arra, hogy a hisztológiai minták mellett citológiai mintákon is vizsgáljuk a CLDN1 megjelenését és értékét, a p16^{INK4a} immunreakciókkal összevetve. Emellett nagyobb számú hisztológiai anyagon is igyekeztünk igazolni a korábbi megfigyeléseket a CLDN1 fokozott expressziójára vonatkozóan.

A Genoid Laboratórium által szervezett HPV_SCREEN multicentrikus klinikai vizsgálat és a KT121128 KMR_BIOMARKER vizsgálat során, melyre a Semmelweis Egyetem II. Sz. Patológiai Intézetével, II. Sz. Nőgyógyászati Klinikájával és néhány egyéb résztvevővel együtt került sor, 502 beteg mintája került be a vizsgálatba. Ezen betegek közül 342 esetben mind az LBC minta, mind a konizációs hisztológiai preparátum rendelkezésre állt. 150 további LCB minta a nőgyógyászati szűréseken megjelent populációból származott (5, 6. táblázat).

Az értekezésemben csak a CLDN1 és p16^{INK4a}-ra vonatkozó eredményeket, illetve számításokat ismertetem, ugyanis a HPV-re és ennek összefüggésére az immunmarkerekkel vonatkozó vizsgálatokat Dr. Benczik Márta értékelte és képezte értekezése anyagát. Dr. Benczik Márta közlése szerint, melyet értekezésében foglalt össze, "A HPV vizsgálathoz a DNS-t az AmpliLute Liquid Media Extraction kittel (Hoffmann-La Roche Ltd., Basel, Switzerland) preparáltuk 4 ml PreservCyt mintából. A Full Spectrum L1F/L1R-HPV tesztet alkalmaztuk a HPV fertőzés kimutatására és genotipizálásra."

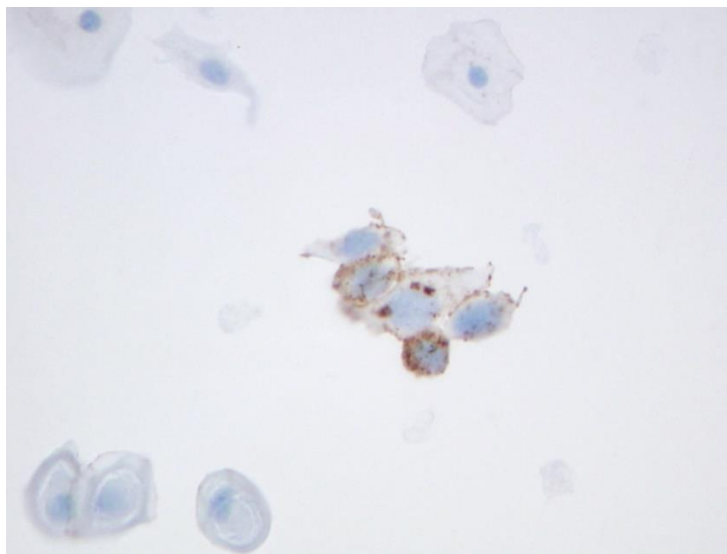
5. táblázat A CLDN1 és p16^{INK4a} immunreakciók mintaszámai

IC=immuncitokémia, IH=immunhisztokémia (*Dr. Benczik Márta értekezésében szereplő táblázat alapján került összeállításra*). A továbbiakban csak az immunreakciók eredményeire térek ki. A HPV vizsgálat eredményei (sötétszürkével jelölve), ennek értékelése és összefüggése az immunreakciók eredményeivel Dr. Benczik anyaga és értekezésében szerepel, ezt nem ismertetem. (*Benczik M, Galamb Á. et al. (2016) Pathol Oncol Res, 22:179-188*)

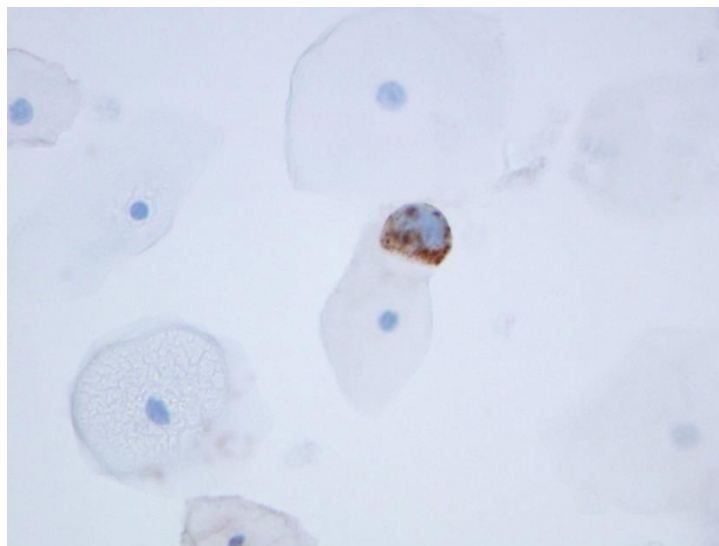
	Hisztológia	Citológia	HPV	IC-p16INK4a	IC-CLDN1	IH-p16INK4a	IH-CLDN1
összes vizsgálat	342	458	452	202	194	288	280
statisztikára alkalmas minta	291	395	395	172	172	261	261
hisztológia eredménnyel		291	279	162	162	239	239
citológia eredménnyel	291		395	158	158	210	210
HPV eredménnyel	279	395		172	172	195	195

Az elvégzett immuncitokémiai reakciók szerint, a CLDN1, erős membranózus reakciót adott, mely DAB kromogént használva, barna színben látható (14. ábra). A p16 immunreakció a kóros sejtek citoplazmájában mutat barna színreakciót (15. ábra). Mindkét reakció után jól látható, hogy a morfológiai eltérést nem mutató cervikális laphámsejtek nem reagálnak az immunreakcióban, kékes színben festődnek. A környező sejtörmelék (valószínűleg széteső sejtek) nem adnak aspecifikus reakciót (14. ábra).

14. ábra. Claudin-1 LBC cervix preparátumban (**a, b**). A cervicalis hámsejtek halványan festődnek. A CLDN1 pozitivitást mutató diszplasztikus sejtek membánján barna festődés látható, mely néhol pontozott. (CLDN1 immunhisztokémiai reakció, DAB kromogén, hematoxylin festés, 250x)

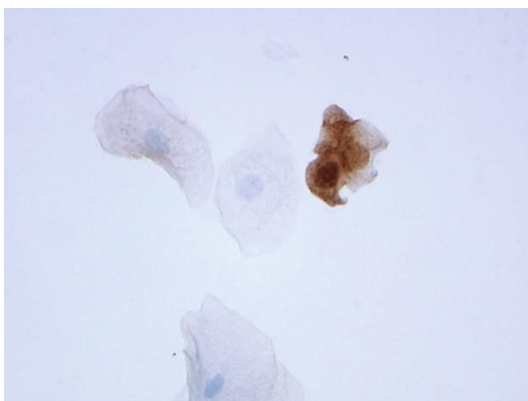


14.a ábra

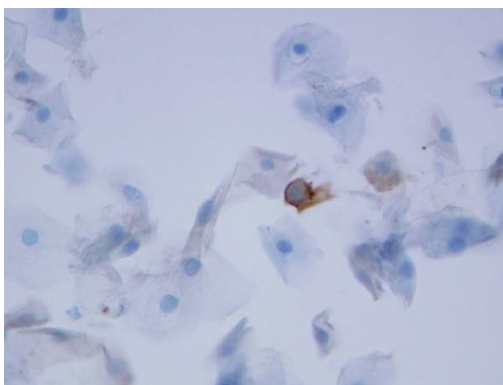


14.b ábra

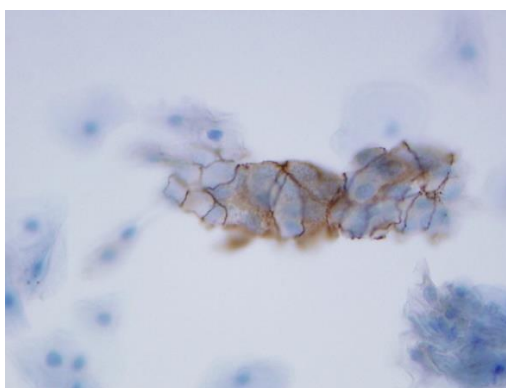
15. ábra. P16^{INK4a} (a) és CLDN1 (b, c) immuncitokémiai reakció LBC lemezekén. A barna színreakció jelzi a pozitív sejteket. (DAB kromogén, 250x)



15.a ábra



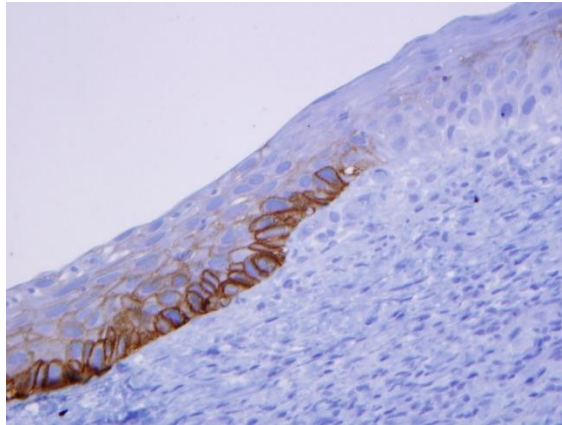
15.b ábra



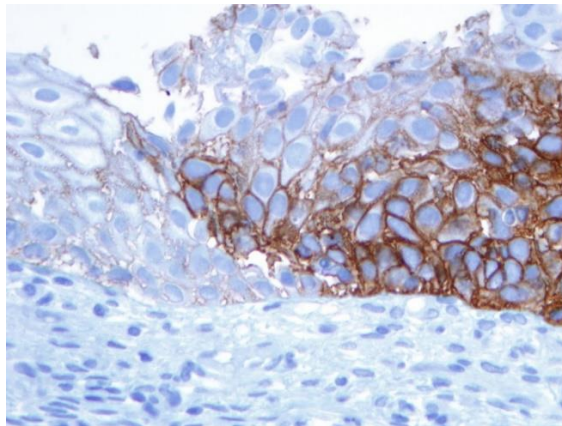
15.c ábra

Az immunhisztokémiai reakciók erős membrán pozitivitást mutattak CLDN1-ellenes antitestet használva (16. ábra), barna citoplazmatikus színreakció volt látható p16^{INK4a}-reakció után (17. ábra) CIN 2-3 esetekben, konizációs anyagban.

16. ábra. CLDN1 immunreakció konizátumban **(a, b)**. Erős barna színű membranózus reakció látható a diszplasztikus sejtekben CIN1-2-ben **(a)** és CIN2-3-ban **(b)**. (DAB kromogén, a:250x, b:400x)

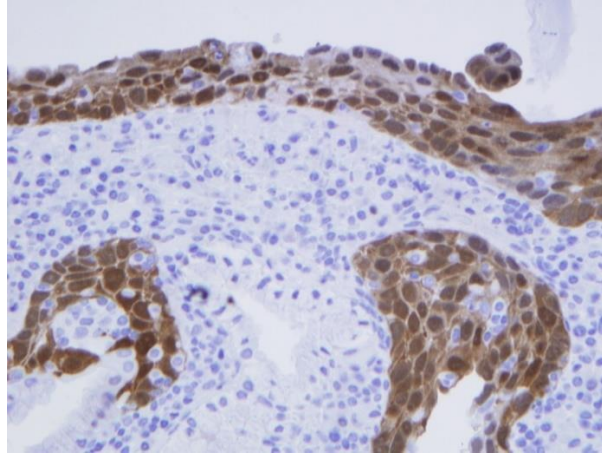


16.a ábra

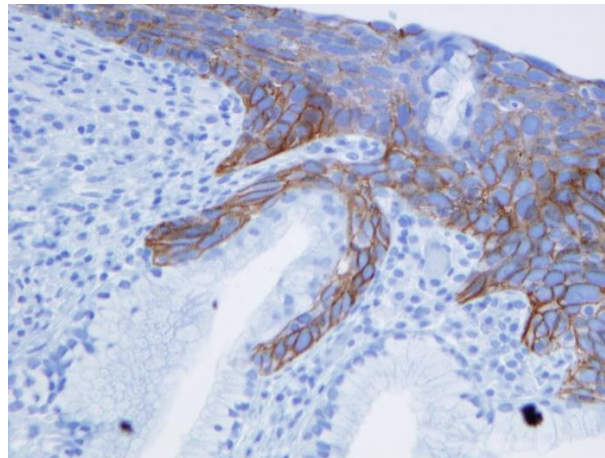


16.b ábra

17. ábra P16^{INK4} immunreakció konizátumban **(a)**, összehasonlítva CLDN1 immunreakcióval **(b)**. A barna citoplazmatikus reakció jelzi a pozitív sejteket P16^{INK4a} reakcióban **(a)**, membranózus reakció látható CLDN1 reakció után **(b)** CIN2-3-ban. (DAB kromogén, hematoxin festés, 250x)



17.a ábra



17.b ábra

A statisztikai elemzések szerint a CIN2+ hisztológiai eredményeket végpontnak tekintve, az IC-CLDN1 szenzitivitása kissé magasabb volt, mint az IC-p16^{INK4a} érzékenysége [77,3 % (68,7-84,6) vs. 69,3 % (60,9-76,3)]. Az IC-CLDN1 specificitása azonban alacsonyabb volt, mint az IC-16^{INK4a} értéke [60,9 % (53,5-67,2) vs. 80,5 % (73,2-86,5)]. Összevetve a három teszt (citológia, IC-CLDN1, IC-16^{INK4a} adatait, az IC-CLDN1 szenzitivitása volt a legmagasabb a három teszt között, minimálisan meghaladva

a citológia érzékenységét. Specifitásban azonban a három között az utolsó helyen végzett a IC-p16^{INK4a} és citológia mögött (6. táblázat).

Az immunhisztokémia eredményeit vizsgálva az IH-CLDN1 szenzitivitása meghaladta az IH-p16^{INK4a} értékét (88,2 % vs 75,5 %), azonban specifitásban elmaradt mögötte (33,3 % vs 68,1 %) (6. táblázat). A fenti eredmények olyan kiegészítő teszt bevezetését tették szükségessé, melynek a specifitása jelentősen növelheti diagnosztikus értékét.

5. **táblázat** Az immunreakciók és citológia szenzitivitása és specifitása a CIN2+ hisztológia diagnózishoz, mint „gold standard”-hez viszonyítva

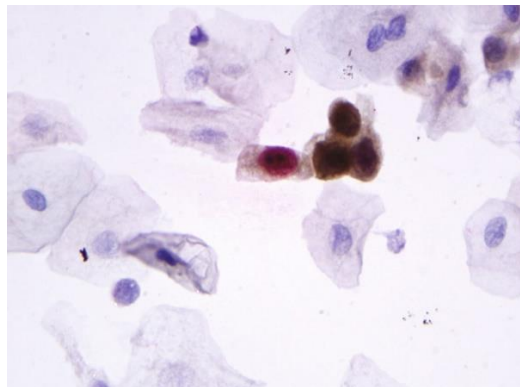
	Kiértékelési protokoll	
IC-CLDN1	szenzitivitás (95%CI)	77,3 % (68,7-84,6)
	specifitás (95%CI)	60,9 % (53,5-67,2)
IC-p16 ^{INK4A}	szenzitivitás (95%CI)	69,3 % (60,9-76,3)
	specifitás (95%CI)	80,5 % (73,2-86,5)
IH-CLDN1	szenzitivitás (95%CI)	88,2 % (81,7-93,2)
	specifitás (95%CI)	33,3 % (28,5-37)
IH-p16 ^{INK4A}	szenzitivitás (95%CI)	75,5 % (67-81,1)
	specifitás (95%CI)	68,1 % (62,6-73)
citológia	szenzitivitás (95%CI)	75,2 % (68,9-80,8)
	specifitás (95%CI)	66,5 % (61,1-71,2)

4.4. A CLDN1 és Ki67 kettős immunreakció eredményei citológiai és hisztológiai anyagban, összehasonlítása a CINtec®PLUS reakció eredményeivel

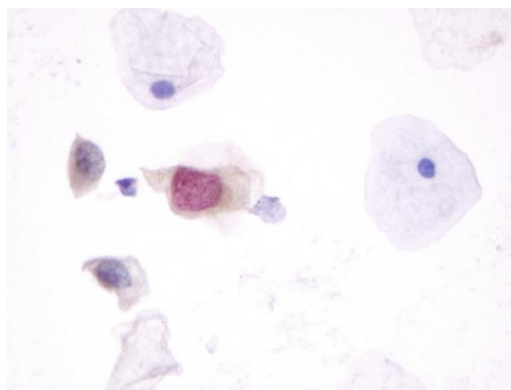
A korábbi vizsgálatok eredményei alapján, melyek a CLDN1-re, mint biomarkerre vonatkoztak, vetődött fel egy további biomarker, a Ki67 beépítése, mint kettős IC/IH reakció, a teszthe. Ezidőben került forgalomba a Roche cég CINtec®PLUS tesztje, mely ugyancsak kettős immunreakciót, a p16^{INK4a}-t és Ki67-t használ.

A vizsgálat első lépésében beállítottuk és értékeltük a CINtec®PLUS reakciót, melyről elsőként számoltunk be Magyarországon (18. ábra), (Sobel és mtsai, I. Interdiszciplináris HPV Kongresszus, Budapest, 2015).

18. ábra. CINtecPLUS reakció LBC preparátumban (a, b). A p16^{INK4a} barna színben, a Ki67 reakció a magban piros színben látható. A normális cervikális laphámsejtek nem adnak barna színreakciót. (Hematoxilin festés, 250x)



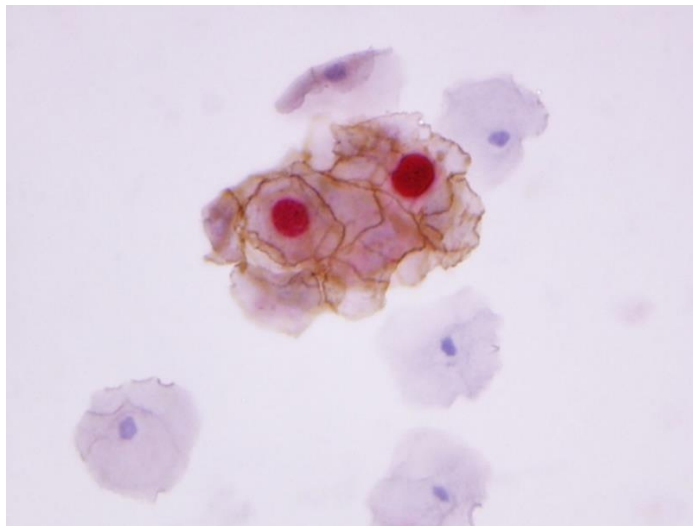
18.a ábra



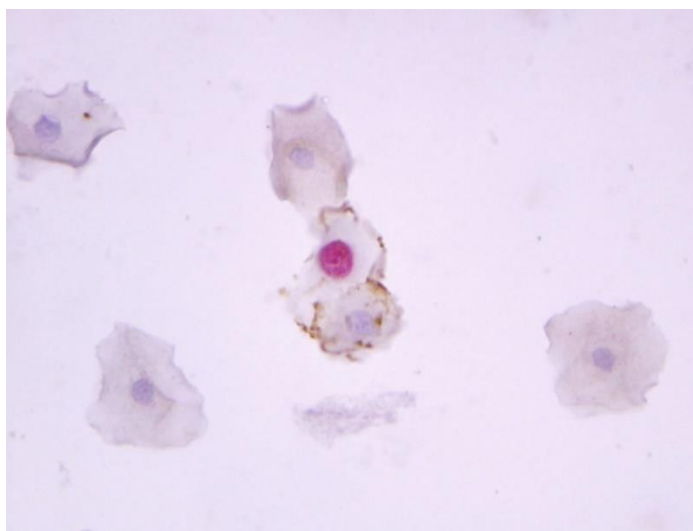
18.b ábra

Ezt követően állítottuk be a CLDN1/Ki67 kettős immuncitokémiai reakciót (19. ábra).

19. ábra (a, b) A CLDN1/Ki67 kettős immuncitokémiai reakció a pozitív sejtek membránját barna színnel festi, a magvak pirosak. (Hematoxilin festés, 250x)

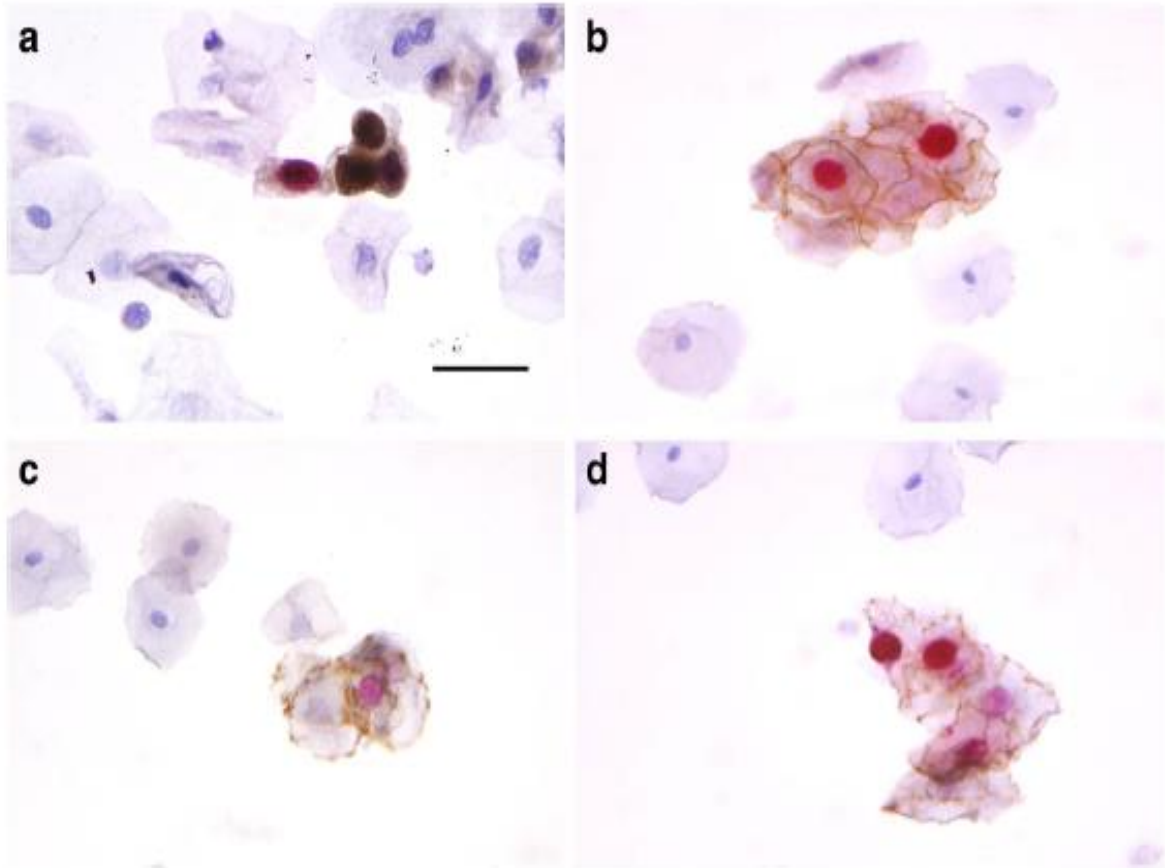


19.a ábra

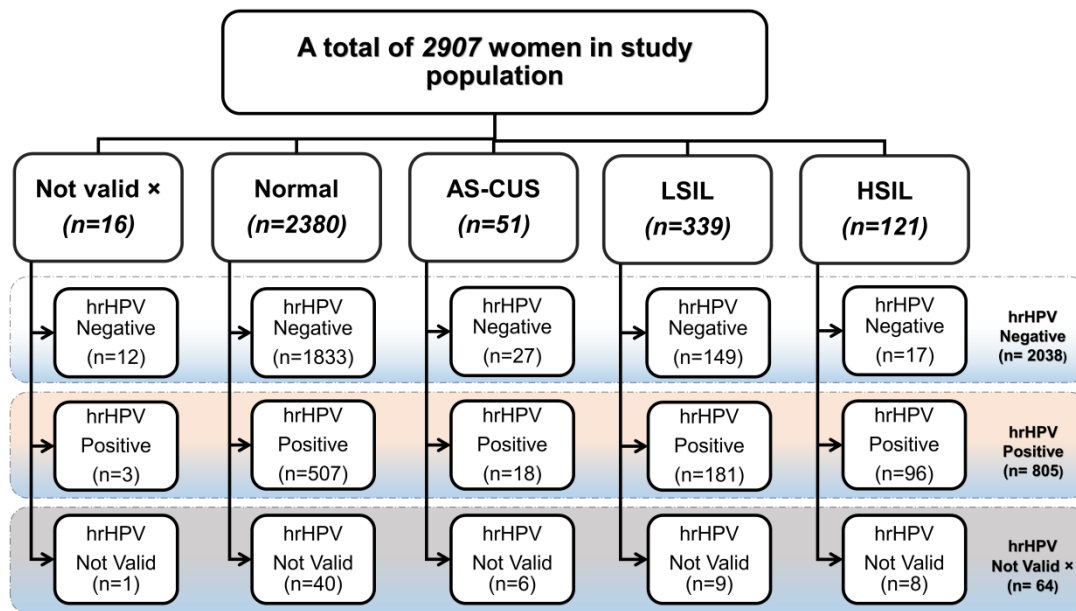


19.b ábra

A CINtec®PLUS és CLDN1/Ki67 reakció beállítása után párhuzamosan vizsgáltuk a LBC valamint hisztológiai mintákat a két kettős jelölésű immunreakcióval, melyek összehasonlító képét a 20. ábra mutatja (20. a, b, c, d ábra).



20. ábra. CINtec®PLUS (a), CLDN1 reakció (b, c, d) LBC mintákban. Nukleáris piros festődés és citoplazmatikus (a), valamint membranózus (b, c, d) barna reakció látható a kóros sejtekben. (Hematoxilin festés, scale: 35 μ m)



* „Not valid” means that the samples could not be evaluated for cytology; HPV testing

21. ábra A vizsgálatba bevont, LBC-val vizsgált populáció (Szekerczés T, Galamb Á et al. (2019) *Pathol Oncol Res*, 25:477-486.)

Mint a 21. ábrából látható, összesen 2907 citológiai mintát vontunk be a vizsgálatba, melyen a diagnózis szerinti megoszlás is fel van tüntetve. A minták jelentős része nem mutatott eltérést (2380 eset), AS-US 51, LSIL 339, HSIL 121 esetben volt diagnosztizálva. 16 esetben a mintákat nem lehetett értékelni. hrHPV 805 mintában volt jelen (GenoID eredménye). A vizsgálatba 63 hisztológiai minta került bevonásra (7. táblázat).

7. táblázat A hisztológiai minták diagnózis szerinti megoszlása (Szekerczés T, Galamb Á et al. (2019) *Pathol Oncol Res*, 25:477-486.)

Histological diagnosis	Number of cases	Average ages (yrs)	CINtec® PLUS		CLDN1/Ki67	
			Positive	Negative	Positive	Negative
Carcinoma in situ	7	40.57	7	0	7	0
HSIL (CIN 2 or 3)	30	33.50	30	0	30	0
LSIL (CIN 1)	3	42.33	0	3	0	3
No dysplasia, chronic cervicitis	23	35.61	0	23	0	23

CLDN1 claudin-1, HSIL high grade squamous intraepithelial lesion, LSIL low grade squamous intraepithelial lesion, CIN cervical intraepithelial neoplasia

4.5. A CINtec®PLUS és CLDN1/Ki67 citológiai és hisztológiai eredmények

összehasonlítása (Szekerczés T, Galamb Á et al. (2019) *Pathol Oncol Res*, 25:477)

A **CINtec®PLUS** reakciót 1596 LBC mintán végeztük el (8. táblázat). A pozitív reakció a korábban leírt barna citoplazmatikus és piros nukleáris reakció formájában látható (18. ábra). Az 1596 mintából 1386 adott értékelhető eredményt mind Pap teszttel, mind CINtec®PLUS reakcióval. 207 esetben valamelyik minta nem volt értékelhető.

8. táblázat A CINtec®PLUS reakció LBC mintákon (Szekerczés T, Galamb Á et al. (2019) *Pathol Oncol Res*, 25:477)

Liquid-based cytology (LBC)	CINtec® PLUS (n=1596)		
	Positive (n=317)	Negative (n=1072)	Not valid (n=207)
Normal (n=1226)	173	880	173
ASC-US (n=33)	8	20	5
LSIL (n=233)	62	151	20
HSIL (n=98)	72	20	6
Not Valid x (n=6)	2	1	3

* the highlighted section shows the number of acceptable cases by both Pap test and CINtec® PLUS (n= 1386)

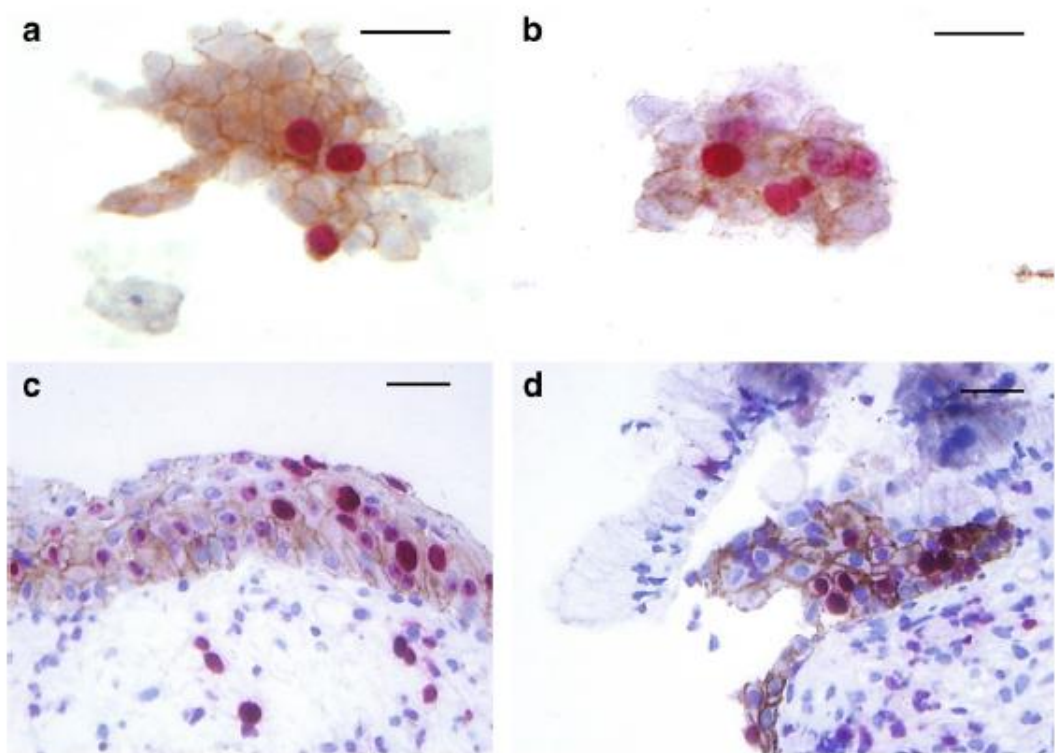
A **CLDN1/Ki67 citokémiai reakció** összesen 1358 esetben került elvégzésre, melyből 1159 adott elfogadható IC reakciót (9. táblázat). A pozitív sejtek a kettős reakcióban piros magi festődést és barna membrán-festődés mutattak (19, 20. ábra).

9. táblázat A CLDN1/Ki67 reakció LBC mintákon (Szekerczés T, Galamb Á et al. (2019) *Pathol Oncol Res*, 25:477)

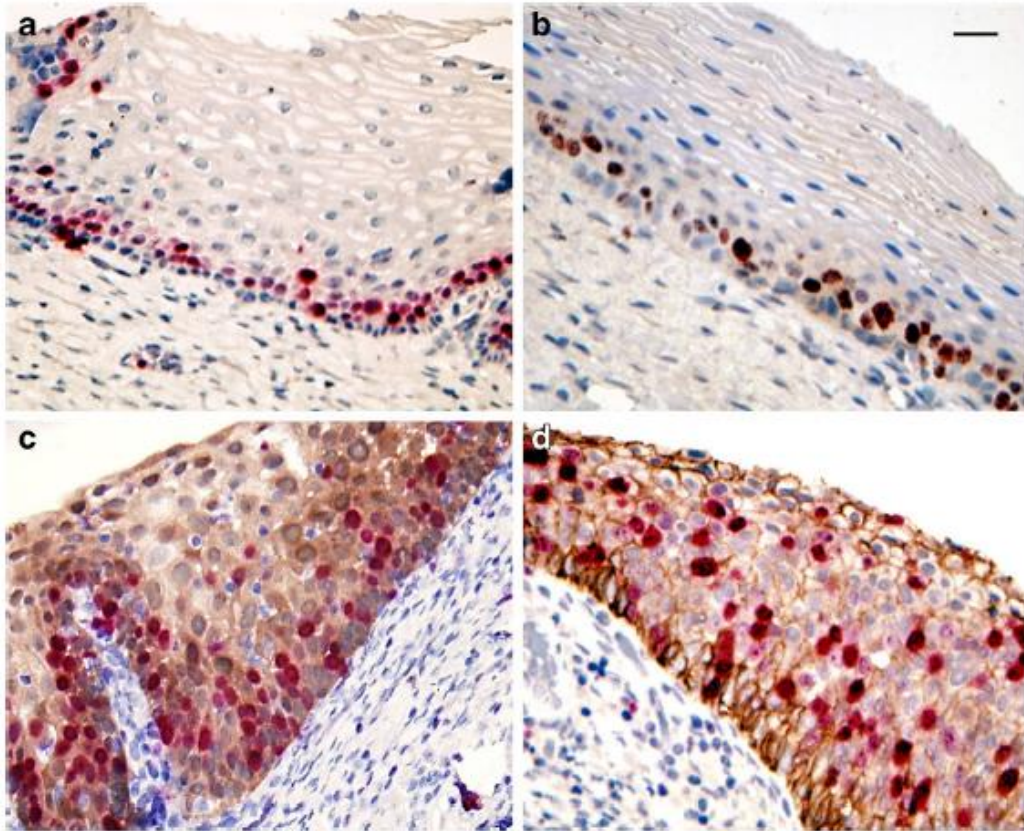
Liquid-based cytology (LBC)	CLDN1/Ki67 (n=1358)		
	Negative (n=962)	Positive (n=200)	Not valid (n=196)
Normal (n=1085)	803	117	165
ASC-US (n=25)	13	7	5
LSIL (n=186)	131	37	18
HSIL (n=56)	12	39	5
Not Valid x (n=6)	3	0	3

* the highlighted section shows the number of acceptable cases by both Pap test and CLDN1/KI67 (n= 1159)

A *CLDN1/Ki67 és CINtec®PLUS reakció* 63 hisztológiai mintán történt (22, 23. ábra). Mindkét teszttel a Ki67 pozitív magvak pirosak. Az CLDN1/Ki67 reakcióban a CLDN1 membranózis festődést mutat (22., 23.d ábra). A CINtec®PLUS reakcióval citoplazmatikus, barna színű reakció látszik a kóros hámban (23.c ábra).



22. ábra. CLDN1/Ki 67 reakció LBC mintákban (a, b) és hisztológiai metszeteken (c, d). A barna membánreakció a CLDN1-t jelöli, mely jól körülrajzolja a kóros sejteket mind az LBC mintákban (a,b), mind a hisztológiai metszetekben (c,d). A Ki67 piros nukleáris reakció formájában látható. (Hematoxilin festés, scale: 35µm).



23. ábra. CINtec[®]PLUS (a,c) és CLDN1/Ki67 (b,d) reakció normális cervikális hámban (a, b) és HSIL lézióban. A normál hámban csak a bazális sejtek magvai festődnek Ki67 reakció után (piros szín), HSIL lézióban a Ki67 reakció kiterjedt és ugyanazon sejtek citoplasmája p16^{INK4a} pozitív (barna szín, c), vagy „lépeshéz”-szerű membrán festődést mutat CLDN1 reakció után (d). (Hematoxilin festés, scale: 50 μ m)

A CLDN1/Ki67 és a CINtec[®]PLUS reakciók értékét viszonyítva a citológiai értékeléshez, mindkét reakció elfogadható volt 1097 esetben (10. táblázat). A két immunreakció megegyezett 1003 mintában (840 negatív, 163 pozitív, 94,1 %). A két reakció értéke megegyezett Kappa teszttel ($\kappa=0,724$: 95 % CI 0,672 – 0,776).

10. táblázat A CLDN1/Ki67 és CINtec®PLUS reakció összehasonlítása LBC mintákban
(Szekerczés T, Galamb Á et al. (2019) *Pathol Oncol Res*, 25:477)

CINtec® PLUS (n = 1352)	CLDN1/Ki67 (n=1352)		
	Positive (n=197)	Negative (n=959)	Not valid (n=196)
Negative (n=890)	25	840	25
Positive (n=267)	163	69	35
Not valid x (n=195)	9	50	136

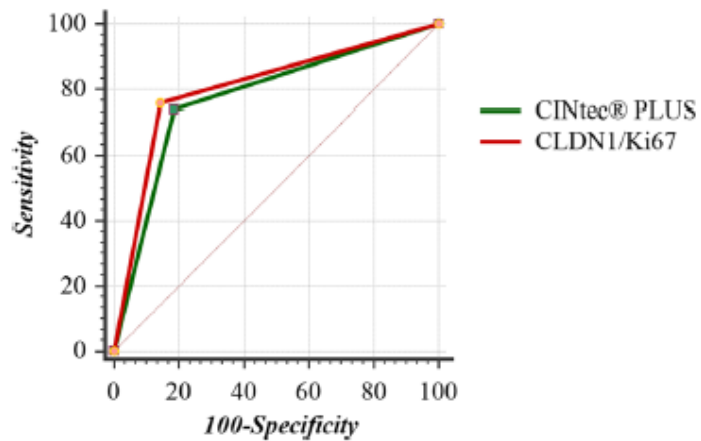
* the highlighted section shows the number of acceptable cases (n= 1097)

A két teszt teljesítménye, a citológiai értékelés és efficiencia értékek [szenzitivitás és specificitás, pozitív (PPV) és negatív érték (NPV)] a 11. táblázatban láthatók. Összegezve az olvasható le a táblázat értékeiből, hogy a két teszt között nem volt lényeges különbség a fenti paraméterekben. LSIL esetében ugyan kissé magasabb szenzitivitást mutatott a CINtec®PLUS, mint a CLDN1/Ki67 (40,28 vs. 35,07 %), de a specificitási értékei alacsonyabbak voltak (83,41 vs. 87,13 %). A HSIL esetében mind a szenzitivitás, mind a specificitás jó értéket ért el, 70-80 % között. A CLDN1/Ki67 kissé jobb szenzitivitást mutatott [76,00 % (95 % CI 61.83 %-86.94 %); specificitás 85,67 % (95 % CI 83,40 %-86,74 %)], mint a CINtec®PLUS (11. táblázat). (Szekerczés et al. 2019).

11. táblázat A CINtec®PLUS és CLDN1/Ki67 reakció szenzitivitása, specificitása, pozitív prediktív értékei (PPV) és negatív prediktív (NPV) értékei (Szekerczés T, Galamb Á et al. (2019) *Pathol Oncol Res*, 25:477)

a,				
CINtec® PLUS	Sensitivity	Specificity	Positive Predictive Value (PPV)	Negative Predictive Value (NPV)
ASC-US/ASC-US+ (95% CI)	39.21% (32.81% to 45.89%)	83.56 % (80.93% to 85.97%)	38.36% (32.07% to 44.95%)	84.05 % (81.43% to 86.42%)
LSIL/LSIL+ (95% CI)	40.28% (33.61% to 47.24%)	83.41 % (80.79% to 85.80%)	36.64% (30.43% to 43.19%)	85.43 % (82.90% to 87.72%)
HSIL (95% CI)	74.00% (59.66% to 85.37%)	81.38 % (78.88% to 83.69%)	15.95% (11.48% to 21.31%)	98.50 % (97.44% to 99.20%)
b,				
CLDN1/Ki67	Sensitivity	Specificity	Positive Predictive Value (PPV)	Negative Predictive Value (NPV)
ASC-US/ASC-US+ (95% CI)	34.36% (28.20% to 40.93%)	87.36 % (84.96% to 89.49%)	41.49% (34.37% to 48.89%)	83.61 % (81.04% to 85.96%)
LSIL/LSIL+ (95% CI)	35.07% (28.65% to 41.92%)	87.13 % (84.75% to 89.27%)	39.36% (32.33% to 46.73%)	84.93 % (82.43% to 87.19%)
HSIL (95% CI)	76.00% (61.83% to 86.94%)	85.67 % (83.40% to 87.74%)	20.21% (14.72% to 26.67%)	98.68 % (97.71% to 99.32%)

Receiver Operating Characteristic (ROC) görbe analízissal volt demonstrálható az immunreakciók teljesítménye közötti különbség (24. ábra). A görbék alapján nem volt szignifikáns különbség kimutatható közöttük, mivel a két teszt közti terület különbség 0,0317 volt.



24. ábra A két LCB immunreakció ROC analízis görbéi. A CLDN1/Ki67 (vörös) görbe enyhén magasabb, mint a CINtec®PLUS (zöld) görbe, de a kettő közti különbség nem szignifikáns ($p=0,177$) (Szekerczés T, Galamb Á et al. (2019) *Pathol Oncol Res*, 25:477)

4.6. A mikroRNS expresszió vizsgálata premalignus (HSIL, CIN2-3) mintákban

A vizsgálatra kiválasztott 22 beteg adatait a 12. táblázat mutatja. Retrospektív módon, a II. Sz. Patológiai Intézet archívumából 22 olyan formalinban fixált, paraffinba ágyazott (FFPE) blokkot választottunk, amelyben a diagnózis CIN2-3/HSIL volt. A betegek átlagéletkora 32,9 év volt. HPV-t a 22 mintából 17 esetben lehetett kimutatni, HPV16 13 esetben volt jelen, a GenoID Laboratóriumban végzett meghatározás alapján.

12. táblázat A HSIL(CIN2-3)-ben szenvedő betegek kora és HPV fertőzöttsége

No	Kor (év)	HPV típus
1	31	16 ⁺
2	30	16 ⁺
3	38	Negativ
4	25	16 ⁺
5	44	16 ⁺
6	32	Negativ
7	34	33 ⁺
8	27	16 ⁺
9	30	Negativ
10	32	58 ⁺
11	23	16 ⁺
12	25	16 ⁺ ; 31 ⁺ ; 33 ⁺
13	35	18 ⁺
14	28	16 ⁺ , 66 ⁺ , 45 ⁺ , 59 ⁺
15	35	16 ⁺
16	34	Negativ
17	43	16 ⁺ , 18 ⁺
18	36	16 ⁺
19	43	Negativ
20	22	16 ⁺
21	35	LR ⁺ and 56 ⁺
22	42	16 ⁺
átlag:	32.9	

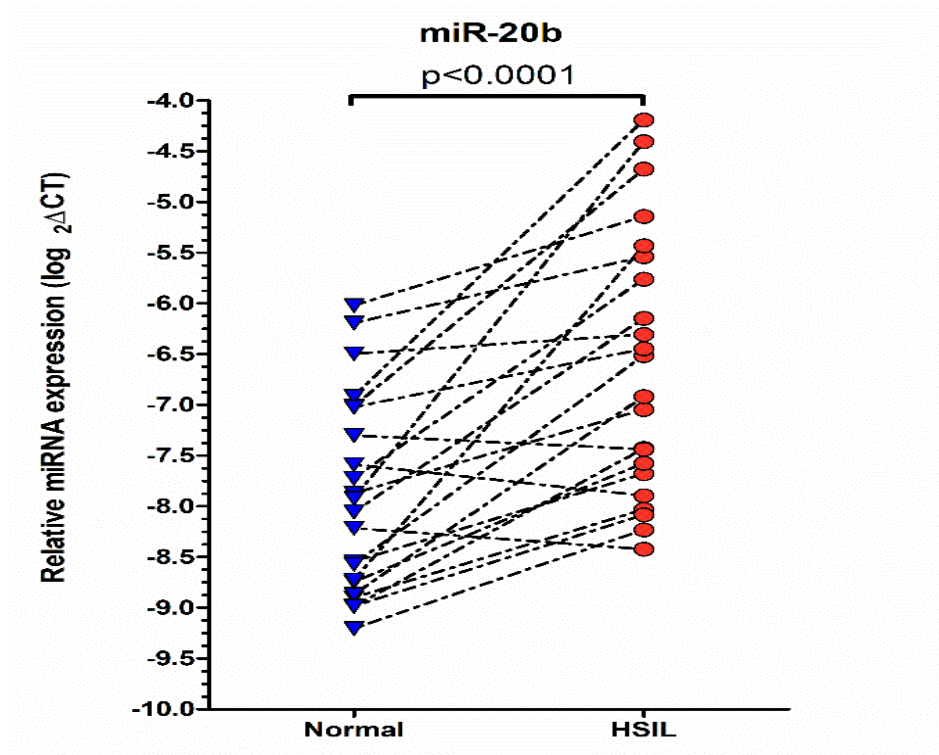
A módszertani fejezetben leírt módon, (3.2.4. fejezet) mikrodisszekcióval vágtuk ki a mintákból a kóros területeket, valamint az alterációt nem mutató, morfológiailag épnek tűnő hámterületet. A 13. táblázatban felsorolt 9 miRNS-t vizsgáltuk.

A statisztikai analízishez a nem parametrikus Wilcoxon Matched Pairs Test, STATISTICA software, version 12-t (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA) használtuk. A szignifikancia p értéke 0,05 volt.

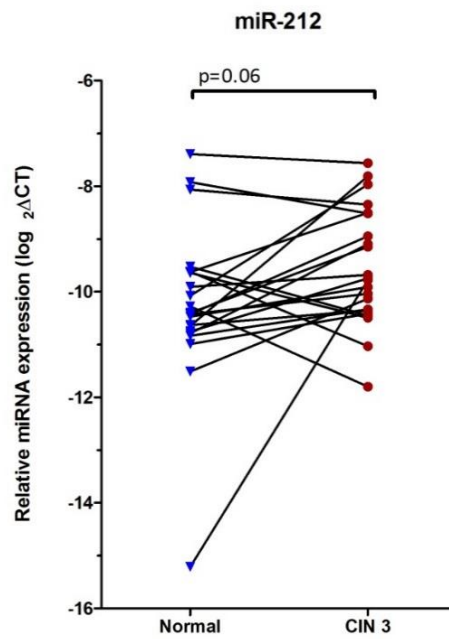
13. táblázat A vizsgálatban kimutatásra került mikroRNS-k

Assay ID	miRNS
001014	hsa-miR-20b
000437	hsa-miR-100
000469	hsa-miR-147
000515	hsa-miR-212
000402	hsa-miR-24
000405	hsa-miR-26a
000413	hsa-miR-29b
002369	hsa-miR-515-3p
000435	hsa-miR-99a
Referencia:	
001006	RNU48
001973	U6

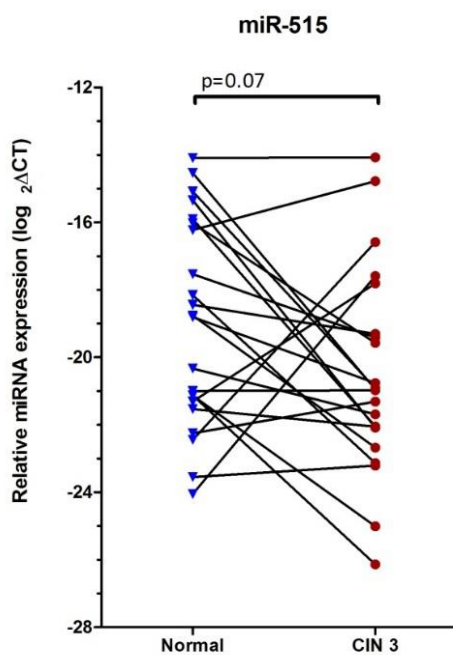
A HSIL és környező normál hám között a **miR-20b** esetében tudunk szignifikáns különbséget kimutatni ($p < 0,0001$, 25. ábra). A miR-212 és a miR-515 esetében is volt különbség az egyes párok között, azonban ezek nem bizonyultak szignifikánsnak. ($p = 0,06$ és $p = 0,07$), (26.a,b ábra). A további, vizsgált miR-ek esetében nem volt különbség a mintapárok között.



25. ábra. Szignifikáns különbség ($p < 0,0001$) a HSIL/CIN3 (vörös pontok) és normális hám (kék háromszögek) között. A miR-20b upregulált a normális hámhoz viszonyítva.



26.a ábra. Különbség látható a miR-212 expressziójában, azonban ez nem szignifikáns ($p=0,06$) (piros pontok: HSIL, kék háromszögek: normál)



26.b ábra. Különbség látható a miR-515 expressziójában, azonban ez nem szignifikáns ($p=0,069$) (piros pontok:HSIL, kék háromszögek: normál)

14. táblázat Eltérést mutató mikro-RNS-ek

miRNA	p value
miR-20b	<0.0001
miR-212	0.06
miR-515	0.069

5. Megbeszélés

A méhnyakrák előfordulása és az ezzel összefüggő halálozás, bár némi csökkenést mutatott a világban, azonban ez számos országban nem következett be. Hazánkban is csökkent ugyan 10 éves átlagban mindkét mutató, azonban az elmúlt évek adatai, elsősorban az Országos Rákregiszter szerint, jelentős csökkenést nem mutattak. Szentirmay és mtsai (2017) szerint 2015-ben enyhe emelkedés is megfigyelhető volt az előfordulásban a 2009-ben regisztrált esetekhez viszonyítva, 980-ról 1200 esetre nőtt a betegségben szenvedők száma. A mortalitás ugyancsak növekedett, 400-ról 430-ra. 2018-ban az incidencia tovább nőtt, 1312-re, a mortalitás 499-re. A kor szerinti megoszlás is figyelemre méltó adatokat mutatott, a 45-49 év közötti korcsoportban észlelt magasabb esetszám (143) mellett, a 60-64 évek között is jelentős emelkedést észleltek (163 eset) (Országos Rákregiszter adatai, 2018). Mindez felhívja a figyelmet a méhnyakrák elleni küzdelem fokozásának szükségességére hazánkban.

A HPV kórokozó szerepének felismerése Harald zur Hausen és mtsai nevéhez fűződik, melyért 2008-ban Nobel-díjjal jutalmazták a professzort, alapvetően megváltoztatta szemléletünket a méhnyakrák patogenezise tekintetében. Jelenleg csaknem 200 (2015-ig 198) HPV típust azonosítottak (Arroyo Mühr et al. 2015). Az elkövetkező időszak intenzív kutatásai feltárták a méhnyakrák szempontjából különösen nagy kockázatú HPV (hrHPV) típusokat, melyekhez jelenleg 12 típust sorolnak (Arroyo Mühr et al. 2015). Világszerte kiterjedt epidemiológiai vizsgálatok detektálták ezen típusok előfordulását, eloszlását (Nicolás et al. 2020). Az átlagos női népességben, akiknek nem volt cervix abnormalitásuk, a HPV prevalencia 11-12 % szerinti bontásban a leggyakoribb fertőzés (Torres-Poveda et al. 2019 világszerte. Magunk a vizsgált 1155 páciensben 55,5 %-ban detektáltunk HPV pozitivitást. Ezen páciensek között hrHPV 38,5 %-ban fordult elő. Ezen magas arány magyarázata az lehet, hogy a HPV Központban, a meghirdetett HPV tesztre elsősorban azon nőbetegek jelentkeztek, akiknek már valamilyen panaszuk volt, ezért érdeklődtek fokozottan a HPV teszt iránt, így népesség szempontjából az adatok nem mérvadók. A közelmúltban (2017-2018) Dr. Kósa Zsigmond vezetésével „Komplex népegészségügyi szűrések” elnevezésű kiemelt projekt részeként, HPV-szűrés zajlott hazánkban, melybe mintegy 4000 nőt vontak be a 25–65 év közötti korcsoportból, vidéki és fővárosi/nagyvárosi lakosságot, illetve

kisvárosi/faluban élőket (EFOP-1.8.1.). A még nem publikált adatok szerint, közülük 11,15 % bizonyult hrHPV pozitívnak, mely arány a fővárosban magasabb volt.

Csaknem minden közleményben a világon a **HPV16-t** találták a leggyakrabban előforduló kórokozónak a típus-specifikus megoszlásban méhnyakrákban (Munoz et al. 2003, Tjama et al. 2013, Torres-Poveda et al. 2019), 3,2 %, cervikális eltéréssel nem járó esetekben. Saját vizsgálatunkban is a HPV16-t találtuk leggyakoribbnak, bár az általunk vizsgált populációban magas volt a cervix abnormalitással járó esetek száma (Galamb és mtsai 2011). Ezen adatok megegyeztek a fent említett, Dr. Kósa irányította vizsgálattal is. Tanulmányunkban ezt a HPV51 és HPV31 követte, a Dr. Kósa-féle anyagban a HPV31, HPV51 és HPV58. A HPV genotípusok eloszlása azon eseteinkben viszont, melyek citológiai eltérést mutattak, a sorrend HPV16, HPV51, HPV31 és HPV18 volt. Számos közleményben a HPV18-as típus következik a második helyen a HPV16-t követően (Munoz et al. 2003, Tjalma et al. 2013, Torres-Poveda et al. 2019, Nicolás et al. 2020), mely azonban a mi vizsgálatunkban a 7. helyen volt a hrHPV gyakoriság szerinti eloszlásban. A citológiai eltéréssel járó esetekben viszont a HPV18 előbbre került, a 4. helyen állt vizsgálatainkban, mely hasonló a Tjalma és munkatársai (2013) által közölt, 2001-2008 között 17 országban (köztük Magyarország) keresztmetszeti vizsgálattal, mely a HPV18-t a 4. helyen találta CIN2-3 és adenocarcinoma esetén, azonban invazív cervikális carcinómában a HPV18 a második helyet foglalta el a gyakoriságban. Ezen adatok felhívják a figyelmet a HPV genotípusok eloszlásának különbözőségére a világ egyes régióiban, mely különösen a HPV-elleni vakcináció esetében lényeges. Ennek alapján hazánkban is a korábban populáció szintű oltásként bevezetett 2-komponensű (HPV16 és HPV18 ellenes) vakcina, mellyel a 12-13 éves lányokat oltották, a HPV16 mellett nem, vagy csak kis mértékben ad védelmet a többi hrHPV-vel szemben és a HPV18, a vakcina másik komponense csak a viszonylag ritkább előfordulású HPV18 ellen véd. Az új, 9 komponensű vakcina, mely 7 hrHPV komponenst tartalmaz (HPV16/18/31/33/45/52/58) és két lrHPV-t (HPV6/11), várhatóan nagyobb védettséget biztosíthat a HPV fertőzésekkel szemben (Guan et al. 2012, Joura et al. 2014).

A bevezetőben rámutattunk a citológia és a HPV-tesztek szenzitivitásában és specificitásában mutatkozó különbségekre, ami egyéb *biomarkerek* bevezetését indokolta a méhnyakszűrésbe (Benczik et al. 2013, 2016; de Freitas et al. 2013, Göcze et al. 2013, 2015, Tornesello et al. 2013, Isidean and Franco, 2014, Galamb et al. 2015,

Varga et al. 2017, Pardini et al. 2018, Wang and Chen 2018). Az u.n. cellularis biomarkerek közül kiemelkedett a **p16^{INK4a}** kimutatása, mint a fertőzött sejtek transzformációját jelző biomarker, melynek fokozott expresszióját HPV-asszociált daganatokban több közlemény igazolta és kiterjedten használják biomarkerként (Tringler et al. 2004, Carozzi et al. 2008, Kanthiya et al. 2016, Nikolás et al. 2020). A felszaporodott fehérje immunmódszerrel (immuncito- vagy immunhisztokémia) kimutatható, mint azt korábban bemutattuk. A HPV tesztről ismert ugyanis, hogy magasabb érzékenységgű a citológiával szemben, azonban specificitásban elmarad mögötte. Ennek oka elsősorban az, hogy a HPV fertőzések jelentős része átmeneti és a szervezet immunrendszere legyőzi a vírust, eliminálja, különösen fiatal nőkben és nem hoz létre transzformáló, perzisztens vírusfertőzést (Benczik et al. 2016). Több csoport javasolta a primer HPV DNS-alapú szűrés alkalmazását, melyet a hrHPV-pozitívknak bizonyult esetekben citológiai vizsgálat követ (Naucler et al. 2009, Rijkaart et al. 2012).

Munkacsoportunk korábban egy másik cellularis biomarker, a **claudin1 (CLDN1)** fokozott expresszióját mutatta ki a cervix premalignus és malignus elváltozásaiban (Sobel et al. 2005), valamint endometrialis carcinomában (Sobel et al. 2006, Szabó et al. 2009). Ezen vizsgálatok indították el a SE II. Sz. Patológiai Intézetben a claudinokkal kapcsolatos vizsgálatokat, melyek több, egyéb claudin altípus kóros expresszióját igazolták, a 26, emberben eddig identifikált claudin típus között. Több claudin, elsősorban a CLDN1 és CLDN4 fokozott expressziója volt kimutatható cholangiocarcinomában (Lódi et al. 2006), az emlőcarcinoma egyes típusaiban (Tőkés et al. 2005), pancreas carcinomában (Borka et al. 2007), oesophagus carcinomában (Gyórfy et al. 2005), pajzsmirigycarcinomában (Németh et al. 2010) és néhány egyéb tumorban. Ezen előzmények után indítottuk el azon vizsgálatokat, melyek a ***CLDN1 fokozott expressziójának kimutatását tűzték ki célul citológiai anyagban.***

Az immuncitokémiai vizsgálatok során a folyadékalapú citológiát alkalmaztuk (LBC) a „hagyományos” kenetek helyett, az Anyag és módszer fejezetben leírtak szerint. Ismert ugyanis, hogy a „hagyományos” keneteken több sejtréteg egymásra vetülhet, a vér és nyák zavarhatja az értékelést. Másrészt a tervezett vizsgálatokban több párhuzamos lemezre volt szükség, melyet az LBC technika tudott biztosítani. A vizsgálatok elkezdése előtt párhuzamosan nagyszámú (687) nőgyógyászati hagyományos kenetet és LBC mintát vettünk (valamint az LBC folyadékból HPV meghatározásra anyagot). A

bemutatott eredmények (4. sz. táblázat) alapján a Bethesda-szerinti értékelés szempontjából *nem volt különbség a kétféle módszer között*, bár a preparátumok minősége lényegesen jobb volt LBC-vel (egy sejtréteg, vér, nyák mentes minta). Az elemzések során azonban egyértelművé vált, hogy kiegészítő immuncitológiai vizsgálat végzése esetén az LBC minták készítésének (szükség szerint 3-4) meg kell előznie a HPV vizsgálatra, a sejtszuszpenziót tartalmazó edényből erre a célra kivett anyagot. Ennek oka, hogy kedvezőbb, ha a citológiai vizsgálatra „frissebb” anyag érkezik (a szuszpenzió 1-2 hétig +4C°-on tárolható, melyet ugyancsak teszteltünk), másrészt így az LBC-re jutó sejtszám magasabbnak bizonyult, különösen több lemez készítése esetén. A nőgyógyásznak is „alkalmazkodnia” kellett az új mintavételi technikához, azaz igyekeznie kellett nagyobb mennyiségű sejtet tartalmazó mintavételre. A HPV DNS vizsgálatot nem zavarta, ha később (1-2 hét után) érkezik vizsgálatra az anyag és a „maradék” minta elegendőnek bizonyult a HPV DNS meghatározására.

Az LBC lemezeken az első minta a diagnózis megállapítását szolgálta, mint erre már utaltunk. A második lemezen a **p16^{INK4a}** reakciót végeztük el, majd a harmadik lemezt használtuk a **CLDN1** kimutatására. A párhuzamos immuncitokémiai vizsgálatok a két teszt (p16 és CLDN1) értékének összehasonlítását szolgálták. Többen hangsúlyozzák, hogy egy új biomarker értékének a meghatározását, egy már elfogadott teszthez kell viszonyítani (Denton et al. 2010, Galamb et al. 2015). Az eredmények alapján magas korreláció volt kimutatható a két biomarker között. Az egyezés a CLDN1 immunfestésben CIN2+ esetében 84,0 % (73,8-89,3) volt. A CIN2 negatív esetekben 69,0 % (59,6–75,8). Mindezek alapján megállapíthatjuk, hogy a CLDN1 potenciálisan a p16^{INK4a} értékének megfelelően teljesített a tesztben. Kiemelendő, hogy vizsgálatunkban a minták jelentős része (352 minta) olyan nőktől származott, akik konizáción estek át, tehát a citológiai diagnózisok ellenőrzése hisztológiai vizsgálattal is megtörtént, mint „gold standard”. Mindkét immunreakció esetében azonban nagy volt az olyan CIN2+ negatív léziók száma, melyek fals pozitív p16 reakciót és ugyancsak fals pozitív CLDN1 reakciót mutattak. A fenti eredmények igazolták, hogy a ***CLDN1 fokozott expressziója citológiai mintákban is kimutatható, és nem marad el a p16^{INK4a} eredményei mellett. Mindkét teszt azonban specificitásban gyengén teljesített a citológiai vizsgálathoz viszonyítva***, ami további, kombinált biomarkerek felé irányította a figyelmünket.

Benczik dr, a közösen publikált munkánkban (Benczik et al. 2016) a HPV DNS teszt eredményeit hasonlította össze az immuncitokémiai vizsgálatokkal. Megállapította, hogy az IC-CLDN1 a HPV teszttel összehasonlítva alacsonyabb szenzitivitást mutatott, hasonló specificitás értékekkel [szenzitivitás: IC-CLDN1 77,3 % (68,7-84,6) vs. HPV 95 % (89,9-97,7), specificitás: IC-CLDN1 60,9 % (53,5-67,2) vs. HPV 61,4 % (57,4-63,6)]. Megállapította viszont, hogy az IC-p16^{INK4a} még alacsonyabb szenzitivitást, azonban magasabb specificitást mutatott [szenzitivitás: 69,3 % (60,9-76,3), specificitás: 80,5 % (73,2-86,5)].

A további lépést vizsgálatainkban a kombinált „kettős” immunteszt alkalmazása jelentette, a CLDN1 reakciót követően alkalmazott Ki67 proliferációs markerrel kiegészített immunreakcióval, citológiai és hisztológiai anyagon. A bemutatott eredmények szerint összesen 2907 LBC mintát gyűjtöttünk össze a vizsgálathoz, melyeket Bethesda-rendszer szerint került értékelésre. Ezt követően a további lemezeken a CINtec[®]PLUS és CLDN1/Ki67 reakciót végeztük el, lehetőség szerint párhuzamosan. Pozitívnak azon sejteket tekintettük, melyek az adott tesztben ugyanazon sejtben lokalizált barna citoplazmatikus (p16), vagy membrán (CLDN1) és piros magi reakciót adtak.

A nagyszámú mintából 2380 normál citológiai képet mutatott. 51 esetben AS-CUS, 339-ben LSIL és 121 esetben HSIL volt a diagnózis. A CINtec[®]PLUS reakciót 1596 mintában tudtuk elvégezni, a CLDN1/Ki67 kettős immunreakciót 1358 mintán. Összevetve a két reakciót, azok az esetek kerültek be az összehasonlításba, melyek mind az értékelő citológia, mind a CINtec[®]PLUS és CLDN1/Ki67 reakciókkal egyaránt megfelelő minőségűeknek bizonyultak. A két teszt 1003 esetben megegyezett, ugyanis mindkettő negatív volt 840 mintában és 163 pozitív immuncitokémiai eredményt adott. Ez 91,4 %-os egyezést jelentett ($\kappa=0,724$, 95 % CI). A különbség becslését a ROC analízis is szolgálta, mely hasonló szintű egyezést mutatott. Az immunhisztológiai értékelés során a bevont 73 esetből (CIS:7, HSIL:30, LSIL:3, nincs dysplasia:23) teljes egyezés volt a CINtec[®]PLUS és CLDN1/Ki67 reakciók között.

Korábban utaltunk az egyes biomarkerek, kiemelten a p16, valamint a **p16/Ki67** kombinált kettős teszt alkalmazásának értékére, melynek alkalmazhatóságát multicentrikus, prospektív, paneurópai vizsgálatok (PALMS study) igazolták (Ikenberg et al. 2013, Possati-Resende et al. 2015, Wentzensen et al. 2015, Yu et al. 2016, Polman

et al. 2017). Ezen vizsgálatok szerint ezen teszt prediktív értéke meghaladta a HC2 HPV teszt értékét CIN2+ léziókban (Bergeron et al. 2015). Ugyancsak igazolták, hogy a p16/Ki67 reakció hrHPV perzisztálással is összefügg (Yu et al. 2016). Ennek tükrében értékelhető a saját vizsgálatunk, mely a CLDN1/Ki67 reakció teljesítését hasonlította össze a p16/Ki67 (CINtec[®]PLUS) reakcióval. A korábbi, csak p16 és CLDN1-re vonatkozó immunreakciók összehasonlítása vetette fel, hogy a két biomarker (p16 és CLDN1) hasonló értékű lehet. Mint előzőleg ismertettük, azonban mindkét teszt specificitása alulmaradt a citológiai vizsgálattal szemben. A claudinokkal kapcsolatban utaltunk korábban arra, hogy ezen sejtkapcsoló fehérjék expressziója hogyan módosulhat a daganatos átalakulás során. Az egyes claudinok fokozott expressziója nem feltétlenül „erősebb sejtkapcsolatot” jelent, hanem az egyes, TJ-t képező fehérjék egyensúlyának megváltozását, deregulációját, a funkció zavarát (Sobel et al. 2005, Szabó et al. 2009). Ez nemcsak a sejtkapcsolatokat, hanem egyes jelátviteli folyamatokat is érinti, ami sejtmorfológia változásokhoz is vezet (Furuse et al. 1998, Morin 2005, Soini 2005, Cunniffe et al. 2014, Akimoto et al. 2016). Az általunk észlelthez hasonló fokozott expresszió más nőgyógyászati daganatokban és egyéb szervek daganataiban is kimutatható (Győrffy et al. 2005, Lee et al. 2005, Lódi et al. 2006, Soini 2005, Szabó et al. 2009, Tőkés et al. 2005, English and Santin 2013). A CLDN1 megnövekedett expressziója például a nyelőcső laphám eredetű daganataiban (Győrffy et al. 2005), a CLDN4 cholangiocarcinómában (Lódi et al. 2006), prosztatata carcinómában (Szász et al. 2010) stb. is megfigyelhető volt.

A két kettős immuncitológiai teszt összehasonlításakor HSIL-citológiai eredményre vonatkoztatva a CLDN1/Ki67 szenzitivitása 76 %, specificitása 85,67 % volt. Ezen értékek a CINtec[®]PLUS esetében 74 %-os szenzitivitás, és 81,38 %-os specificitás voltak, amikor a Pap citológia eredményeire vonatkoztattuk az értékeket. Ennek alapján a CINtec[®]PLUS és a CLDN1/Ki67 fenti értékei nagyon közel álltak egymáshoz, köztük szignifikáns különbség nem volt megállapítható. Ehhez hozzá kell vennünk, hogy etikai szempontok figyelembevételével, a 3. lemezt használtuk a CLDN1/Ki67 reakció elvégzésére, mely kissé kevesebb sejtet tartalmazott. A 62 konizációval nyert hisztológiai esetet elemezve, a két kettős immunhisztokémiai teszt teljes egyezést mutatott. Mindez azt igazolta, hogy a CLDN1/Ki67 és a CINtec[®]PLUS

kettős immuntesztek immuncitokémiával és immunhisztokémiával hasonló eredményt nyújtanak mind szenzitivitásban, mind specificitásban.

Korábban Wentzsen és mtsai (2015) értékelték a p16/Ki67 immunreakciót a Pap citológiához viszonyítva. Tanulmányukban, a kettős festés alacsonyabb pozitivitást mutatott, mint a Pap citológia az AS-CUS tartományban. CIN2+-diagnózis esetén a kettős reakció szenzitivitása a citológiával megegyezett és magasabb specificitást mutatott.

Egy másik, 5 európai országban végzett vizsgálat során CIN2/CIN2+ mintákat vizsgáltak, melynek során a p16/Ki67 kettős festés AS-CUS-ban hasonló eredményt adott, mint a HC2 HPV teszt (Qiagen, Hilden, Germany), alacsonyabb volt LSIL-ben, de magasabb specificitású, mint a HC2 HPV teszt (Bergeron et al. 2015).

Figyelembe véve, hogy magunk hasonló eredményt értünk el a CLDN1/Ki67 teszttel, mint a CINtec[®]PLUS reakcióval, ez arra utal, hogy teljesítménye megfelelő lehet egy biomarker tesztként való használathoz. Ezt kiegészítik azok az eredmények, melyeket az immunhisztokémiai vizsgálatok során nyertünk. Ezen összehasonlító vizsgálatok azt mutatták, hogy *a CINtec[®]PLUS és a CLDN1/Ki67 reakció eredményei megegyeztek, azaz mindkét reakció megbízható biztonsággal jelölte a kóros sejteket.*

Az utóbbi években az epigenetikai vizsgálatok, mint a **miRNS expresszió változásának** a kimutatása, bővítették a lehetséges biomarkerek sorát, mely a méhnyakrák és rákelőző elváltozásainak területére is kiterjedt. Ennek jelentőségére magunk már korán felhívtuk a figyelmet összehasonlító közleményünkben (Galamb et al. 2015). Ezen munkában, áttekintve az irodalmat, csoportosítottuk az eddig közölt kóros miRNS expressziót mutató miRNS-eket méhnyakrákban és premalignus léziókban. Igen kiterjedt táblázatot mutattunk be, melyben 42 fokozottan expresszált és 40 csökkent expressziót mutató miRNS-re vonatkozó közlést találtunk az irodalomban. Mindezen adatok arra utaltak, hogy a miRNS-ek feltehetően fontos szerepet játszanak a karcinogenezisben, beleértve a méhnyakrákot is. Az értekezésben bemutatott munkák ezen irodalmi áttekintés és összefoglaló értékelés alapján indultak el. Megállapítottuk ugyanis, hogy a közölt eredmények során az összehasonlított minták, azaz a kóros és a „normál”, a közlemények többségében nem ugyanazon egyénekből származtak. A szerzők többsége méhnyakrákos betegek tumorait és más egyének normál méhnyakhám szövetét hasonlította össze (Nan et al. 2019). Ugyancsak a munkák többsége már

kialakult, invazív méhnyakrákot vizsgált, csak kevesen tanulmányoztak premalignus elváltozásokat (Göcze et al. 2013, 2015; Pardini et al. 2018). Ezért volt célunk olyan tanulmányt végezni, mely ugyanazon betegekből származó premalignus léziókat (CIN2-3/HSIL) hasonlít össze a környező, morfológiailag diszpláziát nem mutató hámmal. A lehető legpontosabb mintavétel céljából, a megfelelő minták szeparálását lézer mikrodisszekcióval végeztük. Hasonló módon feldolgozásra került anyaggal nem találkoztunk az irodalomban.

A munka során a feldolgozott *22 mintapárban*, melyben 9 miRNS expresszióját vizsgáltuk, a ***miR-20b jelentősen fokozott expresszióját*** találtunk (2,4x, $p < 0,0001$).

A miRNS-ek kis (18-25 nukelotid nagyságú) endogén, nem kódoló RNS molekulák, melyek, mint utaltunk rá a Bevezetésben, a génexpressziót posztranszkripció szinten befolyásolják, a messenger RNS (mRNS) szuppressziójával (Lendvai és mtsai 2010, Pardini et al. 2018). A 2015-ben megjelent közleményünkben (Galamb et al. 2015) még csak „1000-en felüli” miRNS-ről írtunk, azonban ez a szám 2019-re a miRBase database (www.mirbase.org) adatai alapján kb. 2500 humán miRNS-re nőtt és feltehetően ez a szám sem tekinthető véglegesnek. A miRNS-ek szövet-, szerv-, sejt- és „differenciáció”- specifikusak, ami azt jelenti, hogy a miRNS mintázat nagymértékben jellemzi a fentieket. Számos kóros folyamatban, különösen a karcinogenezisben, ez a mintázat megváltozhat, ami felhasználható lehet egyes folyamatok megértésében, sőt biomarkerként segítheti a diagnózis megállapítását. A miRNS-ek egy része „oncomir”-ként funkcionál, azaz onkogén, vagy szuppresszor hatást fejt ki a karcinogenezis során, attól függően, hogy a mRNS, melyhez kapcsolódik, milyen fehérjét szabályoz és az milyen funkciót tölt be a sejtben. A miRNS-ek ezen fokozott („up”) vagy csökkent („down”) regulációja/expressziója detektálható és potenciális tumormarkerként felhasználható lehet (Göcze et al. 2013, 2015, Gonzalez-Quintana et al. 2016, Torres et al. 2016, Laengsri et al. 2018, Liu et al. 2018, Pardini et al. 2018, Pedroza-Wang and Chen 2018, Nan et al. 2019).

Pardini és munkatársai (2018) a Pubmed database-ben 24 olyan tanulmányt találtak, melyben miRNS expressziót vizsgáltak méhnyakrákban és ezen vizsgálatok, megállapításuk szerint is „nagy variabilitást” mutattak. Áttekintve az egyes tanulmányokat, igen eltérő számú mintát, különböző típusú anyagokat (folyadék, szolid szövet, formalinban fixált, paraffinba ágyazott, fagyasztott) használtak a miRNS-k

vizsgálathoz. Ugyancsak nem volt egységes a szövettani diagnózis, azaz premalignus, vagy malignus elváltozás, mint kiindulási anyag, valamint eltérések voltak az izolálási technikákban is. Ezen tanulmányokban a *miR-20b* ismételten fokozottan expresszálnak bizonyult, *hasonlóan a mi vizsgálatunkhoz, melyben a CIN2-3/HSIL mintákban észleltük ezt, a beteg saját, normális cervikális laphám szövetéhez viszonyítva.*

A *miR-20b*-t a *miR-106a-363* klaszter kódolja, mely az X kromozómán helyezkedik el. Feedback hurkot mutattak ki az E2F1 és a *miR-20b_5p* között, ami a proliferációban és differenciációban érintett (Xu et al. 2019). Emlőrákban kimutatták, hogy a *miR20b* tumor szuppresszor hatása, az emlő carcinoma sejtek migrációját és invázióját gátolja (Xu et al. 2019). Mások azt igazolták, hogy a HPV E6 befolyásolja a *miR-20b*-t és elősegíti az inváziót méhnyakrákban, megcélözva a szöveti inhibitor metalloproteináz 2-t (Cheng et al. 2017).

Cheung et al. (2012) normál hámot, CIN és carcinoma mintákat hasonlítottak össze. 10 miRNS fokozott, 2 miRNS csökkent expresszióját észlelték a CIN léziókban. Ezek között a *miR-20b* és a *miR-9* fokozott expressziója mutatta a legnagyobb növekedést a CIN2/3-ban, a normális szövethez viszonyítva. Ez hasonló eredmény az általunk végzett tanulmányhoz, melyben a *miR-20b* expresszió jelentős növekedését észleltük CIN2/3 léziókban, a környező, nem diszplastikus hámmal viszonyítva.

Pereira és munkatársai (2010) tanulmányukban 25 szövetmintát használtak 281 miRNS-t tartalmazó microarray-vel vizsgálva. 8 miRNS progresszív csökkenést mutatott a CIN léziótól a carcinomáig, míg 5 növekedést. Li és munkatársai (2011) 18 mintát analizálva 31 csökkent és 17 fokozott miRNS expressziót észleltek, további validálás során a *miR-99a* és a *miR-29a* mutatott upregulációt. Liu és munkatársai (2018) 582 beteg mintáját vizsgálva 6 miRNS fokozott expresszióját találták méhnyakrákban és premalignus léziókban, azonban a kóros mintákat nem azonos betegekből származó hámmal hasonlították össze.

Más munkákban a *miR-218* expresszió csökkenését mutatták ki CIN2/3-ban és carcinomában és ezen miRNS antitumor aktivitásának szerepét vetették fel méhnyakrákban (Liu et al. 2020). A szerzők azt találták, hogy a *miR-218* fordítottan függ össze a tumor méretével és az érinvázióval. Mások alacsonyabb *miR-100* expressziót észleltek CIN3-ban, mint CIN1/2-ben (Li et al. 2010). Magunk nem találtunk szignifikáns különbséget a *miR-100* expresszióban a CIN2/3 és a normális hám között.

Korábban Göcze és mtsai (2015) a miR-27a progresszív növekedését találták CIN2/3-ban a CIN1-hez, valamint a laphámrákban, a CIN2/3-hoz viszonyítva. A szerzők alacsonyabb miR-34a szintet mértek CIN2/3-ban, a CIN1-hez és laphámrákban a CIN2/3-hoz viszonyítva (Göcze et al. 2015). Más kutatók a miR-101 szérumban mért szintjét javasolták biomarkerként, melynek változása megítélésük szerint összefügg a metasztázissal és a méhnyakrák prognózisával (Jiang et al. 2017), míg a miR-140-5p csökkenése méhnyakrákban rossz túléléssel függött össze (Su et al. 2016).

Göcze és munkatársai (2013) különbséget észlelt a miRNS expresszióban a méhnyak laphámrákja és az adenocarcinoma között. Több miRNS fokozott expresszióját detektálták laphámrákban, melyek közül több a HPV pozitív laphámrákokat jellemezte (miR-21, miR-27, miR-34a, miR-196a és miR-221), ellentétben az adenocarcinomákkal. Mások összefüggést találtak a miRNS expresszió és a hrHPV fertőzés között (He et al. 2016, Liu et al. 2018) és egy másik csoport adatai szerint összefüggés volt a HPV16 és HPV18 fertőzés és több miRNS fokozott, vagy csökkent szintje között (Wang et al. 2014, Virtanen et al. 2016, Cheng 2017).

A fentiek alapján, bár egyértelmű, hogy számos miRNS szabályozása érintett a cervikális karcinogenezisben, azonban a jelenlegi kép nem egyértelmű. Ugyancsak nem teljesen világos, milyen *mechanizmussal* befolyásolják a miRNS-ek a karcinogenezist. Egyesek a miR-224 kóros szabályozását találták, melynek közvetlen célpontja az EZH2 (Enhancer of zeste homolog 2), az egyik sejtproliferáció regulátor, mely tumor szuppresszorként hat (Yang et al. 2018). Mások azt találták, hogy a miR-202 csökkent carcinoma mintákban és annak fokozatával, stádiumával és a túléléssel is összefügg (Yi et al. 2016). In vitro igazolták, hogy a miR-202 a cyclin D1 proteint befolyásolja, melynek a sejtproliferációban van jelentős szerepe (Yi et al. 2016). Egy másik munkában azt mutatták ki, hogy a csökkent miR-140-5p expresszió rossz prognózissal jár és korrelál az inzulin-like growth factor 2 kötő proteinnel (IGF2BP1), amely a c-myc proto-onkogénnel való interakció révén hat (Su et al. 2016). A közelmúltban megjelent tanulmányban a miR-375 és miR-196a DNS metiláció-szabályozott deregulációját találták, mely a méhnyakrák progresszióját gyorsítja, az EGFR jelátviteli útvonal befolyásolása révén (Varghese et al. 2019).

Több csoport közölt adatokat a kóros miRNS detektálásáról nem-szolid szövetekben, így vérben, vaginális nyákban, nyálban, vizeletben stb. (Kawai et al. 2018, Berti et al. 2019). Kawai és munkatársai (2018) négy miRNS fokozott expresszióját mutatták ki cervikális nyákban, CIN 2/3, laphámrák és adenocarcinoma esetekben, melyet később ugyanazon beteg fagyasztott anyagában is igazoltak. Az általunk szignifikánsan emelkedettnek talált miR20b is köztük volt. A nem-szolid szövetekben talált miRNS-ek egy része az u.n. „Argonauta (AGO)” proteinnel asszociált, míg mások extracelluláris vezikulákban „széles diverzitásban” kerülhetnek szét és nemcsak sejtekben, hanem extracellulárisan is elhelyezkedhetnek (Berti et al. 2019). Ezen adatoknak a későbbiekben jelentősége lehet új biomarkerek alkalmazásában, mivel a testfolyadékokban, szekréciókban megjelenő miRNS-ek könnyebben hozzáférhetőek a diagnosztika szempontjából. Mindez hangsúlyozza a jelenleg még nem teljesen értett és feltárt miRNS szabályzás és a szöveteket, sejteket jellemző miRNS mintázat megismerésének a fontosságát normális és kóros körülmények között.

6. Következtetések

6.1. Az Első Magyar HPV Központ adatai alapján 2007-2011 között hazánkban, a vizsgált népességben a leggyakoribb a **HPV16, ezt követte a HPV31 és HPV51-es** típusok. Ezen adatokat később mások is megerősítették.

6.2. A **folyadékalapú (LBC) és „hagyományos” citológiai minták** Bethesda-rendszer szerinti értékelésének eredményei között **nem volt lényeges különbség**. A több lemez előállítását lehetővé tevő LBC az értékelés szempontjából előnyösebb és további immunhisztokémiai reakciók elvégzését teszi lehetővé.

6.3. A CLDN1 immuncitokémiai reakció segítségével - a hisztológiai metszetekhez hasonlóan - citológiai mintákban is lehetséges a kóros hám/daganatsejtek kimutatása a sejtfelszín festő színreakció formájában. A CLDN1 reakció eredményét összevetve a p16^{INK4a} immunreakcióval, nem volt lényeges különbség a kettő között. A statisztikai értékelések alapján azonban, bár a CLDN1 reakció szenzitivitása magasabb volt, de specificitása nem érte el a citológiai vizsgálatokét. Mindez arra utalt, hogy a **CLDN1 reakció alkalmazható a premalignus és malignus cervikális hámsejtek/tumorsejtek kimutatására**, azonban a specificitás további javítást igényel.

6.4. Ki67 proliferációs marker alkalmazása CLDN1 reakciót követően, kettős immunreakcióban, mind szenzitivitásban, mind specificitásban azonos eredményt adott a p16/Ki67 (CINtec[®]PLUS) reakció eredményeivel. Ez azt igazolta, hogy a **CLDN1/Ki67 kettős immunreakció megfelelő a transzformált cervikális sejtek detektálására, hasonló szenzitivitású és specificitású, mint az összehasonlításként alkalmazott p16/Ki67 (CINtec[®]PLUS) teszt**. Ez a jövőben új molekuláris teszt kifejlesztését eredményezheti a méhnyakrák citológiai és hisztopatológiai diagnosztikájában.

6.5. A **mikroRNS** expresszió változásainak vizsgálata a cervix premalignus és malignus elváltozásaiban ellentmondásos adatokat szolgáltatott az irodalomban. Jelen eredményeink alapján a **miR-20b jelentősen fokozott expressziót** mutatott CIN2-3 (HSIL)-ban a környező, azonos betegekből származó normál hámhoz viszonyítva ($p < 0,0001$). Ennek alapján a miR-20b a jövőben esetlegesen biomarkerként használható. Ezen adatainkkal hozzájárultunk egyes mikroRNS-k szerepének vizsgálatához a méhnyak karcinogenezisében.

6. Összefoglalás

A méhnyakrák a 4. helyen áll a nők daganatos megbetegedései között, melynek előfordulását a méhnyak citológiai módszerrel történő szűrésének bevezetése és a humán papilloma vírus (HPV) kórokozó szerepének felismerése csökkentette. A Semmelweis Egyetem II. Sz. Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikáján megalakult Első Magyarországi HPV Központban 1155 nőbeteget vizsgálva, munkatársaimmal igazoltuk, hogy a leggyakoribb a HPV16, majd a HPV 31 és HPV51, a HPV18 a 4. helyen áll ezen populációban. Ismert, hogy a citológiai vizsgálat, bár specificitása magas, szenzitivitása alacsony, míg a HPV nagy kockázati típusainak (hrHPV) kimutatása ezzel fordított képet mutat. Mindez szükségessé tette további „kiegészítő” biomarkerek bevezetését. A fentiek alapján határoztuk meg célkitűzéseinket, mely a méhnyakrák és rákelőtti (premalignus) elváltozások korai detektálására irányult.

Munkacsoportunk korábban hisztológiai anyagban igazolta, hogy a sejtfelszínen detektálható egyik sejtkapcsoló fehérje, a claudin-1 (CLDN1) fokozottan expresszálódik méhnyakrákban és premalignus elváltozásaiban. Ezen munka folytatásaként magunk kimutattuk 502 folyadék alapú (liquid based cytology – LBC) mintát használva, hogy a CLDN1 jól használható immuncitokémiai marker citológiai anyagban a transzformált sejtek jelölésére, azonban specificitása nem éri el a citológiai értékelését. A módszert továbbfejlesztve a CLDN1 reakciót egy proliferációs markerrel (Ki67) kombinálva, kettős immuncitokémiai és immunhisztokémiai módszert dolgoztunk ki (CLDN1/Ki67) és azt 2907 minta felhasználásával, LBC preparátumokban vizsgáltuk. Igazoltuk, hogy a CLDN1/Ki67 reakció mind specificitásban, mind szenzitivitásban megegyezik az összehasonlításként párhuzamosan alkalmazott CINtec®PLUS reakció eredményeivel, mely a jövőben új molekuláris teszt kifejlesztését eredményezheti. Az egyezést 63 hisztológiai mintán is igazoltuk.

22 mintapárban (CIN2-3/HSIL és környező hám) vizsgáltuk 9 mikroRNS (miR) expresszióját. Megállapítottuk, hogy a miR20b jelentősen ($p < 0,0001$) megemelkedett a kóros sejtekben, a környező, elváltozást nem mutató sejtekhez viszonyítva.

Mindezen vizsgálataink a méhnyakrák korai felismerésének új lehetőségeit és új biomarkerek alkalmazásának lehetőségét tárták fel.

7. Summary

Cervical cancer is the fourth most common cancer in women, the incidence of which has decreased owing to introduction of cervical cytology and HPV screening tests. At the First Hungarian HPV Center established at 2nd Department of Obstetrics and Gynecology of Semmelweis University, with my coworkers we examined a total of 1155 patients whose data showed that the most common HPV type is HPV16, followed by HPV31 and HPV51, and HPV18 stands fourth. It is known that the cytological test has high specificity but low sensitivity, whereas detection of the high risk HPV types (hrHPV) shows the reverse. Accordingly, the introduction of „complementary” biomarkers became necessary. Based on the above, our aim was the early detection and diagnosis of cervical cancer and the premalignant lesions.

Our team has previously revealed that the cell junction protein claudin-1 (CLDN1) shows increased expression in cervical cancer and precancerous lesions. Further to this, we have demonstrated in a collection of 502 liquid-based cytology (LBC) samples that CLDN1 is a good immunocytochemical marker suitable for labeling transformed cells in cytological specimens. Its specificity, however, does not reach that of cytological tests. We therefore used the Ki67 proliferation protein as a marker following CLDN1 reaction, producing a CLDN1/Ki67 double immunocytochemical reaction, which was examined in a total of 2907 LBC specimens. We found that the CLDN1/Ki67 reaction gave similar results regarding both specificity and sensitivity as did the CINtec[®]PLUS test that was used as a comparison. This finding may lead to the development of a new molecular test in the future. The found similar results were also confirmed in case of 63 histological samples.

Studying the expression of 9 microRNAs (miR) in 22 sample pairs (CIN2-3/HSIL and surrounding epithelium) were able to demonstrate that miR20b was significantly increased in abnormal cells ($p < 0.0001$) as compared to the surrounding normal cells.

Our studies support the possibility of new opportunities for the early detection of cervical cancer and for the application of new biomarkers.

9. Irodalomjegyzék

Akimoto T, Takasawa A, Murata M, Kojima Y, Takasawa K, Nojima M, Aoyama T, Hiratsuka Y, Ono Y, Tanaka S, Osanai M, Hasegawa T, Saito T, Sawada N. (2016) Analysis of the expression and localization of tight junction transmembrane proteins claudin-1, -4, -7, occludin and JAM-A, in human cervical adenocarcinoma. *Histol Histopathol*, 31:921-931.

Andersen CL, Jensen JL, Orntoft TF. (2004) Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res*, 64:5245-5250.

Anderson JM, Van Itallie CM. (2009) Physiology and function of the tight junction. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 1:a002584.

Arbyn M, Ronco G, Anttila A, Meijer CJ, Poljak M, Ogilvie G, Koliopoulos G, Naucler P, Sankaranarayanan R, Peto J. (2012) Evidence regarding human papillomavirus testing in secondary prevention of cervical cancer. *Vaccine*, 30 Suppl 5:F88-99.

Arroyo Mühr LS, Bzhalava D, Lagheden C, Eklund C, Johansson H, Forslund O, Dillner J, Hultin E. (2015) Does human papillomavirus-negative condylomata exist? *Virology*, 485:283-288.

Benczik M, Galamb Á, Koiss R, Kovács A, Járay B, Székely T, Szekerczés T, Schaff Z, Sobel G, Jeney Cs. (2016) Claudin-1 as a biomarker of cervical cytology and histology. *Pathol Oncol Res*, 22:179-188.

Benczik M, Galamb Á, Zinner B, Mikó M, Ács N, Jeney Cs, Sobel G. (2013) Új molekuláris biológiai módszerek és biológiai jelzők a méhnyakrák szűrésben. *Nőgyógy Onkol*, 18:63-67.

Bergeron C, Ikenberg H, Sideri M, Denton K, Bogers J, Schmidt D, Alameda F, Keller T, Rehm S, Ridder R. (2015) Prospective evaluation of p16/Ki-67 dual-stained cytology for managing women with abnormal Papanicolaou cytology: PALMS study results. *Cancer Cytopathol*, 123:373-381.

Bernard HU, Burk RD, Chen Z, van Doorslaer K, zur Hausen H, de Villiers EM. (2010) Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology*, 401:70-79.

Berti FCB, Salviano-Silva A, Beckert HC, de Oliveira BK, Cipolla GA, Malheiros D. (2019) From squamous intraepithelial lesions to cervical cancer: Circulating microRNAs as potential biomarkers in cervical carcinogenesis. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 1872:188306

Borka K, Kaliszky P, Szabó E, Lotz G, Kupcsulik P, Schaff Z, Kiss A. (2007) Claudin expression in pancreatic endocrine tumors as compared with ductal adenocarcinomas. *Virchows Arch*, 450:549-557.

Boyer SN, Wazer DE, Band V. (1996) E7 protein of human papilloma virus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway. *Cancer Res*, 56:4620-4624.

Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. (2018) Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*, 68:394-424.

Carozzi F, Confortini M, Dalla Palma P, Del Mistro A, Gillio-Tos A, De Marco L, Giorgi-Rossi P, Pontenani G, Rosso S, Sani C, Sintoni C, Segnan N, Zorzi M, Cuzick J, Rizzolo R, Ronco G. (2008) Use of p16-INK4A overexpression to increase the specificity of human papillomavirus testing: a nested substudy of the NTCC randomised controlled trial. *Lancet Oncol*, 9:937-945.

Cheng Y, Geng L, Zhao L, Zuo P, Wang J. (2017) Human papillomavirus E6-regulated microRNA-20b promotes invasion in cervical cancer by targeting tissue inhibitor of metalloproteinase 2. *Mol Med Rep*, 16:5464-5470.

Cheung TH, Man KN, Yu MY, Yim SF, Siu NS, Lo KW, Doran G, Wong RR, Wang VW, Smith DI, Worley MJ, Jr., Berkowitz RS, Chung TK, Wong YF. (2012) Dysregulated microRNAs in the pathogenesis and progression of cervical neoplasm. *Cell Cycle*, 11:2876-2884.

Crosbie EJ, Einstein MH, Franceschi S, Kitchener HC. (2013) Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet*, 382:889-899.

Cunniffe C, Brankin B, Lambkin H, Ryan F. (2014) The role of claudin-1 and claudin-7 in cervical tumorigenesis. *Anticancer Res*, 34:2851-2857.

Dahlstrand HM, Lindquist D, Björnest LL, Ohlsson A, Dalianis T, Munck-Wikland E, Elmberger G. (2005) P16^{INK4a} correlates to human papillomavirus presence, response to radiotherapy and clinical outcome in tonsillar carcinoma. *Anticancer Res*, 25:4375-4384.

Darragh TM, Colgan TJ, Cox JT, Heller DS, Henry MR, Luff RD, McCalmont T, Nayar R, Palefsky JM, Stoler MH, Wilkinson EJ, Zaino RJ, Wilbur DC. (2012) The Lower Anogenital Squamous Terminology Standardization Project for HPV-Associated Lesions: background and consensus recommendations from the College of American Pathologists and the American Society for Colposcopy and Cervical Pathology. *Arch Pathol Lab Med*, 136:1266-1297.

Denton KJ, Bergeron C, Klement P, Trunk MJ, Keller T, Ridder R, European CCSG. (2010) The sensitivity and specificity of p16(INK4a) cytology vs HPV testing for detecting high-grade cervical disease in the triage of ASC-US and LSIL pap cytology results. *Am J Clin Pathol*, 134:12-21.

English DP, Santin AD. (2013) Claudins overexpression in ovarian cancer: Potential targets for Clostridium perfringens enterotoxin (CPE) based diagnosis and therapy. *Int J Mol Sci*, 14:10412-10437.

Förster C. (2008) Tight junctions and the modulation of barrier function in disease. *Histochem Cell Biol*, 130:55-70.

de Freitas AC, Coimbra EC, Leitao MC. (2013) Molecular targets of HPV oncoproteins: potential biomarkers for cervical carcinogenesis. *Biochim Biophys Acta*, 1845:91-103.

Furuse M, Fujita K, Hiragi T, Fujimoto K, Tsukita S. (1998) Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol*, 141:1539-1550.

Galamb A, Benczik M, Zinner B, Vigh E, Baghy K, Jeney C, Kiss A, Lendvai G, Sobel G. (2015) Dysregulation of microRNA expression in human cervical preneoplastic and neoplastic lesions. *Pathol Oncol Res*, 21:503-508.

Galamb Á, Pajor A, Langmár Z, Sobel G. (2011) Az első magyarországi humán papillomavírus központ tapasztalatai 2007-2011). *Orv Hetil*, 152:1804-1807.

Göcze K, Gombos K, Juhász K, Kovács K, Kajtár B, Benczik M, Göcze P, Patczai B, Arany I, Ember I. (2013) Unique microRNA expression profiles in cervical cancer. *Anticancer Res*, 33:2561-2567.

Göcze K, Gombos K, Kovács K, Juhász K, Göcze P, Kiss I. (2015) MicroRNA expressions in HPV-induced cervical dysplasia and cancer. *Anticancer Res*, 35:523-530.

Gonzalez-Quintana V, Palma-Berre L, Campos-Parra AD, Lopez-Urrutia E, Peralta-Zaragoza O, Vazquez-Romo R, Perez-Plasencia C. (2016) MicroRNAs are involved in cervical cancer development, progression, clinical outcome and improvement treatment response (review). *Oncol Rep*, 35:3-12.

Guan P, Howell-Jones R, Li N, Bruni L, de Sanjose S, Franceschi S, Clifford GM. (2012) Human papillomavirus types in 115,789 HPV-positive women: a meta-analysis from cervical infection to cancer. *Int J Cancer*, 131:2349-2359.

Győrffy H, Holczbauer Á, Nagy P, Szabó Z, Kupcsulik P, Páska C, Papp J, Schaff Z, Kiss A. (2005) Claudin expression in Barrett's esophagus and adenocarcinoma. *Virchows Arch*, 447:961-968.

Gyugos M, Lendvai G, Kenessey I, Schlachter K, Halász J, Nagy P, Garami M, Jakab Z, Schaff Z, Kiss A. (2014) MicroRNA expression might predict prognosis of epithelial hepatoblastoma. *Virchows Arch*, 464:419-427.

He Y, Lin J, Ding Y, Liu G, Luo Y, Huang M, Xu C, Kim TK, Etheridge A, Lin M, Kong D, Wang K. (2016) A systematic study on dysregulated microRNAs in cervical cancer development. *Int J Cancer*, 138:1312-1327.

Ikenberg H, Bergeron C, Schmidt D, Griesser H, Alameda F, Angeloni C, Bogers J, Dachez R, Denton K, Hariri J, Keller T, von Knebel Doeberitz M, Neumann HH, Puig-Tintore LM, Sideri M, Rehm S, Ridder R, Group PS. (2013) Screening for Cervical Cancer Precursors With p16/Ki-67 Dual-Stained Cytology: Results of the PALMS Study. *J Natl Cancer Inst*, 105:1550-1557.

Isidean SD, Franco EL. (2014) Embracing a new era in cervical cancer screening. *Lancet*, 383:493-494.

Jeney C, Takacs T, Sebe A, Schaff Z. (2007) Detection and typing of 46 genital human papillomaviruses by the L1F/L1R primer system based multiplex PCR and hybridization. *J Virol Methods*, 140:32-42.

Jiang W, Pan J-J, Deng Y-H, Liang M-R, Yao L-H. (2017) Down-regulated serum microRNA-101 is associated with aggressive progression and poor prognosis of cervical cancer. *J Gynecol Oncol*, 28:e75.

Joura EA, Ault KA, Bosch FX, Brown D, Cuzick J, Ferris D, Garland SM, Giuliano AR, Hernandez-Avila M, Huh W, Iversen OE, Kjaer SK, Luna J, Miller D, Monson J, Munoz N, Myers E, Paavonen J, Pitisuttithum P, Steben M, Wheeler CM, Perez G, Saah A, Luxembourg A, Sings HL, Velicer C. (2014) Attribution of 12 high-risk human papillomavirus genotypes to infection and cervical disease. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 23:1997-2008.

Kanthija K, Khunnarong J, Tangjitgamol S, Puripat N, Tanvanich S. (2016) Expression of the p16 and Ki67 in cervical squamous intraepithelial lesions and cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*, 17:3201-3206.

Kawai S, Fujii T, Kukimoto I, Yamada H, Yamamoto N, Kuroda M, Otani S, Ichikawa R, Nishio E, Torii Y, Iwata A. (2018) Identification of miRNAs in cervical mucus as a novel diagnostic marker for cervical neoplasia. *Sci Rep*, 8:7070.

Laengsri V, Kerdpin U, Plabplueng C, Treeratanapiboon L, Nuchnoi P. (2018) Cervical cancer markers: Epigenetics and microRNAs. *Lab Med*, 49:97-111.

Lee JW, Lee SJ, Seo J, Song SY, Ahn G, Park CS, Lee JH, Kim BG, Bae DS. (2005) Increased expressions of claudin-1 and claudin-7 during the progression of cervical neoplasia. *Gynecol Oncol*, 97:53-59.

Lendvai G, Kiss A, Kovalszky I, Schaff Z. (2010) Eltérések a májbetegségek mikro-RNS-expressziós mintázatában. *Orv Hetil*, 151:1843-1853.

Lendvai G, Szekerczés T, Gyöngyösi B, Schlachter K, Kontsek E, Pesti A, Patonai A, Werling K, Kovalszky I, Schaff Z, Kiss A. (2019) MicroRNA expression in focal nodular hyperplasia in comparison with cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Pathol Oncol Res*, 25:1103-1109.

Li Y, Liu J, Yuan C, Cui B, Zou X, Qiao Y. (2010) High-risk human papillomavirus reduces the expression of microRNA-218 in women with cervical intraepithelial neoplasia. *J Int Med Res*, 38:1730-1736.

Li Y, Wang F, Xu J, Ye F, Shen Y, Zhou J, Lu W, Wan X, Ma D, Xie X. (2011) Progressive miRNA expression profiles in cervical carcinogenesis and identification of HPV-related target genes for miR-29. *J Pathol*, 224:484-495.

Liu SS, Chan KKL, Chu DKH, Wei TN, Lau LSK, Ngu SF, Chu MMY, Tse KY, Ip PPC, Ng EKO, Cheung ANY, Ngan HYS. (2018) Oncogenic microRNA signature for early diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia and cancer. *Mol Oncol*, 12:2009-2022.

Liu Z, Mao L, Wang L, Zhang H, Hu X. (2020) MiR-218 functions as a tumor suppressor gene in cervical cancer. *Mol Med Rep*, 21:209-219.

Lódi C, Szabó E, Holczbauer Á, Batmunkh E, Szijártó A, Kupcsulik P, Kovalszky I, Paku S, Illyés G, Kiss A, Schaff Z. (2006) Claudin-4 differentiates biliary tract cancers from hepatocellular carcinomas. *Mod Pathol*, 19:460-469.

Mineta K, Yamamoto Y, Yamazaki Y, Tanaka H, Tada Y, Saito K, Tamura A, Igarashi M, Endo T, Takeuchi K, Tsukita S. (2011) Predicted expansion of the claudin multigene family. *FEBS Lett*, 585:606-612.

Morin PJ. (2005) Claudin proteins in human cancer: promising new targets for diagnosis and therapy. *Cancer Res*, 65:9603-9606.

Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ. (2003) Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*, 348:518-527.

Naucler P, Ryd W, Törnberg S, Strand A, Wadell G, Elfgren K, Radberg T, Strander B, Forslund O, Hansson BG, Hagmar B, Johansson B, Rylander E, Dillner J. (2009) Efficacy of HPV DNA testing with cytology triage and/or repeat HPV DNA testing in primary cervical cancer screening. *J Natl Cancer Inst*, 101:88-99.

Nan P, Niu Y, Wang X, Li Q. (2019) MiR-29a function as tumor suppressor in cervical cancer by targeting SIRT1 and predict patient prognosis. *Onco Targets Ther*, 12:6917-6925.

Németh J, Németh Z, Tátrai P, Péter I, Somorácz Á, Szász AM, Kiss A, Schaff Z. (2010) High expression of claudin-1 protein in papillary thyroid tumor and its regional lymph node metastasis. *Pathol Oncol Res*, 16:19-27.

Nicolás I, Saco A, Barnadas E, Marimon L, Rakislova N, Fusté P, Roviroso A, Gaba L, Bunesch L, Gil-Ibanez B, Pahisa J, Diaz-Feijoo B, Torne A, Ordi J, del Pino M. (2020) Prognostic implications of genotyping and p16 immunostaining in HPV-positive tumors of the uterine cervix. *Mod Pathol*, 33:128-137.

Pardini B, De Maria D, Francavilla A, Di Gaetano C, Ronco G, Naccarati A. (2018) MicroRNAs as markers of progression in cervical cancer: a systematic review. *BMC Cancer*, 18:696.

Parkin DM, Bray F. (2006) Chapter 2: The burden of HPV-related cancers. *Vaccine*, 24 Suppl 3:S3/11-25.

Pedroza-Torres A, Fernandez-Retana J, Peralta-Zaragoza O, Jacobo-Herrera N, Cantu de Leon D, Cerna-Cortes JF, Lopez-Camarillo C, Perez-Plasencia C. (2016) A microRNA expression signature for clinical response in locally advanced cervical cancer. *Gynecol Oncol*, 142:557-565.

Pereira PM, Marques JP, Soares AR, Carreto L, Santos MA. (2010) MicroRNA expression variability in human cervical tissues. *Plos One*, 5:e11780.

Polman NJ, Uijterwaal MH, Witte BI, Berkhof J, van Kemenade FJ, Spruijt JW, van Baal WM, Graziosi PG, van Dijken DK, Verheijen RH, Helmerhorst TJ, Steenbergen RD, Heideman DA, Ridder R, Snijders PJ, Meijer CJ. (2017) Good performance of p16/ki-67 dual stained cytology for surveillance of women treated for high-grade CIN. *Int J Cancer*, 140:423-430.

Possati-Resende JC, Fregnani JHTG, Kerr LM, Mauad EC, Longatto-Filho A, Scapulatempo-Neto C. (2015) The accuracy of p16/Ki67 and HPV test in the detection of CIN2/3 in women diagnosed with ASC-US or LSIL. *Plos One*, 10:e0134445.

Rijkaart DC, Berkhof J, van Kemenade FJ, Coupe VM, Rozendaal L, Heideman DA, Verheijen RH, Bulk S, Verweij W, Snijders PJ, Meijer CJ. (2012) HPV DNA testing in population-based cervical screening (VUSA-Screen study): results and implications. *Br J Cancer*, 106:975-981.

Ronco G, Dillner J, Elfstrom KM, Tunesi S, Snijders PJ, Arbyn M, Kitchener H, Segnan N, Gilham C, Giorgi-Rossi P, Berkhof J, Peto J, Meijer CJ. (2014) Efficacy of HPV-based screening for prevention of invasive cervical cancer: follow-up of four European randomised controlled trials. *Lancet*, 383:524-532.

Safaeian M, Sherman ME. (2013) From Papanicolaou to papillomaviruses: evolving challenges in cervical cancer screening in the era of human papillomavirus vaccination. *J Natl Cancer Inst*, 105:1524-1526.

Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley PM. (1990) The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell*, 63:1129-1136.

Singh AB, Sharma A, Dhawan P. (2010) Claudin family of proteins and cancer: an overview. *J Oncol*, 2010:541957.

Sobel G, Páska C, Szabó I, Kiss A, Kádár A, Schaff Z. (2005) Increased expression of claudins in cervical squamous intraepithelial neoplasia and invasive carcinoma. *Hum Pathol*, 36:162-169.

Sobel G, Németh J, Kiss A, Lotz G, Szabó I, Udvarhelyi N, Schaff Z, Páska C. (2006) Claudin 1 differentiates endometrioid and serous papillary endometrial adenocarcinoma. *Gynecol Oncol*, 103:591-598.

Soini Y. (2005) Expression of claudins 1, 2, 3, 4, 5 and 7 in various types of tumours. *Histopathology*, 46:551-560.

Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M, Raab S, Sherman M, Wilbur D, Wright T, Jr., Young N, Forum Group M, Bethesda W. (2002) The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA*, 287:2114-2119.

Stanly M. (2006) Immun response to human papillomavirus. *Vaccine*, 24 S1:16-22.

Su Y, Xiong J, Hu J, Wei X, Zhang X, Rao L. (2016) MicroRNA-140-5p targets insulin like growth factor 2 mRNA binding protein 1 (IGF2BP1) to suppress cervical cancer growth and metastasis. *Oncotarget*, 7:68397-68411.

Szabo I, Kiss A, Schaff Z, Sobel G. (2009) Claudins as diagnostic and prognostic markers in gynecological cancer. *Histol Histopathol*, 24:1607-1615.

Szász AM, Nyírády P, Majoros A, Szendrői A, Szűcs M, Székely E, Tőkés AM, Romics I, Kulka J. (2010) Beta-catenin expression and claudin expression pattern as prognostic factors of prostatic cancer progression. *BJU Int*, 105:716-722.

Szekerczes T, Galamb A, Kocsis A, Benczik M, Takacs T, Martonos A, Jaray B, Kiss A, Jeney C, Nyiri M, Schaff Z, Sobel G. (2019) Dual-Stained Cervical Cytology and Histology with Claudin-1 and Ki67. *Pathol Oncol Res*, 25:477-486.

Szentirmay Z, Veleczki Z, Kasler M. (2017) Humán papillomavírus asszociált méhnyak-megbetegedések Magyarországon: epidemiológia és a HPV-típusok összefüggése a párhuzamosan végzett citológiai diagnózissal. *Orv Hetil*, 158:1213-1221.

Tjalma WA, Fiander A, Reich O, Powell N, Nowakowski AM, Kirschner B, Koiss R, O'Leary J, Joura EA, Rosenlund M, Colau B, Schledermann D, Kukk K, Damaskou V, Repanti M, Vladareanu R, Kolomiets L, Savicheva A, Shipitsyna E, Ordi J, Molijn A, Quint W, Raillard A, Rosillon D, De Souza SC, Jenkins D, Holl K. (2013) Differences in human papillomavirus type distribution in high-grade cervical intraepithelial neoplasia and invasive cervical cancer in Europe. *Int J Cancer*, 132:854-867.

Tornesello ML, Buonaguro L, Giorgi-Rossi P, Buonaguro FM. (2013) Viral and cellular biomarkers in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia and cancer. *Biomed Res Int*, 2013:519619.

Torres-Poveda K, Ruiz-Fraga I, Madrid-Marina V, Chavez M, Richardson V. (2019) High risk HPV infection prevalence and associated cofactors: a population-based study in female ISSSTE beneficiaries attending the HPV screening and early detection of cervical cancer program. *BMC Cancer*, 19:1205.

Tóké AM, Kulka J, Paku S, Szik Á, Páska C, Novák PK, Szilák L, Kiss A, Bögi K, Schaff Z. (2005) Claudin-1, -3 and -4 proteins and mRNA expression in benign and malignant breast lesions: a research study. *Breast Cancer Res*, 7:R296-305.

Tringler B, Gup CJ, Singh M, Groshong S, Shroyer AL, Heinz DE, Shroyer KE. (2004) Evaluation of p16INK4a and pRb expression in cervical squamous and glandular neoplasia. *Hum Pathol*, 35:689-696.

Tsukita S, Furuse M. (1999) Occludin and claudins in tight-junction strands: leading or supporting players? *Trends Cell Biol*, 9:268-273.

Varga N, Mozes J, Keegan H, White C, Kelly L, Pilkington L, Benczik M, Schaff Z, Sobel G, Koiss R, Babarczy E, Nyiri M, Kovacs L, Attila S, Kaltenecker B, Geresi A, Kocsis A, O'Leary J, Martin CM, Jeney C. (2017) The Value of a Novel Panel of Cervical Cancer Biomarkers for Triage of HPV Positive Patients and for Detecting Disease Progression. *Pathol Oncol Res*, 23:295-305.

Varghese VK, Shukla V, Jishnu PV, Kabekkodu SP, Pandey D, Sharan K, Satyamoorthy K. (2019) Characterizing methylation regulated miRNA in carcinoma of the human uterine cervix. *Life Sci*, 232:116668.

Virtanen E, Pietila T, Nieminen P, Qian K, Auvinen E. (2016) Low expression levels of putative HPV encoded microRNAs in cervical samples. *Springerplus*, 5:1856.

Wang S, Chen X. (2018) Identification of potential biomarkers in cervical cancer with combined public mRNA and miRNA expression microarray data analysis. *Oncol Lett*, 16:5200-5208.

Wang X, Wang H-K, Li Y, Hafner M, Banerjee NS, Tang S, Briskin D, Meyers C, Chow LT, Xie X, Tuschl T, Zheng Z-M. (2014) microRNAs are biomarkers of oncogenic human papillomavirus infections. *Proc Natl Acad Sci*, 111:4262-4267.

Wentzensen N, Fetterman B, Castle PE, Schiffman M, Wood SN, Stiemerling E, Tokugawa D, Bodelon C, Poitras N, Lorey T, Kinney W. (2015) p16/Ki-67 Dual Stain Cytology for Detection of Cervical Precancer in HPV-Positive Women. *J Natl Cancer Inst*, 107:1-8.

Wentzensen N, Schwartz L, Zuna RE, Smith K, Mathews C, Gold MA, Allen RA, Zhang R, Dunn ST, Walker JL, Schiffman M. (2012) Performance of p16/Ki-67 immunostaining to detect cervical cancer precursors in a colposcopy referral population. *Clin Cancer Res*, 18:4154-4162.

Xu H, Li W, Luo S, Yuan J, Hao L. (2019) Adipose derived stem cells promote tumor metastasis in breast cancer cells by stem cell factor inhibition of miR20b. *Cell Signal*, 62:109350.

Yang Y, Liu Y, Li G, Li L, Geng P, Song H. (2018) MicroRNA-214 suppresses the growth of cervical cancer cells by targeting EZH2. *Oncol Lett*, 16:5679-5686.

Yi Y, Li H, Lv Q, Wu K, Zhang W, Zhang J, Zhu D, Liu Q, Zhang W. (2016) miR-202 inhibits the progression of human cervical cancer through inhibition of cyclin D1. *Oncotarget*, 7:72067-72075.

Yu LL, Guo HQ, Lei XQ, Qin Y, Wu ZN, Kang LN, Zhang X, Qiao YL, Chen W. (2016) p16/Ki-67 co-expression associates high risk human papillomavirus persistence and cervical histopathology: a 3-year cohort study in China. *Oncotarget*, 7:64810-64819.

10. Saját publikációk jegyzéke

Galamb Á, Pajor A, Langmár Z, Sobel G. Az első magyarországi humán papillomavírus központ tapasztalatai (2007-2011). Orv Hetil 152: 1804-1807, 2011

Benczik M, **Galamb Á**, Zinner B, Mikó M, Ács N, Jeney Cs, Sobel G. Új molekuláris biológiai jelzők a méhnyakrák szűrésében. Nőgyógy Onkol 18: 63-67, 2013

Galamb Á, Benczik M, Zinner B, Vígh E, Baghy K, Jeney Cs, Kiss A, Lendvai G, Sobel G. Dysregulation of microRNA expression in human cervical preneoplastic and neoplastic lesions. Pathol Oncol Res 21: 503-508, 2015 **IF: 1,940**

Benczik M⁺, **Galamb Á**⁺, Koiss R, Kovács A, Járay B, Székely T, Szekerczés T, Schaff Zs, Sobel G, Jeney Cs. Claudin-1 as a biomarker of cervical cytology and histology. Pathol Oncol Res 22: 179-188, 2016 (+*megosztott első szerzők*) **IF: 1,736**

Szekerczés T⁺, **Galamb Á**⁺, Kocsis A, Benczik M, Takács T, Martonos A, Járay B, Kiss A, Jeney Cs, Nyíri M, Schaff Zs, Sobel G. Dual-stained cervical cytology and histology with Claudin-1 and Ki67. Pathol Oncol Res 25: 477-486, 2019 (+*megosztott első szerzők*) **IF: 2,433**

Szekerczés T⁺, **Galamb Á**⁺, Benczik M, Schlachter K, Kocsis A, Kiss A, Schaff Zs, Jeney Cs, Lendvai G, Sobel G. Increased miR-20b level in high-grade cervical intraepithelial neoplasia. Pathol Oncol Res (közlésre benyújtva 2020 február) (+*megosztott első szerző*) **IF: 2,433**

11. Köszönetnyilvánítás

Az értekezés zárásaként szeretném köszönetemet kifejezni témavezetőmnek, Dr. Sobel Gábor egyetemi docensnek, aki lehetővé tette, hogy pályám indulásakor csatlakozzak munkacsoportjához, és az azóta is töretlenül zajló közös munka eredményeképpen elkészítsem a munkámat. Munkám alatt iránymutatást adott, mindig számíthattam a segítségére.

Köszönöm a segítséget klinikánk igazgatójának Dr. Pajor Attila professzor úrnak, aki a humán papilloma vírusok jelentőségére felhívta a figyelmemet és munkánkat támogatta. Ugyancsak hálás vagyok Dr. Ács Nándor Professzor Úrnak, aki támogatott a kutatásomban és hasznos tanácsokkal látott el.

Hálával tartozom Dr. Schaff Zsuzsa Professzor Asszonynak, aki az összes, a II. Sz. Patológiai Intézetben zajló munka irányítójaként olyan feladatokkal látott el, amelyek hozzájárultak a témában való tudásom elmélyítéséhez, szakmai fejlődésemhez és tanácsaival hozzájárult az útközben felvetődő nehézségek leküzdéséhez.

Köszönetemet szeretném továbbá kifejezni Dr. Lendvai Gábor biológusnak, a Molekuláris Labor vezetőjének, Szekerczés Tímea PhD hallgató, biomérnöknek az együttes munkáért, és a statisztika elkészítésében nyújtott segítségével. Emellett köszönetet mondok Pekár Magdolna citológus és hisztológus szakasszisztensnek, aki a laboratóriumi munkák és technikai feladatok oroszlánrészét végezte.

Az első magyarországi humán papillomavírus központ tapasztalatai (2007–2011)

Galamb Ádám dr. ■ Pajor Attila dr.
Langmár Zoltán dr. ■ Sobel Gábor dr.

Semmelweis Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, II. Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika, Budapest

A humán papillomavírus (HPV) a XXI. század leggyakoribb nemi úton terjedő kórokozója. A daganatkeltő (onkogén) HPV-típusokkal történő fertőzés tehető felelőssé a méhnyakrák 99,7%-ának kialakulásáért. A megelőzésben döntő szerepe van a szűrésnek, amely a méhnyakrák előfordulását és halálózását bizonyítottan csökkentheti. Jelenleg 16 női HPV-centrum működik országszerte, amelyekben egységes irányelvek alapján végeznek szűréseket, tanácsadást és gondozást. Az első központot 2007 márciusában jelen közlemény szerzői hozták létre Budapesten, a Semmelweis Egyetem II. Számú Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikáján. *Betegek és módszerek:* A szerzők 1155 páciensnél végeztek HPV-tipizálást, a vírus DNS-ének PCR-módszerrel való kimutatásával. Vizsgálták, hogy ebben a nem válogatott népességben milyen arányban mutatható ki a HPV-vel való fertőzöttség, milyen a különböző genotípusok, illetve a magas kockázatú (onkogén) típusok aránya, milyenek a fenti mutatók korcsoportokra vetítve, valamint milyen arányban mutatható ki egyidejűleg citológiai eltérés. A szerzők a központban elvégzett szűrések adatait összehasonlították a fejlett országokban talált eredményekkel, és választ kerestek arra, vajon magasabb-e a vírussal való fertőzöttség aránya a hazai népességben. *Eredmények:* A páciensek 55,5%-ában volt kimutatható a vírus valamelyik típusa, 38,5%-ában az onkogén típusok egyike. A HPV-vel való fertőzöttség aránya a 15 és 25 év közötti korosztályban volt a legmagasabb (62,9%). A magas kockázatú típusok között a 16-os volt a leggyakoribb, 19,5%-os aránnyal. A magas kockázatú vírussal való fertőzöttség mellett 32,1%-ban fordult elő egyidejű citológiai eltérés, s ezek több mint kétharmadában (70,6%) több magas kockázatú típus egyidejű jelenlétét igazolták. A citológiai eltéréssel járó esetekben 32%-ban volt kimutatható a 16-os típus. *Következtetések:* A szerzők által vizsgált, nem válogatott népesség fertőzöttségének aránya meghaladja a nemzetközi adatokat. Figyelemre méltó a legfiatalabb korosztály magas fertőzöttségi aránya, valamint a több onkogén típusal való egyidejű fertőzöttséggel járó magasabb kockázat. A 16-os és a 18-as típus magas daganatkeltő képessége szembevetve az általunk vizsgált csoportban, de nem elhanyagolható az 51-es és a 31-es típus szerepe sem. Orv. Hetil., 2011, 152, 1804–1807.

Kulcsszavak: humán papillomavírus-fertőzés, méhnyakrák, rákmegelőző állapot, szűrés

Results of the first human papilloma virus center in Hungary (2007–2011)

Human papilloma virus (HPV) is the most common sexually transmitted infection in the 21st century. It has been established that infections with specific HPV types are contributing factors to cervical cancer. Approximately 99.7% of cervical cancers are associated with high risk HPV types. HPV testing plays an important role in the prevention, by decreasing the prevalence and the mortality of cervical cancer. There are 16 HPV-centers operating in Hungary, in which patients undergo HPV screening, cervical exams, and treatment based on standardized guidelines. *Patients and methods:* The first HPV-center was founded in 2007 in Budapest, at the 2nd Department of Obstetrics and Gynecology, Semmelweis University. This study aimed to define the presence and prevalence of HPV-DNA in the cervical swab samples obtained from patients in our center. Authors conducted to assess the age-specific-prevalence, and HPV type distribution, the associated cervical abnormalities, comparing our results with international data. *Results:* Overall 1155 woman underwent HPV-testing and genotyping, using polymerase chain reaction. Overall, 55.5% of patients had positive test for HPV DNA types, in which 38.5% for high-risk HPV DNA. Overall prevalence was the highest among females aged 15 to 25years (62.9%). The most common HPV type found was the high risk type 16 (19.5% among the patients with positive HPV testing). Presence of high risk HPV with concurrent cervical

cytological abnormality was in 32%. More than two-thirds of woman with cytological atypia (70.6%) were infected with two or more high risk HPV types. HPV 16 was detected in 32% of patients with cytological abnormalities. *Conclusions:* The results suggest that the prevalence of HPV in this study population exceeds the international data. The results attracts the attention the peak prevalence of the high risk types in the youngest age-group, and the higher risk of cervical abnormality in case of presence of two or more HPV types. The dominance of type 16 and 18 was predictable, but the strong attendance of type 51 and 31 among patients who had cytological atypia, was slightly surprising. *Orv. Hetil.*, 2011, 152, 1804–1807.

Keywords: human papillomavirus infection, cervical carcinoma, preblastomatosis, screening

(Beérkezett: 2011. szeptember 7.; elfogadva: 2011. szeptember 26.)

Rövidítések

ASCUS = (atypical squamous cell of undetermined significance) atípusos laphámsejtek nem meghatározható jelentőséggel; ASC-H = (atypical squamous cells, can not exclude high-grade squamous intraepithelial lesion) atípusos laphámsejtek, nem zárható ki H-SIL jelenléte; CIN = cervicalis intraepithelialis neoplasia; HPV = humán papillomavírus; H-SIL = (high grade squamous intraepithelial lesion) kifejezett intraepithelialis laphámelváltozás; L-SIL = (low grade squamous intraepithelial lesion) enyhe fokú intraepithelialis laphámelváltozás; PCR = (polymerase chain reaction) polimeráz láncreakció

A méhnyakrák világszerte a második leggyakoribb rosszindulatú betegség a fiatal nők között az emlő rosszindulatú daganata után. Évente 371 000 méhnyakrákot kórisméznek világszerte, és körülbelül 240 000 nő esik a betegség áldozatául. Az esetek 83%-a fejlődő országokra esik, ahol a női daganatok 15%-át teszi ki. A méhnyakrák előfordulása Európában kevesebb mint 15/100 000/év, míg a fejlődő országokban ennek a kétszerese (30/100 000/év) [1, 2, 3]. Magyarországon a Központi Statisztikai Hivatal adatai szerint évente 1500–1600 új esetet kórisméznek, és 500 beteg hal meg e betegség következtében. Hazánkban a halálozási átlag két-háromszorosa az európai átlagnak, és ezek az adatok 10 éve változatlanok. Az összes emberi daganat 6,7%-ának és a méhnyakrákok 99,7%-ának kialakulásáért az onkogén HPV (humán papillomavírus) -típusokkal való fertőzés tehető felelőssé [1].

A betegség megelőzésében döntő szerepe van a szűrésnek és a HPV tipizálásának, amely a méhnyakrák előfordulását és halálozását bizonyítottan csökkentheti [1]. Jelenleg 16 női HPV-központ működik országszerte, amelyekben egységes irányelvek alapján végeznek citológiai szűrést, HPV-tipizálást, szűkség esetén kezelést és tanácsadást. Az első központot 2007 márciusában hoztuk létre Budapesten, a Semmelweis Egyetem II. Számú Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikáján, amely azóta folyamatosan és eredményesen működik.

Vizsgált betegek és módszerek

Központunkban 2007 és 2011 között 1155 személynél végeztünk HPV-meghatározást, legtöbbször citológiai kenetvétellel egybekötve. A páciensek egy része saját esetleges HPV-fertőzöttségét kívánta felmérni, másik részénél a korábbi citológiai vizsgálat során HPV jelenlétének gyanúja merült fel, ezért kérték a vizsgálatot. Kisebb részben pozitív sejtkenet vagy már kóros szövettani lelet birtokában („posztoperatív tipizálás”) jelentkeztek a centrumban. A vírus DNS-ét a méhnyak váladékából vett mintából PCR-módszerrel mutatta ki a GenoID laboratórium. Vizsgáltuk, hogy ebben a nem válogatott népességben milyen arányban mutatható ki a HPV-vel való fertőzöttség, milyen a különböző genotípusok, illetve a magas kockázatú típusok aránya, és milyenek a fenti mutatók korcsoportokra vetítve. Megvizsgáltuk továbbá, hogy a HPV jelenléte mellett milyen arányban mutatható ki egyidejű citológiai eltérés, milyen fokúak az eltérések a Bethesda-osztályozás, illetve a sejtkenetek eltéréseivel járó esetekben, mely vírustípusok mutathatók ki és milyen arányban. Az alacsony kockázatú HPV-genotípusokat (például: 6, 11) és az úgynevezett „NA” (nem azonosítható) változatokat egy-egy közös csoportba soroltuk, az onkogén típusokat egyenként vizsgáltuk.

A központunkban elvégzett szűrések adatait összehasonlítottuk a fejlett ipari országokban mért eredményekkel, és választ kerestünk arra, vajon magasabb-e a vírussal való fertőzöttség aránya a hazai populációban.

Eredmények

A páciensek 55,5%-ában lehetett kimutatni a vírus valamely genotípusának DNS-ét, ebből 38,5%-ban az onkogén típusok egyike (is), a maradék 17%-ban pedig az alacsony kockázatú és a nem azonosítható típus volt jelen. Korcsoportokra vetítve a HPV-fertőzöttség a 15 és 25 év közötti korosztályban volt a legmagasabb (62,9%), de 50% feletti volt a 26 és a 45 év közötti

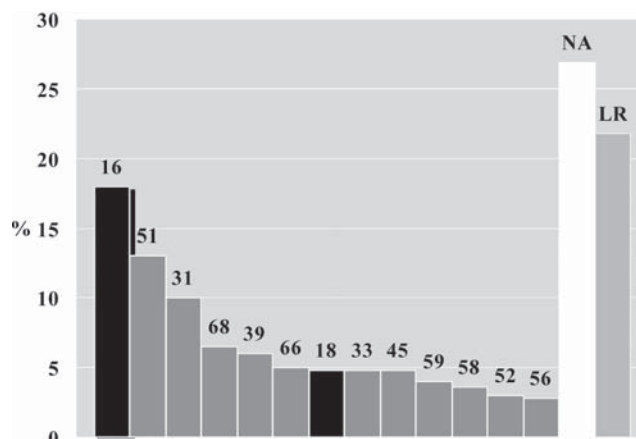
1. táblázat | HPV-pozitivitás korcsoportok szerinti bontásban (HPV: humán papillomavírus)

	Tipizálások száma	HPV-negatív (-)	HPV-pozitív (+)
Összes páciens	1155	44,5%	55,5%
15–25 év	251	37,1% (n = 93)	62,9% (n = 158)
26–45 év	792	43,8% (n = 347)	56,2% (n = 445)
46–55 év	88	70,4% (n = 62)	29,6% (n = 26)
56 év felett	24	50% (n = 12)	50% (n = 12)

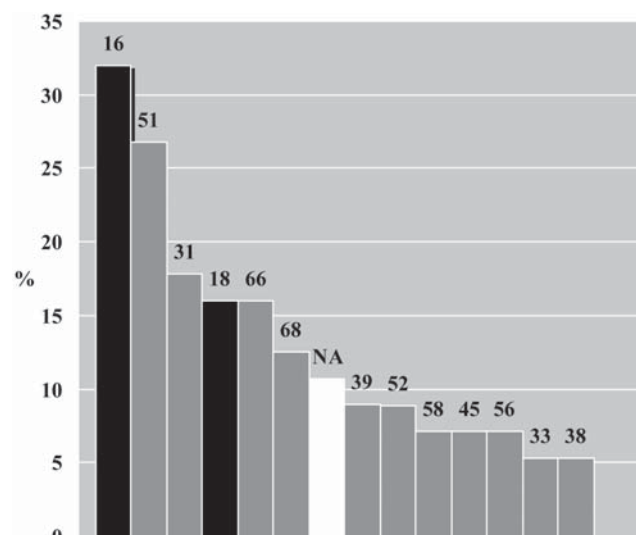
korosztályban is (56,2%) (1. táblázat). A legfiatalabbak csoportjában az összes vírusfertőzött között 70%-ban volt jelen a magas és 30%-ban az alacsony kockázatú típus. Az 1. ábra mutatja be a különböző HPV-genotípusok előfordulási gyakoriságát a HPV-pozitív leletek százalékában. Az onkogén típusok között a 16-os volt a leggyakoribb, 19,5% az összes fertőzött között, ezt követte az 51-es és a 31-es típus (12,4, illetve 10,1%), majd a többi onkogén típus kisebb arányokban fordult elő. A nem azonosítható típus 26,9%-ban volt jelen, 21,8%-ban az alacsony kockázatú típusok egyike volt kimutatható. Az onkogén genotípussal való fertőzöttség mellett, 32,1%-ban (445-ből 143 esetben) állt fenn egyidejű citológiai eltérés, ebből 45 esetben ASCUS, 68 esetben CIN I, 24 esetben H-SIL (CIN II vagy CIN III), két esetben ASC-H fordult elő. A 143, citológiai eltéréssel járó eset 70,6%-ában (101 eset) pedig több onkogén típus egyidejű jelenléte volt kimutatható. Amennyiben a sejtkenetben L-SIL-t vagy H-SIL-t észleltek, az onkogén vírusok egyike minden alkalommal jelen volt egyidejűleg. A citológiai eltéréssel járó esetekben 32%-ban volt kimutatható a 16-os, 26,8%-ban az 51-es és 17,8%-ban a 31-es típus (2. ábra). Figyelemre méltó, hogy a citológiai eltérések 10,7%-ban az úgynevezett „nem azonosítható” vírusok egyik típusát mutatták ki.

Megbeszélés

Az ambulanciára jelentkezők HPV-fertőzöttsége jóval meghaladja a nemzetközi irodalomban közölt átlagot. Világszerte 10%-ra becsülik a normál citológiai lelettel bíró páciensek HPV-fertőzöttségi rátáját [4]. Az általunk vizsgált mintában ez a szám jelentősen magasabb, 49,2% (1012-ből 498 eset) volt, az Amerikai Egyesült Államokban ugyanez az érték 39,2%, Chilében 29,2%, Afrikában átlagban 22% körüli, míg egy olaszországi tanulmányban (Torino) mindössze 9%-os fertőzöttséget találtak [5, 6, 7]. A harmadik világ bizonyos országaiiban (Uganda) a pontprevalencia a 75%-ot is meghaladja [8]. A magas rizikójú típusok aránya a tumorcitológiai eltéréssel nem bíró esetekben a hazai mintában 29,8%



1. ábra | Humán papillomavírus (HPV) -genotípusok gyakoriság szerinti megoszlása a HPV-pozitív leletek százalékában (LR: low risk – alacsony kockázatú; NA: nem azonosított kockázatú)



2. ábra | Humán papillomavírus (HPV) -genotípusok gyakoriság szerinti megoszlása a citológiai eltéréssel járó esetekben (NA: nem azonosított kockázatú)

volt, míg az Amerikai Egyesült Államokban 26,7%, Chilében 15,1%, Olaszországban 7,1% [5, 6, 7].

A genotípusok megoszlási gyakoriságát tekintve világszerte a 16-os és a 18-as a két leggyakoribb onkogén változat, ezzel szemben a fenti eredmények szerint hazánkban a leggyakoribb 16-os típus (19,5%) mellett a 18-as jóval ritkább (5,3%), s ez megegyezik az Amerikai Egyesült Államokban (16, illetve 7%) és Chilében észlelt arányokkal; megjegyzendő, hogy az utóbbi vizsgálatban a 18-as típust szinte egyáltalán nem észlelték [9]. A tanulmányok alapján Afrikában az 51-es típus előfordulása a leggyakoribb. Figyelemre méltó a legfiatalabb korosztály magas fertőzöttségi aránya, amely a fejlett országok adataival vethető össze: 20 és 24 év között az Amerikai Egyesült Államokban 45%, a vizsgált hazai népességben pedig 63% [10]. Nemzetközi adatok szerint 30 éves kor felett a HPV prevalenciája erősen csök-

ken, az általunk vizsgált népességben mérsékelt csökkenést észleltünk [11].

A több onkogén típusal való egyidejű fertőzöttséggel járó magasabb kockázat logikusnak tűnik, azonban az erre vonatkozó nemzetközi adatok szegényesek. A 16-os és a 18-as típus magas onkogén potenciálja régóta ismert, a méhnyakrákok 70%-áért ez a két genotípus felelős [12]. Ez a tendencia az általunk vizsgált populációban is követhető volt. Az 1. és a 2. ábra összevetéséből kitűnik az 51-es és a 31-es típus erős daganatkeltő potenciálja is, amelyek nemcsak gyakoriságban, hanem a citológiai pozitívítás melletti előfordulásukban is szorosra követik a 16-os típust. A laboratórium, amellyel magunk is együttműködtünk, számos HPV-genotípust „nem azonosított kockázatu”-ként (NA) sorol be, vagyis eddig még ismeretlen fokú kockázatot hordoz. Más források ezen típusok közül néhányat (26, 53) „lehetséges, hogy magas rizikójú”-ként említenek, ami mást jelent, tehát nincs egységes álláspont a „nem azonosítható” típusokat illetően [13].

Érdekes, hogy a centrumban megfordult páciensek 26,9%-ában és a citológiai eltéréssel járó esetek 10,7%-ában az NA vírusok egyik típusát mutattuk ki. Ez utóbbi felveti annak lehetőségét, hogy az NA megnevezés mögött valójában több eddig azonosítatlan, magas rizikójú típus állhat. Lehetséges azonban, hogy az „NA” csak egy korábban jelen lévő ismert onkogén típus DNS-ének maradványa, amely az immunrendszer működése következtében eliminálódott, ám a jelenlegi laboratóriumi technika még nem képes pontosabban azonosítani.

A legújabb szakirodalmi adatok szerint a HPV-típzálással kiegészített citológiai vizsgálat egyértelműen magasabb érzékenységgel a méhnyak rákmegelőző állapotainak szűrésében és előrejelzésében, mint önmagában a citológiai kenetvétele [14]. Harmincéves kor alatt, negatív citológiai lelet és HPV-teszt birtokában a szűrést követő 10 évben CIN III vagy súlyosabb elváltozás kialakulásának esélye kevesebb mint 2% [15].

Az általunk közölt eredmények összhangban vannak a fentiekben idézett szerzők megfigyeléseivel és azzal a gyakorlattal, amely szerint a magas rizikójú típusokat hordozó páciensek magasabb kockázatu csoportba sorolandók a méhnyak rosszindulatú elváltozásainak kialakulása szempontjából. Megfigyeléseink alátámasztják a vírus vizsgálatának jelentőségét, különösen a perzisztáló HPV-infekció prediktív értékét a rákmegelőző állapotok kialakulásának előrejelzésében.

Irodalom

- [1] Walboomers, J. M., Jacobs, M. V., Manos, N. M. és mtsai: Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J. Pathol.*, 1999, 189, 12–19.
- [2] International Agency for Research on Cancer. Available at: http://www.iarc.fr/ENG/Press_Releases/Evaluation.pdf. Accessed November 29, 2005.
- [3] Parkin, D. M., Bray, F., Ferlay, J. és mtsai: Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J. Clin.*, 2005, 55, 74–108.
- [4] De Sanjosé, S., Diaz, M., Castellsague, X. és mtsai: Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in woman with normal cytology: a meta-analysis. *Lancet Infect. Dis.*, 2007, 7, 453–459.
- [5] Peyton, C. L., Gravitt, P. E., Hunt, W. C. és mtsai: Determinants of genital human papillomavirus detection in a US population. *J. Infect. Dis.*, 2001, 183, 1554–1564.
- [6] Ferreccio, C., Corvalán, A., Margozzini, P. és mtsai: Baseline assessment of prevalence and geographical distribution of HPV types in Chile using self-collected vaginal samples. *BMC Public Health*, 2008, 8, 78.
- [7] Ronco, G., Ghisetti, V., Segnan, N. és mtsai: Prevalence of human papillomavirus infection in women in Turin, Italy. *Eur. J. Cancer*, 2005, 41, 297–305.
- [8] Banura, C., Franceschi, S., Doorn, L. J. és mtsai: Infection with human papillomavirus and HIV among young woman in Kampala, Uganda. *J. Infect. Dis.*, 2008, 197, 555–562.
- [9] Markowitz, L. E., Sternberg, M., Dunne, E. F. és mtsai: Seroprevalence of human papillomavirus types 6, 11, 16 and 18 in the United States. National Health and Nutrition Examination Survey 2003–2004. *J. Infect. Dis.*, 2009, 200, 1059–1067.
- [10] Dunne, E. F., Unger, E. R., Sternberg, M. és mtsai: Prevalence of HPV infection among females in the United States. *JAMA*, 2007, 297, 813–819.
- [11] Wright, T. C. Jr., Schiffman, M.: Adding a test for human papillomavirus DNA to cervical-cancer screening. *N. Eng. J. Med.*, 2003, 348, 489–490.
- [12] Bosch, F. X.: Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections and type-specific implications in cervical neoplasia. *Vaccine*, 2008, 26 (Suppl. 10), K1–K16.
- [13] Muñoz, N., Castellsagué, X., de González, A. és mtsai: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine*, 2006, 24 (Suppl. 3), S1–S10.
- [14] Cuzick, J., Clavel, C.: Overview of the European and North American studies on HPV testing in primary cervical cancer screening. *Int. J. Cancer*, 2006, 119, 1095–1101.
- [15] Kjaer, S., Hogdall, E.: The absolute risk of cervical abnormalities in high risk human papillomavirus-positive, cytologically normal woman over a 10-year period. *Cancer Res.*, 2006, 66, 106–130.

(Galamb Ádám dr.,
Budapest, Üllői út 78/A, 1082
e-mail: galamb.adam@gmail.com)

Új molekuláris biológiai módszerek és biológiai jelzők a méhnyakrák szűrésében**

BENCZIK MÁRTA DR.,¹ GALAMB ÁDÁM DR.,² ZINNER BALÁZS DR.,² MIKÓ MÁRTON DR.,² ÁCS NÁNDOR DR.,² JENEY CSABA DR.,¹ SOBEL GÁBOR DR.,²

¹CellCall Kft., 1139 Budapest, Röpentyű u. 48.; ²Semmelweis Egyetem II. Sz. Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika, Budapest

E-posta: sobelg@gmail.com

■ GRANTOK

KMR_12-1-2012-0032; FP7-HEALTH-2012-INNOVATION-1-Grant Agreement Number 306037; OTKA PD 105019

■ ÖSSZEFOGLALÓ

A méhnyak sejtkeneti szűrővizsgálatának bevezetésével a méhnyakrák előfordulása a fejlett országokban jelentősen csökkent. További előrehaladást jelentett a méhnyakrák és a humán-papillomavírus (HPV) közötti kapcsolat felismerése. Ennek ellenére a jelenlegi szűrőmódszerek mind érzékenységekben, mind fajlagosságban elmaradnak a legjobbtól. Új, korszerű módszereken alapuló eljárások bevezetésétől további eredmények várhatók a méhnyakrák korai felismerésében. Közleményünk célja a jelenleg elérhető, illetve részben még kutatás alatt álló módszerek, biojelzők áttekintése. E módszerek alapvetően két csoportra oszthatók, az egyik a HPV-DNS vagy az E6/E7 fehérjék hírvívő RNS-(mRNS) kifejeződését vizsgálja (Aptima, NucliSense EasyQ, OncoTect stb.), a másik csoport a daganatosan átalakult sejtekben észlelhető jellegzetes fehérjeelváltozásokat mutatja ki. Az utóbbiak közül a p16^{ink4a} fokozott jelenlétének bizonyításával, a kettős jelölési teszt (CINtec Plus, Roche), a ProEx C (Beckton Dickinson) alkalmazásával, a sejtkapcsoló molekulákkal (claudin1) és a mikroRNS-ekkel, mint kórismézési jelzőanyagokkal, biológiai jelzőkkel foglalkozik a közlemény.

Kulcsszavak: méhnyakrák, biomarker, p16, CINtec, claudin

■ ABSTRACT

Cervical cancer screening has led to a dramatic decrease in the rates of cervical cancer, especially in developed countries. Further progress has been made owing to the discovered relationship between cervical cancer and infection with the human papillomavirus (HPV). The current screening methods, however, are less than optimal in regard to both sensitivity and specificity. Introduction of new, modern techniques is expected to result in early recognition of cervical cancer. This

survey gives a review of the methods and biomarkers which are currently available or are still under investigation, respectively. The methods can basically be divided into two groups; one which studies the expression of HPV DNA or E6/E7 oncoprotein messenger RNA (mRNA) (Aptima, NucliSense EasyQ, OncoTect, etc.), the other which demonstrates the characteristic alterations of the protein composition in tumor cells. From the latter, a review is given of the increased presence of the so-called p16^{ink4a}, the use of double labelling test (CINtec Plus, Roche), ProEx C (Beckton Dickinson), as well as of cell junction proteins (claudin1) and microRNAs, as diagnostic markers.

Keywords: cervical cancer, biomarkers, p16, CINtec, claudin

■ BEVEZETÉS

A méhnyakrák a női rosszindulatú daganatok előfordulási gyakoriságában világszerte a 3. helyen áll, ez 529 800 megbetegedést és 275 100 halálesetet jelentett 2008-ban (1, 2). Ezen adatok azonban lényegesen különböznek az egyes földrajzi területek között. A megbetegedési gyakoriság, azaz az incidencia Afrikában a legmagasabb, Ausztráliában és Észak-Amerikában a legalacsonyabb (1). A halálozásban is az afrikai államok vezetnek, itt a méhnyakrákban megbetegedettek csaknem 70–80%-át, míg a fejlettebb országokban 30%-át veszítik el (1). Hazánkban *Kásler és Ottó* adatai szerint (3), a Központi Statisztikai Hivatal adataira támaszkodva 2008-ban a méhnyakrák miatt 416 nő halt meg, ezzel ez a daganat a hazai halálozások 9. helyét foglalta el a nőknél. A fenti népességi adatok világszerte arra sarkallták a kutatókat, hogy növeljék a méhnyakrák korai felismerésének a lehetőségeit.

A mindenki által jól ismert „Pap-teszt” alkalmazása, amelyet Babes és Papanicolaou 1920-ban vezetett be, és az 1950-es években vált általánosan elfogadottá, jelentősen csökkentette a méhnyakrák előfordulását, elsősorban a fejlett országokban (4). Az értékelés többszöri módosítása, kiemelten a Bethesda

* Dr. Sobel Gábor a Semmelweis Fórum 11., „Nőgyógyászati daganatok megelőzése és szűrése” című rendezvényen elhangzott előadása alapján.

Konferencián, a 2001-ben megfogalmazott diagnosztikus nevezéktan (5) jelentős előrehaladást jelentett a kórismezésben. Az elmúlt években azonban egyre több kritikát fogalmaztak meg ezzel a vizsgálati módszerrel kapcsolatban, kiemelve a sejtvizsgálat viszonylag alacsony érzékenységét (szenzitivitását), elismerve a magas fajlagosságát (specifitását) (6). Többen rámutattak az egyes vizsgálatok és az alkalmazott módszerek közötti különbségekre is.

A sejt- és szövettanászok 2013-ban Lisszabonban, az Európai Patológus Kongresszuson kiterjedt összehasonlító vizsgálatok alapján a következő nehézségeket fogalmazták meg:

- a sejtvizsgálat és a mintavétel nem mindig tükrözi és/vagy tartalmazza a kóros területet;
- az értékelés értelmezésében eltérés van a vizsgálatok között;
- a cervicalis intraepithelialis neoplasia-2 (CIN2) igen bizonytalan fokozat mind az értékelésben, mind a kezelésben;
- az értékelés eltérései nem javíthatók ki teljesen a vizsgálatok kizárólag sejtteni elveken alapuló képzésével.

Emellett sok vizsgálatban megfogalmazódott, hogy a jelenlegi rákmegelőző méhnyakelváltozások beosztása, illetve elnevezése sem teljesen megfelelő. Ezt a kérdést, illetve az Amerikai Patológusok Kollégiumának véleményét a megítélésről, *Bősze Péter* professzor foglalta össze nemrégiben e folyóiratban megjelent kitűnő áttekintő közleményében (7).

Jelentős áttörést hozott a méhnyak elváltozásainak értékelésében a humán-papillomavírussal (HPV) való kapcsolat felismerése, amely a 2008-ban Nobel-díjjal kitüntetett Harald zur Hausen professzor és munkacsoportjának az érdeme, valamint a HPV kimutatására kialakított, elsősorban molekuláris biológiai módszerek szélesebb körű alkalmazása (8–12). A HPV-fertőzés kimutatása azonban önmagában nem azonos annak eldöntésével, hogy megmaradó/átmeneti vagy transzformáló HPV-fertőzésről van-e szó. A nagy kockázatú HPV (hrHPV) pozitív és a sejtvizsgálattal negatív esetek értékelése és főleg kezelése további újabb nehézségeket és eldöntendő kérdéseket vetett fel (9, 13).

Mindez annak szükségességét hangsúlyozza, hogy újabb – elsősorban modern molekuláris – módszereket dolgozzanak ki és alkalmazzanak, amelyek nagyobb érzékenységgel és a sejtvizsgálathoz hasonlóan fajlagossággal jelzik a méhnyakhám daganatos átalakulását, lehetőleg annak korai, rákelőző szakaszában is (9, 13). Ezen gondolatmenet alapján számos biomarker, illetve azok kimutatására alkalmas teszt került kereskedelmi forgalomba, amelyek közül a legismertebbek, illetve néhány, fejlesztés alatt álló biomarker/teszt felsorolása és rövid áttekintése közleményünk célja.

■ BIOMARKEREK/TESTEK A MÉHNYAKRÁK KÓRISMÉZÉSÉBEN

A jelenleg elérhető, nagyrészt már kereskedelmi forgalomban is kapható legfontosabb, új, biomarkereket, azaz biológiai jelzőanyagokat és ezek kimutatásán alapuló teszteket, amelyeket a

következőkben röviden áttekintünk, az 1. sz. táblázatban soroltuk fel. Ezen tesztek alapja részben a kórokozó vírus, a hrHPV-nukleinsavak, illetve vírusfehérjék (onkoproteinek, az E6/E7) kimutatása, másrészt a daganatos sejtszaporodással, a sejtek kóros átalakulása miatt fokozottan termelődő vagy jelen lévő gazdasejti fehérjék, hírvivő (messenger) RNS-k (mRNS) kimutatása, amelyek közvetve bizonyítják a daganatos folyamatot (9, 13). Ezen vizsgálatok többsége *in vitro* tesztben és/vagy a sejtkeneteken, szövettani mintákon is elvégezhető, párhuzamosan a morfológiai vizsgálatokkal. Jelen összefoglalóban nem foglalkozunk a HPV-DNS kimutatásának már széles körben, évek óta alkalmazott molekuláris biológiai módszereinek az ismertetésével, csak az újonnan bevezetett eljárások közül azokat ismer-tjük röviden, amelyek a gazdasejtben bekövetkező daganatos átalakulást jelzik, illetve a vírusfehérjéket mutatják ki.

1. táblázat. A méhnyakrák és rákelőző elváltozásainak kórismezésében használatos sejtes és virális biomarkerek (*)

1. SEJTÉS (CELLULARIS) BIOMARKEREK

P16^{ink4a} immunhisztokémia/immuncitokémia (CINtec, Roche)
 P16^{ink4a}/ Ki67 kettős immunhisztokémia/immuncitokémia (CINtec Plus, Roche)
 ProEx C (TOP2A/MCM2, Bechtol Dickinson)
 Claudin 1 (tight junction fehérje)
 Egyéb receptorok és sejt felszíni markerek

2. VIRÁLIS MARKEREK

HPV RNS
 APTIMA (15 hrHPV E6/E7 mRNS, GenProbe)
 PreTect Proofer (5 hrHPV E6/E7 mRNS, Norchip)
 NucliSens EasyQ (5 hrHPV, Biomerieux)
 Onco Tect (13 hrHPV E6/E7 mRNS, InCellDx)

HPV DNS (**)

Cobas 4800 (L1 HPV DNS, Roche)
 Hybrid Capture 2 (L1 HPV DNS, Qiagen)
 AmpliCor (L1 HPV DNS, Roche)
 Digene HPV eHC (teljes genom, Qiagen)
 Digene HPV eHC 16 18 45 (teljes genom, Qiagen)
 InnoLiPA (L1 HPV DNS, Innogenetics)
 Linear Array (L1 HPV DNS, Roche)
 Genoid Genital Human Papillomavirus Detektáló Rendszer (L1 HPV DNS, Genoid)

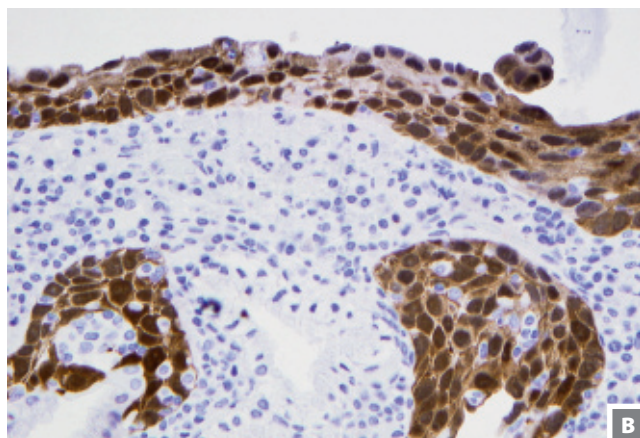
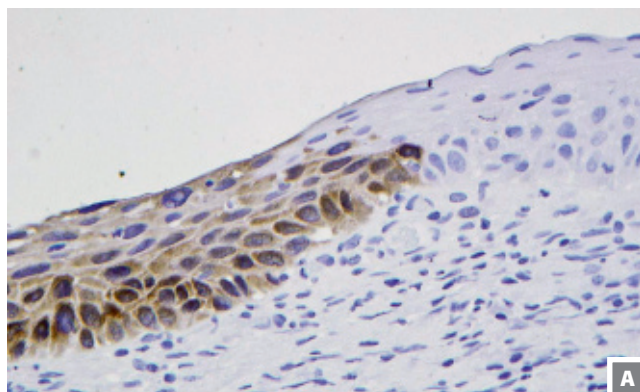
* A jegyzék nem teljes, csak a legismertebb és hazánkban alkalmazott vagy ki-próbált tesztek soroltak fel

** A felsorolt tesztek nem ismertettük az összefoglaló közleményben

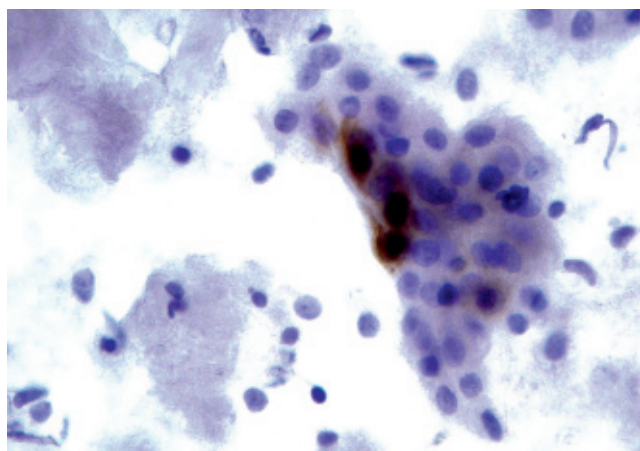
■ SEJTÉS („CELLULARIS”) BIOMARKEREK, TESZTEK

1. P16^{INK4A}: CINTEC

A P16^{ink4a} ciklin-dependens kinázinhibitor daganatgátlóként vált ismertté (9, 14, 15). Alkalmazásának alapja az, hogy a daganatosan átalakult méhnyaki hámsejtekben a hrHPV E7-fehérje fokozottan képződik, felhalmozódik a sejtplazmában és a magban, és ez elsősorban immunhisztokémiai/immuncitokémiai módszerekkel kimutatható (16, 17). A p16^{ink4a}-t fokozottan képző sejtek magvai és/vagy plazmája erős barnás színűen festődik az említett módszerekkel (1, 2. ábra). A fehérje fokozott megjelenését a HPV hatására bekövetkező átíródás hozza létre, ennek ellenére a fokozott p16^{ink4a}-fehérjék nem gátolják a sejtciklus előrehaladását (15, 18). A fokozódás részben azzal magyarázható, hogy a hrHPV-E7 gátolja a pRB (retinoblastoma tumor-szuppresszor



1. ábra. P16 immunhisztokémiai reakció CIN2-ben (a) és CIN3-ban (b). A barna magi és/vagy citoplazmatikus színreakció jelzi a kóros sejteket a paraffinban ágyazott szövettani metszetekben



2. ábra. P16 immunhisztokémiai reakció méhnyaki kenetben. A pozitív sejtek barnán festődnek

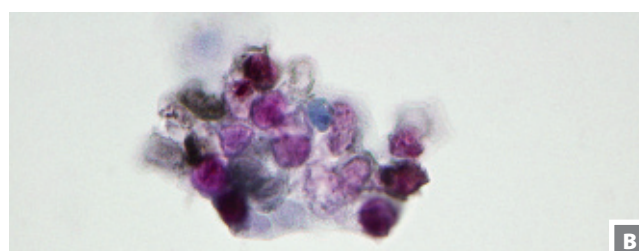
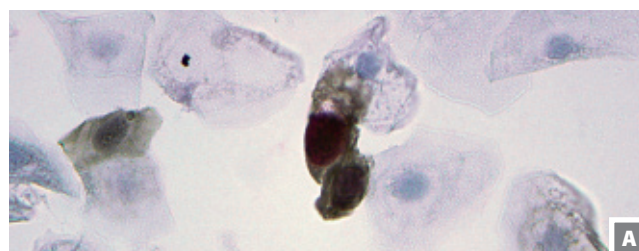
fehérje) működését, az E2F átíróadási faktorhoz való kötődés gátlásával (19). Ez a folyamat, azaz a hrHPV-E7 gátló hatása olyankor érvényesül, amikor az fokozottan termelődik a vírus-DNS sejtmagba való beépülése következtében (13).

A már említett 2013-as Európai Patológus Kongresszuson, Lisszabonban, 1500 méhnyaki laphámminta vizsgálatánál a p16 fokozott képződését az ép hámszövetek 5%-ban, CIN1-ben 39%-ban, CIN2-ben 77%-ban és CIN3-ban 99%-ban észlelték (20).

Az Amerikai Egyesült Államokban nagyszámú, CIN2-nek kórismézett, méhnyaki szövetmintákon végzett p16 immunhisztokémiai reakció eredményeit összehasonlították a csak hematoxilín-eozin (HE) festéssel végzett vizsgálatok eredményével. Megállapították, hogy az érzékenység 85,6%-ról (csak HE) 90,8%-ra (HE+p16) nőtt, míg a fajlagosság nem változott (20).

2. P16^{INK4A} / KI67 (MIB1) KETTŐS TESZTEK (CINTECPLUS, ROCH)

A fentiek alapján a p16 immunhisztokémiai reakció alkalmazásával javítható a méhnyak daganatos elváltozásainak kimutatására szolgáló tesztek érzékenysége és fajlagossága. Ezt kiegészítve egy másik, a sejtciklus előrehaladását és a sejtgazapodást jelző antigénnel, a Ki67-tel (Mib1), még jobb találati arányok érhetők el (9, 13, 14, 16, 21). Ez valósult meg a CINtecPlus (Roch) tesztben, amely egyidejűleg mutatja ki a p16^{ink4a} és Ki67-fehérjéket a kóros sejtekben, kenetmintákban (3. ábra) és szöveti metszetekben egyaránt. A két lépésben végzett immunreakció két elsődleges monoklonális ellenanyagot alkalmaz, eltérő színű (barna és piros) másodlagos kimutatási rendszerrel párosítva. Ennek eredményeként a kóros sejteket a két színreakció egyazon sejtben való megjelenése jelzi (3. ábra).



3. ábra. CINtec Plus (Roche) reakció méhnyaki kenetben (a, b). A Ki67 pozitívítás a kóros sejtek magjában piros színreakció, az ugyancsak magi és citoplazmatikus p16 reakció barna színreakció formájában látható a folyadék-alapú sejtekkel készített keneteken

Kérdés, hogy a HE-vel végzett értékelés mellett a p16^{ink4a} vagy a kettős reakció alkalmazása mikor indokolt, figyelembe véve az utóbbiak jelentős többletköltségét. Ridder (20) szerint a p16^{ink4a}, illetve a kettős reakció elvégzése a következő feltételek mellett javasolt:

- Minden olyan esetben, amelyben a HE morfológia alapján nem egyértelmű a CIN2 vagy CIN3 elkülönítése a kissé hasonló képet nyújtó elváltozásoktól (pl. éretlen hámátalakulás, reparatív eltérések, sorvadás stb.).
- Ha a szövettani/sejtjani kórisme CIN2.
- Amennyiben a szakmai vélemények nem egyeznek a minta értékelésében, elsősorban a CIN2/CIN3 megítélésében.

A fentiekkel ellentétben nem ajánlott a p16-reakció elvégzése, amennyiben a HE alapján a vélemény ép hám, CIN1 vagy egyértelmű CIN3. Ajánlott viszont minden olyan CIN1-nek kórismézett esetben, amelyben felmerül a súlyosabb elváltozás gyanúja a korábbi diagnózis alapján (HSIL, ASC-H, ASC-US/HPV16+, AGC) (20).

Az eddigi vizsgálatok szerint a p16/Ki67 kettős immunhisztokémiai reakció növelte a rákelőző méhnyaki elváltozások elkülönítésének az érzékenységét és fajlagosságát a HPV-tesztekkel (21), valamint a Pap-teszttel összevetve (14, 17).

3. ProEx C KIT (BECKTON DICKINSON)

A reakció a TOP2A (topoizomeráz-II-alfa) és az MCM2 („mini-chromosome maintenance protein 2”) méhnyakrákban bizonyított fokozott keletkezésének a kimutatásán alapszik (22). Az eddigi vizsgálatok szerint a ProEx C érzékenysége hasonló a hibrid capture 2 (HC2)-höz, a fajlagossága azonban nagyobb. Az enyhébb laphámelváltozásokban (LSIL) fokozott, a súlyosabb eltéréseknél azonban kevésbé volt érzékeny (9). Kiegészítő vizsgálatként javasolják.

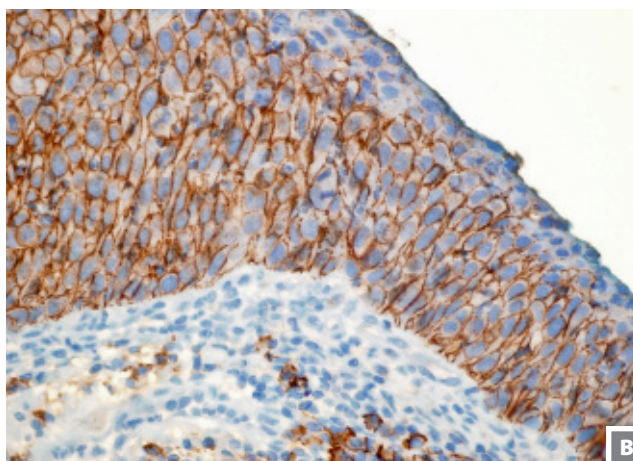
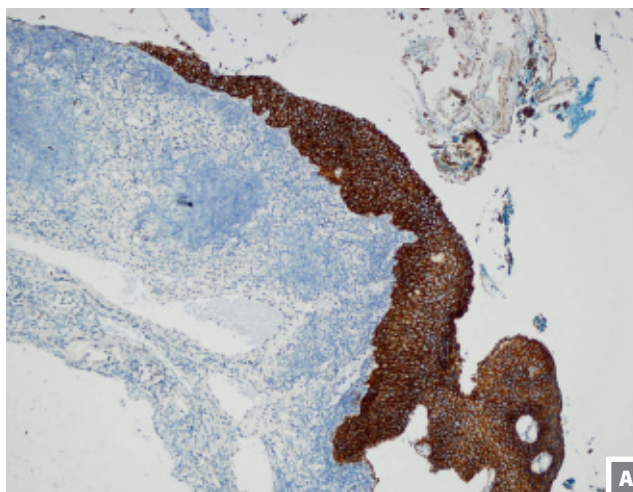
4. SEJTKAPCSOLÓ SZERKEZETEK FEHÉRJÉI MINT JELZŐ ANYAGOK A MÉHNYAKRÁKBAN

A daganatos átalakuláskor jól ismert, hogy a sejtkapcsolatok megváltoznak, többnyire fellazulnak, és ez az egyes sejtkapcsoló rendszereket alkotó fehérjék összetételének a megváltozásával is együtt jár (23). Az egyik jellegzetes sejtkapcsoló rendszer, amely a sejtek polaritását, a sejten belüli ion- és folyadékcsere szabályozza, a tight junction (TJ), amelyet számos fehérje képez, köztük a gerincüket alkotó claudinok. Először *Sobel és mtsai* (24, 25) mutatták ki, hogy e fehérjék egyikének, a claudin-1-nek a mennyisége jelentős mértékben fokozódik a rákelőző és rosszindulatú méhnyaki elváltozásokban. A kórszöveti mintákban kimutatható fokozott immunhisztokémiai reakció (4. ábra) a sejtkapcsolatokban is jól látható immunhisztokémiai reakcióval (5. ábra), amely jelzi a fokozott mennyiségben jelen lévő fehérjét, barna színreakció formájában (amennyiben diamino-benzidin – DAB – a jelzőanyag).

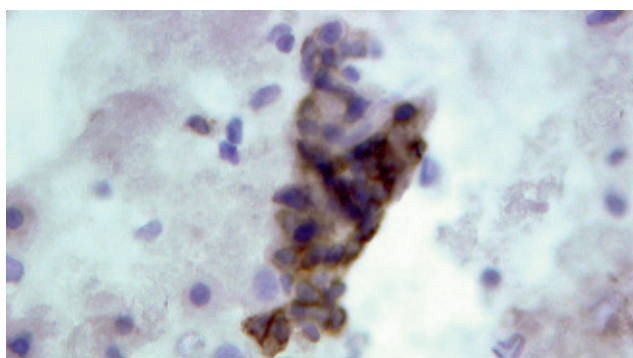
5. A MICRORNS-EK JELENTŐSÉGE A MÉHNYAKI DAGANATOK KÓRISMÉZÉSÉBEN

A microRNS-ek (miRNS) kis, endogén, nem kódoló RNS-molekulák, amelyek a génműködést poszttranszkripciós szinten szabályozzák, és jelenleg számos típusuk (1000 felett) ismert (26). Kórismézési felhasználhatóságuk alapja az, hogy a miRNS-mintázat jellemző az egyes sejtekre és szövetekre, illetve jellegzetes változása a daganatos átalakulás során is megfigyelhető. Onkogénként és daganatgátlóként is érvényesülhet a hatásuk, mintázatuk tükrözheti a daganat szöveti eredetét, a daganat típusát, sőt egyes esetekben a klinikai kimenetelt is (26–31).

Az elmúlt években több munkacsoport vizsgálta a miRNS-mintázat változását a méhnyakrák kialakulása során, annak egyes stádiumaiban (32). Megállapították, hogy egyes



4. ábra. Claudin 1 immunhisztokémiai reakció CIN3-ban. Intenzív pozitív reakció látható a kóros sejtek membránján a méhnyaki hám teljes vastagságában, a parafinba ágyazott szövettani metszetekben (a, b)



5. ábra. Claudin 1 immunhisztokémiai reakció méhnyaki sejtkapcsolatokban. A pozitív kóros sejtek hátyáján erős barna színreakció látható

miRNS-ek felülszabályozottak, így a miRNS-199, -133, -214 stb., mások alul, így a miRNS-149, -203, -218 stb. (15, 29, 30, 33, 34). Bár jelenleg még csak kutatás szintjén folynak a vizsgálatok, azonban ettől a gyorsan növekvő kutatási területtől várható, hogy az új diagnosztikus jelzők mellett segítséget nyújtanak a kórjelzés meghatározásában, sőt kezelési célpont azonosításához is vezethetnek az ezen a területen nyert megfigyelések (35).

■ II. ÚJ VIRÁLIS HPV-RNS-TESZTEK

HPV-E6/E7 MRNS-TESZTEK

Ezen tesztek alapja az, hogy a HPV-E6/E7 termelésében szereplő mRNS-ek ugyancsak fokozottan kifejeződnek a méhnyakrák kialakulásakor. A legismertebb tesztek a következők:

1. APTIMA (GenProbe): olyan kvalitatív nukleinsav amplifikációs teszt, amely 14 hrHPV-fajta E6/E7 mRNS-ét mutatja ki. Klinikai érzékenysége hasonló a Hibrid Capture 2 HPV-próbához, a fajlagossága viszont magasabb (9, 36).
2. NucliSense EasyQ (bioMérieux): ugyancsak nukleinsav-alapú teszt, amely ötféle hrHPV E6E/7 mRNS-ét mutatja ki. Az adatok alapján specifikusabb, mint az APTIMA és a HC2, ám kevésbé érzékeny (9, 36)
3. OncoTect (IncellDx): 13 hrHPV E6/E7 mRNS-ét mutatja ki (9).

A fenti összefoglalásból kitűnik, milyen kiterjedt jelenleg a méhnyakrák kórismezésében már elérhető és jelenleg még a kutatás szintjén álló biomarkerek és tesztek területe, amelyek közül a legismertebbeket soroltuk fel. Mindehhez az alapot a HPV-fertőzés és a méhnyakrák összefüggésének a megállapítása, illetve a szűrőmódszerek, elsősorban a sejtvizsgálat alkalmazása jelentette. Remélhető, hogy a szűrések érzékenységének és fajlagosságának növelésével, illetve a fent felsorolt tesztek alkalmazásával az eddiginél is jobb eredmények érhetők el a méhnyakrák korai felismerésében és így az eredményesebb gyógyításában.

IRODALOM

1. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 2010;127:2893–2917.
2. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011;61:69–90.
3. Kásler M, Ottó Sz. Európai és hazai kihívások az onkológiában. *Magy Onkol* 2008;52:21–33.
4. Safaeian M, Sherman ME. From Papanicolaou to papillomaviruses: evolving challenges in cervical cancer screening in the era of human papillomavirus vaccination. *J Natl Cancer Inst* 2013;105:1524–1526.
5. Solomon D, Davey D, Kurman R, et al. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA* 2002;287:2114–2119.
6. Isidean SD, Franco EL. Embracing a new era in cervical cancer screening. *Lancet* 2013; Nov 1. pii: S0140-6736(13)62028-0. doi: 10.1016/S0140-6736(13)62028-0. [Epub ahead of print].
7. Bösze P. A női és a férfi alsó nemi szervi, a végbél és a végbél környéke laphámsejtes rákosodásának új nevezéktana. *Nőgyógy Onkol* 2013;18:35–37.
8. Crosbie EJ, Einstein MH, Franceschi S, Kitchener HC. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet* 2013;382:889–899.
9. Tornesello ML, Buonaguro L, Giorgi-Rossi P, Buonaguro FM. Viral and cellular biomarkers in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia and cancer. *Biomed Res Int* 2013; Article ID519619:1–10.
10. Arbyn M, Ronco G, Anttila A, et al. Evidence regarding human papillomavirus testing in secondary prevention of cervical cancer. *Vaccine* 2012;30S:F88–F99.
11. Ronco G, Dillner J, Elfström KM, et al. Efficacy of HPV-based screening for prevention of invasive cervical cancer: follow-up of four European randomised controlled trials. *Lancet* 2013; Nov 1. pii: S0140-6736(13)62218-7. doi: 10.1016/S0140-6736(13)62218-7. [Epub ahead of print].
12. Bösze P. Az emberi papillomavirus fertőzéseinek népességi gyakorisága – a HPV-járvány. *Nőgyógy Onkol* 2009;14:148–150.

13. de Freitas AC, Coimbra EC, Leitao MCG. Molecular targets of HEPV oncoproteins: Potential biomarkers for cervical carcinogenesis. *Biochim Biophys Acta* 2014; Jan 2. pii: S0304-419X(13)00063-2. doi: 10.1016/j.bbcan.2013.12.004. [Epub ahead of print].
14. Ikenberg H, Bergeron C, Schmidt D, et al. Screening for cervical cancer precursors with p16/Ki-67 dual-stained cytology: Results of the PALMS study. *J Natl Cancer Inst* 2013;105:1550–1557.
15. Saavedra K, Brebi P, Roa JC. Epigenetic alterations in preneoplastic and neoplastic lesions of the cervix. *Clin Epigenetics* 2012;4:1–7.
16. Edgerton N, Cohen C, Siddiqui MT. Evaluation of CINtec PLUS® testing as an adjunctive test in ASC-US diagnosed surepath® preparations. *Diagn Cytopath* 2011;41:35–40.
17. Denton KJ, Bergeron C, Klement P, et al. The sensitivity and specificity of p16^{INK4a} cytology vs HPV testing for detecting high-grade cervical disease in the triage of ASC-US and LSIL Pap cytology results. *Am J Clin Path* 2010;134:12–21.
18. Li JG, Li L, Zhang SW. Different expression of p16^{INK4a} and p14^{ARF} in cervical and lung cancers. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2013;17:3007–3011.
19. Dahlstrand HM, Lindquist D, Björnestal L, et al. P16^{INK4a} correlates to human papillomavirus presence, response to radiotherapy and clinical outcome in tonsillar carcinoma. *Anticancer Res* 2005;25:4375–4384.
20. Ridder R. Transforming cervical cancer screening: How p16/Ki67 dual stain cytology can improve patient management. 25th European Congress of Pathology, 31 August–4 September 2013, Lisbon, Portugal.
21. Wentzensen N, Schwartz L, Zuna RE, et al. Performance of p16/Ki-67 immunostaining to detect cervical cancer precursors in a colposcopy referral population. *Clin Cancer Res* 2012; 18:4154–4162.
22. Alaghebandan R, Fontaine D, Bentley J, et al. Performance of ProEx C and PreTect HPV-Proofer E6/E7 mRNA tests in comparison with the hybrid capture 2 HPV DNA test for triaging ASCUS and LSIL cytology. *Diagn Cytopathol* 2013;41:767–775.
23. Szabó I, Kiss A, Schaff Zs, Sobel G. Claudins as diagnostic and prognostic markers in gynecological cancer. *Histol Histopathol* 2009;24:1607–1615.
24. Sobel G, Páska Cs, Szabó I, Kiss A, Kádár A, Schaff Zs. Increased expression of claudins in cervical squamous intraepithelial neoplasia and invasive carcinoma. *Hum Pathol* 2005;36: 162–169.
25. Sobel G, Németh J, Kiss A, et al. Claudin 1 differentiates endometrioid and serous papillary endometrial adenocarcinoma. *Gynecol Oncol* 2006;103:591–598.
26. Lendvai G, Kiss A, Kovalszky I, Schaff Zs. Eltérések a májbetegségek mikro-RNS-expressziós mintázatában. *Orv Hetil* 2010;151:1843–1853.
27. Deng S, Calin GA, Croce CM, Coukos G, Zhang L. Mechanisms of microRNA deregulation in human cancer. *Cell Cycle* 2008;7:2643–2646.
28. Farazi TA, Spitzer JI, Morozov P, Tuschl T. miRNAs in human cancer. *J Pathol* 2011;223:102–115.
29. Reshmi G, Radhakrishna Pillai M. Beyond HPV: Oncomirs as new players in cervical cancer. *FEBS Letters* 2008;582:4113–4116.
30. Tang T, Wong HK, Gu W, et al. MicroRNA-182 plays an onco-miRNA role in cervical cancer. *Gynecol Oncol* 2013;129:199–208.
31. Ribeiro J, Sousa H. MicroRNAs as biomarkers of cervical cancer development: a literature review on miR-125b and miR-34a. *Mol Biol Rep* 2014; DOI 10.1007/s11033-013-2998-0, Published online: 09 January 2014
32. Gocze K, Gombos K, Juhasz K, et al. Unique microRNA expression profiles in cervical cancer. *Anticancer Res* 2013;33:2561–2567.
33. Pereira PM, Marques JP, Soares AR, Carreto L, Santos MAS. MicroRNA expression variability in human cervical tissues. *Plos One* 2010;5:e11780.
34. Rao Q, Zhou H, Peng Y, Li J, Lin Z. Aberrant microRNA expression in human cervical carcinomas. *Med Oncol* 2012;29:1242–1248.
35. Hu X, Schwarz JK, Lewis JS Jr. A microRNA expression signature for cervical cancer prognosis. *Cancer Res* 2010;70:1441–1448.
36. Ratnam S, Coutlee F, Fontaine D, et al. Aptima HPV E6/E7 mRNA test is as sensitive as hybrid capture 2 assay but more specific at detecting cervical precancer and cancer. *J Clin Microbiol* 2011;49:557–564.

Claudin-1 as a Biomarker of Cervical Cytology and Histology

Márta Benczik^{1,5} · Ádám Galamb² · Róbert Koiss³ · Attila Kovács¹ · Balázs Járny⁴ · Tamás Székely⁴ · Tímea Szekerczés⁴ · Zsuzsa Schaff⁴ · Gábor Sobel² · Csaba Jeney^{1,6}

Received: 1 April 2015 / Accepted: 29 September 2015 / Published online: 13 October 2015
© Arányi Lajos Foundation 2015

Abstract Several immunochemistry tests are used for triaging human papilloma virus (HPV) and cytology positive cases in cervical cancer screening and as an adjunct test to diagnose cervical cancer. Claudin-1 (CLDN1) protein is a major component of the tight junction, shown to have altered expression in cervical cancer. In this study, value of CLDN1 was analysed as a screening and triage immunochemistry test compared to cytology and HPV testing. A population of 352 women attending colposcopic referral visits resulting in cervical conisation and a second population of 150 women attending routine gynaecological visits with negative cervical cytology were enrolled in a multi-centre clinical study in Hungary. Cytology and HPV (Genoid Full Spectrum HPV Amplification and Detection System) testing were carried out along with immunocytochemistry for CLDN1, and as a reference, using CINtec p16

Cytology Kit. Three different evaluation protocols were used which assessed immunostaining characteristics with or without cytological readings. High correlation observable between p16^{INK4a} and CLDN1 established CLDN1 as a competing marker in cervical cancer. Concordance of CLDN1 immunostaining of cervical intraepithelial neoplasia 2 and above (CIN2+) positives was 84.0 % (73.8–89.3); concordance of CIN2+ negatives was 69.0 % (59.6–75.8). In conclusion, CLDN1 has similar diagnostic potential as p16^{INK4a}, our results established it as a histological and cytological biomarker with the potential to improve the clinical performance of cervical cytology and histology.

Keywords Cervical cancer · Biomarker · Claudin-1 · Immunocytochemistry

Gábor Sobel and Csaba Jeney equally contributed.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s12253-015-9990-z) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Csaba Jeney
csjeney@gmail.com

- ¹ Cellcall Ltd., Rőppentyű u. 48, Budapest 1134, Hungary
- ² 2nd Department of Obstetrics and Gynecology, Semmelweis University, Üllői út 78/a, Budapest 1082, Hungary
- ³ Combined Szent István and Szent László Hospital, Nagyvárad tér 1, Budapest 1097, Hungary
- ⁴ 2nd Department of Pathology, Semmelweis University, Üllői út 93, Budapest 1091, Hungary
- ⁵ Synlab Hungary Ltd., Bajcsy-Zsilinszky út 53, Budapest 1065, Hungary
- ⁶ Department of Medical Microbiology, Semmelweis University, Nagyvárad tér 4, Budapest 1089, Hungary

Introduction

Global cervical cancer incidence increased from 378.000 (256.000–489.000) cases per year in 1980 to 454.000 (318.000–620.000) cases per year in 2010, which is a 0.6 % annual rate of increase. Cervical cancer death rates have been decreasing but the disease still killed 200.000 (139.000–276.000) women in 2010, of whom 46.000 (33.000–64.000) were aged between 15 and 49 years in developing countries [1]. Cervical cancer is usually preceded by a long phase of pre-invasive disease called cervical intraepithelial neoplasia [CIN]. This precursor phase is generally asymptomatic and can occur over a period of 10–20 years [2]. Cytology based primary cervical cancer screening of these precancerous lesions has reduced the incidence and mortality of cervical cancer after its introduction in the 1940s [3, 4].

High-risk human papillomaviruses (hr-HPV, in this paper referred to as HPV) are definite aetiological agents of almost

all cervical carcinomas [5]. Based on the findings of different clinical trials, HPV testing further improves the efficacy of primary screening as compared with cytological screening [6–8]. The HPV test is less specific than the cytology test by reason that the vast majority of infections are transient and cleared, particularly in young women [9, 10]. HPV testing is not recommended under 30 years of age, in this age group the cytology test is more specific [11] due to the high prevalence of HPV infections.

It is important to increase specificity in order to reduce the cost of HPV based cervical cancer screening and although being costly, maintaining high sensitivity also has public health significance. The primary HPV DNA-based screening with cytology triage and repeated HPV DNA testing of cytology-negative women has been suggested as an effective triage strategy amongst the available techniques, however cytology testing lacks sensitivity whereas repeated HPV testing still lacks specificity [12, 13]. An alternative strategy would be HPV genotyping, which is based on the increased cancer risk of the HPV-16 genotype, however, genotyping tests are not widely available [14].

Great efforts have been made to identify novel biomarkers aiming at improving the specificity of screening, which could distinguish between productive and transforming HPV infections and/or could predict disease severity. Different technologies have been proposed, such as HPV triage based technologies like p16^{INK4A} and ProexC (combined MCM2 and TOP2A detection), or either cellular gene or HPV gene promoter methylation based biomarkers or microRNAs [15–21].

p16^{INK4A} has been proposed as a biomarker for transforming HPV infection, originally introduced for improvement of the histological and cytological evaluation of cervical precancerous lesions. Usually, p16^{INK4A} is expressed at a very low level in healthy cells, whereas being strongly over-expressed in almost all CIN2+ cases in which HPV is present [21–24].

Claudins are functional and structural components of tight junctions (TJ) belonging to a large family of transmembrane proteins with a function of regulating paracellular permeability, maintaining cellular polarity and playing a role in signal transduction [25]. Alterations of claudin expression patterns have been described in many types of gynaecological cancers such as cervical and endometrial, ovarian cancers and in premalignant lesions [26–30]. Significant increase in CLDN1 and 7 was detected in premalignant cervical lesions and invasive cancers as compared with the normal cervical epithelium [29–31]. These findings are consistent with the facts that TJs are disassembled during tumorigenesis and that overexpressed claudins may have roles in motility, invasion and survival.

In the current study we analysed the value of CLDN1 and p16^{INK4A} immunocytochemistry and immunohistochemistry in cervical cancer diagnostics, in screening and triage settings and we compared the results with those of cytology and HPV testings.

Material and Methods

Patient Population In total, 502 patient samples were enrolled including 352 cytology [liquid based cytology (LBC)] controlled conisation (both loop and knife) samples (histology samples) and 150 consecutive screening population based LBC samples enrolled in the HPV_SCREEN multi-centre clinical study and the KTI121128_KMR_BIOMARKER study in Hungary (see details in Table 1.). Cases with valid histology or cytology diagnosis were considered eligible. All clinical samples were obtained with the permission of the National Ethical Committee and all patients gave informed consent.

Cytological Diagnosis Cytology was evaluated by the Bethesda system for cervical smears and concurrently the PreservCyt (Hologic, Bedford, USA) cervical specimens were used for subsequent testing including HPV and immunocytochemical reactions (see later).

HPV Testing DNA was extracted from cervical samples, collected in PreservCyt media using AmpliLute Liquid Media Extraction Kit (Hoffmann-La Roche Ltd., Basel, Switzerland) from 4 ml of PreserveCyt sample. HPV testing was carried out using Full spectrum HPV System HPV Amplification and Detection System (Genoid, Budapest, Hungary) according to manufacturer's instructions.

Triage Testing The diagnostic performances of cytology and HPV triage were calculated for the different tests. Sensitivity and specificity of cytology (for ASCUS+ samples) and HPV (for hr-HPV+ samples) triage populations were assessed using gold standard CIN2+ histology as positivity cut-off. For the sake of comparison, results of the pooled population (PP), where the figures represented the whole study population, as well as results of only the triage test positive population (TP) were calculated.

Immunohistochemistry and Immunocytochemistry

Immunohistochemistry (IH) Four μm thick formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) sections were used for the IH reactions. CINtec p16^{INK4a} Kit (Hoffmann-La Roche, Basel, Switzerland) was used on the slides according to manufacturer instructions. Parallel slides were prepared from each case and immunostained for CLDN1 using an antibody (Zymed, San Francisco, CA, USA) in 1:100 dilution for one hour, at room temperature. The reaction was carried out in Ventana ES automatic immunostainer (Ventana Medical System, Inc., Tucson, AZ, USA) using HRP multimer-based, biotin-free detection technique. Reagents and secondary antibody were obtained from Ventana (iView DAB Detection Kit, Ventana).

Table 1 Samples collected for the multicentre clinical study. A. Stratification of samples according to the diagnosis made. In total, 502 samples were enrolled comprising 352 cytology controlled conisation samples (both LBC and histology samples) and 150 consecutive screening population based LBC samples. In case of cytology and HPV testing, test sensitivities and specificities were calculated according to the gold standard histological diagnosis of CIN2+ as the clinical cut-off. B. Breakups according to the tests performed (cytology and histology, HPV, immunocytochemistry [IC-CLDN1, IC-p16^{INK4A}] and immunohistochemistry [IH-CLDN1, IH-p16^{INK4A}] diagnoses). Samples were considered statistically eligible if all tests were valid

A.		N = 291 (of 502)	N = 395 (of 502)	HPV test results	N = 395 (of 502)
Histology results					
CIN1-		129	230	HR positive	179
CIN1+		162	62	HR negative	216
CIN2-		158	45		
CIN2+		133	58		
			165		
			75.2 % (68.9–80.8)	sensitivity (CIN2+) (95%CI)	95 % (89.9–97.7)
			66.5 % (61.1–71.2)	specificity (CIN2+)(95%CI)	61.4 % (57.4–63.6)
B.					
all tests	Histology	Cytology	HPV	IC-p16 ^{INK4A}	IH-CLDN1
eligible for statistics	342	458	452	202	288
with histology result	291	389	395	172	261
with cytology result	291	291	279	162	239
with HPV result	279	395	395	158	210
				172	195

LBC liquid based cytology, CIN2+ cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or above, HPV human papilloma virus, ASCUS atypical squamous cells of undetermined significance, LSIL low-grade squamous intraepithelial lesion, HSIL high-grade squamous intraepithelial lesion

Immunocytochemistry (IC) Cytology slides were prepared using cytospin centrifugation applying 2 ml of LBC PreserveCyt sample. The CINtec p16^{INK4A} Cytology Kit (Hoffmann-La Roche) was used according to the manufacturer instructions with slight modification. Briefly, a protein blocking reagent (Protein Block Serum Free, Dako Cytomation, Glostrup, Denmark) was used after the peroxidase blocking step, incubating the slides with the reagent for 30 min, followed by two washing steps for 5 min. Parallel cytospin slides were prepared from each case and immunostained for CLDN1 as well as by CINtec p16^{INK4A} Cytology Kit.

CLDN1 immunocytochemistry was performed by replacing the p16^{INK4A} antibody in the kit with CLDN1 antibody (Zymed) in 1:100 dilution incubated for one hour at room temperature according to the protocol described above. The slides were evaluated by two experienced cytopathologists both blinded to all results.

Evaluation of Immunocytochemistry For semiquantitative evaluation of CLDN1 and p16^{INK4A} IH, 10 areas were selected and 100 cells per field were analysed using high power field objective ($\times 40$). Different protocols were used for evaluation of immunocytochemistry, which assessed staining characteristics with or without the cytomorphological readings of dysplastic cells.

The *simple scoring method (SM)* was a semiquantitative evaluation of the staining intensity without cytomorphological reading. The following grades were used: 0: no staining, 1: weak staining, 2: medium staining, 3: strong staining. Score 1 was the positivity cut-off value for this method.

The *morphological reading adjusted scoring method (MASM)* evaluated and calculated staining intensity as described above. In addition, the cytomorphologically positive (ASCUS+) dysplastic cells were accessed, followed by calculation of the percentage of positively stained ASCUS+ cells.

CLDN1 and p16^{INK4A} were combined in certain evaluations providing *double triage settings (DTS)* as well. In triage settings, the triage test was evaluated only in case of the base test positives, however, in order to provide better comparability of the methods, sensitivity and specificity values were also calculated for both the whole population including base test negatives (pooled population) as well as for only the base test positives (trriage of positives).

Statistical Analysis

Two-way Contingency Table Analysis was carried out using JavaStatistics (<http://statpages.org/ctab2x2.html>). Yates-corrected chi-square, Mantel-Haenszel chi-square, Fisher Exact Test were calculated, and only the significant measures were used in the study. Statistical measurements were

calculated, including sensitivity, specificity, positive and negative predictive values, positive and negative likelihood ratios, diagnostic and error odds ratios. Confidence intervals for the estimated parameters were computed by a general method (based on “constant chi-square boundaries”). The gold standard clinical cut-off was CIN2 or greater histological findings (CIN2+) used in contingency tables. To analyse two treatments given to matched subjects, McNemar’s test was used (see supplement material).

Results

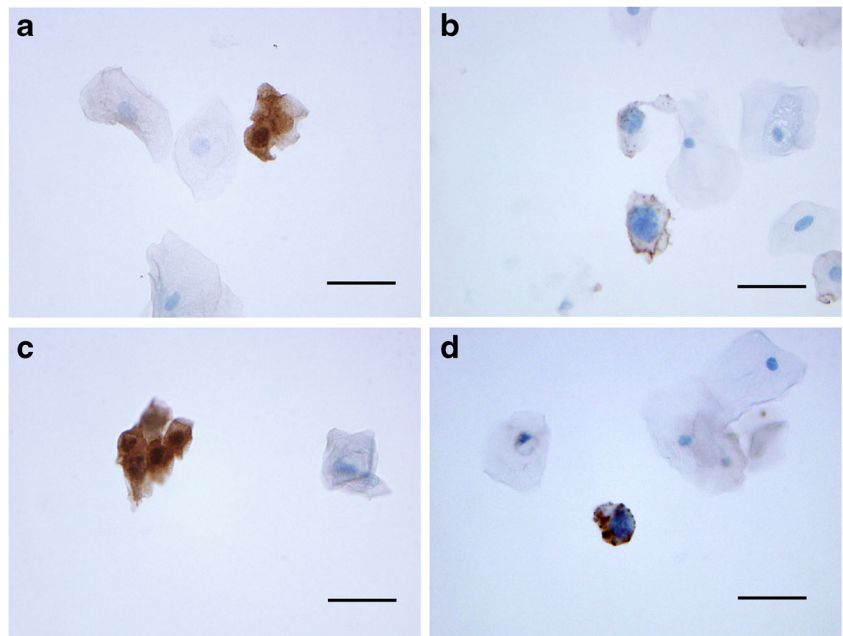
Study population characteristics are given in Table 1. In the evaluation of test performances CIN2 or greater histological findings (CIN2+) were considered as being positive for cervical disease. In the eligible study population 45.7 % of cases were CIN2+ (133/291) and ASCUS or greater cytology (ASCUS+) diagnosis was detected in 41.7 % (165/395) of eligible cases. Similarly, the prevalence of HPV was high, 45.5 % (179/395) including all cases (Table 1.). The performance of immunochemistry was evaluated in the triage settings for both cytology and HPV triage.

Comparing test performance for CLDN1 and p16^{INK4A} immunochemistry, scoring based evaluation (SM)

Sensitivities and specificities for immunochemistry were calculated for both CLDN1, see representative images in figures. (Figure 1b, d, Fig. 2b, c, d) and p16^{INK4A} (Fig. 1a, c, Fig. 2a) against CIN2+ as positives using the simple scoring method (SM), with mean values given. For details see Table 2. The immunocytochemistry (IC) results indicated that IC-CLDN1 sensitivity was slightly higher than IC-p16^{INK4A} sensitivity [77.3 % (68.7–84.6) vs. 69.3 % (60.9–76.3)], whereas specificity of IC-CLDN1 [60.9 % (53.5–67.2) vs. 80.5 % (73.2–86.5)] was found to be lower. The same pattern was evident for immunohistochemistry (IH) [IH-CLDN1 sensitivity: 88.2 % (81.7–93.2) vs. IH-p16^{INK4A} 75.5 % (67–81.1) and specificity: 33.3 % (28.5–37) vs. 68.1 % (62.6–73)], although the differences between the two biomarkers were more prominent, especially in regard to specificity.

Comparing CLDN1 immunocytochemistry to cytology (Table 2.) insignificant differences were demonstrable [sensitivity 77.3 % (68.7–84.6) vs. 75.2 % (68.9–80.8) and specificity (60.9 % (53.5–67.2) vs. 66.5 % (61.1–71.2)], however p16^{INK4A} immunocytochemistry results showed lower sensitivity [69.3 % (60.9–76.3) vs. 75.2 % (68.9–80.8)] but higher specificity [80.5 % (73.2–86.5) vs. 66.5 % (61.1–71.2)]. Comparing IC-CLDN1 to HPV performance, lower sensitivity was observable [77.3 % (68.7–84.6) vs. 95 % (89.9–97.7)]

Fig. 1 Immunocytochemical reaction for p16^{INK4a} and CLDN1 in LBC samples. Strong dark brown positive reaction can be seen for p16^{INK4a} in the nuclei and cytoplasm of dysplastic cells (**a, c**). Thin linear membranous reaction **b** and dot-like membranous and cytoplasmic reaction **d** are observable for CLDN1. Several normal cells in the samples do not express the antigens, scalebars represent 35 μm



with the same specificity [60.9 % (53.5–67.2) vs. 61.4 % (57.4–63.6)] and the results of p16^{INK4A} immunocytochemistry revealed even lower sensitivity [69.3 % (60.9–76.3) vs. 95 % (89.9–97.7)], but higher specificity [80.5 % (73.2–86.5) vs. 61.4 % (57.4–63.6)]. The immunohistochemistry of CLDN1 showed unacceptably low specificity [33.3 % (28.5–37)] paired with very high sensitivity [88.2 % (81.7–93.2)]. On the contrary, p16^{INK4A} immunohistochemistry performed better, showing the same range, but slightly higher specificity than HPV testing [68.1 % (62.6–73) vs. 61.4 % (57.4–63.6)] and a much lower sensitivity [75.5 % (67–81.1) vs. 95 % (89.9–97.7)].

Comparing test performance for CLDN1 and p16^{INK4A} immunochemistry, morphological reading adjusted scoring based evaluation (MASM)

These figures changed significantly when the full staining of morphologically evident lesions was taken into account as positives only (morphological reading adjusted scoring method - MASM). In general, the sensitivities were found to be lower, however, better correlations were noticeable between the test performances of CIN2+ negative cases [e.g. concordance of CIN2+ negatives in comparison with SM IC-CLDN1 and IC-p16^{INK4A}: 69.0 % (59.6–75.8) vs. MASM for the same

Fig. 2 Immunohistochemical reaction for p16^{INK4a} and CLDN1 in cervical samples. Strong nuclear and cytoplasmic reaction can be seen for p16^{INK4a} **a** in a CIN3 lesion. The reaction for CLDN1 is membranous as it can be demonstrated in CIN3 **b, d** and CIN1 **c** lesions. CLDN = claudin, scalebars represent 50 μm

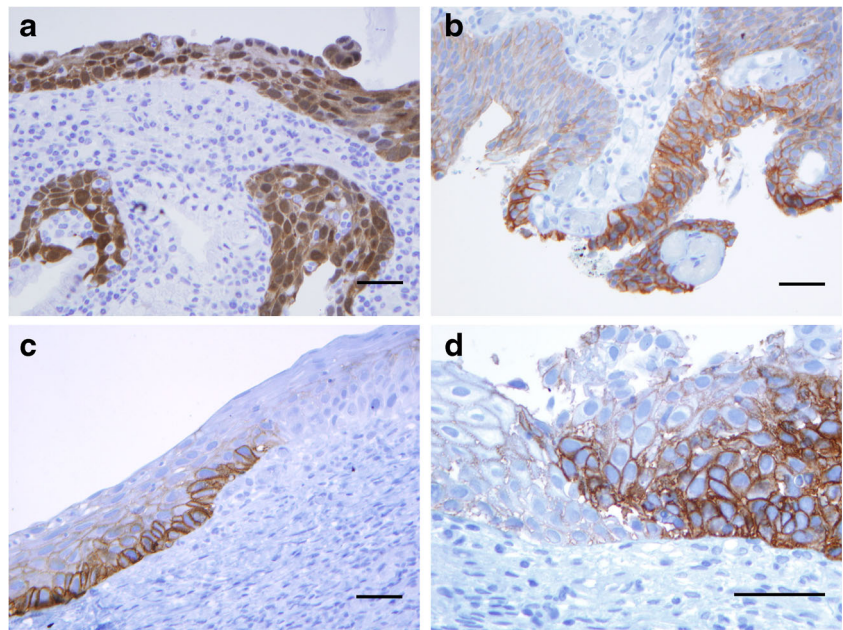


Table 2 Sensitivity and specificity data of the immunochemistry tests for samples with CIN2+ histology diagnosis as positivity gold standard clinical cutoff

	evaluation protocols		
		SM	MASM
IC- CLDN1	sensitivity (95%CI)	77.3 % (68.7–84.6)	53.3 % (44.7–61)
	specificity (95%CI)	60.9 % (53.5–67.2)	77 % (69.6–83.6)
IC- p16 ^{INK4A}	sensitivity (95%CI)	69.3 % (60.9–76.3)	52 % (43.8–58.6)
	specificity (95%CI)	80.5 % (73.2–86.5)	85.1 % (78–90.8)
IC- p16 ^{INK4A} and IC-CLDN1	sensitivity (95%CI)		69.3 % (60.7–76.8)
	specificity (95%CI)		73.6 (66.1–80)
IH- CLDN1	sensitivity (95%CI)	88.2 % (81.7–93.2)	52 % (44.3–59)
	specificity (95%CI)	33.3 % (28.5–37)	69.3 % (63.6–74.8)
IH- p16 ^{INK4A}	sensitivity (95%CI)	75.5 % (67–81.1)	54.9 % (48.8–59.8)
	specificity (95%CI)	68.1 % (62.6–73)	91.2 % (86.4–94.4)
IH- p16 ^{INK4A} and IH-CLDN1	sensitivity (95%CI)		85.3 % (78.4–90.7)
	specificity (95%CI)		67.2 % (62–71.2)
HPV	sensitivity (95%CI)	95 % (89.9–97.7)	
	specificity (95%CI)	61.4 % (57.4–63.6)	
cytology	sensitivity (95%CI)	75.2 % (68.9–80.8)	
	specificity (95%CI)	66.5 % (61.1–71.2)	

SM simple scoring method; MASM morphological reading adjusted scoring method. HPV (hr-HPV) and cytology (ASCUS+) sensitivity and specificity data are also shown

tests: 85.1 % (76.8–90.0)] (See Supplement Table 1.). Noteworthy were the findings that marginal homogeneity was also improved according to the McNemar's test values and that the MASM evaluation improved the association between the test results. Mirroring the decrease in sensitivity observable during MASM evaluation, the concordance between tests of CIN2+ positives cases was also lower [e.g. concordance of CIN2+ positives in comparison with SM IC-CLDN1 and IC-p16^{INK4A}: 84.0 % (73.8–89.7) vs. MASM of the same: 69.3 % (56.8–79.7), see Supplement Table 1.].

More importantly, the specificities over the markers and test methods were also improved, especially for p16^{INK4A} (see details in Table 2.). IC-CLDN1 sensitivity was equal to IC-p16^{INK4A} sensitivity [53.3 % (95 % (89.9–97.7) vs. 52.0 % (43.8–58.6)], however the specificity of IC-CLDN1 was improved as compared with the SM evaluation [77.0 % (69.6–83.6) vs. 60.9 % (53.5–67.2)] but was lower than the IC-p16^{INK4A} value [77.0 % (69.6–83.6) vs. 85.1 % (78–90.8)]. The same pattern was evident for immunohistochemistry regarding IH-CLDN1 [sensitivity: 88.2 % (81.7–93.2) vs. 52.0 % (44.3–59) and specificity: 33.3 % (28.5–37) vs. 69.3 % (63.6–74.8)], in which case specificity was again found to be highly improved as compared with sensitivity.

Comparison Between Cytology and HPV Test Performance and Immunochemistry

Regarding comparison of cytology and HPV test performances with immunochemistry (both IC and IH), higher

specificity was manifest in case of biomarkers, especially concerning MASM evaluation, which outperformed the specificity of either cytology or HPV testing [77.0 % (69.6–83.6) for IC-CLDN1, 85.1 % (78–90.8) for IC-p16^{INK4A}, 69.3 % (63.6–74.8) for IH-CLDN1, 91.2 % (86.4–94.4) for IH-p16^{INK4A} vs. 66.5 % (61.1–71.2) for cytology and 61.4 % (57.4–63.6) for HPV]. Another important feature of this evaluation method was the remarkably similar test performances of p16^{INK4A} and CLDN1 tests with the noticeable exception of IH-CLDN1 (Fig. 2b, d), which showed much higher specificity as compared with the SM evaluation, but was still significantly lower than the specificity value of IH-p16^{INK4A} (Fig. 2a, c). Nevertheless the agreement between IC and IH tests was also highly improved compared with the SM evaluation in test negative cases (see Supplement Table 1.) along with the marginal homogeneity of the test comparisons.

During analysis, however, it was evident that the concordance between tests for a given sample was moderate only (for CIN2+ positives in the range of 39 %–84 %, where the MASM IH-p16^{INK4A} vs. IC-p16^{INK4A} was at the lower, and the MASM IC-CLDN1 vs. IC-p16^{INK4A} was at the higher end of the range). This finding warrants the combination of these markers (Supplement Table 1.). Theoretically, in case of any marker combinations, either test positivity requirement would improve the sensitivity and lower the specificity as a tendency. Accordingly, combinations for MASM evaluation were calculated (Table 2.). The expected tendency of the changes in test performance was found to be generally true; both the combination of IC and IH tests showed higher sensitivity together

with a moderate decrease in specificity [sensitivity: 69.3 % (60.7–76.8) for combined IC test, 85.3 % (78.4–90.7) for combined IH test; specificity: 73.6 % (66.1–80) for combined IC test, 67.2 % (62–71.2) for combined IH test]. In case of combined IH evaluation test, high sensitivity and acceptable specificity were found, however in case of combined IC test the non-combined SM evaluation of IC-p16^{INK4A} performed better than the combined IC-CLDN1-p16^{INK4A} MASM evaluation. Overall, the improved sensitivities of the combinations of biomarkers imply their staining or biological variations for CIN2+ cases. This is underlined by the significant McNemar’s test for immunohistochemistry of p16^{INK4a} vs. immunohistochemistry of CLDN1 regardless of the evaluation method, also indicating differences in staining behaviour (see Supplement Table 1.).

Comparing Test Performance for CLDN1 and p16^{INK4A} Immunochemistry in Cytology and HPV Triage

As the major area of application of biomarkers is in different triage settings, HPV and cytology triages with different biomarker tests were calculated. Without requirement of full staining of the morphologically evident lesions (SM evaluation), the tests generally have higher sensitivities and lower specificities. In our study, the MASM evaluation of the tests gave higher specificities and lower sensitivities, a behaviour which was in agreement with that observed in non-triage settings. As a baseline, triaging cytology with HPV resulted in a sensitivity of 97.6 % (92.3–99.6) and a specificity of 44.9 % (36.0–48.3) (Table 3.). All biomarker based triage strategies are likely to perform better, since they have higher specificities. In this regard, IC-p16^{INK4A} (in the range of 81–86 % over evaluations and triage settings) demonstrated higher specificity but lower

sensitivity than IC-CLDN1 (58–76 %), which finding validates the established application of IC-p16^{INK4A} in triage. Generally, MASM evaluation further improved the specificity to the detriment of sensitivity (see Supplement Table 2.).

As correlation between biomarkers is moderate at sample level, the combination performance of these markers in triage was also determined. Only combinations for MASM evaluation were calculated (Table 3.). The specificities were found to be highly improved, however only small drops in sensitivity were evident. Especially cytology IC-CLDN1-p16^{INK4A} triage showed good test performance: 70.5 % (62.4–76.9) regarding sensitivity and 72.7 % (57.7–84.7) regarding specificity, which latter value was much better than the 44.9 % (36–48.3) observed for cytology HPV triage, while the otherwise significant drop in sensitivity from 97.6 % (92.3–99.6) (cytology HPV triage) to 70.5 % (62.4–76.9) could be regarded as an acceptable trade-off in cervical cancer screening. However, the SM evaluation but not the MASM evaluation of the standalone IC-P16^{INK4A} test is still a competitive alternative.

Discussion

There are many biomarkers proposed for cervical cancer screening, which have been discussed in detail [32, 33]. Well established commercial diagnostic platforms exist for immunochemical methods, however, more clinical data are needed to support their use, particularly regarding well controlled cross-sectional and longitudinal studies where the candidates are assessed alongside concurrent pathology. In general, there is a lack of literature reviewing side-by-side comparisons between competing tests.

Table 3 Sensitivity and specificity data of cytology (ASCUS+) and HPV (hr-HPV+) triage with combined biomarker tests

triage methods	evaluation protocols	HPV	HPV	cytology	cytology PP
		TP MASM	PP MASM	TP MASM	MASM
IC- p16 ^{INK4A} and IC-CLDN1	sensitivity (95%CI)	62.3 % (54.7–68.5)	58.1 % (50.1–64.1)	70.5 % (62.4–76.9)	63.9 % (55.9–69.7)
	specificity (95%CI)	73 % (58.8–84.5)	88.5 % (81.7–93.6)	72.7 % (57.7–84.7)	88.3 % (80.9–93.7)
IH- p16 ^{INK4A} and IH-CLDN1	sensitivity (95%CI)	73.1 % (66.4–78.6)	66.9 % (62.6–75.2)	77.1 % (70.4–82.4)	53.9 % (47.2–58.5)
	specificity (95%CI)	68.6 % (53.7–80.9)	90.7 % (85.1–94.8)	70.4 % (52.9–84.1)	92.7 % (87.3–96.4)
HPV	sensitivity (95%CI)			97.6 % (92.3–99.6)	75 % (68.3–80.7)
	specificity (95%CI)			44.9 % (36–48.3)	79.8 % (74–84.8)
cytology	sensitivity (95%CI)	81 % (75.4–86.3)	76.4 % (69.6–82.2)		
	specificity (95%CI)	43.8 % (32.1–54.7)	78.6 % (74–84.8)		

Test outcome is regarded positive if either test combination is positive. For better comparison the table shows the results of the pooled population (PP) with the figures representing the whole study population and with values for the base test positive population only (TP). Immunochemistry was evaluated using two different protocols: SM simple scoring method; MASM morphological reading adjusted scoring method. Sensitivity and specificity data for HPV and cytology are also shown

A meta-analysis has established the value of p16^{INK4A} use in cytological or histological specimens of uterine cervix. It has been shown that the proportion of cervical smears over-expressing p16^{INK4A} increases with the severity of cytological abnormality and histological grade, however the consistency of positive staining is varied depending on the severity of the lesion [20]. The immunohistochemical (IH) p16^{INK4A} staining of cervical biopsies with a rigorous evaluation was found to be a moderate diagnostic adjunct for distinguishing biopsies with or without CIN2+ (sensitivity 86.7 %, specificity 82.8 %) [21]. A multicentric study compared the sensitivity and specificity of p16^{INK4A} immunocytochemistry with HPV testing in histologically detected CIN2+ cases, in the triage of atypical cells of undetermined significance (ASCUS) and low grade squamous intraepithelial lesions (LSIL). The IC-p16^{INK4A} sensitivity was found to be similar to HPV testing in both triage settings (ASCUS: 92.6 % vs. 90.1 %; LSIL: 92.0 % vs. 95.7 %). P16^{INK4A} however provided significantly better specificity than HPV alone for the triage of ASCUS Pap cytology cases (63.2 % vs. 37.8 % and LSIL (37.1 % vs. 18.5 %) [22]. In their report, these authors discussed the need for more comprehensive and powerful studies to demonstrate the performance of p16^{INK4A} testing in cervical cancer screening. In addition, there is a high variability in the literature regarding the evaluation protocols and cut-offs for p16^{INK4A} immunocytochemistry and immunohistochemistry positivity [20, 23].

Any new cervical cancer biomarker should be compared with existing tests, especially with p16^{INK4A}. To complicate the picture, the value of p16^{INK4A} has been disputed and analysed in a number of studies [20, 23] with variable conclusions; furthermore, there is no clear consensus on what would be the most appropriate method for evaluation of immunocytochemical results. Another aspect is the highly anticipated and reportedly [20] unmatched performance of p16^{INK4A} immunocytochemistry in cytology and histology specimens, which has been confirmed by our data on the basis of the concordance of CIN2+ positive cases comparing SM IH-p16^{INK4A} and IC-p16^{INK4A}. In our study the gold standard histology and immunohistochemistry/immunocytochemistry tests for p16^{INK4A} and the performance of a new biomarker claudin 1 (CLDN1) were evaluated in case-control manner, with morphology control at the sample level in certain cases.

The proposal that the morphology of lesions is still a significant aid in the evaluation of both immunocytochemistry and immunohistochemistry has been underlined in our study by the large differences between cytology and histology concerning the performance of p16^{INK4A}, especially in triage (Supplement Table 1.) when applying the traditional immunocytochemistry reading (SM evaluation). Strikingly, the performance of p16^{INK4A} was highly reduced if the evaluation was restricted to only morphologically evident lesions (MASM evaluation) in negative cases, whereas the positive cases

exhibited lost concordance, indicating other factors in the background. It is, however, noteworthy that the marginal homogeneity of concordances was found to be improved. This was also true for CLDN1. Apparently, a large number of CIN2+ negative lesions showed false-positive IH-p16^{INK4A} (and IH-CLDN1) staining (see Supplement Table 2.). Moreover, the unspecific staining was most probably a significant factor of false positivity in case of both immunocytochemistry and immunohistochemistry, since all specificities were found to be improved using MASM evaluations. In this regard, the problem of CLDN1 false positivity in case of both IC and IH was more evident (see Supplement Table 2.).

Recent analyses of claudins have suggested that the TJ-based perm-selective barrier system is involved in the regulation of cell proliferation [25, 26]. CLDN1 overexpression was demonstrated in cervical cancer biopsies by cDNA array technology [34]. In another study the expressions of CLDN1 and claudin-7 were gradually increased in accordance with the progression from LSIL to in situ CC, however expression of these proteins was very low in normal cervical epithelium by immunohistochemistry, thus these proteins may serve as diagnostic markers for CINs [28, 29, 31].

Regarding CLDN1 immunocytochemical staining, a remarkable finding in our study was that CLDN1 – p16^{INK4A} concordance (SM evaluation) was very high [e.g. concordance of CIN2+ positives 84.0 % (73.8–89.3); concordance of CIN2+ negatives 69.0 % (59.6–75.8), see Supplement Table 2.]. As a consequence, CLDN1 is a promising, new immunocytochemistry cervical biomarker with a very similar performance to, but being generally less specific than p16^{INK4A} (see Table 2, Supplement Table 1.). In our study, CLDN1 showed advantages especially in IC (SM evaluation) and stained p16^{INK4A} CIN2+ negative lesions more intensely than p16^{INK4A} did CLDN1 negative lesions (both IC and IH, Supplement Table 1.). This finding was partly true for MASM as well. As a consequence, the application of CLDN1 as a combinational marker with the p16^{INK4A} triage test seems a straightforward strategy for obtaining a balanced sensitivity and specificity.

An effective cytology triage would be a mandatory technological advance in cervical cancer screening, since in the absence of such technology cytology should be replaced by other screening technologies such as HPV testing, resulting in loss of grading information and producing uncertainty in patient management. Our study population was well suited to assess the value of HPV triage strategies compared to cytology triage strategies, since the number of ASCUS cases was high (62/389). In our study, the cytology HPV triage was only slightly different from the HPV cytology triage [97.6 % (92.3–99.6 %) vs. 81.0 % (75.4–86.3 %) for sensitivity and 44.9 % (36.0–48.3) vs. 43.8 % (32.1–54.7 %) for specificity]. More importantly, the cytology biomarker triage and the HPV biomarker triage were not found to significantly differ in case of

either evaluation method (see Supplement Table 1.), enabling usage of biomarkers after both tests.

HPV tests are also used in the triage of equivocal cytological abnormalities and post-treatment surveillance [5]. HPV is a sensitive marker for identifying patients at risk for cervical neoplasia and has greater sensitivity than conventional cytology for identifying CIN2-3 cases [7, 8]. In a published pooled analysis of studies with HPV testing pooled sensitivity of 96 % (94 %-97 % CI95%) versus 53 % (49 %-57 % CI95%) was shown for CIN2+ compared to cytology, but the pooled specificity was found to be 91 % (90 %-91 % CI95%) versus 96 % (96 %-97 % CI95%) for cytology in women between the age of 18–96 years [6]. The HPV high sensitivity encourages policies to widen the screening interval with reduced overall costs, however, several drawbacks are involved as compared with the high specificity triage options, including lower chances of incidental diagnosis of advanced lesions and possible lower screening compliance. Our study reflects that HPV and cytology based HPV or cytology triage strategies show low specificities. Regarding immunochemical triage strategies, traditional (SM) immunochemistry evaluation generally showed inferior case-control correlation for CIN2+ negatives between cytology and histology in our study, which was improved by MASM evaluation. In this scenario, cytology IC-CLDN1-p16^{INK4A} triage using MASM evaluation showed a performance comparable to HPV IC-p16^{INK4A} triage with the advantage of better CIN2+ negative correlation between IC and IH than the SM based p16^{INK4A} (82.1 % vs 68 %) (Supplement Table 2.). This underlines the importance of morphological readings of cervical smear immunochemistry and shows that cytology can be improved in order to achieve the state-of-the-art of HPV based screening technologies, which might be of interest in the future of screening protocols. In those countries where cytology screening is in place, its replacement with the less informative HPV screening test would result in reduced quality of patient management.

The current study focused on the clinical behaviour of cervical pre-cancer and cancer specific biomarkers, general proliferative markers were therefore not considered. The published and newly established immunocytochemical dual staining protocol - which is a combination of p16^{INK4A} and proliferation marker Ki-67 immunochemistries (CINTec[®] Plus) - is based on a novel definition of positivity [35]. Introduction of a proliferative marker is a sound concept regarding the nature of the carcinogenic process, however taking together our morphological findings concerning the unspecific and variable staining of diseased cells, further evaluation is necessary. Especially the existence of p16^{INK4A} and CLDN1 single marker positive diseased cells warrants more fundamental studies on the gene expression variations in cervical pre-cancer and cancer lesions. In our study, by restricting the immunocytochemical and immunohistochemical readings to

morphology positive cells, the number of positive test outcomes was significantly reduced for both CLDN1 and p16^{INK4A} covering all methods, and reduced CIN2+ positive concordance was also shown. Even though we found certain advantages regarding the combination of morphology and immunochemistries, neither morphology nor biomarkers alone or in combinations were able to deliver an ultimate test performance. In conclusion, the combination of different markers is a logical next step for the future. These studies can lead to the better understanding of the cervical carcinogenesis process and will ultimately result in cervical diagnostic tests which will have better diagnostic performance.

Acknowledgments This work was supported by FP7 Collaborative project Automatic Cancer Screening Based on Real-time PCR – AUTOCAS, #HEALTH-2007-2.4.1-4; NKFP_07_2-SPE-SAFE, Jedlik Ányos 2nd sub program #KMR_12-1-2012-0032 by the Hungarian National Research and Development Fund and by the Hungarian National Research Foundation #PD105019.


References

1. Forouzanfar MH, Foreman KJ, Delossantos AM, et al. (2011) Breast and cervical cancer in 187 countries between 1980 and 2010: a systematic analysis. *Lancet* 378:1461–1484. doi:10.1016/S0140-6736(11)61351-2
2. Iarc (2003) Colposcopy and treatment of cervical intraepithelial neoplasia: A beginners' manual. 1–132.
3. Wright TC, Massad LS, Dunton CJ, et al. (2007) 2006 consensus guidelines for the management of women with abnormal cervical cancer screening tests. *Am J Obstet Gynecol* 197:346–355. doi:10.1016/j.ajog.2007.07.047
4. Gustafsson L, Pontén J, Bergström R, Adami HO (1997) International incidence rates of invasive cervical cancer before cytological screening. *Int J Cancer* 71:159–165
5. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, et al. (1999) Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 189:12–19. doi:10.1002/(SICI)1096-9896(199909)189:1<12::AID-PATH431>3.0.CO;2-F
6. Cuzick J, Clavel C, Petry K-U, et al. (2006) Overview of the European and north American studies on HPV testing in primary cervical cancer screening. *Int J Cancer* 119:1095–1101. doi:10.1002/ijc.21955
7. Ronco G, Giorgi-Rossi P, Carozzi F, et al. (2010) Efficacy of human papillomavirus testing for the detection of invasive cervical cancers and cervical intraepithelial neoplasia: a randomised controlled trial. *Lancet Oncol* 11:249–257. doi:10.1016/S1470-2045(09)70360-2
8. Anttila A, Kotaniemi-Talonen L, Leinonen M, et al. (2010) Rate of cervical cancer, severe intraepithelial neoplasia, and adenocarcinoma in situ in primary HPV DNA screening with cytology triage: randomised study within organised screening programme. *BMJ* 340:c1804
9. Plummer M, Schiffman M, Castle PE, et al. (2007) A 2-year prospective study of human papillomavirus persistence among women with a cytological diagnosis of atypical squamous cells of undetermined significance or low-grade squamous intraepithelial lesion. *J Infect Dis* 195:1582–1589. doi:10.1086/516784
10. Rodríguez AC, Schiffman M, Herrero R, et al. (2008) Rapid clearance of human papillomavirus and implications for clinical focus on

- persistent infections. *J Natl Cancer Inst* 100:513–517. doi:10.1093/jnci/djn044
11. Saslow D, Solomon D, Lawson HW, et al. American Cancer Society, American Society for Colposcopy and Cervical Pathology, and American Society for Clinical Pathology screening guidelines for the prevention and early detection of cervical cancer. *CA Cancer J Clin* 62:147–172. doi:10.3322/caac.21139
 12. Naucler P, Ryd W, Törnberg S, et al. (2009) Efficacy of HPV DNA testing with cytology triage and/or repeat HPV DNA testing in primary cervical cancer screening. *J Natl Cancer Inst* 101:88–99. doi:10.1093/jnci/djn444
 13. Rijkaart DC, Berkhof J, van Kemenade FJ, et al. (2012) HPV DNA testing in population-based cervical screening (VUSA-screen study): results and implications. *Br J Cancer* 106:975–981. doi:10.1038/bjc.2011.581
 14. Castle PE, Stoler MH, Wright TC, et al. (2011) Performance of carcinogenic human papillomavirus (HPV) testing and HPV16 or HPV18 genotyping for cervical cancer screening of women aged 25 years and older: a subanalysis of the ATHENA study. *Lancet Oncol* 12:880–890. doi:10.1016/S1470-2045(11)70188-7
 15. Overmeer RM, Louwers JA, Meijer CJLM, et al. (2011) Combined CADM1 and MAL promoter methylation analysis to detect (pre-)malignant cervical lesions in high-risk HPV-positive women. *Int J Cancer* 129:2218–2225. doi:10.1002/ijc.25890
 16. Depuydt CE, Makar AP, Ruymbeke MJ, et al. (2011) BD-ProExC as adjunct molecular marker for improved detection of CIN2+ after HPV primary screening. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 20:628–637. doi:10.1158/1055-9965.EPI-10-0818
 17. Patel DA, Rozek LS, Colacino JA, et al. (2012) Patterns of cellular and HPV 16 methylation as biomarkers for cervical neoplasia. *J Virol Methods* 184:84–92. doi:10.1016/j.jviromet.2012.05.022
 18. De Strooper LMA, Hesselink AT, Berkhof J, et al. (2014) Combined CADM1/MAL methylation and cytology testing for colposcopy triage of high-risk HPV-positive women. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 23:1933–1937. doi:10.1158/1055-9965.EPI-14-0347
 19. Bibbo M, DeCecco J, Kovatich AJ (2003) P16INK4A as an adjunct test in liquid-based cytology. *Anal Quant Cytol Histol* 25:8–11
 20. Galamb Á, Benczik M, Zinner B, et al. (2015) Dysregulation of microRNA expression in human cervical preneoplastic and neoplastic lesions. *Pathol Oncol Res*. doi:10.1007/s12253-014-9871-x
 21. Tsoumpou I, Arbyn M, Kyrgiou M, et al. (2009) p16(INK4a) immunostaining in cytological and histological specimens from the uterine cervix: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Treat Rev* 35:210–220. doi:10.1016/j.ctrv.2008.10.005
 22. Galgano MT, Castle PE, Atkins KA, et al. (2010) Using biomarkers as objective standards in the diagnosis of cervical biopsies. *Am J Surg Pathol* 34:1077–1087. doi:10.1097/PAS.0b013e3181e8b2c4
 23. Denton KJ, Bergeron C, Klement P, et al. (2010) The sensitivity and specificity of p16(INK4a) cytology vs HPV testing for detecting high-grade cervical disease in the triage of ASC-US and LSIL pap cytology results. *Am J Clin Pathol* 134:12–21. doi:10.1309/AJCP3CD9YKYFJDQL
 24. Van Bogaert L-J (2012) P16INK4a immunocytochemistry/immunohistochemistry: need for scoring uniformization to be clinically useful in gynecological pathology. *Ann Diagn Pathol* 16:422–426. doi:10.1016/j.anndiagpath.2012.03.006
 25. Lal-Nag M, Morin PJ (2009) The claudins. *Genome Biol* 10:235. doi:10.1186/gb-2009-10-8-235
 26. Tsukita S, Yamazaki Y, Katsuno T, Tamura A (2008) Tight junction-based epithelial microenvironment and cell proliferation. *Oncogene* 27:6930–6938. doi:10.1038/onc.2008.344
 27. Morin PJ (2005) Claudin proteins in human cancer: promising new targets for diagnosis and therapy. *Cancer Res* 65:9603–9606. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-2782
 28. Sobel G, Németh J, Kiss A, et al. (2006) Claudin 1 differentiates endometrioid and serous papillary endometrial adenocarcinoma. *Gynecol Oncol* 103:591–598. doi:10.1016/j.ygyno.2006.04.005
 29. Sobel G, Páska C, Szabó I, et al. (2005) Increased expression of claudins in cervical squamous intraepithelial neoplasia and invasive carcinoma. *Hum Pathol* 36:162–169. doi:10.1016/j.humpath.2004.12.001
 30. Szabó I, Kiss A, Schaff Z, Sobel G (2009) Claudins as diagnostic and prognostic markers in gynecological cancer. *Histol Histopathol* 24:1607–1615
 31. Lee J-W, Lee S-J, Seo J, et al. (2005) Increased expressions of claudin-1 and claudin-7 during the progression of cervical neoplasia. *Gynecol Oncol* 97:53–59. doi:10.1016/j.ygyno.2004.11.058
 32. Wentzensen N, von Knebel DM (2007) Biomarkers in cervical cancer screening. *Dis Markers* 23:315–330
 33. Tornesello ML, Buonaguro L, Giorgi-Rossi P, Buonaguro FM (2013) Viral and cellular biomarkers in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia and cancer. *Biomed Res Int* 2013:519619. doi:10.1155/2013/519619
 34. Vázquez-Ortiz G, Ciudad CJ, Piña P, et al. Gene identification by cDNA arrays in HPV-positive cervical cancer. *Arch Med Res* 36:448–458. doi:10.1016/j.arcmed.2005.04.016
 35. Vrdoljak-Mozetič D, Krašević M, Verša Ostojić D, et al. (2015) HPV16 genotype, p16/Ki-67 dual staining and koilocytic morphology as potential predictors of the clinical outcome for cervical low-grade squamous intraepithelial lesions. *Cytopathology* 26:10–18. doi:10.1111/cyt.12121



Dual-Stained Cervical Cytology and Histology with Claudin-1 and Ki67

Tímea Szekerczés¹ · Ádám Galamb² · Adrienn Kocsis^{3,4} · Márta Benczik^{3,4,5} · Tibor Takács^{3,4,5} · Attila Martonos² · Balázs Járny¹ · András Kiss¹ · Csaba Jeney^{3,6} · Miklós Nyíri^{3,4} · Zsuzsa Schaff¹  · Gábor Sobel²

Received: 18 October 2017 / Accepted: 30 January 2018
© Arányi Lajos Foundation 2018

Abstract

Several biomarkers are in use to improve the sensitivity and specificity of cervical cancer screening. Previously, increased expression of tight junction protein claudin-1 (CLDN1) was detected in premalignant and malignant cervical lesions and applied for cytology screening. To improve the specificity, a double immunoreaction with CLDN1/Ki67 was developed in the recent study. Parallel p16/Ki67 (CINtec® PLUS) and CLDN1/Ki67 dual-stained cytology and histology were performed and compared. p16/Ki67 immunoreaction showed positivity in 317 out of 1596 smears with negativity in 1072 and unacceptable reactions in 207 samples. CLDN1/Ki67 dual staining was positive in 200 of 1358 samples, negative in 962, whereas 196 smears could not be evaluated due to technical reasons. Considering the high-grade squamous intraepithelial lesion cytology as gold standard, sensitivity of CLDN1/Ki67 reaction was 76%, specificity was 85.67%, while for p16/Ki67 sensitivity was 74% and specificity was 81.38%. Comparison of CLDN1/Ki67 and p16/Ki67 dual stainings showed the results of the two tests not to be significantly different. Analysing histological slides from 63 cases, the results of the two tests agreed perfectly. As conclusion the sensitivity and specificity proved to be similar using p16/Ki67 and CLDN1/Ki67 double immunoreactions both on LBC samples and on histological slides.

Keywords Cervical cancer · Claudin-1/Ki67 immunochemistry · p16/Ki67 reaction · Claudins

Introduction

Papanicolaou (Pap) smear-screening significantly reduced the incidence and mortality of cervical cancer, however, because of the low sensitivity and poor reproducibility in contrast to the high specificity, more “sophisticated” methods have been introduced in the last decades and new screening guidelines have been proposed [1–6].

High-risk human papillomaviruses (hrHPV) play crucial role in the development of premalignant and malignant cervical lesions and HPV DNA-based testing has significantly increased the sensitivity of primary cervical screening [3, 5, 7]. HPV testing however, is less specific than cytology, mainly because the majority of infections are transient and spontaneously eliminated in the majority of cases [3, 6, 8].

New biomarkers aiming to improve the specificity of screening have been developed, which might be used to differentiate the productive and transforming HPV infection and/or predict disease severity [6, 9, 10]. Several new tests were introduced, such as p16^{INK4A}, dual p16^{INK4A}/Ki67 staining, ProexC (combined MCM2/TOP2A), etc. [6, 10, 11].

Previously, our group as well as others demonstrated significantly increased expression of the tight junction (TJ) protein claudin-1 in premalignant and malignant cervical lesions [12–14]. Claudin-1 (CLDN1) as a biomarker has been suggested to be used for both cytology and histology with similar diagnostic potential as p16^{INK4A} [9]. Claudins are the main functional and structural components of TJs, playing role in paracellular permeability, maintaining cellular polarity and participating in signal transduction [15]. The limitation of our previous study was the relatively low specificity of CLDN1 staining similarly to p16^{INK4A} testing [9]. For this

Tímea Szekerczés and Ádám Galamb equally contributed

✉ Zsuzsa Schaff
schaff.zsuzsa@med.semmelweis-univ.hu

- ¹ 2nd Department of Pathology, Semmelweis University, Üllői út 93, Budapest H-1091, Hungary
- ² 2nd Department of Obstetrics and Gynecology, Semmelweis University, Budapest, Hungary
- ³ Cellcall Ltd., Budapest, Hungary
- ⁴ NEUMANN Diagnostics Ltd., Budapest, Hungary
- ⁵ SYNLAB Hungary Ltd., GenoID Molecular Diagnostic Laboratory, Budapest, Hungary
- ⁶ Department of Medical Microbiology, Semmelweis University, Budapest, Hungary

reason, the aim of the present study was to test a double immunoreaction using antibodies against CLDN1 and the proliferation marker Ki67 on cytological and histological samples, in order to improve specificity. The results of the p16/Ki67 (CINtec® PLUS) and CLDN1/Ki67 dual immunostainings were compared with each other, as well as with the cervical cytological readings and also with the histological results, and then analysed statistically.

Materials and Methods

Patient Population and Tissues Samples

An outpatient population of 2907 women between 18 and 65 years of age who attended routine gynaecological screening between 2013 and 2015 were enrolled in the TRACE clinical study conducted in Hungary [11] (Fig. 1). All clinical samples were obtained with the approval of the National Ethics Committee (asset number: V-R-021/04346-4/2013), all patients gave informed consent and the trial was performed in accordance with the Declaration of Helsinki. Cervical cytology samples were collected after colposcopy assisted visual inspection of the cervix by gynecologists and were kept in preservation solution for subsequent liquid-based cytology (LBC) analysis. When required by the cytological diagnosis, confirmatory histological diagnosis was made (cone or punch biopsy).

Cytological Diagnosis

All samples obtained for cytology were collected in PreservCyt® Solution (Hologic™ Inc. Marlborough, MA,

USA) and processed using ThinPrep® 2000 Processor (Hologic™ Inc.). The first slide from each vial was taken for cytology smears, Pap-stained and reported using the 2001 Bethesda Reporting System [16, 17]. Further ThinPrep slides were prepared from the same container for immunocytochemical reactions and for subsequent HPV testing (see below). ThinPrep smears were evaluated if at least 500 cervical epithelial cells were present.

HPV Testing

HPV viral DNA detection was performed on LBC samples using CONFIDENCE HPV™ test, which detects HPV16 and HPV18 separately and other high-risk types in groups based on multiplex real-time PCR technology [11].

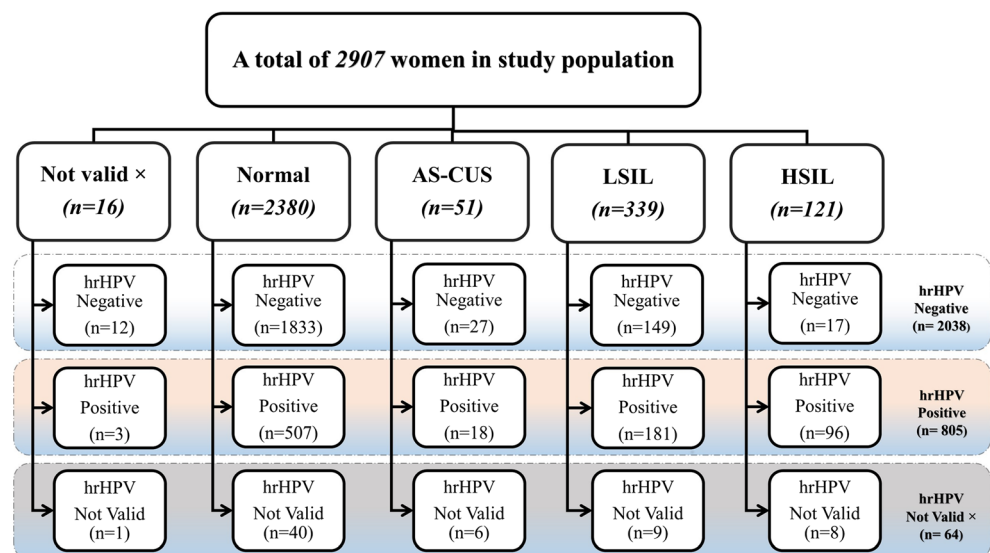
Immunocytochemistry and Immunohistochemistry

Parallel ThinPrep slides from the residual material from each vial were used for the immunoreactions (CINtec® PLUS, CLDN1/Ki67 sequence). For immunohistochemistry the 3–4 µm thick, formalin fixed paraffin embedded (FFPE) sections were cut and prepared further.

CINtec®PLUS Immunoreaction (p16^{INK4a}/Ki67 Testing)

ThinPrep slides were prepared for CINtec® PLUS (Roche mtm Laboratories AG, Mannheim, Germany) reaction according to the manufacturer's instructions. When accessing the reactions, the cases were called positive if one or more cell(s) out of at least 500 normal or altered squamous epithelial cells

Fig. 1 Cytology (liquid-based cytology) diagnosis and hrHPV testing of the study population. hrHPV = high-risk human papilloma virus, AS-CUS = atypical squamous cells of undetermined significance, LSIL = low-grade squamous intraepithelial lesion, HSIL = high-grade squamous intraepithelial lesion



× „Not valid” means that the samples could not be evaluated for cytology; HPV testing

on the slides stained both with a brown cytoplasmic/nuclear (p16) and a red nuclear (Ki67) reaction irrespective of the interpretation of morphologic abnormalities.

CLDN1/Ki67 Immunoreaction

Parallel LBC (3rd slide from the collection vials) and FFPE slides were prepared for CLDN1 and Ki67 reactions. Similarly as in the case of CINtec® PLUS reaction, a case was considered positive if one or more cervical epithelial cell(s) had both a brown membrane stain (CLDN1) and a red nuclear reaction (Ki67).

CLDN1 reaction was carried out in a Ventana ES automatic immunostainer (Ventana Medical Systems Inc.; Tucson, AZ, USA). The slides were incubated for 30 min at 42 °C with the primary polyclonal rabbit antibody against CLDN1 in 1:100 dilution (Cell Marque, Roclin, CA, USA), followed by a HRP multimer-based, biotin-free detection method. Secondary antibody and reagents were obtained from Ventana (iView DAB Detection Kit; Ventana Medical Systems Inc.). Bluing reagent was not used because CLDN1 immunoreactions were followed manually by Ki67 reaction. In the first step, antigen retrieval was used again for 10 min at 95 °C with Antigen Unmasking Solutions (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA, in 1:100 dilution). Thereafter the slides were incubated for 30 min with the mouse monoclonal primary antibody against Ki67 (Dako, Glostrup, Denmark) diluted 1:100, at room temperature. The secondary antibody reagent (ImmPRESS AP Reagent; Vector Laboratories) included a polymer reagent conjugated to alkaline phosphatase (AP) and goat anti-mouse Fab' antibody fragments for detection of Ki67, applied for 30 min at room temperature (1:100 dilution). Vector Red Alkaline Phosphatase Substrate Kit (Vector Laboratories) was applied for 25 min using Fast Red as chromogen. Finally, the slides were counterstained with alcohol-free hematoxylin and coverslipped with xylene-based Cytoseal XYL Mounting Medium (Richard-Allan Scientific, Thermo Scientific, Kalamazoo, MI, USA).

Statistical Analysis

Statistical analysis was carried out using STATISTICA software v12.0 (StatSoft; Tulsa, OK, USA) and MedCalc (v12.4.0.0; MedCalc Software, Mariakerke, Belgium). Differences were considered statistically significant when $p < 0.05$. McNemar's test was used to evaluate differences in positivity for p16/Ki67 and CLDN1/Ki67 in cytological samples. Kappa test was used to measure the agreement of the two immunochemical tests. Sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV), negative predictive value (NPV), with 95%-confidence intervals were calculated for endpoint which was CIN2/CIN2+ (cervical intraepithelial neoplasia,

high-grade squamous intraepithelial lesion - HSIL). Receiver Operating Characteristic (ROC) curves and Area under the curve (AUC) were computed to further compare CINtec® PLUS with CLDN1/Ki67.

Results

1. Patient Population, Cytology and Histology

Out of a total of 2907 women who underwent LBC for routine cervical cancer screening, 2891 samples provided acceptable results, from which 2380 proved to be normal as shown together with the results of hrHPV testing (Fig. 1). High-risk HPV (hrHPV) were detected in 805 samples, negative results were found in 2038 samples and no acceptable results were received in 64 cases (Fig. 1). The diagnosis of the 63 histological samples is demonstrated on Table 1.

2. Comparing Cytology and Histological Diagnosis to p16/Ki67 (CINtec® PLUS) and CLDN1/ Ki67 Dual-Stainings

a) Comparing Cytology Diagnosis and p16/Ki67 (CINtec® PLUS) Reaction

CINtec® PLUS reactions were performed in 1596 cases (Table 2). The positive reaction presented a brownish cytoplasmic/nuclear reaction for p16 and a red immunostaining for Ki67 simultaneously in one or more cervical epithelial cells (Fig. 2a). Out of the 1596 samples, 1386 presented evaluable results with both Pap test and CINtec® PLUS reactions, in 207 cases one of the tests could not be evaluated because of technical reasons (Table 2).

b) Comparing Cytology Diagnosis with CLDN1/Ki67

CLDN1-positive cells gave an intense brown linear circular/semi-circular or spotted reaction along the cellular membranes, sometimes in the cytoplasm, together with a bright red nuclear Ki67 reaction in the same cells (Fig. 2b, c, d; Fig. 3a, b). CLDN1/Ki67 dual-immunostaining was performed in 1358 cases and 1159 provided acceptable immunostaining as shown on Table 3.

c) Comparing Histology Diagnosis with CLDN1/Ki67 and p16/Ki67 (CINtec® PLUS)

Parallel slides from the FFPE blocks were used for immunohistochemistry. Ki67 positivity was seen in the cells of the basal layer in normal cervical squamous epithelium both by CINtec® PLUS and by CLDN1/Ki67 reaction (Fig. 4a, b). Brownish reaction for p16 (Fig. 4c) and CLDN1 (Fig. 3c, d;

Table 1 P16/Ki67 (CINtec® PLUS) and CLDN1/Ki67 on histological section ($n = 63$)

Histological diagnosis	Number of cases	Average ages (yrs)	CINtec® PLUS		CLDN1/Ki67	
			Positive	Negative	Positive	Negative
Carcinoma in situ	7	40.57	7	0	7	0
HSIL (CIN 2 or 3)	30	33.50	30	0	30	0
LSIL (CIN 1)	3	42.33	0	3	0	3
No dysplasia, chronic cervicitis	23	35.61	0	23	0	23

CLDN1 claudin-1, HSIL high grade squamous intraepithelial lesion, LSIL low grade squamous intraepithelial lesion, CIN cervical intraepithelial neoplasia

Fig. 4d) and numerous Ki67 positive red nuclei could be demonstrated by both tests in the CIN2+ lesions. By comparison of the two tests (CINtec® PLUS and CLDN1/Ki67), the results agreed perfectly (Table 1).

3. Comparing Test Performance for CLDN1/Ki67 and p16/Ki67 (CINtec® PLUS) Considering the Cytological Evaluation

CINtec® PLUS and CLDN1/Ki67 could be performed parallel in 1352 cases. Both reactions were accepted in 1097 cases (Table 4). Assessment of the two immune tests equalled in 1003 samples (840 negative and 163 positive, 91.4%) (Table 4). The value of agreement between the two tests by Kappa tests and the result of the two tests agreed accordingly ($\kappa = 0.724$; 95% CI from 0.672 to 0.776).

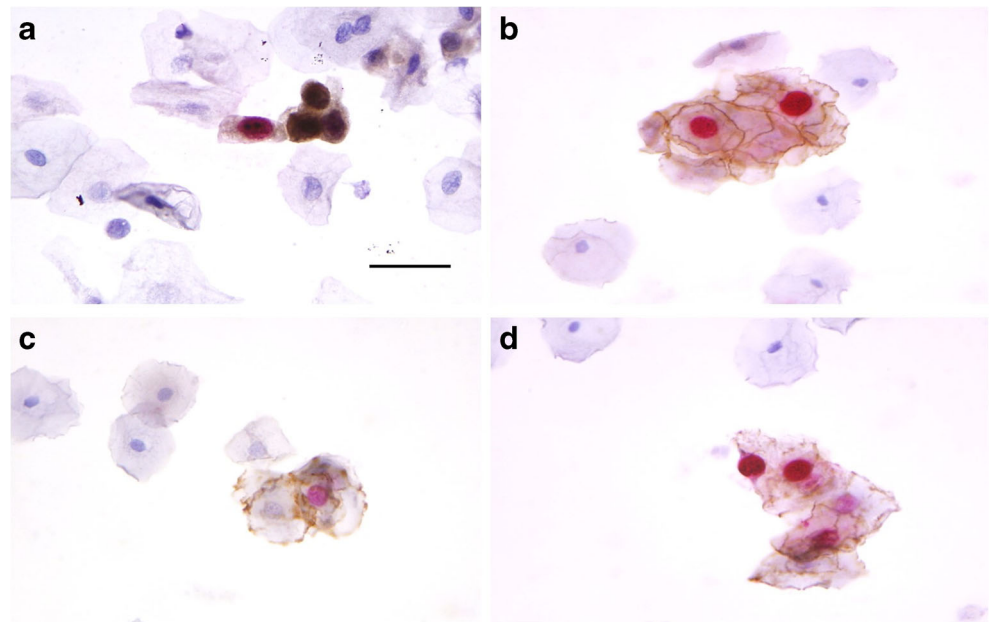
Furthermore, comparison of the test performances for CINtec® PLUS and CLDN1/Ki67 considering cytological evaluation and efficiency values [sensitivities, specificities, positive (PPVs), and negative predictive values (NPVs)] for all screening methods to detect ASC-US, LSIL or HSIL is summed in Table 5 a and b. It is worthy of note that among women with LSIL cytology CINtec® PLUS showed slightly higher sensitivity than CLDN1/Ki67 (40.28 vs. 35.07%) but the specificity values were lower (83.41 vs 87.13%). For patients with HSIL, the sensitivity and specificity values reached a good, evaluable range, over 70–80%. CLDN1/Ki67 showed slightly better sensitivity [76.00% (95% CI from 61.83% to 86.94%)] and specificity [85.67% (95% CI from 83.40% to 87.74%)] (Table 5 b) than the CINtec® PLUS values [sensitivity 74.00% (95% CI from (59.66% to 85.37%) and specificity 81.38% (95% CI from 78.88% to 83.69%)].

Table 2 Results of p16/Ki67 (CINtec® PLUS) on LBC specimens.

Liquid-based cytology (LBC)	CINtec® PLUS ($n=1596$)		
	Positive ($n=317$)	Negative ($n=1072$)	Not valid ($n=207$)
Normal ($n=1226$)	173	880	173
ASC-US ($n=33$)	8	20	5
LSIL ($n=233$)	62	151	20
HSIL ($n=98$)	72	20	6
Not Valid x ($n=6$)	2	1	3
* the highlighted section shows the number of acceptable cases by both Pap test and CINtec® PLUS ($n= 1386$)			

AS-CUS atypical squamous cells of undetermined significance, LSIL low grade squamous intraepithelial lesions, HSIL high grade squamous intraepithelial lesion

Fig. 2 Dual immunoreactions on LBC (ThinPrep) cytology slides (a). p16/Ki67 (CINtec® PLUS) reaction shows positive cells with red nuclei and brown cytoplasmic staining (a). CLDN1/Ki67 positive cells have red nuclei and brown membranous linear or spotted staining (b, c, d). LBC = liquid-based cytology, CLDN1 = claudin-1. Scalebar: 35 µm



Regarding the efficiency of the CINtec® PLUS and CLDN1/Ki67 test analysis, Receiver Operating Characteristic (ROC) curves were demonstrated to assess differences between the two immunoreaction performances. The result of the analysis are given in Fig. 5. Data were similar to the previous comparison above, CLDN1/Ki67 had slightly higher curve [AUC = 0.806 (95% CI from (0.781 to 0.829))] than CINtec® PLUS [AUC = 0.774 (95% CI from 0.748 to 0.798)], but no significant difference ($p=0.177$) was found between the two tests since the difference area was only 0.0317.

Discussion

Several biomarkers have been introduced for cervical cancer screening so as to improve sensitivity and specificity as compared with Pap cytology readings and HPV testing [10, 18, 19]. Among these, immunochemical methods are already commercially available and several studies have proved their usefulness in diagnostic practice [20].

Detection of p16^{INK4a} is one of the extensively evaluated methods for recognition of altered dysplastic cervical cells,

Fig. 3 CLDN1/Ki67 immunoreactions on LBC (a, b) and histological slides (c, d). Red nuclei and brown membranous staining show positive cells. CLDN1 = claudin-1, LBC = liquid-based cytology. Scalebar: 35 µm (a, b) and 50 µm (c, d)

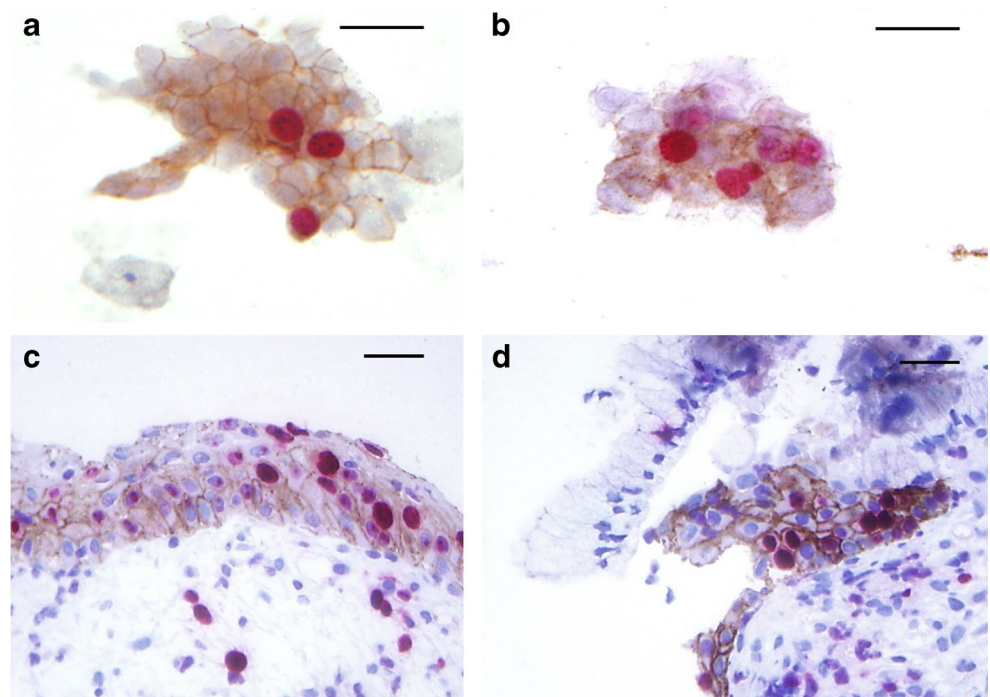


Table 3 Results of CLDN1/Ki67 on LBC specimens.

Liquid-based cytology (LBC)	CLDN1/Ki67 (n=1358)		
	Negative (n=962)	Positive (n=200)	Not valid (n=196)
Normal (n=1085)	803	117	165
ASC-US (n=25)	13	7	5
LSIL (n=186)	131	37	18
HSIL (n=56)	12	39	5
Not Valid x (n=6)	3	0	3
* the highlighted section shows the number of acceptable cases by both Pap test and CLDN1/KI67 (n= 1159)			

CLDN1 claudin-1, ASC-US atypical squamous cells of undetermined significance, LSIL low grade squamous intraepithelial lesions, HSIL high grade squamous intraepithelial lesion

and the specificity of the reaction increased significantly after being combined in a dual immunostaining with Ki67 [5, 6, 20–22]. The results have been confirmed in a multicentric, prospective, pan-European study (PALMS study), which

found that positive predictive values for CIN2+ were higher for p16/Ki67 immunocytochemistry versus HC2 HPV testing [10]. More recently it has been shown that p16/Ki67 reaction is associated with hrHPV persistence and CIN2+ lesions [21].

Fig. 4 CINtec® PLUS (a, c) and CLDN1/Ki67 (b, d) immunoreactions on histological slides. Ki67 positive red nuclei are detected in basal cells of the normal cervical epithelium (a, b) by both stainings. Nuclear reactions are more extended in the HSIL samples together with brown p16 cytoplasmic reaction with CINtec® PLUS (c) and membranous reaction with CLDN1 (D). CLDN1 = claudin-1, HSIL = high-grade squamous epithelial lesion. Scalebar: 50 µm

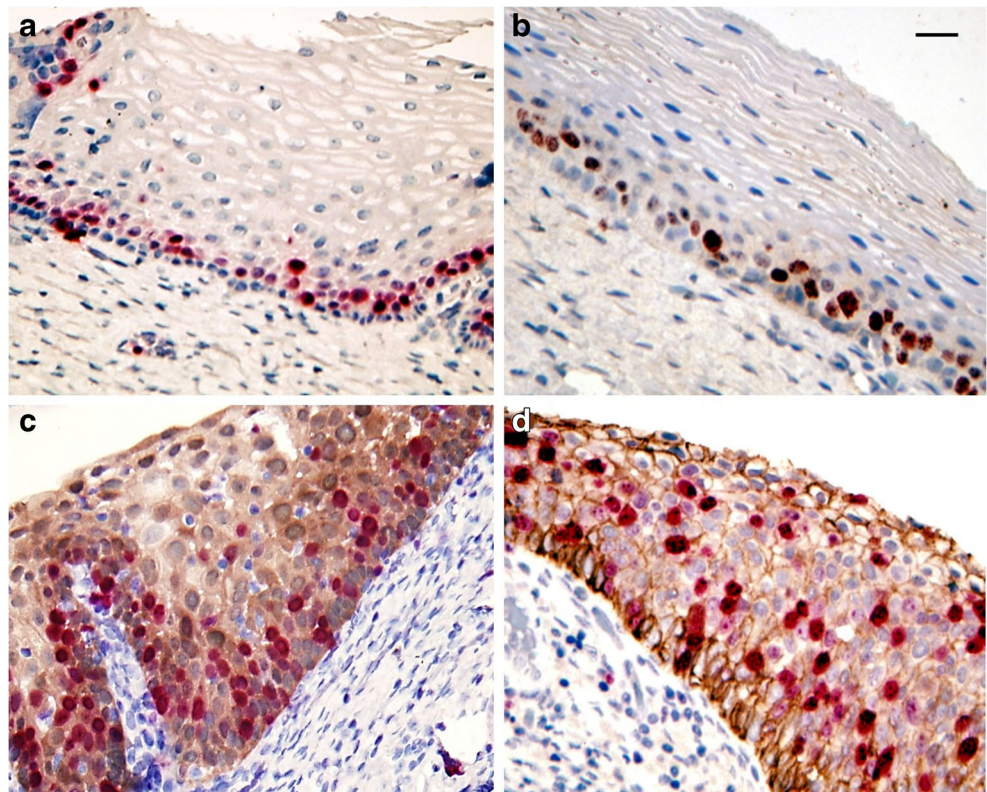


Table 4 Comparison of CLDN1/Ki67 and p16/Ki67 (CINtec® PLUS) results on LBC samples.

CINtec® PLUS (n = 1352)	CLDN1/Ki67 (n=1352)		
	Positive (n=197)	Negative (n=959)	Not valid (n=196)
Negative (n=890)	25	840	25
Positive (n=267)	163	69	35
Not valid x (n=195)	9	50	136

* the highlighted section shows the number of acceptable cases (n= 1097)

CLDN1 claudin-1

The objective of our current study was to compare side-by-side the results of the commercially available test, p16^{INK4a}/Ki67 (CINtec® PLUS) dual staining with our newly developed CLDN1/Ki67 double immunoreaction. In our previous study the detection of tight junction protein CLDN1 proved to have similar diagnostic potential as p16^{INK4a} [9]. Concordance of CLDN1 immunocytochemistry of HSIL positives was 84.0%, being 69.0% for negatives, suggesting CLDN1 to be a competing marker for detection of premalignant and malignant cervical lesions [9].

Claudins (CLDNs) belong to the family of integral membrane proteins [23] and are the main components of the belt-like networks of tight junctions (TJs). TJs act as important

paracellular seals, semi-barriers for trafficking different molecules, ions and water and participate in the maintenance of cellular polarity. TJs are dynamic structures undergoing continuous “molecular remodelling” and respond to several stimuli as to cytokines and growth factors or epigenetic events [24]. CLDNs interact with other proteins and participate in signal transduction through a PDZ domain, influencing cell proliferation and transformation [24]. Deregulation of TJ proteins - increase, decrease or loss - in association with altered cellular morphology during carcinogenesis and with the progression of the lesions is well documented [13, 25, 26]. A significant upregulation of CLDN1 was demonstrated in premalignant and malignant cervical squamous [12, 14] and

Table 5 Performance of p16/Ki67 (a) and CLDN1/Ki67 (b) in abnormal cervical lesions (n=1097)

a.				
CINtec® PLUS	Sensitivity	Specificity	Positive Predictive Value (PPV)	Negative Predictive Value (NPV)
ASC-US/ASC-US+	39.21%	83.56%	38.36%	84.05%
(95% CI)	(32.81% to 45.89%)	(80.93% to 85.97%)	(32.07% to 44.95%)	(81.43% to 86.42%)
LSIL/LSIL+	40.28%	83.41%	36.64%	85.43%
(95% CI)	(33.61% to 47.24%)	(80.79% to 85.80%)	(30.43% to 43.19%)	(82.90% to 87.72%)
HSIL	74.00%	81.38%	15.95%	98.50%
(95% CI)	(59.66% to 85.37%)	(78.88% to 83.69%)	(11.48% to 21.31%)	(97.44% to 99.20%)
b.				
CLDN1/Ki67	Sensitivity	Specificity	Positive Predictive Value (PPV)	Negative Predictive Value (NPV)
ASC-US/ASC-US+	34.36%	87.36%	41.49%	83.61%
(95% CI)	(28.20% to 40.93%)	(84.96% to 89.49%)	(34.37% to 48.89%)	(81.04% to 85.96%)
LSIL/LSIL+	35.07%	87.13%	39.36%	84.93%
(95% CI)	(28.65% to 41.92%)	(84.75% to 89.27%)	(32.33% to 46.73%)	(82.43% to 87.19%)
HSIL	76.00%	85.67%	20.21%	98.68%
(95% CI)	(61.83% to 86.94%)	(83.40% to 87.74%)	(14.72% to 26.67%)	(97.71% to 99.32%)

CLDN1 claudin-1, AS-CUS atypical squamous cell of undetermined significance, LSIL low grade squamous intraepithelial lesions, HSIL high grade squamous intraepithelial lesion

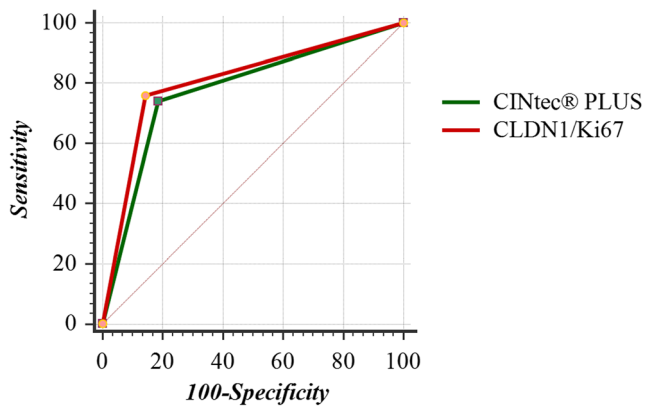


Fig. 5 ROC analysis curves of the two dual stainings. CLDN1/Ki67 (red) has slightly higher curve than CINtec® PLUS (green), but no significant difference ($p = 0.177$) was found. ROC = Receiver Operating Characteristic, CLDN1 = claudin-1

glandular lesions [13, 27], in other squamous carcinomas as in esophageal [28] cancer, in different forms of breast cancer [29] etc. Other claudins such as claudin-3 and -4 were highly expressed in cholangiocarcinomas [30], in prostate [31] and ovarian cancers [32] etc. Increased expression of certain claudins does not necessary mean the “increased tightness” or “better” function of TJs, it is rather a deregulation of the interaction between TJ proteins in the multiprotein complexes and expresses disturbed protein “partnering” with other proteins in these dynamic structures.

Based on our own previous observations as well as of others, increased expression of CLDN1 characterizes the neoplastic cervical epithelial cells, which can be demonstrated both by histology, cytology and by cDNA array technique [9, 12, 14, 33]. It was proved that the expression of CLDN1 increases with the severity of the cervical lesions from CIN1 to CIN2+ and invasive cancer [12]. Previously CLDN1 has been suggested to be a biomarker in cervical cytology however, in that particular study the proliferative marker was not considered [9].

In the recent study, expressions of CLDN1 and proliferation marker Ki67 were combined in dual immunostaining and compared with the results of p16/Ki67 (CINtec® PLUS) reaction. The latter test showed a sensitivity of 74.00% and a specificity of 81.38%, while for CLDN1/Ki67 they were 76.00% and 85.67%, respectively using Pap cytology readings as reference.

Taking ethical questions into consideration, the first slide from each LBC vial was used for Pap cytology diagnosis evaluated by the Bethesda system, the second slide for CINtec® PLUS and the third for CLDN1/Ki67 immunoreaction. Those samples where the cell number was not sufficient for any of the three tests were excluded from further evaluation, decreasing the power of the statistical analysis.

One of the main goals of the current study was the comparison of the recently available and widely used dual immunostaining method for p16/Ki67 (CINtec® PLUS) with our

newly developed reaction (CLDN1/Ki67). The relatively large number of samples available for comparing the two tests seemed to be sufficient for statistical analysis. In addition, the fact that the 3rd sample from the LBC collecting vials was used for the CLDN1/Ki67 staining, probably with a less number of cells, further strengthens our results, which demonstrated that no significant differences were found between the CLDN1/Ki67 and CINtec® PLUS dual stainings.

Previously, significantly increased CLDN1 expression was demonstrated with the severity and progression of histological grade during cervical carcinogenesis detected by immunohistochemistry [12]. In the recent study, the CLDN1/Ki67 reaction gave a result similar to the reaction with CINtec® PLUS. This suggests that the CLDN1/Ki67 dual staining might be used in the future for the detection of CIN2/CIN2+ lesions on histological slides too.

A new cervical biomarker test needs to be compared with existing ones, in this case CLDN1/Ki67 to p16/Ki67 (CINtec® PLUS) for cervical immunochemistry and immunohistochemistry, as discussed above. Wentzensen et al. [6] evaluated the clinical relevance of the dual immunoassay with p16/Ki67 compared with Pap cytology diagnosis. In their study, the double staining demonstrated lower positivity than cytology at ASC-US threshold. For CIN2+, the double staining had similar sensitivity and higher specificity as compared with cytology, and the pattern for CIN2+ was similar [6].

Bergeron et al. [10] in the PALMS study involving 5 European countries, using colposcopy-guided biopsy diagnosis of CIN2/CIN2+ as clinical endpoints, found that the p16/Ki67 dual staining cytology gave comparable results for ASC-US as HC2 (Qiagen, Hilden, Germany) testing and lower for LSIL, but higher specificity compared to HC2 HPV testing both for ASC-US and LSIL.

In our recent study the p16/Ki67 (CINtec® PLUS) and CLDN1/Ki67 dual reactions were compared in a case-control manner. The sensitivity and specificity of the two tests were performing equally in a large number of sample sets, which suggests that the CLDN1/Ki67 double immunoreactions might be used in the future for the detection of premalignant and malignant cervical lesions.

Author Contributions TSz performed and evaluated the immunoreactions and statistics, ÁG and AM collected the clinical samples and data, BJ and AKi evaluated the cytology, ZsS and GS designed and coordinated the study and wrote the manuscript. AKo and MB are clinical experts of the TRACE clinical study (Cellcall). TT is the inventor of the HPV detection technology applied in the CONFIDENCE HPV™ (NEUMANN Diagnostics) testing. CsJ was former head of the TRACE clinical study (Cellcall). ZsS accepts full responsibility for the work. All authors have read and approved the final manuscript.

Funding This work was supported by grant #NKFP_07_2-SPE-SAFE, Jedlik Ányos 2. subprogram KMR_12–1–2012–0032 by the Hungarian National Research and Development Fund and grant #OTKA PD105019 by the Hungarian National Research Foundation.

Compliance with Ethical Standards

Conflict of Interest The authors declare that they have no conflict of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

AKo is an employee of Cellcall and NEUMANN. MB receives consultancy fees from Cellcall and NEUMANN, she is an employee of SYNLAB GenoID Laboratory, which participated in the TRACE clinical study (all related expenses were charged to Cellcall and NEUMANN). TT is a part time employee of Cellcall, he receives consultancy fees from NEUMANN, he is minority owner of NEUMANN, the inventor of the HPV detection technology described in the manuscript covering which Cellcall submitted a patent application (license now owned by NEUMANN Diagnostics Ltd.); he is a part time employee of SYNLAB GenoID Laboratory. CsJ was a former employee of Cellcall. MNy is an employee of Cellcall and NEUMANN.

References

- Hillemans P, Soergel P, Hertel H, Jentschke M (2016) Epidemiology and early detection of cervical cancer. *Oncol Res Treat* 39:1–6
- Sawaya GF, Smith-McCune K (2016) Cervical cancer screening. *Obstet Gynecol* 127:459–467
- Lees BF, Erickson BK, Huh WK (2016) Cervical cancer screening: evidence behind the guidelines. *Am J Obstet Gynecol* 214:438–443
- Ocque R, Austin RM (2016) Follow-up of women with negative pap test results and abnormal clinical signs or symptoms. *Am J Clin Pathol* 145:560–567
- Ikenberg H, Bergeron C, Schmidt D, Griesser H, Alameda F, Angeloni C, Bogers J, Dachez R, Denton K, Hariri J, Keller T, von Knebel Doeberitz M, Neumann HH, Puig-Tintore LM, Sideri M, Rehm S, Ridder R, PALMS Study Group (2013) Screening for cervical cancer precursors with p16/Ki-67 dual-stained cytology: results of the PALMS study. *J Natl Cancer Inst* 105:1550–1557
- Wentzensen N, Fetterman B, Castle PE, Schiffman M, Wood SN, Stiemerling E, Tokugawa D, Bodelon C, Roitras N, Lorey T, Kinney W (2015) p16/Ki-67 dual stain cytology for detection of cervical precancer in HPV-positive women. *J Natl Cancer Inst* 107: 1–8
- Cuzick J, Clavel C, Petry KU, Meijer CJ, Hoyer H, Ratnam S, Szarewski A, Birembaut P, Kulasingam S, Sasieni P, Iftner T (2006) Overview of the European and north American studies on HPV testing in primary cervical cancer screening. *Int J Cancer* 119: 1095–1101
- Plummer M, Schiffman M, Castle PE, Maucort-Boulch D, Wheeler CM, ALTS Group (2007) A 2-year prospective study of human papillomavirus persistence among women with a cytological diagnosis of atypical squamous cells of undetermined significance or low-grade squamous intraepithelial lesion. *J Infect Dis* 195:1582–1589
- Benczik M, Galamb Á, Koiss R, Kovács A, Járny B, Székely T, Szekerczés T, Schaff Z, Sobel G, Jeney C (2016) Claudin-1 as a biomarker of cervical cytology and histology. *Pathol Oncol Res* 22: 179–188
- Bergeron C, Ikenberg H, Sideri M, Denton K, Bogers J, Schmidt D, Alameda F, Keller T, Rehm S, Ridder R, PALMS Study Group (2015) Prospective evaluation of p16/Ki-67 dual-stained cytology for managing women with abnormal Papanicolaou cytology: PALMS study results. *Cancer Cytopathol* 123:373–381
- Kocsis A, Takács T, Jeney C, Schaff Z, Koiss R, Járny B, Sobel G, Pap K, Székely I, Ferenci T, Lai HC, Nyíri M, Benczik M (2017) Performance of a new HPV and biomarker assay in management of hrHPV positive women: Subanalysis of the ongoing multicenter TRACE Clinical Trial (n>6,000) to evaluate POU4F3 as a potential biomarker of cervical precancer and cancer. *Int J Cancer* 140:1119–1133
- Sobel G, Páska C, Szabó I, Kiss A, Kádár A, Schaff Z (2005) Increased expression of claudins in cervical squamous intraepithelial neoplasia and invasive carcinoma. *Hum Pathol* 36: 162–169
- Szabo I, Kiss A, Schaff Z, Sobel G (2009) Claudins as diagnostic and prognostic markers in gynecological cancer. *Histol Histopathol* 24:1607–1615
- Lee JW, Lee SJ, Seo J, Song SY, Ahn G, Park CS, Lee JH, Kim BG, Bae DS (2005) Increased expressions of claudin-1 and claudin-7 during the progression of cervical neoplasia. *Gynecol Oncol* 97:53–59
- Lal-Nag M, Morin PJ (2009) The claudins. *Genome Biol* 10:235
- Nayar R, Wilbur DC (2015) The pap test and Bethesda 2014. *Cancer Cytopathol* 123:271–281
- Solomon D (2015) Foreword. In: Nayar F, Wilbur DC (ed) The Bethesda system for reporting cervical cytology. Definitions, criteria, and explanatory notes, 3rd ed. Springer International Publishing Switzerland, Cham, pp v–vii
- Wentzensen N, von Knebel Doeberitz M (2007) Biomarkers in cervical cancer screening. *Dis Markers* 23:315–330
- Lee S, Rose MS, Sahasrabudde VV, Zhao R, Duggan MA (2017) Tissue-based immunohistochemical biomarker accuracy in the diagnosis of malignant glandular lesions of the uterine cervix: a systematic review of the literature and meta-analysis. *Int J Gynecol Pathol* 36:310–322
- Polman NJ, Uijterwaal MH, Witte BI, Berkhof J, van Kemenade FJ, Spruijt JW, van Baal WM, Graziosi PG, van Dijken DK, Verheijen RH, Helmerhorst TJ, Steenbergen RD, Heideman DA, Ridder R, Snijders PJ, Meijer CJ (2017) Good performance of p16/ki-67 dual-stained cytology for surveillance of women treated for high-grade CIN. *Int J Cancer* 140:423–430
- Yu LL, Guo HQ, Lei XQ, Qin Y, Wu ZN, Kang LN, Zhang X, Qiao YL, Chen W (2016) p16/Ki-67 co-expression associates high risk human papillomavirus persistence and cervical histopathology: a 3-year cohort study in China. *Oncotarget* 7:64810–64819
- Possati-Resende JC, Fregnani JHTG, Kerr LM, Mauad EC, Longatto-Filho A, Scapulatempo-Neto C (2015) The accuracy of p16/Ki67 and HPV test in the detection of CIN2/3 in women diagnosed with ASC-US or LSIL. *PLoS One* 10:e0134445
- Furuse M, Fujita K, Hiragi T, Fujimoto K, Tsukita S (1998) Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol* 141:1539–1550
- Morin PJ (2005) Claudin proteins in human cancer: promising new targets for diagnosis and therapy. *Cancer Res* 65:9603–9606
- Soini Y (2005) Expression of claudins 1, 2, 3, 4, 5 and 7 in various types of tumours. *Histopathology* 46:551–560
- Cunniffe C, Brankin B, Lambkin H, Ryan F (2014) The role of claudin-1 and claudin-7 in cervical tumorigenesis. *Anticancer Res* 34:2851–2857
- Akimoto T, Takasawa A, Murata M, Kojima Y, Takasawa K, Nojima M, Aoyama T, Hiratsuka Y, Ono Y, Tanaka S, Osanai M, Hasegawa T, Saito T, Sawada N (2016) Analysis of the expression and localization of tight junction transmembrane proteins, claudin-1, -4, -7, occludin and JAM-A, in human cervical adenocarcinoma. *Histol Histopathol* 31:921–931
- Györfy H, Holczbauer Á, Nagy P, Szabó Z, Kupcsulik P, Páska C, Papp J, Schaff Z, Kiss A (2005) Claudin expression in Barrett's esophagus and adenocarcinoma. *Virchows Arch* 447:961–968
- Tökés AM, Kulka J, Paku S, Szik Á, Páska C, Novák PK, Szilák L, Kiss A, Bögi K, Schaff Z (2005) Claudin-1, -3 and -4 proteins and

- mRNA expression in benign and malignant breast lesions: a research study. *Breast Cancer Res* 7:R296–R305
30. Lódi C, Szabó E, Holczbauer Á, Batmunkh E, Szíjjártó A, Kupcsulik P, Kovalszky I, Paku S, Illyés G, Kiss A, Schaff Z (2006) Claudin-4 differentiates biliary tract cancers from hepatocellular carcinomas. *Mod Pathol* 19:460–469
 31. Szász AM, Nyírády P, Majoros A, Szendrői A, Szűcs M, Székely E, Tőkés AM, Romics I, Kulka J (2010) Beta-catenin expression and claudin expression pattern as prognostic factors of prostatic cancer progression. *BJU Int* 105:716–722
 32. English DP, Santin AD (2013) Claudins overexpression in ovarian cancer: potential targets for *Clostridium Perfringens* enterotoxin (CPE) based diagnosis and therapy. *Int J Mol Sci* 14:10412–10437
 33. Vázquez-Ortíz G, Ciudad CJ, Pina P, Vazquez K, Hidalgo A, Latorre B, Garcia JA, Salamanca F, Peralta-Rodriguez R, Rangel A, Salcedo M (2005) Gene identification by cDNA arrays in HPV-positive cervical cancer. *Arch Med Res* 36:448–458

Dysregulation of microRNA Expression in Human Cervical Preneoplastic and Neoplastic Lesions

Ádám Galamb · Márta Benczik · Balázs Zinner · Eszter Vígh · Kornélia Baghy · Csaba Jeney · András Kiss · Gábor Lendvai · Gábor Sobel

Received: 8 April 2014 / Accepted: 25 November 2014 / Published online: 20 January 2015
© Arányi Lajos Foundation 2015

Abstract Data discussed in recent reviews demonstrated that dysregulation of microRNA (miRNA) expression profiles occurs during cervical carcinogenesis and characteristic up- or downregulation of certain miRNAs might be used as biomarkers. The majority of altered miRNAs, however were found to be inconsistent upon comparison with cancerous and normal cervical epithelia in the discussed studies due to several reasons. The results obtained in this present review suggest the need for further investigations on miRNAs on larger sample sizes in order to indicate sensitivity and specificity by means of well defined, “unified” methods. In addition, obtaining further data on the clinical course and outcome of patients in comparison to the dysregulation of miRNA expression profile could turn miRNAs into prognostic and/or progression markers. Inhibition of overexpressed miRNAs, as suggested by some authors, might even serve as target for cancer therapy.

Keywords Cervix · Cervical cancer · microRNA · Biomarker · Screening

Ádám Galamb, Márta Benczik, Gábor Lendvai and Gábor Sobel equally contributed

Á. Galamb · B. Zinner · G. Sobel (✉)
2nd Department of Obstetrics and Gynecology, Semmelweis University, Üllői út 78/a, 1082 Budapest, Hungary
e-mail: sobelg@gmail.com

M. Benczik · C. Jeney
Cellcall Kft, Rőppentyű u. 48, 1134 Budapest, Hungary

E. Vígh · A. Kiss · G. Lendvai
2nd Department of Pathology, Semmelweis University, Üllői út 93, 1091 Budapest, Hungary

K. Baghy
First Institute of Pathology and Experimental Cancer Research, Semmelweis University, Üllői út 26, 1085 Budapest, Hungary

Introduction

Cervical cancer is the third most common malignant tumor among women worldwide, responsible for 529 800 cases yearly and 275 100 cancer-related deaths in 2008 [1, 2]. There are, however, significant geographical differences around the world in cervical cancer incidence and mortality, with more than 85 % of cases occurring in developing countries [1, 2]. Introduction of the “Pap” test for cervical cancer screening resulted in a significant reduction of both cancer incidence and mortality [3]. Moreover, early cancer detection was further supported by new evaluation methods, especially the guideline summarized at the Bethesda Conference in 2001 [4], as well as by the etiological role of the human papilloma virus (HPV), discovered by Harald zur Hausen and his group, in cervical carcinogenesis [5].

More recently, cytology as a gold standard has been criticized, since while the high specificity of this method is accepted, its relatively low sensitivity is a problem [6]. According to a recent study by Ronco et al., the more extensive use of modern molecular biological methods, first of all HPV DNA testing, led to a 60–70 % reduction in invasive cervical cancer incidence as compared with cytology-based screening [7].

Detection of high risk HPV (hrHPV) infection, however does not provide answers to whether the infection is of the productive, transient or of the transforming type [5, 7–10]. Several novel biomarkers have been developed for detection of transformed, neoplastic cells, with the goal to increase the sensitivity and/or specificity of cervical cancer screening tests, even in combination with cytology and/or HPV DNA testing (for review see [9, 11]). Some of these biomarkers might even have the potential to become prognostic markers [12, 13].

Besides HPV DNA, the newly introduced biomarkers are also capable of detecting other viral components, such as HPV RNA, HPV oncoproteins (E6/E7) or overexpressed cellular

genes, RNAs and/or proteins involved in cervical carcinogenesis [8, 9].

Several studies proved the correlation between microRNA (miRNA) expression and carcinogenesis including premalignant cervical lesions, preinvasive and invasive cervical cancer [14–21]. Some of the miRNAs, which become altered in cervical cancer were suggested to be useful biomarkers in diagnostics or even suggested as possible prognostic markers and targets for therapy [13]. In the followings, recent progress in the field of miRNA research will be presented with focus on the potential of miRNA expression profiles as diagnostic, prognostic markers and potential targets for therapy in cervical carcinogenesis.

miRNAs

miRNAs are small (18–25 nucleotides in size) endogenous non-coding RNA molecules, which regulate gene expression at posttranscriptional level by affecting messenger RNAs (mRNA) by means of translational suppression (Fig. 1a–d). Since partial complementer binding of miRNA is sufficient for the regulation effect much effort has been made to reveal the potential ways a miRNA is able to bind to mRNA [22], indicating an unsurpassed help in target prediction of miRNAs (Fig. 1b and c). Over 1000 human miRNAs have been identified since the first one discovered in 1993; at the time named lin-4 [23], later identified by the term miRNAs [24, 25]. Shortly after their discovery, data saw light suggesting that miRNAs are involved in carcinogenesis [26] referred to as “oncomirs” by some authors [15]. It was verified that miRNAs might function as either oncogenes or tumor suppressors depending on the cell/tissue types (Fig. 1d) [15, 27, 28]. Studies demonstrated that miRNAs are dysregulated in cancer and the changes in expression profiles might classify human malignancies and even predict the outcome [12, 26, 27, 29]. This means that each cancer has a specific miRNA profile or pattern [26], which reflects both the tissue of origin and the stage of carcinogenesis [15, 27, 29–32]. The mechanism of miRNA deregulation, however, is not exactly clear, there are several biogenesis machineries contributing to the alteration [18, 27]. Both up- and downregulation of different miRNAs were reported in different types of cancer [27, 28].

miRNA Expression Profiles in the Normal Cervix and in Preneoplastic and Invasive Cancerous Lesions

miRNA expression profiles were characterized in human cervical cancer cell lines and normal cervical tissues [20] followed by several studies in cervical cancer, which demonstrated that miRNA expression profiles are different in

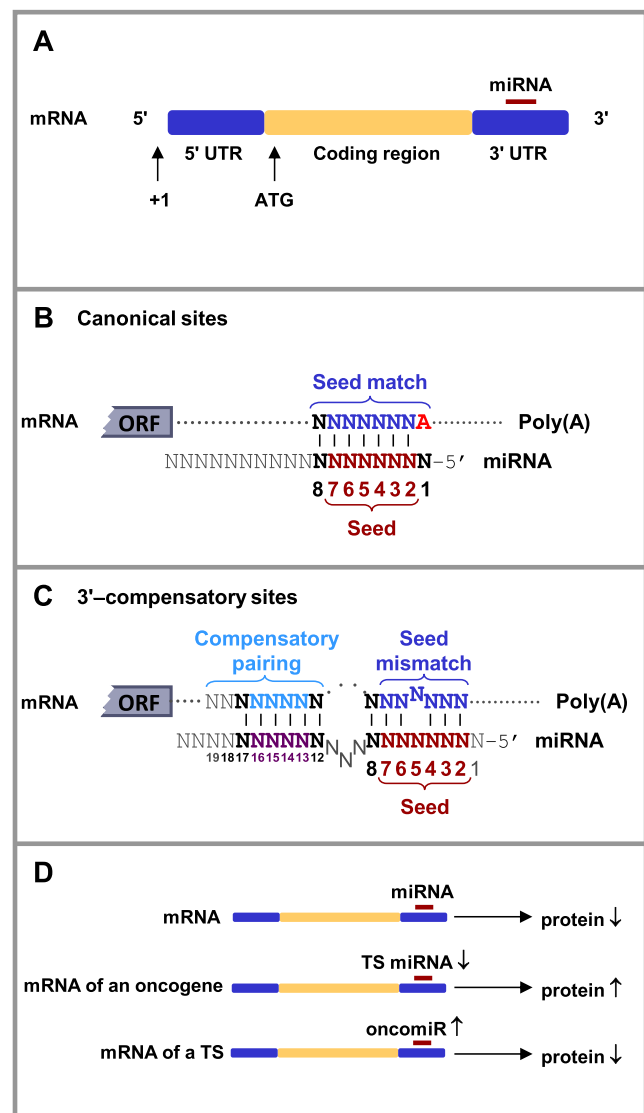


Fig. 1 miRNAs interfere with gene expression at posttranscriptional level. **a** Regulation role of a miRNA is attained by binding to 3'-UTR (untranslated region) of target mRNA. **b** Partially complementer binding is sufficient, which involves the nucleotides 2–7 (6mer), 1–7 (7mer-A1), 2–8 (7mer-m8) or 1–8 (8mer) of 5' end of miRNA called the “seed”. These are considered to be the main basepairing types. **c** A mismatch in the seed region can be compensated by a ≥ 4 –5 nucleotide pairing located 1–5 nucleotide farther from the seed. However, this type tends to be only slightly more effective than the canonical binding types. **d** Interfering of miRNA with gene expression results in translational arrest of mRNA and reduced protein production. In diseases, mainly in cancers, the production of an oncogene can be increased if the regulatory miRNA(s) (called tumor suppressor miRNA) is/are downregulated; whereas a tumor suppressor protein may be eliminated if the regulatory miRNA(s) (called oncomir) is/are upregulated. *mRNA* Messenger RNA, *UTR* Untranslated region, *ATG* Start codon, *miRNA* microRNA, *ORF* Open reading frame, *TS* Tumor suppressor (gene)

the normal and cancerous cervix. The majority of these studies compared miRNA expression profiles in cervical cancer with their normal – usually matched - cervical tissue

counterparts [16, 19, 20]. The results of these studies, however are inconsistent [31, 33].

High variability of miRNA expression was observed in 4 cervical squamous cell carcinomas, 5 high-grade (HSIL) and 9 low-grade (LSIL) squamous intraepithelial lesions, as compared with 19 normal cervical tissues [16]. It was shown that high “natural expression variability exists among human samples”, however, aberrant miRNA expression was present in the studied cancerous and preneoplastic lesions [16]. The samples could not be separated from each other based on miRNA pattern, probably due to the previously mentioned high variability. The authors of this particular study suggested that the “variability” might be associated with the fact that some of the normal cervical samples were infected with HPV, which might influence miRNA expression, or that natural genetic variations, aging and other health problems are linked to the variability [16].

It was demonstrated that some miRNAs are upregulated (as miRs -21, -27a, 34a, -155, 182, -196a, -199, -221), while others are downregulated (as miRs -143, -145, -99a, -26a, -203, 218-497 etc.) in different stages of cervical carcinogenesis [13, 15-17, 20, 21, 31, 34-36] (Table 1). Certain authors have found the downregulated miRNAs to be downregulated in other cancers, too, such as miRs -143, -145 in colorectal cancer [37], miR-199a in hepatocellular carcinoma [38]. Others, however, have reported on contradictory data, according to which increase rather than decrease of miRNA expression was detected in invasive cervical carcinoma when compared with normal cervical tissue [19].

miRNA expression was analysed comparing normal cervix and preneoplastic cervical lesions [16]. Interestingly some miRNAs were downregulated in preneoplastic lesions as compared to normal tissues, but upregulated in cancer [16].

Several miRNAs were found to be upregulated in preneoplastic lesions, such as miRs -148a, -302b, -10a, -196 and -132 [16]. Interestingly, known oncogenes (as myc, KRAS etc.), tumor suppressors (TP53, PTEN) were found to be specific targets of the aberrantly expressed miRNAs [16]. It was found that miR-92 is highly expressed in cervical cancer as compared with normal cervical tissue [39].

Lee et al. [19] in a study of 10 cases each of advanced invasive cervical cancer and normal cervix found that miR-127 is a marker for lymph node metastasis of invasive cervical cancer and suggested that miRNA profiling might be used as a prognostic marker for “clinical aggressiveness”. In another study on 102 cervical cancer cases miR-200a and miR-9 were found to probably influence metastasis of cervical cancer cells and to likely predict survival of the patients [12]. These authors suggested a “miRNA-based model to predict cervical cancer survival” [12]. Luo et al. [13] analysed 60 cervical cancer tissues and corresponding non-tumorous epithelia for the expression of miR-497. They found that miR-497 was

Table 1 Altered expression of miRNAs in premalignant and malignant cervical lesions

	References
a. Increased expression of miRNAs	
let-7f	[43]
miR-7	[17]
miR-9	[19, 43]
miR-10a	[16, 21]
miR-15b	[21]
miR-16	[21, 41, 43]
miR-17	[43]
miR-18a	[17]
miR-20a,b	[17, 21, 41]
miR-21	[12, 20, 21, 33, 41, 43]
miR-24	[21]
miR-27a	[43]
miR-31	[17, 43]
miR-34a	[43]
miR-92	[39]
miR-93	[17, 21, 41]
miR-106a	[21, 41]
miR-127	[19, 43]
miR-132	[21]
miR-133a,b	[19, 43]
miR-141	[17]
miR-142	[17]
miR-145	[19]
miR-146a	[17, 21]
miR-148a	[21]
miR-155	[21, 41]
miR-181c	[21]
miR-182	[21, 31, 41]
miR-183	[21, 31, 41]
miR-185	[21, 41]
miR-193	[43]
miR-196a	[21]
miR-199	[19, 43]
miR-200	[17, 43]
miR-203	[12, 16]
miR-205	[21, 43]
miR-210	[17, 43]
miR-214	[19, 43]
miR-223	[21]
miR-224	[17, 21, 41]
miR-302	[21]
miR-324	[21]
miR-429	[17]
b. Decreased expression of miRNAs	
miR-1	[17]
let-7b, c	[21, 36, 44]
miR-10b	[17, 21, 44]
miR-26a	[16, 21]
miR-29a	[16, 21, 41]

Table 1 (continued)

miR-30b	[21]
miR-34a	[21, 41]
miR-99a,b	[16, 17, 21, 31]
miR-100	[17, 21, 41, 44]
miR-125a,b	[21, 41, 44]
miR-126	[21, 41]
miR-127	[17, 21, 41]
miR-133a,b	[21]
miR-140	[17]
miR-142	[31]
miR-143	[16, 17, 20, 21, 31, 36, 44]
miR-145	[16, 17, 21, 36, 41, 44]
miR-149	[19, 36]
miR-150	[31]
miR-152	[17]
miR-195	[17, 31]
miR-196b	[36]
miR-199a,b	[16, 21, 31, 44]
miR-203	[12, 16, 19, 21, 36]
miR-211	[31]
miR-214	[17]
miR-218	[12, 17, 21, 41, 42]
miR-223	[31]
miR-320	[17]
miR-328	[31]
miR-368	[17]
miR-376	[17]
miR-378	[21]
miR-422a	[21]
miR-424	[21]
miR-450	[21]
miR-455	[21]
miR-497	[13, 17]
miR-513	[16, 21]
miR-574	[21]

downregulated in the cancerous tissue and correlated closely with FIGO Federation International of Gynecologists and Obstetrics) stage and lymph node metastasis in cervical cancer patients [13].

Rao et al. [17] studied 13 HPV-16 or -18 infected patients with cervical cancer. A total of 18 miRNAs were upregulated, 19 miRNAs were downregulated out of 924 miRNAs, as compared with the normal adjacent cervical tissue. They concluded, however, that miRNA expression was not associated with lymph node or vascular invasion and histological differentiation of the cancerous tissue, and also that the expression was independent of cancer stage and metastasis [17].

HPV and miRNA Expression Profile

After discovery of the association between HPV infection and cervical cancer major progress was made by learning how the binding of HPV oncoproteins E6 and E7 results in degradation of tumor suppressor proteins p53 and pRb and leads to cervical cancer [40].

Wang et al. [21] demonstrated aberrant expression of several miRNAs in association with HPV infection. Decreased p53 expression increased miR-200c expression resulting deactivated SLIT2 – a “candidate tumor suppressor gene” – expression, which resulted the development of cervical carcinoma. Other studies did not find different expressions of miR-9 and miR-200a between normal and cancerous cervical tissue [21, 41]. Li et al. [41] analysing 78 samples, demonstrated that reduced miR-218 expression was associated with hrHPV infection and according to their opinion down-regulation of miR-218 has a role in development of cervical carcinogenesis.

Based on microarray and/or quantitative real-time PCR analysis, Martinez et al. [42] showed that 3 miRNAs were overexpressed, 24 were underexpressed in cervical cell lines with integrated HPV-16 DNA. miR-218 was “specifically underexpressed” in HPV containing cell lines and cervical carcinoma tissue and was associated with the E6 oncogene of HPV-16. More recently “progressive miRNA profiles” were demonstrated during cervical carcinogenesis with increased expression of 12 and decrease expression of 9 miRNAs [41].

It was shown that HPV E6 regulates the expression of miR-23b, miR-34a, miR-218 and HPV E7 of miR-15a/-16-1, -203 [28]. On the other hand, it was demonstrated that cellular miRNAs might regulate HPV viral gene expression [28]. Yu et al. [39] detected high expression of miR-92 in 34 cervical cancers compared with 34 normal cervical samples. They found that HPV 16 E6 upregulates miR-92 expression in cervical cancer cell lines in association with the decrease of tumor suppressor phosphatase and tensin homologue (PTEN) protein expression [39].

Conclusions

A large number of studies have analysed the expression profile of miRNA in premalignant and malignant cervical squamous epithelial lesions in comparison with normal cervical squamous epithelia. The results, the identified up- or down-regulation of certain miRNAs, are quite inconsistent upon comparison of the discussed studies. This might be due to the way the samples were collected (fresh, frozen, paraffin embedded), the mode of cell isolation (macro-, microdissection or no dissection), the HPV status of normal and neoplastic samples used, the available clinical data, the application of in vitro or in vivo models as cell lines, xenographs etc.). All data agree, however, that significant dysregulation of miRNA expression profiles occurs during cervical carcinogenesis and certain miRNAs act as oncogens, while others as tumor suppressors. Some of the up- or downregulated miRNAs may be so characteristic that they might be used as biomarkers. For this, however, studies should be performed on larger sample sizes to indicate sensitivity and specificity using well defined,

“unified” methods. In addition, obtaining further data on the clinical course and outcome of patients in comparison to the dysregulation of miRNA expression profile could turn miRNAs into prognostic and/or progression markers. Inhibition of overexpressed miRNAs, as suggested by some authors, might even serve as target for cancer therapy.

Acknowledgments This work was supported by the Hungarian Ministry of National Development (KMR_12-1-2012-0032); the EU Framework Programme for Research and Innovation (FP7-HEALTH-2012-INNOVATION-1-Grant Agreement Number 306037); the Hungarian National Scientific Research Foundation (OTKA PD105019).

References

- Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM (2010) Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer J Int Du Cancer* 127(12):2893–2917. doi:10.1002/ijc.25516
- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D (2011) Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 61(2):69–90. doi:10.3322/caac.20107
- Safaeian M, Sherman ME (2013) From Papanicolaou to papillomaviruses: evolving challenges in cervical cancer screening in the era of human papillomavirus vaccination. *J Natl Cancer Inst* 105(20):1524–1526. doi:10.1093/jnci/djt267
- Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M, Raab S, Sherman M, Wilbur D, Wright T Jr, Young N, Bethesda W, Forum Group M (2002) The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA J Am Med Assoc* 287(16):2114–2119
- Crosbie EJ, Einstein MH, Franceschi S, Kitchener HC (2013) Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet* 382(9895):889–899. doi:10.1016/S0140-6736(13)60022-7
- Isidean SD, Franco EL (2014) Embracing a new era in cervical cancer screening. *Lancet* 383(9916):493–494. doi:10.1016/S0140-6736(13)62028-0
- Ronco G, Dillner J, Elfstrom KM, Tunesi S, Snijders PJ, Arbyn M, Kitchener H, Segnan N, Gilham C, Giorgi-Rossi P, Berkhof J, Peto J, Meijer CJ, International HPVswg (2014) Efficacy of HPV-based screening for prevention of invasive cervical cancer: follow-up of four European randomised controlled trials. *Lancet* 383(9916):524–532. doi:10.1016/S0140-6736(13)62218-7
- de Freitas AC, Coimbra EC, Leitao MD (2014) Molecular targets of HPV oncoproteins: potential biomarkers for cervical carcinogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1845(2):91–103. doi:10.1016/j.bbcan.2013.12.004
- Tomesello ML, Buonaguro L, Giorgi-Rossi P, Buonaguro FM (2013) Viral and cellular biomarkers in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia and cancer. *Biomed Res Int* 2013:519619. doi:10.1155/2013/519619
- Arbyn M (2012) Evidence regarding human papillomavirus testing in secondary prevention of cervical cancer. *Vaccine*
- Zinner B, Gyongyosi B, Babarzi E, Kiss A, Sobel G (2013) Claudin 1 expression characterizes human uterine cervical reserve cells. *J Histochem Cytochem Off J Histochem Soc* 61(12):880–888. doi:10.1369/0022155413501324
- Hu X, Schwarz JK, Lewis JS Jr, Huettner PC, Rader JS, Deasy JO, Grigsby PW, Wang X (2010) A microRNA expression signature for cervical cancer prognosis. *Cancer Res* 70(4):1441–1448. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-3289
- Luo M, Shen D, Zhou X, Chen X, Wang W (2013) MicroRNA-497 is a potential prognostic marker in human cervical cancer and functions as a tumor suppressor by targeting the insulin-like growth factor 1 receptor. *Surgery* 153(6):836–847. doi:10.1016/j.surg.2012.12.004
- Reshmi G, Chandra SS, Babu VJ, Babu PS, Santhi WS, Ramachandran S, Lakshmi S, Nair AS, Pillai MR (2011) Identification and analysis of novel microRNAs from fragile sites of human cervical cancer: computational and experimental approach. *Genomics* 97(6):333–340. doi:10.1016/j.ygeno.2011.02.010
- Reshmi G, Pillai MR (2008) Beyond HPV: oncomirs as new players in cervical cancer. *FEBS Lett* 582(30):4113–4116. doi:10.1016/j.febslet.2008.11.011
- Pereira PM, Marques JP, Soares AR, Carreto L, Santos MA (2010) MicroRNA expression variability in human cervical tissues. *PLoS One* 5(7):e11780. doi:10.1371/journal.pone.0011780
- Rao Q, Shen Q, Zhou H, Peng Y, Li J, Lin Z (2012) Aberrant microRNA expression in human cervical carcinomas. *Med Oncol* 29(2):1242–1248. doi:10.1007/s12032-011-9830-2
- Cheung TH, Man KN, Yu MY, Yim SF, Siu NS, Lo KW, Doran G, Wong RR, Wang VW, Smith DI, Worley MJ Jr, Berkowitz RS, Chung TK, Wong YF (2012) Dysregulated microRNAs in the pathogenesis and progression of cervical neoplasm. *Cell Cycle* 11(15):2876–2884. doi:10.4161/cc.21278
- Lee JW, Choi CH, Choi JJ, Park YA, Kim SJ, Hwang SY, Kim WY, Kim TJ, Lee JH, Kim BG, Bae DS (2008) Altered MicroRNA expression in cervical carcinomas. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 14(9):2535–2542. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-1231
- Lui WO, Pourmand N, Patterson BK, Fire A (2007) Patterns of known and novel small RNAs in human cervical cancer. *Cancer Res* 67(13):6031–6043. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-0561
- Wang X, Tang S, Le SY, Lu R, Rader JS, Meyers C, Zheng ZM (2008) Aberrant expression of oncogenic and tumor-suppressive microRNAs in cervical cancer is required for cancer cell growth. *PLoS One* 3(7):e2557. doi:10.1371/journal.pone.0002557
- Bartel DP (2009) MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 136(2):215–233. doi:10.1016/j.cell.2009.01.002
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75(5):843–854
- Lee RC, Ambros V (2001) An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294(5543):862–864. doi:10.1126/science.1065329
- Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T (2001) Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 294(5543):853–858. doi:10.1126/science.1064921
- Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Ebert BL, Mak RH, Ferrando AA, Downing JR, Jacks T, Horvitz HR, Golub TR (2005) MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 435(7043):834–838. doi:10.1038/nature03702
- Deng S, Calin GA, Croce CM, Coukos G, Zhang L (2008) Mechanisms of microRNA deregulation in human cancer. *Cell Cycle* 7(17):2643–2646
- Zheng ZM, Wang X (2011) Regulation of cellular miRNA expression by human papillomaviruses. *Biochim Biophys Acta* 1809(11–12):668–677. doi:10.1016/j.bbagr.2011.05.005
- Farazi TA, Spitzer JI, Morozov P, Tuschl T (2011) miRNAs in human cancer. *J Pathol* 223(2):102–115. doi:10.1002/path.2806
- Lendvai G, Kiss A, Kovalszky I, Schaff Z (2010) Alterations in microRNA expression patterns in liver diseases. *Orv Hetil* 151(45):1843–1853. doi:10.1556/OH.2010.28985
- Tang T, Wong HK, Gu W, Yu MY, To KF, Wang CC, Wong YF, Cheung TH, Chung TK, Choy KW (2013) MicroRNA-182 plays an onco-miRNA role in cervical cancer. *Gynecol Oncol* 129(1):199–208. doi:10.1016/j.ygyno.2012.12.043

32. Ribeiro J, Sousa H (2014) MicroRNAs as biomarkers of cervical cancer development: a literature review on miR-125b and miR-34a. *Mol Biol Rep* 41(3):1525–1531. doi:10.1007/s11033-013-2998-0
33. Deftereos G, Corrie SR, Feng Q, Morihara J, Stern J, Hawes SE, Kiviat NB (2011) Expression of mir-21 and mir-143 in cervical specimens ranging from histologically normal through to invasive cervical cancer. *PLoS One* 6(12):e28423. doi:10.1371/journal.pone.0028423
34. Gocze K, Gombos K, Juhasz K, Kovacs K, Kajtar B, Benczik M, Gocze P, Patczai B, Arany I, Ember I (2013) Unique microRNA expression profiles in cervical cancer. *Anticancer Res* 33(6):2561–2567
35. Saavedra KP, Brebi PM, Roa JC (2012) Epigenetic alterations in preneoplastic and neoplastic lesions of the cervix. *Clin Epigenetics* 4(1):13. doi:10.1186/1868-7083-4-13
36. Liu L, Yu X, Guo X, Tian Z, Su M, Long Y, Huang C, Zhou F, Liu M, Wu X, Wang X (2012) miR-143 is downregulated in cervical cancer and promotes apoptosis and inhibits tumor formation by targeting Bcl-2. *Mol Med Rep* 5(3):753–760. doi:10.3892/mmr.2011.696
37. Slaby O, Svoboda M, Fabian P, Smerdova T, Knoflickova D, Bednarikova M, Nenutil R, Vyzula R (2007) Altered expression of miR-21, miR-31, miR-143 and miR-145 is related to clinicopathologic features of colorectal cancer. *Oncology* 72(5–6):397–402. doi:10.1159/000113489
38. Murakami Y, Yasuda T, Saigo K, Urashima T, Toyoda H, Okanoue T, Shimotohno K (2006) Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in hepatocellular carcinoma and non-tumorous tissues. *Oncogene* 25(17):2537–2545. doi:10.1038/sj.onc.1209283
39. Yu Y, Zhang Y, Zhang S (2013) MicroRNA-92 regulates cervical tumorigenesis and its expression is upregulated by human papillomavirus-16 E6 in cervical cancer cells. *Oncol Lett* 6(2):468–474. doi:10.3892/ol.2013.1404
40. Scheffner M, Huibregtse JM, Vierstra RD, Howley PM (1993) The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell* 75(3):495–505
41. Li Y, Wang F, Xu J, Ye F, Shen Y, Zhou J, Lu W, Wan X, Ma D, Xie X (2011) Progressive miRNA expression profiles in cervical carcinogenesis and identification of HPV-related target genes for miR-29. *J Pathol* 224(4):484–495. doi:10.1002/path.2873
42. Martinez I, Gardiner AS, Board KF, Monzon FA, Edwards RP, Khan SA (2008) Human papillomavirus type 16 reduces the expression of microRNA-218 in cervical carcinoma cells. *Oncogene* 27(18):2575–2582. doi:10.1038/sj.onc.1210919
43. Liu L, Wang YL, Wang JF (2012) Differential expression of miR-21, miR-126, miR-143, miR-373 in normal cervical tissue, cervical cancer tissue and Hela cell. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 43(4):536–539
44. Huang L, Lin JX, Yu YH, Zhang MY, Wang HY, Zheng M (2012) Downregulation of six microRNAs is associated with advanced stage, lymph node metastasis and poor prognosis in small cell carcinoma of the cervix. *PLoS One* 7(3):e33762. doi:10.1371/journal.pone.0033762

Increased miR-20b level in high grade cervical intraepithelial neoplasia

Tímea Szekerczés^{1§}, Ádám Galamb^{2§}, Norbert Varga³, Márta Benczik^{4,5}, Adrienn Kocsis⁵,
Krisztina Schlachter^{1#}, András Kiss¹, Nándor Ács², Zsuzsa Schaff¹, Csaba Jeney⁶, Gábor
Lendvai^{1§}, Gábor Sobel^{2§}

¹*2nd Department of Pathology, Semmelweis University, Budapest, Hungary*

²*Department of Obstetrics and Gynecology, Semmelweis University, Budapest, Hungary*

³*Nuffield Department of Clinical Neurosciences, Sleep & Circadian Neuroscience Institute, Oxford University, Oxford, United Kingdom*

⁴*SYNLAB Hungary Kft, Budapest, Hungary*

⁵*NEUMANN Diagnostics Ltd, Budapest, Hungary*

⁶*Department of Microsystems Engineering, Albert-Ludwigs University, Freiburg, Germany*

§ equally contributed

currently Department of Pathology, National Institute of Oncology, Budapest, Hungary

Corresponding author:

Gábor Sobel
Department of Obstetrics and Gynecology
Semmelweis University
Üllői 78/A
1082 Budapest
Hungary
Tel:+36 1 459 1500 / 61704
Fax: +36 1 333 4934
e-mail: sobelg@gmail.com

Abstract

Cervical cancer is a common malignant tumor worldwide ranking fourth in incidence and mortality among females, which was reduced significantly by cytology screening and human papilloma virus (HPV) DNA testing. The specificity of cytology is high; however, the sensitivity is low, in contrast to the HPV DNA testing. Despite the success of these measures, new biomarkers are still considered to aim increasing sensitivity and specificity of screening and diagnosis. Significant alterations in microRNA (miRNA) expression have been detected in several cancers with variable consistency. To investigate the stratification role of miRNAs between normal epithelium and cervical intraepithelial neoplasia (CIN2-3), we screened the expression of 667 miRNAs to identify significant markers (n=10), out of them 9 miRNAs were applied in the study (miR-20b, -24, -26a, -29b, -99a, -100, -147, -212, -515-3p) along with RNU48 and U6 as the references. To benchmark the miRNAs, 22 paired (tumor-free and tumor tissue pairs) laser microdissection-obtained cervical formalin fixed, paraffin embedded tissue samples were assayed. The expression of miR-20b was 2.4 times higher in CIN2-3 samples as compared to normal tissues ($p<0.0001$). In the HPV16-positive subsets of the samples (n=13), miR-20b showed 2.9-times elevation ($p<0.001$), whereas miR-515 was 1.15-times downregulated ($p<0.05$) in CIN2-3 as compared to normal tissue. These results suggest the potential value of miR-20b as a stratification biomarker in order to differentiate neoplastic and non-tumorous cases.

Keywords: cervical cancer, cervical intraepithelial neoplasia (CIN), microRNA, human papilloma virus

Introduction

Cervical cancer is a common malignant tumor worldwide among females regarding both incidence and mortality, ranking fourth after breast, lung, and colorectal cancer with an estimated 570,000 new cases yearly and 311,000 cancer related deaths in 2018 according to GLOBOCAN sources [1]. There is, however, great variability across the geographic regions of the world, with higher numbers occurring in several developing countries, where cervical cancer ranks second for both incidence and mortality[1]. The effect of population-based screening programs using the Papanicolaou („Pap”) test for cervical cancer resulted a significant decrease both in incidence and mortality [1–3]. Introduction of world-wide accepted guidelines for new evaluation methods, including the one formulated at the Bethesda Conference in 2001 [4], led to further decline in cervical cancer incidence. Discovery of the etiological role of the human papilloma virus (HPV) in cervical carcinogenesis [5] and the introduction of population-based vaccination programs were further steps towards the prevention of cervical cancer [6]. It became clear, however, that while being highly specific, the sensitivity of cytology is relatively low regarding the detection of high-grade squamous intraepithelial lesions (HSIL) or cervical intraepithelial neoplasia (CIN) [7]. Recently, more sensitive though less specific HPV DNA molecular detection tests have been introduced into the screening system effectively reducing cervical cancer incidence better than cytology screening alone. The demonstration of high-risk HPV (hrHPV) infection however does not prove whether the infection is transient or of the transforming type. [6,8–10]

Several new biomarkers have been applied for detection of transformed cells aiming to increase the sensitivity and/or specificity of the screening tests and/or in combination with cytology and/or with HPV DNA testing [8,11]. More recently, several groups have demonstrated aberrant expression of microRNAs (miRNAs) in premalignant and malignant cervical lesions, suggesting that this might be used as a more specific biomarker [3,12–19]. The majority of these works analyzed cervical cancer and/or premalignant lesions, with no surrounding tumor-free tissues coming from the same patient. For this reason, we performed a study comparing the miRNA expressions of HSIL/CIN2-3 lesions and histologically non-altered surrounding cervical epithelium in pairs deriving from the same patients.

Materials and methods

Patients and specimens

In total, 10 paired (normal/diseased) formalin fixed paraffin embedded (FFPE) histological samples with CIN1, 2, 3 and in situ carcinoma (CIS) were applied for miRNA screening and further 44 FFPE tissues (22 pairs of CIN2-3 and surrounding normal tissue) were chosen for validation of the results. The samples were selected from the archives of the 2nd Department of Pathology of Semmelweis University. The study was performed with the permission of the National Ethical Committee (V-R-021/04346-4/2013), according to the principles of the Declaration of Helsinki and with written consent from the patients. The samples derived from patients between 22 and 45 years of age at the time of obtaining tissue material with an average of 32.9 years (Table 1). Laser captured microdissection was used for selection and isolation of morphologically altered, dysplastic and non-tumorous foci performed by experienced pathologists. The 4-5 μm -thick FFPE sections were cut on FrameSlides 1.4 μm Pet Membrane (MicroDissect GmbH, Herborn, Germany). Leica AS LMD (Meyer Instruments, Houston, Texas, USA) instrument was used for microdissection of the areas of HSIL and non-altered epithelium, which were collected in BRAND[®]PCR-tubes (0,5 ml, BrandTech[®] Scientific, Merck KGaA, Darmstadt, Germany). A total of 10-12 microdissected sections were collected from the selected areas for the subsequent RNA isolation.

HPV genotyping test

The Human papilloma virus (HPV) viral DNA detection was performed by CONFIDENCE HPV[™] test (GenoID, Budapest, Hungary), which detects HPV16, HPV18 separately, and the other high-risk HPV-types (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 and 68) in group using multiplex real-time polymerase chain reaction technology [20].

RNA isolation

Total RNA including the miRNA fraction was extracted from the removed tissue areas by RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation Kit (Ambion brand by Life Technologies, Carlsbad, California, USA) according to the manufacturer's instructions. The purified RNA was kept until use at -80°C after the determination of the RNA concentration by a NanoDrop 1000 spectrophotometer (Life Technologies of Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA).

miRNA Screening

A preliminary miRNA expression screening was performed in 10 paired (normal/tumor) samples using TaqMan Array (TaqMan Array Human MicroRNA Cards Set v2.0, Panel A and B, Life Technologies, Foster City, CA, USA) according to the manufacturer's instructions (Table 2). The two-card sets contained 667 specific assays to human miRNAs and four control assays (three endogenous control and one negative control assays). In order to increase sensitivity of the analysis for miRNAs being present in lower concentration, a preamplification step was included using Megaplex PreAmp Primers (Applies Biosystems by Life Technologies Foster City, CA, USA). The miRNA measurements were performed in 384-plate format in a 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applies Biosystems by Life Technologies Foster City, CA, USA). Ct values were calculated using the SDS software v.2.1 using automatic baseline settings.

Determination of the expression levels of miRNAs identified in the screening

The expression of the selected miRNAs listed in Table 3 was determined using TaqMan MicroRNA Assays (Life Technologies brand of Thermo Fisher Scientific Inc). Reverse transcription (RT) and quantitative polymerase chain reaction (qPCR) were performed according to manufacturer's instructions. RT reaction was carried out using TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit containing 10 ng total RNA. The qPCR was performed by applying TaqMan Universal Master Mix II, no UNG and 0.65 μ L of the RT product. Owing to low copy numbers of miRNAs initially present in the samples, two miRNAs (miR-147 and miR-515) were preamplified just before qPCR for 12 cycles including the assays for reference as well. The amplification reaction was run in triplicates on a LightCycler 480 Instrument II (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA). Relative expression ($2^{\Delta Cq}$, where $\Delta Cq = Cq_{Ref} - Cq_{miR}$) was calculated applying the average of RNU48 and U6 as the most stable reference determined by the NormFinder application [21].

Statistical analysis

The differences between normal and HSIL/CIN2-3 lesions were analyzed by means of non-parametric Wilcoxon Matched Pairs Test using STATISTICA software, version 12

(StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA). A p value of 0.05 was set as the threshold for statistical significance.

Results

To investigate whether miRNAs could predict the difference between normal and HSIL/CIN2-3 tissue samples, we analyzed the expression of 667 miRNAs in a preliminary set of samples ($n=10$). The paired healthy and diseased samples were evaluated according to the average down-regulation / up-regulation and their respective standard deviation and miRNAs with significant values (compared to the zero change) were selected for the study. It is noteworthy that there were significant average fold changes in the data sets. A total of 52 dysplasia upregulated and 27 downregulated miRNAs with more than 3-fold changes were detected, but the majority of these changes was also highly variable, which renders them statistically insignificant. The final selection of the miRNAs was based on significantly different expression in diseased as compared to healthy tissue pairs (miR-20b, -24, -26a, -100) and additional miRNAs were selected based on a literature review (miR-29b, -99a, -147, -212, -515-3p).

In order to assess the expression of these selected 9 miRNAs in HSIL/CIN2-3 and surrounding morphologically non-altered (“normal”) epithelia, further 22 paired FFPE cervical samples was used from the patient cohort. Statistical analysis of the miRNA expressions in the sample pairs (normal contra HSIL) showed a 2.4 fold overexpression of miR-20b in HSIL/CIN2-3 samples compared to normal tissues with high statistical significance ($p<0.0001$) (Fig. 1). Additionally, miR-212 was also elevated with 1.6 fold increase ($p<0.06$) and miR-515 showed 4 fold downregulation ($p<0.07$) in dysplasia tissue compared to normal; however, these differences were not statistically significant (Table 4). The other miRNAs analyzed did not show any difference between dysplasia and normal areas.

When investigating miRNA expression in the samples tested to be HPV16-positive ($n=13$), miR-20b showed 2.9 fold upregulation ($p<0.001$) and miR-515 was 1.15 fold downregulated ($p<0.05$) in HSIL/CIN2-3 compared to normal tissue, which were statistically significant (Fig. 2).

Discussion

The novelty of our study is the pairs of HSIL/CIN2-3 and morphologically non-altered tissues, derived from the same patients as the source of miRNAs, precisely removed by laser microdissection, which has been rarely done in previous reports [22]. Our results demonstrated significantly increased expression of miR-20b in HSIL/CIN2-3 lesions in comparison to the surrounding morphologically non-altered cervical epithelium; while increased miR-212 and decreased miR-515 expression were also detected, however, these expressional differences were not statistically significant regarding the whole study population.

miRNAs are a family of small (18-25 nucleotides in length) single-stranded non-coding RNA molecules, which regulate gene expression at post-transcriptional level. miRNAs affect messenger RNAs (mRNAs) by degradation or by repression of translation via binding to the 3' untranslated region of the targeted mRNAs [11,17,23]. Until now, approximately 2500 human miRNAs have been described in the miRBase database (www.mirbase.org), consisting of tissue-, organ-, cell- and „differentiation”- specific miRNAs. It has been shown that dysregulated miRNA-expression is involved in various biological processes including carcinogenesis. miRNAs may act as „oncomirs” functioning as either oncogenes or tumor suppressors depending on the type of tissue and stage of tumor development. miRNAs may be up- or downregulated in cancer tissue and thus these molecules have been suggested to be potential novel tumor markers [3,13,14,17,19,24–28].

According to Pardini et al., 24 studies targeting miRNA expression in cervical cancer show „great variability”. The variability, however, can be attributed to the differing numbers of samples (and consequently the varied statistical power) and the studied different histological backgrounds (pre-malignant or malignant lesions). Nevertheless, the analyzed samples (liquid, solid, FFPE or frozen) and the RNA isolation methods are also varied. Despite the mixed backgrounds, miR-29a and miR-21 were the most often found down- and upregulated miRNAs in invasive cervical cancer, while the altered expression of other miRNAs, especially miR-20b, was found to be associated with a range of pathological lesions including from pre-malignant to malignant stages [17]. Cheung et al., by comparing normal epithelium, CIN and carcinoma samples, found 10 upregulated and 2 downregulated miRNAs in CIN lesions. The upregulation of miR-20b was found to be of the highest fold changes (2.89) in CIN2-3 lesions compared to normal tissue. As miR-20b was shown to be upregulated from the stage of pre-malignancies to invasive cancer, our results confirm the earlier findings regarding HSIL/CIN2-3 samples [29].

miR20b is encoded by the miR-106a-363 cluster located on human chromosome X and an autoregulatory feedback loop exists between E2F1 and miR-20b-5p, which was shown to be involved in proliferation and differentiation [30]. In a breast cancer study, miR-20b was shown to act as a tumor suppressor by inhibiting the migration and invasion of breast cancer cells [30]. Others demonstrated that HPV E6-regulates miR-20b and promotes invasion in cervical cancer by targeting the tissue inhibitor metalloproteinase 2 [31].

Regarding other dysregulated miRNAs in cervical cancer development, Pardini et al. and He et al. reviewed the available studies, with listing miR-26a, -29a, -99a, -100, and -212 reported to be downregulated in CIN2-3 and/or cervical cancer in comparison to normal cervical epithelium [17,32]. In addition, aberrant expression of miR-24 and -29b has been observed in cervical cancer [33–35] and downregulated miR-147 and upregulated miR-515-3p have been found in several solid cancers [36,37]. However, we did not find statistically significant differences in the expression of these miRNAs when all of the 22 pairs of HSIL/CIN2-3 samples were analyzed.

When examining the miRNA expression in the 10 pairs of preliminary samples, we observed highly variable fold changes with relative large standard deviation, suggesting that the samples were rather heterogenous. This means that samples of different molecular background might have been put into the same group of HSIL/CIN2-3, which signifies the finding of a more efficient way for the stratification of samples with the aim to reduce the heterogeneity between the samples even more. For this reason, we chose a subgroup of samples tested positive for HVP16 and found a more upregulated miR-20b in HPV16-positive HSIL/CIN2-3 samples as compared to normal cervical epithelium. Association between miRNA expression and hrHPV infection has been reported [16,32,38]. For example, Wang et al. (2014) detected 13 up- and downregulated miRNAs, which were associated with hrHPV 16 and 18 [39].

In association with CIN2-3 and cervical carcinoma, several further miRNAs showing dysregulated expression have been reported, such as miR-218, 29a, -101, -140-5p [40–44]. In the study of Gocze et al (2015), progressively increased expression of miR-27a was demonstrated in CIN2-3 as compared to CIN1 and in squamous cell carcinoma (SCC) as compared to CIN2-3, while the levels of miR-34a were found to be lower in CIN2-3 when compared to CIN1 and in SCC in comparison to CIN2-3. These data were found to be correlated with HPV16 positivity [14]. Differences were also detected in miRNA expression between SCC

and adenocarcinoma [13]. Overexpression of several miRNAs was shown in SCC (miR-21, -27a, -34a, -155, -196, -203, -221) regardless of HPV status, however miR-21, -27a, -34a, -196a, and -221 characterized HPV positive SCC, in contrast to adenocarcinoma having the same HPV status [13].

More recently, altered miRNA expression has been reported in non-solid tissues, such as biofluids (blood, vaginal mucus, saliva, urine etc.) [18,45]. Four miRNAs were upregulated in CIN2-3, SCC and adenocarcinoma, showing a correlation with hrHPV. The data were confirmed in frozen tissues coming from the same patients and miR-20b was among the upregulated miRNAs, as found in our HSIL/CIN2-3 cases. miRNAs may be associated with „Argonaute (AGO) proteins” or located in extracellular vesicles implying that miRNAs are „diversely distributed” across tissues and extracellular fluids, meaning that miRNAs are present intracellularly and extracellularly as well [45].

To summarize, our study revealed overexpression of miR-20b in HSIL/CIN2-3 tissue lesions as compared to the morphologically non-dysplastic adjacent epithelium. This might suggest the use of miR-20b as a potential biomarker in order to differentiate neoplastic from normal tissues. Further studies may examine the use of miR-20b as a marker in vaginal fluid/mucous and/or in liquid based cytology samples.

Acknowledgements

The authors thank Mrs. Elvira Kálé Rigóné for the English proofreading.

Compliance with Ethical Standards

Conflict of Interest: The authors declare that they have no conflict of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

MB is an employee of Synlab Hungary Kft. and NEUMANN Diagnostics Ltd., AK is of the NEUMANN Diagnostics Ltd. CJ and NV were former employees of NEUMANN Diagnostics Ltd.

Funding: The work was supported by grant #OTKA PD105019 by the Hungarian National Research Foundation and #KMR-12-A FP7-HEALTH-2012-INNOVATION-1-Grant Agreement Number 306037 from the Hungarian Ministry of National Development.

Authors Contribution TS, NV and GL performed the RNA isolation and microRNA evaluation, ÁG and KS provided and selected the cervical samples and performed statistics, MB and AK performed the microRNA screening and HPV testing, NÁ, CJ, ZS and GS designed and coordinated the study. ZS and GS accept full responsibility for the work. All authors read and approved the final manuscript.

References

- [1] Bray F., Ferlay J. et al. (2018) Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 68:394–424 <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- [2] Safaeian M., Sherman M.E. (2013) From papanicolaou to papillomaviruses: Evolving challenges in cervical cancer screening in the era of human papillomavirus vaccination. *J Natl Cancer Inst* 105:1524–6 <https://doi.org/10.1093/jnci/djt267>
- [3] Laengsri V., Kerdpin U. et al. (2018) Cervical Cancer Markers: Epigenetics and microRNAs. *Lab Med* 49:97–111 <https://doi.org/10.1093/labmed/lmx080>
- [4] Solomon D., Davey D. et al. (2002) The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA* 287:2114–9
- [5] Crosbie E., Einstein M. et al. (2013) Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet* 382:889–99 [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60022-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60022-7)
- [6] Ronco G., Dillner J. et al. (2014) Efficacy of HPV-based screening for prevention of invasive cervical cancer: follow-up of four European randomised controlled trials. *Lancet* 383:524–32 [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)62218-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)62218-7)
- [7] Isidean S.D., Franco E.L. (2014) Embracing a new era in cervical cancer screening. *Lancet* 383:493–4 [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)62028-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)62028-0)
- [8] Arbyn M., Ronco G. et al. (2012) Evidence regarding human papillomavirus testing in secondary prevention of cervical cancer. *Vaccine* 30:F88-99 <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.06.095>
- [9] Tornesello M.L., Buonaguro L. et al. (2013) Viral and cellular biomarkers in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia and cancer. *Biomed Res Int* 2013:519619 <https://doi.org/10.1155/2013/519619>
- [10] Nicolás I., Saco A. et al. (2020) Prognostic implications of genotyping and p16 immunostaining in HPV-positive tumors of the uterine cervix. *Mod Pathol* 33:128–37 <https://doi.org/10.1038/s41379-019-0360-3>
- [11] Galamb Á., Benczik M. et al. (2015) Dysregulation of microRNA expression in human cervical preneoplastic and neoplastic lesions. *Pathol Oncol Res Oncol Ogy Res*

21:503–8

- [12] Pereira P.M., Marques J.P. et al. (2010) MicroRNA expression variability in human cervical tissues. *PLoS One* 5 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011780>
- [13] Gocze K., Gombos K. et al. (2013) Unique microRNA expression profiles in cervical cancer. *Anticancer Res* 33:2561–8
- [14] Gocze K., Gombos K. et al. (2015) MicroRNA expressions in HPV-induced cervical dysplasia and cancer. *Anticancer Res* 35:523–30
- [15] Pedroza-Torres A., Fernández-Retana J. et al. (2016) A microRNA expression signature for clinical response in locally advanced cervical cancer. *Gynecol Oncol* 142:557–65 <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2016.07.093>
- [16] Liu S.S., Chan K.K.L. et al. (2018) Oncogenic microRNA signature for early diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia and cancer. *Mol Oncol* 12:2009–22 <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12383>
- [17] Pardini B., De Maria D. et al. (2018) MicroRNAs as markers of progression in cervical cancer: A systematic review. *BMC Cancer* 18:1–17 <https://doi.org/10.1186/s12885-018-4590-4>
- [18] Kawai S., Fujii T. et al. (2018) Identification of miRNAs in cervical mucus as a novel diagnostic marker for cervical neoplasia. *Sci Rep* 8:1–11 <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25310-1>
- [19] Wang S., Chen X. (2018) Identification of potential biomarkers in cervical cancer with combined public mRNA and miRNA expression microarray data analysis. *Oncol Lett* 16:5200–8 <https://doi.org/10.3892/ol.2018.9323>
- [20] Kocsis A., Takács T. et al. (2017) Performance of a new HPV and biomarker assay in the management of hrHPV positive women: Subanalysis of the ongoing multicenter TRACE clinical trial (n > 6,000) to evaluate POU4F3 methylation as a potential biomarker of cervical precancer and cancer. *Int J Cancer* 140:1119–33 <https://doi.org/10.1002/ijc.30534>
- [21] Andersen C.L., Jensen J.L. et al. (2004) Normalization of Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR Data: A Model-Based Variance Estimation Approach to

- Identify Genes Suited for Normalization, Applied to Bladder and Colon Cancer Data Sets. *Cancer Res* 64:5245–50 <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-0496>
- [22] Yang Y., Liu Y. et al. (2018) MicroRNA-214 suppresses the growth of cervical cancer cells by targeting EZH2. *Oncol Lett* 16:5679–86 <https://doi.org/10.3892/ol.2018.9363>
- [23] Chen R., Shi Y.H. et al. (2018) Systematic prediction of target genes and pathways in cervical cancer from microRNA expression data. *Oncol Lett* 15:9994–10000 <https://doi.org/10.3892/ol.2018.8566>
- [24] Dweep H., Sticht C. et al. (2011) miRWalk--database: prediction of possible miRNA binding sites by “walking” the genes of three genomes. *J Biomed Inform* 44:839–47 <https://doi.org/10.1016/j.jbi.2011.05.002>
- [25] Iorio M. V., Croce C.M. (2012) Causes and consequences of MicroRNA dysregulation. *Cancer J (United States)* 18:215–22 <https://doi.org/10.1097/PPO.0b013e318250c001>
- [26] Chen E.Y., Tan C.M. et al. (2013) Enrichr: interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool. *BMC Bioinformatics* 14:128 <https://doi.org/10.1186/1471-2105-14-128>
- [27] González-Quintana V., Palma-Berré L. et al. (2016) MicroRNAs are involved in cervical cancer development, progression, clinical outcome and improvement treatment response (Review). *Oncol Rep* 35:3–12 <https://doi.org/10.3892/or.2015.4369>
- [28] Kori M., Arga K.Y. (2018) Potential biomarkers and therapeutic targets in cervical cancer: Insights from the meta-analysis of transcriptomics data within network biomedicine perspective. *PLoS One* 13:1–27 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200717>
- [29] Cheung T.H., Man K.N.M. et al. (2012) Dysregulated microRNAs in the pathogenesis and progression of cervical neoplasm. *Cell Cycle* 11:2876–84 <https://doi.org/10.4161/cc.21278>
- [30] Xu H., Li W. et al. (2019) Adipose derived stem cells promote tumor metastasis in breast Cancer cells by stem cell factor inhibition of miR20b. *Cell Signal* 62:109350 <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2019.109350>
- [31] Cheng Y., Geng L. et al. (2017) Human papillomavirus E6-regulated microRNA-20b

- promotes invasion in cervical cancer by targeting tissue inhibitor of metalloproteinase 2. *Mol Med Rep* 16:5464–70 <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.7231>
- [32] He Y., Lin J. et al. (2016) A systematic study on dysregulated microRNAs in cervical cancer development. *Int J Cancer* 138:1312–27 <https://doi.org/10.1002/ijc.29618>
- [33] Wang X., Tang S. et al. (2008) Aberrant expression of oncogenic and tumor-suppressive microRNAs in cervical cancer is required for cancer cell growth. *PLoS One* 3 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002557>
- [34] Li Y., Zhang Z. et al. (2017) Chemotherapy-mediated miR-29b expression inhibits the invasion and angiogenesis of cervical cancer. *Oncotarget* 8:14655–65 <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14738>
- [35] Servín-González L.S., Granados-López A.J. et al. (2015) Families of microRNAs expressed in clusters regulate cell signaling in cervical cancer. *Int J Mol Sci* 16:12773–90 <https://doi.org/10.3390/ijms160612773>
- [36] Zhang Y., Zhang H. et al. (2016) MicroRNA-147 suppresses proliferation, invasion and migration through the AKT/mTOR signaling pathway in breast cancer. *Oncol Lett* 11:405–10 <https://doi.org/10.3892/ol.2015.3842>
- [37] Han X., Li X. et al. (2019) Serum miR-515-3p, a potential new RNA biomarker, is involved in gastric carcinoma. *J Cell Biochem* 120:15834–43 <https://doi.org/10.1002/jcb.28854>
- [38] Virtanen E., Pietilä T. et al. (2016) Low expression levels of putative HPV encoded microRNAs in cervical samples. *Springerplus* 5 <https://doi.org/10.1186/s40064-016-3524-3>
- [39] Wang X., Wang H.K. et al. (2014) MicroRNAs are biomarkers of oncogenic human papillomavirus infections. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:4262–7 <https://doi.org/10.1073/pnas.1401430111>
- [40] Liu Z., Mao L. et al. (2020) MiR-218 functions as a tumor suppressor gene in cervical cancer. *Mol Med Rep* 21:209–19 <https://doi.org/10.3892/mmr.2019.10809>
- [41] Nan P., Niu Y. et al. (2019) MiR-29a function as tumor suppressor in cervical cancer by targeting sirt1 and predict patient prognosis. *Onco Targets Ther* 12:6917–25

<https://doi.org/10.2147/OTT.S218043>

- [42] Jiang W., Pan J.-J. et al. (2017) Down-regulated serum microRNA-101 is associated with aggressive progression and poor prognosis of cervical cancer. *J Gynecol Oncol* 28:e75 <https://doi.org/10.3802/jgo.2017.28.e75>
- [43] Su Y., Xiong J. et al. (2016) MicroRNA-140-5p targets insulin like growth factor 2 mRNA binding protein 1 (IGF2BP1) to suppress cervical cancer growth and metastasis. *Oncotarget* 7:68397–411 <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.11722>
- [44] Varghese V.K., Shukla V. et al. (2019) Characterizing methylation regulated miRNA in carcinoma of the human uterine cervix. *Life Sci* 232:116668 <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.116668>
- [45] Berti F., Salviano-Silva A. et al. (2019) From squamous intraepithelial lesions to cervical cancer: Circulating microRNAs as potential biomarkers in cervical carcinogenesis. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* 1872:188306 <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2019.08.001>

Tables List

Table 1. List of patients

No	Age	HPV type
1	31	16 ⁺
2	30	16 ⁺
3	38	Negative
4	25	16 ⁺
5	44	16 ⁺
6	32	Negative
7	34	33 ⁺
8	27	16 ⁺
9	30	Negative
10	32	58 ⁺
11	23	16 ⁺
12	25	16 ⁺ ; 31 ⁺ ; 33 ⁺
13	35	18 ⁺
14	28	16 ⁺ , 66 ⁺ , 45 ⁺ , 59 ⁺
15	35	16 ⁺
16	34	Negative
17	43	16 ⁺ , 18 ⁺
18	36	16 ⁺
19	43	Negative
20	22	16 ⁺
21	35	LR ⁺ and 56 ⁺
22	42	16 ⁺
<i>Average: 32.9</i>		

HR: high risk HPV types; LR: low risk HPV types

Table 2. Kits used for preliminary miRNA expression screening

Name of the kit	Catalogue Number
TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit	4366596
Megaplex RT Primers Human Pool A	4399966
Megaplex RT Primers Human Pool B	4399968
TaqMan PreAmp Master Mix Kit	4384267
Megaplex PreAmp Primers Human Pool A	4399233
Megaplex PreAmp Primers Human Pool B	4399201
TaqMan 2X Universal PCR Master Mix, No AmpErase UNG (1 x 5 ml)	4324018
Human Array A and B	4400238

Table 3. The list of selected miRNAs

Assay ID	miRNA
001014	hsa-miR-20b
000402	hsa-miR-24
000405	hsa-miR-26a
000413	hsa-miR-29b
000435	hsa-miR-99a
000437	hsa-miR-100
000469	hsa-miR-147
000515	hsa-miR-212
002369	hsa-miR-515-3p
For reference:	
001006	RNU48
001973	U6

Table 4. miRNAs showing statistical differences between HSIL/CIN2-3 and corresponding normal tissue

miRNA	p value
In the 22 pairs	
miR-20b	<0.0001
miR-212	0.06
miR-515	0.07
In HPV16+ samples	
miR-20b	<0.001
miR-515	<0.05

Figure legends

Fig. 1. Relative miRNA expression in HSIL/CIN2-3 and corresponding normal cervical samples. Black interrupted lines represent the pairs of samples and indicate the direction of alteration of miRNA expression in dysplastic samples as compared to normal tissue.

Fig. 2. Relative miRNA expression in HSIL/CIN2-3 samples known to be HPV16 positive and in corresponding normal cervical samples (n=13). Black interrupted lines represent the pairs of samples and indicate the direction of alteration of miRNA expression in dysplastic samples as compared to normal tissue.