

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). Többben 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 sejtekeneken, 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)

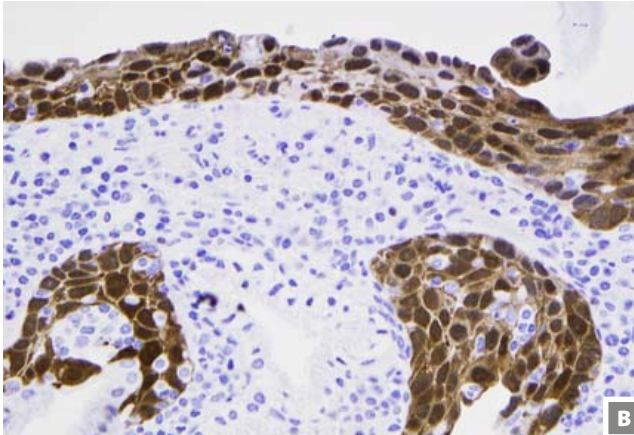
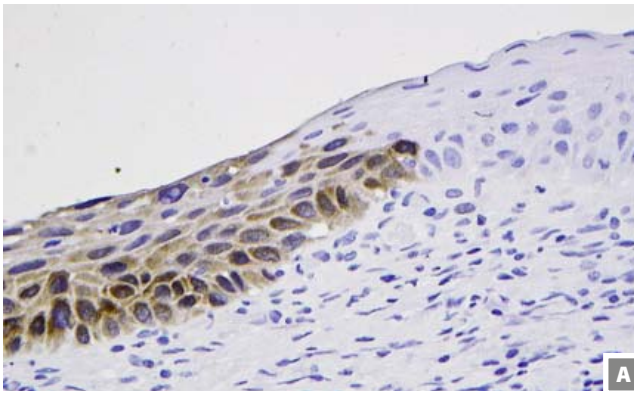
* A jegyzék nem teljes, csak a legismertebb és hazánkban alkalmazott vagy kipróbált tesztek soroltak fel

** A felsorolt tesztek nem ismertették az összefoglaló közleményben

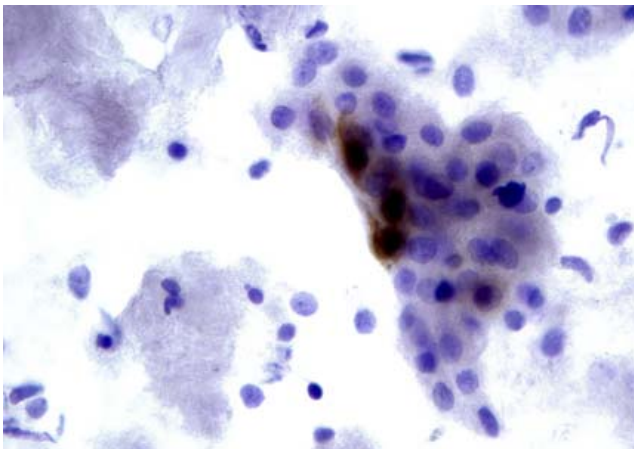
■ SEJTÉS („CELLULARIS”) BIOMARKEREK, TESZTEK

1. P16^{INK4A}: CINTEC

A P16^{ink4a} ciklindependens 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 immunocitokémiai reakció méhnyaki kenetben. A pozitív sejtek barnán festődnek

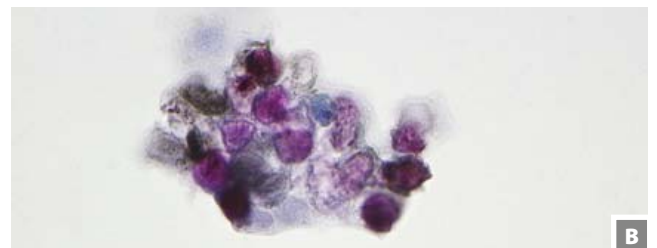
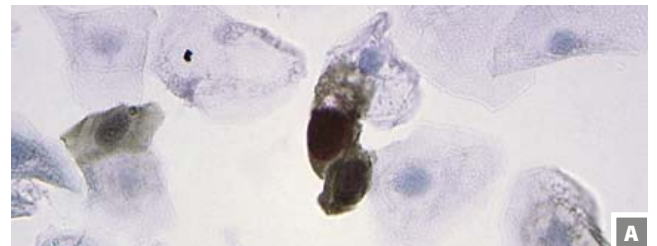
fehérje) működését, az E2F átíróadási faktorhoz való kötődés gátlásával (19). Ez a folyamat, azaz a hrHPV-E7 gátló hatása olyankor érvényesül, amikor az fokozottan termelődik a vírus-DNS sejtmagba való beépülése következtében (13).

A már említett 2013-as Európai Patológus Kongresszuson, Lisszabonban, 1500 méhnyaki laphámminta vizsgálatánál a p16 fokozott képződését az ép hámsejtek 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 sejtgyparodást 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 kenetekben

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-tesztel 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.

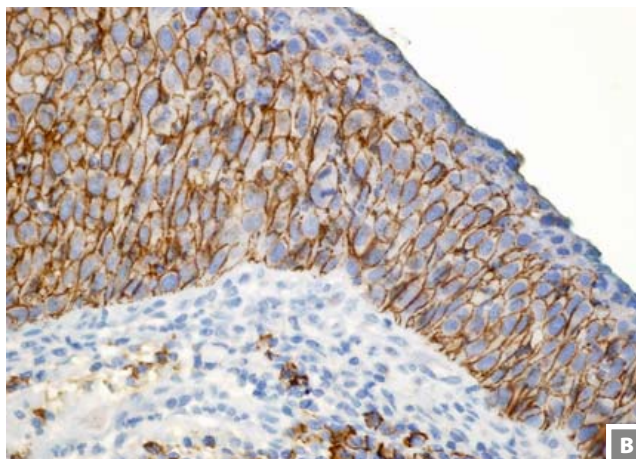
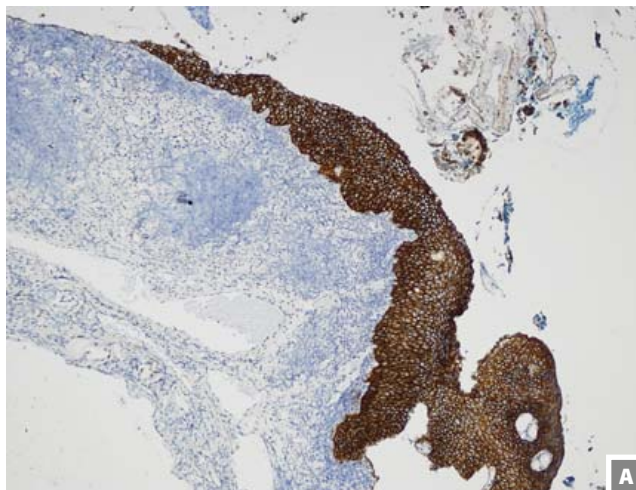
4. SEJTKAPCSOLÓ SZERKEZETEK FEHÉRJÉI MINT JELZŐ ANYAGOK A MÉHNYAKRÁKBAN

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).

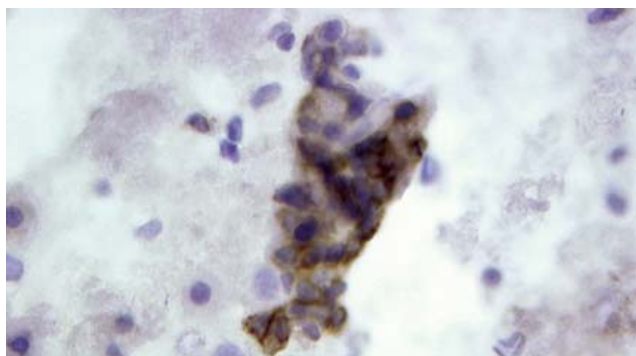
5. A MICRO-RNS-EK JELENTŐSÉGE A MÉHNYAKI DAGANATOK KÓRISMÉZÉSÉBEN

A microRNS-ek (miRNS) kis, endogén, nem kódoló RNS-molekulák, amelyek a génműködést poszttranszkripció 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, ám 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 E6/E7 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 eddigienél 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;127:2893–917.
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;105:1524–6.
5. Solomon D, Davey D, Kurman R, et al. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA* 2002;287:2114–9.
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. Bősze P. A női és a férfi alsó nemi szervi, a végbél és a végbél környéke laphámsejtes rákosodásának új nevezéktana. *Nőgyógy Onkol* 2013;18:35–7.
8. Crosbie EJ, Einstein MH, Franceschi S, Kitchener HC. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet* 2013;382:889–99.
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. Bősze P. Az emberi papillomavírus fertőzéseinek népességi gyakorisága – a HPV-járvány. *Nőgyógy Onkol* 2009;14:148–50.

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;105:1550–7.
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;17:3007–11.
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;25:4375–84.
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; 18:4154–62.
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;41:767–75.
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: 162–69.
25. Sobel G, Németh J, Kiss A, et al. Claudin 1 differentiates endometrioid and serous papillary endometrial adenocarcinoma. *Gynecol Oncol* 2006;103:591–8.
26. Lendvai G, Kiss A, Kovalszky I, Schaff Zs. Eltérések a májbetegségek mikro-RNS-expressziós mintázatában. *Orv Hetil* 2010;151:1843–53.
27. Deng S, Calin GA, Croce CM, Coukos G, Zhang L. Mechanisms of microRNA deregulation in human cancer. *Cell Cycle* 2008;7:2643–6.
28. Farazi TA, Spitzer JI, Morozov P, Tuschl T. miRNAs in human cancer. *J Pathol* 2011;223:102–15.
29. Reshmi G, Radhakrishna Pillai M. Beyond HPV: Oncomirs as new players in cervical cancer. *FEBS Letters* 2008;582:4113–6.
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;33:2561–7.
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;29:1242–8.
35. Hu X, Schwarz JK, Lewis JS Jr. A microRNA expression signature for cervical cancer prognosis. *Cancer Res* 2010;70:1441–8.
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;49:557–64.