

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ
KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM ANA BİLİM DALI

**SERVİKAL PREİNVAZİV VE İNVAZİV LEZYONLARDA P16İNK4A
EKSPRESYONU: PREİNVAZİV LEZYONLARIN DERECEİ İLE İLİŞKİSİ VE
PROGNOZA ETKİSİ**

Uzmanlık Tezi
Dr. Mahmut ALĞAÇ

İSTANBUL, 2009

ÖNSÖZ

Eğitim serüvenimizde her türlü mesleki deneyimini bizlerle paylaşan, eleştirileri ile disiplinli ve ilkeli çalışmayı öğreten hocam İ.Ü.Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum A.D. Başkanı Prof.Dr.SEYFETTİN ULUDAĞ'a ;

Etik ve sosyal sorumluluk bilincini bizlere kazandıran çok değerli öğretim üyelerine ;

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi birikimleri, klinik tecrübelerinden faydalandığım, tezimin hazırlanmasının her aşamasında desteklerini eksik etmeyen, özgün fikirleri çalışmamın hipotezinde katkıları olan ve her zaman saygıyla hatırlayacağım çok değerli hocalarım sayın Prof.Dr.FUAT DEMİRKİRAN ve Jinekolojik Onkoloji Bilim Dalı Başkanı sayın Prof . Dr. MACİT ARVAS' a ;

Engin tecrübeleri ve bilgi birikimleriyle eğitimimde sonsuz emekleri olan hocalarım Prof.Dr.CEVDET ŞANİOĞLU ve Prof.Dr.TUGAN BESE'ye ;

Tezimin patoloji kısmının hazırlanmasındaki çabalarından dolayı Prof.Dr. ŞENNUR İLVAN'a ;

Cerrahpaşa Tıp Fakültesi'nde geçirdiğimiz çalışma saatlerini ve nöbetleri unutulmaz anılara dönüştüren çok sevgili asistan arkadaşlarıma ;

Çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

1-GİRİŞ-----	4-5
2-GENEL BİLGİLER-----	6-14
3-MATERYAL METOD-----	15-16
4-BULGULAR-----	17-21
5-TARTIŞMA-----	22-25
6-SONUÇ-----	26-27
7-İNGİLİZCE-TÜRKÇE ABSTRACT-----	27-29
8-KISALTMALAR-----	30-31
9-KAYNAKLAR-----	31-38

GİRİŞ

Serviks kanseri tüm dünyada genç kadınlarda en sık görülen ikinci kanserdir (1). Serviks kanserine bağlı mortalite; sitoloji ve taramalara giderek daha önem verilmesiyle , ABD' de son 50 yıldır azalmış ve bu kanserden ölüm ABD 'de 13. sıraya gerilemiştir (2).

1940'lı yılların ortalarında G. Papanicolaou'nın kendi adıyla anılan boyayı sitoloji preparatlarına uygulamasıyla birlikte vajinal sitolojik araştırmalar tüm dünyada yaygınlaşmıştır. Bu gelişmeye paralel olarak servikal patolojiler için vajinal sitoloji ile tarama programları o yıllardan günümüze yaygınlaşmış bunların sonucunda invaziv serviks kanseri insidansında önemli düşüşler saptanmıştır (3). ABD 'de yapılan istatistiksel analizlerde son 50 yılda başarılı tarama stratejileri ile serviks kanserini %75 oranında ve bu kanserden ölümleri de %74 oranında azaldığı bildirilmiştir (4). Ayrıca SEER (The Surveillance, Epidemiology, and End Results) sonuçlarına göre; 1975 yılından 2000 yılına kadar olan süre içinde invaziv serviks kanser insidansı 100.000 de 14.8 den 7.6'ya düşmüştür(5). Sağlık sistemlerindeki eksikliklerden dolayı vajinal smear testinin uygulanmaması invaziv kanser gelişimi için en önemli risk faktörü olarak kabul edilmektedir (6). Son yıllarda 20-29 yaş grubunda servikal intraepitelyal lezyon (CIN) insidansı 1970'li yıllara göre iki kat artmış ve ortalama görülme yaşı düşmüştür. Aynı şekilde 40 yaşın altındaki hastalarda serviks kanser insidansı da giderek artmaktadır (7).

Serviko-vajinal sitoloji testinin düşük tanı duyarlılığının olması ve yanlış negatiflik oranlarının %15-20 kadar olmasından dolayı yeni tarama metodları geliştirilmektedir (8). Yakın zamanda yapılan bir çalışmada invaziv serviks kanseri gelişen kadınların % 47'sinde son 5 yıl içinde normal bir smear sonucu vardı (9). Vajinal smearin tanısal doğruluk ve güvenilirliğini artırma çabalarından biri tarama programlarına HPV tip tayininin eklenmesidir. Amaç servikal preinvaziv lezyonların tamamını yakalamak ve invazyona gidişi önlemektir. Bunun yanında son 10 yıldaki yeni teknolojik gelişmelere paralel olarak ; likid bazlı sitoloji ve bilgisayar yardımlı serviko-vajinal sitoloji smear okuma programları (pap-net) ile bu tarama testlerinin duyarlılık, özgünlüğü artmıştır (10). Her türlü gelişmeye rağmen bu amaca varmak için günümüzde en faydalı araç halen vajinal sitolojik taramalardır. Vajinal smear 'in özgünlüğünün yüksek olmasına rağmen duyarlılığı düşüktür. Clavel ve ark. 2001 yılında yaptığı çalışmada sitolojinin duyarlılığı % 70-80, likid bazlı sitolojinin duyarlılığı ise %85-95 olarak bildirilmişlerdir (11). Vajinal smearlerde yalancı negatifliklerin oranının yüksek olmasından dolayı sıvı bazlı teknolojiler gelişmiş ülkelerde

daha fazla kullanılmaya başlanmıştır. Sıvı bazlı teknoloji ile HPV tip tayinin de yapılabilmesi, vajinal smear yöntemine üstünlüğü olarak kabul edilmektedir.

Vajinal sitolojinin uygulama ve yorumunun kolaylaştırmak için pek çok sınıflama sistemi geliştirilmiştir. Bunlardan sonuncusu 1988 yılında ABD. Bethesda'da sunulmuş ve 2001 yılında tekrar düzenlenmiştir. Bethesda 2001 sınıflama sisteminde epitelyal hücre anormallikleri; skuamöz hücrelerde ASCUS ("Önemi belirlenemeyen atipik skuamöz hücre"), ASC-H ("yüksek dereceli intraepitelyal lezyonun dışlanamadığı atipik skuamöz hücre"), LSIL ("düşük dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon"), HSIL ("Yüksek dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon") ve skuamöz hücreli kanser olarak sınıflanmıştır; Glandüler hücrelerde ise AGC ("Atipik glandüler hücre"), AIS ("adenokanser in situ") ve adenokanser olarak değerlendirilmiştir.

Serviksin preinvaziv ve invaziv lezyonların oluşumunda HPV enfeksiyonlarının mutlak gerekli bir faktör olduğu bilinir. Başka bir değişle habasete giden süreç yüksek riskli HPV enfeksiyonlar ile başlar. Şüphesiz başta çevresel ve genetik faktörler olmak üzere pek çok ilave faktörün katkısı gerekmektedir. Yaşam boyu kadınların % 50 'si HPV ile temas eder. Buna karşılık her 100.000 kadının ortalama 12 'sinde serviks kanseri görülür. Neden bazı HPV enfeksiyonları preinvaziv servikal lezyonlara ve bazı preinvaziv serviks lezyonları da invaziv serviks kanserine ilerlemektedir? Bu açıklanması gereken bir konudur. İnvazyona ilerlemesi olası olan preinvaziv lezyonların bazı belirteçler ile saptanabilir olması bu lezyonların yönetimini kolaylaştıracaktır. Ancak günümüzde böyle bir belirteç tanımlanmamıştır. HPV E6 ve E7 onkogen proteinlerinin konak hücrelerinde p53 ve pRB gen inaktivasyonuna neden olduğu ve bunun moleküler düzeyde habasete giden süreci başlattığı bilinir. Bu esnada oluşan p16ink4a overekspresyonu bir belirteç olarak kullanılabilir. Bu bulguları destekleyen sınırlı sayıda da olsa çalışma mevcuttur .

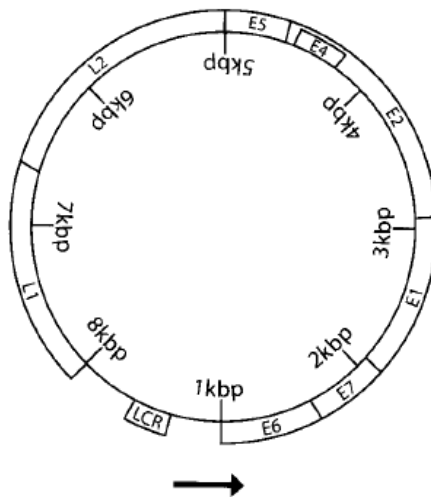
Çalışmamızda amacımız normal ve preinvaziv serviks dokularında p16ink4a overekspresyonunu araştırmak ve preinvaziv lezyon derecesi ile p16ink4a overekspresyonu arasındaki ilişkiyi irdelemektir. Böylece p16ink4a'nın klinik uygulanabilirliği değerlendirilecektir.

GENEL BİLGİLER

Serviks kanseri gelişmiş ülkelerde erken yaşlarda meme kanserinden sonra ikinci sıradadır. Gelişmekte olan ülkelerde ise en sık görülen kanserdir. Dünya sağlık örgütü'nün 2006 yılı verilerine dayanarak tüm dünyada 510.000 yeni serviks kanseri olgusunun tanı aldığı ve 288.000 olgunun da serviks kanserinden öldüğü bildirilmektedir. Bu olguların da %80'i gelişmekte olan ülkelerde görülmektedir(12). Amerikan kanser derneği verilerine göre ABD'de 2006 yılında 9710 yeni serviks kanseri olgusu tanı almış ve serviks kanserinden 3700 ölüm olgusu bildirilmiştir(13). HPV enfeksiyonu ve serviks kanseri arasındaki ilişki ilk olarak 1980 yılında Alman virolog Harold Zur Hasuen tarafından saptanmıştır. Bu konudaki sayısız yayınlara ek olarak serviks kanseri nedenleri arasında HPV'nin kilit rolü olduğuna dair kanıtlar 1980 yılından beri artmıştır(14). Serviks kanseri gelişiminde Human Papilloma Virus (HPV) enfeksiyonunun , bazı yardımcı faktörlerin etkisiyle kansere yol açtığı günümüzde kabul görmektedir. Bilimsel yayınlar , HPV varlığının servikte kanser gelişimi için gerekli olduğunu vurgularken, yeterli olmadığı konusunda birleşmektedir. İnvaziv serviks kanseri dokularında HPV DNA' s ı %99.7 civarında saptanmıştır(15).

HUMAN PAPİLLOMAVİRUS (HPV)

Human papillomavirus (HPV) 72 kapsomerden oluşan zarfsız , ikozahedral (20 yüzlü) bir kapsül içinde çift sarmallı 7.9 kb'lık DNA içeren bir virustur. Virus partikülü ısıya dayanıklı olup DNA içeriği 5.2 milyon daltondur ve 8000 baz çiftinden oluşur . HPV viral genomu başlıca üç bölgeye ayrılmaktadır. HPV DNA genomu üzerinde viral proteinleri kodlayan 8 adet açık zincir dizini (ORF) yer almaktadır (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. HPV genomu

L1, L2 geç viral kapsid proteinleri enfeksiyöz viral partiküllerin birleştirilmesinde kullanılan yapısal proteinlerin senteziyle ilgilidir. L1 ve L2 kapsid proteinleri hücre

zarındaki reseptörler ile iletişime girerek virus DNA'sının hücre içine alınmasında rol alır. L1 kapsid proteini majör kapsül proteininin sentezinden sorumludur . L2 ise nispeten daha az miktarda bulunan minör kapsül proteininin sentezinden (%5) sorumlu olup HPV tipine özeldir (16).

DNA replikasyon ve onkogenlerle ilgili proteinleri kodlayan E1-E2-E4-E5-E6-E7 erken viral kapsid proteinleri DNA replikasyonu , transkripsiyonu ve hücrel transformasyonu düzenler. E1 , E2 virus replikasyonunun ilk aşamalarında yer alır. E1 ve E2 parabazal keratinositlerde bulunur; viral epizomun stabilize edilmesi ve viral replikasyonun başlaması için gereklidir (17). Virustaki transkripsiyon işlemlerinde düzenleyici olarak görev yapan proteinlerin genetik şifresi E2 bölümünde bulunmaktadır . E2; E6 ve E7 'nin transkripsiyonunu düzenler. Bu proteinler hücrenin büyüme ve siklus kontrol mekanizmalarını bozar, DNA sentezini yeniden başlatır ve replikasyon proteinlerini aktive ederler. Virusun maturasyonunun sağlanmasında rol oynayan proteinler ise E4 bölümü tarafından sentezlenir (18). E4 proteininin hazır virionların hücreden salınımında rol aldığı düşünülmektedir. Hücre transformasyonunda kilit rol oynayan E6 ve E7 bölümleri , HPV 16 ve 18'deki onkogenlerin sentezinden sorumludur .

Ayrıca LCR adı verilen kodlanmayan alan olup transkripsiyon regülatör sekansları ve replikasyon başlangıcını içeren uzun kontrol bölümü içeren bir dizin mevcuttur (19). Günümüzde 200 civarında HPV tipi belirlenmiştir ve bunların yaklaşık olarak 40'ı anogenital epiteli enfekte etmektedir. Son yapılan çalışmalarda 15 anogenital HPV tipininin yüksek riskli ve serviks kanseri ile ilişkili olduğu saptanmıştır. HPV 16, 18, 31, 33, 34, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 ,66 ,68 ve 70 'in karsinojenik potansiyeli olduğuna dair yeterli bilimsel kanıt mevcuttur (20). İlk kez 1981 yılında Alman virolog Harold Zur Hausen tarafından HPV-serviks kanseri ilişkisine değinilmiştir (21). HPV 16 ve 18 tüm serviks kanserlerin %70 'ine neden olduğu kabul edilmekle beraber yüksek riskli onkojenik HPV tipleri arasında HPV 16 prevelansı en yüksek olandır. Lorinc ve ark. 1992 yılında yaptığı bir çalışmada skuamöz hücreli serviks kanserinde % 50 oranında HPV tip 16 saptamışlardır . HPV tip 18 ; invaziv serviks kanseri neden olan onkojenik virus sıralamasında HPV 16 'dan sonra ikinci sıklıkta görülmektedir (22). Serviks kanseri hücrelerinde HPV 18 , 31 ve 45 saptanma oranı %25-30 civarındadır (23).

HPV VE GENİTAL KANSER EPİDEMİYOLOJİSİ

HPV bulaşması açısından en önemli risk faktörü cinsel aktivitedir. HPV enfeksiyonunun prevalansı genç cinsel aktif kadınlarda yüksektir (24). HPV' nin peak insidansı 20-25 yaşları arasında ortaya çıkmakta ve bunların büyük kısmı da kendiliğinden gerilemektedir . Bazı kesitsel çalışmalar ; sitolojisi normal olan cinsel aktif kadınların %20 ila %40 'nda HPV enfeksiyonu olabileceğini ve prevalansın da yaşla azalabileceğini bildirmişlerdir (25). Genç kadınlarda virusun vücuttan temizlenme hızı yüksektir. Adolesanlarda HPV prevalansının %19-46 arasında olduğu bilinmektedir. Fakat düşük dereceli CIN lezyonu olanların çoğunda bu durum kendiliğinden olarak kaybolmaktadır. Adolesanların sadece %0.12-3'ü yüksek riskli HPV tipleri ile enfekte olmaktadır. Moscicki ve ark. yüksek riskli HPV taşıyanların ileride yüksek dereceli CIN geliştirdiğini , duyarlı adolesanlarda tekrarlayan HPV teması ve immunolojik olarak enfeksiyonun baskılanamadığı bu durumlarda virusun onkojenik potansiyelini gösterdiğini bildirmişlerdi (26). Günümüzde yapılan çalışmalarda cinsel eş sayısının neoplazi riskini artırmadığı yalnızca 16 yaşından önce cinsel ilişkisi olanlarda HPV taşıyıcılık süresinin artmasına bağlı olarak serviks kanser riskinin artabileceği öngörülmüştür (27). Cinsel aktif erkek ve kadınların en az yarısı HPV virüsüne yaşamlarının bir süresinde maruz kalmakta en az %80'nin ise 50 yaşına kadar enfekte olduğu kabul edilmektedir (28). İnvazyona ilerleme nikotin , ekzojen östrojen , p53 polimorfizmi , bağışıklık durumu ve muhtemel diğer enfektif ajanlara bağlıdır. Sigaranın , HPV enfeksiyonundan bağımsız olarak serviks epitelinde DNA hasarına yol açtığı gösterilmiştir. Sigara hedef hücreleri mutajen ve karsinojenlere maruz bırakıp gen mutasyonlarıyla kromozom aberasyonlarına yol açarak kanser gelişimine neden olur. Sigaranın benzopiren ve NNK karsinojenleri içerdiği, serviks kanseri oluşumunda da önemli bir yaşam stili ve çevresel faktör olduğu kabul edilmiştir (29).

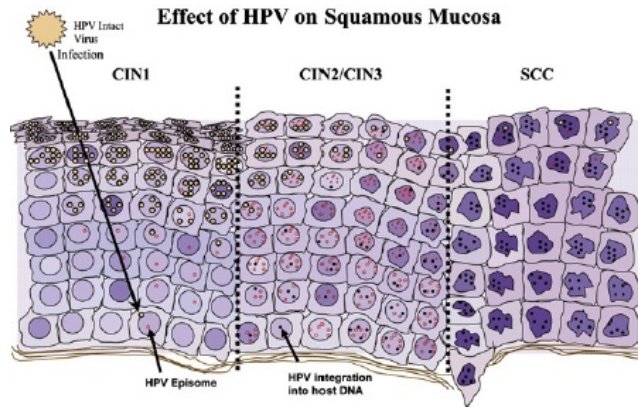
SERVİKAL KARSİNOGENEZİSTE HPV 'NİN ROLÜ

Serviks transformasyon bölgesindeki immatur skuamöz metaplazi , habis transformasyon için en yüksek risk taşıyan bölgedir(Şekil 1.2). Transformasyon bölgesinde metaplazinin en aktif olduğu üç dönem sırasıyla fetal period , puberteyi takip eden yıllar ve gebeliğin erken ilk haftalarıdır (30).



Şekil 1.2 .Serviks transformasyon bölgesi

Genital HPV enfeksiyonu latent, subklinik ve klinik olmak üzere üç dönemde görülür. Bazal keratinositleri hedef alan viral enfeksiyonlardaki replikasyon zincirinde , viral proteinlerin yüksek derecede ekspresyonu ve viral yük, skuamöz epitelin stratum granulozumunda ve stratum spinosumun farklılaşan keratinositlerinde ortaya çıkmaktadır. Virus ilk olarak stratum germinativumdaki bazal hücreleri enfekte eder. Bu da en çok cinsel ilişkiye bağlı mikrotravmaların olduğu bölgede oluşur. Virus genomu, ikozahedral protein kılıfından ayrılıp hücrenin çekirdeğine girer ve burada epizomal (konak DNA'sı dışında) yerleşim gösterir. Yara iyileşmesi sırasındaki bazal hücre bölünmesiyle vasküler ve bazal hücre proliferasyonu başlar. Virus replikasyonu ile birlikte bazal intermediyer hücre hiperplazisi ortaya çıkar. Başlangıçta latent fazda HPV DNA'sı yalnızca bazal epitel tabakasındadır (Şekil 1.3)



Şekil 1.3. HPV epizomal replikasyon ile CIN1 oluşumu ve CIN3'e ilerleme aşamaları

Latent dönemde hastalığın sitolojik, kolposkopik ya da morfolojik hiçbir bulgusu yoktur, yalnızca duyarlı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) teknikleri ile HPV DNA 'sı gösterilebilir (31).

Subklinik dönemde HPV'ye bağılı sitolojik ve ya mikroskopik değişiklikler ancak kolposkopi gibi büyütme yöntemleri uygulanarak görülebilen lezyonlar mevcuttur. CIN ve intraepitelyal neoplaziler genelde bu dönemde görülen lezyonlardır .

Genital kondilom ya da invaziv kanser gibi gözle görülebilen lezyonların ve semptomların bulunduğu dönemde klinik dönem adını alır.

Latent dönemin ne kadar süreceği , ileri aşamalara geçip geçemeyeceği çeşitli faktörlere bağılıdır. Tüm bu dönemler aynı anda beraber bulunabileceği gibi birbirine geçiş de gösterebilir. Hatta klinik belirti veren epiteler komşu normal epitelde latent HPV enfeksiyonu bulunabilir ki buna bağılı olarak genital kondilom ya da intraepitelyal neoplazi alanlarına komşu alanlarda tedavi sonrası nüksler sıkça görülmektedir (32).

İmmunolojik kontrolün kaybıyla virus genomu replike olmakta, buna bağılı ortaya çıkan büyüme faktörlerinin etkisiyle epitel proliferasyonu ; akantozis (intermediyer hücre hiperplazisi) ve hiperkromazi oluşmaktadır. Olguların %30 'unda bu proliferasyon aşırı olup servikste gözle görülebilir ekzofitik kondilom gelişebilir. Epitel tabakasının üst sıralarında oluşan koilositler habis dönüşüm göstermeyen , ölü ya da ölmekte olan stratum granulosum hücreleridir. Koilosit nükleusu düzensiz ve virus partikülleri ile dolu olduğu için hiperkromatiktir. Sitoplazmada çekirdeğin hemen kenarında vakuol bulunur. Bu koilositler aslında daha çok düşük risk grubundaki HPV enfeksiyonlarının bir bulgusudur.

HPV enfeksiyonu olmadan da akantozis, hiperkeratoz ve koilositoz oluşabilir. Koilositlerin ayırıcı tanısında perinükleer halo ve nükleer atipi (nükleer büyüme , düzensiz çekirdek sınırları , binükleasyon , hiperkromazi) gibi bulgular kullanılır .

Hücresel boyutta HPV enfeksiyonu iki farklı şekilde izlenebilir. Epizomal enfeksiyonda viral olarak aktif HPV , hücre çekirdeğine yerleşmiştir ancak viral DNA konak hücre DNA 'sından ayrıdır. Entegre enfeksiyonda , HPV DNA düşük ve yüksek riskli HPV tiplerinin DNA'sı epizomal kalabilir. Bu durum anormal sitoloji bulguları oluşturabilir . Bu gelişmeler geçici HPV enfeksiyonlarının bulgularıdır. HPV enfeksiyonları geçici ve kalıcı olmak üzere iki grupta toplanır. Habis transformasyona götüren süreç kalıcı HPV enfeksiyonları ile başlar. Kalıcı HPV enfeksiyonlarının da hemen tamamında virus DNA'sı ile konak hücre DNA'sına entegre olur. Başka bir deyişle virus DNA 'sı ile konak hücre DNA 'sı birleşir ve birlikte çalışmaya başlar. Bu durum yalnız yüksek riskli HPV tipleri ile izlenir. Epizomal hastalıkta olduğu gibi, anormal serviko-vajinal sitoloji testlerine neden olabilir ve kolposkopik olarak görülür.

Virus L1- L2 gen bölgeleri ile konak hücre DNA'sına bağlanır. Bunun sonucunda özellikle E2 bölgesi geni parçalanarak inaktif hale geçer . E2 bölümünün fonksiyonu yitirmesi E6 ve E7 bölümlerinin aktif olarak çalışmasını sağlar. Bu da konak hücre tümör baskılayıcı genlerden sırasıyla p53 ve pRb 'nin baskılanmasına ve sonuç olarak kontrolsüz hücre çoğalmasına ve habaset gelişmesine yol açar. Nadir durumlarda , HPV DNA'sının hücre DNA 'sına entegre olmadan , epizomal kalarak da tümör gelişimine yol açabildiği bildirilmiştir (33).

Yukarıda da belirtildiği gibi , enfeksiyon oluşturmak için HPV'nin bazal ve parabazal hücrelere ulaşması gerekmektedir. Genomlarını ve enfektif virionları oluşturabilmek için HPV konakçı hücrelerinde bir miktar farklılaşmaya yol açar. Bu etkileşim konakçı hücrenin süperfisyal hücrelere ilerlemesini engellemez. Ancak bu durum viral genlerin ekspresyonunun kontrolünü sağlayan düzenleyici hücre içi özelliklerin bozulması ve denetiminin ortadan kalkması ile engellenir. Viral genler, epitelyal hücrenin çoğalmasını kontrol eden mekanizmalarla etkileşerek kromozomal anormallik ortaya çıkmasına neden olur. Bu süreçte etkili olan viral genetik işlevler moleküler ve biyokimyasal düzeyde pek çok çalışma ile gösterilmiştir. Üç önemli mekanizma ile kromozomal anormallik ortaya çıkmaktadır (34). Birincisi onkojenik HPV tiplerinin E6 proteini , p53 tümör baskılayıcı genin erken yıkımına neden olmakta ve bu hücrenin apoptotik fonksiyonlarını bozmaktadır. İkincisi ; E7 proteini ise retinoblastoma pRb protein kompleksinin işlevini engelleyerek hücre siklusunun pRb yolu ile kontrolden çıkmasına neden olmaktadır. Üçüncüsü ise her iki gen sentromer sentezi ve fonksiyonunu etkileyerek mitotik fonksiyonların düzgün gidişini bozarlar. Bunun sonucunda mitoz sırasında kromozomlarda sayısal ve yapısal anormallikler oluşmaktadır.

Viral E6 ve E7 onkogenlerin bazal ve parabazal hücrelerde anormal ekspresyonu ile serviks kanseri patogenezi indüklenir.

CDKN2A gen ürünü olan p16ink4a, tümör baskılayıcı proteini olarak kabul edilmektedir. P16ink4a siklin bağımlı kinaz inhibitörü (CKI) 'dür. P16ink4a 'nın hücre siklusunun düzenlenmesinde önemli görevleri vardır (35). P16ink4a hücre döngüsünde G1 kontrol noktasını düzenler. HPV virusleri ; onkoproteinleri olan E6 ve E7 'nin sırasıyla tümör baskılayıcı genler olan p53 ve pRb 'ye bağlanmasıyla serviks kanseri patogeneze mekanizmasında rol alırlar (36). P16ink4a ekspresyonu pRb 'nin negatif feedback'i ile kontrol edilir. Azalmış ve ya kaybolan pRb p16ink4a'nın ekspresyonunda artışa neden olur. Dolayısıyla P16ink4a 'nın HPV onkogenlerinin saptanmasında duyarlı ve özgün bir belirteç olduğu düşünülmektedir (37).

Yüksek riskli HPV tipleri serviks epitelyal hücreleri enfekte edip , E6 ve E7 onkoproteinleri ile p53 ve pRb'ye bağlanarak bunları inaktif hale getirmektedirler. Yüksek riskli HPV enfeksiyonu olanlarda bu tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu ile kontrolsüz hücre bölünmesi meydana gelmektedir (38). E7 onkoproteini tümör baskılayıcı protein olarak kabul edilen retinoblastoma (pRb) bağlanarak kompleks aktif hipofosfor ile retinoblastoma'dan E2F benzeri kopyalama faktörü salınmasına neden olmaktadır. PRb ilişkili genlerin kopyalanması aktive olup, hücre siklusunda G1/S fazının ilerlemesi sağlanır. Bundan dolayı E7 proteini pRB inaktivatörü gibi davranır ve gen mutasyonu mekanizmasına katılır. E6 ve E7 ile ilişkili onkojenik mekanizmalar diğer kanser tiplerinde de sık olarak görülür. E6 yüksek E2F seviyeleri ile oluşan apoptosisi önler (39). Primer serviks kanserlerinde tümör hücreleri incelendiğinde, yüksek riskli viral genom HPV tiplerinin host genomu ile birleşerek, E1 ve E2 genlerinin fonksiyonlarını tahrip ederek E6 ve E7 onkogenlerinin aktivasyonuna neden olmaktadır. In vitro da E6 ve E7 kodlayan DNA'ların primer hücrelerinde immortilizasyon olduğu saptanmıştır . Genetik anormallik saptanan hücrelerde yüksek riskli HPV enfeksiyonları; E6 ve E7 protein ekspresyonuyla serviks kanseri oluşum süreci kolaylaştırmaktadır (40). Somatik olarak oluşan genetik lezyonlar ; hasarlanmış DNA'larının kopyalanması sonrası bir sonraki hücreye kalıtımla aktarılır. Karsinogenez mekanizmasının temelini oluşturan teoriye göre normal memeli hücresinde DNA hasarı sonrası hücre onarımında DNA sentezi ve mitozu sırasında hücre siklusunun G1 ve G2 fazlarında duraksaması olur (41). DNA kırıklarına neden olan iyonizan radyasyon ve Aktinomisin D sonrası G1 siklus duraksaması görülür. Bu durumda wild tip protein p53 (wtp53) artışında geçici bir artış görülür. Wt p53 olmayan ve ya mutant p53 'ü olanlarda DNA sentezi ile ilgili olan G1 arresti gösteremezler. Wild tip p53 proteini DNA hasarından sonra hücre bölünmesini engeller. DNA hasarına olan cevap oluşumunda; p53 mutasyonu olanlarla wild tip p53 ile E6 etkileşimi arasında benzer bir ilişki saptanmıştır (42). HPV pozitif serviks kanserli hastalarda p53 mutasyonu olan hücreler saptanabilmektedir. Bu durumda etkilenmiş olan hücre bölünmesinde artış olduğu görülmüştür (43). Önceki çalışmalarda in vitro ortamda yüksek riskli HPV E6 proteinlerinin wtp53 'e bağlanıp ubikutin aracılığıyla p53 yıkımına neden olduğu saptanmıştı (44). Yin ve ark. p53 geni olmayan hücrelere wtp53 geçiş göstererek ederek hücre bölünme siklusunu ve gen amplifikasyon frekansını kontrol altına almayı başarmışlardır (45).

Serviks displazilerde geniş serilerde yapılan ekspresyon analizlerinde p16ink4a'nın displastik epitelin proliferasyon gösteren kısımlarında diffüz boyanma gösterdiği ortaya konmuştur (46). Son zamanlarda yapılan çalışmalarda da P16ink4a tanısında CIN 2 ve üzeri lezyonların belirlenmesinde yardımcı olabileceği düşünülmektedir. P16ink4a biyobelirteci ASCUS ve LSIL 'da sitolojik spesimenlerde de immün boyama ile belirlenebilmektedir (47).

SERVİKAL İNTRAEPİTELYAL NEOPLAZİ (CIN) GELİŞİMİ

HPV 'ye bağlı olarak gelişen lezyonlar morfolojik ve kolposkopik olarak düşük ve yüksek dereceli lezyonlar olarak ikiye ayrılmaktadır. Koilositotik atipi ve CIN1 düşük dereceli grubu ; CIN2 ve CIN3 ise yüksek dereceli grubu oluşturmaktadır.

HPV temas eden bir kadında klinik ya da subklinik infeksiyon her zaman görülmeyebilir ve virus kendiliğinden ortadan kalkabilir . Bu kadınlarda PCR tekniği ile HPV 'sına tekrar bakıldığında % 90 'lara varan oranda virus DNA'sının kayıp olduğu ortaya çıkmaktadır. Viral gerileme için belirli bir süre verilememektedir. HPV ile enfekte olan kişilerin %90'ında yaklaşık 2 yıl içerisinde gerileme olduğu bilinmektedir. Ancak bu olguların % 10 'u ilerleyerek olarak intraepitelyal lezyon haline geçmekte ; bunların da %1'i invaziv kansere dönüşmektedir . Tüm CIN lezyonlarının gerileyebileceği düşünülmeli , tedavi ve takipte hastalar buna göre değerlendirilmelidir (48).

2005 yılında Arbyns ve ark. yaptığı bir meta-analizde , CIN1 olgularının % 57'sinin kendiliğinden gerilemeye uğradığı , %31'nin devam ettiği , % 11'nin CIN3 'e ve %1'nin ise invaziv kansere dönüştüğü saptanmıştır (49). CIN3 için gerileme oranı %32 ve invazyona geçiş %12 olarak bulunmuştur (tablo 1.1).

TABLO 1.1. CIN'de ilerleme – gerileme (Arbyn,2005)

	Gerileme	Kalıcılık	İlerleme	
			CIN3	invazyon
CIN1	57	31	11	1
CIN2	43	35	22	5
CIN3	32	56	-	12

İleri dereceli CIN'e geçişin daha çok 25-29 yaşları arasında ortaya çıktığı ve HPV tipine bağımlı olduğu bildirilmektedir. Serviks kanseri patogenezinde ana aşamalar, metaplazik

transformasyon bölgesinin bir ya da daha fazla onkogenik HPV ile enfeksiyonu, virusun kalıcılığı, kalıcı enfekte olan epitelin serviks prekanseröz lezyonlara klonal ilerlemesi ve sonra invaziv lezyona neden olmaktadır. En önemli viral özellikler, virusun genotipi ve kalıcılık süresidir. Örnek olarak HPV 16 diğer tiplere göre daha uzun sürede elimine edilmektedir ve HPV 16'nın enfeksiyonun 5 yıllık kalıcılığı %40 CIN3 riski taşır (50). HPV 16 ve 18 ile enfekte olan kadınlar bu enfeksiyonun devam etmesi durumunda diğer HPV tiplerine göre daha fazla CIN3 ve kanser geliştirme riskine sahiptir (51).

İleri dereceli lezyonların gelişmesinde virus yükünün de çok önemli rolü olduğu üzerinde durulmaktadır. Buna göre anormal sitolojik bulguları olup da kolposkopisi negatif olan ve daha az hassas bir yöntem olan dot blot hibridizasyon ile HPV DNA saptanan olgularda ilerde % 55 oranında CIN gelişmektedir . CIN 'den invaziv serviks kanserine geçiş genelde 35-39 yaşları arasında plato yapmaktadır. Bu ilerleme genelde kofaktörlerin de etkisiyle HPV DNA 'sının konak hücre DNA 'sı içine katılmasıyla beraberdir . Preinvaziv dönemde daha az ve normal kadında hiç rastlanılmayan bu DNA katılımının tamamlanmasında çeşitli faktörlerin etkisi olabileceği üzerinde durulmaktadır (52)

MATERYAL VE METOD

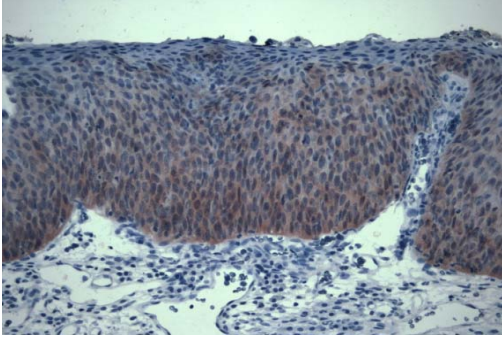
Bu çalışma İ.Ü.C.T.F. Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Jinekolojik Onkoloji Bilim Dalı'nda prospektif olarak yürütüldü. Çalışma protokolü için İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Araştırma Etik Kurulu'nun onayı alındı. Çalışmaya alınan tüm hastalara bilgi verildi . 2005-2008 tarihleri arasında kliniğimizde tanısı konulan ve tedavi edilen preinvaziv ve ya invaziv servikal lezyonu saptanan olgular çalışma grubuna alındı. Kontrol grubunu histopatolojide servikal preinvaziv lezyonu olmayan normal olgular oluşturdu. Jinekolojik Onkoloji polikliniğine anormal sitoloji sonucuyla müracat eden tüm olgularda Bethesda sitoloji sınıflama sistemi kullanıldı (53). Bethesda'ya göre ASC-US, ASC-H, LSIL, HSIL, ve AGUS anormal sitolojik bulgular olarak değerlendirildi. Anormal smear saptanan tüm olgulara kolposkopi yapıldı. Servikste transformasyon bölgesinin net görülebildiği olguların kolposkopik incelemesi yeterli olarak kabul edildi. Kolposkopik muayenesi sonucunda serviksin 2/3 'den fazlasını ilgilendiren anormal kolposkopili olgulara LEEP veya soğuk konizasyon yapıldı. Yüksek dereceli anormal kolposkopi bulgusu olan tüm anormal sitolojik olgulara da aynı biyopsi tekniği uygulandı. ASC-US, ASC-H ve HSIL gibi anormal sitolojisi olan olgularda düşük dereceli anormal kolposkopi bulgusu varsa veya anormal kolposkopi bulgusu serviksin 2/3'ünden daha az ise biyopsi tekniği olarak punch biyopsi kullanıldı. Sitoloji sonucu HSIL saptanan olgularda anormal kolposkopi bulgusu yok ise sitoloji tekrar değerlendirildi. AGUS olarak değerlendirilen olgulara LEEP eksizyon uygulandı. Servikal biyopsi yapılan olguların hemen tamamına ECC (Endoservikal kuretaj) uygulandı. LEEP ve ECC işlemleri genel anestezi , punch biyopsi ve ECC ise poliklinik şartlarında yapıldı.

Alınan tüm materyaller formol içine koyularak İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'na gönderildi. Normal servikal dokular preinvaziv lezyonlu dokular ve invaziv lezyonlu dokular parafin bloklar haline getirildi. Bu parafin bloklardan hazırlanan kesitlere belirli bir süre sırasıyla xylene, absolut alkolde ve hidrojen peroksit (Novocastra) uygulamasından sonra primer antikor (p16-zymed) uygulandı. Post primer blok ile sekonder antikor bağlamasından sonra AEC kromojeni ve substratı solusyonundan geçirilen boyanmış preparatlara mayer Hemotoksilen-Eozin ile zıt boyama uygulandı. İmmunohistokimyasal olarak p16ink4a klonal antikorları ile boyanmış incelemeye hazır preparatlar Nikon marka mikroskop altında 4, 10 ve 40'lik büyütme alanı ile incelendi ve servikal patoloji tanıları

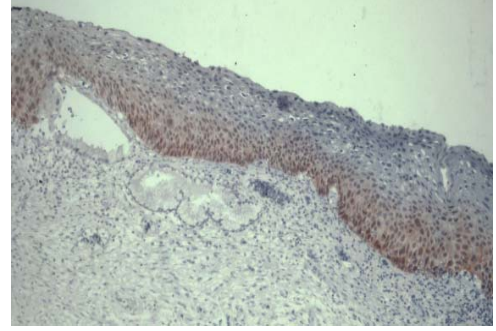
belirlendi. Boyama işleminden sonra preparatlar hasta hakkında bilgisi olmayan tek bir patalog tarafından, ışık mikroskobu altında değerlendirildi.

Doku kesitlerindeki boyanma özellikleri; P16ink4a ekspresyon dereceleri %0-%20 olanlar negatif (0); %20-30 olanlar zayıf (+1); %31-50 olanlar orta derece (+2); ve %50 ve üzerindeki lezyonlar şiddetli pozitif (+3) olarak kabul edildi (Resim 1.1-1.2-1.3). P16ink4a ekspresyonu hem sitoplazmik hem de nükleer reaktivite tutulumu gösterenler pozitif olarak değerlendirildi.

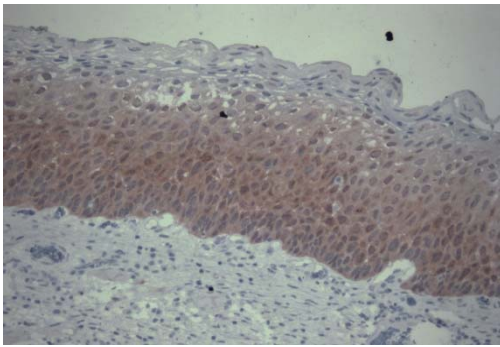
Toplam 101 olguluk bir grubun sonuçlarının değerlendirilmesi için veriler Microsoft Office Excel 2007 ve SPSS 16.01 istatistik programına kayıt edildi. İstatistiksel değerlendirmede; ortalamaları karşılaştırmak için ki kare, Fisher Exact ve kappa korelasyon testi kullanıldı. Anlamlılık değeri $p < 0,05$ olarak kabul edildi.



Resim1.1:Şiddetli pozitif p16ink4a ekspresyonu



Resim1.2: Orta derecede p16ink4a ekspresyonu



Resim 1.3: Zayıf derecede p16ink4a ekspresyonu

BULGULAR

Tablo 1 . Olguların Klinik Ve Morfolojik Özellikleri

	n:101	%	Ort.	Std.
Yaş			36.7 ± 9.4	
Sitoloji				
ASCUS	19	%19		
LSIL	27	%27		
HSIL	55	%54		
Biyopsi şekli				
Leep ve				
Soğuk konizasyon	99	%98		
Punch biyopsi	2	% 2		
Histopatoloji				
Normal	25	%25		
LSIL	30	%30		
HSIL	46	%45		

Toplam 101 olgu çalışmaya alındı. Olguların yaş ortalaması 36.68±9.4 idi. 101 olgunun 99’una leep ve ya soğuk konizasyon 2’sine punch biyopsi yapıldı. Kanser olguları çalışmaya alınmadı. Histopatolojik bulgusu servisit olarak saptanan olgular normal olarak kabul edildi.

Sitolojide ASCUS, LSIL, HSIL saptanan olguların oranları sırasıyla %19, %27, %54; histopatolojide normal, LSIL, HSIL tanıları saptanan olguların oranları sırasıyla %25, %30, %45 idi(tablo 1).

Tablo 2: Olguların Sitolojik Ve Histopatolojik Bulguları Arasındaki İlişki

		Histopatoloji		
	n: 101	Normal (n:25)	LSIL(n:30)	HSIL(n:46)
Sitoloji				
ASCUS	19	10(%53)	5 (%26)	4(%21)
LSIL	27	7(%26)	17(%63)	3 (%11)
HSIL	55	8(%14)	8 (%14)	39(%71)

Kappa : 0.071

Vajinal smear sonucu ASCUS olan 19 olgunun 4'ünde (%21) histopatolojik tanı HSIL idi. İstatiksel analizde korelasyon uyumu kappa değeri 0.071 olarak bulundu ve anlamlı olarak kabul edildi (tablo 2).

Tablo 3: Olguların Kolposkopi, Sitoloji Ve Histopatoloji Sonuçları Arasındaki İlişki

		Kolposkopi	
	n: 101	Normal (n:34)	Anormal(n:67)
Sitoloji			
ASCUS	19	11 (%58)	8(%42)
LSIL	27	13 (%48)	14(%52)
HSIL	55	10 (%18)	45(%82)
			p :0.001 ^a
Histopatoloji			
NORMAL	25	19(%76)	6(%24)
LSIL	30	7(% 23)	23(%77)
HSIL	46	8 (%17)	38(%83)
			p:0.0001 ^a

^a Ki-kare

Sitolojide ASCUS,LSIL ve HSIL saptanan olgular için anormal kolposkopi oranları sırasıyla %42, %52, %82 ; histopatolojide normal, LSIL, HSIL tanısı alan olgular için anormal kolposkopi oranları sırasıyla %24, %77, %83 olarak hesaplandı. Sitoloji ve ya histopatoloji tanıları ile kolposkopi bulguları arasındaki fark istatiksel olarak anlamlıydı (tablo 3).

Tablo 4: Kolposkopinin preinvaziv lezyonları saptamada duyarlılık, özgünlük, NBP, PBD değerleri

Kolposkopi	Duyarlılık	Özgünlük	PBD	NBD
	% 80	% 76	% 91	% 56

PBD : Pozitif belirleyici değer

NBD : Negatif belirleyici değer

Kolposkopinin preinvaziv displazilerin histopatolojik tanısındaki duyarlılık, özgünlük, PBD, NBD değerleri sırasıyla %80, %76, %91 ve %56 idi (tablo 4).

Tablo 5. Preinvaziv Lezyonlarda Kolposkopi Yeterliliğinin Cerrahi Sınır Ve ECC Sonuçları Üzerindeki Etkisi^a

		Kolposkopi	
n:75		Yeterli (n:64)	Yetersiz(n:11)
Cerrahi Sınır			
Pozitif	19	15(% 23)	4 (%36)
Negatif	56	49 (%77)	7 (%64)
		p:0.455 ^b	
ECC			
Pozitif	6	6 (%9)	0 (%0)
Negatif	69	58 (%91)	11(%100)
		p :0.583 ^b	

^a Biyopsi tekniği leep ve soğuk konizasyon olan olgular

^b Fisher –Exact test

Kolposkopisi yeterli 64 olgunun 15’inde (%23) eksizyonel cerrahi sınırı pozitif. Kolposkopisi yeterli 64 olgunun 6’sında (%9) ECC pozitifliği saptandı. Displazi saptanan olguların kolposkopi yeterliliği ve cerrahi sınır pozitifliği arasındaki fark istatistiksel analizde anlamlı değildi(tablo 5).

Tablo 6. Preinvaziv Lezyonlarda Lezyon Derecesi İle Cerrahi Sınır Ve ECC Sonuçları Arasındaki İlişki^a

		Histopatoloji	
n: 75		LSIL (n:29)	HSIL(n:46)
Cerrahi Sınır			
Pozitif	19	0 (%0)	19 (%41)
Negatif	56	29 (%100)	27 (%59)
		p :0.0001 ^b	
ECC			
Pozitif	6	0 (% 0)	6 (%13)
Negatif	69	29(%100)	40 (%87)
		p :0.076 ^b	

^a Biyopsi tekniği leep ve soğuk konizasyon olan olgular

^b Fisher-Exact test

Histopatolojide tanısı LSIL olan 29 olgunun 29'unda (%100) eksizyonel cerrahi sınırı ve ya ECC negatifti. HSIL saptanan 46 olgunun 19'unda (%41) eksizyonel cerrahi sınırı pozitif. Olguların displazik durumu ve eksizyonel cerrahi sınır pozitifliği arasındaki fark istatistiksel analizde anlamlıydı (tablo 6).

Tablo 7. Sitoloji Sonuçları İle P16ink4a Ekspresyonu Arasındaki İlişki

	p 16ink4a ekspresyonu				
	n:101	(negatif)n:35	(+) n:13	(++) n:9	(+++) n:44
Sitoloji					
ASCUS	19	10(%52)	3(%16)	3(%16)	3(%16)
LSIL	27	11(%41)	5(%18)	3(%11)	8 (%30)
HSIL	55	14(%26)	5 (%9)	3(%5)	33(%60)

P :0.011 (Fisher-Exact test)

Sitolojide tanısı ASCUS, LSIL, HSIL olguları için şiddetli p16ink4a ekspresyonu oranlarını sırasıyla %16, %30 ve %60 olarak bulduk. Sitolojik bulguların derecesi ile p16ink4a ekspresyon şiddeti arasındaki fark istatistiksel analizde anlamlıydı(tablo 7).

Tablo 8. Histopatoloji Sonuçları İle P16ink4a Ekspresyonu Arasındaki İlişki

	p 16ink4a ekspresyonu				
	n:101	(negatif) n:35	(+) n:13	(++) n:9	(+++)n:44
Histopatoloji					
NORMAL	25	25(%100)	0 (%0)	0(%0)	0 (% 0)
LSIL	30	6 (%20)	12(%40)	6(%20)	6 (%20)
HSIL	46	4 (%9)	1(%2)	3(%6)	38 (%83)

P <0.0001 (Fisher-Exact test)

Histopatolojide tanısı normal, LSIL, HSIL için şiddetli p16ink4a ekspresyonu oranlarını sırasıyla %0, %20 ve %83 olarak bulundu. Histopatolojik bulguların derecesi ile p16ink4a ekspresyon şiddeti arasındaki fark istatistiksel analizde anlamlıydı (tablo 8).

Tablo 9. Preinvaziv Lezyon İle P16ink4a Ekspresyonu Arasındaki İlişki

		p 16ink4a ekspresyonu	
	n:101	pozitif(n:66)	negatif (n:35)
Preinvaziv lezyon			
yok	25	0 (% 0)	25(%100)
var	76	66(%87)	10(%13)

P<0.0001 (Ki-kare)

Displazi saptanmayan 25 olgunun 25'inde (%100) ve displazi saptanan 76 olgunun 10 'unda (%13) p16ink4a ekspresyonu negatifti. Displazi saptanan 76 olgunun 66'sında (%87)'inde p16ink4a pozitifliği saptadık. Olguların displazik durumu ve p16ink4a ekspresyon pozitifliği arasındaki fark istatistiksel analizde anlamlıydı (tablo 9).

TARTIŞMA

Bugün HPV' nin hangi mekanizmalarla serviks epitelinde değişikler yaparak preinvaziv serviks lezyonları ve ya serviks kanseri insidansını arttırdığı ve patogenezi araştırmacıların ilgisini çekmektedir. Bu mekanizmalar üzerinde çalışmalar sürerken, HPV enfeksiyonu kalıcılığı saptanan hastalarda oluşabilecek preinvaziv ve invaziv serviks lezyonların takibi de ayrıca önem kazanmaktadır. Vajinal servikal smear slaytların patologlar arasında farklı yorumlanabilmesi serviks kanser tarama programlarının önündeki en önemli sorunlardan birisidir. Hastalar görsel inspeksiyon, kolposkopi ile takip edilmekte ve gerektiğinde kolposkopi eşliğinde şüpheli alanlardan biyopsiler için farklı teknikler kullanılmaktadır. Son yıllarda likid bazlı sitolojinin kullanımıyla HPV DNA moleküler analizi daha kolay mümkün olmuştur. Diğer tarafta HPV DNA testlerinin moleküler analizlerinin çok standardize edilmemiş olması, özgünlüğünün sitolojiye göre düşük olması ve kalite kontrol programları ile ilgili kaygılar nedeniyle bu testlerin kullanımı tartışılmaya başlanmıştır. Tüm bunlar serviks preinvaziv lezyonlarının ve serviks kanserinin saptanmasında yeni bir biyobelirteçin gerekliliğini göstermekteydi (54).

Çalışmamızda sitoloji tanı dağılımı incelendiğinde olguların %19'u ASCUS tanısı almıştı. ASCUS tanısı en tecrübeli patologlar arasında yorum farklılığına neden olabilen borderline epitelyal hücre anormallikleri olarak kabul edilmektedir (55). Bethesda 2001 yılında servikal sitoloji sınıflamasında ASCUS kategorisini ikiye ayırmıştır. Bunların birincisi ASC-US; hücrel anormalliklerde skuamöz intraepitelyal lezyon olduğu düşünülen ve kesin tanısı konulamayan olgular, ikincisi ise ASC-H; hücrel anormalliklerde HSIL 'e dönüşme ihtimali yüksek olgular için kullanılmaktadır. ASCUS saptanan olguların %5-10'unda ASC-H saptanabilmektedir (56). ABD' de yapılan sitolojik tetkik analizlerinde 55 milyon vajinal smearin %5'inde ASCUS saptanmıştır (57). ASCUS oranlarını yüksek saptamamızın nedeni daha önceden biyopsi ile histopatolojik tanısı konmuş olguların merkezimize refere edilmesidir. ASCUS olguların %21'inde histopatolojik tanı HSIL idi. Arbyn ve ark yaptığı bir metaanalizde ASCUS olguların %3-36'sında histopatolojik tanının HSIL olduğunu bildirmişlerdir (58).

Çalışmamızda histopatolojide HSIL saptanan olguların %83'ünde kolposkopi incelemesi anormaldi. Anormal smear takibinde kolposkopi eşliğinde punch biyopsi altın standart tanı yöntemi olarak kabul edilmektedir. Kolposkopinin preinvaziv displazilerin histopatolojik tanısındaki duyarlılık, özgünlük, PBD, NBD değerlerini sırasıyla %80, %76, %91, %56 olarak bulduk. Benedet ve ark. yaptığı bir çalışmada 84244 hastadaki kolposkopi ve histopatoloji bulguları arasındaki korelasyon oranını %87 olarak bildirmişlerdir (59). Bizim

çalışmamızda bu uyum % 80 idi. Kolposkopi sonuçları ile histopatolojik bulgular arasında uyumun düşük gibi görünmesinin nedeni kliniğimizin eğitim hastanesi olması ile açıklanabilir. Kolposkopinin tanılarda kullanılması ile serviks konizasyonları % 80 oranında azalmıştır (60). Serviks lezyonlarının değerlendirmesinde kolposkopi yapanlar arasında gözlemleyici değişkenliğine bağlı olarak duyarlılık ve özgünlük oranları çalışmalarda farklılık göstermektedir. Hopman ve ark. yaptığı bir çalışmada 1972 ile 1995 yılları arasındaki literatürler değerlendirilmiş ve kolposkopide histopatolojik CIN3 tanısının saptanmasındaki pozitif belirleyici değerlerinin ortalamasını %78 olarak bildirmişlerdir (61). Massad ve ark. yaptığı çalışmada kolposkopinin herhangi bir lezyonun saptanmasındaki duyarlılık oranını %89, özgünlük oranını %52 olarak bulmuşlardı (62). Javaheri ve ark. kolposkopinin histopatolojik displazi tanısında pozitif prediktif değeri % 76.5 olarak hesaplamışlardır (63).

Çalışmamızda kolposkopisi yeterli olguların %23'ünde eksizyonel cerrahi sınırı pozitif. Reich ve ark. yaptığı çalışmada CIN3 için soğuk konizasyon yapılan olguların %18'inde eksizyonel cerrahi sınır pozitifliği saptanmıştı (64). Lapaquette ve ark. yaptığı çalışmada eksizyonel cerrahi sınır pozitiflik oranını %18 iken; cerrahi sınır pozitif olgularda CIN kalıcılığını %13 olarak bildirmişlerdir (65). Felix ve ark. yaptığı 57 olguluk çalışmada 19 ECC ve ya cerrahi sınır pozitifliği saptanan olguların 12 'sinde rezidüel displazi vardı (66). Cerrahi sınır pozitif saptanan olgularda displazinin devam etmesi ve ya invaziv serviks kanseri riski yüksektir. Eksizyonel cerrahi sınır pozitifliği saptanan olgularda displazinin kalıcılığı, tekrarlama ve ilerleme göstererek invaziv serviks kanseri gibi riskleri vardır. Eksizyonel cerrahi sınır pozitifliği saptanan olgularda takip önem kazanmaktadır.

Çalışmamızda kolposkopisi yeterli 64 olgunun 6'sında (%9) ECC pozitifliği saptadık. Yapılan çalışmalarda ECC'nin yetersiz kolposkopi durumlarında preinvaziv ve invaziv serviks lezyonlarının tanısında doğruluk oranlarını artırdığı gösterilmiştir (67). ECC'nin kolposkopik tanılarda destekleyici olduğu bilinmektedir. Talebian ve ark. ECC'nin histopatolojik tanılarda ek yarar sağlamıyacağını konusunda birleşmektedir (68). Irvin ve ark. anormal servikal sitolojisi olan 298 olguluk çalışmada 19 olguda ECC pozitifliği saptamışlardır. 13 olguda kolposkopi yeterliyken 6 olguda yetersizdi. Bu çalışmada kolposkopisi yetersiz olguda ECC yapmanın tanıda ek yarar sağlamıyacağını savunmuşlardır (69). Hanjani ve ark 518 olguluk çalışmada kolposkopisi yeterli olguların %1.4'ünde ECC pozitifliği bulmuş ve ECC'nin tanıda ek yarar sağlamıyacağını göstermişlerdi (70). Urcuyo ve ark. kolposkopisi yeterli olguların %8.6 'sında ECC pozitifliği saptamışlar ve kolposkopi

sırasında ECC yapmanın tanısal oranları artırmayacağını bildirmişlerdir (71). Bu duruma zıt olarak Li ve ark. yaptığı çalışmada yetersiz kolposkopi saptanan olguların %9.1'inde ECC pozitif iken kolposkopisi negatif olup sitolojide HSIL saptanan olguların %2.5'inde ECC pozitifliği. Sitoloji HSIL ve üzeri lezyonlarda kolposkopinin yetersiz olması durumunda ECC yapılmasının gerekli olduğunu bildirmişlerdir (72). Drescher ve ark. yaptığı çalışmada kolposkopisi yeterli olguların %17.9'unda ECC pozitifliği saptamışlardır. Displazi tanı oranlarını artırdığı için anormal vajinal smeari olan tüm olgularda ECC 'nin yapılması gerekliliği konusunda birleşmektedir (73). Moniak ve ark. yaptığı çalışmada ECC bulguları LEEP ile kıyaslanmış ve ECC pozitifliği saptanan olguların %86'sında eksizyonel tanılarda displazi bildirilmiştir. Yetersiz kolposkopi durumunda sitolojik anormalliklerde kalıcılık saptanması durumunda konizasyon düşünülmelidir. Endoservikal cerrahi sınır pozitifliği saptanan olgularda da histopatolojik tanı CIN3 ise kalıcılık ve nüks riski yüksektir (74).

Çalışmamızda leep ve ya soğuk konizasyon sonrası histopatolojide HSIL saptanan olgularda eksizyonel cerrahi ve ECC pozitifliği oranını sırasıyla %41 ve %59 olarak bulduk. Costa ve ark. cerrahi sınır pozitifliğine neden olan faktörle ilgili çalışmasında histopatolojide CIN1, CIN2, CIN3 tanısı alan olgularda leep eksizyonel cerrahi pozitifliği oranlarını %3, %12, %39; ECC pozitifliğini ise %1, %7, %19 olarak bildirmişlerdir. Histopatolojik tanı derecesi cerrahi sınır pozitifliğini etkileyen en önemli faktördür (75). Saltzman ve ark. yaptığı çalışmada eksizyonel cerrahi histopatolojik tanısında CIN3 tanısı alan olguların %27.4'ünde ECC pozitif iken; CIN1-2 tanısı alan olgularda ise %10.4 olarak hesaplamışlar ve ECC'nin anormal sitoloji saptanan olgularda kolposkopi muayenesi sırasında ek inceleme olarak yapılması gerektiğini bildirmişlerdir (76).

Çalışmamızda histopatolojide tanısı normal, LSIL, HSIL için şiddetli p16ink4a ekspresyonu oranlarını sırasıyla %0, %20, %83 idi. Displazi saptanan 76 olgunun 66'sında (%87) p16ink4a ekspresyonu saptadık. Preinvaziv serviks lezyonları ve serviks kanseri öncü lezyonlarında p16ink4a ekspresyonu ile ilgili çok sayıda çalışma mevcuttur. Çalışmamızdaki bulgulara benzer olarak Klaes ve ark. CIN II-III lezyonların tümünde ve CIN 1 lezyonların % 60'ında tüm displazik epitel boyunca şiddetli p16ink4a ekspresyonu izlemişlerdir (77). Ishikawa ve ark yaptığı çalışmada CIN1, CIN2, CIN3 için şiddetli p16ink4a ekspresyonu oranlarını sırasıyla %19, %62, %71 olarak bildirmişlerdir (78). Eleuterio ve ark. histopatolojide HSIL olguların % 92.3 'ünde ve LSIL olgularının %15.4 'ünde p16ink4a pozitifliği saptamışlardır (79). Yıldız ve ark. yaptığı çalışmada tüm HSIL

olguları ve LSIL olgularının %80'inde p16ink4a pozitifliği saptamışlardır (80). Branca ve ark. yaptığı çalışmada CIN1, CIN2, CIN3 için şiddetli p16ink4a ekspresyon oranları sırasıyla %10, %24, %54 olarak hesaplamış ve şiddetli p16ink4a ekspresyonunu CIN3 ve ya serviks kanseri için risk faktörü olduğu konusunda birleşmektedir(OR=4.07)(%95 CI 2.03-8.16) (81).

P16ink4a negatif 10 olguda displazi mevcuttu. Bu 10 olgu analiz edildiğinde 6'sında histopatolojik tanının CIN1 olduğu görülmektedir. Her ne kadar yapılmış çalışmalarda daha yüksek oranlar bulunmuş olsa da bunun sebebi kullanılan değişik immunohistokimyasal antikor kitlerinin standart olmaması, farklı tekniklerde kullanılması ve gözlemleyici değişkenliğine bağlanmaktadır. Bu durum çalışmalar arasındaki bulguların kıyaslanmasını imkansız hale getirmektedir (82).

SONUÇ

Histopatolojide yüksek dereceli preinvaziv lezyon, Bethesda sınıflamasında HSIL olduğu kabul edilen anormal sitolojili olgularda % 71 oranında saptanmıştır. Çalışmamızda ASCUS olgularında %21 gibi yüksek oranda saptamamızın nedeni daha önceden biyopsi ile histopatolojik tanısı HSIL olduğu kanıtlanmış ve ya diğer anormal histolojili ASCUS olgularının kliniğimize refere edilmesidir.

Kolposkopik muayene; preinvaziv servikal lezyonlarının değerlendirilmesinde önemli bir tanı aracıdır. Çalışmamızda kolposkopik incelemelerde preinvaziv lezyonların %80'i etkoservikte görülmüştür. Kolposkopik muayenin preinvaziv lezyonları saptamada duyarlılık, özgünlük, PBD, NBD değerlerini sırasıyla %80, %76, %91, %56 olarak bulduk.

Eksizyonel tedavi sırasında, kolposkopinin yeterliliği ile cerrahi sınır ve ECC arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı. Yetersiz kolposkopili olguların %36' sında cerrahi sınır pozitif olarak bulunurken; yeterli kolposkopisi olan olgularda bu oran %23 olarak bulundu. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Çalışmamızda yüksek dereceli lezyonlarında daha yüksek oranda cerrahi sınır ve ECC pozitifliği saptandı. Eksizyonel tedavi sonrası cerrahi sınır pozitifliği LSIL olgularının hiçbirinde görülmezken, HSIL olgularının %41' inde pozitif olarak bulundu. Aradaki fark ileri derecede anlamlıydı. Aynı şekilde LSIL olgularında hiçbirinde ECC pozitifliği saptanmazken, HSIL olgularının %13'ünde ECC pozitif . Başka bir değişle endoservikte hastalık saptandı. Ancak aradaki fark sınırdan anlamlı olarak bulundu.

Servikal preinvaziv ve invaziv lezyon derecesi ile p16ink4a overekspresyonu arasında ileri derecede anlamlı bir ilişki saptandı. Buna göre histopatolojisi normal olan olguların hiçbirinde p16ink4a overekspresyonu pozitifliği saptanmazken, LSIL olgularının %20'sinde ve HSIL olgularının ise %83'ünde şiddetli p16ink4a overekspresyonu saptandı. Başka bir açıdan bakıldığında preinvaziv lezyonu olmayan olguların hiçbirinde p16ink4a overekspresyonu bulunamadı. Buna karşılık preinvaziv lezyonlu dokuların %87'sinde immunohistokimyasal p16ink4a overekspresyonu belirlendi. Bu durum preinvaziv lezyonun derecesi ile p16ink4a overekspresyonu arasında sıkı bir ilişkinin olduğunu göstermektedir. Bu bulgulardan yola çıkarak preinvaziv lezyonların tanısında immunohistokimyasal olarak p16ink4a 'nın overekspresyonunun araştırılması kullanılabilir. Bu şekilde yeni çalışmalarla

desteklenmesinin gerekliliğine rağmen, klinik uygulamalarda p16ink4a overekspresyonu gösteren preinvaziv lezyonların tedavi edilmesi, diğerlerinin ise takip edilmesi mantıklı gibi görünmektedir.

ÖZET

Giriş: CDKN2A gen ürünü olan p16ink4a, tümör baskılıyıcı protein olarak kabul edilmektedir. Bu proteininin HPV enfeksiyonu ile başlayan serviks kanseri oluşum patogeneğinde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Bu çalışmanın amacı normal ve preinvaziv serviks dokularında p16ink4a overekspresyon dereceleri araştırmak ve preinvaziv lezyon dereceleri ile arasındaki ilişkiyi irdelemektir. Böylece p16ink4a ‘nın klinik uygulanabilirliği değerlendirilecektir.

Materyal ve Metod : Bu çalışma İ.Ü.C.T.F. Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Jinekolojik Onkoloji Bilim Dalı'nda prospektif olarak yürütüldü. 2005-2008 tarihleri arasında kliniğimizde tanısı konulan ve tedavi edilen preinvaziv ve ya invaziv servikal lezyonu saptanma durumuna göre 101 olgu çalışma grubuna alındı. Kontrol grubunu histopatolojide servikal preinvaziv lezyonu olmayan normal olgular oluşturdu. Kolposkopik muayene sonucunda serviksin 2/3 ‘den fazlasını ilgilendiren anormal kolposkopi olgularına LEEP veya soğuk konizasyon tekniği uygulandı. ASCUS ve HGSIL gibi anormal sitolojisi olan olgularda düşük dereceli anormal kolposkopi bulgusu varsa veya anormal kolposkopi bulgusu serviksin 2/3’ünden daha az ise biyopsi tekniği olarak punch biyopsi kullanıldı. Doku kesitleri p16ink4a immunohistokimyasal antikor ile boyandı. Doku kesitlerindeki boyanma özellikleri; P16ink4a ekspresyon dereceleri %0-%20 olanlar negatif (0); %20-30 olanlar zayıf (+1); %31-50 olanlar orta derece (+2); ve %50’ nin (+3) ve üzeri lezyonlar şiddetli pozitif olarak kabul edildi. P16ink4a ekspresyonu hem sitoplazmik hem de nükleer reaktivite tutulumu gösterenler pozitif olarak değerlendirildi.

Bulgular: Toplam 101 olgu çalışmaya alındı. Olguların yaş ortalaması 36.68 ± 9.4 idi. Sitolojide ASCUS, LSIL, HSIL saptanan olguların oranları sırasıyla %19, %27, %54; histopatolojide normal, LSIL, HSIL tanıları saptanan olguların oranları sırasıyla %25, %30, %45 idi. Vajinal smear sonucu ASCUS olan 19 olgunun 4’ünde (%21) histopatolojik tanı HSIL idi. Olguların sitolojik ve histopatolojik bulguları arasındaki ilişkinin istatistiksel analizinde korelasyon oranı %80 ve kappa değeri 0.071 olarak bulundu. Kolposkopinin preinvaziv displazilerin histopatolojik tanısındaki duyarlılık, özgünlük, PBD, NBD değerleri sırasıyla %80, %76, %91 ve %56 idi. Histopatolojide tanısı normal, LSIL, HSIL için şiddetli p16ink4a ekspresyonu oranlarını sırasıyla %0, %20, %83 olarak bulundu. Histopatolojik bulguların derecesi ile p16ink4a ekspresyon şiddeti arasındaki fark istatistiksel analizde anlamlıydı.

Sonuç: P16ink4a boyanması tüm yüksek dereceli servikal lezyonlarda görülüyor olması p16ink4a düzeyinin yüksek riskli HPV enfeksiyonu ile ilişkili olduğu hipotezini desteklemektedir. Displazik servikal lezyonlarla, p16ink4a boyanma derecesi arasında bir ilişki olduğu görülmektedir. P16ink4a ekspresyonu'nun preinvaziv ve invaziv servikal displazilerin morfolojik tanısında destekleyici ve prognostik önemi olan bir parametre olduğu kabul edilmelidir.

ABSTRACT

Introduction: CDKN2A gene product p16ink4a is a tumor suppressor protein that directly implicate aberrant cell cycle regulation in tumorigenesis. The aim of this study was to analyze p16ink4a expression in cervical preneoplastic and neoplastic lesions. We also investigated the relation between p16ink4a expression and preinvasive lesion grade.

Materials and Methods: 101 patients who were admitted to Cerrahpasa Medical Faculty Obstetric and Gynecology Department, Division of Gynecologic Oncology Outpatient Clinic with a history of preinvasive cervical lesions were entered. Specimens from 101 biopsies, which represented CIN1-3 lesions, obtained between 2005 and 2008, were collected from the Cerrahpasa Medical Faculty, Department of Pathology.

Biopsy samples were collected from an archive of formalin fixed, paraffin-embedded cervical tissues of a large histopathological diagnostic routine service laboratory. From all samples hematoxylin and eosin (H&E)-stained sections were reviewed by one pathologist. The biopsies were grouped according to morphological diagnosis. The immune staining was evaluated independently by one observer and was considered positive for p16INK4a when the nuclei were clearly positive. Scoring of immunohistochemistry results were performed on the basis of both the staining intensity and the percentage of immunoreactive epithelial cells. The scoring criteria for p16INK4a, as shown in percentages (%): - (negative): (no expression); <20: weak staining ±; 20–30, weak or moderate staining +; 31–50 moderate or strong staining ++; >50 strong staining +++. The scores +, ++ and +++ were considered positive sample for p16INK4a. The study was approved by the Local Ethics Committee of Cerrahpasa Medical Faculty, İstanbul, Turkey.

Results: In 101 cases the material sufficed for immunological analysis of the p16INK4a antigen. In this study, we investigated in parallel, p16 expression and preinvasive cervical lesions 101 cervical biopsies (25 normal tissues, 30 LSIL, 46 HSIL). Results obtained demonstrated that none of the 25 normal cervical tissues, evaluated by immunohistochemistry, presented p16 positivity whereas, starting from LSIL to HSIL a constant and significant increase of protein overexpression was observed. Strong staining reactivity to this antigen could only be demonstrated in % 20 of LSIL and in (%80) of HSIL cases. The level of reactivity correlated with CIN grade. In our study, a statistically significant association was observed between cervical lesion grade and p16INK4a expression ($P < 0.001$). The kappa value for the strength of the correlation was 0.071 and concordance between them was % 80.

In addition, colposcopy consistently showed sensitivity (% 80) and specificity (% 76) in detecting preneoplastic lesions with a high positive predictive value (%91) and negative predictive value (% 56).

Conclusion: Our findings confirmed that p16 overexpression is associated to high-grade precancerous lesions. the demonstration of p16INK4a accumulation in the cell nucleus is one simple way of emphasising the presence of dysplastic cells and this staining can be applied to cytological samples. Dysplastic cells could also be identified in cervical smears using a specific p16INK4a monoclonal antibody. These data demonstrate that p16INK4a is a specific biomarker to identify dysplastic cervical epithelia in sections of cervical biopsy samples or cervical smears. We concluded that p16INK4a expression could be a marker for dysplastic and neoplastic cervical cells.

KISALTMALAR

- AIS:** Adenokarsinoma in situ
AGH: Atipik Granüler Hücreler
AGUS: Atypical Glandular Cells of Undetermined Significance (Önemi belirlenemeyen anormal glanduler hücreler)
ASCUS: Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance (Önemi belirlenemeyen atipik skuamöz hücreler)
ASC-H: Atypical Squamous Cells-can not exclude HSIL (yüksek dereceli lezyonun dışlanamadığı anormal yassı epitel hücreleri)
ACOG: American College of Obstetricians and Gynecologists
ACS: American Cancer Society
AIDS: Acquired Immun Deficiency Syndrome
CIN: Cervical Intraepitelial Neoplasm
CIS: Carcinoma In Situ
DNA: Deoxiribo Nükleik Asit
DES: Dietilstilbestrol
E1-E2-E3-E4-E5-E6-E7: Erken viral kapsid proteinleri
ECC: Endoservikal kurtaj
FIGO: International Federation of Gynecology and Obstetrics
HPV: Human Papilloma Virus
HSIL: High-grade Squamous Intraepitelial Lesions (yüksek dereceli yassı epitel lezyonları)
HSV: Herpes Simplex Viruses
HIV: Human Immun Deficiency Virus
L1-L2: Geç viral kapsid proteinleri
LCR: Transkripsiyon regülatör sekansları ve replikasyon başlangıcını içeren uzun kontrol bölümü içeren dizin
LEEP: Loop Electrosurgical Excision Procedure
LSIL: Low-grade Squamous Intraepitelial Lesions (düşük dereceli yassı epitel lezyonları)
NCI: National Cancer Institute (Ulusal Kansere Enstitüsü)
PAP: Papanicolaou
PCR: Polymerase Zincir Reaksiyonu
ORF: Açık zincir dizini
SEER: The Surveillance, Epidemiology, and End Results
SCJ: Squamo Columnar Junction
WHO: World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü)

KAYNAKLAR

-
- 1-Pisani P, Bray F, Parkin DM. Estimates of the world-wide prevalence of cancer for 25 sites in the adult population. *Int J Cancer* 2002;97:72–81.
 - 2-American Cancer Society, *Cancer Facts & Figures* 2002.
 - 3-Papanicolaou GN. *Science* 1942;95:438 –9.
 - 4-Devesa SS. Descriptive epidemiology of cancer of the uterine cervix. *Obstet Gynecol* 1984;63:605–612
 - 5-Ries LAG, Eisner MP, Kosary CL, Hankey BF, Miller BA, Clegg L, Mariotto A, Fay MP, Feuer EJ, Edwards BK. editors. *SEER cancer statistics review, 1975 – 2000*. 2003 . Available at: http://seer.cancer.gov/csr/1975_2000
 - 6-Kenter GG, Schoonderwald EM, Koelma IA, Arentz N, Hermans J, Fleuren GJ. The cytological screening history of 469 patients with squamous cell carcinoma of the cervix uteri; does interval carcinoma exist? *Acta Obstet Gynecol Scand* 1996 ; 75 : 400 – 3.
 - 7-Warren Winkelstein and Steve Selvin cervical cancer in young americans ,*The Lancet*, Volume 333, Issue 8651, 17 June 1989, Page 1385
 - 8-Koss LG. The Papanicolaou test for cervical cancer detection: a triumph and a tragedy. *JAMA*. 1989;261:737-743.
 - 9-Sasieni PD, Cuzick J, Lynch-Framery E. Estimating the efficacy of screening by auditing smear histories of women with and without cervical cancer. *Br J Cancer*. 1996;73:1001-1005.
 - 10-Sherman ME. Chapter 11: future directions in cervical pathology. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2003 ; 31 : 72 – 9.
 - 11-Clavel C, Masure M, Bory JP, Putaud I, Mangeonjean C, Lorenzato M, Nazeyrollas P, Gabriel R, Quereux C, Birembaut P. Human papillomavirus testing in primary screening for the detection of high-grade cervical lesions: a study of 7932 women. *Br J Cancer*. 2001 Jun 15;84(12):1616-23
 - 12-Parkin DM: The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *Int J Cancer* 118:3030-3044, 2006
 - 13-Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2006. *CA Cancer J Clin* 2006;56:106–130.

14-Zur hausen H. Papillomavirus infections-a major cause of human cancers. *Biochem Biophys Acta* 1996 ; 1288 :F55-788

15-Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer. *J Pathol* 1999;189(1):1-3.

16 Stanley MA: Virus-keratinocyte interactions in the infectious cycle, Stern PL, Stanley MA (eds): *Human Papillomaviruses and Cervical Cancer* s.116-31, Oxford University Press, Oxford (1994).

17-Liu JS, Kuo SR , Broker TR , Chow LT. The functions of human papillomavirus type 11 E1 ,E2 and E2c proteins in cell-free DNA replication . *J. Biol. Chem* 1995 ; 270 :27283-91

18-Doorbar J. ,Ely S. Sterling J. ,Mclean C., Crawford L. Spesifik interaction between HPV16 E1-E4 and cytokeratin results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature* 1991 ; 352: 824-7

19-Galloway DA. McDougall JK.The disruption of cell cycle checkpoints by papillomavirus oncoproteins contributes to anogenital neoplasia. *Semin cancer Biol* 1996 ; 7: 309 -15

20-Burd Eileen M. , *Human Papillomavirus and Cervical Cancer* , clinical microbiology reviews, Jan. 2003, p. 1-17, DOI: 10.1128/CMR.16.1.1-17., 2003

21 - Zur Hausen H: Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application, *Nat Rev Cancer* 2002;2(5):342-50.

22-Lorincz AT, Reid R, Jenson AB, Greenberg MD, Lancaster W, Kurman RJ, Human papillomavirus infection of the cervix: relative risk associations of 15 common anogenital types., *Mar*;79(3):328-37, *Obstet Gynecol.* 1992

23 -Harro, C. D., Y.-Y. S. Pang, R. B. S. Roden, A. Hildesheim, Z. Wang, M. J. Reynolds, T. C. Mast, R. Robinson, B. R. Murphy, R. A. Karron, J. Dillner, J. T. Schiller, and D. R. Lowy. 2001. Safety and immunogenicity trial in adult volunteers of a human papillomavirus 16 L1 virus-like particle vaccine. *J. Natl. Cancer Inst.* 93:284-292.

24-Woodman CB, Collins S, Winter H, Bailey A, Ellis J, Prior P, et al. Natural history of cervical human papillomavirus infection in young women: a longitudinal cohort study. *Lancet* 2001;357(9271):1816.

25-Melkert PW, Hopman E, van den Brule AJ, et al: Prevalence of HPV in cytomorphologically normal cervical smears, as determined by the polymerase chain reaction, is age-dependent. *Int J Cancer* 53:919-923, 1993

-
- 26-Moscicki AB, Shiboski S, Broering J, et al. The natural history of human papillomavirus infection as measured by repeated DNA testing in adolescent and young women. *J Pediatr* 1998;132:277–284
- 27-Bosch FX, Lorincz A, Munoz N, Meijer CJ, Shah KV. 2002. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol* 55: 244-265
- 28-Myers ER, McCrory DC, Nanda K, et al. Mathematical model for the natural history of human papillomavirus infection and cervical carcinogenesis. *Am J Epidemiol* 2000;151:1158–1171.
- 29-B. Prokopczyk, J.E. Cox, D. Hoffmann and S.E. Waggoner, Identification of tobacco-specific carcinogen in the cervical mucus of smokers and nonsmokers, *J. Natl. Cancer Inst.* 89 (1997), pp. 868–873
- 30-Coppleson M, Reid B. The etiology of squamous carcinoma of the cervix. *Obstet. Gynecol* 1968; 32 :432-6.
- 31-Münger K, Basile JR, Duensing S, Eichten A, Gonzalez SL, Grace M, Zacny VL. Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein. *Oncogene*. 2001 Nov 26;20(54):7888-98
- 32-Ferenczy A, Mitao M, Nagai N, Silverstein SJ, Crum CP. , Latent papillomavirus and recurring genital warts., *N Engl J Med*. 1985 Sep 26;313(13):784-8.
- 33-Matsukura T, Koi S, Sugase M , Both episomal and integrated forms of human papillomavirus type 16 are involved in invasive cervical cancers *Virology*. 1989 Sep;172(1):63-72.
- 34-Münger K, Howley PM. , Human papillomavirus immortalization and transformation functions *Virus Res*. 2002 Nov;89(2):213-28.
- 35-Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cellcycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 1993;366:704–7.
- 36 -DysonN, HowleyPM, MungerK, HarlowE: The human papillom virus 16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma product. *Science* 1989;243:934
- 37-Klaes R, Friedrich T, Spitkovsky D et al. Overexpression of p16(INK4A) as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int J Cancer* 2001;92:276–84

38-Fujii T, Tsukazaki K, Kiguchi K et al. The major E6/E7 transcript of HPV-16 in exfoliated cells from cervical neoplasia patients. *Gynecol Oncol* 1995;58:210–5.

39 -Zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2002;2:342–50.

40-Schwarz, E., Freese, U. K., Gissmann, L., Mayer, W., Roggenbuck, B., Stremlau, A. & zur Hausen, H. *Nature (London)* (1985) ,314, 111-114.

41-Painter, R. B. & Young, B. R. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 7315-7317. 22
Kuerbitz, S., Plunkett, B., Walsh, W. & Kastan, M. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 7491-7495

42-Kuerbitz, S., Plunkett, B., Walsh, W. & Kastan, M. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 7491-7495

43-Fujita, M., Inoue, M., Tanizawa, O., Iwamoto, S. & Enomoto, T. (1992) *Cancer Res.* 52, 5323-5328

44-Werness, B. A., Levine, A. J. & Howley, P. M. (1990) *Science* 248, 76-79.

45-Yin, Y., Tainsky, M., Bischoff, F., Strong, L. & Wahl, G. (1992) *Cell* 70, 937-948.

46-Sherr CJ. Principles of tumor suppression. *Cell.* 2004 ; 116(2) :235-46

47-Dray M, Russell P, Dalrymple C, Wallman N, Angus G, Leong A, Carter J, Cheerla B. p16(INK4a) as a complementary marker of high-grade intraepithelial lesions of the uterine cervix. I: Experience with squamous lesions in 189 consecutive cervical biopsies. *Pathology.* 2005 Apr;37(2):112-24.

48- Moscicki AB, Ellenberg JH, Farhat S, Xu J. Persistence of human papillomavirus infection in HIV infected and uninfected girls : risk factors and differences, by phylogenetic type. *J Infect Dis* 2004 ; 190: 37-45

49-M. Arbyn, E. Paraskevaidis, P. Martin-Hirsch, W. Prendiville and J. Dillner, Clinical utility of HPV–DNA detection: Triage of minor cervical lesions, follow-up of women treated for high-grade CIN: An update of pooled evidence *Gynecologic Oncology*, Volume 99, Issue 3, Supplement 1, December 2005

50-Mark Schiffman, Rolando Herrero, Rob DeSalle, Allan Hildesheim, Sholom Wacholder, Ana Cecilia Rodriguez, Maria C. Bratti, Mark E. Sherman, Jorge Morales, Diego Guillen, Mario Alfaro, Martha Hutchinson, Thomas C. Wright, Diane Solomon, Zigu Chen, John

Schussler, Philip E. Castle and Robert D. Burk , The carcinogenicity of human papillomavirus types reflects viral evolution , *Virology*, Volume 337, Issue 1, 20 June 2005, Pages 76-84

51-Castle PE, Solomon D, Schiffman M, Wheeler CM. , Human papillomavirus type 16 infections and 2-year absolute risk of cervical precancer in women with equivocal or mild cytologic abnormalities., *J Natl Cancer Inst.* 2005 Jul 20;97(14):1066-71.

52-Nuovo GJ, Moritz J, Walsh LL, MacConnell P, Koulos J., Predictive value of human papillomavirus DNA detection by filter hybridization and polymerase chain reaction in women with negative results of colposcopic examination., *Am J Clin Pathol.* 1992 Nov;98(5):489-92.

53-National Cancer Institute. The 1988 Bethesda system for reporting cervical/vaginal cytological diagnoses. *JAMA.* 1989;262:931-934

54-Klaes R, Benner A, Friedrich T, et al. Immunohistochemistry improves interobserver agreement in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Surg Pathol* 2002;26:1389–1399.

55-Stoler MH, Schiffman M, Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance-Low-grade Squamous Intraepithelial Lesion Triage Study (ALTS) Group. Interobserver reproducibility of cervical cytologic and histologic interpretations: realistic estimates from the ASCUS-LSIL Triage Study. *JAMA* 2001;285:1500–5.

56-Solomon D, Davey D, Kurman R, et al. The Bethesda System 2001: terminology for reporting the results of cervical cytology. *JAMA.* 2002;287:2114-2119.

57-ASCUS-LSIL Triage Study (ALTS) Group. Results of a randomized trial on the management of cytology interpretations of atypical squamous cells of undetermined significance. *Am J Obstet Gynecol* 2003;188:1383–92

58-Marc Arbyn, Frank Buntinx, Marc Van Ranst, Evangelos Paraskevaïdis, Pierre Martin-Hirsch, Joakim Dillner Virologic Versus Cytologic Triage of Women With Equivocal Pap Smears: A Meta-analysis of the Accuracy To Detect High-Grade Intraepithelial Neoplasia, *Journal of the National Cancer Institute*, Vol. 96, No. 4

59-Benedet JL, Matisic JP, Bertrand MA. An analysis of 84244 patients from the British Columbia cytology-colposcopy program. *Gynecol Oncol* 2004; 92(1):127–34.

60-Dolan TE, Boyce J, Rosen Y et al. Cytology, colposcopy, and directed biopsy: what are the limitations? *Gynecol Oncol* 1997;3:314.

61-Hopman EH, Kenemans P, Helmerhorst TJ. Positive predictive rate of colposcopic examination of the cervix uteri: an overview of literature. *Obstet Gynecol Surv* 1998;53(2):97–106.

62-Massad LS, Collins YC. Strength of correlations between colposcopic impression and biopsy histology. *Gynecol Oncol* 2003;89(3):424–8.

63-Javaheiri G.,Fejgin MD: Diagnostic value of colposcopy in the investigation of cervical neoplasia . *Am. J Obs. Gyn* 1980;137:588-594

64-Reich O, Lahousen M, Pickel H, Tamussino K, Winter R. Cervical intraepithelial neoplasia III: long-term follow-up after cold-knife conization with involved margins. *Obstet Gynecol* 2002;99(2):193–6.

65-Lapaquette TK, Dinh TV, Hannigan EV, Doherty MG, Yandell RB, Buchanan VS. Management of patients with positive margins after cervical conization. *Obstet Gynecol* 1993;82(3):440–3.

66-Felix C. Juan , The significance of positive margins in loop electrosurgical cone biopsies: 1994: *The American college of obstet. Gynecol.* vol 84 -996-999

67-Matseoane S, Williams SB, Navarro C et al. Diagnostic value of conization of the uterine cervix in the management of cervical neoplasia: A review of 756 consecutive patients. *Gynecol Oncol* 1992;47:287.

68-Talebian F.,colposcopic evaluation of patients with abnormal cervical cytology .*Obstet Gynecol* 1977;49:670-675

69-Irvin W. , Flora Stefanie, Endocervical curettage ,the journal of reproductive medicine 2004; 49:1-7

70-Hanjani P.,Endocervical curettage :Does it contribute to the management of patients with abnormal cervical cytology?*Gyn. Obs.* 1986;25:204-211

71-Urcuyo R. Some observations on the value of endocervical performed as an integral part of colposcopic evaluation of patients with abnormal cervical cytology .*Am J Obstet Gynecol* 1977;128:787-792

72-Liu Za Zhi, *Zhonghua Zhong*,2004 ;26(7):406-8

73-Dresher CW, Peters WA, Roberts JA. Contribution of endocervical curettage in evaluating abnormal cervical cytology .Obst. Gyn. 1983; 62:343.

74-Charles W. Moniak , ,Susan Kutzner ,Endocervical Curettage in evaluating abnormal cytology the journal of reproductive medicine 2000, volume 45; No. 4 ;285-292

75-Costa S, De Nuzzo M, Terzano P, Santini D, De Simone P, Bovicelli A, et al. Factors associated with cone margin involvement in CIN patients undergoing conization equivalent electrosurgical procedure. Acta Obstet Gynecol Scand 2000;79(7): 586–92.

76-Daniel H. Saltzman , Mark Evans, Endocervical curettage as a part of colposcopic examinations for abnormal cervical cytology . The journal of reproductive medicine ; 871-873.

77-Klaes R, Friedrich T, Spitkowsky D, Ridder R, Rudy W, Petry U, Dallenbach-Hellweg G, Schmidt D, von Knebel Doeberitz M (2001) Overexpression of p16INK4a as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. Int J Cancer 92:276–284

78-Ishikawa, M., Fuji, T., Saito, M., et al., 2006. Overexpression of p16INK4a as an indicator for human papillomavirus oncogenic activity in cervical squamous neoplasia. Int. J. Gynecol. Cancer 16, 347-353.

79-Eleutério, J.Jr., Giraldo, P.C., Gonçalves, A.K., Cavalcante, D.I.M., et al., 2007. Prognostic markers of highgrade squamous intraepithelial lesions: the role of p16INK4a and high-risk human papillomavirus. Acta Obstet. Gynecol. 86, 94-98.

80-Yildiz, I.Z., Usubütün, A., Firat, P., Ayhan, A., Küçükali, T., 2007. Efficacy of immunohistochemical p16 expression and HPV typing in cervical squamous intraepithelial lesion grading and review of the p16 literature. Pathol. Res. Pract. 203, 445-449.

81-Branca, M., Ciotti, M., Santini, D., et al., 2004. P16INK4a expression is related to grade of CIN and high-risk human papillomavirus but does not predict virus clearance after conization or disease outcome. Int. J. Gynecol. Pathol. 23, 354-365.

82-Agoff N, Lin P, Morihara J, et al. p16INK4a expression correlates with degree of cervical neoplasia: a comparison with Ki-67 expression and detection of high risk HPV types. Mod Pathol 2003;16:665–673