

Aspekt ekonomiczny wykorzystania wybranych biomarkerów w badaniach przesiewowych raka szyjki macicy

Economic aspects of using selected biomarkers in cervical cancer screening

Rokita Wojciech¹, Kędzia Witold², Gaj Agnieszka¹, Kulig Bartosz³

¹ Oddział Położnictwa i Ginekologii Szpital Kielecki NZOZ Św. Aleksandra, Kielce

² Klinika Onkologii Ginekologicznej, Ginekologiczno-Położniczy Szpital Kliniczny Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu,

³ Klinika Ginekologii Operacyjnej, Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi

Streszczenie

Wzrost wiedzy na temat procesów kancerogenezy w połączeniu z rozwojem technologii diagnostyki molekularnej z wykorzystaniem matryc DNA i mRNA oraz metod immunohistochemicznych wykrywających ekspresję białka p 16 wprowadził nową jakość do badań profilaktycznych raka szyjki macicy sprowadzając ją z poziomu komórkowego na poziom molekularny. Pozwala to nie tylko na rozpoznawanie istniejących stanów przedrakowych i raka ale również na przewidywanie tych patologii na etapie zmian komórkowych lub molekularnych za pomocą oznaczeń biomarkerów onkogenezy. Te nowe narzędzia diagnostyczne dają nadzieję na poprawę skuteczności skriningu raka szyjki macicy oraz znaczną redukcję jego kosztów.

Słowa kluczowe: **rak szyjki macicy / skrining / biomarkery /**

Summary

Increasing knowledge about the cervical cancer etiology, combined with the development of molecular diagnostics technology using DNA matrix and mRNA matrix, introduced a new quality in cervical cancer screening. Moving the diagnostics from the cellular level into the molecular level allowed not only to identify the existing precancerous states, but also to foresee these pathologies in the stage of cellular or molecular changes using oncogenesis biomarkers. The new diagnostic tools give hope for the improvement of effectiveness of cervical cancer screening and for a significant reduction of costs.

Key words: **cervical cancer / screening / biomarkers /**

Adres do korespondencji:

Wojciech Rokita
Oddział Położnictwa i Ginekologii Szpital Kielecki NZOZ Św. Aleksandra
25-316 Kielce, ul. Kościuszki 25
tel. +48601480918, fax. +48413680456
e-mail: rokita@kielce.com.pl

Otrzymano: 10.05.2010
Zaakceptowano do druku: 20.09.2010

Wprowadzenie 50 lat temu badań profilaktycznych opartych o rozmaz cytologiczny oceniany według kryteriów PAPA (Papanicolaou) doprowadziło do zmniejszenia śmiertelności z powodu raka szyjki macicy w objętych skринingiem populacjach kobiet [1]. Mimo tych niewątpliwych sukcesów zastosowanie cytologii jako podstawowego narzędzia diagnostycznego w skринingu raka szyjki macicy nie jest rozwiązaniem pozbawionym wad. Podstawowy problem stanowi duży odsetek wyników fałszywie negatywnych i fałszywie pozytywnych co generuje dodatkowo wysokie koszty badań przesiewowych [2, 3].

Badanie cytologiczne nie jest doskonałym i jednoznacznym narzędziem diagnostycznym w rozpoznawaniu zmian śród nabłonkowych i raka szyjki macicy. Czulość jednokrotnego badania cytologicznego w rozpoznawaniu tych patologii zależy w dużym stopniu od poziomu fachowości personelu prowadzącego skринing (osoba pobierająca, sprzęt, dokładność pobrania, utrwalenia, techniki histologicznej, skринingu cytologicznego, reskrинingu). Dlatego też czulość i odsetek wyników fałszywie negatywnych jest miarą poziomu konkretnego ośrodka diagnostycznego. Dodatkowo badanie cytologiczne cechuje ograniczona powtarzalność wyników oraz duży odsetek wyników niejednoznacznych (ASCUS, ASC-H, rozmazy nienadające się do oceny).

Wyniki niejednoznaczne mogą dotyczyć nawet do 7% kobiet objętych skринingiem. U większości z nich stwierdza się na szyjce macicy zmiany łagodne, jednak powoduje to konieczność wykonywania kontrolnych rozmazów cytologicznych oraz dodatkowych badań diagnostycznych (kolposkopia, badania wirusologiczne, badania histologiczne) co znacznie komplikuje i zwiększa koszty programów badań profilaktycznych raka szyjki macicy [4]. Nakłady finansowe ponoszone na weryfikację niejasnych wyników rozmazów cytologicznych znacznie przewyższają koszty związane z diagnostyką i leczeniem stanów przedrakowych (CIN2+) [5]. Wykrycie 1 przypadku raka szyjki macicy w oparciu o podstawowe badania cytologiczne wymaga poniesienia kosztów związanych z prowadzeniem badań przesiewowych u 1000 kobiet przez 35 lat [6].

Wprowadzenie kosztownych modyfikacji klasycznego badania cytologicznego i stworzenie cytologii na podłożu płynnym (*liquid base cytology* – LBC) nie poprawiło w znaczącym stopniu jego czulości i specyficzności w wykrywaniu zmian śród nabłonkowych i raka szyjki macicy [7]. Dlatego prowadzone są bardzo intensywne prace nad poszukiwaniem nowych biomarkerów raka szyjki macicy, które pozwoliłyby na pewną identyfikację grupy kobiet z niejasnymi wynikami cytologii, u których istnieje bezwzględna konieczność włączenia szczegółowej diagnostyki na etapie pogłębionym skринingu.

Względy ekonomiczne i ograniczone możliwości diagnostyczne rozmazu cytologicznego spowodowały, że klasyczny model profilaktyki raka szyjki macicy oparty o skринing cytologiczny, badanie kolposkopowe z wycinkiem celowanym i leczeniem stanów przedrakowych ulega obecnie zmianom [8, 9].

Zastosowanie nowych technologii molekularnych ma poprawić efektywność skринingu poprzez wzrost jego czulości z jednoczesnym ograniczeniem konieczności wykonywania dodatkowych badań na etapie pogłębionej diagnostyki programów profilaktycznych, co ma znacznie obniżyć nakłady finansowe przeznaczane na prowadzenie badań profilaktycznych raka szyjki macicy. Dotyczy to głównie kobiet młodych z latentną postacią zakażenia HPV, u których wynik pojedynczego badania cytolo-

gicznego bardzo często może być nieprawidłowy [10].

Zakażenie wirusem brodawczaka ludzkiego (HPV) jest powszechnie uznawane za główny czynnik etiologiczny rozwoju stanów przedrakowych i raka szyjki macicy. Zostało to potwierdzone w licznych badaniach eksperymentalnych i epidemiologicznych [11, 12, 13]. Zakażenie jednym z 15 typów wirusa HPV o wysokim potencjale onkogennym jest niezbędnym, ale niewystarczającym czynnikiem przyczynowym rozwoju zmian śród nabłonkowych i raka szyjki macicy [14]. Tylko u części kobiet zakażonych wirusem HPV rozwija się śród nabłonkowa neoplazja lub rak szyjki macicy. U części z nich, głównie kobiet młodych przed 30 rokiem, zakażenie może mieć charakter przejściowy lub utajony [15]. Czynnikiem niezbędnym do wywołania transformacji nowotworowej w komórkach nabłonka szyjki macicy jest integracja wirusowego DNA z genomem komórkowym. Ma to miejsce głównie w postaci przetrwałej zakażenia HPV. Nastęstwem tego procesu jest nadekspresja białek wirusowych E6/E7 o właściwościach transformujących, które inaktywują główne regulatory cyklu komórkowego i supresory transformacji nowotworowej p53, pRb (retinoblastoma). Równocześnie aktywują one telomerazę powodując rozwój zmian śród nabłonkowych i raka inwazyjnego [16, 17, 18]. Stwierdzenie przewlekłej ekspresji onkogenów E6/E7 może służyć jako wskaźnik prognostyczny potencjału transformacji nowotworowej w komórkach nabłonka szyjki macicy już na bardzo wczesnym jej etapie [19].

Spośród licznych dostępnych komercyjnych testów DNA służących do wykrywania zakażenia wirusami HPV, FDA (*Food and Drug Administration*) zaaprobowala do badań skринingowych na terenie USA komercyjny test Hybryd Capture II (HC2) firmy Digene [20]. Jednak testy te mają ograniczone zastosowanie u kobiet młodych poniżej 30 roku życia, u których bardzo często stwierdza się utajoną postać zakażenia HPV. Stwierdzenie dodatniego wyniku testu na obecność DNA HPV poniżej 21 roku życia jest mało przydatne w praktyce klinicznej i nie należy zalecać jego wykonywania. Jeżeli badanie zostało wykonane w tej grupie kobiet a jego wynik jest dodatni to nie należy poszerzać diagnostyki (kolposkopia, histologia) w tej grupie pacjentek bowiem w większości przypadków zakażenie HPV i zmiany z nią związane ulegną regresji wraz z upływem czasu [21, 22].

W grupie kobiet starszych testy HPV DNA są bardzo pomocne w prowadzeniu badań profilaktycznych jednak nie pozwalają na podstawie jednokrotnego badania na zróżnicowanie utajonej i przetrwałej postaci zakażenia HPV. Poznanie i zrozumienie przebiegu naturalnego zakażenia HPV jest istotne dla zachowania równowagi między odpowiednim prowadzeniem badań przesiewowych w celu zapobiegania rozwojowi raka a wykonywaniem nadmiernej liczby badań, co związane jest z rosnącymi kosztami skринingu oraz możliwością wystąpienia szeregu niekorzystnych powikłań [23].

Wprowadzenie testów wykrywających DNA HPV pozwoliło na wdrożenie nowej jakości do badań profilaktycznych na etapie pogłębionej diagnostyki szczególnie u kobiet z nieprawidłowymi wynikami badań cytologicznych. Testy DNA HPV HR (diagnozujące typy wirusa o wysokim potencjale onkogennym) wykrywające obecność wirusowego DNA posiadają dużo większą czulość w rozpoznawaniu śród nabłonkowej neoplazji i raka szyjki macicy niż klasyczny rozmaz cytologiczny [10]. Przydatność kliniczną tych testów potwierdzono w trzech dużych badaniach prospektywnych przeprowadzonych zarówno w USA jak

i w Europie [24, 25, 26]. Jednak powszechne stosowanie tych testów na etapie pogłębionej diagnostyki w ramach badań profilaktycznych napotyka na ograniczenia i nie spełnia pokładanych nadziei. Związane jest to ze stosunkowo niską ich swoistością oraz niską wartością predykcijną dodatnią (*positive predictive value* – PPV) szczególnie u kobiet młodych z utajoną postacią zakażenia wirusem Papilloma. Powoduje to konieczność powtarzania tych testów co 6-12 miesięcy w celu potwierdzenia lub wykluczenia występowania przetrwałej postaci zakażenia, co znacznie podwyższa koszty prowadzonego skriningu [27, 28].

Pacjentki z przetrwałą postacią zakażenia wirusami HPV o wysokim potencjale onkogennym (HR HPV) są szczególnie zagrożone rozwojem śródnałonkowej neoplazji i raka szyjki macicy. Wymagają one intensywnego nadzoru, dlatego konieczne jest szybkie i dokładne ocenianie tej postaci zakażenia [29, 30]. Takie możliwości stwarzają nowe testy oparte o analizę transkryptów mRNA wirusów HPV HR. Wykrycie transkryptów mRNA HPV HR wydaje się mieć większą wartość prognostyczną w rozpoznawaniu stanów przedrakowych i raka szyjki macicy w porównaniu z diagnostyką opartą o rozmaz cytologiczny i testy HPV DNA [31]. Przydatność testów DNA HPV w badaniach profilaktycznych raka szyjki macicy została szczegółowo opracowana w licznych doniesieniach, natomiast wartość prognostyczna testów opartych o analizę mRNA w rozpoznawaniu zmian śródnałonkowych i raka szyjki macicy wciąż nie została do końca poznana. W dostępnym piśmiennictwie opublikowano zaledwie kilka prac porównujących wyniki testów DNA HPV i mRNA HPV u kobiet z CIN i rakiem szyjki macicy [10]. Obecnie dostępny jest już na rynku komercyjny test oparty o analizę mRNA wirusów HPV dopuszczony do zastosowań klinicznych (NucliSENSE EasyQ®). Test ten wykrywa obecność zwiększonej ilości transkryptów mRNA onkogenów E6/E7 pięciu najczęściej wywołujących raka szyjki macicy onkogennych typów HPV: 16, 18, 31, 33 i 45 i charakteryzuje się wyższą specyficznością i czułością w wykrywaniu zmian CIN2+ w porównaniu z testami HPV DNA [32].

Obecnie trwają poszukiwania innych bardziej obiektywnych niż testy HPV DNA markerów molekularnych pozwalających na zróżnicowanie postaci utajonej i przewlekłego zakażenia HPV. Wydaje się, że rolę takiego biomarkera może pełnić białko p16 [33]. Białko p16 w warunkach fizjologicznych pełni rolę inhibitora cyklinozależnej kinazy CDK 4/6 i zapobiega fosforylacji białka retinoblastoma (Rb) hamując cykl komórkowy poprzez utrzymywanie komórki w fazie G1. Wzrost poziomu onkogenów E6/E7 związany z przetrwałym zakażeniem wirusem HPV powoduje zwiększoną ekspresję białka p16 [34].

Silną ekspresję białka p16 obserwuje się w niektórych nowotworach, w tym w raku szyjki macicy. Ekspresja białka p16 w może sugerować rozwój śródnałonkowej neoplazji płaskonałonkowej dużego stopnia (CIN3) lub wyższy stopień patologii komórek nabłonka szyjki macicy [9]. W pojedynczych pracach wykazano, że nasilenie ekspresji białka p16 jest związane z progresją śródnałonkowej neoplazji i raka [35, 36].

Ekspresję białka p16 stwierdza się również w przypadkach śródnałonkowej neoplazji szyjki macicy u kobiet, u których nie potwierdzono zakażenia wirusami brodawczaka ludzkiego o wysokim potencjale onkogennym. Koszty związane z wykonywaniem badań pozwalających na stwierdzenie ekspresji białka p16 są wielokrotnie mniejsze niż diagnostyka zakażeń HPV.

Być może więc oznaczenie ekspresji białka p16 będzie wystarczającym sposobem na wyselekcjonowanie grupy pacjentek zagrożonych rozwojem śródnałonkowej neoplazji szyjki macicy i raka bez konieczności wykonywania drogiej diagnostyki wirusologicznej z genotypowaniem wirusów *papilloma*. Konieczne są jeszcze jednak dalsze badania nad tym zagadnieniem. Dodatkowo w odróżnieniu od wielu klasycznych markerów nowotworowych ekspresja białka p16 nie jest związana z proliferacją, ale raczej z procesem starzenia się komórki i zahamowaniem cyklu komórkowego, dlatego nie stwierdza się ekspresji p16 w prawidłowych komórkach warstwy podstawnej nabłonka i innych nienowotworowych komórkach o zdolnościach do namnażania się [37].

Rozpoznanie ekspresji białka p16 ustala się za pomocą takich metod immunohistochemicznych pozwalających na wykrycie zmian w metabolizmie komórek nabłonka szyjki macicy w przebiegu przewlekłego zakażenia wirusami HR HPV. Metodyka badań immunohistochemicznych w kierunku ekspresji białka p16 w preparatach histologicznych wykonanych z biopatów szyjki macicy jest dokładnie opracowana a kryteria diagnostyczne są dobrze wystandaryzowane. Natomiast diagnostyka immunohistochemiczna rozmazów cytologicznych pobranych z szyjki macicy jest wciąż przedmiotem badań naukowych [38]. W pojedynczych doniesieniach zwrócono uwagę na duże korzyści płynące z oceny ekspresji białka p16 w rozmazach cytologicznych u kobiet z nieprawidłowym wynikiem konwencjonalnego badania cytologicznego (HSIL). Badania te pozwalają bowiem na wyselekcjonowanie z tej grupy kobiet pacjentek p16 negatywnych, u których ryzyko rozwoju raka szyjki macicy jest niewielkie. Pozwala to na wdrożenie postępowania zachowawczego i uniknięcie zbędnych zabiegów zwłaszcza u kobiet młodych w okresie prokreacji. Konieczne są jednak dalsze badania kliniczne, które potwierdzą powyższe obserwacje [39]. W chwili obecnej jest już dostępny jedyny na rynku komercyjny test pozwalający na wykrywanie ekspresji p16 zarówno w rozmazach cytologicznych jak i w preparatach biopsyjnych z szyjki macicy (CINtecPlus™) [40]. Prostota wykonania testu, duża czułość i specyficzność w diagnostyce zmian śródnałonkowych i raka szyjki macicy oraz dużo niższe koszty w porównaniu z testami HPV DNA i HPV mRNA stwarzają nadzieję na wykorzystanie tej metody w programach skriningowych.

Wzrost wiedzy na temat procesów kancerogenezy w połączeniu z rozwojem technologii diagnostyki molekularnej z wykorzystaniem matryc DNA, mRNA oraz metod immunohistochemicznych wykrywających ekspresję białka p16 wprowadził nową jakość do badań profilaktycznych raka szyjki macicy sprowadzając ją z poziomu komórkowego na poziom molekularny. Badania molekularne doprowadziły do wykrycia i zidentyfikowania 150 genów związanych z kancerogenezą, które kodują białka regulujące cykl komórkowy, różnicowanie komórek i ich apoptozę. Spośród tych białek część jest już wykorzystana w diagnostyce CIN i raka szyjki macicy. Pozwala to nie tylko na rozpoznawanie istniejących stanów przedrakowych i raka ale również na przewidywanie tych patologii na etapie zmian komórkowych lub molekularnych za pomocą oznaczeń biomarkerów onkogenezy. Te nowe narzędzia diagnostyczne dają nadzieję na poprawę skuteczności skriningu raka szyjki macicy oraz znaczną redukcję jego kosztów.

Piśmiennictwo

1. Bray F, Loos J, Mc Carron P, [et al.]. Trends in cervical squamous cell carcinoma incidence in 13 European countries: Changing risk and the effects of screening. *Cancer Epidemiol, Biomarkers Prev.* 2005, 14, 677-686.
2. Cox J, Schiffman M, Salomon D. ASCUS-LSIL Triage Study (ALTS) Group. Prospective follow up suggest similar risk of subsequent cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 among women with cervical intraepithelial neoplasia grade 1 or negative colposcopy and directed biopsy. *Am J Obstet Gynecol.* 2003, 188, 1406-1412.
3. Spaczyński M, Kotarski J, Nowak-Markwitz E, [i wsp.]. Postępowanie w przypadku nieprawidłowego wyniku przesiewowego badania cytologicznego. Rekomendacje Centralnego Ośrodka Koordynującego Populacyjny Program Profilaktyki i Wczesnego Wykrywania Raka Szyjki Macicy, Polskiego Towarzystwa Ginekologicznego, Polskiego Towarzystwa Patologów i Polskiego Towarzystwa Kolposkopii i Patofizjologii Szyjki Macicy. *Ginekol Pol.* 2009, 80, 129-138.
4. Stoler M, Schiffman M. Intraobserver reproducibility of cervical cytologic and histologic interpretations: realistic estimates from ASCUS-LSIL Triage Study. *JAMA.* 2001, 285, 1500-1505.
5. Solomon D, Schiffman M, Tarone R. ALTS Study Group. Comparison of three management strategies for patients with atypical squamous cells of undetermined significance: baseline results from a randomized trial. *J Natl Cancer Inst.* 2001, 93, 293-299.
6. Reffle A, Alden B, Quinn M, [et al.]. Outcomes of screening to prevent cancer: analysis of cumulative incidence of cervical abnormality and modeling of cases and deaths prevented. *BMJ.* 2003, 326, 901.
7. Arbyn M, Bergaron C, Klinkhamer P, [et al.]. Liquid compared with conventional cervical cytology. A systematic review and meta-analysis. *Obstet Gynecol.* 2008, 111, 167-177.
8. Solomon D. Role of triage testing in cervical cancer screening. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2003, 31, 97-101.
9. Kędzia W, Spaczyński M. Nowe metody wykrywania śródnamionkowej neoplazji szyjki macicy. W: Profilaktyka pierwotna i wtórna raka szyjki macicy, diagnostyka i leczenie. Książka dla lekarzy, położnych i studentów. Red. Spaczyński M, Kędzia W, Nowak-Markwitz E. Poznań: PTG-WTGO, 2008, 46-52.
10. Gravitt P, Coutlee F, Iftner T, [et al.]. New Technologies in cervical cancer screening. *Vaccine.* 2008, 26, Suppl. 10, K42-K52.
11. Wallin K, Wiklund F, Angstrom T, [et al.]. Type specific persistence of human papillomavirus DNA before the development of invasive cervical cancer. *N Engl J Med.* 1999, 341, 1633-1638.
12. Senior K. Cervical cancer research focuses on the HPV E7 gene. *Lancet Oncol.* 2002, 3, 585.
13. Munoz N, Bosch X, de Sanjose S, [et al.]. Epidemiological classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med.* 2003, 348, 518-527.
14. Walboomers J, Jacobs M, Manos M, [et al.]. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol.* 1999, 189, 12-19.
15. de Oliveira E. DNA viruses in human cancer. An intergrated overview on fundamental mechanism of viral carcinogenesis. *Cancer Lett.* 2007, 247, 182-196.
16. Galloway D, Mc Dougall J. The disruption of cell cycle check-points by papillomavirus oncoproteins contributes to anogenital neoplasia. *Semin Cancer Biol.* 1996, 7, 309-315.
17. zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basis studies to clinical application. *Nat Rev Cancer.* 2002, 2, 342-350.
18. Molden T, Kraus J, Karlsen F, [et al.]. Human papillomavirus E6/E7 mRNA expression in women younger than 30 years of age. *Gynecol Oncol.* 2006, 100, 95-100.
19. Sotlar K, Stubner A, Diemer D, [et al.]. Detection of high-risk human papillomavirus E6 and E7 oncogene transcripts in cervical scrapes by nested RT-polymerase chain reaction. *J Med Virol.* 2004, 74, 107-116.
20. Wright J, Pinto A, Powell M, [et al.]. Atypical squamous cells of undetermined significance in girls and women. *Obstet Gynecol.* 2004, 103, 632-638.
21. Moscicki A, Shiboski S, Hills N, [et al.]. Regression of low - grade squamous intraepithelial lesion in young women. *Lancet.* 2004, 364, 1678-1683.
22. Fuchs K, Weitzen S, Wu L, [et al.]. Management of cervical intraepithelial neoplasia 2 in adolescent and young women. *J Pediatr Adolesc Gynecol.* 2007, 20, 269-274.
23. ACOG. Practice Bulletin No 109. *Obstet Gynecol.* 2009, 114, 1409-1420.
24. Sherman M, Schiffman M, Cox T. Effects of age and human papilloma viral load on colposcopy triage: data from the randomized. Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance/ Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesion Triage Study Group (ALTS). *J Natl Cancer Inst.* 2002, 94, 102-107.
25. Cuzick J, Szarewski A, Cubie H, [et al.]. Management of women who test positive for high-risk types of human papillomaviruses: the HART study. *Lancet.* 2003, 362, 1871-1876.
26. Petry K, Menton S, Menton M, [et al.]. Inclusion of HPV testing in routine cervical cancer screening for women above 29 years in Germany: results of 8466 patients. *Br J Cancer.* 2003, 88, 1570-1577.
27. Cuzick J, Beverley E, Ho L, [et al.]. HPV testing in primary screening of older woman. *Br J Cancer.* 1999, 81, 554-558.
28. Cuzick J, Mayrand M, Ronco G. New dimension in cervical cancer screening. *Vaccine.* 2006, 24, Suppl. 3, S3/90-97.
29. Kjaer S, van den Brule A, Paul G, [et al.]. Type specific persistence of high risk human papillomavirus (HPV) as indicator of high grade cervical squamous intraepithelial lesions in young women population based prospective follow up study. *BMJ.* 2002, 325, 572.
30. Cuschieri K, Whitley M, Cubie H. Human papillomavirus type specific DNA and RNA- persistence implications for cervical disease progression and monitoring. *J Med Virol.* 2004, 73, 65-70.
31. Lie A, Risberg B, Borge B, [et al.]. DNA versus RNA-based methods for human papillomavirus detection in cervical neoplasia. *Gynecol Oncol.* 2005, 97, 908-915.
32. Halfon P, Benmoura D, Agostini A, [et al.]. Relevance of HPV mRNA detection in a population of ASCUS plus women using the NucliSENS EasyQ 9 HPV assay. *J Clin Virol.* 2010, 47, 177-178.
33. Wentzensen N, von Knebel Doeberitz M. Biomarkers in cervical cancer screening. *Dis Markers.* 2007, 23, 315-330.
34. Tsoumpou J, Arbyn M, Kyrgiou M, [et al.]. p16 INK4a immunostaining in cytological and histological specimens from the uterine cervix: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Treat Rev.* 2009, 35, 210-220.
35. Negri G, Vitadello F, Romano F, [et al.]. p16 INK4a expression and progression risk of low-grade intraepithelial neoplasia of cervix uteri. *Virchows Arch.* 2004, 445, 616-620.
36. Wang J, Zheng B, Li X, [et al.]. Predictive significance of the alterations of p16 INK4a, p14ARF, p53 and proliferating cell nuclear antigen expression in the progression of cervical cancer. *Clin Cancer Res.* 2004, 10, 2407-2414.
37. Beausejour C, Krtolica A, Galimi F, [et al.]. Reversal of human cellular senescence: roles of the p-53 and p-16 pathways. *EMBO J.* 2003, 22, 4212-4222.
38. Carozzi F, Cecchini S, Confortini M, [et al.]. Role of p16 (INK4a) expression in identifying CIN2 or more severe lesion among HPV-positive patients referred for colposcopy after abnormal cytology. *Cancer.* 2006, 108, 119-123.
39. Richart R. Cervical intraepithelial neoplasia. *Pathol Annu.* 1973, 8, 301-323.
40. Jović M, Nenadić D, Magić Z, [et al.]. Reliability of the CINtec p16INK4a immunocytochemical test in screening cervical precancerous lesions. *Vojnosanit Pregl.* 2008, 65, 211-219.