



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
UFUK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**SMEARDE ASC-US (ÖNEMİ BELİRSİZ ATİPİK SKUAMOZ
HÜCRELER) TANISI KONULAN HASTALARIN BİYOPSİLERİNDE
SERVİKAL İNTRAEPİTELYAL NEOPLAZİ BULUNMA ORANININ
P16 İLE GÖSTERİLMESİ**

Dr. Zehra EDEBAL

TIBBİ PATOLOJİ ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Aytaç GÖKÖZ

ANKARA
2014

UFUK ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ PATOLOJİ ANABİLİM DALI

Tıpta uzmanlık eğitimi çerçevesinde yürütülmüş olan “Smearde ASC-US (Önemi Belirsiz Atipik Skuamoz Hücreler) Tanısı Konulan Hastaların Biyopsilerinde Servikal İntraepitelyal Neoplazi Bulunma Oranının p16 ile Gösterilmesi” başlıklı, Zehra EDEBAL’a ait bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **Tıpta Uzmanlık Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 04/06/2014



Prof. Dr. Aytaç GÖKÖZ

Ufuk Üniversitesi Tıp Fakültesi

Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı Başkanı

Tez Danışmanı ve Jüri Başkanı

Doç. Dr. Haldun UMUDUM

Ufuk Üniversitesi Tıp Fakültesi

Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı

Üye

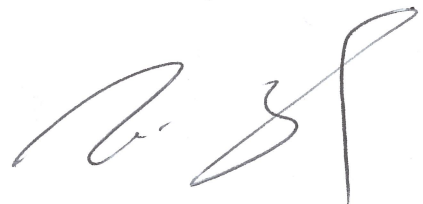


Yrd. Doç. Dr. Handan DOĞAN

Ufuk Üniversitesi Tıp Fakültesi

Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı

Üye



ÖNSÖZ

Tıpta uzmanlık eğitimimin süresince rehberliği, bilgi birikimi ve nesnel yaklaşımıyla yolumu aydınlatan, kişiliği ve akademik duruşuyla daima örnek aldığım çok değerli tez danışmanı hocam ve Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Aytaç Gököz'e,

Beni her konuda destekleyen ve yüreklendiren Ufuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Doç. Dr. Haldun Umudum'a, Yrd. Doç. Dr. Handan Doğan'a ve Uz. Dr. Egemen Akıncıoğlu'na;

Patoloji eğitimime yön veren, ilminden faydalandığım, insani ve ahlaki değerleri ile de örnek edindiğim, yanında çalışmaktan onur duyduğum, bana daima hoşgörü ve sabır gösteren değerli hocam Prof. Dr. Ömür Ataoğlu'na ve Özel Mikropat Laboratuvarı Ailesine;

Sonsuz sevgisini ve koşulsuz desteğini her zaman yanımda hissettiğim hayat arkadaşım, sevgili eşim Oğuz Han'a ve hayatımın neşesi biricik oğlum Mete Han'a;

Beni yetiştiren ve bugünlere gelmemi sağlayan sevgili anneme ve kendisini her konuda örnek aldığım ağabeyime;

Birlikte çalışmaktan daima keyif aldığım çalışma arkadaşlarım Berna Başhan'a ve Özgür Lort'a;

İmmünohistokimya çalışmasındaki yardımlarını asla unutmayacağım Osman Başhan'a;

Teşekkürlerimi, saygılarımı ve şükranlarımı sunarım.

Dr. Zehra EDEBAL
Ankara, 2014

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	i
ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	v
ŞEKİLLER ve RESİMLER DİZİNİ	vi
TABLolar DİZİNİ	vii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Serviks Anatomisi	3
2.2. Serviks Kanseri ve Servikal İntraepitelyal Neoplazi.....	5
2.3. Pap Smear	7
2.3.1. Pap Smearın Değerlendirilmesi ve Bethesda Sistemi	8
2.4. Atipik Skuamoz Hücreler	11
2.4.1. Atipik Skuamoz Hücre Tanımlaması.....	11
2.4.2. Atipik Skuamoz Hücre – Önemi Bilinmeyen.....	13
2.5. Human Papilloma Virüsü.....	17
2.6. p16 ^{INK4A}	19
3. GEREÇ ve YÖNTEM	22
3.1. Popülasyon Seçimi	22
3.2. p16 Boyaması.....	22
3.3. İstatistiksel Değerlendirme	23
4. BULGULAR	24

5. TARTIŞMA.....	33
6. SONUÇLAR.....	39
ÖZET	40
SUMMARY.....	42
KAYNAKLAR.....	44

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

AIS: Endoservikal adenokarsinoma in situ

AGC: Atipik glandular hücreler

ALTS: Skuamoz İntraepitelyal Lezyon Triaaj çalışması

ASC: Atipik skuamoz hücreler

ASC-H: Atipik skuamoz hücreler - yüksek dereceli skuamoz intraepitelyal lezyon dışlanamıyor

ASC-US: Atipik skuamoz hücreler - önemi bilinemeyen

AZD: Açık zincir dizini

CIN: Servikal intraepitelyal neoplazi

HPV: Human Papilloma Virüsü

HPV – DNA: Human Papillomavirus DNA

HSIL: Yüksek dereceli skuamoz intraepitelyal lezyon

LSIL: Düşük dereceli skuamoz intraepitelyal lezyon

NILM: İntraepitelyal lezyon veya malignite yönünden negatif

p16: p16^{INK4A}

Pap testi: Papanicolaou testi

pRb: Retinoblastoma proteini

SIL: Skuamoz intraepitelyal lezyonlar

ŞEKİLLER ve RESİMLER DİZİNİ

Şekil 2.1:	Serviksin Yapısı	4
Şekil 2.2:	p16'nın Hücre Döngüsüne Etkisi	20
Resim 2.1:	Normal histopatolojik görünümün CIN ile Karşılaştırılması	6
Resim 2.2:	Bethesda Tanı Kriterleri – 1	14
Resim 2.3:	Bethesda Tanı Kriterleri – 2	14
Resim 2.4:	Bethesda Tanı Kriterleri – 3	15
Resim 2.5:	Bethesda Tanı Kriterleri – 4	15
Resim 2.6:	HPV'nin 3 Boyutlu Modellemesi	17
Resim 3.1:	p16 Negatif Boyanma	28
Resim 3.2:	p16 Negatif Boyanma	29
Resim 3.3:	p16 Pozitif Boyanma	30

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 2.1:	Servikal Sitolojik Tanıların Bildiriminde 2001	
	Bethesda Sistemi	9
Tablo 2.2:	Bethesda ASC-US Kriterleri	13
Tablo 3.1:	Bethesda ASC-US Tanı Kriterlerinin	
	Pozitiflik Oranlarının Dağılımları	24
Tablo 3.2:	Bethesda ASC-US Tanı Kriterlerinin	
	Histopatolojik Tanıya Göre Dağılımları (1. Madde)	25
Tablo 3.3:	Bethesda ASC-US Tanı Kriterlerinin	
	Histopatolojik Tanıya Göre Dağılımları (2. Madde)	25
Tablo 3.4:	Bethesda ASC-US Tanı Kriterlerinin	
	Histopatolojik Tanıya Göre Dağılımları (3. Madde)	26
Tablo 3.5:	Bethesda ASC-US Tanı Kriterlerinin	
	Histopatolojik Tanıya Göre Dağılımları (4. Madde)	26
Tablo 3.6:	ASC-US Tanı Kriterlerinin Örnek Başına	
	Ortalama Pozitiflik Oranları	27
Tablo 3.7:	p16 Boyanma Oranının Histopatolojik Tanıya Göre Dağılımı ...	28

1. GİRİŞ

Serviks kanseri dünya çapında her yıl 528 bin yeni vakanın görüldüğü ve 266 bin kadının hayatını kaybetmesine yol açan önemli bir sağlık sorunudur. Kadınlarda görülen tüm kanserlerin yaklaşık %12'si serviks kanseridir (1). Yurtdışında yapılan çalışmalarda serviks kanserinin insidansında ve mortalitesinde kayda değer bir düşüş gözlemlendiği bildirilmiştir. Bu düşüşün en önemli nedeni Pap smear testinin etkin bir tarama programı olarak kullanılmaya başlanmasıdır (2). Pap smear testiyle serviks kanserinin öncü lezyonları erken safhalarda fark edilmektedir. Skuamoz epitelden köken alan bu lezyonların invaziv karsinomun öncüsü olduğu düşünülmektedir (3). İntraepitelyal yerleşimli bu lezyonlar invaziv tümörün pek çok hücresel özelliğini taşımaktadır. Servikal intraepitelyal neoplazi (CIN) olarak adlandırılan bu lezyonlar konizasyon, elektrodiatermi, kriyoterapi, loop eksizyon gibi yöntemlerle tedavi edilmekte ve kanser gelişimi büyük oranda engellenmektedir (4).

Pap smear tanısal raporlarının standardizasyonu için geliştirilen Bethesda sistemi, 2001 yılında güncellenerek çeşitli yeni tanımlamalara kavuşmuştur. Atipik skuamoz hücreler (ASC) bu sistemde önemi bilinmeyen (ASC-US) ve yüksek dereceli skuamoz intraepitelyal lezyon dışlanamıyor (ASC-H) olarak iki farklı sınıflamaya tabi tutulmuştur (5). ASC-US tanısı patologlar arasında tekrar üretilebilirliği düşük ve tanı kriterleri üzerindeki tartışmaların halen devam ettiği bir konudur. Buna rağmen tüm Pap smear incelemelerinin yaklaşık %5 kadarı ASC-US olarak raporlanmakta ve bu vakalar takip edildiğinde intraepitelyal lezyon veya maligniteye rastlanamayabilindiği gibi değişen oranlarda CIN de görülebilmektedir (6). Pap

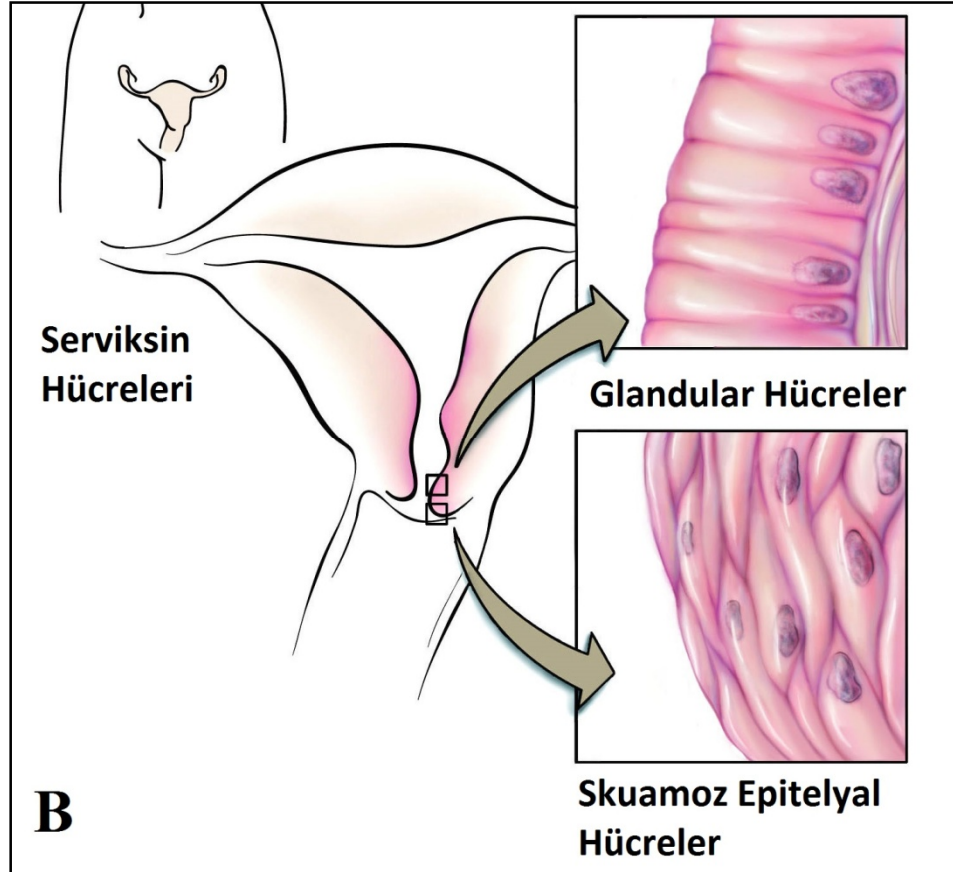
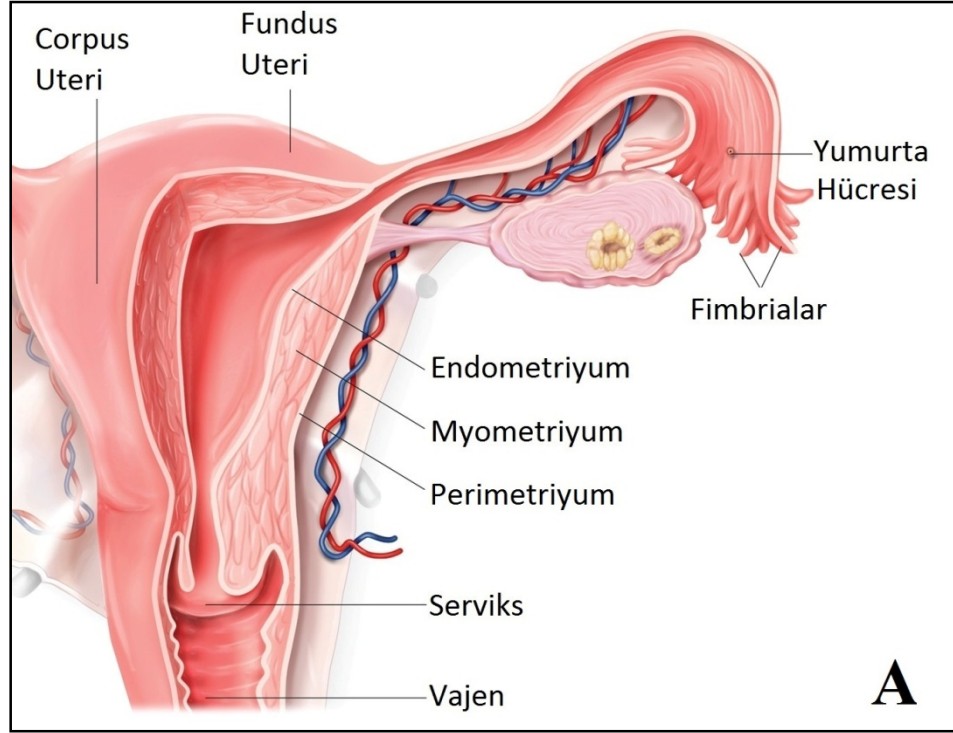
smear ve servikal biyopsi sonuçlarında gözlenen bu değişkenlik ve tekrarlanabilirlik sorunları, servikal tarama programlarını yönlendirmede HPV – DNA, p16^{INK4A} (p16), Ki-67 gibi yeni testlerin ortaya çıkmasına yol açmıştır (7). Bu yeni testlerin klinik kullanımdaki yerleri ve maliyet/etkinlik analizleri gibi konularda hala çalışmalar süregelmektedir.

Bizim çalışmamızın amacı, Ufuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı olarak Bethesda sistemine göre ASC-US tanısı koyduğumuz Pap smear vakalarının takiplerinde yapılan servikal biyopsi örneklerini değerlendirmek ve bu vakaların CIN olarak değerlendirilme oranlarını ortaya koymaktır. Servikal biyopsi örneklerinin tümü histopatolojik inceleme ve p16 immünohistokimyasal boyama yöntemi ile değerlendirilerek CIN tanısı konulan vakaların p16 boyama ile de teyit edilmesi ve ASC-US Bethesda tanı kriterlerinin histopatolojiye yansımalarının açığa çıkarılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Serviks Anatomisi

Uterusun istmus uteri bölümüyle vajina arasında kalan yaklaşık 3 cm uzunluğundaki parçası serviks olarak adlandırılmaktadır (Şekil 2.1). Silindir şeklinde vajina içine doğru yerleşim gösterir ve uterusun alt 1/3'lük kısmını oluşturur. Serviksin vajina içine yerleşim gösteren kısmına "portio vaginalis uteri" denir. Vajina duvarıyla portio vaginalis uteri arasında oluşan çıkmaz kısma "fornix vagina" denir. Portio vaginalisin vajinadan görülebilen açıklığına "ostium uteri" (eksternal os) denir. Vajina arka duvarına bakan bu açıklığın şekli yaşla, hormonal durumla ve kişinin vajinal doğum yapıp yapmadığına göre farklılıklar gösterir. Ostium uterinin yukarı doğru devamında "canalis cervicis uteri" yer alır. Bu kanalın iki ucu orta kısmına göre daha dardır. Endoservikal kanal, internal os aracılığıyla uterus kavitesine açılarak sonlanır (8).



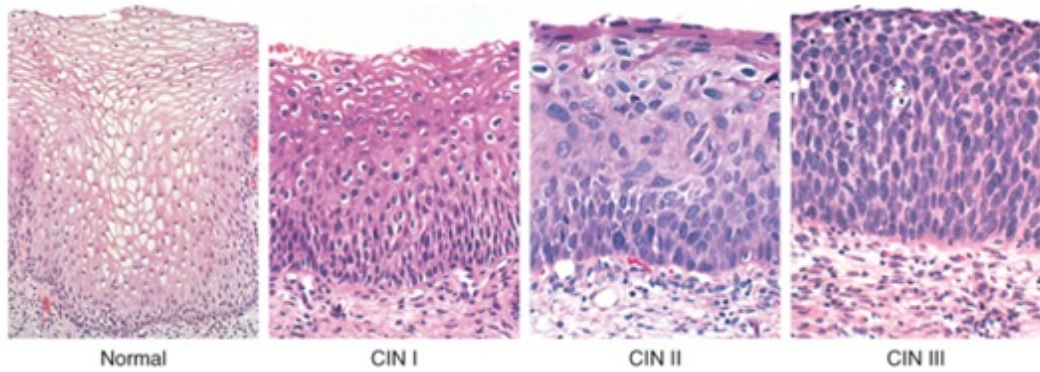
Şekil 2.1: Serviksin Yapısı. A)Anatomik yapı, B)Temel hücresel yapı (9).

2.2. Serviks Kanseri ve Servikal İntraepitelyal Neoplazi

Serviks kanseri kadınlarda insidans ve mortalite bakımından meme, akciğer ve kolorektal kanserden sonra gelmektedir. Dünya çapında her yıl 500.000'in üzerinde yeni vaka görülmekte ve 250.000'in üzerinde kadın hayatını serviks kanseri nedeniyle kaybetmektedir. Serviks kanserine bağlı her 10 ölümden 9'u az gelişmiş ülkelerde görülmektedir ve dünyada bölgeler arasındaki mortalite oranları arasında 18 kata kadar farklılık görülmektedir (1). Türkiye'de ise Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu'nun son yayınladığı verilere göre kadınlarda serviks kanserinin tüm kanserler içinde görülme oranı %2,7'dir. Yaşa göre standardize edilmiş insidansı ise yüz binde 4,5 olarak belirtilmiştir. Genç erişkin kadın popülasyonunda (25 – 49 yaş) serviks kanseri meme, tiroid, kolorektal ve over kanserinden sonra en sık görülen 5. kanser türüdür ve tüm kanserler içinde %3,9 oranında rastlanılmaktadır. Yaş grubu büyüdükçe serviks kanseri insidansı da belirgin şekilde azalmaktadır. Serviks kanseri evrelerinin dağılımı incelendiğinde, ülkemizde vakaların %52,1'ine lokalize, %37,3'üne bölgesel durumda tanı konulmaktadır. Vakaların %10,6'sına ise metastatik durumda tanı konulmaktadır (10).

Servikal intraepitelyal neoplazi (CIN), serviksin skuamoz hücreli karsinomunun öncü lezyonudur ve bu nedenle yıllardır bu lezyonu konu alan sayısız çalışma yapılmıştır (11, 12). Servikal intraepitelyal lezyonları daha iyi anlamak ve tanımlamak için günümüze kadar farklı sınıflandırma yöntemleri geliştirilmiş ve kullanılmıştır. Bunlardan ilki displazi/karsinoma in situ sınıflamasıdır. Bu sınıflamada displazi hafif, orta ve şiddetli olarak 3 ayrı gruba ayrılmıştır. Kullanılmış bir başka yöntem,

CIN sınıflamasıdır. Bu sınıflamada CIN I hafif displazi, CIN II orta derecede displazi ve CIN III şiddetli displazi/karsinoma in situya karşılık gelecek şekilde kullanılmaktadır. Bu sınıflama displazi/karsinoma in situ sınıflamasının yerini almıştır (8). CIN, histopatolojik bir tanımlamadır ve kendi içinde CIN 1, 2 ve 3 olmak üzere alt sınıflar içerir. Epitelin üst 2/3'lük kısmının matürasyonunu koruduğu ve yüzeysel hücrelerin viral sitopatik etkiler (koilositoz) içerebildiği, değişken fakat hafif atipi gösteren lezyon CIN 1 olarak adlandırılır. Çekirdek anomalileri tüm örnek boyunca yayılmıştır ancak hafiftir. Bazal kısımda mitotik değişiklikler gözlenebilir fakat sayıca azdır, anormal mitoz tipleri nadirdir. CIN 2'de epitelin üst yarısı matürasyonunu korur ama çekirdek atipisi hem üst, hem de alt epitelyum tabakalarında yaygın şekilde görülür. Bazal 2/3'lük kısımda mitozlar izlenir ve bazıları anormal tiptedir. CIN 3'te yüzey keratinizasyonu dahil matürasyon belirtileri tamamen kaybolmuş olabilir ya da sadece epitelin üst 1/3'lük kısmıyla sınırlıdır. Epitelin tüm katlarında yaygın ve belirgin çekirdek anomalileri göze çarpar. Mitoz sayıca artmıştır, anormal mitozlara sıkça rastlanır ve epitelin tüm katlarında gözlenebilir (3). Böylesine önemli ve sık karşılaşılan bir kanseri erken tanımak için çeşitli stratejiler oluşturulmuştur. Servikal smear örnekleme de bunlardan biridir.



Resim 2.1: Normal histopatolojik görünümün CIN ile Karşılaştırılması (13).

2.3. Pap Smear

Papanicolaou testi (Pap testi, Pap Smear, Servikal yayma), olası prekanseröz hücrelerin erken teşhis edilmesi amacıyla endoservikal kanaldan elde edilen hücrelerin lam üzerine yayılıp mikroskop altında incelenmesi işlemidir. İnceleme sonucunda elde edilen alışılmadık bulgular daha duyarlı tanısal işlemlerle takip altına alınmaktadır. Test, mucidi Dr. Georgios Papanikolaou'ya ithafen "Pap smear" olarak adlandırılmaktadır. Pap semar taramasında genel yaklaşım smear tekrarının yıllık olarak yapılmasıdır ve bizim de dahil olduğumuz pek çok merkez bu yaklaşımı benimsemiştir. Ancak yakın zamanda yayınlanmış bir kılavuzda serviks kanseri taramasının sıklığı ve yapılış yöntemi hakkında yeni öneriler sunulmuştur. Bu kılavuza göre;

- 21 – 29 yaş arası kadınlar Pap smear testiyle takip edildiğinde test sonucu negatif geldiği sürece testin 3 yılda bir tekrarlanması;
- 30 – 65 yaş arasındaki kadınlarda Pap smear testinin ve HPV – DNA testinin birlikte uygulanması;
 - Her iki test de negatif olduğu sürece bu hastaların 5 yılda bir taranması;
 - Bu yaş grubundaki kadınlar sadece Pap smear testi ile takip edildiklerinde ise sonuç negatif olduğu sürece Pap smear testinin 3 yılda bir tekrarlanması

önerilmektedir (14). Pap smear testinin kullanımının yaygınlaşmasıyla birlikte serviks kanserinde karşılaşılan yeni vaka sayısında ve mortalite oranında gözle görülür bir düşüş sağlanmıştır (15, 16).

Pap smear klasik yöntemle hazırlanabildiği gibi, sıvı bazlı yöntemle de hazırlanabilmektedir. Sıvı bazlı sitoloji yönteminde serviksten alına sürüntü örneği doğrudan lama yayılıp fiske edilmek yerine içinde fiksatif bir solüsyon bulunan bir sıvı ortama aktarılmakta ve laboratuara ulaştırılmaktadır. İki yöntemin uzun dönem sonuçları karşılaştırıldığında birbirlerine duyarlılık ve özgüllük bakımından belirgin bir avantajları bulunmamaktadır (17). Yalnız, klasik Pap smardan farklı olarak sıvı bazlı hazırlanan sitolojik örnekte HPV – DNA ve immünohistokimya çalışmaları yapılabilmektedir. Ayrıca, LSIL tanısı konulmasında sıvı bazlı sitolojinin duyarlılığı klasik yönteme göre anlamlı şekilde daha yüksektir (17). İster klasik yöntemle hazırlansın, ister sıvı bazlı yöntemle hazırlansın, Pap smear sınıflamasında ve değerlendirilmesinde en çok kabul gören sistem Bethesda sistemidir.

2.3.1. Pap Smearın Değerlendirilmesi ve Bethesda Sistemi

Servikal ve vajinal sitolojik tanıların bildirilmesi için düzenli bir terminoloji oluşturmak ve tanısal raporları standart hale getirmek için sistematik bir yaklaşım geliştirilmesine ihtiyaç duyulmuştur. Bu amaçla hazırlanan Bethesda sistemi 1988 yılında ortaya çıkmış, 1991 yılında gözden geçirilmiştir. Son hali ise 2001 yılında hazırlanmıştır ve günümüzde hala kullanılmaktadır (5). Bethesda sistemi smear örneğinin değerlendirmeye uygunluğu hakkında da sınıflama içermektedir (Tablo 2.1). Buna göre skuamoz intraepitelyal lezyonlar (SIL) düşük dereceli skuamoz intraepitelyal lezyon (LSIL) ve yüksek dereceli skuamoz intraepitelyal lezyon (HSIL) olarak sınıflandırılmaktadır. Bethesda sisteminde LSIL CIN I'e, HSIL ise CIN II ve CIN III'e karşılık gelmektedir (8). Pap smear, en sık ve yaygın kullanılan

servikal tarama testidir ve invaziv serviks kanserinin insidans ve mortalitesinde dünya çapında görülen azalmanın başlıca sebebidir. Fakat Pap smear testi belirli dezavantajlar da içermektedir. Testin öznel nitelikte olması, yetişmiş eleman ve laboratuvar ihtiyacı, çoğu rutin uygulamada duyarlılığının düşük oluşu bunlardan başlıcalarıdır. Pap smearın rutin uygulamalarda CIN 2 ve üstü lezyonları tespit etmedeki duyarlılığı %47-62 arasında değişirken özgüllüğü %60-95 arasında bildirilmiştir. Gelişmekte olan ülkelerde Pap testinin duyarlılığı %31-78, özgüllüğü %91-96 aralığında bildirilmiştir (2).

Tablo 2.1: Servikal Sitolojik Tanıların Bildiriminde 2001 Bethesda Sistemi (5)

ÖRNEK YETERLİLİĞİ

Değerlendirme İçin Yeterli

Endoservikal veya transformasyon zonunun varlığı veya yokluğu ya da kısmi kan veya inflamasyon varlığı gibi kalite belirteçleri

Değerlendirme İçin Yetersiz (nedenini belirtin)

Örnek reddedildi veya işleme alınmadı (nedenini belirtin)

Örnek işleme alındı ve değerlendirildi fakat epitelyal anormalliklerin değerlendirilebilmesi için yeterli bulunmadı (nedenini belirtin)

GENEL SINIFLAMA (isteğe bağlı)

İntraepitelyal lezyon veya malignite yönünden negatif

Epitelyal hücre anomalisi

Diğer

DEĞERLENDİRME/SONUÇ

İntraepitelyal lezyon veya malignite yönünden negatif (NILM)

Organizmalar

Trichomonas vaginalis

Fungal organizmalar veya morfolojik olarak Candida ile uyumlu

Bakteriyel vaginozisi düşündüren flora değişimi

Actinomyces türleriyle uyumlu bakteriyel morfoloji

Herpes simplex ile uyumlu hücresel değişimler

Diğer non-neoplastik bulgular (raporlanması isteğe bağlı)

Aşağıdakilerden biriyle uyumlu reaktif hücresel değişimler:

İnflamasyon (tipik onarım dahil)

Radyasyon

Rahim içi araç

Posthisterektomi durumunda glandular hücreler

Atrofi

Epitelyal hücre anomalileri

Skuamoz hücre

Atipik skuamoz hücreler (ASC)

ASC, önemi bilinmeyen (ASC-US)

ASC, yüksek dereceli skuamoz intraepitelyal lezyon (HSIL) dışlanamıyor (ASC-H)

Düşük dereceli skuamoz intraepitelyal lezyon (LSIL)

Human papillomavirus, hafif displazi ve servikal intraepitelyal neoplazi (CIN) 1' i kapsar

Yüksek dereceli skuamoz intraepitelyal lezyon (HSIL)

Orta ve şiddetli displazi, karsinoma in situ, CIN 2 ve CIN 3'ü kapsar

Skuamoz hücreli karsinom

Tablo 2.1 (Devam)...

<p>Glandular Hücre Atipik glandular hücreler (AGC) Başka şekilde tanımlanmamış endoservikal, endometriyal veya glandular hücreleri belirtin Atipik glandular hücreler, neoplastiği destekleyen Endoservikal veya başka yerde tanımlanmamış olarak belirtin Endoservikal adenokarsinoma in situ (AIS) Adenokarsinom Diğer (liste tamamlanmamış) Endometriyal hücreler, 40 yaşında veya daha yaşlı bir kadında</p> <p>OTOMATİKLEŞTİRİLMİŞ DEĞERLENDİRME VE İKİNCİL TEST (Eğer uygulanmışsa ekleyin)</p> <p>EĞİTİCİ NOTLAR VE ÖNERİLER (isteğe bağlı)</p>

2.4. Atipik Skuamoz Hücreler

2.4.1. Atipik Skuamoz Hücre Tanımlaması

Atipik skuamoz hücre (ASC) yıllardır çeşitli fikir ayrılıklarına neden olan ve yeniden ele alınarak değişiklikler uygulanan bir sitolojik tanımlamadır. Bethesda sisteminde ASC 2001 yılında gözden geçirilmiş ve tanımlamasında düzenlemeye gidilmiştir. Bu son düzenlemeyle ASC başlığı altında atipik skuamoz hücre – önemi bilinmeyen (ASC-US) ve atipik skuamoz hücre – HSIL dışlanamıyor (ASC-H) şeklinde iki tanımlamaya yer verilmiştir. ASC tek bir biyolojik oluşumu ifade etmez. Bu sınıflama altında HPV enfeksiyonuna bağlı gözlenen değişimlerin yanı sıra inflamasyon, dejenerasyon gösteren atipi, havada kurutulmuş smear ve diğer

artefaktlar da yer alır. Bethesda sistemine göre ASC tanısı konulduğunda ASC-US veya ASC-H olarak raporlanmalıdır.

ASC tanımı, nicel veya nitel olarak tanımlayıcı bir değerlendirmeye olanak tanımayan fakat SIL düşündüren sitolojik değişiklikleri ifade etmektedir (5). Benign reaktif değişiklikleri düşündüren bulgular dikkatle değerlendirilmeli ve “İntraepitelyal lezyon veya malignite yönünden negatif” olarak sınıflanmalıdır. ASC değerlendirmesinde bulunabilmek için söz konusu hücrelerin aşağıdaki 3 temel özelliği taşıması şarttır:

- 1- Skuamoz diferansiyasyon
- 2- Nükleus/sitoplazma oranının artması
- 3- Minimal nükleer hiperkromazi, kromatin kümeleşmesi, irregülarite, bulanıklaşma veya multinükleasyon

ASC tanısı için anormal nükleusların bulunması şarttır, fakat HPV enfeksiyonunu düşündüren parakeratoz, koilositoz gibi sitoplazmik değişiklikler fark edildiğinde ASC veya SIL düşündüren hücrelerin varlığı daha da dikkatle araştırılmalıdır. Ayrıca değerlendirme yapılırken ASC kategorisinin tek tek hücreleri tanımlamak için değil, tüm bir örneği nitelemek için geliştirildiği unutulmamalıdır (18).

2.4.2. Atipik Skuamoz Hücre – Önemi Bilinmeyen

Atipik skuamoz hücre – önemi bilinmeyen (ASC-US) tanımı, 1988 yılında Bethesda sistemi tarafından ilk ortaya konulduğu andan itibaren patologlar, klinisyenler ve hastalar açısından sorunlu ve tartışmalı bir tanı olmaktan kurtulamamıştır. Amerika Birleşik Devletleri'nde her yıl 2 milyondan fazla kadına ASC-US tanısı konulmaktadır (19). ASC-US tanısının aslında LSIL'i düşündüren vakalar için kullanılması hedeflenmiş olsa da yapılan bir çalışmada %10-20 kadar vakada altta yatan CIN 2 veya CIN 3 bulunduğu bildirilmiştir (20). Farklı kaynaklarda daha düşük oranlar da bildirilmiştir (4). ASC-US 1988 yılında ilk ortaya çıkarıldığında özgün morfolojik tanımlamalar yapılmadığı için ve rutin uygulamada karşılaşılan zorlukları gidermek adına 1991 yılında revize edilmiş ve “ASC-US; reaktifi destekleyen” ve “ASC-US; neoplaziyi destekleyen” olmak üzere sınıflama önerilmişti. 1994 yılında ise tanısız ikilemleri ortadan kaldırmak adına bir atlas yayınlanmış ve geçici kılavuzlar önerilerek anormal sitoloji tanılarının düzenlenmesi hedeflenmişti. Bu atlasta ASC-US'un tanımı “nitelik veya nicelik olarak skuamoz intraepitelyal lezyon (SIL) tanısı konulmasına yeterli olmayan fakat reaktif değişikliklere ait olanlara göre daha belirgin olan hücresel anormallikler” şeklinde yapılmıştı (21). Burada dikkat çeken, ASC-US'un ne olduğunun değil ne olmadığına tanımlanmış olmasıydı. Gözlemciler arasındaki temel değişkenliğin kaynağı da bu tanıma uyabilecek atipik hücre çeşitliliğinin oldukça fazla olmasıydı. Düşük düzeyde anormallik gösteren smear örneklerinin en iyi şekilde yönetilmesini temin etmek amacıyla “Skuamoz İntraepitelyal Lezyon Triaj çalışması (ALTS)”

başlatıldı (22). Bethesda'ya göre ASC-US kriterleri aşağıda belirtilmiştir (Tablo 2.2; Resim 2.2 – 2.5).

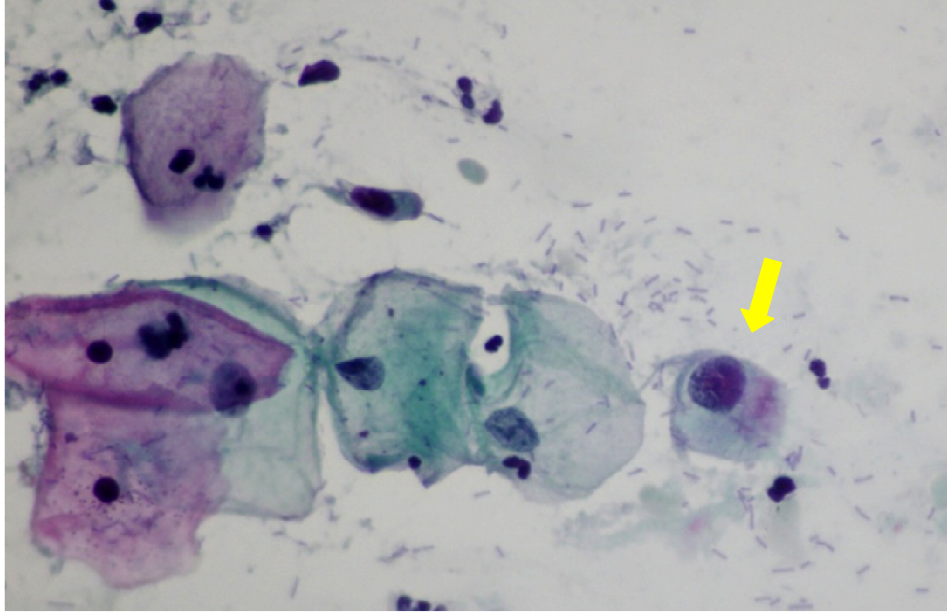
ASC-US tanımı gereği belirsizlik üzerine kurgulandığı için, gözlemciler arasında ve gözlemcinin kendi içinde aynı sonucun tekrar üretilebilme oranı beklenildiği gibi yüksek değildir. Bu handikapın incelemeyi yapan kişinin eğitim süresinden ve kişisel tecrübeden bağımsız olduğu çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir (23).

Tablo 2.2: Bethesda ASC-US Kriterleri (18).

1. Çekirdeklerin kapladığı alan normal intermediate skuamoz hücre çekirdeğine göre 2,5 – 3 kat daha fazla
2. Çekirdek/Sitoplazma alan oranı hafifçe artmış
3. Minimal nükleer hiperkromazi ve kromatin dağılımında veya çekirdek şeklinde düzensizlik
4. Dens oranjoofilik sitoplazma (“atipik parakeratoz”) ile ilişkili nükleer anormallikler

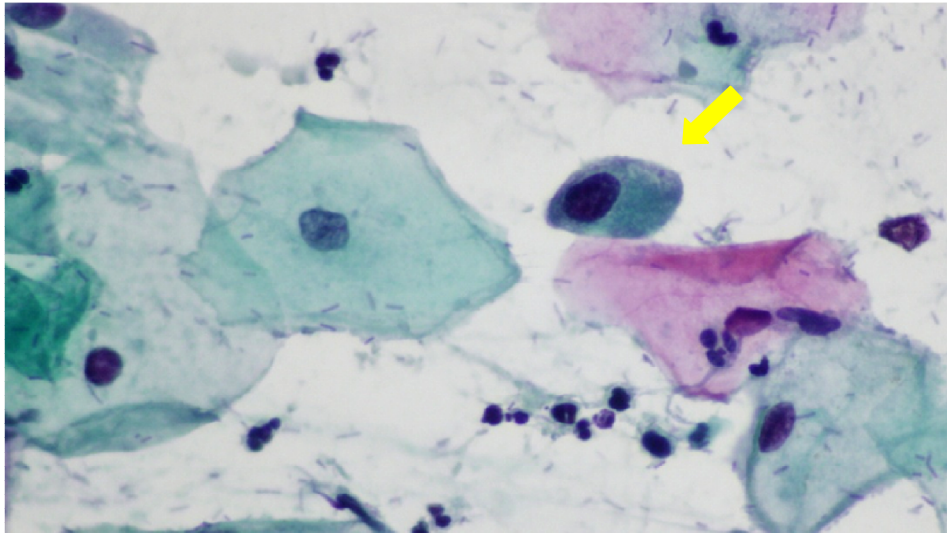
Dens oranjoofilik veya eozinofilik sitoplazmaya ve küçük piknotik çekirdeğe sahip küçük poligonal skuamoz hücreler (“parakeratoz”), eğer çekirdekleri normal görünümdeyse NILM olarak sınıflandırılmalıdır. Ancak, çekirdekleri genişlemiş, hiperkromatik hale gelmiş, sınırları düzensizleşmiş veya hücreler üç boyutlu kümelenme gösteriyor ise, anomalinin derecesine bağlı olarak ASC-US, ASC-H veya SIL tanıları da akla getirilmelidir (18). ASC-US tanısı konulan hastalardan elde edilen servikal biyopsi materyallerinde CIN 1 oranı %10-20, CIN 2 veya 3 oranıysa %3-5 olarak bildirilmiştir. Bu vakaların %0-2 kadarında ise altta yatan nedenin

invaziv kanser olduğu bildirilmiştir (4). Aşağıda ASC-US tanı kriterlerine ait örnek resimler verilmiştir. Bu resimler çalışma vakalarımıza aittir (Resim 2.2 – 2.5).



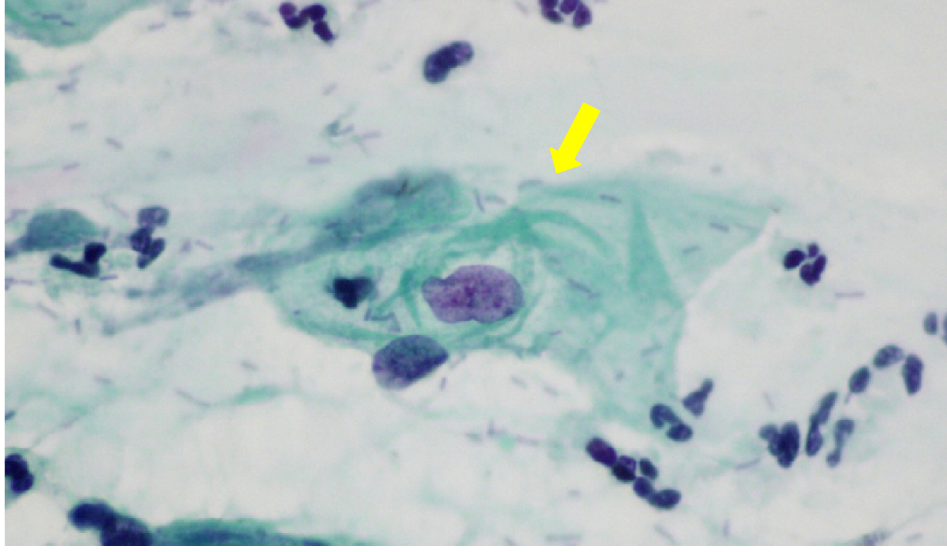
Resim 2.2: Bethesda Tanı Kriterleri – 1.

Artmış ekirdek alanına sahip bir hücre görülmektedir (x600 büyütme).



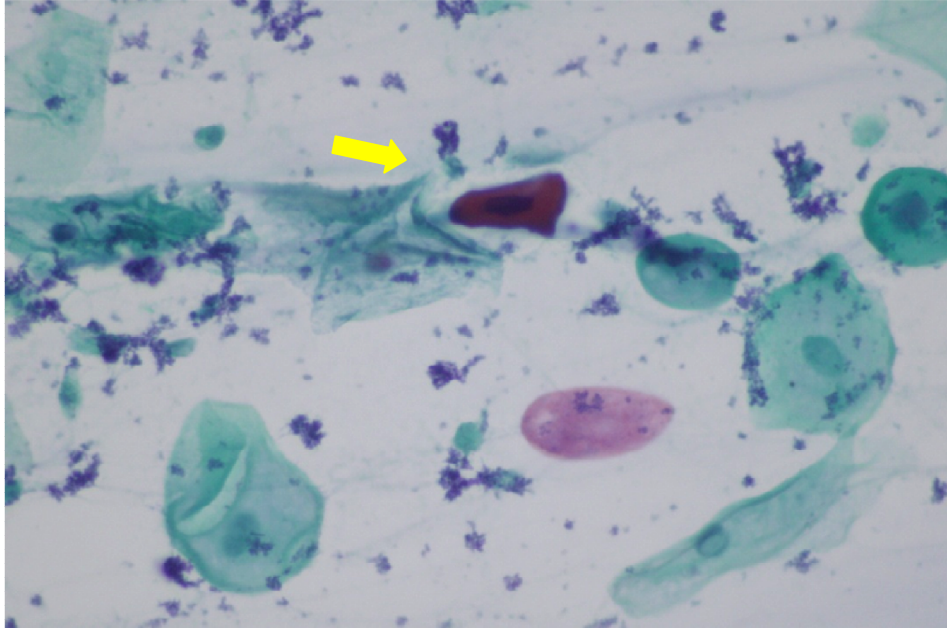
Resim 2.3: Bethesda Tanı Kriterleri – 2.

Artmış ekirdek/sitoplazma oranına sahip bir hücre görülmektedir (x600 büyütme).



Resim 2.4: Bethesda Tanı Kriterleri – 3.

Minimal hiperkromazi ve çekirdek düzensizliği izlenmektedir (x600 büyütme).



Resim 2.5: Bethesda Tanı Kriterleri – 4.

Oranjofili izlenmektedir (x600 büyütme).

2.5. Human Papilloma Virüsü

Human Papilloma Virüsü (HPV), *papillamoviridae* ailesinde yer alan ikozahedral kapsülü içinde çift sarmallı dairesel DNA yapısına sahip zarfsız bir virüstür. HPV DNA'sı 8000 baz çiftinden meydana gelmekte, viral proteinleri kodlayan 8 açık zincir dizininden (AZD) ve düzenleyici elemanlar içeren kodlanmayan bölgelerden oluşmaktadır. AZD elemanları enfeksiyon sırasındaki ekspresyon sıralarına göre erken (E) ya da geç (L) olarak sınıflandırılırlar (24). L1 ve L2 AZD, hücre zarındaki reseptörlerle etkileşime girerek viral DNA'nın hücre içine alınmasını sağlayan proteinleri kodlarlar. Ayrıca majör ve minör kapsid proteinleri de L1 ve L2 AZD'lerinde kodlanmıştır. Viral genomda kodlanan diğer proteinler DNA replikasyonu ve onkogenlerle ilgili proteinlerdir. E1, E2, E4, E5, E6 ve E7 AZD'lerinde kodlanan proteinler DNA replikasyonu, transkripsiyon ve hücrel dönüşümün düzenlenmesiyle ilgili işlevlere sahiplerdir.

HPV E1 AZD viral genomun idamesini ve replikasyonun kontrolünü sağlayan proteinleri kodlar. E2 AZD transkripsiyonu düzenleyen temel proteinleri kodlar. E4 AZD'de kodlanan proteinlerin işlevleri tam olarak aydınlatılamamıştır fakat sitokeratin ağının bozulması ve enfekte hücrelerin karakteristik koilositik görünümün ortaya çıkmasıyla ilişkili olduğu bilinmektedir. E5 proteini membranla ilişkili hidrofobik bir moleküldür ve epidermal büyüme faktörü reseptörlerine etki ederek hücre büyümesini uyardığı düşünülmektedir. Ayrıca p21 tümör baskılayıcı genini de inhibe ederek hücre siklusu kontrolünü etkilemektedir. HPV'nin ana onkogen proteinleri E6 ve E7 proteinleridir. Bu proteinler siklus kontrol mekanizmalarını

bozarlar, DNA sentezini yeniden başlatırlar ve replikasyon proteinlerini aktive ederler (24).



Resim 2.6: HPV'nin 3 Boyutlu Modellemesi (25).

HPV, L1 genindeki DNA sekansına göre sınıflandırıldığında 100'den fazla farklı genotipe sahiptir. Bunların en az 30 tipi de genital bölge mukozasını enfekte etmeye yatkındır. HPV sadece stratifiye epitel dokusunun bazal hücrelerini enfekte edebilir. HPV'nin bazal hücrelere ulaşması için mukozada travma gibi altta yatan bir sorun bulunmalıdır (26). HPV, CIN vakalarının büyük kısmından sorumlu olan ajandır. CIN vakalarının %90-100 oranında HPV enfeksiyonu zemininde geliştiği

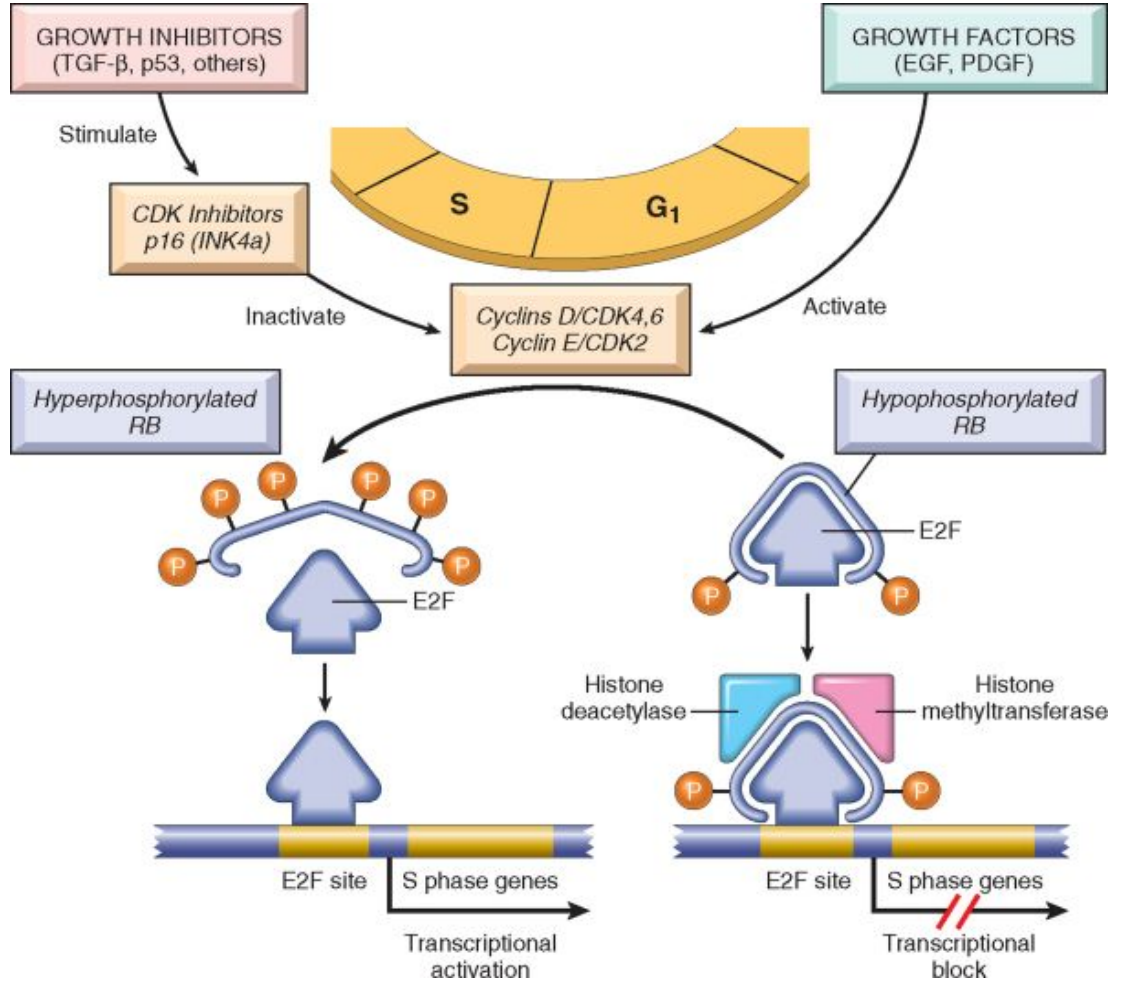
bildirilmiştir (27-29). HPV tüm serviks kanserlerinin %99,7'sinde tespit edilmiştir. Bunun yanında eski dönemlerde HPV negatif olarak sınıflandırılan serviks kanserleri günümüzde daha duyarlı tanı yöntemleriyle yeni keşfedilen HPV tipleriyle birlikte yeniden test edildiğinde, bu vakaların da aslında HPV pozitif olduğu görüşmüştür (28).

2.6. p16^{INK4A}

Siklin bağımlı kinaz inhibitörü 2A, çoklu tümör baskılayıcı – 1 gibi isimlere de sahip olan p16, insanlarda 9. kromozomda bulunan CDKN2A geninde kodlanmış olan bir tümör baskılayıcı proteindir. Etkisini hücrelerin G1 fazından S fazına geçişini yavaşlatarak gösterir. p16 CDK4, CDK6 gibi siklin bağımlı kinazların inhibitörüdür, p16^{Ink4A} ismi de molekül ağırlığı ve inhibe ettiği CDK4'ten gelmektedir (30).

Normal bir hücre döngüsünde G1 fazından S fazına geçiş Şekil 2.2'de gösterilmiştir (31). Bu aşamada G1'den S'e geçişte E2F ve TFDP gen ailesinin ürünleri olan transkripsiyon faktörleri görev almaktadır. Retinoblastoma proteini (pRb) bu faktörlerin oluşturduğu heterodimer yapıdaki E2F-DP transkripsiyon proteini kompleksine defosforile haldeyken bağlanarak işlev görmesini engellemekte ve hücrenin G1'den S'e geçişini durdurmaktadır. Siklin bağımlı kinazlar pRb'yi fosforile ederek deaktif etmekte ve E2F-DP kompleksinin inhibisyonunu engelleyerek hücre siklusunun ilerlemesini sağlamaktadır. p16 proteini bu kinazlardan CDK 4 ve CDK6'yı inhibe etmektedir. HPV E7 proteini pRb proteinini fosforilleyerek deaktif eder ve E2F-DP kompleksi üzerindeki kontrol ortadan

kalkar, hücre kontrolsüz bölünmeye ilerler. p16 ekspresyonu normalde pRb'nin negatif geri bildirimle kontrol edilir, dolayısıyla pRb'nin işlevini kaybetmesi p16'nın ekspresyonunu aşırı derecede artırır. Fakat E7 proteinine bağlı gerçekleşen E2F-DP aktivitesi CDK4/6'dan bağımsız olduğu için artmış p16 herhangi bir etkinlik gösteremez. Bu anormal durum fizyolojik koşullarda apoptotik kontrol süreciyle dengelenebilir, fakat bir başka HPV proteini olan E6 da p53 kaybına neden olur ve apoptozisin indüksiyonu önlenir. Zaman içinde HPV ile enfekte olmuş ve hücre döngüsü kontrolünü yitirmiş hücrelerin sitoplazmalarında ve çekirdeklerinde birikir (32, 33). Bu nedenlerden ötürü p16 duyarlı ve özgül bir neoplastik transformasyon belirteci olarak kullanılmaktadır.



Şekil 2.2: p16'nın Hücre Döngüsüne Etkisi (31).

Yapılan çeşitli araştırmalarda CIN 2 ve üstü lezyonlarda p16'nın %81-95 duyarlılık oranına ve %96-100 özgüllük oranına sahip olduğu bildirilmiştir. Bunun yanında, p16 yine CIN 2 ve üstü lezyonlarda %20-30 arası pozitif prediktif değere sahipken %99,7-100 negatif prediktif değere sahiptir (34, 35). HPV serviksin adenokarsinomunda da önemli etiyolojik etkenlerden biridir. p16'nın skuamoz hücre lezyonlarının yanı sıra, servikal adenokarsinomlarda da benzer tanısal oranlara sahip olduğu gösterilmiştir ve bu durum da HPV varlığıyla ilişkilendirilmiştir (36).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Popülasyon Seçimi

Bu araştırma için Ufuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan gerekli izinler alındı. Araştırma kapsamında Ufuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda 2006-2013 yılları arasında servikal smear incelemesi yapılmış olan tüm hastalar geriye dönük olarak tarandı ve ASC-US tanısı konulan hastalardan servikal histopatolojik incelemesi yapılmış olanların çalışmaya dahil edilmesi kararlaştırıldı.

ASC-US tanısı konulmuş ve histopatolojik inceleme yapılmış vakalara ait tüm Pap smear örnekleri tekrar değerlendirmeye alındı. Her smearın 2001 Bethesda ASC-US tanı kriterlerinden hangilerini karşıladığı ayrı ayrı belirlendi. Bu vakaların biyopsi materyallerine ait histopatoloji raporları incelenerek tanılarına göre gruplandırıldı.

3.2. p16 Boyaması

p16 immünohistokimyasal boyaması için Becton Dickinson Pharmingen™ purified Mouse anti-human p16 (BD and Co., New Jersey, ABD) G175-405 klonu kullanıldı. Boyama işlemi Ventana BenchMark XT (Ventana Medical Systems, Inc., Arizona, ABD) cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Doku 4 mikron kalınlığında kesildi. Hazırlanan kesitler deparafinizasyon için 60 °C'de 45 dakika etüvde bekletildi. Preparatlar Ventana BenchMark XT cihazına yerleştirilerek cihaz üzerinde de

yeniden otomatik deparafinizasyon gerçekleştirildi. Preparatlar “cell conditioning” işlemine tabi tutuldu. Bunun için sırasıyla kısa ayarda 8 dakika, orta ayarda 30 dakika ve standart ayarda 60 dakika işlem uygulandı. Önceden 1:20 oranında titre edilerek hazırlanmış olan p16 boyası kesitlere damlatıldı. Primer antikor inkübasyonu süresi 1 saat olarak ayarlandı. Sonra sırasıyla “counter stain” (hematoksilen – 8 dakika) ve “post-counter stain” (bluing reagent – 4 dakika) işlemleri uygulanarak boyama işlemi tamamlandı. Hazırlanan preparatlar mikroskop altında incelenerek %25 ve üzeri diffüz boyanma pozitif olarak kabul edildi (37).

3.3. İstatistiksel Değerlendirme

Elde edilen veriler “SPSS 11.5 for Windows” yazılımıyla değerlendirildi (SPSS Inc., Chicago, U.S.A.). Sitolojik incelemede Bethesda ASC-US tanı kriterlerinin pozitiflik oranının CIN pozitif vakalardaki frekans dağılımını incelemek ve p16 boyanma oranını değerlendirmek için ki-kare testi ve Yate’s süreklilik düzeltmesi kullanıldı. $P < 0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Ufuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'nda 2006 – 2013 yılları arasında Pap smear incelemesi sonrasında ASC-US tanısı konulmuş ve sonrasında servikal histopatolojik inceleme gerçekleştirilmiş toplam 33 hastanın tıbbi kayıtlarına ulaşıldı. Hastaların yaş ortalaması 38 ± 11 'di. 33 hastanın 13'ünün histopatolojik tanısı CIN olarak bulundu (%39). Bu hastalardan 11'i CIN 1, 2'si ise fokal CIN 2 odakları taşıyan CIN 1 olarak raporlanmıştı. Histopatolojik değerlendirme sonucunda CIN tanısı konulmuş hastalarla malignite yönünden negatif olarak raporlanmış hastaların yaşları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlemlenmedi ($37\pm 12 - 39\pm 10, P>0,05$).

Bethesda ASC-US tanı kriterlerinin (Tablo 2.2), CIN tanısı konulan ya da malignite yönünden negatif olarak raporlanan biyopsi sonuçlarına göre dağılımları aşağıda gösterilmiştir (Tablo 3.1). Çalışmamızda Bethesda ASC-US tanı kriterlerinin sitolojik dağılımının histopatolojik tanıyla bir ilişkisi olup olmadığı incelendi. Bunun için 4 tanı kriterinden her birinin, malignite yönünden negatif olarak raporlanmış vakalarda ve CIN vakalarında görülme sıklıkları düzeltilmiş ki-kare testiyle değerlendirildi. Bethesda'nın 4 tanı kriterinden hiçbiri için, CIN 1 ve malignite yönünden negatif vakalarda görülme sıklıkları bakımından anlamlı bir farklılığa rastlanamadı ($P>0,05$). Tanı kriterlerinin histopatolojik incelemelerinde CIN tanısı konulan ya da malignite yönünden negatif olarak değerlendirilen vakaların Pap smear preparatlarında pozitif ya da negatif olması açısından tek tek ele alındığında da anlamlı bir farklılık gözlenmedi (Tablo 3.2 – 3.5). Ayrıca her bir örnekte ortalama kaç

kriterin bir arada pozitif olduğu da incelendi (Tablo 3.6). Malignite yönünden negatif olarak raporlanmış örneklerin Pap smearlarında ortalama $2,5\pm 1,0$ kriter pozitifken CIN olarak raporlanmış vakalarda bu değer $2,9\pm 0,8$ olarak bulundu. CIN vakalarında ASC-US tanı kriterlerinin pozitif olma eğilimi daha fazla gibi görünse de iki ortalama kıyaslandığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı görüldü ($P>0,05$). Tüm ASC-US vakalarında örnek başına pozitif tanı kriteri sayısı ortalaması ise $2,7\pm 0,9$ olarak bulundu.

Tablo 3.1. Bethesda ASC-US Tanı Kriterlerinin Pozitiflik Oranlarının Dağılımları

	Histopatolojik Tanı		TOPLAM
	CIN 1	Malignite Açısından Negatif	
Kriter 1	13	18	31
Kriter 2	11	15	26
Kriter 3	10	14	24
Kriter 4	4	4	8

Tablo 3.2. Bethesda ASC-US Tanı Kriterlerinin Histopatolojik Taniya Göre Dağılımları (1. Madde)

Tanı Kriteri: Çekirdeklerin kapladığı alan normal intermediate skuamoz hücre çekirdeğine göre 2,5 – 3 kat daha fazla			
	Histopatolojik Tanı		TOPLAM
	CIN 1	Malignite Açısından Negatif	
Pozitif	13	18	31
Negatif	0	2	2
TOPLAM	13	20	33

Tablo 3.3. Bethesda ASC-US Tanı Kriterlerinin Histopatolojik Taniya Göre Dağılımları (2. Madde)

Tanı Kriteri: Çekirdek/Sitoplazma alan oranı hafifçe artmış			
	Histopatolojik Tanı		TOPLAM
	CIN 1	Malignite Açısından Negatif	
Pozitif	11	15	26
Negatif	2	5	7
TOPLAM	13	20	33

Tablo 3.4. Bethesda ASC-US Tanı Kriterlerinin Histopatolojik Tanıya Göre Dağılımları (3. Madde)

Tanı Kriteri: Minimal nükleer hiperkromazi ve kromatin dağılımında veya çekirdek şeklinde düzensizlik			
	Histopatolojik Tanı		TOPLAM
	CIN 1	Malignite Açısından Negatif	
Pozitif	10	14	24
Negatif	3	6	9
TOPLAM	13	20	33

Tablo 3.5. Bethesda ASC-US Tanı Kriterlerinin Histopatolojik Tanıya Göre Dağılımları (4. Madde)

Tanı Kriteri: Dens oranjofilik sitoplazma (“atipik parakeratoz”) ile ilişkili nükleer anormallikler			
	Histopatolojik Tanı		TOPLAM
	CIN 1	Malignite Açısından Negatif	
Pozitif	4	4	8
Negatif	9	16	25
TOPLAM	13	20	33

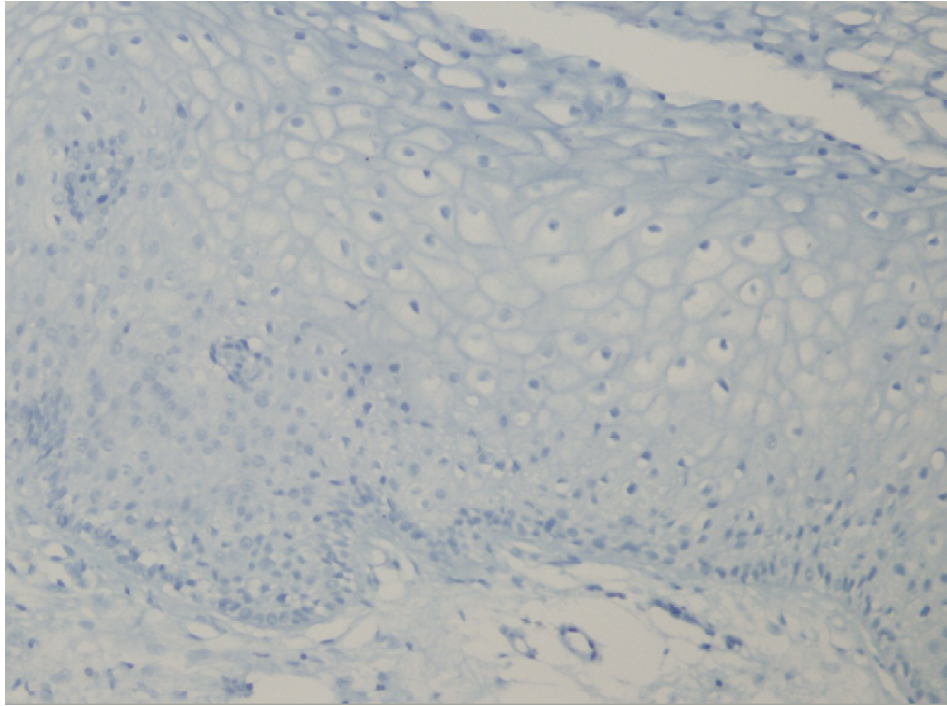
Tablo 3.6. ASC-US Tanı Kriterlerinin Örnek Başına Ortalama Pozitiflik Oranları

	Histopatolojik Tanı		TOPLAM
	CIN 1	Malignite Açısından Negatif	
Pozitif Kriter Sayısı (Ortalama ±SS)	2,9±0,8	2,5±1,0	2,7±0,9

Biyopsi materyallerinin parafin bloklarından hazırlanan preparatlarda gerçekleştirilen p16 immünohistokimya boyamalarının sonuçları Tablo 3.7’de gösterilmiştir. ASC-US tanısı konulmuş ve histopatolojik olarak malignite yönünden negatif olan vakaların hiçbirinde p16 boyaması pozitif değildi. Bunun yanında, CIN 1 ve CIN 1+CIN 2 olarak raporlanmış 13 vakadan 6’sında (%46) diffüz p16 pozitifliği gözlemlendi. Buna ek olarak 4 vakada da %25’in altında fokal boyanma odaklarına rastlandı. 3 vakada ise p16 negatifti. (Resim 3.1 – 3.3) Tüm vakalar birlikte değerlendirildiğinde ASC-US tanısı konulan vakaların histopatolojik örneklerinde p16 boyanma oranı %18 olarak bulundu.

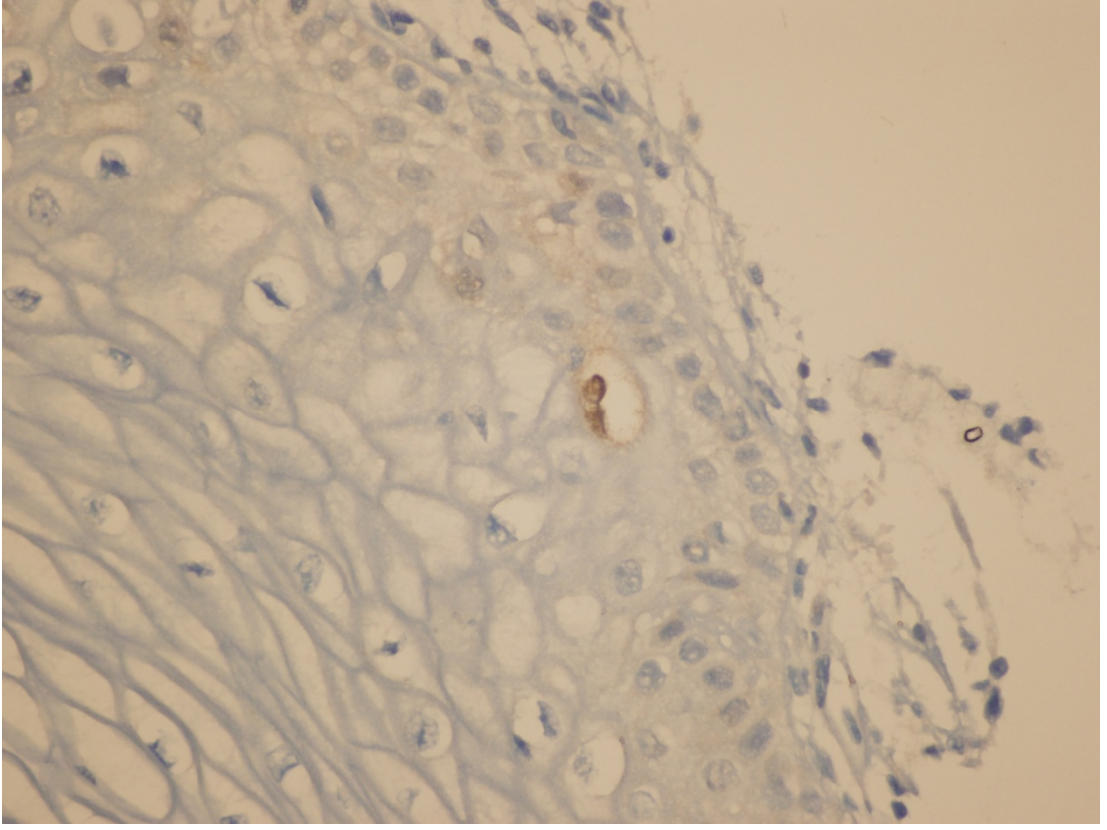
Tablo 3.7. p16 Boyanma Oranının Histopatolojik Tanıya Göre Dağılımı

Tanı Kriteri: p16 boyanma			
	Histopatolojik Tanı		TOPLAM
	CIN 1	Malignite Açısından Negatif	
Pozitif	6	0	6
Negatif	7	20	27
TOPLAM	13	20	33



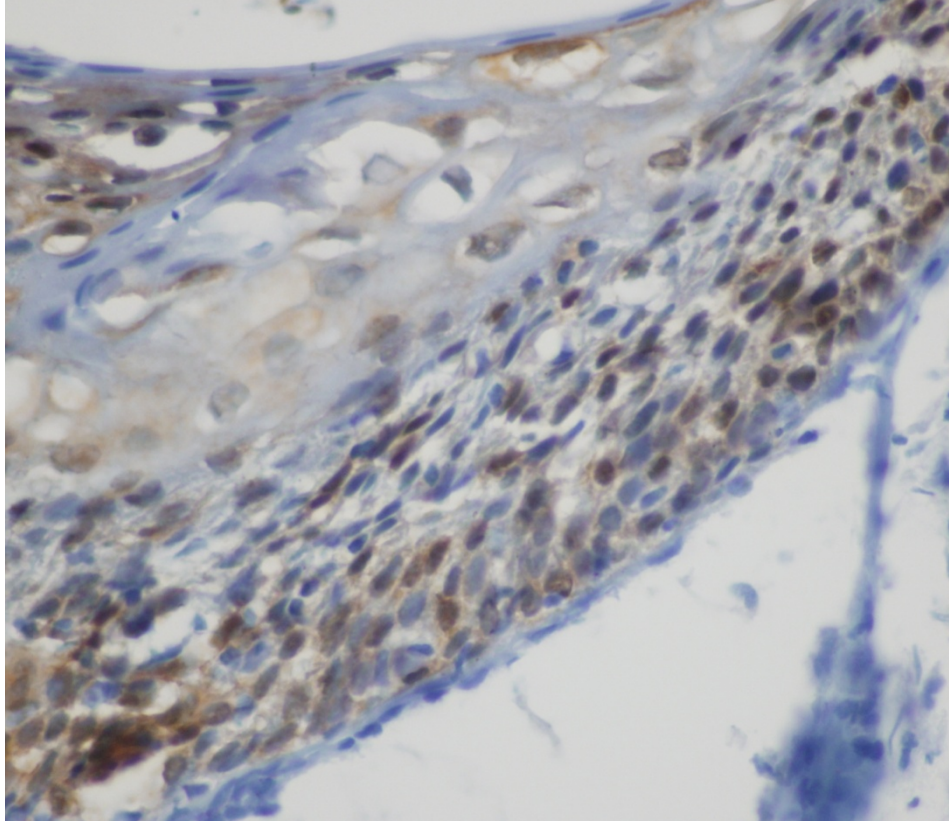
Resim 3.1: p16 Negatif Boyanma.

Negatif olan vakalarımızdan biri (x200 büyütme).



Resim 3.2: p16 Negatif Boyanma.

Nükleer ve sitoplazmik boyanma gösteren fakat boyanma oranı %25'in altında olduğu için ve fokal boyanma özelliği gösterdiği için negatif kabul edilen bir vakamız (x600 büyütme).



Resim 3.3: p16 Pozitif Boyanma.

Diffüz boyanma paternine sahip, p16 pozitif vakalarımızdan biri (x600 büyütme).

ASC-US tanısı konulmuş Pap smear örneklerinin Bethesda tanı kriterlerinin hangilerini karşıladığını değerlendirmek adına 33 örnek yeniden incelendi. İkinci değerlendirme sonucunda 2 ASC-US tanısı NILM olarak belirlendi. Bu vakaların histopatolojik tanıların malignite yönünden negatif olarak raporlanmış olduğu görüldü. Bunun yanında 2 ASC-US vakası da yeniden değerlendirme sonucunda LSIL olarak değerlendirildi. Bu hastaların histopatolojik incelemeleri de malignite yönünden negatif olarak değerlendirilmişti. 33 vakadan 29'unun ASC-US tanısında bir değişikliğe gidilmemiş oldu. Bu şekilde, Ufuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi

Patoloji Anabilim Dalı'nda Pap smear sonucu ASC-US olarak bildirilen raporların tekrar üretilebilirlik oranı %88 olarak bulundu.

Çalışmamızda p16 immünohistokimyasal boyamanın sitolojik olarak ASC-US tanısı konulmuş vakaların biyopsi incelemelerinde CIN tanısı koymada duyarlılığı %46, özgüllüğü ise %100 olarak hesaplandı. Testin pozitif prediktif değeri, yani test pozitif sonuçlandığında kişinin gerçekten o hastalığı taşıma olasılığı %100 olarak bulundu. Buna karşın testin negatif prediktif değeri yani test negatif olduğunda kişinin gerçekten o hastalığı taşımama oranı %74 olarak hesaplandı.

5. TARTIŞMA

Pap smear, servikal kökenli neoplazilerin taranmasında günümüzde hala en önde gelen laboratuvar testidir. Pap testinin rutin uygulamaya girmesinden sonra çoğu ülkede serviks kanserinin insidansında ve serviks kanserine bağlı mortalite oranlarında oldukça belirgin bir düşüş meydana gelmiştir (2, 38). Buna rağmen Pap smear, sitolojinin en tartışmalı konularından biridir. Fikir ayrılıklarının sebepleri arasında testin değerlendiren kişiler arası değişkenliğin yüksek oluşu ve yüksek yanlış negatiflik ve pozitiflik oranları öne çıkmaktadır. Literatürde bildirilen yanlış negatiflik oranları %20-30 civarındadır. Buna karşın, yanlış pozitiflik oranının %70'leri bulduğu araştırmalar mevcuttur (39). Değerlendiriciler arası farklılık oranları hakkında bildirilen oranlar genelde %50 dolaylarındadır (40). Çalışmamızda ASC-US tanısı konulmuş vakaların tekrar üretilebilirlik oranı %88 olarak bulunmuştur. Literatüre göre bu oranın hayli yüksek olduğu görülmektedir. Bizce bunun başlıca nedeni bölümümüzün klinikle korelasyonunun üst düzeyde olmasıdır. ASC-US tanısı konulmuş hastalarda patolojide reaktif değişiklikler ile SIL ayırıcı tanısını yapamadığını belirtmek istemektedir. Bu hastaların klinik takibe alınmalarını sağlamak için de benign bir tanı yerine ASC-US tanısını koymayı tercih etmektedir. Bölümümüzde servikal sitolojik raporlama aşamasında şüpheye düşüldüğünde Pap smear örneği için tanısal bir rapor hazırlanmayıp inflamatuvar süreç sona erdikten sonra smear tekrarı ile yeniden değerlendirilmesi istenmektedir. (Bu yaklaşım 1988 yılında ilk duyurulan Bethesda Sistemi'nde "ASC-US; reaktif düşündürücü" tanısı olarak yer almıştır fakat 2001 yılındaki güncellemeyle ASC-US başlığı altına dahil edilmiştir). Böylece Fakültemizin Kadın Hastalıkları ve Doğum

Anabilim Dalı'yla klinikopatolojik iletişim sürekliliği sağlanarak bu hastaların takibi ve tedavi sonrasında yeni bir Pap smear ile değerlendirilmesi sağlanmaktadır. Bu şekilde reperatif değişikliklerin neden olduğu hatalı pozitif ASC-US tanıları elimine edilmekte ve geriye gerçek şüpheli vakalar kalmaktadır. Böylece yanlış pozitif ASC-US tanı oranının azaldığı ve reaktif değişikliklerin hatalı olarak ASC-US şeklinde raporlanmasının önüne geçildiği düşünülmektedir.

Tekrarlanabilirlik oranımızı belirlemek amacıyla ASC-US olarak raporlanmış 33 vaka yeniden değerlendirildi. Bunlardan 4'ünde tanı değişikliğine gidildi. İki vakanın aslında sitopatolojik olarak LSIL ile daha uyumlu olduğu, iki vakanın da NILM olarak raporlanmış olması gerektiği düşünüldü. Bu 4 vakanın histopatolojik inceleme sonuçlarından hiçbiri CIN ile uyumlu değildi. Biyopsi sonuçlarına göre Pap smearın tekrar değerlendirilmesi ve tanının gözden geçirilmesinin, smearda uzun vadede başarı oranını arttıracakı düşünülmektedir.

Çalışmamızda ASC-US tanısı konulmuş hastaların histopatolojik incelemeleri sonucunda CIN çıkma oranının belirlenmesi hedeflenmiştir. Ufuk Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde 2006 – 2013 yılları arasında ASC-US tanısı konulmuş ve servikal histopatolojik incelemesi yapılmış hastalar değerlendirmeye alındı. Bu kapsamda servikal histopatolojik incelemesi yapılmış 33 ASC-US vakasının 13'ünde biyopsi sonucunda neoplaziyle uyumlu bulgulara (CIN) rastlanmıştır. Geriye kalan 20 vaka ise malignite yönünden negatif bulunmuştur. Bu vakaların oranıysa %61 kadardır. Hastaların histopatolojik incelemeleri sonrasında konulan tanıları kronik servisit, inflamasyona bağlı reaktif değişiklikler, atrofik değişiklikler, aktif kronik servisit,

spesifik patoloji içermeyen çok katlı yassı epitel fragmanları, çok katlı yassı epitel metaplazisi şeklindedir. Bu sayılan non-neoplastik tanılarda gözlenen değişikliklerin ASC-US tanısı konulmasına neden olabilecek paternleri taşıdığı bilinmektedir. Bu değişiklikler neoplastik değişiklikler taşıyan vakaların yakalanma oranını azaltmaktadır. Ayrıca biyopsinin alındığı bölgenin lezyonu temsil etmeyebileceği, bu nedenle hatalı negatif sonuç verilebileceği de akılda tutulmalıdır. ASC-US tanısı konulmuş tüm hastalar, servikal biyopsi sonuçları malignite açısından negatif olsa bile smear takibinde kalmalıdır. Çalışmamızda ASC-US tanısının neoplastik değişiklikleri yakalama anlamında başarı oranı %39 (13/33 vaka) olarak bulunmuştur. Bu yüzde değeri aynı zamanda ASC-US tanısının pozitif prediktif değeridir. Özet olarak, tarafımızca ASC-US tanısı konulan her 100 hastanın 39'unda gerçekten altta yatan bir neoplastik değişiklik bulunduğu, geriye kalan 61 hastanın ise malignite açısından negatif olduğu anlamı çıkarılmaktadır. Bu oranın literatürle de uyumlu olduğu görülmüştür (39).

Bethesda 2001 yılında güncellendiğinde ASC tanısı iki alt tanıya ayrılmış ve atipik skuamöz hücrelerin ya ASC-US ya da ASC-H olarak raporlanması gerektiği belirtilmiştir (5). Ayrıca ASC-US tanısının kişiden kişiye değişkenliğini azaltmak ve sitolojik tanımlamalara bir standardizasyon kazandırmak hedefiyle 4 maddeden oluşan bir tanı kriteri listesi oluşturulmuştur (Tablo 2.2) (18). Çalışmamızda Bethesda'da ASC-US tanı kriterlerinin sitolojide bulunma oranının histopatolojik tanıyla bir ilişkisi olup olmadığı incelendi. Çalışmamızda Bethesda ASC-US tanı kriterlerinden hiçbirinin, histopatolojik tanıyı öngörme açısından istatistiksel olarak diğer kriterlerden farklı olmadığı bulundu. Her bir tanı kriterine göre smear örnekleri

ve histopatolojik tanıları eşleştirilerek incelendi. Hiçbir tanı kriterinin CIN tanısı koyma veya CIN tanısını ekarte etme anlamında tek başına tanısal olmadığı dikkati çekmiştir. Örnek başına ortalama kaç kriterin pozitif bulunduğu ve bu oranın CIN ve malignite yönünden negatif vakalar arasında farklılık gösterip göstermediği de incelendi. Ancak ortalama pozitif kriter sayısı bakımından gruplar arasında anlamlı bir farklılık olmadığı görüldü. Tüm örneklerde ortalama pozitif kriter sayısının 2,7 oluşu da ASC-US tanısı koymak için Bethesda tanı kriterlerinin en az ikisinin, çoğunlukla da üçünün bir arada görülmesinin daha sağlıklı bir değerlendirmeye olanak sağlayacağını düşündürmüştür. Dolayısıyla, ASC-US tanısı konulurken tariflenen her 4 kriterin de Pap smear örneğinde varlığı ya da yokluğu ayrı ayrı araştırılmalıdır.

p16 proteini siklin bağımlı kinazların bir inhibitörüdür ve hücre siklusunun kontrolünde görev almaktadır (41). Bu proteinin ekspresyonunun servikal neoplazilerde siklin E ve Ki-67 gibi artmış olması, söz konusu hastalık için bir biyo belirteç olarak kullanılmasına olanak sağlamıştır (7). p16 varlığının immünohistokimyasal olarak gösterilmesi, hem sitolojik, hem de histolojik olarak servikal neoplazi tanısını kolaylaştırmaktadır (33). Yapılan bir çalışmada ASC-US tanısı konulmuş 66 vakanın %60'ında p16 pozitifliği saptanmıştır. Bunun %45'i zayıf/sporadik olarak, %55'i ise kuvvetli boyanma olarak bildirilmiştir. Aynı çalışmada p16 immünoaktivitesinin atipik hücreleri tespit etmedeki duyarlılığı %95, özgüllüğü ise %96 olarak bildirilmiştir (42). Yapılan bir meta analizde servikal sito-histopatolojide p16 boyamayla ilgili yapılmış çalışmalar ele alınmış ve bunların arasından 61'i değerlendirmeye uygun bulunarak incelenmiştir. Bu araştırmaların

büyük kısmında p16 pozitifliği için eşik değerin belirlenmesinde, bizim de çalışmamızda kıstas olarak kullandığımız Klaes ve ark.'ın (37) yaptığı çalışmanın referans alındığı belirtilmiştir. Genel olarak ASC-US smearlarında %45 oranında p16 pozitifliği bulunduğu bildirilmiştir. Sitolojik tanının ciddiyeti arttıkça p16 pozitiflik oranının da yükseldiği görülmüştür. LSIL vakalarının %45'i pozitifken HSIL vakalarında bu oranın %89 olduğu bildirilmiştir. Histolojik incelemelerde ise normal biyopsilerin sadece %2'sinde pozitiflik saptanırken CIN 1 vakalarının %38'inde, CIN 2 vakalarının %68'inde ve CIN 3 vakalarının %82'sinde p16'nın pozitif olarak bildirildiği görülmüştür (33). Biz de çalışmamızda ASC-US tanısı konulmuş olan 33 vakanın 6'sında diffüz boyanma, 4'ünde ise fokal boyanma tespit ettik. ASC-US tanısı konulan vakalarda p16 pozitiflik oranımız %18, CIN 1 vakalarında ise %46 olarak bulundu. Bu orana, fokal olarak boyanmış 4 vaka negatif kabul edildiğinden dahil edilmedi. Eğer bu vakalarda toplam orana eklenseydi, CIN vakalarında p16 boyanma oranı %77 olacaktı. Yine aynı şekilde ASC-US vakalarında p16 boyanma oranı da %30 olacaktı. CIN 1 vakalarının p16 boyanma yüzdeleri incelendiğinde, fokal boyanmayı pozitif vakalara dahil etmediğimiz oranın literatürle daha uyumlu olduğu görülmektedir. Bu da çalışmamızda pozitif boyanma için eşik değeri %25 olarak belirlemiş olmamızın doğru bir yaklaşım olduğunu ve güncel literatürle uyumunu göstermesi açısından önemlidir.

Sonuç olarak, anabilim dalımızca Pap smear incelemelerinde Bethesda sistemi kullanılarak ASC-US tanısı konulan vakalarımızın %39'unda altta yatan bir servikal intraepitelyal neoplazi bulunduğu saptanmıştır. ASC-US tanısı konulurken birden fazla Bethesda tanı kriterini bir arada kullanmanın daha akılcı bir yaklaşım olduğu

düşünülmüştür. Ayrıca, immünohistokimyasal p16 çalışmasının yalancı pozitiflik oranının oldukça düşük olduğu, bu sayede neoplazi potansiyeli taşıyan vakaların belirlenmesinin oldukça kolaylaştığı görülmüştür. İlerleyen yıllarda p16 boyanmasının sitopatolojiyle birlikte kullanılabilir önemli bir tanısal araç haline geleceği düşünülmektedir.

6. SONUÇLAR

- Ufuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nın ASC-US tanısı koyduğu vakalarda servikal intraepitelyal neoplazi bulunma olasılığı %40 dolaylarındadır.
- Bethesda ASC-US tanı kriterlerinden hiçbiri olası neoplastik değişiklikleri öngörmeye tek başına diğer kriterlerden üstün değildir.
- ASC-US tanısı konulurken Bethesda tanı kriterlerinin her birinin varlığı ayrı ayrı araştırılmalı ve en az 2, tercihen 3 kriterin pozitif olması tercih edilmelidir.
- p16 boyanması sitopatolojik incelemeyle birlikte neoplastik değişiklikleri taşıma riski daha yüksek olan hastaların tespitinde kullanılabilir.

ÖZET

Smearda ASC-US Tanısı Konulan Hastaların Biyopsilerinde Servikal İntraepitelyal Neoplazi Bulunma Oranının p16 ile Gösterilmesi

Serviks kanseri, gelişmiş ve gelişmekte olan ülkeler için önemli bir halk sağlığı sorunudur. Dünyada her yıl 528 bin yeni vaka görülmekte ve 266 bin kadın bu nedenle hayatını kaybetmektedir. Serviks kanserinin insidansında ve mortalite hızında oldukça belirgin bir düşüş meydana geldiği bildirilmektedir ve bu azalmanın başlıca sebebi olarak da Pap smear testinin yaygın bir şekilde tarama programı olarak kullanılması gösterilmektedir. Pap smear testinin standardizasyonu için çeşitli uğraşlar verilmiş ve Bethesda sistemi 2001 yılında güncellenerek son halini almıştır. Fakat bu sistemin problemleri tanılarından biri olan ASC-US patolojilerinin üzerinde en çok fikir ayrılığı yaşadığı tanımlar arasında yerini almıştır. ASC-US tanısının önemi, bu vakaların bir kısmının ileride invaziv serviks kanserine dönüşme riski olan öncü lezyonları da kapsayabiliyor oluşudur. Bizim çalışmamızın amacı Ufuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı olarak Bethesda sistemine göre ASC-US tanısı koyduğumuz hastaların histopatolojik sonuçlarında servikal intraepitelyal neoplazi çıkma oranını belirlemek, bu sayede Bethesda ASC-US tanı kriterlerinin güvenilirliğini test etmek ve CIN tanısı konulan vakaları p16 boyaması ile de teyit etmektir.

Bu amaçla Ufuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda 2006-2013 yılları arasında ASC-US tanısı konulup histopatolojik incelemeye tabi tutulmuş geriye

dönük olarak tarandı. Bu koşullara uyan toplam 33 vakanın smear örnekleri yeniden değerlendirildi ve histopatolojik örneklerinde p16 immünohistokimyasal çalışması yapıldı.

Araştırmanın bulgularına göre, anabilim dalımızın ASC-US tanısı koyduğu vakaların %39'u servikal intraepitelyal neoplaziydi. Bunun yanında, hiçbir Bethesda kriteri, neoplastik değişiklikler gösteren örneklerle benign karakterde örnekleri öngörmeye tek başına diğer kriterlerden anlamlı bir farklılık taşımamaktaydı ($P>0,05$). CIN pozitif olarak raporlanmış vakaların p16 pozitif boyanma oranı %46 olarak bulunmuşken malignite yönünden negatif vakalardan hiçbirinde p16 boyanması görülmedi. Tüm vakalar bir arada değerlendirildiğinde ASC-US tanısı koyduğumuz örneklerin %18'i p16 pozitif olarak bulundu.

Sonuç olarak, ASC-US tanısı koyduğumuz vakalarda servikal intraepitelyal neoplazi bulunma olasılığı %40 civarındadır. Bethesda ASC-US tanı kriterlerinden neoplastik değişiklikleri öngörmeye tek başına birbirlerinden üstün değildir. p16 boyanması sitopatolojik incelemeyle birlikte riskli popülasyonun tespitinde kullanılabilir.

Anahtar Kelimeler: ASC-US, immünohistokimya, Pap smear, p16^{INK4A}, serviks kanseri

SUMMARY

Exhibition of cervical intraepithelial neoplasia rate with p16 in patients with an ASC-US diagnose in Pap Smear

Cervix cancer is a serious public health issue for both developed and developing countries with 528,000 new cases and mortality rate of 266,000 annually. Through last decades, it has been demonstrated that the incidence of this malignancy markedly decreased. Routine usage of Pap smear as a cervical cancer screening test is thought to be the main factor for this decrease. Serious efforts have been put in order to standardize the Pap test and The Bethesda System has been revised to its last form in 2001. The main weakness of this system is surely the ASC-US diagnosis, which is hard to reproduce and has a great interobserver and intraobserver variability. The importance of this diagnosis is that some portions of this group of patients have an underlying cervical dysplasia and even carcinoma. Our study is aimed to exert the ratio of cervical intraepithelial neoplasia in the patients with a diagnosis of ASC-US given by Ufuk University Faculty of Medicine Department of Pathology.

For this purpose, all the patients whose pap smears were examined in Ufuk University Faculty of Medicine Department of Pathology between 2006 and 2013 and also have been examined histopathologically were enrolled in this study and inspected retrospectively. Thirty three patients were found to be suitable to these criteria. All Pap smears were re-evaluated and all histopathology specimens were also tested for p16 immunohistochemical staining.

According to the findings of the study, 39% of the patients were positive for cervical intraepithelial neoplasia with diagnose of ASC-US given by our department. Besides, none of the Bethesda ASC-US diagnostic criteria is found to be significantly different alone from other criteria when foreseeing neoplastic changes ($P>0.05$). CIN positive cases had a ratio of 46% for p16 staining and none of the cases that are negative for malignancy is found to be positive for p16. When assessed all together, the cases with an ASC-US diagnosis from our department had a p16 positivity rate of 18%.

In conclusion, the ASC-US cases of our department have a probability of being positive for cervical intraepithelial neoplasia by 40 percent. Bethesda Criteria for diagnosis of ASC-US do not have any significant difference from each other for predicting neoplastic changes. High risk population can be identified better with the usage of p16 in conjunction with cytopathology.

Keywords: ASC-US, cervical cancer, immunohistochemistry, Pap smear, p16^{INK4A}

KAYNAKLAR

1. S. I. Ferlay J, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013 [cited 2014 06/05/2014]; Available from: <http://globocan.iarc.fr>.
2. Screening for Cervical Cancer. In: P. Boyle, B. Levin, editors. World Cancer Report 2008. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2008. p. 288-296.
3. Tumours of the Uterine Cervix. In: F. A. Tavassoli, P. Devilee, editors. Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs Lyon: IARC Press; 2003. p. 259-290.
4. F. Garcia, K. Hatch, J. Berek. Intraepithelial Disease of the Cervix, Vagina and Vulva. In: J. S. Berek, editor. Berek & Novak's Gynecology. 15th ed. Philadelphia, USA: Lippincott Williams & Wilkins (LWW); 2012.
5. D. Solomon, D. Davey, R. Kurman, A. Moriarty, D. O'Connor, M. Prey, et al. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. JAMA : the journal of the American Medical Association. 2002;287(16):2114-2119.
6. C. Iavazzo, I. Boutas, C. Grigoriadis, N. Vrachnis, N. Salakos. Management of ASCUS findings in Papanicolaou smears. A retrospective study. European Journal of Gynaecological Oncology. 2012;33(6):605-609.

7. J. T. Keating, A. Cviko, S. Riethdorf, L. Riethdorf, B. J. Quade, D. Sun, et al. Ki-67, Cyclin E, and p16 INK4 Are Complimentary Surrogate Biomarkers for Human Papilloma Virus-Related Cervical Neoplasia. *The American Journal of Surgical Pathology*. 2001;25(7):884-891.
8. J. Rosai. *Rosai and Ackerman's Surgical Pathology*. 10th ed. New York, USA: Mosby Elsevier; 2011.
9. <http://www.cancer.gov/cancertopics/types/cervical>. 2014 [cited 2014 01.05.2014]; Available from: [ttp://www.cancer.gov/cancertopics/types/cervical](http://www.cancer.gov/cancertopics/types/cervical).
10. Türkiye Kanser İstatistikleri M. Gültekin, G. Boztaş, editors 2014. 55 p.
11. J. Melnikow, J. Nuovo, A. R. Willan, B. K.S. Chan, L. P. Howell. Natural History Of Cervical Squamous Intraepithelial Lesions: A Meta-Analysis. *Obstetrics & Gynecology*. 1998;92(4, Part 2):727-735.
12. S. B. Cantor, E. N. Atkinson, M. Cardenas-Turanzas, J. L. Benedet, M. Follen, C. MacAulay. Natural History of Cervical Intraepithelial Neoplasia. *Acta Cytologica*. 2005;49(4):405-415.
13. A. Montag, V. Kumar. The Female Genital System and Breast In: V. Kumar, A. K. Abbas, N. Fausto, R. Mitchell, editors. *Robbins Basic Pathology*. 8th ed. Philadelphia, U.S.A.: Elsevier 2007.
14. D. Saslow, D. Solomon, H. W. Lawson, M. Killackey, S. L. Kulasingam, J. Cain, et al. American Cancer Society, American Society for Colposcopy and Cervical Pathology, and American Society for Clinical Pathology screening guidelines for the prevention and early detection of cervical cancer. *American Journal of Clinical Pathology*. 2012;137(4):516-542.

15. S. S. Devesa, J. L. Young, L. A. Brinton, J. F. Fraumeni. Recent trends in cervix uteri cancer. *Cancer*. 1989;64(10):2184-2190.
16. M. S. Piver. Invasive cervical cancer in the 1990s. *Seminars in Surgical Oncology*. 1990;6(6):359-363.
17. M. Arbyn, C. Bergeron, P. Klinkhamer, P. Martin-Hirsch, A. G. Siebers, J. Bulten. Liquid Compared With Conventional Cervical Cytology: A Systematic Review and Meta-analysis. *Obstetrics & Gynecology*. 2008;111(1):167-177.
18. F. W. A.-K. Mark E. Sherman, Jonathan S. Berek, Celeste N. Powers, Mary K. Sidway, Sana O. Tabbara. Atypical Squamous Cells. In: R. N. Diane Solomon, editor. *The Bethesda System for Reporting Cervical Cytology*. New Yor, USA: Springer-Vering; 2004. p. 67-87.
19. D. Solomon, M. Schiffman, R. Tarone, F. t. A. Group. Comparison of Three Management Strategies for Patients With Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance: Baseline Results From a Randomized Trial. *Journal of the National Cancer Institute*. 2001;93(4):293-299.
20. TheALTSGroup. Results of a randomized trial on the management of cytology interpretations of atypical squamous cells of undetermined significance. *American Journal of Obstetrics And Gynecology*. 2003;188(6):1383-1392.
21. C. M. McGrath. ASCUS in Papanicolaou smears. Problems, controversies, and potential future directions. *Am J Clin Pathol*. 2002 Jun;117 Suppl:S62-75.
22. S. M, A. ME. ASCUS-LSIL Triage Study. Design, methods and characteristics of trial. *Acta Cytol*. 2000 Sep-Oct;44(5):726-42.
23. A.E. Smith, M.E. Sherman, D.R. Scott, S.O. Tabbara, L Dworkin, J Olson et al. Review of the Bethesda System atlas does not improve reproducibility or

- accuracy in the classification of atypical squamous cells of undetermined significance smears. *Cancer*. 2000;90(4):201-206.
24. M. E. Scheurer, G. Tortolero-Luna, K. Adler-Storthz. Human papillomavirus infection: biology, epidemiology, and prevention. *International journal of gynecological cancer : Official Journal of The International Gynecological Cancer Society*. 2005;15(5):727-746.
 25. Atomic model of the papillomavirus capsid. Y. Modis, B. L. Trus, S. C. Harrison, editors. 2002; 4754-4762 p.
 26. K. Munger, J. R. Basile, S. Duensing, A. Eichten, S. L. Gonzalez, M. Grace, et al. Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein. *Oncogene*. 2001;20(54):7888-7898.
 27. M. H. Schiffman, H. M. Bauer, R. N. Hoover, A. G. Glass, D. M. Cadell, B. B. Rush, et al. Epidemiologic evidence showing that human papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia. *Journal of the National Cancer Institute*. 1993;85(12):958-964.
 28. J. M. Walboomers, M. V. Jacobs, M. M. Manos, F. X. Bosch, J. A. Kummer, K. V. Shah, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *The Journal of Pathology*. 1999;189(1):12-19.
 29. C. M. Wheeler. Natural History of Human Papillomavirus Infections, Cytologic and Histologic Abnormalities, and Cancer. *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America*. 2008;35(4):519-536.
 30. S. Stone, P. Jiang, P. Dayananth, S. V. Tavtigian, H. Katcher, D. Parry, et al. Complex structure and regulation of the P16 (MTS1) locus. *Cancer research*. 1995;55(14):2988-2994.

31. T. Stricker, V. Kumar. Neoplasia. In: V. Kumar, A. K. Abbas, N. Fausto, R. Mitchell, editors. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. 8th ed. Philadelphia, U.S.A.: Elsevier; 2009.
32. N. Wentzensen, M. von Knebel Doeberitz. Biomarkers in cervical cancer screening. *Disease markers*. 2007;23(4):315-330.
33. Tsoumpou, M. Arbyn, M. Kyrgiou, N. Wentzensen, G. Koliopoulos, P. Martin-Hirsch, et al. p16INK4a immunostaining in cytological and histological specimens from the uterine cervix: A systematic review and meta-analysis. *Cancer treatment reviews*. 2009;35(3):210-220.
34. D. Dehn, K. C. Torkko, K. R. Shroyer. Human papillomavirus testing and molecular markers of cervical dysplasia and carcinoma. *Cancer*. 2007;111(1):1-14.
35. M. Guo, L. Hu, M. Baliga, Z. He, M. D. Hughson. The predictive value of p16(INK4a) and hybrid capture 2 human papillomavirus testing for high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *American Journal of Clinical Pathology*. 2004;122(6):894-901.
36. O. Schorge, J. S. Lea, K. J. Elias, R. Rajanbabu, R. L. Coleman, D. S. Miller, et al. P16 as a molecular biomarker of cervical adenocarcinoma. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2004;190(3):668-673.
37. R. Klaes, T. Friedrich, D. Spitkovsky, R. Ridder, W. Rudy, U. Petry, et al. Overexpression of p16INK4A as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *International Journal of Cancer*. 2001;92(2):276-284.

38. R. Sankaranarayanan, L. Gaffikin, M. Jacob, J. Sellors, S. Robles. A critical assessment of screening methods for cervical neoplasia. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*. 2005;89, Supplement 2(0):S4-S12.
39. M. T. Fahey, L. Irwig, P. Macaskill. Meta-analysis of Pap Test Accuracy. *American Journal of Epidemiology*. 1995;141(7):680-689.
40. M. H. Stoler, M. Schiffman. Interobserver reproducibility of cervical cytologic and histologic interpretations: realistic estimates from the ASCUS-LSIL Triage Study. *JAMA : The Journal of The American Medical Association*. 2001;285(11):1500-1505.
41. T. Sano, T. Oyama, K. Kashiwabara, T. Fukuda, T. Nakajima. Expression Status of p16 Protein Is Associated with Human Papillomavirus Oncogenic Potential in Cervical and Genital Lesions. *The American Journal of Pathology*. 1998;153(6):1741-1748.
42. S. Nieh, S.-F. Chen, T.-Y. Chu, H.-C. Lai, E. Fu. Expression of p16INK4A in Papanicolaou smears containing atypical squamous cells of undetermined significance from the uterine cervix. *Gynecologic Oncology*. 2003;91(1):201-208.