

# Гиперэкспрессия белка p16<sup>INK4a</sup> в эпителиальных клетках шейки матки и его значение в оценке риска формирования рака

Л.М. Захарцева, Е.П. Манжура, Г.В. Вакуленко, Е.А. Пекур, Л.В. Пак

Киевская городская онкологическая больница

Рак шейки матки (РШМ) является одной из наиболее частых опухолей у женщин. В структуре онкологической заболеваемости женщин в Украине он занимает пятое место, однако, в возрастной группе от 18 до 54 лет – второе место. Показатель заболеваемости РШМ в мире в среднем составляет 16 на 100 тыс. женского населения, в Украине показатель заболеваемости выше – 19,3 на 100 тыс. женского населения. В последние годы отмечен рост заболеваемости среди женщин в возрасте до 39 лет на фоне заметного снижения заболеваемости РШМ у женщин среднего и пожилого возраста. В Украине за период 1976–1996 гг. заболеваемость РШМ в возрастной группе до 29 лет выросла на 75%.

Среди причин смерти от онкологических заболеваний в Украине РШМ занимает шестое место. Показатель 5-летней выживаемости в Украине составляет 53,8, что на 20% ниже аналогичного показателя в США. Следует отметить, что в Украине 16,2% пациентов умерли в течение первого года после установления диагноза РШМ. Эти статистические показатели свидетельствуют о высокой актуальности проблемы РШМ в Украине, которая может быть решена не только путем ранней диагностики и повышения эффективности лечения, но и путем выявления и лечения предопухолевой патологии.

Большинство РШМ развиваются на базе дисплазий шейки матки (ШМ) (CIN – cervical intraepithelial neoplasia) [5]. Но не все CIN приводят к развитию рака, лишь небольшое количество их прогрессируют в инвазивную карциному [6–8]. Поэтому актуально выделение среди дисплазий случаев, относящихся к облигатному предраку. Разработка и внедрение в повседневную практику четких критериев оценки риска развития РШМ на стадии дисплазии позволит отобрать группу пациентов, нуждающихся в противоопухолевом лечении.

Разработка современных методов ранней диагностики предраковых заболеваний ШМ стала возможна благодаря изучению причин возникновения РШМ и основных этапов канцерогенеза. Рак развивается на фоне нарушения важнейших биологических механизмов, одним из которых является пролиферация. В процессе пролиферации принимают участие циклинзависимые киназы 4 и 6 (CDKs), которые в комплексе с циклином D1 (cyclin D1) фосфорилируют белок ретинобластомы (pRb). Это ведет к функциональной инактивации белка pRb и последующему высвобождению фактора транскрипции E2F – промотора клеточного деления [9]. Инактивация белка pRb и/или высвобождение E2F приводит к увеличению экспрессии белка p16<sup>INK4a</sup> – опухолевого супрессора, который ингибирует циклинзависимые киназы 4 и 6 («INK4a» означает «ингибитор киназы 4а»), что предотвращает новое деление клетки [15, 16, 21]. Таким образом, белок p16<sup>INK4a</sup> блокирует фосфорилирующую активность комплекса CDK4/6–Cyclin D и изменяет баланс между фосфорилированным (неактивным, не способным связать E2F) pRb и нефосфорилированным (функционально активным) pRb.

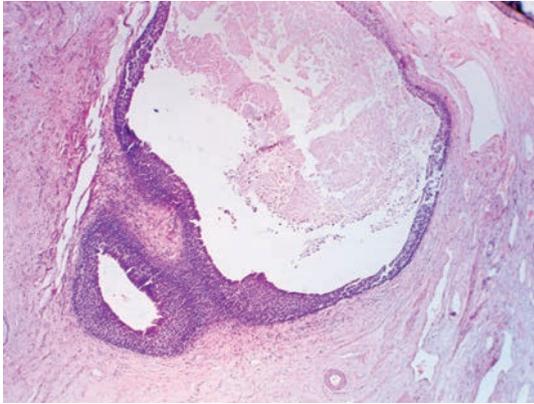
Белки высокоонкогенного вируса папилломы человека (HR-HPV) могут нарушать этот процесс. Высокоонкоген-

ные вирусы папилломы человека (HR-HPV) являются наиболее значимым фактором развития CIN и в дальнейшем РШМ [9–13, 19]. Инфицирование HR-HPV протекает скрыто и в большинстве случаев спонтанно излечивается в течение 6 мес [7]. Наиболее значимым событием в запуске большинства случаев CIN и в дальнейшем РШМ является встраивание генома HR-HPV в геном клетки хозяина. При этом происходит immortalization клеток хозяина и превращение их в опухолевые [9–14]. В ходе интеграции вируса нарушается функция фактора E2. Запускается гиперэкспрессия вирусных белков E6 и E7 и инактивация ими фактора p53 и белка pRb [15–19]. Инактивированный pRb провоцирует высвобождение фактора E2 – что позволяет клетке входить в новые и новые циклы деления. Одновременно по механизму обратной связи в клетке продуцируется большое количество белка p16<sup>INK4a</sup> [9, 15, 16, 20, 21].

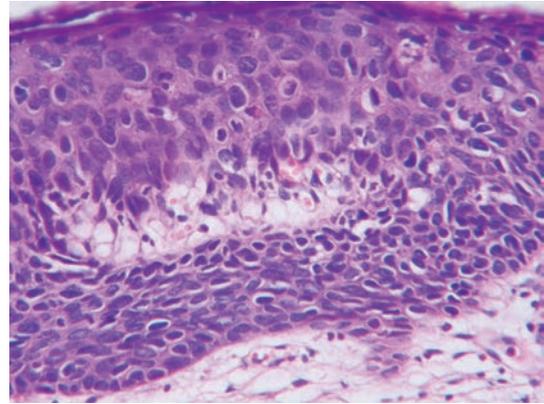
В некоторых популяциях инфицирование HR-HPV среди женщин молодого возраста составляет около 30%. Однако наличие у женщины HR-HPV-инфекции не всегда приводит к развитию РШМ. Эта инфекция зачастую исчезает спонтанно. Поэтому серологические тесты, выявляющие HR-HPV в крови (в частности, Digene Hybrid Capture 2, HC2), не могут среди инфицированных женщин определить тех, кто находится в группе риска развития РШМ [27, 28]. Выявление гиперэкспрессии белка p16<sup>INK4a</sup> выявляют на гистологических срезах биопсии ткани ШМ с помощью иммуногистохимического метода. В эпителиальных клетках, не участвующих в процессе формирования рака, белок p16<sup>INK4a</sup> экспрессируется в небольшом количестве и не определяется с помощью иммуногистохимического метода. Гиперэкспрессия белка p16<sup>INK4a</sup> в дисплазированном эпителии ШМ и отсутствие этого белка (в количествах, доступных определению) в нормальном или реактивно измененном (например, вследствие воспалительных процессов) эпителии ШМ позволяет рассматривать p16<sup>INK4a</sup> как суррогатный маркер опухолевой активности HR-HPV [16, 18, 21–26]. Следует отметить, что в ряде случаев у женщин с CIN не обнаруживается HR-HPV. Негативный результат тестирования на HPV может быть обусловлен как техническими ошибками теста, так и персистенцией ДНК вируса в клетке ШМ. В ходе исследования J. Ordi и соавторов установлено, что у всех пациенток с HR-HPV-/CIN2/3, а также у 4% пациенток со статусом HR-HPV-/CIN1 отмечена гиперэкспрессия p16<sup>INK4a</sup>, несмотря на отсутствие выявления вируса в серологических пробах [29].

Экспрессия белка p16<sup>INK4a</sup> в клетках дисплазированного эпителия позволяет выявить женщин с высоким риском развития РШМ среди пациенток с воспалительными и другими процессами в ШМ [25, 31–33]. По данным J. Hariri и A. Oster (2007), у 36% женщин с CIN1/p16+ и у 4% с CIN1/p16 – наблюдалась развитие в дальнейшем CIN2–3 [34]. Negri и соавторы установили, что уровень прогрессии CIN1 в CIN3 составил 62,2% у пациенток p16+ и 28,6% – у пациенток p16– [25].

Существует достоверная связь между гиперэкспрессией маркера p16<sup>INK4a</sup> и выраженностью неоплазий ШМ. В иссле-



**Рис. 1а.** Тяжелая дисплазия поверхностного эпителия шейки матки, окраска гематоксилин-эозином, увеличение х400

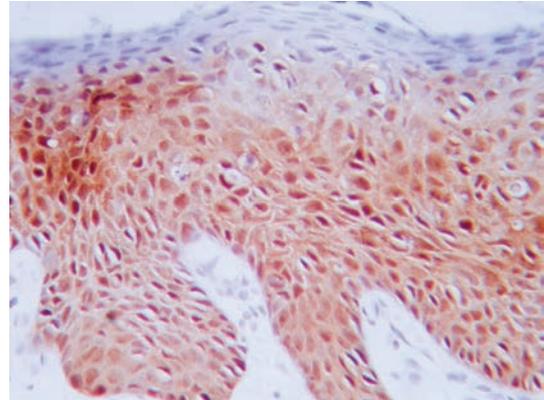


**Рис. 1б.** Распространенные участки плоскоклеточной метаплазии резервноклеточного эпителия желез ШМ с признаками тяжелой дисплазии, окраска гематоксилин-эозином, увеличение х40.

дованиях J.Nariri и A.Oster у 71% пациенток с диагнозом CIN1 и у 100% пациенток с CIN2–3 выявляли гиперэкспрессию p16<sup>INK4a</sup> [34]. Это сочетается с более ранними исследованиями Negri и соавторов и Klaes и соавторов, которые выявили гиперэкспрессию p16<sup>INK4a</sup> во всех случаях тяжелых неоплазий и в большинстве случаев легких [16, 25]. По данным Makiko Omori и соавторов, в 60% случаев CIN1, 87% – CIN2, в 100% – CIN3 и плоскоклеточной карциномы выявлена гиперэкспрессия белка p16 [35]. В случаях CIN1 гиперэкспрессия p16<sup>INK4a</sup> отмечается в 30–60% [8, 16, 18, 21, 23, 37–44]. Эти данные расходятся с результатами G. Volgareva и соавторов, которые выявили лишь фокальную экспрессию p16<sup>INK4a</sup> в 14% случаев CIN1, слабую экспрессию в 32% случаев CIN2; в 1/3 случаев CIN3 не установлена экспрессия белка p16<sup>INK4a</sup> и лишь в 12 из 24 случаев CIN3 отмечена слабая экспрессия белка p16<sup>INK4a</sup> [45].

Отмечается достоверная корреляция между уровнем гиперэкспрессии белка p16<sup>INK4a</sup> и положительной реакцией на HR-HPV [35]. Пациентки с CIN2 гиперэкспрессией белка p16<sup>INK4a</sup> и наличием HR-HPV+ находятся в группе высокого риска развития РШМ. Учет дополнительных характеристик (иммуногистохимическое исследование CK17, p63, VEGF-C, Ki67, CDC6, MCM5, исследование HPV-статуса с помощью методик *in situ* гибридизации и других) позволяет с еще большей достоверностью прогнозировать развитие РШМ [36, 44, 46, 47, 49].

Существуют различные методики оценки результатов иммуногистохимического окрашивания клеток. По методике Klaes и соавторов выделяют спорадическое (изолированные позитивные клетки, менее 5%), фокальное (небольшие скопления клеток, но не более 25%) и диффузное окрашивание (более 25% позитивных клеток) [16]. Makiko Omori и соавторы классифицируют окрашивание на 4 категории: негативное (менее 1% позитивных клеток), слабое (слабое окрашивание ядер и цитоплазмы), умеренное (умеренное окрашивание ядер и слабое – цитоплазмы) и сильное (сильное окрашивание ядер и цитоплазмы), кроме того, учитывали отношение толщины p16+ пласта к общей толщине эпителия [35]. Однако дальнейшие исследования не выявили различий в прогнозе у пациенток с негативной и слабопозитивной реакцией. По рекомендациям производителя тест-системы p16<sup>INK4a</sup> (CINtec®Histology kit, mtm laboratories AG, Germany), только диффузное окрашивание клеток оценивается как гиперэкспрессию p16<sup>INK4a</sup> [16, 18, 37]. Можно предположить, что окрашивание отдельных клеток и их скоплений (или только цитоплазматическое окрашивание) не оказывает существенного влияния на прогноз CIN и может считаться негативной реакцией теста. Диффузное окрашивание



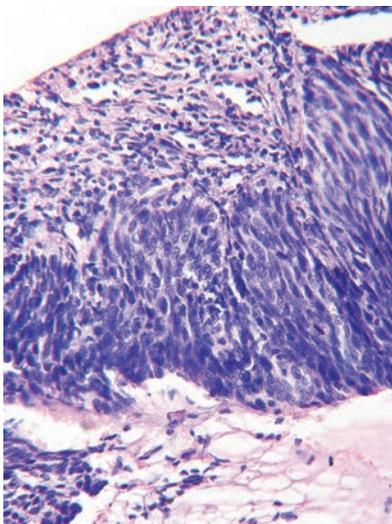
**Рис. 1с, 1д.** Позитивная реакция на p16 – как в поверхностном эпителии, так и в метаплазированных железах, увеличение соответственно х400, х40

клеток базального и/или парабазального слоев или окрашивание всего эпителиального пласта большинством исследователей связывают с достоверной прогрессией CIN в РШМ.

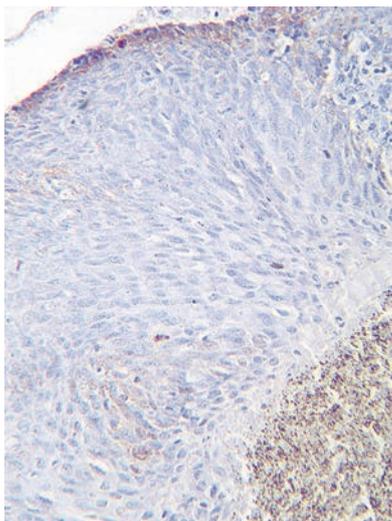
Таким образом, исследование гиперэкспрессии белка p16 может помочь оценить степень риска развития РШМ.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

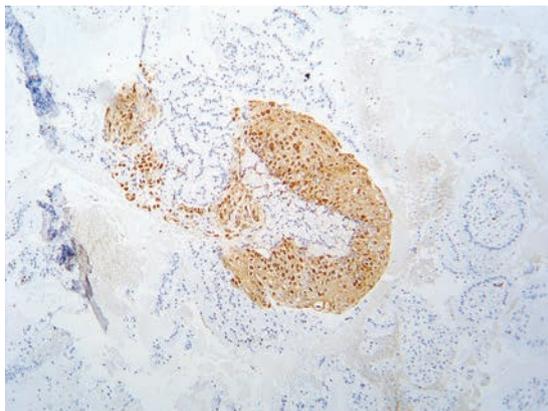
На базе Киевской городской онкологической больницы нами было исследовано 28 пациенток в возрасте 18–58 лет (медиана возраста 34,64 года). Для исследования использо-



**Рис. 2а.** В материале биопсии – участок многослойного плоского эпителия с нарушенной стратификацией, гиперхромными ядрами, воспалительная инфильтрация подлежащих тканей. Окраска гематоксилин-эозином, увеличение  $\times 400$



**Рис. 2b.** Негативная реакция на белок p16 в указанном фрагменте ткани, увеличение  $\times 400$



**Рис. 3.** Единичный микроскопический фрагмент многослойного плоского эпителия в материале соскоба – положительная реакция на p16, увеличение  $\times 400$

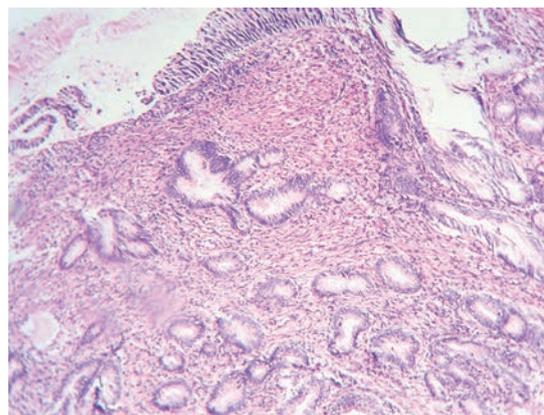
вали материал биопсии ШМ, деконизации ШМ и соскобов из канала ШМ. Гистологическое исследование проводили на срезах, окрашенных гематоксилин-эозином и иммуногистохимическим методом. Для иммуногистохимического исследования экспрессии белка p16<sup>INK4a</sup> использовали тест-систему CINtec®Histology kit (mtm laboratories AG, Germany) на основе мышиного моноклонального антитела (клон Е6Н4) против человеческого белка p16<sup>INK4a</sup>, система визуализации EnVision+ (DAKO).

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

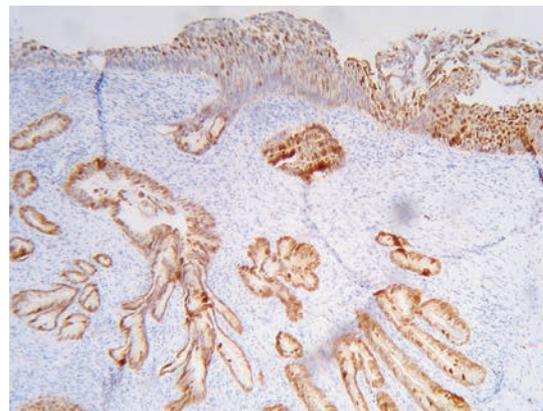
Среди 28 обследованных пациенток нами было выявлено 22 случая экспрессии белка p16<sup>INK4a</sup>, что позволило уточнить диагноз. Ниже приведены наиболее показательные случаи из собственных наблюдений.

**Наблюдение 1.** Женщина, 41 год. Находится под наблюдением онкогинеколога по поводу дисплазии ШМ. В 2008 г. выявлена CIN3 с койлоцитарной атипией. Была отмечена выраженная положительная реакция на белок p16<sup>INK4a</sup> (рис. 1с, 1d). В 2009 г. у пациентки обнаружен плоскоклеточный Ca in situ (рис 1а, 1b).

**Наблюдение 2.** Женщина, 27 лет. В анамнезе была выявлена HPV-инфекция 16-го типа, по поводу которой пациентка успешно прошла лечение. На момент исследования у нее



**Рис. 4а.** Участок ШМ, покрытый дисплазированным многослойным плоским эпителием, в глубоких отделах – железы ШМ с признаками дисплазии, гематоксилин-эозин, увеличение  $\times 200$



**Рис. 4б.** Положительная реакция на p16 в поверхностном плоском эпителии и железах (без признаков плоскоклеточной метаплазии) – CIN 3 в сочетании с CGIN,  $\times 200$

обнаружено инфицирование гарднереллой. Проведена биопсия ШМ. В гистологическом препарате – CIN3 и диффузная воспалительная инфильтрация подлежащей стромы (рис. 2а). По данным обследования экспрессия белка p16 не обнаружена и дано заключение: тяжелая дисплазия эпителия ШМ воспалительной природы (рис. 2б).

**Наблюдение 3.** Женщина, 40 лет. Во время профилактического осмотра выявлена дисплазия ШМ. По результатам лабораторного исследования крови HPV-инфекция (методом полимеразной цепной реакции – ПЦР) не обнаружена. Проведено раздельное диагностическое выскабливание, в материале которого обнаружены участки CIN2, а также гиперэкспрессия белка p16. В дальнейшем после деконизации ШМ выявлена тяжелая дисплазия эпителия ШМ.

**Наблюдение 4.** Женщина, 55 лет. В течение 5 лет у пациентки неоднократно выявляли HPV. Дважды проходила противовирусное и антибактериальное лечение. В настоящее время клинический диагноз «плоскоклеточный Ca in situ». Выполнена деконизация ШМ. Гистологический диагноз: CIN3 с участками плоскоклеточного Ca in situ, отмечается гиперэкспрессия белка p16 в виде диффузного окрашивания в измененном плоском эпителии и в отдельных железах (без признаков плоскоклеточной метаплазии).

### ВЫВОДЫ

Белок p16<sup>INK4a</sup> является достоверным и надежным маркером оценки риска развития РШМ при исследовании биопсий ШМ с признаками CIN разной стадии. Использование в повседневной практике тестов, изучающих гиперэкспрессию белка p16<sup>INK4a</sup>, позволит выявить и пролечить женщин с предраковой патологией, что даст возможность снизить заболеваемость РШМ.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Stoler MH, and Schiffman M. Interobserver reproducibility of cervical cytologic and histologic interpretations. *JAMA* 2001, 285:1500–5.
2. McCluggage WG, Walsh MY, Thornton CM, et al. Inter- and intra-observer variation in the histopathological reporting of intraepithelial lesions using a modified Bethesda grading system. *Br J Obstet Gynaecol* 1998, 105:206–10.
3. Ismail SM, Colclough AB; Dinnen JS, et al. Reporting cervical intraepithelial neoplasia (CIN): intra- and interpathologist variation and factors associated with disagreement. *Histopathology* 1990, 16:371–6.
4. De Vet HCW, Knipschild PG, Schouten HJA, et al. Interobserver variation in histopathological grading of cervical dysplasia. *J Clin Epidemiol* 1990, 43:1395–8.
5. El Hamidi A, Kocjan G, Du MQ. Clonality analysis of archival cervical smears: correlation of monoclonality with grade and clinical behavior of cervical intraepithelial neoplasia. *Acta Cytol.* 2003;47:117–123.
6. Schneider V. CIN prognostication: will molecular techniques do the trick?. *Acta Cytol.* 2003;47:115–116.
7. Wang SS, Trunk M, Schiffman, et al. Validation of p16INK4a as marker of

8. cers. *Biochim Biophys Acta.* 1996 Oct 9;1288(2):F55–78.
14. HPV types natural history and epidemiology: in clinical proceedings, March 2000, Association of Reproductive Health Professionals. Available at: (www.arhp.org). Accessed January 2006.
15. Kheif SN, DeGregory J, Yee C, et al. 1996. Inhibition of cyclin D-CDK4/CDK6 activity is associated with an E2F-mediated induction of cyclin kinase inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93:4350–4354.
16. Klaes R, Friedrich T, Spitkovsky D, et al. Overexpression of p16(INK4A) as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int J Cancer.* 2001 Apr 15;92(2):276–84.
17. Sano T; Oyama T; Kashiwbara K; et al. Immunohistochemical overexpression of p16 protein associated with intact retinoblastoma protein expression in cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasia. *Pathol Int.* 1998, 48:580–585.
18. Klaes R, Benner A, Friedrich T, et al. p16INK4a immunohistochemistry improves interobserver agreement in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Surg Pathol.* 2002 Nov;26(11):1389–99.
19. Bosch FX, Lorincz A, Mucoz N, et al. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol* 2002;55:244–265.
20. Pientong C, Ekalaksananan T, et al. Immunohistochemical staining of p16INK4a protein from conventional Pap test and its association with human papillomavirus infection. *Diagn Cytopathol* 2004;31:235–42.
21. Sano T, Oyama T, Kashiwbara K, Fukuda T, Nakajima T. Expression status of p16 protein is associated with human papillomavirus oncogenic potential in cervical and genital lesions. *Am J Pathol.* 1998;153:1741–1748.
22. Murphy N, Ring M, Heffron CC, et al. p16INK4A, CDC6, and MCM5: predictive biomarkers in cervical preinvasive neoplasia and cervical cancer. *J Clin Pathol* 2005;58:525–534.
23. Agoff N, Lin P, Morihara J, et al. p16INK4a expression correlates with degree of cervical neoplasia: a comparison with Ki-67 expression and detection of high-risk HPV types. *Mod Pathol* 2003;16(7):665–673.
24. Murphy N, Ring M, Killalea AG, et al. p16INK4A as a marker for cervical dysplasia: CIN and cGIN in cervical biopsies and ThinPrep smears. *J Clin Pathol* 2003;56:53–63.
25. Negri G, Vittadello F, Romano F, et al. p16INK4a expression and progression risk of low-grade intraepithelial neoplasia of the cervix uteri. *Virchows Arch.* 2004;445:616–620.
26. Dray M, Russell P, Dalrymple C, Wallman N, Angus G, Leong A, Carter J, Cheerala B: p16(INK4a) as a complementary marker of high-grade intraepithelial lesions of the uterine cervix. I: Experience with squamous lesions in 189 consecutive cervical biopsies. *Pathology* 2005, 37(2):112–124.
27. Ordi J, Puig-Tintore LM, Torne A, et al. Contribution of high risk human papillomavirus testing to the management of premalignant and malignant lesions of the uterine cervix. *Med Clin (Barcelona)* 2003;121:441–5.
29. Ordi J, Garcia S, Marta del Pino, et al. p16INK4a Immunostaining identifies occult CIN Lesions in HPV-positive women. *Int JGynecol Path* 2008;28:90–97.
28. Ordi J, Alonso I, Torne A, et al. Human papillomavirus load in Hybrid Capture II assay: does increasing the cutoff improve the test? *Gynecol Oncol* 2005;99:313–9.
30. Ma L, Fisk JM, Zhang RR, et al. Eosinophilic dysplasia of the cervix: a newly recognized variant of cervical squamous intraepithelial neoplasia. *Am J Surg Pathol* 2004;28:1474–84.
31. Klaes R, Benner A, Friedrich T, et al. p16INK4a immunohistochemistry improves interobserver agreement in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Surg Pathol* 2002;26:1389–99.
32. del Pino M, Garcia S, Fustñ V, Alonso I, et al. Value of p16(INK4a) as a marker of progression/regression in cervical intraepithelial neoplasia grade 1. *Am J Obstet Gynecol.* 2009 Nov;201(5):488.e1-7.
33. Redman R, Ruffony I; Liu C, et al. The utility of p16ink4a in discriminating between cervical intraepithelial neoplasia 1 and nonneoplastic equivocal lesions of the cervix. *Arch Pathol Lab Med.* 2008;132:795–799.
34. Hariri, Jalil M.D.; Wlster, Anne M.Sc., Ph.D. The negative predictive value of p16INK4a to assess the outcome of cervical intraepithelial neoplasia 1 in the uterine cervix. *Int J Gynecol Pathol* 2007;26:223–228.
35. Omori M, Hashi A, Nakazawa K, Yuminamochi T, et al. Estimation of prognoses for cervical intraepithelial neoplasia 2 by p16INK4a immunorepression and high-risk HPV in situ hybridization signal types. *Am J Clin Pathol.* 2007 Aug;128(2):208–17.
36. Wang SS, Trunk M, Schiffman M, et al. Validation of p16INK4a as a marker of oncogenic human papillomavirus infection in cervical biopsies from a population-based cohort in Costa Rica. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004, 13:1355–60.
37. Negri G, Egarter-Vigl E, Kasal A, et al. p16INK4a is a useful marker for the

- diagnosis of adenocarcinoma of the cervix uteri and its precursors: an immunohistochemical study with immunocytochemical correlations. *Am J Surg Pathol* 2003; 27:187–93.
38. Schorge JO, Lea JS, Elias KJ, et al. P16 as a molecular biomarker of cervical adenocarcinoma. *Am J Obstet Gynecol* 2004;190:668–73.
39. Christal L, and Valente T. The utility of p16 immunohistochemistry in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. *Pathology Case Reviews* 2006, 11 no.3:117.
40. Kong CS, Balzer BL, Troxell ML, et al. p16INK4A immunohistochemistry is superior to HPV in situ hybridization for the detection of high-risk HPV in atypical squamous metaplasia. *Am J Surg Pathol* 2007;31:33–43.
41. Nucci MR, and Crum CP. Redefining Early Cervical Neoplasia: Recent Progress. *Adv Anat Pathol* 2007, 14:1–10.
42. Ishikawa M, Fujii T, Saito M, Nindl I, et al. Overexpression of p16INK4a as an indicator for human papillomavirus oncogenic activity in cervical squamous neoplasia. *Int J Gynecol Cancer* 2006, 16: 347–353.
43. Ansari-Lari MA, Staebler A, Zaino RJ, Shah KV, and Ronnett BM. Distinction of endocervical and endometrial adenocarcinomas: immunohistochemical p16 expression correlated with human Papillomavirus (HPV) DNA detection. *Am J Surg Pathol* 2004, 28: 160–167.
44. Regauer S, Reich O. CK17 and p16 expression patterns distinguish (atypical) immature squamous metaplasia from high-grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN III). *Histopathology*. 2007 April 1; 50(5): 629–635.
45. Volgareva G, Zavalishina L, Andreeva Y, et al. Protein p16 as a marker of dysplastic and neoplastic alterations in cervical epithelial cells. *BMC Cancer*. 2004; 4: 58.
46. Branca M, Giorgi C, Santini D, et al. Aberrant expression of VEGF-C is related to grade of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) and high risk HPV, but does not predict virus clearance after treatment of CIN or prognosis of cervical cancer. *J Clin Pathol* 2006 59: 40–47.
47. Iaconis L, Hyjek, Lora H. Ellenson LH, et al. p16 and Ki-67 Immunostaining in Atypical Immature Squamous Metaplasia of the Uterine Cervix Correlation With Human Papillomavirus Detection. *Arch Pathol Lab Med*. 2007;131: 1343–1349.
48. Murphy N, Ring M, Killalea AG, et al. p16INK4A as a marker for cervical dyskaryosis: CIN and cGIN in cervical biopsies and ThinPrep™ smears. *J Clin Pathol* 2003;56:56–63.
49. Murphy N, Ring M, Heffron CCBB. p16INK4A, CDC6, and MCM5: predictive biomarkers in cervical preinvasive neoplasia and cervical cancer. *J Clin Pathol* 2005;58: 525–534.
50. Fletcher CDM 2000 *Diagnostic Histopathology of Tumors*, Churchill Livingstone, London, p 687–688.
51. Kurian K, Al-Nafussi A. Relation of cervical glandular intraepithelial neoplasia to microinvasive and invasive adenocarcinoma of the uterine cervix: a study of 121 cases. *J Clin Pathol* 1999;52:112–117.
52. Kumar G, Hourell R. Cervical glandular neoplasia. *The Obstetrician and Gynaecologist* 2000;2(1):43–45.