

SERVİKAL KANSERLİ TÜRK KADINLARINDA HUMAN PAPİLOMA VİRUS İNSİDANSİNİN "POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU" İLE BELİRLENMESİ*

Sabahattin ALTUNYURT*, Berrin ACAR*, Serkan GÜÇLÜ*, Oktay ERTEN*, Neşe ATABEY**,
Kutsal YÖRÜKOĞLU***, Meral SAKIZLI**

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı*

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı**

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı***

ÖZET

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) metodu ile İzmir ve çevre bölgelerindeki servikal kanserli kadınlardaki Human Papilloma Virus (HPV) insidansının belirlenmesi amacıyla servikal kanser tanısı almış 79 hastanın formalin ile fiksé edilmiş ve parafine gömülü bloklarında PCR yöntemi ile çalışıldı. Patolojik incelemede vakaların 44'ünde servikal intraepitelial neoplazi, 15'inde adeno karsinoma, 19'unda skuamoz hücreli karsinoma ve 1 vakada da mikst tipte karsinoma tanısı kondu. Servikal premalign veya malign bir patolojisi olmayan 22 hasta da kontrol grubu olarak belirlendi. Tüm örneklerde PCR metodu kullanılarak HPV DNA saptanmaya çalışıldı ve sonuçlar birbirileyle kıyaslandı.

Anahtar sözcükler: Servikal kanser, HPV, Polimeraz Zincir Reaksiyonu

SUMMARY

We investigate the incidence of Human Papilloma Virus (HPV) by Polymerase Chain Reaction (PCR) Method in formaline fixed paraffine blocks of 79 cases of uterine cervical cancer in Turkish women from Izmir and surrounding. Cases were classified according to the pathological diagnosis as cervical intraepithelial neoplasia (n=44), adenocarcinoma (n=15), squamous cell carcinoma (n=19) and mixed type carcinoma (n=1). Another 22 cases without any premalignant or malignant cervical lesions were handled as a control group. HPV - DNA was determined by PCR method in all samples and results were compared.

Key words: Cervical cancer, HPV, Polymerase chain reaction

Serviks kanserinin gelişiminde Human Papilloma Virus'un (HPV) rolü şimdije kadar yapılan klinik, epidemiyolojik ve eksperimental veriler ile gösterilmeye çalışılmıştır (1-6). Çeşitli teknikler kullanılmış, farklı coğrafi bölgelerde çalışılmış ve sonuçta birbirinden farklı sonuçlar bildirilmiştir (7-10). Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) tekniği HPV'un saptanmasında oldukça duyarlı bir testtir (11,12). Halen bu alanda yapılan değişik çalışmalar olup, PCR tekniğinin biopsi örneklerinde ön bir

tarama yöntemi olarak kullanılabileceğini düşününterler vardır (13-20). HPV'nin serviks neoplazmlarının patogenezinde rolü olduğu gösterilebilirse bu alanda serumda HPV'ye spesifik proteinleri saptayan bazı basit tarama testlerinin geliştirilebileceği ve aşılama yöntemi ile koruyuculuk sağlanabileceği yolunda hipotezler vardır (21,22).

Ülkemizde bu alanda yok denecék kadar uzun çalışma yapılmıştır. Bu çalışma ile fiksé edilmiş

* Bu çalışma 5.Uluslararası Obstetrik ve Jinekoloji Kongresinde (İZMİR, 5-8 Mayıs 1999) tebliğ olarak sunulmuştur.

parafinli servikal doku örneklerinde PCR yöntemi kullanılarak ön bir tarama yapıp, HPV'nin Türk toplumunun küçük bir örnekleminde, servikal neoplazilerde ne oranda görülebileceği saptanmak istenmiştir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma 44 servikal intraepitelial neoplazi (CIN) (21 CIN I, 14 CIN II, 9 CIN III), 19 skuamoz hücreli karsinom (SCC), 15 adenokarsinom (AC) ve 1 mikst tip karsinoma saptanmış toplam 79 olgunun formalinle fiks edilmiş parafin bloklarından HPV DNA'sının izole edilmesi amacıyla yapıldı. Servikal patoloji göstermeyen 22 olgu da kontrol grubu olarak seçildi.

Patolojik İşlem

101 hastaya ait parafine gömülü normal ve kanserli servikal dokulardan 0.7 mikron kalınlığında alınan kesitlerden deparafinizasyon sonrasında tuz ile çök-türme yöntemi kullanılarak DNA elde edildi (23). HPV L1 bölgesine özgü dejenere MY09/MY11 primerleri (MY11: 5' GCM CAG GGW CAT AAY AAT GG 3' ve MY09: 5' CGT CCM ARR GGA WAC TGA TC 3') M: A/C R: A/G W: A/T (Kits and Probe Almanya) kullanılarak Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile amplifikasyon gerçekleştirildi. PCR'de negatif kontrol olarak distile su ve pozitif kontrol olarak ise plazmide takılı HPV L1 DNA'sı kullanılmıştır. Toplam 50 μ l içinde gerçekleştirilen HPV PCR'de kullanılan maddelerin son konsantrasyonları ve sıcaklık profili Tablo I ve Tablo II'de verilmiştir.

PCR ürünlerini %1.5'lik agaroz jei elektroforezi sonrasında etidium bromid ile boyanarak U.V. transilluminatörde görünür hale getirilerek fotoğraflandı (23).

Tablo I: HPV PCR için sıcaklık profili

Sıcaklık (°C)	Süre (Dakika)	Döngü sayısı
94	7	1
94	1	
55	2	35
72	1	
72	7	1

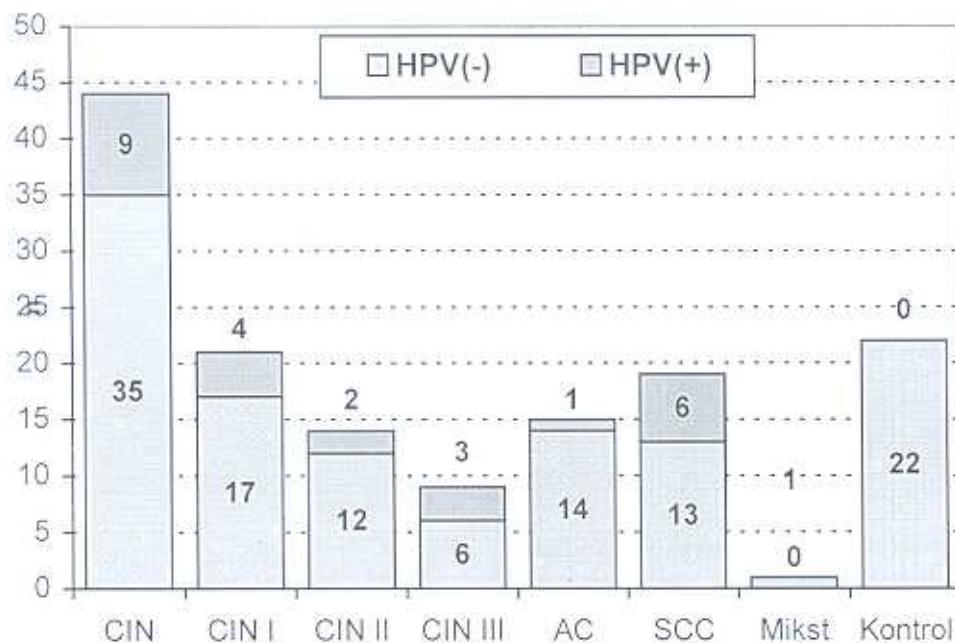
Tablo II: HPV PCR'da kullanılan maddeler ve son konsantrasyonları

Kullanılan maddeler	Son Konsantrasyonları
10x PCR Tamponu* (Appligene, Oncor)	1X
dNTP (Sigma)	200 nM
Primer 1 (MY11)	20 pmol
Primer 2(MY09)	20 pmol
Taq DNA Polimeraz (Appligene, Oncor)	1.25 Ünite
Kalıp	200 ng

*10x PCR Tamponu içinde 1.5 mM MgCl₂ bulunmaktadır.

SONUÇLAR

PCR yöntemi ile 79 servikal patolojili hastanın parafin bloklarından 44 CIN olgunluğunun 9'unda HPV DNA'sı saptanmış olup bu patolojide görülmeye oranı %20.45 olarak belirlenmiştir. CIN I olgularının 4'ünde (%19), CIN II olgularının 2'sinde (14.2) ve CIN III olanların 3'ünde (%33.3) HPV DNA'sı pozitif olarak tespit edilmiştir. 19 SCC'lu olgunun 6'sında (%31.6), AC'ların 1'inde (%6.7) ve mikst tip karsinoma olan olguda da aynı pozitiflik gösterilmiştir. Genel olarak HPV DNA'sının serviks'in premalign ve malign lezyonlarında %21.5'lik bir oranda pozitifliği saptanırken, servikal patolojisi olmayan 22 olgudan alınan örneklerin hiç birinde HPV DNA'sının varlığı gösterilememiştir (Şekil 1, Tablo III). HPV DNA'sının görülmeye insidīnsı CIN I, CIN II ve AC'da CIN III ve SCC olan olgulardan daha düşük bulunmuştur.



AC: Adenokarsinom
SCC: Skuamoz hücreli karsinom
CIN: Servikal İntraepitelyal Neoplazi

Şekil 1: HPV DNA saptanma oranları

Tablo III: HPV DNA saptanma oranları

Grup	HPV (+)/Total	Oran (%)
CIN	9/44	20.45
CIN I	4/21	19.0
CIN II	2/14	14.2
CIN III	3/9	33.3
AC	1/15	6.7
SCC	6/19	31.6
Mikst	1/1	100
Kontrol	0/22	0

CIN: Servikal İntraepitelyal Neoplazi

AC: Adenokarsinom

SCC: Skuamoz hücreli karsinom

TARTIŞMA

Değişik coğrafi bölgelerde HPV insidansının farklı bulunması nedeniyle Türk kadınlarındaki HPV'nin

yaygınlığım anlamak açısından bu çalışma gerçekleştirilmiştir. Daha önce yapılan bazı çalışmalarında servikal kanserin gelişiminde suçlanan HPV'nin saptanmasına yönelik çeşitli yöntemler karşılaştırılmış ve formalinle fiks edilmiş parafin bloklara gömülü servikal dokuların HPV saptanmasında uygun olduğu ve hem in situ hibridizasyonun hem de PCR'nin bu arşiv dokularda çalışılabilcecigi ifade edilmiştir (16,24,25). Bu bulgular ışığında formalin ile fiks edilmiş parafin bloklar iyi bir örnek olacağı için PCR yöntemi kullanılarak ön bir tarama yapılmak istenmiştir. Meyer ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada (26) HPV DNA'sı L1 uyumlu PCR

metodu ile bakıldığından normal örneklerde %28, Condyloma Accuminata'da %0, düşük grade'li skuamoz intra epitelial lezyonlarda %12, yüksek grade'li skuamoz intraepitelial lezyonlarda %8 ve servikal karsinomlarda ise %4 olarak saptanmıştır. Ancak Zazove ve arkadaşları ise (11) CIN'li vakalarda %24.6. Condyloma Accuminata vakalarında ise %7.6'luk HPV pozitifliği bildirmiştirlerdir. Suruk ve arkadaşları ise (9) Uygur kadınlarda yaptıkları bir çalışmada E6 tipe spesifik PCR metodunun L1 uyumlu PCR metodundan daha hassas olduğunu bildirmiştir ve serviks'in skuamoz hücreli kanserlerinde ilk metodla HPV DNA'sının %77.6 (+) bulurken, ikincisi ile %22.4'lük (+) sonuç gösterdiğini saptamışlardır. Bu çalışmada ise 19 SCC olgusunda L1 uyumlu PCR metodu ile %31.6 gibi bir oranı bulunmuş olup, ayrıca CIN III ve SCC'da

görülmeye oranının (%33.3 ve %31.6) CIN I, CIN II ve AC olgularından (%19, %14.2 ve %6.7) daha fazla olduğu saptanmıştır. Meksika, Hindistan ve İspanya gibi değişik coğrafi bölgelerden farklı sonuçlar bildirilmiştir (21,27,28). Ancak bu çalışmalardaki yöntem farklılıklarının da göz önünde tutulması gerekmektedir.

Son zamanlarda servikal kanserin oluşumunda HPV'nin rol oynadığı düşünüлerek, onu özel yöntemlerle serumda antikor saptama ile tesbit etme ve hatta aşılama ile korunmaya yönelik çalışmalar yapılmaktadır (21). Bizim de genel Türk populasyonunun HPV DNA'sının özelliklerini ortaya çıkarmak amacıyla yaptığı bu çalışmanın sonucunda, bu konuda daha fazla vaka içeren ileri çalışmalar yapılması gerektiği kamışına varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Gissmann L, Schneider A: Role of human papilloma virus in genital cancer, Herpes and Papillomavirus, Edited by G De Palo, F Rilke, H zur Hausen. New York, Serzona Symposia Publication, Raven Press 1986;31:15-25.
2. De Villiers EM, Gissmann L, zur Hausen H: Molecular cloning of viral DNA from human genital Warts. J Virol 1981;40:932-935.
3. Boshart M, Gissmann L, Ikenberg H, Kleinheinz A, Scheurlen W, zur Hausen H: A new type of papillomavirus DNA: Its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. EMBO J 1984; 3:1151-1157.
4. Durst H, Kleinheinz A, Hotz M, Gissmann L: The physical state of human papillomavirus type 16 DNA in benign and malignant genital tumors. J Gen Virol 1985;66:1515-1522.
5. Beaudenon S, Kremsdorff D, Ciroissant O, Jablonska S, Wain-Hobson S, Orth G: A novel type of human papiloma virus associated with genital neoplasias. Nature 1986;321:246-249.
6. Banner W, Darin C, Borkhuis C, de Mesy Jenson K, Reichman RC, Rose RC: Isolation and propagation of human papillomavirus type 16 in human xenografts implanted in the severe combined immunodeficiency mouse. J Viral 1998;72:5256-5261.
7. Adam E, Kaufman RH, Berkova Z, Icanogle J, Reeves WC: Is Human papilloma virus testing an effective triage method for detection of high

- grade (grade 2 or 3) cervical intraepithelial neoplasia? *Am J Obstet Gynecol* 1998;178: 1235-1244.
8. Sano T, Hikino T, Niwa Y et al. In situ hybridization with biotinylated tyramide amplification. *Mod Pathol* 1999; 11: 19-23.
 9. Suruk L, Noffsinger AE, Aili M. Detection of human papillomavirus DNA in cervical squamous cell carcinoma in Xinjiang Uygur women. *Chung Hua Fu Chan Ko Tsa Chih* 1997;32:405-408.
 10. Virtaj P, Maie M, Badea M, Badea I, Popa O. Cervical intraepithelial neoplasia and Human Papillomavirus infection. *Eur J Gynaecol Oncol* 1998;19:179-181.
 11. Zazove P, Reed BD, Gregoire L, Ferenczy A, Gorenflo DW, Lancaster WD. Low false-negative rate of PCR analysis for detecting human papillomavirus-related cervical lesions. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 2708-2713.
 12. Karaloglu D, Yazici H, Alatli C, Yaman F, Aslay I, Onat H, Dalay N. Detection of HPV 16 and HPV 18 infection in patients with cervical neoplasia. *Eur J Gynaecol Oncol* 1996; 17: 296-298.
 13. Lorincz AT. Molecular methods for the detection of human papillomavirus infection. *Obstet Gynecol Clin North Am* 1996; 23: 707-730.
 14. Saegusa M, Okayasu I. DCC expression is related to mucinous differentiation but not changes in expression of p21(WAF1/Cip1) and p27kip1, apoptosis, cell proliferation and human papillomavirus infection in uterine cervical adenocarcinomas. *Br J Cancer* 1999; 80: 51-58.
 15. Mitsuhashi A, Tanaka H, Tanaka N, Sugita M, Shirasawa H, Tokita H, Eda H, Jekiya S. Establishment and characterization of a new HPV-negative squamous cell carcinoma cell line (Yumoto) from the human uterine cervix. *Gynecol Oncol* 1998; 70: 339-347.
 16. Lombard I, Vincent-Salomon A, Validire P, Zafrani B, de la Rochedordiere A, Clough K et al. Human papillomavirus genotype as a major determinant of the course of cervical cancer. *J Clin Oncol* 1998; 16: 2613-2619.
 17. Ho GY, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ, Burk RD. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med* 1998; 338: 423-428.
 18. Merkelbach-Bruse S, Jakob C, Tietze L, Schroder W, Rath W, Fuzesi L. Consensus polymerase chain reaction and enzyme-linked immunosorbent assay for human papillomavirus detection and typing in cervical specimens. *Diagn Mol Pathol* 1999; 8: 32-38.
 19. Lee MF, Chang MC, Wu CH. Detection of human papillomavirus types in cervical adenocarcinoma by the polymerase chain reaction. *Int J Gynaecol Obstet* 1998; 63: 265-270.
 20. Tabrizi SN, Fairley CK, Chen S, Borg AJ, Baghurst P, Quinn MA, Garland SM. Epidemiological characteristics of women with high grade CIN who do and do not have human papillomavirus. *Br J Obstet Gynaecol* 1999;106: 252-257.
 21. Lizano M, Garcia-Carranca A. Molecular variants of human papillomaviruses types 16, 18 and 45 in tumors of the uterine cervix in Mexico. *Gac Med Mex* 1997;133 (Suppl) 1:43-48.
 22. Orth G, Croissant O. Human papilloma viruses and carcinogenesis of the uterine cervix: future

- prospects in the domain of detection and prevention. *J Med Viral* 1998;54:192-195.
23. Ting Y, Manos MM (eds.) Detection and typing of genital human papilloma viruses. In: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications Academic Press 1990, 356-367.
24. Unger ER, Vernon SD, Lee DR, Miller DL, Reeves WC. Detection of human papillomavirus in archival tissues: Comparison of in situ hybridization and polymerase chain reaction. *J Histochem Cytochem* 1998;46:535-540.
25. Guney I, Ince U, Kullu S, Pekin S, Cirakoglu B. Detection and typing of human papillomavirus in cervical specimens of Turkish women. *Eur J Gynaec Oncol* 1997;18:546-550.
26. 26-Meyer T, Arndt R, Cristophers E et al. Association of rare human papillomavirus types with genital premalignant lesions. *J Infect Dis* 1998;178:252-255.
27. Munirajan AK, Kannan K, Bhuvarahamurthy V et al. The status of human papillomavirus and tumor suppressor genes p53 and p16 in carcinomas of uterine cervix from India. *Gynecol Oncol* 1998;69:205-209.
28. Canadas MP, Martinez F, de Sanjose S, Valls I, Cloveras B, Bosch FX, Shah K. Detection of human papillomavirus DNA by PCR in high-risk women. Validation of a protocol. *Enferm Infect Microbiol Clin* 1998; 16: 400-403.