

Larinksin Papillomları, Prekanseröz Lezyonları ve Kanserlerinde, İn Situ Hibridizasyon Tekniğiyle HPV DNA pozitifliğinin Saptanması

Dr. Ömer Yalçın *, Dr. Selçuk Bilgi *, Dr. Latife Candan *, Dr. Kemal Kutlu *, Dr. M. Kemal Adalı **

ÖZET

Larinks karsinomlarında risk faktörü olarak sigara, alkol kullanımı ve radyasyon yanısıra Human Papilloma Virus (HPV) enfeksiyonu da gösterilmektedir. Bu çalışmada larinks lezyonlarında HPV pozitifliğini araştırmak amaçlanmış, Langerhans hücrelerindeki sayısal değişikliklerle ilişkisi saptanmaya çalışılmıştır.

Olgularda, HPV DNA in situ hibridizasyon metoduyla HPV DNA (+) epitelyal hücre nükleusu aranmış, immunohistokimyasal (İHK) yöntem kullanılarak sağlam doku ve lezyon alanlarında Langerhans hücre sayılarındaki değişiklikler saptanmıştır. Tüm veriler birbiri ile karşılaştırılmış ve HPV DNA pozitifliği ile koilostozis ve skuamöz hücreli karsinom arasında anlamlı bir ilişki ($p < 0.005$) bulunmuştur. Skuamöz hücreli karsinom olgularının % 69.2'si (9/13) HPV DNA (+) olarak saptanmıştır.

Sonuç olarak, iyi diferansiye epidermoid karsinomla HPV pozitifliği arasında anlamlı bir ilişkinin olması, karsinomların etiyolojisinde HPV'nin rol oynadığını düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: HPV, larinks, skuamöz hücreli karsinom, in situ hibridizasyon

GİRİŞ

Erkeklerde en sık görülen kanserler arasında yer alan larinks kanserleri direkt yayılım, yaygın metastaz ve alt solunum yolu enfeksiyonları ile ölüme neden olabilen tümörlerdir (1). Laringeal papillomatozis de lokal ağırsık oluşu, yüksek nüks insidansı, solunum yollarını tıkaması nedeniyle ciddi bir sağlık sorunudur (2). Son yıllarda yapılan pek çok araştırmada, diğer papillomlarda olduğu gibi laringeal papillomlarda da, epitel hücrelerinde viral etkiye bağlı histopatolojik değişiklikler ve çeşitli tekniklerle HPV varlığı saptanmıştır (3,11). Ayrıca, lezyon tipi, HPV pozitifliği ve Langerhans hücresi kantitatif değerleri arasındaki ilişki üzerinde durulmaktadır (12).

Bu çalışmada laringeal papillom, larinksin prekanseröz lezyonları ve skuamöz hücreli karsinomlarında viral etkiyle beklenen histopatolojik değişikliklerin varlığı, in situ hibridizasyon tekniğiyle HPV DNA pozitiflik oranı, immunohistokimyasal teknikle lezyondaki Langerhans hücrelerinin kantitatif değerleri arasındaki ilişkiyi belirlemek amaçlanmıştır.

SUMMARY

Detection of HPV DNA in larynx pre-cancerous lesions and carcinomas by in situ hybridization method

Besides smoking, alcohol and radiation, human papilloma virus (HPV) infection is considered as an etiologic agent of larynx carcinomas.

In this study, we investigated the HPV positivity in larynx lesions and its relationship with the quantitative differences in Langerhans cells. The cases were investigated by in situ hybridization method for HPV DNA positivity and immunohistochemistry was applied for the quantitative differences of Langerhans cells in the lesions and normal adjacent tissues.

All the data are compared with each other and there was a relationship among HPV DNA positivity, koilocytosis and well differentiated squamous cell carcinomas ($p = 0.0005$). HPV DNA positivity was shown in 69.2% (9/13) of the squamous cell carcinomas.

In conclusion, our results indicate that there has been a significant relation between the HPV DNA positivity and well differentiated squamous cell carcinomas.

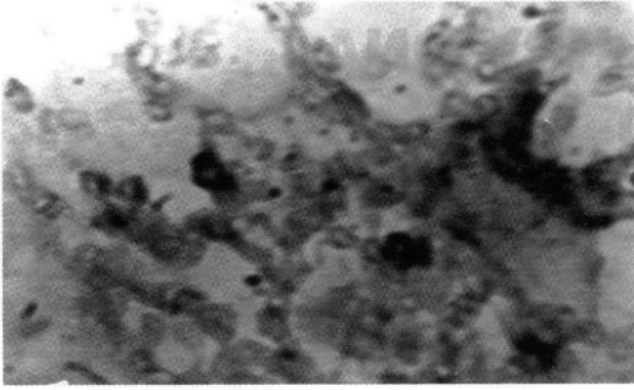
Key words: HPV, larynx, squamous cell carcinoma, in situ hybridization

GEREÇ VE YÖNTEM

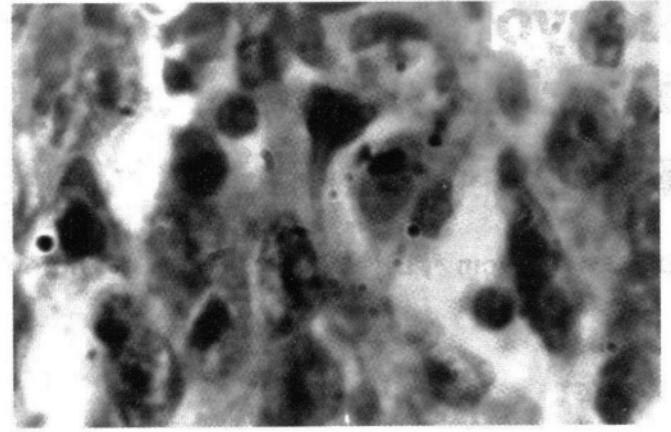
Son bir yıl içinde Patoloji Anabilim Dalı'na başvuran laringeal lezyonu olan hastalar arasından seçilen 23 olgu çalışma grubuna alındı. Olgular seçilirken biyopsi örneklerinin lezyonla birlikte sağlam komşu epiteli de içermeleri dışında özellik aranmadı. Yaşları 23-75 olan olguların tamamı erkekti. Olgulardan 1 tanesi polip, 3 tanesi laringeal nodül, 2 tanesi keratozis, 3 tanesi papillom, 1 tanesi displazi, 1 tanesi laringeal nodülle birlikte orta derecede diferansiye skuamöz hücreli karsinom, 1 tanesi az diferansiye skuamöz hücreli karsinom, 4 tanesi orta derecede diferansiye karsinom ve 7 tanesi iyi diferansiye skuamöz hücreli karsinom tanısı almıştı (Tablo 1). Laringeal nodül, non-neoplastik olmasına rağmen hem negatif kontrol olarak hem de daha objektif değerlendirme yapmak için

* Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji AD

** Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi KBB AD



Resim 1: Skuamöz hücreli karsinomda invazyon alanlarında, HPV DNA (+) malign epitelyal hücre nükleusları (DISH, Fast red, x50)



Resim 2: Skuamöz hücreli karsinomda malign epitelyal hücreleri arasında S-100(+) dendritik Langerhans hücreleri. (S-100, x100)

çalışma grubumuza alındı.

Olguların rutin doku takip yöntemleri uygulanan ve parafin bloğa gömülen doku örneklerinden hazırlanan hematoksil-eosin kesitlerinde lezyonun histopatolojik özellikleri yeniden gözden geçirilirken, lezyona komşu sağlam epitel alanları HPV enfeksiyonunda beklenen koilositik değişiklikler yanı sıra diskeratotik ve binükleer yassı epitel hücreleri açısından incelendi. Bu histopatolojik bulgular aramakla zor bulunuyorsa (+), bazı alanlarda kısmen bulunuyorsa (++), hemen hemen bütün alanlarda bulunuyorsa (+++) olarak değerlendirildi.

HPV saptamak amacıyla, lezyonlu ve lezyonsuz alanları birlikte içeren uygun kesitlere digoksisinin bağlı DNA probu (Krea Tech Kat No Ap 4010 pHPV) kullanılarak, in situ hibridizasyon yöntemi uygulandı. Nitro blue tetrazolium (Krea Tech Kat No DS-OAP/SAP-3a) ve 5-Bromo 4-Chloro Indolyphosphate solüsyonu (Krea Tech Kat No DS-OAP/SAP-3b) ile renklendirme yapılan yöntemde bir tek hücre nükleusunda dahi boyanmanın saptanması pozitif boyanma olarak kabul edildi.

Aynı doku bloklarından hazırlanan kesitlerde Langerhans hücresi taramak amacıyla, immunohistokimyasal yöntem kullanılarak S-100 proteini (DAKO Code No N 1573) varlığı

araştırıldı. Renklendirici olarak diaminobenzidine (DAKO Code No S 3000) kullanıldı. Boyanan tüm lamalarda sağlam epitel ve lezyon alanlarındaki S-100 pozitif dendritik Langerhans hücreleri büyük büyütme (x40 objektif) ile sayıldı. Alanların genişliğine göre 3-10 alan değerlendirilerek ortalama bir büyük büyütme alanına düşen Langerhans hücreleri sayısal olarak değerlendirildi. Elde edilen değerler tanı ve HPV DNA pozitiflikleri ile karşılaştırıldı.

BULGULAR

Çalışma grubuna alınan 23 hastanın hepsi erkekti. Olgulardan 3 tanesi (% 13.04) papillom, 3 tanesi (% 13.04) laringeal nodül, 1 tanesi (% 4.34) displazi, (% 4.34) az diferansiye skuamöz hücreli karsinom 5 tanesi (%21.73) orta derecede diferansiye skuamöz hücreli karsinom, 5 tanesi (% 21.73) Arto derecede diferansiye skuamöz hücreli karsinom, 7 tanesi (% 30.43) iyi diferansiye skuamöz hücreli karsinomdu (tablo 1).

2 keratozis olgusunun 1 tanesinde, 2 papillom olgusunun 2 tanesinde, 13 karsinom olgusunun 9'unda olmak üzere 20 adet neoplastik olgunun 12 tanesinde (% 60) HPV DNA varlığı saptandı (resim 1) Nonneoplastik bir durum laringeal nodüllerde ise HPV DNA pozitifliği saptanmadı. HPV DNA pozitif karsinom olgularının 7 tanesi iyi diferansiye skuamöz hücreli karsinom, 2 tanesi orta diferansiye skuamöz hücreli karsinomdu. HPV DNA pozitifliği ile iyi diferansiye epidermoid karsinom arasında istatistiksel olarak anlamlı bir beraberlik mevcuttu ($p=0.04$).

Lezyona komşu sağlam epitelyal alanlar koilositozis, tek hücre diskeratozisi ve binükleozis gibi hücresel değişiklikler açısından incelendiğinde, laringeal nodüllerde lezyona komşu epitelde bu hücresel değişikliklerden hiçbirine rastlanmadı. Tüm papillom olgularında belirgin koilositozis saptanırken, diğer hücresel değişiklikler daha siki. Keratozis olgularından birinde koilostozis çok belirgindi. Skuamöz hücreli karsinom olgularında bu değişiklikler kantitatif olarak daha geniş dağılım göstermekteydi (tablo 2). HPV DNA pozitifliği ile koilostozis arasında anlamlı bir beraberlik saptandı ($p=0.02$). Oysa diskeratozis ve binükleasyon ile HPV DNA pozitifliği arasındaki ilişki anlamlı değildir (sırasıyla $p=0.32$ ve $p=0.28$).

Tablo 1 : Çalışmaya alınan olguların dağılımı

Lezyonlar	Sayı	%
Polip	1	4.35
Laringeal nodül	3	13.04
Keratozis	2	8.7
Papillom	3	13,04
Displazi	1	4.35
Az diferansiye SHK	1	4.5
Orta diferansiye SHK	5	21.73
İyi diferansiye SHK	7	30.43
Toplam	23	100

Tablo 2 : Tanılara göre saptanan histolojik değişiklikler ve HPV DNA pozitiflikleri

Tanı	K			D			M			HPV DNA pozitifliği	
	+	+	+	*	*	*	0	0	0	Sağlam epitel (Ort.hücre sayısı/x40)	Lezyon (Ort. hücre sayısı/x40)
Polip	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Laringeal nodül	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Keratozis	1	0	1	2	0	0	1	0	0	0	1
Papillom	0	3	0	1	1	0	1	0	0	0	2
Displazi	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
Az diferansiye SHK	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
Orta diferansiye SHK	3	1	1	1	1	0	3	0	0	1	2
İyi diferansiye SHK	2	4	1	3	2	0	1	0	0	3	7

Lezyona ait epiteldeki Langerhans hücreleri (resim 2) ile lezyona komşu yassı epiteldeki Langerhans hücrelerinin kantitatif değerlerindeki değişiklikler saptandı. HPV DNA pozitif 12 olgunun 8 tanesinde (% 66.6) tümördeki Langerhans hücre sayısı lezyona komşu epitele göre daha az sayıydı. Olgularda 3 tanesinde bunun tam tersi bir durum izlenirken, 1 olguda değişiklik görülmedi. HPV DNA negatif olgularda ise 11 olgunun 9'unda (% 80.1) sağlam epitelde tümöre doğru ilerledikçe Langerhans hücre sayısı arttı (tablo 3). Bununla birlikte, bu değişiklikler istatistiksel olarak anlamlı değildi. Aynı şekilde, sigara içimi ile Langerhans hücrelerinin sayısal değişimi arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir beraberlik saptanmadı.

TARTIŞMA

Çalışma grubumuzdaki papillom olgularında epitelin spinal ve yüzey tabakalarında belirgin koilositoz saptanmıştır. Diğer histolojik değişiklikler ise belirgin değildir. 3 papillom olgusunun 2 tanesinde (% 66) HPV DNA (+) epitel hücre nükleuslarının mevcut olduğu saptandı. Ancak HPV DNA saptanmayan olguda da koilositoz mevcuttu. Kullanmış olduğumuz DISH tekniği 50-100 kopya üzerindeki DNA dizilerini saptayabilmektedir. Bu tek olguda belki de saptayamayacağımız kadar az sayıda HPV DNA kopyası mevcuttu. Bununla birlikte bu olgudaki koilositoz ve Langerhans hücre sayısındaki azalma HPV varlığını dolaylı olarak desteklemektedir. Bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı olmasa da papillomlarda etiolojide HPV'nin düşünülebileceğini göstermektedir.

Laringeal nodül olgularımızın 3'ünün epitelinde de viral etkide beklenen değişikliklerin silik olduğu görüldü ve HPV DNA tespit edilemedi.

İmmunohistokimyasal teknik kullanılarak HPV kapsid proteininin saptandığı bir çalışmada epidermoid karsinomda % 12.5, verrüköz karsinomda %20 pozitiflik bulunmuştur (3). Janet L. Brandsma ve arkadaşları DNA hibridizasyon tekniği

Tablo 3 : Tanılara göre HPV DNA pozitifliği ve S100(+) Langerhans hücre sayıları

Tanı	HPV DNA Pozitifliği	Langerhans hücre sayısı	
		Normal epitel	Lezyonlu epitel
Polip	-	0	2.6
Laringeal nodül	-	0.8	3.7
Laringeal nodül	-	0	1.7
Laringeal nodül	-	2	2.6
Keratozis	-	3	9
Keratozis	+	4	0.83
Papillom	+	Saptanamadı	0
Papillom	-	2	0
Papillom	+	2.6	0.8
Displazi	-	0	0
Az diferansiye SHK	-	0.1	1.87
Orta diferansiye SHK	+	0.1	0.25
Orta diferansiye SHK	+	11.9	11.4
Orta diferansiye SHK	-	3.2	4.5
Orta diferansiye SHK	-	1.9	5.7
Orta diferansiye SHK	-	1.3	9.2
İyi diferansiye SHK	+	1.4	10.12
İyi diferansiye SHK	+	4.3	2.3
İyi diferansiye SHK	+	0.1	0
İyi diferansiye SHK	+	3.9	3.5
İyi diferansiye SHK	+	0.83	6.8
İyi diferansiye SHK	+	17	2.1
İyi diferansiye SHK	+	3.2	0.5

kullanarak larinks verrüköz karsinomlu 6 vakanın hepsinde HPV DNA elde etmiş, ancak bunların hiçbirinde İHK olarak HPV antijeni saptayamamıştır (13). Bu sonuçlar iki metod arasındaki farklılığı açıkça göstermektedir. DNA kopya sayısının 10'dan daha az olduğu durumlarda DNA ISH tekniği HPV DNA'sını saptayamaktadır. Bu gibi durumlarda DNA kopya sayısını saptanabilir seviyeye ulaştıracak PCR gen amplifikasyon tekniği geliştirilmiştir. Milton T. Kiyabu ve arkadaşları PCR metodu ile 10 larinks skuamöz hücreli karsinom olgusunun 4'ünde (% 40) HPV DNA pozitifliği saptamışlardır (14). Bu metodun dezavantajı morfolojik bütünlüğün olmamasıdır. Ancak, son yıllarda aranan gen parçasının lokalizasyonunu saptayan DNA ISH ile tek bir geni amplifiye edip gösterebilen PCR yöntemlerini birlikte kullanan yeni ve çok duyarlı metodlar geliştirilmektedir.

13 SHK vakasının 9'unda (% 69.2) DNA ISH tekniği ile özellikle malign epitelyal hücrelerde olmak üzere HPV DNA(+) hücre nükleusları saptandı. Sağlam yassı epitel alanlarındaki HPV DNA(+) hücre nükleusların spinöz ve granüler hücre tabakalarında lokalize oluşu, literatürlerde bildirilen lokalizasyonlarla uyumluydu (8,15). Çalışmamızda HPV DNA pozitifliği oldukça yüksek oranda saptanmasına rağmen istatistiksel değerlendirme ve bu etiyolojik ilişki gösterilememiştir.

Bir çalışmada karsinom diferansiyasyonu ile HPV DNA (+)'liği arasında anlamlı beraberlik saptanamazken (16), çalışmamızda iyi diferansiye karsinomlarla HPV DNA (+) liği arasında istatistiksel olarak anlamlı beraberlik ($p=0.04$) saptanmıştır. Yine aynı çalışmada HPV DNA(+) karsinomların (-) olanlara göre daha genç yaşlarda olduğu saptanmıştır. Çalışmamızda böyle bir ilişki mevcut değildir.

Çalışmamızda benign ve malign tüm vakalarda hücresel değişikliklerdeki şüpheli pozitiflikler negatif gruplara dahil

edildiğinde HPV DNA (+) arasında istatistiksel olarak anlamlı beraberlik ($p=0.02$) saptandı. Fakat diğer hücresel değişikliklerle bu beraberlik görülmedi.

Larinks lezyonlarında HPV DNA pozitifliğiyle Langerhans hücresi kantitatif değerleri arasındaki ilişki pek incelenmemiş, daha çok servikal lezyonlarda böyle bir ilişki üzerinde durulmuştur. HPV pozitifliğinin eşlik ettiği servikal intraepitelyal neoplazilerde (CIN) Langerhans hücre sayısının azaldığı; HPV negatif CIN'larda ise çevre normal epitele göre lezyonun şiddetiyle orantılı olarak bu hücrelerin ve dentritik dallanmalarını arttığı hücrel immun savunmayı bozan lokal immun yetmezliğe neden olabileceği belirtilmiştir (17). S-100 proteininin, muhtemelen T hücresinde intrasellüler serbest kalsiyum iyon konsantrasyonunun değiştirerek, T hücresinin antijene olan cevabını aktive ettiği düşünülmüş, S-100 proteinindeki yetersizliğin HPV replikasyonuna ve neoplastik gelişime izin veren kazanılmış immun yetmezliğe sebep olabileceği bahsedilmiştir (19).

Çalışmamızda HPV (+) vakalar ve karsinomlar hariç tutulduğunda polip, 2 laringeal nodül, displazi, 1 keratozis tanıli hastada, sigara kullanımına karşın, S-100 (+) Langerhans hücrelerine ait kantitatif değerlerin sağlam alanlarda lezyona doğru arttığı saptandı. Hasta sayısı sınırlı olduğundan bu değerlerin istatistiksel olarak anlamlılığı yoktu. Ayrıca, hastaların biyopsi alınmadan önceki dönemlere ait steroid tedavisi, radyoterapi konusunda sağlıklı bilgi elde edilemedi. S-100(+) Langerhans hücrelerindeki kantitatif değerler HPV DNA pozitifliğiyle karşılaştırıldığında 12 HPV DNA(+) olgudan 8'inde (% 66.7) S-100(+) Langerhans hücrelerinin sağlam epitelyal alandan lezyona ait epitelyal alana doğru azaldığı saptandı.

Tüm bu sonuçlarla birlikte değerlendirildiğinde, özellikle iyi diferansiye SHK ile HPV pozitifliği arasında anlamlı bir ilişkinin olması karsinomların etiyolojinde HPV'nin rol oynadığını düşündürmektedir.

KAYNAKLAR

1. Cotran RS, Kumar V., Robbins SL. Robbins Pathologic Basis of Disease. 5th Ed Philadelphia. Saunders, 1995; Ch 7:241-304, Ch 16: 735-754.
2. Sperry K.: Lethal asphyxiating juvenile laryngeal papillomatosis: A case report with Human Papillomavirus in situ hybridization analysis. Am J For Med Path. 1994;5(2): 146-150,
3. Akyol MU. Human papilloma virüs enfeksiyonunun laringeal papillomatosis, larinks verrüköz kanseri ve larinks epidermoid kanseri ile ilişkisinin immunohistokimyasal yöntemle araştırılması, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi, 1990.
4. Ataman M, Sungur A, Tuncer MA.: Juvenil laringeal papillomatosis human papilloma virüs enfeksiyonu, Ankara Patoloji Bülteni 1989;11(1): 19-21,
5. Bomholt A. Juvenil laringeal papillomatosis an epidemiological study from Copenhagen Region, Acta Otolaryngol (STCKH) 1988;105: 367-371,
6. Broker TR. Structure and genetic expression of papillomaviruses, Obstet Gynecol Clin North Am 1987;14: 329-348,
7. Byrne JC, Tsao MS, Fraser RS. HPV 11 DNA in patient with chronic laryngotracheobronchial papillomatosis and metastatic squamous-cell carcinoma of the lung. NEJM. 1987;317(14): 873-878,
8. Kirchner H. Immunobiology of human papillomavirus infection, Prod Med Virol 1986;33: 1-41,
9. Krebs HB. Milestones in HPV Research, Clin Obst Gynecol 1989;32: 107-111,
10. Ostrow RS, Faras AJ. The molecular biology of HPVs and the pathogenesis of genital papillomas and neoplasms. Cancer and Met Rev. 1987;6:383-395,
11. Quiney RE, Wells M, FA. Laryngeal Papillomatosis: Correlation between severity of disease and presence of HPV 6 and 11 detected by in situ DNA hybridization, J Clin Pathol 1989;42: 694-698,
12. Seçkin S, Aksoy F, Tezcan S, Dündar İ, Ortaç F, Yavuz H. Servikal neoplazi (CIN) ve human papilloma virüs enfeksiyonunda Langerhans hücreleri. Ankara Patolog Bülteni 1994;11(1) 22-24,
13. Brandsma JL, Steinberg BM, Abranson AL, Winkler B: Presence of Human Papillomavirus Type 16 related sequences in verrucous carcinoma of the larynx. Cancer Res 1986;46: 2185-2188,
14. Kiyabu MT. et al. Detection of HPV in formalin fixed invasive squamous carcinoma using the polymerase chain reaction. Am J Surg Pathology. 1989;13(3): 221-224,

15. Swoboda H, Braun P, Schratter M: Zum Problem der pulmonalen Kanzerisierung der juvenilen Larynxpapillomatose, Laryn Rhinol Otol 1987;66: 557-561,
16. Hoshikawa T, Nakajima T, Uhara H, Gotoh M, Shimosato Y, Tsutsumi K. Detection of human papillomavirus DNA in laryngeal squamous cell carcinomas by polymerase chain reaction. Laryngoscope 1990;100: 647-650,
17. Barton SE, Hollingworth A, Maddox PH, Edwards R, Cuzick J, McCance DJ. Possible cofactors in the etiology of cervical intraepithelial neoplasia. An immunopathologic study. J Rep Med 1989;34: 613-616,
18. Hawthorn RJS, Murdoch JB, MacLean AB, MacKie RM. Langerhans' cells and subtypes of human papillomaviruses in cervical intraepithelial neoplasia. Br J Med 1988;297: 643-646,
19. Tay SK, Jenkins D, Maddox P, Campion M, Singer A. Subpopulation of Langerhans' cells in cervical neoplasia. Br J Obstet Gynecol 1987;94: 10-15, 1987.