

İN SITU HİBRİDİZASYON YÖNTEMİ İLE MESANENİN DEĞİŞİCİ EPİTEL HÜCRELİ KARSİNOMLARINDA HPV TARAMASI

Dr. Handan KAYA, Dr. Esin KOTİLOĞLU, Öğr. Gör. Gülsün EKİCİOĞLU, Dr. Süheyla Uyar BOZKURT, Dr. Sevgi KÜLLÜ

ÖZET: Son yıllarda yapılan çalışmalarda mesanenin değişici epitel hücreli karsinomlarının etyolojisinde insan papilloma virüsü (HPV) suçlanmaktadır. Bu çalışmanın amacı mesanenin değişici epitel hücreli karsinomlarında HPV DNA varlığını sorgulamanın yanısıra, HPV DNA varlığı ile tümörün diferansiasyon derecesi ve yayılımı arasındaki ilişkiyi araştırmaktır. Otuz değişici epitel hücreli karsinom olgusunun parafin doku kesitlerine in situ hibridizasyon yöntemiyle HPV DNA probu uygulanmıştır. Çalışmanın sonucunda %3,3 (1/30) oranında HPV DNA'sı saptanmıştır. Sonuçlar HPV DNA varlığı ile mesane karsinomlarında malignite gelişimi arasında önemli bir ilişki olmadığını düşündürmektedir.

ANAHTAR KELİMELEER: HPV DNA, mesane, değişici epitel hücreli karsinom.

SUMMARY: DETECTION OF HPV IN THE TRANSITIONAL CELL CARCINOMA OF THE URINARY BLADDER USING IN SITU HYBRIDIZATION. Recently published data have suggested a link between active human papillomavirus (HPV) infection and the development of bladder cancer. The aim of our study was to detect HPV DNA in of transitional cell carcinomas of the urinary bladder. We analysed a series of 30 formalin-fixed, paraffin-embedded transitional cell carcinomas of the urinary bladder for the presence of HPV DNA by using in situ hybridization technique. HPV DNA was detected in %3,3 (1/30) of the cases. Our results suggest that HPV DNA may play a minor role in the transitional cell carcinoma development in the urinary bladder.

KEY WORDS: HPV DNA, transitional cell carcinoma, urinary bladder.

GİRİŞ

Mesanenin değişici epitel hücreli karsinomları üriner sistemin sık görülen kanserlerinden olup sıklığı giderek artmaktadır. Etiyolojisi hala tartışmalı olan bu karsinomlarda, çok sayıda karsinojenik ajan suçlanmakta, bunlar arasında aromatik aminler, sigara, paraziter enfeksiyonlar yer almaktadır (1).

İnsan papilloma virüsü (HPV) 60 dan fazla genotipi bulunan heterojen bir DNA virüsüdür. Kondiloma Akuminatum ile HPV ilişkisi bilinmektedir. Serviksin displazi ve invaziv karsinomlarında %75-100 oranında HPV varlığı gösterilmiştir (2). HPV tip 6 ve 11 benign kondilomlarda izlenirken, anogenital karsinomlarda HPV tip 16 ve 18'in varlığı gösterilmiştir (3). Ancak HPV varlığı ile mesane karsinomunun ilişkisi henüz tam olarak aydınlatılamamıştır.

İn Situ Hibridizasyon (ISH) moleküler biyolojik bir yöntem olup, dokuda genlerin izole edilmesinin yanısıra virüs ve diğer mikroorganizmaların tanımlanmasını da sağlar. Bu yöntem ile dokudaki HPV DNA varlığı ve lokalizasyonu gösterilebilir (4).

Bu çalışmanın amacı mesanenin değişici epitel hücreli karsinomlarında HPV DNA varlığını sorgulamanın yanısıra, HPV DNA ekspresyonu ile tümör diferansiasyon derecesi ve yayılımı arasındaki ilişkiyi araştırmaktır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda 1992-1996 yılları arasında 30 mesane değişici epitel hücreli karsinomu olgusunun parafin doku kesitlerinde in situ hibridizasyon yöntemiyle HPV DNA (Kreatech hkd 38000), HPV DNA pozitif olguların subtiplemesi için ise HPV 6/11, 16/18, 31/33 problemleri (Biogenex hk863-2k and supersensiti- ve ISH detection system Biogenex 230-ss) kullanılmıştır.

ISH Yöntemi:

Olgulara ait uygun lamaların seçiminden sonra her olgu için seçilen parafin bloktan 5µ kalınlığında organosilane kaplı lamlara seri kesit alınmıştır. Kesitlerin ksilen ve dereceli al-

kollerde deparafinizasyonunu takiben 37°C'de 30 dakika pepsin ile proteinlerin degradasyonu, %70, 95, 100'lük alkol-lerden geçirilerek dehidratasyon gerçekleştirilmiştir.

Hibridizasyon: Tüm lamlara damlatılan probe, 95°C'de 5 dakika tutulmuş ve hibridizasyon gerçekleştirilmiştir. Daha sonra hücrelerin nemli ortamda 37°C'de 14 saat tutularak hücrelerin hibridizasyonu tamamlaması beklenmiştir.

Pozitif kontrol dışındakiler, differansiasyon reaktanı ile 15 dakika 37°C'de işlem görmüştür.

İmmünohistokimyasal İşlem:

Alkalen fosfataz konjuge ve digoksigenin ile hibridizasyonu gerçekleştirmiş oligonükleotidlerin işaretlenmesi NBT/BCIP ile 37°C'de 5-20 dakika mikroskop altında kontrol edilerek sinyaller görülür hale getirilmiştir. TBS ile 1 dakika yıkamayı takiben, Mayer hematoksilin ile zıt boyama uygulanmış ve su bazlı kapama maddesi ile kapatılmıştır.

BULGULAR

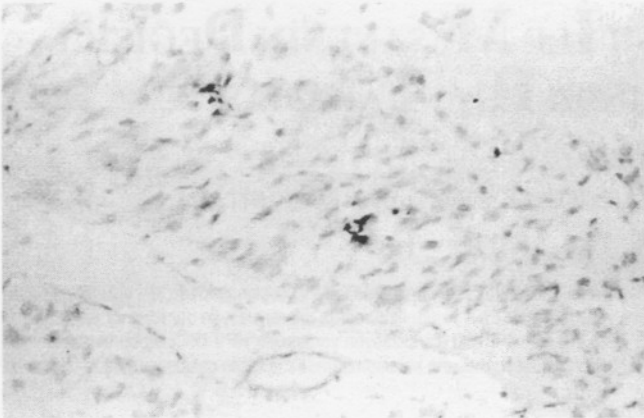
Olguların diferansiasyon derecelerine ve evrelerine göre dağılımı Tablo 1'de gösterilmiştir.

30 olgunun birinde (%3,3) HPV DNA ekspresyonu izlenmiştir (Resim 1).

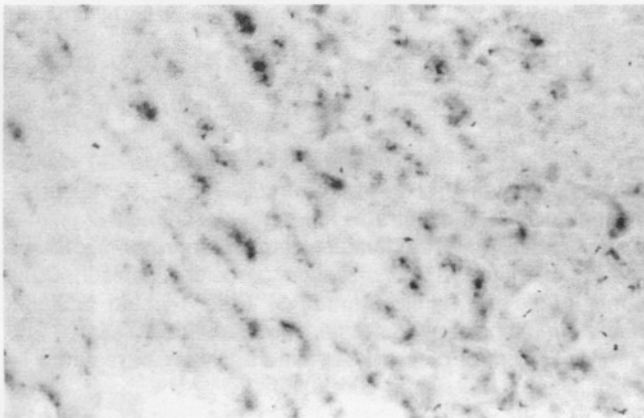
Çalışmada pozitif kontrol olarak anal kondiloma akumina- tum olgusu alınmış ve HPV DNA varlığı izlenmiştir (Resim 2).

TARTIŞMA

Üriner sistemin sık görülen kanserlerinden olan mesanenin değişici epitel hücreli karsinomlarının etyolojisi hala tartışmalıdır. Etiyolojide suçlanan ajanlar arasında aromatik aminler, sigara, parazitik enfeksiyonlar yer alırken HPV'nin etkisi henüz açıklık kazanmamıştır. Literatürde mesane karsinomlarında %81 oranında HPV DNA'sı saptayan çalışmanın yanısıra, hiçbir olguda HPV DNA'sı saptanamamış olan yayınlar dikkati çekmektedir (5-9). Bizim çalışmamızda ise %3,3 (1/30) oranında HPV DNA'sı saptanmıştır. Sonuçların değişkenliğinden HPV DNA'sını göstermede uygulanan yöntemlerin farklılığı sorumlu tutulabilir. Ancak farklı sensitivite- de yöntemlerin karşılaştırıldığı bir çalışmada olduğu gibi,



Resim 1: Mesanenin değişici epitel hücreli karsinomunda HPV DNA varlığı (NBT/BCIP x200).



Resim 2: Pozitif kontrol, anal kondiloma akümünatum lezyonunda HPV DNA varlığı (NBT/BCIP x400).

Türk toplumunda hibrid yakalama (hybrid capture) yöntemi ile yapılan bir çalışmada da mesane tümörlerinde HPV DNA varlığı saptanamamıştır (10,11). Bu çalışmanın sonucu da bizim çalışmamızın sonuçları ile paralellik göstermekte ve farklı yöntemler arasında da önemli bir sonuç farklılığı olmadığını desteklemektedir.

İmmün yetmezlik durumunda, HPV DNA'sının karsinomlarda fırsatçı enfeksiyon olarak bulunabileceği düşünülebilir. de literatürde bu konuda yapılan çalışmaların sonucu çelişkilidir. Noel ve ark.'ı HPV DNA'sı saptadıkları iki olguda immün yetmezlik bulunduğunu bildirmişlerdir (12). Ancak bu birliktelik diğer çalışmalarda izlenmemiştir (13-15). Bizim çalışmamızda da HPV DNA pozitifliği saptanan hastada genital kondilom ve/veya immün yetmezlik bulunmamaktadır.

HPV DNA varlığının, mesanenin değişici epitel hücreli karsinomlarında karsinogeneze gelişimindeki rolünü sorgulayan yayınlarda erken evre tümörlerde HPV DNA'sının gösterilmesi anlamlı bulunmuştur (15). Öte yandan Shibutani ve ark.'ı neoplazi bulunmayan yalnızca inflamasyonun bulunduğu bir olguda da HPV DNA'yı göstermiştir (16). Kerley ve ark. 27 mesane tümörünü kapsayan bir çalışmada, 1 invaziv skuamöz karsinomda HPV DNA'yı göstermişlerdir (17). Munoz ve ark.'ı ise yüksek dereceli ileri evre tümörlerde HPV DNA varlığını yüksek oranda (%71.44) gözlemişlerdir (10). HPV

TABLO 1: OLGULARIN DİFERANSİYASYON DERECELERİ VE EVRELERİ

	pTa	pT1	pT2	pT3
Grade I	8	3	-	-
Grade II	7	4	-	-
Grade III	-	3	2	3

subtipi ile evre ilişkisini araştıran çalışmalarda ise tip 16,18, 33'ün ileri evre tümörlerde varlığı dikkati çekmiştir (5,10). Bizim çalışmamızda da HPV DNA pozitifliği saptanan olgu ileri evre olup HPV subtip 31/33 saptanmıştır. Ancak çalışmamızda HPV DNA pozitifliği saptanan tek olgu bulunması nedeniyle HPV'nin mesanenin değişici epitel karsinomlarında prognoza etkisine ilişkin yorum yapılamamıştır.

Sonuçlar HPV DNA varlığı ile mesane karsinomlarında malignite gelişimi arasında önemli bir ilişki olmadığını düşündürmektedir.

Bu çalışma Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Vakfı tarafından desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

- Mallone WF, Kelloff GJ, Pierson H and Greenwald P: Chemoprevention of bladder cancer. *Cancer* (3 Suppl) 1987; 60: 650-657.
- Kumar V, Cotran R, Robbins S. *Cervix In: Kumar V, Cotran R, Robbins (eds). Basic Pathology. Philadelphia: W.B. Saunders, 1997; 5: 611-615.*
- Arends MJ, Wyllie AH, Bird CC. Papillomavirus and human cancer. *Human Pathol* 1990; 21(7): 686-697.
- De Ellis RA. In situ hybridization techniques for the analysis of gene expression: application in tumor pathology. *Hum Pathol* 1994; 25: 580-585.
- Anwar K, Phil M, Naki H, Nakakuki K, Inuzuka M. High frequency of Human Papilloma Virus infection in carcinoma of the urinary bladder. *Cancer* 1992; 70: 1967-73.
- Chang F, Lipponen P, Tervahauta A, Syrjänen S, Syrjänen K. Transitional cell carcinoma of the bladder: Failure to demonstrate Human Papilloma Virus deoxyribonucleic acid by in situ hybridization and polymerase chain reaction. *J Urol* 1994; 152: 1429-1433.
- Maloney KE, Wiener JS, Walther PH. Oncogenic Human Papilloma Viruses are rarely associated with squamous cell carcinomas of the bladder: Evaluation by differential polymerase chain reaction. *J Urol* 1994; 154: 360-364.
- Aynaud O, Tranbaloc P, Gerad O. Lack of evidence for a role of Human Papilloma Viruses in transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol* 1998; 159: 86-90.
- Kamel D, Paakko P, Pöllänen R, Vahakangas K, Lehto V, Soini Y. Human Papillomavirus DNA and abnormal p53 expression in carcinoma of the urinary bladder. *APMIS* 1995; 103: 331-338.
- Beltran AL, Munoz E. Transitional cell carcinoma of the bladder: Low incidence of Human Papilloma Virus DNA detected by the polymerase chain reaction and in situ hybridization. *Histopathology* 1995; 26: 565-569.
- Güney Aİ, Mougin C, Marquet CS, İnce Ü, Çirakoğlu B. Failure to detect Human Papilloma Virus DNA by in situ hybridization, hybrid capture system and polymerase chain reaction in transitional cell carcinoma of the bladder (Abst) *Cancer Detection and Prevention* 1996; 20(5): 421.
- Noel JC, Peny MO, Thiry L, Sattar AA, Verhest A, Schulman CC, Deschepper N, Haot J. Transitional cell carcinoma of the bladder: evaluation of the role of Human Papilloma Viruses. *Urology* 1994; 44(5): 671-675.
- Bishop JW, Emanuel JM, Sims KL. Disseminated mucosal papilloma/condyloma secondary to Human Papilloma Virus. *Am J Surg Pathol* 1998; 22(10): 1291-1295.
- Chetsanga C, Malmström PU, Gyllenstein U, Moreno-Lopez J, Dinter Z, Pettersson U. Low incidence of Human Papilloma Virus type 16 DNA in bladder tumor detected by the polymerase chain reaction. *Cancer* 1992; 69: 1208-1211.
- Roussel F, Picquenot JM, Rousseau O. Identification of Human Papillomavirus antigen in a bladder tumor. *Acta Cytol* 1991; 35(3): 273-275.
- Shibutani YF, Schoenberg MP, Carpinelli VL, Malloy TR. Human Papilloma Virus associated with bladder cancer. *Urology* 1992; 40(1): 15-17.
- Kerley S W, Person's DL, Fishback JL. Human Papillomavirus and carcinoma of the urinary bladder. *Mod Pathol* 1991; 4: 316-319.