

Bölgemizdeki Servikal İntraepitelyal Neoplazi Vakalarında HPV 16 ve 18 Genomlarının PCR Yöntemi İle Araştırılması

INVESTIGATION OF HPV 16 AND HPV 18 GENOMES IN CERVICAL INTRA-EPITHELIAL NEOPLASIA CASES IN OUR REGION BY PCR METHOD

Ekrem SAPMAZ*, Mehmet ŞİMŞEK*, Hüsnu ÇELİK*, Selahattin KUMRU*, Mehmet Z. DOYMAZ**

*Yrd.Doç.Dr., Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum AD,

*

Özet

Amaç: Servikal intraepitelyal neoplazi tanısı konulan hastaların serviks biopsilerinde PCR yöntemi ile HPV 16 ve 18 suşlarının ve bölgemizde hangisinin daha fazla servikal intraepitelyal neoplazi etkeni olduğunun araştırılması.

Çalışmanın Yapıldığı Yer: Fırat üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum ABD, Devlet Hastanesi Kadın Doğum Bölümü, Elazığ.

Materyal ve Metod: Aralık 1997-Ekim 2001 tarihleri arasında Fırat üniversitesi tıp fakültesi araştırma hastanesi ve Elazığ devlet hastanesi kadın doğum bölümüne başvuran hastalardan servikal smear sonucu class 3 gelen hastalara kolposkopiye takiben şüpheli alanlardan biopsi alındı. Servikal biopsi örneklerinde histopatolojik olarak servikal intraepitelyal neoplazi tanısı konulan vakalardan 40 vaka ile (G1= Servikal intraepitelyal neoplazi=Çalışma), total abdominal histerektomi materyallerinde normal servikal bulgu tanısı konulan 40 vaka (G2=Normal serviks=Kontrol) prospektif çalışma programına alındı. Vakaların parafin bloğa gömülü serviks biopsi doku örneklerinden 5-10 µm kalınlığında 80 parafin blok örneği alındı. Bu örneklerde PCR yöntemi kullanılarak HPV 16 ve 18 suşlarının genomları araştırıldı. Nominal veriler için χ^2 , ordinal veriler için Mann Whitney U testi kullanıldı. $p < 0.05$ anlamlı kabul edildi. HPV 16 ve 18 genomları için Relatif risk (RR; %95 CI) hesaplandı.

Bulgular: Servikal intraepitelyal neoplazi vakalarında HPV 16 genomu 13 vakada (%33), HPV 18 genomu ise 2 vakada (%5), kontrol grubunda ise HPV 16 genomu 2 vakada (%5), HPV 18 genomu 1 vakada (%2.5) saptandı. HPV 16 genomu anlamlı olarak servikal intraepitelyal neoplazi grubunda yüksek ($p=0.003$, χ^2 test), $RR=6.5$, (%95 CI=1.5-30) bulundu. HPV 18 genomu ise benzer ($p>0.05$, Fisher exact test), $RR=2$, (%95 CI=0.2-21) bulundu.

Sonuç: Bölgemizdeki servikal intraepitelyal neoplazi vakalarında HPV16 suşu 6.5 kat daha fazla etkin rol oynamaktadır.

Anahtar Kelimeler: HPV 16, HPV 18, PCR, Servikal intraepitelyal neoplazi

T Klin Jinekoloj Obst 2003, 13:58-61

Summary

Objective: To investigate HPV 16 and HPV 18 suşes in the cervical biopsies of patients diagnosed as cervical intra-epithelial neoplasia by using PCR method and to find out which of the two is a more frequent agent of cervical intra-epithelial neoplasia in our region.

Instution: Fırat University, School of Medicine, Obstetrics and Gynecology Department, State Hospital's Obstetrics Department, Elazığ.

Material and Method: Of the patients who were admitted to the Fırat University School of Medicine research hospital and Elazığ State Hospital's Obstetrics department between December 1997 and October 2001, those who were class 3 according to cervical smear were examined by colposcope and after that, biopsies were taken from suspected sites. 40 cases who were diagnosed as cervical intra-epithelial neoplasia after the histopathologic investigation of cervical biopsy samples (G1= cervical intra-epithelial neoplasia = study group) and 40 cases who were diagnosed as having normal cervical findings in their total abdominal hysterectomy materials (G2= normal cervix = control group) were included in a prospective study program. 80 paraffin block samples of 5-10 µm. thickness were taken from the cases' cervix biopsy tissue samples embedded in paraffin block. The genomes of HPV 16 and HPV 18 suşes were investigated by using PCR method in these samples. χ^2 was used for nominal data and Mann Whitney U Test for ordinal data. $P < 0.05$ was regarded significant. Relative risk for HPV 16 and HPV 18 genomes were calculated (RR; 95% CI).

Results: In the cervical intra-epithelial neoplasia cases, HPV genome was found in 13 cases (33%) and HPV 18 genome in 2 cases (5%), while in the control group HPV 16 genome was identified in 2 cases (5%) and HPV 18 in 1 case (2.5%). HPV 16 genome was found to be significantly higher in cervical intra-epithelial neoplasia cases ($p = 0.003$, χ^2 test) and RR was found equal to 6.5 (95% CI = 1.5-30). HPV 18 genome was found similar and RR was equal to 2 (95% CI = 0.2-21).

Conclusion: HPV 16 genome plays a 6.5 times more effective role in cervical intra-epithelial neoplasia cases in our region.

Key Words: HPV 16, HPV 18, PCR, Cervical intra-epithelial neoplasia

T Klin J Gynecol Obst 2003, 13:58-61

Serviksteki intraepitelyal neoplazi (CIN) ve kanser gelişiminde cinsel yolla bulaşan ve kondiloma aküminatam

etkeni olan human papilloma virüs (HPV)'ün bir onkojenik ajan olduğu saptanmıştır (1-3).

HPV6 ve 11 suşu düşük riskli suşlar olup, koilositoz gibi tipik viral değişikliklerle giden kondilomlarda sık bulunurken, epitelyal atipi gösteren lezyonlarda ise (CIN veya serviks kanseri) HPV16,18 ve 31 suşları daha sık bulunur (4).

Yapılan deneysel çalışmalarda HPV 16 ve 18 DNA'larının kemirici hücrelerinde in vitro koşullarda transformasyona yol açtığı, onları immortalize (in vitro şartlarda sürekli yaşayabilmek) ettiği ve ortama Ha-ras onkogenide eklendiğinde bu hücrelerde malign transformasyona yol açtıkları tespit edilmiştir (5-7).

HPV tanısında bir çok yöntem vardır. Bunlar mikroskopik, nükleik asit hibridizasyon teknikleri ve polimeraz zincir reaksiyon (PCR) yöntemleridir (8-11). PCR en duyarlı yöntem olup bir milyon hücre içinde dahi bir HPV DNA molekülünü tespit eder (11).

Amaç: Servikal intraepitelyal neoplazi tanısı konulan hastaların serviks biopsilerinde PCR yöntemi ile HPV 16 ve 18 suşlarının ve bölgemizde hangisinin daha fazla servikal intraepitelyal neoplazi etkeni olduğunun araştırılması.

Materyal ve Metod

Aralık 1997-Ekim 2001 tarihleri arasında Fırat üniversitesi tıp fakültesi araştırma hastanesi ve Elazığ devlet hastanesi kadın doğum bölümüne başvuran hastalardan servikal smear sonucu class 3 gelen hastalara kolposkopiye takiben şüpheli alanlardan biopsi alındı. Servikal biopsi örneklerinde histopatolojik olarak servikal intraepitelyal neoplazi tanısı konulan vakalardan, 40 vaka ile (G1= Servikal intraepitelyal neoplazi=Çalışma), total abdominal histerektomi materyallerinde normal servikal bulgu tanısı konulan 40 vaka (G2=Normal serviks=Kontrol) prospektif çalışma programına alındı. Vakaların parafin bloğa gömülü serviks biopsi doku örneklerinden 5-10 µm kalınlığında 80 parafin blok örneği alındı. Bu örneklerde PCR yöntemi kullanılarak HPV 16 ve 18 suşlarının genomları araştırıldı. Bu genomların varlığı için nominal data (var=1p, yok=0p) oluşturuldu. Ayrıca tüm hastaların yaş (yıl), gebelik sayısı (adet), düşük sayısı (adet), yaşayan sayısı (adet) araştırıldı.

Nominal veriler için χ^2 , ordinal veriler için Mann Whitney U testi kullanıldı. $p < 0.05$ anlamlı kabul edildi. HPV 16 ve 18 genomları için Relatif risk (RR; %95 CI) hesaplandı.

Verilerin istatistiksel analizi SPSS 9.0 programında yapıldı.

Bulgular

Hastaların sosyo-demografik verileri benzer olup Tablo 1'de gösterildi.

Kırk adet servikal intraepitelyal neoplazi vakasının 15'i CIN I, 13'ü CIN II, 12'si ise CIN III idi. CIN I vakala-

Tablo 1. Servikal intraepitelyal neoplazi ve normal serviks özelliklerine sahip vakaların sosyodemografik verileri. Değerler ortalaması ± SD olarak belirtildi.

Parametre	G1	G2	p
Yaş (yıl)	50±4	50±5	AD
Gravida (adet)	5.8±1.4	5.9±1.5	AD
Parite (adet)	4.7±1.4	5±1.5	AD
Yaşayan (adet)	4±1.2	4±1.3	AD
Abortus (adet)	1±0.9	0.9±0.8	AD

AD (Anlamlı değil)= $p > 0.05$, Mann Whitney U testi.

Tablo 2. Vakaların ayrıntılı dökümantasyonu. Değerler n, (%) olarak gösterildi.

Grup	HPV16	HPV18	HPV16+HPV18
G1 (n=40) (*)	13 (33)	2 (5)	1 (2.5)
CINI (n=15)	2 (13)	1 (2.5)	
CINII (n=13)	5 (38)		
CINIII (n=12)	6 (50)	1 (2.5)	1 (2.5)
G2 (n=40) (**)	2 (5)	1 (2.5)	0 (0)
P değeri (***)	0.003, χ^2 test	>0.05, Fischer exact test	>0.05, Fischer exact test
RR (%95 CI)	6.5 (1.5-30)	2 (0.2-21)	0 (0.9-1)

rının 2'sinde, CIN II vakalarının 5'inde, CIN III vakalarının ise 6'sında, toplam 13 vakada (%33) HPV 16 genomu tespit edildi.

HPV 18 genomu ise CIN I vakalarının 1'inde ve CIN III vakalarının 1'inde, toplam 2 vakada (%5) bulundu. Kontrol grubunda ise HPV 16 genomu 2 vakada (%5), HPV 18 genomu 1 vakada (%2.5) oranında saptandı. HPV 16 genomu anlamlı olarak servikal intraepitelyal neoplazi grubunda yüksek ($p = 0.003$, χ^2 test), RR=6.5, (%95 CI=1.5-30) bulundu. HPV 18 genomu ise benzer ($p > 0.05$, Fisher exact test), RR=2, (%95 CI=0.2-21) bulundu. Sadece CIN III'deki bir vakada hem HPV16, hemde 18 genomu tespit edildi.

Vakaların ayrıntılı dökümantasyonu Tablo 2'de gösterildi.

Tartışma

Bölgemizdeki CIN vakalarında HPV 16 suşu önemli bir rol oynamaktadır. CIN tanısı konulan hastalarda, normal serviks bulguları olan hastalara göre, HPV 16 suşu ile enfeksiyon geçirme riski 6.5 kat fazladır.

HPV varlığını saptamada gerçeğe en yakın sonuçlar PCR yöntemi ile alınır. PCR az miktarda virüs varlığında dahi (hatta teorik olarak klinik örnekte tek kopya gen varlığı yeterlidir) hızlı ve özgül olarak tanı imkanı sağlar. Bu

nedenle diğer tekniklere göre yetersiz miktar ve kalitede DNA varlığında özellikle yararlıdır (11). Bu nedenle biz PCR yöntemini kullandık.

Syrjanen ve ark. normal servikal doku örneklerinde (servikal sürüntü, lavaj veya biopsi) HPV 16 ve 18 prevalansını %5-21 arasında bulmuştur (12). Lorincz ve ark. 2627 vaka incelemiş ve normal serviks hücrelerinde %6.4 oranında HPV DNA pozitifliği saptamıştır. Bunların yarısından fazlasında HPV 16 ve 18 suşları tespit edilmiştir (13).

Bizim normal servikal doku örneklerimizde ise %5 oranında HPV 16 ve %2.5 oranında HPV 18 genomu tespit edildi. DNA saflaştırılmasında kayıp olduğu için, taze doku örnekleri kullanıldığında bu oranlar artabilir. Bulgularımız uyumludur. Normal servikste HPV DNA varlığı, test hatası, servikste mevcut yüzeysel kontaminasyon veya HPV latensine bağlı olabilir. Ayrıca HPV görülme sıklığı gerçek HPV prevalans değerinin altındadır. Bunun birinci nedeni HPV'nin tüm tiplerine yönelik hibridizasyon testlerinin kullanılmasının pratik ve ekonomik açıdan mümkün olmaması, ikinci neden ise hibridizasyon yöntemleri ile varolan HPV'nin her zaman yakalanamamasıdır. Aynı olgularda yapılan seri taramalarda HPV DNA oranı değişmektedir. Bunun bir nedeni virüsle infekte epitel hücrelerinin dökülmesindeki periyodik değişiklikler veya virüs üretiminin hormonal ya da başka nedenlerden etkilenmesi olabilir (14).

HPV tiplendirmesi CIN ve serviks kanserlerinde prognostik öneme sahiptir. Çünkü HPV 18, HPV 16'ya göre daha agresif, kötü diferansiye, genç yaşta ve daha sık lenf nodu metastazı yapan serviks kanserlerinde saptanır (4,15). Ustaçelebi ve Tuncer HPV 18 pozitiflik oranının servikal hastalık derecesinde artışa neden olduğunu tespit etmiştir. Ancak normal gruba göre istatistiksel anlamlı bir fark bulamamıştır (16). Biz de CIN grubu ile normal vakalarda HPV 18 genomunu benzer bulduk. Bulgularımız uyumludur.

Farklı HPV tipleri aynı servikal doku örneğinde eş zamanlı olarak bulunabilir. Schiffman yaptığı çalışmada çok sayıda HPV tipinin %20 oranında eş zamanlı olarak bulunabildiğini tespit etmiştir (17). Biz yaptığımız çalışmada ise eş zamanlı bulunma oranını %2.5 oranında bulduk. Bulgularımız uyumsuzdur. Nedeni sadece iki HPV suşunu incelememiz ve vaka sayımızın az olması olabilir. Aynı örnekte daha fazla sayıda HPV suşu incelenirse ve vaka sayısı artırılırsa bu oran artabilir.

Schneider ve ark. HPV 16 ve 18 saptanan CIN vakalarında 24 aylık izlem sonucunda %20'sinde yüksek gradeli lezyonlara ilerleme gösterdiğini, HPV 6 ve 11 saptanan olgularda ise %0 oranında ilerleme tespit etmişlerdir (18). Champion ve ark. ise 100 CIN I vakasını 18 ay izlemiş, CIN III'e ilerleyen 26 vakanın %85'de HPV 16

tespit edilmiştir (19). Bu sonuçlar HPV 16 ve 18 içeren lezyonların HPV 6 ve 11 içerenlere göre daha agresif davranışlarını göstermektedir.

Sonuç: Bölgemizdeki servikal intraepitelyal neoplazi vakalarında HPV16 suşu 6.5 kat daha fazla etkin rol oynamaktadır.

KAYNAKLAR

1. Koutsky LA, Holmes KK, Critchlow CW, Stevens CE, Paavonen J, Beckmann AM, DeRouen TA, Galloway DA, Vernon D, Kiviat NB. A cohort study of the risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 in relation to papillomavirus infection. *N Engl J Med* 1992; 327:1272-8.
2. 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. *Obstet Gynecol* 1992; 79:328-37.
3. Schmauz R, Claussen CP, Cordes B, Owor R. Condylomata acuminata and their possible relation to cancer of the uterine cervix. Case report and geographic observations. *Acta Cytol* 1983; 27:533-9.
4. Mitao M, Nagai N, Levine RU, Silverstein SJ, Crum CP. Human papillomavirus type 16 infection: a morphological spectrum with evidence for late gene expression. *Int J Gynecol Pathol*. 1986; 5:287-96.
5. Storey A, Pim D, Murray A, Osborn K, Banks L, Crawford L. Comparison of the in vitro transforming activities of human papillomavirus types. *EMBO J* 1988; 7:1815-20.
6. McCance DJ, Kopan R, Fuchs E, Laimins LA. Human papillomavirus type 16 alters human epithelial cell differentiation in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988; 85:7169-73.
7. DiPaolo JA, Woodworth CD, Popescu NC, Notario V, Doniger J. Induction of human cervical squamous cell carcinoma by sequential transfection with human papillomavirus 16 DNA and viral Harvey ras. *Oncogene* 1989; 4:395-9.
8. Lorincz AT. Detection of human papillomavirus infection by nucleic acid hybridization. *Obstet Gynecol Clin North Am*. 1987; 14:451-69.
9. Crum CP, Nuovo G, Friedman D, Silverstein SJ. A comparison of biotin and isotope-labeled ribonucleic acid probes for in situ detection of HPV-16 ribonucleic acid in genital precancers. *Lab Invest* 1988; 58:354-9.
10. Young LS, Bevan IS, Johnson MA, Blomfield PI, Bromidge T, Maitland NJ, Woodman CB. The polymerase chain reaction: a new epidemiological tool for investigating cervical human papillomavirus infection. *BMJ* 1989; 298:14-8.
11. Kiyabu MT, Shibata D, Arnheim N, Martin WJ, Fitzgibbons PL. Detection of human papillomavirus in formalin-fixed, invasive squamous carcinomas using the polymerase chain reaction. *Am J Surg Pathol* 1989; 13:221-4.
12. Syrjanen S, Syrjanen K. Human papillomavirus infections of the genital tract. Clinical significance and diagnosis by polymerase chain reaction. In: Berker Y, Darai G, eds. *Diagnosis of human viruses by polymerase chain reaction*, Berlin, Springer-Verlag. 1192: 185-207.
13. Lorincz AT, Reid R. Association of human papillomavirus with gynecologic cancer. *Curr Opin Oncol*. 1989; 1:123-32.
14. Schneider A, Kirchmayr R, Gissmann L. Human papillomavirus preceding intraepithelial neoplasia in serial cervical smears. *Lancet* 1988; 1:989.
15. King LA, Tase T, Twigg LB, Okagaki T, Savage JE, Adcock LL, Prem KA, Carson LF. Prognostic significance of the presence of human papillomavirus DNA in patients with invasive carcinoma of the cervix. *Cancer* 1989; 63:897-900.

16. Ustaçelebi Ş, Tuncer S. Servikal biopsi örneklerinde insan papilloma virüsleri Tip 16 ve 18'in polimeraz zincir reaksiyonu ile saptanması. Flora 1996; 1:40-4.
 17. Schiffman MH. Epidemiology of cervical human papillomavirus infections. Current topics in Microbiology and Immunology 1994; 186:55-81.
 18. Schneider A, Sawada E, Gissmann L, Shah K. Human papillomaviruses in women with a history of abnormal Papanicolaou smears and in their male partners. Obstet Gynecol 1987; 69:554-62.
 19. Campion MJ, McCance DJ, Cuzick J, Singer A. Progressive potential of mild cervical atypia: prospective cytological, colposcopic, and virological study. Lancet 1986; 2:237-40.
-

Geliş Tarihi: 07.01.2002

Yazışma Adresi: Dr.Ekrem SAPMAZ
Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi
Kadın Hastalıkları ve Doğum AD,
ekremlangaza@hotmail.com