



T.C.

BOLU ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

TIBBİ PATOLOJİ ANABİLİM DALI

**YÜKSEK RİSK GRUBUNDAKİ HPV TİPLERİ İLE OLAN
ENFEKSİYONLARDA SERVİKS EPİTELİNDEKİ SUPRESÖR
GEN DEĞİŞİKLİKLERİ, İNFLAMASYON VE MORFOLOJİK
DEĞİŞİKLİKLERİN İLİŞKİSİ**

UZMANLIK TEZİ

DR. NUR TUNÇ KARABEKİROĞLU

BOLU, EKİM - 2021



T.C.
BOLU ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ PATOLOJİ ANABİLİM DALI

**YÜKSEK RİSK GRUBUNDAKİ HPV TİPLERİ İLE OLAN
ENFEKSİYONLARDA SERVİKS EPİTELİNDEKİ SUPRESÖR
GEN DEĞİŞİKLİKLERİ, İNFLAMASYON VE MORFOLOJİK
DEĞİŞİKLİKLERİN İLİŞKİSİ**

UZMANLIK TEZİ

DR. NUR TUNÇ KARABEKİROĞLU

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Çetin BORAN

BOLU, EKİM - 2021

TEZ ONAY BELGESİ

	BOLU ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI	DOKÜMAN KODU: ASS. FR.06
		YAYIN TARİHİ:11.06.2020
		REVİZYON NO 00
		REVİZYON TARİHİ:00
TEZ ONAY BELGESİ		SAYFA NO:01

Adayın Adı Soyadı : Nur Tunç KARABEKİROĞLU
Anabilim Dalı/Bilim Dalı : Tıbbi Patoloji
Tezin Başlığı : Yüksek risk grubundaki HİV tipleri ile ağız enfeksiyonlarında
serviks epitelindeki supressör gen değişiklikleri, inflamasyon
ve morfolojik değişikliklerin ilişkisi
Tezin Danışmanı : Prof. Dr. Cetin BORAN
Tezin Savunma Tarihi : 11.10.2021

Jüri Başkanı Prof. Dr. Cetin Boran

Üye

Doç. Dr. Hediye Mireyyen Aşhan

Üye

Dr. Öğr. Üyesi Selma Erdem Öz

DEKANLIK ONAYI

Bu tez Uzmanlık Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Muhammet Güzel KURTOĞLU
DEKAN V.

ETİK BEYAN

Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Tıp Fakültesi Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Bilimsel ve etik kurallara uyulduğunu,
- Başkalarının eserinden yararlanılması halinde atıfta bulunulduğunu,
- Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını,
- Tezin bir kısmı veya tamamının başka bir yerde tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

DR. NUR TUNÇ KARABEKİROĞLU

TEŞEKKÜR

Asistanlık eğitimim süresince engin bilgi, beceri ve deneyimlerinden faydalandığım, çalışma disiplini, iş ahlakı ve etik kurallara bağlılığı ile kendime örnek edindiğim, mesleki tecrübelerimin oluşmasında önemli katkıları bulunan tez danışmanım saygıdeğer hocam **Prof. Dr. Çetin BORAN**'a,

Asistanlığa başladığım andan itibaren bilgi ve deneyimlerini aktararak iyi bir patoloji uzmanı olmam için değerli katkılarını esirgemeyen gerek asistanlık sürecimde gerekse özel hayatımda her daim varlığını yanımda hissettiğim, her zaman yolumu aydınlatan ve bizleri sahiplenerek değerli hocam **Doç. Dr. Hesna Müzeyyen ASTARCI**'ya,

Asistanı olmaktan her zaman büyük keyif aldığım, insani, mesleki ve bilimsel açıdan üzerimde büyük emeği olan, bilgi ve tecrübelerini fedakârca bizlerle paylaşan, eğitimim süresince hiçbir konuda yardım ve desteğini esirgemeyen kıymetli hocam **Dr. Öğr. Üyesi Selma ERDOĞAN DÜZCÜ**'ye,

Tezimin istatistik aşamasında büyük emeği olan Halk Sağlığı Anabilim Dalı öğretim üyesi değerli hocam **Dr. Öğr. Üyesi Aysu KIYAN**'a,

Birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum ve her zaman dostluklarıyla yanımda olan sevgili çalışma arkadaşlarım Dr. Ertunç ÇİNPOLAT, Dr. Eda Hilal İMAMOĞLU, Dr. Gülşah ÜNSAL KAYAR ve Dr. Şeyma ÖZTÜRK'e,

Tezimin hazırlanması sırasında verdiği maddi destek için Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAİBÜ BAP) birimine,

Yardımlarını, güler yüzlerini ve hoş sohbetlerini esirgemeyen tüm patoloji laboratuvarı çalışanlarına,

Sevgilerini ve desteklerini her daim yanımda hissettiğim, beni okutup yetiştiren ve bugünlere getiren canım annem-babam Aysel-Mustafa TUNÇ ve koruyucu meleğim ablam Vildan TUNÇ'a, dünyamı güzelleştiren biricik yeğenim Lina'ya ve her konuda beni destekleyen sevgili eşim Dr. Kıyancan KARABEKİROĞLU'na,

Tüm içtenliğimle sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Nur TUNÇ KARABEKİROĞLU

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY BELGESİ	iii
ETİK BEYAN.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
TABLO LİSTESİ	viii
RESİM LİSTESİ	ix
KISALTMA VE SEMBOLLER LİSTESİ	x
ÖZET.....	xi
ABSTRACT	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 Serviks Anatomisi	3
2.2 Serviks Embriyolojisi	4
2.3 Serviks Histolojisi	5
2.3.1 Ektoservikal Epitel.....	5
2.3.2 Endoservikal Epitel.....	6
2.3.3 Transformasyon Zonu	7
2.3.4 Servikal Stroma.....	9
2.4 Serviksin İnflamatuvar Lezyonları	9
2.4.1 Reaktif Atipi	10
2.4.2 Hiperkeratozis ve Parakeratozis.....	11
2.5 Servikte Skuamöz Metaplazi	11
2.6 Serviksin Premalign Lezyonları	12
2.6.1 Skuamöz İntraepitelyal Lezyonlar (SIL)/ Servikal İntrapitelyal Neoplazi (CIN)	12
2.7 Human Papilloma Virus (HPV) ve Kadın Genital Sistem	15
2.7.1 Papillomavirüslerin Genel Özellikleri ve Klasifikasyonu	16
2.7.2 HPV'nin Genom Yapısı, Proteinleri ve Replikasyonu	17
2.7.3 HPV Enfeksiyonlarında İmmun Yanıt.....	22
2.8 Hücre Siklusu	23
2.9 Çalışmamızda Değerlendirilecek İmmunohistokimyasal Belirteçler	26
2.9.1 Rb.....	26
2.9.2 p53	26
2.9.3 p16	27
2.9.4 p27	27
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	28
3.1 Olgu Seçimi	28
3.2 İmmunohistokimyasal İnceleme.....	30
3.3 İmmunoreaktivitenin Değerlendirilmesi	30
3.4 Epitelyal İnflamasyon Değerlendirmesi	35
3.5 İstatistiksel Değerlendirme	37

4.	BULGULAR	38
4.1	Klinik ve Patolojik Bulgular.....	38
4.1.1	HR-HPV ile Enfeksiyon	38
4.1.2	Intraepitelyal Nötrofil İnfiltrasyonu.....	40
4.1.3	Intraepitelyal Lenfosit İnfiltrasyonu	40
4.2	İmmunohistokimyasal Bulgular	41
4.2.1	p16	41
4.2.2	Rb.....	42
4.2.3	p27	45
4.2.4	p53	48
4.2.5	p16, Rb, p27, p53.....	51
4.2.6	Rb, p53, p27 ve p16 Genlerinin İmmunohistokimyasal Ekspresyonlarının Korelasyon Analizi	52
5.	TARTIŞMA	53
6.	SONUÇLAR	62
7.	KAYNAKLAR.....	65

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 2-1. Serviksin premalign lezyonlarının histolojik sınıflaması (30).....	13
Tablo 2-2. Onkojenik potansiyellerine göre HPV tipleri (48).....	17
Tablo 2-3. HPV genom yapısı (34).	18
Tablo 4-1. HR-HPV Tipleri.....	38
Tablo 4-2. HR-HPV Tiplerinin Gruplar Arasındaki Dağılımı	39
Tablo 4-3. HPV 16 Varlığının Gruplardaki Dağılımı	39
Tablo 4-4. İntraepitelyal Nötrofil İnfiltrasyonu Yoğunluğunun Gruplardaki Dağılımı.....	40
Tablo 4-5. p16 Boyanma Yaygınlığının Gruplardaki Dağılımı	41
Tablo 4-6. p16 Boyanma Yaygınlığının HPV 16 ile ilişkisi	42
Tablo 4-7. Rb ekspresyonunun epitelde dağılım paterninin gruplardaki dağılımı	43
Tablo 4-8. Rb ekspresyonunun epitelde dağılım paterni ve single/multiple HR-HPV pozitifliği Dağılımı.....	44
Tablo 4-9. Rb ekspresyonunun epitelde dağılım paterni ve HPV 16/HPV 16 dışı HR-HPV pozitifliği Dağılımı	44
Tablo 4-10. p27 ekspresyonunun epitelde dağılım paterninin gruplardaki dağılımı	45
Tablo 4-11. p27 ekspresyonunun epitelde dağılım paterni ve single/multiple HR-HPV pozitifliği Dağılımı.....	47
Tablo 4-12. p27 ekspresyonunun epitelde dağılım paterni ve HPV 16/HPV 16 dışı HR-HPV pozitifliği Dağılımı	47
Tablo 4-13. p53 ekspresyonunun epitelde dağılım paterninin gruplardaki dağılımı	48
Tablo 4-14. p53 ekspresyonunun epitelde dağılım paterni ve single/multiple HR-HPV pozitifliği Dağılımı.....	50
Tablo 4-15. p53 ekspresyonunun epitelde dağılım paterni ve HPV 16/HPV 16 dışı HR-HPV pozitifliği Dağılımı	50
Tablo 4-16. Tüm Markırların Gruplardaki Kombine Skor Ortalamaları	51
Tablo 4-17. Rb, p53 ve p27'ye ait epitelde dağılım paternleri.....	51
Tablo 4-18. Immunohistokimyasal Markırların Spearman Korelasyon Analizi	52

RESİM LİSTESİ

Sayfa

- Resim 3-1.** Normal epitel ve displazilerin ışık mikroskopik görünümü (H&E x200)
A) Non-D B) L-SIL C) H-SIL29
- Resim 3-2.** p16 immunohistokimyasal ekspresyonu A) Orta yoğunlukta fokal boyanma (x100) B) Şiddetli diffüz boyanma (x200)31
- Resim 3-3.** Rb immunohistokimyasal ekspresyonu. A) Hücrelerin %50'sinden fazlasında şiddetli pozitif boyanma (x200). B) Hücrelerin %10'undan azında hafif yoğunlukta pozitif boyanma (x200).32
- Resim 3-4.** p27 immunohistokimyasal ekspresyonu. A) Hücrelerin %50'sinden fazlasında şiddetli pozitif boyanma (x200). B) Hücrelerin %10-50'sinde hafif yoğunlukta pozitif boyanma (x200).33
- Resim 3-5.** p53 immunohistokimyasal ekspresyonu. A) Hücrelerin %10'undan fazlasında şiddetli pozitif boyanma (x200) B) Epitelde seyrek olarak orta yoğunlukta pozitif boyanma (x200).34
- Resim 3-6.** Servikal epitelde nötrofil infiltrasyon yoğunluğu A) Orta yoğunlukta nötrofil infiltrasyonu (H&E x200). B) Yoğun nötrofil infiltrasyonu (H&E x200).36
- Resim 4-1.** Rb immün ekspresyonunun epitelde dağılım paterni. A) Non-D olgusunda olağan boyanma paterni (bazal/parabazal boyanma) (x200). B) H-SIL olgusunda random boyanma (x200).43
- Resim 4-2.** p27 ekspresyonunun epitelde dağılım paterni. A) Non-D olgusunda olağan boyanma paterni (intermedier/süperfisyal boyanma) (x200). B) H-SIL olgusunda bazal boyanmayı da içerecek şekilde random boyanma (x200).46
- Resim 4-3.** p53 ekspresyonunun epitelde dağılım paterni. A) Non-D olgusunda olağan boyanma paterni (bazal ve/veya parabazal boyanma) (x200). B) H-SIL olgusunda random boyanma (x200).49

KISALTMA VE SEMBOLLER LİSTESİ

BBA	: Büyük büyütme alanı
CDK	: Siklin bağımlı kinaz
CDKI	: Siklin bağımlı kinaz inhibitörleri
CIN	: Servikal intraepitelyal neoplazi
CIS	: Karsinoma in situ
CK	: Sitokeratin
CSF-1	: Koloni uyarıcı faktör-1
E	: Early region
EGFR	: Epidermal büyüme faktörü reseptörü
H-SIL	: Yüksek dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon
H&E	: Hematoksilen&eoizin
hPL	: Human plasental laktojen
HPV	: Human Papilloma Virus
HR-HPV	: Yüksek riskli HPV
IARC	: International Agency for Research on Cancer
L	: Late region
L-SIL	: Düşük dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon
LAST	: Lower Anogenital Squamous Terminology
LCR	: Long control region
LEEP	: Loop Electrosurgical Excision Procedure
LR-HPV	: Düşük riskli HPV
mRNA	: Messenger RNA
NO	: Nitrik Oksit
Non-D	: Displazi olmayan grup
ORF	: Open reading frames
PAFR	: Trombosit aktive edici faktör reseptörü
PV	: Papillomavirus
Rb	: Retinoblastom geni
SCC	: Skuamöz hücreli karsinom
SIL	: Skuamöz intraepitelyal lezyon
SMILE	: Stratified mucin producing intraepithelial lesion
WHO	: Dünya sağlık örgütü

ÖZET

YÜKSEK RİSK GRUBUNDAKİ HPV TİPLERİ İLE OLAN ENFEKSİYONLARDA SERVİKS EPİTELİNDEKİ SUPRESÖR GEN DEĞİŞİKLİKLERİ, İNFLAMASYON VE MORFOLOJİK DEĞİŞİKLİKLERİN İLİŞKİSİ

Amaç: Yüksek riskli HPV (HR-HPV) E6 ve E7 onkoproteinlerinin hücre siklusunun farklı seviyelerinde supressör gen değişikliklerine yol açtığı bilinmektedir. Bu çalışmada p16, Rb, p53 ve p27 supressör genlerinin HR-HPV ile ilişkili servikal karsinogeneze etkisini tartışmayı ve ayrıca bu markırların ekspresyonlarının preneoplastik lezyonlarda morfolojik tanıya katkısını incelemeyi amaçladık. Bunun yanında HR-HPV enfeksiyonuna eşlik eden inflamasyonun karsinogeneze katkısını tartışmayı hedefledik.

Gereç-Yöntem: Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'nda 2017-2021 yılları arasında herhangi bir HR-HPV tipi ile enfekte ve bu enfeksiyonu biyopsi öncesinde PCR ile saptanmış 100 olguya ait kolposkopik biyopsi, konizasyon ve histerektomi materyalleri retrospektif olarak incelendi. Olgular üç grupta toplandı. Displazinin olmadığı birinci grup 34, L-SIL grubu 32 ve H-SIL grubu 34 olgudan oluşmaktadır. Bölümümüz arşivinden olgulara ait uygun parafin bloklar çıkarılarak H&E ve immunohistokimyasal olarak Rb, p53 ve p27 çalışıldı. Olgulara ait daha önceden çalıştığımız p16 boyaması da arşivden çıkarılıp tekrardan değerlendirilerek çalışmaya dahil edildi.

Bulgular: HR-HPV ile enfekte servikal epitelde displazi derecesi arttıkça genel olarak p16 ekspresyonunda artma ve Rb, p53, p27 ekspresyonlarında değişen oranlarda azalma görüldü. p16'da, displazi derecesi arttıkça diffüz boyanmanın arttığı dikkati çekti. Rb ve p53, non-displastik grupta bazal/parabazal ağırlıklı boyanırken H-SIL'de random boyanma eğilimi gösterdi. Farklı olarak p27, non-displastik grupta bazal/parabazal boyanma göstermezken H-SIL grubunda bazal hücreleri de içerecek şekilde random boyanma gösterdi. Tek tip HR-HPV enfeksiyonuna sahip olgularda, multiple HR-HPV enfeksiyonuna sahip olgulara göre daha yüksek oranda H-SIL izlendi.

Sonuç: Rb-p16 arasındaki negatif feedback mekanizmasına bağlı olarak artış gösteren p16'nın, displastik lezyonlarda HR-HPV enfeksiyonu için potansiyel bir biyobelirteç olarak kullanılabileceğini destekledi. Rb ve p53'ün L-SIL ve H-SIL olgularında, H-SIL'de daha fazla olmak üzere random boyanma paterni göstermesinin, morfolojik olarak arada kalınan olgulara L-SIL ve H-SIL tanımlarının verilmesine katkı sağlayacağı düşünüldü. p27, non-displastik epitelde çoğunlukla bazal boyanma yapmamasına rağmen L-SIL ve H-SIL'de bazal boyanmayı da içerecek şekilde random boyanma paternine sahipti. Displazi veya displazi derecesini saptarken p27'nin bu boyanma paterninin göz önünde bulundurulması doğru tanıya ulaşılmasını destekleyecektir.

ANAHTAR KELİMELEER: İnsan papillomavirüsü, Serviks uteri, Rb, p53, p27, p16

ABSTRACT

THE RELATIONSHIP OF SUPPRESSOR GENE CHANGES, INFLAMMATION AND MORPHOLOGICAL CHANGES IN CERVICAL EPITHELIUM INFECTIONS RELATED WITH HPV TYPES IN HIGH RISK GROUP

Background: It is known that HR-HPV E6 and E7 oncoproteins cause suppressor gene changes at different levels of the cell cycle. In this study, we aimed to discuss the effects of p16, Rb, p53 and p27 suppressor genes on HR-HPV-related cervical carcinogenesis and to examine the contribution of the expressions of these markers to the morphological diagnosis of preneoplastic lesions. In addition, we aimed to discuss the contribution of inflammation accompanying HR-HPV infection to carcinogenesis.

Material-Methods: Colposcopic biopsy, conization and hysterectomy materials of 100 patients infected with any HR-HPV type between 2017-2021 in Bolu Abant İzzet Baysal University Faculty of Medicine, Department of Pathology and whose infection was detected by PCR before biopsy were retrospectively analyzed. The cases were collected in three groups. The first group without dysplasia consisted of 34 cases, the L-SIL group consisted of 32 cases, and the H-SIL group consisted of 34 cases. Appropriate paraffin blocks were extracted from the archives of our department and Rb, p53 and p27 were studied by H&E and immunohistochemistry. The previously applied p16 staining of the cases was also taken from the archive and re-evaluated and included in the study.

Results: As the degree of dysplasia increased in the cervical epithelium infected with HR-HPV, an increase in p16 expression and a decrease in Rb, p53 and p27 expressions were observed at varying rates. In p16, it was noted that diffuse staining increased as the degree of dysplasia increased. While Rb and p53 stained predominantly basal/parabasal in the non-dysplastic group, they showed a tendency to stain randomly in H-SIL. Differently, p27 did not show basal/parabasal staining in the non-dysplastic group but showed random staining including basal cells in the H-SIL group. H-SIL was observed at a higher rate in cases with a single type of HR-HPV infection than in cases with multiple HR-HPV infections.

Conclusion: It supported that p16, which increased due to the negative feedback mechanism between Rb-p16, could be used as a potential biomarker for HR-HPV infection in dysplastic lesions. It was thought that the random staining increase of Rb and p53 in L-SIL and H-SIL cases, more in H-SIL, would contribute to the diagnosis of L-SIL and H-SIL, which are morphologically in between. Although p27 mostly did not show basal staining in non-dysplastic epithelium, it had a random staining pattern, including basal staining in L-SIL and H-SIL. Considering this staining pattern of p27 when determining the degree of dysplasia or dysplasia will support reaching the correct diagnosis.

KEYWORDS: Human papillomavirus, Cervix uteri, Rb, p53, p27, p16

1. GİRİŞ

Serviks kanseri dünya çapında kadınlar arasında sık görülen kanser türlerindendir. Gelişmekte olan ülkelerde ve genç kadınlarda mortalite ve morbiditenin önde gelen ikinci nedenidir (1)(2).

Servikal karsinomun gelişme aşaması çok aşamalı bir karsinogeneze dayanmaktadır. Human Papilloma Virus (HPV), servikal intraepitelyal neoplazi (CIN) ve servikal skuamöz hücreli karsinom (SCC) gelişiminde ana etiyolojik faktördür. Özellikle yüksek riskli HPV (HR-HPV) tipleri ile enfekte servikal epitelde, düşük riskli HPV (LR-HPV) tiplerine kıyasla daha yüksek neoplastik dönüşüm görülmektedir (1)(3).

Servikal karsinogenez üzerine yapılan çalışmalar, HR-HPV DNA'sının konak hücre genomuna entegrasyonu sonucu yüksek seviyede E6/E7 onkoprotein ekspresyonu ile sonuçlandığını göstermiştir. HR-HPV E6 ve E7 onkoproteinleri sırasıyla p53 ve retinoblastom (Rb) tümör supressör proteinlerine bağlanmaktadır. Böylelikle p53 ve Rb proteinleri inaktive olmaktadır ve hücrede transformasyon süreci başlamaktadır (4)(5)(6).

E6-p53 ve E7-Rb etkileşimi, hücresel proliferasyonunda artışa neden olsa da neoplastik sürecin progresyonu için yeterli değildir. Bu nedenle E6 ve E7 onkoproteinlerinin, hücre siklus regülasyonunda önemli görevleri bulunan siklin bağımlı kinaz inhibitörleri (CDKI) üzerinde de etkisi olduğu düşünülmektedir (7).

CDKI, Cip/Kip (p21, p27, p57) ve INK4 (p15, p16, p18, p19) olmak üzere iki sınıftır. Cip/Kip ailesinin önemli bir üyesi olan p27, serviksin normal skuamöz epitelinin büyümesi ve farklılaşmasında rol oynar. Asıl işlevi G1/S geçişini kontrol eden siklin-CDK komplekslerine bağlanarak kinaz komplekslerini inhibe etmektir. Bir diğer CDKI ise INK4 ailesinden p16'dır. p16, hücre siklusunda G1-S faz geçişinde Rb proteinini aracılı kontrolün ayrılmaz bir parçasıdır. p16, siklin D/CDK4-6 kompleksini inhibe ederek Rb'nin fosforillenmesini önler. Böylelikle hücre siklusu G1 kontrol noktasında durur ve hücre proliferasyonu engellenmiş olur (8)(9)(10).

Rb, p53, p16 ve p27 hücre siklusunda önemli rolleri olan ve karsinogenez mekanizmalarında supressör görevi gören genlerdir. Çalışmamızda HR-HPV ile enfekte olgularda servikal displazi derecesi ile Rb, p53, p16 ve p27 genlerindeki

moleküler sapmaları tetkik ederek, bu genlerdeki değişikliklerin karsinogenezdeki rollerini ve bu gen değişikliklerinin birbiri ile korelasyonunu göstermeyi amaçlamaktayız. Aynı zamanda immunohistokimyasal boyanma ile gösterilen bu değişikliklerin preneoplastik lezyonlarda morfolojik tanıya yardımcı olup olmayacağını da irdedeceğiz.



2. GENEL BİLGİLER

2.1 Serviks Anatomisi

Serviks uteri, uterusun en alt dar kısmına verilen isimdir. Serviksin vajinal ve supravajinal olmak üzere iki kısmı bulunur. Supravajinal segment posteriorda peritonla kaplı iken anterior ve yan kısımlarda gevşek bağ doku (parametrium) ile çevrilidir. Vajene doğru çıkıntı yapan vajinal kısım ortalama 2.5 cm, supravajinal kısım ise ortalama 1,5 cm uzunluktadır. Postmenopozal dönemde veya servikal prolapsuslarda göreceli olarak uzunluğu artabilir (11).

Servikse spekulum ile bakıldığında silindirik şekillidir ve merkezi kısmında eksternal os bulunmaktadır. Eksternal os, nullipar bir kadında 3 ile 5 mm çapta iken multipar bir kadında 1 cm veya daha fazla çapta olabilmektedir (12).

Servikal ve uterin vasküler yapılar birbiriyle ilişkilidir. Serviksin arteriyel kaynağını uterin arterin inen dalı oluşturur. Servikal arterler, serviksin her iki yanında uzanır ve serviksi çevreleyen koroner arteri oluşturur. Azygos arterleri ise serviks ve vajinanın ön ve arka tarafında uzanır. Bu damarlar ile vajinal ve orta hemoroidal arterler arasında çok sayıda anastomoz bulunur. Venöz drenaj ise bu arterlere eşlik eder.

Serviksin lenfatik drenajı karmaşıktır. Başlıca bölgesel lenf nodları obturator, common iliak, internal iliak, eksternal iliak ve parametrial visseral lenf nodlarıdır.

Endoserviks, serbest sinir uçlarından zengindir. Ağrı lifleri, ikinci, üçüncü ve dördüncü sakral segment parasempatik liflere eşlik eder. Bundan dolayı kadınlarda transservikal uterin araç yerleştirilmesi esnasında vazovagal yanıt oluşabilir ve seri kardiak izlemlerde refleks bradikardi meydana gelebilir. Ektoserviksin duyuşal innervasyonu ise endoserviks kadar karmaşık değildir. Bu nedenle hastaya büyük bir rahatsızlık vermeden ektoserviksin soğuk veya sıcak koterizasyonu gerçekleştirilebilir (11).

2.2 Serviks Embriyolojisi

Kloaka, gebeliğin ikinci haftasının başında görülen primordial organdır. Primitif arka bağırsak (hindgut) ve allantois birleşimini temsil eden bu yapı gebeliğin dördüncü haftasından hemen önce mezonefrik duktal sistemin yapısına katılır. Bu haftada ortaya çıkan ürorektal septum, ürogenital sinüsü anal kanaldan ayırır.

Ürorektal septum iki bileşenden oluşur. Birincisi, allantois ile arka bağırsak arasındaki koronal düzlem boyunca gelişen ve kloakal membrana doğru kaudal tarzda büyüyen Tourneux katlantısıdır. Bu septum kloakal membrana yaklaştıkça kloakanın yan duvarlarının kıvrımları olan Rathke plikasını oluşturur. Gelişimin 6-7. haftalarında ürorektal septum, kloakal membran ile kaynaşır. Böylelikle ürogenital ve anal membran oluşur (13).

Ürorektal primordium bölünürken, gelişen mezonefrik kanallar müllerian tüberkülün yakınında ürogenital sinüse girer. Mezonefrik kanalın bir dalı olan üreter tomurcuğu böbreğin sekretuar komponentini oluşturacak olan metanefrik blastemin gelişimini indüklemek için uzanır. Daha sonra üreter tomucuğunun mezonefrik kanaldaki son dallanma noktası ürogenital sinüse absorbe olur. Bu kompleksin uygun şekilde oluşması üreterlerin trigonun iki yanına açılmasına olanak sağlar (14).

Gelişimin bu kritik aşamasında çöломik epitelden gelişen müllerian kanallar, mezonefrik kanalların laterinde gelişir ve orta hatta kaynaşmak üzere çarpazlaşır. Müllerian kanallar kaudal olarak ilerleyerek ürogenital sinüse katılır ve burada müllerian tüberkülü oluşturur. Bu kanalların kaudal füzyonu ortak orta hat bölümünün çözülmesine ve ortak bir uterovajinal kanalın (uterus, serviks ve vajinanın proksimal üçte ikisi) oluşmasını sağlar. Septal regresyonun kaybı birtakım müllerian kanal anomalilerine neden olur (15).

Uterovajinal primordium ve ürogenital sinüs birlikteliğinden oluşan müllerian tüberkül (sinovajinal ampulla) içindeki hücreler daha sonra vajinanın distal üçte birini oluşturmak için kaudalden kraniyale doğru kanalize olacak bir doku kordonu oluşturmak için çoğalır. Ürogenital sinüsün müllerian tüberkülün distalinde kalan kısmı ekstrofiye olur ve vestibül halini alır. Bunun sonucunda üretra ve vajina vulvada ayrı olarak açıklık kazanmış olur (13).

2.3 Serviks Histolojisi

Uterin serviks vajinal ve supravajinal kısım olarak ikiye ayrılmaktadır. Vajinal kısım serviks yüzeyi ektoserviks olarak adlandırılır. Bu kısım vajinal fornikslerin mukozasıyla bağlantılı olarak skuamöz epitel ile kaplıdır. Supravajinal kısım serviks mukozal yüzeyi ise alt uterin segmentin epiteli ile devamlılık göstermektedir. Bu servikal mukozal yüzey müsin salgılayan epitel ile örtülü olup endoserviks olarak adlandırılır. Ektoserviksin skuamöz epiteli ile endoservikal glandüler mukozanın birleşim yerine ise skuamokolumnar bileşke (transformasyon zonu) adı verilir.

2.3.1 Ektoservikal Epitel

Ektoserviks, non-keratinize skuamöz epitel ile örtülüdür. Dolaşımdaki östrojene (östradiol) bağlı olarak epitel katmanları mature olur ve glikojen biriktirir. Çocuklukta ve postmenopozal dönemde kandaki düşük östrojen seviyesi nedeniyle skuamöz hücrelerde proliferasyon ve matürasyon gerçekleşemez. Böylelikle epitelin üst katmanlarında glikojen depolanamaz. Postpartum dönemde yenidoğan serviksinde maternal östrojen etkisiyle maturasyon izlenir; ancak epitel hızla atrofiye gider. Östrojen seviyeleri düştükçe glikojen kaybolur.

Reproduktif dönemde östrojenik uyarılara bağlı olarak servikal skuamöz epitel üç (3) katmana ayrılabilir.

1. Bazal/parabazal hücre katmanı
2. Midzone (stratum spongiosum)
3. Superfisyal katman

Bazal hücre katmanı dar sitoplazmalı, oval hiperkromatik nükleuslu hücrelerden oluşur. Bu hücreler genellikle mitotik olarak inaktiftir. Bazal katmanın hemen üzerindeki hücreler, sitopatolojide sıklıkla kullanılan bir terim olan parabazal hücreler olarak bilinir. Bu hücreler artan sitoplazma oranına bağlı olarak bazal hücrelerden biraz daha irilerdir ve daha az yoğun kromatine sahiplerdir. Bazal katmanın aksine mitotik figürler genellikle mevcuttur; ancak çok sayıda değildir.

Midzone, daha geniş sitoplazmaya ve daha küçük veziküler nükleuslara sahip hücrelerden oluşur. Bunlar intermedier hücreler olarak bilinir. Glikojenin çoğu bu hücrelerde birikir ve sitoplazmaya granüler-berrak bir görünüm kazandırır.

Superfisyal hücreler, küçük yuvarlak nükleusludur ve yoğun glikojen birikiminden dolayı berrak sitoplazmalıdır.

İntermedier ve superfisyal hücrelerde genellikle perinükleer sitoplazmik halo bulunur. Bu perinükleer halo aynı zamanda HPV ile enfekte olmuş hücrelerin de (koilositler) bir özelliğidir. Bu nedenle glikojen içeren normal epitel hücreleri anormal olarak yanlış yorumlanabilir.

Gebelikte ve menstrüel döngüde luteal fazda progesteron seviyesindeki artışa bağlı olarak intermedier hücreler baskın hale gelir (16).

2.3.2 Endoservikal Epitel

Endoserviks, küçük ve bazal yerleşimli nükleuslara sahip müsin salgılayan tek katlı epitel ile örtülüdür. Bazal yerleşimli nükleusların üzerindeki müsin dolu sitoplazma ‘bahçe çiti’ görünümü kazandırır. Nükleuslar genellikle küçüktür ve hiperkromatiktir. Endoservikal epitel hasar gördüğünde yenilenme aşamasında nükleuslar daha iri ve yuvarlak görülebilir; fakat mitotik figür bulunmaz.

Endoservikal epitelde farklı hücre tipleri bulunabilir. Siliyer hücreler genellikle mevcuttur ve bu hücrelerin varlığı neoplazi şüphesini dışlayıcı yararlı bir belirteç olabilmektedir. Siliyer hücrelerde sayıca artış görüldüğünde siliyer veya tubal metaplazi terimi kullanılır. Bazen siliyer hücre nükleusları iri, hiperkromatik olabilir ve neoplastik hücrelere benzeyebilir. Bu gibi durumlarda hücrelerde silyaların araştırılması yardımcı olabilir. Siliyer hücreler, malign endoservikal glandüler proliferasyonda son derece nadirdir. İmmunohistokimyasal olarak CEA ve vimentin kombinasyonu in situ adenokarsinom ve tubal metaplazi ayırımında yararlı olabilir. İn situ adenokarsinomda CEA pozitif, vimentin negatif iken tubal metaplazide tam tersi görülmektedir (16).

Endoservikal epitel sadece endoservikal kanal yüzeyini örtmekle kalmaz aynı zamanda endoservikal stroma içerisine yarıklar oluşturarak uzanır. Bu uzanım, hematoxilen&eosin (H&E) kesitlerinde endoservikal gland benzeri bir görünüm oluşturur. Gerçek glandların sekretuar ve duktal kısımlarını örten epitel farklıdır. Stromal yarıkları örten endoservikal epitel çoğaldıkça yan dallar vermeye başlar. Bu histolojik görüntü ‘tunnel clusters (tünel kümeleri)’ olarak adlandırılır (17).

Endoservikal glandlar servikal stromada 1 cm'lik derinliğe kadar uzanabilirler; ancak genellikle 5 mm'lik derinlikte bulunurlar. Bu anatomik varyasyon gastrik tip adenokarsinom gibi neoplazi şüphesi durumunda önem kazanmaktadır (18).

Menstrüel siklusta endoservikal hücrelerde, endometrial hücrelerin aksine minimal morfolojik değişiklikler görülür. Siklusun proliferatif fazı boyunca endoservikal hücreler daha düşük viskoziteli mukus salgılar. Bu durumun spermatozoaların servikal kanal penetrasyonlarına yardımcı olduğu düşünülmektedir. Luteal fazda progesteron seviyelerinin en yüksek olduğu zamanda endoservikal glandüler sekresyon yoğun bir hal alır. Bu aşamada sekresyon H&E kesitlerde daha belirgin hale gelir.

Gebelik döneminde tunnel clusters sayısı artar. Bu artış aşırı olduğu zaman 'servikal glandüler hiperplazi' terimi kullanılır. Ayrıca gebelikte endoservikal glandüler sekresyonda koyulaşma meydana gelir (19).

2.3.3 Transformasyon Zonu

Kadınlarda servikste endoservikal-ektoservikal mukoza oranları yaşam boyunca değişkenlik gösterir. Infantların üçte ikisinde endoservikal mukozanın ektoservikal mukozayı kapladığı görülmektedir. Menarş öncesi çoğu kızda endoservikal mukozanın endoservikal kanala gerilediği görülür. Pubertal dönem başlangıcında ise endoservikal mukoza tekrar ektoservikse uzanır ve genellikle serviksin anterior kısmında posterior kısmından daha belirgindir. Endoservikal mukozanın yer değiştirmesi, hormonal uyarıya bağlı servikal stromanın ödemlenmesinden kaynaklıdır. Servikal stromanın ödemeine bağlı olarak endoservikal mukozanın eksternal ostan açığa çıkmasına 'ektropion' adı verilir. Açığa çıkan endoservikal mukoza çıplak gözle kırmızı ve ülser görüldüğünden erozyon olarak da yorumlanmaktadır; ancak mukozada ülserasyon yoktur ve bu durum fizyolojik ektopi sürecinden ibarettir (20).

Menarşial ektropion meydana geldikten sonra reproduktif dönem süresince endoservikal mukoza kademeli olarak skuamöz epitel ile yer değiştirmeye başlar. Glandüler dokunun yerini skuamöz epitelin aldığı alan 'transformasyon zonu' olarak bilinir. İki epitel arasındaki bağlantı 'skuamokolumnar bileşke' olarak adlandırılır. Bu bileşke noktası genellikle keskin bir sınırla ayrılır.

Neoplastik değişiklikler en sık transformasyon zonunda başlar ve kolposkopik olarak yapısal değişiklikler görülür.

Reproduktif dönemin sonlarına doğru skuamokolumnar bileşke, menarşial yolculuğunun tersine endoservikal kanala doğru ilerlemeye başlar. Perimenopozal dönemde skuamokolumnar bileşke, endoservikal kanal içerisinde gizlenir (21).

Endoservikal epitelin iki mekanizma ile skuamöz epitale dönüştüğü düşünülmektedir: bunlardan ilki skuamöz epitelizasyon, ikincisi ise skuamöz metaplazidir. Skuamöz epitelizasyon, ektoserviks epitelinin endoservikal glandüler hücrelerinin hemen altında gelişmesini tariflemektedir. Bu mekanizmada skuamöz hücreler, endoservikal hücreleri bazal membrandan iterler ve kademeli olarak kolumnar hücreler dejenere olur. Skuamöz epitelizasyon bir süre sonra endosevikal glandların ağzını tıkar ve glandüler sekresyon devam ettikçe içleri müsin dolu kist yapıları (Naboth kistleri) veya eozinofilik sekret ile dolu tunnel clusters yapıları oluşmaya başlar. Sonuç olarak skuamöz epitelizasyon alanından alınan H&E kesitlerde Naboth kistleri, müsin dolu tunnel clusters yapıları veya skuamöz epitel adaları görülecektir.

H&E kesitlerde gözlenen skuamöz epitelizasyon, invaziv bir skuamöz karsinom odağı ile karıştırılmamalıdır. Skuamöz epitelizasyondaki hücreler iri nükleuslu, belirgin nükleollü hücreler olsalar da bu hücrelerde anaplazi, pleomorfizm ve atipik mitoz görülmez. Skuamöz epitelizasyon önceki endoservikal glandın yapısını alır ve stromaya infiltrasyon göstermez.

Skuamöz metaplazi ise endoservikal rezerv hücrelerin müsin üreten hücrelerden ziyade skuamöz hücrelere farklılaşmasıdır. Skumaöz epitelizasyondaki hücrelerin aksine rezerv hücreler başlangıçta skuamöz özelliğe sahip değildir. Rezerv hücrelerdeki proliferasyon, immatür skuamöz metaplaziyi meydana getirir. Daha sonra ektoserviksin superfisyal hücrelerinden ayırt edilemeyen glikojen içeren skuamöz hücrelere dönüşür. Rutin pratikte skuamöz metaplazi terimi hem metaplazi hem de skuamöz epitelizasyon için kullanılır.

İmmatür skuamöz metaplazide matür hücre görünümünün aksine hücre nükleuslarının bulunması, yüksek dereceli displazi ile benzer görünüme neden olabilir. Ancak immatür skuamöz metaplazide nükleuslar uniform görünümündedir ve nükleer konturler genellikle düzgündür. Mitotik figürler görülse de mitozlar bazal yerleşimlidir ve atipik mitoz bulunmaz (16)(22).

2.3.4 Servikal Stroma

Ektoserviks stroması, uterin korpusun kalın muskuler duvarının aksine seyrek düz kas lifleri ve elastic iplikçiklerin karışımından oluşan fibröz bir dokudur. Vasküler yapılardan oldukça zengindir. Endoservikal stromanın ise büyük bir kısmı fibroelastik yapıdadır; ancak yüzeysel fibröz stroma ile alt uterin segmentin endometrial stroması oldukça benzerdir. Bu benzerlik küretaj materyallerinde neoplastik sürecin endometriumdan mı yoksa endoserviksten mi kaynaklandığını belirlemekte güçlük çıkarmaktadır. Endoserviksın derin stromasında ektoservikal stromaya oranla daha fazla düz kas lifi bulunur ve bu durum alt uterin segment myometriuma benzemektedir.

2.3.4.1 STROMAL İNFLAMASYON

Serviks, uterin kavitenin steril ortamı ile alt genital traktın mikrobiyolojik florası arasında köprü görevi görmektedir. Servikte bu nedenle hem humoral hem de hücrel immunité göze çarpmaktadır. Endoservikal stromada normal olarak çok sayıda T lenfosit bulunmaktadır. B lenfositler, plazma hücreleri ve germinal merkezleri aktif lenfoid folliküllerde sıkça gözlenmektedir. Bunlara ek olarak servikte çok sayıda dentritik hücre bulunur. Bunlardan biri antijenin T lenfositlere sunulmasında rol oynayan Langerhans hücreleridir (16).

Servikal epitel ve stromanın inflamatuvar sürecini yansıtan servisit terimi, travma, inflamatuvar sistemik hastalıklar, neoplazi ve enfeksiyöz nedenlerle ilişkilendirilebilir. Servikal mukus basit bir fiziksel bariyer olarak görülse de aslında bakteriostatik bir etki göstermektedir. Mukus ayrıca endoservikal epitel hücre reseptörleri için bakterilerle yarışmalı inhibitör görevi görmektedir. Servikal mukus ayrıca cinsel yolla bulaşan organizmalara karşı aktif antikor ve inflamatuvar hücre içermektedir (23).

2.4 Serviksın İnflamatuvar Lezyonları

Servisit, erişkin yaşta ki kadınlarda oldukça sık görülen bir durumdur. Sıklıkla skuamokolumnar bileşkeyi ve endoserviksi etkiler. Kadınların bir çoğu asemptomatiktir. Servisit etiyolojisi enfeksiyöz ve non-enfeksiyöz olarak iki kategoriye ayrılabilir (24).

Serviks Neisseria gonorrhoeae, Chlamydia trachomatis, HSV, HPV ve Mycoplasma için potansiyel bir rezervuardır. Servikal enfeksiyonlar endoservisit

veya ektoservisit (mukopürülan servisit) olarak iki şekilde oluşabilir. Ektoservisit en sık HSV ve Candida albicans'a bağlı olarak gelişirken endoservisit ise genellikle Neisseria gonorrhoeae ve Chlamydia trachomatis'e bağlı gelişmektedir.

Servikte non-enfeksiyöz servisit görülebilir. Bu duruma kimyasal iritanlar, yabancı cisim kaynaklı lokal travmalar, cerrahi aletler ve terapötik müdahale neden olabilmektedir. Non-enfeksiyöz servisitte mikroskopik olarak değişen miktarlarda granülasyon dokusu ve stromal fibrozis ile birlikte lenfositler, histiyositler ve plazma hücreleri görülebilir. Bazen epitel altı alanlarda germinal merkezleri aktif lenfoid foliküller bulunabilir (25)(26).

Servikte lenfoid infiltrat yoğun olmadığı sürece 'kronik servisit' tanısı vermek doğru değildir. Kronik servisit, reproduktif dönem kadınlarda oldukça yaygın görüldüğünden (inflamasyon yoğunluğuna bağlı olarak) normal olarak kabul edilmelidir (24).

Servikte aktif inflamasyon nadir değildir; ancak erozyon ve mikroabse odağına sıkça rastlanmaz (16).

Enfeksiyöz nedenlere bağlı servisitlerde inflamasyona reaktif iki tür morfolojik değişiklik vardır. Bunlar reaktif atipi ve hiperkeratoz-parakeratozdur.

2.4.1 Reaktif Atipi

Reaktif atipi, biyopsi veya konizasyona bağlı epitel hasarı durumunda skuamöz veya endoservikal epitelde epitel düzensizliği ve nükleer atipi ile karakterize duruma verilen isimdir. Bu değişiklikler histolojik ve sitolojik olarak genellikle intraepitelyal neoplazi ile karıştırılır.

Reaktif atipide skuamöz epitelde sitoplazmik membran sınırları belirgindir, nükleus şekil ve boyut anormallliği yoktur ve kromatin dağılımı eşittir. Epitel genellikle inflamatuvar hücrelerle infiltredir. Bazal ve parabazal hücrelerle sınırlı mitozlar görülebilir. Karakteristik olarak epitelin üst yarısındaki hücreler matür görünümündedir.

Endoservikal hücrelerde ise nükleer boyut ve şekil düzensizliği, hiperkromazi, sitoplazmik müsin kaybı gibi bir takım morfolojik değişiklikler görülebilir. Bu tip glandüler hücreler oldukça atipik görünmesine rağmen değişiklikler oldukça fokaldır ve arada normal müsinöz kolumnar hücreler yer alır. Ayrıca atipik mitoz ve sitoplazmik eozinofili görülmez (26).

2.4.2 Hiperkeratozis ve Parakeratozis

Rutin Pap smear taramasında kadınların %8'inde sitolojik olarak saptanabilir. Hem hiperkeratozis hem de parakeratozis makroskopik olarak beyaz bir plak görünümündedir. Diffüz hiperkeratozise sahip hastaların çoğunda uterin prolapsus mevcuttur.

Mikroskopik olarak piknotik nükleuslar içeren (parakeratozis) veya içermeyen kalın bir keratin tabakası (hiperkeratozis) bulunur. Epitel genellikle akantotiktir ve granüler tabaka belirgindir. Karakteristik olarak epitel hücrelerinde glikojen azlığı vardır; ancak sitolojik atipi görülmez. Matür skuamöz metaplazi, sıklıkla parakeratozis ile ilişkilidir.

Parakeratozisin serviksin premalign lezyonlarını temsil ettiğine dair kanıt olmasa da yüksek dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon (H-SIL) veya invaziv servikal kanserlerde parakeratozis ve hiperkeratozis ile karşılaşılabilir (26).

2.5 Servikte Skuamöz Metaplazi

Metaplazi, matür bir dokunun başka matür bir doku ile yer değiştirmesine denir (26). Servikte çeşitli tiplerde metaplastik değişiklikler bulunmaktadır ve etkilenen mukoza tipine göre görünümleri değişmektedir. Skuamöz metaplazi, içlerinde en yaygın görülen metaplazi tipidir.

Skuamöz metaplazi, endoservikal epitelin skuamöz epitele farklılaşmasıdır. Reprodüktif dönemde hemen hemen her kadında uterin servikte değişik derecelerde skuamöz metaplazi görmek mümkündür (24).

Kolposkopik olarak transformasyon zonunda yüzeysel damarlarda dallanmalar, pembe-beyaz alanlar şeklinde görülebilir. Asetik asit ile bu alanlar soluk camı bir hal alır. Lügol iodin ile kahverengi-siyah alanlar şeklinde görülecektir (27).

Mikroskopik olarak sıklıkla endoservikal glandüler epitelin yüzeyini örten skuamöz epitelin varlığıyla tanımlamak mümkündür. Ancak bazen glandüler epitel tamamen ortadan kalkar ve ortaya çıkan immatür skuamöz metaplazi, SIL benzeri bir görünüm meydana getirir. Neoplastik epitelin aksine immatür skuamöz metaplazide hücre organizasyonu ve kohezyonu korunur, nükleer atipi yoktur. Sıklıkla tek sıra halinde endoservikal hücreler, skuamöz hücrelerin üzerini örter.

İmmünohistokimyasal olarak immatür skuamöz metaplazi hem matür skuamöz epitelin hem de kolumnar müsinöz epitelin özelliklerini gösterir (24)(26).

Skuamöz metaplazi, HPV ilişkili H-SIL'lerin benign bir taklitçisidir. H-SIL'de atipik mitoz dahil epitelin üst üçte ikisinde yüksek nükleer-sitoplazmik oran, nükleer pleomorfizm ve hiperkromazi gösteren hücreler bulunmaktadır. HSIL ile prekanseröz lezyonların, skuamöz metaplazi veya atrofi gibi benign taklitçilerden ayrımında p16 kullanılması önerilmektedir. Skuamöz epitelin en az üçte birlik kısmında güçlü-yaygın sitoplazmik ve nükleer p16 boyanması H-SIL tanısını desteklemektedir. Yeni bir belirteç olan ProExc, tüm H-SIL'lerde güçlü nükleer boyanma sergiler. ProExc ve p16 kombinasyonu HSIL tanısı için yüksek özgüllüğe sahiptir (27)(28).

2.6 Serviksin Premalign Lezyonları

2.6.1 Skuamöz İntraepitelyal Lezyonlar (SIL)/ Servikal İntrapitelyal Neoplazi (CIN)

Serviksin intraepitelyal lezyonları, HPV enfeksiyonu ile ilişkili olarak transformasyon zonu bölgesinde veya yakınında meydana gelen skuamöz değişiklikleri ifade etmektedir. Skuamöz epiteldeki bu morfolojik değişikliklere yönelik olarak LAST (Lower Anogenital Squamous Terminology) projesinde, tek bir sınıflandırma sistemi için ön çalışma sunulmuştur (28)(29).

Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO-2014) malign ve premalign serviks lezyonları sınıflandırma sistemi ile morfolojik ve biyolojik davranışları farklılık gösteren serviksin intraepitelyal lezyonları, spontan regresyon veya progresyon potansiyellerine göre iki gruba ayrılmıştır. Bu ikili sınıflandırmaya göre iyi prognozlu ve spontan regresyon özelliğine sahip lezyonlar 'düşük dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon' (L-SIL), nispeten kötü prognozlu ve progresyon gösteren lezyonlar 'yüksek dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon' (H-SIL) olarak adlandırılmıştır.

SIL terminolojisi geniş çapta kabul görmüş olsa da 'servikal intraepitelyal neoplazi' (CIN) terminolojisi de kullanılabilmektedir. L-SIL grubu CIN1 lezyonları, H-SIL grubu ise CIN2-3 lezyonları içermektedir (28)(30).

Skuamöz intraepitelyal lezyonlar, cinsel aktivitenin başlamasıyla birlikte her yaş grubunda görülebilir. HPV, genç yaşlarda en yüksek enfeksiyon sıklığına

sahiptir. Enfeksiyonlar genellikle geçicidir ve herhangi bir morfolojik anomaliye yol açmazken tek bir HPV tipi ile kalıcı enfeksiyonlar veya servikal neoplaziler gelişebilmektedir (31).

Tablo 2-1. Serviksin premalign lezyonlarının histolojik sınıflaması (30).

Displazi derecesi	Servikal intraepitelyal neoplazi	Intraepitelyal lezyonlar (WHO-2014)
Hafif displazi	CIN1	L-SIL
Orta derece displazi	CIN2	H-SIL
Şiddetli displazi/ karsinoma in situ (CIS)	CIN3	H-SIL

2.6.1.1 L-SIL (CIN1)

HPV'nin neden olduğu hücresel değişiklikler L-SIL için karakteristik özellikleri oluşturmaktadır. Bu değişikliklerden en önemlisi nükleer atipidir. Nükleer atipi nükleer boyut artışı, hiperkromazi ve nükleer membran düzensizliği ile karakterizedir. Nükleus boyutları normalin üç katına kadar genişleyebilir.

L-SIL'de epitelin alt üçte birlik kısmında hücrelerde genellikle minimal bir nükleer atipi söz konusudur. Epitelin yüzeyel kısımlarındaki hücreler daha küçük ve piknotik nükleuslara sahip olabilir (32).

Produktif HPV enfeksiyonlarında skuamöz hücrelerdeki nükleer atipiye ek olarak perinükleer sitoplazmik halolar da eşlik eder. Ultrastrüktürel olarak bu halolar, HPV proteini E4 tarafından oluşturulan sitopatik bir değişikliktir. Perinükleer sitoplazmik halolarla ilişkili nükleer değişiklikler koilositik atipi (koilositoz) olarak adlandırılır (33)(34).

Epitelin alt üçte birlik kısmında az sayıda mitotik figürler görülebilir. Genellikle produktif HPV enfeksiyonlarında anormal mitotik aktivite sonucu binükleasyon veya multinükleasyon görülebilir.

Koilositoz, nükleer atipi, arkitektural anormallikler, binükleasyon veya multinükleasyon HPV ile enfekte bir hücre için patognomoniktir ve L-SIL'de bu özellikler belirgindir. L-SIL ile ilişkili arkitektural anormallikler, enfekte epitelin bazal ve parabazal hücre proliferasyonundan kaynaklanmaktadır. Bu anormal proliferasyon sonucunda epitelde, enfekte olmayan epitele göre oldukça farklı bir morfolojik görünüm açığa çıkmaktadır. Bu nedenle L-SIL'de genellikle epitelin üst

katmanlarında belirgin hiperkromatik çekirdeklere sahip epitel hiperplazisi görülmektedir. HPV ile indüklenen bu hiperplazi sıklıkla papillomatozis veya akantozis ile karakterizedir (26).

L-SIL yüzeyinde sıklıkla parakeratoz ve daha az sıklıkla hiperkeratoz da görülebilmektedir. Bazen diskeratoz bulunabilir. Ayrıca endoservikal gland tutulumları da olabilmektedir (35).

L-SIL sıklıkla tedavi gerektirmeyen, spontan regresyon gösteren bir lezyon olmasına rağmen az bir kısmı H-SIL'e ilerleyebilmektedir. H-SIL'e ilerlemedeki en önemli risk faktörü HR-HPV varlığıdır. L-SIL tedavi gerektirmeyen lezyonlardır (36).

2.6.1.2 H-SIL (CIN2/3)

H-SIL'de atipi, epitelin sadece alt üçte birlik kısmına sınırlı değildir ve tüm epitel katmanlarında görülebilmektedir. Atipinin derecesi L-SIL'dekinden yüksektir. Belirgin bir bazal-parabazal hücre atipisi ve atipik mitoz mevcuttur. Ek olarak nükleer kalabalıklaşma, pleomorfizm ve hücrel polarizasyon kaybı vardır. Nükleuslarda belirgin irileşme görülür ve daha çok epitelin alt yarısında belirgin olmakla birlikte süperfisyal hücreler de bir dereceye kadar irileşme göstermektedir. L-SIL'e benzer şekilde nükleuslar hiperkromatiktir. Perinükleer sitoplazmik halo, binükleasyon veya multinükleasyon görülebilir. Atipik mitozlar genellikle epitelin üst yarısında da bulunur. Nükleus sitoplazma oranı artmıştır. Epitel yüzeyinde tek tek diskeratotik hücreler görülebilir. Bu hücreler piknotik nükleuslu ve yoğun asidofilik sitoplazmalıdır (32). H-SIL'in karakteristik özelliklerinden biri de nükleus boyutlarındaki değişkenliktir (anizonükleoz).

H-SIL'de L-SIL'e benzer şekilde epitelin üst tabakalarında koilositik özellikler mevcuttur. Bu koilositik özellikler genellikle bizar nükleuslar ve anormal keratinizasyondan oluşmaktadır (26).

CIN terminolojisi H-SIL'i CIN2 ve CIN3 olmak üzere iki kategoriye ayırır. Bu ayrım neoplastik hücrelerin epiteli kaplama oranına göre yapılmaktadır. CIN2 lezyonlarda neoplastik hücreler epitelin alt üçte ikisinde bulunurken epitelin üst üçte birine uzanmaz. CIN3, şiddetli displazi ve karsinoma in situya eşdeğerdir ve bu lezyonlarda neoplastik hücreler tüm epiteli kaplarken epitelin her seviyesinde mitozlar görülebilmektedir (37).

H-SIL’de sıklıkla endoservikal gland tutulumu görülmektedir. H-SIL’de glandüler tutulum ve pozitif cerrahi sınır varlığı rezidüel veya rekürren lezyonların bağımsız prediktörleridir (24).

L-SIL ve H-SIL tanılarının H&E boyama ile ayrımında kullanılabilen bir takım kriterler mevcuttur. Bunlar; neoplastik hücrelerin epiteldeki dağılımı, mitotik figürlerin epitelde bulunduğu seviye, epiteldeki nükleer atipi ve diferansiyasyon derecesi gibi özellikleri içermektedir. H-SIL’de hücre boyutu, koilositoz, nükleer atipi ve keratinizasyon derecesi farklılık gösterebilmektedir. H-SIL’deki değişken histolojik görünüm, bu lezyonları farklı formlara ayırmıştır. En yaygın görülen form, epitelin üst üçte ikisinde mitotik figürlerle birlikte atipinin eşlik ettiği koilositik (matür) formdur. Bir diğer sık görülen form, epitel yüzeyinde belirgin keratinizasyon gösteren keratinize H-SIL’dir. H-SIL’in tanınması en zor formu immatür metaplastik fenotiptir. Bu lezyonlar immatür skuamöz metaplaziye benzer ancak immatür skuamöz metaplazi ile karşılaştırıldığında immatür metaplastik fenotipli H-SIL’de belirgin hiperkromazi ve anizonükleoz görülür. H-SIL’de nadiren görülen form ise hem skuamöz hem de müsinöz farklılaşmadır. Bu lezyonlar SMILE (stratified mucin producing intraepithelial lesion) olarak adlandırılır ve belirgin müsin damlacıkları içeren hücrelerle karakterizedir (26)(38).

L-SIL’lerin %80’den fazlası ve H-SIL’in %100’ü HR-HPV ile ilişkilidir. Her iki lezyonda da en sık görülen HPV tip 16’dır. H-SIL’in büyük bir çoğunluğu varolan L-SIL zemininden gelişmektedir ve H-SIL’lerin on yıllık süreçte %10’u invaziv karsinomaya ilerlemektedir (33)(39).

2.7 Human Papilloma Virus (HPV) ve Kadın Genital Sistem

Serviks kanserleri her yıl yaklaşık olarak 500.000 yeni tanı alan, dünya çapında kadınlarda en yaygın görülen kanserlerden biridir. Kadınlarda önemli bir halk sağlığı sorunu olmakla birlikte en sık görülen dördüncü kanser türüdür. Ayrıca servikal kanserler kadınlarda kansere bağlı ölümden ikinci önde gelen nedendir. Özellikle gelişmekte olan ülkelerde yetersiz sağlık hizmetleri ve sınırlı kaynaklar nedeniyle kansere bağlı ölümlerde önemli bir yer edinmiştir (40)(41).

Dünyada viral enfeksiyonlara bağlı kanserler %15-20 oranında görülmekte olup HPV tüm kanserlerin %5’inden sorumludur. Tüm serviks kanserlerinin %90’ından fazlası HR-HPV tipleri ile olan kalıcı enfeksiyonlardan kaynaklanır ve

öncelikle premalign lezyonların gelişmesine ve ilerleyen süreçte invaziv kansere dönüşmesiyle sonuçlanır. HPV ilişkili karsinogenez; immunsupresyon, sürdürülmüş hücre proliferasyon sinyalleri, replikatif ölümsüzlük, tümör supresörlerinden kaçınma gibi özellikler içeren hücrelerde genetik değişikliklerin birikmesi ile ilişkili çok aşamalı bir süreçtir.

Çoğu HPV enfeksiyonu asemptomatiktir. Enfeksiyonların bir çoğu konakçı immun sistemi tarafından ortadan kaldırılır; ancak yaklaşık %10'unda HR-HPV tipi ile kalıcı enfeksiyon gelişir (41).

2.7.1 Papillomavirüslerin Genel Özellikleri ve Klasifikasyonu

Omurgalıları enfekte eden eski tip virüslerden olan papillomavirüsler (PV), enfekte ettikleri omurgalı türüne göre adlandırılırlar ve tür adı öne yazılır. Human papillomavirüs (HPV) bunlardan biridir. Papillomavirüsler epiteliotropiktir ve epitelyal proliferasyona neden olurlar. Bu özellik genellikle benign lezyonlara neden olsa da bazen maligniteyle sonuçlanabilmektedir.

Papillomavirüsler;

- 52-55 nm çapta,
- 72 kapsomerden oluşan ikozahedral kapsidli,
- Yaklaşık 7900 baz çiftinden oluşan, 5×10^6 Da molekül ağırlığında, tek bir kodlama ipliğine sahip süperkoil çift sarmallı DNA genomu bulunduran
- Zarfsız
- Epiteliotropik DNA virusleridir (42)(43).

HPV papillomaviridea ailesinde bulunur ve genom sekans analizi ile sınıflandırılır. Genom sekans analizine göre papillomaviridea ailesinde toplamda 12 cins yer almaktadır ve bunların beşi (alfa, beta, gamma, mu ve nu) HPV içerisinde bulunmaktadır. Alfa papillomavirüsler en büyük grubu oluşturmakta olup klinik önemi olan HPV'lerin birçoğu bu grupta yer almaktadır (44).

Birçok virüsün aksine HPV'ler, antijenik yapılarına göre sınıflandırılmazlar. DNA yapısına göre genotipler olarak ve keşfedildikleri sıraya göre numaralandırılmaktadırlar. 200'ün üzerinde HPV tipi tanımlanmıştır ve bu tipler daha sonra ilgili HPV tiplerine gruplandırılmıştır. HPV'lerin sınıflandırılmasında viral genomlar arasındaki %90-98 homoloji derecesi önemli olmaktadır (45)(46).

Papillomavirüs tiplerinin alt tiplere ayrılması L1 nükleotid sekansının (majör yapısal gen) herhangi bir HPV genomundan en az %10 farklılığı ile tanımlanmaktadır (47). Ancak birbirinden en uzak tiplerde bile en az %40 benzerlik görülmektedir (45).

HPV'ler sistematik yaklaşımın tamamen ötesinde sıklıkla enfekte ettikleri cilt tipi veya anatomik bölgeye göre de gruplandırılmıştır. Bu gruplandırmaya göre kutanöz, mukozal veya genital HPV terimleri yardımcı olsa da tam anlamıyla açıklayıcı değildir (43).

HPV'leri gruplandırmanın bir başka yolu da onkojenik potansiyelleridir. Onkojenik potansiyellerine göre düşük veya yüksek riskli HPV tipleri gruplandırılmıştır. International Agency for Research on Cancer (IARC) tarafından uterin serviks için 12 HPV tipi (HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59) kesin karsinojen, 8 HPV tipi ise (HPV 26, 53, 66, 67, 68, 70, 73, 82) olası karsinojen olarak kabul edilmiştir (48). Bunlar içerisinde HPV 16 ile 18, %70-80 oranında serviks kanseri ve prekürsör lezyonlarından sorumlu en yaygın görülen ve en yüksek onkojenik potansiyele sahip tiplerdir. Düşük riskli grupta ise HPV 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 55 ve 62 yer almaktadır (24). Bu gruptaki HPV tipleri genital siğiller, kondiloma aküminata ve benign servikal lezyonlarla ilişkilidir. HPV tip 6 ile 11 bu grupta en sık görülen tipler olmakla birlikte genital siğillerin %90'ından sorumludur (41).

Tablo 2-2. Onkojenik potansiyellerine göre HPV tipleri (48).

Düşük riskli HPV (LR-HPV)	6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 55, 62
Olası yüksek riskli HPV	26, 53, 66, 67, 68, 70, 73, 82
Yüksek riskli HPV (HR-HPV)	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59

2.7.2 HPV'nin Genom Yapısı, Proteinleri ve Replikasyonu

Papillomavirüslerin genomik yapısı oldukça karmaşıktır. HPV genomu yaklaşık 7900 baz çiftinden oluşur ve tüm varsayılan kodlama dizileri (open reading frames: ORF) tek bir DNA ipliği üzerinden düzenlenir. Böylelikle tüm papillomavirüsler aynı genomik organizasyonu paylaşır. ORF'lar spesifik protein ürünlerini üretmektedir. Bununla birlikte çoğu viral protein birden fazla ORF'a özgü messenger RNA'nın (mRNA) birleştirilmesinden oluşmaktadır (42).

HPV genomu işlevsel olarak erken bölge (early: E), geç bölge (late: L) ve uzun kontrol bölgesi (long control region: LCR) olarak üç bölgeye ayrılmıştır. Erken bölge replikasyon, transkripsiyon ve hücresel proliferasyonu kontrol eden altı geni (E1, E2, E4, E5, E6, E7), geç bölge major ve minor yapısal kapsid proteinlerini kodlayan iki geni (L1, L2), LCR ise E ve L genlerinin kodlanmasını ve transkripsiyonunu kontrol eden düzenleyici dizileri içermektedir (49). LCR ‘non-coding’ (protein kodlamaz) olarak da bilinir. Büyük ölçüde patojeniteden sorumlu proteinler ise erken bölgeden kodlanmaktadır (43).

Tablo 2-3. HPV genom yapısı (34).

HPV Geni	Fonksiyonu	Primer rolü
E1	Replikasyon	Viral plasmid replikasyonu, Epizomal onarım
E2	Replikasyon, transkripsiyon	Epizomal onarım
E4	Replikasyon, transkripsiyon	Sitokeratin filament harabiyeti, L2 üretimi
E5	Replikasyon, transkripsiyon, transformasyon	Hostgrowth faktör reseptörlerinin uyarılması
E6	Replikasyon, transkripsiyon, transformasyon	Hücre siklusunda p53, Bak, Bax baskılanması, telomeraz uyarımı
E7	Replikasyon, transkripsiyon, transformasyon	Hücre siklusunda Rb baskılanması, p21 ve p27 uyarılması
L1	Viral kapsid	Major kapsid proteini
L2	Viral kapsid	Minor kapsid proteini

2.7.2.1 E6 VE E7 HPV ONKOPROTEİNLERİ

HPV’nin iki temel onkoproteini vardır ve HPV’lerin onkojenik potansiyellerini sürdürmeleri E6 ve E7 onkoproteinlerin üretimi ile mümkündür. Bu onkoproteinlerin devamlı ekspresyonu HPV ile enfekte servikal hücre büyümesi için gereklidir. Bu da enfekte hücrelerin büyümesinin sürekli bir E6/E7 ekspresyonuna bağlı olması nedeniyle ‘onkoprotein bağımlı’ olduğunu göstermektedir (50)(51).

Uzun yıllardır yapılan çalışmalar, E6/E7 onkoproteinlerinin HPV ile enfekte hücrelerde altı ana fenotipik değişikliğe neden olduğunu göstermiştir. Bu değişiklikler, kesintisiz proliferatif sinyal verme, tümör supresörlerinden kaçınma, doku invazyonunu veya metastazı uyarma, replikatif ölümsüzlüğü oluşturma, angiogenezi indüklemeye ve hücre ölümüne karşı koymadır (51).

E6 ve E7 proteinleri sırasıyla yaklaşık olarak 150 ve 100 aminoasit uzunluğunda küçük proteinlerdir. Enzimatik aktiviteleri yoktur; ancak hücresel proteinlerle kompleks oluşturarak hücreyi manipüle ederler (52).

E6 onkoproteini, HR-HPV tipleri ile enfekte hücrelerin nükleus ve sitoplazmasında yer alır ve yaklaşık 17 kDa büyüklüğündedir. E6 proteini, tümör supresör p53 proteininin parçalanmasını uyarıp hücre proliferasyonunu başlatmak için p53 ve hücresel übikuitin ligaz E6-AP (E6 ile ilişkili protein) ile trimerik kompleks oluşturur. E6'nın aktivasyonu sonucu parçalanan p53 proteini nedeniyle enfekte hücre proliferasyonu meydana gelir (53).

E6, telomeraz enzimini indükleyerek de apoptotik etkinin ortadan kalkmasına yol açmaktadır. Telomeraz, kromozomların uç kısmında telomer uzunluğunu stabilize eden böylece replikatif yaşlanmayı önleyen bir enzimdir. Bu enzim, harabiyete uğrayan ve kısalan telomerleri tamir ederek otoregülasyonu önler, hücre yaşamının uzamasını ve apoptozisin ortadan kaldırılmasını sağlar. Telomeraz işlevi bozulduğu zaman hücrelerde sürekli bölünme, yaşlanma ve fonksiyon kaybı meydana gelir. HPV E6 proteini de bu amaçla telomeraz ekspresyonunu indüklemektedir (53)(54).

E7 onkoproteini, enfekte hücrelerin nükleusunda bulunur ve yaklaşık 12 kDa büyüklüğündedir. E7 proteininin temel olarak, HPV ile enfekte hücrelerde tümör supresör Rb proteinine bağlanıp Rb'yi inaktive eder ve hücre siklusunun S fazına ilerlemesine yol açar (53)(55).

E7 aynı zamanda siklin bağımlı kinaz (CDK) inhibitörleri olan p21 ve p27 bileşenlerini, histon deasetilazları ve AP1 transkripsiyon kompleksini içeren hücre proliferasyonu ile ilgili proteinlerle de etkileşmektedir (55). Enfeksiyon sırasında bazı hücrelerde p21/p27 CDK inhibitörlerinin düzeyine bağlı olarak E7'nin hücre proliferasyonunu uyarma yeteneği inhibe edilmektedir. Keratinositlerin farklılaşmasında yüksek p21/p27 düzeyleri, hücre içinde E7 ve siklin E ile inaktif komplekslerin oluşumuna yol açabilmektedir. E7'nin enfekte hücreleri mitozaya yönlendirme özelliği, düşük p21/p27 eksprese eden hücrelerle veya hücre siklusunun progresyonunu devam ettirecek yeterli düzeyde E7 ekspresyonuyla sınırlanmıştır.

Viral onkoproteinlerin düzensiz ekspresyonunun, HPV ilişkili kanserlerin gelişiminde bir predispozan faktör olduğu göz önüne alındığında tüm bu ifadeler önem arz etmektedir. Bu nedenle ki düşük dereceli servikal lezyonlardaki E7

seviyelerine bakıldığında, bazen p21/p27 ve siklin E / CDK ile ilişkinin bir sonucu olarak E7 aracılı hücre proliferasyonunun inhibe edilebileceği düşünülmektedir. Servikal kanser hücrelerinde bulunan yüksek E7 seviyelerinin, CDK inhibitörü p21/p27'i bağlayarak ve inaktive ederek bu inhibisyonun üstesinden geldiği düşünülmektedir (56).

2.7.2.2 L1 VE L2 PROTEINLERİ

Geç bölge yaklaşık 3kb uzunlukta olup L1 ve L2 genlerini içermektedir. L1 geni yaklaşık 55kDa büyüklüğündedir ve viral kapsidin büyük çoğunluğunu kapsayan major kapsid proteinini kodlamaktadır (57). Ayrıca L1'in immunojenik özelliğinden dolayı yeni papillomavirüslerin tanımlanmasında kullanılmaktadır. L1 nükleotid sekansının mevcut papillomavirus genomundan %10'dan fazla farklılığı mevcutsa yeni papillomavirus olarak tanımlanmaktadır. Eğer bu farklılık %10'dan az ise alt tip olarak isimlendirilmektedir (46).

L2 geni yaklaşık 72 kDa büyüklüğündedir ve viral kapsidin minor proteinlerini kodlamaktadır. Ayrıca L2'nin viral DNA'nın enfekte hücre nükleusuna taşınmasından ve enkapsidasyondan sorumlu olduğu düşünülmektedir (57).

2.7.2.3 VIRAL REPLİKASYON

Papillomavirüsler yüksek oranda türe özgüdür ve kendi konak dokuları dışında verimli bir enfeksiyöz süreç gösteremezler. HPV'nin de insan karsinogenezi ile ilişkisi uzun zamandır bilinmektedir ve özellikle yüksek riskli HPV tipleriyle olan enfeksiyonlarla ilgili çalışmalara odaklanılmıştır.

HPV'nin replikatif döngüsü epitelyal farklılaşmaya bağlıdır ve bu döngü yalnızca farklılaşmış skuamöz epitelde tamamlanmaktadır. Replikatif döngü, düşük kopya sayısındaki viral partiküllerin stratum bazaleyi enfekte etmesiyle başlar. Ancak viral partiküllerin bazal hücrelerin yüzeyinde bulunan heparan sülfat proteoglikanlarına ulaşabilmesi için epitelde bir aşınma veya başka bir travmatik olay olması gerekmektedir. Heparan sülfat proteoglikanları yoluyla hücre yüzeyi ile etkileşime giren protein, major kapsid proteinini L1'dir. Viral partiküllerin hücre yüzeyine bağlanmasından sonra endositoz yoluyla hücre içine giriş başlar (43)(58).

Enfekte bazal hücreler farklılaştıkça epitel yüzeyine doğru ilerler. Yüksek oranda viral proteinlerin sentezi ve viral partiküllerin nükleusta toplanması stratum spinosum ve granüloza tabakalarında meydana gelir. Viral genlerin (HPV DNA)

sentezi keratinositlerde gerçekleşir ve başlangıçta bazal hücrelerde düşük kopya sayısındaki viral partiküller, viral DNA replikasyonunun başlamasıyla hücre siklusuna bağlı olarak 50-100 kopya/hücre sayısına ulaşır (59). E6 ve E7 onkogen ekspresyonu, E6/E7 transkriptlerinin kontrolü altındadır ve viral gen sentezi minimum düzeydedir. Enfekte keratinositlerin epitelin st tabakalarına ilerlemesiyle viral partikül kopya sayısı 1000 kopya/hücre sayısına kadar artış gösterir. Dökülen enfekte keratinosit kalıntılarında ise replikatif sürecini tamamlamış bulaşıcı virionlar bulunur (60).

HPV enfeksiyonlarında viral replikasyon, bazal tabaka hariç epitel tabakalarının aşır proliferasyonu ile ilişkilidir. Aşır proliferasyonla epitelde akantozis, parakeratozis ve hiperkeratozis meydana gelebilmektedir (61). Ayrıca sürekli olarak viral partiküllerin epitelyal yüzeyde toplanması ve yüzeyden salınmasıyla viral genlerin düzenli ekspresyonuna yol açar. Bu ekspresyonlar tipik olarak viral genom tarafından kodlanan E4 proteininin sitoplazmik matrikste bozulmaya neden olduğu viral bir sitopatik etki olan koilositik değişim (koilositik atipi) ile sonuçlanır. Sonuçta meydana gelen koilosit; perinükleer halo, yoğun ve irregüler boyanmış periferel sitoplazma, kuru üzüm benzeri dalgalı membran özelliği gösteren irileşmiş hiperkromatik nükleus ile karakterize sperfiyal veya intermedier matür skuamöz hücrelerdir. Bazen koilosit nükleuslarında binükleasyon veya multinükleasyon görülebilir. Epitel tabakalarının değişik seviyelerinde atipik mitotik figürler tespit edilebilir (24). Normal olarak skuamöz hücrelerde glikojen birikimine bağlı olarak oluşan sitoplazmik berraklaşmanın koilosit ile karıştırılmamasına dikkat edilmelidir.

Enfekte keratinositlerin düzenli olarak epitelin st tabakalarına hareketi ve bunun sonucu olarak viral genomun düzenli ekspresyonu L-SIL ile sonuçlanır. HR-HPV tipleri ile olan enfeksiyonlarda viral genom düzensiz bir şekilde eksprese edilebilir. Bu HPV tiplerinin genomları tarafından kodlanan E6-E7 proteinleri, p53 ve Rb tümör supresör genleri tarafından kodlanan proteinleri bağlar ve inaktive ederek konak hücrenin düzensiz proliferasyonuna neden olur. Bu düzensiz proliferasyon E4 ekspresyonuna, virion üretimine ve koilositik değişikliklerin azalmasına yol açar. Böylece viral genomun konak genomu üzerindeki entegrasyonunu arttırarak konak hücrelerin malign transformasyonuna neden olur (62)(63).

2.7.3 HPV Enfeksiyonlarında İmmun Yanıt

Viral enfeksiyonlarda doğal immunitenin ilk aşamasını yabancı etkenin tanınması oluşturmaktadır. Bundan sonraki aşamalarda doğal immunitenin hücresel elemanları devreye girer ve inflamatuvar süreç başlatılır. Böylece inflamatuvar sitokinler ve efektör moleküller üretilir. Dendritik hücreler gibi doğal immunitenin bazı elemanları, antijenin T helper lenfositlere (Th; CD4+) sunumunu gerçekleştirerek edinsel immunitiyi uyarır. Edinsel immunité her patolojen için spesifik olmakla birlikte humoral ve hücresel immunitiyi içermektedir. Antijen sunumuyla birlikte antijenin özelliğine göre uygun edinsel immün yanıt süreci başlamış olur (64).

HPV enfeksiyonlarına karşı immün yanıt özellikleri de genel anlamda viral enfeksiyonlarda görülen immün yanıtı benzemektedir; ancak farklı olarak HPV enfeksiyonlarında immün yanıt daha geç gerçekleşmektedir. Bunun nedeni HPV'nin çeşitli yapısal ve fizyolojik özelliklerinden dolayı zayıf immünojenik olmasındandır. HPV'nin zayıf immünojenik özelliği, konakçı immün sistemi tarafından saptanmadan kolayca kaçmasına neden olmaktadır. Bu kaçış esnasında immün sistemin bazı fonksiyonlarını baskılamasından dolayı HPV enfeksiyonlarının iyileşmesi uzun zaman almaktadır (64).

İmmün yanıtın yeterli oluşabildiği bir konakçıda hem LR-HPV hem de HR-HPV tipleri aylarca veya yıllarca kalabilmektedir ve epitel yüzeyinden virüsün sürekli salınımına neden olacak kronik lezyonlara yol açabilmektedir. Bunun nedeni, HPV'nin aktif bir immün sistem karşısında bile enfekte epitel hücresinde kalmasına izin veren bir takım adaptasyon mekanizmaları geliştirmesidir. Bu mekanizmalardan en önemlisi replikatif döngüde bazal-parabazal hücre tabakasında viral gen ekspresyonunun çok düşük seviyelerde olmasıdır. HPV, viral gen ekspresyonunu T lenfositlerin ve dendritik hücrelerin daha az bulunduğu epitelin yüzeyel tabakalarına kadar geciktirmektedir ve doğal immunitenin uyarılmasını yavaşlatmaktadır (65). Bir diğer önemli mekanizma ise keratinositlerden antijen sunumunun iyi olmamasıdır. Buna bağlı olarak edinsel immün yanıt gecikmektedir (45).

Sonuç olarak HPV enfeksiyonuna karşı konakçı tepkisi, immün sistem tarafından tanımlanabilen viral antijenlere ve enfeksiyon başlangıcı ile tam oluşmuş immün yanıt arasında geçen süreye bağlıdır (65).

2.8 Hücre Siklusu

Hücre siklusu sıralı bir dizi fazdan oluşmaktadır. Bu fazlar, S, M ve G (G1, G2) olarak bilinir. G1 fazı, DNA sentezi için hazırlık aşamasıdır. S fazı, parental hücrenin DNA sentezi ve kromozom duplikasyonunda görevlidir. G2 fazı, hücre bölünmesine hazırlık aşamasıdır. Son olarak M fazı, iki benzer hücre bölünmesini içermektedir (66).

Aktif olarak döngüye girmeyen stabil hücreler, G0 olarak adlandırılan fazda döngü dışında beklerler. Nöronlar ve iskelet kası hücreleri gibi bazı hücreler ömürlerinin tamamını G0'da geçirir. Kemik iliği hücreleri ve gastrointestinal sistem epitel hücreleri gibi hücreler sürekli bölünme gösterirler. Hücrelerin G1 fazına geçişi, G0 fazında bekleyen stabil hücrelerden ya da bir mitoz turunu tamamlamış hücrelerden oluşmaktadır (67).

Tamamlanması yaklaşık olarak 24 saat süren her bir hücre siklusu bir önceki siklusun uygun şekilde aktivasyonuna ve tamamlanmasına bağlıdır. Bu nedenle siklusta kontrol noktası mekanizmaları bulunur ve DNA bütünlüğü ve siklus için kritik olaylar yakından takip edilir. G1-S kontrol noktası, DNA hasarını kontrol etmektedir. G2-M kontrol noktası ise hücre bölünmesinden önceki son kontrolleri yapmaktadır. Siklus içerisinde bir sorun tespit edildiğinde (DNA hasarı vb.) onarıma izin vermek için siklus duraklatılır ya da onarım mümkün değilse hücreler apoptozise yönlendirilir. Birçok onkojen ve tümör baskılayıcı protein, hücre siklusu kontrol noktalarına müdahale ederek neoplastik hücrelerin sürekli bölünmesine ve birikmesine izin verir. DNA hasarı kontrol noktalarının işlev kaybı, artmış mutasyon oranıyla sonuçlanır ve karsinogeneze yol açar (67)(68).

Hücre siklusunun uygun şekilde ilerlemesi siklinler, siklin bağımlı kinazlar (CDK) ve CDK inhibitörleriyle düzenlenir. CDK'lar, hücre siklusunun faza özgü aktivitelerinin gerçekleştirilmesinde yer alan spesifik protein substratlarının (Rb vb.) fosforilasyonunu düzenler. CDK'ların enzimatik aktiviteleri siklin adı verilen düzenleyici proteinlere bağlıdır. Siklinler, siklusun belirli evrelerinde sentezlenirler ve CDK'ları aktive ederler. 15'ten fazla siklin tanımlanmıştır ve bunlardan siklin D, E, A ve B hücre siklusunda görülür (69).

G1, kritik bir fazdır ve hücre etkileşimleri, büyüme faktörleri ve hormonlar ile düzenlenir. Buradaki kilit nokta Rb fosforilasyon derecesidir. G1 fazında siklin D, CDK4 veya CDK6'ya bağlanır. Siklin D/CDK4-6 komplekslerinin temel hedefi

Rb fosforilasyonudur. G1 kontrol noktasında Rb yetersiz fosforile edilirse hücre proliferasyonu bloke edilir ve hücre G1 fazında kalır. Hipofosforile Rb, aktive edici E2F transkripsiyon faktörüne bağlanarak E2F'ye bağlı gen ekspresyonunu bloke eder. G1-S geçişinde siklin E'ler CDK2'ye bağlanarak Rb'yi hiperfosforile eder ve Rb'nin E2F'den ayrılmasını sağlar. Sonuç olarak E2F'ye bağlı gen ekspresyonu aktifleşir. Siklin A, S fazının sonunda CDK2'ye bağlanır ve mitoz geçişe teşvik eder. Siklin E ve A'ya bağlanan CDK2, S ve G2 fazlarında siklusun ilerlemesi için birçok hedefi fosforile eder. Son olarak siklin B, CDK1 ile birleşip hücresel protein fosforilasyonlarını gerçekleştirerek siklusu mitoz fazına geçirir (69)(70).

Siklin-CDK komplekslerinin aktivitesi CDK inhibitörleri (CDKI) ile sıkı şekilde kontrol edilmektedir. CDKI iki ana sınıfa ayrılır. Bunlar Cip/Kip ve INK4/ARF aileleridir. Bu inhibitörler tümör supressör olarak fonksiyon görürler ve sıklıkla tümörlerde değişikliğe uğrarlar. Cip/Kip ailesi p21(Cip1), p27(Kip1) ve p57(Kip2)'i içerir. INK4 ailesi üyeleri ise p15(INK4B), p16(INK4A), p18(INK4C) ve p19(INK4D)'dur. INK4 ailesinin tüm üyeleri spesifik olarak CDK4 ve CDK6'ya siklin D kinaz aktivitelerini inhibe ederler. Böylelikle G1 noktasından geçişi durdurmuş olurlar (68).

Cip/Kip ailesi üyeleri siklin-CDK komplekslerine bağlanarak aktivitelerini bozarlar ve siklusun G1 ve S fazlarının tüm basamaklarını denetlerler. Memelilerde ilk tanımlanan CDKI, p21'dir. Daha sonra p21'e yapısal ve fonksiyonel olarak benzerlik gösteren p27 ve p57 tanımlanmıştır. P21 ekspresyonu, DNA hasarı ile aktive edilen tümör baskılayıcı protein olan p53 tarafından indüklenir ve ekspresyonun artmasıyla DNA onarımının sağlanabilmesi için siklus durdurulur. P21 bu etkisini CDK2 inhibisyonu yolu ile gerçekleştirir. CDK2 inhibisyonu ile Rb fosforilasyonu ortadan kalkar ve Rb-E2F kompleks oluşumuna yol açar. Tam tersi olarak p21, siklin D/CDK4-6 kompleksini aktive eder ve Rb'nin fosforillenmesini sağlar (68).

P27 regülasyonu ise p21'e zıt olarak posttranskripsiyonel olarak gerçekleşir. P27 protein seviyeleri G0 ve erken G1 fazlarında maksimumdur. P27 proteini, siklin E/CDK2 kompleksine bağlanarak inhibe eder. G1 sırasında p27 seviyesindeki aşamalı azalma, S fazına geçiş için gerekli olan siklin E/CDK2 kompleksinin aktivasyonuna izin verir. Özellikle G1 fazının sonunda aktif siklin E/CDK2 kompleksleri, fosforile p27'nin ubiquitin aracılı bozunmasına neden olur ve p27 seviyesinde ani düşüş meydana gelir (70).

p21 ve p27, siklin-CDK inhibisyon özelliklerinin yanısıra tümör supresör genlerdir. Artmış p21 ekspresyonun tümör rekürrensiyle, azalmış p27 ekspresyonun ise artan tümör derecesi, patolojik evre ve düşük sağkalım ile ilişkisi mevcuttur (68)(70).

INK4 ailesi üyeleri başta p16 olmak üzere tümör supresör gibi davranarak hücre siklusunu bloke ederler. p16, CDK4-6' ya bağlanmak için siklin D ile yarışır ve siklin D/CDK4-6 kompleksinin inhibisyonunu sağlayarak Rb'nin fosforilasyonunu engeller. Rb'nin fosforilasyonu engellendiğinde hücre siklusu G1 kontrol noktasında durur ve hücre proliferasyonu engellenmiş olur. p16, çeşitli kanserlerde sıklıkla mutasyona uğrayarak veya hipermetilasyonla inaktif hale getirilir (70).

HPV enfeksiyonlarında E6 ve E7 onkogenleri, Rb'yi inaktive ederek p16 aşırı ekspresyonuna neden olurlar. Bu nedenle p16 aşırı ekspresyonu, özellikle HR-HPV tipleriyle enfekte alt kadın genital sistem neoplazilerinin değerlendirilmesinde önemli bir biyobelirteçtir.

2.9 Çalışmamızda Değerlendirilecek İmmunohistokimyasal Belirteçler

Tümör supresör genler insan karsinogenezisinde kritik öneme sahiptir. Bu genler hücre siklusunu kontrol eden proteinleri inhibe ederek etki etmektedir. Normal bir hücrede supresör gen proteinlerinin inaktivasyonu, başka proteinlere bağlanma veya fosforilasyonla gerçekleşirken tümör hücrelerindeki inaktivasyon genellikle mutasyonlar veya delesyonlardan kaynaklanmaktadır (69).

2.9.1 Rb

Rb, bir tümör supresör gendir. 13q14 kromozomu üzerinde lokalize olan Rb geni hücre siklusunun negatif düzenleyicisi görevini gören nükleer pRb'yi kodlamaktadır. Rb, DNA hasarına bağlı olarak hücre siklusunu durdurur veya apoptozisi indükler. Rb, hücre siklusunda G1 fazından S fazına geçişi inhibe eder ve aktivitesi fosforilasyonla düzenlenir. Hipofosforile Rb proteini, E2F'ye bağlanıp inaktive ederek normal hücre proliferasyonunu bloke eder. E2F, hücre siklusunun ilerleyebilmesi için gereklidir. Rb proteini fosforillenirse E2F serbest kalır ve hücre siklusu ilerlemeye devam eder. HPV E7 onkoproteininin, Rb fosforilasyonunu artırarak hücre proliferasyonunu arttırdığı bilinmektedir. Bununla birlikte Rb'da veya ilişkili olduğu düzenleyici yol bileşenlerinde (siklin D-E, CDK4, E2F, p16, p27 vb.) meydana gelen değişiklikler birçok kanserde rol oynamaktadır (68)(69). E7 proteini Rb'ye bağlanarak fosforile eder ve Rb'nin fosforilasyonu ile hücre siklusundaki negatif regülatör etkisi ortadan kalkar. E7 'nin Rb proteini ile etkileşimi, Rb'nin E2F transkripsiyon faktörleri ile arasındaki ilişkiyi bozmaktadır. E2F bu etkileşim sonrası siklin A ve E gibi viral DNA replikasyonu için gerekli hücre proteinleri transaktive etmektedir (56).

2.9.2 p53

p53 geni, 17p13 kromozomunda bulunan bir tümör supresör gendir. p53 hücre siklusu kontrol noktalarında kilit öneme sahiptir. Transkripsiyon, DNA bağlanması, tetramerizasyon ve otoinhibisyonun düzenlenmesi gibi görevlere sahiptir. p53'ün majör fonksiyonu DNA hasarına bağlı hücre siklusunu durdurması ve apoptozisi başlatmasıdır. p53 geninde homozigot bir kayıp yaşanırsa DNA hasarı onarılamaz ve hücre proliferasyonu DNA hasarına rağmen ilerler. Böylelikle

mutasyona sahip hücreler birikmeye başlar. p53 gen mutasyonları tümörlerde sıkça görülmektedir. Birçok tümörde p53 inaktivasyonu mevcuttur. HPV E6 onkoproteininin de, p53'e bağlanıp inaktive ederek hücre proliferasyonunu arttırdığı, kromozomal defektli hücrelerin birikmesine neden olduğu ve apoptotik etkiyi ortadan kaldırıldığı bilinmektedir (55)(69)(71)(72).

2.9.3 p16

p16, INK4 ailesinin siklin bağımlı kinaz inhibitörü olmakla birlikte bir tümör supressör gendir. Kromozom 9p21 yerleşimli olup CDKN2A tarafından kodlanır. p16, siklin D/CDK4-6 kompleksini inhibe ederek Rb'nin fosforillenmesini önler. Böylelikle hücre siklusu G1 kontrol noktasında durur ve hücre proliferasyonu engellenmiş olur.

p16 genellikle non-neoplastik servikal epitelde ekspresyon göstermezken HPV ilişkili servikal lezyonlarda p16 ekspresyonunun arttığı bildirilmiştir. HPV E7 onkoproteini tarafından Rb'nin inaktivasyonuna sekonder olarak hücre siklusunun durdurulması için p16 ekspresyonunda artış olduğu düşünülmektedir. Sonuç olarak servikte yaygın p16 pozitifliği, HPV varlığının önemli bir belirteçidir (10).

2.9.4 p27

p27, Cip/Kip ailesinin siklin bağımlı kinaz inhibitörü olmakla birlikte bir tümör supressör gendir. Asıl işlevi G1/S geçişini kontrol eden siklin-CDK komplekslerine bağlanarak kinaz komplekslerini inhibe etmektir. p27, serviksin normal skuamöz epitelinin büyümesi ve farklılaşmasında rol oynar. Normal epitel hücrelerinde artmış bir ekspresyon söz konusu iken, tümör hücrelerinde sıklıkla kaybı izlenir. Birçok malignitede hızlandırılmış proteoliz yoluyla p27 ekspresyonunda azalma veya kayıp görülmüştür. Bazı yazarlar düşük p27 seviyesinin kötü prognozla ilişkili olduğunu öne sürmüştür (8)(9).

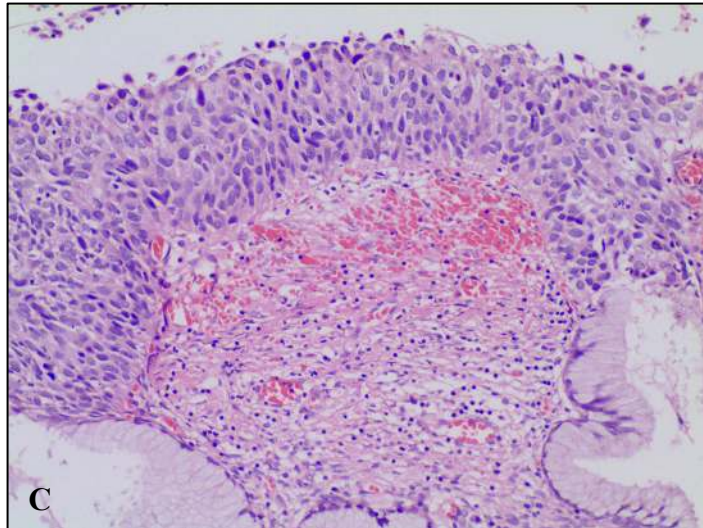
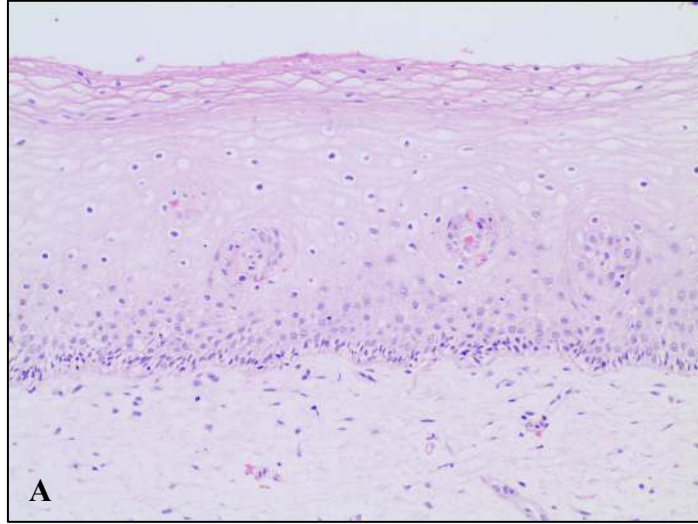
3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Olgu Seçimi

Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'nda 2017-2021 yılları arasında herhangi bir yüksek riskli HPV (HR-HPV) tipi ile enfekte olgulara ait kolposkopik biyopsi, konizasyon ve histerektomi materyalleri retrospektif olarak incelendi. Bu olgulara ait H&E kesitler ve parafin bloklar arşivden çıkarılarak tekrar değerlendirildi. Bu değerlendirme sonucunda immunohistokimyasal boyama için yeterli doku içeren 100 olgu çalışmaya dahil edildi. Bu olgulara ait daha önceden çalıştığımız p16 boyaması da arşivden çıkarılıp tekrardan değerlendirilerek çalışmaya dahil edildi.

Seçtiğimiz 100 olguya ait HPV bilgileri, hastanemizin hasta bilgi sisteminden elde edilmiştir. Olgulara ait elde ettiğimiz HR-HPV tipleri, ilimizde bulunan Kanser Erken Teşhis ve Tarama Eğitim Merkezi'nce (KETEM) PCR yöntemi ile saptanmaktadır.

Histopatolojik değerlendirme sonucunda olgular üç grupta toplandı. Birinci grupta (grup non-D) HR-HPV tipleri ile enfekte fakat servikte displazinin izlenmediği 34 olgu, ikinci grupta (grup L-SIL) HR-HPV tipleri ile enfekte L-SIL tanılı 32 olgu, üçüncü grupta (grup H-SIL) ise HR-HPV tipleri ile enfekte H-SIL tanılı 34 olgu belirlendi (**Resim 3-1**).



Resim 3-1. Normal epitel ve displastik epitellerin ışık mikroskopik görünümü (H&E x200) **A)** Non-D **B)** L-SIL **C)** H-SIL

3.2 İmmunohistokimyasal İnceleme

100 olguya ait H&E kesitler incelenerek en uygun parafin blok seçildi. Seçilen parafin bloklardan Rb (Leica, Newcastle, UK, klon 13A10, 1:30 dilüe, mouse monoclonal antibody), p53 (Leica, Newcastle, UK, klon DO-7, 1:500 dilüe, mouse monoclonal antibody) ve p27 (Sigma Aldrich, California, USA, klon SX53G8, 1:500 dilüe, mouse monoclonal antibody) immunohistokimyasal boyaları çalışılmak üzere her olgu için 3 adet olacak şekilde 4 mikron kalınlığında kesitler yapılarak Poly-L-Lysine adhezivli lamlara alındı. Alınan kesitlerin deparafinizasyonu sonrasında seri alkol solüsyonları ile rehidratasyonu sağlandı. Tam otomatik immunohistokimya boyama cihazı kullanılarak standart compact polymer teknoloji kit ile boyama yapıldı. Antijen açığa çıkarma işleminde sitrat, boyanmanın görülebilmesi için diaminobenzidin (DAB) kromojen kullanıldı. Son olarak Mayer's hematoksilen ile kesitler boyandı. Kontrol dokusu olarak p53 için kolon adenokarsinom, Rb ve p27 için tonsil dokusu kullanıldı. Ayrıca bölümümüzde aynı tam otomatik immunohistokimya boyama cihazı ile önceden çalıştığımız p16'nın (Zeta, California, USA, klon MX007, 1:100 dilüe, mouse monoclonal antibody) lamları incelendi.

3.3 İmmunoreaktivitenin Değerlendirilmesi

Rb, p53, p27 ve p16 için immunohistokimyasal ekspresyon değerlendirilmesi, ışık mikroskopunda semi-kantitatif olarak yapıldı.

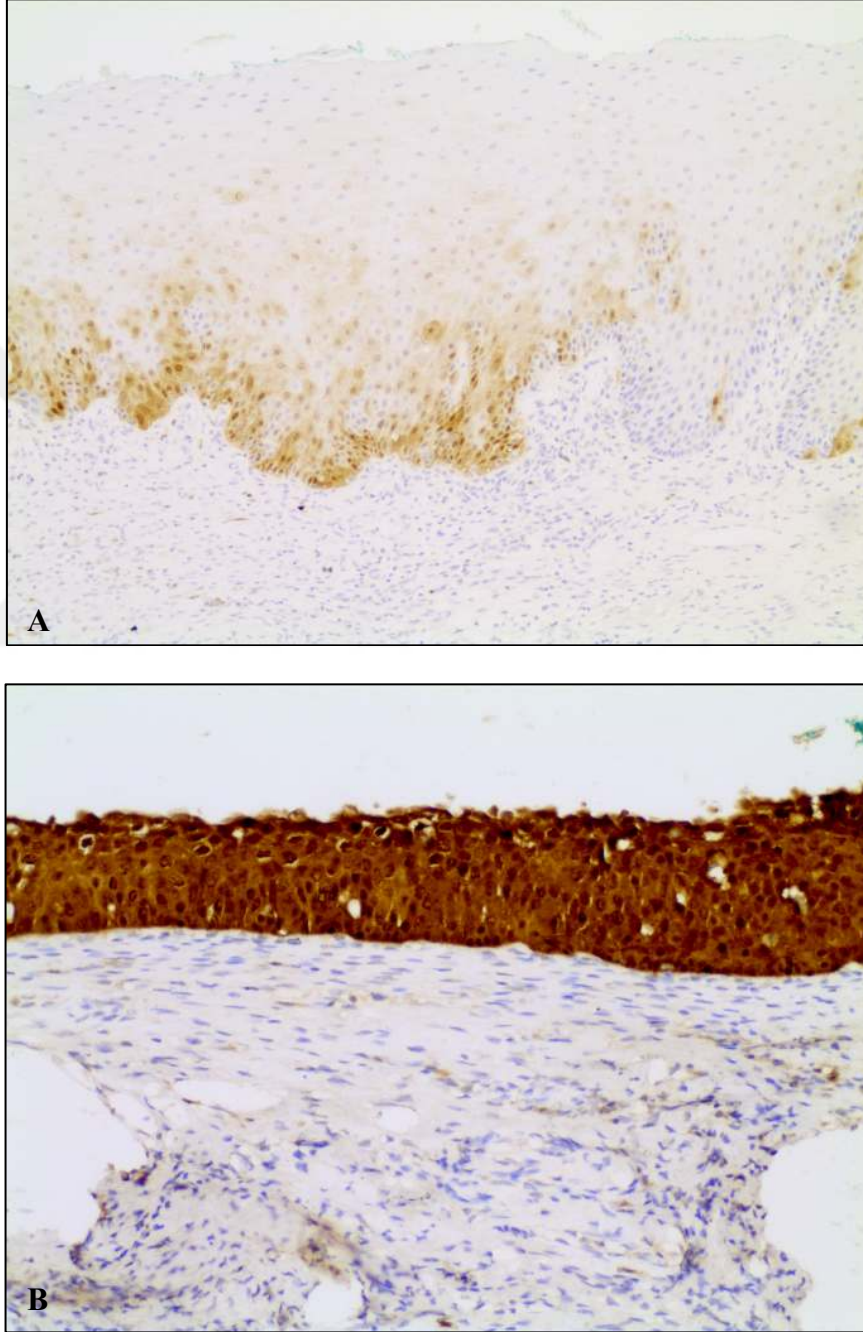
Tüm immunohistokimyasal belirteçler için boyanma yoğunluğu; boyanma yok (0), hafif (+1), orta (+2) ve şiddetli (+3) olarak değerlendirildi.

İmmunohistokimyasal belirteçlerin ayrıca boyanma yaygınlığına bakıldı.

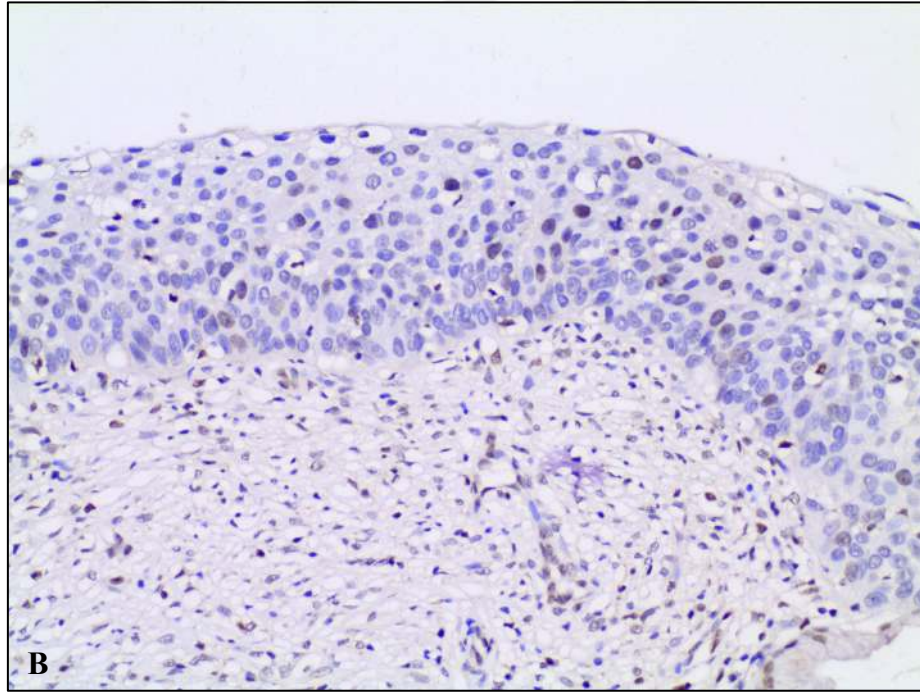
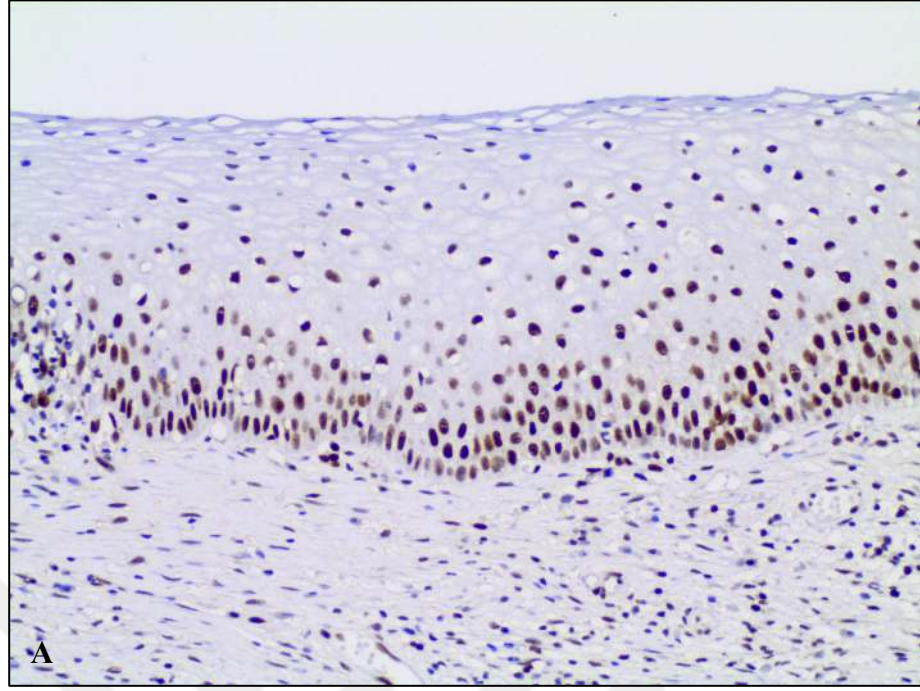
- p16 için boyanma yaygınlığı; epitelde boyanma yok (0), epitelin herhangi bir düzeyinde tek tek veya hücre kümeleri halinde nükleer-sitoplazmik fokal boyanma (+1), süperfisyal boyanma olsun veya olmasın bazal-parabazal düzeyde kesintisiz nükleer-sitoplazmik diffüz boyanma (+2) olarak değerlendirildi (**Resim 3-2**). Epitelde p16 boyanma yaygınlığına 'Lower Anogenital Squamous Terminology (LAST)' önerileri doğrultusunda bakıldı (73).
- Rb ve p27 için boyanma yaygınlığı; epitelde x400 büyük büyütme alanında (BBA) %10'dan az nükleer pozitif hücre (+1), %10-50 arası

nükleer pozitif hücre (+2), %50'den fazla nükleer pozitif hücre (+3) olarak değerlendirildi (74) (**Resim 3-3 ve 3-4**).

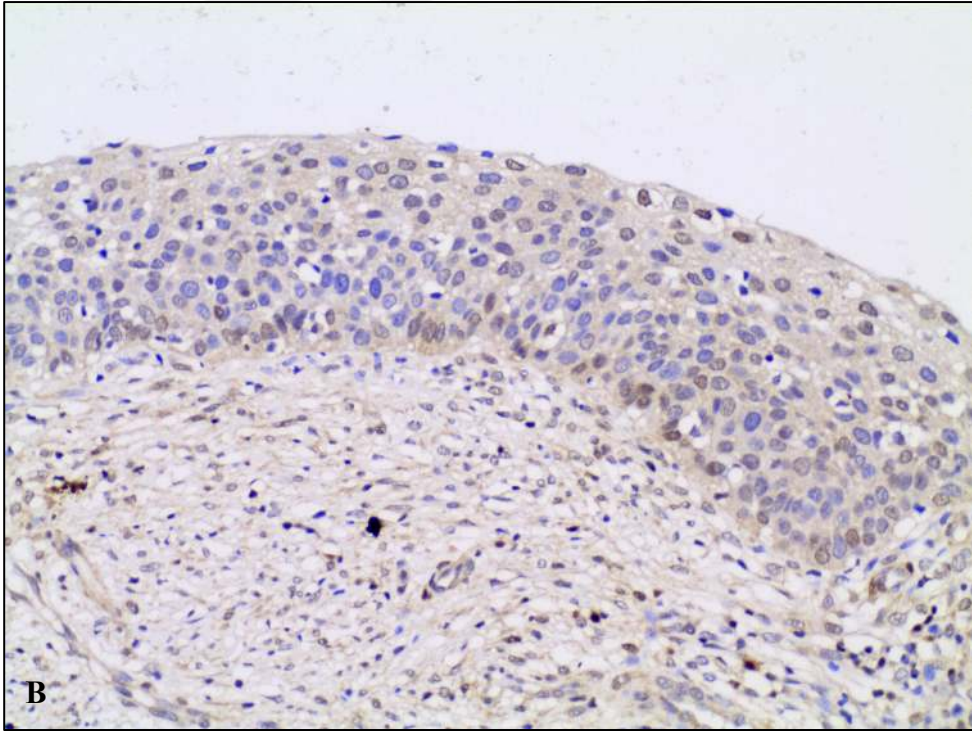
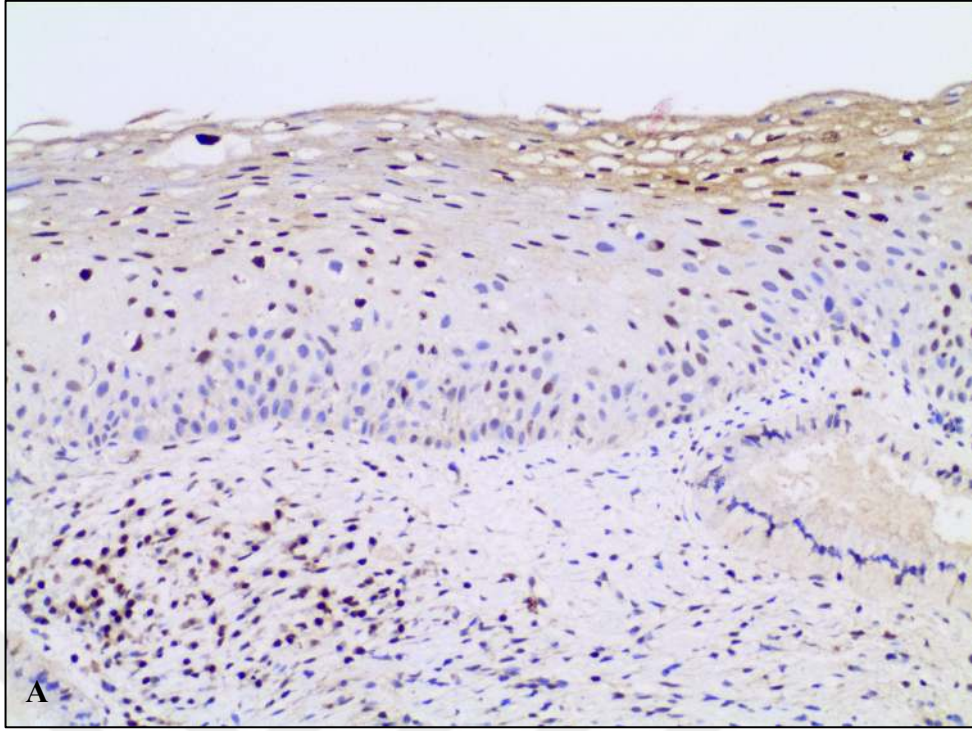
- p53 için boyanma yaygınlığı; epitelde boyanma yok (0), seyrek nükleer pozitif hücrelerin varlığı (+1), %10'dan fazla nükleer pozitif hücrelerin varlığı (+2) olarak değerlendirildi (75) (**Resim 3-5**).



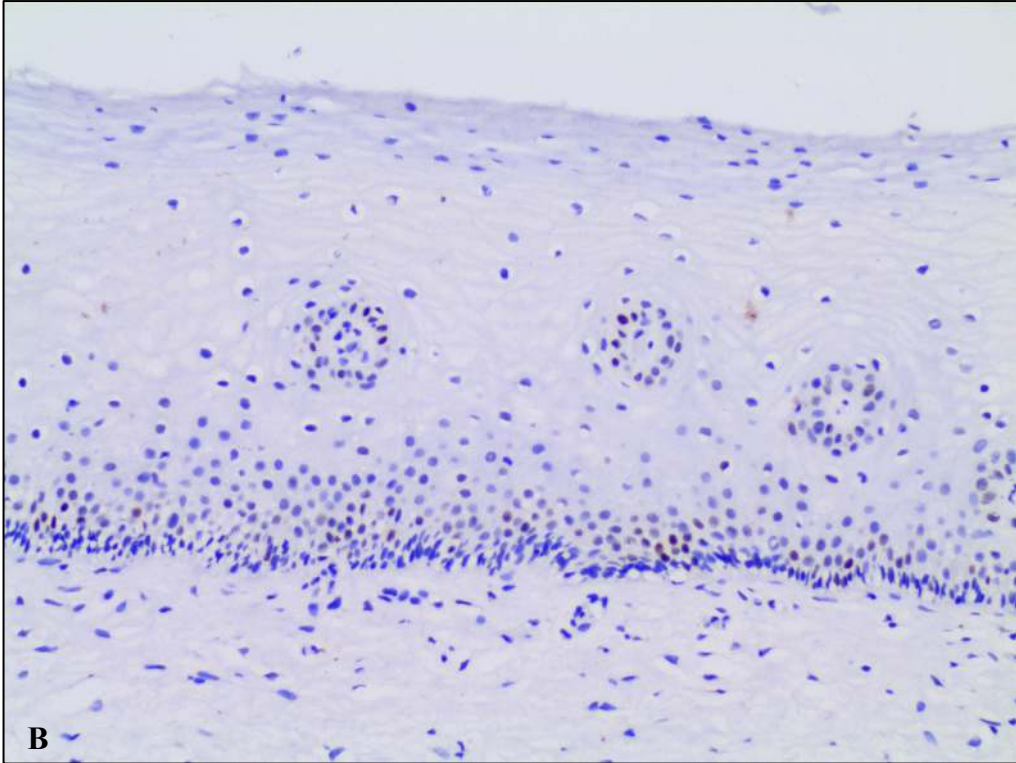
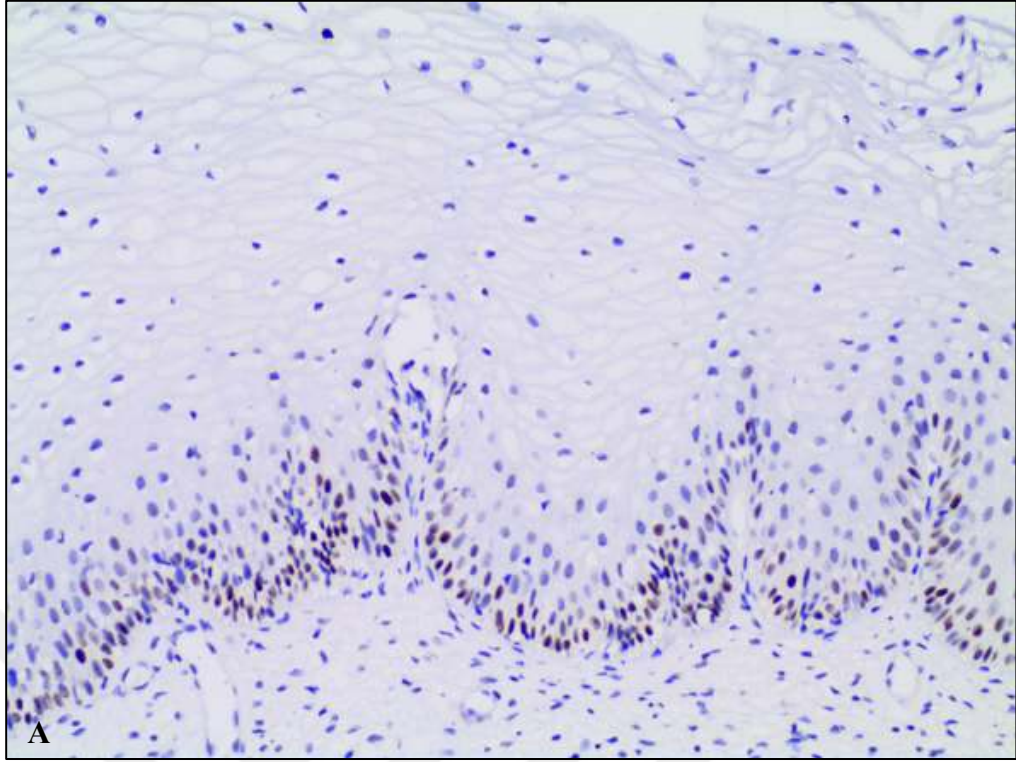
Resim 3-2. p16 immunohistokimyasal ekspresyonu A) Orta yoğunlukta fokal boyanma (x100) B) Şiddetli diffüz boyanma (x200)



Resim 3-3. Rb immunohistokimyasal ekspresyonu. **A)** Hücrelerin %50'sinden fazlasında şiddetli pozitif boyanma (x200). **B)** Hücrelerin %10'undan azında hafif yoğunlukta pozitif boyanma (x200).



Resim 3-4. p27 immunohistokimyasal ekspresyonu. **A)** Hüclerin %50'sinden fazında şiddetli pozitif boyanma (x200). **B)** Hücrelerin %10-50'sinde hafif yoğunlukta pozitif boyanma (x200).



Resim 3-5. p53 immunohistokimyasal ekspresyonu. **A)** Hücrelerin %10'undan fazlasında şiddetli pozitif boyanma (x200) **B)** Epitelde seyrek olarak orta yoğunlukta pozitif boyanma (x200).

Boyanma yoğunluğu ve yaygınlığı skorları toplanarak her bir immunohistokimyasal boyanma için kombine skor elde edildi. İstatistiksel değerlendirmeler elde edilen kombine skorlar üzerinden yapıldı.

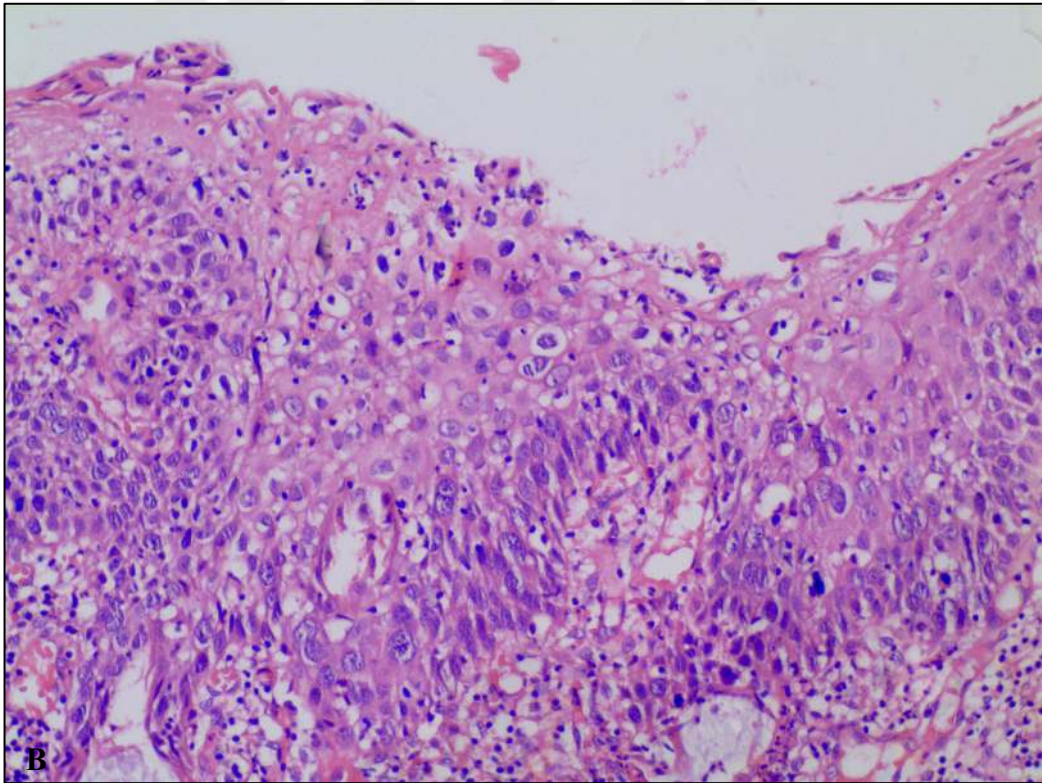
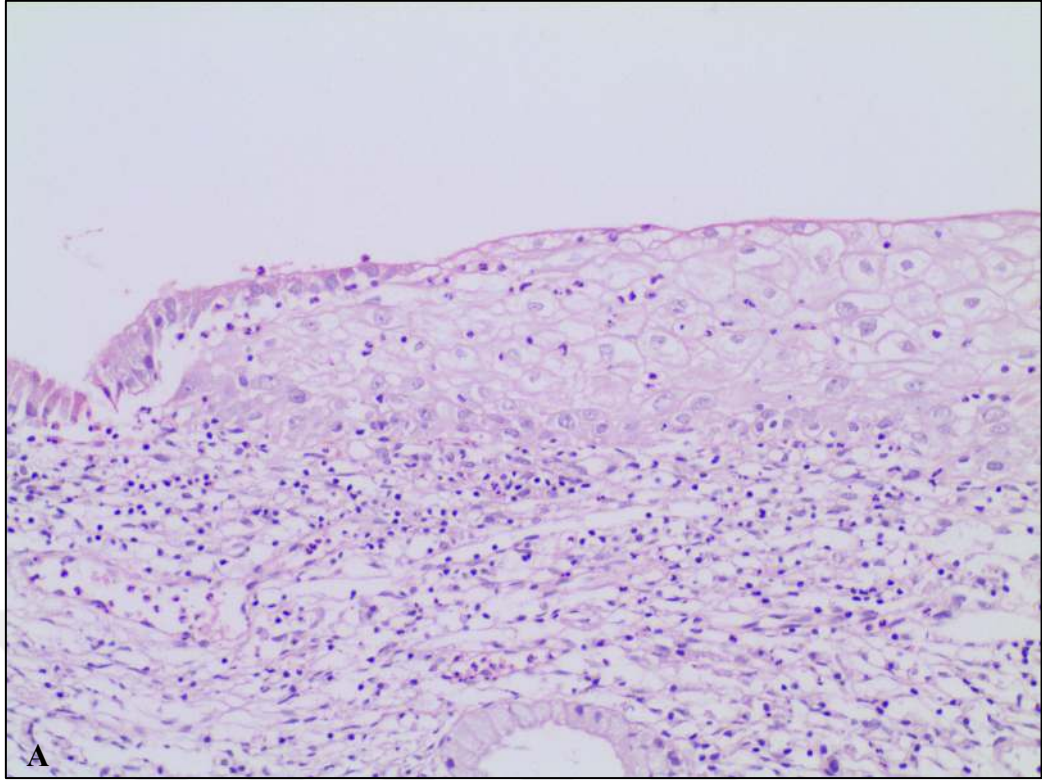
Ayrıca Rb, p53 ve p27 ekspresyonlarının epitelde dağılım paternine de bakıldı.

- Rb ve p53 için değerlendirme; olağan boyanma paterni (bazal ve/veya parabazal boyanma) (+1) ve random boyanma (+2) olarak yapıldı.
- p27 için değerlendirme; olağan boyanma paterni (0, intermedier/süperfisyal boyanma var, bazal/parabazal boyanma yok) ve random boyanma (+1) olarak yapıldı.

p16 için boyanma paterni ayrıca verilmedi. Çünkü mevcut immunohistokimyasal boyanma durumu göz önüne alındığında p16 boyanma yaygınlığı verilerinden farklı bir boyanma gözlenmedi. Ancak boyanma yaygınlığı ile HR-HPV tiplerinin ilişkisi ayrıca değerlendirildi.

3.4 Epitelyal İnflamasyon Değerlendirmesi

Epitelyal inflamasyonun değerlendirilmesi, birinci gruptaki olgularda matur skuamöz epitel, iki ve üçüncü gruptaki olgularda ise displastik epitel ile sınırlandırdı. Epitelde nötrofil ve lenfosit infiltrasyonlarının yoğunlukları ayrı ayrı değerlendirildi. 100 olguya ait H&E kesitler incelendi. Epitelyal inflamasyon yoğunluğu, hafif (+1), orta (+2) ve yoğun (+3) olarak yapıldı (**Resim 3-6**).



Resim 3-6. Servikal epitelde nötrofil infiltrasyon yoğunluğu **A)** Orta yoğunlukta nötrofil infiltrasyonu (H&E x200). **B)** Yoğun nötrofil infiltrasyonu (H&E x200)

3.5 İstatistiksel Değerlendirme

Gruplar arasında anlamlı bir farklılık olup olmadığı Ki-kare testi ile belirlendi. Ki-kare testinin varsayımlarının karşılanmadığı durumlarda ikiden fazla grup arasında fark olup olmadığını belirlemede Kruskal Wallis testi, iki grup arasında fark olup olmadığını belirlemede Mann-Whitney U testi kullanıldı. Immunohistokimyasal markırlar arasındaki korelasyon hesaplamasında Spearman korelasyon analizi kullanıldı. Korelasyon analizinde anlamlılık, $r < 0.20$ çok zayıf, $r = 0.20-0.50$ zayıf, $r = 0.50-0.75$ orta ve $r > 0.75$ yüksek korele olarak değerlendirildi. İstatistiksel olarak anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak alındı.



4. BULGULAR

4.1 Klinik ve Patolojik Bulgular

Çalışmaya toplam 100 olgu dahil edilmiştir. Non-D grup 34, L-SIL grubu 32 ve H-SIL grubu 34 olgudan oluşmaktadır. Belirlenen 100 olgunun 53'ü (%53) kolposkopik biyopsi, 28'i (%28) konizasyon ve 19'u (%19) histerektomi materyalidir.

Olguların yaşları 28 ile 66 arasında değişmekte olup ortalama yaş 41.7 ($\pm 8,5$)'dir. Birinci grupta yaşlar 31-58 arasında olup ortalama yaş 40.9 (± 7.1), ikinci grupta yaşlar 31-57 arasında olup ortalama yaş 44.4 (± 7.5) ve üçüncü grupta yaşlar 28-66 arasında olup ortalama yaş 39.9 (± 10.0)'dur.

4.1.1 HR-HPV ile Enfeksiyon

Olgularda görülen HR-HPV tipleri **Tablo 4-1**'de verilmiştir. Olguların büyük çoğunluğu (%66'sı) bir tip HR-HPV (single HR-HPV) enfeksiyonuna sahiptir ve single HR-HPV tipi ile enfekte olguların da %68'i HPV 16'dır.

Tablo 4-1. HR-HPV tipleri

		N (%)	Toplam (n)
HR-HPV	Single HR-HPV	66 (%66)	100
	Multiple HR-HPV	34 (%34)	
Single HR-HPV	HPV 16	45 (%68)	66
	HPV 18	6 (%9)	
	HPV 31	5 (%8)	
	Diğer tipler	10 (%15)	
Multiple HR-HPV	HPV 16-18	7 (%21)	34
	HPV 16-31	2 (%6)	
	Diğer HPV grupları	25 (%73)	

Single ve multiple HPV tipi ile enfekte olguların üç grup içerisindeki dağılımı **Tablo 4-2**'de verilmiştir. H-SIL'de daha yüksek single HR-HPV enfeksiyonu olduğu görülmüştür. Ancak single HR-HPV tiplerinin büyük çoğunluğunun en yüksek risk gösteren iki tipten (tip 16 ve 18) birine aittir. H-SIL'de L-SIL'e kıyasla daha fazla single HR-HPV gözlenmiştir ve Mann-Whitney U testi ile yapılan istatistiksel değerlendirmede bu fark anlamlı bulunmuştur ($p=0.025$).

Tablo 4-2. HR-HPV tiplerinin gruplar arasındaki dağılımı

		HR-HPV		Total
		Single HPV	Multiple HPV	
Non-D	N	22	12	34
	%	%64.7	%35.3	%100
L-SIL	N	17	15	32
	%	%53.1	%46.9	%100
H-SIL	N	27	7	34
	%	%79.4	%20.6	%100

Üç grup içerisinde HPV 16 ve HPV 16 dışı HR-HPV pozitifliğinin dağılımı **Tablo 4-3**'te verilmiştir. HPV 16 pozitifliği en fazla H-SIL' de gözlenmiş olup H-SIL'li olguların %73.5'ini oluşturmaktadır. Grup non-D'den sırasıyla L-SIL ve H-SIL gruplarına doğru HPV 16 pozitif olguların oranı artmaktadır ve bu istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0.019$).

Tablo 4-3. HPV 16 varlığının gruplardaki dağılımı

		HPV16 dışı HR-HPV	HPV16	Total
Non-D	N	19	15	34
	%	%55.9	%44.1	%100
L-SIL	N	18	14	32
	%	%56.2	%43.8	%100
H-SIL	N	9	25	34
	%	%26.5	%73.5	%100

4.1.2 Intraepitelyal Nötrofil İnfiltrasyonu

İntraepitelyal nötrofil infiltrasyonu yoğunluğunun gruplardaki dağılımı **Tablo 4-4**'te verilmiştir. Nötrofiller epitelin çoğunlukla yüzeyel kısımlarında görülmüştür. İntraepitelyal nötrofil infiltrasyonu yoğunluğuna bakıldığında üç grup arasında Ki-kare testi ile yapılan istatistiksel değerlendirmede anlamlı bir fark izlenmiştir ($p=0.001$). Non-D gruba göre L-SIL ve H-SIL'de artmış nötrofil infiltrasyon yoğunluğu dikkati çekmiştir. Bu fark non-D ile L-SIL ($p=0.021$) ve non-D ile H-SIL arasında ($p=0.000$) istatistiksel olarak anlamlıdır. L-SIL ile H-SIL arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark izlenmemiştir ($p=0.292$).

Tablo 4-4. İntraepitelyal nötrofil infiltrasyonu yoğunluğunun gruplardaki dağılımı

		İntraepitelyal Nötrofil İnfiltrasyonu Yoğunluğu				Total
		Yok	Hafif	Orta	Yoğun	
Non-D	N	18	10	4	2	34
	%	%52.9	%29.4	%11.8	%5.9	%100
L-SIL	N	7	9	8	8	32
	%	%21.9	%28.1	%25	%25	%100
H-SIL	N	2	13	10	9	34
	%	%5.9	%38.2	%29.4	%26.5	%100

4.1.3 Intraepitelyal Lenfosit İnfiltrasyonu

Lenfositler, nötrofillerin aksine epitelin çoğunlukla bazal kısımlarında yoğunlaşma göstermektedir. İntraepitelyal lenfosit infiltrasyonu ile üç grup arasındaki Kruskal-Wallis testi ile yapılan istatistiksel değerlendirmede anlamlı bir fark izlenmemiştir ($p=0.141$).

4.2 İmmunohistokimyasal Bulgular

4.2.1 p16

p16, L-SIL ve H-SIL'deki tüm olgularda boyanırken non-D gruptaki 4 (%11.8) olguda boyanma göstermemiştir. Boyanma yaygınlığı ve yoğunluğu toplamından elde edilen kombine skor, 0-5 arasında değişmekte olup gruplar içerisindeki kombine skor ortalamasına bakıldığında, ortalamanın non-D grupta en düşük, H-SIL grubunda en yüksek olarak görülmüştür. Buna göre non-D, L-SIL ve H-SIL gruplarında kombine skor ortalamaları sırasıyla 2.20 (± 1.03), 3.31 (± 1.17) ve 4.55 (± 0.82)'tir.

p16 kombine skoru ile üç grup arasındaki Kruskal-Wallis testi ile yapılan istatistiksel değerlendirmede anlamlı bir fark izlenmiştir ($p=0.000$). Farkı oluşturan grupları belirlemek amacıyla Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. Grup non-D'nin L-SIL'e göre daha düşük p16 ekspresyonu göstermesi istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0.000$). Aynı şekilde non-D'de H-SIL'e göre ve L-SIL'de H-SIL'e göre daha düşük p16 ekspresyonu görülmüştür. Bu bulgular istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0.000$).

p16'nın boyanma yaygınlığının gruplar içindeki dağılımı **Tablo 4-5**'de verilmiştir.

Tablo 4-5. p16 boyanma yaygınlığının gruplardaki dağılımı

		Non-D	L-SIL	H-SIL	Total
p16 boyanması yok	N	4	0	0	4
	%p16	%100	%0	%0	%100
	%grup	%11.8	%0	%0	%4
Tek tek veya hücre kümeleri halinde fokal p16 boyanması	N	27	21	6	54
	%p16	%50	%38.9	%11.1	%100
	%grup	%79.4	%65.6	%17.6	%54
Süperfisyal boyanma olsun veya olmasın bazal-parabazal düzeyde diffüz p16 boyanması	N	3	11	28	42
	%p16	%7.1	%26.2	%66.7	%100
	%grup	%8.8	%34.4	%82.4	%42
		34	32	34	100

p16 boyanma yaygınlığı ile HPV 16 ve HPV 16 dışı HR-HPV pozitifliği karşılaştırıldığında, diffüz p16 boyanması gösteren 42 olgunun 30 (%71.4)'unda HPV 16 izlenmiştir. Fokal p16 boyanması gösteren 54 olgunun 32 (%59.3)'sinde ise HPV 16 görülmemiştir (**Tablo 4-6**). Buna göre HPV 16 pozitif olgular daha fazla diffüz p16 boyanması göstermiştir ve istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0.003$).

Tablo 4-6. p16 boyanma yaygınlığının HPV 16 ile ilişkisi

	p16 boyanması yok (N/%)	Fokal p16 boyanması (N/%)	Diffüz p16 boyanması (N/%)	Total
HPV 16 dışı HR-HPV	2 (%50)	32 (%59.3)	12 (%28.6)	46
HPV 16	2 (%50)	22 (%40.7)	30 (%71.4)	54
Total	4	54	42	100

4.2.2 Rb

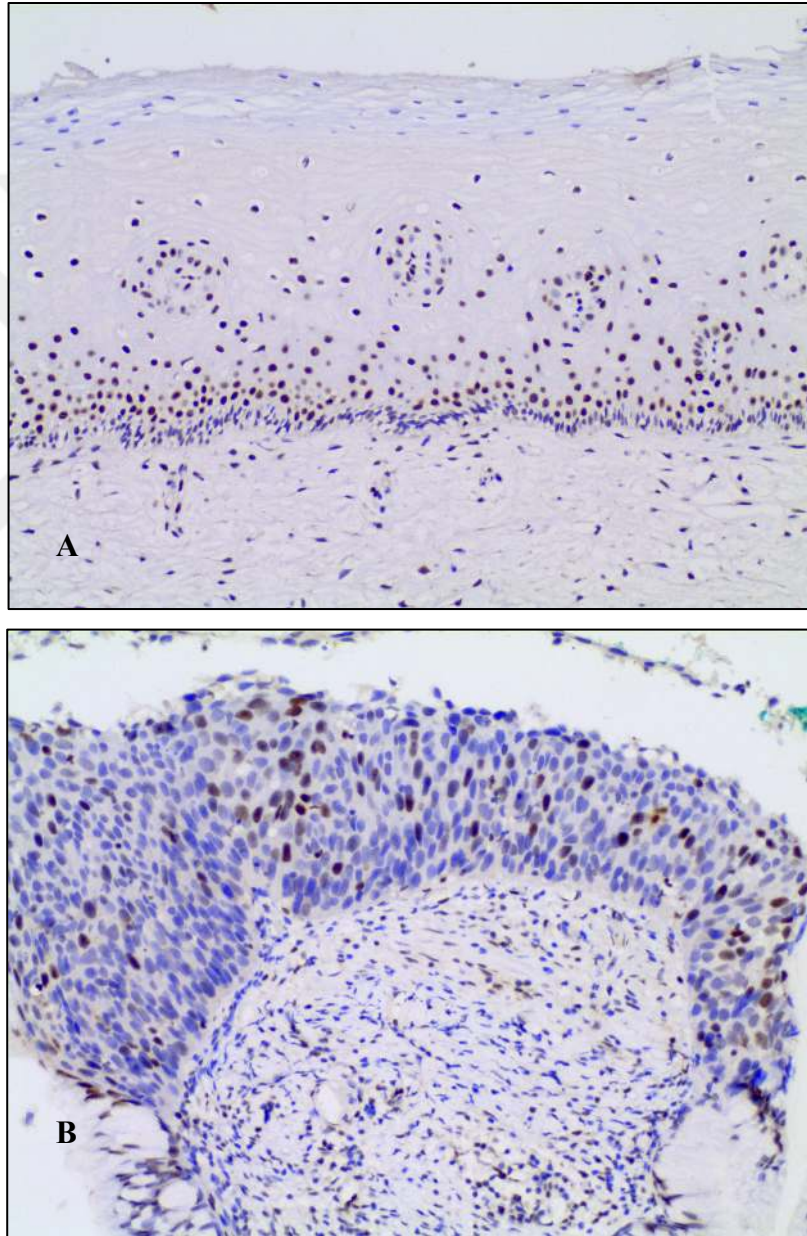
Rb, tüm gruplarda değişen oranlarda boyanma göstermiştir. Kombine skor 2-6 arasında değişmekte olup gruplar içerisindeki kombine skor ortalamasına bakıldığında Rb ekspresyonu non-D grupta en yüksek, H-SIL grubunda en düşük olarak görülmüştür. Buna göre non-D, L-SIL ve H-SIL gruplarında kombine skor ortalamaları sırasıyla $4.85 (\pm 1.20)$, $4.50 (\pm 1.21)$ ve $3.38 (\pm 1.30)$ 'dir.

Rb kombine skor ile üç grup arasındaki Kruskal-Wallis testi ile yapılan istatistiksel değerlendirmede anlamlı bir fark izlenmiştir ($p=0.000$). Farkı oluşturan grupları belirlemek amacıyla Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. Grup non-D'ye göre H-SIL'de ve L-SIL'e göre H-SIL'de daha düşük Rb ekspresyonu izlenmiştir ve bu fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0.000$, $p=0.001$). Grup non-D'ye göre L-SIL'de hafif Rb ekspresyon kaybı görülse de bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p=0.260$).

Rb ekspresyonunun epitelde dağılım paternine bakılmıştır (**Resim 4-1**). Rb ekspresyonunun epitelde dağılım paterninin gruplardaki dağılımı **Tablo 4-7**'da verilmiştir. Buna göre üç grup ile Rb ekspresyonunun epitelde dağılım paterni arasında Ki-kare testi ile yapılan istatistiksel değerlendirmede anlamlı bir fark izlenmiştir ($p=0,000$). Grup non-D'ye göre H-SIL'de ve L-SIL'e göre H-SIL'de random boyanmanın arttığı görülmüştür ve bu fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0.000$). Grup non-D'ye göre L-SIL'de hafif bir random boyanma artışı olsa da istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p=0.095$).

Tablo 4-7. Rb ekspresyonunun epitelde dağılım paterninin gruplardaki dağılımı

	Rb ekspresyonunun epitelde dağılım paterni		
	Bazal ve/veya parabazal ağırlıklı boyanma	Random boyanma	Total
Non-D (N/%)	30 (%88.2)	4 (%11.8)	34
L-SIL (N/%)	23 (%71.9)	9 (%28.1)	32
H-SIL (N/%)	0 (%0)	34 (%100)	34
Total	53	47	100



Resim 4-1. Rb immün ekspresyonunun epitelde dağılım paterni. **A)** Non-D olgusunda olağan boyanma paterni (bazal/parabazal boyanma) (x200). **B)** H-SIL olgusunda random boyanma (x200).

Single/multiple HR-HPV pozitifliği ile Rb ekspresyonunun epitelde dağılım paterni karşılaştırılmıştır (**Tablo 4-8**) Single HR-HPV'lerin daha fazla random boyanma ile ilişkili olduğu görülmüş olup yapılan istatistiksel değerlendirmede (Ki-kare testi) anlamlı bulunmuştur ($p=0.035$).

Tablo 4-8. Rb ekspresyonunun epitelde dağılım paterni ve single/multiple HR-HPV pozitifliği Dağılımı

		Single HPV (N/%)	Multiple HPV (N/%)
Rb	Bazal ve/veya parabazal ağırlıklı boyanma	30 (%45.5)	23 (%67.6)
	Random boyanma	36 (%54.5)	11 (%32.4)
Total		66	34

HPV 16 ve HPV 16 dışı HR-HPV pozitifliği ile Rb ekspresyonunun epitelde dağılım paterni karşılaştırılmıştır (**Tablo 4-9**). HPV 16 pozitifliği gösteren olgularda random boyanmanın daha yüksek olduğu görülmüştür ve bu bulgu istatistiksel (Ki-kare testi) olarak anlamlı bir fark göstermiştir ($p=0.008$).

Tablo 4-9. Rb ekspresyonunun epitelde dağılım paterni ve HPV 16/HPV 16 dışı HR-HPV pozitifliği Dağılımı

		HPV 16 dışı HR-HPV (N/%)	HPV 16 (N/%)
Rb	Bazal ve/veya parabazal ağırlıklı boyanma	31 (%67.4)	22 (%40.7)
	Random boyanma	15 (%32.6)	32 (%59.3)
Total		46	54

4.2.3 p27

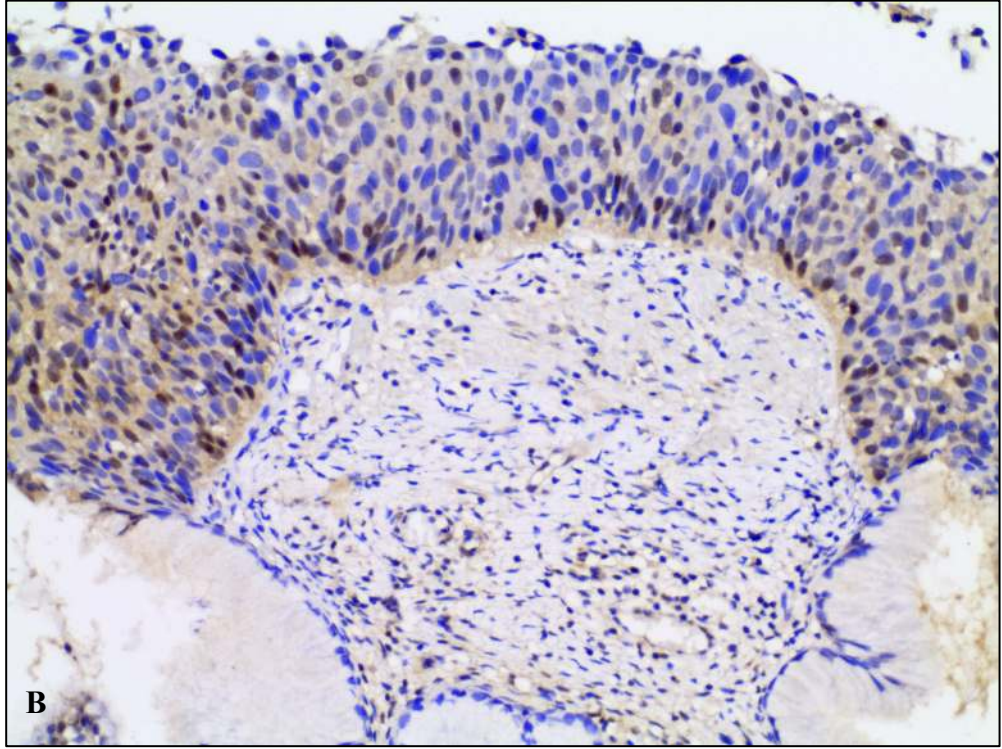
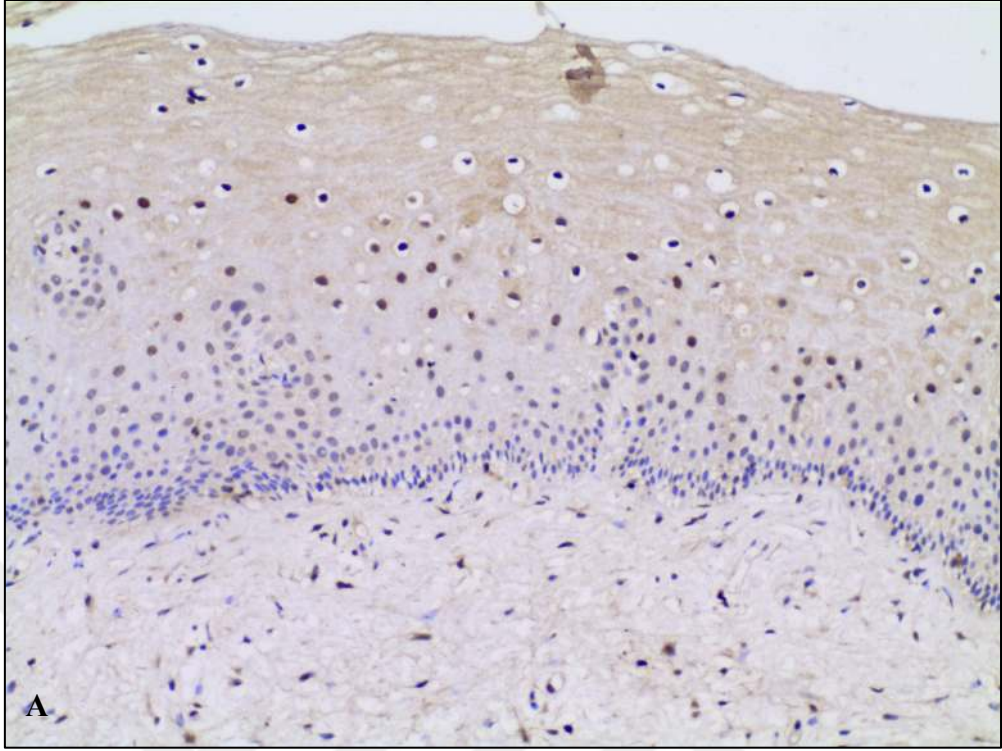
p27, tüm gruplarda değişen oranlarda boyanma göstermiştir. Kombine skor 2-6 arasında değişmekte olup gruplar içerisindeki 45ombine skor ortalamasına bakıldığında grup non-D’de en yüksek, L-SIL’de en düşük grup ortalaması görülmüştür. Buna göre non-D, L-SIL ve H-SIL gruplarında 45ombine skor ortalamaları sırasıyla 4.73 (± 1.56), 3.00 (± 1.31) ve 3.41 (± 1.23)’dir.

P27 kombine skorlarını üç grup arasında karşılaştırdığımızda (Kruskal-Wallis testi) istatistiksel olarak anlamlı bir fark izlenmiştir ($p=0.000$). Farkı oluşturan grupları belirlemek amacıyla Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. Non-D’ye göre L-SIL’de ve non-D’ye göre H-SIL’de daha düşük p27 ekspresyonu görülmüştür ve bu fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0.000$). H-SIL’de L-SIL’e göre hafif p27 ekspresyon artışı görülse de istatistiksel olarak anlamlı fark izlenmemiştir ($p=0.141$).

p27 ekspresyonunun epitelde dağılım paternine bakılmıştır (**Resim 4-2**). P27 ekspresyonunun epitelde dağılım paterninin gruplardaki dağılımı **Tablo 4-10**’de verilmiştir. Buna göre non-D’den H-SIL’e doğru random boyanma artışı izlenmiş olup Ki-kare testi ile yapılan istatistiksel değerlendirmede bu artış anlamlı bulunmuştur ($p=0,000$). Non-D ile L-SIL arasında ($p=0.001$), non-D ile H-SIL arasında ($p=0.000$) ve L-SIL ile H-SIL arasında ($p=0.000$) istatistiksel olarak anlamlı fark mevcuttur.

Tablo 4-10. P27 ekspresyonunun epitelde dağılım paterninin gruplardaki dağılımı

	p27 ekspresyonunun epitelde dağılım paterni		
	İntermedier/süperfisyal boyanma	Random boyanma	Total
Non-D (N/%)	27 (%79.4)	7 (%20.6)	34
L-SIL (N/%)	13 (%40.6)	19 (%59.4)	32
H-SIL (N/%)	1 (%2.9)	33 (%97.1)	34
Total	41	59	100



Resim 4-2. P27 ekspresyonunun epitelde dağılım paterni. **A)** Non-D olgusunda olağan boyanma paterni (intermedier/süperfisyal boyanma) (x200). **B)** H-SIL olgusunda bazal boyanmayı da içerecek şekilde random boyanma (x200).

Single/multiple HR-HPV pozitifliği ile p27 ekspresyonunun epitelde dağılım paterni karşılaştırılmıştır (**Tablo 4-11**) Single HR-HPV’lerin daha fazla random boyanma ile ilişkili olduğu görülmüş olup yapılan istatistiksel değerlendirmede (Ki-kare testi) anlamlı bulunmuştur ($p=0.030$).

Tablo 4-11. p27 ekspresyonunun epitelde dağılım paterni ve single/multiple HR-HPV pozitifliği Dağılımı

		Single HPV (N/%)	Multiple HPV (N/%)
p27	İntermedier/süperfisyal boyanma	22 (%33.4)	19 (%55.9)
	Random boyanma	44 (%66.7)	15 (%44.1)
Total		66	34

HPV 16 ve HPV 16 dışı HR-HPV pozitifliği ile p27 ekspresyonunun epitelde dağılım paterni karşılaştırılmıştır (**Tablo 4-12**). HPV 16 pozitifliği gösteren olgularda random boyanmanın daha yüksek olduğu görülmüştür ve yapılan istatistiksel değerlendirmede (Ki-kare testi) anlamlı bir fark izlenmiştir ($p=0.036$).

Tablo 4-12. p27 ekspresyonunun epitelde dağılım paterni ve HPV 16/HPV 16 dışı HR-HPV pozitifliği Dağılımı

		HPV 16 dışı HR-HPV (N/%)	HPV 16 (N/%)
p27	İntermedier/süperfisyal boyanma	24 (%52.2)	17 (%41)
	Random boyanma	12 (%47.8)	37 (%59)
Total		46	54

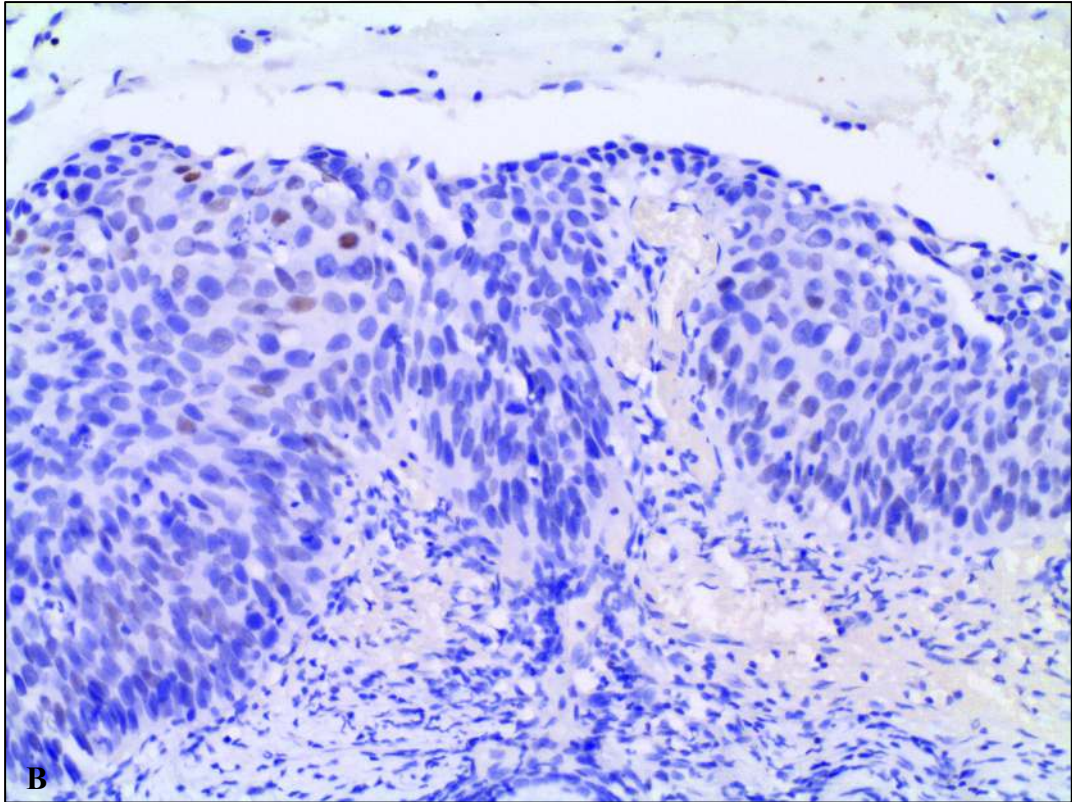
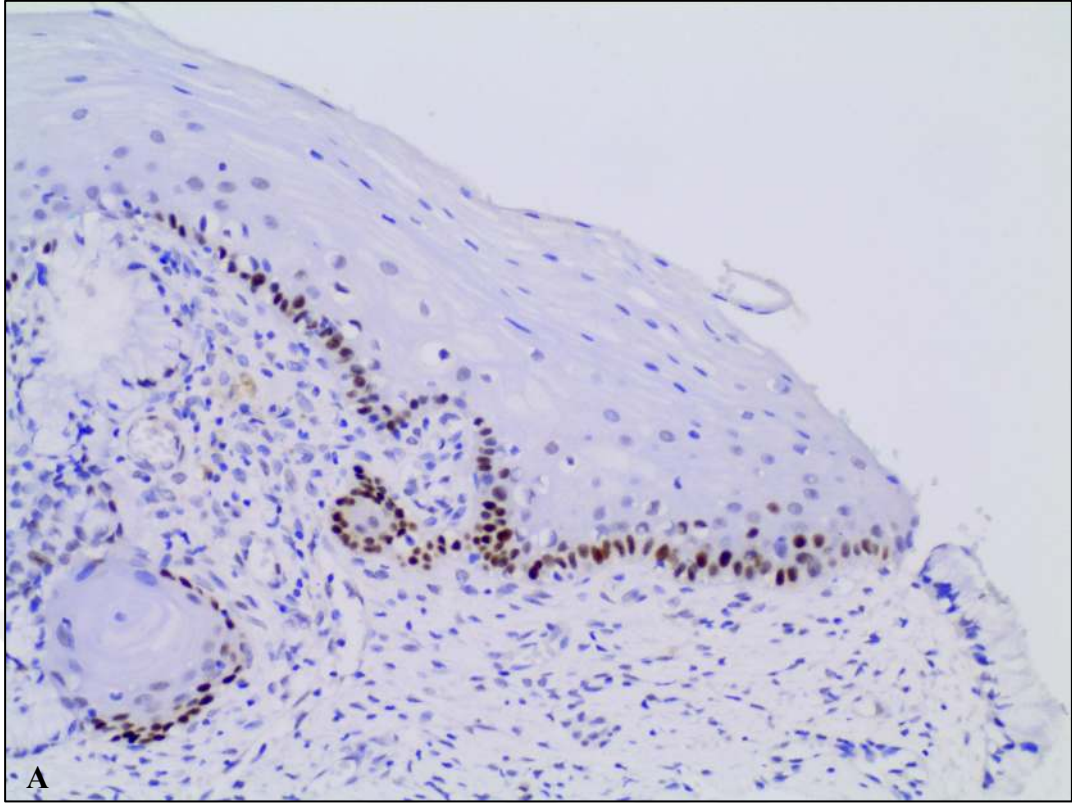
4.2.4 p53

p53, toplam 13 olguda boyanma göstermemiştir. 13 olgudan 3'ü (%23.1) non-D'de, 4'ü (%30.8) L-SIL'de ve 6'sı (%46.1) H-SIL'de yer almaktadır. Kombine skor 0-5 arasında değişmekte olup gruplar içerisindeki kombine skor ortalamasına bakıldığında L-SIL grubunda en yüksek, H-SIL grubunda en düşük olarak görülmüştür. Buna göre non-D, L-SIL ve H-SIL gruplarında kombine skor ortalamaları sırasıyla 2.73 (± 1.30), 3.03 (± 1.57) ve 2.38 (± 1.39)'dir. p53 kombine skoru ile üç grup arasındaki Kruskal-Wallis testi ile yapılan istatistiksel değerlendirmede anlamlı bir fark izlenmemiştir ($p=0.169$).

p53 ekspresyonunun epitelde dağılım paternine bakılmıştır (**Resim 4-3**). p53 ekspresyonunun epitelde dağılım paterninin gruplardaki dağılımı **Tablo 4-13**'de verilmiştir. Buna göre üç grup ile p53 ekspresyonunun epitelde dağılım paterni arasında Kruskal-Wallis testi ile yapılan istatistiksel değerlendirmede anlamlı bir fark izlenmiştir ($p=0.000$). Farkı oluşturan grupları belirlemek amacıyla Mann-Whitney U testi uygulanmıştır. Non-D'ye göre H-SIL'de ve L-SIL'e göre H-SIL'de random boyanmanın arttığı görülmüştür ve bu istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.000$). Non-D ile L-SIL arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark izlenmemiştir ($p=0.919$).

Tablo 4-13. p53 ekspresyonunun epitelde dağılım paterninin gruplardaki dağılımı

	p53 ekspresyonunun epitelde dağılım paterni			
	Boyanma yok	Bazal ve/veya parabazal boyanma	Random boyanma	Total
Non-D (N/%)	3 (%8.8)	31 (%91.2)	0 (%0)	34
L-SIL (N/%)	4 (%12.5)	27 (%84.4)	1 (%3.1)	32
H-SIL (N/%)	0 (%0)	28 (%82.4)	6 (%17.6)	34



Resim 4-3. p53 ekspresyonunun epitelde dağılım paterni. **A)** Non-D olgusunda olağan boyanma paterni (bazal ve/veya parabazal boyanma) (x200). **B)** H-SIL olgusunda random boyanma (x200).

Single/multiple HR-HPV pozitifliği ile p53 ekspresyonunun epitelde dağılım paterni karşılaştırılmıştır (**Tablo 4-14**). p53 ekspresyonu göstermeyen 13 olgunun 13 (%100)'ünün de single HPV ile enfektif olduğu görülmüştür ve single HR-HPV'lerin daha fazla random boyanma ile ilişkili olduğu dikkati çekmiştir. Bu bulgular istatistiksel olarak (Kruskal-Wallis testi) anlamlı bulunmuştur ($p=0.006$).

Tablo 4-14. p53 ekspresyonunun epitelde dağılım paterni ve single/multiple HR-HPV pozitifliği Dağılımı

		Single HPV	Multiple HPV	Total
P53	Boyanma yok (N/%)	13 (%100)	0 (%0)	13
	Bazal ve/veya parabazal ağırlıklı boyanma (N/%)	32 (%55.2)	26 (%44.8)	58
	Random boyanma (N/%)	21 (%72.4)	8 (%27.6)	29
Total		66	34	100

HPV 16 ve HPV 16 dışı HR-HPV pozitifliği ile p53 ekspresyonunun epitelde dağılım paterni karşılaştırılmıştır (**Tablo 4-15**). HPV 16 pozitifliği gösteren olgularda random boyanmanın daha yüksek olduğu görülmüştür ve yapılan istatistiksel değerlendirmede (Ki-kare testi) anlamlı bir fark izlenmiştir ($p=0.050$).

Tablo 4-15. p53 ekspresyonunun epitelde dağılım paterni ve HPV 16/HPV 16 dışı HR-HPV pozitifliği Dağılımı

		HPV 16 dışı HR-HPV (N/%)	HPV 16 (N/%)
p53	Boyanma yok	6 (%13)	7 (%13)
	Bazal ve/veya parabazal ağırlıklı boyanma	32 (%69.6)	26 (%48.1)
	Random boyanma	8 (%17.4)	21 (%38.9)
Total		46	54

4.2.5 p16, Rb, p27, p53

Tüm markırların gruplar içerisindeki kombine skor ortalamaları **Tablo 4-16**'da verilmiştir.

Tablo 4-16. Tüm markırların gruplardaki kombine skor ortalamaları

	Kombine Skor Ortalamaları (N/±)			
	p16	Rb	p27	p53
Non-D	2.20 (±1.03)	4.85 (±1.20)	4.73 (±1.56)	2.73 (±1.30)
L-SIL	3.31 (±1.17)	4.50 (±1.21)	3.00 (±1.31)	3.03 (±1.57)
H-SIL	4.55 (±0.82)	3.38 (±1.30)	3.41 (±1.23)	2.38 (±1.39)

Rb, p53 ve p27'ye ait epitelde dağılım paternleri **Tablo 4-17**'de verilmiştir.

Tablo 4-17. Rb, p53 ve p27'ye ait epitelde dağılım paternleri

		Non-D	L-SIL	H-SIL
Rb	Bazal ve/veya parabazal ağırlıklı boyanma (N/%)	30(%88.2)	23(%71.9)	0 (%0)
	Random boyanma (N/%)	4 (%11.8)	9 (%28.1)	34 (%100)
		Non-D	L-SIL	H-SIL
p53	Boyanma yok (N/%)	3 (%8.8)	4 (%12.5)	0 (%0)
	Bazal ve/veya parabazal ağırlıklı boyanma (N/%)	31(%91.2)	27(%84.4)	28(%82.4)
	Random boyanma (N/%)	0 (%0)	1 (%3.1)	6 (%17.6)
		Non-D	L-SIL	H-SIL
p27	İntermedier/süperfisyal boyanma (N/%)	27(%79.4)	13(%40.6)	1 (%2.9)
	Random boyanma (N/%)	7(%20.6)	19(%59.4)	33(%97.1)
Toplam 100		34	32	34

4.2.6 Rb, p53, p27 ve p16 Genlerinin Immunohistokimyasal Ekspresyonlarının Korelasyon Analizi

Rb, p53, p27 ve p16, Spearman korelasyon analizi yöntemi ile tüm markırların kombine skorlarının birbirleriyle korelasyonu incelenmiştir (**Tablo 4-18**).

Rb ve p53 kombine skorları arasında pozitif yönlü orta derecede korelasyon mevcuttur ($r=0.518/p=0.000$).

Rb ve p27 kombine skorları arasında pozitif yönlü zayıf korelasyon mevcuttur ($r=0.286/p=0.004$).

Rb ve p16 kombine skorları arasında ters yönlü zayıf korelasyon mevcuttur ($r=-0.251/p=0.012$).

p27 ve p53 kombine skorları arasında pozitif yönlü zayıf korelasyon mevcuttur ($r=0.213/p=0.034$).

Tablo 4-18. Immunohistokimyasal markırların Spearman korelasyon analizi

Kombine Skor		p16	Rb	p27	p53
p16	r		-0.251	-0.022	0.041
	p		0.012	0.825	0.686
Rb	r	-0.251		0.286	0.518
	p	0.012		0.004	0.0003
p27	r	-0.022	0.286		0.213
	p	0.825	0.004		0.034
p53	r	0.041	0.518	0.213	
	p	0.686	0.0003	0.034	

5. TARTIŞMA

Servikste skuamöz hücreli karsinom (SCC) gelişimi çok aşamalı bir karsinogeneze dayanmaktadır. En önemli ana etiyolojik faktör HPV'dir. HPV tipleri neoplastik dönüşüm yeteneklerine göre düşük ve yüksek riskli olarak ayrılır. Yüksek riskli-HPV tipleri 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73 ve 82 olmakla birlikte bu gruptaki HPV tipleri ile enfekte kadınların birçoğunda SIL ve devamında SCC dönüşümü izlenmektedir (1).

Çalışmamıza, bu bilgiler ışığında herhangi bir HR-HPV tipi ile enfekte 100 olgu dahil edilmiştir ve olgular non-displastik (non-D), L-SIL ve H-SIL olmak üzere üç gruba ayrılmıştır. Non-D grupta 34 (%34), L-SIL'de 32 (%32) ve H-SIL'de 34 (%34) olgu bulunmaktadır.

Dünya çapında servikal lezyonlarda HR-HPV tipi prevalansına ait veriler oldukça geniştir. Birçok çalışmada HPV 16 en sık saptanan tip iken bunu HPV 18 takip eder (76)(77)(78). HPV 16 ile enfekte olgular yüksek oranda H-SIL dönüşümü göstermektedir. Servikal SCC'lerin %70'inden ve H-SIL'lerin %50'sinden HPV 16 sorumludur. Bazı olgularda single HR-HPV ile enfeksiyon oluşabilirken multiple HR-HPV enfeksiyonları da yaygındır. Single-multiple HR-HPV ile enfeksiyonun displazi derecesi ile ilişkili olup olmadığına dair çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmaların büyük kısmında multiple HR-HPV'ler L-SIL'de daha sık görülmüş olup single HR-HPV'lerin H-SIL ve SCC ile daha fazla ilişkili olduğunu bulunmuştur (79)(80)(81)(82)(83).

Çalışmamızda en sık saptanan HR-HPV tipi HPV 16 olmuştur. 100 olgunun 54'ünde HPV 16 saptanmış olup olguların %46.3'ü (25/54) H-SIL grubunda yer alırken %25.9'u (14/54) L-SIL ve %27.8'i (15/54) non-D grupta yer almaktadır. Özellikle displazi derecesinin artmasıyla HPV 16 saptanma oranının artması, HPV 16'nın yüksek karsinojenik özelliğini desteklemektedir. Çalışmada tek tip HR-HPV enfeksiyonun yanı sıra çoklu HR-HPV enfeksiyonu da görülmüştür. Single HR-HPV'ler içerisinde en sık gözlenen tip HPV 16 olmakla birlikte multiple HR-HPV'ler içerisinde en sık HPV 16 ve 18 birlikteliği saptanmıştır. Çalışmamızda L-SIL grubunda single/multiple HPV'ler neredeyse eşit bir dağılım göstermiş olsada H-SIL grubunda belirgin şekilde single HPV baskınlığı görülmüştür. Buna göre birden fazla HPV viral genomunun yarışmalı olarak konakçı genom üzerindeki

entegrasyonlarının azalmasıyla malign transformasyon hızının azaldığı düşünülmüştür.

Bazı epidemiyolojik çalışmalar HR-HPV ile enfekte kadınlarda inflamasyonun servikal displazi derecesini arttırdığını ve servikal karsinogenezle ilişkili olduğunu ileri sürmektedir (84)(85). Bunun nedeni olarak; inflamasyonla artan proinflamatuvar sitokinlerin, büyüme faktörlerinin ve nitrik oksidin (NO) HPV ile enfekte dokuda DNA hasarını indükleyerek displaziyi arttırdığı düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarda HR-HPV ile enfekte H-SIL olgularında yüksek DNA hasarı saptanmış ve bir antiinflamatuvar molekül olan iNOS'un H-SIL olgularında seviyesinin oldukça azaldığı bulunmuştur (86)(87). Kovacic ve ark'ları (88) yaptıkları bir çalışmada, servikal biyopsi materyallerinde nötrofil ile lenfosit infiltrasyonunun servikal displazi derecesi ile ilişkisine bakmışlardır. Nötrofiller genel olarak epitelin süperfisyal kısımlarında görülürken, lenfositler daha çok bazal kısımda görülmüştür. Ayrıca HPV negatif olgulara kıyasla HR-HPV pozitif olgularda daha fazla epitelyal inflamasyon saptamışlardır. Yine Kobayashi ve ark.'larının (89) yaptığı çalışmada, normal serviks ve H-SIL örnekleri karşılaştırıldığında H-SIL örneklerinde nötrofil infiltrasyonunun oldukça arttığı gözlenmiştir. Aynı çalışmada lenfosit infiltrasyonu ile displastik lezyonlar arasında anlamlı ilişki görülmemiştir.

Çalışmamızda epitelyal inflamasyon ve servikal displazi ilişkisi, literatür ile benzer sonuçlara sahiptir. Epitelyal nötrofil infiltrasyonu daha çok epitelin süperfisyal kısımlarında izlenmiş olup, non-D gruba kıyasla L-SIL ve H-SIL'lerde anlamlı olarak artış göstermiştir. Her ne kadar L-SIL ile H-SIL arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülme de H-SIL grubunda nötrofil infiltrasyon oranı daha yüksek saptanmıştır. Epitelyal lenfosit infiltrasyonu daha çok epitelin bazal kısımlarında görülmüş olup, displazi derecesi ile lenfosit infiltrasyonu arasında anlamlı bir ilişki izlenmemiştir.

p16, progresif HPV enfeksiyonlarını öngörmede kullanılan bir immunohistokimyasal belirteç olarak görülen supressör bir gendir. HPV enfeksiyonuna yanıt olarak konakçı epitel hücresinden eksprese edilir. Çoğu yazar, HPV ile enfektif olmayan normal servikal epitelde p16 ekspresyonunun olmadığını ve herhangi bir HPV tipi ile enfekte servikal displazi olgularında değişen derecelerde p16 ekspresyonunun olduğunu bildirmiştir (90)(91)(92). LR-HPV ve HR-HPV ile enfektif servikal lezyonlardaki p16 ekspresyonunu karşılaştıran

alışmalara bakıldığında, HR-HPV ile enfektif olgularda displazi olmasa bile yüksek p16 pozitifliği olduğu görülmüştür (93)(94)(95)(96). Benzer şekilde Keating ve ark. (97) alışmalarında LR-HPV’lerin aksine HR-HPV ile enfekte servikal displazilerde daha yüksek seviyelerde p16 ekspresyonu olduğunu öne sürmüşlerdir. Klaes ve ark.’nın, (98) HR-HPV ile enfektif displastik lezyonlardaki p16 ekspresyonuna baktıkları çalışmasında, H-SIL ve L-SIL olgularında %100 p16 pozitifliği gözlenmiştir. Ordi ve ark. (95), HR-HPV ile enfekte p16 pozitifliği gösteren displazisiz olguların takip değerlendirmelerinde büyük kısmının displastik lezyonlara ilerlediğini göstermişlerdir. Buna göre HR-HPV’li p16 pozitifliği bulunan ancak displazi göstermeyen olguların gizli displastik lezyonların tanınmasında yol gösterici olabileceğini düşünmüşlerdir. Dona ve ark. (99) HPV 16 ve/veya 18 ile diğer HR-HPV tipleri ile olan enfeksiyonlarda p16/Ki-67 ekspresyonunu karşılaştırmışlardır. Bu çalışmaya göre HPV 16 ve/veya 18 ile olan enfeksiyonlarda diğer HR-HPV tiplerine göre iki kat daha fazla p16/Ki-67 ekspresyonu gözlenmiştir. Bu bulgu ile HPV 16/18’in diğer HR-HPV tiplerine göre daha yüksek karsinogenik potansiyeline kanıt olabileceği düşünülmüştür. p16’nın servikal epitelde fokal/diffüz boyanma farkının L-SIL/H-SIL ayrımını yaptırmada destekleyici olacağını ne süren çalışmalar da bulunmaktadır (100)(101)(102)(103)(104). Bu çalışmalarda, servikal epitelde fokal p16 pozitifliğinin L-SIL ve diffüz p16 pozitifliğinin ise sıklıkla H-SIL lehine olabileceği öne sürülmektedir.

Çalışmamızda, L-SIL ve H-SIL grubunda %100 p16 ekspresyonu görülürken, non-D grubun %11.8’inde p16 ekspresyonu izlenmemiştir. LR-HPV’lerin de dahil edildiği önceki çalışmalara kıyasla non-D grupta daha yüksek p16 ekspresyonunun bulunması, HR-HPV’lerin yüksek enfektivitesine kanıt oluşturmaktadır. Çalışmamızda bir diğer bulgu ise non-D grupta daha fazla olmakla birlikte displazi derecesi arttıkça fokal boyanmanın azalması ve diffüz p16 boyanmasının artmasıdır. Ayrıca HPV 16 ile enfekte olgularda, HPV 16 dışı HR-HPV ile enfekte olgulara kıyasla daha yüksek diffüz p16 boyanması gözlemlenmiştir. Sonuçlarımız daha önce yapılan çalışmalar ile benzerlik göstermekte ve p16’nın displastik servikal lezyonlar için hassas ve spesifik bir belirteç olduğunu desteklemiştir.

Rb, hücre siklus regülasyonunda önemli bir rol oynayan nükleer bir tümör supressor gendir. Rb fonksiyon kaybı, hücrelerin kontrolsüz proliferasyonuna ve

malignleşmenin başlamasına neden olabilir. Hücre siklusunun G1 fazında hipofosforile Rb baskın halde bulunur ve hücreler S fazına ilerledikçe Rb fosforilasyonu başlayarak hücre proliferasyonunun önü açılır. Viral onkoproteinlerin, Rb fosforilasyonunu arttırarak hücre proliferasyonunu arttırdığı bilinmektedir. Özellikle HR-HPV'lerin E6 ve E7 onkoproteinlerinin, sırasıyla p53 ve Rb inaktivasyonu yaptığı, G1 ve G2 kontrol noktalarına bağlı CDKI'ları etkilediği ve bunun sonucunda genetik anormalliklerin birikmesine neden olduğu yapılan bazı çalışmalarda gösterilmiştir (105)(106)(107). Salcedo ve ark.'nın (108) HR-HPV pozitif olgular üzerinde yaptığı çalışmada, tüm lezyonlarda Rb ekspresyonu izlenirken, lezyonlar arasında epitelde boyanma paterni ve yaygınlık farklılıkları gözlenmiştir. Non-displastik ve L-SIL olgularında ağırlıklı parabazal boyanma izlenirken, displazi derecesi arttıkça tüm epitelde random boyanma bildirilmiştir. Ayrıca displazi derecesi arttıkça Rb ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir. Benzer sonuçlara sahip başka çalışmalar da mevcuttur (7)(109)(110)(111)(112)(113)(114). Nam ve ark. (112), Rb ekspresyonundaki azalmanın, HR-HPV'lere ait E7'nin Rb proteinine daha yüksek afinite göstermesinden kaynaklanabileceğini öne sürmüştür. Noraini ve ark. (115) yüksek displazili lezyonlarda artan random boyanmanın nedeninin, Rb inaktivasyonu ile hücre siklusunun asenkron bir şekilde ilerlemesinden kaynaklanabileceğini düşünmüştür.

Çalışmamızda tüm gruplarda Rb ekspresyonu izlenmiş olup, displazi derecesi arttıkça immunohistokimyasal ekspresyon miktarının azaldığı görülmüştür. Ayrıca non-D ve L-SIL grubunda epitelde ağırlıklı bazal ve/veya parabazal boyanma izlenmiş olup L-SIL'de random boyanma gösteren olgu sayısında artış dikkati çekmiştir. H-SIL olgularının ise tamamında random boyanma gözlenmiştir. Sonuçlarımız genel olarak önceki çalışmalarla benzerlik göstermekte ve Rb ekspresyon kaybının neoplastik süreçlerle ilişkili olduğunu desteklemektedir. Çalışmamızda ayrıca single/multiple HR-HPV'lerin, Rb'un epiteldeki dağılım paternine etkisi değerlendirilmiştir. Buna göre single HR-HPV ile enfektif olgularda random boyanmanın arttığı görülmüştür ($p<0.05$). Bunun nedeninin tek bir HR-HPV'ye ait E7 onkoprotein konsantrasyonunun, Rb üzerindeki etkiyi arttırmış olabileceğinden kaynaklandığı düşünülmüştür. Ayrıca çalışmamızda single HR-HPV tipleri arasında en sık karşılaşılan tip HPV 16'dır ve bu tipin en yüksek karsinogenik etkiye sahip olan tiplerden biri olduğu

bilinmektedir. Dolayısıyla random boyanma paterninin görülme oranının artması ve genel Rb ekspresyon yoğunluğu ve yaygınlığının azalması çoğunlukla HPV 16'dan kaynaklanmıştır. Aynı zamanda Rb'nin random boyanma paterninin belirginleşmesini, morfolojik olarak arada olan ve displazisi belirgin olmayan vakalar için displazinin destekleyici delili olarak kullanmak mümkündür.

p53 tümör supressor proteini, hücre proliferasyonu ve apoptozisten sorumludur. DNA hasarına yanıt olarak hücre siklusunun durdurulmasını ve apoptozisin indüklenmesi sağlar. Ayrıca p53, HPV E6 onkoproteininin en önemli hedefidir (1)(3)(116). p53 ilişkili servikal karsinogenezde iki farklı mekanizma tariflenmiştir. İlk mekanizma, HPV E6'nın ubiquitin aracılığıyla wild-tip p53'e bağlanıp p53'ü inaktive etmesidir. Bu mekanizma ile serbest p53 seviyesindeki azalma sonucu hücre siklusunda bozulma, proliferasyonda artma ve apoptoziste azalma meydana gelir. İkinci mekanizma ise HPV'den bağımsız p53 geni mutasyonudur. Bu mekanizma servikal karsinogenezde nadirdir (3).

Servikal neoplazilerde p53 ekspresyonuna dair farklı sonuçlar bildiren birçok çalışma bulunmaktadır. Ancak bu çalışmaların birçoğunda, olguların HPV ile enfektif olup olmadığı belirsizdir. Bazı çalışmalar servikal displazi derecesi ile korele olarak p53 ekspresyonunun artması gerektiğini söylerken (117)(118), bazı çalışmalar ise p53 ekspresyonunun geç bir olay olduğunu, sadece yüksek displastik lezyonlarda ve invaziv SCC'de görüldüğünü bildirmiştir (119)(120)(121). Öte yandan Raju ve ark. (3) non-displastik olgularda da p53 ekspresyonu bildirmiştir. Aynı çalışmada p53'ün epiteldeki dağılım paterni de değerlendirilmiş olup non-displastik ve L-SIL olgularında bazal/parabazal boyanma, H-SIL'de tüm epitelde random boyanma görülmüştür. Benzer sonuçlar Tan ve ark.'nın (122) çalışmasında da mevcuttur. Vassallo ve ark. (123) HR-HPV ile enfekte olgularda p53 ekspresyonunun, olguların tamamında bazal/parabazal düzeyde birkaç izole hücre ile sınırlı olduğunu bildirmiştir. Godoy ve ark. (124) p53'te bazal boyanmanın özellikle H-SIL'lere ilerlemeyle birlikte random boyanmaya dönüşmesinin, hücre siklus regülasyon bozukluğunun ve epitelyal maturasyon kaybının göstergesi olduğunu ileri sürmüştür. Ghosh ve ark.'nın (125) HR-HPV ile enfekte olgular üzerinde yaptığı çalışmada p53, non-displastik lezyonlara kıyasla L-SIL' de hafif yükselme ve H-SIL'lerde ise hafif azalma sergilemiştir. Benzer sonuçlar Chetty ve ark.'nın (126) HPV16 ve 18 pozitif olgular üzerindeki çalışmasında da görülmüştür. Erken lezyonlarda p53'teki hafif artışın sebebi, DNA

koruyucu mekanizma ile displazi progresyonunu engelleme girişimi olarak görülmüştür. Ayrıca mutasyona uğramış inaktif p53 geninin nükleusta birikerek pozitif boyanmada artış yapmış olabileceği de düşünülmüştür (75). Bazı yazarlar ise HPV 16 ve 18'e ait E6'nın, LR-HPV'lere göre daha fazla p53 inaktivasyonu yaptığını ve bu nedenle servikal SCC olgularında p53 ekspresyonunda azalma görüldüğünü bildirmiştir (127)(128)(129).

Çalışmamızda, gruplardaki p53 ekspresyon miktarına bakıldığında non-D gruba göre L-SIL grubunda hafif yükselme ve H-SIL grubunda ise azalma izlenmiştir. Bu sonuçlar Ghosh ve ark.'nın (125) çalışması ile benzerlik göstermektedir. Ayrıca p53'ün erken lezyonlarda DNA koruyucu mekanizma ile miktarını arttırmış olabileceği düşüncesini desteklemiştir. p53'ün epitelde dağılım paternine bakıldığında non-D grupta ağırlıklı bazal ve/veya parabazal boyanma gözlenmiş olup random boyanma izlenmemiştir. Displastik lezyonlarda ise özellikle de H-SIL'de random boyanma gösteren olgu sayısının bir miktar arttığı görülmüştür. Random boyanma gösteren olgu sayısındaki artış, Godoy ve ark.'nın (124) ileri sürdüğü düşüncayı güçlendirmektedir. Çalışmamızda ayrıca single/multiple HR-HPV'lerin, p53'ün epiteldeki dağılım paternine etkisi değerlendirilmiştir. Buna göre single HR-HPV ile enfektif olgularda H-SIL'de daha fazla random boyanma gözlemlendiği ve p53 ekspresyonu göstermeyen tüm olguların single HR-HPV ile enfekte olduğu görülmüştür ($p<0.05$). Bu bulgu, multiple HR-HPV'lere ait farklı E6 konsantrasyonlarının valığı ile wild-tip p53'ün savunma mekanizmasında tetiklenme ve ekspresyonunda artma ile açıklanabilir.

p27, Cip/Kip ailesinin bir tümör suppressor genidir. Asıl işlevi G1/S geçişini kontrol eden siklin-CDK komplekslerine bağlanarak kinaz komplekslerini inhibe etmektir. p27 regülasyonu iki mekanizmaya bağlı olarak gerçekleşir. İlk mekanizma, p27'nin posttranslasyonel regülasyondur. G0 ve erken G1'de kinaz komplekslerinin inhibisyonu için seviyesi oldukça artar. Hücre siklusu S fazına geçerken ise seviyesinde önemli ölçüde azalma görülür. İkinci mekanizma ise ubiquitin-proteazom aracılı p27 azalmasıdır. Birçok malignitede hızlandırılmış proteoliz yoluyla p27 protein kaybı veya azalması görülmüştür (130)(131).

Serviksin preinvaziv lezyonlarında p27 ekspresyon derecesini değerlendiren çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmaların büyük kısmında normal serviks epitelinde güçlü p27 ekspresyonu izlenirken, displazi derecesi arttıkça p27 seviyesinde hafif azalma görülmüştür (8)(132)(133)(134)(135). Bir kısım çalışma

ise p27 seviyelerinin H-SIL ve SCC'de daha yüksek olduğunu bildirmiştir (130)(136)(137). Bu çalışmalarda ortak görülen özellik, normal servikal epitelde ve L-SIL'in bir kısmında epitelin sadece intermedier ve/veya superfisyal kısmında p27 ekspresyonunun gözlenmesidir. Bu ortak bulgu, p27'nin terminal olarak farklılaşmış, dinlenme fazındaki matür hücrelerde daha fazla eksprese edildiğini kanıtlamaktadır. HPV ile p27 arasındaki ilişkiyi gösteren az sayıda çalışma bulunmaktadır. HPV'li ve HPV'siz olgularda p27 seviyesini karşılaştıran üç çalışmada (130)(133)(138), HPV'li olgularda HPV'siz olgulara göre daha düşük p27 seviyeleri olduğu görülmüştür. Kim ve ark.'nın (133) çalışmasında HPV'li olgularda yüksek siklin E seviyeleri gözlenmiştir. Bu bulguya destekleyici olarak Zerfass ve ark.'nın (139) hücre kültürü sistemindeki in-vitro çalışmasında, HPV 16 E7 onkoprotein Rb'ye bağlanarak inaktive etmesiyle siklin E ve CDK2'de hızlı bir indüksiyona yol açtığını ve bu durumun p27'nin tümör suppressor etkisinin üstesinden gelerek p27'i inaktive ettiğini göstermiştir. Benzer bulgular Fredersdorf ve ark.'nın (140) çalışmasında da bildirilmiştir. Charette ve ark. (141), p27'nin sitoplazmada sitoskeletal düzenleyicilere bağlanarak inhibe ettiğini ve hücre hareketlerini azalttığını göstermiştir. Ters etki olarak HPV E7'nin, p27'ye bağlanarak p27'nin sitoskeletal düzenleyiciler üzerindeki etkisini azaltıp keratinosit göçünü arttırdığı bildirmiştir. Troncone ve ark.'nın (132) çalışması diğer çalışmalara kıyasla daha az farklılık göstermiştir. Büyük çoğunluğu HPV pozitif olgularda, normal servikal epitelde yüksek p27 ekspresyonu görülürken L-SIL ve H-SIL'de p27 ekspresyonunda azalma görülmüştür. Ancak L-SIL'deki azalmanın H-SIL'e göre belirgin olduğu bulunmuştur. Normal servikal epitelde intermedier ve superfisyal p27 boyanması görülürken H-SIL'de bazal hücre tabakasını da içerecek şekilde random boyanmanın arttığı dikkati çekmiştir. LR-HPV ile HR-HPV ile enfekte olgularda p27 seviyeleri benzerlik göstermiştir. H-SIL'de gözlenen p27 boyanma paterninin HR-HPV prevalansı ile açıklanamayacağı sonucuna varılmıştır.

Çalışmamızda tüm gruplarda değişen oranlarda p27 ekspresyonu saptanmıştır. p27 ekspresyon miktarına bakıldığında, p27 ekspresyonunun non-D'ye göre L-SIL ve H-SIL'de daha düşük olduğu görülmüştür. Displastik lezyonlardaki bu azalma L-SIL'de daha belirgindir. Bu bulgular Troncone ve ark.'nın (132) çalışması ile benzerlik göstermiştir. H-SIL'de bir miktar p27 ekspresyonundaki artışın nedeni, daha önce Schmidt-Grimminger ve ark.'nın (142),

p21'in HPV ile enfekte hücrelerde HR-HPV E6 tarafından inaktive edilen p53'e yanıt olarak viral DNA replikasyonunu önlemek için bir miktar ekspresyon artışı gösterdiğini öne sürdüğü çalışmasına benzer bir mekanizma yoluyla açıklanabilir. Çalışmamızda p27'nin epitelde dağılım paternine bakıldığında grup non-D'nin %79.4'ünde (27/34) intermedier/süperfisyal boyanma gözlenmiştir. L-SIL'de bu oran %40.6'ya (13/32) düşmüş olup %59.4'ünde (19/32) random boyanma görülmüştür. H-SIL'de ise %97.1 (33/34) oranında bazal boyanmayı da içerecek şekilde random boyanma izlenmiştir. Non-displastik epitelde p27'nin çoğunlukla epitelin üst yarısında görülmesi ve displazi derecesi arttıkça random boyanma gösteren olgu sayısının artması literatürle benzerlik göstermektedir. Sonuçlarımız, displastik lezyonlarda p27 seviyesinin azalmakla kalmayıp L-SIL ve H-SIL'de farklı bir epitelyal patern göstermesi, p27'nin hücre proliferasyonu kontrolü için bazal hücre tabakasında da eksprese edilebileceğini göstermektedir. Bu nedenle random p27 boyanma paterni ve p27 ekspresyonunda azalma, invaziv neoplazilere ilerlemede erken bir haberci olarak düşünülebilir. Çalışmamızdaki bir diğer bulgu, single HR-HPV ile enfekte olgularda multiple HR-HPV'li olgulara kıyasla daha fazla random boyanmanın görülmesidir. Bu bulgu, çalışmamızdaki Rb ve p53 immunohistokimyasal boyalarının sonuçları ile benzerdir.

Çalışmamıza dahil ettiğimiz tüm supressör genler hücre siklusu içinde birbiri ile bağlantılı olarak hareket etmektedirler. HR-HPV'nin E6 ve E7 onkoproteinlerinin p53 ve Rb'u inaktive etmesi diğer supressör genleri de etkilemektedir (143). p53'ün E6 onkoproteini ve Rb'nin E7 onkoproteini tarafından inaktivasyonu sonucunda sırasıyla CDK aktivasyonu ile p21/p27 seviyesinde azalma ve Rb-E2F kompleksinden E2F'nin ayrılması meydana gelir (112). Hücre proliferasyonunu düzenleyen Cip/Kip ve INK4 olmak üzere iki grup CDKI bulunmaktadır. Bunlar aynı zamanda tümör supressor görevi de görmektedir. p27, Cip/Kip ailesinin üyesi olup normal epitelde artan p27 ekspresyonu ile hücre siklusunun ilerlemesi engellenmektedir. Bununla birlikte Rb fosforilasyonu da inhibe edilmiş olur (116). HR-HPV ile enfekte hücrelerde E7'nin aynı zamanda p21/p27 fonksiyonunu inhibe ettiği de gösterilmiştir (138). p16, INK4 ailesinden olup siklin D/CDK4-6 kompleksini inhibe ederek hücre siklusunu inhibe eder. Aynı zamanda Rb fosforilasyonunu ortadan kaldırır. p16 yokluğunda Rb fosforile edilir. Rb'nin, HR-HPV E7 onkoproteini tarafından inaktivasyonu, Rb-p16 arasındaki negatif feedback mekanizması ile p16'nın aşırı ekspresyonu ile sonuçlanır (112).

Çalışmamızda, Rb-p53 ($r=0.518$), Rb-p27 ($r=0.286$), Rb-p16 ($r=-0.251$) ve p27-p53 ($r=0.213$) arasında korelasyon gözlenmiştir. Genlerin hücre siklusunda birbirleri ile olan ilişkisi göz önüne alındığında beklendiği gibi bizim çalışmamızda da Rb-p16 arasında negatif korelasyon gözlenirken diğer genler arasında pozitif korelasyon görülmüştür.

Sonuç olarak HPV, viral DNA sentezi için konak hücrenin replikatif mekanizmasına ihtiyaç duymaktadır. Bu nedenle virüs, terminal olarak farklılaşmaya programlanmış hücrelerde, G1-S fazı geçişini uyarmak için birçok protein değişikliğine neden olur. Bu çok aşamalı servikal karsinogeneze en önemli iki adım, virüsün E6 ve E7 onkoproteinleri tarafından p53 ve Rb inaktivasyonudur. Aynı zamanda HPV enfeksiyonu süresince ortamda bulunan inflamatuvar hücreler tarafından büyüme faktörleri ve NO gibi serbest radikal etkisi de olan sitokinlerin salınımının artması servikal karsinogeneze katkı yapmaktadır. Sonuçlarımız, HPV tarafından Rb inaktivasyonunun, geç malign transformasyon aşamasından ziyade, servikal karsinogenezin erken aşamalarında meydana geldiğini göstermektedir. Bu nedenle Rb-p16 arasındaki negatif feedback mekanizması ile artış gösteren p16'nın, displastik lezyonlarda HR-HPV enfeksiyonu için potansiyel bir biyobelirteç olarak kullanılabileceğini desteklemektedir.

Ayrıca çalışmamızda Rb, p53 ve p27'nin epitelde dağılım paternlerine baktığımızda; Rb ve p53'ün non-D grupta ağırlıklı bazal/parabazal boyanma paternine sahip olduğu görüldü. Displastik lezyonlarda özellikle de H-SIL'de random boyanma paterni daha çok olguda saptandı. Bu nedenle Rb ve p53 immunohistokimyasal boyanma paterninin ayrıca değerlendirilmesinin morfolojik olarak arada kalman L-SIL ve H-SIL tanımlarının verilmesine yardımcı olabileceğini göstermiştir. p27'nin normal servikal epitelde çoğunlukla bazal ve/veya parabazal boyanma yapmamasına rağmen L-SIL ve H-SIL'de bazal boyanmayı da içerecek şekilde random boyanma paterni göstermesi, invaziv neoplazilere ilerlemede erken bir haberci olabileceğini ve displazisi belirgin olmayan vakalarda destekleyici bir delil olabileceğini ortaya çıkarmıştır.

6. SONUÇLAR

2017-2021 yılları arasında Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'nda herhangi bir HR-HPV tipi ile enfekte 100 olguya ait kolposkopik biyopsi, konizasyon ve histerektomi materyalleri retrospektif olarak incelendi. Olgular üç grupta toplandı. Displazinin olmadığı grup (non-D) 34, L-SIL grubu 32 ve H-SIL grubu 34 olgudan oluşmaktaydı.

Bu çalışmada p16, Rb, p53 ve p27 ekspresyonlarının HR-HPV ile ilişkili servikal karsinogenez gelişimine katkılarını ve karsinogenezin hangi aşamalarını etkilediklerini ortaya koymayı amaçladık. Ayrıca bu markırların ekspresyonlarının preneoplastik lezyonlarda morfolojik tanıya katkısını incelendik. Bunun yanında HR-HPV enfeksiyonuna eşlik eden inflamasyonun karsinogeneze katkısını tartışmayı hedefledik. Buna göre çalışmamızdan çıkan sonuçlar şu şekildedir:

- 100 olgunun yaşları 28 ile 66 arasında değişmekte olup ortalama yaş 41.7 ($\pm 8,5$)'dir. Birinci grubun yaş ortalaması 40.9 (± 7.1), ikinci grubun yaş ortalaması 44.4 (± 7.5) ve üçüncü grubun yaş ortalaması 39.9 (± 10.0)'dur.
- En sık saptanan HR-HPV tipi HPV 16'dır. Özellikle H-SIL olgularının 25/34'ünde HPV 16 görüldü. Displazi derecesinin artmasıyla HPV 16 saptanma oranının artması, HPV 16'nın yüksek karsinogenik özelliğe sahip olduğunu destekledi.
- Single ve multiple HR-HPV enfeksiyonunun gruplardaki dağılımına bakıldığında H-SIL grubunda belirgin şekilde single HPV baskınlığı görüldü. Bu da single HR-HPV ile enfekte olguların takibinin daha dikkatli yapılması gerektiğini gösterdi.
- Servikal epitelde nötrofil infiltrasyonunun normal epitelde H-SIL'e ilerledikçe arttığı görüldü ve bu bulgu literatürle uyumlu bulundu. Ayrıca nötrofil infiltrasyonu daha çok epitelin üst kısımlarında, lenfositler ise bazal kısımlarda gözlemlendi. Epitelyal lenfosit infiltrasyonu ile displazi derecesi arasında ilişki görülmedi.
- Tüm L-SIL ve H-SIL olgularında p16 ekspresyonu izlendi. Non-D olgularda da p16 ekspresyonu görüldü. Ancak LR-HPV'lerin de dahil edildiği çalışmalara göre non-D grupta daha yüksek oranda p16 ekspresyonu izlenmesi HR-HPV'lerin yüksek enfektivitesine kanıt oluşturdu. Ayrıca displazi derecesi arttıkça p16'da fokal boyanmanın

azaldığı ve diffüz boyanmanın arttığı gözlemlendi. Bu bulgu literatürle uyumlu olmakla birlikte p16'nın servikal displastik lezyonlar için hassas ve spesifik bir belirteç olduğunu destekledi.

- Tüm olgularda Rb ekspresyonu izlenirken displazi derecesi arttıkça Rb ekspresyonunda azalma dikkati çekti. Ayrıca non-D grubun %88.2'sinde ve L-SIL'in %71.9'unda epitelde bazal ve/veya parabazal ağırlıklı boyanma izlenirken H-SIL olgularının tamamında random boyanma görüldü. Bu bulgular Rb ekspresyon kaybının neoplastik süreçlerle ilişkili olduğunu ve Rb'nin boyanma paterninin L-SIL ve H-SIL kararını vermede yardımcı olabileceğini gösterdi.
- p53 ekspresyonu, non-D gruba göre H-SIL'de azalma gösterdi. Ancak L-SIL grubunda hafif bir ekspresyon artışı dikkati çekti. Epitelde dağılım paternine bakıldığında Rb'ye benzer şekilde L-SIL ve H-SIL'de random boyanma paternine sahip olgu sayısının arttığı görüldü. Bu bulgular p53'ün erken lezyonlarda DNA koruyucu mekanizma ile miktarını arttırmış olabileceği düşüncesini destekledi. Ayrıca random boyanma paternine sahip olgu sayısındaki artışın, hücre siklus regülasyonunda bozukluk ve epitelyal maturasyon kaybı göstergesi olduğunu düşündürdü. Ayrıca bu bulgunun morfolojik olarak arada kalınan vakalarda L-SIL ve H-SIL tanılarının verilmesinde katkı sağlayacağı düşünüldü.
- Tüm olgularda p27 ekspresyonu izlenirken displastik gruplarda ekspresyonda azalma dikkati çekti. Bu azalma L-SIL grubunda daha belirgindi. p27'nin epitelde dağılım paterni Rb ve p53'e göre farklılık gösterdi. Non-D grubun %79.4'ünde (27/34) epitelin intermedier/süperfisyal kısmında boyanma gözlenirken bazal ve/veya parabazal boyanma izlenmedi. L-SIL grubunda bu oran %40.6'ya (13/32) düştü ve %59.4'ünde (19/32) random boyanma izlendi. H-SIL'in %97.1'inde ise (33/34) ise bazal boyanmayı da içerecek şekilde random boyanma görüldü. Bu bulgular p27'nin invaziv neoplazilere ilerlemede erken haberci olabileceğini ve bazal tabakayı da içeren random boyanmanın displazi kararını vermede yardımcı olabileceğini düşündürdü.
- Hem Rb'da hem p27'de single HR-HPV ile enfekte olgularda displazi derecesi arttıkça random boyanmanın arttığı görüldü. Benzer şekilde

random p53 boyanması gösteren tüm olguların single HR-HPV ile enfekte olduğu dikkati çekti. Bu bulgular single HR-HPV enfeksiyonlarının ilerleyici displastik lezyonlarla daha çok ilişkili olduğunu gösterdi.

- Rb-p16 arasında gözlenen ters korelasyon ($r:-0.251$), HPV ile enfektif hücrelerde bu iki belirteçin negatif feedback mekanizması gösterdiğini kanıtladı. Rb-p53 arasındaki pozitif korelasyon ($r:0.518$), HPV E6/E7'nin iki önemli tümör supresör protein üzerinde etkili olduğunu gösterdi. Rb-p27 ($r:0.286$) ve p53-p27 ($r:0.213$) arasındaki korelasyon, HPV onkoproteinlerinin hücre siklusunun farklı seviyelerindeki proteinleri birbirleri ile bağlantılı olabilecek şekilde etkilediğini gösterdi.

Özetle bu çalışmada, HR-HPV ile enfekte olgularda displazi derecesi arttıkça artan p16 ve azalan Rb, p53 ve p27 ekspresyonu izlendi. Çalışmamızdaki immunohistokimyasal bulgular, bu supressör genlerin karsinogenez üzerindeki etkilerinin yanı sıra displastik lezyonların erken veya geç evrelerinde klinik seyri tahmin etmeyi kolaylaştıracağını ve histopatolojik olarak tanı verme güçlüğü yaşanan olgularda doğru tanıya ulaşılmaya katkı sağlayacağını gösterdi.

7. KAYNAKLAR

1. Stiasny A, Kuhn C, Mayr D, Alexiou C, Janko C, Wiest I, et al. Immunohistochemical Evaluation of E6/E7 HPV Oncoproteins Staining in Cervical Cancer. *Anticancer Res.* 2016 Jun;36(6):3195–8.
2. Nayel MA, Shaker OG, Hosni AN, Hosni HN, Khalifa SE, Shazly AF. Human papillomavirus (HPV) in Egyptian females: study by cytology, histopathology, colposcopy and molecular diagnosis of high risk types. *Malays J Pathol.* 2016 Dec;38(3):257–66.
3. Raju K, Punnayanapalya SS, Mariyappa N. Significance of p53, pRb and Ki-67 markers in Cervical intraepithelial lesion and Malignancy. *Biomed Res Ther.* 2015;
4. Omran OM, AlSheeha M. Human papilloma virus early proteins E6 (HPV16/18-E6) and the cell cycle marker P16 (INK4a) are useful prognostic markers in uterine cervical carcinomas in Qassim Region--Saudi Arabia. *Pathol Oncol Res.* 2015 Jan;21(1):157–66.
5. Rodrigues LC, Speck NM de G, Focchi GR de A, Schimidt MA, Marques RM, Ribalta JCL. Immunoexpression of HPV 16/18 E6 and E7 oncoproteins in high-grade cervical squamous intraepithelial lesions in HIV-positive women. *Genet Mol Res.* 2016 Feb;15(1).
6. Wang HL, Lu DW. Detection of human papillomavirus DNA and expression of p16, Rb, and p53 proteins in small cell carcinomas of the uterine cervix. *Am J Surg Pathol.* 2004 Jul;28(7):901–8.
7. Bahnassy AA, Zekri ARN, 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 May;7:4.
8. Nicol AF, Pires ARC, de Souza SR, Nuovo GJ, Grinsztejn B, Tristão A, et al. Cell-cycle and suppressor proteins expression in uterine cervix in HIV/HPV co-infection: comparative study by tissue micro-array (TMA). *BMC Cancer [Internet].* 2008 Oct 7;8:289.
9. Aral B, Özekinci S, Yalçın Ö. Evaluation Of P16, P27, Cycline D1, Bcl-2 Expressions In Uterine Cervical Intraepithelial Neoplasia and Skuamous Cell Carcinoma. *İstanbul Kanuni Sultan Süleyman Tıp Derg.* 2017;
10. O'Neill CJ, McCluggage WG. p16 expression in the female genital tract and its value in diagnosis. Vol. 13, *Advances in Anatomic Pathology.* 2006.
11. Katz VL. Reproductive Anatomy : Gross and Microscopic, Clinical Correlations. In: Katz: *Comprehensive Gynecology [Internet].* 2007. p. YP-.
12. Baggish MS. Anatomy of the Cervix. In: Baggish MS, editor. *Atlas of Pelvic Anatomy and Gynecologic Surgery.* Fifth Edit. Elsevier; 2021. p. 507–11.
13. Kaefer M. Management of Abnormalities of the Genitalia in Girls. In: Partin AW, editor. *Campbell-Walsh Urology.* Twelfth Ed. Elsevier; 2021. p. 973-989.e3.
14. Laurence S. Baskin GC. Embryology of the Genitourinary Tract. In: Partin AW, editor. *Campbell-Walsh-Wein Urology.* Twelfth Ed. Elsevier; 2021. p. 305-340.e4.
15. Beth W. Rackow RAL and GML. Congenital Abnormalities of the Female Reproductive Tract: Anomalies of the Vagina, Cervix, Uterus, and Adnexa. In: Lobo RA, editor. *Comprehensive Gynecology.* Seventh Ed. Elsevier; 2017. p. 205-218.e2.
16. Kristen A. Atkins. Normal Histology of the Uterus and Fallopian Tubes. In: Mills SE, editor. *Histology for Pathologists: Fifth Edition.* Elsevier; 2020. p. 2483–507.
17. Fadare O, Roma A. Normal Anatomy of the Uterine Cervix. In: *Atlas of Uterine Pathology,* editor. Atlas of Anatomic Pathology. springer, cham.; 2019. p. 193–6.

18. Boria F, Siegrist J, Hardisson D, Saturio N, Zapardiel I. Lobular endocervical glandular hyperplasia mimicking cervical adenocarcinoma. *J Obstet Gynaecol (Lahore)*. 2020;
19. Chretien FC, Cohen J, Borg V, Psychoyos A. Human cervical mucus during the menstrual cycle and pregnancy in normal and pathological conditions. *J Reprod Med Obstet Gynecol*. 1975;
20. Aggarwal P, Ben Amor A. Cervical Ectropion. In *Treasure Island (FL)*; 2020.
21. Reich O, Regauer S, McCluggage WG, Bergeron C, Redman C. Defining the Cervical Transformation Zone and Squamocolumnar Junction: Can We Reach a Common Colposcopic and Histologic Definition? *Int J Gynecol Pathol [Internet]*. 2017;36(6).
22. Miyatake T, Ueda Y, Yoshino K, Shroyer KR, Kanao H, Sun H, et al. Clonality Analysis and Human Papillomavirus Infection in Squamous Metaplasia and Atypical Immature Metaplasia of Uterine Cervix: Is Atypical Immature Metaplasia a Precursor to Cervical Intraepithelial Neoplasia 3? *Int J Gynecol Pathol [Internet]*. 2007;26(2).
23. Gardella C, Eckert LO, Lentz GM. Genital Tract Infections: Vulva, Vagina, Cervix, Toxic Shock Syndrome, Endometritis, and Salpingitis. In: *Comprehensive Gynecology*. 2017. p. 524–65.
24. Gilks B. Uterus: Cervix. In: Goldblum JR, editor. *Rosai and Ackerman's Surgical Pathology*. Eleventh E. Elsevier; 2018. p. 1260–93.
25. Lusk MJ, Konecny P. Cervicitis: A review. *Current Opinion in Infectious Diseases*. 2008.
26. Ferenczy TCW. BMR. A. Benign Diseases of the Cervix, Precancerous Lesions of the Cervix. In: Kurman RJ, editor. *Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract*. Sixth Edit. Springer; 2011. p. 155–240.
27. Harrison B. Nonneoplastic Lesions of the Cervix. In: Nucci MR, editor. *Gynecologic Pathology: A Volume in Foundations in Diagnostic Pathology Series*. Second Edi. Elsevier; 2021. p. 185–225.
28. Darragh TM, Colgan TJ, Thomas Cox J, Heller DS, Henry MR, Luff RD, et al. The lower anogenital squamous terminology standardization project for HPV-associated lesions: background and consensus recommendations from the college of american pathologists and the american society for colposcopy and cervical pathology. *Arch Pathol Lab Med*. 2012;
29. Christopher D.M. Fletcher MD Frcp. Tumors of the Female Genital Tract. In: Carrie Y. Inwards, Jodi M. Carter AMO, editor. *Diagnostic Histopathology of Tumors, 2 Volume Set*. Fifth Edit. Elsevier; 2021. p. 702–912.
30. Kurman RJ, Carcangiu ML, Harrington CS, Young RH. WHO classification of tumours of female reproductive organs. IARC Press. 2014;
31. Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J, Rodriguez AC, Wacholder S. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet*. 2007.
32. Hugol D. Low and high grade squamous intraepithelial lesions: Cytological criteria and histopathological correlations. Differential diagnosis. *Rev Fr des Lab*. 2002;
33. Waxman AG, Chelmos D, Darragh TM, Lawson H, Moscicki AB. Revised terminology for cervical histopathology and its implications for management of high-grade squamous intraepithelial lesions of the cervix. *Obstetrics and Gynecology*. 2012.
34. Thomison J, Thomas LK, Shroyer KR. Human papillomavirus: molecular and cytologic/histologic aspects related to cervical intraepithelial neoplasia and carcinoma. *Hum Pathol*. 2008;
35. C. Simon Herrington, Jan P.A. Baak GLM. Cervical Squamous Intraepithelial Lesions. In: Mutter GL, editor. *Pathology of the Female Reproductive Tract*. Third Edit. Elsevier; 2014.

p. 200–31.

36. Holowaty P, Miller AB, Rohan T, To T. Natural history of dysplasia of the uterine cervix. *J Natl Cancer Inst.* 1999;
37. Nayar R, Wilbur DC. The Bethesda system for reporting cervical cytology: A historical perspective. *Acta Cytologica.* 2017.
38. Park JJ, Sun D, Quade BJ, Flynn C, Sheets EE, Yang A, et al. Stratified mucin-producing intraepithelial lesions of the cervix: Adenosquamous or columnar cell neoplasia? *Am J Surg Pathol.* 2000;
39. Lora Hedrick Ellenson and Edyta C. Pirog. The Female Genital Tract. In: Aster KA, editor. *Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease.* Tenth Edit. Elsevier; 2021. p. 985–1036.
40. Berti FCB, Salviano-Silva A, Beckert HC, de Oliveira KB, Cipolla GA, Malheiros D. From squamous intraepithelial lesions to cervical cancer: Circulating microRNAs as potential biomarkers in cervical carcinogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer.* 2019.
41. Gupta S, Kumar P, Das BC. HPV: Molecular pathways and targets. *Current Problems in Cancer.* 2018.
42. Bonne W. Papillomaviruses. In: Bennett JE, editor. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases.* Ninth Edit. Elsevier; 2020. p. 1916-1930.e6.
43. Cubie HA, Cuschieri KS, Tong CYW. Papillomaviruses and polyomaviruses: Warts: Warts and cancers; polyomavirus associated nephropathy; progressive multifocal leucoencephalopathy. In: *Medical Microbiology: Eighteenth Edition.* 2012. p. 452–63.
44. Hwang LY, Moscicki AB. Human Papillomaviruses. In: Long SS, editor. *Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases.* Fifth Edit. 2018. p. 1101-1105.e1.
45. Avcı GA, Bozdayı G. İnsan Papilloma Virüsü. *Kafkas J Med Sci.* 2013;
46. Burd EM. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clinical Microbiology Reviews.* 2003.
47. Reinhard Kirnbauer PL. Human Papillomaviruses. In: Bolognia JL, Schaffer J V, Cerroni L, editors. *Dermatology.* 4th Editio. Elsevier; 2018. p. 1383–99.
48. IARC. List of Classifications by cancer sites with sufficient or limited evidence in humans, Volumes 1 to 123. *IARC Monographs.* 2018;
49. William Bonne JMD. Papillomavirus. In: Goldman L, editor. *Goldman's Cecil Medicine.* Twenty Fou. 2020. p. 2185-2189.e2.
50. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell.* 2011.
51. Mesri EA, Feitelson MA, Munger K. Human viral oncogenesis: A cancer hallmarks analysis. *Cell Host and Microbe.* 2014.
52. Hoppe-Seyler K, Bossler F, Braun JA, Herrmann AL, Hoppe-Seyler F. The HPV E6/E7 Oncogenes: Key Factors for Viral Carcinogenesis and Therapeutic Targets. *Trends in Microbiology.* 2018.
53. Fehrmann F, Laimins LA. Human papillomaviruses: Targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation. *Oncogene.* 2003.
54. Zhang EY, Tang XD. Human papillomavirus type 16/18 oncoproteins: Potential therapeutic targets in non-smoking associated lung cancer. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention.* 2012.

55. Yim E-K, Park J-S. The Role of HPV E6 and E7 Oncoproteins in HPV-associated Cervical Carcinogenesis. *Cancer Res Treat*. 2005;
56. Doorbar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clinical Science*. 2006.
57. Finnen RL, Erickson KD, Chen XS, Garcea RL. Interactions between Papillomavirus L1 and L2 Capsid Proteins. *J Virol*. 2003;
58. Tommasino M. The human papillomavirus family and its role in carcinogenesis. *Seminars in Cancer Biology*. 2014.
59. Mac M, Moody CA. Epigenetic regulation of the human papillomavirus life cycle. *Pathogens*. 2020.
60. Pinidis P, Tsikouras P, Iatrakis G, Zervoudis S, Koukouli Z, Bothou A, et al. Human Papilloma Virus' Life Cycle and Carcinogenesis. *Maedica (Buchar)*. 2016;
61. Chow LT. Model systems to study the life cycle of human papillomaviruses and HPV-associated cancers. *Virologica Sinica*. 2015.
62. Graham S V. The human papillomavirus replication cycle, and its links to cancer progression: A comprehensive review. *Clinical Science*. 2017.
63. Albert E, Laimins L. Regulation of the human papillomavirus life cycle by DNA damage repair pathways and epigenetic factors. *Viruses*. 2020.
64. Frazer I. Correlating immunity with protection for HPV infection. *International Journal of Infectious Diseases*. 2007.
65. Doorbar J. Host control of human papillomavirus infection and disease. *Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology*. 2018.
66. James M. Ritter, Rod Flower, Graeme Henderson, Yoon Kong Loke, David MacEwan HPR. Cell proliferation, apoptosis, repair and regeneration. In: James M. Ritter, editor. *Rang & Dale's Pharmacology*. Elsevier; 2020. p. 82–92.
67. Harold J. Burstein, Vanja Douglas, Hilary J. Goldberg, Ira Hanan, Cadence Kim, Anne LaCase, Joyce Liu, Graham McMahon, Meyeon Park, Anna E. Rutherford MJS. The Cell as a Unit of Health and Disease. In: Aster KA, editor. *Robbins Basic Pathology*. Tenth Edit. Elsevier; 2018. p. 1–29.
68. Karen S. Sfanos MLG. Molecular Genetics and Cancer Biology. In: Partin AW, editor. *Campbell-Walsh Urology*. Twelfth Ed. Elsevier; 2021. p. 1346–69.
69. Oscar R. Colegio, Edel A. O'Toole, Fredrik Pontén, Joakim Lundeberg AA. Principles of Tumor Biology and Pathogenesis of BCCs and SCCs. In: Bologna JL, editor. *Dermatology: 2-Volume Set*. Fourth Edi. Elsevier; 2018. p. 1858–71.
70. Fischer M, Dang C V., DeCaprio JA. Control of Cell Division. In: Hoffman R, editor. *Hematology: Basic Principles and Practice*. Seventh Ed. Elsevier; 2018. p. 176–85.
71. Mary Jue Xu, Joseph O. Humtsoe PKH. Biology of Head and Neck Cancers. In: Flint PW, editor. *Cummings Otolaryngology*. Seventh Ed. Elsevier; 2021. p. 1032–42.
72. Hubbert NL, Sedman SA, Schiller JT. Human papillomavirus type 16 E6 increases the degradation rate of p53 in human keratinocytes. *J Virol*. 1992;
73. Castle PE, Adcock R, Cuzick J, Wentzensen N, Torres-Martinez NE, Torres SM, et al. Relationships of p16 Immunohistochemistry and Other Biomarkers With Diagnoses of Cervical Abnormalities: Implications for LAST Terminology. *Arch Pathol Lab Med*. 2020 Jun;144(6):725–34.

74. Al-Shuwaikh A, Latif I. Immunohistochemical Study of Retinoblastoma Protein (Prb) Expression in Cervical Carcinomas and Their Premalignant Lesions. *Diyala J Pure Sci.* 2010 Jan 1;6:68–76.
75. Boran C, Kandirali E, Yanik S, Ahsen H, Ulukaradağ E, Yilmaz F. Does smoking change expression patterns of the tumor suppressor and DNA repair genes in the prostate gland? *Urol Oncol Semin Orig Investig* [Internet]. 2017;35(8):533.e1-533.e8.
76. Bosch FX, Burchell AN, Schiffman M, Giuliano AR, de Sanjose S, Bruni L, et al. Epidemiology and Natural History of Human Papillomavirus Infections and Type-Specific Implications in Cervical Neoplasia. *Vaccine* [Internet]. 2008;26:K1–16.
77. Bosch FX, Manos MM, Muñoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, et al. Prevalence of Human Papillomavirus in Cervical Cancer: a Worldwide Perspective. *JNCI J Natl Cancer Inst* [Internet]. 1995 Jun 7;87(11):796–802.
78. Balasubramaniam SD, Balakrishnan V, Oon CE, Kaur G. Key Molecular Events in Cervical Cancer Development. *Medicina (Kaunas)* [Internet]. 2019 Jul 17;55(7):384.
79. De Brot L, Pellegrini B, Moretti ST, Carraro DM, Soares FA, Rocha RM, et al. Infections with multiple high-risk HPV types are associated with high-grade and persistent low-grade intraepithelial lesions of the cervix. *Cancer Cytopathol* [Internet]. 2017 Feb 1;125(2):138–43. Available from: <https://doi.org/10.1002/cncy.21789>
80. Sasagawa T, Basha W, Yamazaki H, Inoue M. High-risk and multiple human papillomavirus infections associated with cervical abnormalities in Japanese women. *Cancer Epidemiol biomarkers Prev a Publ Am Assoc Cancer Res cosponsored by Am Soc Prev Oncol.* 2001 Jan;10(1):45–52.
81. Mastutik G, Alia R, Rahniayu A, Rahaju AS, Kurniasari N, Putra ST. GENOTYPING OF HUMAN PAPPILOMAVIRUS IN CERVICAL PRECANCEROUS LESION AND SQUAMOUS CELL CARCINOMA AT DR. SOETOMO HOSPITAL, SURABAYA, INDONESIA. *African J Infect Dis* [Internet]. 2018 Mar 7;12(1 Suppl):7–12.
82. Herrero R, Hildesheim A, Bratti C, Sherman ME, Hutchinson M, Morales J, et al. Population-based study of human papillomavirus infection and cervical neoplasia in rural Costa Rica. *J Natl Cancer Inst.* 2000 Mar;92(6):464–74.
83. Kalantari M, Karlsen F, Johansson B, Sigurjonsson T, Warleby B, Hagmar B. Human papillomavirus findings in relation to cervical intraepithelial neoplasia grade: A study on 476 stockholm women, using pcr for detection and typing of HPV. *Hum Pathol* [Internet]. 1997;28(8):899–904.
84. Castle PE, Hillier SL, Rabe LK, Hildesheim A, Herrero R, Bratti MC, et al. An association of cervical inflammation with high-grade cervical neoplasia in women infected with oncogenic human papillomavirus (HPV). *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2001;
85. Castle PE, Giuliano AR. Chapter 4: Genital tract infections, cervical inflammation, and antioxidant nutrients--assessing their roles as human papillomavirus cofactors. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2003;(31):29–34.
86. Mazibrada J, Rittà M, Mondini M, De Andrea M, Azzimonti B, Borgogna C, et al. Interaction between inflammation and angiogenesis during different stages of cervical carcinogenesis. *Gynecol Oncol.* 2008 Jan;108(1):112–20.
87. Hiraku Y, Tabata T, Ma N, Murata M, Ding X, Kawanishi S. Nitrate and oxidative DNA damage in cervical intraepithelial neoplasia associated with human papilloma virus infection. *Cancer Sci.* 2007 Jul;98(7):964–72.
88. Kovacic MB, Katki HA, Kreimer AR, Sherman ME. Epidemiologic analysis of histologic cervical inflammation: relationship to human papillomavirus infections. *Hum Pathol.* 2008 Jul;39(7):1088–95.

89. Kobayashi A, Greenblatt RM, Anastos K, Minkoff H, Massad LS, Young M, et al. Functional attributes of mucosal immunity in cervical intraepithelial neoplasia and effects of HIV infection. *Cancer Res.* 2004 Sep;64(18):6766–74.
90. Murphy N, Ring M, Killalea AG, Uhlmann V, O'Donovan M, Mulcahy F, et al. p16INK4A as a marker for cervical dyskaryosis: CIN and cGIN in cervical biopsies and ThinPrep smears. *J Clin Pathol.* 2003 Jan;56(1):56–63.
91. Lesnikova I, Lidang M, Hamilton-Dutoit S, Koch J. p16 as a diagnostic marker of cervical neoplasia: a tissue microarray study of 796 archival specimens. *Diagn Pathol [Internet].* 2009 Jul 9;4:22. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19589135>
92. Lin Z-H, Shen X-H, Jin Z, Kim Y, Lee E, Kim H, et al. Human papillomavirus genotyping by oligonucleotide microarray and p16 expression in uterine cervical intraepithelial neoplasm and in invasive carcinoma in Korean women. *Pathol Int.* 2005 Aug;55(8):491–6.
93. Jackson JA, Kapur U, Erşahin Ç. Utility of p16, Ki-67, and HPV test in diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia and atrophy in women older than 50 years with 3- to 7-year follow-up. *Int J Surg Pathol.* 2012 Apr;20(2):146–53.
94. Zhao C, Zhao S, Heider A, Austin RM. Significance of high-risk human papillomavirus DNA detection in women 50 years and older with squamous cell papanicolaou test abnormalities. *Arch Pathol Lab Med.* 2010 Aug;134(8):1130–5.
95. Ordi J, Garcia S, del Pino M, Landolfi S, Alonso I, Quintó L, et al. p16 INK4a immunostaining identifies occult CIN lesions in HPV-positive women. *Int J Gynecol Pathol Off J Int Soc Gynecol Pathol.* 2009 Jan;28(1):90–7.
96. Sano T, Oyama T, Kashiwabara K, Fukuda T, Nakajima T. Expression status of p16 protein is associated with human papillomavirus oncogenic potential in cervical and genital lesions. *Am J Pathol.* 1998 Dec;153(6):1741–8.
97. Keating JT, Cviko A, Riethdorf S, Riethdorf L, Quade BJ, Sun D, et al. Ki-67, cyclin E, and p16INK4 are complimentary surrogate biomarkers for human papilloma virus-related cervical neoplasia. *Am J Surg Pathol.* 2001 Jul;25(7):884–91.
98. Klaes R, Friedrich T, Spitkovsky D, Ridder R, Rudy W, Petry U, et al. Overexpression of p16(INK4A) as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int J cancer.* 2001 Apr;92(2):276–84.
99. Donà MG, Vocaturo A, Giuliani M, Ronchetti L, Rollo F, Pescarmona E, et al. p16/Ki-67 dual staining in cervico-vaginal cytology: correlation with histology, Human Papillomavirus detection and genotyping in women undergoing colposcopy. *Gynecol Oncol.* 2012 Aug;126(2):198–202.
100. Hu L, Guo M, He Z, Thornton J, McDaniel LS, Hughson MD. Human papillomavirus genotyping and p16INK4a expression in cervical intraepithelial neoplasia of adolescents. *Mod Pathol an Off J United States Can Acad Pathol Inc.* 2005 Feb;18(2):267–73.
101. Kalof AN, Evans MF, Simmons-Arnold L, Beatty BG, Cooper K. p16INK4A immunoexpression and HPV in situ hybridization signal patterns: potential markers of high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Surg Pathol.* 2005 May;29(5):674–9.
102. Dray M, Russell P, Dalrymple C, Wallman N, Angus G, Leong A, et al. p16(INK4a) as a complementary marker of high-grade intraepithelial lesions of the uterine cervix. I: Experience with squamous lesions in 189 consecutive cervical biopsies. *Pathology.* 2005 Apr;37(2):112–24.
103. Yildiz IZ, Usubütün A, Firat P, Ayhan A, Küçükali T. Efficiency of immunohistochemical p16 expression and HPV typing in cervical squamous intraepithelial lesion grading and review of the p16 literature. *Pathol Res Pract.* 2007;203(6):445–9.

104. Ozgul N, Cil AP, Bozdayi G, Usubutun A, Bulbul D, Rota S, et al. Staining characteristics of p16INK4a: is there a correlation with lesion grade or high-risk human papilloma virus positivity? *J Obstet Gynaecol Res*. 2008 Oct;34(5):865–71.
105. Zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: From basic studies to clinical application. Vol. 2, *Nature Reviews Cancer*. European Association for Cardio-Thoracic Surgery; 2002. p. 342–50.
106. Chen PL, Riley DJ, Lee WH. The retinoblastoma protein as a fundamental mediator of growth and differentiation signals. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 1995;5(1):79–95.
107. Dyson N, Howley PM, Münger K, Harlow E. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science*. 1989 Feb;243(4893):934–7.
108. Salcedo M, Taja L, Utrera D, Chávez P, Hidalgo A, Pérez C, et al. Changes in retinoblastoma gene expression during cervical cancer progression. *Int J Exp Pathol* [Internet]. 2002 Dec;83(6):275–86.
109. Cordon-Cardo C, Richon VM. Expression of the retinoblastoma protein is regulated in normal human tissues. *Am J Pathol*. 1994 Mar;144(3):500–10.
110. Amortegui AJ, Meyer MP, Elborne VL, Amin RM. p53, retinoblastoma gene product, and cyclin protein expression in human papillomavirus virus DNA-positive cervical intraepithelial neoplasia and invasive cancer. *Mod Pathol an Off J United States Can Acad Pathol Inc*. 1995 Dec;8(9):907–12.
111. Sano T, Oyama T, Kashiwabara K, Fukuda T, Nakajima T. Immunohistochemical overexpression of p16 protein associated with intact retinoblastoma protein expression in cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasia. *Pathol Int*. 1998 Aug;48(8):580–5.
112. Nam EJ, Kim JW, Kim SW, Kim YT, Kim JH, Yoon BS, et al. The expressions of the Rb pathway in cervical intraepithelial neoplasia; predictive and prognostic significance. *Gynecol Oncol* [Internet]. 2007;104(1):207–11.
113. Tringler B, Gup CJ, Singh M, Groshong S, Shroyer AL, Heinz DE, et al. Evaluation of p16INK4a and pRb expression in cervical squamous and glandular neoplasia. *Hum Pathol*. 2004 Jun;35(6):689–96.
114. Kruse A-J, Skaland I, Munk AC, Janssen E, Gudlaugsson E, Baak JPA. Low p53 and retinoblastoma protein expression in cervical intraepithelial neoplasia grade 3 lesions is associated with coexistent adenocarcinoma in situ. *Hum Pathol*. 2008;39(4):573–8.
115. Noraini MD, Siti-Aishah MA, Kwan SW. An immunohistochemical study of retinoblastoma gene product in normal, premalignant and malignant tissues of the uterine cervix. *Malaysian J Med Sci*. 2003;
116. Kim YT, Zhao M. Aberrant cell cycle regulation in cervical carcinoma. *Yonsei Med J*. 2005 Oct;46(5):597–613.
117. 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;
118. Türkçüoğlu I, Tezcan S, Kaygusuz G, Atabekoğlu CS, Ortaç F, Güngör M, et al. The role of p53, Bcl-2 and Ki-67 in premalignant cervical lesions and cervical cancer. *Eur J Gynaecol Oncol*. 2007;28(4):290–3.
119. Madhumati G, Kavita S, Anju M, Uma S, Raj M. Immunohistochemical expression of cell proliferating nuclear antigen (PCNA) and p53 protein in cervical cancer. *J Obstet Gynecol India*. 2012;62(5).
120. Dimitrakakis C, Kymionis G, Diakomanolis E, Papaspyrou I, Rodolakis A, Arzimanoglou

- I, et al. The possible role of p53 and bcl-2 expression in cervical carcinomas and their premalignant lesions. *Gynecol Oncol.* 2000 Apr;77(1):129–36.
121. Cardillo MR, Stamp GW, Pignatelli MN, Lalani EN. Immunohistochemical analysis of p53 oncoprotein and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in the cervix uteri. *Eur J Gynaecol Oncol.* 1993;14(6):484–90.
 122. Tan GC, Sharifah NA, Salwati S, Shiran MS, Hatta AZ, Ng HO. Immunohistochemical study of p53 expression in premalignant and malignant cervical neoplasms. *Med Heal.* 2007;2(2):125–32.
 123. Vassallo J, Derchain SFM, Pinto GA, Martinez EZ, Syrjänen KJ, Andrade LAL. High risk HPV and p53 protein expression in cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Gynecol Obstet [Internet].* 2000;71(1):45–8.
 124. Godoy AEG, Bazzo KO, De Moura LB, Serafini EP. Expression analysis of p53, Ki-67 and bcl-2 in pre-malignant lesions of the cervix. *Open J Obstet Gynecol.* 2014;2014.
 125. Ghosh D, Roy AK, Murmu N, Mandal S, Roy A. Risk Categorization with Different Grades of Cervical Pre-Neoplastic Lesions - High Risk HPV Associations and Expression of p53 and RAR β . *Asian Pac J Cancer Prev.* 2019 Feb;20(2):549–55.
 126. Chetty R, Bramdev A, Aguirre-Arteta A, Pegoraro RJ, Sataar N. Relation between retinoblastoma and p53 proteins in human papilloma viruses 16/18 positive and negative cancers of the uterine cervix. *J Clin Pathol [Internet].* 1997 May;50(5):413–6.
 127. Conesa-Zamora P, Doménech-Peris A, Orantes-Casado FJ, Ortiz-Reina S, Sahuquillo-Frías L, Acosta-Ortega J, et al. Effect of Human Papillomavirus on Cell Cycle-Related Proteins p16, Ki-67, Cyclin D1, p53, and ProEx C in Precursor Lesions of Cervical Carcinoma: A Tissue Microarray Study. *Am J Clin Pathol [Internet].* 2009 Sep 1;132(3):378–90.
 128. Hiller T, Poppelreuther S, Stubenrauch F, Iftner T. Comparative analysis of 19 genital human papillomavirus types with regard to p53 degradation, immortalization, phylogeny, and epidemiologic risk classification. *Cancer Epidemiol biomarkers Prev a Publ Am Assoc Cancer Res cosponsored by Am Soc Prev Oncol.* 2006 Jul;15(7):1262–7.
 129. Tsuda H, Hashiguchi Y, Nishimura S, Kawamura N, Inoue T, Yamamoto K. Relationship between HPV typing and abnormality of G1 cell cycle regulators in cervical neoplasm. *Gynecol Oncol.* 2003 Dec;91(3):476–85.
 130. 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;
 131. Çalik M, Demirci E, Altun E, Çalik İ, Gündoğdu ÖB, Gürsan N, et al. Clinicopathological importance of Ki-67, p27, and p53 expression in gastric cancer. *Turkish J Med Sci.* 2015;45(1):118–28.
 132. Troncione G, Vetrani A, De Rosa G, Gerbasio D, Palombini L. Cyclin dependent kinase inhibitor p27(Kip1) expression in normal and neoplastic cervical epithelium. *J Clin Pathol.* 1999;
 133. Tae Kim Y, Kyoung Choi E, Hoon Cho N, Hung Ko J, Ick Yang W, Wook Kim J, et al. Expression of cyclin E and p27(KIP1) in cervical carcinoma. *Cancer Lett.* 2000;
 134. Huang LW, Chao SL, Hwang JL, Chou YY. Down-regulation of p27 is associated with malignant transformation and aggressive phenotype of cervical neoplasms. *Gynecol Oncol.* 2002;
 135. 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;

136. Shiozawa T, Shiohara S, Kanai M, Konishi I, Fujii S, Nikaido T. Expression of the cell cycle regulator p27Kip1 in normal squamous epithelium, cervical intraepithelial neoplasia, and invasive squamous cell carcinoma of the uterine cervix: Immunohistochemistry and functional aspects of p27Kip1. *Cancer*. 2001;
137. Dellas A, Schultheiss E, Leivas MR, Moch H, Torhorst J. Association of p27Kip1, cyclin E and c-myc expression with progression and prognosis in HPV-positive cervical neoplasms. *Anticancer Res*. 1998;18(6A):3991–8.
138. Cho NH, Kim YT, Kim JW. Correlation between G1 cyclins and HPV in the uterine cervix. *Int J Gynecol Pathol*. 1997;
139. Zeffass-Thome K, Zwerschke W, Mannhardt B, Tindle R, Botz JW, Jansen-Dürr P. Inactivation of the cdk inhibitor p27KIP1 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *Oncogene*. 1996 Dec;13(11):2323–30.
140. Fredersdorf S, Burns J, Milne AM, Packham G, Fallis L, Gillett CE, et al. High level expression of p27(kip1) and cyclin D1 in some human breast cancer cells: inverse correlation between the expression of p27(kip1) and degree of malignancy in human breast and colorectal cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Jun;94(12):6380–5.
141. Charette ST, McCance DJ. The E7 protein from human papillomavirus type 16 enhances keratinocyte migration in an Akt-dependent manner. *Oncogene*. 2007 Nov;26(52):7386–90.
142. Schmidt-Grimminger DC, Wu X, Jian Y, Broker TR, Chow LT. Post-transcriptional induction of p21cip1 protein in condylomata and dysplasias is inversely related to human papillomavirus activities. *Am J Pathol*. 1998 Apr;152(4):1015–24.
143. Nam EJ, Kim JW, Hong JW, Jang HS, Lee SY, Jang SY, et al. Expression of the p16 and Ki-67 in relation to the grade of cervical intraepithelial neoplasia and high-risk human papillomavirus infection. *J Gynecol Oncol* [Internet]. 2008/09/30. 2008 Sep;19(3):162–8.