



T.C. MARMARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ PATOLOJİ ANABİLİM DALI

**SERVİKAL İNTRAEPİTELYAL NEOPLAZİLERDE P16, Ki67, MCM2, TOP2A VE
CK7 İMMUNOEKSPRESYONUNUN HİSTOMORFOLOJİK TANIYA KATKIDAKİ
ROLÜ**

Dr. BEYZA KESKİN
UZMANLIK TEZİ

İSTANBUL 2021



**T.C. MARMARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ PATOLOJİ ANABİLİM DALI**

**SERVİKAL İNTRAEPİTELYAL NEOPLAZİLERDE P16, Ki67, MCM2, TOP2A VE
CK7 İMMUNOEKSPRESYONUNUN HİSTOMORFOLOJİK TANIYA KATKIDAKİ
ROLÜ**

**Dr. BEYZA KESKİN
UZMANLIK TEZİ**

Danışman: Prof.Dr. ŞİRİN FUNDA EREN

İSTANBUL 2021

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	iv
ÖZET	v
TABLO LİSTESİ	vii
ŞEKİL LİSTESİ	viii
KISALTMALAR DİZİNİ	x
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Embriyoloji.....	2
2.2. Anatomi	3
2.3. Histoloji.....	4
2.4. Servikal İntraepitelyal Neoplazide Etyoloji.....	5
2.4.1. Human Papillomavirus (HPV)	5
2.5. Histopatoloji	11
2.6. Çalışmada Kullanılan İmmunohistokimyasal Belirteçlerin Özellikleri.....	17
2.6.1. P16 (P16-INK4a).....	17
2.6.2. Ki-67.....	18
2.6.3. MCM2 (Minichromosome Maintenance Protein 2)	19
2.6.4. TOP2A (Topoizomeraz 2A).....	20
2.6.5. CK7 (Sitokeratin 7)	22
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	22
3.1. Olgu Seçimi	22
3.2. Etik Kurul	23
3.3. Yöntem	23
3.3.1. İmmunohistokimya Uygulanması.....	23
3.4. Değerlendirme.....	24
3.4.1. Histopatolojik Değerlendirme	24
3.4.2. P16 immunohistokimyasal değerlendirme.....	24
3.4.3. Ki67 immunohistokimyasal değerlendirme.....	29
3.4.4. TOP2A immunohistokimyasal değerlendirme.....	33
3.4.5. MCM2 immunohistokimyasal değerlendirme.....	37
3.4.6. CK7 immunohistokimyasal değerlendirme	41
3.5. İstatistik	43
4. BULGULAR	44
4.1. Demografik Veriler	44

4.2.	İmmunohistokimya - Histomorfoloji Karşılaştırması ve İstatistiksel Sonuçlar ile Yorumları	46
4.2.1.	P16 İmmunohistokimyasının Değerlendirme Sonuçları	46
4.2.2.	Ki-67 İmmunohistokimyasının Değerlendirme Sonuçları	48
4.2.3.	MCM2 İmmunohistokimyasının Değerlendirme Sonuçları	51
4.2.4.	TOP2A İmmunohistokimyasının Değerlendirme Sonuçları	53
4.2.5.	CK7 İmmunohistokimyasının Değerlendirme Sonuçları	56
5.	TARTIŞMA	59
6.	SONUÇLAR	65
7.	KAYNAKLAR	67



ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimimde sahip oldukları bilgi birikimi ve edindikleri tecrübeleri benimle paylaşan, araştırmaya, öğrenmeye sevk eden, öğrencileri olmaktan mutluluk duyduğum, başta tez danışmanım Prof. Dr. Şirin Funda Eren ve kıymetli hocalarım Prof. Dr. Çiğdem Ataizi Çelikel, Prof. Dr. Rengin Ahıskalı, Prof. Dr. Handan Kaya, Prof. Dr. Süheyla Uyar Bozkurt, Prof. Dr. Pelin Bağcı, Prof. Dr. Hüseyin Kemal Türköz, Doç. Dr. İpek Erbarut Seven, Doç. Dr. Deniz Filinte ve Dr. Öğr. Gör. Emine Bozkurtlar'a,

Asistan hekimlik sürecimde bana katkı ve destekleriyle her zaman yanımda hissettiğim Dr. Gamze Akbaş, Dr. İrem Şahver İşgör, Dr. Hülya Şahin Özkan, Dr. Medine Özgür Günay, Dr. Mehmet Fatih Tekin, Dr. Kadriye Ebru Akar, Dr. Cem Berk Türk, Dr. Damlanur Karaman, Dr. Orkhan Farmanlı, Dr. İhsan Turan Ceran, Dr. Nurşah Arı, Dr. İlknur Hotmanoğlu Şahin, Dr. Özgür Can Eren, Dr. Gizem Menetlioğlu, Dr. Seher Eda Aras'a,

Bir parçası olmaktan gurur duyduğum tüm Marmara Üniversitesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı ailesine,

Desteklerini hep hissettiğim ve her zaman yanımda olan ailem ve yol arkadaşşıma sonsuz teşekkürlerimle.

Beyza Keskin

Ekim 2021

İstanbul

ÖZET

Amaç: Servikal intraepitelyal neoplazilerin derecelendirilmesinde histomorfolojinin yanında literatürde CIN ile ilişkilendirilen immunohistokimyasal işaretleyicilerin kullanılmasının tanıyı belirlemedeki etkisini saptamak çalışmanın ana amacı olarak belirlenmiştir.

Gereç ve Yöntem: Ocak 2014 – Aralık 2020 tarihleri arasında Marmara Üniversitesi Pendik Eğitim Araştırma Hastanesi Patoloji arşivinde bulunan servikal intraepitelyal neoplazi tanısı almış biyopsi materyalleri ve olağan servikal biyopsi tanısı almış kontrol grubundan oluşan toplam 168 vakaya p16, Ki-67, MCM2, TOP2A ve CK7 immunohistokimyasal boyaları uygulanmış ve semikantitatif olarak boyalar skorlanmıştır.

Bulgular: Toplam 75 CIN1, 50 CIN2, 23 CIN3 ve 20 olağan servikal doku içeren kontrol grubu incelenmiştir. P16, Ki-67, MCM2, TOP2A ve CK7 skorları tanılarla karşılaştırıldığında anlamlı istatistiksel korelasyon ($p<0.001$) saptanmıştır. İmmunohistokimyasal boyaların birbirleriyle olan kıyaslamasında da benzer şekilde her biri için anlamlı istatistiksel fark ($p<0.001$) izlenmiştir. CIN1-CIN2 ayrımı için boyalarla korelasyona bakıldığında her bir boyanın anlamlı düzeyde korele olduğu saptanmıştır. CIN2-3 ayrımı için ise P16 ($p<0.001$) ve TOP2A ($p=0.0027$) boyalarının anlamlı korelasyon gösterdiği saptanmıştır.

Sonuç: Çalışmamızda vakalara uygulanan P16, Ki-67, MCM2, TOP2A ve CK7 boyalarının displazi derecesiyle anlamlı ilişkili olduğu görülmüştür. Sonuçlara göre; rutin pratikte en çok uygulanan boyalar olan p16 ve Ki-67 ile birlikte displazi derecesine karar verilemeyen durumlarda spesiviteyi ve sensitiviteyi arttırmak için öncelikle TOP2A olmak üzere MCM2 ve CK7'nin kullanılabileceği düşünülmüştür.

Anahtar kelimeler: Servikal intraepitelyal neoplazi (CIN), p16, Ki-67, MCM2, TOP2A, CK7

ABSTRACT

Introduction: The main aim of this study was to evaluate the effectiveness of CIN-associated, immunohistochemical markers used in literature in the grading of cervical intraepithelial neoplasia.

Methodology: A total of 168 cases, consisting of biopsy samples diagnosed with cervical intraepithelial neoplasia and with normal cervical tissue as the control group, were included in the study. The biopsies were performed between January 2014 to December 2020 and taken from the Pathology archive of the Marmara University Pendik Training and Research Hospital. p16, Ki-67, MCM2, TOP2A and CK7 immunohistochemical stains were applied, and scored semiquantitatively.

Results: A total of 75 CIN1, 50 CIN2, 23 CIN3 and a control group including 20 cases were examined in the study. A significant statistical correlation ($p<0.001$) was found between the P16, Ki-67, MCM2, TOP2A and CK7 scores and positive diagnoses. Similarly, a statistically significant difference ($p<0.001$) was observed for each of the immunohistochemical stains when they were compared with each other. Considering the correlation of the markers with distinguish the CIN1-CIN2 diagnoses it was determined that each marker was able to correctly predict a positive diagnosis. For distinguish the diagnosis of CIN2-3, the P16 ($p<0.001$) and the TOP2A ($p=0.0027$) markers were found to show significant correlation.

Conclusion: The P16, KI-67, MCM2, TOP2A and CK7 markers were found to be significantly associated with the degree of dysplasia. To increase the specificity and sensitivity of diagnosis, the TOP2A, MCM2 and CK7 markers can be applied alongside the routinely used p16 and Ki-67 markers in cases where the degree of dysplasia cannot be determined.

Keywords: Cervical intraepithelial neoplasia (CIN), P16, Ki-67, MCM2, TOP2A, CK7

TABLO LİSTESİ

Tablo 1: Kullanılan immunohistokimyasal antikorlar ve uygulanma biçimi.....	24
Tablo 2: P16 İmmunohistokimyasının Değerlendirme ve Tanılar ile Korelasyon Tablosu.....	47
Tablo 3: P16 immunohistokimyasının diğer immunohistokimyasal belirteçlerle karşılaştırılması	47
Tablo 4: MCM2 İmmunohistokimyasının Değerlendirme ve Tanılar ile Korelasyon Tablosu.....	52
Tablo 5: MCM2 immunohistokimyasının diğer immunohistokimyasal belirteçlerle karşılaştırılması	52
Tablo 6: MCM2 için tanılara göre sensitivite ve spesifite tablosu.....	53
Tablo 7: TOP2A İmmunohistokimyasının Değerlendirme ve Tanılar ile Korelasyon Tablosu.....	54
Tablo 8: TOP2A immunohistokimyasının diğer immunohistokimyasal belirteçlerle karşılaştırılması	55
Tablo 9: TOP2A için tanılara göre sensitivite ve spesifite tablosu	55
Tablo 10: CK7 İmmunohistokimyasının Değerlendirme ve Tanılar ile Korelasyon Tablosu.....	57
Tablo 11: CK7 immunohistokimyasının diğer immunohistokimyasal belirteçlerle karşılaştırılması	57
Tablo 12: CK7 için tanılara göre sensitivite ve spesifite tablosu	58

ŞEKİL LİSTESİ

1. Şekil:	Servikal İntraepitelyal Neoplazi Spektrumu	1
2. Şekil:	Servikal İntraepitelyal Neoplazi Terimi ve Tedavi Yaklaşımı	2
3. Şekil:	Uterusun Gelişimi	3
4. Şekil:	Uterusun Gelişimi 2	3
5. Şekil:	Serviksin anatomisi	4
6. Şekil:	Serviks Histolojisi	5
7. Şekil:	HPV genomunun düzenlenimi	6
8. Şekil:	Human Papillomavirus Tipleri	7
9. Şekil:	HPV'nin serviks epitelini enfekte etmesi ve çoğalması	8
10. Şekil:	HPV enfeksiyonunun evreleri: İmmun regresyon, Latent enfeksiyon ve Reaktivasyon	9
11. Şekil:	E7 proteininin etki mekanizması	10
12. Şekil:	E6 proteininin etki mekanizması	11
13. Şekil:	Servikal Lezyonların Tarihçesi	12
14. Şekil:	Servikal Lezyonlar ve Tedavi Seçeneklerinin Değişimi	12
15. Şekil:	CIN1 histopatolojisi	13
16. Şekil:	CIN2 Histopatolojisi	14
17. Şekil:	CIN3 Histopatolojisi 1	15
18. Şekil:	CIN3 Histopatolojisi 2	16
19. Şekil:	Servikal intraepitelyal neoplazilerin şematizasyonu	16
20. Şekil:	HPV'nin p16 üzerindeki etkisi	18
21. Şekil:	Ki-67 Etki Mekanizması	19
22. Şekil:	MCM kompleksinin fosforillenerek helikaz etkisini göstermesi	20
23. Şekil:	Hücre Siklusu boyunca TOP2A'nın rolü	21
24. Şekil:	P16 skor 0	25
25. Şekil:	P16 yamasal boyanma paterni	26
26. Şekil:	P16 1+ boyanma paterni	27
27. Şekil:	P16 2+ boyanma paterni	28
28. Şekil:	P16 3+ boyanma paterni	29
29. Şekil:	Ki-67 skor 0	30
30. Şekil:	Ki-67 1+ boyanma paterni	31

31. Şekil:	Ki-67 2+ boyanma paterni (x20)	32
32. Şekil:	Ki-67 3+ boyanma paterni	33
33. Şekil:	TOP2A skor 0	34
34. Şekil:	TOP2A 1+ boyanma paterni	35
35. Şekil:	TOP2A 2+ boyanma paterni	36
36. Şekil:	TOP2A 3+ boyanma paterni	37
37. Şekil:	MCM2 skor 0	38
38. Şekil:	MCM2 1+ boyanma paterni	39
39. Şekil:	MCM2 2+ boyanma paterni	40
40. Şekil:	MCM2 3+ boyanma paterni	41
41. Şekil:	CK7 pozitif boyanma 1	42
42. Şekil:	CK7 pozitif boyanma 2	43
43. Şekil:	P16 skorlarının tanılara göre dağılım grafiği	46
44. Şekil:	Ki-67 skorlarının tanılara göre dağılım grafiği	49
45. Şekil:	MCM2 skorlarının tanılara göre dağılım grafiği	51
46. Şekil:	TOP2A skorlarının tanılara göre dağılım grafiği	54
47. Şekil:	CK7 skorlarının tanılara göre dağılım grafiği	56

KISALTMALAR DİZİNİ

CIN: Servikal İnterapitel Neoplazi (Cervical Intraepithelial Neoplasia)

CK7: Sitokeratin 7

DNA: Deoksiribonükleik asit

HPV: Human Papilloma Virus

HSIL: Yüksek dereceli Skuamöz İnterapitel Lezyon (High Grade Squamous Intraepithelial Lesion)

LSIL: Düşük dereceli Skuamöz İnterapitel Lezyon (Low Grade Squamous Intraepithelial Lesion)

MCM2: Minikromozom Onarım Proteini 2 (Minichromosome Maintenance 2)

mRNA: Messenger Ribonükleik asit

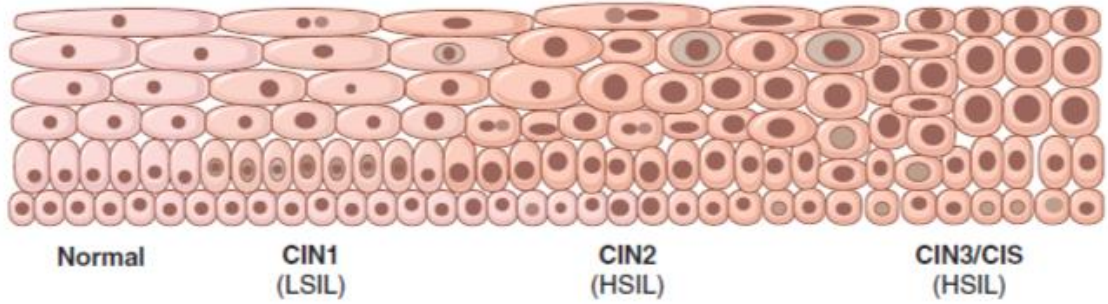
Rb: Retinoblastom

SIL: Skuamöz İnterapitel Lezyon (Squamous Intraepithelial Lesion)

TOP2A: Topoizomeraz 2 alfa

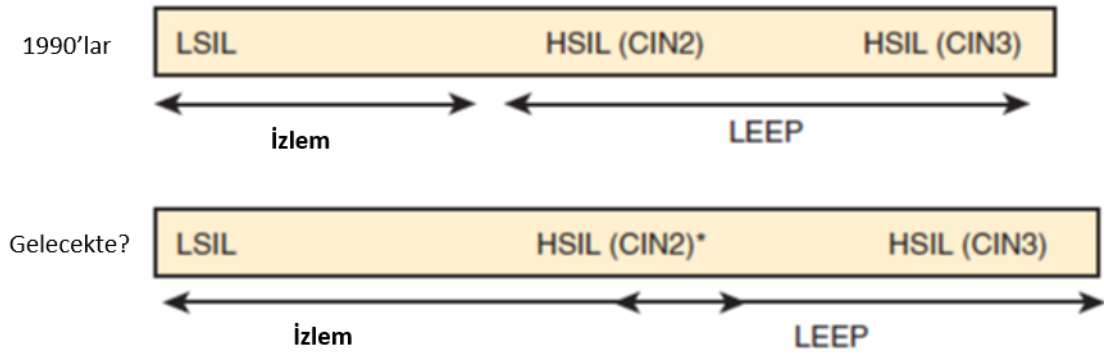
1. GİRİŞ VE AMAÇ

Servikal intraepitelyal neoplaziler(CIN), Human Papilloma Virus (HPV) enfeksiyonu ile oluşan ve serviks kanserine ilerleme riski olan lezyonlardır [1, 2]. Bu lezyonlar 3 grupta derecelendirilmektedir; CIN1, CIN2 ve CIN3 [3].



1. Şekil: Servikal İntraepitelyal Neoplazi Spektrumu

Morfolojik olarak CIN2 ve CIN3 ayrımının oldukça subjektif olması ve tedavi yaklaşımının benzer olması nedeniyle bu iki lezyon LAST (The Lower Anogenital Squamous Terminology Standardization Project for HPV-Associated Lesions) terminolojisine göre yüksek dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon (HSIL) olarak tek grupta toplanmıştır. Bu terminolojide CIN1; düşük dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon (LSIL), CIN2 ve CIN3 olguları ise; yüksek dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon (HSIL) olarak adlandırılmaktadır [3, 4]. HSIL olgular prekanseröz kabul edildiklerinden tedavi yaklaşımı LSIL'den farklı olmakta ve bu nedenle LSIL/HSIL ayrımı önem kazanmaktadır. Bununla birlikte HSIL olarak tek grupta toplanan CIN2 ve CIN3 olgularının ayrımında ise önemli olan nokta; CIN2 tanısı alan vakaların bazılarında regresyon görülebilmesi ya da çok uzun sürede invaziv kansere transforme olabilmelerinden kaynaklanmaktadır [5, 6]. Hastanın fertilité isteği söz konusu ise CIN2 vakalarına daha konservatif yaklaşılabilir [7]. Bu nedenle mümkün olduğunca CIN2 ve CIN3'ün ayrılması prognoz ve tedavi yaklaşımı açısından önem kazanmaktadır. Fakat CIN2 tanısının patoloğlar arası tekrarlanabilirliği düşük bir tanı olması bu ayrımı zorlaştırmaktadır [8, 9]. Bu sebeple, servikal intraepitelyal neoplazilerin derecelendirilmesinde histomorfolojiye destek olacak ve gözlemciler arası uyumu artıracak ek yöntemlerin saptanması ihtiyacı doğmaktadır.



2. Şekil: Servikal İntraepitelyal Neoplazi Terimi ve Tedavi Yaklaşımı

Çalışmamızda 'CIN'lerin derecelendirilmesinde histomorfolojiye ek olarak literatürde CIN ile ilişkilendirilen immunohistokimyasal işaretleyicileri kullanarak tanıya katkı sağlanabilir mi?' sorusunu cevaplandırabilmek ana hipotez olarak belirlenmiştir. Bu amaçla "Çalışmada kullanılan immunohistokimyasal proteinlerin özellikleri" bölümünde daha ayrıntılı olarak bahsedilen hücre siklusunun çeşitli evrelerinde etkisi olan proteinler olan **Ki67**, **mini kromozom onarım proteini 2 (MCM2)**, **topoizomeraz 2a(TOP2A)**; bu lezyonların etyolojisinde önemi olan HPV'nin E7 proteini üzerinden etki gösteren **p16**, HPV'nin enfekte ettiği skuamokolumnar bileşke hücrelerini göstermeye yardımcı olan **sitokeratin 7(CK7)** proteinlerinin işaretleyicisi olan immunohistokimyasal boyalar seçilmiştir.

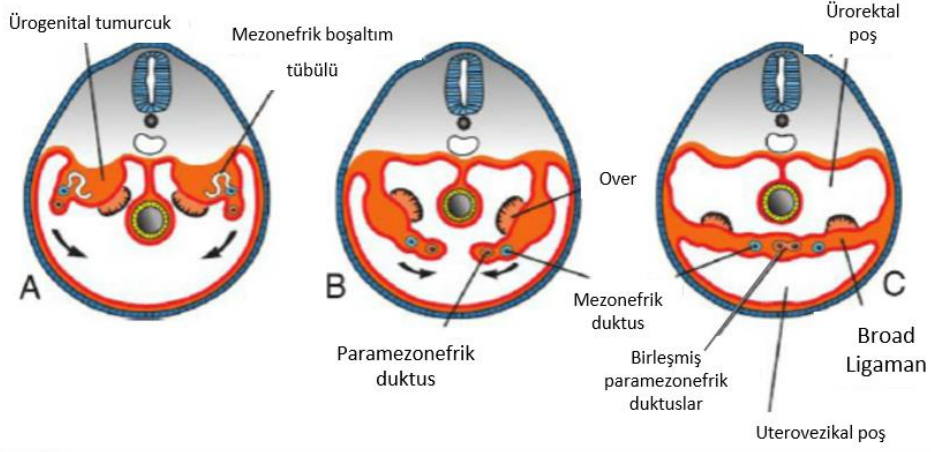
Tıbbi literatürde daha önce bu immunohistokimyasal işaretleyicilerin bir kısmının kombine olarak uygulandığı çalışmalar bulunmakla birlikte P16, Ki67, MCM2, TOP2A ve CK7'nin tümünün birbirleriyle ilişkisinin ya da etkinliğinin bütün halinde değerlendirildiği bir çalışma bulunmamaktadır. Bu bilgilerle çalışmamızda; immunohistokimyasal işaretleyicilerin tanımlar ve birbirleriyle korelasyonunu değerlendirmek, spesifite ile sensitivitesini belirlemek ana amaçlar olarak belirlenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

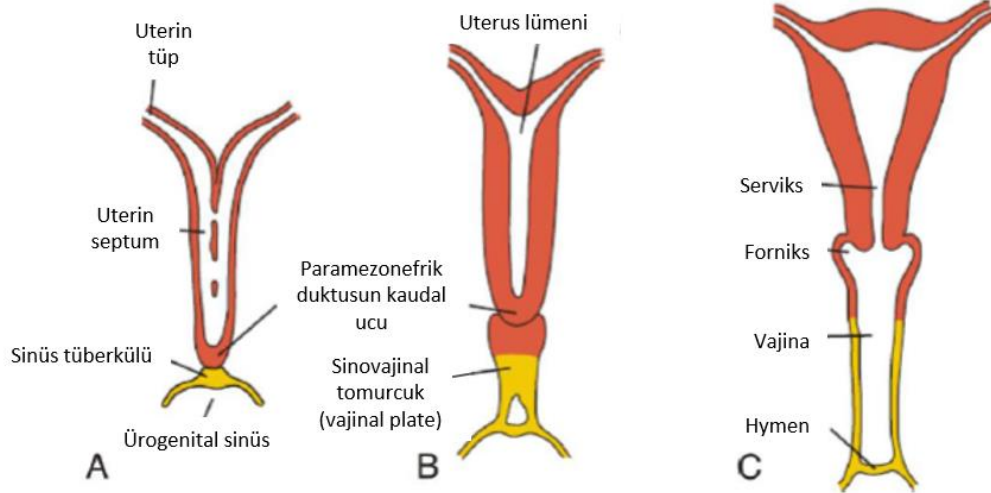
2.1. Embriyoloji

Östrojenin etkisi ve testosteron ile anti-Müllerian hormonun olmayışıyla

paramezonefrik duktus dişide ana genital duktusun gelişimini sağlamaktadır. Paramezonefrik duktuslar kaudal hareketlerle medialde birleşmekte ve uterus korpusunu, serviksi ve vajinanın üst 1/3'ünü oluşturmaktadırlar.



3. Şekil: Uterusun Gelişimi

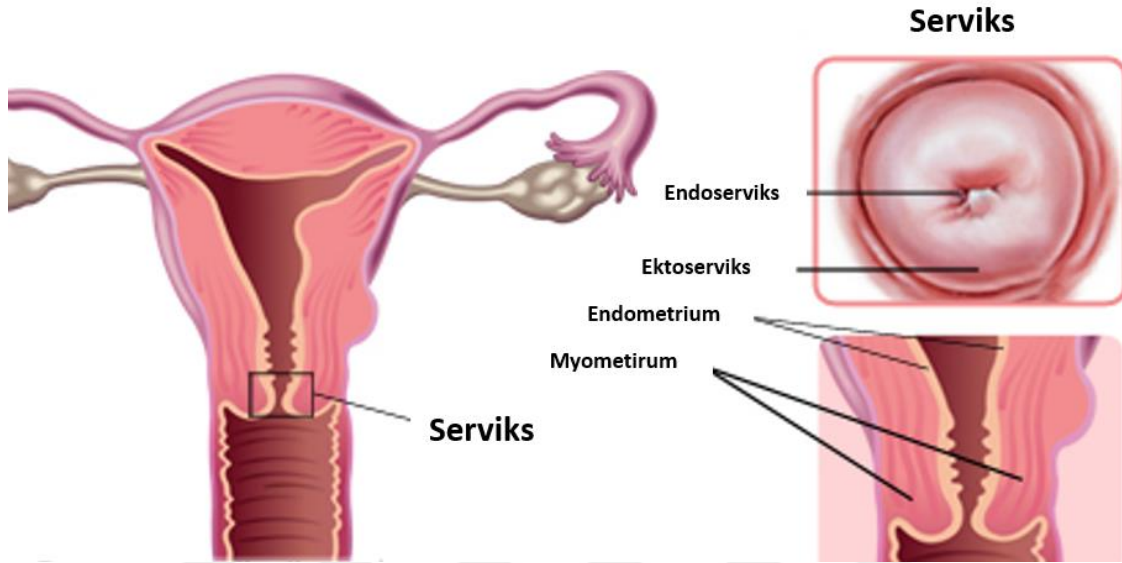


4. Şekil: Uterusun Gelişimi 2

2.2. Anatomi

Uterus korpus ve serviks olmak üzere iki bölümden oluşmaktadır. Serviks; uterusun alt kısmıdır, devamında vajina bulunmaktadır. Vajinaya açılan taraftaki bölüm ektoserviks olarak adlandırılırken, servikal açıklıktan uterin korpusa kadar olan bölüm

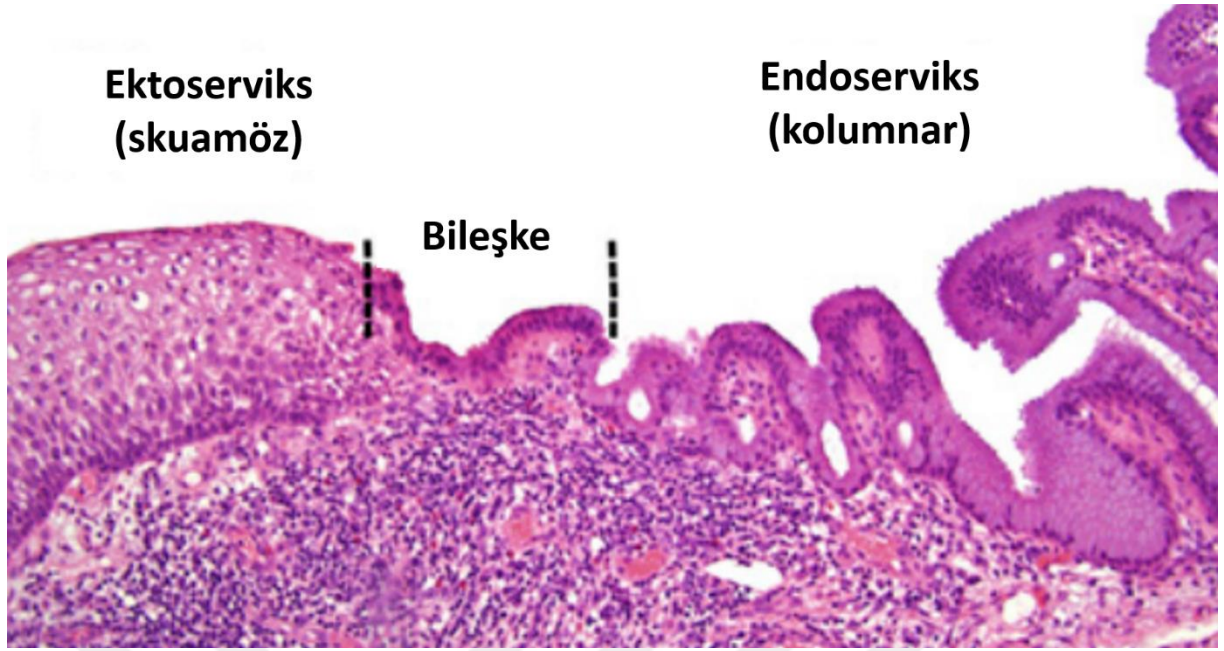
endoserviks olarak isimlendirilmektedir.



5. Şekil: Serviksin anatomisi

2.3. Histoloji

Serviks, uterusun en alttaki bölümüdür. Histolojik özellikleri de uterusun diğer bölümlerinden farklıdır. Serviksin uterusu doğru olan bölümüne endoserviks, vajinaya doğru olan bölümüne ise ektoserviks denilmektedir. Bu bölümlerin histolojik özellikleri birbirinden farklıdır. Endoservikal alanın yüzeyinde tek katlı kolumnar müsinöz epitel bulunmaktadır. Ektoservikal bölümde ise skuamöz epitel ile döşelidir. Endoserviks ve ektoserviks arasındaki geçişte ise kuboidal morfolojili skuamokolumnar bileşke hücreleri yer almaktadır. Ektoserviks ve endoserviks arasındaki bileşke noktası östrojenin etkisiyle endoservikal epitele doğru yer değiştirmektedir. Bu değişim sonrası oluşan skuamokolumnar bileşke noktası ile bu bileşkenin ilk konumu arasındaki alan transformasyon zonu olarak isimlendirilmektedir. Transformasyon zonunu; metaplastik skuamöz epitel hücreleri ve bunlar arasında bulunan rezerv kök hücre özelliğinde bulunan skuamokolumnar bileşke hücreleri oluşturmaktadır. Bu skuamokolumnar bileşke hücreleri spesifik immunohistokimyasal işaretleyicilerle (CK7, AGR2, CD63, MMP7, GDA) gösterilebilmektedir.



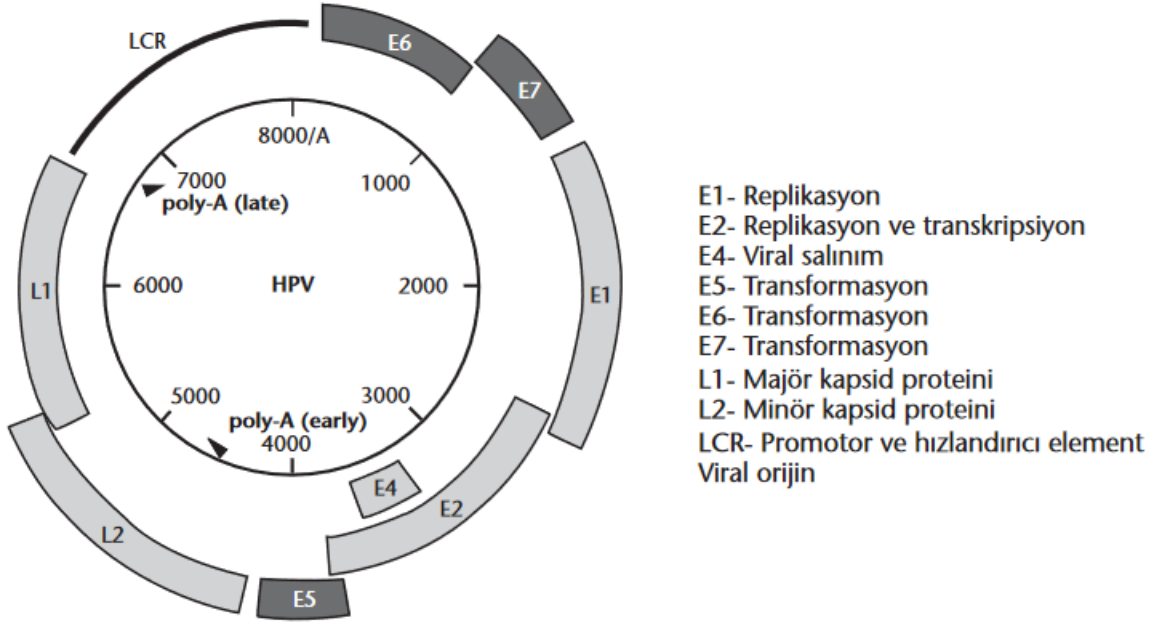
6. Şekil: Serviks Histolojisi

2.4. Servikal İntraepitelyal Neoplazide Etiyoloji

2.4.1. Human Papillomavirus (HPV)

2.4.1.1. HPV yapısı ve genel özellikleri

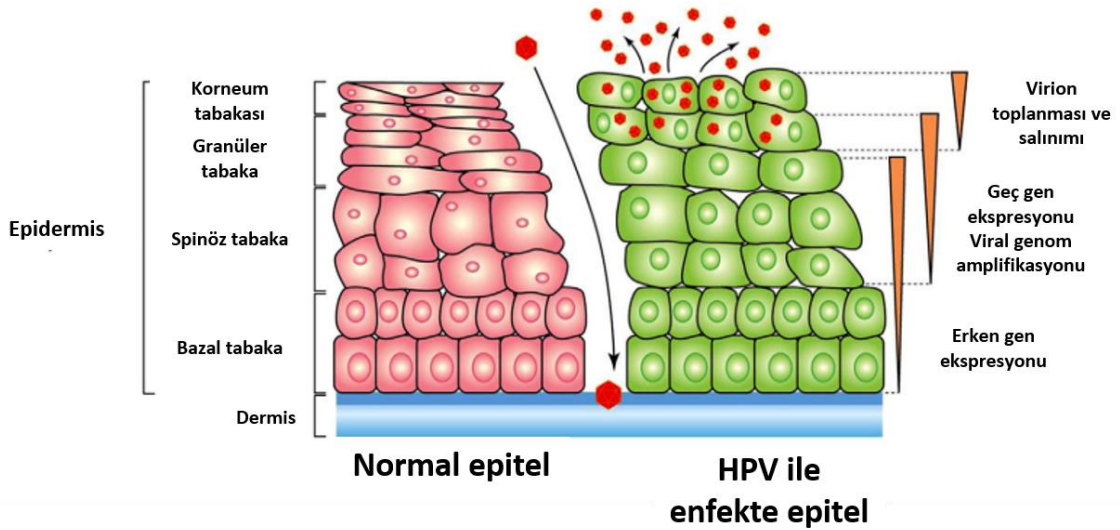
Human papillomavirus (HPV), Papillomaviridae ailesinde bulunan virüslerdir. İkozahedral şekilli, çıplak, çift iplikli DNA içermekte ve yaklaşık 55 nm boyutundadır. Dışında kapsid proteinleri olan L1 ve L2 proteinleri bulunmaktadır. Kapsidin içinde viral genom bulunmaktadır. Genomda temel olarak; viral replikasyon orijini (Ori), erken promotör (PE), geç promotör (PL) adı verilen alanlar uzun kontrol bölgesi (LCR) lokalizasyonunda bulunmaktadır. DNA'dan transkripte olan mRNA'lar viral proteinlerin sentezinde kullanılmaktadır. Erken mRNA'lar E1, E2, E4, E5, E6 ve E7 adlı proteinlerin sentezinde yer almaktadır. Daha geç sentezlenen mRNA'lar ise L1 ve L2 adlı kapsid proteinlerinin sentezinde görev almaktadır (Şekil 7).



7. Şekil: HPV genomunun düzenlenimi

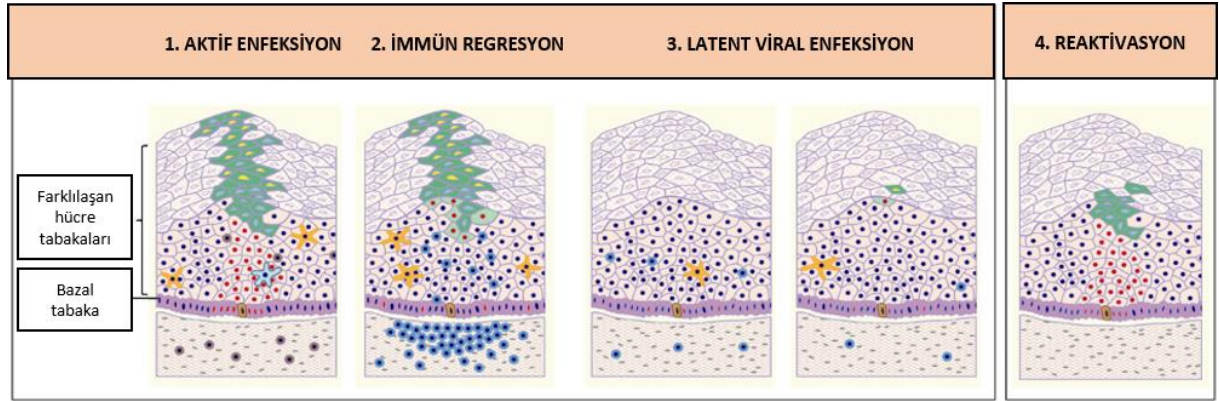
Günümüze kadar 150'den fazla Human Papillomavirus(HPV) tipi tespit edilmiştir (Şekil 8). HPV; DNA sekans analiz bulguları, hücre siklus özellikleri ve hastalıklarla ilişkisi bakımından ana olarak 5 gruba ayrılmaktadır (Alfa, Beta, Gama, Nu, Mu) [10].

Yüksek riskli HPV tiplerinin neden olduğu lezyonlarda; bazaldeki hücreler E6 ve E7'yi eksprese etmektedir. Bu durum hücre siklusunun devamına ve hücrelerin bölünmesine neden olmaktadır. Epitelin orta seviyelerine gelindiğinde; hücrelerde genom amplifikasyonu için gerekli olan proteinlerin düzeyi artmaktadır. Bu hücreler viral E4 proteinini eksprese etmekte ve genellikle hücre döngüsünün S ya da G2 fazında bulunmaktadır. Epitelin üst katlarına gelindiğinde ise; buradaki hücreler hücre siklusundan çıkmaktadır. E4 pozitif olan hücrelerden bir kısmı virüse ait L1 ve L2 proteinlerini üretmektedir. Bu proteinler amplifiye olan genomun paketlenmesini sağlamaktadır (Şekil 9) [11].



9. Şekil: HPV'nin serviks epitelini enfekte etmesi ve çoğalması

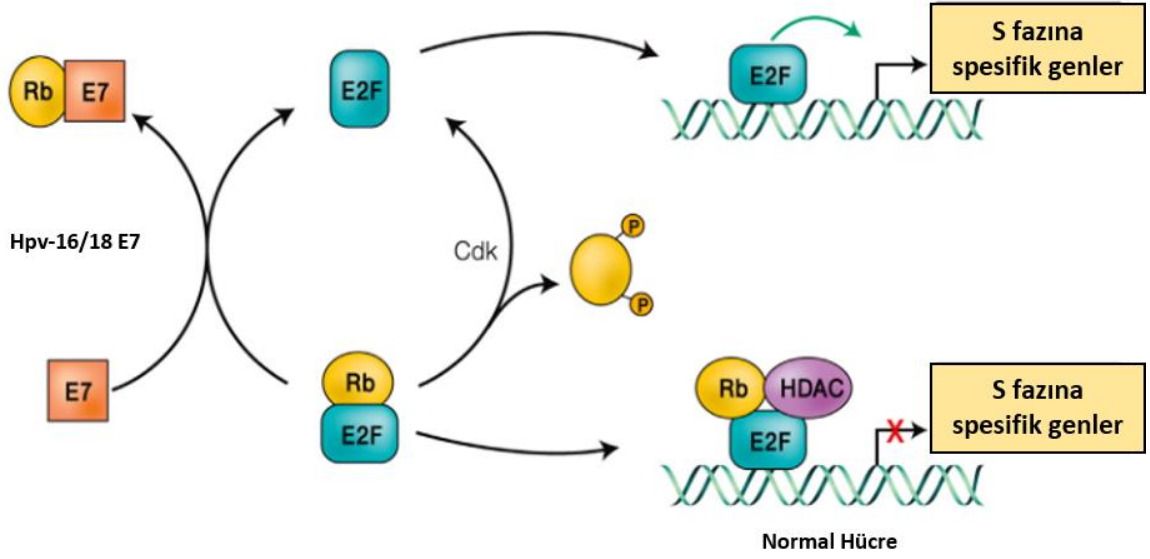
HPV enfeksiyonları dokuda farklı sonuçlara sebep olabilmektedir. Enfeksiyonu takiben, viral genomdan ekspresyon bazen baskılanabilir; bu da viral genomların belirgin bir hastalık olmaksızın bazal tabakada tutulduğu "sessiz" enfeksiyona yol açar. Sessiz enfeksiyon sonrası vakaların bazılarında; virüs sentezi ve üst epitel katmanlarından virüsün salınımı ile karakterli düşük dereceli neoplazi (CIN1) veya düzenli bir viral gen ekspresyonu görülen yüksek dereceli neoplazi (CIN2/CIN3) gelişebilir [10]. Çoğu durumda ise; sessiz HPV enfeksiyonları, hücre aracılı bağışıklığın etkisiyle ortadan kalkar. Bunun yanında CIN1'lerin büyük kısmında da bağışıklığın etkisiyle displazinin kaybolması ve normal servikal epitele dönüş görülebilmektedir.



10. Şekil: HPV enfeksiyonunun evreleri: İmmün regresyon, Latent enfeksiyon ve Reaktivasyon

Yüksek dereceli lezyonlar virüsün normal erken gen replikasyonunun bozulduğu lezyonlardır. Özellikle de E6 ve E7 seviyesindeki bir yükselmenin neoplazi şiddetinin artmasıyla doğrudan ilişkili olduğu düşünülmektedir [12]. Bu genlerin yeniden düzenlenen ekspresyonu enfekte hücrelerde genetik hataların birikimine ve viral epizomun konak hücre kromozomuna entegrasyonuna yol açmaktadır [11].

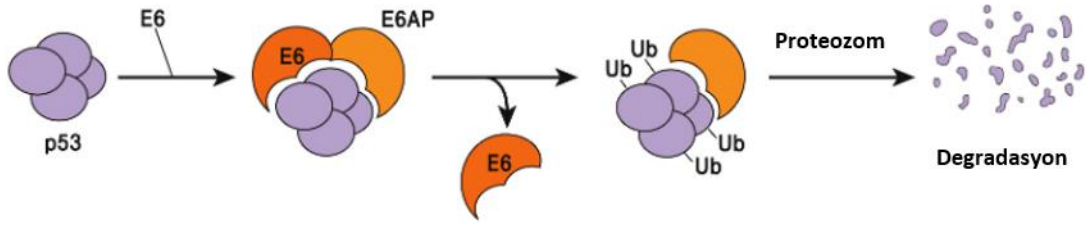
E7 Proteinin Rolü: HPV genom replikasyonunun gerçekleştirildiği epitelin üst tabakasındaki hücreler; farklılaşmış olup hücre döngüsünde G1 fazında olduğundan DNA sentezinin yapılmadığı hücrelerdir. HPV ile enfekte hücrelerde, dinlenme halindeki hücrelerin hücre döngüsünün S fazına yeniden girmesine neden olan E7 proteindir. E7 proteini, tümör baskılayıcı gen Rb13'ün bir ürünü olan Retinoblastom (Rb) proteinine bağlanmaktadır. Spesifik olarak, Rb proteini E2F'ye bağlanır, böylece E2F'nin G1'den S faz geçişindeki rolünü düzenlemektedir. E7 proteininin Rb proteinine bağlanması, Rb-E2F kompleksinden E2F'yi serbest bırakır. Daha sonra salınan E2F (S fazına özgü transkripsiyon faktörü) S fazına yol açan DNA polimeraz gibi S fazına özgü genlerin transkripsiyonunu yönetmektedir (Şekil 11) [11].



11. Şekil: E7 proteininin etki mekanizması

HPV E7 proteini, DNA sentezinin normalde gerçekleşmediği üst katman hücrelerindeki sürekli viral genom replikasyonunu; tümör supresör etkili Rb ve ATM proteinleri üzerinden yapmaktadır. E7 proteini ayrıca; tümör baskılayıcı bu proteinlerin tümör baskılayıcı fonksiyonlarının regülasyonunu bozarak tümör oluşumunu indüklemektedir.

E6 Proteinin Rolü: HPV ile enfekte hücrede, DNA sentezi ve programsız hücre bölünmesi meydana gelmektedir. p53 aracılı apoptoz, epitelin üst tabakasında meydana gelen aşırı hücre bölünmesini dengelemek için indüklenmektedir. HPV; yayılmasını sürdürmek için, HPV ile enfekte olmuş hücrelerin apoptozunu bloke edecek bir mekanizmaya ihtiyaç duymaktadır. E6 proteini; ubikuitin aracılı proteoliz yoluyla p53'ü down-regüle eder ve E6AP18'e bağlanır; bu durum p53'ün yaygınlaştırılmasını kolaylaştıran bir E6-E6AP kompleksi oluşturur. p53, proteozomlar tarafından proteolize tabi tutulur. Böylece, E6-E6AP kompleksi yeni bir ubikuitin E3 ligazı gibi davranmaktadır (Şekil 12) [11].



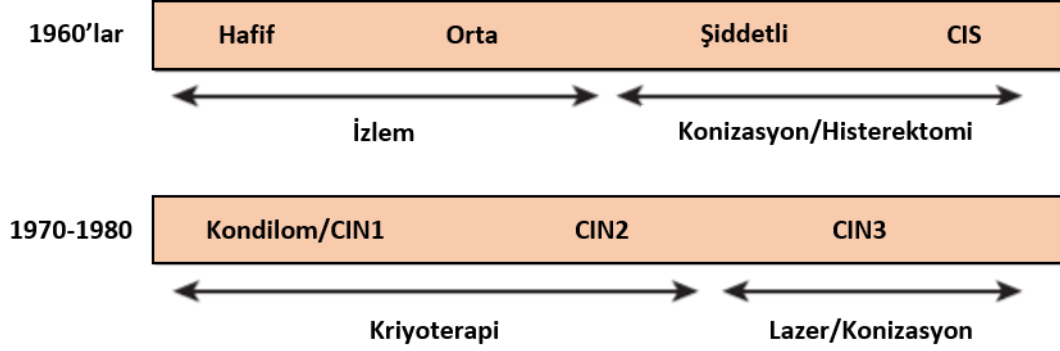
12. Şekil: E6 proteininin etki mekanizması

Servikal karsinomların ve servikal kanser prekürsörlerinin çoğu ektoserviksten ya da transformasyon zonundan; özellikle de bu alanda bulunan skuamokolumnar bileşke hücrelerinden kaynaklanmaktadır. Servikal lezyonların bir kısmında görülen skuamokolumnar bileşke hücrelerine özgü işaretleyicilerin pozitifliği ile de bu veri desteklenmektedir. Skuamokolumnar bileşke hücrelerinin rezerv embriyolojik hücreler olması sebebiyle farklılaşma yeteneği oldukça yüksek olup, bu hücrelerin etkilenmesi servikal lezyonların oluşması için bir zemin hazırlamaktadır. Servikal lezyonların temel nedeni olan HPV de skuamokolumnar bileşke hücrelerine seçici olup bu bölgeye yerleşmektedir. Fakat bu seçilimin nedeni net olarak ortaya konamamıştır [13]. Ektoservikse yerleşen HPV, bazal hücreleri enfekte etmekte ve epitelde farklı seviyelerde virüse özgü proteinlerinin sentezi gerçekleşmektedir. Skuamokolumnar bileşke hücreleri ise transformasyon zonu içerisinde dağınık olarak bulunmakta hatta bu hücrelere özgü işaretleyicilerle saptanan “yukarıdan aşağı (top-down)” paterninde olabilmektedir. HPV’nin ektoservikte bazal hücrelere ulaşması için epitelin bir travmaya maruz kalması gerekmektedir. Bu durumda ise HPV’nin etkilediği hücre grubu yüzeyde ya da yüzeye daha yakın olduğundan HPV tarafından etkiye daha açık hale gelmesine neden olduğu düşünülmektedir [14-16].

2.5. Histopatoloji

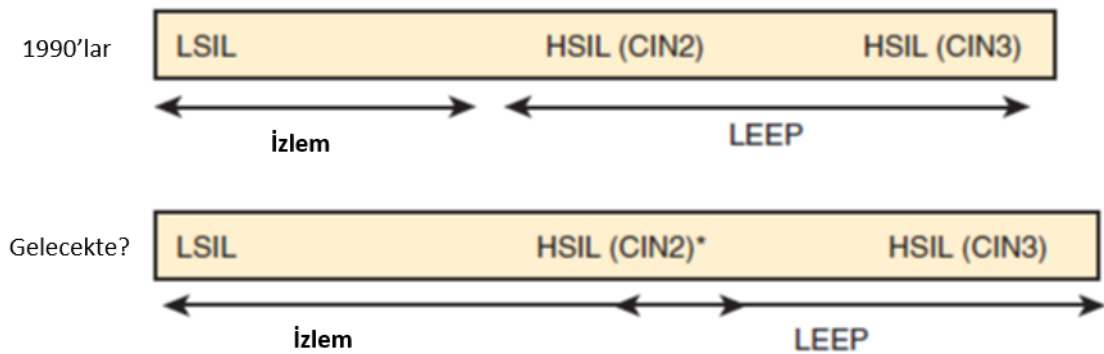
Servikal skuamöz epitelde görülen lezyonların dizplazi açısından sınıflandırılması ilk şekliyle 1960’larda oluşturulmaya başlanmıştır. İlk sınıflandırmada hafif, orta, şiddetli displazi ve karsinoma in-situ terimleri kullanılmıştır. Hafif ve orta şiddette displazi görülen vakaların takibi yapılırken daha ileri lezyon görülen vakalar histerektomi ile

tedavi edilmiştir. 1970'lere gelindiğinde ise sınıflandırma; flat kondilom/CIN1, CIN2, CIN3 şeklini almıştır. CIN2'ye kadar olan lezyonlara kriyoterapi uygulanırken, CIN3 görülen vakalara konizasyon yapılmaya başlanmıştır (Şekil 13).



13. Şekil: Servikal Lezyonların Tarihçesi

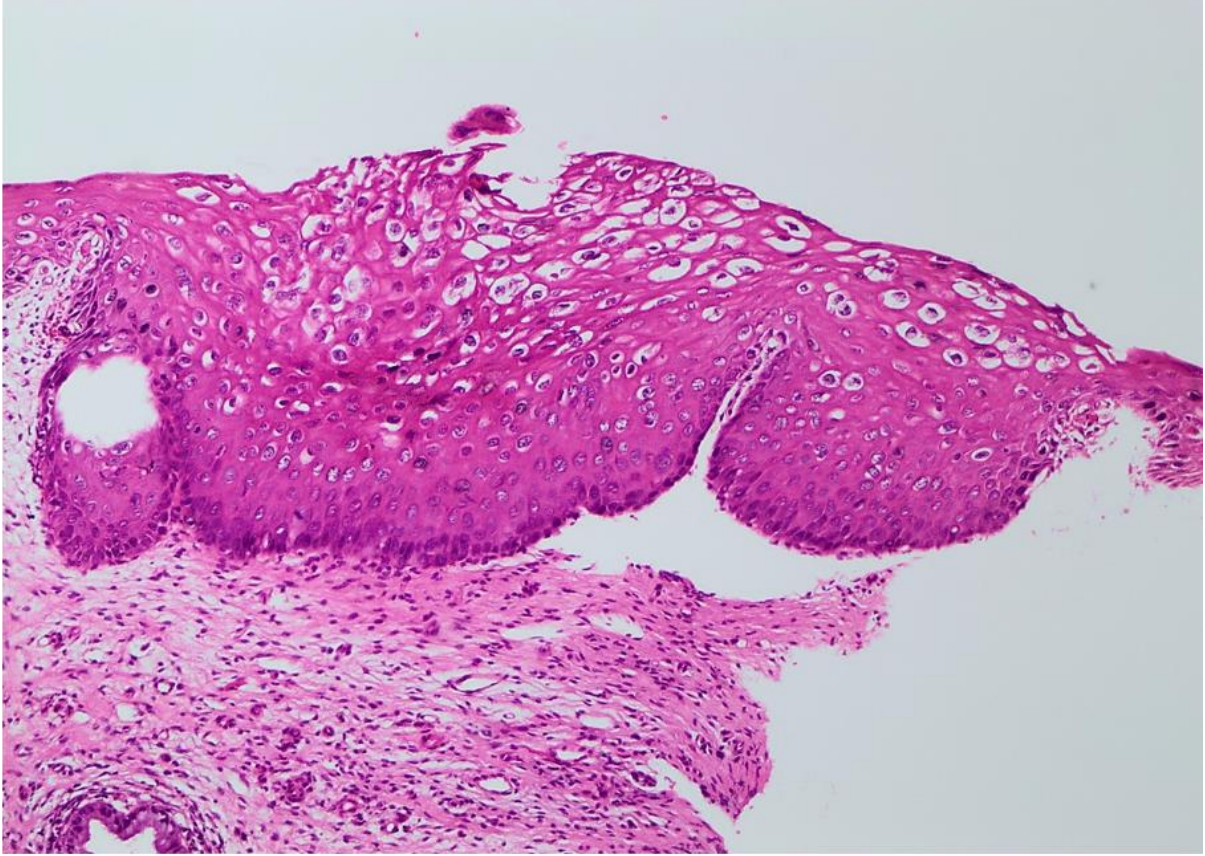
Günümüzde ise CIN1/düşük dereceli servikal intraepitelyal lezyon (LSIL), CIN2-CIN3/yüksek dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon(HSIL) olarak sınıflandırılmaktadır. CIN1 görülen vakalar takip edilirken CIN3 görülen vakalara konizasyon uygulanmaktadır. CIN2 görülen vakalarda ise hastanın yaşı, fertilizasyon isteği göz önünde bulundurularak takip ya da konizasyon uygulanabilmektedir.



14. Şekil: Servikal Lezyonlar ve Tedavi Seçeneklerinin Değişimi

Servikal intraepitelyal neoplazilerin sınıflandırılmasında temel bazı histopatolojik parametreler kullanılmaktadır.

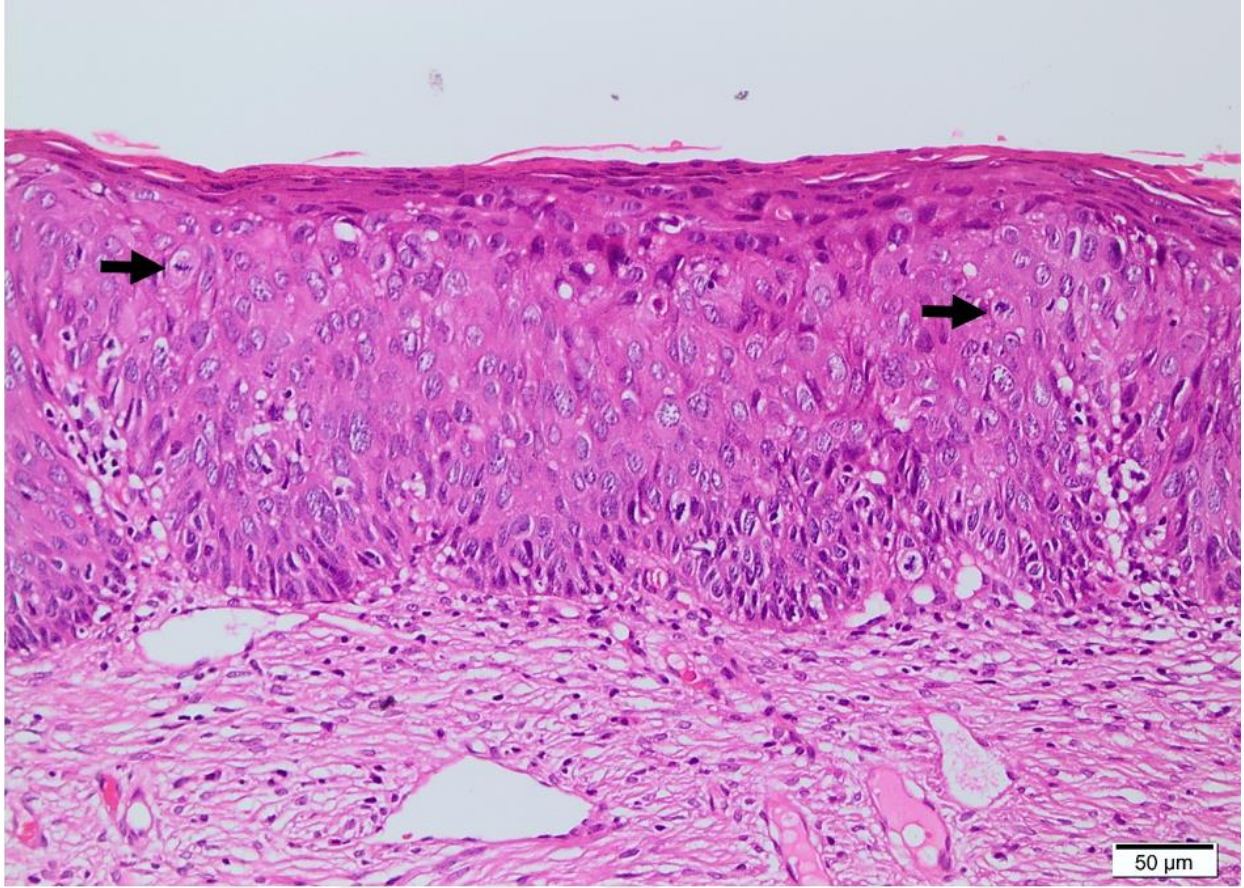
Servikal intraepitelyal neoplazi 1 (CIN1) tanısı; epitelin yüzeyinde koilositik hücrelerin görüldüğü, epitelde mitoz artışı izlenmesine karşın atipik mitozun izlenmediği vakalar için kullanılmaktadır.



Epitelin yüzeyinde, nükleusların etrafında belirgin haloların izlendiği koilositik hücreler görülmektedir.

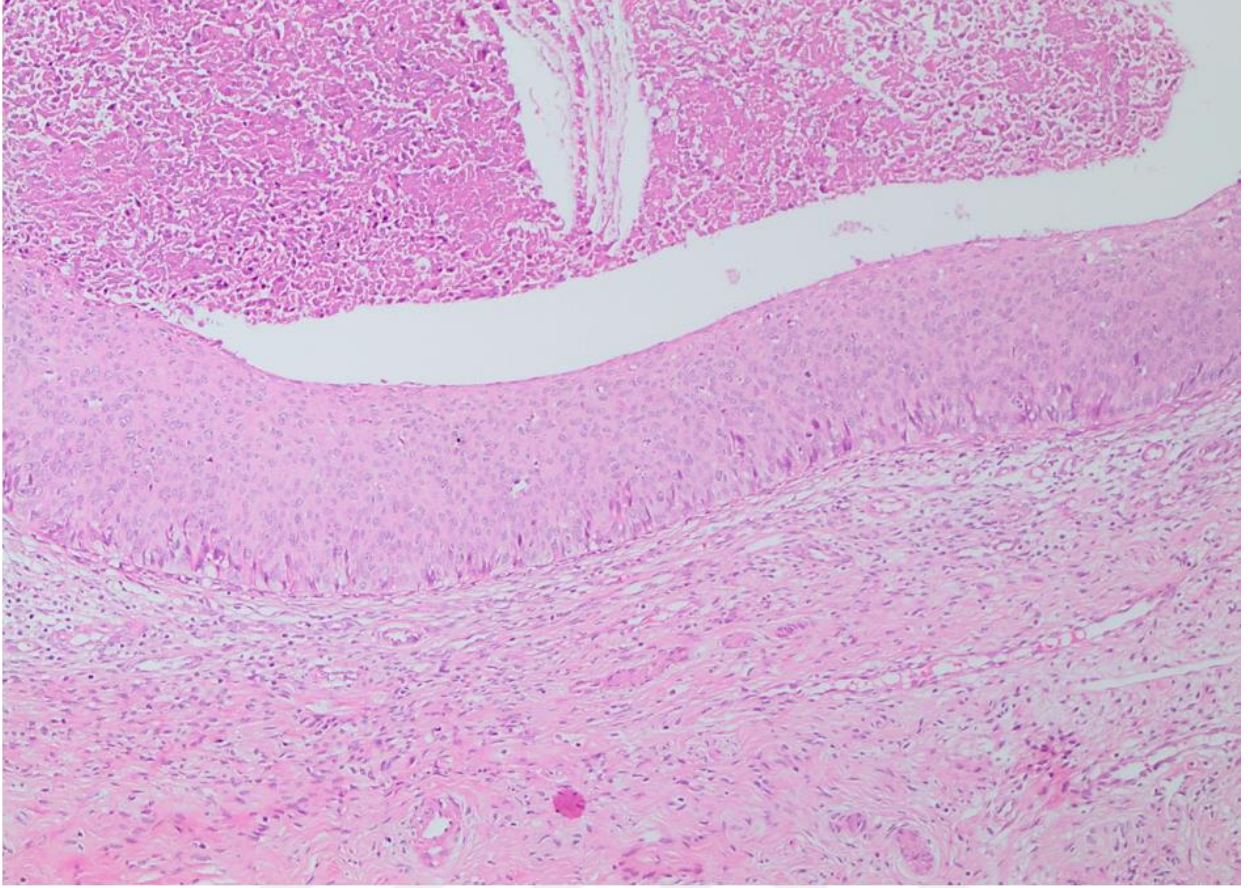
15. Şekil: CIN1 histopatolojisi

Servikal intraepitelyal neoplazi 2 (CIN2) ve 3 (CIN3) tanıları; hiperkromazinin, kaba kromatinin, nükleer membran düzensizliğinin görüldüğü hücrelerden oluşan, artmış mitozun izlendiği, atipik mitozun da görülebildiği vakalar için kullanıldı. Bu bulgular epitelin 2/3'üne kadar ulaşıyorsa ve yüzeyde maturasyon izleniyorsa tanı CIN2 ve epitelin tamamında izleniyorsa ve yüzeyde maturasyon görülüyorsa CIN3 olarak isimlendirilmektedir.



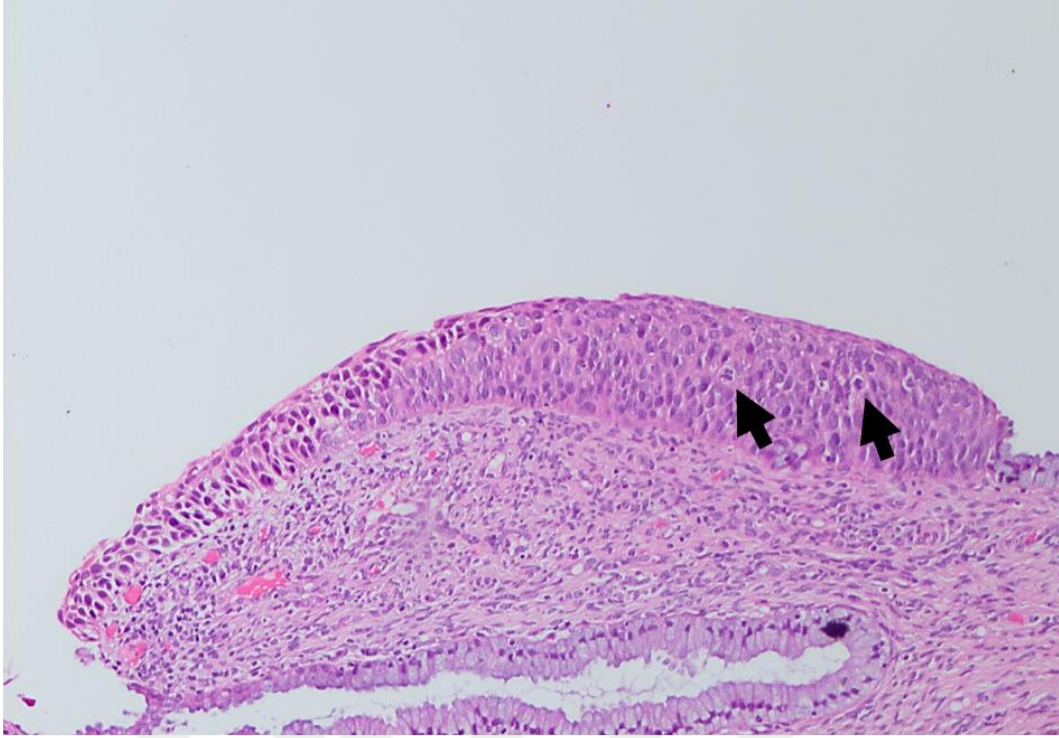
Epitelin 2/3'üne kadar ulaşan neoplastik hücreler ile yüzeyde maturasyonun devam ettiği izlenmektedir. Ok ile işaretli alanlarda mitozlar dikkat çekmektedir.

16. Şekil: CIN2 Histopatolojisi



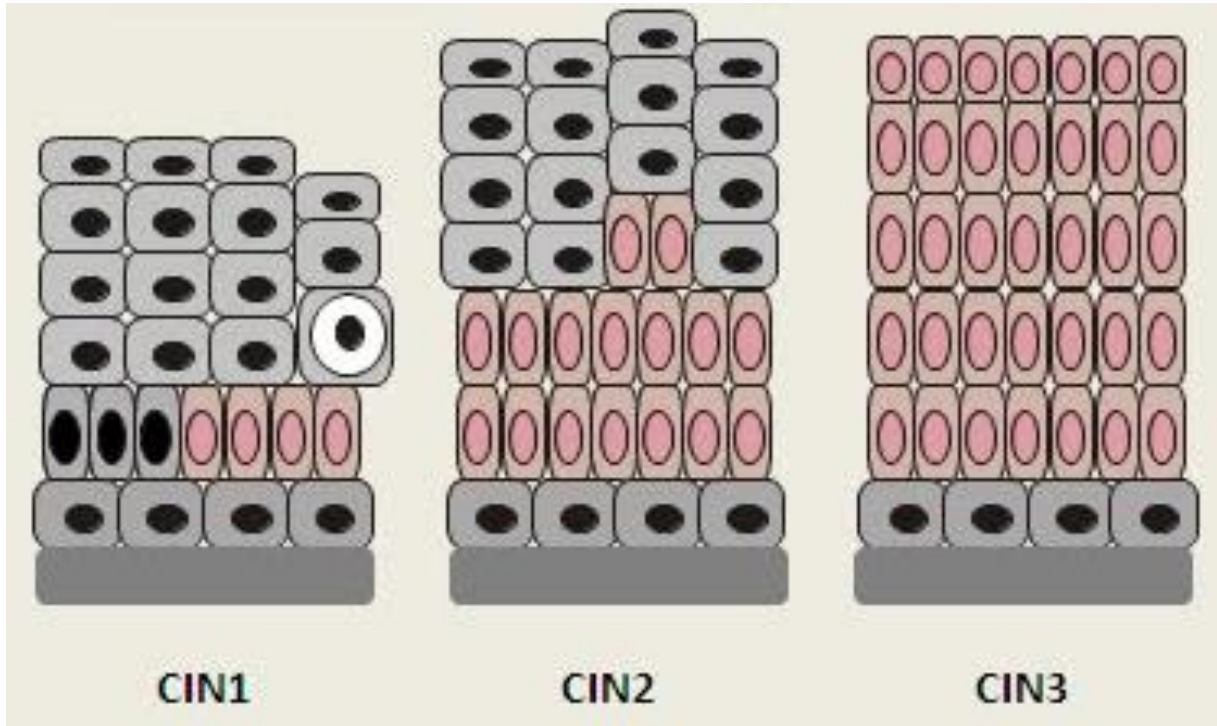
Epitelde tam kat olarak neoplastik hücreler izlenmektedir, yüzeyde maturasyon bulunmamaktadır.

17. Şekil: CIN3 Histopatolojisi 1



Epitelde tam kat olarak neoplastik hücreler izlenmektedir, yüzeyde maturasyon bulunmamaktadır. Ok ile işaretli alanlarda mitozlar dikkati çekmektedir.

18. Şekil: CIN3 Histopatolojisi 2



19. Şekil: Servikal intraepitelyal neoplazilerin şematizasyonu

2.6. Çalışmada Kullanılan İmmunohistokimyasal Belirteçlerin Özellikleri

2.6.1. P16 (P16-INK4a)

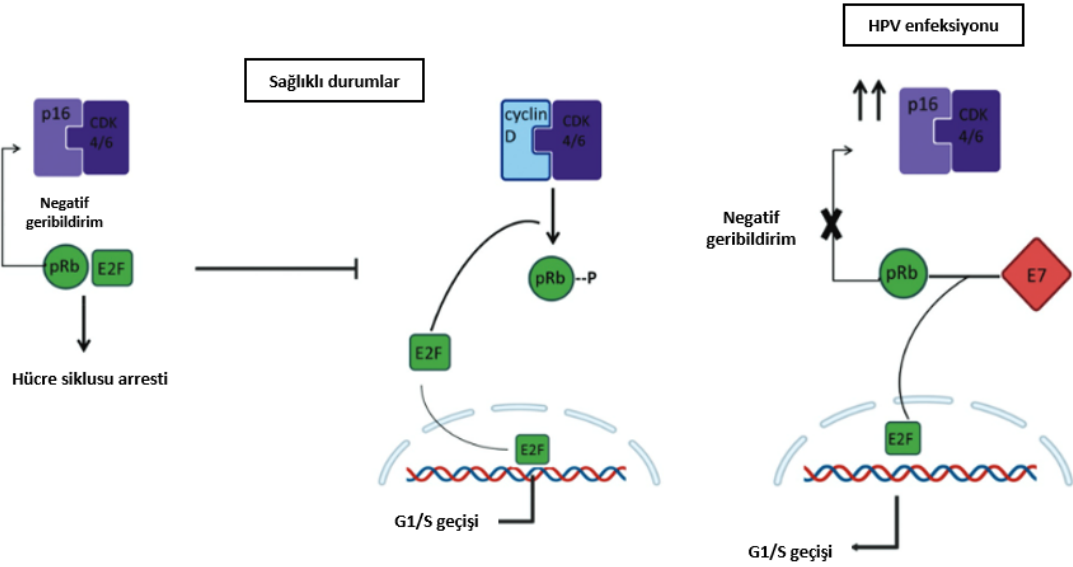
P16 (P16-INK4a); 9. kromozomun p kolunun 21.3 lokusunda bulunan CDKN2A geninin ürünüdür. Bu gen hücre içinde başlıca;

- Onkogenlerin indüklediği yaşlanma [17, 18],
- Oksidatif stresin indüklediği yaşlanma [19],
- Strese karşı hücre yanıtı,
- Mitotik G1 fazı ve G1/S geçişinde etkilidir.

P16; G1 fazının erken döneminde Rb gen kompleksi aracılığıyla hipofosforile olur ve E2F kompleksinin salınmasına neden olur [20-23]. Bu da transkripsiyon ilişkili birçok geni aktive etmekte ve hücre bölünmesini bu aşamada yavaşlatıcı bir etkiye sebep olarak hücre siklusu üzerindeki etkisini gerçekleştirmektedir. Bu etkisi nedeniyle tümör supressör gen olarak sınıflandırılmaktadır. P16-INK4a geni; homozigot delesyonlar, nokta mutasyonları, promoter metilasyonu gibi durumlarla inaktive olduğunda birçok tümörün gelişimine zemin hazırlamaktadır. Bu tümörler başlıca; baş boyun, özofagus, karaciğer, pankreatobiliyer sistem, akciğer, mesane, kolon ve meme karsinomları ile lösemi ve gliosbastomlardır. Bazı ailesel sendromlarda da P16-INK4a'nın tümör baskılayıcı rolünü güçlendiren INK4/ARF lokusunda meydana gelen germline mutasyonlar tümör gelişimine neden olabilmektedir. Bu mutasyonlar ile ailesel melanom sendromları gelişebilmektedir.

HPV ilişkili tümörlerde olduğu gibi bazı tümör tiplerinde ise P16-INK4a overekspresyonu görülmektedir. P16INK4a-Rb yolu uygun olmayan hücre çoğalmasını önlemek için kritik bir öneme sahiptir. Bu nedenle bu yolun bloke edilmesi viral onkoproteinlerin hedefi haline gelmektedir. Rb proteini, yüksek riskli HPV onkoproteini olan E7 ile etkileşime girerek inaktive edilir ve onkoprotein E6, tümör baskılayıcı p53'ün bozulmasına neden olur. Rb inaktivasyonu, P16INK4a negatif geri bildirim kontrolünden kaçmakta ve kontrolsüz hücresel replikasyonu inhibe etmeye çalışan P16INK4a seviyelerinde paradoksal bir artışa neden olmaktadır. Özet olarak; P16INK4a, hücre proliferasyonunu durdurmak için başarısız bir girişimde bulunarak

HPV ile ilişkili tümörlerde overeksprese edilmektedir [24].

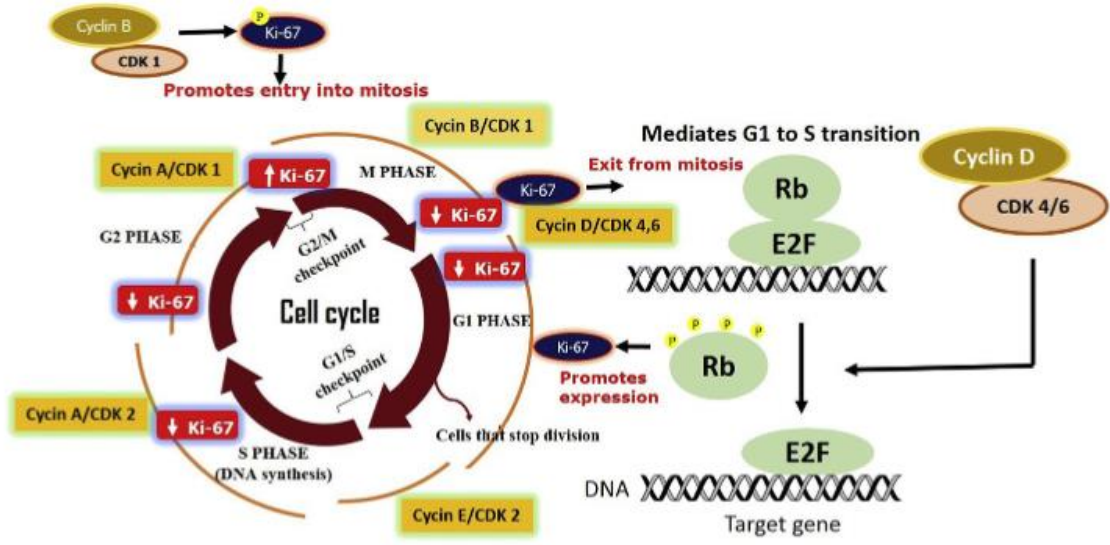


20. Şekil: HPV'nin p16 üzerindeki etkisi

2.6.2. Ki-67

Ki67; MKI-67 geni tarafından kodlanan 320 kDa ağırlıkta, non-histon nükleer ve nükleolar bir proteindir. 16 kodondan oluşmakta ve 10q26.2 kromozomunda yerleşim göstermektedir. Hücre siklusunun G1, S, G2, M fazında eksprese olan bir DNA bağlayıcı proteindir. G1 fazında esas olarak perinükleolar bölgeye yerleşim göstermektedir. İnterfaz süresi boyunca nükleolusun dens fibriler komponentinde lokalizedir. Mitoz boyunca nükleolusun parçalanması nedeniyle immunohistokimyada diffüz boyanma paterni oluşturmaktadır [25].

Ki-67; G0 dışındaki tüm hücre siklus evrelerinde bulunmaktadır. G1'den M fazına doğru düzeyleri artmakta ve en yüksek düzeye M fazı başında ulaşmaktadır. M fazı süresince CDK-1 aracılığıyla Ki-67'nin fosforilasyonu gerçekleşmekte ve bu durum mitozun ilerlemesini sağlamaktadır. CDK4/6 ise G1 fazında Rb proteininin fosforilasyonunu başlatarak E2F gibi transkripsiyon faktörlerinin salınımına neden olur. E2F overekspresyonunun görüldüğü kanserlerde; Ki-67, E2F proteinine bağlı olduğundan Ki-67 akümüülasyonu da görülmektedir [25].

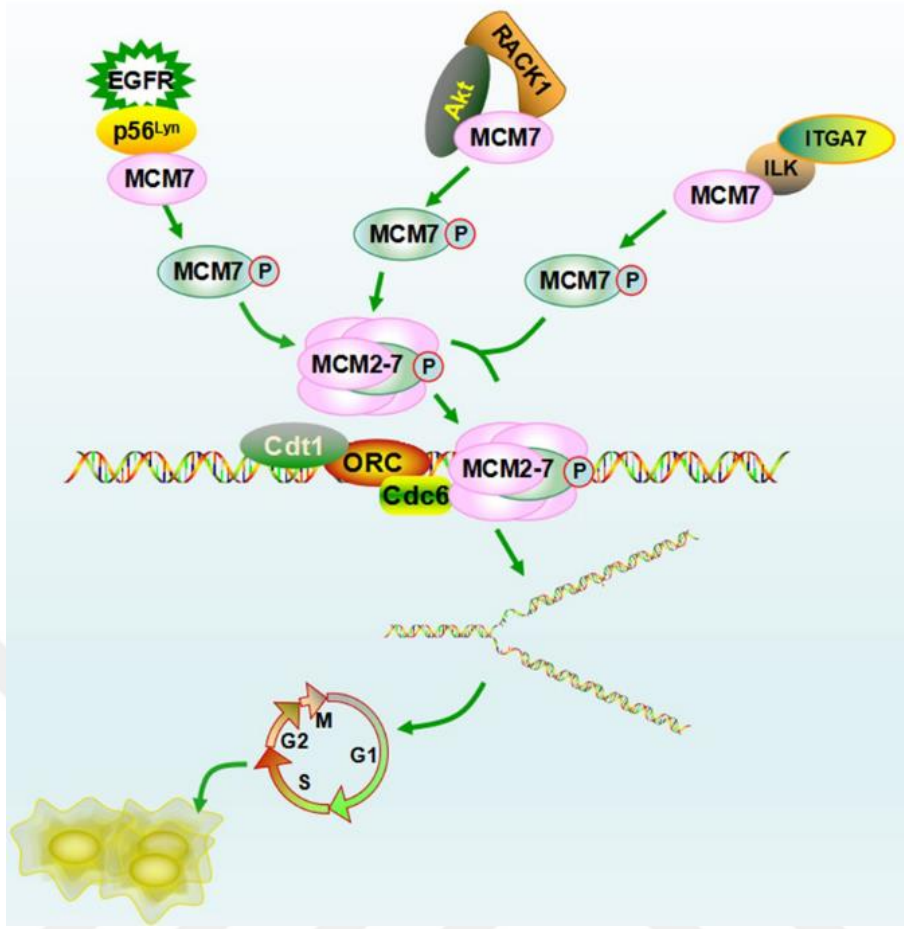


21. Şekil: Ki-67 Etki Mekanizması

2.6.3. MCM2 (Minichromosome Maintenance Protein 2)

MCM2; heteroheksamerik bir protein kompleksi olan MCM2-7 nin bir komponentidir. Ökaryotlarda replikatif enzimlerin aktivasyonunda önemli bir rol oynamaktadır. MCM kompleksi G1 fazı boyunca S fazına kadar inaktif durumdadır. Replikasyonun başlangıcında aktive duruma geçmektedir[26, 27]. MCM2 proteini; prereplikatif kompleksin aktivasyonuna ve DNA helikaz aktivasyonuna yardımcı olarak DNA duplikasyonunda DNA iplikçığının uzamasına neden olmaktadır [28, 29].

MCM kompleksi G1-S fazı geçişinde birçok farklı noktadan fosforile olmaktadır. Bu fosforilasyon MCM protein aktivitesinin ve fonksiyonunun regülasyonunu sağlamaktadır (Şekil 22). MCM proteinlerinin fosforilasyonunda meydana gelen disfonksiyon DNA replikasyonunu aksattığı gibi; hücre siklusunun progresyonunu ve hücre siklus kontrol noktası cevabını da etkilemektedir[27]. Bu durum da kanserlerin gelişmesine zemin hazırlamaktadır. Servikal intraepitelyal neoplazilerde de MCM2 proteininde ekspresyon artışı olduğu bilinmektedir [30]



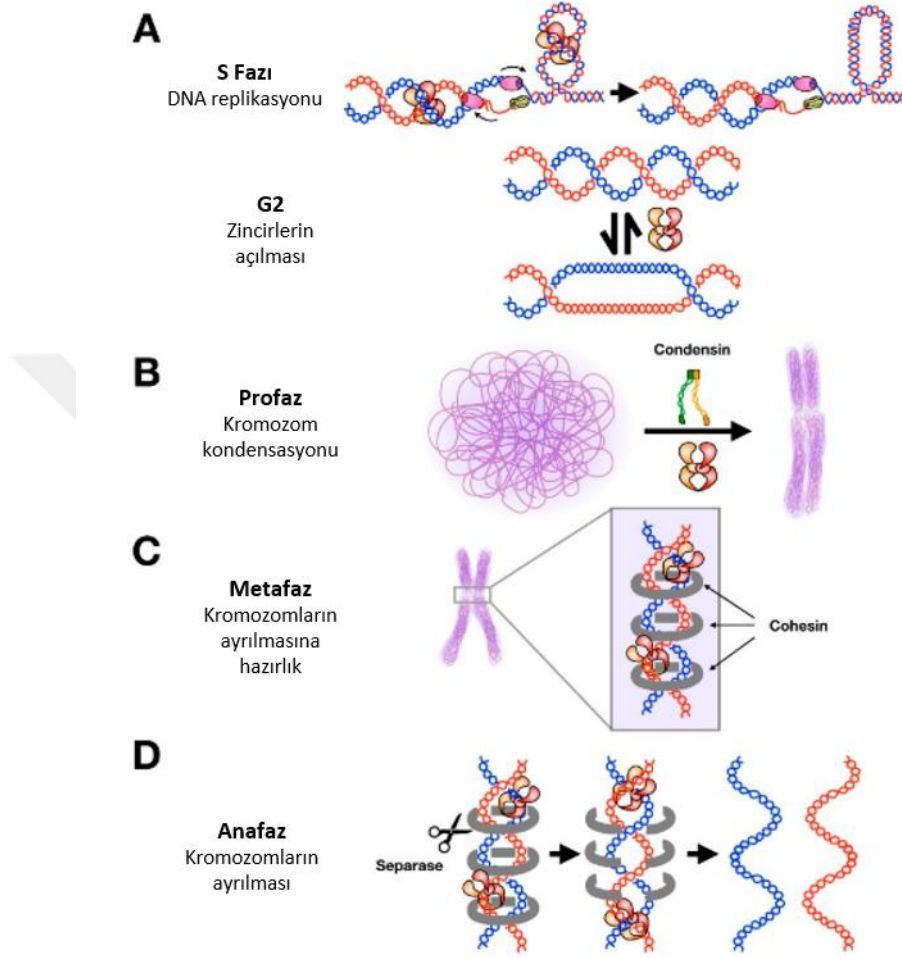
22. Şekil: MCM kompleksinin fosforillenerek helikaz etkisini göstermesi

2.6.4. TOP2A (Topoizomeraz 2A)

TOP2A; nükleer bir enzim olup, DNA süpersarmalının çözülmesini katalizlemektedir [31]. Bu özelliği nedeniyle hücre siklusuyla doğrudan ilişkisi bulunmaktadır. Hücre siklusunun S, G2, M fazı süresince eksprese edilmekte; G2-M geçişinde pik yapmakta, G1 fazında ise düzeyi azalmaktadır [32, 33].

DNA replikasyonu boyunca yeni replike edilmiş kardeş kromozomların arasındaki pozitif süpersarmalların açılmasını sağlamaktadır. Bu işlemin çoğu profaza girişte tamamlanmaktadır (Şekil 23-A). Profaz evresinde kondensin ve TOP2A kromozom kondensasyonunun gerçekleşmesinde etki göstermektedir (Şekil 23-B). Metafaz evresinde TOP2A sentromer bölgesinde lokalizedir fakat kohesin proteininin TOP2A aktivitesini engellemesi nedeniyle bu bölgedeki zincir ayrılmasını sağlayamamaktadır

(Şekil 23-C). Anafaz evresine girildiğinde ise kohesinin TOP2A aktivitesine izin vermesiyle kromozomların birbirinden ayrılması sağlanmaktadır (Şekil 23-D) [34].



23. Şekil: Hücre Siklusu boyunca TOP2A'nın rolü

TOP2A'nın DNA substratlarına afinitesi ve katalitik aktivitesi;

- DNA topolojisindeki hücre döngüsü ilişkili değişiklikleri,
- Protein-protein interaksiyonlarını,
- Post-translasyonel modifikasyonları direkt olarak kontrol eder.

TOP2A ilişkili süreçteki yanlış adımlar G2-M geçişinde hücre siklusunun durmasına neden olur; bu durum genomik hasarın önüne geçilmesinde etkilidir. Hücre siklusundaki bu kontrol noktasının kaybı tümörögenезis ile ilişkilidir [34]. TOP2A'nın up-regüle olmasının da servikal kanserlerin patogeneğinde etkisi olduğu gösterilmiştir

[35].

2.6.5. CK7 (Sitokeratin 7)

Sitokeratin 7 (CK7); bir tip II keratindir. Sitokeratinler epitelyal hücrelerdeki intrasitoplazmik hücre iskeletinde yer alan proteinlerdir. Belirli tip hücreler spesifik sitokeratinler içermektedir. Bunlardan CK7 ise skuamokolumnar bileşke hücrelerine oldukça sensitif bir belirteçtir. Embriyolojik dönemde skuamokolumnar bileşke hücreleri suprabazal yerleşimli olarak bulunmaktadır. Doğumda skuamokolumnar bileşke immatür görünüm kazanmaktadır. Stratifiye bazal skuamöz tabakanın gelişimiyle bu alana özgü olan embriyolojik markerler progresif olarak kaybolurlar. Yalnızca rezidual embriyonik hücreler (skuamokolumnar bileşke hücreleri) çok katlı skuamöz epitelin yüzeyinde bulunabilmektedirler [15].

Skuamokolumnar bileşke hücreleri neoplastik transformasyon açısından oldukça önemli rol oynamaktadır; çünkü bu hücrelerin yüksek riskli HPV ile enfekte olması servikal karsinogenezin ilk aşamasını oluşturmaktadır. Literatürde CK7'deki yüksek immunekspresyonun CIN1'den CIN2 ve CIN3'e transformasyonla ilişkili olabileceği gösterilmiştir [9, 36-38]. Literatürdeki bu ilişkiden yola çıkarak CIN1 vakalarına kıyasla CIN2 ve CIN3 vakalarında CK7 pozitifliğinin daha fazla görüleceği öngörülmüştür. Bu durumun tanısal açıdan bir anlamlılık oluşturup oluşturmadığı çalışmamızın amaçları arasında yer almaktadır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Olgu Seçimi

Çalışmamızda değerlendirilen vakalar Ocak 2014 – Aralık 2020 tarihleri arasında Marmara Üniversitesi Pendik Eğitim Araştırma Hastanesi Patoloji arşivinde bulunan servikal intraepitelyal neoplazi tanısı almış biyopsi materyalleri ve olağan servikal biyopsi tanısı almış kontrol grubu vakalarından oluşmaktadır. Bu vakalar Marmara Üniversitesi Pendik Eğitim Araştırma Hastanesi Bilgi Sistemi Origo programı

kullanılarak tespit edilmiş ve vaka numaralarına ulaşılmıştır.

Gerekli vaka listesi elde edildikten sonra hastane arşivinden vaka parafin blokları ve lamları çıkarılmış, eksik parafin bloğu olan ya da parafin blokta yeterli doku bulunmayan vakalar çalışmaya dahil edilmemiştir.

3.2. Etik Kurul

09.2020.84 protokol numaralı projemiz, Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 03.01.2020 tarihli yazı ile onaylanmıştır.

3.3. Yöntem

3.3.1. İmmunohistokimya Uygulanması

İmmunohistokimya uygulanması için formalin fikse parafine gömülü doku bloklarından 3 mikrometre kalınlığında kesitler hazırlanarak pozitif şarjlı lamlara alındı. 70°C'de etüvde bekletildi. İmmunohistokimyasal boyama süreci Ventana Medical Systems, Tuscon, AZ tarafından üretilen tam otomatize Ventana Benchmark Ultra cihazında yapıldı. Deparafinizasyon ve antijen açığa çıkarma işlemleri otomatize şekilde uygulandı. Cihazda biyotinsiz, HRP multimer bazlı, hidrojen peroksit substrat ve 3,3'-diaminobenzidin tetrahidroklorit (DAB) içeren hazır kit (ultraView™ Universal DAB Detection Kit, Catalog Number 760-500, Ventana Medical Systems, Tuscon, AZ) kullanıldı. P16 (Klon G175-1239, BD Pharmingen™ , BD Biosciences, US), Ki-67 (Klon MIB-1, DAKO, Denmark), MCM2 (Klon EP40, Epitomics, USA), TOP2a (Klon EP93, Epitomics, USA), CK7 (Klon M7018, DAKO, Denmark) antikorları kullanıldı (Tablo 1). Arka plan boyası için 16 dakika Hematoxylin, 4 dakika Bluing Reagent kullanıldı. Boyamam ardından havada kurutulan lamların üzerine kapatıcı materyal ile lamel konuldu.

Tablo 1: Kullanılan immunohistokimyasal antikorlar ve uygulanma biçimi

Antikor	Klon	Dilüsyon	İnkübasyon Süresi	Sıcaklık
P16	G175-1239	4/100	1 saat	37 °C
Ki-67	MIB-1	Kullanıma hazır	36 dakika	37 °C
MCM2	EP40	1/100	1 saat	37 °C
TOP2A	EP93	1/100	1 saat	37 °C
CK7	M7018	Kullanıma hazır	1 saat	37 °C

3.4. Değerlendirme

3.4.1. Histopatolojik Değerlendirme

Hematoksilen&Eozin boyalı lamalar jinekopatoloji konusunda uzman iki patoloğ tarafından vakaların tanıları bilinmeden ayrı ayrı değerlendirildi. Değerlendirme sonucunda olgular aşağıda histopatolojik özelliklerinden bahsedilen CIN1, CIN2 ve CIN3 tanı kriterlerine göre gruplandı.

Servikal intraepitelyal neoplazi 1 (CIN1) tanısı; epitelin yüzeyinde koilositik hücrelerin görüldüğü, epitelde mitoz artışı izlenmesine karşın atipik mitozun izlenmediği vakalar için kullanıldı.

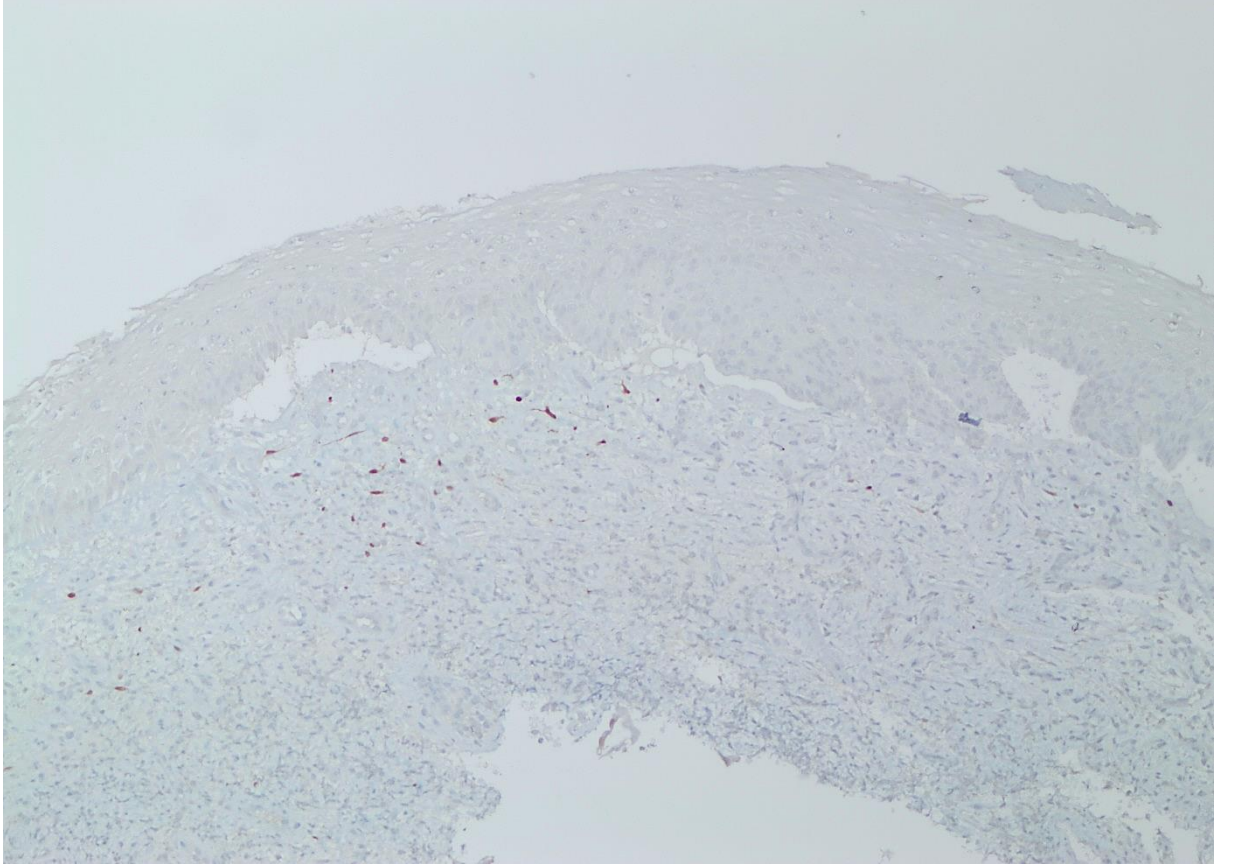
Servikal intraepitelyal neoplazi 2 (CIN2) ve 3 (CIN3) tanıları; hiperkromazinin, kaba kromatinin, nükleer membran düzensizliğinin görüldüğü hücrelerden oluşan, artmış mitozun izlendiği, atipik mitozun da görülebildiği vakalar için kullanıldı. Bu bulgular epitelin 2/3'üne kadar ulaşıyorsa ve yüzeyde maturasyon izleniyorsa tanı CIN2 ve epitelin tamamında izleniyorsa ve yüzeyde maturasyon görülüyorsa CIN3 olarak ayrıldı.

Uyumsuzluk olan tanıları birlikte tekrar değerlendirilerek ortak tanıya ulaşıldı.

3.4.2. P16 immunohistokimyasal değerlendirme

Ventana Benchmark Ultra cihazında uygulanan P16 (Klon G175-1239, BD

Pharmlngen™, BD Biosciences, US) immunohistokimyası ile boyalı lamlar mikroskopta değlerlendirildi. Hücrelerdeki sitoplazmik ve nükleer boyanma anlamlı olarak kabul edildi. Lezyon alanlarında boyanmanın yaygınlığı, epiteldeki boyanma yükseklığı ve şiddeti göz önüne alınarak değlerlendirilme yapıldı. Lezyon alanında görülen yamasal ve zayıf şiddetteki boyanmalar negatif olarak değlerlendirildi. Epitelde bant şeklinde boyanma pozitif olarak değlerlendirildi ve boyanma y kseklığıne göre epitelin 1/3' ne kadar olan boyanma 1+, 2/3' ne kadar olan boyanma 2+ ve 3/3' ne kadar (tam kat) olan boyanma 3+ olarak skorlandı.



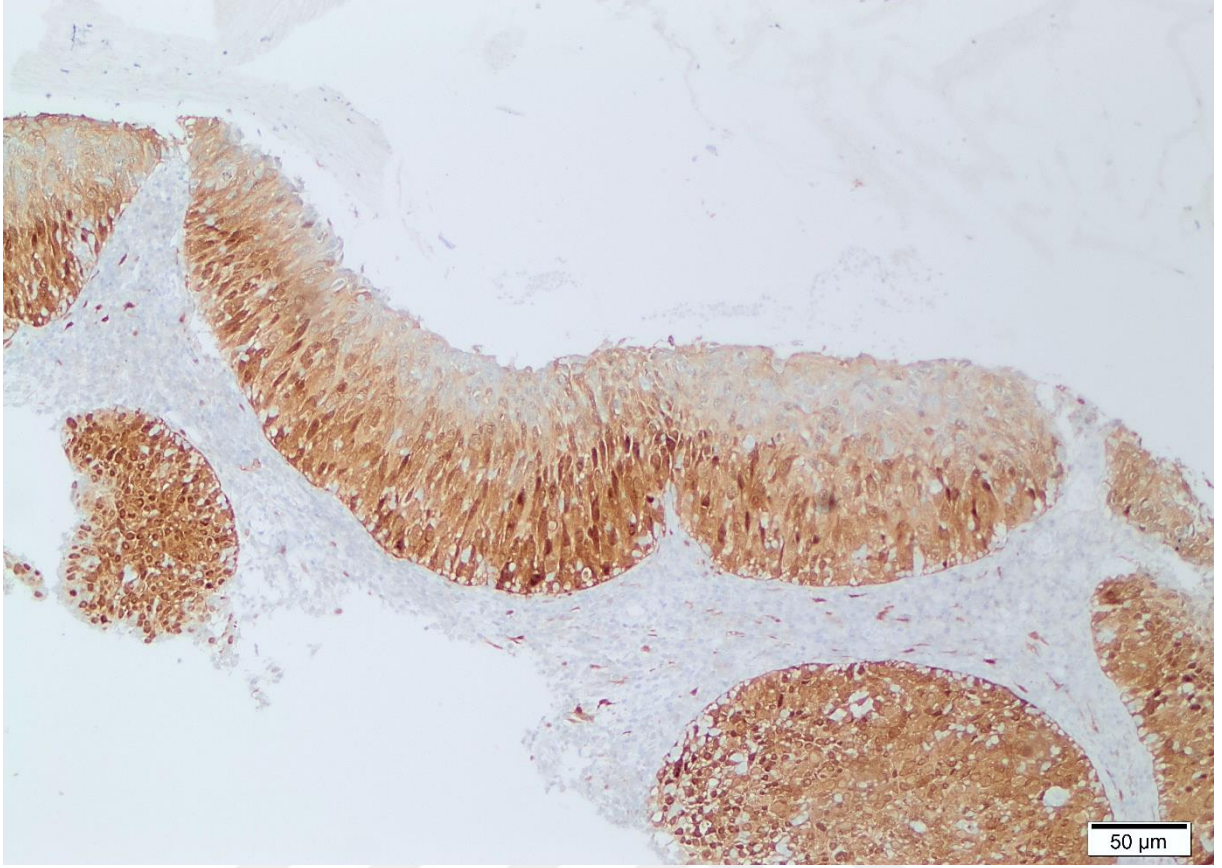
24. Şekil: P16 skor 0



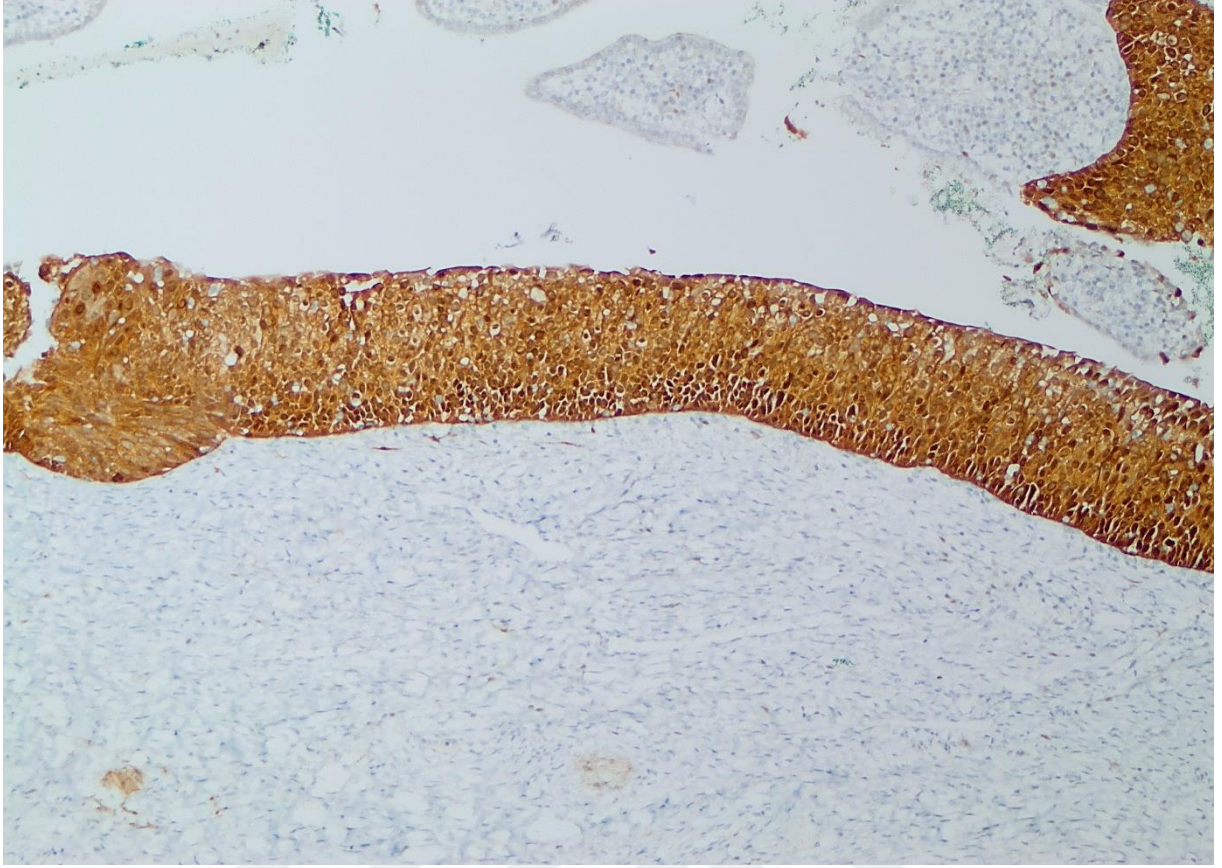
25. Şekil: P16 yamasal boyanma paterni



26. Şekil: P16 1+ boyanma paterni



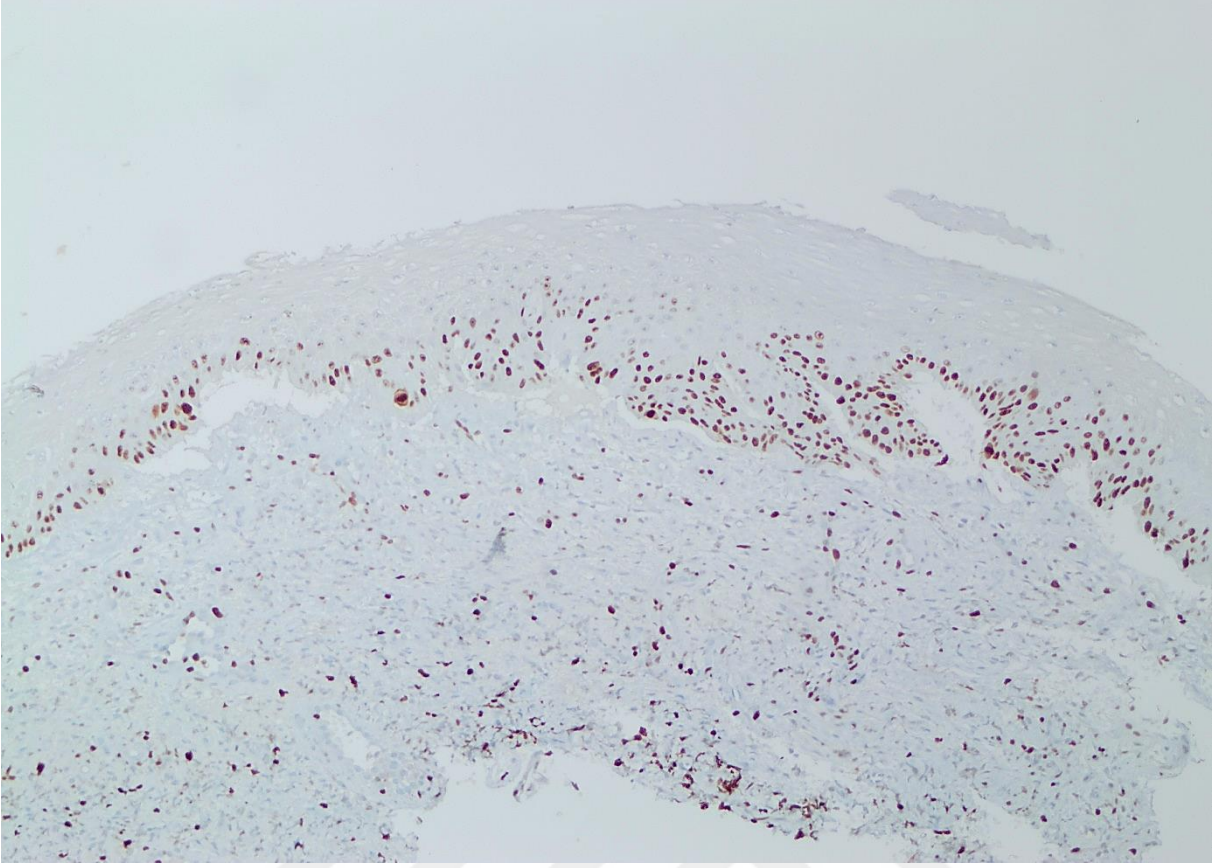
27. Şekil: P16 2+ boyanma paterni



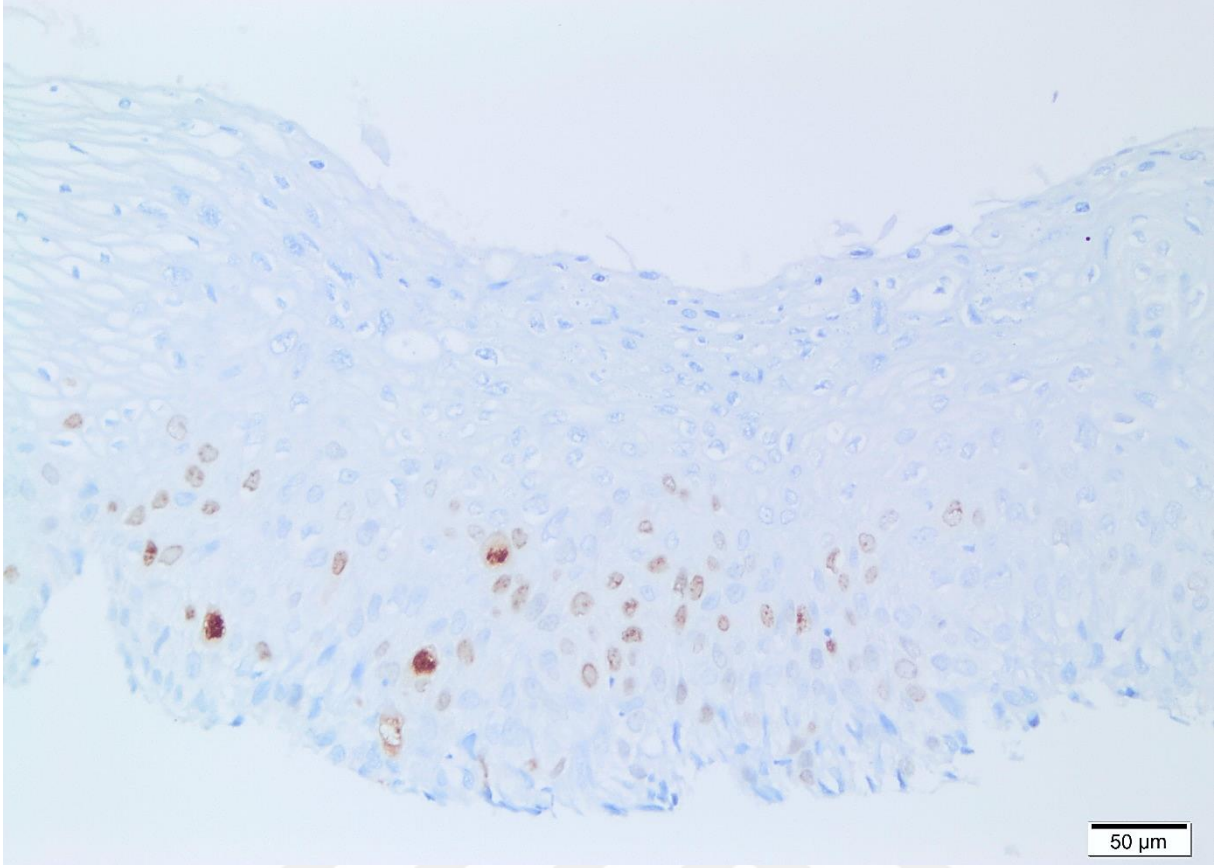
28. Şekil: P16 3+ boyanma paterni

3.4.3. Ki67 immunohistokimyasal değerlendirme

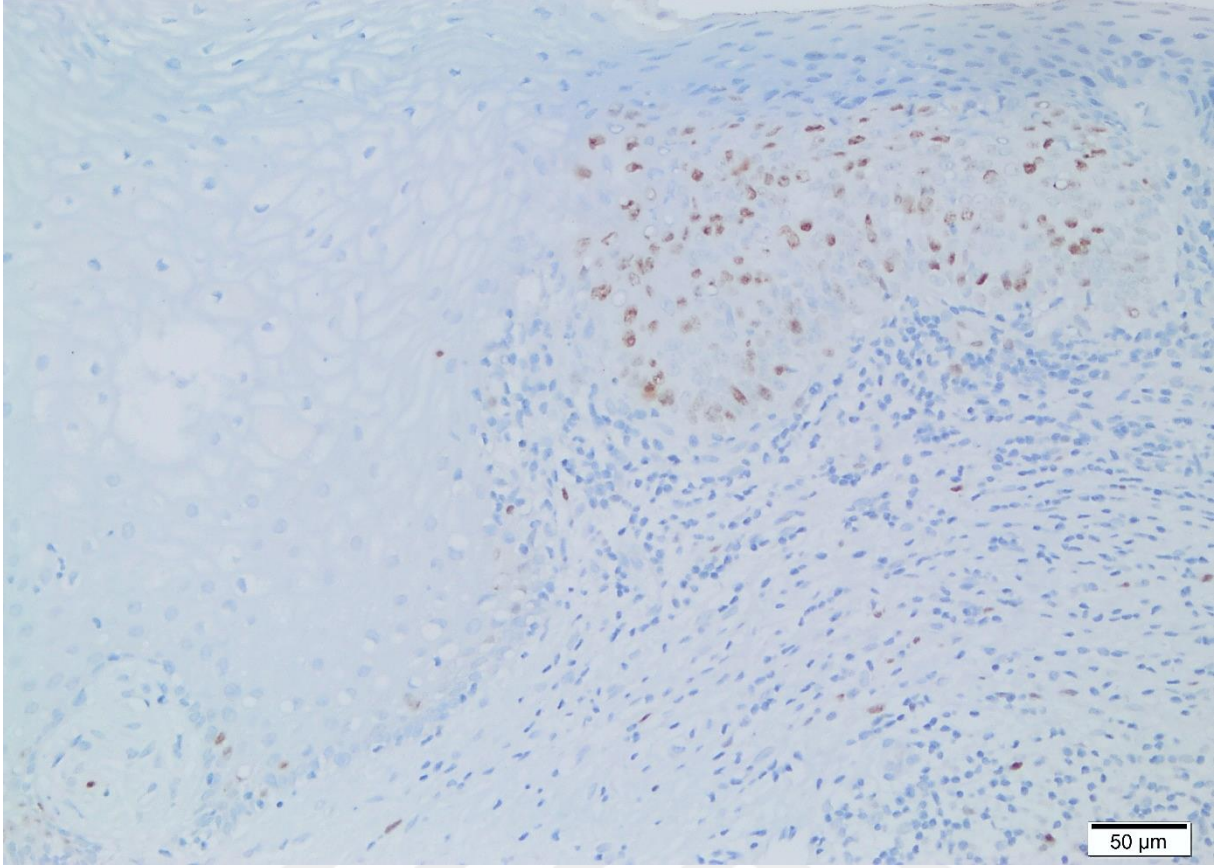
Ventana Benchmark Ultra cihazında uygulanan Ki-67 (Klon MIB-1, DAKO, Denmark) immunohistokimyası ile boyalı lamalar mikroskopta değerlendirildi. Hücrelerdeki nükleer boyanma anlamlı olarak kabul edildi. Boyanmanın bazal/parabazale sınırlı olması skor 0, epitelin alt 1/3'üne ulaşması 1+, 2/3'üne ulaşması 2+, 2/3-3/3 arası 3+ olarak değerlendirildi. Nükleer boyanma homojen olarak bazal/parabazal tabaka ya da alt 1/3'de izlenmesine karşın epitel yüzeyinde tek tük nükleer boyanmanın izlendiği olgular da 1+ olarak değerlendirildi.



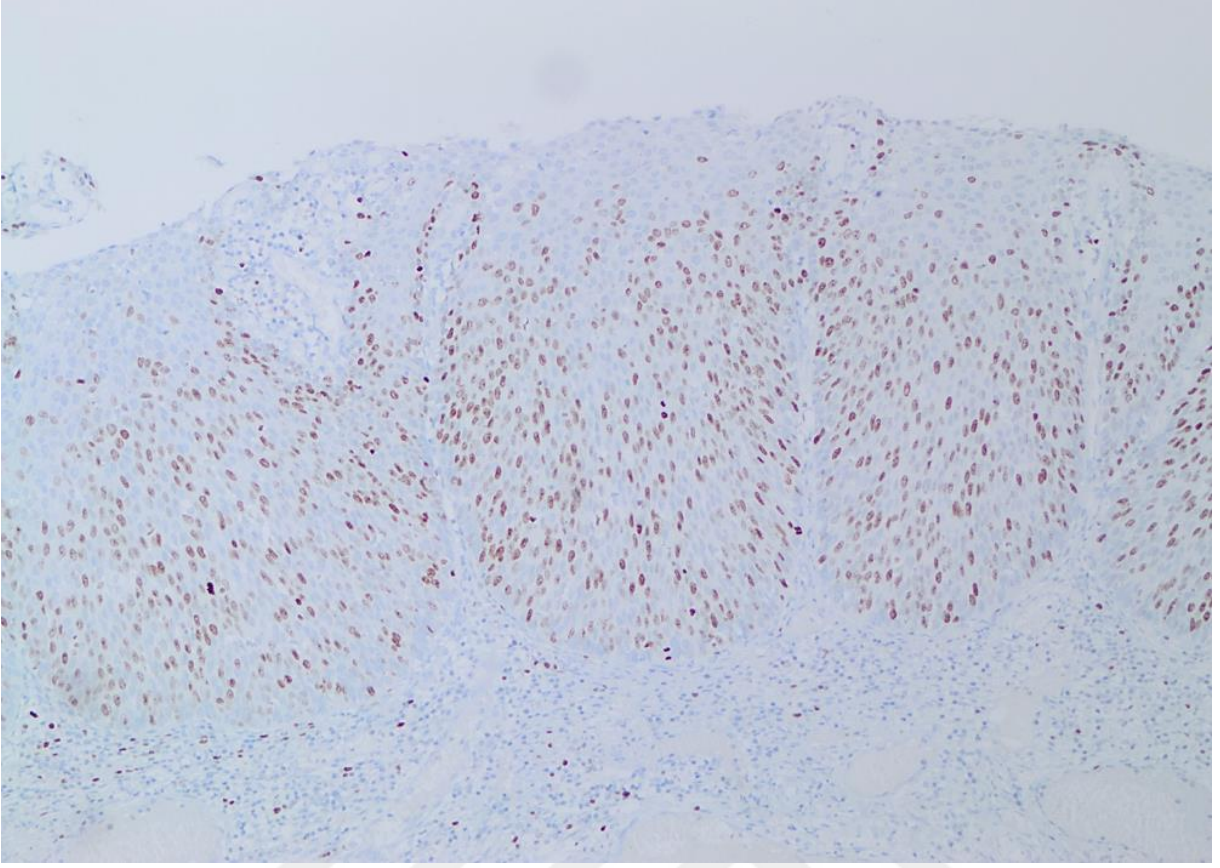
29. Şekil: Ki-67 skor 0



30. Şekil: Ki-67 1+ boyanma paterni



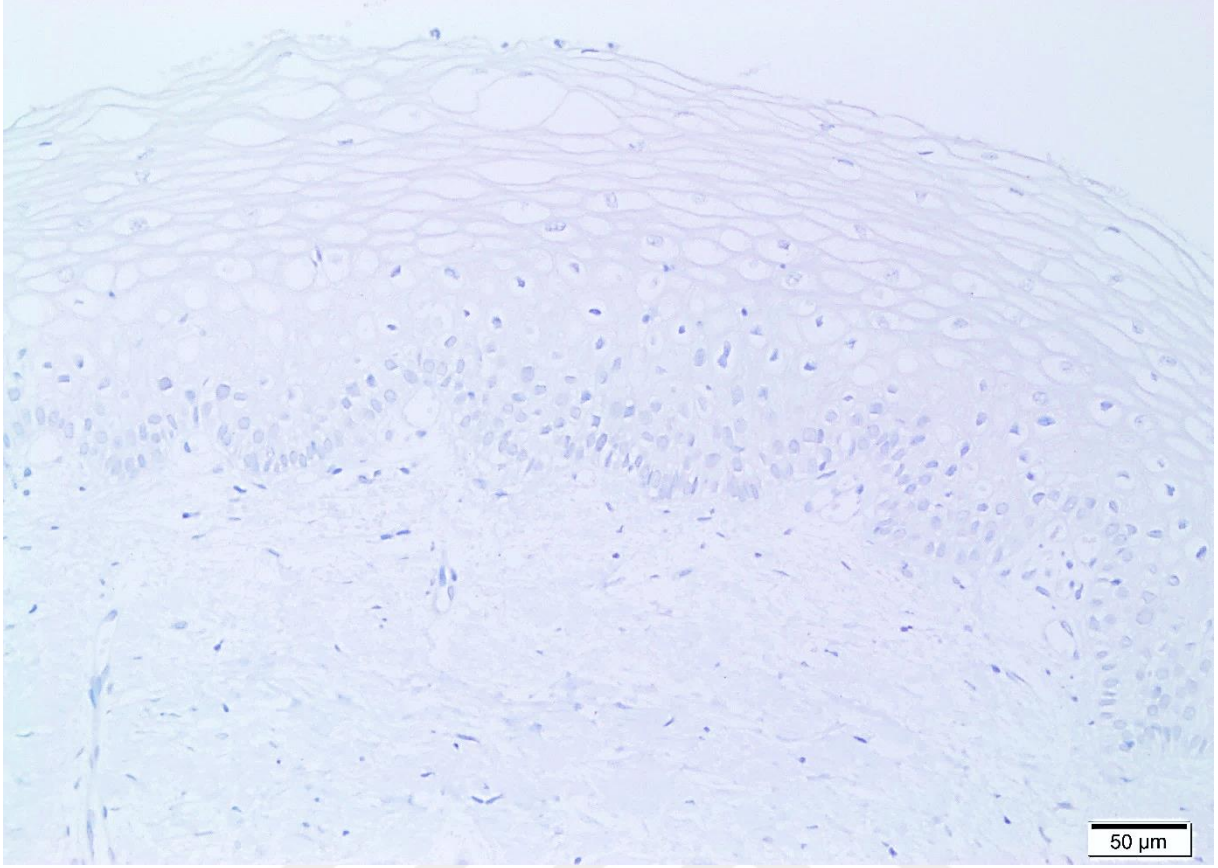
31. Şekil: Ki-67 2+ boyanma paterni (x20)



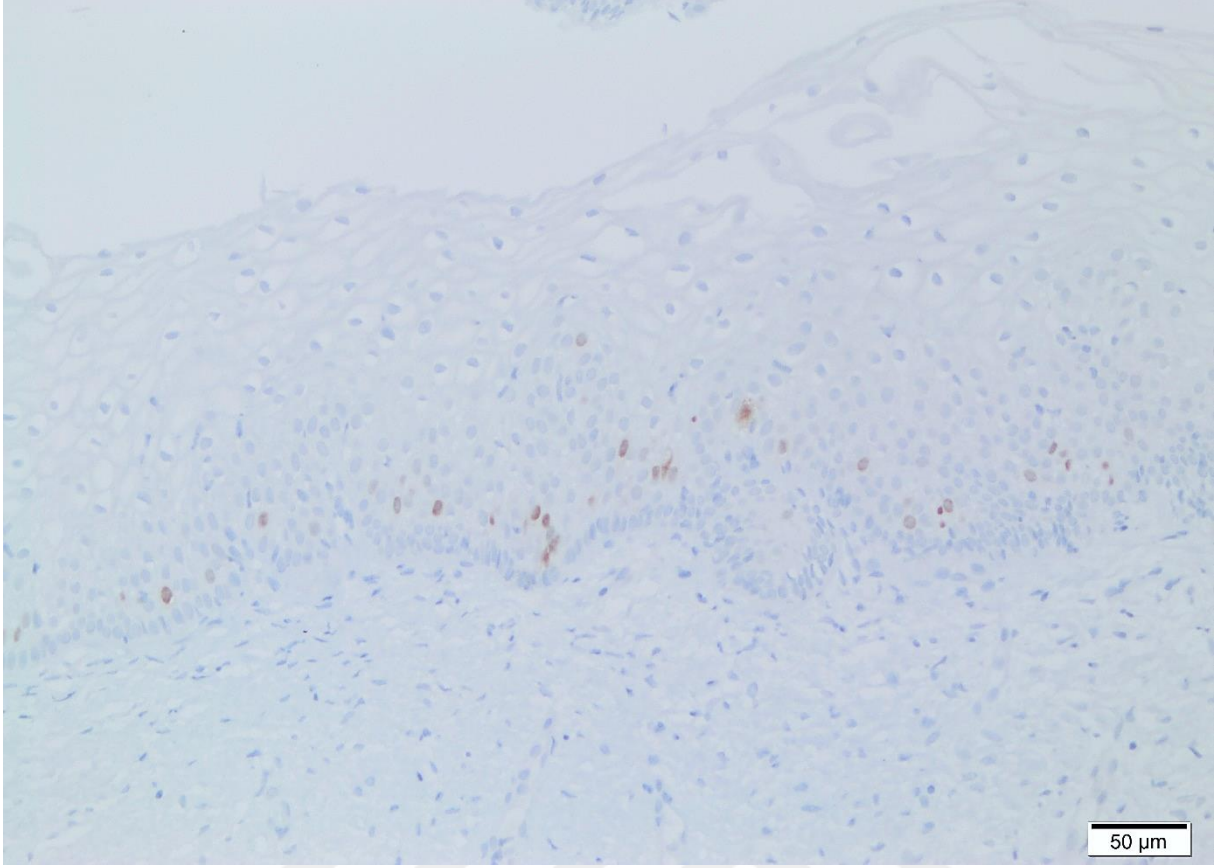
32. Şekil: Ki-67 3+ boyanma paterni

3.4.4. TOP2A immunohistokimyasal değerlendirme

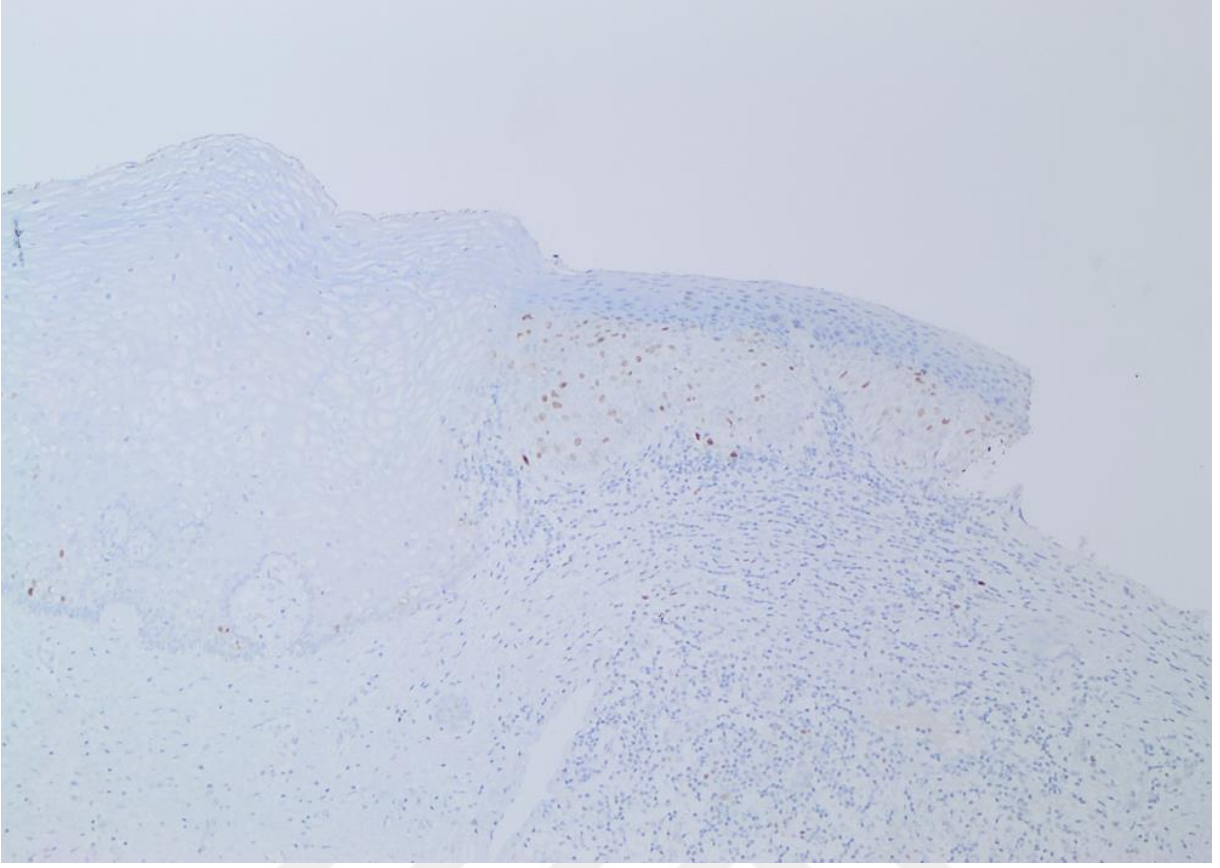
Ventana Benchmark Ultra cihazında uygulanan TOP2a (Klon EP93, Epitomics, USA) immunohistokimyası ile boyalı lamalar mikroskopta değerlendirildi. Hücrelerdeki nükleer boyanma anlamlı olarak kabul edildi. Boyanmanın hiç olmaması ya da bazal/parabazale sınırlı olması skor 0, epitelin alt 1/3'üne ulaşması 1+, epitelin alt 2/3'üne ulaşması 2+, epitelin üst 1/3'üne ulaşması ya da tam kat boyanması 3+ olarak değerlendirildi.



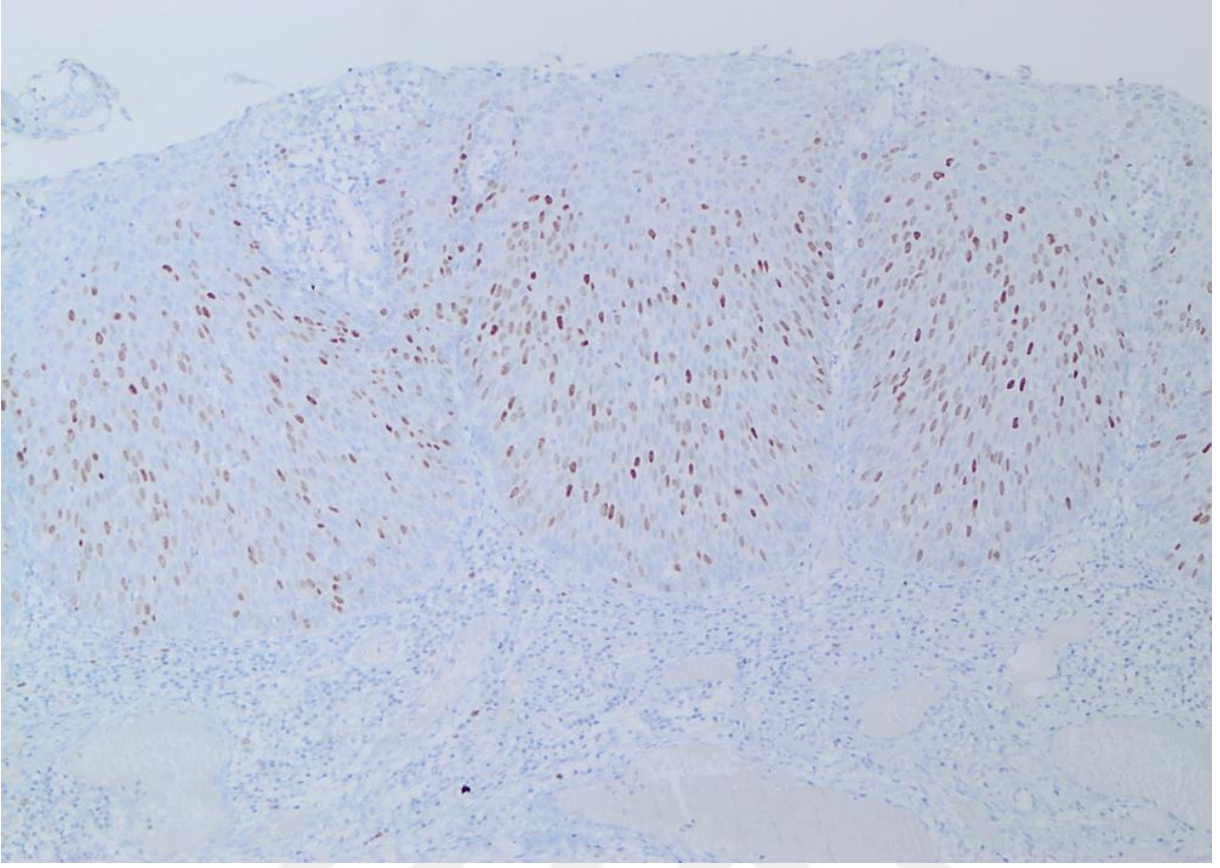
33. Şekil: TOP2A skor 0



34. Şekil: TOP2A 1+ boyanma paterni



35. Şekil: TOP2A 2+ boyanma paterni



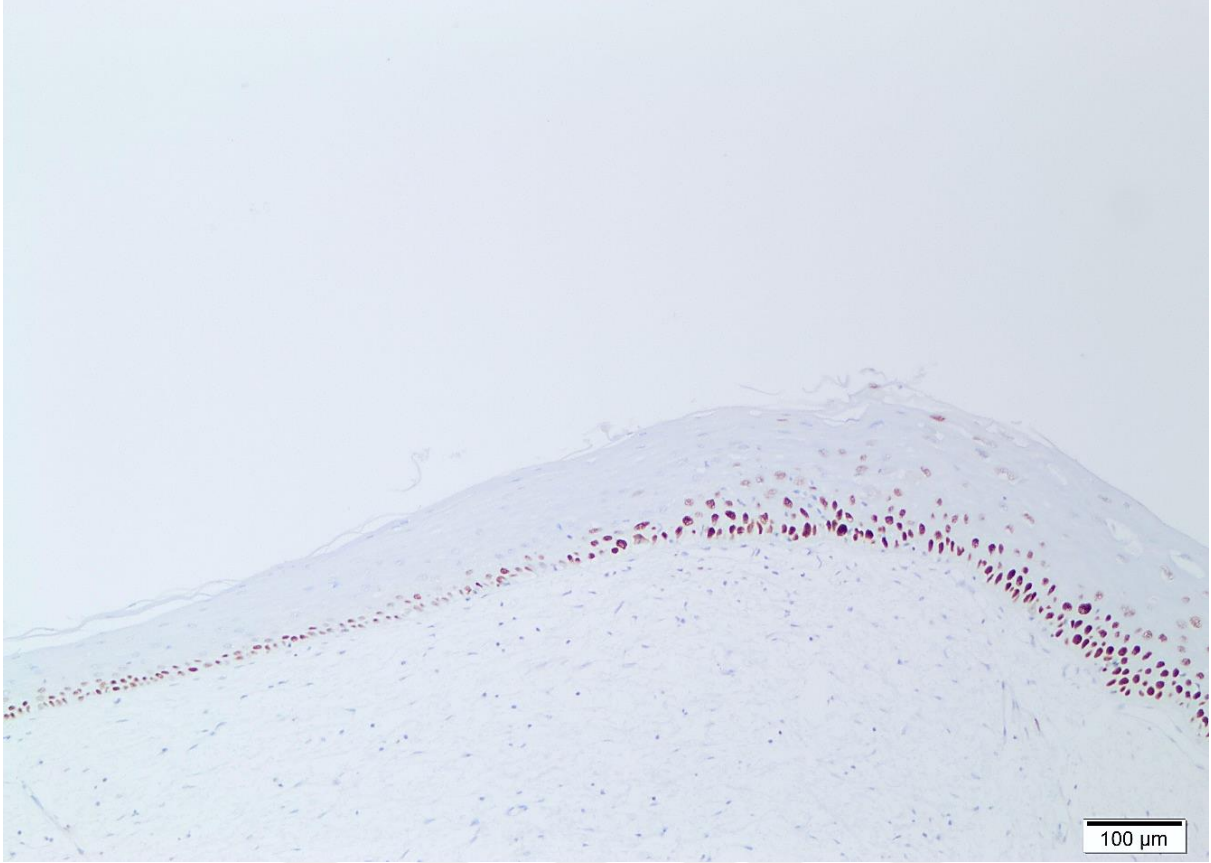
36. Şekil: TOP2A 3+ boyanma paterni

3.4.5. MCM2 immunohistokimyasal değerlendirme

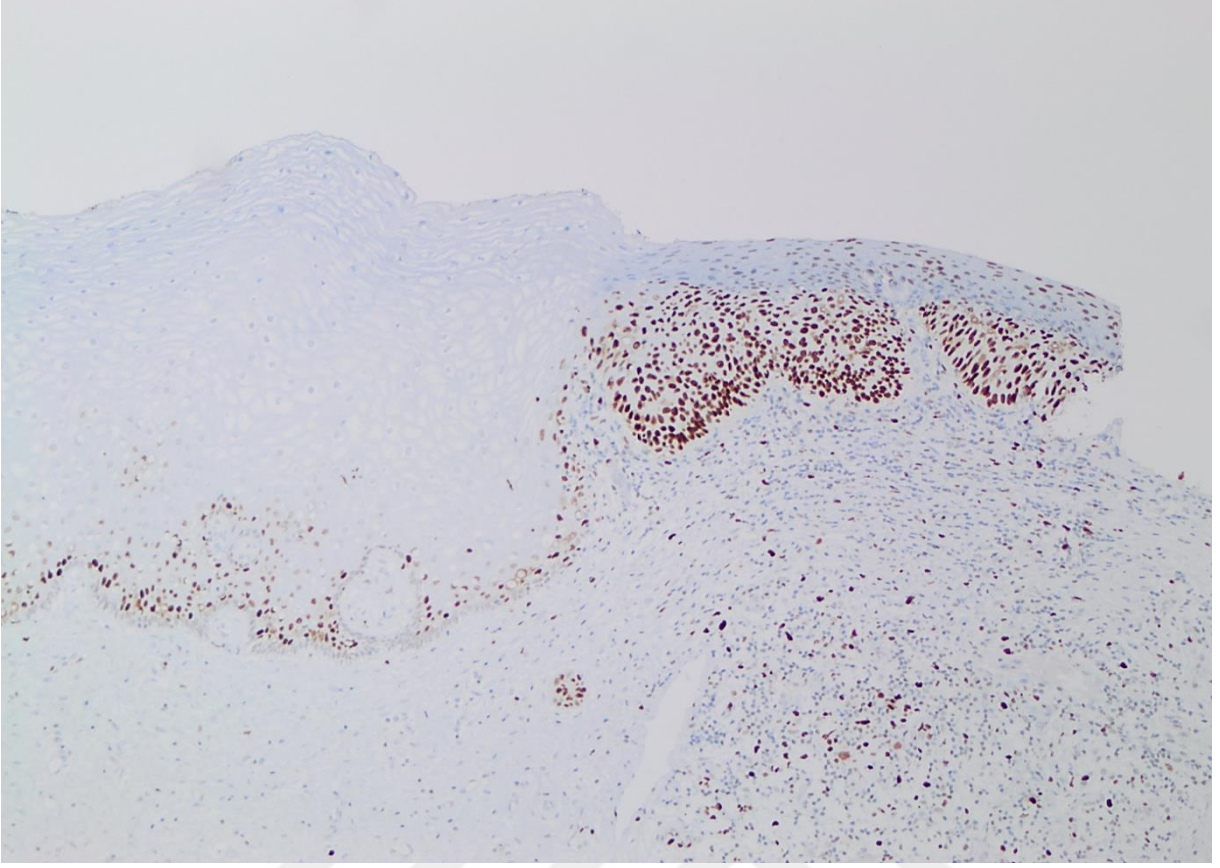
Ventana Benchmark Ultra cihazında uygulanan MCM2 (Klon EP40, Epitomics, USA) immunohistokimyası ile boyalı lamlar mikroskopta değerlendirildi. Hücrelerdeki nükleer boyanma anlamlı olarak kabul edildi. Boyanmanın hiç olmaması ya da bazal/parabazale sınırlı olması skor 0, epitelin alt 1/3'üne ulaşması 1+, epitelin alt 2/3'üne ulaşması 2+, epitelin üst 1/3'üne ulaşması ya da tam kat boyanması 3+ olarak değerlendirildi.



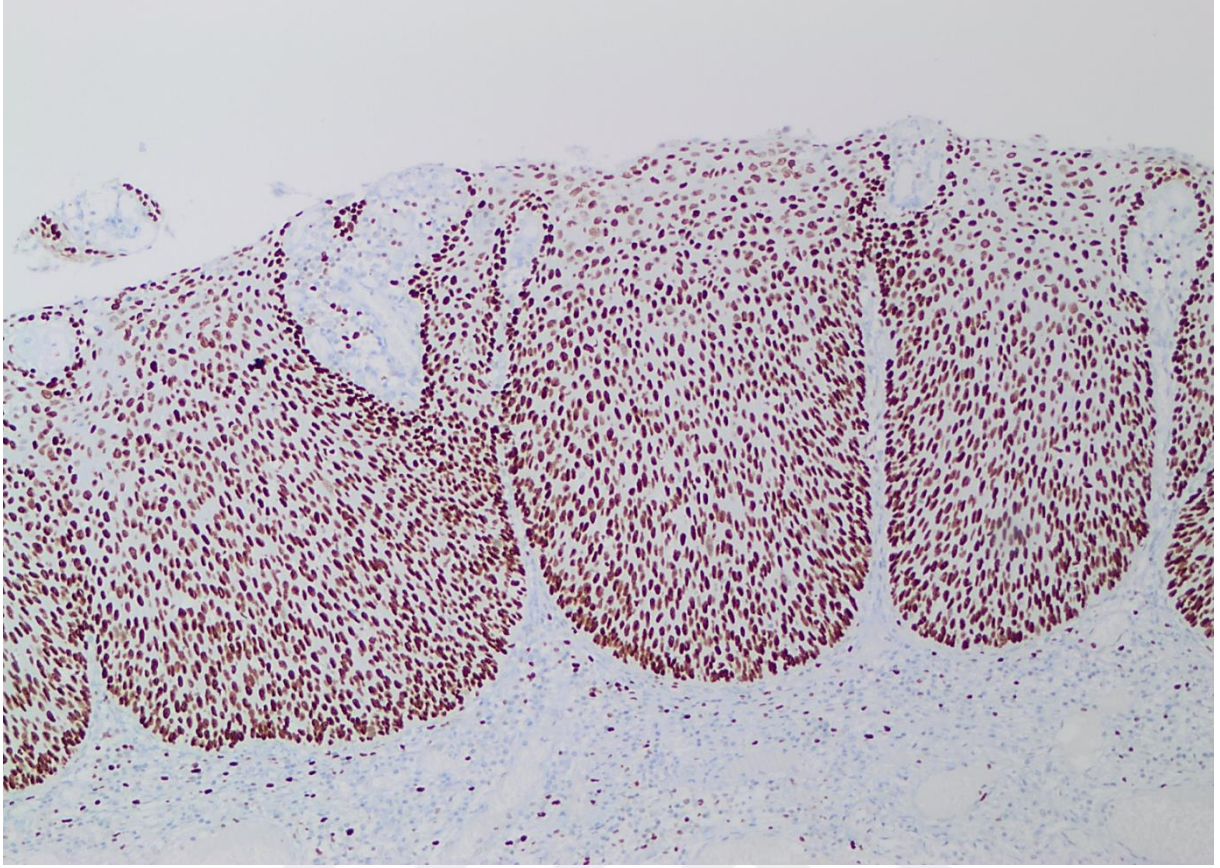
37. Şekil: MCM2 skor 0



38. Şekil: MCM2 1+ boyanma paterni



39. Şekil: MCM2 2+ boyanma paterni

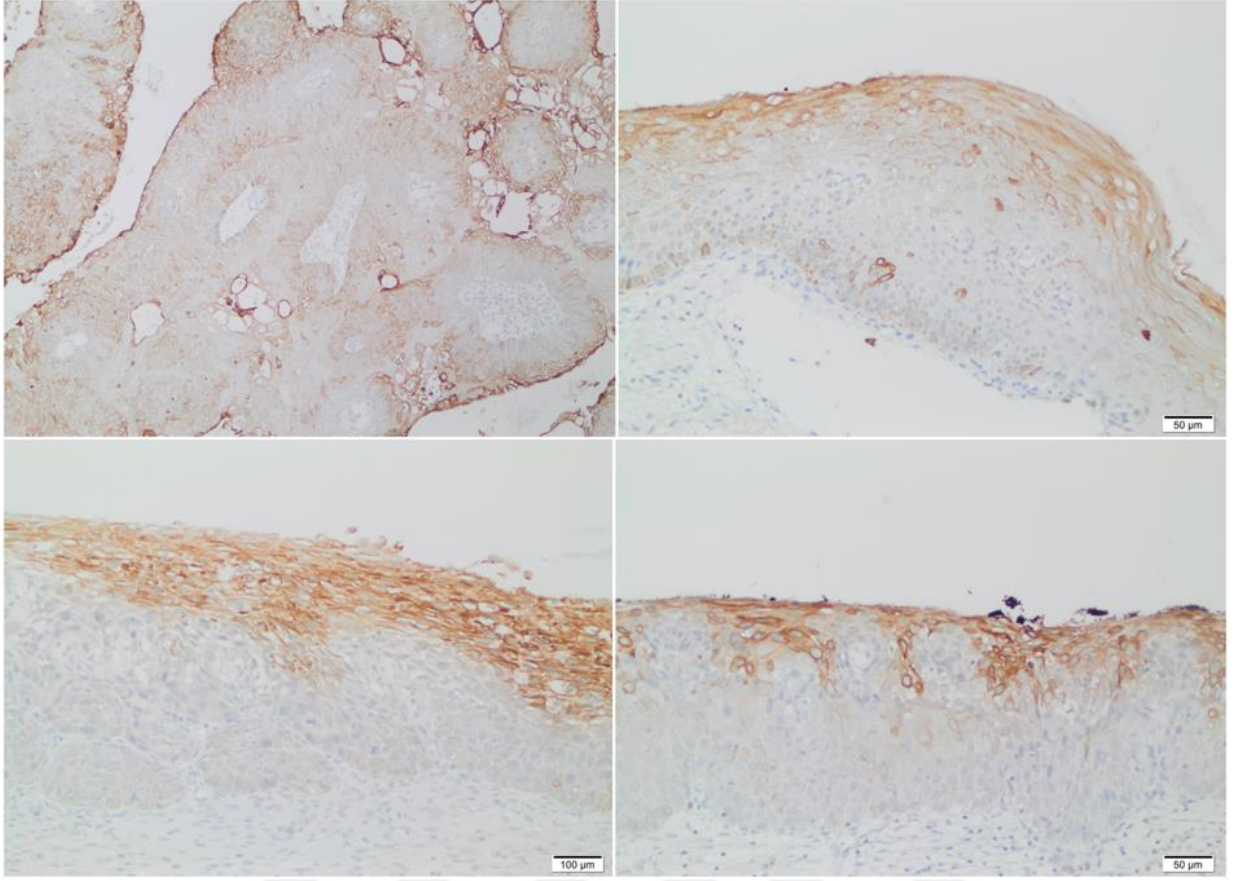


40. Şekil: MCM2 3+ boyanma paterni

3.4.6. CK7 immunohistokimyasal değerlendirme

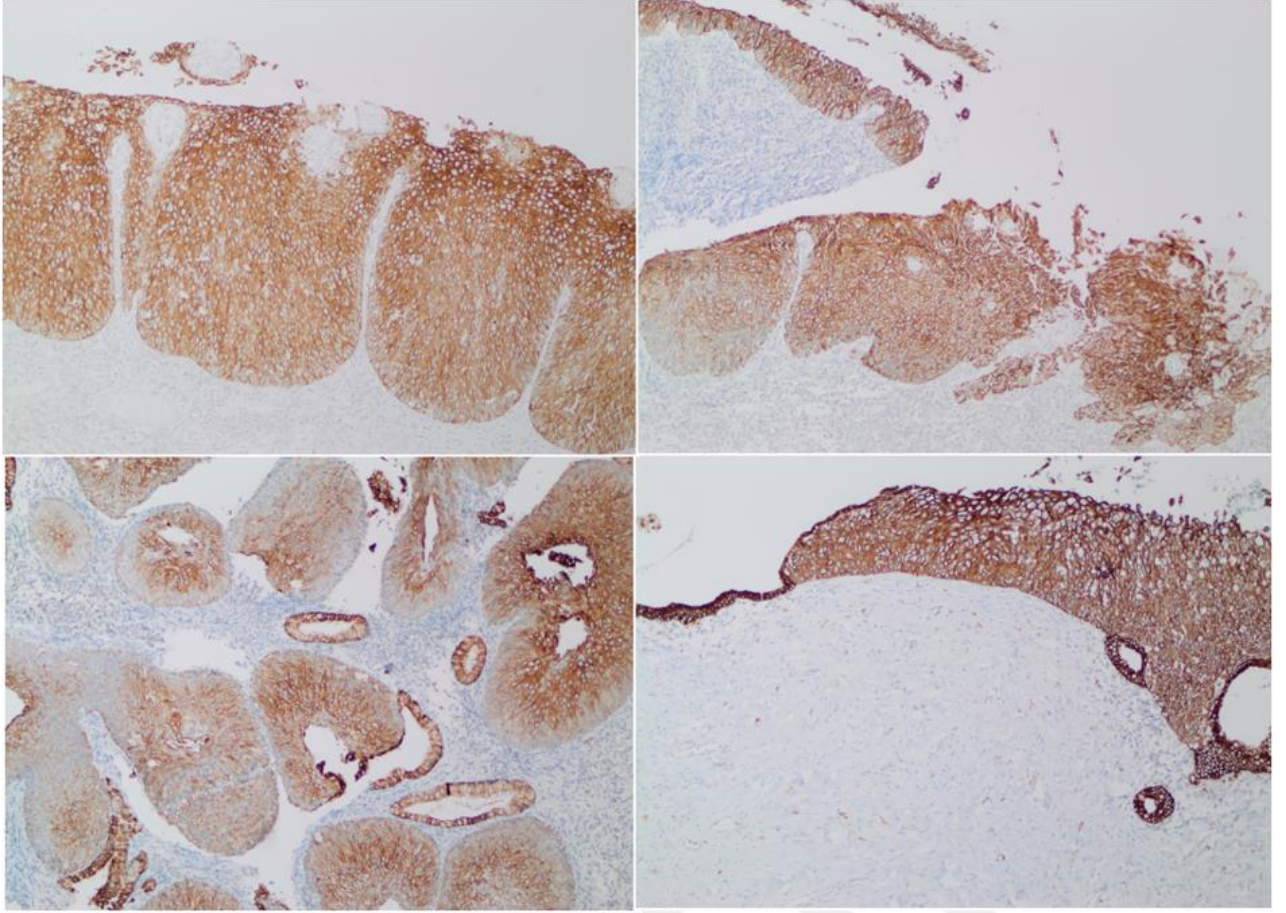
Ventana Benchmark Ultra cihazında uygulanan CK7 (Klon M7018, DAKO, Denmark) immunohistokimyası ile boyalı lamalar mikroskopta değerlendirildi. Hücrelerdeki sitoplazmik boyanma anlamlı olarak kabul edildi. Lezyon alanında görülen boyanmalar negatif ya da pozitif olarak sınıflandırıldı. Hücrelerin tek tek izole olarak fokal boyanması ya da hiç boyanmaması negatif olarak kabul edildi. Endoservikal epiteldeki boyanmadan internal kontrol olarak yararlanıldı.

Herfs, M. ve arkadaşlarının çalışmasında olduğu gibi CK7'nin pozitifliği için metaplastik/skuamöz epiteldeki suprabazal yerleşimli ya da apikal hücrelerdeki yan yana duran en az 5-6 hücre dizisinin kuvvetli boyanması anlamlı kabul edildi [14].



Epitelin yüzeyinden aşağı doğru (top-down) boyanma izlenmektedir.

41. Şekil: CK7 pozitif boyanma 1



Epitelde diffüz sitoplazmik boyanma izlenmektedir.

42. Şekil: CK7 pozitif boyanma 2

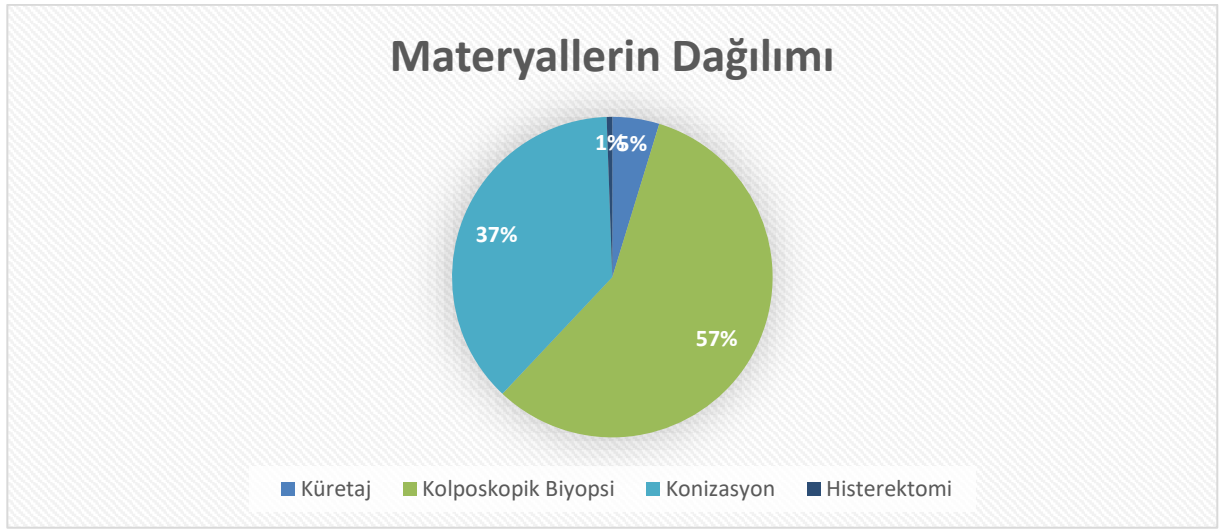
3.5. İstatistik

İstatistiksel analizler SPSS versiyon 25.0 programı yardımıyla gerçekleştirilmiştir. Tanımlayıcı analizler sunulurken sayı ve yüzde değerleri kullanılmıştır. Skorlar arasındaki ilişkinin incelenmesinde Spearman Korelasyon testinden faydalanılmıştır. Ayrıca tanı ile P16, Ki-67, MCM2, TOP2A ve CK7 boyaları arasındaki uyum, Kappa Analizi ile incelenmiştir. Boyaların CIN1, CIN2 ve CIN3 tespitindeki sensitivite, spesifite, pozitif prediktif değer, negatif prediktif değer oranları da verilmiştir. P-değerinin 0.05'in altında olduğu durumlar istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar şeklinde değerlendirildi.

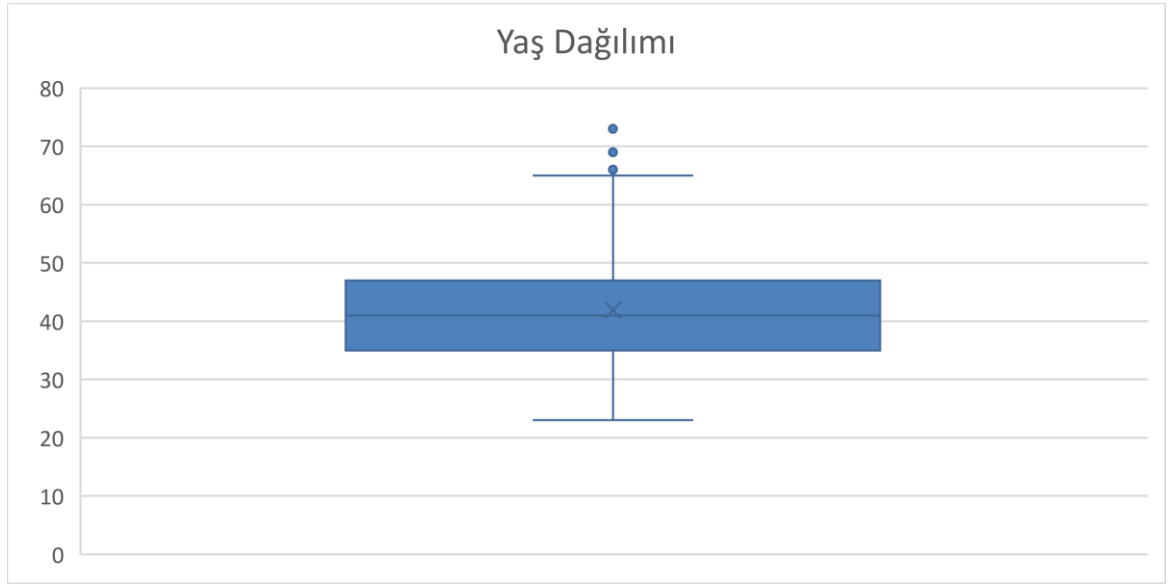
4. BULGULAR

4.1. Demografik Veriler

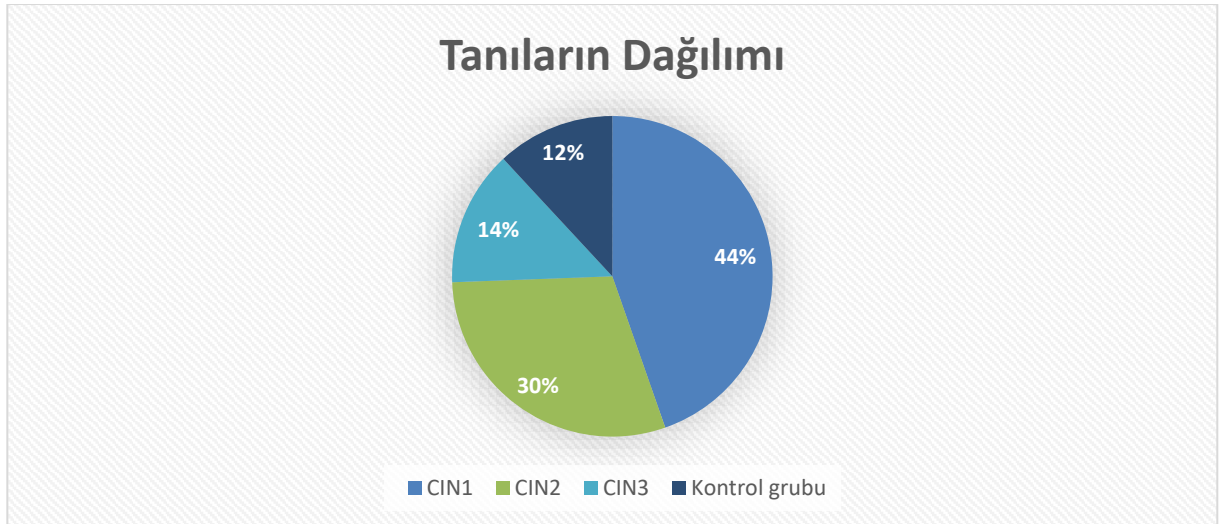
Çalışmamızda değerlendirilen vakalar Ocak 2014 – Aralık 2020 tarihleri arasında Marmara Üniversitesi Pendik Eğitim Araştırma Hastanesi Patoloji arşivinde bulunan servikal intraepitelyal neoplazi tanısı almış biyopsi materyalleri ve olağan servikal biyopsi tanısı almış kontrol grubu vakalarından oluşmaktadır. Belirtilen tarih aralığında hastane sisteminde toplam 211 vaka bulunmaktadır. Vakaların 10'u endoservikal küretaj, 121'i servikal biyopsi, 79'u konizasyon, 1'i ise histerektomi materyalidir.



Vaka serisinde bulunan; bloklarına ve lamlarına ulaşamayan, dış merkezden ikinci görüş için gönderilen, lezyon alanı çok küçük olan, lezyon alanı immunohistokimyasal boya kesitlerinde kaybolan ya da epiteli tam kat olarak izlenemeyen 63 vaka çalışmaya dahil edilemedi. Bu vakalar çalışmadan çıkartılarak toplam 148 vaka ile çalışma sürdürüldü. Çalışmamıza dahil olan vakaların yaş ortalaması 42(23-73)'ydi.



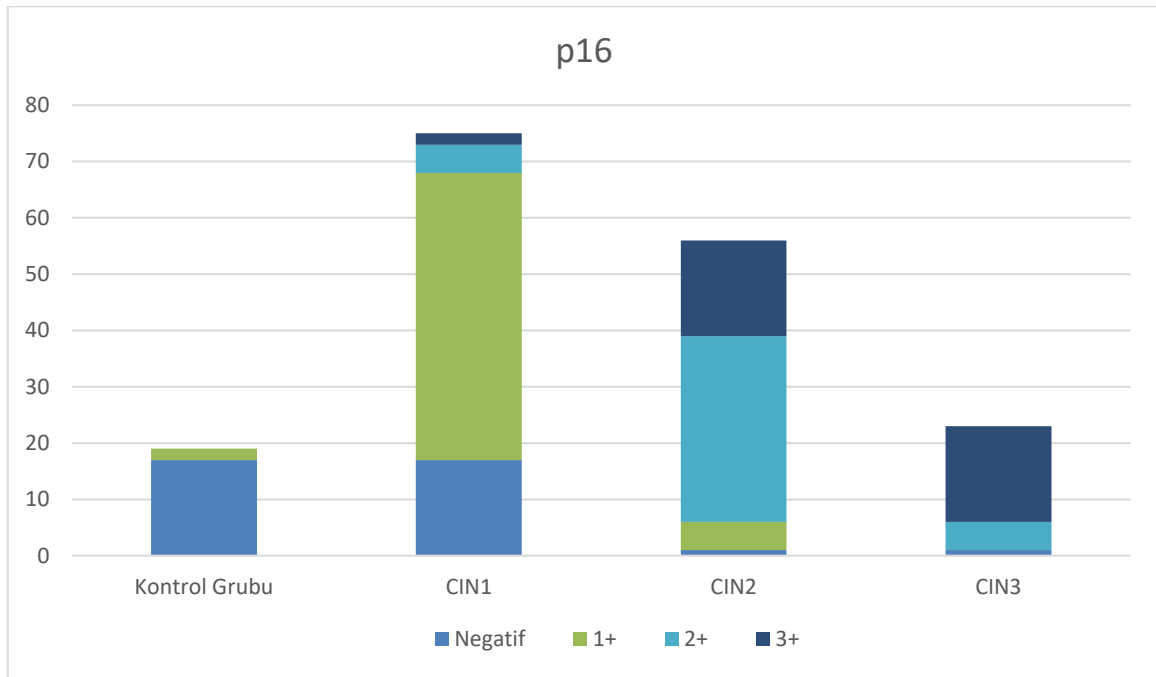
Tanıların dağılımına bakıldığında ise; 75 CIN1, 50 CIN2, 23 CIN3 vakası bulunmaktaydı. Olağan servikal doku içeren örneklerle displastik vakaların karşılaştırılmasında anlamlı sonuç elde edebilmek için hesaplanan örneklem büyüklüğüne göre kontrol dokusu olarak 20 olağan serviks/kronik servisit olgusu çalışmamıza dahil edildi.



4.2. İmmunohistokimya - Histomorfoloji Karşılaştırması ve İstatistiksel Sonuçlar ile Yorumları

4.2.1. P16 İmmunohistokimyasının Değerlendirme Sonuçları

Kontrol grubunda vakaların %90'ının (n:18) negatif olduğu görüldü. CIN1 vakalarına bakıldığında olguların %90.6'sının negatif (n:17) ya da 1+ (n:51) olduğu saptandı. CIN2 vakalarında %88'inin 2+ (n:33) ya da 3+ (n:11) olduğu görüldü. CIN3 vakalarında ise %95.6'sının 2+ (n:5) ya da 3+ (n:17) olduğu saptandı.



43. Şekil: P16 skorlarının tanılara göre dağılım grafiği

Tablo 2: P16 İmmunohistokimyasının Değerlendirme ve Tanılar ile Korelasyon Tablosu

	P16 Skor				Toplam
TANI	0	1+	2+	3+	
Kontrol Grubu	18	2	0	0	20
	(%90)	(%10)	(%0)	(%0)	(%100)
CIN1	17	51	5	2	75
	(%22.67)	(%68)	(%6.67)	(%2.67)	(%100)
CIN2	1	5	33	11	50
	(%2)	(%10)	(%66)	(%22)	(%100)
CIN3	1	0	5	17	23
	(%4.35)	(%0)	(%21.74)	(%73.91)	%100
Toplam	37	58	43	30	168
	(%22.02)	(%34.52)	(%25.60)	(%17.86)	(%100)

P16 skorları ile tanıları arasında anlamlı korelasyon saptanmıştır ($p<0.001$). Her bir tanı grubu için ayrı ayrı bakıldığında P16 ile anlamlı uyum izlenmiştir ($p<0.001$). Kontrol grubu-CIN1, CIN1-CIN2, CIN2-CIN3 tanıları arasında da p16 sonuçları anlamlı istatistiksel fark göstermektedir ($p<0.01$).

P16 immunohistokimyasının diğer belirteçlerle kıyaslanmasında da Ki-67, TOP2A, MCM2 ve CK7 ile anlamlı istatistiksel korelasyon ($p<0.001$) saptanmıştır.

Tablo 3: P16 immunohistokimyasının diğer immunohistokimyasal belirteçlerle karşılaştırılması

		Ki-67	MCM2	TOP2A	CK7
P16	ρ	0.743	0.724	0.682	0.434
	p	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

P16 için sensitivitenin en yüksek oranda kontrol grubunda olduğu spesifitenin ise

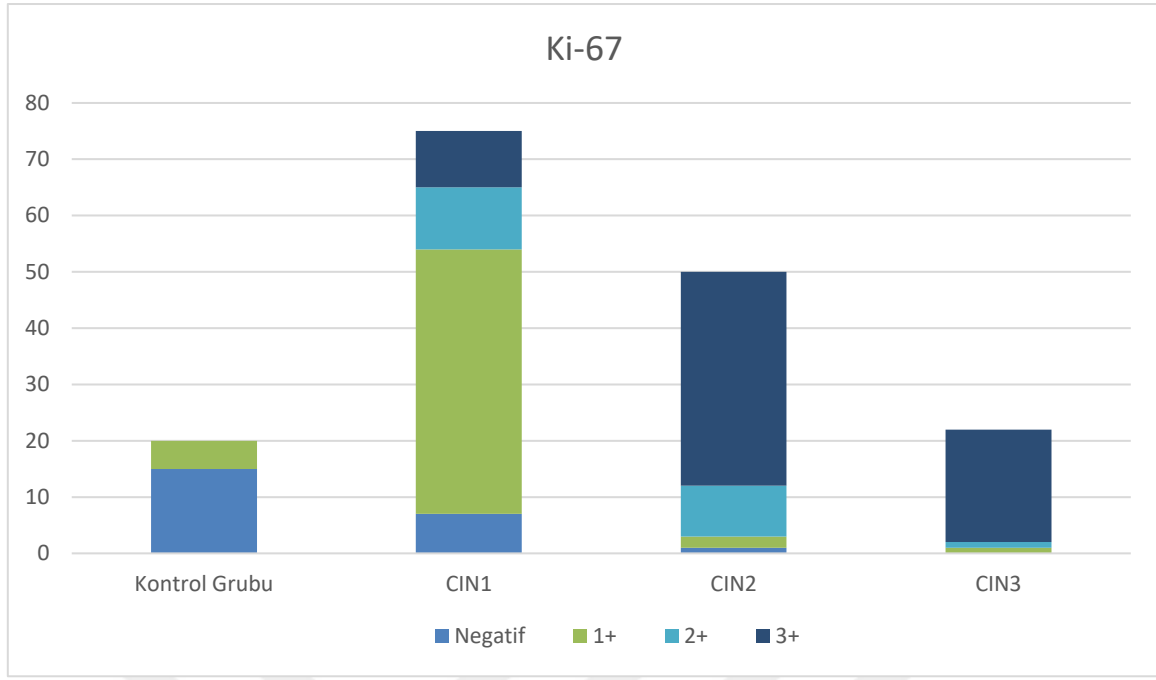
tüm tanılar için oldukça yüksek olduğu görülmüştür (sırasıyla; %87, %92, %91, %91). Pozitif prediktif değerin en yüksek oranda (%87) CIN1 tanısında, negatif prediktif değerin ise en yüksek oranda kontrol grubunda olduğu (%98) görülmüştür.

Tablo 4: P16 için tanılara göre sensitivite ve spesifite tablosu

		SENSİTİVİTE	SPESİFİTE	POZİTİF PREDİKTİF DEĞER	NEGATİF PREDİKTİF DEĞER
P16	Kontrol Grubu	90.00	87.16	48.65	98.47
	CIN1	68.00	92.47	87.93	78.18
	CIN2	66.00	91.53	76.74	86.40
	CIN3	73.91	91.03	56.67	95.65

4.2.2. Ki-67 İmmunohistokimyasının Değerlendirme Sonuçları

Kontrol grubunda vakaların tamamının skorları 0 ya da 1+ olarak değerlendirildi. CIN1 vakalarına bakıldığında; en çok görülen skorun vakaların %62.7'sini oluşturan 1+ (n:47) boyanma olduğu görüldü. CIN2 vakalarının skorlarının %94'ünün 2+ (n:9) ya da 3+ (n:38) olduğu görüldü. CIN3 vakalarında ise %91.3'ünün skorunun 3+ (n:21) olduğu saptandı.



44. Şekil: Ki-67 skorlarının tanılara göre dağılım grafiği

Tablo 5: Ki-67 İmmunohistokimyasının Değerlendirme ve Tanılar ile Korelasyon Tablosu

TANI	Ki-67 Skor				Toplam
	0	1+	2+	3+	
Kontrol Grubu	15	5	0	0	20
	(%75)	(%25)	(%0)	(%0)	(%100)
CIN1	7	47	11	10	75
	(%9.33)	(%62.67)	(%14.67)	(%13.33)	(%100)
CIN2	1	2	9	38	50
	(%2)	(%4)	(%18)	(%76)	(%100)
CIN3	0	1	1	21	23
	(%0)	(%4.35)	(%4.35)	(%91.30)	%100
Toplam	23	55	21	69	168
	(%13.69)	(%32.74)	(%12.50)	(%41.07)	(%100)

Ki-67 skorları ile tanılar arasında anlamlı korelasyon saptanmıştır ($p < 0.001$). Tanı

gruplarına ayrı ayrı bakıldığında; kontrol grubu, CIN1 ve CIN3 tanıları için Ki-67 skorları ile anlamlı uyum izlenmiştir ($p<0.001$). Kontrol grubu-CIN1 ve CIN1-CIN2 tanıları arasında Ki-67 sonuçları anlamlı istatistiksel fark göstermektedir ($p<0.001$).

Ki-67 immunohistokimyasının diğer belirteçlerle kıyaslanmasında P16, TOP2A, MCM2 ve CK7 ile anlamlı istatistiksel korelasyon ($p<0.001$) saptanmıştır.

Tablo 6: Ki-67 immunohistokimyasının diğer immunohistokimyasal belirteçlerle karşılaştırılması

		P16	MCM2	TOP2A	CK7
Ki-67	ρ	0.743	0.843	0.783	0.398
	p	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

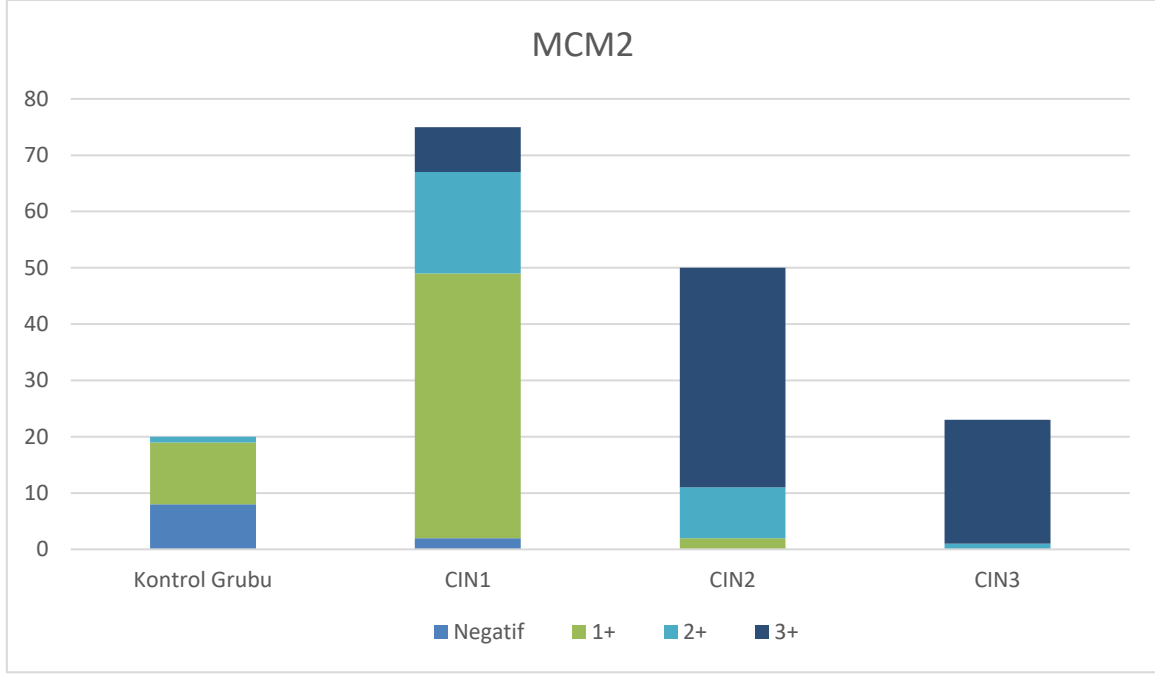
Ki-67 için sensitivitenin en yüksek oranda CIN3 grubunda olduğu, spesifitenin ise kontrol grubu, CIN1 ve CIN2 gruplarında oldukça yüksek olduğu görülmüştür (sırasıyla; %94, %91, %89). Pozitif prediktif değer en yüksek oranda (%85) CIN1 grubunda, negatif prediktif değer ise en yüksek oranda CIN3 grubunda olduğu (%98) görülmüştür.

Tablo 7: Ki-67 için tanılara göre sensitivite ve spesifite tablosu

		SENSİTİVİTE	SPESİFİTE	POZİTİF PREDİKTİF DEĞER	NEGATİF PREDİKTİF DEĞER
Ki-67	Kontrol Grubu	75.00	94.59	65.22	96.55
	CIN1	62.67	91.40	85.45	75.22
	CIN2	18.00	89.83	57.14	75.71
	CIN3	91.30	66.90	30.43	97.98

4.2.3. MCM2 İmmunohistokimyasının Değerlendirme Sonuçları

Kontrol grubundaki vakaların %95'inin skorlarını 0 (n:8) ve 1+ (n:11) oluşturmaktaydı. CIN1 vakalarına bakıldığında; en çok görülen skorun vakaların %62.7'sini oluşturan 1+ (n:47) boyanma olduğu görüldü. CIN2 vakalarının %96'sının 2+ (n:9) ya da 3+ (n:39) olduğu görüldü. CIN3 vakalarının ise %95.6'sının 3+ (n:22) olduğu saptandı.



45. Şekil: MCM2 skorlarının tanılara göre dağılım grafiği

Tablo 4: MCM2 İmmunohistokimyasının Değerlendirme ve Tanılar ile Korelasyon Tablosu

	MCM2 Skor				Toplam
TANI	0	1+	2+	3+	
Kontrol Grubu	8	11	1	0	20
	(%40)	(%55)	(%5)	(%0)	(%100)
CIN1	2	47	18	8	75
	(%2.67)	(%62.67)	(%24)	(%10.67)	(%100)
CIN2	0	2	9	39	50
	(%0)	(%4)	(%18)	(%78)	(%100)
CIN3	0	0	1	22	23
	(%0)	(%0)	(%4.35)	(%95.65)	%100
Toplam	10	60	29	69	168
	(%5.95)	(%35.71)	(%17.26)	(%41.07)	(%100)

MCM2 skorları ile tanıları arasında anlamlı korelasyon saptanmıştır ($p<0.001$). Tanı gruplarına ayrı ayrı bakıldığında; kontrol grubu CIN1 ve CIN3 için MCM2 skorları ile anlamlı istatistiksel uyum izlenmiştir. Kontrol grubu-CIN1 ve CIN1-CIN2 ayırımında da MCM2 sonuçları anlamlı istatistiksel fark göstermektedir (sırasıyla; $p=0.008$, $p<0.01$).

MCM2 immunohistokimyasının diğer belirteçlerle kıyaslanmasında P16, Ki-67, TOP2A ve CK7 ile anlamlı istatistiksel korelasyon ($p<0.001$) saptanmıştır.

Tablo 5: MCM2 immunohistokimyasının diğer immunohistokimyasal belirteçlerle karşılaştırılması

		P16	Ki-67	TOP2A	CK7
MCM2	ρ	0.724	0.843	0.823	0.423
	p	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

MCM2 için sensitivitenin en yüksek oranda CIN3 grubunda olduğu spesifitenin ise

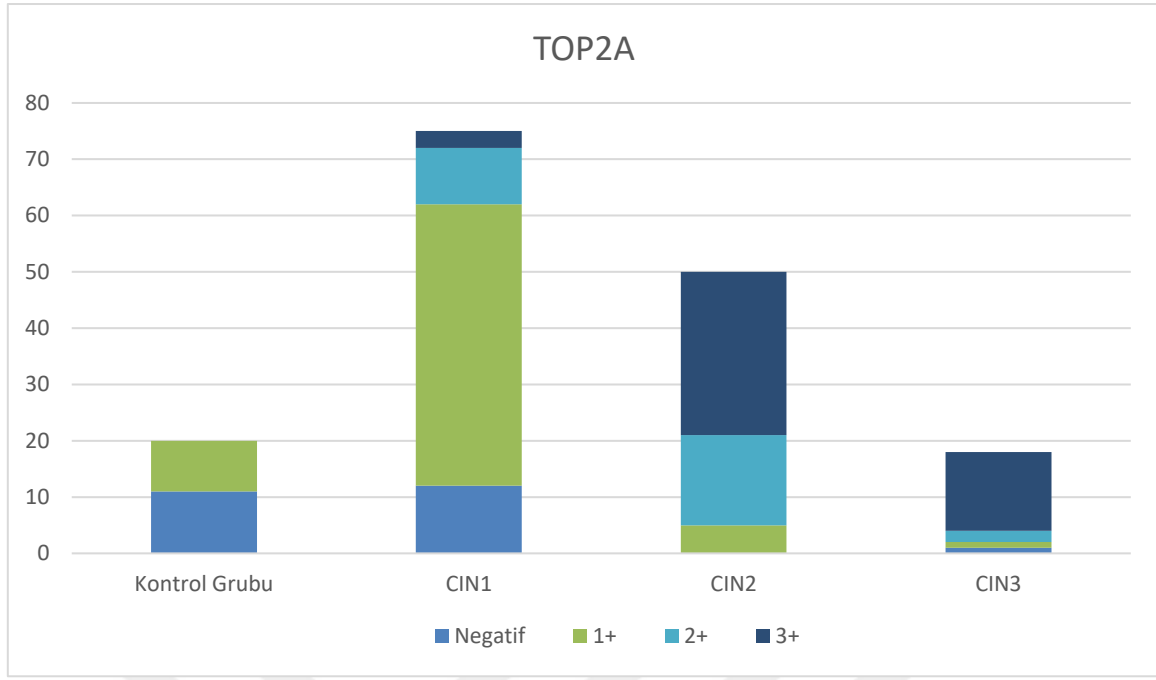
kontrol grubu, CIN1 ve CIN2 gruplarında oldukça yüksek olduğu görülmüştür (sırasıyla; %98, %86, %83). Pozitif prediktif değerin en yüksek oranda (%88) kontrol grubunda, negatif prediktif değerin ise en yüksek oranda CIN3 grubunda olduğu (%99) görülmüştür.

Tablo 6: MCM2 için tanılara göre sensitivite ve spesifite tablosu

		SENSİTİVİTE	SPESİFİTE	POZİTİF PREDİKTİF DEĞER	NEGATİF PREDİKTİF DEĞER
MCM2	Kontrol Grubu	40,00	98,65	80,00	92,41
	CIN1	62,67	86,02	78,33	74,07
	CIN2	18,00	83,05	31,03	70,50
	CIN3	95,65	67,59	31,88	98,99

4.2.4. TOP2A İmmunohistokimyasının Değerlendirme Sonuçları

Kontrol grubunda vakaların tamamının skorları 0 ya da 1+ olarak değerlendirildi. CIN1 vakalarına bakıldığında olguların %84'ünün negatif (n:34) ya da 1+ (n:29) olduğu saptandı. CIN2 vakalarında %84'ünün skorlarının 2+ (n:18) ya da 3+ (n:24) olduğu görüldü. CIN3 vakalarında ise %86.9'unun skorlarının 2+ (n:6) ya da 3+ (n:14) olduğu saptandı.



46. Şekil: TOP2A skorlarının tanılara göre dağılım grafiği

Tablo 7: TOP2A İmmunohistokimyasının Değerlendirme ve Tanılar ile Korelasyon Tablosu

TANI	TOP2A Skor				Toplam
	0	1+	2+	3+	
Kontrol Grubu	11	9	0	0	20
	(%55)	(%45)	(%0)	(%0)	(%100)
CIN1	12	50	10	3	75
	(%16)	(%66.67)	(%13.33)	(%4)	(%100)
CIN2	0	5	16	29	50
	(%0)	(%10)	(%32)	(%58)	(%100)
CIN3	1	1	2	19	23
	(%4.35)	(%4.35)	(%8.70)	(%82.61)	%100
Toplam	24	65	28	51	168
	(%14.29)	(%38.69)	(%16.67)	(%30.36)	(%100)

TOP2A skorları ile tanılar arasında anlamlı korelasyon saptanmıştır ($p < 0.001$). Tanı gruplarına ayrı ayrı bakıldığında her bir tanı için TOP2A'nın anlamlı istatistiksel uyum

gösterdiği görülmüştür ($p<0.001$). Kontrol grubu-CIN1, CIN1-CIN2, CIN2-CIN3 ayırımında da TOP2A sonuçları anlamlı istatistiksel fark göstermektedir ($p<0.001$).

TOP2A immunohistokimyasının diğer belirteçlerle kıyaslanmasında P16, Ki-67, MCM2 ve CK7 ile anlamlı istatistiksel korelasyon ($p<0.001$) saptanmıştır.

Tablo 8: TOP2A immunohistokimyasının diğer immunohistokimyasal belirteçlerle karşılaştırılması

		P16	Kİ-67	MCM2	CK7
TOP2A	ρ	0.682	0.783	0.823	0.371
	p	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

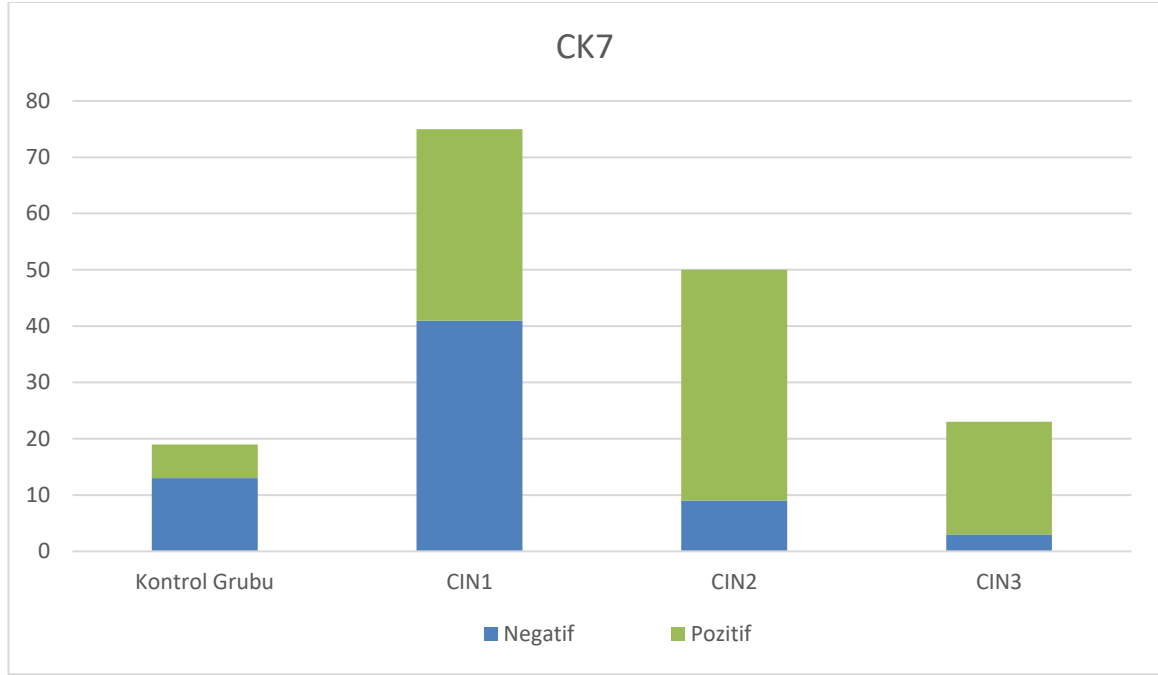
TOP2A için sensitivitenin en yüksek oranda CIN3 grubunda olduğu spesifitenin ise kontrol grubu, CIN1 ve CIN2 oldukça yüksek olduğu görülmüştür (sırasıyla; %91, %82, %89). Pozitif prediktif değer en yüksek oranda (%76) CIN1 grubunda, negatif prediktif değer ise en yüksek oranda CIN3 grubunda olduğu (%96) görülmüştür.

Tablo 9: TOP2A için tanılara göre sensitivite ve spesifite tablosu

		SENSİTİVİTE	SPESİFİTE	POZİTİF PREDİKTİF DEĞER	NEGATİF PREDİKTİF DEĞER
TOP2A	Kontrol Grubu	55,00	91,22	45,83	93,75
	CIN1	66,67	83,87	76,92	75,73
	CIN2	32,00	89,83	57,14	75,71
	CIN3	82,61	77,93	37,25	96,58

4.2.5. CK7 İmmunohistokimyasının Değerlendirme Sonuçları

Toplam olguların 65'i (%38.7) negatif iken, 103'ü (%61.3) pozitif saptandı. CIN1 vakalarına negatif/pozitif oranı arasında belirgin seçilim görülmezken; CIN2 vakalarının %82'sinin pozitif olduğu, CIN3 vakalarının ise %86.9'unun pozitif olduğu görüldü.



47. Şekil: CK7 skorlarının tanılara göre dağılım grafiği

Tablo 10: CK7 İmmunohistokimyasının Değerlendirme ve Tanılar ile Korelasyon Tablosu

	CK7		Toplam
TANI	Negatif	Pozitif	
Kontrol Grubu	14	6	20
	(%70)	(%30)	(%100)
CIN1	41	34	75
	(%54.67)	(%45.33)	(%100)
CIN2	8	42	50
	(%16)	(%84)	(%100)
CIN3	2	21	23
	(%8.70)	(%91.30)	%100
Toplam	65	103	168
	(%38.69)	(%61.21)	(%100)

CK7 sonuçları ile tanıları arasında anlamlı korelasyon saptanmıştır ($p < 0.001$). CIN1 $\geq$ ve CIN2 $\leq$ arasında da CK7 için anlamlı fark saptanmıştır ($p < 0.01$).

Tablo 11: CK7 immunohistokimyasının diğer immunohistokimyasal belirteçlerle karşılaştırılması

		P16	Kİ-67	MCM2	TOP2A
CK7	ρ	0.434	0.398	0.423	0.371
	p	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

CK7 için sensitivitenin en yüksek oranda CIN3 grubunda olduğu spesifitenin ise kontrol grubu, CIN1 ve CIN2 oldukça yüksek olduğu görülmüştür (sırasıyla; %91, %82, %89). Pozitif prediktif değerin en yüksek oranda (%76) CIN1 grubunda, negatif prediktif değerin ise en yüksek oranda CIN3 grubunda olduğu (%96) görülmüştür.

Tablo 12: CK7 için tanılara göre sensitivite ve spesifite tablosu

		SENSİTİVİTE	SPESİFİTE	POZİTİF PREDİKTİF DEĞER	NEGATİF PREDİKTİF DEĞER
CK7	Kontrol Grubu	55,00	91,22	45,83	93,75
	CIN1	66,67	83,87	76,92	75,73
	CIN2	32,00	89,83	57,14	75,71
	CIN3	82,61	77,93	37,25	96,58

5. TARTIŞMA

Servikal kanserler; Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı'nın (IARC) verilerine göre kadınlarda görülen en sık 4. kanser türüdür. 45 yaş altı kadınlarda ise 3. sıklıkta görülmektedir. 2018 yılında dünya genelinde 500 binden fazla vaka tespit edilmiş bunların ise yarısından fazlası ölümle sonuçlanmıştır [39]. Servikal skuamöz hücreli karsinomların büyük çoğunluğunun HPV ilişkili olduğu bilinmektedir. Servikste, invaziv karsinom gelişiminden önce görülen preneoplastik/displastik lezyonlar tanımlanmıştır. Bunlar; servikal intraepitelyal neoplazi 1, 2, 3 şeklinde derecelendirilmektedir. Bu lezyonların da büyük çoğunluğu HPV enfeksiyonu ile ilişkilidir.

Yüksek riskli HPV onkoproteini olan E7, bir tümör supresör protein olan p16'nın overekspresyonuna neden olmaktadır. HPV ilişkili lezyonların tanımlanmasında ve derecelendirilmesinde p16 immunohistokimyası kullanılabilmektedir. Alt Anogenital Skuamöz Terminoloji Standardizasyon Projesi'ne (LAST) göre skuamöz intraepitelyal neoplaziler için p16 immunohistokimyasal boyasının uygulanması 3 temel amaç için önerilmektedir. Bunlar; (1) yüksek dereceli lezyonların taklitçisi olan lezyonlardan ayrımı, (2) düşük dereceli lezyonlar ve displazi içermeyen dokuların ayrımı, (3) CIN1 ve CIN2 ayrımı yapılamayan vakaların ayrımı ana amaçlardır [3].

Çalışmamızda vakaların tümüne p16 immunohistokimyası uygulanmış olup; CIN1'den CIN3'e doğru pozitifliğin arttığı görülmüştür. Tanılar ve p16 skorları arasında anlamlı korelasyon saptanmıştır ($p<0.0001$). Kishore V. ve arkadaşlarının çalışmasında; normal servikal doku, CIN1, 2, 3 ve servikal skuamöz hücreli karsinoma p16 uygulanmış ve displazi derecesi arttıkça p16 ekspresyonunun da arttığı izlenmiştir [40]. Lesnikova I. ve arkadaşlarının çalışmasında; normal servikal dokuda p16 ekspresyonu görülmezken lezyon derecesi ile ilişkili olarak ekspresyon oranının arttığı izlenmiştir (CIN1 için %72.3, CIN2 için %91.0, CIN3 için %98.3, invaziv karsinom için %98.5) [41]. Özgül N. ve arkadaşlarının çalışmasında vakalar LSIL, HSIL, skuamöz hücreli karsinom ve normal doku örneklerine p16 immunohistokimyası uygulanmış. P16'nın boyanma paterni, dağılımı ve yoğunluğu servikal lezyonun derecesiyle anlamlı olarak korele olduğu gösterilmiştir [42]. Vilorio, M. E. ve arkadaşlarının çalışmasında; CIN1 vakalarının %75'inde, CIN2-3 vakalarının ise tamamında p16 ile pozitiflik saptanmıştır [43]. Vinyuvat S. ve arkadaşlarının çalışmasında ise vakalar normal servikal doku, LSIL ve HSIL olarak sınıflandırılmış,

p16 skorlaması pozitif hücrelerin oranı, boyanma yoğunluğu ve paternine göre yapılmış; LSIL vakalarından 1'i hariç tüm vakalar p16 ile pozitif saptanmıştır. Normal servikal dokulardan ise p16 ile pozitif saptanan vaka bulunmamaktadır [44]. Bu bulgular çalışmamız ile uyumluluk göstermektedir. Çalışmamızda; displazi derecesi ile p16 boyanması arasında anlamlı istatistiksel ilişki olduğu görülmüştür. Kontrol grubu için p16'nın sensitivitesi %90, negatif prediktif değeri ise %98 olarak bulunmuştur. Displazi görülen vakalarda ise p16'nın pozitif prediktif değeri oldukça yüksek olarak bulunmuştur. Normal servikal doku ile displazi arasında p16 boyanmasının bu kadar seçici olması nedeniyle p16, tanı zorluğu yaratan atrofik vakaların displastik vakalardan ayırımında da kullanılabilir. Bu sonuçların yanında; P16 skorları ile Ki-67, MCM2, TOP2A immunohistokimyasal işaretleyicilerinin sonuçları kıyaslandığında her biri ile anlamlı korelasyon gösterdiği görülmüştür ($p<0.0001$).

LAST projesinde bahsedilen yüksek dereceli lezyonların taklitçisi olan lezyonlardan ayırımı çalışmamızın ana amaçlarından biri olmamakla birlikte vaka grubumuz içerisinde atrofik morfolojili vakalar ayrıca not edilmiştir. Literatüre baktığımızda çeşitli yayınlarda P16'nın atrofik servikal epitel - displastik epitel ayırımında ya da atrofik servikal epitel – yüksek dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon ayırıcı tanısında kullanılabileceğine dair anlamlı sonuçlar bulunmaktadır [45, 46]. Düşük dereceli servikal intraepitelyal neoplazi ve atrofik servikal epitel ayırımında ise P16'nın yeri tartışmalı olsa da Ki-67'deki %30'un üzerindeki boyanmanın ya da epitelin üst bölümlerine kadar ulaşan boyanmanın olmasının bu lezyonların ayırımında etkili olabileceği bazı yayınlarda belirtilmektedir [47]. Bizim çalışmamızda ise atrofik görünümlü vakalarda; displastik olmayan ile düşük ve yüksek dereceli displazi izlenen vakaların P16 boyanması arasında anlamlı korelasyon gösterdiği görülmüştür. P16'nın yanında bu vaka popülasyonunda displastik olan ve olmayanlar ile aynı zamanda displazi derecesiyle Ki-67, MCM2, TOP2A skorları ve CK7 pozitifliği arasında korelasyon izlenmiştir. Çalışmamızda atrofik morfolojili vaka sayısının oldukça az olması nedeniyle bu verilerin geniş vaka serilerinde sonuçlarının incelenmesi daha net yorum yapabilmek için faydalı olacaktır.

Ki-67 hücre proliferasyonunu gösteren bir markerdir. G1 den M fazına doğru düzeyleri artmakta ve en yüksek düzeye M fazı başında ulaşmaktadır. CDK4/6 ise G1 fazında Rb proteininin fosforilasyonunu başlatarak E2F gibi transkripsiyon faktörlerinin salınımına neden olur. E2F overekspresyonunun görüldüğü kanserlerde; Ki-67, E2F

proteinine bağılı olduğundan Ki-67 akümülayonu da görülmektedir. Mitoz sırasında nükleolusun parçalanması nedeniyle immunohistokimya da diffüz boyanma paterni oluşturmaktadır [25]. Servikal intraepitelyal neoplazilerde p16'yla birlikte en çok kullanılan ve en güvenilir ikincil marker olarak kabul edilmektedir.

Literatürde p16 ile Ki-67 boyanmasının CIN displazi derecesiyle anlamlı olarak ilişkili olduğu bildirilmektedir. Nam, E. J. ve arkadaşlarının çalışmasında; CIN vakalarına p16 ve Ki-67 uygulanmış ve displazi derecesiyle arasında anlamlı ilişki bulunmuştur [48]. Keating ve arkadaşlarının çalışmasında; LSIL, HSIL vakaları ve displastik olmayan vakalara p16, Ki-67 ve Siklin E immunohistokimyası uygulanmış, histolojik derece ve HPV durumu ile anlamlı korelasyon saptanmıştır [49]. Zhong, P. ve arkadaşlarının çalışmasında; CIN1, CIN2, CIN3, servikal karsinom ve displastik olmayan vakalara p16 ve Ki-67 immunohistokimyası uygulanmış. Displazi açısından negatif vakalardan skuamöz hücreli karsinoma kadar p16 ($P<0.001$) ve Ki-67 ($P<0.001$) ekspresyonlarının anlamlı olarak arttığı görülmüştür [50]. Kim, T.H. ve arkadaşlarının çalışmasında; CIN1, CIN2, CIN3, servikal karsinom ve displastik olmayan vakalara p16, Ki-67 ve PCNA immunohistokimyası uygulanmış. Tüm boyaların ekspresyonlarının CIN derecesi ile ilişkili olduğu görülmüştür [51]. Çalışmamızda da vakaların tümüne Ki-67 immunohistokimyası uygulanmış olup; tanılar ve Ki-67 skorları arasında anlamlı korelasyon saptanmıştır ($p<0.0001$).

Galgano, M.T. ve arkadaşlarının çalışmasında; CIN vakaları ve displazi izlenmeyen vakalarına p16, Ki-67 ve HPV L1 immunohistokimyası uygulanmış. Her bir immunohistokimyasal işaretleyicinin sonucu birbiri ile korele bulunmuştur. P16 ile immunohistokimyasal boyanmanın CIN2≤ olan ve olmayan biyopsileri ayırt etmek için yararlı ve güvenilir bir marker olduğu tespit edilmiştir [52]. Kanthiya, K. ve arkadaşlarının çalışmasında; CIN1, CIN2-3, servikal karsinom ve displastik olmayan vakalara p16 ve Ki-67 immunohistokimyası uygulanmış. CIN1 ve CIN2/3 arasında p16 ve Ki-67 için anlamlı fark izlenmiştir (p değeri <0.001). p16 ve Ki-67 ekspresyonu lezyon şiddetiyle direkt olarak ilişkili bulunmuştur. CIN2≤ lezyonların CIN1'den ayrımında özellikle etkili oldukları gösterilmiştir [53]. Tüm bu bulgular çalışmamız ile uyumluluk göstermektedir. Kontrol grubu-CIN1 arasında ve CIN1-CIN2 arasında P16 ve Ki-67 için anlamlı uyum saptanmıştır ($p<0.001$). CIN2-CIN3 arasında ise yalnızca p16 ile anlamlı uyum saptanmıştır ($p<0.001$). P16, MCM2, TOP2Ave CK7 skorlarıyla Ki-67 skorları karşılaştırıldığında da anlamlı pozitif korelasyon ($p<0.0001$) görülmüştür.

MCM2, replikatif enzimlerin aktivasyonunda rol oynamaktadır. MCM kompleksi G1-S geçişinde birçok noktadan fosforile olmaktadır. Bu fosforilasyon da MCM2 proteininin aktivasyonunu ve regülasyonunu sağlamaktadır. Fosforilasyonda meydana gelen bozulmalar hücre siklusunun kontrol noktası cevabını etkilemektedir [27]. Bu durum da kanserlerin gelişimine zemin hazırlamaktadır. Servikal intraepitelyal neoplazilerde de MCM2 proteininde ekspresyon artışı olduğu bilinmektedir. Kaur, G. ve arkadaşlarının çalışmasında; normal servikal doku, LSIL, HSIL, SCC vakalarında MCM gen profili incelemesinin yanında MCM2 immunohistokimyası uygulanmıştır. Histolojik gruplar arasında MCM2 skorunun anlamlı derecede farklı olduğu görülmüştür [30]. Bu sonuçlarla çalışmamızın sonuçları uyumluluk göstermektedir. MCM2 skorları ile tanılar arasında anlamlı korelasyon saptanmıştır ($p<0.001$). Kontrol grubu-CIN1 arasında ve CIN1-CIN2 arasında MCM2 için anlamlı uyum saptanmıştır ($p<0.001$). CIN2-CIN3 arasında ise anlamlılığa yakın bir uyum görülmüştür ($p=0.074$).

TOP2A; nükleer bir enzim olup, DNA süpersarmalının çözülmesini katalizlemektedir [31]. TOP2 ilişkili süreçteki yanlış adımlar G2-M geçişinde hücre siklusunun durmasına neden olur; hücre siklusundaki bu kontrol noktasının kaybı tümörögenезis ile ilişkilidir [34]. TOP2A'nın up-regüle olmasının da servikal kanserlerin patogeneğinde etkisi olduğu gösterilmiştir [35]. Branca, M. ve arkadaşlarının çalışmasında; skuamöz hücreli karsinom ve CIN vakalarına TOP2A immunohistokimyası uygulanmış. CIN derecesi arttıkça TOP2A ekspresyonunun anlamlı olarak arttığı gözlenmiştir ($p=0.0001$) [54]. Çalışmamızda da literatürle uyumlu olarak, TOP2A skorları ile tanılar arasında anlamlı korelasyon saptanmıştır ($p=0.0001$). Kontrol grubu-CIN1, CIN1-CIN2 ve CIN2-CIN3 arasında TOP2A için anlamlı uyum saptanmıştır (p değerleri sırasıyla; <0.001 , <0.001 , 0.027)

Literatüre bakıldığında CIN vakalarının derecelendirilmesi için kullanılan ProExC isimli immunohistokimyasal marker da karşımıza çıkmaktadır. Bu marker MCM2 ve TOP2A'nın kombinasyonu ile oluşturulmuştur. Tek renk üzerinden iki proteini de işaretlemektedir. Conesa-Zamora P. ve arkadaşlarının çalışmasında; normal servikal doku, LSIL, HSIL, SCC vakalarında ProExC immunohistokimyası uygulanmış. Displazi derecesi arttıkça pozitiflik oranının arttığı görülmüştür. Düşük dereceli – yüksek dereceli lezyonların ayırımında kullanılabileceği belirtilmiştir [55]. Çalışmamızda da CIN1 - CIN2 ayırımı için hem TOP2A hem de MCM2'nin anlamlı istatistiksel fark gösterdiği görülmüştür. Bu bulgu literatür ile uyumludur. Pinto, A. P. ve arkadaşlarının

çalışmasında; HSIL ve reaktif epitelyal değişiklik arasında ayırıcı tanı yapılan vakalara ProExC, P16 ve Ki-67 uygulanmış. Her bir immunohistokimyasal boyanın displaziyi saptamada etkin olduğu gösterilmiştir [56]. Bu bulgu çalışmamız ile uyumluluk göstermektedir. Badr, R.E. ve arkadaşlarının çalışmasında; CIN vakalarına ProExC, P16 ve Ki-67 uygulanmış. CIN2 ve CIN3 için ProExC'nin p16 ve Ki67 ile benzer boyanma gösterdiği fakat CIN1 vakalarında diskordansın daha fazla olduğu saptanmıştır [57]. Çalışmamızda ise hem MCM2'nin hem TOP2A'nın boyanmaları p16 ve Ki-67 ile kıyaslandığında tanılar ile arasında uyumluluk izlenmiştir. Shi,J. ve arkadaşlarının çalışmasında; benign skuamöz epitel, LSIL ve HSIL vakalarına p16, MCM2, TOP2A ve ProExC boyaları ile p16 – ProExC kokteyli uygulanmıştır. HSIL'i tespit etmede P16'nın diğer markerlardan daha sensitif ve spesifik olduğu saptanmıştır [58]. Bu bulgu çalışmamız ile uyumluluk göstermektedir. P16 – ProExC kokteylinin LSIL ve HSIL'i belirlemede en yüksek diagnostik değere sahip olduğu tespit edilmiştir [58]. Bizim çalışmamızda bu boyalar ayrı ayrı uygulanmış olup tüm tanılar için pozitif prediktif değer en yüksek olduğu boya p16 olarak tespit edilirken, diğer boyaların prediktif değerleri ise sırasıyla; CIN1 tanısı için Ki-67, MCM2 ve TOP2A, CIN2 tanısı için TOP2A, Ki-67 ve MCM2, CIN3 tanısı için ise TOP2A, MCM2 ve Ki-67 olarak bulunmuştur. Guo M. Ve arkadaşlarının çalışmasında; olağan servikal doku, CIN1, CIN2, CIN3 ve SCC vakalarına p16 ve ProExC uygulanmış ve lezyonun derecesinin artmasıyla pozitifliğin anlamlı olarak arttığı görülmüştür. CIN2 ve CIN3 tanıları için p16'nın ProExc'den daha sensitif olduğu belirtilmektedir [59]. Bizim çalışmamızda ise CIN2 spesifitesi en yüksek olan p16 iken, CIN3 için spesifitesi en yüksek olan ise MCM2 olarak bulunmuştur.

CK7; skuamokolumnar bileşke hücrelerine oldukça sensitif bir belirteçtir. Skuamokolumnar bileşke hücreleri neoplastik transformasyon açısından oldukça önemli rol oynamaktadır; çünkü bu hücrelerin yüksek riskli HPV ile enfekte olması servikal karsinogenezin ilk aşamasını oluşturmaktadır. Literatürde CK7'deki yüksek immunekspresyonun CIN1'den CIN2 ve CIN3'e transformasyonla ilişkili olabileceği gösterilmiştir [9, 36-38]. Literatürdeki bu ilişkiden yola çıkarak CIN1 vakalarına kıyasla CIN2 ve CIN3 vakalarında CK7 pozitifliğinin daha fazla görüleceği öngörülmüştür. Bu durumun tanısal açıdan bir anlamlılık oluşturup oluşturmadığı çalışmamızın amaçları arasında yer almaktadır. Çalışmamızda CIN1 vakalarına negatif/pozitif oranı arasında belirgin seçim görülmezken; CIN2 vakalarının %82'sinin pozitif olduğu, CIN3

vakalarının ise %86.9'unun pozitif olduğu görüldü. CIN1-CIN2 arasında CK7 pozitifliği bakımından anlamlı istatistiksel fark görülmesine karşın diğer tanılar arasında bu fark yakalanamamıştır.

Çalışmamızda vakalara uygulanan P16, Ki-67, MCM2, TOP2A ve CK7 belirteçlerinin displazi derecesiyle anlamlı ilişkili olduğu görülmüştür. Sonuçlara göre; rutin pratikte en çok uygulanan ve literatürde en geniş yere sahip belirteçler olan p16 ve Ki-67 ile birlikte displazi derecesine karar verilemeyen durumlarda spesiviteyi ve sensitiviteyi arttırmak için öncelikle TOP2A'nın olmak üzere MCM2 ve CK7'nin kullanılabileceği düşünülmektedir. Tüm bu belirteçlerin birlikte kullanıldığı ve karşılaştırmasının yapıldığı bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır. Daha büyük vaka serilerinde bu immunohistokimyasal belirteçlerle çalışmalar yapıldığı takdirde hangi kombinasyonlarının daha sensitif ve spesifik olarak tanıya ulaştıracağı ile ilgili daha net yorumlamalar yapılabileceği düşünülmektedir.

6. SONUÇLAR

- Çalışmamızda toplam 168 vaka bulunmaktadır. Tanıların dağılımı; 75 CIN1, 50 CIN2, 23 CIN3 ve 20 olağan servikal doku/kontrol grubu şeklindedir.
- P16 immunohistokimyasal belirtecinin sonuçlarına göre; displazi görülmeyen vakalarda negatif prediktif değerin çok yüksek olduğu, displazi görülen vakalarda ise pozitif prediktif değerin yüksek olduğu saptanmıştır. Bu durum; displazi varlığını belirlemede p16'nın iyi bir seçenek olduğunu göstermektedir.
- P16'nın displazi varlığını belirlemedeki etkisinin yanında displazi derecesinin artmasıyla da P16 skorlarının arttığı ve aralarında anlamlı korelasyon izlenmesi bu amaçla da kullanılabileceğini göstermektedir.
- Ki-67 immunohistokimyasal belirtecinin sonuçlarına göre; kontrol grubunda negatif prediktif değer oldukça yüksek olduğundan displazi görülmeyen ve görülen vakaların arasında ayrımın bu belirteç ile yapılabileceği düşünülmektedir.
- Ki-67 sonuçlarıyla displazi derecesi ile de anlamlı korelasyon elde edilmiştir. Kontrol grubu-CIN1 ve CIN1-2 grupları arasında Ki-67 ile ayrım mümkün olmakla birlikte CIN2-3 arasında aynı anlamlılık düzeyi elde edilememiştir. Bu gruplardaki vaka sayısının artırılmasının CIN2-3 ayrımı için de sonucu anlamlılık düzeyine getirebileceği öngörülmektedir.
- MCM2 immunohistokimyasal belirtecinin sonuçlarına göre; skorlar ve tanı arasında anlamlı korelasyon izlenmesine karşın CIN2-3 vakalarının ayrımında anlamlılık düzeyi elde edilememiştir.
- TOP2A immunohistokimyasal belirtecinin sonuçlarına göre; skorlar ve tanı arasında anlamlı korelasyon izlenmiştir. CIN2'deki sensitivitesi çok yüksek olmamasına karşın tüm tanı grupları arasında anlamlı korelasyon izlenmiş olup; displazi derecesinin belirlenmesinde p16'dan sonra kullanılabilecek en iyi ikinci belirteç olduğu görülmüştür.
- CK7 immunohistokimyasal belirtecinin sonuçlarına göre; pozitifliği ile tanı arasında anlamlı korelasyon izlenmiştir. Çalışmamızın amaçları doğrultusunda CIN1 $\geq$ ve CIN2 $\leq$ grupları kıyaslandığında aralarında anlamlı istatistiksel fark izlenmiş olup, displazi derecesine karar verirken diğer belirteçlerin yanında destekleyici olarak kullanılabileceği düşünülmektedir.

- P16, Ki-67, MCM2, TOP2A, CK7 immunohistokimyasal belirteçlerinin karşılaştırmalı korelasyon incelemesinde her bir belirtecin diğerleriyle anlamlı olarak ($p<0.0001$) pozitif korelasyon gösterdiği tespit edilmiştir. Tanıları belirlemedeki etkinliğine bakıldığında ise sıralamanın; P16, TOP2A, Ki-67, MCM2, CK7 şeklinde olduğu görülmektedir.
- CIN2 tanısını tespit etmede P16 ve TOP2A ile anlamlı istatistiksel uyum izlenmiş olup; CIN2-CIN3 ayrımında da yine bu işaretleyicilerin etkili olduğu saptanmıştır. Bunun yanında CIN1-CIN2 ayrımında ise çalışmamızda kullanılan tüm işaretleyicilerle anlamlı istatistiksel fark saptanmıştır.
- Hangi belirteçlerin kombine kullanımının tanıyı tespit etmede daha sensitif ve spesifik olduğuna bakıldığında; çalışmamızda displazi derecelerinin birbirinden ayrımı amaçlandığından her skor ve displazi derecesi kendi içinde değerlendirilmiş bu durum da spesifiteyi oldukça artırırken sensitivitenin düşük seviyede kalmasına neden olmuştur.
- Çalışmamızın sonuçlarına göre P16'dan sonra displazi derecelerini belirlemede en etkili olan belirtecin TOP2A olduğu belirlenmiş; bu iki belirtecin birlikte kullanımının da en iyi ikili kombinasyon olduğu görülmüştür. Geniş vaka serilerinde değerlendirme yapılırsa bu belirteçlerin hangi kombinasyonlarla kullanılabileceğinin daha net olarak belirlenebileceği öngörülmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Arbyn M, Benoy I, Simoens C, Bogers J, Beutels P, Depuydt C: **Prevaccination distribution of human papillomavirus types in women attending at cervical cancer screening in Belgium.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009, **18**(1):321-330.
2. Arbyn M, Martin-Hirsch P, Buntinx F, Van Ranst M, Paraskevaidis E, Dillner J: **Triage of women with equivocal or low-grade cervical cytology results: a meta-analysis of the HPV test positivity rate.** *J Cell Mol Med* 2009, **13**(4):648-659.
3. Darragh TM, Colgan TJ, Cox JT, Heller DS, Henry MR, Luff RD, McCalmont T, Nayar R, Palefsky JM, Stoler MH *et al*: **The Lower Anogenital Squamous Terminology Standardization Project for HPV-Associated Lesions: background and consensus recommendations from the College of American Pathologists and the American Society for Colposcopy and Cervical Pathology.** *J Low Genit Tract Dis* 2012, **16**(3):205-242.
4. Stoler MH: **New Bethesda terminology and evidence-based management guidelines for cervical cytology findings.** *JAMA* 2002, **287**(16):2140-2141.
5. Moscicki AB, Shiboski S, Hills NK, Powell KJ, Jay N, Hanson EN, Miller S, Canjura-Clayton KL, Farhat S, Broering JM *et al*: **Regression of low-grade squamous intra-epithelial lesions in young women.** *Lancet* 2004, **364**(9446):1678-1683.
6. Tainio K, Athanasiou A, Tikkinen KAO, Aaltonen R, Cardenas J, Hernandez, Glazer-Livson S, Jakobsson M, Joronen K, Kiviharju M *et al*: **Clinical course of untreated cervical intraepithelial neoplasia grade 2 under active surveillance: systematic review and meta-analysis.** *BMJ* 2018, **360**:k499.
7. Chelmow D, Waxman A, Cain JM, Lawrence HC, 3rd: **The evolution of cervical screening and the specialty of obstetrics and gynecology.** *Obstet Gynecol* 2012, **119**(4):695-699.
8. Galgano MT, Castle PE, Stoler MH, Solomon D, Schiffman M: **Can HPV-16 genotyping provide a benchmark for cervical biopsy specimen interpretation?** *Am J Clin Pathol* 2008, **130**(1):65-70.
9. Huang EC, Tomic MM, Hanamornroongruang S, Meserve EE, Herfs M, Crum CP: **p16ink4 and cytokeratin 7 immunostaining in predicting HSIL outcome for low-grade squamous intraepithelial lesions: a case series, literature review and commentary.** *Mod Pathol* 2016, **29**(12):1501-1510.
10. Doorbar J, Quint W, Banks L, Bravo IG, Stoler M, Broker TR, Stanley MA: **The**

biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine* 2012, **30** Suppl 5:F55-70.

11. Ryu W-S: **Molecular virology of human pathogenic viruses.** *Amsterdam: Academic press* 2017:97-109.
12. Melsheimer P, Vinokurova S, Wentzensen N, Bastert G, von Knebel Doeberitz M: **DNA aneuploidy and integration of human papillomavirus type 16 e6/e7 oncogenes in intraepithelial neoplasia and invasive squamous cell carcinoma of the cervix uteri.** *Clin Cancer Res* 2004, **10**(9):3059-3063.
13. Richart RM: **Cervical intraepithelial neoplasia.** *Pathol Annu* 1973, **8**:301-328.
14. Herfs M, Parra-Herran C, Howitt BE, Laury AR, Nucci MR, Feldman S, Jimenez CA, McKeon FD, Xian W, Crum CP: **Cervical squamocolumnar junction-specific markers define distinct, clinically relevant subsets of low-grade squamous intraepithelial lesions.** *Am J Surg Pathol* 2013, **37**(9):1311-1318.
15. Herfs M, Vargas SO, Yamamoto Y, Howitt BE, Nucci MR, Hornick JL, McKeon FD, Xian W, Crum CP: **A novel blueprint for 'top down' differentiation defines the cervical squamocolumnar junction during development, reproductive life, and neoplasia.** *J Pathol* 2013, **229**(3):460-468.
16. Herfs M, Yamamoto Y, Laury A, Wang X, Nucci MR, McLaughlin-Drubin ME, Munger K, Feldman S, McKeon FD, Xian W *et al*: **A discrete population of squamocolumnar junction cells implicated in the pathogenesis of cervical cancer.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012, **109**(26):10516-10521.
17. Lal A, Kim HH, Abdelmohsen K, Kuwano Y, Pullmann R, Jr., Srikantan S, Subrahmanyam R, Martindale JL, Yang X, Ahmed F *et al*: **p16(INK4a) translation suppressed by miR-24.** *PLoS One* 2008, **3**(3):e1864.
18. Serrano M, Hannon GJ, Beach D: **A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4.** *Nature* 1993, **366**(6456):704-707.
19. Moiseeva O, Bourdeau V, Roux A, Deschenes-Simard X, Ferbeyre G: **Mitochondrial dysfunction contributes to oncogene-induced senescence.** *Mol Cell Biol* 2009, **29**(16):4495-4507.
20. Chellappan SP, Hiebert S, Mudryj M, Horowitz JM, Nevins JR: **The E2F transcription factor is a cellular target for the RB protein.** *Cell* 1991, **65**(6):1053-1061.
21. Connell-Crowley L, Harper JW, Goodrich DW: **Cyclin D1/Cdk4 regulates retinoblastoma protein-mediated cell cycle arrest by site-specific**

- phosphorylation.** *Mol Biol Cell* 1997, **8**(2):287-301.
22. Sherr CJ: **Cancer cell cycles.** *Science* 1996, **274**(5293):1672-1677.
 23. Li M, Yang J, Liu K, Yang J, Zhan X, Wang L, Shen X, Chen J, Mao Z: **p16 promotes proliferation in cervical carcinoma cells through CDK6-HuR-IL1A axis.** *J Cancer* 2020, **11**(6):1457-1467.
 24. Romagosa C, Simonetti S, Lopez-Vicente L, Mazo A, Lleona ME, Castellvi J, Ramon y Cajal S: **p16(Ink4a) overexpression in cancer: a tumor suppressor gene associated with senescence and high-grade tumors.** *Oncogene* 2011, **30**(18):2087-2097.
 25. Menon SS, Guruvayoorappan C, Sakthivel KM, Rasmi RR: **Ki-67 protein as a tumour proliferation marker.** *Clinica Chimica Acta* 2019, **491**:39-45.
 26. Lei M: **The MCM complex: its role in DNA replication and implications for cancer therapy.** *Curr Cancer Drug Targets* 2005, **5**(5):365-380.
 27. Fei L, Xu H: **Role of MCM2-7 protein phosphorylation in human cancer cells.** *Cell Biosci* 2018, **8**:43.
 28. Mendez J, Stillman B: **Chromatin association of human origin recognition complex, cdc6, and minichromosome maintenance proteins during the cell cycle: assembly of prereplication complexes in late mitosis.** *Mol Cell Biol* 2000, **20**(22):8602-8612.
 29. Tanaka T, Knapp D, Nasmyth K: **Loading of an Mcm protein onto DNA replication origins is regulated by Cdc6p and CDKs.** *Cell* 1997, **90**(4):649-660.
 30. Kaur G, Balasubramaniam SD, Lee YJ, Balakrishnan V, Oon CE: **Minichromosome Maintenance Complex (MCM) Genes Profiling and MCM2 Protein Expression in Cervical Cancer Development.** *Asian Pac J Cancer Prev* 2019, **20**(10):3043-3049.
 31. Fagerberg L, Hallstrom BM, Oksvold P, Kampf C, Djureinovic D, Odeberg J, Habuka M, Tahmasebpoor S, Danielsson A, Edlund K *et al*: **Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics.** *Mol Cell Proteomics* 2014, **13**(2):397-406.
 32. Kaufmann WK: **Human topoisomerase II function, tyrosine phosphorylation and cell cycle checkpoints.** *Proc Soc Exp Biol Med* 1998, **217**(3):327-334.

33. Park JE, Yi H, Kim Y, Chang H, Kim VN: **Regulation of Poly(A) Tail and Translation during the Somatic Cell Cycle.** *Mol Cell* 2016, **62**(3):462-471.
34. Lee JH, Berger JM: **Cell Cycle-Dependent Control and Roles of DNA Topoisomerase II.** *Genes (Basel)* 2019, **10**(11).
35. Wu X, Peng L, Zhang Y, Chen S, Lei Q, Li G, Zhang C: **Identification of Key Genes and Pathways in Cervical Cancer by Bioinformatics Analysis.** *Int J Med Sci* 2019, **16**(6):800-812.
36. Mills AM, Paquette C, Terzic T, Castle PE, Stoler MH: **CK7 Immunohistochemistry as a Predictor of CIN1 Progression: A Retrospective Study of Patients From the Quadrivalent HPV Vaccine Trials.** *Am J Surg Pathol* 2017, **41**(2):143-152.
37. Paquette C, Mills AM, Stoler MH: **Predictive Value of Cytokeratin 7 Immunohistochemistry in Cervical Low-grade Squamous Intraepithelial Lesion as a Marker for Risk of Progression to a High-grade Lesion.** *Am J Surg Pathol* 2016, **40**(2):236-243.
38. Lee H, Lee H, Cho YK: **Cytokeratin7 and cytokeratin19 expression in high grade cervical intraepithelial neoplasm and squamous cell carcinoma and their possible association in cervical carcinogenesis.** *Diagn Pathol* 2017, **12**(1):18.
39. Sargent A, Fletcher S, Bray K, Kitchener HC, Crosbie EJ: **Cross-sectional study of HPV testing in self-sampled urine and comparison with matched vaginal and cervical samples in women attending colposcopy for the management of abnormal cervical screening.** *BMJ Open* 2019, **9**(4):e025388.
40. Kishore V, Patil AG: **Expression of p16INK4A Protein in Cervical Intraepithelial Neoplasia and Invasive Carcinoma of Uterine Cervix.** *J Clin Diagn Res* 2017, **11**(9):EC17-EC20.
41. Lesnikova I, Lidang M, Hamilton-Dutoit S, Koch J: **HER2/neu (c-erbB-2) gene amplification and protein expression are rare in uterine cervical neoplasia: a tissue microarray study of 814 archival specimens.** *APMIS* 2009, **117**(10):737-745.
42. Ozgul N, Cil AP, Bozdayi G, Usubutun A, Bulbul D, Rota S, Kose MF, Biri A, Haberal A: **Staining characteristics of p16INK4a: is there a correlation with lesion grade or high-risk human papilloma virus positivity?** *J Obstet Gynaecol Res* 2008, **34**(5):865-871.
43. Vilorio ME, Bravo J, Carrero Y, Mosquera JA: **In situ expressions of protein 16 (p16(CDKN2A)) and transforming growth factor beta-1 in patients with**

cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2018, **228**:303-307.

44. Vinyuvat S, Karalak A, Suthipintawong C, Tungsinmunkong K, Kleebkao P, Trivijitsilp P, Siriaunkgul S, Triratanachai S, Khunamornpong S, Chuangsuwanich T *et al*: **Interobserver reproducibility in determining p16 overexpression in cervical lesions : use of a combined scoring method.** *Asian Pac J Cancer Prev* 2008, **9**(4):653-657.
45. Cremer ML, Alonzo TA, Alspach AE, Shulman IA, Cernosek S, Tsai S, Kalichanda N, Felix JC: **Diagnostic reproducibility of cervical intraepithelial neoplasia 3 and atrophy in menopausal women on hematoxylin and eosin, Ki-67, and p16 stained slides.** *J Low Genit Tract Dis* 2010, **14**(2):108-112.
46. Selvi K, Badhe BA, Papa D, Ganesh RN: **Role of p16, CK17, p63, and human papillomavirus in diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia and distinction from its mimics.** *Int J Surg Pathol* 2014, **22**(3):221-230.
47. Crum CP, Nucci, M. R., Lee, K. R., & Boyd, T. K. : **Diagnostic gynecologic and obstetric pathology.** 2017:298-374.
48. Nam EJ, Kim JW, Hong JW, Jang HS, Lee SY, Jang SY, Lee DW, Kim SW, Kim JH, Kim YT *et al*: **Expression of the p16 and Ki-67 in relation to the grade of cervical intraepithelial neoplasia and high-risk human papillomavirus infection.** *J Gynecol Oncol* 2008, **19**(3):162-168.
49. Keating JT, Cviko A, Riethdorf S, Riethdorf L, Quade BJ, Sun D, Duensing S, Sheets EE, Munger K, Crum CP: **Ki-67, cyclin E, and p16INK4 are complimentary surrogate biomarkers for human papilloma virus-related cervical neoplasia.** *Am J Surg Pathol* 2001, **25**(7):884-891.
50. Zhong P, Li J, Gu Y, Liu Y, Wang A, Sun Y, Lu L: **P16 and Ki-67 expression improves the diagnostic accuracy of cervical lesions but not predict persistent high risk human papillomavirus infection with CIN1.** *Int J Clin Exp Pathol* 2015, **8**(3):2979-2986.
51. Kim TH, Han JH, Shin E, Noh JH, Kim HS, Song YS: **Clinical Implication of p16, Ki-67, and Proliferating Cell Nuclear Antigen Expression in Cervical Neoplasia: Improvement of Diagnostic Accuracy for High-grade Squamous Intraepithelial Lesion and Prediction of Resection Margin Involvement on Conization Specimen.** *J Cancer Prev* 2015, **20**(1):70-77.
52. Galgano MT, Castle PE, Atkins KA, Brix WK, Nassau SR, Stoler MH: **Using biomarkers as objective standards in the diagnosis of cervical biopsies.** *Am J Surg Pathol* 2010, **34**(8):1077-1087.
53. Kanthiya K, Khunnarong J, Tangjitgamol S, Puripat N, Tanvanich S:

Expression of the p16 and Ki67 in Cervical Squamous Intraepithelial Lesions and Cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* 2016, **17**(7):3201-3206.

54. Branca M, Giorgi C, Ciotti M, Santini D, Di Bonito L, Costa S, Benedetto A, Bonifacio D, Di Bonito P, Paba P *et al*: **Over-expression of topoisomerase IIalpha is related to the grade of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) and high-risk human papillomavirus (HPV), but does not predict prognosis in cervical cancer or HPV clearance after cone treatment.** *Int J Gynecol Pathol* 2006, **25**(4):383-392.
55. Conesa-Zamora P, Domenech-Peris A, Ortiz-Reina S, Orantes-Casado FJ, Acosta-Ortega J, Garcia-Solano J, Perez-Guillermo M: **Immunohistochemical evaluation of ProEx C in human papillomavirus-induced lesions of the cervix.** *J Clin Pathol* 2009, **62**(2):159-162.
56. Pinto AP, Schlecht NF, Woo TY, Crum CP, Cibas ES: **Biomarker (ProEx C, p16(INK4A), and MiB-1) distinction of high-grade squamous intraepithelial lesion from its mimics.** *Mod Pathol* 2008, **21**(9):1067-1074.
57. Badr RE, Walts AE, Chung F, Bose S: **BD ProEx C: a sensitive and specific marker of HPV-associated squamous lesions of the cervix.** *Am J Surg Pathol* 2008, **32**(6):899-906.
58. Shi J, Liu H, Wilkerson M, Huang Y, Meschter S, Dupree W, Schuerch C, Lin F: **Evaluation of p16INK4a, minichromosome maintenance protein 2, DNA topoisomerase IIalpha, ProEX C, and p16INK4a/ProEX C in cervical squamous intraepithelial lesions.** *Hum Pathol* 2007, **38**(9):1335-1344.
59. Guo M, Baruch AC, Silva EG, Jan YJ, Lin E, Sneige N, Deavers MT: **Efficacy of p16 and ProExC immunostaining in the detection of high-grade cervical intraepithelial neoplasia and cervical carcinoma.** *Am J Clin Pathol* 2011, **135**(2):212-220.