

SERVİKS KANSERLİ OLGULARDA "SOUTHERN BLOT HYBRİDİZATİON" METODU İLE HUMAN PAPİLLOMA VİRUS DNA'SININ SAPTANMASI*

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

Servikal premalign ve malign lezyonlu vakalarda çeşitli Human Papilloma Virus (HPV) tiplerinin DNA'sının varlığının oranını saptamak amacıyla servikal biyopsi veya histerektomi materyallerinden elde edilen 19 doku spesmeni üzerinde "Southern Blot Hybridization" metodu kullanılarak örneklerde HPV DNA'sı ve HPV tipi belirlendi. Tüm örneklerin 9'unda (%47.4) HPV DNA saptanmıştır. SCC grubunda 2 HPV tip 16 (%12.5), 2 HPV tip 18 (%12.5) ve 1 HPV tip 35 (%6) tesbit edildi. AC vakasının örneğinde HPV tip 18 saptandı. CIN grubunda sadece 1 vakada HPV tip 16 saptandı.
Anahtar sözcükler: Serviks kanseri, HPV, Southern Blot Hybridization

SUMMARY

We determined the incidence of certain types of Human Papilloma virus (HPV) DNA by "Southern Blot Hybridization" in 19 cervical premalignant and malignant specimens which were obtained by cervical biopsies or hysterectomies. We have found HPV DNA in 9 of all specimens (47.4%). In SCC group we have isolated 2 HPV type 16 (12.5%), 2 HPV type 18 (12.5%) and 1 HPV type 35 (1/16%). HPV type 18 was isolated from the specimen of AC. In CIN group HPV type 16 was isolated only in 1 case.

Key words: Cervical cancer, HPV, Southern Blot Hybridization

Human Papilloma Virusu (HPV) seksüel yolla geçen bir patojen olup, serviksin premalign ve malign hastalıklarının patogeneğinde rol oynadığı düşünülmektedir. HPV'yi belirlemek için henüz ideal bir yöntem saptanamamıştır. Bu virüsün 70 civarında tipi vardır. Southern hybridization (SH) tekniği ile birçok çalışmada HPV araştırması yapılmıştır (1-4). SH ve Dot Filter Hybridization (DFH) gibi DNA hybridization metodları

kullanılarak 20'den fazla HPV tipi servikal neoplazilerde gösterilmiştir (5). HPV Tip 6,11 ve 42 genellikle benign genital kondilomlarda ve düşük dereceli servikal displazilerde izole edilirken, Tip 16, 18 ve daha az sıklıkla da Tip 31, 33 ve 35'in servikal ve vulvar intra-epitelial ve invaziv karsinomların tüm derecelerinde saptandığı bildirilmiştir (6-12). Bazı otörlerin; servikal kanserlerdeki HPV prevalansı ile tümörün histo-

* Bu Çalışma 5.Uluslararası Obstetrik ve Jinekoloji Kongresinde (Hilton Oteli,İZMİR,5-8 Mayıs1999) tebliğ olarak sunulmuştur.

patolojisi, klinik görünümü ve hastalığın prognozu arasında korelasyon olduğunu bildirmesine karşın, bu sonuçları doğrulamayanlar da vardır (13,14). Bazı araştırmacılara göre HPV 16 tipi, iyi diferansiyel keratinize lezyonlarda, HPV 18 tipi ise kötü diferansiyel, kötü prognoz gösteren adenokarsinomlarda daha fazla görülmektedir (15-18). Bazı çalışmalarda, HPV (-) karsinomlarda mortalite fazla bulunurken, bazı araştırmaların sonuçları ise bu görüşü desteklememiştir (19-23). Türkiye’de ise serviks neoplazmlarında HPV izolasyonu ile yapılan çalışmalar çok az olduğu için böyle bir çalışma yapma gereksinimine ihtiyaç duyulmuştur.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bir sene içinde Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı’na başvuran hastalarda servikal smear ve kolposkopisi normal olmayan, tedavi edilmemiş, biopsi incelemesi sonucu premalign ve malign servikal patoloji tanısı almış 19 olguda aynı zamanda biopsi örneklerinde SH metodu ile HPV Tip 6,11,16,18,31,33 ve 35’in DNA’larının izolasyonu için testler yapıldı. Hastaların yaşları 35 ile 75 arasında olup, ortalama yaş 51.52 ± 8.68 idi. Serviks patolojili olguların yaşları, histolojik tanısı, uluslararası jinekoloji ve obstetri federasyonu (FIGO) klasifikasyonu ve HPV tiplerini Tablo 1’de gösterildi.

Biopsi ve histerektomi materyallerinden elde edilen dokular %10 tamponlu formalin ile fikse edildikten sonra parafin bloklara gömüldü ve 5µm aralıklarla kesit alındı. Kesitler hematoxilen ve eosin boyaları ile boyanıp ışık mikroskopunda incelendi.

Tablo 1: Hastaların yaş, histolojik tanı FIGO evresi ve HPV tiplerine sonuçları dağılımı

Yaş	Histoloji	FIGO Stage	HPV tipi
71	SCC	3B	HPV 35
48	SCC	1B	HPV (-)
52	SCC	1B	HPV 16
54	SCC	1A	HPV (-)
55	SCC	1A	HPV (-)
60	SCC	1B	HPV (-)
42	AC	3A	HPV 18
56	SCC	2A	HPV X
50	SCC	1A	HPV (-)
48	SCC	1A	HPV (-)
48	CIN II		HPV 16
58	SCC	1A	HPV (-)
53	SCC	IV	HPV 16
45	CIN I		HPV (-)
41	SCC	1A	HPV (-)
35	SCC	2A	HPV 18
53	SCC	3B	HPV (-)
66	SCC	3B	HPV X
44	SCC	1B	HPV 18

AC: Adenokarsinom

SCC: Skuamoz hücreli karsinom

CIN: Servikal Intraepitelyal Neoplazi

Patolojik İnceleme

DNA izolasyonu

Doku örnekleri 1 ml toplama solusyonunda saklandı (STE= 10 mM Tris HCl pH 8.0, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA). Örnekler %0.5’lik sodyum dodesil sülfat (SDS) varlığında sindirilmesi için proteinaz K ile bir gece 55°C’de bekletildikten sonra DNA saptama işlemi uygulandı. DNA etanol ile çöktürülüp TE tamponu (10 mM Tris HCl pH 8.0, 0.1 mM EDTA) ile ayrıştırıldı. Örneklerin DNA içeriği spektrofotometre kullanılarak tesbit edildi.

HPV DNA'nın ve tiplerinin saptanmasında SBH analizi

Total 30 µL hacminde 37°C'de su banyosunda gece boyunca tutulan yaklaşık 10 µg tümör DNA'sı HPV Restriction Enzyme Mix (Oncor S 6606) ile parçalandı. 5 µg jel yükleme solüsyonu reaksiyonu durdurmak için her bir tüpe eklendi. DNA örnekleri %1'lik (w/v) agarose jel içinde elektroforez ile fraksiyonlara ayrıldı. Düşük konsantrasyonda (Oncor S 6618) ve yüksek konsantrasyonda pozitif kontroller (Oncor S 6617) ve biyotin ile işaretlenmiş moleküler ağırlık belirteci (Oncor S 6616) her bir jele yüklendi. Örnekler kontroller ve moleküler ağırlık belirteci nitroselüloz filtreye (Sure Blot Hybridization membranes Oncor S 6615) transfer edildi. Filtreler daha sonra 70°C'de 30 dakika fırınladı ve 50°C'de 2 saat süreyle prehibridizasyon solüsyonunda prehibridize edildi ve HPV tip 6, 11, 16, 18, 31, 33 ve 35 problemleri (Oncor S 6619) için biyotin ile işaretlenmiş HPV analiz "probe mix" ile hibridize edildi. Hibridizasyon 50°C'de 2 saat süre ile yapıldı. Filtreler oncors protokolüne göre 0.16 x SSC ve %0.5 SDS içeren solüsyonlarda yıkandı. Hibridizasyon 1X Membran Durdurma Solüsyonu (MBS Oncor S 6620) ile durduruldu. Streptavidin Solüsyonu (Oncor S 6625) 10 dakika süre ile membran üzerine eklendi ve üç kez 1XSCC ile yıkandı. Alkaline fosfatase (Oncor S 6626) 10 dakika süre ile eklendi ve 1x Yıkama Tamponu (Oncor S 6627) ile 4 kez yıkandı. Bundan sonra 5 dakika boyunca 1x Boyama Tamponu (Oncor S

6628) eklendi. NBT (Oncor S 6629) ve BCIP (Oncor S 6630) solüsyonu boyama solüsyonuna eklendi. Tepsi alüminyum folyo ile kaplandı ve 16-18 saat süreyle karanlıkta 37°C'de inkübe edildi. Membran %70 etanol ile durulandı ve 70°C'de 30 dakika süre ile fırınladı. Bütün boyanmış membranlar mavi zeminden kaçınmak için karanlıkta tutuldu.

Sonuçların açıklanması

Aynı bantların gözlenmesi ile bir örnekte HPV DNA'sının varlığı konfirme edilmiştir. Aynı blot'ta bulunan ve bilinen kontrollerin aynı bantlarda migrasyonunu karşılaştırarak aynı örnekteki HPV tipi belirlendi. Bir örneğin yalnız bir bant içermesi durumunda ve HPV belirteç bantlarından biriyle aynı sırada olmaması durumunda örnek "HPV X" olarak adlandırıldı. Southern blot tekrarlanabilirliği, örneklerin yeniden test edilmesi ile belirlendi.

BULGULAR

19 olgunun 9'unda (%47.4) HPV DNA saptanmış olup, skuamoz hücreli karsinomali (SCC) 16 hastanın 2'sinde (%12.5) HPV tip 16, 2'sinde (%12.5) tip 18 ve 1'inde de tip 35 izole edildi. 2 olguda HPV DNA olduğu gösterildiği halde tiplene yapılamadı. Adenokarsinomali (AC) olguda HPV tip 18, servikal intraepitelyal neoplazili (CIN) olgulardan 1'inde de HPV tip 16 olduğu gösterildi. HPV tip 16 ve 18 görülme oranı tüm olguların %15,8'ini oluşturmaktaydı. Her iki tipin prevalansı SCC'de benzerlik gösteriyordu (Tablo II). HPV DNA (+) olanlarla (-) olanlar arasında yaş açısından fark yoktu.

Tablo II. Vakaların HPV tip prevalansları

HPV Tipi	SCC (n=16)	AC (n=1)	CIN (n=2)	Total (n=19)
HPV Tip 16	2 (%12.5)		1 (%50.0)	3 (%15.8)
HPV Tip 18	2 (%12.5)	1 (%100)		3 (%15.8)
HPV Tip 35	1 (%6.25)			1 (%5.3)
HPV Tip X	2 (%12.5)			2 (%10.5)
Total (-)	9 (%56.25)	0 (%0)	1 (%50.0)	10 (%52.6)

AC: Adenokarsinom

SCC: Skuamoz hücreli karsinom

CIN: Servikal İntraepitelyal Neoplazi

TARTIŞMA

Servikal kanser ve displazi olgularında HPV DNA prevalansı Southern Blot yöntemiyle tesbit edilmiştir. Uterin serviks karsinomalarında HPV'nin rolünün araştırıldığı diğer çalışmalara kıyasla %47.4'lük HPV pozitifliği daha düşük bulunmuştur. Örneğin Southern Blot tekniğini kullanarak Lombard ve arkadaşları (2) %83, Ikenberg ve arkadaşları (14) %72.7 ve Riou ve arkadaşları (20) da %81 oranında HPV pozitif tümör belirlemişlerdir. Bu oranlar bizim bulduğumuz %47.4'lük pozitiflik oranına kıyasla oldukça yüksek olsalar da 1996'da Karaloğlu ve arkadaşlarının (24) İstanbul'dan yayınladıkları bir çalışmada yine aynı metod kullanılarak servikal karsinoma örneklerinde HPV pozitifliği %45.4 olarak bulunmuştur. İstanbul'dan açıklanan bu değer diğerlerinin aksine bizim oranımıza yakındır ve Türk kadınlarında HPV pozitifliğinin Avrupa ve Amerika'daki oranlardan daha düşük olduğu fikrini desteklemektedir. Ayrıca bizim çalışmamızın sonuçları Güney ve arkadaşlarının (25) sonuçları ile de paralellik göstermektedir. Higgins ve arkadaşları (19), formalin ile fikse edilmiş materyallerde I^{125} ile işaretlenmiş

riboprolar yardımı ile 80% HPV RNA tesbit etmişlerdir. Ancak King ve arkadaşları (16) daha önce alınmış patolojik materyallere SH insitu hibridizasyonu uygulayarak %45 gibi daha düşük oranda HPV pozitifliği saptamışlardır. SH tekniği ile yapılan diğer çalışmalarda %43-73 arasında HPV pozitifliği saptanmıştır (21,26-29). Oranların bu farklılığının biraz yöntem farklılıklarından, ancak daha çok coğrafi ve kültürel farklılıkların getirdiği etkilerden kaynaklandığını düşünmekteyiz. Bu konuda yapılan çalışmaların bir çoğu HPV 16 ile SCC arasında bir ilişki saptamışlardır (14,16,20,27,30). Bizim çalışmamızda da 16 SCC vakasından 7'sinde HPV saptanmış (%43.75) ve HPV 16 ve HPV 18 sıklığı yukarıdaki çalışmaların aksine birbirine benzer bulunmuştur. Bu durum örneklerin kısıtlı sayıda olmasına veya bazı bölgesel farklılıklara bağlı olabilir. Bunun yanında 2 HPV tipi (%12.5) yukarıda belirtilen yöntemler kullanılarak klasifiye edilememiştir. Bu sonuçlar HPV 16, 18, 31, 33 ve 35 dışındaki HPV tiplerinin SCC'de rolü olabileceğini ve bunların coğrafi farklılıklar gösterebildiğini düşündürmektedir. AC'lu tek bir vaka çalışılmış ve bu vakada HPV 18 saptanmıştır. Literatüre göre HPV 16 ve 18

DNA'sının servikal adenokarsinomlarda %15-90 arasında var olduğu rapor edilmiştir (31,32). Aneak AC'lu olan bu vakadan elde edilen veriler bu konu için bir sonuç çıkarmak için yeterli değildir. Daha fazla hastadan elde edilen örneklerle çalışmalara gereksinim vardır. Önceki 3 çalışmaya benzer şekilde (14,16,23) hasta yaşı ile HPV bulguları

arasında bir ilişki saptanmazken bazı başka raporlarda ise HPV 18 (19,27) veya HPV 16'nın (20) daha çok genç yaş grubunda görüldüğü bildirilmiştir. Çalışmamız yeni hasta gruplarıyla ve parafine gömülmüş dokular kullanılarak devam edecek vaka sayısının artırılmasıyla gelecekte daha güvenilir sonuçlar elde edilebilecektir.

KAYNAKLAR

1. 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.
2. Lombard I, Vincent-Salomon A, Validire P, Zafrani B, de la Rochefordiere A, Clough K, Fayre M, Pouillart P, Sastre-Garau X. Human papillomavirus genotype as a major determinant of the course of cervical cancer. *J Clin Oncol* 1998; 16: 2613-2619.
3. Abadi MA, Ho GY, Burk RD, Romney SL, Kadish AS. Stringent criteria for histological diagnosis of koilocytosis fail to eliminate overdiagnosis of human papillomavirus infection and cervical intraepithelial neoplasia grade 1. *Hum Pathol* 1998; 29: 54-59.
4. Ho GY, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ, Burk RD. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med* 1998; 12: 338: 423-428.
5. Lorincz AT. Molecular methods for the detection of human papillomavirus infection. *Obstet Gynecol Clin North Am* 1996; 23: 707-730.
6. Gissmann L, Wolnik L, Ikenberg H, Koldovosky U, Schnurch HG, zur Hausen H: Human Papillomavirus types 6 and 11 DNA sequences in genital and laryngeal papillomas and in some cervical cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; 80:560-563.
7. 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.
8. De Villiers EM, Gissmann L, zur Hausen H: Molecular cloning of viral DNA from human genital Warts. *J Virol* 1981; 40: 932-935.
9. Boshart M, Gissmann L, Ikenberg H, Kleinheinz A, Scheurlen W, zur Hausen H: A new type of papilomavirus DNA: Its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *EMBO J* 1984;3: 1151-1157.
10. 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.
11. Beaudenon S, Kremsdorf D, Ciroissant O, Jablonska S, Wain-Hobson S, Orth G: A novel

- type of human papilloma virus associated with genital neoplasias. *Nature* 1986; 321: 246-249.
12. Lorincz AT, Lancaster WD, Temple GF. Cloning and characterization of the DNA of a new human papilloma virus from women with dysplasia of the uterin cervix. *J Virol* 1986; 58: 225-229.
 13. Hausen H zur. Synergism between two virus infections or synergism between a virus infection and initiating events. *Lancet* 1982; 2: 1370-1372.
 14. Ikenberg H, Sauerbrei W, Scottmüller U, Spitz C, Pfeleiderer A. Human papillomavirus DNA in cervical carcinoma correlation with clinical data and influence on prognosis. *Int J Cancer* 1994; 59: 322-326.
 15. Wilczynski SP, Bergen S, Walker J, Liao S, Pearlman LF. Human papillomaviruses and cervical cancer: analysis of histopathologic features associated with different viral types. *Hum Pathol* 1988; 19: 697-326.
 16. King LA, Tase T, Twigg LB, et al. Prognostic significance of the presence of human papillomavirus DNA in patients with invasive carcinoma of the cervix. *Cancer* 1989; 63: 897-900.
 17. Barnes W, Delgado G, Kürman RJ, et al. Possible prognostic significance of human papillomaviruses type in cervical cancer. *Gynecol Oncol* 1988; 29: 267-273.
 18. Burnett AF, Barnes WA, Johnson JC, et al. Prognostic significance of polymerase chain reaction detected human papillomavirus of tumors and lymph nodes in surgically treated stage-Ib cervical cancer. *Gynecol Oncol* 1993; 47: 343-347.
 19. Higgins GD, Davy M, Roder D, Uzelin DM, Phillips GE, Burrell CJ. Increased age and mortality associated with cervical carcinomas negative for human papillomavirus DNA. *Lancet* 1991; 388: 910-913.
 20. Riou G, Favre M, Jeannel D, Bourhis J, Le Doussal V, Orth G. Association between poor diagnosis in early stage invasive cervical carcinomas and non detection of HPV DNA. *Lancet* 1990; 337: 1171-1174.
 21. Rose BR, Tompson CH, Cossart YE, Elliot PE, Tattersall MH. Papillomavirus DNA and prognosis in cervical cancer. *Lancet* 338: 489;1991.
 22. Kentner GG, Cornelisse CJ, Jiwa LM. Human papillomavirus type 16 in tumor tissue of low stage squamous carcinoma of the uterine cervix in relation to ploidy grade and prognosis. *Cancer* 1993; 71: 397-401.
 23. Sebbelaw AM, Kjørstad KE, Abeler VM, Norrild B. The prevalence of the human papillomavirus type 16 and 18 DNA in cervical cancer in different age groups: a study on the incidental cases of cervical cancer in Norway in 1985. *Gynecol Oncol* 1991; 41: 141-148.
 24. Karaloglu D, Yazici H, Alali C, et al. Detection of HPV 16 and HPV 18 infection in patients with cervical neoplasia. *Eur J Gynaecol Oncol* 1996; 17: 296-298.
 25. Güneş İ, İnce U, Kullu S, Pekin S, Çirakoglu B. Detection and typing of human papillomavirus in cervical specimens of Turkish Women. *Eur J Gynaec Oncology* 1997; 18(n.6): 546-550.
 26. Meanwell CA, Cox MF, Blackledge G, Martindale M. HPV 16 DNA in normal and malignant cervical epithelium: Implication for the etiology and behaviour of cervical neoplasia. *Lancet* 1987; 1: 703-707.

27. Walker J, Bloss JD, Liao S, Berman M, Bergen S, Wilczynski SP. Human papillomavirus genotype as a prognostic indicator in carcinoma of uterine cervix. *Obstet Gynecol*, 1989;74:781-785.
28. Suzuk L, Noffsinger AE, Aili M. Detection of human papillomavirus DNA in cervical squamous cell carcinoma in Ningjiang Uygur women. *Int J Oncol* 1998 Jul;13:5-9.
29. Sano T, Hikiro T, Niwa Y, et al. In situ hybridization with biotinylated tyramide amplification: detection of human papillomavirus DNA in cervical neoplastic lesions. *Mod Pathol* 1998 Jan;11:19-25.
30. Vassilandonopoulou G, Panotopoulou E, Fotiou S, Tserkezoglou A, Mactera E, Kottaridis S. Human papillomaviruses in cervical cancer I. HPV-16 and 18 predominate in the Greek population. *Anticancer Res* 1997; 17: 117-120.
31. Iiko K, Tsuda H, Sato S, Hirohushi S. Pathogenetic significance of p53 and c-Ki-ras gene mutation and HPV DNA integration in adenocarcinoma of the uterine cervix and uterine isthmus. *Int J Cancer*, 1994,59,601-606.
32. Hording U, Teglbjaerg CS, Vistfeldt J, Bock H. Human papillomavirus type 16 and 18 in adenocarcinoma of the uterine cervix. *Gynecol Oncol*,1992,46,513-516.