

HUMAN PAPİLLOMAVİRUS ENFEKSİYONUNUN SERVİKAL İNTRAEPİTELYAL NEOPLAZİLER VE SERVİKS KANSERİ İLE İLİŞKİSİNİN İMMÜNOHİSTOKİMYASAL YÖNTEMLE ARAŞTIRILMASI

¹Arzu SUNGUR, ¹Ayşe AYHAN, ¹Şevket RUACAN, ²Ali AYHAN

ÖZET

Bu çalışmada Türk toplumunda servikal intraepitelyal neoplazi (CIN) ve serviks kanserinde Human Papillomavirus (HPV) enfeksiyonunun varlığını ve bu beraberliğin oranını belirlemek amacı ile, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalında 1968-1990 yılları arasında servikal displazi, karsinoma in situ ve servikal karsinom tanısı almış olgulardan 100 tanesi random olarak seçilmiştir. HPV kapsid antijenine karşı hazırlanmış poliklonal rabbit anti-bovine HPV antikorlu ile tüm olgular immünohistokimyasal olarak streptavidin-biotin yöntemi ile boyanmıştır. CIN'lerin % 23'ünde ve skuamöz hücreli karsinomların % 20'sinde olmak üzere, 100 olgunun 22'sinde (% 22) HPV antijen pozitifliği saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler : Serviks kanseri, servikal intraepitelyal neoplazi, Human Papillomavirus enfeksiyonu, onkogenik virüs.

GİRİŞ

Dünyada kadınlarda en sık görülen kanserler arasında ikinci sırayı alan serviks kanseri, özellikle gelişmekte olan ülkelerde ve genç yaşta kadınlar da önemli mortalite ve morbiditeye neden olmaktadır (1). 1960'lı yıllardan başlayarak gelişmiş ülkelerde de mortalitesinin artması nedeniyle yeni risk faktörlerinin devreye girdiği düşünülerek çeşitli epidemiyolojik çalışmalar başlatılmıştır. Üzerinde en çok durulan etkenleri cinsel yolla bulaşan enfeksiyonlar oluşturmaktadır. Başlangıçta suçlanan etkenler spiroketler, trikomonas vaginalis, gonokok gibi mikroorganizmalar iken teknoloji ve immünoloji-deki gelişmelere paralel olarak son yıllarda virüslerin etiyopatogenezdaki rolleri ön plana çıkmıştır.

SUMMARY

This study was designed to search for human papillomavirus (HPV) infection in cervical intraepithelial neoplasia (CIN) and cervical carcinomas of Turkish women. Patients receiving a diagnosis of cervical dysplasia, carcinoma in situ or cervical carcinoma between 1968 and 1990 in Hacettepe University Medical School, Department of Pathology were reviewed retrospectively and 100 cases were included in this study randomly. Immunohistochemical staining for HPV was established by a polyclonal rabbit anti-bovine HPV antibody and the method used was streptavidin-biotin. Evidence for HPV infection was observed in 23 % of CINs and 20 % of cervical carcinomas and 22 % of the 100 cases studied.

Key Words: cervical carcinoma, cervical intraepithelial neoplasia, human papillomavirus infection, oncogenic virus

HPV ile serviks kanseri arasındaki ilişkiyi araştıran ilk epidemiyolojik çalışma 1970 yılında Zur Hausen tarafından başlatılmıştır (2). 1980 yılında Shah ve arkadaşları (3) HPV'un kapsid proteini ile reaksiyona giren grup spesifik antikorlar üretmişler ve bu antikor sayesinde servikal displazilerin özellikle yüzeysel tabakasında koilositotik hücrelerde papillomavirüsü göstermek mümkün olmuştur. Bugün için HPV enfeksiyonu ile servikal neoplaziler arasında kesin bir "neden-sonuç" ilişkisi gösterilmemiş olmakla birlikte, bu ilişkiyi destekleyen birçok veri elde edilmiştir. Bu çalışmada da Türk hasta popülasyonunda CIN ve serviks kanserinde HPV enfeksiyonunun varlığı ve bu beraberliğin oranı araştırılmıştır.

¹ Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı

² Hacettepe Üniversitesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Ankara

GEREÇ VE YÖNTEM

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalında 1968-1990 yılları arasında serviks karsinomu, karsinoma insitu ve servikal displazi tanılarını almış 100 olgu random olarak seçilmiş ve tüm olguların Hematoksilen-Eozin kesitleri incelenerek CIN'ler günümüzde kullanılan son kriterlere göre grade'lenmiştir (4). Servikal karsinomalar ise Dünya Sağlık Örgütü'nün sınıflandırmasına göre sınıflandırılmıştır (5). Ayrıca CIN olgularında HPV enfeksiyonunun histopatolojik bulgularının varlığı araştırılmıştır.

Olguların hepsinde immünohistokimyasal çalışma ile avidin-biotin indirekt metodu kullanılarak HPV antijen varlığı araştırılmıştır. Primer antikor olarak HPV-kapsid antijenine karşı geliştirilmiş "Rabbit Anti-bovine Papillomavirus" antikor (DAKO) kullanılmıştır.

Formalin ile tespit edilmiş ve parafine gömülmüş doku bloklarından 5 mikron kalınlığında kesitler hazırlanarak, 16 saat süreyle 56°C'de etüvde daha sonra 15 dakika süre ile ksilolde deparafinize ve 15 dakika süre ile alkolde dehidrate edilmiştir. 5 dakika çeşme suyunda yıkanmış ve 10 dakika süre ile % 0.5'lik hidrojen peroksidad içeren % 80'lik metanol ile endojen peroksidad aktivitesi inhibe edilmiştir. 0.01M, pH'sı 7.4 olan "phosphate-buffered saline" (PBS) ile 5 dakika yıkanmış ve primer antikor (Poliklonal Rabbit Anti-bovine Papillomavirus) PBS ile 1/1000 oranında dilue edilerek dokular ile bir gece süreyle oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. PBS ile 5 dakika yıkanarak poliklonal bağlayıcı antikor (Biotin-labeled anti-rabbit immunoglobulin) ile 30 dakika inkübe edilmiştir. PBS ile 5 dakika yıkanmış ve streptavidin enzim bağlayıcı ile 30 dakika inkübe edilmiştir. Tekrar PBS ile 5 dakika yıkanarak 8-10 dakika süreyle DAB (Diamino benzidine tetrahydrochloride 5 mikrogram (SIGMA), pH'si 7.6 olan 10 ml Tris-Hcl buffer ve 100 ml % 1'lik H2O2) ile boyanmıştır. Çeşme suyunda yıkanmış ve 45-60 saniye hematoksilen ile boyanmıştır. Alkolde dehidrate edilmiş ve ksilolde şeffaflandırılmış olan kesitler balsam ile kapatılmıştır.

Yapılan immünohistokimyasal çalışmada HPV antijen pozitifliğinin kriteri olarak daha önce bildirilen yayınlarda tanımlandığı biçimde, granüler ve yüzeyel tabakada en az iki hücrede intranükleer kahverengi granüler veya diffüz boyanma kabul edilmiştir (1-12).

BULGULAR

Çalışmaya alınan 100 olgunun histopatolojik tanıların dağılımı Tablo 1'de, skuamöz hücreli serviks karsinomlarının alt tiplerinin dağılımı da Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo -1 : 100 Olgunun Histopatolojik Tanılarının Dağılımı.

Tanı	Olgu Sayısı	%
CIN	70	70
CIN1	20	20
CIN2	25	25
CIN3	25	25
Skuamöz Hücreli CA	30	30

Tablo -2 : Skuamöz Hücreli Karsinomaların Alt Tiplerinin Dağılımı.

Histopatolojik Tip	Olgu Sayısı	%
Büyük hücreli keratinize	18	60
Büyük hücreli nonkeratinize	10	33
Küçük hücreli nonkeratinize	2	7

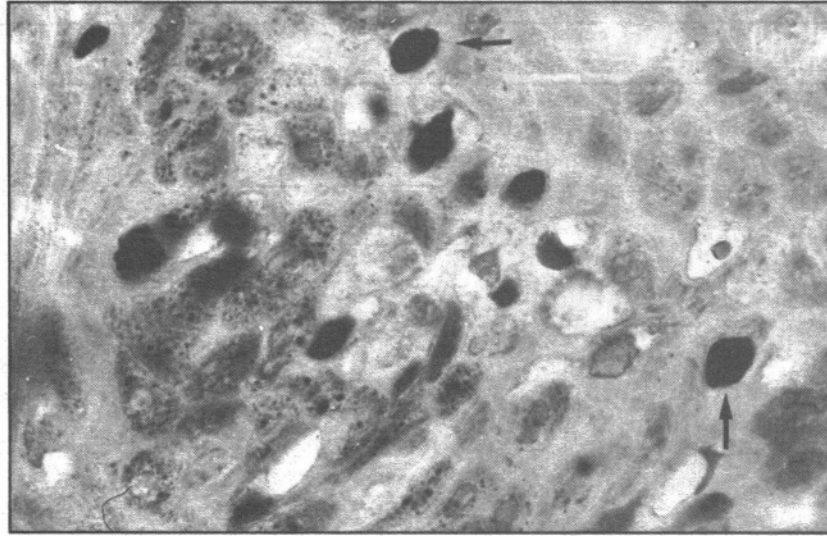
Olguların yaş ortalaması 43 (Range: 24-70) olarak saptanmıştır. CIN tanısı alan olgular için yaş ortalaması 37, servikal karsinomlu olgular için 47 olarak saptanmıştır.

HPV enfeksiyonunun en önemli histopatolojik bulguları olarak kabul edilen koilositotik atipi, multi-nükleasyon ve diskeratoz CIN tanısı almış olan olguların % 30'unda saptanmıştır. Tablo 3'de bu bulguların CIN lezyonlarındaki dağılımı özetlenmiştir.

İmmünohistokimyasal çalışma sonucu değerlendirildiklerinde incelenen 100 olgunun 22'sinde (% 22) HPV antijeninin pozitifliği belirlenmiştir (Resim 1). HPV antijeninin CIN'lerdeki dağılımı Tablo 4'de gösterilmiştir. HPV enfeksiyonu kriteri olarak kabul edilen ışık mikroskopisi bulguları ile antijen pozitifliği arasında önemli bir korrelasyon bulunmuş ve veriler Tablo 5'de özetlenmiştir.

Tablo -3 : Koilositotik Atipli, Diskeratoz, Multinükleasyon Bulgularının İncelenen CIN Lezyonlarında Görülme Sıklığı.

LEZYON	CIN1		CIN2		CIN3		TOPLAM	
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
(+) Bulgu Saptanan Olgular	4	20	13	52	4	16	21	30
(+) Bulgu Saptanmayan Olgular	16	80	12	48	21	84	49	70



Resim 1 : HPV antikoruna pozitif nükleer boyanma (immüno-peroksidaz, X 700).

Tablo -4 : 100 Servikal Lezyonda HPV Antijen Pozitifliğinin Oranları.

Histolojik Tanı	İncelenen Toplam Olgu Sayısı	Pozitif	
		Sayı	Yüzde
CIN1	20	7	35
CIN2	25	8	32
CIN3	25	1	4
Skvamöz Hücreli Ca	30	6*	20
TOPLAM	100	22	22

* 4 Büyük hücreli keratinize, 2 büyük hücreli nonkeratinize

İmmünohistokimyasal yöntemin kullanıldığı benzer çalışmalardan alınan sonuçlar ile bu çalışmanın sonuçları karşılaştırıldığında değişik toplumlarda ve incenen servikal lezyona bağlı olarak insidansın farklı olduğu izlenmiştir. Bu veriler de Tablo 6'da yer almaktadır.

TARTIŞMA

Son 30 yıl içinde jinekolojik patoloji alanında üzerinde en çok araştırma yapılan konulardan biri prekanseröz servikal lezyonların invaziv karsinoma

Tablo -5 : HPV Enfeksiyonunun Işık Mikroskopi Bulguları ile İmmünohistokimyasal Bulguların İlişkisi

Tanı	Olgu Sayısı	HPV Antijeni Pozitif+ Koilositotik Atıplı Pozitif Olgular		HPV Antijeni Pozitif+ Koilositotik Atıplı Negatif Olgular	
		Sayı	Yüzde	Sayı	Yüzde
CIN1	7	3	43	4	57
CIN2	8	8	100	0	0
CIN3	1	0	0	1	100

Tablo -6 : HPV Enfeksiyonu ile Servikal Neoplaziler Arasındaki İlişkinin Gösterilmesinde İmmünohistokimyasal Yöntemden Yararlanan Çalışmalar

Araştırmacı	Yıl	Servikal Lezyonlarda HPV Varlığı							
		CIN1		CIN2		CIN3		CA	
Sayı		Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
Kurman RJ (8) 1981		22/46	48	2/4	50	-	-	-	-
Syrjanen K (9) 1982		8/16	50	5/6	83	9/25	36	22/47	47
Singer A (10) 1985		8/33	24	6/11	55	6/23	26	20/67	30
Sungur AA. 1990		7/20	35	8/25	32	1/25	4	6/30	20
								22/100	22

dönüşümüne yol açan etkenler olmuştur. Yine aynı süre zarfında ilgi odaklarından birini de viral onkogeneze ve varlığını uzun süre devam ettiren viral enfeksiyonlar oluşturmıştır. Önceleri HPV'lerin kadın genital traktusunda yol açtığı yegane lezyonun kondilom olduğu sanılırken 1974 yılında DNA hibridizasyon tekniği ile kondilom oluşturan HPV'nin birden fazla tipi olduğu saptanmıştır (6). 1980 yılında Shah ve arkadaşlarının (3) ürettikleri spesifik antikor ile servikal displazilerin özellikle yüzeyel tabakalarındaki koilositotik hücrelerde HPV antijeni gösterilebilmiştir. Bu konuda yapılan bazı çalışmalarda CIN'de % 48 (7), % 46.8 (8) ve % 30 (9) oranında HPV antijen pozitifliği saptanmıştır. Bizim çalışmamızda ise bu oran % 23 olarak bulunmuştur. Diğer çalışmaların oranlarının yüksek olmasının nedeni bu çalışmaların bir kısmında özellikle koilositotik atipi gösteren olguların çalışmaya alınmasıdır. Bilindiği gibi koilositotik atipi ile HPV enfeksiyonu arasında önemli bir ilişki vardır. bu çalışmada HPV antijen pozitifliği saptanan CIN1 olgularının %

43'ünde, CIN2 olgularının ise % 100'ünde koilositotik atipi belirlenmiştir. Bizim çalışmamız ile diğer çalışmalar arasındaki oran farkının diğer bir nedeni de incelenen hasta gruplarının üyesi oldukları toplumun sosyal yapıları olabilir.

Viral kapsid protein, grup spesifik antikorlarla genellikle düşük grade'li displazilerde saptanabilmektedir. Yüksek grade'li displazilerde ve invaziv karsinomlarda pozitiflik oranı düşmektedir. Çünkü virüsün yaşam siklusu yüksek grade'li displaziler ve kanserlerde bloke olmakta ve yeni virüs partikülleri yapılamamaktadır (10). Bu nedenle immünohistokimyasal yöntemlerin uygulandığı çalışmalarda invaziv karsinomlarda HPV varlığının oranı genellikle düşmektedir. Bizim çalışmamızda 30 skuamöz hücreli karsinomun 6 tanesinde HPV antijen varlığı saptanabilmiştir.

Çalışma sonunda belirlenen bu oranlar ülkemizde de HPV enfeksiyonunun CIN ve skuamöz hücreli karsinomlarda önemli bir risk faktörü olduğu

nu göstermiştir. Ancak bu yöntemle çalışılacak monoklonal antikorların olmaması nedeni ile HPV tipleri ayırd edilememektedir. Son yıllarda DNA hibridizasyon ve polimeraz zincir reaksiyonu ile hastanın lezyonunda immünohistokimyasal yöntemle gösteri-

lemeyen HPV gösterilebilmekte ve virüs tiplendirmesi kesin olarak yapılabilmektedir. Bu çalışmalar sonunda HPV tip 6 ve 11'in genellikle düşük grade'li, tip 16, 18 ve 31'in ise yüksek grade'li CIN'ler ve invaziv karsinomlar ile ilişkili olduğu saptanmıştır.

KAYNAKLAR

1. Munoz N, Bosch FX, Jensen OM. Human papillomavirus and cervical cancer. Lyon: IARC Scientific Publications No: 94, 1989, 1-18.
2. Zur Hausen H, Sculte-Holthausen H, Klein G ve ark.: EBV DNA in biopsies of Burkitt tumours and anaplastic carcinomas of the nasopharynx. *Nature* 1970; 229: 1056-1059.
3. Shah KH, Jenson AB, Lancaster WD. Papillomavirus and cervical dysplasia. *Lancet* 1980; 2: 1190 (Letter).
4. Coleman DV, Evans DMD. Biopsy pathology and cytology of the cervix. 1st ed. London, Chapman and Hall 1988, ch 10: 197-239.
5. Poulsen HW, Taylor CW, Sabin LH. Histological typing of female genital tract tumour. International histological classification of tumours, No. 13, World Health Organisation 1975, Geneva.
6. Krebs HB. Milestones in HPV research. *Clin Obstet Gynecol* 1989; 32: 107-111.
7. Kurman RJ, Shah KH, Lancaster WD ve ark. Immunoperoxidase localisation of papillomavirus in cervical dysplasia and vulvar condylomas. *Am J Obstet Gynecol* 1981; 140: 931-935.
8. Syrjänen KJ, Pyrhönen S. Immunoperoxidase demonstration of human papillomavirus in dysplastic lesions of the uterine cervix. *Arch Gynecol* 1982; 233: 53-61.
9. Singer A, Wilters J, Walker P ve ark. Comparison of prevalence of human papillomavirus antigen in biopsies from women with cervical intraepithelial neoplasia. *J Clin Pathol* 1985; 38: 855-857.
10. Smotkin D. Virology of human papillomavirus. *Clin Obstet Gynecol* 1989; 32: 117-126.
11. Bistolletti P, Zellbi A, Moreno-Lopez J ve ark. Genital papillomavirus infection after treatment for intraepithelial neoplasia (CIN) III. *Cancer* 1988; 62: 2056-2059.
12. Woodruff D, Braun L, Cavalieri R ve ark. Immunologic identification of papillomavirus antigen in condyloma tissues from the female genital tract. *Obstet Gynecol* 1980; 56: 727-732.