

ارتباط نشانگر Ki67 با شدت راکتیویتی و محل سرطان داخل اپی تلیوم دهانه رحم

دکتر نوریه شریفی^۱، دکتر زهره یوسفی^{۲*}، دکتر شهره سعید^۳، مریم بحرینی^۴، مهری داورپناه^۵

۱. دانشیار گروه پاتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
۲. استاد گروه زنان و زایمان، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
۳. دستیار تخصصی زنان و زایمان، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
۴. دانشجوی پزشکی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
۵. کارشناس بیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸۸/۷/۲

تاریخ دریافت: ۱۳۸۸/۲/۷

خلاصه

مقدمه: ضایعات پیش سرطانی و سرطان داخل اپی تلیوم دهانه رحم طیف پیوسته ای از تغییرات مورفولوژیک هستند که مرزهای دقیق آنها نسبتاً نامشخص است. استفاده از روش های ایمنو هیستوشیمی و نشانگرهای پرولیفراتیو روش قابل اعتمادی در طبقه بندی ضایعات مختلف دیسپلازی دهانه رحم است. در مطالعات انجام شده از نشانگر پرولیفراتیو Ki67 به عنوان فاکتور پیشگویی کننده پیشرفت ضایعات سرطانی دهانه رحم استفاده شده است. این مطالعه به منظور طبقه بندی دقیق تر موارد سرطان داخل اپی تلیوم دهانه رحم با استفاده از نشانگر پرولیفراتیو Ki67 انجام شد.

روش کار: در این مطالعه مقطعی توصیفی- تحلیلی گذشته نگر ۴۲ اسلاید از نمونه های دهانه رحم شامل ۱۶ مورد دیسپلازی خفیف، ۸ مورد دیسپلازی متوسط و ۱۰ مورد دیسپلازی شدید و ۸ مورد بافت طبیعی دهانه رحم با مراجعه به بایگانی بخش آسیب شناسی بیمارستان قائم (عج) مشهد در سال ۱۳۸۶ جمع آوری و بروز فاکتور Ki67 به روش ایمنو هیستوشیمی در این بلوک های پارافینی مطالعه شد و ارتباط بین شدت راکتیویتی و محل بروز Ki67 و درجه دیسپلازی دهانه رحم بررسی شد. آنالیز آماری با نرم افزار SPSS (نسخه ۱۱) انجام و تفاوت آماری بین گروه های مورد بررسی توسط تست های واریانس یک طرفه آنووا تحلیل شد.

یافته ها: ارتباط مستقیم بین درجه دیسپلازی و میزان راکتیویتی اپی تلیوم دهانه رحم برای نشانگر پرولیفراتیو Ki67 وجود داشت و همچنین رابطه مستقیم بین درجه دیسپلازی و محل درگیری اپی تلیوم سرویکال بانشانگر Ki67 مشاهده شد.

نتیجه گیری: ارزیابی ضایعات داخل اپی تلیوم دهانه رحم با روش ایمنو هیستوشیمی و نشانگر Ki67 روش قابل اعتمادی برای تشخیص و طبقه بندی شدت ضایعات مختلف دیسپلازی است.

کلمات کلیدی: ایمنو هیستوشیمی، ضایعات نئوپلازی داخل اپی تلیوم سرویکس؛ نشانگر پرولیفراتیو Ki67؛ شدت راکتیویتی

* نویسنده مسؤؤل مکاتبات: دکتر زهره یوسفی؛ مشهد، مرکز تحقیقات سلامت زنان، دانشگاه علوم پزشکی مشهد؛ تلفن: ۰۵۱۱)۸۴۱۷۴۹۳؛ پست الکترونیک: yousefiz@mums.ac.ir

مقدمه

پنجاه سال قبل سرطان دهانه رحم اولین علت مرگ ناشی از سرطان در زنان در ایالات متحده بود، اما امروزه میزان مرگ به اندازه دوسوم کاهش پیدا کرده و هم-اکنون در رده هشتم از نظر مرگ ناشی از سرطان قرار دارد (۱). برخلاف کاهش میزان مرگومیر، میزان کشف زودرس سرطان و حالت‌های پیش‌سرطانی افزایش یافته است. در دسترس بودن گردن رحم برای امتحان کولپوسکوپی و انجام بیوپسی، برنامه گسترده غربالگری با آزمایش سیتولوژیک پاپانیکولائو دلایل اصلی موفقیت فوق است (۲).

دلیل دیگر آن که غربالگری بدین‌سان در جلوگیری از سرطان گردن رحم موثر بوده، این است که اکثریت سرطان‌های سرویکال به دنبال یک ضایعه داخل اپیتلیومی دهانه رحم^۱ (CIN) ایجاد می‌شوند و ممکن است خودبخود پسرفت کنند و یا با دخالت سایر فاکتورها مشابه آلودگی با انواع پرخطر ویروس پاپیلوما انسانی (HPV) به درجات بالاتر و در نهایت به طرف سرطان مهاجمی پیشرفت کنند (۳) این ضایعات ممکن است حتی تا ۲۰ سال در مرحله غیرتهاجمی باقی بمانند. این موارد نمایانگر طیف پیوسته‌ای از تغییرات مورفولوژیک و ملکولی هستند که مرزبندی دقیق آنها نسبتاً نامشخص است (۴).

گوئل و همکاران در مطالعه‌ای وجود آنتی ژن‌های هیستوپاتولوژیک را بیانگر انعکاسی از تغییرات بیولوژیک و ویرال ضایعات CIN گزارش کردند و تاکید کردند که بیان این آنتی ژن‌ها با شدت تغییرات مورفولوژیک و درجات CIN هم‌آهنگی دارد (۵). این محققین معتقدند ارزیابی فاکتور پرولیفراتیو باید همراه تفسیر پاپ اسمیر مرسوم جهت کمک به تشخیص بهتر استفاده شود. مطالعه دیگر نشان داد که بررسی پرولیفراسیون آنتی ژن‌های هسته سلولی Ki67 روش بسیار اختصاصی برای تعیین پیش‌آگهی سرطان دهانه رحم و مخصوصاً موارد CIN با درجات بالا است (۶). قدیمی‌ترین روش بررسی پرولیفراسیون سلولی

در ضایعات پیش‌سرطانی که هنوز هم مورد استفاده قرار می‌گیرد، بررسی و شمارش میتوز است که بدلیل وابستگی شاخص میتوتیک به سایر پارامترهای مشابه ضخامت برش‌های بافتی و نوع میکروسکوپ، روش دقیقی برای تعیین میزان پرولیفراسیون سلولی محسوب نمی‌شود (۷). روش‌های صحیح‌تر بررسی پرولیفراسیون سلولی با شمارش هسته‌های فاز S بعد از نشان‌دار کردن با تیمیدین و اتورادیوگرافی است (۸) و تکنیک‌های ایمنوهیستوشیمی آنتی ژن‌های هسته‌ای که ارتباط رشد سلولی یا تقسیم سلولی را با دقت و صحت بالا نشان می‌دهند هم استفاده می‌شوند. بررسی فعالیت پرولیفراسیون سلولی در رفتار بیولوژیک توده علاوه بر تشخیص شدت بیماری در پیشگویی عود این ضایعات هم کمک کننده است (۹).

نشانگر Ki67 آنتی ژن هسته‌ای در ارتباط با پروتئین‌های غیرهستونی است که در فاز پرولیفراتیو S, M, G1, G2 بروز می‌کند راکتیویتی و آنتی بادی‌های منوکلونال MIB1 به‌خوبی آن را در هسته سلول بارز می‌کند و میزان بروز آن ارتباط مستقیم با میزان پرولیفراسیون سلولی سلول‌های نئوپلازیک تهاجمی و غیرتهاجمی دارد. این نشانگر در تشخیص ضایعات ویژه می‌تواند کمک کننده باشد (۱۰).

ضایعات CIN به صور مختلف طبقه بندی می‌شوند. در صورت امکان تشخیص این سرطان در مراحل اولیه با استفاده از روش‌های مختلف، مسلماً این امر در درمان و پیش‌آگهی بیماران تاثیر بسزایی خواهد داشت (۱۱). هدف از انجام این مطالعه استفاده از روش ایمنوهیستوشیمی و نشانگر پرولیفراتیو Ki67 در ضایعات داخل اپی‌تلیوم دهانه رحم از نظر تشخیص درجات مختلف دیسپلازی شدت راکتیویتی و محل درگیری ضایعات گردن رحم بود.

روش کار

در این مطالعه مقطعی توصیفی-تحلیلی گذشته‌نگر ۴۲ اسلاید بیوپسی دهانه رحم طبیعی و دهانه رحم با درجات مختلف دیسپلازی (خفیف، متوسط و شدید) با مراجعه به بایگانی بخش آسیب شناسی بیمارستان

¹ Cervical intraepithelial neoplasia

سنگفرشی سرویکال به عنوان راکسیون مثبت در نظر گرفته شد و به صورت نیمه کمی (منفی، +، ۱+، ۲+، ۳+) بر اساس عدم وجود راکتیویتی و رنگ پذیری، ۲۵-۵٪، ۲۵-۷۵٪ و بیش از ۷۵٪ طبقه بندی شدند. محل راکتیویتی سلولهای مخاط سنگفرشی دهانه رحم همه به صورت نیمه کمی، در لایه بازال و یک سوم تحتانی، یک سوم تا دوسوم ضخامت پوشش و دوسوم تا تمامی ضخامت پوشش مورد بررسی قرار گرفت. آنالیز آماری با نرم افزار SPSS (نسخه ۱۱) انجام و تفاوت آماری بین گروه‌های مورد بررسی با تست‌های واریانس یک طرفه آنوا تحلیل شد.

نتایج

در این مطالعه در نمونه‌های طبیعی و بدون دیسپلازی برای نشانگر Ki67 هیچ گونه ایمینوراکتیویتی در اپی تلیوم سرویکال دیده نشد (جدول ۱ و ۲) و یا حداکثر محدود به لایه بازال بود (۶۶/۷٪). در موارد دیسپلازی خفیف ایمینوراکتیویتی ضعیف سلولهای پوشش سرویکال مشاهده شد که عمدتاً محدود به لایه بازال بود (۵۵/۶٪). در درجات متوسط دیسپلازی دهانه رحم ایمینوراکتیویتی در ضخامت عمدتاً دوسوم اپی تلیوم سرویکس مشاهده شد (۸۳/۳٪). در درجات شدید دیسپلازی دهانه رحم ایمینوراکتیویتی شدید سلولهای پوششی با درگیری دوسوم تا تمام اپی تلیوم برای نشانگر Ki67 به روش ایمنوهیستوشیمی مشاهده شد (۱۰۰٪) (جدول ۲) (تصاویر ۱ تا ۳).

قائم (عج) مشهد در سال ۱۳۸۶ مورد بررسی قرار گرفت.

حجم نمونه با توجه به محدودیت تعداد نمونه‌ها و هزینه انجام تکنیک ایمنوهیستوشیمی با ضریب اطمینان ۹۵٪ و با استفاده از مطالعات قبلی و فرمول $n=P(1-p)z^2$ انتخاب شد.

اسلایدهای میکروسکوپی پس از بازبینی و تهیه برش عمقی به منظور طبقه بندی به درجات مختلف دیسپلازی به ضخامت چهار میکرومتر جهت رنگ آمیزی ایمنوهیستوشیمی انتخاب و آماده شد و از روش ایمنوپراکسیداز-استرپتواوکیدین بیوتین استفاده شد. ابتدا برش‌ها پرافین گیری و آب‌دهی و سپس با محلول پراکسید هیدروژن ۳٪ انکوبه شدند. بازیابی آنتی ژنی توسط محلول بافر سترات ۰/۱۰ مولار (PH=6) برای مدت ۲۰ دقیقه در مایکروویو انجام شد. در مرحله بعد برش‌ها با آنتی بادی Ki67 در ۳۷ درجه برای مدت ۶۰ دقیقه انکوبه شدند و سپس ایمونوگلوبین موشی و خرگوشی بیوتینه شده و کمپلکس استرپتواوکیدین پراکسیداز استفاده شد. وجود پراکسیداز با کروموزن دی آمینونیزیدین تتراییدورکلراید (DAB) نشان داده شد. رنگ آمیزی زمینه ای هماتوکسیلین مایر روی اسلایدها به کار رفت و پس از دهیدراته کردن لامل چسبانده شد. جهت شاهد منفی آنتی بادی Ki67 در مراحل رنگ آمیزی حذف شد. جهت شاهد منفی غده لنفاوی راکتیو با مراکز زایگر فعال انتخاب شد. اسلایدهای میکروسکوپی توسط پاتولوژیست بررسی و تفسیر شد. راکتیویتی هسته‌ای سلول‌های پوشش

جدول ۱- ارتباط شدت راکتیویتی سلولهای پوششی دهانه رحم با نشانگر پرولیفراتیو Ki67 با درجه دیسپلازی به روش ایمنوهیستوشیمی

کل	شدید	متوسط تا شدید	متوسط	راکتیویتی / میزان	
				بدون راکتیویتی	بروز درجه دیسپلازی
۱۹/۱	۰٪	۰٪	۲۳/۵٪	۶۶/۷٪	بدون دیسپلازی
۳۸/۱	۲۳/۱٪	۱۶/۷٪	۵۸/۵٪	۳۳/۳٪	خفیف
۱۹	۳۰/۸٪	۱۶/۷٪	۱۸/۶٪	۰٪	متوسط
۲۳/۸	۴۶/۲٪	۶۶/۷٪	۰٪	۰٪	شدید
۱۰۰	۱۰۰٪	۱۰۰٪	۱۰۰٪	۱۰۰٪	جمع

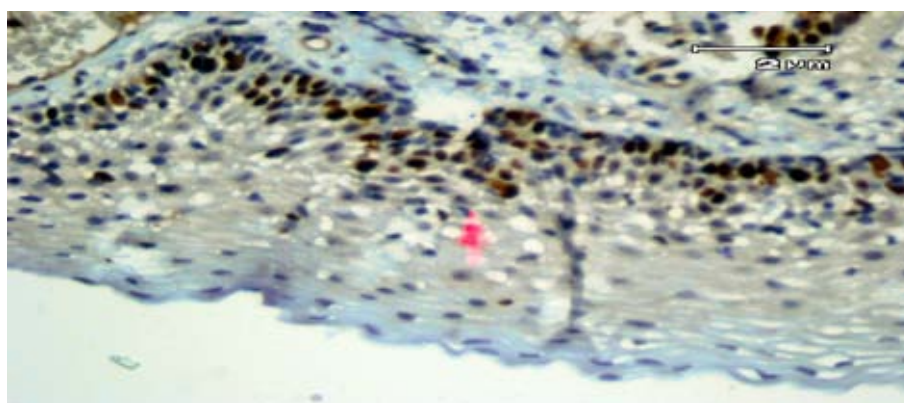
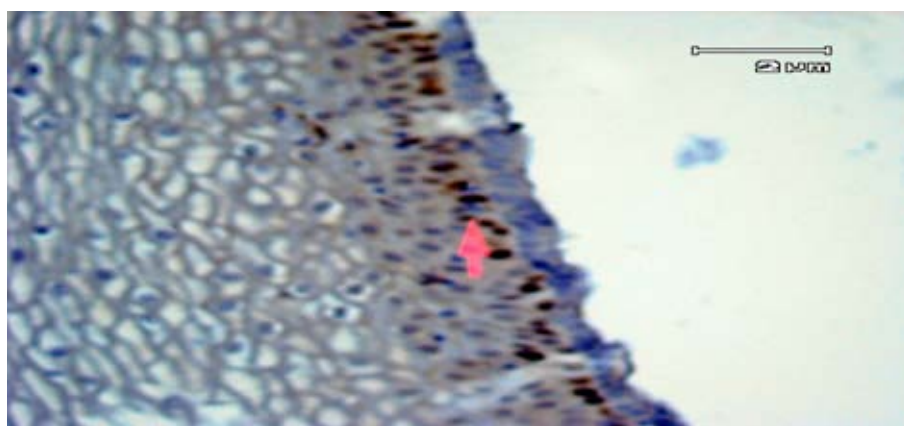
¹ Biotinylated link anti-mouse and anti-rabbit immunoglobulin

² DAKOLASABRZ system, peroxidase kit, Denmark

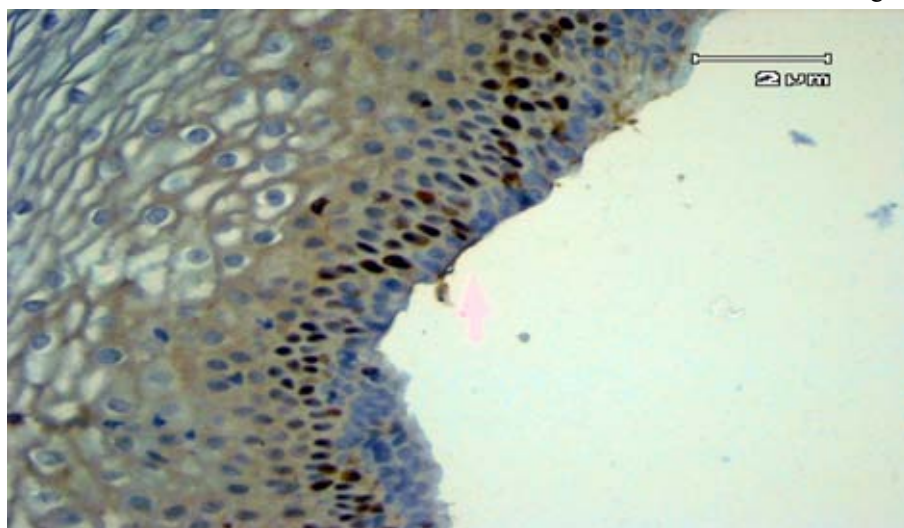
جدول ۲- ارتباط درجه دیسپلازی سرویکال و محل رآکتیویتی پوشش بافت با نشانگر Ki67 به روش ایمنوهیستوشیمی

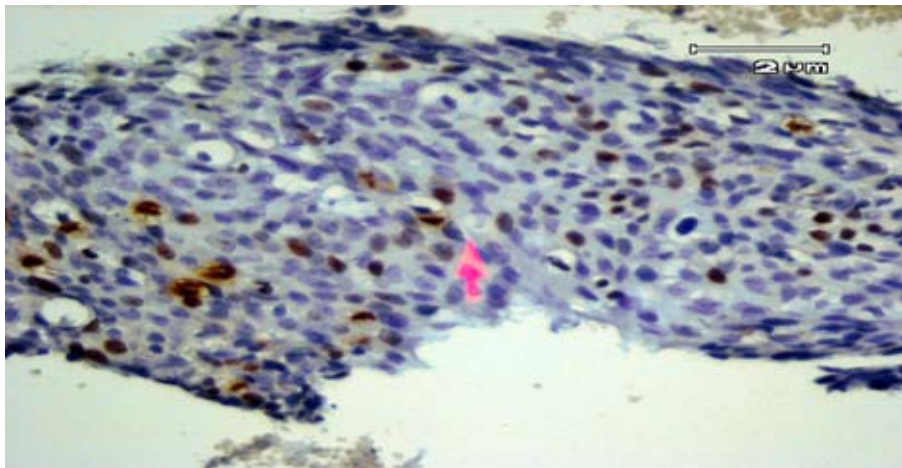
کل	درگیری همه اپیتلیوم	درگیری تا ۲/۳ اپیتلیوم	درگیری تا ۱/۳ اپیتلیوم	درگیری لایه بازال	بدون درگیری	
٪۱۹/۱	٪۰	٪۰	٪۰	٪۴۴/۴	٪۶۶/۷	بدون دیسپلازی
٪۳۸/۱	٪۰	٪۱۶/۷	٪۱۰۰	٪۵۵/۶	٪۳۳/۳	خفیف
٪۱۹	٪۰	٪۸۳/۳	٪۰	٪۰	٪۰	متوسط
٪۲۳/۸	٪۱۰۰	٪۰	٪۰	٪۰	٪۰	شدید
٪۱۰۰	٪۱۰۰	٪۱۰۰	٪۱۰۰	٪۱۰۰	٪۱۰۰	جمع

♦ دکتر زهره یوسفی و همکاران

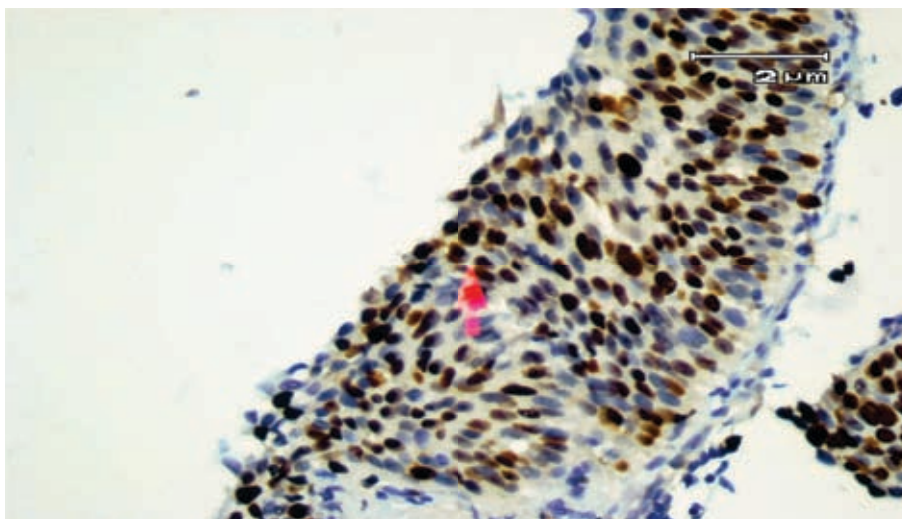


شکل ۱- دیسپلازی خفیف دهانه رحم: ایمینورآکتیویتی سلولهای پوششی سرویکال عمدتاً در ناحیه بازال و ۱/۳ تحتانی اپیتلیوم مشاهده می شود. (IHC Staining x400)





شکل ۲- دیسپلازی متوسط دهانه رحم، ایمینوراکتیویته سلول‌های پوششی بصورت پراکنده محدود به لایه بازال در ۱/۳ تا ۲/۳ ضخامت اپی‌تلیوم سرویکس مشاهده می‌شود.



شکل ۳- دیسپلازی شدید دهانه رحم، ایمینوراکتیویته سلول‌های پوششی سرویکال در تمامی ضخامت اپی‌تلیوم سرویکس مشاهده می‌شود.

مطالعات متعدد به-عنوان فاکتورهای نشان‌دهنده درجات دیسپلازی دهانه رحم و سایر بافت‌های دارای پوشش سنگفرشی با دقت و صحت بیشتر از هیستولوژی شناخته شده اند (۲۰-۱۴).
 Ki67 با آنتی‌بادی شناخته شده MIB1 از آن جهت دارای اهمیت خاص در ارزیابی ضایعات انتراپی تلیال است که مشخص شده در تشخیص ضایعات سرطانی و بررسی فعالیت پرولیفراتیو در مرحله اولیه و پیشگویی سیر این ضایعات از اهمیت ویژه ای برخوردار است (۱۵). لودآلبررسی‌های کوکت و همکاران بروز افزایش نشانگر پرولیفراتیو Ki67 را متناسب با افزایش درجه دیسپلازی در ضایعات پیش‌سرطانی گردن رحم را به اثبات رسانده و نشان داده که میزان بروز فاکتور

بحث

ضایعات پیش سرطانی گردن رحم و CIN فاکتور خطر بالقوه سرطان مهاجم سرویکال است. رفتار و تغییرات بیولوژیک سرطان ایجاب می‌کند که بررسی و مطالعات بیشتر و دقیق‌تر جهت طبقه بندی و تعیین پیش‌آگهی این ضایعات انجام شود (۱۲). مطالعه بار و همکاران بر روی ۱۰۷ مورد ضایعه پیش بدخیم و بدخیم دهانه رحم نشان داد که ارتباط مستقیم بین میزان بروز Ki67 و شدت دیسپلازی سرویکال و میزان آلودگی با انواع ویروس پاپیلوما انسانی وجود دارد (۱۳).
 بیومارکرهای P16 و Ki67 نشانگرهای فعالیت پرولیفراتیو و مشخصات سیکل سلولی هستند که طی

محدودیت‌های مطالعه حاضر کم بودن موارد CIN در مراکز درمانی آموزشی به دلیل عدم پیگیری مناسب اکثر بیماران پس از مشاهده آزمون پاپ غیرطبیعی است. امیداست با انجام موارد بیشتر کولپوسکوپی پس از مشاهده آزمون پاپ اسمیر مشکوک و غیرطبیعی، ضایعات پیش‌سرطانی دهانه رحم در مراحل اولیه در موارد بیشتری تشخیص داده شود.

محدودیت دیگر مطالعه حاضر لزوم نظارت مستمر پاتولوژیست و تکنسین مسئول بر روش ایمنوهیستوشیمی در تمامی مراحل بود. زیرا این تکنیک حساس با کمترین غفلتی ممکن است موارد منفی و مثبت کاذب داشته باشد. با توجه به این مسئله احتیاط لازم در تمامی مراحل ایمنوهیستوشیمی مطالعه فوق انجام شد.

نتیجه‌گیری

بررسی مورفولوژیک معمول ضایعات پیش‌سرطانی دهانه رحم به روش H&E و تفاسیر متنوع آن نیازمند روش‌های کمکی قابل اعتمادتری جهت ارزیابی است و بررسی ایمنوهیستوشیمی این ضایعات با فاکتور پرولیفراتیو Ki67 تکنیک با ارزشی در افتراق و طبقه بندی ضایعات سرطانی داخل اپی‌تلیومی دهانه رحم است که انجام آن به ویژه در موارد عدم وجود اتفاق نظر آسیب شناسی، توصیه می‌شود.

تشکر و قدردانی

از زحمات سرکار خانم دکتر مریم شهریاری که در تدوین این مجموعه و سرکار خانم اکرم مشتاقی که در تایپ این مجموعه همکاری نمودند تشکر و قدردانی می‌شود.

پرولیفراتیو Ki67 می‌تواند بعنوان شاخصی حساس و اختصاصی در طبقه بندی ضایعات CIN مورد استفاده قرار گیرد (۱۶).

مطالعه حاضر به موازات موارد ذکر شده افزایش بروز نشانگر پرولیفراتیو Ki67 را با افزایش درجه دیسپلازی نشان داد و با افزایش میزان درگیری بافت سرویکس، شدت ایمنوراکتیویته هم افزایش داشت. این ارتباط مثبت در مطالعه والید و همکاران هم گزارش شده است (۱۷). همچنین در مطالعه ساها و همکاران هم ارتباط

مثبتی بین پرولیفراسیون و درجه سلولی و بروز نشانگر Ki67 گزارش شده است (۱۸). در پژوهش حاضر در موارد بافت طبیعی دهانه رحم و دیسپلازی خفیف یا درجه کم فعالیت پرولیفراتیو بروز نشانگر Ki67 منحصرأ محدود به لایه بازال و یاحداً کمتر یک سوم ضخامت اپی‌تلیوم سنگفرشی سرویکال بود در حالی که در موارد دیسپلازی با درجه بالا یا شدید بروز این نشانگر در دو سوم یا تمامی ضخامت اپی‌تلیوم مشاهده شد. گزارش‌های مطالعات دیگر هم حاکی از این است که بروز نشانگر Ki67 در سرطان سرویکس هم با فنوتیپ انوازیون و همچنین با شدت پرولیفراسیون سلولی ارتباط دارد (۱۹).

یافته‌های فوق ارتباط مستقیم بین درجه دیسپلازی دهانه رحم و میزان راکتیویته پوشش سنگفرشی و همچنین رابطه مستقیم میان درجه دیسپلازی و محل درگیری اپی‌تلیوم سرویکس را با نشانگر Ki67 نشان داد. برای رسیدن به نتایج قطعی‌تر، مطالعات بیشتر با تعداد موارد بیشتر در ضایعات پیش‌سرطانی سرویکس و در مراحل اولیه ته‌اجم پیشنهاد می‌شود. همچنین توصیه می‌شود مطالعاتی با استفاده از نشانگرهای ایمنوهیستوشیمی جهت پیشگویی پیشرفت بیماران با سرطان داخل اپی‌تلیومی سرویکس انجام شود.

منابع

1. Wright TC Jr, Denny L, Kuhn L, Pollack A, Lorincz A, HPV DNA testing of self-collected vaginal samples compared with cytologic screening to detect cervical cancer. JAMA. 2000 Jan 5;283(1):81-6.
2. Saslow D, Runowicz CD, Solomon D, Moscicki AB, Smith RA, Eyre HJ, et al. American Cancer Society guideline for the early detection of cervical neoplasia and cancer. CA Cancer J Clin 2002 Nov-Dec;52(6):342-62.

3. Crum CP. Symposium part1: Should the Bethesda System terminology be used in diagnostic surgical pathology?: Point. *Int J Gynecol Pathol* 2003 Jan;22(1):5-12.
4. Cuzick J, Arbyn M, Sankaranarayanan R, Tsu V, Ronco G, Mayrand MH, et al. Overview of human papillomavirus-based and other novel options for cervical cancer screening in developed and developed and developing countries. *Vaccine* 2008 Aug 19;26(Suppl 10): K29-41.
5. Goel MM, Mehrotra A, Singh U, Gupta HP, Misra JS. MIB-1 and PCNA immunostaining as a diagnostic adjunct to cervical pap smear. *Diagn Gytopathol* 2005 Jul;33(1):15-9.
6. Xue Y, Feng Y, Zhu G, Zhang X. Proliferative activity in cervical intraepithelial neoplasia and cervical carcinoma. *Chin Med J (Engl)* 1999 Apr;112(4):373-5.
7. Stoler MH, Schiffman M, Stoler MH, Schiffman M; Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance-Low-grade Squamous Intraepithelial Lesion Triage Study (ALTS) Group. Interobserver reproductibility of cervical cytologic and histologic interpretations: realistic estimates from the ASCUS-LSIL Triage Study. *JAMA* 2001 Mar 21;285(11):1500-5.
8. Meyer JS, Connor RE. In vitro labeling of solid tissues with tritiated thymidine for autoradiographic detection of S-phase nuclei. *Stain Technol* 1977 Jul;52(4):185-95.
9. Tjalma W, Weyler J, Pollefliet C, Bogers J, Van Marck E, Van Dam P, et al. The evaluation of proliferative activity in CIN III and microinvasive cervical cancer and its role in recurrence. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2001 Feb;94(2):270-5.
10. Lee KR, Sun D, Crum CP. Endocervical intraepithelial glandular atypia (dysplasia): a histopathologic, human papillomavirus, and MIB-1 analysis of 25 cases. *Hum Pathol* 2000 Jun;31(6):656-64.
11. Wang JL, Zheng BY, Li XD, Angstrom T, Lindstrom MS, Wallin KL. Predictive significance of the alterations of p16INK4A, p14ARF, p53, and proliferating cell nuclear antigen expression in the progression of cervical cancer. *Clin Cancer Res* 2004 Apr 1;10(7):2407-14.
12. Cuzick J, Mayrand MH, Ronco G, Snijders P, Wardle J. Chapter 10: New dimensions in cervical cancer screening. *Vaccine* 2006 Aug 31;24(Suppl 3):S3/90-7.
13. Bar JK, Harlozinska A, Sedlaczek P, Kasiak J, Markowska J. Relations between the expression of p53, c-erbB-2, Ki-67 and HPV infection in cervical carcinomas and cervical dysplasias. *Anticancer Res* 2001 Mar-Apr;21(2A):1001-6.
14. Beneder JL, Bender H, Jones H 3rd, Ngan HY, Pecorelli S. FIGO staging classifications and clinical practice guidelines in the management of gynecologic cancers. FIGO Committee on Gynecologic Oncology. *Int J Gynecol Obstet* 2000 Aug;70(2):209-62.
15. Sanchez-Rosales M, Osorio-Morales S, Diaz-Araujo F. [Evaluation of the immunohistochemical markers PCNA and MIB-1 in the diagnosis of low grade lesions of the uterine cervix]. [Article in Spanish]. *Invest Clin* 2004 Sep;45(3):213-20.
16. Kuo KT, Chang HC, Hsiao CH, Lin MC. Increased Ki-67 proliferative index and absence of P16INK4 in CIN-HPV related pathogenic pathways different from cervical squamous intraepithelial lesion. *Br J Ophthalmol* 2006 Jul;90(7):894-9.
17. al-Saleh W, Delvenne P, van den Brulet FA, Menard S, Boniver J, Castronovot V. Expression of the 67 KD laminin receptor in human cervical preneoplastic and neoplastic squamous epithelial lesions: an immunohistochemical study. *J Pathol* 1997 Mar;181(3):287-93.
18. Saha B, Chaiwun B, Tsao-Wei DD, Groshen SL, Naritoku WY, Atkinson RD, et al. Telomerase and markers of cellular proliferation are associated with the progression of cervical intraepithelial neoplasia lesion. *Int J Gynecol Pathol* 2007 Jul;26(3):214-22.
19. Pirog EC, Baergen RN, Soslow RA, Tam D, DeMattia AE, Chen YT, et al. Diagnostic accuracy of cervical low-grade squamous Intraepithelial lesions is improved with MIB-1 immunostaining. *Am J Surg Pathol* 2002 Jan;26(1):70-5.
20. Erfanian M, Sharifi N, Omid AA. [P63 and Ki67 expression in trophoblastic disease and sponotaneous abortion. [Article in Persian]. *JRMS* 2009 Sept-Oct;114(5): 23-32.