

T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ PATOLOJİ ANABİLİM DALI

UTERİN SERVİKSİN İNTRAEPİTELİYAL NEOPLAZİLERİ
VE YASSI HÜCRELİ KARSİNOMLARINDA p16, p27,
SİKLİN D1 VE BCL-2 EKSPRESYONLARININ
DEĞERLENDİRİLMESİ

Dr. BÜLENT ARAL
TIPTA UZMANLIK TEZİ

Doç. Dr. SELVER ÖZŞENER ÖZEKİNCİ

DİYARBAKIR-2011

ÖNSÖZ

Asistanlık eğitimim süresince yardım ve desteğini esirgemeyen, bilimsel ve mesleki deneyimlerinden faydalandığım hocalarım Prof. Dr. Hüseyin Büyükbayram, Prof. Dr. Bülent Mızrak, Doç. Dr. Selver Özşener Özekinci, Yrd. Doç. Dr. Uğur Fırat, Yrd. Doç Dr. Ayşenur Keleş ve Uzm. Dr. Asuman Çelik’e

İstatiksel değerlendirmemde yardımcı olan Yrd. Doç. Dr. Yılmaz Palancı’ya,

Beraber çalışmaktan mutluluk duyduğum asistan arkadaşlarım Dr. Ulaş Alabalık, Dr. Gülseren Özel, Dr. Songül Yerlikaya Kavak, Dr. Yılmaz Yıldız, Dr. Yahya Avcı’ya

Çalışmamın immünohistokimyasal aşamasında yardımcı olan teknisyen Neval Tanış, Murat Çetinkaya ve biyolog Cemal Çavuş ile bölümümüzdeki tüm çalışma arkadaşlarıma,

Bu tezin hazırlanmasında maddi destek sağlayan ‘Dicle Üniversitesi Araştırma Proje Koordinatörlüğü (DÜBAP)’ne

Bugünlere gelmemi sağlayan ve destek veren anneme, babama, kardeşlerime, eşim Sakine’ye, kızlarım Eylül ve Doğa’ya teşekkürlerimi sunuyorum.

İÇİNDEKİLER

	Sayfalar
Önsöz	i
Özet	iii
İngilizce Özet (Abstract)	iv
Simgeler ve Kısaltma.....	v
1. Giriş ve Amaç	1
2. Genel Bilgiler.....	2
2.1.Serviks Anatomisi.....	2
2.2.Serviks Embriyolojisi.....	2
2.3.Serviks Histolojisi.....	2
2.4.Serviks Kanseri İnsidansı ve Epidemiyolojisi.....	3
2.5. Risk faktörleri.....	5
2.6. Patogenez.....	8
2.6.1 Hücre Siklusu.....	8
2.6.2 Apoptozis.....	11
2.7. Servikal İntraepitelyal Lezyonlar.....	11
2.7.1. Düşük dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon.....	12
2.7.1.1. Ayırıcı tanı.....	13
2.7.2. Yüksek dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon.....	13
2.7.2.1. Alt tipleri.....	14
2.7.2.2. Ayırıcı tanı	14
2.7.3. İntraepitelyal lezyonlarda immünohistokimya.....	15
2.8. Mikroinvaziv Karsinom.....	15
2.9. Serviks Kanseri	16
2.9.1. Sınıflaması.....	17
2.9.2 Evrelemesi.....	18
2.9.3 Skuamöz hücreli karsinom.....	19
2.9.4. Alt tipleri.....	20
2.9.5 İmmünohistokimya.....	21
2.9.6. Ayırıcı tanı.....	21
2.10.Çalışmada kullanılan belirteçler	22
3. Gereç ve Yöntem.....	24
3.1. İmmünohistokimyasal Yöntem.....	24
3.2. İstatiksel Yöntem.....	26
4.Bulgular.....	27
5.Tartışma.....	46
6.Sonuçlar.....	52
7.Kaynaklar.....	53

ÖZET

Serviks kanseri Dünyada meme kanserinden sonra en yaygın görülen ikinci kanserdir. Servikal karsinogenezisdeki en önemli ajan Human papilloma virüsünün (HPV) özellikle yüksek riskli tipleridir. Servikal biyopsilerin değerlendirilmesinde morfolojik inceleme altın standarttır. Pataloglar arasında servikal lezyonların değerlendirilmesinde görülen uyuşmazlıkları ortadan kaldırmak için immün belirteçlere ihtiyaç duyulmaktadır.

Biz de bu amaçla arşivimizden seçtiğimiz 20 LSIL, 16 HSIL ve 20 SCC tanılı olguya p16, p27, siklin D1 ve Bcl-2 immunohistokimyasal belirteçlerini uyguladık. 20 non-neoplazik serviks biyopsisini kontrol grubu olarak kullandık.

Servikal intraepitelyal neoplazi ve yassı hücreli karsinomların p16, p27 ve Bcl-2 ile boyanma dağılımı arasında 'Khi kare' testi ile yapılan istatistiksel değerlendirmede, anlamlı bir fark izlenirken, siklin D1 ile izlenmedi. Mann-Whitney U testi ile non-neoplazik serviks ile LSIL, HSIL ve SCC grupları arasında p16 ve p27 ekspresyonlarında istatistiksel olarak anlamlı fark izlendi. p16, p27, siklin D1 ve Bcl-2 arasındaki ilişki dörtlü karşılaştırma testiyle incelediğinde, tüm gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bir fark izlendi. LSIL'li olgularda immunohistokimyasal belirteçler arasındaki ilişkiyi öğrenmek için yapılan ikili karşılaştırma testinde, tüm belirteçler arasında anlamlı bir fark izlenirken, HSIL'li olgularda siklin D1-p16, siklin D1-p27, Bcl-2-p16, p16-p27, SCC'li olgularda p27-p16, p16-Bcl-2, siklin D1-p27, siklin D1-p16, siklin D1-Bcl-2 arasında anlamlı bir fark izlendi.

Sonuçlarımıza göre, p16 ve p27'nin ayırıcı tanıda yardımcı olabileceği, p16'nın özellikle LSIL ve non-neoplazik olguların ayırıcı tanısında, p27'nin ise prognostik bir belirteç olarak kullanılabileceğini destekler niteliktedir. Siklin D1 ve Bcl-2 ile elde ettiğimiz sonuçlar ikisinin de ayırıcı tanıda katkısının olmadığını, prognostik parametreler olabileceğini düşündürmüştür.

Anahtar kelimeler: Serviks, servikal intraepitelyal lezyon, SCC, p16, p27, siklin D1, Bcl-2.

ABSTRACT

Cervical cancer is the second most common cancer worldwide after mammarian cancer. The most important agent in cervical carcinogenesis is especially high-risk types of Human Papilloma Virus. The gold standart in the evaluation of cervical biopsies is morphological examination. Immunological markers are needed to eliminate the disagreements between pathologists seen in the evaluation of cervical biopsies.

With this purpose, we applied the p16, p27, cyclin D1 and Bcl-2 immunohistochemical markers on 20 cases diagnosed as LSIL, 16 cases diagnosed as HSIL, and 20 cases diagnosed as SCC. We used 20 non-neoplastic cervical biopsies as control group.

As a significant difference was seen between the p16, p27, and Bcl-2 staining distributions of cervical neoplasias and those of squamous cell carcinomas on the statistically evaluation done with chi-square test, this difference was not seen in cyclin D1 staining. With Mann-Whitney U test, a statistically significant difference was seen in the p16 and p27 expressions of LSIL, HSIL and SCC groups compared to non-neoplastic ones. When we examined the relation between p16, p27, cyclin D1, and Bcl-2 with a comparison test of four variables, a significant difference was seen in all group. When, in the cases with LSIL, a significant difference was seen a significant between all the markers, in the comparison test of two variables which was done to learn the relation between the immunohistochemical markers, in the cases with HSIL cyclin D1-p16, cyclin D1-p27, Bcl-2-p16, p16-p27 and with in the cases SCC p27-p16, p16- Bcl-2, cyclin D1-p27, cyclin D1-p16, cyclin D1-Bcl-2 was not seen a significant between the immunohistochemical markers.

According to our resuts, p16 and p27 immunohistochemical markers may assist in the differential diagnosis. p16 may assist between LSIL and non-neoplastic cervix in the differential diagnosis especially and p27 can be used as a prognostic marker. The results obtained with cyclin D1 and Bcl-2 immunohistochemical markers may not assist in the differential diagnosis and these two markers might have prognostic parameter.

Key words: Cervix, Cervical Intraepithelial Lesion, SCC, p16, p27, cyclin D1, Bcl-2.

KISALTMALAR:

A.B.D: Amerika Birleşik Devletleri
ASCUS: Önemi bilinmeyen atipik skuamöz hücreler
Ca: Kanser
CDK: Siklin bağımlı kinaz
CIN: Servikal intraepitelyal neoplazi
Cis: Karsinoma in situ
CK: Sitokeratin
DNA: Deoksiribonükleik asit
FIGO: Uluslararası jinekoloji ve obstetri federasyonu
HIV: Human immunodeficiency virus
HPV: Human papilloma virüs
HR-HPV: Yüksek riskli Human papilloma virus
HSIL: Yüksek dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon
HSV: Herpes simpleks virus
IARCH: International Agency for Research on Cancer
LEEP: Loop Electrosurgical Excision Procedure
LR-HPV: Düşük riskli Human papilloma virus
LSIL: Düşük dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon
Pap: Papanicolaou smear testi
PBS: Phosphate Buffered Saline
Rb: Retinablastoma protein
SCC: Skuamöz hücreli karsinom
SCJ: Skuamo-kolumnar bileşke
WHO: Dünya Sağlık Örgütü

1.GİRİŞ ve AMAÇ

Serviksin yassı hücreli karsinomu gelişmemiş ülkelerde en sık görülen kadın genital sistem tümörlerinden biridir. Gelişmiş ülkelerde düzenli smear tarama programlarının uygulanması, sosyoekonomik durumun iyi olması ve doğurganlığın azalması gibi etmenlerle serviks kanseri sıklığında azalma olmuş, prekanseröz lezyonlarda ise artış gözlenmiştir.

HPV (Human Papilloma Virus) serviks kanserlerinden sorumlu tutulan en önemli etkidir. HPV DNA'sı hibridizasyon teknikleriyle servikal kanserlerin %95'inde gösterilmiştir HPV karsinojenik etkisini E6 ve E7 onkoproteinleriyle hücre siklusunda görev alan p53 ve Retinablastoma tümör supresör proteinleri üzerinden gösterir. Doğurganlık çağı süresince kadınların yaklaşık %75'i bir veya daha çok HPV tipi ile enfekte olmakta, ancak enfekte kadınların küçük bir yüzdesinde önce displazi sonrasında ise kanser gelişimi izlenmektedir.

Literatürde Pap (Papanicolaou) testi ve biyopsilerde yanlış negatiflik ve pozitiflik oranları yüksek bildirilmektedir. Bu konuda gözlemciler arası uyum oranı yaklaşık %70-75 civarındadır. Lezyon varlığında bile, araştırmacılar arasında servikal intraepitelyal neoplazi tanısında fikir ayrılıklarının olması ve diğer lezyonlarla ayırıcı tanıda yaşanan güçlüklerden dolayı spesifik belirteçlere ihtiyaç vardır.

p16 ve p27 hücre siklusunda büyümeyi durduran tümör supresör proteinlerdir. Siklin-siklin bağımlı kinaz kompleksine bağlanarak siklusu bloke eder. Siklin D1 hücre siklusu boyunca salınır ve CDK-4'e (siklin bağımlı kinaz) bağlanarak siklusun devamlılığını sağlar. Bcl-2 ise apoptotik süreçte görevli en bilinen apoptoz inhibitörüdür. Hücre siklusunda p53 tarafından BAX geni aracılığıyla Bcl-2'nin inhibisyonu ile apoptozun devamlılığı sağlanır.

p16, p27, siklin D1 ve Bcl-2'nin serviksin neoplastik ve non-neoplastik lezyonlarının ayırıcı tanısına katkısını araştırmak amacıyla arşivimizden seçtiğimiz 20 LSIL (Düşük dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon), 16 HSIL (Yüksek dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon), 20 SCC (Yassı hücreli karsinom) tanılı olguya ve kontrol grubu olarak belirlediğimiz 20 non-neoplazik servikse immunohistokimyasal yöntem ile bu dört belirteç uygulandı. Sonuçlarımızı literatür eşliğinde değerlendirdik.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Serviks Anatomisi

Serviks yaklaşık 3 cm uzunluğunda, uterusun isthmus uteri ile vajina arasında kalan bölümüdür. Uterusun silindirik biçimli, alt 1/3 'ünü oluşturur ve vajina içerisine doğru sokulmuş durumdadır. Serviksin vajina içerisine giren bu bölümüne portio vajinalis, yukarısında kalan bölümüne portio supravajinalis denir. Portio vajinalisin vajinadan görülebilen açıklığına ostium uteri (external os) denir. Vajina arka duvarına doğru bakan bu açıklık doğurmamışlarda yuvarlak, doğurmuşlarda ise transvers bir yarık şeklindedir. Ostium uteri yukarı doğru canalis cervicis uteri ile devam eder. Bu kanalın iki ucu orta bölümüne oranla daha dardır. Portio vajinalis uteri ile vajina duvarı arasında oluşan çepeçevre çıkmaza fornix vajina denir (1,2).

2.2. Serviks Embriyolojisi

Embriyolojik olarak çölemik mezoderminden kaynaklanan müller kanalları (paramezonefrik kanal) ve ürogenital sinüs müller kanallarının orta hatta birleşmesiyle ortaya çıkan uterovajinal taslaktan köken alır. Uterovajinal taslaktan tuba, uterus ve 1/3 üst vajen üst kısmı gelişir. Serviks uterovajinal taslağın alt kısmından gelişir (3).

2.3. Serviks Histolojisi

Servikal kanal endoserviks denilen müköz membran ile örtülüdür. Portio vajinalis vajinanın mukozal örtüsü ile devam eder ve ekzoserviks adını alır (2).

Ekzoserviks çok katlı yassı epitel ile örtülüdür. Dolaşımdaki östrojen epitelde büyüme ve maturasyon ile glikojen birikimine sebep olur. Çocukluk ve postmenapozal dönemde skuamöz epitel matür değildir. Östrojen etkisindeki seksüel yönden olgun bir kadında skuamöz epitel üç tabakaya ayrılır.

1- Bazal/parabazal hücreli tabaka: Bazal hücreler dar sitoplazmalı koyu kromatinli oval hücrelerdir. Parabazal hücreler bazal hücrelerin üstünde orta tabakanın altında yer alır. Bazal hücrelere göre sitoplazmaları artmış nükleusları daha az yoğun kromatin içerir.

2- Orta tabaka: İntermedier hücrelerden oluşur. İntermedier hücreler geniş sitoplazmalı küçük veziküler nükleusludur. İçerdikleri bol glikojenden dolayı sitoplazmaları şeffaf görünümündedir.

3- Süperfisyel tabaka: Süperfisyel hücreler küçük yuvarlak nükleuslu geniş ve şeffaf sitoplazmalı hücrelerdir. Süperfisyel ve intermedier hücrelerin her ikisinde de keratinizasyon izlenebilir, bu da epitelde düz ve tabakalı bir görünüm oluşturur. Süperfisyel ve intermedier hücrelerde özellikle perinükleer şeffaflık karakteristiktir. Bu özellikleriyle koilositik hücrelerle karıştırılabilir. Postmenapozal kadınlarda ekzoserviks epiteli bazal ve parabazal hücrelerden oluşup sitoplazmik glikojen çok az ya da yoktur (4).

Endoserviks tek sıralı müsin sekresyonu yapan prizmatik epitel ile örtülüdür. Nükleusları küçük elonge ve bazal yerleşimli olup sitoplazmaları müsin içermektedir. Endoservikal epitelde silyalı hücreler, subkolumnar rezerv hücreler ve endokrin hücrelerde olmak üzere farklı tipte hücreler vardır. Endoservikal kanalda prizmatik epitel altındaki stromaya uzanarak değişik derecelerde yarıklar oluşturur. Bunlara ek olarak sıklıkla endoserviks yüzeyinden 5 mm derinlikte endoservikal bezler izlenir. Endoservikal bezler uterus gövdesindeki bezlere göre daha fazla dallanmalara sahiptirler ve müsin salgılarlar.

Serviks stroması başlıca fibroelastik dokudan ve daha az miktarda düz kastan oluşur, damarsal yapılardan zengindir (2,4).

Eksternal os seviyesinde tek katlı prizmatik epitelden skuamöz epitele ani bir değişim olur. Değişimin olduğu bu alana SJC (skuamokolumnar junction) denir. Doğal (orjinal) ekzoserviks epiteli ile endoserviks epitelinin birleştiği nokta orjinal SJC olarak isimlendirilmiştir. Yaşam boyunca skuamöz metaplazi gelişimi ile orijinal SJC endoservikse doğru yer değiştirir, metaplastik hücrelerin kolumnar endoservikal epitel hücreleri ile birleştiği bu yeni noktaya fonksiyonel SJC denir. Yeni ve orjinal SJC arasındaki bu skuamöz metaplazi alanına transformasyon zonu denir.

Transformasyon zonunun önemi serviksin preinvaziv ve invaziv neoplastik lezyonlarının en sık bu bölgeden gelişmesidir (2,4).

2.4. Serviks Kanseri İnsidans ve Epidemiyolojisi

Dünyada serviks kanseri görülme sıklığı açısından yedinci sırada olmakla birlikte kadınlarda meme kanserinden sonra ikinci en yaygın görülen kanserdir. 2002 yılında 493.000 yeni vaka saptanmış bunların 274.000'ni ölümle sonuçlanmıştır (5).

1990'da Dünyada kadınlarda görülen toplam 470.000 kanser vakasının yaklaşık %10'nunu serviks kanseri oluşturmaktaydı (6). Genel olarak vakaların büyük çoğunluğu gelişmekte olan ülkelerde görülmekte olup, 65 yaş öncesinde risk %1.5'dir. Gelişmiş ülkelerde yeni kanser vakalarının sadece %3.6'sını serviks kanseri oluşturmaktadır. En yüksek görülme oranı olan ülkeler Afrika Sahrası, Latin Amerika, Karayibler, Güneydoğu Asya ve Güney Asya merkezidir. Gelişmiş ülkelerde serviks kanseri insidansı ve mortalitesi hızlı bir düşüş göstermiştir. Bu düşüşteki en önemli faktör yoğun tarama programları ile gelen başarıdır. Gelişmekte olan ülkelere Çin'de de serviks kanseri insidansı dikkat çekici bir şekilde düşük bulunmuştur (5).

Gelişmiş tarama programları uygulanmadan önce 1960 ve 1970'li yıllarda Avrupa, Kuzey Amerika, Yeni Zelanda ve Avustralya'daki oranlar gelişmekte olan ülkelere benzer oranlarda seyretmekteydi (7).

Doğu Avrupa ülkeleri ile Balkan ülkelerinde serviks kanseri insidansı yıllık yüzbinde 24-40 arasındadır. Buna karşılık batı ve kuzey Avrupa ülkelerinde ise yıllık insidans yüzbinde 16 ve daha altındadır (8).

Ortadoğuda 4.8/100.000, Doğu Afrikada 44.3/100.000 oranlarında görülmektedir. En alt (Çinli kadınlar 4.9/100.000) ve en üst (Orta Amerikalı kadınlar 45/100.000) oran arasında yaklaşık 10 kat fark vardır (9).

Ülkemizde ise geniş bir veri tabanı olmamakla birlikte Sağlık Bakanlığının 1999 yılı verilerine göre kadınlarda en sık görülen kanserler meme, mide, deri, kolon ve jinekolojik kanserlerdir. Jinekolojik kanserler arasında ilk sırayı serviks kanseri almaktadır (10). 2000 yılında yapılan bir diğer çalışmada ise jinekolojik kanserler kadınlarda en sık görülen ilk dört kanser içinde yer almakta, ancak serviks kanseri uterin korpus kanserlerinden sonra ikinci sırada görülmektedir (11). International Agency for Research on Cancer'in (IARCH) 2002 yılında yaptığı çalışmasına göre Türkiye'de serviks kanseri insidansı yüzbinde 4.5 olarak bulunmuş. 2003 yılında Sağlık Bakanlığı Kanserle Savaş Daire Başkanlığının ülkemizi temsil ettiği düşünülen 8 il üzerinde yapılan çalışmada, tüm kadın kanserleri içerisinde serviks kanseri 10. sırada olup insidansı yüzbinde 4.76'dır. Bu sonuçlara bakılarak ülkemizde serviks kanseri görülme sıklığının, gelişmiş ülkelere benzer oranlarda olduğunu söyleyebilir (12).

2.5. Risk faktörleri

1. Human Papilloma Virus (HPV)

Serviks kanserlerinin primer etyolojik ajanı olarak kabul edilen HPV Papillomavirus ailesine ait bir DNA (Deoksiribonükleik asit) virusudur. Papillomaviruslar doğada son derece yaygın olarak bulunurlar ve orjin aldıkları tür içindeki genetik ilişki derecelerine göre sınıflandırılırlar (13). HPV'nin günümüzde 200'ü aşkın tipi olduğu bilinmektedir (14). Epidemiyolojik çalışmalar serviks kanseri gelişiminde en önemli risk faktörünün HPV enfeksiyonları olduğunu ortaya koymuştur. Serviks kanserlerine ek olarak anal, perianal, vulvar ve penil kanserler, laringeal karsinomda HPV enfeksiyonlarının rol oynadığı gösterilmiştir (15). Orofarengeal kanserlerin %20'sinden HPV enfeksiyonları sorumlu tutulmuşlardır. HPV aynı zamanda verruka (siğil) etkenidir. Verrukalar klinik, morfolojik ve yerleşim yerlerine göre sınıflandırılırlar. En bilinenleri deride görülen Verruka vulgaris ve anogenital bölgede görülen Kondiloma aküminatum'dur. Bunların dışında Bowenoid papülozis, Epidermodisplaziya verrusiformis, nazal-laringeal papillom ve diğer meydana getirdikleri hastalıklardır (16,17,18).

1980'li yıllarda Harald zur Hausen ve ark.(19) serviks kanserlerinde HPV 16 ve 18'i izole etmeyi başarmışlardır. Serviks kanserlerinin %95'inde hibridizasyon teknikleri ile HPV DNA saptanmış, HPV 16 ve 18 serviks kanserlerinin %60-72'sinden sorumlu bulunmuştur. Epidemiyolojik çalışmalarla serviks kanseri açısından HPV yüksek ve düşük riskli olarak sınıflanmıştır. Yüksek riskli (HR-HPV) tipler 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56 düşük riskli (LR-HPV) tipler 6, 11, 40, 42, 44, 53 olarak tespit edilmiştir (20,21). Munoz ve ark. (22) tip 26, 53, 66, 70'i ise genital lezyonlarda olası yüksek riskli olarak sınıflanmıştır.

HR-HPV tipleri büyümeyi stimüle edici ve transforme edici özelliklere sahip en az üç protein (E5, E6, E7) kodlar. E5 enfeksiyon başlangıcında salınır, enfeksiyon ilerledikçe kaybolur. HPV 16 ve HPV 18'in onkojenik potansiyeli E6 ve E7 proteinleri ile ilgilidir. E6 ve E7 hücre siklusunda sırasıyla p53 ve Rb'ya (Retinoblastoma protein) bağlanarak hücre siklusunun inhibisyonunu bloke eder (15).

Genital HPV enfeksiyonları esas itibarıyla cinsel ilişki yoluyla bulaşmaktadır, Dünyada en yaygın seksüel geçişli hastalıktır. Yapılan HPV testlerinde virigolarda

HPV'ye rastlanmamıştır. Partnerin HPV pozitif olması önemli bir risk faktörüdür. Erken yaşta cinsel ilişkiye girmek, sık aralıklarla partner değiştirmek ve çok sayıda cinsel ilişkiye girmek enfeksiyon riskini artıran diğer risk faktörleridir. 25 yaş altında seksüel yönden aktif kadınlarda HPV yüksek oranda bulunmuş yaşın ilerlemesiyle birlikte bu oran düşmekte 55'li yaşlarda yeniden yükselişe geçmektedir. HPV enfeksiyonları ortalama birkaç ayda iyileşir ancak karsinojen tipler özellikle HPV 16 uzun süre sebat eder (22,23).

Erkekler üzerine yapılan bir çalışmada 18-23 yaş arasındaki 240 erkek 24 ay takip edilmiş ve periyodik kontrollere tabi tutulmuş. Bu süre sonucunda erkeklerin 2/3'de 33 farklı tipte HPV saptanmış, kümülatif insidans oranı %62.4 olarak bulunmuş. En sık rastlanan HPV tipi ise HPV 84 ve HPV 16 bulunmuş (24). Sonex ve ark.(25) yaptığı bir başka çalışmada genital siğili olan erkeklerin tırnak altlarında HPV'ye rastlanmış. Bu durumun otoinokulasyon sonucu olduğu ve cinsel partnerlere bulaşıcılıkta bir basamak olabileceği düşünülmüş. Bu veriler göstermektedir ki cinsel ilişkinin başlaması ile birlikte kadınlarda HPV'ye maruz kalma riski de artmaktadır. Yine önceki partnerini serviks kanserinden kaybeden bir erkeğin sonraki partnerlerinde serviks kanseri riskinin arttığı gözlenmiştir (23, 24). Sünnet olmuş erkeklerde HPV pozitifliği diğerlerine göre 3 kat azdır ve bu kişilerin partnerlerinde de HPV pozitifliği ve serviks kanseri riski daha azdır (26).

HR-HPV tipleri tarafından meydana gelen HPV enfeksiyonları az sayıda kadında görülmekte olup, enfeksiyonun kalıcı olabilmesi için en az 6 aylık bir süre gerekmektedir. Bununla birlikte CIN (servikal intraepitelyal neoplazi) veya kanser gelişimi için ısrarcı HPV enfeksiyonu tek başına yeterli değildir (27). Doğurganlık çağı süresince kadınların yaklaşık %75'i HPV ile enfekte olmakta, ancak enfekte kadınların küçük bir kısmında yıllar sonrasında kanser gelişmektedir. HPV enfeksiyonunun latent kalmasını veya kansere doğru gelişimini diğer kokarsinojenler, bağışıklık durumu, beslenme ve diğer faktörler etkiler (6,21).

2.Sigara

Yapılan çalışmalarda sigara içen HPV ile infekte kadınlarda, sigara içmeyen HPV ile infekte kadınlara göre serviks kanseri riskinin arttığı gözlenmiştir. Sigara içen kadınların serviks epitelinde değişikliklerin olduğu, karsinojen tütün derivelerinin serviks sekresyonlarında serumdan daha yüksek oranda bulunduğu

görülmüştür. Klinik çalışmalarda sigarayı bırakanlarda HPV enfeksiyonlarının gerilediği görülmüş (28). Serviksin yassı hücreli karsinomu ile adenokarsinomunu karşılaştıran bir çalışmada, sigara içen kadınlarda serviksin yassı hücreli karsinomunun daha sık görüldüğü ve ikincil kanser gelişiminin sigara kullanan adenokarsinom vakalarına göre daha yüksek olduğu saptanmış (29).

3. Oral kontraseptifler

Oral kontraseptif kullanımı ile HPV enfekte kadınlarda serviks kanseri gelişimi arasındaki ilişki belirsiz olup, bu konuda farklı görüşler mevcuttur. Harris ve ark. (30) 10 yılı aşkın süreyle oral kontraseptif kullanan HPV enfekte kadınlarda serviks kanserinin arttığını, kısa süreli kullanımlarda ise risk olmadığını bildirmiştir. Smith ve ark. (31) 12.531 servikal kanser olgusununu değerlendirdikleri çalışmada 5 yıl, 5-9 yıl ve 10 yıl veya üzeri oral kontraseptif kullanımında riskin sırasıyla 1.1, 1.6 ve 2.2 kat arttığını bulmuşlar.

4. Diğer infeksiyöz ajanlar

IARCH'ın çalışmalarında Chlamydia trachomatis ya da HSV-2'ye (Herpes simpleks virus) karşı antikorlar varsa serviks kanseri riskinin 2,1 kat arttığı bildirilmiş (32). Bir başka geniş kapsamlı çalışmada HPV ile enfekte kadınlarda beraberinde Chlamydia trachomatis olması durumunda, serviks SCC (yassı hücreli karsinom) için riskin arttığı gösterilmiş; ancak adenokarsinom ile anlamlı bir ilişki bulunamamış (33).

5. İmmünite

HPV enfeksiyonlarının önlenmesinde etkili bir bağışıklık sistemi önemli rol oynar. İmmün yetmezlik durumlarına neden olan en başta HIV (Human Immunodeficiency Virus) enfeksiyonları, organ transplantasyonları, immünsupresif ilaç kullanımı hallerinde HPV enfeksiyon süresi uzar CIN veya kanser riski artar (34).

6. Ailesel faktörler

Ailesinde serviks kanserine yakalanmış bir kadında serviks kanseri riski yaklaşık iki kat artmıştır.

7. Sosyoekonomik durum

Yüksek sosyoekonomik düzeye sahip olanlarla karşılaştırıldığında, düşük sosyoekonomik düzeyde olanlarda serviks kanseri riskinin yaklaşık iki kat arttığı görülmüştür (35,36).

8. Obstetrik faktörler

HPV ile infekte kadınlarda doğum sayısı arttıkça serviks kanseri veya CIN riskinin arttığı bildirilmiştir. Bu durum net olarak bilinmemekle birlikte doğum esnasındaki travmalar, hormonal değişiklikler, immün baskılanma, transformasyon zonunun değişmesinin neden olabileceği öne sürülmüştür (35). 16.563 invaziv ve preinvaziv kanserli olgu ile 33.542 kontrol grubunu karşılaştıran epidemiyolojik çalışmada term gebelik oranları arttıkça riskin de buna paralel olarak arttığı saptanmıştır. İlk ilişki yaşı ve partner sayısına göre veriler standardize edildiğinde 7 ve üzeri term gebelik için riskin 2.39 kat arttığı görülmüş. İlk gebelik yaşına bakıldığında 25 yaş altında riskin arttığı, özellikle 16- 18 yaşlarda çok daha belirgin olduğu görülmüş. Son gebelikten sonra geçen zaman ile serviks kanseri arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır. Term gebelik sayısı ile ilk gebelik yaşı birlikte incelendiklerinde yine yüksek risk oranları saptanmıştır (37).

2.6. Patogenez

Servikal karsinom gelişiminde en önemli etkenin HPV olduğu kabul görmüştür. Enfekte kadınların küçük bir kısmında önce displazi yıllar sonrasında kanser gelişimi izlenir (38). Malign dönüşüm HPV'nin hücre siklusunun kontrol noktalarına yaptığı müdahalesiyle başlar. Bilindiği üzere HR-HPV'ler E6 ve E7 onkoproteinlerini sentezler. E6 hücre siklusunda hücre siklusunun durmasını sağlayan ve kontrol noktalarını tetikleyerek apoptoza neden olan, p53'e bağlanarak, ubiquitin bağımlı proteolizis yoluyla hızla p53 düzeyini azaltır. E7 hipofosforile haldeki Rb'ya bağlanarak aktif bir kompleks oluşturur. Hipofosforile Rb normalde inaktif kompleks halindedir ve hücre siklusunun G1'den S fazına geçişini engeller. E6 ve E7 proteinleri bir yandan genetik olarak değişikliğe uğramış hücrelerin p53 bağımlı büyüme duraklamasını ve apoptozunu engellerken diğer yandan da DNA sentezini harekete geçirirler (38,39).

2.6.1. Hücre siklusu

Hücre siklusu G1(premitotik), S (DNA sentezi), G2 (premitotik) ve M (mitoz) fazlarını içerir. Dokular esas olarak G0'daki stabil hücrelerden oluşmakla

birlikte, matür dokuların çoğu sürekli bölünen, diferansiasyona uğrayan yada nadiren siklusa giren hücrelerden oluşur. Hücre siklusunun farklı evreleri boyunca ilerleme, protein yapısındaki siklinler, siklin bağımlı kinazlar (CDK) ve bunların inhibitörleri ile beraber düzenlenir. CDK'lar, hücre siklusunu kritik hedef proteinleri fosforilleyerek harekete geçirir. CDK'lar siklus boyunca inaktif formda salınırlar, siklinlere bağlandıktan sonra fosforilasyonla aktive olurlar. Siklinler ise hücre siklusunun spesifik fazları boyunca sentezlenir ve fonksiyonları CDK'ları aktive etmektir. 15'den fazla tanımlanmış siklin vardır. Siklin D, E, A ve B hücre siklusunda ardı ardına salınır bir veya daha fazla CDK'ya bağlanır (40).

Siklin D ve Retinablastom fosforilasyonu: Siklin D hücre siklusunda ilk artan siklindir, D1, D2, D3 olmak üzere 3 formu bulunur. Siklin D diğer siklinler gibi stabil olmayıp, ubiquitin-proteazom yolağıyla azalır. Hücre siklusunun G1 fazı boyunca siklin D, CDK 4'e bağlanır, siklin D-CDK 4 kompleksi oluşur. Bu kompleks, Rb fosforilasyonunda kritik role sahiptir. Rb'nin fosforilasyonu hücre siklusunda çok önemli bir role sahip olup moleküler değişimi sağlar. Hipofosforile halde Rb hücre çoğalmasını baskılar. Hipofosforile Rb dinlenme halindeki hücrelerde (G0 ya da erken G1) bulunur ve E2F ve DP1 altgrup içeren protein kompleksine bağlıdır (E2F/DP1/Rb kompleksi). Bağlı E2F/DP1/Rb kompleksi inaktif bir koplekstir. Rb'nin fosforilasyonu ile kompleks ayrılır ve hücre siklusunun ilerlemesindeki ana engel ortadan kalkar.

Özetle, dinlenme halindeki hücreler büyüme faktörleri ile uyarıldıklarında siklin D ve E artar. G1/S kontrol noktasında siklin D-CDK4 ve siklin E-CDK2 aktivasyonu olur ve Rb fosforilasyonu gerçekleşir. M fazında fosfat grupları sellüler fosfatazlarla Rb'den ayrılır ve Rb hipofosforile hale döner (40).

Hücre siklusunun G1/S kontrol noktasından öteye ilerlemesi: Siklusun S fazı boyunca ilerlemesi ve DNA replikasyonunun başlamasında, siklin E ve CDK2'nin aktif kompleks oluşturması rol oynar. DNA replikasyonu için, aktive E2F artışıyla siklin E'nin transkripsiyonu ve polimerazlar gereklidir. Hücre siklusunda bir sonraki karar noktası G2/M geçisidir. Bu geçiş, siklin A'nın E2F aracılı transkripsiyonuyla başlar. Siklin A-CDK2 kompleksi mitotik profazda düzenleyicidir. Hücrenin profaza ilerlemesindeki ana mediatör siklin B-CDK1 kompleksidir. Siklin B-CDK1 aktivasyonu nükleer membranda bozulmaya neden olur ve mitozu başlatır. Mitozdan

çıkış için siklin B-CDK1'in inaktivasyonu gerekir. Yeni bölünmüş hücreler G1'e geri dönebilir ve yeni bir replikatif siklus başlar ya da hücreler dinlenmeye çekilir (40).

Hücre siklus inhibitörleri: Siklin-CDK kompleksi, CDK inhibitörleri ile düzenlenir. İki ana sınıf CDK inhibitörü vardır: Cip/Kip ve INK4/ARF aileleri. Bu inhibitörler tümör supresör gibi fonksiyon görür ve sıklıkla tümörlerde değişirler.

Cip/Kip ailesi p21, p27 ve p57 olmak üzere 3 komponentten oluşur ve siklin-CDK kompleksini inaktive eder. p21'in aktivasyonu, p53'ün kontrolü altındadır. p53'ün hücre siklusundaki görevi hasarlı hücrelerin hücre siklusunda ilerlemesini durdurmak için kontrol noktalarını uyararak ve DNA onarımı gerçekleşmezse apoptoza neden olmaktır.

İnsan INK4/ARF lokusu, p16INK4a ve p14ARF olmak üzere iki proteinle kodlanır. Bunlar tümör supresör gen gibi davranarak hücre siklusunu bloke eder. p16INK4a, CDK4'e bağlanmak için siklin D ile yarışır ve siklin D-CDK4 kompleksinin inhibisyonunu sağlayarak Rb'nin fosforilasyonunu engeller. Bu da hücre siklusunu geç G1 fazında durdurur. p16INK4a, insan kanserlerinde sıklıkla mutasyona uğramış ya da hipermetilasyonla inaktive edilmiştir. p14ARF ise p53'ün feedback döngüsünü inhibe ederek p53'ü azalmaktan korur (38,39,40).

Hücre siklus kontrol noktaları: Hücre siklusu, kendi internal kontrol noktalarına sahiptir. İki temel kontrol noktası vardır. Biri G1/S geçişi, diğeri G2/M geçisidir. S fazı hücre siklusunda geri dönüşü olmayan noktadır. Hücre replikasyona girmeden önce G1/S kontrol noktasında DNA hasarı için kontrol edilir. Eğer DNA hasarı varsa DNA tamir mekanizmaları çalışır ve siklus durur. Siklus ilerlemesindeki ertelenme tamir için gerekli zamanı sağlar. Bu sürede hasar tamir edilemezse apoptotik yolla hücre öldürülür. G1/S kontrol noktasında hücre siklusunda durma p53 aracılıdır. p53 hücre siklusunun durdurulmasına ve apoptoza aracılık eden çeşitli genlerin transkripsiyonunu uyarır. p53 aracılı hücre siklusu durması geç G1 fazında gerçekleşir ve buna CDK inhibitörü p21'in p53 bağımlı transkripsiyonu neden olur. DNA hasarı onarılamazsa p53 son olarak apoptozu uyaran BAX genini aktive eder. BAX apoptozu inhibe eden Bcl-2 proteinine bağlanır ve onu antagonize eder.

G2/M kontrol noktası DNA replikasyonu bitiminde izlenir ve mitozun düzenli başlamasını kontrol eder. Bu kontrol noktası özellikle hücreler iyonize radyasyona maruz kalırsa önemlidir. Hücreler iyonize radyasyonla hasarlanırsa

G2/M kontrol noktası aktive olur ve siklus G2'de durur. Bu noktadaki hatalar kromozomal anomalilere neden olur. Hücre siklusunda G2/M kontrol noktası aracılığıyla durma hem p53 bağımlı hem de bağımsız mekanizmalarla olur. Hücre siklusu kontrol noktalarındaki defekt, kanser hücrelerindeki genetik instabilitenin en büyük nedenidir (40).

2.6.2. Apoptozis

İntraselüler programla yürütülen hücre ölümüdür. Hücre intiharı olarak da isimlendirilir. Apoptozis fizyolojik ve patolojik olaylardan sorumlu tutulmaktadır.

Fizyolojik olarak; embriogenez sırasında hücrelerin programlı olarak ortadan kaldırılmasında, hormonal stimulus azalmasına yanıt olarak menstruel siklus, menapoz, prostat atrofisi gibi durumlarda, intestinal kript epiteli gibi proliferen olan hücrelerde, akut inflamasyonda nötrofil löksitlerde meydana gelir.

Patolojik olarak; radyasyon ve sitotoksik kanser ilaçları gibi DNA'yı hasara uğratan durumlarda hasar onarılamadığında, virusle enfekte ve neoplastik değişime uğramış hücrelerde, tümör hücrelerinde, duktusları tıkanan parankimal organlarda atrofi olarak meydana gelir.

Proapoptotik moleküllerden en önemlileri Bcl-2 protein ailesidir. Bcl-2 ailesi, üyelerinin bir kısmının apoptozisi indüklediği (Bax, Bad, Bid Bcl-X_S) bir kısmının ise inhibe ettiği (Bcl-2, Bcl-X_L) geniş bir ailedir. Antiapoptik olanlardan en önemli ikisi Bcl-2 ve Bcl-X_L mitokondrial membranda ve sitoplazmada yerleşmişlerdir. Hücreler büyüme sinyalleri kesildiği veya strese maruz kaldıklarında Bcl-2 ve Bcl-X_L kaybolur, onların yerini Bax ve Bid proteinleri alır. Bu durum kaspazların aktivasyonu ile sonlanır. Kaspazlar bir dizi işlemle pek çok yaşamsal proteini kırarlar hücre iskeletini bozarlar, DNA'yı parçalayan DNAaz'ları aktive ederler. Son olarak apoptotik hücreler inflamatuvar yanıt oluşturmaksızın ve çevre dokularda hasar oluşturmaksızın fagosite edilirler (41-42).

2.7. Servikal İntraepitelyal Lezyonlar

Servikal intraepitelyal lezyonlar serviksin yassı hücreli karsinomunun prekürsör lezyonlarıdır. Preinvaziv servikal intraepitelyal lezyonları tanımlamada çeşitli sınıflamalar kullanılmıştır. En eski sınıflama displazi-karsinoma insitu sınıflaması olup, displazi değişikliklerin şiddetine bağlı olarak hafif, orta ve şiddetli

olmak üzere grublara ayrılmıştır. Bir diğer sınıflama ise CIN sınıflamasıdır. Bu sınıflamaya göre CIN I hafif displazi, CIN II orta derecede displazi, CIN III ise şiddetli displazi/karsinoma in situ'ya karşılık gelmekte ve bu sınıflama displazi-karsinoma insitu sınıflamasının yerini almıştır. Bir diğer yeni sınıflama ise sitolojide de kullanılan Bethesda sınıflamasıdır. Bethesda sistemine göre lezyonlar düşük dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon (LSIL) ve yüksek dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon (HSIL) şeklinde sınıflanmıştır. LSIL CIN I'e, HSIL ise CIN II ve III'e karşılık gelmektedir .

Bütün bu sınıflamaların altında bu lezyonlarda uygulanan tedavideki farklılıklar yatmaktadır. LSIL'lerin çoğunda takiple yetinilirken, HSIL'lerde çeşitli cerrahi girişimler uygulanmaktadır (43).

Pap testinin etkin bir şekilde kullanılmaya başlanması ile 1950'den bugüne A.B.D.'de serviks kanserinde %75 oranında azalma görülmüştür (44). Pap testi ile servikal premalign lezyonlar ve servikal kanserde yanlış negatiflik oranı %15-%50, yanlış pozitiflik oranı ise yaklaşık %30 olarak bildirilmiştir (45). Skuamöz intraepitelyal lezyonların biyopsi tanılarında da uyumsuzluk olduğu bilinmektedir (46,47). Biyopsilerde uyumsuzluk oranı özellikle LSIL olgularında ve HPV'ye bağlı sitopatik değişikliklerin yorumlanmasında en fazladır. Biyopsilerde uyum oranı HSIL ve invaziv karsinom gibi yüksek dereceli lezyonlarda yüksektir (48).

2.7.1. Düşük dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon (LSIL)

Servikal intraepitelyal lezyonlarının tanısında temel kriterler nükleer atipinin varlığı, mitotik aktivite ve normal skuamöz maturasyonun kaybıdır. Hafif displazik ve flat condylomatalı lezyonlar LSIL kapsamında değerlendirilmektedir.

Buna göre LSIL'de epitelin üst 2/3'de maturasyon mevcuttur. Tanı koydurucu değişiklikler epitelin alt 1/3 kısmındaki bazal tabakadadır. Koilositik değişikliklere ek olarak hücrelerde binükleer veya multinükleer nükleuslar, keratinizasyon (diskeratozis) ve büyüme görülür. Bazal tabakada mitotik figürler görülür ancak atipik mitoz izlenmez. Yoğun glikojenize skuamöz epitel ve inflamasyona reaktif epitel, gerçek koilositozla karışabilir. Koilositoz ile birlikte düzensiz nükleer konturlar binükleasyon/multinükleasyon, hiperkromazi ve/veya sellüler pleomorfizm LSIL tanısı koymada yardımcı olur. LSIL'lerin %80'den fazlasının HR-HPV tiplerinden kaynaklandığı belirtilmekle birlikte, büyük

çoğunluğu yaklaşık bir yıl içinde kendiliğinden geriler. Yaklaşık %10 kadar vaka HSIL'e doğru ilerler, %1 vakada ise invaziv kanser geliştiği bildirilmektedir (49-50). Koilositoz: HPV etkisindeki servikte yaygın olarak hücresel düzeyde koilositotik atipi olarak isimlendirilen değişiklikler meydana gelir. Bu değişiklikler başlıca: düzgün sınırlı geniş perinükleer halo, hafif derecede nükleer hiperkromazi, artmış nükleositoplazmik oran ve nükleer membranda düzensizlik şeklinde tanımlanmıştır. Koilositoz varlığı HPV enfeksiyonuna işaret etmektedir. Bethesda sınıflamasına göre koilositik değişiklikler LSIL lezyonları kapsamında değerlendirilmiş olup, smear taramalarında görülen en yaygın hücresel anormalliklerdir.

Condyloma acuminata: Serviks, vajen ve vulva yerleşimli bu lezyonun kolposkopik görünümü invaziv karsinom ile karışabilir ve biyopsi ile ayrımı yapılmalıdır. Servikte ekzofitik bir büyüme gösteren lezyon olarak izlenir. Epitelde hiperkeratoz, akantoz ve papillomatozis izlenir. Hücresel düzeyde koilositik değişiklikler, diskeratozis ve multinükleer hücreler izlenir. Servikal stromada sıklıkla kronik bir inflamasyon beraberinde bulunur. Bu özellikleri ile Condyloma acuminata lezyonları LSIL kapsamında değerlendirilmektedir (49).

2.7.1.1. Ayırıcı tanı

1.Vajinal papillomatozis: Histolojik olarak papillomatozis, parakeratoz ve sitoplazmik halo görülür, ancak belirgin akantoz, nükleer atipi ve atipik parakeratoz görülmez.

2.Reaktif epitelyal değişiklikler (nonspesifik): Epitelin direkt ya da alttaki başka bir inflamasyona sekonder olarak, belirgin sitoplazmik halonun eşlik ettiği epitelyal glikojenizasyon ile hafif bir nükleer atipinin görüldüğü değişiklik halidir. Bu tip olgularda en önemli ayırt edici özellik hücre boyutu ya da boyanma yoğunluğunda farklılıklar olmamasıdır.

3. Postmenapozal skuamöz atipi: Menapozal ya da postmenapozal kadınlarda parsiyelden komplete giden bir spektrum içinde atrofik hücresel değişiklikler görülür. Bu spektrum içinde psödokoilosit, transizyonel metaplazi ve klasik atrofik değişiklikler bulunur. Psödokoilosit, epitelyal maturasyon, sitoplazmik halo ve genellikle değişken nükleer boyut ya da boyanma ile karakterlidir (51).

2.7.2. Yüksek dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon (HSIL):

CIN 2 ve CIN3 lezyonları HSIL kapsamında değerlendirilmektedir. Epitelde maturasyon ya hiç yoktur ya da epitelin üst yarısında sınırlıdır. Nükleer anormallikler daha belirgin olup, epitelin tamamı boyunca vardır. Nükleositoplazmik oran artışı, nükleer sınırlarda düzensizleşme ve kromatinde kabalaşma dikkati çeker. Hücreler arasında pleomorfizm gözlenir. Epitel daha koyu görünümündedir. Mitotik figürler çok sayıda ve epitelin tamamı boyunca izlenir. Atipik mitoz izlenebilir. Koilositik atipili ya da maturasyonun korunduğu lezyonlar CIN II, maturasyonun seçilemediği lezyonlar CIN III değerlendirilmektedir.

HSIL’li vakaların yaklaşık %12’de invazyon gelişir. Bu nedenle HSIL olgularına LEEP (Loop Electrosurgical Excision Procedure) veya servikal konizasyon gibi girişimsel işlemler yapılır (49-50).

2.7.2.1. HSIL alt tipleri:

1-Keratinize ya da koilositik HSIL: Yüzeyde belirgin keratinizasyon ile karakterizedir. Keratinize hücreler benign hücresel reaksiyonlarda görülebileceği gibi ASCUS, LSIL, HSIL ve SCC’de de görülebilir. Keratinize HSIL’deki hücrelerin konturlarında büyük oranlarda düzensizlik görülür. Kromatin yoğun veya kabadır. Sitoplazma sıklıkla eozinofiliktir. Keratinize HSIL’de belirgin yüzeyel nükleer atipi görülür. Parabazal atipi çeşitli dereceldedir.

2-HSIL ve immatür metaplastik diferansiasyon: İmmatür metaplazinin kesin özelliklerini koruyan, kötü sınırlı lezyon spektrumuna dahil edilen tipidir. Yuvarlak ya da dalgalı epitelyal stromal geçiş, uniform görünümlü immatür hücrelerle birlikte değişkenlik gösteren sitoplazmik diferansiasyon izlenir. Klasik metaplazinin tersine bu tip HSIL’de yüzeydeki hücresel maturasyon gerilemiştir.

3-Stratifiye, müsin üreten tip: Az görülen bir tip olup, tek başına ya da adenokarsinom in situ ile birlikte görülebilir. Bu lezyon morfolojik olarak belirgin müsin damlaları dışında immatür metaplastik HSIL’e benzer. Müsin damlaları epitelde uniform dağılım gösterir. Bu hücrelerde çok katlı dizilim adenokarsinoma in situyu düşündürür ancak skuamöz diferansiasyon belirleyicisi p63 ile boyanma zayıf ya da negatiftir (51).

2.7.2.2. Ayırıcı tanı:

1-Bazal Hücre Hiperplazisi: Bazal ve parabazal tabakada kalınlaşma ve nükleer büyüme ile karakterizedir. Bununla birlikte nükleuslarda hiperkromazi ve pleomorfizm izlenmez. Epitelin üst yarısında differansiasyon normal görünümde dir.

2-Reaktif Epitelyal Değişiklikler: Skuamöz epitelin onarımını takiben meydana gelen değişiklikler hafif displaziye taklit edebilir. Stromada kronik bir inflamasyon görülür. Hücrelerde nükleusda büyüme ve nükleoluslarda belirginleşme izlenir, nükleer pleomorfizm minimaldir. Atipi genellikle epitelin alt yarısında sınırlıdır ve yüzeydeki skuamöz epitel maturasyonunu korur.

3-Radyasyona bağlı değişiklikler: Hücreler uniform görünümde olup nükleus ve sitoplazmada eşit miktarda büyüme izlenir. Mitoz nadir olarak izlenir.

4-LSIL: Tipik olarak epitelin 2/3'de matürasyon mevcudiyeti ve yüzeyel epitelde koilositik değişiklikler ayırıcı tanıda yardımcı olur. Nükleer atipi minimal olup epitelin alt 1/3'de izlenir.

5-İnvaziv Skuamöz Hücreli Karsinom: Serviks biyopsilerinde kimi kez yeterli miktarda subepitelyal stroma örneklenmemişse invazyon ve HSIL ayrımı yapılamayabilir. Paradoksal maturasyon mevcudiyeti, büyük atipik hücre, sınırları düzensiz keratinize hücreler, keratin tıkaçları, komedo benzeri nekroz alanları ve neovaskularizasyon invazyon lehinedir .

6-Skuamöz atrofi: Skuamöz epitelde incelmeye, maturasyon kaybı ve parabazal hücre hakimiyeti görülür. Hücreler uniform yapıda olup hafif bir nükleer hiperkromazi görülür, nükleer pleomorfizm yoktur ve mitoz nadir görülür.

7-İmmatür skuamöz metaplazi: Erken skuamöz diferansiasyon, polarite kaybı, bazal hücre hiperplazisi ve nükleer büyümeyle karakterize, uniform yapıdaki hücrelerden oluşan fizyolojik bir durumdur. Nükleer pleomorfizm ve hiperkromazi yoktur. Mitoz olabilir ancak atipik mitoz izlenmez (52). İmmünohistokimyasal olarak CK17 (sitokeratin) pozitifliği ve p16 negatifliği ayırıcı tanıda yardımcı olur (53).

2.7.3. İntraepitelyal lezyonlarda immünohistokimya

Ayırıcı tanıda en önemli kriter Hematoksilen/Eozin kesitler olmakla birlikte, bazı immün belirteçler reaktif/reperatif epitelyal değişiklikler, immatür skuamöz metaplazi ve atrofi ayırımında yardımcı olur. Ki-67 ve p16 intraepitelyal neoplazilerde kullanılmaktadır. SIL olgularında farklı boyanma paternleri olmakla

birlikte genel olarak kuvvetli pozitif boyanma izlenmektedir. Ayırıcı tanıya gidilemeyen olgularda Ki-67 ve p16'nın beraber kullanımı önerilmektedir (54-55).

2.8. Mikroinvaziv Karsinom

Uluslararası jinekoloji ve obstetri federasyonu (FIGO) evre IA serviks kanserini mikroinvaziv karsinom olarak kabul etmiştir. Evre IA kanserler sadece mikroskopik olarak tanınırlar. Evre IA kanserlerde stromal invazyonun derinliği maksimum 5 mm, genişliği 7 mm olarak kabul edilmiştir. Vasküler alanlar veya lenfatik tutulum evreyi değiştirmez. Önceleri evre IA1 kanserler erken stromal invazyon olarak isimlendirilirken, günümüzde mikroinvaziv değişiklikler olarak isimlendirilmekte ve evre IA2 kanserleri de bu kapsama dahil edilmiştir. Yapılan çalışmalarda kansere bağlı ölüm oranı evre IA1 ve evre IA2'de benzer (%1.2-%1.7) bulunmuş ve anlamlı bir farklılık saptanmamıştır. İnvazyon derinliğinin 3 mm olduğu ve metastaz yapmamış olgularda tedavide konizasyon ve basit histerektomi yeterlidir (56).

Mikroinvaziv karsinomların büyük çoğunluğuna HSIL eşlik etmekte ve invazyonun HSIL'lerin progresyonu sonucu geliştiği düşünülmektedir. HSIL'lerin eşlik ettiği mikrokarsinomlarda yüzey epitelinde ve derin endoservikal kriptlerde geniş alanlarda yaygın HSIL'ler, luminal nekroz ve intraepitelyal skuamöz matürasyon izlenir (57). Mikroinvaziv karsinom tanısı en iyi konizasyon ve LEEP materyallerinde konur. Bununla birlikte biyopsi yapılacaksa çok sayıda biyopsi alınması önerilmektedir. 120 konizasyon materyalinin değerlendirildiği bir çalışmada vakaların %88'de tek bir invazyon odağı, %12'de ise birden fazla invazyon odağı saptanmış. Bu invazyon odaklarının %49'unun ekzoserviks ile eksternal os arası yerleşimli ve derindeki glandların tutulumu ile seyrettiği izlenmiş (58).

Mikroinvaziv karsinomları değerlendirirken ayırıcı tanıda tanjansiyel kesilmiş HSIL'e bağlı kript tutulumu, önceki biyopsi alanlarında kapsayan koter veya ezilme artefaktı, psödoepitelyematöz değişikliklerinde dahil olduğu inflamatuvar veya reperatif değişiklikler, inflamasyon veya diğer artefaktlara epitelyal-stromal yüzeyin bağlı net izlenememesi gözönünde tutulmalıdır (51).

2.9. Serviks Kanseri

Serviks kanserinin iki büyük histolojik formu mevcuttur. Bunlardan en yaygın görüleni yassı hücreli karsinom olup serviks kanserlerinin %80-85'ini oluşturmaktadır. Diğer daha az görüleni formu ise adenokarsinom olup serviks kanserlerinin %15-20'sini oluşturmaktadır (59). Ortalama görülme yaşı 52 olup 35-39 ve 60-64 yaşlarında iki ayrı dönemde pik yapmaktadır. Birleşik Devletlerde yılda 13.000 hasta yeni tanı almakta ve 4100 hasta serviks kanseri nedeniyle hayatını kaybetmektedir (60).

2.9.1. Serviks kanseri epitelyal tümörler WHO 2003 sınıflaması

Skumöz hücreli karsinom

- Keratinize
- Non-keratinize
- Bazaloid
- Verrüköz
- Warty
- Papiller
- Lenfoepitelyoma benzeri
- Skuamotransizyonel

Mikroinvazivskuamöz hücreli karsinom

Skumöz intraepitelyal neoplazi

- Servikal intraepitelyal neoplazi
- Skumöz hücreli karsinoma in situ

Benign skuamöz hücreli lezyonlar

- Condyloma acuminatum
- Skumöz papillom
- Fibroepitelyal polip

Adenokarsinoma

- Müsinöz adenokarsinoma
- Endometrioid adenokarsinoma
- Şeffaf hücreli adenokarsinoma
- Seröz adenokarsinoma
- Mezonefrik adenokarsinoma

Erken invaziv adenokarsinoma

Adenokarsinoma in situ

Glanduler displazi

Benign glanduler lezyonlar

- Müllerian papilloma
- Endoservikal polip

Adenoskuamöz karsinoma

Adeniod kistik karsinoma

Adenoid bazal karsinoma

Nöroendokrin tümörler

- Karsinoid
- Atipik karsinoid
- Küçük hücreli karsinoma
- Büyük hücreli karsinoma

Andiferansiye karsinoma (6)

2.9.2 Serviks kanserinin evrelemesi

Serviks kanserleri için kullanılan evreleme sistemi International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) tarafından geliştirilmiş ve 1995 yılında son hali verilmiştir. Temelde tanı esnasında klinik muayenede tümör büyüklüğünü ve hastalığın pelvisteki yayılımını esas alan klinik evreleme sistemidir.

Evre I: Tümör kesinlikle servikste sınırlıdır.

- Evre IA: Tümör sadece mikroskopik olarak görülebilir. Stromal invazyonun derinliği maksimum 5 mm, genişlik 7 mm den büyük değil.
- Evre IA1: Stromal yayılım 3 mm den küçük ve tümör 7 mm den geniş değildir.
- Evre IA2: Stromal yayılım 3-5 mm arasında ve tümör 7 mm den geniş değildir
- Evre IB: Servikse sınırlı klinik lezyonlar veya Evre IA'dan büyük preklinik lezyonlar.
- Evre IB1: 4 cm den büyük olmayan klinik lezyonlar.
- Evre IB2: 4 cm den büyük klinik lezyonlar.

Evre II: Tümör serviksi aşmış, fakat pelvis duvarına ulaşmamıştır. Vajen tutulumu olabilir ancak alt 1/3'e ulaşmamıştır.

- Evre IIA: Belirgin parametrial tutulum yok.
- Evre IIB: Belirgin parametrial tutulum var.

Evre III: Tümör pelvik duvara kadar ulaşmıştır. Rektal muayenede tümörle pelvis duvarı arasında serbest aralık yoktur. Tümör vajen alt 1/3'ünü tutmuştur. Hastalarda hidronefroz ve/veya böbrek yetmezliği bulguları vardır.

- Evre IIIA: Pelvis duvarına ulaşmamıştır.
- Evre IIIB: Tümör pelvis duvarına ulaşmış veya hidronefroz veya nonfonksiyone böbrek vardır.

Evre IV:

Tümör gerçek pelvisi aşmış veya klinik olarak mesane ve/veya rektum mukozası tutulumu vardır.

- Evre IVA: Tümörün komşu pelvik organlara yayılımı vardır.
- Evre IVB: Uzak organlara yayılım mevcuttur (61)

2.9.3. Skuamöz hücreli karsinom (SCC)

SCC'lerin %98'i transformasyon zonundan gelişir. Makroskopik olarak endofitik ve ekzofitik olmak üzere iki büyüme tipi mevcuttur. Endofitik yönde gelişen karsinomlar ülser ve nodüler olup, endoservikal kanaldan gelişir endoservikal stromaya doğru uzanım gösterir. Tipik olarak serviks fiçi görünümündedir. Ekzofitik yönde gelişim gösteren karsinomlarda ise servikal karsinom polipoid veya papiller görünümündedir (62).

Mikroskopide Reagan ve ark. (63) yassı hücreli karsinomları histolojik olarak üç gruba ayırmışlardır.

1-Büyük hücreli non-keratinize karsinom: Sıklıkla tek hücre keratinizasyonu yapan poligonal şekilli skuamöz hücrelerden oluşur. Keratin incileri görülmez. Hücre sınırları nispeten belirsiz olup, hücreler arası köprüleşmeler izlenebilir. Nükleuslar oval-yuvarlak, kaba kromatinlidir. Mitoz sıktır.

2-Büyük hücreli keratinize karsinom: En karakteristik özelliği epitelde keratin incilerinin bulunmasıdır. İnciler skuamöz epitel hücre kümelerinden oluşmakta ve santralinde aselüler keratin bulunmaktadır. Hücrelerin sitoplazmaları geniş eozinofilik, interselüler köprüleşmeler yapmış ve iri nükleusludur. Mitoz sık değildir.

3-Küçük hücreli non-keratinize karsinom: Küçük oval bazaloid şekilli hücrelerden oluşmuştur. Nükleuslar genellikle uniform hiperkromatik ve küçüktürler. Mitoz sıklığıdır. Nekroz sıklıkla izlenir. Odaksal tarzda skuamöz diferansiasyon ve keratinizasyon olabilirken, keratin incileri izlenmez. Çoğu vakada akciğerin nöroendokrin diferansiasyon gösteren küçük hücreli karsinomuna morfolojik olarak benzeyebilir ayrımı yapılmalıdır.

Yassı hücreli karsinomlar diferansiasyon derecesine göre üç başlıkta toplanmıştır. Bu yöndeki ilk çalışma Broders tarafından yapılmış daha sonra WHO tarafından geliştirilmiştir.

1- İyi diferansiye (grade 1): Keratin incileri yapmış, keratinize matür skuamöz, geniş eozinofilik sitoplazmalı hücrelerden oluşur. Nükleuslar iri ve kaba kromatinlidir. Mitoz olağan sınırlardadır.

2- Orta derecede diferansiye (grade 2): Dar sitoplazmalı, pleomorfizm gösteren iri nükleuslu, hücre sınırları düzensiz hücrelerden oluşur. Keratin incisi olmayıp tek hücre keratinizasyonu olabilir. Mitotik aktivite yüksektir.

3- Az diferansiye (grade 3): Hiperkromatik oval kimi zaman iğsi nükleuslu, dağınık belirsiz sitoplazmalı pleomorfik hücrelerden oluşur. Nekroz alanları bulunur. Mitotik aktivite yüksektir (64) .

2.9.4. Skuamöz hücreli karsinom alt tipleri

1-Verrüköz karsinom: Nadir görülen bir varyantdır. Makroskopik olarak condyloma acuminataya benzerlik gösterir. Sıklıkla servikste dışarı doğru bir büyüme paterni gösterir. Mikroskopide hiperkeratotik, hiperplastik papiller yapı oluşturmuş skuamöz epitel izlenir. Sitolojik atipi ve mitoz minimaldir (53,65).

2-Papiller skuamotransizyonel hücreli karsinom: Nadir görülen bir varyantdır. Papiller yapılar oluşturan üriner sistemin transizyonel hücrelerine benzer diferansiasyon gösteren tümöral yapı izlenir. Mikroskopide fibrovasküler korlar etrafında papiller yapılar yapan skuamöz ve transizyonel hücrelerden oluşmuş atipik hücreler izlenir. CK 7 sıklıkla pozitif, CK 20 negatif boyanır (66).

3-Bazaloid skuamöz hücreli karsinom: Oldukça agresif seyirli bir tümör olup, yuvalanma veya adacıklar yapan, bazaloid tipte küçük immatür ve hiperkromatik hücrelerden oluşur. Hücrelerde keratinizasyon çok az ya da izlenmez. HMWCK ve EMA ile pozitiflik bildirilmiştir (67).

4-Lenfoepitelyoma: Histolojik olarak nazofarenksteki lenfoepitelyomaya benzerlik gösteren serviksin az rastlanan bir tümörüdür. Stromada şiddetli bir lenfoplazmositik inflamasyon izlenir. Hücreler sıklıkla oval-yuvarlak veziküler nükleuslu belirgin nükleollüdür. Sinsityal bir büyüme paterni izlenir. Mitoz artmıştır (68).

5-Spindle hücreli yassı hücreli karsinom: Oldukça kötü seyirli tümörlerdir. Fasiküller oluşturan büyük spindle hücrelerden oluşmuştur. Fokal alanlarda skuamöz diferansiasyon izlenir (69).

2.9.5. Skuamöz hücreli karsinomlarda immünhistokimya

Rutin uygulamada immünhistokimya çok kullanılmamakla birlikte bazı özel durumlarda faydalanılabilir. CK 6,14,17,18,19 ile yassı hücreli karsinomlarda boyanma izlenir (70,71). Skuamöz ve kolumnar diferansiasyon ayrımında ise p53 ve p63 boyaları yardımcı olur. p53 ve p63 ile yassı hücreli karsinomlarda güçlü boyanma izlenirken, adenokarsinomlarda, nöroendokrin karsinomlarda ve bazı andiferansiye karsinomlarda negatif ya da zayıf boyanma izlenir (72).

2.9.6. Ayırıcı tanı:

1-Nöroendokrin karsinom: Kötü diferansiye skuamöz hücreli karsinomlar dağınık sitoplazmaları nedeniyle küçük hücreli nöroendokrin karsinomlar ile karıştırılabilir. Küçük hücreli karsinoma özgü olan apoptotik cisimcikler, nükleer molding ve ezilme artefaktları yassı hücreli karsinomlarda sıklıkla izlenmez. Şüpheli vakalarda nöroendokrin hücrelerin sinaptofizin, kromogranin ve CD56 ile skuamöz hücrelerin CK5/6 ve p63 ile boyanabilmesi ayırıcı tanıda yardımcı olur. Bazı durumlarda ise SCC ile büyük hücreli nöroendokrin karsinom karıştırılabilir. Coğrafik nekroz mevcudiyeti ve belirgin apoptozis ile, bunlara ilaveten nöroendokrin markırlar ile boyanabilmesi büyük hücreli nöroendokrin karsinom lehinedir.

2-Plasental site nodül: Plasental site nodül genelde hyalinize matriks içeren intermedyer trofoblastik hücrelerden oluşmuş düzgün sınırlı bir lezyondur. Hücreler küçük uniform nükleusdan büyük düzensiz hiperkromatik nükleusa kadar değişkenlik gösterebilir. İmmünhistokimyasal olarak CD10, inhibin ve human lökosit antijen-G (HLA-G) boyanması ayırıcı tanıda yardımcı olur.

3-Epiteloid trofoblastik tümör: Endoservikal yüzeyden gelişmesi ve keratin benzeri parlak eozinofilik materyal içermesi nedeniyle yassı hücreli karsinomdan ayrımı

zordur. İmmünohistokimyasal olarak CD10 ve human chorionic gonadotropin (hCG) ile boyanması ayırıcı tanıda yardımcı olur.

4-Yaygın endoservikal gland tutulumu gösteren HSIL: Yaygın endoservikal gland tutulumu gösteren HSIL olgularında epitelyal stromal mesafelerde dağınık yerleşimli, polaritesi korunmuş displastik epitelle örtülü şişkin glandlar izlenir. Derin yerleşimli displazi içermeyen endoservikal gland alanlarıyla, displazik epitelle kaplı glandların bulunduğu alanların karşılaştırılması tanıda yardımcı olur.

5-Yaygın skuamöz metaplazi gösteren hiperplastik endoservikal glandlar: Hiperplastik yaygın skuamöz metaplazi gösteren glandlar tanıda karışıklığa neden olabilir. Glandların düzgün sınırlı olması, desmoplastik bir stromanın olmaması ve metaplastik epitelde anlamlı bir atipinin olmaması ayırıcı tanıda yardımcı olur.

6-İnflamasyona bağlı olarak epitelyal stromal mesafelerin net izlenememesi: Displastik epitelle kaplı endoservikal glandların çevresindeki alanlarda belirgin inflamasyon mevcudiyeti tanıda karışıklığa neden olabilir. Farklı alanlardan örnekleme yapmak yada yeni kesitlerle invazyon ve diğer bulguların yokluğunun gösterilmesi tanıda yardımcı olur.

7-Stromal desidualizasyon: Geniş eozinofilik sitoplazmalı, oval nükleuslu, nükleolusları belirgin, hücre sınırları düzensiz desidualize hücreler kafa karışıklığı yaratabilir. Bu hücrelerin sitokeratinler ile boyanmaması ve mitotik aktivitenin düşüklüğü SCC ile ayırımında yardımcı olur.

8-Adenoskuamöz karsinom: Adenoskuamöz karsinom tanısında glanduler komponentin varlığı tanıyı kolaylaştıran bir etkidir. İmmünohistokimyasal boyalara gerek kalmadan hematoksilen-eozin kesitlerle tanı konulabilir (73).

2-10. Çalışmada kullanılan belirteçler

p16: p16, kromozom 9p21 yerleşimli CDKN2A geni tarafından kodlanan, hücre siklusunun G1-S kontrol noktasında negatif düzenleyici olarak görev alan, tümör supresör proteindir. p16 ekspresyonu normal dokularda çok az veya hiç izlenmezken, nazofarenks, meme, mide, özefagus, over, prostat tümörlerinde p16 ekspresyonu izlenmiş, yapılan çalışmalarda p16 ekspresyonunun tümör progresyonuna ve kötü prognoza eşlik ettiği gösterilmiştir (74, 75, 76, 77, 78). Küçük hücreli dışı akciğer kanseri ve Non-Hodgkin lenfomalarında p16 gen mutasyonun tümör gelişiminde rol oynadığı gösterilmiştir (79,80).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda CIN ve invaziv kanserlerde p16 ile ekspresyonda artış görülmüş, servikal neoplazinin derecesi ve HR-HPV enfeksiyonu arasında pozitif korelasyon saptanmıştır. p16 ile genelde non-neoplastik epitelde ve mezenşimal hücrelerde boyanma izlenmemekle birlikte, kimi zaman proliferatif fibroblastlar, endotel hücreleri, inflamatuvar hücreler ve hiperplastik endoservikal hücrelerde zayıf boyanma izlenir (81,82).

p27: p27 Kip1 geni tümör supresör bir gen olup hücre siklusunun G1 fazında inhibitör olarak görev alır. İnsan kanserlerinde p27 mutasyonu nadiren gözlenir (83, 84, 85). Normal epitel hücrelerinde artmış bir salınım söz konusu iken, tümör hücrelerinde sıklıkla kaybı izlenir. Yapılmış olan çalışmalarda meme, kolon, prostat, akciğer, mide ve over tümörlerinde p27 ekspresyonun azaldığı veya kaybolduğu bildirilmiş, p27 ekspresyon kaybının kötü prognoza eşlik ettiği gösterilmiştir (83, 84, 86, 87, 88,89).

Siklin D1: Siklin D1 kromozom 11q13 yerleşimli CCND1 geni tarafından kodlanan ve hücre siklusunda görev alan onkogendir. İlk olarak paratiroid adenomunda tespit edilmiştir (90). Kromozomal translokasyonlar, gen amplifikasyonları, hücreler arası iletişimin bozulması ve proteolizise uğrama gibi süreçler sonucu, tümörlü hücre nükleuslarında siklin D1 birikimi olmakta, bunun sonucunda pek çok tümörde siklin D1 ekspresyonu izlenmektedir. Mantle cell lenfoma, papiller tiroid ca, küçük hücreli dışı akciğer ca, meme, mesane, özefagus ca, pankreas ca, pituiter adenom ve baş-boyun yassı hücreli karsinomlarında siklin D1 ekspresyonu izlenmektedir (91, 92).

Bcl-2: Bcl-2 üyelerinin bir kısmının apoptozisi indüklediği (Bax, Bad, Bid, Bcl-X_s), bir kısmının ise inhibe ettiği (Bcl-2, Bcl-X_L) geniş bir ailedir. Pro-apoptotik ve anti-apoptotik üyelerinin rölatif oranı hücrenin yaşamını sürdürmesini doğrudan etkiler. Bu oranın artması ya da azalması apoptozisin inhibisyonu veya aktivasyonu ile sonuçlanır (41). Bcl-2 proteini ilk olarak B hücreli foliküler lenfomalarda tanımlanmıştır. Bcl-2 ile çeşitli kanserler (meme, kolon, over, tiroid) üzerine yapılan çalışmalarda, Bcl-2 ekspresyon yüksekliğinin genel olarak iyi prognoz belirteci olduğu gösterilmiştir. (93, 94, 95, 96, 97).

3.GEREÇ ve YÖNTEM

Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenen, 10-TF-18 nolu proje çalışmamız için Dicle Üniversitesi Etik Kurulundan izin (53-09.06.10) alındıktan sonra Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı arşivi taranarak 2007-2011 yılları arasında CIN ve serviks SCC tanısı almış olgular belirlendi. Bu olgulara ait preparatlar tekrar değerlendirildi. Histopatolojik değerlendirme sonucu olgular üç ayrı grupta toplandı. Birinci grupta LSIL tanılı 20 olgu, ikinci grupta HSIL tanılı 16 olgu, üçüncü grupta serviks SCC tanısı almış 20 olgu belirlendi. Kontrol grubu olarak non-neoplazik 20 serviks biyopsi materyali belirlendi. Toplamda dört grup oluşturuldu. Tüm olguların parafine gömülü doku blokları patoloji arşivinden çıkarılarak her bir olgu için ayrı ayrı olmak üzere p16, p27, siklin D1 ve Bcl-2 markırları ile immünohistokimyasal boyama yapıldı.

3.1. İmmünohistokimyasal Yöntem

- Olguların seçilen bloklarından 4 µM'lik kesitler poly-L-Lysinli adhezivli lamlara alındı.
- Lamlar 62 derecelik etüvde 60 dakika bekletildi.
- Deparafinizasyon işlemi için 4x5 dakika boyunca ksilen ve 4x5 dakika boyunca da %96'lık alkol solüsyonlarında bekletildi.
- Antijen retrivel amacıyla plastik taşıyıcılara konulan kesitler pH 6 Edta solüsyonunda basınçlı buhar tenceresinde işlem gördü.
- Kesitler oda sıcaklığında 20 dakika soğutuldu.
- Kesitler oda sıcaklığında 10 dakika distile su içerisinde bekletildi.
- Dokulara 20 dakika protein blok (Ultra V Blok) (ScyTek, USA) damlatılarak bekletildi.
- Kesitler Phosphate Buffered Saline (PBS) solüsyonu ile 2x5 dakika yıkandı.
- Hazırlanan kesitler primer antikör olarak p16 (p16 (1E12E10):sc-81156 (1.0 ml) Santa Cruz Biotechnology INC), Bcl-2 (Bcl-2 (SPM117):sc-5608 (1.0

ml) Santa Cruz Biotechnology INC), siklin D1 (siklin D1 (A-12):sc-8396 (1.0 ml) Santa Cruz Biotechnology INC) ve p27 (p27 (F-8):sc-1641 (1.0 ml) Santa Cruz Biotechnology INC) ile 120 dakika inkübe edildi.

- Kesitler PBS solüsyonu ile 2x5 dakika yıkandı.
- Kesitlere Biotinylated link antibody (ScyTek, USA) damlatılıp 30 dakika bekletildi.
- Kesitler PBS solüsyonu ile 2x5 dakika yıkandı
- Kesitler daha sonra Streptavidin/HRP solüsyonu (ScyTek, USA) ile 30 dakika bekletildi.
- Kesitler PBS solüsyonu ile 2x5 dakika yıkandı
- AEC (3-Amino-9-Etilkarbazol) Single solüsyonunda 5 dakika bekletildikten sonra distile su ile yıkandı.
- Mayer's Hematoksilen (Bio-Optica,USA) ile 1 dakika nükleer zıt boyanma yapıp distile su ile yıkandı.
- Lamlar oda sıcaklığında kuruduktan sonra Aqueus Mounting (ScyTek, USA) kapama maddesi ile kapatıldı.
- Olgular Olympus Cx31 ışık mikroskopunda, 40x10 büyütmede değerlendirildi.
- Bcl- 2 ve p27 için pozitif kontrol tonsil, siklin D1 için pozitif kontrol meme, p16 için epitelin bazal tabakası internal kontrol olarak kullanıldı.
- İmmünohistokimyasal değerlendirmede p16 ve p27 nükleer ve sitoplazmik, Bcl-2 ve siklin D1 sitoplazmik boyanma gösterdi.
- Olgular boyanmanın yaygınlık ve şiddetine göre aşağıdaki gösterildiği şekilde skorlandı.

0- %10'nun altı boyanma negatif

1- %10-30 arası zayıf boyanma

2- %30-70 arası orta boyanma

3- %70 üstü güçlü boyanma.

3.2. İstatistiksel Metod:

Elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirmesi SPSS 17.0 for Windows (SPSS Inc. Chicago) istatistik paket programı kullanılarak yapıldı.

Kesikli değişkenlerin çapraz tabloları hazırlanarak, ‘Yates düzeltmeli Khi-Kare ’ testi ile analiz yapıldı.

Hipotez karşılaştırmalarında çift yönlü hipotez ve 0.05 yanılma olasılığı dikkate alındı.

Grublar arası karşılaştırmada Mann-Whitney U testi ve Kruskal-Wallis testleri kullanıldı.

4. BULGULAR :

Çalışma toplamda 76 olgu üzerinden yapılmış, olguların gruplara göre yaş, p16, Bcl-2, Siklin D1 ve p27 ile immünohistokimyasal değerlendirme sonuçları aşağıda tablolar halinde verilmiştir.

Tablo 1: Kontrol grubu non-neoplazik

Sıra	Yaş	P16	Bcl-2	Siklin D1	p27
0	57	1	1	2	2
1	44	1	2	1	3
3	49	1	1	1	2
4	2	1	1	1	0
5	53	1	1	1	1
6	69	1	1	1	2
7	50	1	1	1	2
8	44	2	1	1	0
9	45	2	1	1	1
10	45	2	1	2	2
11	43	1	1	1	1
12	72	1	1	0	1
13	46	1	1	1	0
14	47	1	1	1	0
15	51	1	1	1	1
16	53	1	1	1	2
17	58	1	1	1	1
18	51	1	1	2	2
19	34	1	1	1	2
20	40	1	1	1	2

Tablo 2: LSIL

Sıra	Yaş	p16	Bcl-2	Siklin D1	p27
1	41	2	1	2	1
2	58	3	1	1	0
3	74	2	1	1	0
4	26	2	2	1	1
5	41	3	1	1	0
6	31	3	2	2	1
7	63	2	1	2	1
8	26	2	1	1	1
9	37	3	1	1	1
10	67	2	1	1	0
11	24	3	1	2	1
12	63	2	1	1	0

13	36	3	0	2	0
14	25	3	1	2	1
15	40	3	1	2	0
16	40	3	1	2	0
17	34	3	0	2	0
18	39	2	1	1	0
19	34	3	1	2	1
20	62	3	1	2	1

(LSIL: Düşük dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon)

Tablo 3: HSIL

Sıra	Yaş	p16	Bcl-2	Siklin D1	p27
1	33	3	1	2	1
2	37	2	0	1	2
3	39	3	1	2	1
4	48	2	1	2	1
5	32	3	1	1	0
6	30	3	2	2	0
7	63	3	2	1	0
8	23	2	1	2	0
9	40	2	0	1	0
10	27	3	1	1	0
11	59	3	0	3	0
12	49	2	2	0	1
13	48	1	1	2	1
14	48	1	1	2	1
15	79	3	1	2	1
16	78	2	0	0	0

(HSIL: Yüksek dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon)

Tablo 4: SCC

Sıra	Yaş	p16	Bcl-2	Siklin D1	p27
1	75	2	1	0	1
2	50	2	0	2	1
3	60	3	1	1	1
4	42	3	2	0	1
5	64	2	0	1	0
6	54	3	1	1	0
7	44	3	0	2	1
8	57	3	1	2	1
9	58	3	0	1	0
10	36	3	1	2	2
11	43	3	0	2	0
12	64	3	2	2	1

13	39	3	1	2	0
14	61	2	0	2	0
15	43	3	0	1	0
16	43	1	0	1	0
17	50	3	0	1	0
18	50	3	0	1	0
19	54	3	0	1	0
20	62	3	2	2	0

(SCC: Yassı hücreli karsinom)

Hastaların yaşları 23 ile 79 arasında olup, ortalama yaş 47.75 olarak bulundu.

p16 ile tüm olgularda değişen derecelerde boyanma izlendi. Olguların %23.7'sinde zayıf boyanma, %31.6'sında orta derecede boyanma, %44.7'sinde güçlü boyanma izlendi.

- Non-neoplazik 20 olgunun 16'sında (%80) zayıf, 4'ünde (%20) orta derecede boyanma izlendi.
- Düşük dereceli servikal intraepitelyal neoplazili 20 olgunun 8'inde (%40) orta derecede, 12'sinde (%60) güçlü boyanma izlendi.
- Yüksek dereceli servikal intraepitelyal neoplazili 16 olgunun 1'inde (%6.3) zayıf, 8'inde (%50) orta derecede, 7'sinde (%43.8) güçlü boyanma izlendi.
- Yassı hücreli karsinom tanılı 20 olgunun 1'de (%5.0) zayıf, 4'ünde (%20) orta derecede, 15'de (%75) güçlü boyanma izlendi.

Bu sonuçlara göre servikal intraepitelyal neoplazili ve yassı hücreli karsinomların p16 ile boyanma dağılımı arasında 'Ki kare' testi ile yapılan istatistiksel değerlendirmede, anlamlı bir fark izlendi (p=0.000).

Tablo 5: Olguların p16 ile boyanma oranları

p16	1		2		3		Total	
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
Non- neoplazik	16	80	4	20	0	0	20	100
LSIL	0	0	8	40	12	60	20	100
HSIL	1	6.25	8	50	7	43.75	16	100
SCC	1	5	4	20	15	75	20	100
Toplam	18	23.7	24	31.6	34	44.7	76	100

(LSIL: Düşük dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon, HSIL: Yüksek dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon, SCC: Yassı hücreli karsinom)

Bcl-2 ile yapılan immünohistokimyasal boyamada olguların %64.5’de zayıf boyanma, %11.8’inde orta derecede boyanma, %23.7’sinde boyanmama izlendi. Hiçbir olguda güçlü boyanma izlenmedi.

- Non-neoplazik 20 olgunun 19’unda (%95) zayıf, 1 olguda (%5) orta derecede boyanma izlendi.
- Düşük dereceli servikal intraepitelyal neoplazili 20 olgunun 2’sinde (%10) boyanmama, 15’inde (%75) zayıf, 3’ünde (%15) orta derecede boyanma izlendi.
- Yüksek dereceli servikal intraepitelyal neoplazili 16 olgunun 5’inde (%31.3) boyanmama, 9’unda (%56.3) zayıf, 2’sinde (%12.5) orta derecede boyanma izlendi.
- Yassı hücreli karsinom tanılı 20 olgunun 11’inde (%55) boyanmama, 6’sında (%30) zayıf, 3’ünde (%15) orta derecede boyanma izlendi.

Bu sonuçlara göre servikal intraepitelyal neoplazili ve yassı hücreli karsinomların Bcl-2 ile boyanma dağılımı arasında ‘Ki kare’ testi ile yapılan istatistiksel değerlendirmede, anlamlı bir fark izlendi (p=0.001).

Tablo 6: Olguların Bcl-2 ile boyanma oranları

Bcl-2	0		1		2		Total	
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
Non- neoplazik	0	0	19	95	1	5	20	100
LSIL	2	10	15	75	3	15	20	100
HSIL	5	31.25	9	56.25	2	12.5	16	100
SCC	11	55	6	30	3	15	20	100
Toplam	18	23.7	49	64.5	9	11.8	76	100

(LSIL: Düşük dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon, HSIL: Yüksek dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon, SCC: Yassı hücreli karsinom)

p27 ile olguların %42.1’inde zayıf boyanma, %14.5’inde orta derecede boyanma, %1.3’ünde güçlü boyanma, %42.1’inde boyanmama izlendi.

- Non-neoplazik 20 olgunun 3'ünde (%15) boyanmama, 7'sinde (%35) zayıf, 9'unda (%45) orta derecede, 1'inde güçlü boyanma (%5) izlendi.
- Düşük dereceli servikal intraepitelyal neoplazili 20 olgunun 9'unda (%45) boyanmama, 11'inde (%55) zayıf boyanma izlendi.
- Yüksek dereceli servikal intraepitelyal neoplazili 16 olgunun 8'inde (%50) boyanmama, 7'sinde (%43.8) zayıf, 1'inde (%6.3) orta derecede boyanma izlendi.
- Yassı hücreli karsinom tanılı 20 olgunun 12'sinde (%60) boyanmama, 7'sinde (%35) zayıf, 1'inde (%5) orta derecede boyanma izlendi.

Bu sonuçlara göre servikal intraepitelyal neoplazili ve yassı hücreli karsinomların p27 ile boyanma dağılımı arasında 'Ki kare' testi ile yapılan istatistiksel değerlendirmede, anlamlı bir fark izlendi ($p=0.002$).

Tablo 7: Olguların p27 ile boyanma oranları

P27	0		1		2		3		Total	
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
Non-neoplazik	3	15	7	35	9	45	1	5	20	100
LSIL	9	45	11	55	0	0	0	0	20	100
HSIL	8	50	7	43.75	1	6.25	0	0	16	100
SCC	12	60	7	35	1	5	0	0	20	100
Toplam	32	42.1	32	42.1	11	14.5	1	1.3	76	100

(LSIL: Düşük dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon, HSIL: Yüksek dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon, SCC: Yassı hücreli karsinom)

Siklin D1 ile olguların %5.3'ünde boyanmama, %51.3'de zayıf boyanma, %42.1'de orta derecede boyanma, %1.3'de güçlü boyanma izlendi.

- Non-neoplazik 20 olgunun 1'inde (%5) boyanmama, 16'sında (%80) zayıf, 3'ünde (%15) orta derecede izlendi.
- Düşük dereceli servikal intraepitelyal neoplazili 20 olgunun 8'inde (%40) zayıf, 12'sinde (%60) orta derecede boyanma izlendi.

- Yüksek dereceli servikal intraepitelyal neoplazili 16 olgunun 1'inde (%6.3) boyanmama, 6'sında (%37.5) zayıf, 8'inde (%50) orta derecede, 1'inde (%6.3) güçlü boyanma izlendi.
- Yassı hücreli karsinom tanılı 20 olgunun 2'sinde (%10) boyanmama, 9'unda (%45) zayıf, 9'unda (%45) güçlü boyanma izlendi.

Bu sonuçlara göre servikal intraepitelyal neoplazili ve yassı hücreli karsinomların Siklin D1 ile boyanma dağılımı arasında 'Ki kare' testi ile yapılan istatistiksel değerlendirmede, anlamlı bir fark izlenmedi ($p=0.061$).

Tablo 8: Olguların siklin D1 ile boyanma oranları

Siklin D1	0		1		2		3		Total	
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
Non-neoplazik	1	5	16	80	3	15	0	0	20	100
LSIL	0	0	8	40	12	60	0	0	20	100
HSIL	1	6.25	6	37.5	8	50	1	6.25	16	100
SCC	2	10	9	45	9	45	0	0	20	100
Toplam	4	5.3	39	51.3	32	42.1	1	1.3	76	100

(LSIL: Düşük dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon, HSIL: Yüksek dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon, SCC: Yassı hücreli karsinom)

Non-neoplazik ve LSIL olguları arasında Mann-Whitney U testi ile ikişerli karşılaştırmalı istatistiksel analiz yapılmış, sonuçlar aşağıda verilmiştir.

- Non-neoplazik olgular ile LSIL'li olgular arasında p16 boyanması açısından sonuçlar istatistiksel değerlendirmede anlamlı bulundu ($p=0.000$).
- Non-neoplazik olgular ile LSIL'li olgular arasında Bcl-2 boyanması açısından sonuçlar istatistiksel değerlendirmede anlamlı bulunmadı ($p=0.989$).
- Non-neoplazik olgular ile LSIL'li olgular arasında siklin D1 boyanması açısından sonuçlar istatistiksel değerlendirmede anlamlı bulunmadı ($p=0.010$).
- Non-neoplazik olgular ile LSIL'li olgular arasında p27 boyanması açısından sonuçlar istatistiksel değerlendirmede anlamlı bulundu ($p=0.001$).

Tablo 9: Non-neoplazik ve LSIL olguları arasında Mann-Whitney U testi ile karşılaştırmalı analiz.

Belirteç	Gruplar	0	1	2	3	Total	P
p16	Non-neoplazik	0	16	4	0	20	0.000
	LSIL	0	0	8	12	20	
Bcl-2	Non-neoplazik	0	19	1	0	20	0.989
	LSIL	2	15	3	0	20	
Siklin D1	Non-neoplazik	1	16	3	0	20	0.010
	LSIL	0	8	12	0	20	
p27	Non-neoplazik	3	7	9	1	20	0.001
	LSIL	9	11	0	0	20	

(LSIL: Düşük dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon)

Non-neoplazik ve HSIL olguları arasında Mann-Whitney U testi ile ikişerli karşılaştırmalı istatistiksel analiz yapılmış, sonuçlar aşağıda verilmiştir.

- Non-neoplazik olgular ile HSIL’li olgular arasında p16 boyanması açısından sonuçlar istatistiksel değerlendirmede anlamlı bulundu ($p=0.000$).
- Non-neoplazik olgular ile HSIL’li olgular arasında Bcl-2 boyanması açısından sonuçlar istatistiksel değerlendirmede anlamlı bulunmadı ($p=0.262$).
- Non-neoplazik olgular ile HSIL’li olgular arasında siklin D1 boyanması açısından sonuçlar istatistiksel değerlendirmede anlamlı bulunmadı ($p=0.046$).
- Non-neoplazik olgular ile HSIL’li olgular arasında p27 boyanması açısından sonuçlar istatistiksel değerlendirmede anlamlı bulundu ($p=0.004$).

Tablo 10: Non-neoplazik ve HSIL olguları arasında Mann-Whitney U testi ile karşılaştırmalı analiz.

Belirteç	Gruplar	0	1	2	3	Total	P
p16	Non-neoplazik	0	16	4	0	20	0.000
	HSIL	0	1	8	7	16	
Bcl-2	Non-neoplazik	0	19	1	0	20	0.262
	HSIL	5	9	2	0	16	
Siklin D1	Non-neoplazik	1	16	3	0	20	0.046
	HSIL	1	6	8	1	16	
p27	Non-neoplazik	3	7	9	1	20	0.004
	HSIL	8	7	1	0	16	

(HSIL: Yüksek dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon)

Non-neoplazik ve SCC olguları arasında Mann-Whitney U testi ile ikişerli karşılaştırmalı istatistiksel analiz yapılmış, sonuçlar aşağıda verilmiştir.

- Non-neoplazik olgular ile SCC'li olgular arasında p16 boyanması açısından sonuçlar istatistiksel değerlendirmede anlamlı bulundu ($p=0.000$).
- Non-neoplazik olgular ile SCC'li olgular arasında Bcl-2 boyanması açısından sonuçlar istatistiksel değerlendirmede anlamlı bulunmadı ($p=0.021$).
- Non-neoplazik olgular ile SCC'li olgular arasında siklin D1 boyanması açısından sonuçlar istatistiksel değerlendirmede anlamlı bulunmadı ($p=0.192$).
- Non-neoplazik olgular ile SCC'li olgular arasında p27 boyanması açısından sonuçlar istatistiksel değerlendirmede anlamlı bulundu ($p=0.001$).

Tablo 11: Nonneoplazik ve SCC olguları arasında Mann-Whitney U testi ile karşılaştırmalı analiz.

Belirteç	Gruplar	0	1	2	3	Total	P
p16	Non-neoplazik	0	16	4	0	20	0.000
	SCC	0	1	4	15	20	
Bcl-2	Non-neoplazik	0	19	1	0	20	0.021
	SCC	11	6	3	0	20	
Siklin D1	Non-neoplazik	1	16	3	0	20	0.192
	SCC	2	9	9	0	20	
p27	Non-neoplazik	3	7	9	1	20	0.001
	SCC	12	7	1	0	20	

(SCC: Yassı hücreli karsinom)

HSIL ve SCC olguları arasında Mann-Whitney U testi ile ikişerli karşılaştırmalı istatistiksel analiz yapılmış, sonuçlar aşağıda verilmiştir.

- HSIL'li olgular ile SCC'li olgular arasında p16 boyanması açısından sonuçlar istatistiksel değerlendirmede anlamlı bulunmadı ($p=0.132$).
- HSIL'li olgular ile SCC'li olgular arasında Bcl-2 boyanması açısından sonuçlar istatistiksel değerlendirmede anlamlı bulunmadı ($p=0.336$).
- HSIL'li olgular ile SCC'li olgular arasında siklin D1 boyanması açısından sonuçlar istatistiksel değerlendirmede anlamlı bulunmadı ($p=0.459$).

- HSIL’li olgular ile SCC’li olgular arasında p27 boyanması açısından sonuçlar istatistiksel değerlendirmede anlamlı bulunmadı (p=0.626).

Tablo 12: HSIL ve SCC olguları arasında Mann-Whitney U testi ile karşılaştırmalı analiz.

Belirteç	Gruplar	0	1	2	3	Total	P
p16	HSIL	0	1	8	7	16	0.132
	SCC	0	1	4	15	20	
Bcl-2	HSIL	5	9	2	0	16	0.336
	SCC	11	6	3	0	20	
Siklin D1	HSIL	1	6	8	1	16	0.459
	SCC	2	9	9	0	20	
p27	HSIL	8	7	1	0	16	0.626
	SCC	12	7	1	0	20	

(HSIL: Yüksek dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon, SCC: Yassı hücreli karsinom)

HSIL ve LSIL olguları arasında Mann-Whitney U testi ile ikişerli karşılaştırmalı istatistiksel analiz yapılmış, sonuçlar aşağıda verilmiştir.

- HSIL’li olgular ile LSIL’li olgular arasında p16 boyanması açısından sonuçlar istatistiksel değerlendirmede anlamlı bulunmadı (p=0.352).
- HSIL’li olgular ile LSIL’li olgular arasında Bcl-2 boyanması açısından sonuçlar istatistiksel değerlendirmede anlamlı bulunmadı (p=0.305).
- HSIL’li olgular ile LSIL’li olgular arasında siklin D1 boyanması açısından sonuçlar istatistiksel değerlendirmede anlamlı bulunmadı (p=0.912).
- HSIL’li olgular ile LSIL’li olgular arasında p27 boyanması açısından sonuçlar istatistiksel değerlendirmede anlamlı bulunmadı (p=0.937).

Tablo 13: HSIL ve LSIL olguları arasında Mann-Whitney U testi ile karşılaştırmalı analiz.

Belirteç	Gruplar	0	1	2	3	Total	P
p16	HSIL	0	1	8	7	16	0.352
	LSIL	0	0	8	12	20	
Bcl-2	HSIL	5	9	2	0	16	0.305
	LSIL	2	15	3	0	20	
Siklin D1	HSIL	1	6	8	1	16	0.912
	LSIL	0	8	12	0	20	
p27	HSIL	8	7	1	0	16	0.937
	LSIL	9	11	0	0	20	

(HSIL: Yüksek dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon, LSIL: Düşük dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon)

SCC ve LSIL olguları arasında Mann-Whitney U testi ile ikişerli karşılaştırmalı istatistiksel analiz yapılmış, sonuçlar aşağıda verilmiştir.

- SCC’li olgular ile LSIL’li olgular arasında p16 boyanması açısından sonuçlar istatistiksel değerlendirmede anlamlı bulunmadı (p=0.495).
- SCC’li olgular ile LSIL’li olgular arasında Bcl-2 boyanması açısından sonuçlar istatistiksel değerlendirmede anlamlı bulunmadı (p=0.038).
- SCC’li olgular ile LSIL’li olgular arasında siklin D1 boyanması açısından sonuçlar istatistiksel değerlendirmede anlamlı bulunmadı (p=0.314).
- SCC’li olgular ile LSIL’li olgular arasında p27 boyanması açısından sonuçlar istatistiksel değerlendirmede anlamlı bulunmadı (p=0.512).

Tablo 14: SCC ve LSIL olguları arasında Mann-Whitney U testi ile karşılaştırmalı analiz.

Belirteç	Gruplar	0	1	2	3	Total	P
p16	SCC	0	1	4	15	20	0.495
	LSIL	0	0	8	12	20	
Bcl-2	SCC	11	6	3	0	20	0.038
	LSIL	2	15	3	0	20	
Siklin D1	SCC	2	9	9	0	20	0.314
	LSIL	0	8	12	0	20	
p27	SCC	12	7	1	0	20	0.512
	LSIL	9	11	0	0	20	

(SCC: Yassı hücreli karsinom, LSIL: Düşük dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon)

LSIL tanılı olgularda p16, p27, siklin D1 ve Bcl-2 immunohistokimyasal boyalarının Kruskal-Wallis testiyle yapılan dörtlü karşılaştırma testinde istatistiksel incelemede anlamlılık bulundu (p=0.000).

Tablo 15: LSIL olgularında Kruskal-Wallis testiyle yapılan inceleme.

	Median	P
p16	3	0.000
Bcl-2	1	
Siklin D1	2	
p27	1	

LSIL olgularında Mann-Whitney U testi ile immün belirteçler arasında yapılan ikişerli karşılaştırmalı analize göre, siklin D1-Bcl-2 ($p=0.002$), siklin D1-p16 ($p=0.000$), siklin D1-p27 ($p=0.000$), Bcl-2 - p16 ($p=0.000$), Bcl-2-p27 ($p=0.005$), p16-p27 ($p=0.000$) ekspresyonları arasında istatistiksel anlamlılık izlendi.

Tablo 16: LSIL olgularında p16, bcl-2, siklin D1, p27 ekspresyonunun istatistiksel olarak Mann-Whitney U testi ikili karşılaştırma sonuçları.

	Median	P
Siklin D1-Bcl-2	2-1	0.002
Siklin D1-p16	2-3	0.000
Siklin D1-p27	2-1	0.000
Bcl-2 - p16	1-3	0.000
Bcl-2-p27	1-1	0.005
p16-p27	3-1	0.000

HSIL tanılı olgularda p16, p27, siklin D1 ve Bcl-2 immunohistokimyasal boyalarının Kruskal-Wallis testiyle yapılan dörtlü karşılaştırma testinde istatistiksel incelemede anlamlılık bulundu ($p=0.000$).

Tablo 17: HSIL olgularında Kruskal-Wallis testiyle yapılan inceleme.

	Median	P
p16	2	0.000
Bcl-2	1	
Siklin D1	2	
p27	0.5	

Mann-Whitney U testi ile immün belirteçler arasında yapılan ikişerli karşılaştırmalı analize göre; siklin D1-p16 (p=0.003), siklin D1-p27 (p=0.001), Bcl-2 - p16 (p=0.000), p16-p27 (p=0.000) ekspresyonları arasında istatistiksel anlamlılık izlendi. Bcl-2-p27 (p=0.267), siklin D1-Bcl-2 (p=0.006) ekspresyonları arasında istatistiksel anlamlılık izlenmedi.

Tablo 18: HSIL olgularında p16, bcl-2, siklin D1, p27 ekspresyonunun istatistiksel olarak Mann-Whitney U testi ile ikili karşılaştırma sonuçları.

	Median	P
Siklin D1-Bcl-2	2-1	0.006
Siklin D1-p16	2-2	0.003
Siklin D1-p27	2-0.5	0.001
Bcl-2 - p16	1-2	0.000
Bcl-2-p27	1-0.5	0.267
p16-p27	2-0.5	0.000

SCC tanılı olgularda p16, p27, siklin D1 ve Bcl-2 immunohistokimyasal boyalarının Kruskal-Wallis testiyle yapılan dörtlü karşılaştırma testinde istatistiksel incelemede anlamlılık bulundu (p=0.000).

Tablo 19: SCC olgularında Kruskal-Wallis testiyle yapılan inceleme.

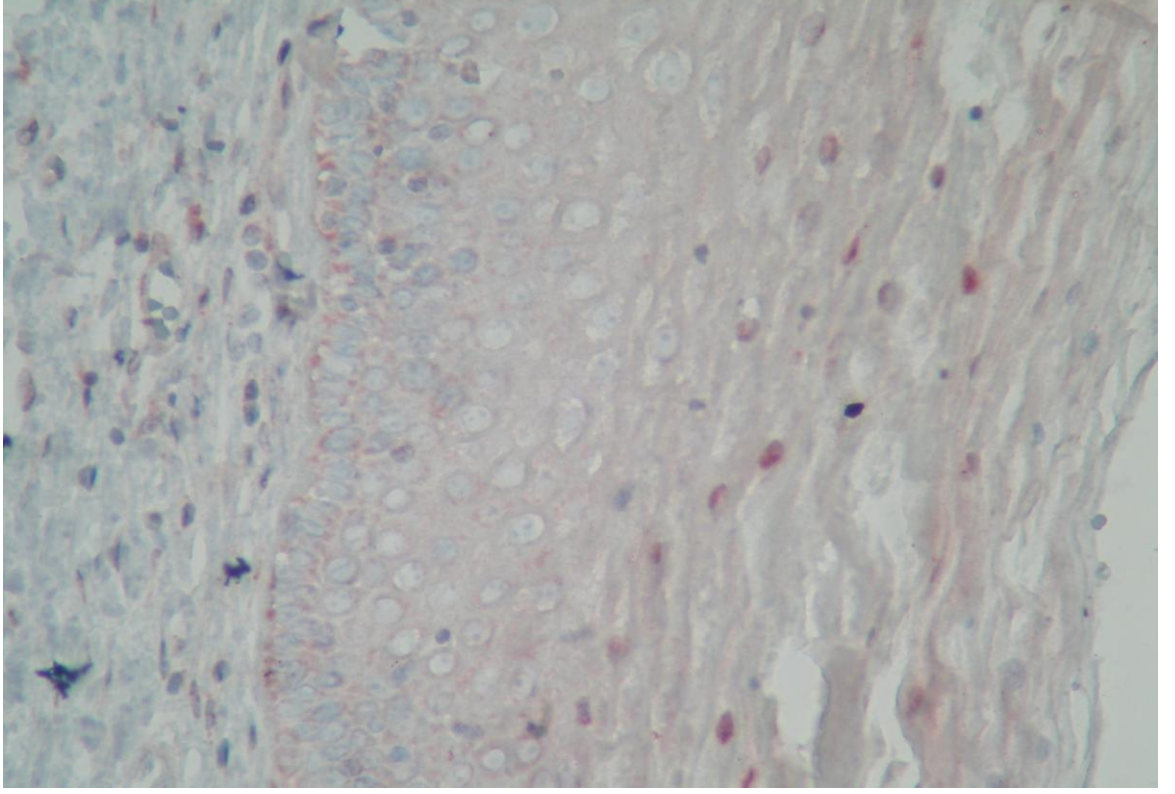
	Median	P
p16	3	0.000
Bcl-2	0	
Siklin D1	1	
p27	0	

Mann-Whitney U testi ile immün belirteçler arasında yapılan ikişerli karşılaştırmalı analize göre ; siklin D1-Bcl-2 (p=0.003), siklin D1-p16 (p=0.000),

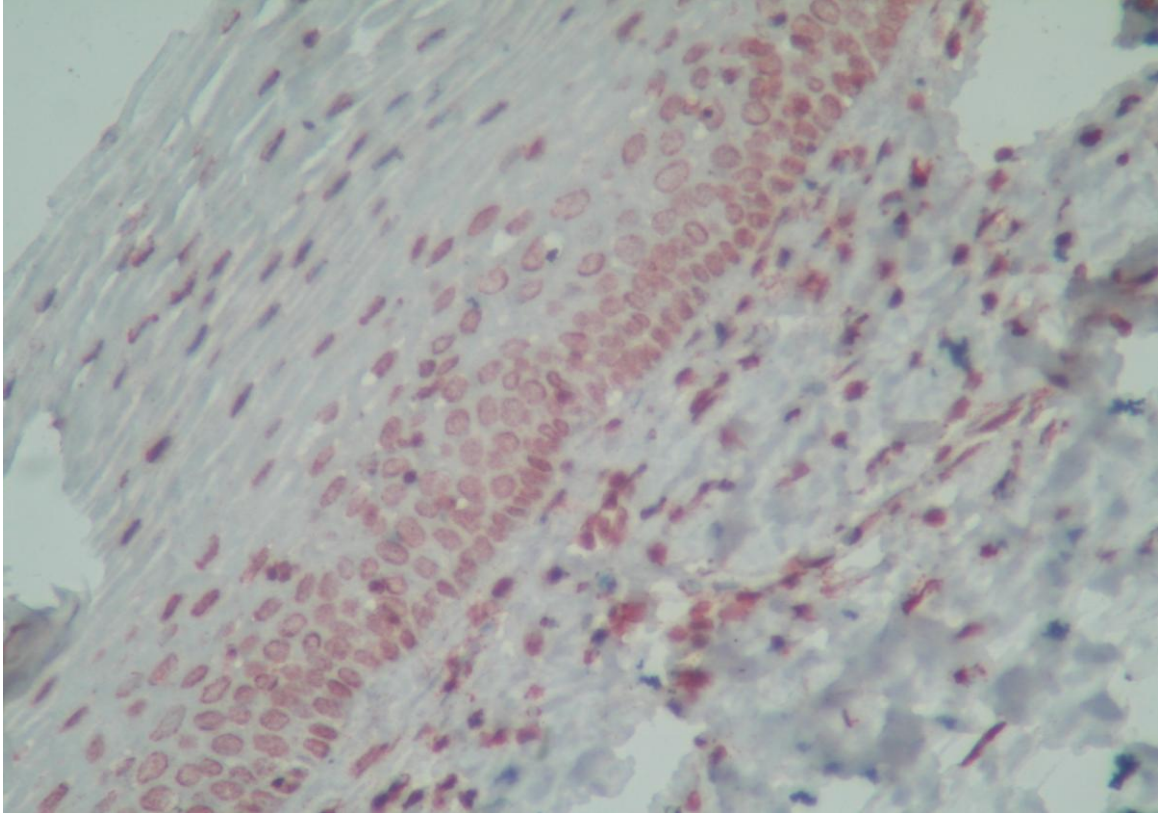
siklin D1-p27 (p=0.000), Bcl-2 - p16 (p=0.000), p16-p27 (p=0.000) ekspresyonları arasında istatistiksel anlamlılık izlendi. Bcl-2-p27 (p=0.591) ekspresyonları arasında istatistiksel anlamlılık izlenmedi.

Tablo 20: SCC olgularında p16, bcl-2, siklin D1, p27 ekspresyonunun istatistiksel olarak Mann-Whitney U testi ile ikili karşılaştırma sonuçları.

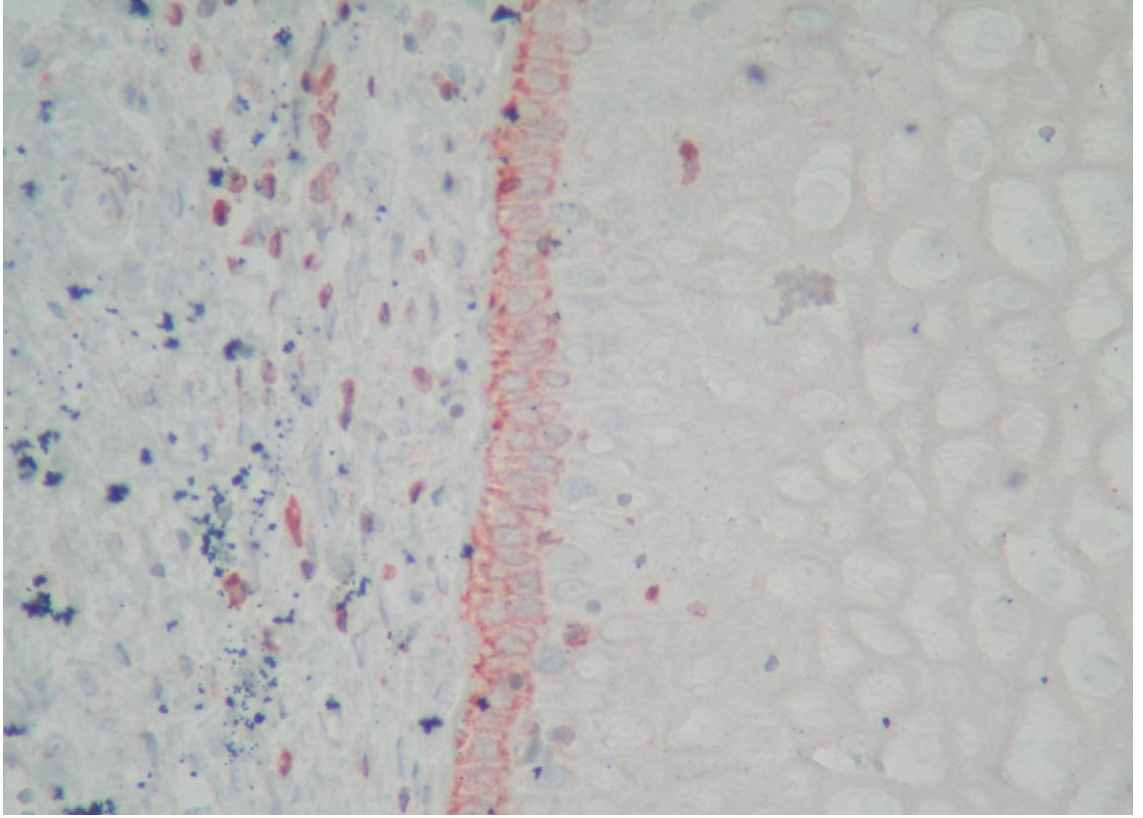
	Median	P
Siklin D1-Bcl-2	1-0	0.003
Siklin D1-p16	1-3	0.000
Siklin D1-p27	1-0	0.000
Bcl-2 - p16	0-3	0.000
Bcl-2-p27	0-0	0.591
p16-p27	3-0	0.000



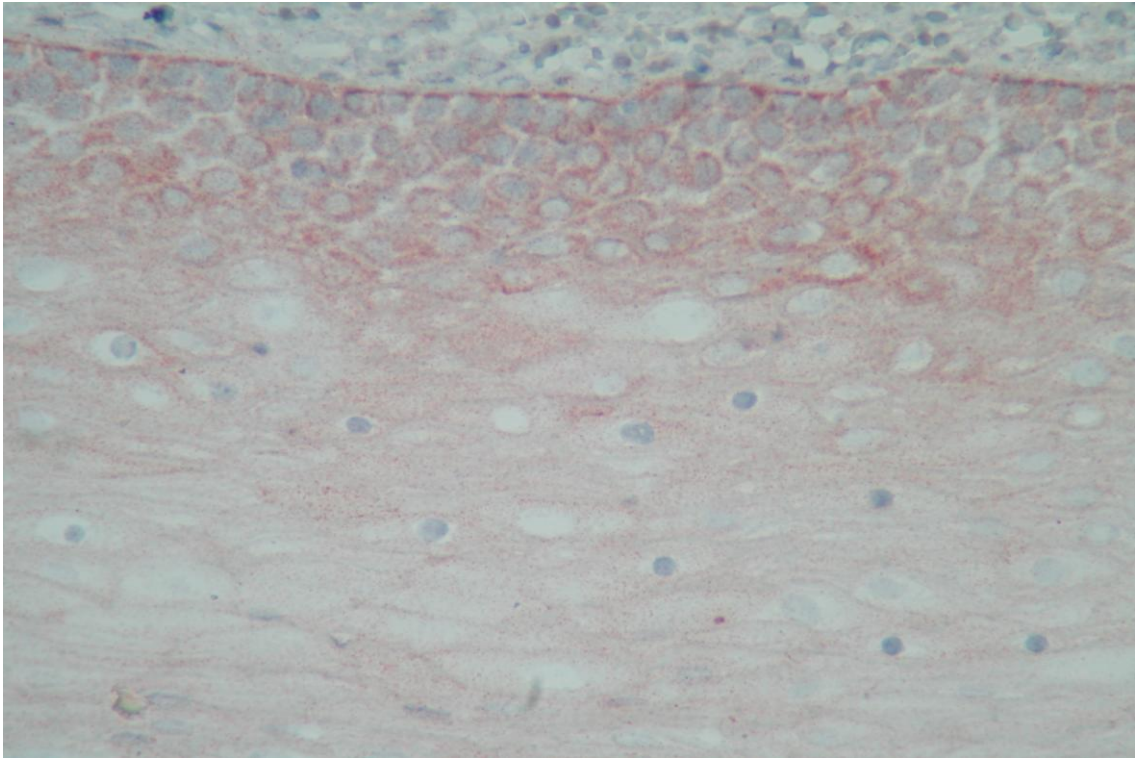
Şekil 1: Non-neoplazik serviks p27 ekspresyonu.



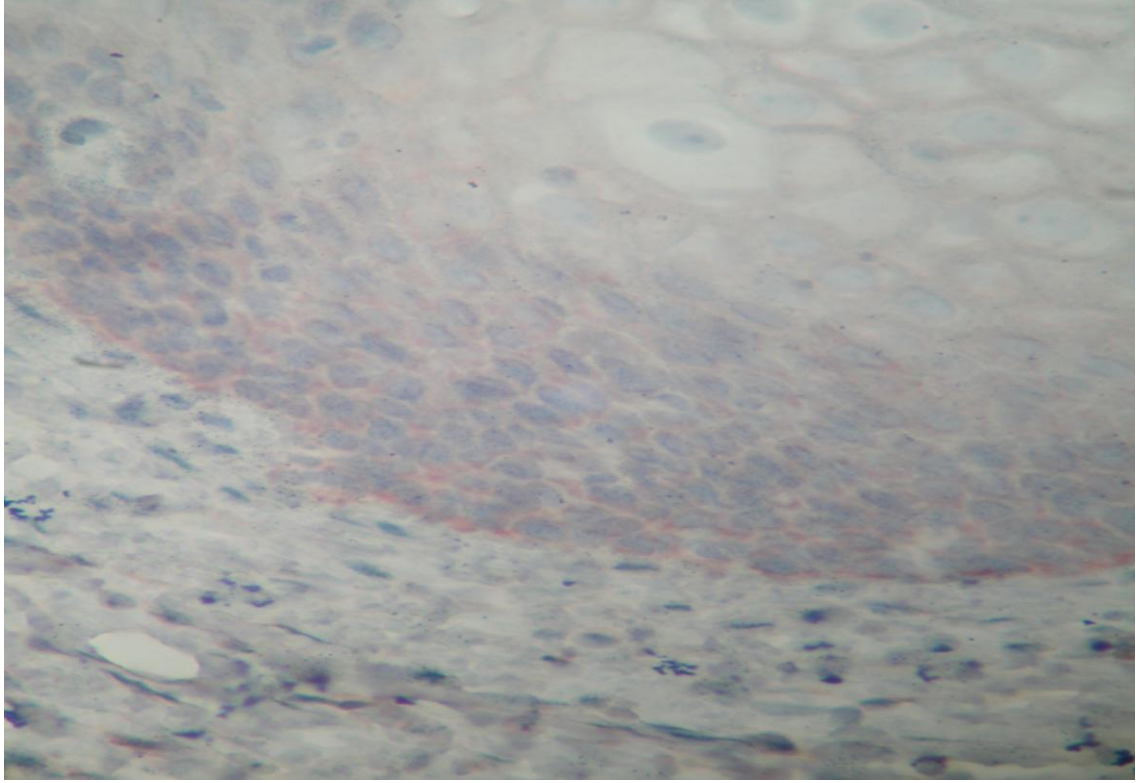
Şekil 2: Non-neoplazik serviks p16 ekspresyonu



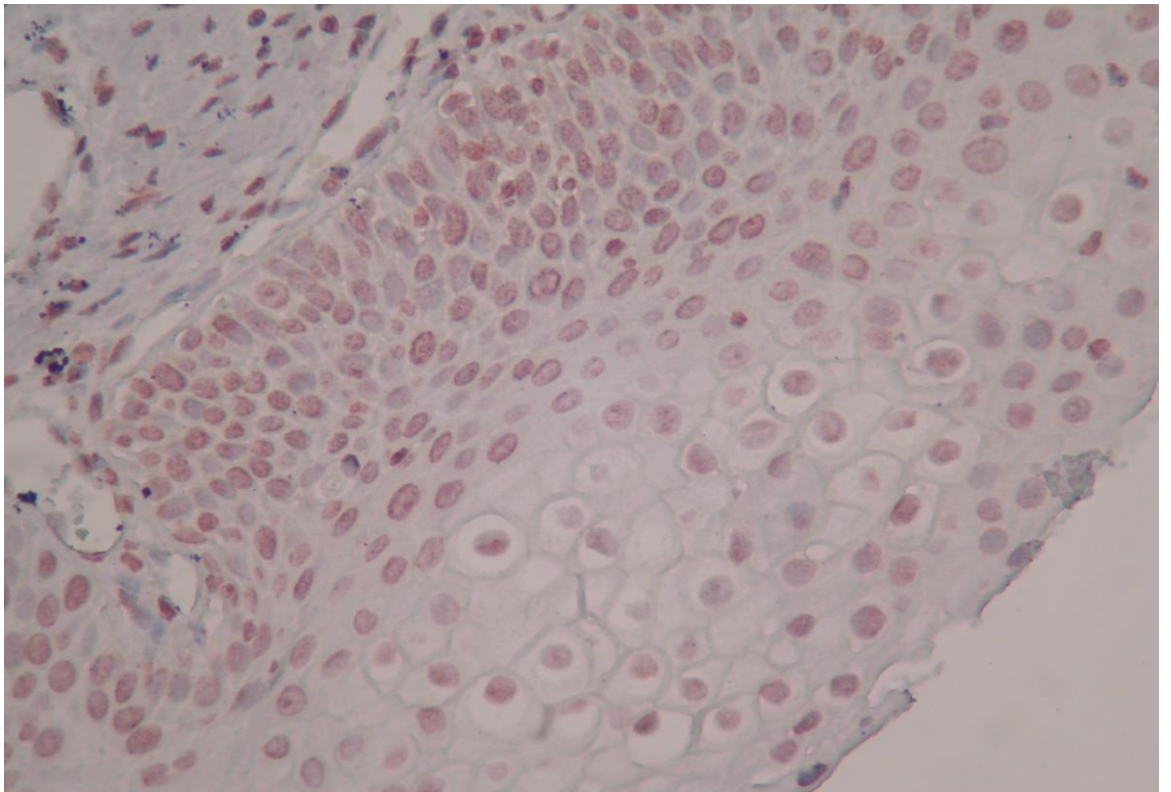
Şekil 3: Non-neoplazik serviks Bcl-2 ekspresyonu.



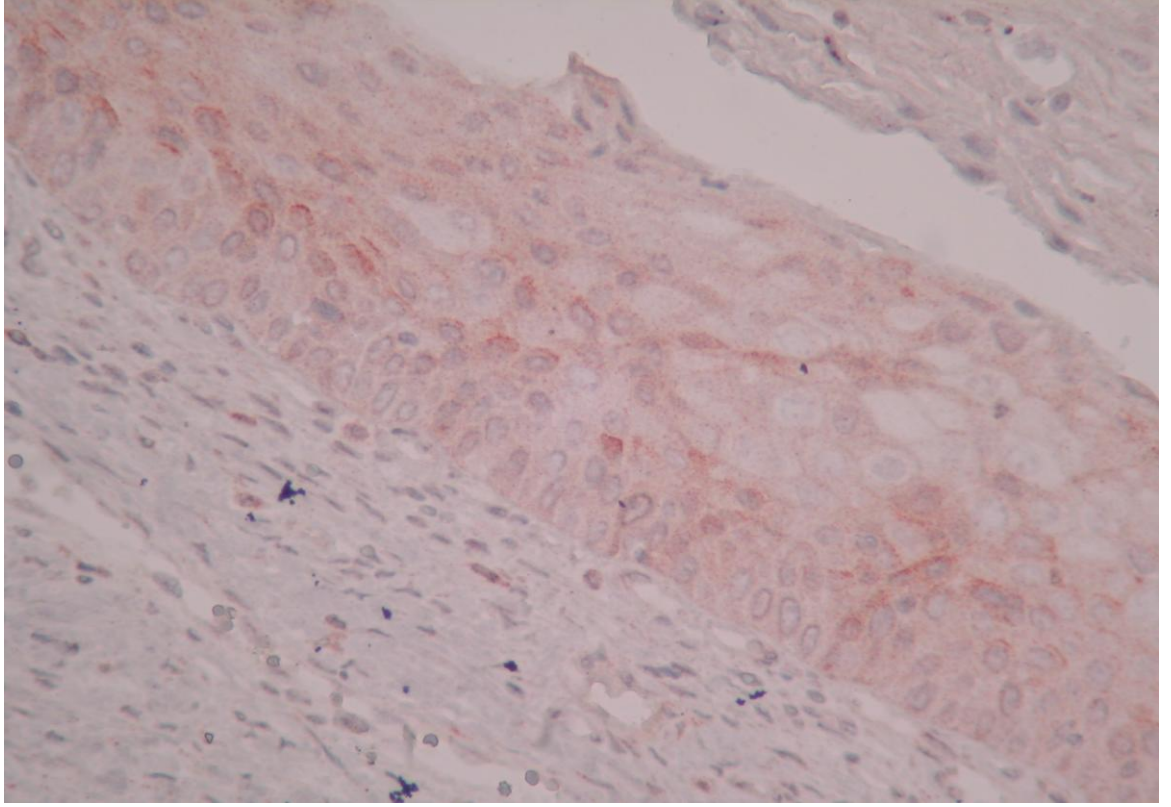
Şekil 4: Non-neoplazik serviks siklin D1 ekspresyonu.



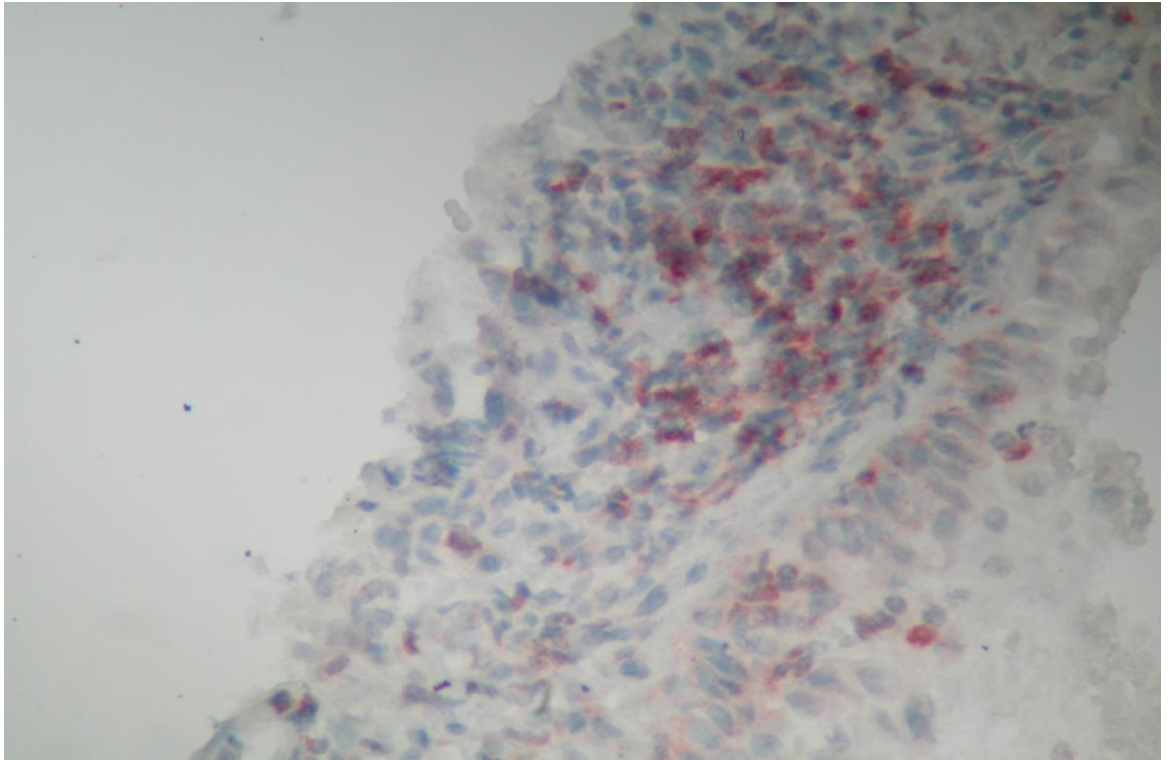
Şekil 5: LSIL p27 ekspresyonu.



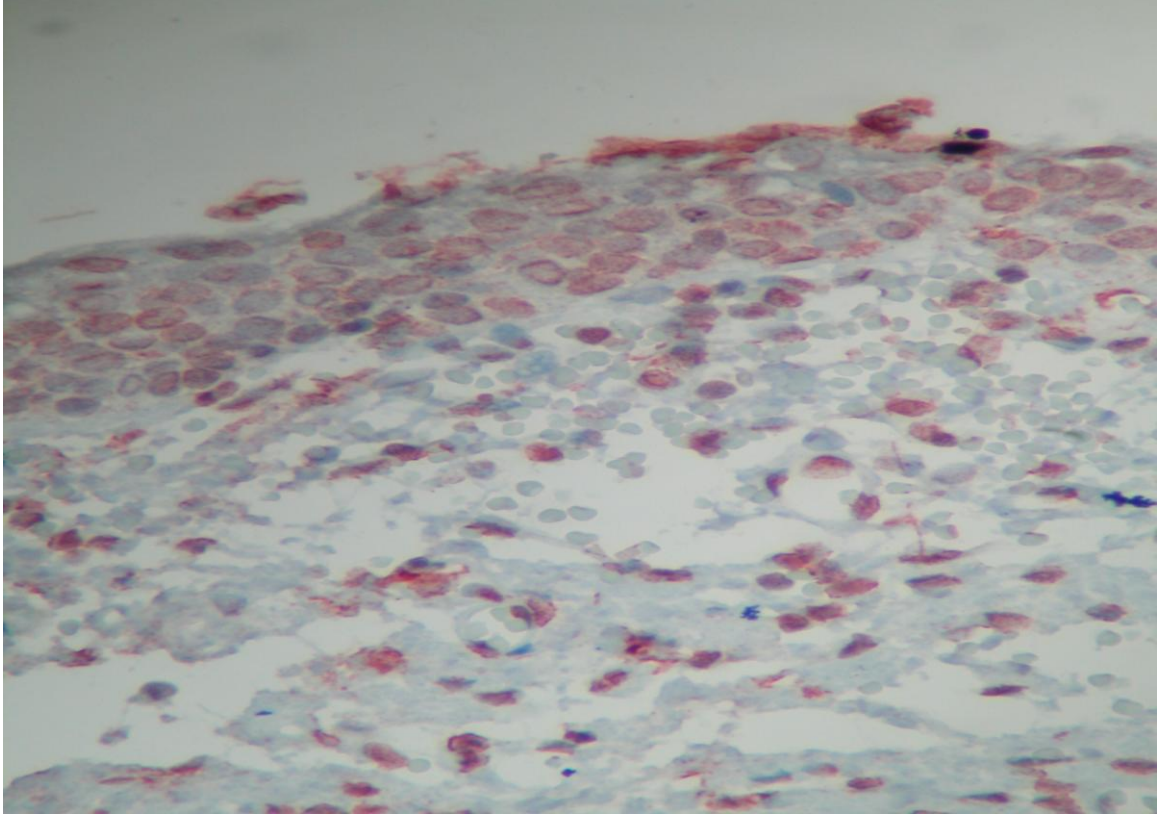
Şekil 6: LSIL p16 ekspresyonu.



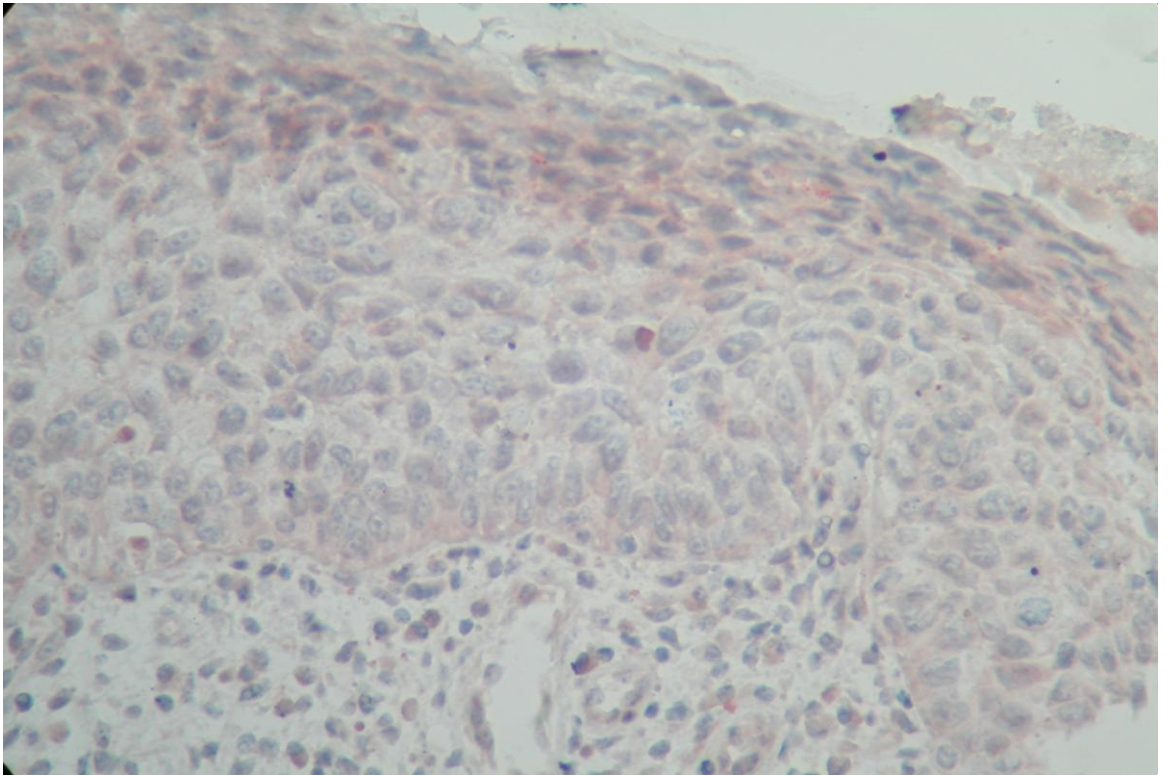
Şekil 7: LSIL siklin D1 ekspresyonu.



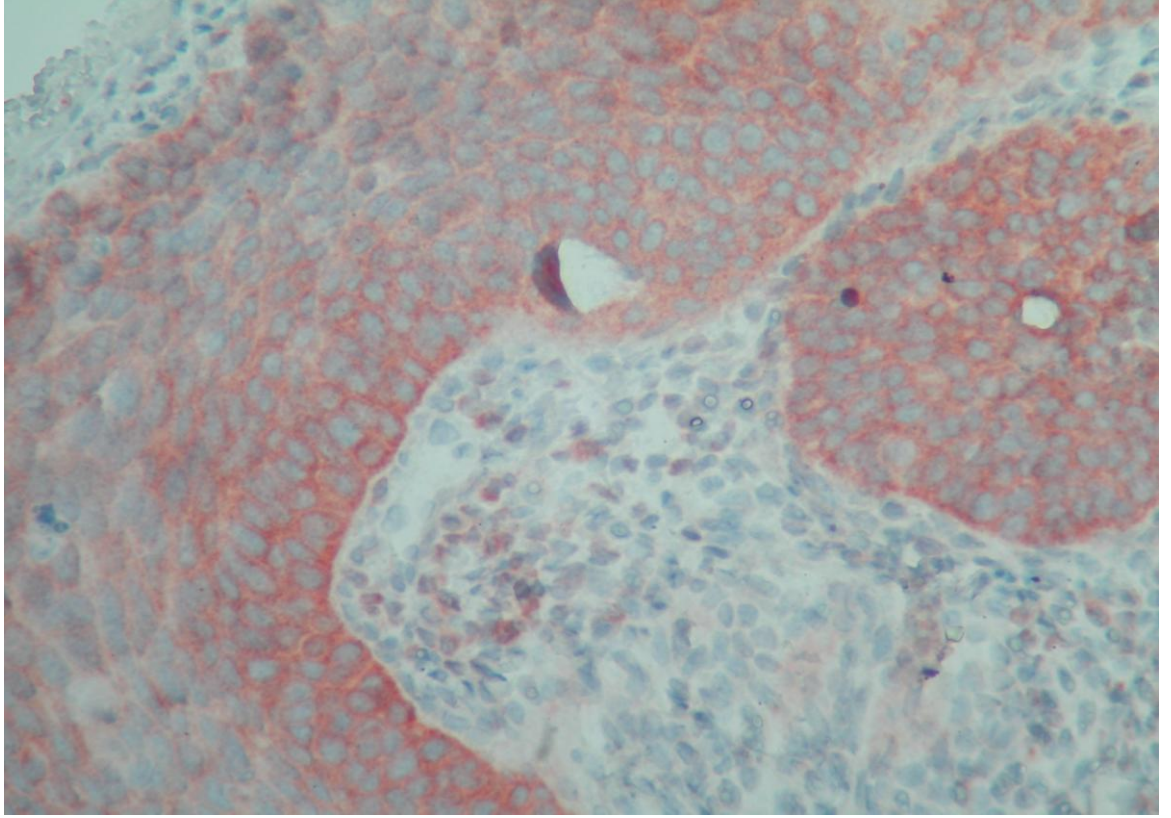
Şekil 8: LSIL Bcl-2 ekspresyonu.



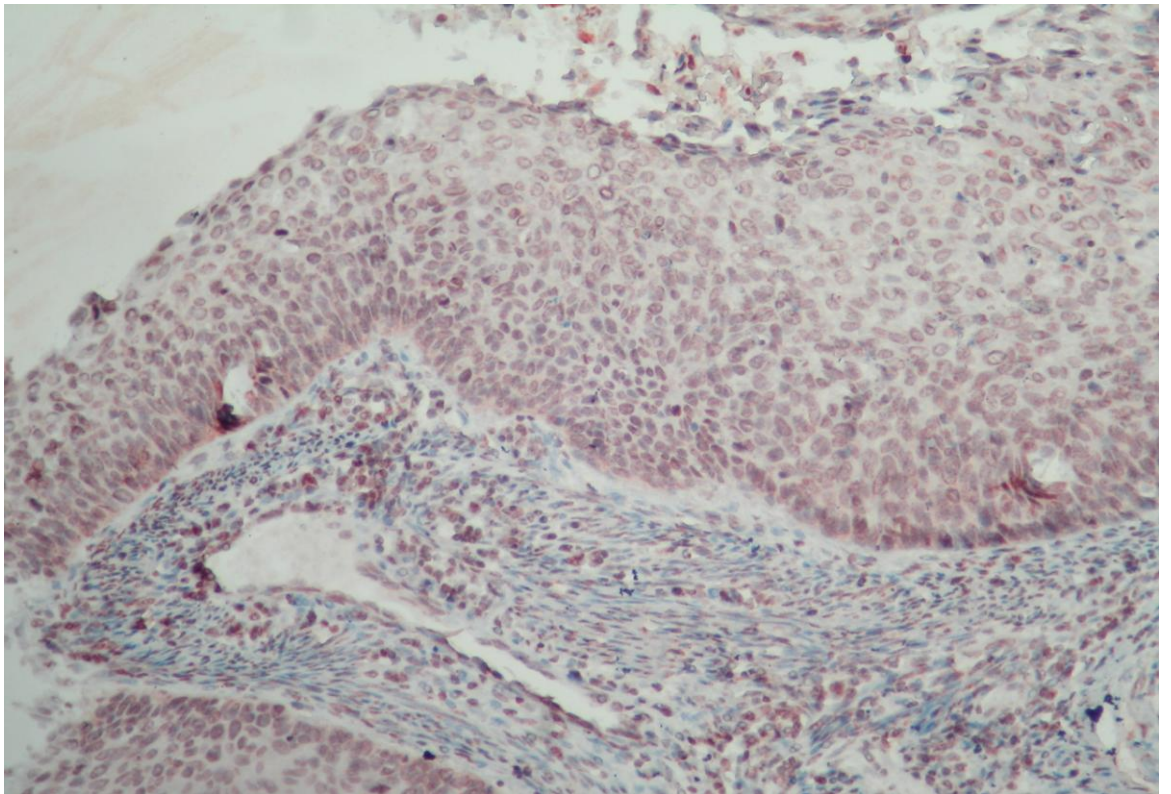
Şekil 9: HSIL p16 ekspresyonu.



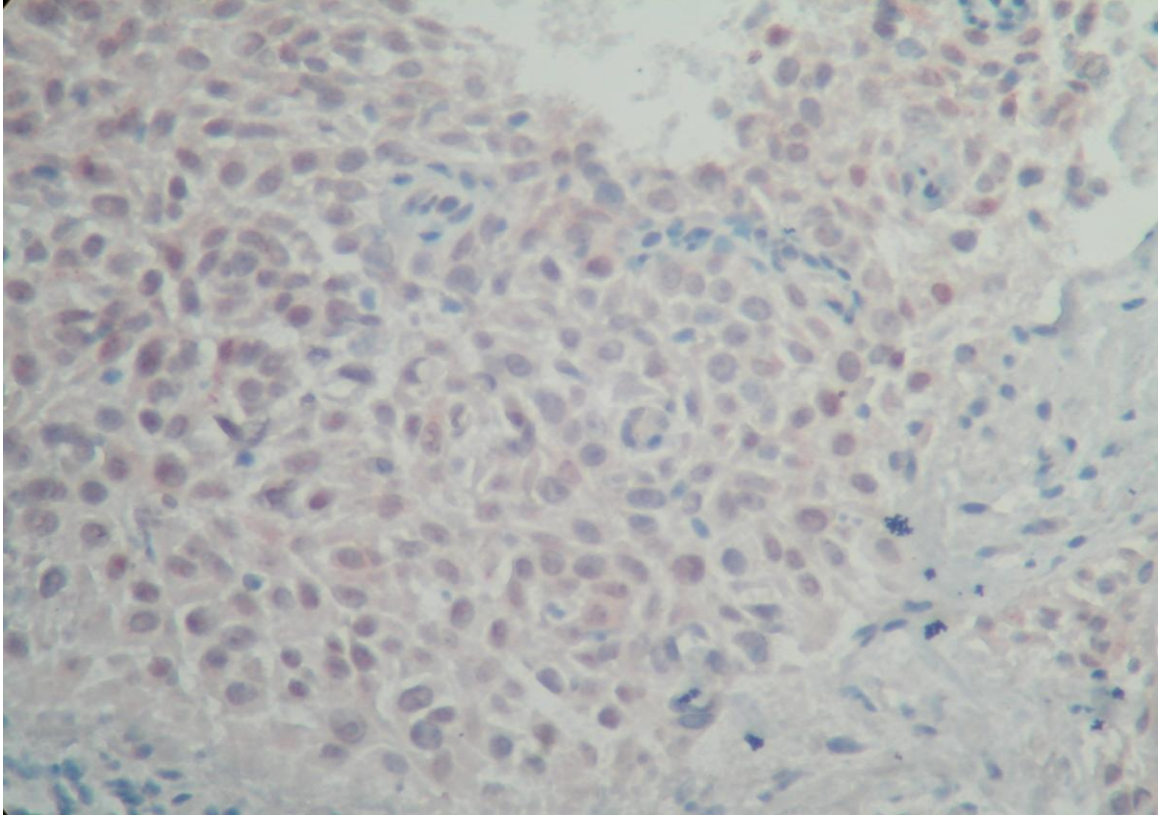
Şekil 10: HSIL siklin D1 ekspresyonu.



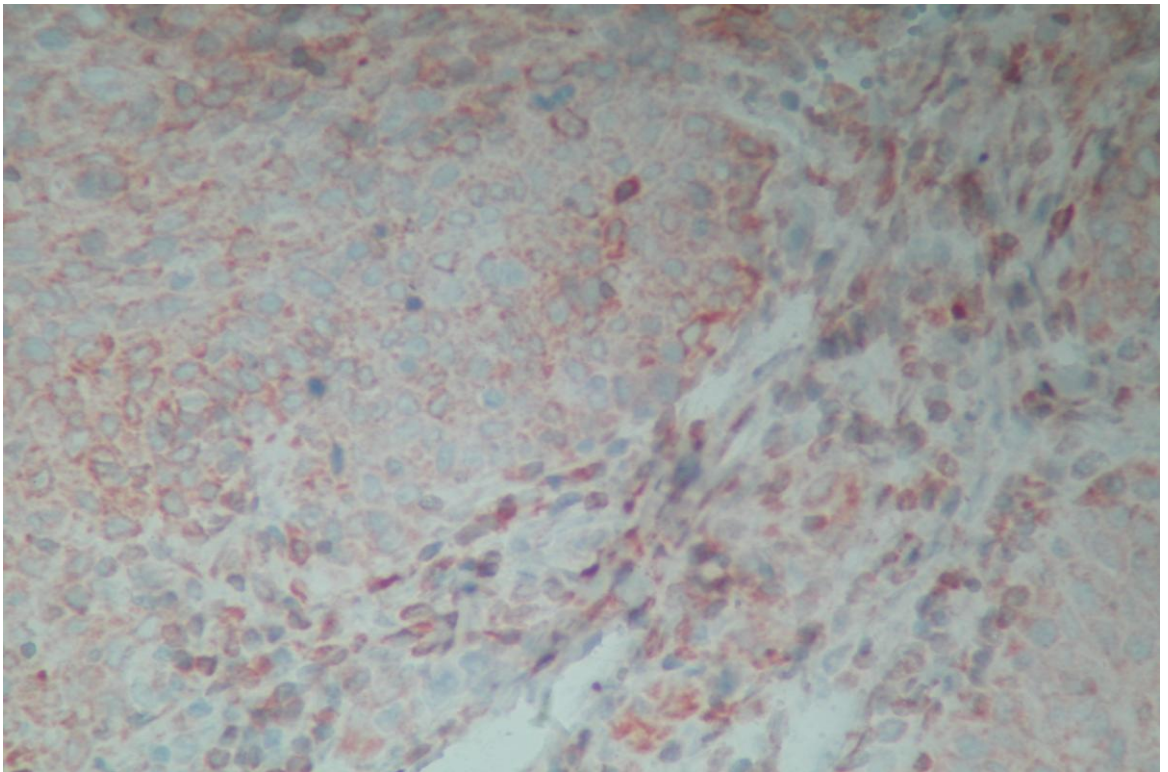
Şekil 11: HSIL Bcl-2 ekspresyonu.



Şekil 12: SCC p16 ekspresyonu



Şekil 13: SCC siklin D1 ekspresyonu.



Şekil 14: SCC Bcl-2 ekspresyonu.

5.TARTIŞMA

Dünyada serviks kanseri görülme sıklığı açısından yedinci sırada olmakla birlikte, kadınlarda meme kanserinden sonra ikinci en yaygın görülen kanserdir (5). Servikal karsinom gelişiminde en önemli etkenin HPV olduğu kabul görmüştür. Doğurganlık çağı süresince kadınların yüksek bir yüzdesi bir veya daha çok HPV tipi ile enfekte, olmakta ancak enfekte kadınların küçük bir yüzdesinde önce displazi, sonrasında kansere dönüşüm izlenmektedir. HPV infeksiyonunun latent kalmasını, prekansere veya kansere doğru gelişimini diğer kokarsinojenler, bireyin bağışıklık durumu, beslenme ve birçok faktör etkiler (6,38).

Yeşil ve ark. (98) tarafından biyopsi örneklerinin yeniden değerlendirildiği çalışmada, servikal biyopsi örneklerinin %20.9'unda yanlış negatiflik bulunmuş, bu sonucun 2/3'ü yorum hatasına bağlanmış. Elit'in (99) çalışmasında başlangıçta LSIL tanısı almış olgular tekrar değerlendirilmiş, bunların %36'sı normal skuamöz epitel tanısı almıştır. Yanlış pozitif ve yanlış negatiflik oranları yüksek bulunmuştur. Grenko ve ark. (100) tarafından yapılan çalışmada, sitolojik tanısı ASCUS olan olguların biyopsileri, deneyimli beş patolog tarafından bağımsız şekilde değerlendirilmiş, benignden SIL'e uzanan tanı aralığındaki %52 oranındaki olgunun, %28'inde uzlaşa sağlanabilmiş.

Morfolojik inceleme CIN tanı ve derecelendirilmesinde altın standarttır. Ancak ayırıcı tanıda ortaya çıkan güçlükler, lezyonun regrese mi olacağı, yoksa progrese olup invaziv karsinoma mı dönüşeceğinin bilinmemesi ve biyopsileri değerlendiren kişiler arası uyumsuzluklar, araştırmacıları objektif kriterler kullanmaya yöneltmiştir. Bütün bu nedenlerle lezyonların ayırımında immün belirteçlere ihtiyaç duyulmaktadır (50, 54, 55, 81, 100).

Sano ve ark. (82) ile Nieh ve ark. (101) yapmış oldukları bir çalışmada HR-HPV ile enfekte HSIL ve invaziv kanser olgularıyla, LSIL olgularının çoğunluğunda, sitoplazmik ve nükleer diffüz/güçlü p16 boyanması izlenmiş. LR-HPV ile enfekte lezyonlarda ise fokal/dağınık boyanma izlenmiş. Normal servikste ise zayıf boyanma izlenmiş. Çalışmada p16'nın HR-HPV ile enfekte serviks lezyonlarıyla, LR-HPV ile enfekte serviks lezyonları arasında ayırıcı ve özellikle de LSIL olgularının ayırımında faydalı olduğu vurgulanmış.

Gupta ve ark. (102) tarafından yapılan çalışmada p16 ile CIN'lerde epitelin 2/3'ünde SCC'de tam kat boyanma izlenmiş. Lesnikova ve ark. (14) ile Focchi ve

ark. (103) tarafından yapılan iki ayrı çalışmada, p16 ile HR-HPV ile enfekte gruplara yapılan boyamada lezyon derecesi arttıkça boyanmanın arttığı, normal servikste ise boyanma izlenmediği görülmüş. HSIL ve SCC gruplarında diffüz ve güçlü boyanma izlenmiş.

Murphy ve ark. (104,105,106) tarafından skuamöz ve glanduler CIN ile invaziv karsinom üzerine yapılan üç ayrı çalışmada, normal serviks epiteli, stroması ile endoservikal yüzey ve glanduler yapılarda boyanma izlenmemiş. Buna karşın invaziv kanser olgularıyla preneoplastik lezyonların tamamında değişen oranlarda p16 ile boyanma izlenmiş, p16'nın skuamöz ve glanduler CIN tespit etmede son derece faydalı olduğu ve tarama programlarında kullanılabileceği ileri sürülmüş.

Nam ve ark. (107) yaptıkları çalışmada nüks gösteren ve göstermeyen olgularda p16 ekspresyon oranlarını karşılaştırmış, düşük p16 ekspresyonun prognostik olarak anlamlı olduğu ve p16'nın displazinin derecesini saptamada progresyonu göstermede etkin olduğu ileri sürülmüş.

Feng ve ark. (38) ile Regauer ve Reich (53) tarafından yapılan çalışmalarda p16'nın reaktif veya atrofik skuamöz epitel gibi tanısal problemli olgular ile displazi ve invaziv karsinom arasında ayırıcı tanıda efektif olarak kullanılabileceğini ileri sürmüşler. Iaconis ve ark. (54) p16 ile Ki-67 beraber kullanımının atipik immatür metaplazi ayırıcı tanısında yardımcı olduğu fikrini desteklemişlerdir .

Son olarak mikroinvaziv ve invaziv serviks karsinomu üzerine yapılan bir başka çalışmada, tüm olgularda p16 ile kuvvetli diffüz nükleer/sitoplazmik boyanma izlenmiş. Tümöre bitişik normal skuamöz epitelde ise boyanma izlenmemiş, lezyonlu alanlar net bir şekilde izlenmiş (108).

Sonuçlarımız literatür ile uyumlu olup, CIN ve SCC olgularında p16 ile boyanma dağılımı arasında yapılan istatistiksel değerlendirmede, anlamlı bir fark izlendi ($p=0.000$). LSIL olgularında, epitelin alt 1/3'ünde boyanma izlenirken, HSIL ve SCC olgularında tam kat, nükleer ve sitoplazmik boyanma izlendi. Dikkat çekici olarak çalışmamızda non-neoplazik olguların %80'inde zayıf, %20'sinde orta derecede tam kat olmayan bazale sınırlı boyanma izlendi. Lezyonlu alanların çevresindeki fibroblastlar, inflamatuvar hücreler ve glanduler epitelde boyanma izlenmekle birlikte, p16 ile lezyonlu ve lezyonsuz alanlar belirgin bir sınırla ayrılmış olarak izlendi. Yapılmış olan çalışmaların genelinde normal serviks dokusunda

boyanma izlenmediği belirtilirken, Keating ve ark. (99) ile Sano ve ark.(100) lezyonsuz alanlarda p16 boyanması ile çalışmamıza benzer sonuçlar elde etmişlerdir.

İstatiksel çalışmada ikişerli karşılaştırma testlerine göre, non-neoplazik/LSIL, non-neoplazik/HSIL, non-neoplazik/SCC gruplarında birbirleriyle aralarında anlamlı bir ilişki bulundu. Sonuçlarımız literatür ile uyumlu olup p16'nın LSIL olgularının ayırımında güvenilir bir belirteç olduğunu düşündük.

Mikroinvaziv karsinom olgularında p16 ile boyanan ve boyanmayan alanların belirgin bir sınırla ayrılmış olmasının, mikroinvaziv karsinom olgularının değerlendirilmesinde patalogların işini oldukça kolaylaştıracağı görüşündeyiz.

p27 Kip1 geni tümör supresör bir gen olup hücre siklusunun G1 fazında negatif düzenleyici olarak görev alır. Normal epitel hücrelerinde artmış bir salınım söz konusu iken, tümör hücrelerinde sıklıkla kaybı izlenir (83, 84, 86, 87).

Goff ve ark. (109) yaptıkları çalışmada p27 ile normal serviks, LSIL ve HSIL olgularının tamamında kuvvetli boyanma izlemişler. Shiozowa ve ark. (110) ile Huang ve ark.(85) p27 ile normal serviks olgularının tamamında boyanma izlerken, süperfisyel ve intermedyer tabakaların bazal tabakaya göre daha güçlü bir boyandığını izlemişler. Huang ve ark. (85) ek olarak karsinomlu olgularda p27 ekspresyon kaybı ve lenf noduna metastaz arasında anlamlı bir korelasyon izlemişler. Troncone ve ark. (111) ile Sgambato ve ark. (112) yaptıkları çalışmada p27 ile normal servikste boyanma izlenirken, SIL'lerde hafif, SCC olgularında daha yüksek seviyede boyanma kaybı izlemişler. İnvaziv kanserlerde azalmış p27 düzeyini hücre siklusunun erken dönemde artmış neoplastik hücre proliferasyonuna bağlamışlar.

Kim ve ark. (113) SIL ve SCC olgularında p27 ile benzer oranlarda boyanma kaybı izlemişler. Nicol ve ark. (114) HIV/HPV koenfekte olgularla sadece HPV enfekte olguları karşılaştıran çalışmalarında, HIV/HPV koenfekte olgularda diğer gruba göre daha yüksek p27 ekspresyonu izlemişler.

Kim ve ark. (115) p27 düzeyi ile tümör çapı, derinliği, evresi ve yaşam süresi arasında anlamlı bir korelasyon bulmuşlar. p27'nin prognostik bir belirteç olarak kullanılabileceğini belirtmişler. Yapılan diğer çalışmalarda (85,113) düşük p27 düzeyi ile yaş, menapozal durum, tümör evresi ve diferansiasyonu arasında herhangi bir ilişki bulunmamış. Suzuki ve ark. (116) serviks kanserli hastalarda tedavi öncesi

ve sonrasında p27 ekspresyon düzeylerini karşılaştırdıklarında, tedavi sonrasında p27 ekspresyon oranının arttığını tespit etmişler.

Çalışmamızda p27 ile boyanma non-neoplazik serviksde süperfisyal ve intermedyer tabakalarda, SIL ve SCC’de daha çok bazalde, nükleer ve sitoplazmik boyanma şeklinde izlendi. SIL ve SCC’nin p27 ile boyanma dağılımı arasında istatistiksel değerlendirmede, anlamlı bir fark izlendi ($p=0.002$). En yüksek p27 ekspresyon oranı non-neoplazik grupta, en düşük p27 ekspresyon oranı invaziv karsinomlarda izlenmiştir. SIL’lerde ekspresyon oranı düşmüş, ancak LSIL ve HSIL arasında anlamlı bir farklılık izlenmemiştir.

İstatistiksel anlamda yaptığımız ikişerli karşılaştırma testlerine göre, non-neoplazik/LSIL, non-neoplazik/HSIL, non-neoplazik/SCC gruplarında birbirleriyle aralarında anlamlı bir ilişki bulundu. LSIL, HSIL ve SCC grupları arasında yapılan ikişerli karşılaştırma testleri ise anlamlı bulunmadı.

Bu sonuçlara göre çalışmamız p27’nin servikal karsinogenezisde görev aldığı ve prognostik bir faktör olarak ayırıcı tanıda kullanılabileceği fikrini desteklemektedir.

Siklin D1 hücre siklusunun G1 fazında sinyal iletiminde görevli bir proteindir (93). Siklin D1’in servikal karsinogenezisteki rolü, net olarak bilinmeyip tartışmalı sonuçlar mevcuttur.

Southern ve ark. (117) yaptıkları çalışmada siklin D1 ile LR- HPV ile enfekte LSIL olgularının %92’sinde bazal ve parabazal tabakalarda boyanma izlerken, HR- HPV’li olguların %87’sinde siklin D1 ile boyanma izlenmemiş. Normal epitelde zayıf boyanma gözlenmiş. Her iki grupta siklin D1 salınımındaki düzensizliğin iki farklı yolla oluştuğu ve LSIL’i meydana getirdiği ileri sürülmüştür.

Bae ve ark. (118) siklin D1 ile yaptıkları çalışmada, normal serviks olgularının tamamında boyanma izlerken, HSIL’de %3 oranında, SCC’de %28 oranında boyanma izlemişler. Cheung ve ark.(119) karsinomlu olgularda siklin D1 yüksekliğini kötü prognozün göstergesi olarak nitelemişler. Zamaro ve ark. (120) normal, LSIL, HSIL, SCC ve atipik immatür metaplazili gruplarda siklin D1 ile yaptıkları çalışmada sırasıyla %86, %90, %98, %100, %86 oranında boyanma izlemişler, gruplar arasında istatistiksel bir anlamlılık bulmamışlar. Çalışmada normal grupta boyanmanın bazale sınırlı, diğerlerinde tüm katmanlarda olması ve lezyon

derecesi arttıkça sitoplazmik boyanmanın artması anlamlı bulunmuş. Benzer bir çalışma yapan Bahnassy ve ark. (121) siklin D1 ile normal servikte boyanma izlemezken, HSIL ve SCC gruplarında artan derecelerde boyanma izlemişler.

Skomedal ve ark. (122) yaptıkları çalışmada siklin D1 ile SCC'li olguların % 2'sinde boyanma izlemişler. Yapılan çalışmalarda (118,121) siklin D1 ile tümör tipi, derecesi, evresi ve yaşı arasında anlamlı bir korelasyon saptanmamış.

Çalışmamızın sonuçları Zamaro ve ark. (120) yapmış oldukları çalışmada elde edilen sonuçlarla büyük oranda uyuştugu gözlemlendi. Servikal intraepitelyal neoplazili ve yassı hücreli karsinomların siklin D1 ile boyanma dağılımı arasında yapılan istatistiksel değerlendirmede, anlamlı bir fark izlenmedi ($p=0.061$). Non-neoplazik grupta bazal ağırlıklı zayıf boyanma izlenirken, diğer gruplarda tüm tabakaların tutulduğu güçlü sitoplazmik boyanma izlendi. İstatistiksel anlamda yaptığımız ikişerli karşılaştırma testlerinde anlamlı bir sonuç elde edilemedi.

Siklin D1 ile elde ettiğimiz sonuçlar ile siklin D1'in servikal karsinogeneziye rol oynadığını, ancak ayırıcı tanıda kullanılabilir bir belirteç olmadığını bulduk. Siklin D1 ile literatürden farklı sonuçların ortaya çıkması olgu sayımızın azlığından kaynaklanmış olabileceğini düşündük.

Bcl-2 geni ilk olarak B hücreli foliküler lenfomalarda tanımlanmış ve apoptoz inhibitörü olarak bilinmektedir. Hücre siklusunun G1 fazında hasarlı DNA'nın onarımı gerçekleştirilemediğinde, p53 aracılı Bcl-2 inhibisyonu ile apoptoz gerçekleşmektedir (41).

Harmsel ve ark. (123) yaptıkları çalışmada Bcl- 2 ile normal serviksde bazalde zayıf boyanma izlerken, CIN'lerde lezyon derecesi arttıkça boyanma artışı izlemişler. Bu durumun servikal karsinom gelişiminde apoptozise karşı artmış hücre proliferasyonunun rol oynadığının belirtisi olarak yorumlamışlar.

Munakata ve ark. (124) ile Crawford ve ark. (125) Bcl- 2 negatif hastalarda Bcl-2 pozitif hastalara göre sağ kalımın kısaldığını izlemişler. Guimaraes ve ark. (126) LSIL'li hastalar üzerine yaptıkları çalışmalarında Bcl-2 ile güçlü bir boyanma izlemişler. Aynı hastalara 9 ay sonra ikinci bir biyopsi yapıldığında, LSIL tanılı vakaların bir kısmının HSIL'e doğru ilerlediği ve Bcl-2 ile boyanmanın azaldığını izlemişler.

Dimitrakakis ve ark. (127) Bcl-2 ile yaptıkları çalışmalarında CIN'lerde lezyon derecesi yükseldikçe boyanmanın arttığını, SCC'de ise boyanma kaybı izlemişler. Bcl-2 pozitif hastalarda sağkalım süresini daha uzun bulmuşlar. Feng ve ark (38) yapmış oldukları çalışmada, normal serviksde bazalde zayıf boyanma izlerken, SIL'lerin tamamında ve SCC'lilerin ise sadece %30'unda, epitelin tüm tabakalarında olmak üzere boyanma izlemişler.

Saito ve ark. (128) benzer sonuçları serviks adenokarsinomlu hastalarla yaptıkları çalışmada elde etmişler.

Giarnieri ve ark. (129) Bcl-2 ile invaziv SCC'li olguların %65.2'sinde boyanma izlerken, Cis'li olguların %14.3'de Bcl-2 ile anlamlı bir boyanma izlemişler. Jain ve ark. (130) çalışmalarında Bcl-2'nin servikal lezyonlarda kullanılabilir bir belirteç olmadığını ileri sürmüşler. Fonseca-Moutinho ve ark. (131) HSIL ve mikroinvaziv olgular üzerine yaptıkları çalışmada Bcl-2 ile boyanmada anlamlı bir farklılık bulamamışlar, ancak ER, PR ve Bcl-2 pozitifliğinin düşük kanser riski bulunan HSIL'leri saptamada etkin olduğunu tespit etmişler.

Çalışmamızda servikal intraepitelyal neoplazili ve yassı hücreli karsinomların Bcl-2 ile boyanma dağılımı arasında yapılan istatistiksel değerlendirmede, anlamlı bir fark izlendi ($p=0.001$). İstatistiksel anlamda yaptığımız gruplar arası ikişerli karşılaştırma testlerinde anlamlı bir sonuç elde edilemedi. Non-neoplazik olguların bütününde bazal ağırlıklı zayıf sitoplazmik boyanma izlenirken, diğer gruplarda epitelin 2/3'de ya da tamamında zayıf-orta derecede boyanma izlendi. LSIL'de HSIL'e göre daha yüksek oranda boyanma izlenirken, SIL'li olguların genelinde SCC'li olgulara göre daha yüksek oranda boyanma izlendi. SCC'li olguların %55'inde boyanma izlenmedi.

Bcl-2 ile yaptığımız çalışmanın sonuçları diğer çalışmaların sonuçları ile büyük oranda paralellik gösterdiği izlendi. Çalışmamız Bcl-2'nin servikal karsinogenezişte rol oynadığını, servikal lezyonlarda prognostik bir belirteç olarak kullanılabileceği düşüncesini doğrular yöndedir. Servikal karsinomlu olgularda Bcl-2 ile boyanma kaybının izlenmesi, servikal karsinogenezişte apoptozun oynadığı rol hakkında daha fazla sayıda çalışma yapılması gerektiğini düşündürmüştür.

6. SONUÇLAR

- Çalışmamızda p16 ile LSIL olgularında, epitelin alt 1/3'ünde boyanma izlenirken, HSIL ve SCC olgularında tam kat, nükleer ve sitoplazmik boyanma izlendi. Non-neoplazik olgularda bazalde boyanma izlendi.
- Lezyonlu gruplar ile p16 arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık izlendi.
- p16 ile servikal lezyonların derecesi arasında bir korelasyon izlenmedi.
- LSIL olgularının tamamında p16 ile boyanma olması, non-neoplazik serviks ile LSIL ayırıcı tanısında kullanılabilir olduğu görüldü.
- SCC olgularında p16 boyanmasının, mikroyinvaziv SCC tanısında yardımcı olabileceği görüldü.
- p27 ile en yüksek boyanma oranı non-neoplazik servikte izlenirken, lezyonlu gruplarda daha düşük bir boyanma izlendi.
- Lezyonlu gruplar ile p27 arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık izlendi.
- Siklin D1 ile SCC'li grupta daha güçlü boyanma izlendi.
- Lezyonlu gruplar ile siklin D1 arasında istatistiksel anlamda farklılık izlenmedi.
- Bcl-2'nin en yüksek non-neoplazik grupta ve bazalde zayıf boyandığı izlendi.
- Bcl-2 ile SCC'li olguların %55'inde boyanma izlenmedi.
- Lezyonlu gruplar ile Bcl-2 arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık izlendi.
- Non-neoplazik grup ile diğer gruplar arasında, p16 ve p27 ile istatistiksel anlamda yapılan ikili karşılaştırma testlerinde anlamlı fark bulundu.
- p16, p27, siklin D1 ve Bcl-2 arasındaki ilişkiyi dörtlü karşılaştırma testiyle tüm gruplarda incelediğimizde, istatistiksel olarak anlamlı bir fark izlendi.
- LSIL'li olgularda immunohistokimyasal belirteçler arasında yapılan ikişerli karşılaştırma testlerinde göre tüm immunohistokimyasal belirteçler arasında anlamlı bir ilişki bulundu.
- HSIL'li olgularda immunohistokimyasal belirteçler arasında yapılan ikişerli karşılaştırma testlerinde sadece p27-Bcl-2, siklin D1-Bcl-2 arasında anlamlı bir ilişki bulunmadı.
- SCC'li olgularda immunohistokimyasal belirteçler arasında yapılan ikişerli karşılaştırma testlerinde sadece p27-Bcl-2 arasında anlamlı bir ilişki bulunmadı.

7. KAYNAKLAR

- 1- Arıncı K, Elhan A. Anatomi, sayfa. 431-432, Güneş Kitapevi, Ankara,1997.
- 2- WK Ovale, PC Nahirney. Netter Temel Histoloji. Müftüoğlu S, Kaymaz F, Atilla P. sayfa.399-425, Güneş yayınevi, Ankara, 2009.
- 3- Sadler TW. Langman's Medical Embryology. pp.15-278 Lippincot Williams &Wilkins, philadelphia, 2006.
- 4- Hendrickson MR, Atkins KA, Kempson RL: Uterus and fallopian tubes. Ed: Mills SE. Histology for Pathologists. pp.1011-1062, Lippincot Williams &Wilkins, philadelphia, 2007.
- 5- Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global Cancer Statistics, 2002. CA Cancer J Clin 2005;55:74-108.
- 6- Wells M, Östör AG, Crum CP, Franceschi S, Tommasino M. Tumours of the Uterine Cervix. In: World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs, pp.259-283. IARC Press, Lyon,2003.
- 7- Gustafsson L. Ponten J, Bergström R, Adami HO. International incidence rates of invasive cervical cancer before cytological screening. Int J Cancer 1997;71:159-165.
- 8-Bilir N. Serviks kanseri kontrolü çalışmaları ve HPV aşısı. Halk Sağlığı Uzmanları Derneği Teknik Raporları no:3, Ankara,2007.
- 9- Haverkos HW, Multifactorial etiology of cervical cancer: A Hypothesis,Med Gen Med 2005; 7: 57-61.
- 10- Zemheri E, Koyuncuer A. Servikal kanserlerin erken tanısında Pap testin önemi. STED 2005;14:1-4.
- 11- Aydın Ö, Polat A, Düsmez D, Eğilmez R. Mersin ilinde kanser sıklığı ve dağılımı üzerine bir çalışma. Türk Patoloji Dergisi. 2000;16:48-52.
- 12-Eser SY, Karakılınç H. Türkiyede Kanser İnsidansı. Ed: Tuncer MA, Özgül N, Gültekin M. Türkiyede Kanser Kontrolü. sayfa 51-65, Koza matbaacılık, Ankara, 2009.
- 13- Quint WGV, Pagliusi SR, Lelie N, Villiers E, Wheeler CM. Results of the First World Health Organization International collaborative Study of Detection of Human Papillomavirus DNA. Journal of clinical Microbiology.2006;44:571-579.

- 14- Lesnikova L, Lidang M, Dutoit SM, Koch J: p16 diagnostic marker of cervical neoplasia: a tissue microarray study of 796 archival specimens. *Diagnostic Pathology* 2009;4:22-29.
- 15- zur Hausen H. Papillomaviruses Causing Cancer: Evasion From Host-Cell Control in Early Events in Carcinogenesis *Journal of the National Cancer Institute*, 2000; 92:692-698.
- 16- Fakhry C, D'souza G, Sugar E, Weber K, Goshu E: Relationship between Prevalent Oral and Cervical Human Papillomavirus Infections in Human Immunodeficiency Virus-Positive and -Negative Women. *J C Microbiology* 2006;44:4479-4485.
- 17- Syrjanen S. Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. *Journal of Clinical Virology*. 2005;32:59–S66
- 18-Lazar AJF, Murphy GF: *The Skin*. Ed: Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease, pp.1165-1204, Elsevier, 2010.
- 19- Boshart M, Gissmann L, Ikenberg H, Kleinheinzl A, Scheurlen W, zur Hausen H: A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *The Embo Journal* 1984;3: 1151-1157.
- 20-zur Hausen H. Papillomavirus infections: a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta* 1996;1288:55-78.
- 21- Muller H, Bauch C: When Do Sexual Partnerships Need to Be Accounted for in Transmission Models of Human Papillomavirus? *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2010;7: 635-650
- 22-Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003; 348:518-527.
- 23- Kjaer SK, Chackerian B, van den Brule AJ. High-risk human papillomavirus is sexually transmitted: evidence from a follow-up study of virgins starting sexual activity (intercourse). *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001;10:101-106.
- 24- Partridge JM, Hughes JP, Feng O, Winer RL, Weaver BA, Long-Fu Xi: Genital Human Papillomavirus Infection in Men: Incidence and Risk Factors in a Cohort of University Students *The Journal of Infectious Diseases*. 2007; 196:1128-36.

- 25-Sonnex C, Strauss S, Gray JJ. Detection of human papillomavirus DNA on the fingers of patients with genital warts. *Sex Transm Infect* 1999;75:317-326.
- 26-Castellsague X, Bosch FX, Munoz N, Meijer CJ, Shah KV, de Sanjose S, Eluf-Neto J, Ngelangel CA, Chichareon S. Male circumcision, penile human papillomavirus infection, and cervical cancer in female partners. *N Engl J Med* 2002;346:1105-1117.
- 27- Liaw KL, Hildesheim A, Burk RD, Gravitt P, Wacholder S, Manos MM : A Prospective Study of Human Papillomavirus (HPV) Type 16 DNA Detection by Polymerase Chain Reaction and Its Association with Acquisition and Persistence of Other HPV Types. *The Journal of Infectious Diseases*. 2001;183:8-15.
- 28- L Fu Xi, LA. Koutsky, PE. Castle, ZR. Edelstein, Relationship between cigarette smoking and human papillomavirus type 16 and 18 DNA load *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009;8:3490-3496.
- 29-Chaturvedi AK, Kleinerman RA, Hildseheim A, Gilbert ES, Storm H, Lynch CF, Hall P. Second Cancers After Squamous Cell Carcinoma and Adenocarcinoma of the Cervix. *J Clin Oncol* 2009; 27:967-973.
- 30- Harris TG, Miller L, Kulasingam SL, Feng Q, Kiviat NV Depot-medroxyprogesterone Acetate and Combined Oral Contraceptive Use and Cervical Neoplasia among Women with Oncogenic Human Papillomavirus Infection. *A J Obstet Gynecol*. 2009;200: 489-489.
- 31- Smith JS, Green J, Berrington DG, Appleby P, Peto J, Plummer M, Franceschi S, Beral V. Cervical cancer and use of hormonal contraceptives: a systematic review. *Lancet* 2003;361:1159-67.
- 32-Cheney J. Cervical cancer and screening. In: *IARC Handbooks of Cancer Prevention, Cervix Cancer Screening*. pp.1-57, IARC Pres, Lyon, 2005.
- 33- Madeleine MM, Anttila T, Schwartz SM, Saikku P. Risk of cervical cancer associated with Chlamydia trachomatis antibodies by histology, HPV type and HPV cofactors. *Int J. Cancer*: 2006,120:650–655.
- 34-Palefsky JM, Holly EA. Immunosuppression and Co-infection with HIV. *J National Cancer Inst Monogr*. 2003; 6:41-47.

- 35-Brinton LA, Schiffman M: Barakat RR, Maurie M, Randall ME (Eds). Principles and Practice of Gynecologic Oncology. chap:1:1-21. Lippincott Williams & Wilkins. 2009.
- 36- Cooper D, Hoffman M, Carrara H, Rosenberg L, Kelly J, Stander I, Denny L, Williamson AL, Shapiro S. Determinants of sexual activity and its relation to cervical cancer risk among South African Women BMC Public Health 2007;7:341-349.
- 37-International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer Cervical carcinoma and reproductive factors: Collaborative reanalysis of individual data on 16,563 women with cervical carcinoma and 33,542 women without cervical carcinoma from 25 epidemiological studies. Int. J. Cancer 2006;119:1108-1124.
- 38-Feng W, Xiao J, Zhang Z, Rosen DG, Brown RE. Senescence and apoptosis in carcinogenesis of cervical squamous carcinoma. Modern Pathology. 2007;20:961-966.
- 39-Kim YT, Zhao M. Aberrant Cell Cycle Regulation in Cervical Carcinoma. Yonsei Medical Journal. 2005;46: 597 - 613.
- 40- Stricker TP, Kumar V.The Neoplasia. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC.Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease, Elsevier. 8th ed. 2010;259-330.
- 41- Sasi N, Hwang M, Jaboin J, Csiki I, Lu B.M Regulated cell death pathways: New twists in modulation of BCL2 family function ol Cancer Ther 2009;8:1421-1429.
- 42- Cellular Response to Stres and Toxic Insults: Adaptation, Injury and Death: Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease, pp.3-42, Elsevier,2010.
- 43-Rosai J. Female reproductive system In: Rosai and Ackerman's Surgical Pathology. pp.1523-1549, Elsevier, 2004.
- 44- NCI. SEER cancer statistics review. 2004;1975-2001. Available at www.seer.ims.nci.nih.gov
- 45- Jacobs MV, Snijders PJF, Voorhorst FJ, Voorhorst FJ, Dillner J, Forslund O, Johansson B. Reliable high risk HPV DNA testing by polymerase chain reaction: an intermethod and intramethod comparison. J Clin Pathol 1999;52:498-503.

- 46-McCluggage WG, Walsh MY, Thornton CM, et al. Inter- and intra-observer variation in the histopathological reporting of cervical intraepithelial lesions using a modified Bethesda grading system. *Br J Obstet Gynaecol*. 1995;105:206–10.
- 47- Parker MF, Zahn CM, Vogel KM, Olsen CH, Miyazawa K, O'Connor DM. Discrepancy in the interpretation of cervical histology by gynecologic pathologists. *Obstet Gynecol* 2002;100:277-280
- 48- 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-LSI L Triage Study. *JAMA* 2001;285:1500-1505.
- 49- Baal JPA, Stoler MH, Bean SM, Anderson MC, Robboy SJ. Cervical Precancer (intraepithelial neoplasia), Including Functional Biomarkers and Colposcopy. Ed: Robboy SJ, Mutter GL, Prat J, Bentley RC, Russell P, Anderson MC. Robboy's pathology of the female reproductive tract. pp.189-226. Churchill Livingstone Elsevier, 2009.
- 50-Kalof NA, Cooper K. Our approach to squamous intraepithelial lesion of the uterine cervix. *J Clin Pathol* 2007; 60:449-455
- 51- Crum CP, Nucci MR. The Cervix. Mills SE, Carter D, Greenson JK, Reuter VE, Stoler MH. In: Sternberg's Diagnostic Surgical Pathology. pp.2131-2183. Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins, 2010.
- 52- Harmon ML, Cooper K. Cervical Neoplasia. Nucci. MR, Oliva E. Gynecologic Pathology. pp. 141-196, Elsevier, 2009.
- 53- Regauer S, Reich O. CK17 and p16 expression patterns distinguish (atypical) immature squamous metaplasia from high-grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN III). *Histopathology* 2007; 50, 629–635.
- 54- Iaconis L, Hyjek E, Ellenson L, Pirog EC. p16 and Ki-67 Immunostaining in Atypical Immature Squamous Metaplasia of the Uterine Cervix Correlation With Human Papillomavirus Detection. *Arch Pathol Lab Med*. 2007;131:1343–1349.
- 55- Pinto AP, Schlecht NF, Woo TC, Crum CP, Cibas ES. Biomarker (ProEx™ C, p16INK4A, and MiB-1) distinction of high-grade squamous intraepithelial lesion from its mimics. *Modern Pathology*. 2008; 21:1067–1074.

- 56- Burghardt E, Östör A, Fox H. The New FIGO Definition of Cervical Cancer Stage IA: A Critique. *Gynecologic Oncology*. 1997;65, 1–5.
- 57- Nafussi AA, Hughes DE. Histological features of CIN3 and their value in predicting invasive microinvasive squamous carcinoma *J Clin Pathol* 1994;47:799-804.
- 58- Reich O, Pickel H, Tamussino K, Winter R. Microinvasive Carcinoma of the Cervix: Site of First Focus of Invasion. *Obstet Gynecol* 2001; 97:890-892.
- 59-Wang SS, Sherman ME, Hildesheim A, et al: Cervical adenocarcinoma and squamous cell carcinoma incidence trends among white women and black women in the United States for 1976-2000. 2004; *Cancer* 100:1035-1044.
- 60- Jemal A, Thomas A, Murray T, et. Al. Cancer istatistics, 2002. *CA CAnce J Clin* 2002;52:23-47.
- 61- Pecorelli S, Odicino F. Cervical cancer staging. *Cancer J*. 2003;9:390:394.
- 62- Mutter GL, Ferency A. Uterus cervix. Robert J. Kurman, MD. Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract. Fifth Edition. 2001; 9: 383.
- 63-Ioffe OB, Henry MR. Uterin cervix. Silverberg SG, DeLellis RA, Frable WJ, Livolsi VA, Wick MR. *Surgicial Pathology and Cytopatholgy*. Elsevier. 5th ed. 2006;1831-1884.
- 64- Crissman JD, Makuch R, Budhreja M. Histopathologic Grading of Squamous Cell Carcinoma of the Uterine Cervix An Evaluation of 70 Stage Ib Patients *Cancer* 1985; 55:1590-1596.
- 65- Leon DC, Montiel DP, Tabarez A, Martinez RM, Cetina L. Serous adenocarcinoma of the fallopian tube, associated with verroccous carcinoma of the uterine cervix: a case report of synchronic rare gynecological tumors. *World Journal of Surgical Oncology* 2009, 7:20.
- 66-Koenig C, Turnicky RP, Kankam CF, Tavassoli FA. Papillary Squamotransitional Cell Carcinoma of the Cervix: A Report of 32 Cases. *J Surgical Pathology*. 1997;21:915-921.
- 67- Kwon YS, Kim YM, Choi GW, KimYT, Nam JH. Pure Basaloid Squamous Cell Carcinoma of the Uterine Cervix: A Case Report. *J Korean Med Sci* 2009; 24: 542-5.
- 68- Tseng CJ, Pao CC, Tseng LH, Chang CT, Lai CH. Lymphoepithelioma-Like Carcinoma of the Uterine Cervix. *Cancer* 1997;80:91–7.

- 69- Steeper TA, Piscioli F, Rosai J. Squamous Cell Carcinoma With Sarcoma-Like Stroma of the Female Genital Tract Cancer 52:890-898, 1983.
- 70- Smedts F, Ramaekers F, Troyanovsky S, Pruszczynski M, Link M. Keratin Expression in Cervical Cancer. American Journal of Pathology 1992;2:141.
- 71- Maddox P, Sasieni P, Szarewski A, Anderson M, Hanby A. Differential expression of keratins 10, 17, and 19 in normal cervical epithelium, cervical intraepithelial neoplasia, and cervical carcinoma J Clin Pathol 1999;52:41-46.
- 72- Wang TY, Chen BF, Yang YC. Histologic and immunophenotypic classification of cervical carcinomas by expression of the p53 homologue p63: a study of 250 cases. Human Pathology 2001;32:479-486.
- 73- Malpica A, Deavers MT, Euscher E. Squamous lesions of the uterine cervix. Biopsy Interpretation of the uterine Cervix and Corpus. pp.16-48. Lippincott Williams & Wilkins, 2010.
- 74- Chae SW, Sohn JH, Kim DH, Choi YJ, Park YL, Kim K, Cho YH, Pyo JS, Kim JH. Overexpressions of Cyclin B1, cdc2, p16 and p53 in Human Breast Cancer: The Clinicopathologic Correlations and Prognostic Implications. Yonsei Med J 2011;52:445-453
- 75- Ding GC, Ren JL, Chang FB, Li JL, Yuan L, Xin Song, Zhou SL, Guo T, Fan ZM, Zeng Y, Dong L. Wang Human papillomavirus DNA and P16INK4A expression in concurrent esophageal and gastric cardia cancers. World J Gastroenterol .2010;16:5901-5906.
- 76- Lee CT, Capodice P, Osman I, Fazzari M, Ferrara J, Scher HI, et al. Overexpression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 is associated with tumor recurrence in human prostate cancer. Clin Cancer Res 1999;5:977-83.
- 77- Dong Y, Walsh MD, McGuckin MA, Gabrielli BG, Cummings MC, Wright RG, et al. Increased expression of cyclin-dependent kinase inhibitor 2 (CDKN2A) gene product P16INK4A in ovarian cancer is associated with progression and unfavourable prognosis. Int J Cancer 1997;74:57-63.
- 78- Looi K, Megliorino R, Shi FD, Peng XX, Chen Y, Zhang JY. Humoral immune response to p16, a cyclin-dependent kinase inhibitor in human malignancies. Oncol Rep 2006;16:1105-10.

- 79- Villuendas R, Beato MS, Martinez JC, Saez AI, Delgado BM, García JF, Mateo MS Verde LS, Benítez J, Martinez P, Piris MA. Loss of p16/INK4A Protein Expression in Non-Hodgkin's Lymphomas Is a Frequent Finding Associated with Tumor Progression American Journal of Pathology. 1998;153:887-897.
- 80- Ye Y, Wang D, Su C, Rong T, Guo A. Combined detection of p53, p16, Rb, and EGFR mutations in lung cancer by suspension microarray. Genet. Mol. Res. 2009;8:1509-1518.
- 81- Keating JT, Ince T, Crum CP. Surrogate biomarkers of HPV infection in cervical neoplasia screening and diagnosis. Adv Anat Pathol 2001;8:83-92.
- 82- Sano T, Oyama T, Kashiwabara K, et al. Expression status of p16 protein is associated with human papillomavirus oncogenic potential in cervical and genital lesions. Am J Pathol. 1998;153(6): 1741-8.
- 83- Esposito V, Baldi A, De Luca A, Groger AM, Loda M, Giordano GG, Caputi M, Baldi F, Pagano M, Giordano A: Prognostic role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in non-small lung cancer. Cancer Res. 1997; 57:3381-3385.
- 84- Tsihlias J, Kapusta LR, Deboer G, Morava-Protzner I, Zbieranowski I, Bhattacharya N, Catzavelos GC, Klotz LH, Slingerland JM. Loss of cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 is a novel prognostic factor in localized human prostate adenocarcinomas. Cancer Res. 1998;58: 542- 8.
- 85- Huang LW, Chao SL, Hwang JL, Chou YY. Downregulation of p27 is associated with malignant transformation and aggressive phenotype of cervical neoplasms. Gynecol Oncol. 2002;85:524-8.
- 86- Newcomb EW, Sosnow M, Demopoulos RI, Zeleniuch-Jacquotte A, Sorich J, Speyer JL. Expression of the cell cycle inhibitor p27Kip1 is a new prognostic marker associated with survival in epithelial ovarian tumors. Am J Pathol 1999;154:119-25.
- 87- Tan P, Cady B, Wanner M, Worland P, Cukor B, Fiorentino M, Magi-Galluzzi C, Lavin P, Pagano M, Loda M: The cell cycle inhibitor p27 is an independent prognostic marker in small (T1a, b) invasive breast carcinomas. Cancer Res. 1997; 57:1259-1263.
- 88- Ciaparrone M, Yamamoto H, Yao Y, Sgambato A, Cattoretti G, Tomita N, Monden T, Rotterdam H, Weinstein B. Localization and Expression of p27KIP1 in Multistage Colorectal Carcinogenesis. Cancer Research. 1998;58:114-122.

- 89- Kim DH. Prognostic Implications of Cyclin B1, p34 cdc32, p27 and p53 Expression in Gastric Cancer. *Yonsei Medical Journal*. 2007;48:694-700.
- 90- Donnellan R, Chetty R. Cyclin D1 and human neoplasia *J Clin Pathol:Mol Pathol* 1998;51:1-7.
- 91- Stamatakis M, Palla V, Karaikos I, Xiromeritis K, Alexiou I, Pateras I, Kontzoglou K. Cell cyclins: triggering elements of cancer or not?. *World Journal of Surgical Oncology* 2010;8:111
- 92- Kim JY, Diehl JA. Nuclear cyclin D1: An oncogenic driver in human cancer. *J Cell Physiol*. 2009;220: 292-296.
- 93- Nguyen PL, Haris NL, Ritz J, Robertson MJ. Expression of CD95 Antigen and Bcl-2 Protein in Non-Hodgkin's Lymphomas and Hodgkin's Disease. *American journal of Pathology*. 1996;148: 847-853.
- 94- Pollina L, Pacini F, Fontanini G, Vignati S, Bevilacqua G, Basolo F. bcl-2, p53 and proliferating cell nuclear antigen expression is related to the degree of differentiation in thyroid carcinomas. *British Journal of Cancer*. 1996;73:139-143
- 95- Sjöström J, Blomqvist C, Boguslawski K, Bengtsson NO, Mjaaland I, Malström P, Ostenstadt B, Wist E, Valverius V, Takayama S, Reed JC, Saksela E. The Predictive Value of bcl-2, bax, bcl-xL, bag-1, fas, and fasL for Chemotherapy Response in Advanced Breast Cancer. *Clinical Cancer Research* 2002;8:811-816.
- 96- Henriksen R, Wilander E, Oberg K. Expression and prognostic significance of Bcl-2 in ovarian tumours. *British Journal of Cancer*. 1995;72:1324-1329.
- 97- Sinicrope FA, Hart J, Hsu HA, Lemoine M, Michelassi F, Stephens LC. Apoptotic and Mitotic Indices Predict Survival Rates in Lymph Node-negative Colon Carcinomas. *Clinical Cancer Research*. 1999; 5:1793-1804.
- 98- Yeşil C, Önder S, Boynukalın K, Ergül Ö, Fırat P, Kuzey GM, Usubütün A. Serviksin premalign lezyonlarında sitolojik ve histopatolojik tanımlar arasındaki ilişki. *Türk patoloji dergisi*. 2010; vol 26:38-43.
- 99- Elit LM. Pitfalls in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia I. *J Low Genit Tract Dis* 2004 ; 8 :181-187.
- 100- Grenko RT, Abendroth CS, Fraumeni EE, et al. Variance in the interpretation of cervical biopsy specimens obtained for atypical squamous cells of undetermined significance. *Am J Clin Pathol* 2000;114:735-740.

- 101- Nieh S, Chen SF, Chu TY, Lai HC, Lin YS, Fu E, Gau CH. Is p16INK4a expression more useful than human papillomavirus test to determine the outcome of atypical squamous cells of undetermined significance categorized Pap smear? A comparative analysis using abnormal cervical smears with follow-up biopsies. *Gynecol Oncol* 2005;97: 35- 40.
- 102- Gupta R, Srinivasan R, Nijhawan R, Suri V, Uppal R. Protein p16INK4A expression in cervical intraepithelial neoplasia and invasive squamous cell carcinoma of uterine cervix. *Indian Journal of Pathology and Microbiology*. 2010;53:7-11.
- 103- Focchi GR, Silva ID, Nogueira-de-Souza NC, Dobo C, Oshima CT, Stavale JN. Immunohistochemical Expression of p16(INK4A) in Normal Uterine Cervix, Nonneoplastic Epithelial Lesions, and Low-grade Squamous Intraepithelial Lesions. *Journal of Lower Genital Tract Disease*. 2007;11:98-104.
- 104- Murphy N, Ring M , Killalea AG, Uhlmann G, O'Donovan M, Mulcahy F, Turner M, McGuinness E, Griffin M, Martin C. p16INK4A as a marker for cervical dyskaryosis: CIN and cGIN in cervical biopsies and ThinPrep smears. *J Clin Pathol* 2003; 56 :56-63.
- 105- Murphy N, Heffron CCB, King B, Ganuguapati UG, Ring M , McGuinness E, Sheils O, O'Leary JJ. P16INK4A positivity in benign, premalignant and malignant cervical glandular lesions: a potential diagnostic problem. *Virchows Arch* 2004;445:610–615
- 106- Murphy N, Ring M, Heffron CCB, King B, Killalea AG, Hughes C, Martin CM, McGuinness E, Sheils O, O'Leary JJ. p16INK4A, CDC6, and MCM5: predictive biomarkers in cervical preinvasive neoplasia and cervical cancer. *J Clin Pathol*. 2005;58:525–534.
- 107- Nam EJ, Kim JW, Kim SW, Kim YT, Kim JH, Yoon BS, Cho NH, Kim S. The expressions of the Rb pathway in cervical intraepithelial neoplasia; predictive and prognostic significance. *Gynecol Oncol* 2007;104:207-211.
- 108- Jedpiyawongse A, Homcha P, Karalak A, Srivatanakul. Immunohistochemical Overexpression of p16 Protein Associated with Cervical Cancer in Thailand. *Asian Pacific J Cancer Pre*. 2008;9:625-630.
- 109- Goff BA, Sallin J, Garcia R, VanBlaricom A, Paley PJ, Muntz HG. Evaluation of p27 in preinvasive and invasive malignancies of the cervix. *Gynecol Oncol*

2003;88: 40-4.

110-Shiozawa T, Shiohara S, Kanai M, Konishi I, Fujii S, Nikaido T. Expression of the cell cycle regulator p27 (KIP1) in normal squamous epithelium, cervical intraepithelial neoplasia, and invasive squamous cell carcinoma of the uterine cervix. Immunohistochemistry and functional aspects of p27(KIP1). *Cancer* 2001;92:3005-11.

111- Troncone G, Vetrani A, de Rosa G, Gerbasio D, Palombini L. Cyclin dependent kinase inhibitor p27KIP1 expression in normal and neoplastic cervical epithelium. *J Clin Pathol.* 1999;52:880-7.

112- Sgambato A, Zannoni GF, Faraglia B, Camerini A, Tarquini E, Spada D, et al. Decreased expression of the CDK inhibitor p27KIP1 and increased oxidative DNA damage in the multistep process of cervical carcinogenesis. *Gynecol Oncol* 2004;92:776-83.

113- Kim YT, Choi EK, Cho NH, Ko JH, Yang WI, Kim JW. Expression of cyclin E and p27KIP1 in cervical carcinoma. *Cancer Lett* 2000;153:41-50.

114- Nicol AF, Pires ARC, Souza SR, Nuovo GJ, Grinsztejn B, Tristão A, Russomano FB, Velasque L, Silva JRL, Pirmez C. Cell-cycle and suppressor proteins expression in uterine cervix inHIV/HPV co-infection: comparative study by tissue micro-array (TMA). *BMC Cancer.* 2008; 8:289.

115- Kim JY, LimSJ, Kim HJ, Shin E, Park K, Lee CM. Clinical significance of p27 and Skp2 protein expression in uterine cervical neoplasm. *Int J Gynecol Pathol.* 2007;26:242-247.

116- Suzuki Y, Nakano T, Ohno T, Oka K. Comparison of the radiobiological effect of carbon ion beam therapy and conventional radiation therapy on cervical cancer. *J Radiat Res.* 2008;49:473-478.

117- Southern SA, Herrington CS. Differential cell cycle regulation by low- and high-risk human papillomaviruses in low-grade squamous intraepithelial lesions of the cervix. *Cancer Res.* 1998;58:2941-5.

118- Bae DS, Cho SB, Kim YJ, Whang JD, Song SY, Park CS, Kim DS, Lee JH. Aberrant Expression of Cyclin D1 Is Associated with Poor Prognosis in Early Stage Cervical Cancer of the Uterus *Gynecologic Oncology.* 2001; 81:341–347.

- 119- Cheung TH, Yu MM, Lo KW, Yim SF, Chung TK, Wong YF. Alteration of cyclin D1 and CDK4 gene in carcinoma of uterine cervix. *Cancer Lett* 2001;166:199-206.
- 120- Zamora PC, Doménech-Peris A, Orantes-Casado FJ, Reina SO, Frías LS, Ortega JA, Solano JG, Guillermo MP. Effect of Human Papillomavirus on Cell Cycle-Related Proteins p16, Ki-67, Cyclin D1, p53, and ProEx C in Precursor Lesions of Cervical Carcinoma. *Am J Clin Pathol*. 2009;132:378-390.
- 121- Bahnassy AA, Zekri AR, Saleh M, Lotayef M, Moneir M, Shawki O. The possible role of cell cycle regulators in multistep process of HPV-associated cervical carcinoma. *BMC Clin Pathol*. 2007;7:4.
- 122- Skomedal H, Kristensen GB, Lie AK, Holm R. Aberrant expression of the cell cycle associated proteins TP53, MDM2, p21, p27, CDK4, cyclin D1, RB, and EGFR in cervical carcinomas. *Gynecol Oncol*. 1999;73:223-8
- 123- Harmsel BT, Smetds F, Kuijpers J, Junink M, Trimbos B, Ramaekers F. Bcl-2 immunoreactivity increases with severity of: CIN a study of normal cervical epithelia, CIN, and cervical carcinoma. *Journal of Pathology*. 1996; 179:26-30.
- 124- Munakata S, Watanabe O, Ohashi K, Morino H. Expression of Fas Ligand and bcl-2 in Cervical Carcinoma and Their Prognostic Significance. *Am J Clin Pathol* 2005;123:879-885
- 125- Crawford RAF, Caldwell C, Iles RK, Lowe D, Shepherd JH, Chard T. Prognostic significance of the bcl2 apoptotic family of proteins in primary and recurrent cervical cancer. *British Journal of Cancer*. 1998; 78:210-214.
- 126- Guimaraes MCM, Gonçalves MAG, Soares CP, Betini JSR, Duarte RA, Soares ER. Immunohistochemical Expression of p16INK4a and bcl-2 According to HPV Type and to the Progression of Cervical Squamous Intraepithelial Lesions. *J Histochem Cytochem*. 2005;53:509-516
- 127- Dimitrakakis C, Kymionis G, Diakomanolis E, Papaspyrou I, Rodolakis A, Arzimanoglou I, Leandros E, Michalas S. The Possible Role of p53 and bcl-2 Expression in Cervical Carcinomas and Their Premalignant Lesions. *Gynecologic Oncology*. 2000; 77:129-136
- 128- Saito T, Takehara M, Tanaka R, Lee R, Horie M, Wataba K, Ito E, Kudo R. Correlation between responsiveness of neoadjuvant chemotherapy and apoptosis-

associated proteins for cervical adenocarcinoma. *Gynecologic Oncology*. 2004;92:284–292

129- Giarnieri E, Mancini R, Pisani T, Alderisio M, Vecchione A. Msh2, Mlh1, Fhit, p53, Bcl-2, and Bax Expression in Invasive and in Situ Squamous Cell Carcinoma of the Uterine Cervix1*Clinical Cancer Research*. 2000;6:3600-3606.

130- Jain D, Srinivasan R, Patel FD, SK Gupta. Evaluation of p53 and Bcl-2 Expression as Prognostic Markers in Invasive Cervical Carcinoma Stage IIb/III Patients Treated by Radiotherapy. *Gynecologic Oncology*. 2003;88:22-28.

131- Fonseca-Moutinho JA, Cruz E, Carvalho L, Prazeres HJM, Lacerda MMP, Silva DP, Mota F, Oliveira CF. Estrogen receptor, progesterone receptor, and bcl-2 are markers with prognostic significance in CIN III. *Int J Gynecol Cancer*. 2004;14:911-920