

Servikal neoplazilerde insan papilloma virüsünün (HPV) in situ hibridizasyon yöntemi ile araştırılması

The detection of HPV by insitu hybridization in cervical neoplasia.

Ali Ahmed Muhamad ¹, Handan Kaya ¹, Gülsün Ekicioğlu ², Sevgi Küllü ¹

¹ Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, İSTANBUL

² Marmara Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu Patoloji Laboratuvar Bölümü, İSTANBUL

Serviksin skuamöz hücreli intraepitelyal ve invaziv karsinomlarında insan papillomavirüsünün (HPV) önemli bir etyolojik etken olduğu gösterilmiştir. 18 servikal intraepitelyal neoplazi ve 14 skuamöz hücreli karsinom olgusunda HPV varlığı ve subtipi in situ hibridizasyon yöntemiyle araştırılmıştır. Bulgularımız da (i) intraepitelyal neoplazi ile karsinom olguları arasında HPV varlığı ve subtipi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmış, ($p < 0.05$), (ii) servikal intraepitelyal neoplazi ve karsinom olguları arasında HPV subtipine ilişkin istatistiksel sorgulamada HPV tip 6/11, servikal intraepitelyal neoplazi ve skuamöz hücreli karsinom olguları arasında anlamlı fark göstermezken, HPV 16/18 pozitifliği servikal intraepitelyal neoplazi ile karsinom olguları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark göstermektedir ($p < 0.04$).

Anahtar Kelimeler: HPV DNA, in situ hibridizasyon, serviks, neoplazm

Human papillomavirus (HPV) is known to be an important etiopathogenetic factor in intraepithelial neoplasia and invasive squamous cell carcinomas of the cervix. We detected HPV DNA occurrence and subtypes in 18 intraepithelial neoplasia and 14 squamous cell carcinomas of the cervix by in situ hybridization technique. We revealed a statistically significant difference for the HPV DNA occurrence between intraepithelial neoplasias and carcinomas ($p < 0.05$). While we could not demonstrate any statistically significant correlation between intraepithelial neoplasias and carcinomas for the HPV subtype 6/11, we found a statistically significant correlation between intraepithelial neoplasia and carcinomas with HPV subtype 16/18 ($p < 0.04$).

Key Words: HPV DNA, in situ hybridization, intraepithelial, cervix, neoplasia

Serviks kanserleri arasında en sık görülen tip % 77 oranla skuamöz hücreli karsinomlardır (SCC) ⁽¹⁾. Servikal intraepitelyal neoplaziler (CIN) ise tüm kadın genital intraepitelyal neoplazilerinin yaklaşık % 91'ini oluşturmaktadır ⁽¹⁾. İnsan papilloma virüsünün (HPV) özellikle

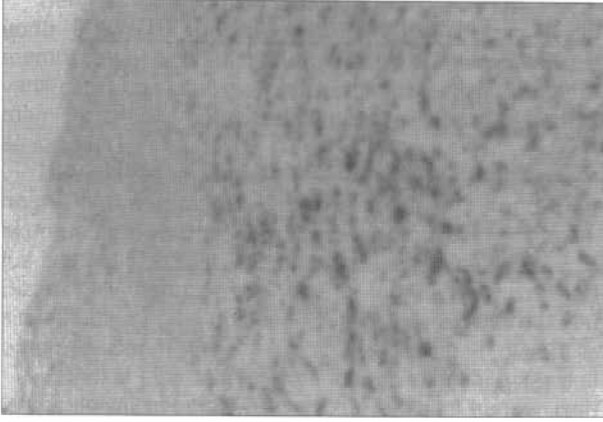
CIN ve SCC'da önemli bir etken olduğu gösterilmiştir ⁽²⁻⁷⁾. İn situ hibridizasyon tekniği virüsün histolojik örneklerdeki topografik dağılımını ortaya koymakta, özellikle servikal neoplazilerin patogenezinin araştırılmasında kullanılmaktadır. Bu teknik her bir hücrede 10-50 HPV genomluk bir duyarlılık göstermektedir ^(8,9). Non-isotopik in situ hibridizasyon (NISH) yöntemi ile HPV enfekte hücre nükleusunda 3 farklı tipte sinyal izlenir. Tip 1 sinyal, nükleusta diffüz pattern göstermekte ve epizomal HPV varlığını, tip 2, noktasal sinyal olup integrasyonu; tip 3 ise tip 1 ve 2'nin kombinasyonu olup, epizomal ve integre virüs varlığını gösterir ^(3,10). Viral genomun host DNA'ya integrasyonu, virüsün viral proteinlerini kodlayan sekanslarının erken veya geç genleri ile gerçekleşmektedir ^(3,11). HPV E6 gen ürünü p53'e bağlanırken HPV E7 gen ürünü Rb-1'e bağlanır. Bu etkileşimin hücresel transformasyonda temel neden olduğu, özellikle p53 gen mutasyonlarının malignite gelişiminde önemli rol oynadığı düşünülmektedir ^(12,13).

Günümüzde 90'ın üzerinde farklı tipi tanımlanmış olan bu virüsler farklı klinik tablolar oluştururlar. HPV onkogenik riskine göre; düşük ve yüksek riskli gruplara ayrılmıştır. Düşük riskli HPV tipleri 6,11, 42,44 olup bu grup en çok servikal kondüloma aküminatum ve CIN 1'lerde izlenmekte iken yüksek riskli HPV tipleri olan 16,18,31,33 ise CIN 2, 3 ve servikal karsinomlarda gösterilmiştir ^(1,5,7,10,12,15,16).

Bu çalışmanın amacı; servikal intraepitelyal neoplazi veya karsinom tanısı alan olgularda NISH yöntemi ile HPV DNA varlığının araştırılması ve HPV DNA varlığı saptanan olgularda subtiplerin belirlenmesidir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Marmara Üniversitesi, Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalında 1989-1999 yılları arasında kondiloma aküminatum, CIN ve SCC tanısı almış toplam 37 olgunun parafin bloklarından hazırlanan kesitlerine in situ hibridizasyon yöntemi ile panHPV probu uygulanmış, HPV varlığı belirlenen olgularda ise subtipendirme (HPV 6/11, 16/18, 31/33) yapılmıştır. Sinyal paternleri değerlendirilmiştir. Kondüloma aküminatumlu 5 olgu pozitif kontrol olarak seçilmiştir. CIN tanısı alan 18 olgu (CIN1; 8, CIN2; 2, CIN3; 8) ve SCC tanısı alan toplam 14 olgu (mikroinvaziv karsinom; 2, büyük hücreli keratinize, 5; büyük hücreli



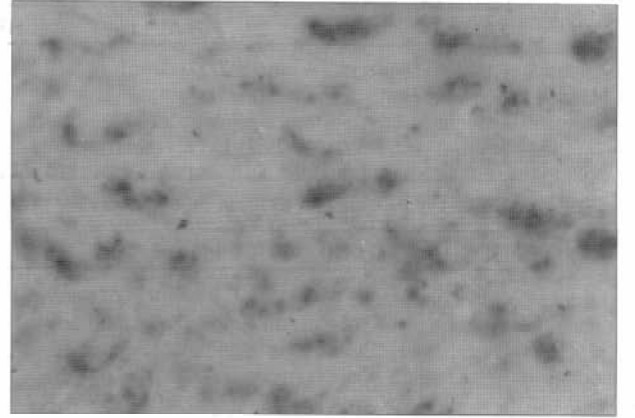
Resim 1: Servikal intraepitelyal neoplazi tip1 (noktasal) HPV DNA sinyali (NISH, x200)

non keratinize, 7) çalışmaya alınmıştır. Tümörlerin grade ve evrelemesi FIGO 1988'e göre yapılmıştır. Olgulara ait uygun lamların seçiminden sonra her olgu için seçilen parafin blokta 5 µm kalınlığında organosilane kaplı lamlara seri kesit alınmıştır.

Kesitlerin deparafinizasyonu ksilen ve farklı derecedeki (% 70,% 95,% 100) alkollerden geçirilerek gerçekleştirilmiştir. Ardından, 37°C de 30 dak pepsin ile proteinlerin degradasyonu ve farklı dereceli alkollerle dokuların dehidrasyonu sağlanmıştır. Tüm lamlarda işaretlenmiş doku örnekleri üzerine HPV DNA prob (Bio genex HPV Screening Probe Cocktail HK 863-2K, HPV tip 6/11; HK 840-2K, HPV tip 16/18; HK 841-2K, HPV tip 31/33; HK842-2K) damlatılmış, 95°C de 5 dak tutularak hibridizasyonun gerçekleşmesi beklenmiş, ardından hibridizasyonun tamamlanması amacıyla kesitler nemli ortamda 12 saat süre ile 37°C etüvde bırakılmıştır. Daha sonra kesitler TB (Tris Buffer) ile 10 dakika yıkanmıştır. Pozitif kontrol dışındakiler diferansiyasyon reaktanı ile 15 dakika 37°C'de işlem görmüş ve tekrar tüm kesitler 2x1 dakika TB ile yıkanmıştır. AP (alkalen fosfataz)- konjuge ve digoksinin ile 37°C'de 30 dak hibridizasyonun gerçekleşmesi ve oligonükleotidlerin işaretlenmesini takiben TB ile 2x1 dak yıkama ve distile suda 1 dak yıkama yapılmıştır. BCIP/NBT (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitro blue tetrazolium) veya alkalin fosfataz uygulanan kesitler 37°C'de, 5-20 dak bekletilmiştir. Mikroskop altında kontrol edilerek sinyallerin görülür hale gelmesi (ortalama 15 dak) ile kesitler TB ile 1 dak yıkanmıştır. Nükleer boyama Mayer hematoksilen ile yapılmıştır.

Değerlendirme :

HPV DNA varlığı; kontrol olgularının (kondüloma-kümünatum) epitel hücreleri ile aynı yoğunlukta, diffüz, noktasal veya mikst tip sinyal göstermesine göre değerlendirilmiştir. HPV DNA'sı pozitif olan CIN ve karsinom olgularında HPV 6/11, 16/18, 31/33 subtiplerinin varlığı araştırılmıştır.



Resim 2: Skuamöz hücreli karsinom tip 3 (diffüz + noktasal) HPV DNA sinyali (NISH, x400)

Değişkenlerin karşılaştırılmasında Ki kare ve Fischer kesin olasılık testleri kullanılmıştır.

BULGULAR

Toplam 5 kondüloma aküminatam olgusunun 4'ünde (% 80) HPV DNA sinyali izlenmiştir. Pozitif olgulara subtiplere yapılmış ve yalnız HPV tip 6 /11 (+) sinyal saptanmıştır (% 100).

CIN olan toplam 8 olgudan sadece birinde HPV pozitif bulunmuştur (% 13) (Resim 1). Pozitif olan bu olguda mikst tip (HPV 6/11 ve HPV16/18) enfeksiyon saptanmış ve boyanma patterni epizomal olarak değerlendirilmiştir. İki CIN2 olgusunda HPV DNA izlenmezken, CIN3 olgularında 3/8 (% 37.5) oranında HPV DNA ekspresyonu izlenmiştir. Subtiplere pozitif olguların ikisinde HPV tip 16/18, birinde ise mikst tip enfeksiyon (HPV 6/11+16/18) varlığı saptanmıştır. CIN olgularında HPV varlığı ile intraepitelyal neoplazinin derecesi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki belirlenmemiştir (Tablo 1).

SCC'larda ise % 50 oranında (7/14) HPV DNA saptanmıştır. Subtiplere ise HPV DNA (+) olguların hepsinde HPV tip 16/18 varlığı saptanmıştır (% 100) (Resim 2). 3 olguda HPV tip 16/18' in yanısıra HPV tip 6 /11'de görülmüştür (% 43). HPV tip 31/33 hiçbir olguda izlenmemiştir.

CIN ve karsinom olguları arasında HPV varlığı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır (p<0.05). Her iki grup arasında HPV subtipleri karşılaştırıldığında HPV tip 6/11 varlığı açısından CIN ve karsinom olguları arasında anlamlı fark gözlenmezken, HPV tip 16/18 pozitifliği açısından CIN ve karsinom olguları arasında anlamlı fark bulunmuştur (p<0.04).

Çalışma kapsamına alınan SCC olgularından beşinin punch biyopsi olması nedeniyle HPV DNA varlığı ile tümör evresinin ilişkisi değerlendirilememiştir. İstatistiksel olarak tümör diferansiyasyonu ile HPV varlığı arasın-

TANI	HPV(-)	HPV6/11(+)	HPV16/18(+)	HPV6/11+16/18(+)	TOPLAM
CIN I	7	-	-	1	8
CIN II	2	-	-	-	2
CIN III	5	-	2	1	8

Tablo 1: CIN I, CIN II ve CIN III olgularında HPV pozitifliği

OLGU	TANI	LN	G	EVRE	HPV	SG
1	SCC	-	1	P	-	-
2	SCC	-	1	T1b, F:lb	-	-
3	SCC	-	2	T2aNo, F: IIa	-	-
4	SCC, Mİ	-	Mİ	T1aNo, F: Ia	-	16/18
5	SCC	-	2	P	+	16/18
6	SCC	-	3	T1bNo, F:lb	-	-
7	SCC	-	1	T1bNo, F:lb	+	16/18
8	SCC, Mİ	-	Mİ	Kon.	-	-
9	SCC	+	4	T2aN1, F: IIa	+	16/18
10	SCC	-	1	P	-	-
11	SCC	-	2	T2Nx, F:IIa	+	6/11+16/18
12	SCC	-	2	T1bNo, F:lb	+	6/11+16/18
13	SCC	-	2	P	-	-
14	SCC	-	3	P	+	6/11+16/18

LN: Lenf nodu metastazı varlığı, SG: Subgrup, P: Punch biyopsi, SCC: Skumöz hücreli karsinom, G: Grade, Kon: Konizasyon, F: FIGO, Mİ: Mikroinvaziv

Tablo 2: Servikal skuamöz hücreli karsinom olguları.

da anlamlı bir ilişki saptanamamıştır.

Olguların HPV DNA sinyal paternleri ise; tip 1: diffüz boyanma patterni kondiloma ve CIN1 olgularında izlenmiştir. CIN3 ve karsinom olgularında ise tip 2: noktasal sinyal % 80 (8/10) oranında ve % 20 (2/10) oranında tip 3: mikst tip sinyal saptanmıştır.

İstatistiksel sonuçları özetlersek; HPV virüsü karsinom olgularında CIN olgularından daha fazla oranda saptanmış ve en sık görülen tipler ise HPV 16/18 olarak izlenmiştir ($p < 0.04$).

TARTIŞMA

Günümüzde İnsan Papilloma Virüsü'nün (HPV) serviks prekaneröz ve skuamöz hücreli karsinomlarının gelişiminde etkili olduğu kanıtlanmıştır ⁽¹⁶⁻¹⁹⁾.

Polimeraz zincir reaksiyon (PCR) yöntemi ile yapılan çalışmalarda CIN lezyonlarında % 25-71 oranında HPV varlığı ve en sık görülen HPV subtipi ise 6 ve 16 olarak gösterilmiştir ^(1,19). Multipl infeksiyonlarda ise en sık görülen HPV tipi 6/16 (% 12) ve 16/31 (% 11) birlikteliğidir ⁽¹⁹⁾. Bizim çalışmamızda ise CIN olgularında HPV varlığı % 22.2 oranında olup, diğer çalışmalara oranla daha düşük olarak bulunmuştur. Diğer yandan kondiloma olgularında % 80 oranında HPV virüsü saptanmış ve en sık görülen tip olarak HPV 6/11 izlenmiş olup sonuçlar literatürle uyumludur. CIN 1 lezyonlarında yapılan çalışmalarda HPV tip ^(16,18,31,33) varlığında belirgin

dev nükleus, koilositik atipi ve atipik mitozlar dikkati çekmiştir ^(10,18,19). Çalışmamızda HPV 6/11 ve 16/18 tipleri taşıyan tek HPV pozitif CIN 1 olgusunda belirgin atipi, atipik mitoz, dev hücre gibi belirgin hücresel değişiklikler gözlenmemiştir.

Serviksin SCC larında ISH yöntemiyle % 89-93 oranında HPV saptanmıştır ^(6,21). En sık görülen HPV tipleri ise 16 ve 18 olup, daha az oranda HPV 31, 33, 35, 51, 52 ve 58 gözlenmiş, düşük riskli HPV tipleri ise saptanmamıştır ⁽⁶⁾. Çalışmamızda ise SCC' larda % 50 oranında HPV DNA pozitifliği bulunmuş ve olguların tümünde HPV tip 16/18 izlenmiştir (% 100). HPV tip 6/11; % 43 oranında saptanmış olup, HPV tip 16/18 ile birlikte izlenmiştir. Diğer çalışmalardan farklı olarak bizim çalışmamızda HPV tip 31/33 izlenmemiştir.

Serviks lezyonlarında HPV varlığını farklı toplumlar arasında karşılaştırdığımızda; PCR yöntemi ile yapılan çalışmalarda HPV varlığı % 72-100 olarak saptanırken, en sık görülen HPV tipi ise tip 16 (% 61-65) olarak belirlenmiştir ^(14,16). Türk kadınlarında serviksin SCC'larında PCR yöntemi kullanılarak HPV varlığı ve tiplemesinin gerçekleştirildiği bir çalışmada, PCR yöntemi ile olguların % 45'inde HPV pozitif olarak saptanırken, multipl HPV infeksiyonu ise olguların % 50'sinde gösterilmiştir ⁽¹⁵⁾. Farklı toplumların sonuçları karşılaştırıldığında; Türk toplumundaki SCC'daki HPV varlığı diğerlerine oranla daha düşük bulunurken, en sık görülen HPV subtipi açısından ise sonuçlar benzerlik göstermekte ancak mikst tip HPV infeksiyonu farklı iki topluma ait çalışmalarda izlenmemiştir ^(14,16).

Servikal karsinomlarda lenf nodu ve damar invazyonu önemli prognostik faktörlerdir ^(1,22). Bizim çalışmamızda lenf nodu metastazının olup olmaması ile HPV varlığı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanamamıştır ancak yorumumuz olgu sayısının azlığı nedeni ile sınırlıdır.

HPV onkogenesinde en önemli rolü viral genomun host DNA'ya integrasyonu oynamaktadır. Kondiloma akümülatum ve CIN 1'lerde en sık görülen sinyal tipi difüz iken, CIN 2,3 ve karsinomlarda noktasal tiptedir ⁽¹⁴⁾. Bizim çalışmamızda da viral integrasyonu yansıtan sinyal patterni olan noktasal tip CIN 3 ve SCC'larda %80 oranında izlenmiştir.

Servikal tarama yöntemlerinin gelişmesi ile servikal intraepitelial neoplazi artmış olup servikal kanser insidansı düşmüştür. Bu olgularda HPV varlığının araştırılmasının, subtipinin ve sinyal paterninin belirlenmesinin, uygun tedavi seçimine ışık tutabileceğini, sonuçların yüksek gradeli CIN ve karsinom gelişmesinde belirgin azalma sağlayabileceğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

- Platz CE, Benda JA. Female genital tract cancer. *Cancer* 1997;75:270-8
- Anderson SM, Brooke PK, Van Eyck SL, Noell H, Frable WJ. Distribution of human papilloma types in genital lesions from two temporally distinct populations determined by insitu hybridization. *Hum Pathol* 1993;24:547-53
- Cooper K, Herrington CS, Stickland JE, Evans MF, Mc Gee J O'D. Episomal and integrated human papillomavirus in cervical neoplasia shown by non-isotopic insitu hybridisation. *J Clin Pathol* 1991; 44:990-6
- Herrington CS: Control of HPV replication: Implications for squamous neoplasia. *J Pathol* 1996;178: 237-8
- Koutsky LA, Holmes KK, Crichtlow CW, Stevens CE, Paavonen PAJ, Beckmann AM et al. A cohort study of the risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 in relation to papillomavirus infection. *N Engl J Med* 1992; 327: 1272-8
- Lorincz AT, Reid R, Jenson B, Greenberg MD, Lancaster W, Greenberg MD et al. Human papillomavirus infection of the cervix: Relative risk associations of 15 common anogenital types. *Obst Gynaecol* 1992;79:328-37
- Wilczynski SP, Oft M, Cook N, Liao SY, Iftner T. Human papillomavirus type 6 in squamous cell carcinoma of the bladder and cervix. *Hum Pathol* 1993;24:96-7
- Jochmus I, Dürst M, Rrid R, et al. Major histocompatibility complex and human papillomavirus type 16 E7 Expression in high grade vulvar lesion. *Hum Pathol* 1993;24:519-24
- Lloyd RV, Jin L, Bonnerup MK. Laboratory Medicine and Pathology : In situ Hybridization in Diagnostic pathology. *Mayo Clin Proc* 1994;69:597-8.
- Zioli M, Tomaso CT, Biaggi A, Tepper M, Piquet P, Carbillon L, et al. Virological and biological characteristics of cervical intraepithelial neoplasia grade 1 with marked koilocytotic atypia. *Hum Pathol* 1998 29:1068-73.
- Cooper K, McGee JOD. Human papillomavirus ,integration and cervical carcinogenesis: A clinicopathological perspective. *J Clin Pathol: Mol Pathol* 1997;50:1-3.
- Herrington CS. Human papillomaviruses, P53, and cervical neoplasia. *J Pathol* 1994; 172:299-300.
- Watts AE, Koeffler HP, Said J. Localization of P53 protein and human papillomavirus in anogenital squamous lesions. Immunohistochemical and insitu hybridization studies in benign, dysplastic, and malignant epithelia. *Hum Pathol* 1993;24:1238-42.
- Dürst M, Gissman L, Ikenberg H, Zur Hausen H. A papillomavirus DNA from cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc Nat Acad Sci* 1983; 80: 3812-5.
- Guney AI, Ince U, Küllü S, Pekin S, Çırakoğlu B. Detection and typing of human papillomavirus in cervical specimens of Turkish women. *Eur J Gynaecol Oncol* 1997; 18: 546-50.
- Van Muyden RCPAV, Harmsel B, Smedts F, Hermans J, Kuijpers JC, Raikhlin NT et al. Detection and typing of human papillomavirus in cervical carcinomas in Russian women: a prognostic study. *Cancer* 1999;85:2011.
- Hildesheim A, Hadjimichael O, Schwartz PE, Wheeler CM, Barnes W, Lowell DM et al. Risk factors for rapid-onset cervical cancer. *Am. J Obstet Gynaecol* 1999;180:571-7.
- Genest DR, Stein L, Cibas E, Sheetes E, Zitz JC, Crum CP. A binary system for classifying cervical cancer precursors : criteria reproducibility and viral correlates. *Hum Pathol* 1993; 24:730-6.
- Kalantari M, Karlsen F, Johansson B, Sigurjonsson T, Warleby B, Hagmar B. Human papillomavirus findings in relation to cervical intraepithelial neoplasia grade. *Hum Pathol* 1997;28:899-903.
- Genest DR, Stein L, Sheets E, Zitz JC, Crum CP. A binary system for classifying cervical cancer precursors: criteria reproducibility, and viral correlates. *Hum Pathol* 1993;24:730-6.
- Poddighe PJ, Bulten J, Kerstens HMJ, Robben JCM, Melchers WJG, Hanselaar AGJM. Human papillomavirus detection by insitu hybridisation signal amplification based on biotinylated tyramine deposition. *J Clin Pathol: Mol. Pathol* 1994;49:3440-4 .
- Sakuragi N, Satoh C, Takeda N, Hareyema H, Takeda M, Yamamoto R et al. Incidence and distribution pattern of pelvic and paraaortic lymph node metastasis in patients with stages IB, IIA, and IIB cervical carcinoma treated with radical hysterectomy. *Cancer* 1999;85:1547-54.