

48670

T.C.
İstanbul Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Ağız, Diş ve Çene Hastalıkları
ve Cerrahisi Anabilim Dalı
Danışman: Prof.Dr. Nevin Büyükakyüz

AĞIZ MUKOZASININ SELİM, PREKANSERÖZ VE HABİS
LEZYONLARINDA HUMAN PAPİLLOMA VİRÜS
VARLIĞININ İN SİTU HİBRİDİZASYON
YÖNTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI

MEHMET YALTIRIK
Dişhekimisi

Dişhekimliği Doktoru
(Dr. Med. Dent.)
Ünvanını kazanmak için
İ.Ü. Dişhekimliği Fakültesinde sunulan

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

DOKTORA TEZİ

İSTANBUL-1996

Bu alışma İstanbul Üniversitesi Araştırma Fonunca Desteklenmiştir.

Proje no: 589/171193

TEŞEKKÜR

Tezimin hazırlanmasında beni yönlendiren ve büyük desteğini, gördüğüm danışman hocam Sn. Prof.Dr. Nevin Büyükakyüz'e,

Tez çalışmamın laboratuvar aşamasında uygun çalışma ortamı sağlayan İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü Tümör Patolojisi Bilim Dalı Başkanı Sn. Prof.Dr. Gülçin Erseven'e, bulguların değerlendirilmesinde ve yorumlanmasında emeği geçen Sn. Prof.Dr. Canan Alatl'ya, çalışmamın her aşamasında büyük bir özveriyle yardımlarını esirgemeyen Sn. Uzm.Biolog. Dr. Ayla Özveren'e,

Örneklerin sağlanmasında yardımcı olan Sn. Prof.Dr. Hülya Aydın'a,

Tez çalışmalarım süresince her konuda yakın ilgilerini gördüğüm aileme ve bütün arkadaşlarıma teşekkür ederim.

İstanbul, 1996

Mehmet Yaltırık

İÇİNDEKİLER

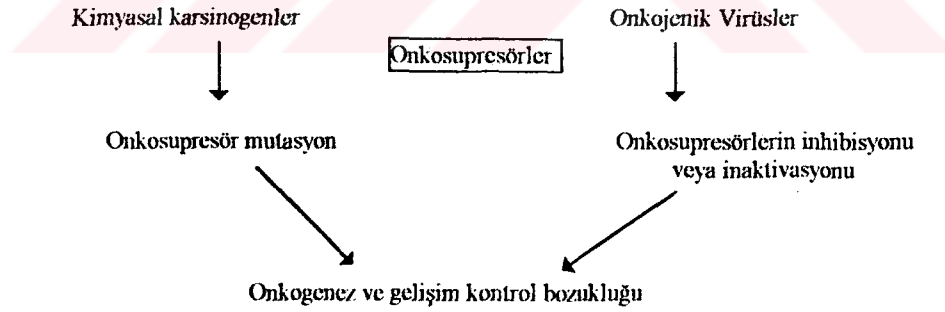
	Sayfa
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	3
AMAÇ	14
GEREÇ VE YÖNTEM	15
BULGULAR	22
TARTIŞMA	30
SONUÇLAR	38
ÖZET	39
İNGİLİZCE ÖZET	41
KAYNAKLAR	43
ÖZGEÇMİŞ	52

GİRİŞ

Her yıl Amerika'da teşhis edilen otuzbinden fazla baş boyun bölgesi kanser olgusundan sekizbininin ölümle sonuçlandığı bildirilmiştir. İngiltere'de yapılan bir araştırmada ağız kanserleri bütün kanser olgularının %1'ini teşkil etmektedir (6,32,78).

Karsinogenezin temelinde genetik yapıda herhangi bir nedenle oluşan değişim söz konusudur. Genetik yapıda değişime neden olan faktörleri üç sınıfta toplamak mümkündür (**Şekil 1**).

- **Kimyasal maddeler
- **Işıma enerjisi
- **Onkojen virüsler (33,60).



Şekil 1: Kimyasal ve biyolojik onkojenik faktörlerin kansere yol açış mekanizması.

Ağız bölgesinde görülen kanserlerde viral etkenin önemli bir rolü olduğu son yıllarda yapılan moleküler biyolojik çalışmalarda, viral DNA'nın mikroskop altında tespit edilmesiyle kanıtlanmıştır (10,32).

Epidemiyolojik olarak onkojenik potansiyele sahip DNA virüsleri, belirli insan tümörleri ile ilişkili olan polyoma virüsü, simian virüs 40 (SV40), adeno virüsler, papilloma virüsler, herpes virüsler ve hepatit B virüsleridir (6,11,38,61,63,81).

Erken teşhis ve tedavinin ağız kanserlerinde ölüm oranını azaltacağı düşüncesiyle bu yöndeki çalışmalara hız verilmiştir.

Yapılan epidemiyolojik çalışmalarda HPV'ün (insan papilloma virüsü) bir çok tipinin mukozada selim papillomatöz oluşumların yanısıra karsinomlarda da görüldüğü bildirilmiştir.

Scully ve ark. (1991), ağız mukozasında yaptıkları çalışmalarda, ağız mukozasının kronik rahatsızlıklarının virüsler ile olan ilişkisini incelemişlerdir. Yazarlar, papilloma virüslerin papillomatöz lezyonlar, epiteliyal hiperplaziler ve karsinomlarla ilişkili olduğunu ifade etmişlerdir (59).

Chang ve ark. (1991), oral karsinom gelişiminde HPV'ün diğer karsinojenler ile birlikte sinerjik etkiye sahip olduğunu bildirmişlerdir (6).

Yapılan çalışmalarda, onkojenik potansiyele sahip HPV'lerin ağız boşluğundaki selim, prekanseröz lezyonlar ve kanserlerde farklı tiplerinin bulunduğu tespit edilmiştir (10,13,40,41,58,59,66).

GENEL BİLGİLER

Son yıllarda ağız boşluğunda prekanseröz lezyonlara ve kanserlere sık rastlanması, bu lezyonların etyolojisi ve pathogenezini araştırmaya yönelik çalışmalara hız vermiştir (6,28,60,78).

Cox ve ark. (1991), oral kanser gelişiminde virüslerin onkojenik potansiyele sahip olduklarından bahsetmişlerdir (10).

Maden ve ark. (1992), yaptıkları çalışmada HSV-1, HSV-2 (herpes simpleks virüs) ve HPV'lerin oral karsinomlarda yüksek risk faktörü olduklarını bildirmişlerdir (40).

Scully (1993), oral karsinomların pathogenezinde HPV ve HSV'ün rol oynadığını ifade etmiştir (60).

Ağız boşluğundaki selim, prekanseröz lezyonlar ve kanserlerden elde edilen materyallerde virüs partiküllerinin elektron mikroskopunda gösterilmesine kadar, bu oluşumların gelişiminde viral etyolojinin olabileceğine şüphe ile bakılmıştır (10,58).

Akut viral infeksiyonların ağız belirtilerinin uzun bir latent dönemden sonra ortaya çıktığı bilinmektedir (10).

Son yıllarda moleküler biyolojideki gelişmeler ve yapılan araştırmalar ile, virüslerin ağız boşluğundaki selim, prekanseröz lezyonlarda ve kanserlerde tespit edildiği bildirilmiştir (63).

Onkojenik potansiyel gösteren papilloma virüsler genital bölge dışında larenks, konjuktiva ve ağız boşluğunu da infekte ederler (1,15,30,67, 71,80,82).

İnsanda mukozal lezyonlarda HPV'ün çeşitli tipleri tespit edilmiştir. HPV'ün öncelikle oral mukozal lezyonlardan selim, prekanseröz

lezyonlar ve kanserler ile ilişkisi olduğu üzerinde durulmuş ve HPV varlığı ile ilgili bir çok çalışma yapılmıştır(57,67,79).

Maitland ve ark. lökoplakilerin %80'den fazlasında, oral karsinomların ise, %46'sında HPV tespit etmişlerdir (41)

De Villiers ve ark. (1985), inceledikleri yedi dil karsinom olgusunun üçünde HPV pozitifliği tespit etmişlerdir. Bu olguların birinde HPV 16'ya, diğer iki olguda HPV 2'ye pozitiflik olduğunu bildirmişlerdir (15).

Eversole ve ark. (1987), yirmi oral verruco vulgaris olgusunun onunda HPV 2'ye pozitiflik tespit etmişlerdir (17).

Cox ve ark. (1991), odontojenik keratokistlerde HPV 16 DNA'sını izole etmişlerdir (9).

Permoli-de-Percoco ve ark. (1993), oral verruco vulgaris olgularında HPV 2,4, HPV 3,10 ve HPV 7'ye pozitiflik saptadıklarını bildirmişlerdir (53).

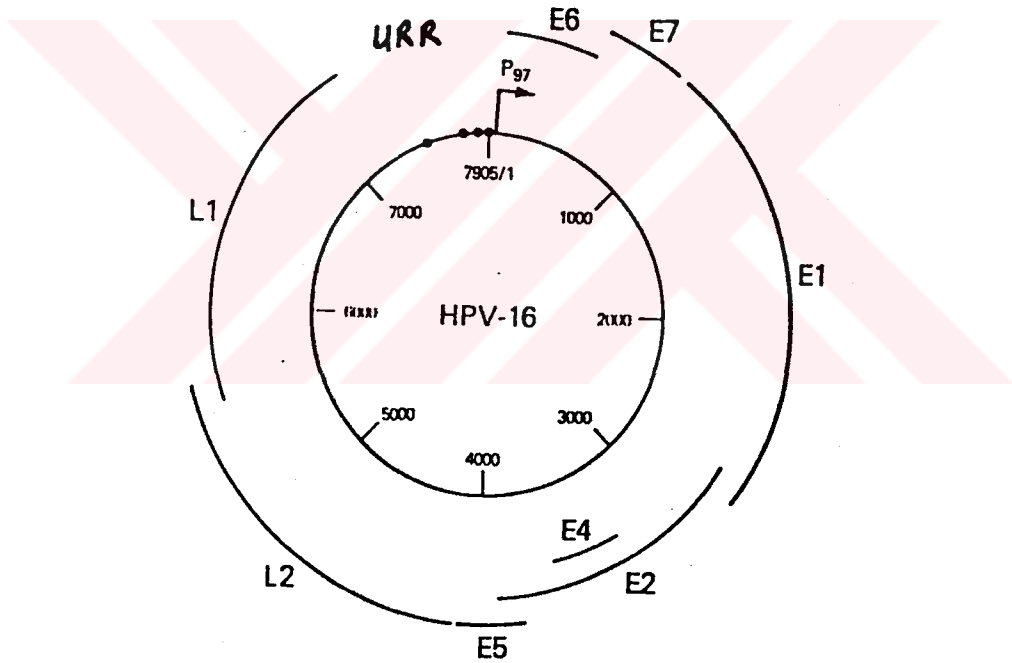
Kashima (29), Zeusss (82). Watts (74), Woods (77), Miller (45), HPV'ün spesifik tiplerinin ağız boşluğundaki lezyonlarda değişik dağılım gösterdiğini söylemişler ve HPV 6/11'in daha çok selim oluşumlarda, HPV 16/18 ve HPV 31/33/51'in ise, intraepitelyal neoplazmlar ve kanserlerde bulunduğunu yaptıkları çalışmalarda saptamışlardır.

PAPİLLOMA VİRÜSLER

Moleküller biyolojideki gelişmelere paralel olarak papilloma virüsler üzerindeki çalışmalar hızlanmış ve papilloma virüslerin yapısı ve etki mekanizmaları hakkında ayrıntılı bilgi edinmemiz sağlanmıştır (6,17).

Papilloma virüsler papovaviridae ailesinin üyesidir ve bu virüs ailesi polyoma virüs, simian virüs 40 (SV40), insan virüsleri BK ve JC yi kapsayan DNA virüsleridir (6,63,81).

Papilloma virüsler 55nm (nanometre) çapında, kapsid ile çevrili, çift zincirli halkasal DNA molekülü içeren DNA virüsleridir (Şekil 2). DNA molekülü 7900 baz çifti uzunluğunda olup çevresinde lipid membran zarı yoktur (13,63,72).



Şekil 2: Human papilloma virüs genom yapısı.

HPV, çift sarmallı epitelotropik DNA virüsü olup, bunların genellikle anogenital bölgeyi infekte ettiği ve virüslerin bu bölge dışında larenks, konjunktiva ve ağız boşluğunda infekte ettiği bilinmektedir (1,16,30,47,67,80,82).

Diğer virüslerden farklı olarak serolojik testler ile HPV'leri tiplendirmek mümkün olmamıştır. Papilloma virüsler ancak nükleotid dizilerindeki farklılıklara ve buldukları konağa göre sınıflandırılmaktadırlar, Bu tip sınıflama ile HPV'ün altmışbeşten fazla tipi tanımlanmıştır (2,8,29,45,64,84).

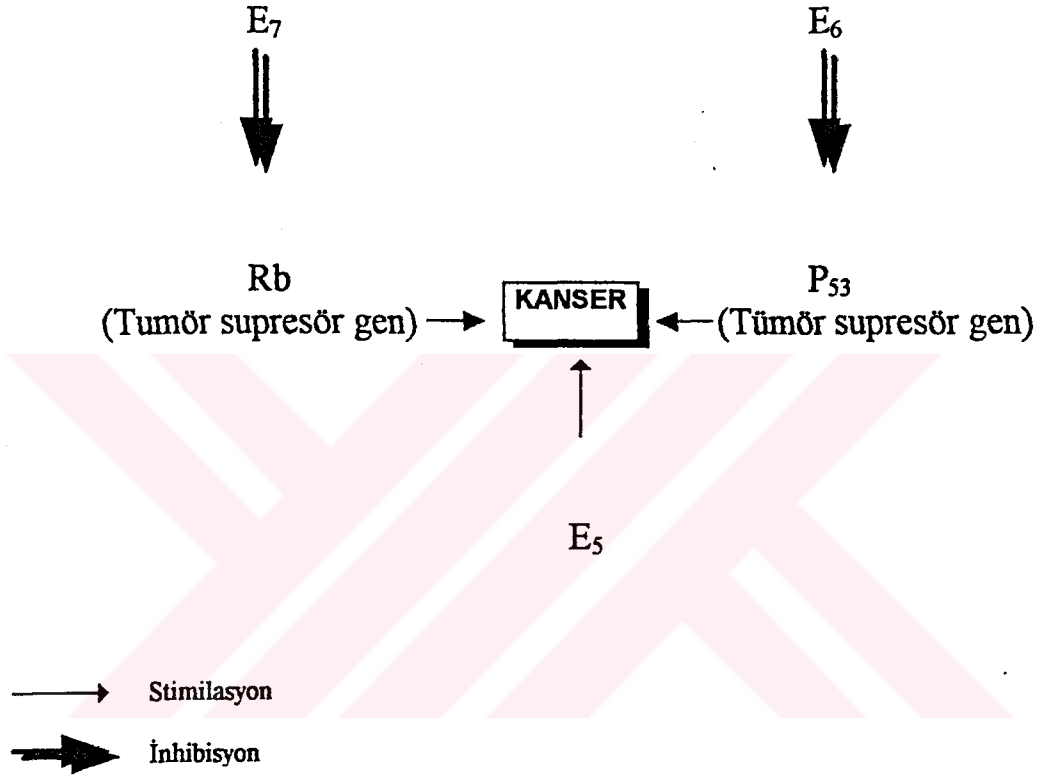
İnsan mukozal lezyonlarında HPV'ün çeşitli tipleri bulunmuş ve en çok HPV 1,2,4,6,7,11,13,16,18,30,31,32,33,51 ve 57 gibi tipleri tespit edilmiştir (6,30,57,67,79,82).

Papilloma virüsler benzer DNA organizasyonu gösterirler. HPV genomu "Erken" (E) ve "Geç" (L) bölgeler olarak iki farklı bölgeden yapılmıştır. Erken bölgeler yedi gen (E₁-E₇), geç bölgeler ise iki gen (L₁ - L₂) kodlamaktadır (8,13,24,25,48,55,60,63,71).

Erken bölge, HPV infeksiyonun ilk aşamasında rol alan ve viral replikasyonu (eşlemesi) başlatan bölgedir. Geç bölge ise, viral kapsid proteinlerinin sentezinden sorumludur. HPV genomunda protein kodlayan ORF (open reading frame) bölgeleride vardır (50,55). Ayrıca protein kodlayıcı bölge taşımayan, 600-900 baz çifti uzunluğunda URR (Upstream Regulatory Region) olarak adlandırılan bir bölgede bulunur (50,63).

L bölgesinin sonu ile E bölgesinin başı arasında yer alan bu URR bölgesinin düzenleyici sinyaller taşıdığı, bununda DNA replikasyonu ve viral genlerin ekspresyonunda (gen anlatımı) rolü olduğu bildirilmiştir (63,84).

E bölgesinin bazıları düzenleyici genler taşır. Örneğin E₂ bölgelerinin, ORF bölgesi ile E₆ ve E₇ bölgeleri gen ekspresyonunu düzenleyici role sahiptir. Bu bölgenin viral veya hücre gen ekspresyonunu değiştirerek transformasyon (dönüşüm) ya da onkogeneizde rol oynadığı kabul edilmiştir. Bunuda konak hücre proteini P₅₃ ve retinoblastom gen ürününe (Rb) bağlanarak gerçekleştirdiği düşünülmüştür (12,13,24,28,48,50,60,64,71,84) (Şekil 3).



Şekil 3: Human papilloma virüs genlerinin (E_5, E_6, E_7) onkojenler ve tümör supresörler arasındaki ilişkisi.

AĞIZ BOŞLUĞUNUN SELİM, PREKANSERÖZ LEZYONLARI VE KANSERLERİ İLE HPV İLİŞKİSİ

Ağız mukozasının selim, prekanseröz lezyonlarında ve kanserlerinde viral bir etyolojinin olabileceği uzun yıllar tartışılmış ve son yıllarda yapılan virolojik çalışmalarla ağız boşluğundaki lezyonlarda HPV varlığı kanıtlanmıştır (6,31,36,53,60,63,66,75,77).

Yapılan çalışmalarda, ağız boşluğunun selim oluşumlarından olan papillomlar, verruco vulgaris, epitelial hiperplazi ve fibröz hiperplazilerde, prekanseröz lezyonlardan lichen planus, lökoplakilerde ve kanserlerde in-situ hibridizasyon yöntemi ile HPV varlığı tespit edilmiştir (6,20,29,59).

HPV'ler spesifik fonksiyonlara sahip genler aracılığıyla, hücre gelişiminin ve diferansiyasyonunun, kontrol mekanizmalarına etki ederek karsinogeneze neden olurlar (20,60).

1989 yılında yapılan kapsamlı bir çalışmada, lökoplakilerin %80'ninden fazlasında, oral karsinomların ise, %46'sında HPV tespit edildiği bildirilmiştir (41).

Papillomlar ağız boşluğunun selim tümörlerinden olup, her yaşta gelişebilen, ağız mukozasında en fazla yumuşak damak, dudak, dil dorsumu ve lateral sınırında, buccal mukozada ve dişetinde görülen oluşumlardır. Yüzeyi hiperkeratotik veya akantotik epitel ile çevrili parmaklı çıkıntılar şeklindedir. Keratinize olduklarından açık pembe, beyaz renkli lezyonlar şeklinde görülürler (4,6,20,25,29,41,82).

Asemptomatik olan papillomlar genellikle 1cm' den küçük lezyonlar halinde, epitelde hiperplazi ve stromal dokuda vaskularizasyon gösterirler. Bunların etyolojisinde HPV'lerden tip 6/11'in rol oynadığı bildirilmiştir.(6,67,80,82).

Tsuchiya ve ark. (1991), on papillom olgusunu inceledikleri çalışmada, papillom olgularından üçünde HPV 6/11 pozitifliği saptamışlardır (67).

Zeuss ve ark. (1991), beş verruco vulgaris, onbeş condiloma acuminata, otuz papillom, yirmi hiperkeratoz, onbeş epiteliyal displazi, beş in-situ karsinom ve onbeş epidermoid karsinom olmak üzere toplam yüzbeş oral mukozal lezyonda HPV 6/11, 16/18 ve 31/33/35'in varlığını araştırmışlar. Sonuç olarak beş verruco vulgaris olgusunun beşinde, onbeş kondiloma acuminatanın onbeşinde, otuz papillomun dördünde, yirmi hiperkeratozisin ikisinde sadece HPV 6/11 pozitifliği tespit etmişlerdir (82).

Young ve ark. (1991), inceledikleri yirmi papillom olgusunda HPV 6/11, 16/18 ve 31/33/55 varlığını araştırmışlardır. Onüç papillom olgusunda HPV 6/11'e kuvvetli pozitiflik, on papillom olgusunda ise, HPV 16/18 ve 31/33/35'e karşı hafif pozitiflik saptadıklarını bildirmişlerdir (80).

Ağız boşluğundaki prekanseröz lezyonlar ve kanserlerden alınan biopsi materyallerinde en çok HPV 16/18 ve 31/33/51 tiplerinin varlığı tespit edilmiştir (29,45,74,77,82).

Lökoplakiler beyaz plak halinde ya da yaygın lezyonlar olup, histolojik olarak epiteliyal hiperplazi, hiperkeratoz ve ciddi displazi gösteren, malignite değişim riski olan beyaz lezyonlardır.

Klinikte ağız mukozasının beyaz plağı olarak tarif edilen lökoplakiler, orta yaşlarda daha sık görülmektedir (3,54,83). Etiyolojisi kesin olarak bilinmemekle birlikte, bu lezyonların sigara ve alkol kullanımına bağlı geliştiği, ancak bazı araştırmacılar tarafından da viral bir etyolojinin olabileceği bildirilmiştir (6,54).

Syrjanen ve ark. (1986), inceledikleri üç lökoplakinin ikisinde HPV tip 6/11 ve 16'ya karşı pozitiflik saptamışlardır (65).

Lichen planus deri ve mukoza tutulumu yaygın bir hastalık olup, ağız boşluğunda yanak mukozası, dil dorsumunda görülen ve etyolojisinde immünolojik bir bozuklukla birlikte viral etkenlerin de rol oynadığı bilinen bir orta yaş hastalığıdır (3,6,54).

Klinikte lichen planuslar reticuler form, plaque form, atrofik form ve erosive form olmak üzere dört ayrı formda görülmektedir. Lichen planuslarda %1 malignite potansiyeli olduğu bildirilmiş, sigara ve alkol kullanımının maligniteyi arttırdığından bahsedilmiştir (54).

Oral kanserler daha çok kırk yaş üzerinde erkeklerde, çoğunlukla alt dudak, ağız tabanı ve dil kenarlarında görülmektedir. Klinikte lokal ağrı ve çiğneme güçlüğü en belirgin semptomlarıdır. Etyolojisinde, kimyasal karsinojenler, ışın enerjisi, kronik iritasyon ve virüslerin önemli bir rolü olduğu düşünülmektedir (6,20,29,33).

Watts ve ark. (1991), kırkdokuz oral karsinom olgusunda HPV 2, 6/11, 13, 16/18 ve 32'nin varlığını araştırdıkları çalışmada, olguların %30'unda HPV 6/11 ve 16/18'e karşı pozitiflik tespit etmişlerdir (74).

Gassenmaier ve ark (1988), ikiyüziki oral lökoplaki olgusunun yirmibirinde HPV 6/11 ve 16'ya, yüzüç prekanseröz oral lökoplakinin ondokuzunda HPV 6/11 ve 16'ya, altmışsekiz oral epidermoid karsinomun onaltısında HPV 6/11 ve 16'ya pozitiflik olduğunu bildirmişlerdir (20).

Kashima ve ark. (1990), yaptıkları çalışmada oral karsinomlar, lökoplaki veya lichen planusta HPV 6/11, 16/18 ve 31'in varlığını incelemişler, sonuç olarak HPV 6/11, 16/18'in daha çok karsinom olgularında bulunduğunu bildirmişlerdir (29).

Abdelsayed ve ark. (1991), onsekiz epidermoid karsinom olgusunda HPV 6/11, 16/18 ve 31/33/35'in varlığını araştırdıkları çalışmada, sadece iki epidermoid karsinom olgusunda HPV 6/11 ve HPV 16/18 pozitifliği saptamışlardır (1).

Woods ve ark. (1993), yaptıkları çalışmada, onsekiz oral epidermoid karsinom olgusunu incelemişler ve ondört olguda HPV DNA'sına pozitiflik tespit etmişler, ondört hastanın dördünde HPV 6/11 ve 16/18'e, bir hastada, HPV 6/11'e, iki hastada, HPV 16'ya, iki hastada HPV 18 ve beş hastada ise, 16/18'e pozitiflik saptamışlardır (77).

VİRÜS HÜCRE ETKİLEŞİMİ VE KARSİNOGENEZDEKİ ROLÜ

Papillomavirüs infeksiyonu genellikle epidermisin keratinositlerinde görülmektedir. Başlangıçta viral partiküller epitelin aşınmış bir bölgesinden bazal tabakadaki hücrelere geçerler. Virüsün hücreye girişi, endositoz ve pinositozla yada epitele spesifik olan virüsün kapsid proteini ile bir hücre reseptörünün bağlanması sonucu olur (50,69).

Virüs bazal tabakadaki hücrelere girdikten sonra kılıfını bırakır. İlk aşamada viral DNA replikasyonu için düzenleyici proteinler sentezlenir ve düşük miktarlarda erken viral genlerin replikasyonu yapılır. Erken viral genler bazal hücrelerde hücre çoğalmasını uyarır. Bazal tabaka hücreleri sürekli bölünme yeteneğine sahip hücrelerdir. Bu uyarı sonucunda aşırı hücre çoğalması, epitelin üst tabakalarında hiperplazi olarak kendini gösterir. Daha yüzeysel tabakalardaki hücrelerde ise, koilositoz olarak adlandırılan, nükleus dejenerasyonu, perinükler vakualizasyon ve sitoplazmik vakualizasyon görülür (2,50).

Bazal hücre farklılaşıp daha üst tabakalara doğru ilerledikçe, hücresel DNA replikasyonu ile senkronize ve stabilize olarak viral DNA replikasyonu uyarılır. Epizomal DNA lar konak hücrenin nükleusunda birikir. Daha yüzeysel hücre tabakalarında L₁ ve L₂ viral kapsid proteinleri sentezlenir. Sonuçta, viral partiküller meydana gelir. Hücre keratinosit şeklinde döküldüğünde virüs başka bölgeleri infekte eder. Böylece virüs keratinositlerle ölümsüzlük kazanır (71,84).

HPV'ün onkogenezdaki rolü HPV infeksiyonundan farklı olup; viral DNA'nın, konak hücrenin genomuna integrasyonu (bağlanma) ile olduğunu gösterir ip uçları elde edilmiştir (12,26,58,60,63,71,84).

Bu konuda yapılan çalışmalarda integrasyon sonucu malignite gelişimini açıklayan bir kaç yol gösterilmiştir. Integrasyon, genellikle viral genomun bir parçasının delesyonu (kopup-birleşme) ile olmaktadır. Genellikle invaziv karsinomlarda görülen HPV 16 ve 18 DNA' sının integrasyonun, viral genin E₂ ve ORF bölgesinde bir açılmaya bağlı delesyonla olduğu gösterilmiştir. E₂ bölgesinin E₆ ve E₇ gen ekspresyonunu

düzenleyici bir fonksiyonu olduğundan, bu bölgedeki bir delesyonun viral gen ekspresyonunu değiştireceği ve onkogeneze rol oynayabileceği, ayrıca E₆ ve E₇ gen ürünü proteinlerin tümör baskılayıcı genlerle etkileştikleri gösterilmiştir. E₆ ve E₇ proteinleri, P₅₃ ve Rb gen ürünlerine bağlanarak, hücre proliferasyonunun kontrolü ile ilgili olan bu genleri inaktive ettikleri ve hücre büyümesinde kontrol kaybına yol açtıkları bildirilmiştir (26,58,60,63,71).

Diğer bir yol olarak, viral genomun bir protoonkogene komşu bölgeye integre olması ile onkogenin aktif hale gelebileceği belirtilmiştir (12,24,28,64).

HPV infeksiyonlarında immün denetimin baskılanmasından da söz edilmiştir (58).

Viral genomun hücre genomuna integre olduğu durumlarda, viral genomun bazı bölgelerinin kaybolduğu, sadece E₆ ve E₇ gibi karsinomla ilişkili bölgelerinin kaldığı bildirilmiştir. (14,50,58,69).

Çeşitli HPV tiplerine ait viral DNA'lar, ileri displazik lezyonlar ve karsinomlarda da saptanmıştır. Viral kapsid proteinleri ise, sadece hafif displazik lezyonlarda gösterilmiş, displazik lezyonlar ve karsinomlarda, normal virüs hayat siklusü bloke olmuştur. Virüs için biyolojik bir ölüm olan bu olayın, konak hücre için sınırsız bir çoğalmaya neden olduğu belirtilmiştir (13,63,72).

HPV SAPTANMASINDA KULLANILAN YÖNTEMLER

HPV infeksiyonunu saptamak ve tiplerini belirlemek için çeşitli moleküler biyoloji yöntemleri kullanılmaktadır (34,39,56).

**** Southern Blot Yöntemi**

**** Dot - Blot Hibridizasyon Yöntemi**

**** Filter In - Situ Hibridizasyon Yöntemi**

**** Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)**

**** İn - Situ Hibridizasyon Yöntemi (ISH)**

İn - situ hibridizasyon yöntemiyle taze hücrede, frozen kesitte, formolde fikse parafin kesitte HPV DNA' sı veya RNA'sı saptanabilmektedir (30,37,43,68).

İn - situ hibridizasyon yöntemiyle her hücredeki HPV genomunun yaklaşık 20 - 800 kopyası tespit edilebilmektedir (56,68).

Doku kesitleri, sitolojik materyaller ve kromozomlar lam üzerinde fikse edilerek DNA hibridizasyonu ile HPV varlığı tespit edilebilir. Hibridizasyon ile, bir çok organizma ve virüste çift sarmal halinde bulunan DNA zinciri ısıtılmak suretiyle denature olur (tek zincir halinde ayrılır). Bu ayrılan DNA zincirleri HPV tipine özel probe DNA'sı ile hibridleştirilerek (melezleştirmek) tespit edilir.

İn - situ hibridizasyon yöntemi, genital ve oral mukozoda HPV'ün spesifik tiplerini tayin etmede güvenle kullanılabilir, aynı zamanda retrospektif çalışmada uygun bir yöntemdir. Hibridizasyon, sonuçları ışık mikroskobu ile değerlendirilebilen ve bu sebeplerden dolayı hızlı, güvenli, ekonomik, laboratuvar çalışanlarında zararlı etkisi olmayan duyarlı bir yöntem olarak bildirilmiştir (37,45,56,68,73,76,82).

AMAÇ

Çalışmamızda, ağız boşluğunda büyük bir sıklıkta görülen selim, prekanseröz lezyonlar ve kanserlerin etyolojisinde, ağız boşluğundaki mikrotravmalar, mikroorganizmalar ve kimyasal faktörler ile birlikte sinerjik etkisi olduğu düşünülen HPV'ün etkisini araştırmayı planladık .

Bu çalışmadaki amaçlarımız:

****Malignite gelişiminde HPV'ün rolünü kanıtlamak .**

****HPV tespit edilmiş olan olgularda, ağız lezyonlarının tedavisinde yeni yaklaşımlara ışık tutmak .**

****HPV'ün bulaşıcı olup olmadığı ve bu enfeksiyona karşı bağışıklık olup olmadığı konusunda yapılacak çalışmalara yardımcı olmak .**

****Ağız boşluğundaki selim, prekanseröz lezyonlar ve kanserlerde spesifik HPV tiplerinin tayin edilmesini sağlamak .**

Kaynak taramasında serviks bölgesinden elde edilen parafin doku kesitleri ve sitolojik materyallerde HPV varlığı incelenmiştir (1,29). Bizde çalışmamızda ağız boşluğundaki selim, prekanseröz lezyonlar ve kanserlerde HPV alt tiplerinin varlığını, sitolojik materyallerde ve doku kesitlerinde tespit etmeyi amaçladık.

GEREÇ VE YÖNTEM

GEREÇ

Olgularımızı, İ.Ü. Dişhekimliği Fakültesi Ağız, Diş, Çene, Hastalıkları ve Cerrahisi ABD kliniklerine ve İ.Ü. Tıp Fakültesi Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi ABD'na müracat eden hastalardan seçtik.

Biopsi uyguladığımız toplam olgu sayısı yirmi idi.

Patolojik tetkik için alınan biopsiler, İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü Tümör Patolojisi ve Onkolojik Sitoloji bilim dalları laboratuvarlarında histopatolojik ve sitolojik olarak değerlendirilmiştir.

Hastalardan alınan biopsi örneklerinden, fikse edilmeden önce patoloji laboratuvarlarında Poly-L-Lysine ile kaplı altı adet lama imprint preparatı hazırlanmıştır. Daha sonra biopsi örnekleri %10'luk Buffer-Formalinde en az 4-8 saat fikse edildikten sonra rutin doku takibine alınmış ve parafine gömülmüştür. Imprint preparatları ise, en az 15 dakika %96'lık alkolde fikse edilmiş ve Papanicolaou (Pap) tekniği ile boyanmıştır.

Klinik, radyolojik ve patolojik tetkikler sonucunda yedisine epidermoid karsinom, yedisine papillomatoz oluşum ve altısına lichen planus veya lökoplaki tanısı konmuş toplam yirmi olgunun, herhangi bir sistemik hastalığı olmamasına ve uzun süre ilaç kullanmamış olmalarına dikkat edilmiştir. Bu olguların lokalizasyon, histopatolojik sonuç, yaş, cinsiyet, sigara ve alkol kullanımı **Tablo 1**'de gösterilmiştir.

Biopsilerden hazırlanan parafin kesitler ve imprint preparatlarında in situ hibridizasyon yöntemi ile HPV 6/11, 16/18 ve 31/33 /51 tiplerinin varlığına bakılmıştır.

Tablo 1: Toplam 20 olgunun lokalizasyon, histopatolojik sonuç, yaş, cinsiyet, sigara ve alkol kullanımındaki dağılımı

Lokalizasyon	Histopatolojik Sonuç	Yaş	Cinsiyet	Sigara	Alkol
Alt dudak	Lökoplaki	38	E	-	-
Alt dudak	Lökoplaki	35	K	-	+
Alt dudak	Lökoplaki	50	E	+	+
Yanak mukozası	Lökoplaki	33	E	+	+
Yanak mukozası	Lichenplanus	42	E	+	+
Yanak mukozası	Lichenplanus	32	E	+	+
Lingual mukoza	Ep Ca	51	E	+	-
Lingual mukoza	Ep Ca	38	K	+	+
Lingual mukoza	Ep Ca	31	K	-	-
Lingual mukoza	Ep Ca	58	K	-	-
Lingual mukoza	Ep Ca	65	E	+	+
Alt dudak	Ep Ca	63	E	-	-
Üst dudak	Ep Ca	72	K	-	-
Yanak mukozası	Papillom	72	K	+	+
Yanak mukozası	Papillom	34	E	+	+
Yanak mukozası	Papillom	32	E	+	-
Yanak mukozası	Papillom	33	E	-	-
Alt dudak	Papillom	15	K	-	-
Yumuşak damak	Papillom	72	K	-	-
Sert damak	Papillom	55	K	-	-

YÖNTEM

İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü Tümör Patolojisi ve Onkolojik Sitoloji bilim dalları laboratuvarlarında histopatolojik ve sitolojik olarak değerlendirilen yirmi olgudan hazırlanan doku kesitleri ve imprint preparatları HPV varlığı ve tiplmesi yapılmak üzere çalışmaya dahil edilmiştir.

Çalışmamızda kit olarak Patho Gene DNA probe assay (Enzo Diagnostic, Inc) kullanılmış ve in situ hibridizasyon yöntemi ile HPV 6/11, 16/18 ve 31/33/51 tiplerinin varlığına bakılmıştır.

Kit içinde; HPV 6/11 doku kontrol lamı, HPV 16 probe kontrol lamı, hibridizasyon için ayıraçlar ve HPV alt tiplerine ait problemler ile çalışacağımız olguların kesitlerini almak için tek ve çift kuyucuklu teflon kaplı lamalar mevcuttur. Alınan biopsi örnekleri %10'luk Buffer- Formalinde fikse edilmeden önce Poly -L- Lysine ile kaplı altı ayrı lam üzerine imprintleri yapıp, %96'lık alkolde en az 15 dakika fikse edildikten sonra Papanicolaou (Pap) tekniği ile boyanarak hücreden zengin olanlar işaretlenmiştir. İn situ hibridizasyon uygulamak üzere her olgudan üç lam ayrılmıştır.

Daha sonra biopsi örnekleri, doku kesitlerini hazırlamak üzere %10'luk Buffer-Formalin solusyonunda 4-8 saat fikse edilmiş ve rutin doku takibine alınarak parafine gömülmüştür.

Doku Kesitlerine Uygulanan İn situ Hibridizasyon Yöntemi:

HPV'ün 6/11, 16/18 ve 31/33/51 tiplerini tayin etmek üzere her bir olgudan 4-6 mikronluk üç ayrı kesit hazırlanıp özel kuyucukları olan lamalar üzerine yerleştirilmiştir.

HPV 6/11 doku kontrol lamı ve olgulara ait lamalar 2-18 saat 60-80°C de fikse edildikten sonra deparafinize işlemi yapılmak üzere sırayla aşağıdaki solusyonlardan geçirilmiştir.

Xylen 10 dakika

X ylen 2 dakika

% 100 Alkol 1 dakika

% 100 Alkol 1 dakika

% 90 Alkol 1 dakika

% 70 Alkol 1 dakika

% 50 Alkol 1 dakika

Deionize suda 1 dakika indirgenen lamların deparafinizasyon işlemi tamamlanmıştır.

Deionize sudan çıkarılan lamlar 37°C de 5-10 dakika kurutulduktan sonra Proteinaz K stok solüsyonunun (20 m Mtris - HCl, 2mM Ca Cl₂) on kez sulandırılmasıyla elde edilen Proteinaz K çalışma solüsyonundan her bir lam üzerindeki kuyucuğa 0,33-0,4 ml ilave edilerek 37°C de 15 dakika bekletilmiştir.

Daha sonra lamlar üzerindeki sıvı akıtılıp Wash-Buffer ile (Bufferlanmış NaCl /EDTA) 1 dakika yıkanmıştır. Lam üzerindeki doku kesitlerinde peroksidaz aktivitesini inaktive etmek için lamlar üzerine 0,5 ml Quench ayırıcından (Bufferlanmış NaCl /EDTA içindeki %3'lük H₂ O₂) damlatılıp, 37°C de 10 dakika inkube edilmiştir.

Daha sonra bütün lamlar oda sıcaklığında sırasıyla aşağıdaki solusyonlardan geçirilerek dehidrate edilmiştir.

Deionize su 1 dakika

% 50 Alkol 1 dakika

% 70 Alkol 1 dakika

% 100 Alkol 1 dakika.

Böylece hibridizasyon ve boyama aşamasına hazırlanmış lamlar 37°C de kurutularak bir gece bekletilmiştir. Bu işlemlerden sonra doku kesitlerinin yerleştirildiği çift kuyucuklu lamların sağ taraflarındaki bölümlere ve HPV 16 probe kontrol lamına, biotinle işaretlenmiş HPV 16/18 DNA probe tiplerini içeren 1b solusyonundan bir damla, lamların sol taraflarındaki

bölümlerine ve HPV 6/11 doku kontrol lamına ise, biotinle işaretlenmiş HPV 6/11 DNA probe tiplerini içeren 1a solusyonundan bir damla damlatılmıştır.

Tek kuyucuklu lamlar üzerindeki kesitlere ise, biotinle işaretlenmiş HPV 31/33/51 DNA probe tiplerini içeren 1c solusyonundan bir damla damlatılıp, her bir kesitin üzeri lamel ile kapatılıp heating block ta 95°C de 8-10 dakika inkube edilmiştir. Lamlar üzerindeki lameller çıkartılmadan 37°C ye aktarılmış ve 20-30 dakika inkube edilmiştir. Böylece DNA denaturasyonu ve hibridizasyonu sağlanmış olur.

Daha sonra Wash Buffer ile yıkanarak lameller çıkarılmış, tekrar yıkama solusyonu ile yıkanıp kuyucukların etrafı kurulanmıştır. Kurulanmış lamlar üzerinde oluşan hibridizasyonları sabitlemek için post hibridizasyon ayırıcından (Bufferlanmış NaCl ve formamidden) 0,5 ml damlatıp 37°C de 10 dakika bekletilmiştir.

Lamlar üzerindeki hibridize olmamış problemleri uzaklaştırmak için üzerindeki sıvı akıtıldıktan sonra oda sıcaklığında 1'er dakika üç kez Wash Buffer ile yıkanıp iyice kurulanmıştır. Hedef nükleotidi saptamak için detection ayırıcından (NaCl içindeki biotinlenmiş horseradish peroksidaz) 0,5 ml damlatılıp 37°C de 15 dakika inkube edilmiştir.

Bu esnada renk reaksiyonu için Chromogen-Substrate solusyonu hazırlanmıştır. 37°C'de 15 dakikalık inkubasyondan çıkartılan bütün lamlar üç kez Wash-Buffer ile yıkanmış ve parçaların etrafı iyice kurulanmıştır. Lamlar üzerinde renk reaksiyonu oluşturan Chromogen-Substrate solüsyonunu hazırlamak için, reaksiyon Buffer/Substrate ayırıcına (Acetat Buffer içindeki H₂O₂) üç damla Chromogen ayırıcından (%2 lik 3 amino 9 ethylcarbazole) damlatılıp karıştırılmıştır. Bu hazırlanan karışımdan her bir lam üzerindeki bölüme 0,5 ml damlatılıp 37°C'de 15 dakika inkube edilmiş ve her bir lam üç defa 1'er dakika Wash-Buffer ile yıkanıp su ile çalkalanmıştır.

Daha sonra zıt boyama için Meyer's Hematoksilen ile 1 dakika boyanıp akarsuda yıkandıktan sonra Aqueous mounting medium (gliserol-jell) kullanılarak 22x22 mm boyutunda lameller ile kapatılmıştır.

Hazırlanan preparatlar ışık mikroskopunda 40 büyütmede incelenmiş, HPV'ün varlığı epitel hücrelerinin nükleuslarında pembe kırmızı veya tuğla kırmızısı boyanma göstermesi pozitif reaksiyon olarak kaydedilmiştir.

Imprint Preparatlarına Uygulanan In Situ Hibridizasyon Yöntemi:

Daha önce biopsi örneklerinden hazırlanan her olguya ait üç ayrı imprint preparat lamellerinin açılması için 24 saat xylende bekletilip lameller açıldıktan sonra sırasıyla aşağıdaki solusyonlardan geçirilmiştir.

Xylende 10 dakika

Xylende 2 dakika

% 100 Alkolde 1 dakika

% 90 Alkolde 1 dakika

% 70 Alkolde 1 dakika

% 50 Alkolde 1 dakika

Deionize suda 1 dakika bekletilip suya kadar indirgenme işleminden sonra Proteinaz K çalışma solusyonundan her lam üzerine 0,5 ml damlatılarak, 37°C de 4-5 dakika bekletilmiş ve sonra Wash-Buffer ile yıkanmıştır.

Bütün lamalar üzerindeki peroksidaz aktivitesini inaktive etmek için, metilalkol içindeki %0,06'lık H₂ O₂ solusyonundan bir damla damlatılıp, 37°C de 30 dakika inkübe edilmiş ve sonra dehidratasyon için sırasıyla aşağıdaki solusyonlardan geçirilmiştir.

Deionize su 1 dakika

%50 Alkol 1 dakika

%70 Alkol 1 dakika

%100 Alkol 1 dakika bekletildikten sonra lamalar 37°C de 10 dakika kurutulmuş, hibridizasyon ve boyama aşamasına hazırlanmıştır.

Daha sonra biopsi örneklerinden hazırlanan üç ayrı imprint preparatının birine HPV 6/11, diğerine, HPV 16/18 ve üçüncüsüne, HPV 31/33/51'in biotinlenmiş DNA probe tipleri damlatılarak lamaların üzeri lameller ile kapatılmıştır.

Lamlar DNA deneturasyonu için 95°C de 5 dakika, hibridizasyon için ise, 37°C de 16 saat inkube edilmiştir.

Ertesi gün inkubasyondan alınan lamlar Wash Buffer ile yıkanıp, üzerindeki lameller kaldırılmış ve posthibridizasyon ayırıcından 0,5 ml damlatılıp, 37°C de 10 dakika inkube edilmiştir.

Lamlar, üzerindeki hibridize olmamış problrarı uzaklaştırmak için Wash Buffer ile yıkanmışlar, kurutulan lamlarda hedef nükleotidi saptamak için detection ayırıcından 0,5 ml damlatılarak 37°C de 15 dakika inkube edilmiştir.

Daha sonra bütün lamlar Wash Buffer ile yıkanıp iyice kurulanmıştır. Renk reaksiyonu için daha önceden hazırlanan Chromogen Substrate solusyonundan her lam üzerine 0.5 ml damlatılıp 37°C de 15 dakika inkube edilmiştir.

Lamlar tekrar Wash Buffer ile yıkanarak ve su ile çalkalanarak zıt boyama için Meyer's Hematoksilen ile boyanmıştır. Üzerleri Aqueous mounthing medium (gliserol jell) kullanılarak 22x22 mm'lik lamelle kapatılmıştır.

Hazırlanan preparatlar ışık mikroskobunda 40 büyütmede incelenmiştir. Imprint preparatlarında HPV'un varlığı, epitel hücrelerin nükleuslarındaki pembe kırmızı boyanma ile saptanmıştır.

BULGULAR

Çalışmamızda klinik, radyolojik ve patolojik tetkikler sonucunda yedisine epidermoid karsinom, yedisine papillomatöz oluşum ve altısına lichen planus veya lökoplaki tanısı konan yirmi olgu değerlendirildi.

Olgu gurubumuzda HPV'ün 6/11, 16/18, 31/33 /51 tiplerinin varlığı, biopsilerden elde edilen parafin kesitlerde ve imprint preparatlarda in situ hibridizasyon yöntemi uygulanarak araştırıldı.

Olgular histopatolojik olarak değerlendirilirken diferansiyasyon, keratoz, koilositoz gibi kriterler göz önüne alındı. Sitolojik olarak imprint preparatlarda yeterli hücre bulunması ve koilositoz değerlendirildi.

Epidermoid karsinom tanısı konan yedi olgudan diferansiyasyon derecesi I olan bir olguda, orta derecede koilositoz ve ortokeratoz saptandı. Bu olgunun imprint preparatlarında yeterli hücre görülmediği için değerlendirilmedi. Parafin kesitlerde ise, in situ hibridizasyon yöntemi ile HPV pozitifliği saptanmadı.

Epidermoid karsinom tanısı konan ve diferansiyasyon derecesi II olan dört olguda, hafif derecede koilositoz görüldü, bu dört olgudan iki olguda parakeratoz, diğer iki olguda ise ortokeratoz saptandı. Olguların birinin imprint preparatında yeterli hücre görülmediği için değerlendirilmedi. Imprint preparatlarında yeterli hücre görülen üç olgudan birinde in situ hibridizasyon yöntemi ile HPV pozitifliği saptanmadı. Geriye kalan iki olgudan birinin imprint preparatında HPV 16/18 ve 31/33 /51 tiplerine **(Resim 1,2)**, diğer olguda ise HPV 31/33/51 tipine pozitiflik saptandı.

Diferansiyasyon derecesi II olan bu dört olgunun parafin kesitlerinde, sadece bir olguda in situ hibridizasyon yöntemi ile HPV 31/33/51 tipine pozitiflik saptanırken, diğer olgularda HPV pozitifliği saptanmadı.

Epidermoid karsinom tanısı konan ve diferansiyasyon derecesi III olan iki olguda, hafif derecede koilositoz, keratoz ve diskeratoz saptandı. Bu olguların imprint preparatlarında ve parafin kesitlerinde ise, in situ hibridizasyon yöntemi ile HPV pozitifliği saptanmadı.

Epidermoid karsinom tanısı konan toplam yedi olgunun yaşları 31 ile 72 arasında değişmekte olup, üç olguda sigara içme ve alkol kullanma alışkanlığı olduğu tespit edildi ve bu alışkanlıklara sahip hastaların birinde HPV varlığı saptandı. Yedi epidermoid karsinom olgusundan birinde, sadece sigara içme alışkanlığı olup, bu olguda da HPV pozitifliği tespit edildi (Tablo 2).

Tablo 2: Epidermoid karsinom olgularının lokalizasyon, diferansiyasyon koilositoz, keratoz dağılımı ve parafin kesit ile imprint preparatlarında HPV 6/11,16/18 ve 31/33/51 tiplerinin pozitifliği

Histopatolojik Soruç	Lokalizasyon	Diferansiyasyon	Parafin Kesit				Imprint Preparat				
			Koilositoz	Keratoz	HPV			Yeterli Hücre Gördülen Imprint Preparatı	HPV		
					6/11	16/18	31/33/51		6/11	16/18	31/33/51
Epidermoid Karsinom	Üst Dudak	III	Hafif	Diskeratoz	-	-	-	+	-	-	-
Epidermoid Karsinom	Alt Dudak	I	Orta	Oriskeratoz	-	-	-	-	-	-	-
Epidermoid Karsinom	Lingual Mukozal	III	Hafif	Keratotik	-	-	-	+	-	-	-
Epidermoid Karsinom	Lingual Mukozal	II	Hafif	Oriskeratoz	-	-	-	+	-	-	-
Epidermoid Karsinom	Lingual Mukozal	II	Hafif	Parakeratoz	-	-	-	+	-	+	+
Epidermoid Karsinom	Lingual Mukozal	II	Hafif	Parakeratoz	-	-	+	+	-	-	+

Papilloma tanısı konan toplam yedi olgudan üç olguda, hafif derecede koilositoz ve hiperkeratoz saptandı. Bu olguların ikisinin imprint preparatında yeterli hücre görülmediği için değerlendirilmedi. Yeterli hücre görülen bir olguda in situ hibridizasyon yöntemi ile HPV pozitifliği saptanmadı. Aynı olguların parafin kesitlerinde ise, bir olguda in situ hibridizasyon yöntemi ile HPV 6/11, diğer bir olguda, yine aynı yöntemle HPV 31/33/51 pozitifliği saptandı. Diğer olguda ise HPV pozitifliği saptanmadı.

Papillom tanısı konan iki olguda, orta derecede koilositoz, hiperkeratoz, ve ortokeratoz saptandı. Bu olguların imprint preparatlarında, in situ hibridizasyon yöntemi ile HPV pozitifliği saptanmadı. Her iki olgunun parafin kesitlerinde ise, in situ hibridizasyon yöntemi ile HPV 6/11 pozitifliği saptandı (**Resim 3**).

Papillom tanısı konan diğer iki olguda, çok ileri derecede koilositoz, hiperkeratoz ve parakeratoz saptandı. Bu olguların birinin imprint preparatı, yeterli hücre görülmediği için değerlendirilmedi. Imprint preparatında yeterli hücre görülen olguda, in situ hibridizasyon yöntemi ile HPV pozitifliği saptanmadı. Bu iki olgunun parafin kesitlerinde ise, in situ hibridizasyon yöntemi ile HPV pozitifliği saptanmadı.

Papillom tanısı konan toplam yedi olgunun yaşları 15 ile 72 arasında değişmekte olup, iki olguda kronik sigara içme ve alkol kullanma alışkanlığı tespit edildi ve bu olguların her ikisinde de HPV'e karşı pozitiflik tespit edildi. Olguların birinde, sadece sigara alışkanlığı tespit edildi ve bu olguda HPV pozitifliği bulunmadı (**Tablo 3**).

Tablo 3: Papillom olgularının lokalizasyon, koilositoz, keratoz dağılımı ve parafin kesit ile imprint preparatlarındaki HPV 6/11,16/18 ve 31/33/51 tiplerinin pozitifliği

Histopatolojik Sonuç	Lokalizasyon	Parafin Kesit					Imprint Preparatı			
		Koilositoz	Keratoz	HPV			Yeterli Hücre Gördüğü Imprint Preparatı	HPV		
				6/11	16/18	31/33/51		6/11	16/18	31/33/51
Papilom	Sert Damak	Orta	Orta	+	-	-	+	-	-	-
Papilom	Yumuşak Damak	Çok	Parakeratoz	-	-	-	-	-	-	-
Papilom	Alt Dudak	Hafif	Hiperkeratoz	-	-	-	-	-	-	-
Papilom	Yanak Mukozası	Çok	Hiperkeratoz	-	-	-	+	-	-	-
Papilom	Yanak Mukozası	Hafif	Hiperkeratoz	-	-	+	-	-	-	-
Papilom	Yanak Mukozası	Hafif	Hiperkeratoz	+	-	-	+	-	-	-
Papilom	Yanak Mukozası	Orta	Hiperkeratoz	+	-	-	+	-	-	-

Lichen planus veya lökoplaki tanısı konan toplam altı olgudan iki olguda, orta derecede koilositoz, hiperkeratoz ve parakeratoz saptandı. Bu olguların her ikisinde de imprint preparatlarda yeterli hücre görülmediği için değerlendirilmedi. Parafin kesitlerinde, sadece bir olguda in situ hibridizasyon yöntemi ile HPV 6/11, 16/18 pozitifliği saptandı.

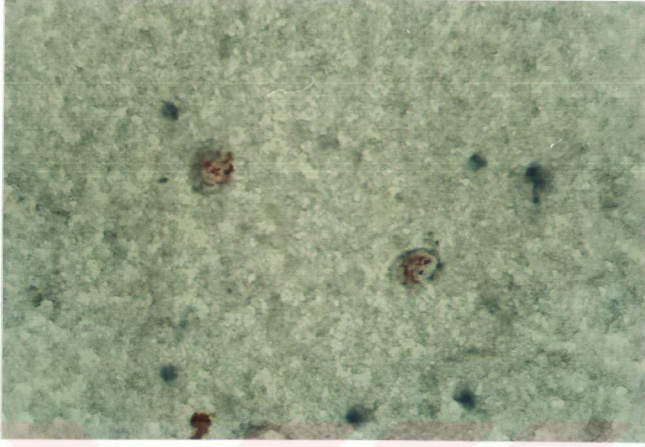
Lichen planus veya lökoplaki tanısı konan dört olguda hafif derecede koilositoz, hiperkeratoz ve parakeratoz saptandı. Bu olguların üçünün imprint preparatlarında yeterli hücre görülmediği için değerlendirilmedi. Diğer bir olgunun imprint preparatında, in situ hibridizasyon yöntemi ile HPV 31/ 33/51 pozitifliği saptandı.

Bu olguların parafin kesitlerinde ise, in situ hibridizasyon yöntemi ile bir olguda HPV 16/18 (**Resim 4**), bir olguda da HPV 31/33/51 pozitifliği saptandı. Diğer iki olguda, in situ hibridizasyon yöntemi ile HPV pozitifliği saptanmadı.

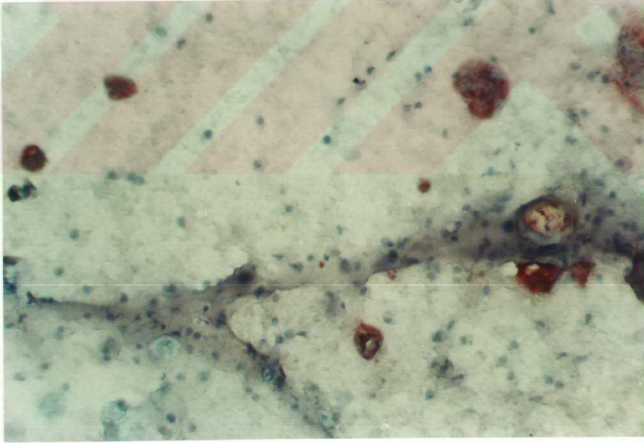
Lichen planus veya lökoplaki tanısı konan toplam altı olgunun yaşları 32 ile 50 arasında değişmekte olup, dört olguda kronik sigara ve alkol alışkanlığı vardı ve bu olguların ikisinde de HPV pozitifliği saptandı. Olguların birinde, sadece alkol alışkanlığı olup, bu olguda da HPV pozitifliği tespit edildi (**Tablo 4**).

Tablo 4: Lichenplanus ve lökoplaki olgularının lokalizasyon, koilositoz, keratoz dağılımı ve parafin kesit ile imprint preparatlarında HPV 6/11,16/18 ve 31/33/51 tiplerinin pozitifliği

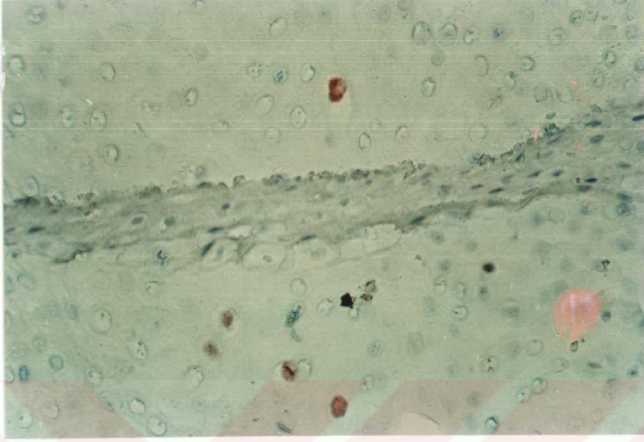
Histopatolojik Sonuç	Lokalizasyon	Parafin Kesit						Imprint Preparatı			
		Koilositoz	Keratoz	HPV			Yeterli Hücre Görülen Imprint Preparatı	HPV			
				6/11	16/18	31/33/51		6/11	16/18	31/33/51	
LichenPlanus	Yanak Mukozası	Hafif	Hiperkeratoz	-	-	-	-	-	-	-	-
LichenPlanus	Yanak Mukozası	Orta	Parakeratoz	-	-	-	-	-	-	-	-
Lökoplaki	Yanak Mukozası	Hafif	Hiperkeratoz	-	-	+	-	-	-	-	+
Lökoplaki	Ait Dudak	Orta	Hiperkeratoz	+	+	-	-	-	-	-	-
Lökoplaki	Ait Dudak	Hafif	Parakeratoz	-	+	-	-	-	-	-	-
Lökoplaki	Ait Dudak	Hafif	Hiperkeratoz	-	-	-	-	-	-	-	-



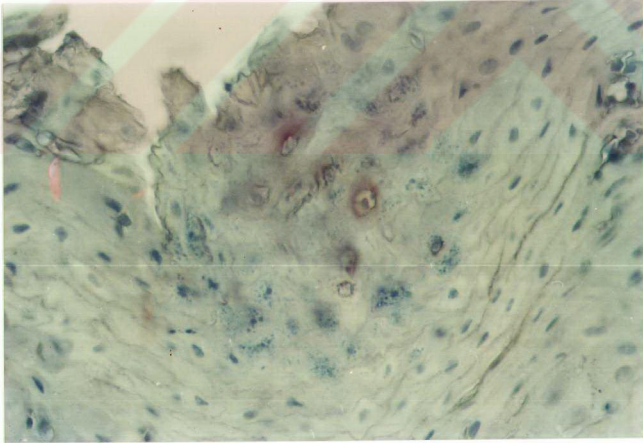
Resim 1: Epidermoid karsinom tanısı konan olgunun imprint preparatında ISH yöntemi ile HPV 6/18 tiplerine pozitiflik görülmektedir.(X 400)



Resim 2: Epidermoid karsinom tanısı konan olgunun imprint preparatında ISH yöntemi ile HPV 31/33/51 tiplerine pozitiflik görülmektedir. (X400)



Resim 3: Papillom tanısı konan olgunun parafin kesitinde ISH yöntemi ile HPV 6/11 tiplerine pozitiflik görülmektedir. (X 250)



Resim 4: Lökoplaki tanısı konan olgunun parafin kesitinde ISH yöntemi ile HPV 16/18 tiplerine pozitiflik görülmektedir.(X 250)

TARTIŞMA

Human papillomavirüsler heterojen bir virüs grubudur. Bugüne kadar altmışbeşten fazla genotipi saptanmıştır. Hayvanlar üzerinde yapılan deneysel çalışmalarda bu virüslerin bir kofaktör olarak onkogeneze rol oynadıkları gösterilmiştir (1,2,8).

HPV'lerin onkojenik rolleri ile ilgili yapılan çalışmaların büyük bir bölümü servikal lezyonlar ile ilgilidir. Son on yıldır yapılan çalışmalarda servikal lezyonlarda HPV alt tiplerinin saptanması ve bu alt tipler ile lezyonun cinsi arasındaki bağlantılar, çeşitli moleküler biyoloji teknikleri ve epidemiyolojik çalışmalar ile kanıtlanmıştır (22,51,70, 83).

Serviks kanserlerinin %90'ında HPV varlığının tespit edilmiş olması, genital bölge mukozası ile aynı histolojik yapıyı gösteren oral mukozanın selim ve malign lezyonlarının gelişiminde HPV'ün etyolojik rolünü gündeme getirmiştir (77).

1981 yılından itibaren Kellokoski ve ark. tarafından başlatılan bir çalışmada genital HPV infeksiyonu olan kadınlarda oral mukozadaki değişiklikler ve oral lezyonlarda da HPV varlığı araştırılmıştır. Bu çalışmanın epidemiyolojik değerlendirilmesinde genital HPV infeksiyonu olan olguların, oral mukozalarında %23 oranında HPV bulunabileceği gösterilmiştir. Bu çalışmanın sonucunda HPV'e karşı bir çeşit spesifik immunosupresyon olabileceği düşünülmüştür (30,31).

Günümüzde çeşitli HPV tiplerinin oral mukozal lezyonlarda da gösterilmesi ile, bu virüslerin doğum sırasında annenin genital bölgesindeki HPV enfeksiyonu ile kazanıldığı ve uzun süre latent kaldığı üzerinde durulmaktadır (23,74).

Nükleik asit hibridizasyon yöntemi kullanılarak yapılan çalışmalarda bazı HPV tiplerinin çocuklarda erişkinlerden daha fazla saptandığı bildirilmiştir (27). Servikal karsinomların etyolojisinden sorumlu tutulan HPV 16 DNA'sının, konak hücre genomuna integre olarak karsinogenezde rol oynadığı gösterilmiştir. Buna karşılık baş boyun bölgesi kanserlerinde HPV'nin etyolojik rolünü açıklamak için yapılan çalışmalarda, HPV 16 DNA'sının konak hücrede hem epizomal tarzda, hemde genoma integre tarzda bulunduğu gösterilmiştir. Buna dayanarak HPV'nin oral mukozada uzun süre epizomal olarak latent kalabileceği ve bazı karsinogen ve kokarsinogenlerle birlikte multikarsinogen bir interaksiyon sonucu tümöral bir gelişimin başlamasından ve gelişmesinden sorumlu olabileceği belirtilmiştir (7,31,74).

Sigara ve alkol kullanımının oral epitelyal displazi ve malignite gelişiminde etyolojik rolü olduğu daha önceden yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (7,10,60,78,).

Kronik sigara/tütün ve alkol kullanımı ile birlikte HPV varlığını araştırmak için yapılan çalışmalarda, sigara ve alkol kullanımı ile birlikte HPV pozitif bulunan epidermoid karsinom olgularının en geniş grubu (%70,6) oluşturduğu bildirilmiştir (7).

Abdelsayed ve ark. yaptıkları bir çalışmada, alkol ve sigara alışkanlığı olmayan, epidermoid karsinom olgularında HPV saptayamadıklarını, buna karşılık alkol ve sigara kullanan grupta HPV varlığı saptadıklarını belirtmişler, alkol ve sigara kullanımı ile birlikte HPV varlığının karsinom gelişiminde sinerjik etkisi olduğunu bildirmişlerdir (1).

Ağız boşluğunun birçok karsinogen ve kokarsinogene açık bir ortam olması ve ağız boşluğundaki lezyonların asemptomatik olmalarından dolayı, erken biopsi alınarak teşhis edilmeleri, selim ve prekanseröz

lezyonlarda bir malign değişim olup olmadığının takibi açısından önem taşımaktadır.

Ağız boşluğunun mukozal lezyonlarından papillomlar, verruco vulgarisler, epitelial hiperplaziler, lichen planuslar, lökoplakiler ve kanserlerden elde edilen biopsi örneklerinde moleküler biyoloji yöntemleri kullanılarak çeşitli HPV tiplerinin varlığı tespit edilmiştir. HPV tip 1,2,4,6,7,11,13,16,18,30,31,33,51, ve 57'nin ağız mukozasında bulunduğu çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilmektedir (6,30,57,67,79,82).

Yapılan çeşitli araştırmalarda HPV 6/11 ve 16/18'in prekanseröz lezyonlarda ve kanserlerde rastlanan en yaygın HPV tipleri olduğu bildirilmiştir (6,29,67).

HPV tiplerinin saptanması ve yüksek risk gruplarının belirlenmesi, prekanseröz lezyonlardaki malign değişimleri takip etmek açısından önemlidir.

Bu lezyonların HPV tiplerini saptamada kullanılacak yöntemin duyarlı ve pratik olması da önem taşımaktadır. Yapılan çalışmalarda PCR'ın daha hassas bir yöntem olarak belirtilmesine karşılık yöntemin uzun sürmesi bir dezavantaj teşkil etmektedir.

İn situ hibridizasyon yöntemi ile frozen kesitte, formalde fikse parafin kesitlerde ve sitolojik preparatlarda HPV DNA'sını yada RNA'sını saptamak mümkündür.

Bu yöntem, HPV'ün spesifik tiplerinin saptanabilmesinde hızlı, güvenli, ekonomik ve normal güçte ışık mikroskopunda değerlendirme yapılabilmesini sağlar. Parafin kesitlerle çalışılması hem retrospektif, hem de prospektif çalışmaya olanak sağlamaktadır. İn situ hibridizasyon yöntemi ile HPV DNA'sı hücre nükleusunda tespit edilmekte ve böylece virüsle infekte hücrenin belirlenmesi sağlanmaktadır. Ayrıca bu yöntemde HPV'ün spesifik tiplerine ait problemler ayrı ayrı kullanılarak aynı doku içindeki değişik HPV tipleri saptanabilmektedir.

İn situ hibridizasyon yönteminde kullanılan ayıraçların radyoaktif olmamasından dolayı laboratuvar çalışanlarına zararlı etkisi yoktur. İn situ hibridizasyon yöntemi imprint preparatlarda ve doku kesitlerinde HPV

varlığını göstermesi ve pozitif sinyalleri nükleus içinde gerçekleştirmesi ve bunun ışık mikroskobunda değerlendirilmesi nedeniyle güvenli bir yöntemdir.

Biz de çalışmamızda bütün bu olumlu özelliklerinden dolayı alternatif diğer yöntemlere rağmen, zararlı etkisinin olmaması, ekonomik olması ve kısa süreli laboratuvar çalışması gerektirmesi nedeniyle in situ hibridizasyon yöntemi ile çalışmayı tercih ettik.

1985 yılında, De Villiers ve ark. tarafından southern blot analiz yöntemi kullanılarak yapılan bir çalışmada yedi dil karsinomu olgusundan birinde HPV 2, ikisinde HPV 16 varlığı tespit edilmiştir (15).

1986 yılında, Syrjanen ve ark. oral lezyonlardan papillom, prekanseröz lezyonlar ve kanserlerde HPV'ün alt tiplerini saptamak üzere in situ hibridizasyon yöntemini kullanarak yaptıkları çalışmalarında papillomlarda genellikle HPV 6/11'in, prekanseröz lezyonlarda HPV 6 ile 16'nın, karsinomlarda da HPV 16'nın pozitif bulunduğunu bildirmişler ve HPV DNA tiplerini tespit etmede in situ hibridizasyon yönteminin güvenilir bir yöntem olduğunu bildirmişlerdir (65).

1987 yılında, Eversole ve ark. oral verruco vulgaris olgularında in situ hibridizasyon yöntemi ile HPV tiplerini araştırmışlar ve yirmi olgudan onikisinde HPV 2 pozitifliği bulmuşlardır(17).

Premoli-de-Perruco ve ark. verruco vulgarisli hastalarda in situ hibridizasyon yöntemini kullanarak HPV 6,11,16,18 karışık probe ile %90'lık pozitiflik saptamışlardır (53).

1988 yılında, Gassensmaier ve ark. tarafından in situ hibridizasyon yöntemi ile oral lezyonlarda HPV tiplerini belirlemek amacıyla yapılan çalışmada, selim lökoplakilerin %10'unda, prekanseröz lökoplakilerin %18'inde ve epidermoid karsinomların %23'ünde HPV 6/11 ve 16'nın varlığı gösterilmiştir (20).

Yapılan bazı çalışmalarda da oral papillom olgularında HPV 6/11 varlığının kesin olduğu, ancak karsinomlarda HPV tiplerinin hiçbirinin bulunamadığı bildirilmiştir (1,67,80).

1991 yılında, Shroyer ve ark. HPV DNA'sının tespiti için PCR ve ISH yöntemlerini karşılaştırmışlardır. In situ hibridizasyon yöntemi ile sekiz

oral karsinom olgusunun yedisinde HPV 16 pozitifliği, birinde HPV 31/33/35 varlığı saptamışlar, aynı olguları PCR yöntemi ile değerlendirdiklerinde ise, sekiz olgusunun hepsinde HPV 16'nın bulunduğunu ve bir olguda bunun yanı sıra HPV 31/33/35 varlığını göstermişlerdir. Yazarlar, in situ hibridizasyon yöntemi ile DNA kopyası daha fazla sayıda olan HPV tipinin pozitif sonuç verdiğini, buna karşılık PCR yönteminde DNA kopyası az sayıda olan bir HPV tipinin dahi tespit edilebileceğini bildirmişlerdir (62).

Miller ve ark. (1991), PCR ve ISH yöntemlerini karşılaştırmak amacı ile yaptıkları bir çalışmada ise, oral karsinom olgularında ISH ile HPV 16/18 varlığını tespit edememelerine karşılık, PCR yöntemi ile olguların 20/30'unda HPV 16/18 varlığını tespit etmişler ve PCR'ın daha güvenilir bir yöntem olduğunu bildirmişlerdir (46).

Yapılan pek çok çalışmada ISH yönteminin PCR yöntemi kadar güvenilir bir yöntem olduğu, aynı zamanda methodun daha pratik olması nedeniyle HPV pozitifliği saptanan prekanseröz lezyonların takibinde avantajları olduğu vurgulanmaktadır (18,37,49,62).

Bu çalışmaların ışığı altında, çalışmamızda papillom, lökoplaki ve epidermoid karsinom tanısı konulan olgularda ISH yöntemi ile HPV alt tiplerinin varlığını araştırdık.

Çalışmamıza dahil ettiğimiz yedi papillom olgusundan üç olguda HPV 6/11 varlığını, bir olguda da HPV 31/33/51 varlığını tespit ettik. Bu konuda yapılan diğer çalışmalarda da papillom olgularında HPV 6/11 pozitifliğinin yüksek olduğu bildirilmektedir (1,65,67,80).

Lichen planus veya lökoplaki tanısı konan altı olgudan birinde, HPV 6/11 ve 16/18'i, bir olguda 16/18'i ve bir diğer olguda da HPV 31/33/51'i pozitif olarak saptadık. Bu bulgularımızda kaynaklardaki bulgular ile uygunluk göstermektedir (20,65,80). Ayrıca daha çok kanser olgularında tespit edilen HPV 16/18 pozitifliğinin, lökoplaki olgularında da ortaya çıkması lezyonun daha dikkatli takip edilmesi gerektiğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda yedi epidermoid karsinom olgusunun birinde HPV 16/18 varlığını tespit ettik, bir olguda da HPV 31/33/51'e pozitiflik saptadık.

Bu veriler HPV'nin tipleri açısından kaynaklardaki bulgular ile karşılaştırıldığında Abdalsayed (1), Tsuchiya (67), Young (80) tarafından bulunan sonuçlara uymakta, Shayer (62) ve Miller (46) tarafından bulunan sonuçlara ise uygunluk göstermemektedir.

Sonuç olarak toplam yirmi olgudan dokuzunda HPV DNA'sının çeşitli alt tiplerinin varlığını tespit ettik. Onbir olgudaki negatif sonucu ise, ya preparatlarda hiç HPV DNA'sı bulunmamasına veya lezyonun farklı bölgelerindeki hücrelerde bulunabileceğine yada bizim kullandığımız probe tiplerinden farklı bir HPV tipini içeriyor olmasına bağlamaktayız.

Yapılan çalışmalarda servikal lezyonların %90'ından fazlasının etyolojisinden sorumlu tutulan HPV tiplerinin, rutin sitolojik değerlendirmeler sırasında tespit edilmesinin, bu lezyonların teşhis ve takibinde çok önemli bir yaklaşım olduğu ortaya atılmıştır (24).

Araştırmacılar çeşitli sitolojik materyal elde etme metodlarını kullanarak, sitolojik preparatlarda in situ hibridizasyon yöntemini kullanmışlar ve HPV alt tiplerinin varlığını göstererek, sitolojik materyallerde HPV varlığını ISH yöntemi ile tespit etmenin kolay ve güvenli bir yöntem olduğunu vurgulamışlardır (5,21,24,52).

Oral lezyonlarda da biopsiye gerek olmadan sitolojik materyallerde viral bir etyolojinin varlığını araştırmak için pek çok çalışma yapılmıştır (35,42,44).

Lawton ve ark., oral mukozada HPV varlığını araştırmak için örnek elde etme metodlarını karşılaştırmışlar ve klinik olarak ağız çalkalama sıvısına dökülen hücrelerde, buccal, lingual, palatinal kazıma yapılarak elde edilen hücrelerde ve biopside PCR yöntemi ile HPV varlığına bakmışlardır. Ağız çalkalama sıvısından yeterli hücre elde edilen kırkdokuz olgudan yirmibeşinde (%51), kazıma ile materyal elde edilen elliüç olgudan yirmidördünde (%45), biopsi alınan ellidokuz olgudan sadece yedisinde (%12) çeşitli HPV DNA tiplerini tespit ettiklerini bildirmişler ve sitolojik örnek elde edilerek oral lezyonların takibinin daha kolay olduğunu ifade etmişlerdir (36).

Chang (6) ve Kefloski (30) çalışmalarında, oral lezyonlarda HPV infeksiyonunun patognomanik morfolojik değişiklikleri olarak koilositik yada balon hücreleri diye adlandırılan değişikliklerden bahsetmişlerdir. Koilositozu HPV infeksiyonunun morfolojik bir kriteri olarak belirtmişlerdir. HPV infeksiyonunda diğer bir sitolojik değişikliğin de parakerototik (diskeratotik) hücreler olduğunu bildirmişlerdir.

Biz de çalışmamızda her olgudan sitolojik materyal alarak HPV varlığını saptamayı amaçladık. Ancak yirmi olgudan sadece onunda yeterli sitolojik materyal elde ederek, bunların üçünde HPV varlığını gösterdik. Örnek elde edemediğimiz olguların çoğunu lichen planus veya lökoplaki tanısı konan grup oluşturmaktaydı.

Lichen planuslardan veya lökoplakilerden elde edilen sitolojik materyallerde hücrelerin çok hiperkeratotik olduğu ve çoğunun nukleus içermediği de kaynaklarda ifade edilmiştir (83). Bizim olgularımızda da bu lezyonlardan elde edilen sitolojik preparatlardaki tanı koydurucu hücreler az ya da çok hiperkeratotik ve nukleussuz hücrelerden oluşmakta idi.

Sitolojik materyal elde edebildiğimiz toplam on olguda ayrıca koilositoz ve keratozu da değerlendirdik. Olguların çoğunluğu hafif ve orta derecede koilositoz, hiperkeratoz ve parakeratoz göstermekte idi. Bu bulgularımızda kaynaklarla uyum sağlamaktadır (6,30,82).

Yapılan çalışmalarda, HPV'ün kronik sigara ve alkol kullanımı ile birlikte sinerjik bir etki göstererek oral lezyonların oluşumunda rolü olduğu bildirilmiştir. Bizim sonuçlarımıza göre HPV'ün herhangi bir tipine karşı pozitiflik saptadığımız dokuz olgudan dördünde, sigara ve alkol kullanma alışkanlığı, bir olguda sadece sigara, bir olguda sadece alkol kullanma alışkanlığının olduğunu tespit ettik. HPV tiplerinden herhangi birine karşı pozitif reaksiyon elde ettiğimiz toplam dokuz olgunun altısında, sigara ve/veya alkol alışkanlıklarını saptadık. Bu bulgularımız daha önce yapılan çalışmalar ile paralellik göstermektedir (1,7,74).

Sonuç olarak ağız boşluğunun selim, prekanseröz lezyonları ve kanserlerini içeren yirmi olgunun dokuzunda HPV DNA'sının spesifik tiplerine karşı pozitif reaksiyon elde ettik.

Bu güne kadar yapılan bir çok çalışmada ağız boşluğunun selim, prekanseröz lezyonları ve kanserlerinde virüslerin etyolojik rolü olduğu bildirilmiştir (10,19).

Ağız boşluğunun birçok kokarsinojen, karsinojen maddelere açık bir ortam olması ve sürekli mikro travmalara maruz kalması nedeniyle bu bölgedeki lezyonların malign bir değişim gösterip göstermediğini takip etmek önemlidir. Ayrıca bu lezyonların etyolojisinden sorumlu tutulan HPV gibi önemli bir faktörü, biopsiye gerek kalmadan sitolojik materyallerde ISH gibi kolay uygulanabilen bir yöntem ile tespit etmek mümkün olmaktadır. Riskli grupların erken teşhis edilmesi ve takibi ile, kanserli olgularda tedavi öncesi ve sonrası takipte bu yöntemin rutin olarak kullanılabileceği düşüncesindeyiz.

Çalışmamızın aynı zamanda, viral etyolojinin tespit edildiği ağız boşluğunun selim ve prekanseröz lezyonlarında ve kanserlerinde medikal tedavi yöntemlerini geliştirmek amacıyla yapılacak yeni çalışmalara ışık tutacağı kanısındayız.

SONUÇLAR

Ağız mukozasının selim, prekanseröz ve maling lezyonlarında HPV 6/11,16/18 ve 31/33/51 tiplerinin varlığını in-situ hibridizasyon yöntemini kullanarak araştırdığımız çalışmamızın sonuçlarını şu şekilde özetleyebiliriz.

Epidermoid karsinom tanısı konan toplam yedi olgunun parafin kesitlerinde, sadece bir olguda HPV 31/33/51 tipine pozitiflik tespit edildi. İmprint preparatlarında yeterli hücre görülen beş epidermoid karsinom olgusunun birinde HPV 16/18 ve 31/33/51 tiplerine, bir olguda ise, parafin kesitle uyumlu olarak HPV 31/33 /51 tiplerine pozitiflik tespit edildi.

Papilloma tanısı konan toplam yedi olgunun ikisinin parafin kesitlerinde, HPV 6/11 tiplerine, bir olguda ise, HPV 31/33/51 tiplerine pozitiflik tespit edildi. İmprint preparatlarında yeterli hücre görülen dört papillom olgusunun hiç birinde HPV pozitifliği tespit edilmedi.

Lichen planus veya lökoplaki tanısı konan altı olgunun parafin kesitlerinde, bir olguda HPV 16/18'e, bir olguda HPV 6/11, 16/18 ve bir olguda da HPV 31/33/51 tiplerine pozitiflik tespit edildi. Sadece bir olgunun imprint preparatında yeterli hücre görüldü ve bu olguda da parafin kesitle uyumlu olarak HPV 31/33/51 tipine pozitiflik tespit edildi.

Çalışmamızda HPV DNA'sına karşı pozitif sonuç elde edilmemesini; viral bir etyolojinin olmamasına, HPV DNA'sının lezyonun farklı bölgelerindeki hücrelerde bulunabileceğine veya lezyonların farklı HPV tiplerini içeriyor olmasına bağladık.

ÖZET

İnsan deri ve mukozasında bir çok lezyona neden olan HPV, epitel hücrelerine yönelik (epitheliotropik) bir virüstür. Yapılan çalışmalarda ağız boşluğundaki selim, prekanseröz ve kanserli bölgelerden alınan biopsilerden hazırlanan parafin kesitlerde HPV 6/11,16/18 ve 31/33/51 tiplerine daha sık rastlanılmıştır.

Çalışmamızda ağız mukozasının selim, prekanseröz lezyonları ve kanserlerinde HPV varlığını in-situ hibridizasyon yöntemi ile araştırmayı amaçladık.

Klinik, radyolojik ve patolojik tetkikler sonucunda olguların yedisine epidermoid karsinom, yedisine papillomatoz oluşum ve altısına lichen planus veya lökoplaki tanısı konularak toplam yirmi olgu çalışmaya dahil edildi.

Çalışmamıza dahil edilen yirmi olgudan hazırlanan parafin kesitler ve imprint preparatlarında kit olarak Patho Gene DNA probe assay (Enzo Diagnostic, Inc) kullanıldı ve in-situ hibridizasyon yöntemi ile HPV 6/11,16/18 ve 31/33/51 tiplerinin varlığına ışık mikroskopunda bakıldı.

Çalışmamıza dahil ettiğimiz olgular İ.Ü. Dişhekimliği Fakültesi Ağız, Diş, Çene Hastalıkları ve Cerrahisi ABD kliniklerine ve İ.Ü. Tıp Fakültesi Plastik ve Rekonstruktif Cerrahisi ABD'na müracat eden hastalardan seçildi. Toplam yirmi hastadan biopsi alındı ve patolojik tetkik için materyaller, İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü Tümör Patolojisi ve Onkolojik Sitoloji laboratuvarlarında histopatolojik ve sitolojik olarak değerlendirildi.

Sonuç olarak epidermoid karsinom tanısı konan yedi olgudan ikisinde HPV pozitifliği tespit edildi. Papillom tanısı konan yedi olgudan

dördünde HPV pozitifliği bulundu. Lichen planus veya lökoplaki tanısı konan toplam altı olgudan sadece üç olguda HPV pozitifliği saptandı.

HPV varlığının ağız boşluğundaki lezyonlarda mikrotravmalar, mikroorganizmalar ve kimyasal faktörler ile birlikte malignite gelişiminde sinerjistik rol oynayacağını düşünmekteyiz.



SUMMARY

HPV is an epitheliotropic virus, predominantly associated with human skin and mucosal lesions. In many studies the presence of HPV types 6/11, 16/18 and 31/33/51 have been demonstrated in oral benign, precancerous lesions and carcinomas.

The purpose of our study is to find out the presence of HPV with in situ hybridization in these lesions.

In the present study biopsy specimens and cytological material of twenty patients were used. Tissue specimens were obtained from patients receiving treatment in the Istanbul University, Faculty of Dentistry, Oral Surgery Department and Istanbul University, Faculty of Medicine, Plastic and Reconstructive Surgery Department. All of the patients were investigated clinically, radiologically and histopathologically. All biopsies were examined at the Istanbul University, Oncology Institute, Department of Tumor Pathology and Cytology. Seven of the twenty specimens were diagnosed as epidermoid carcinoma, seven as papilloma and six as lichen planus or leucoplakia histopathologically.

In situ hybridization technique was used to detect the presence of HPV types 6/11, 16/18 and 31/33/51 with Patho Gene DNA probe assay kit (Enzo Diagnostic, inc). The parafin sections and imprint slides were evaluated for the presence of mentioned HPV types, under light microscope.

As a result, two of the seven specimens from patients with epidermoid carcinomas were positive for different HPV types. Four of the seven papilloma specimens and three of the six lichen planus and various HPV types.

In conclusion it can be stated that the presence of HPV in the oral lesions may act synergistically with microtraumas, micro-organisms and chemical factors in the development of malignancy.



KAYNAKLAR

- 1- Abdelsayed R A. Study of human papillomavirus in oral epithelial dysplasia and epidermoid carcinoma in the absence of tobacco and alcohol use. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1991; 71: 730-732.
- 2- Beutner KR. Human papillomavirus infection. *J Am Acad Dermatol* 1989; 20: 114-123.
- 3- Bhaskar SN. *Synopsis of Oral Pathology*. Fourth edn. St. Lous: Mosby, 1973: 339-489.
- 4- Cawson RA. *Essentials of Dental Surgery and Pathology*. Fifth edn. Edinburg: Churcill Livingstone, 1991: 359-394.
- 5- Cecchini S, Cipparrone I, Confortini M, Scuderi A, Melni L, Prazzesi G. Urethral cytology of cytobrush specimens a new technique for dedecting subclincal human papillomavirus infection in men. *Acta Cytol* 1988; 32: 314-317.
- 6- Chang F, Syrjanen S, Kellokoski J, Syrjanen K. Human papillomavirus (HPV) infections and their associations with oral disease. *J Oral Pathol Med* 1991;20: 305-317.
- 7- Chang K-W, Chang C-S, Lai K-S, Chou M-J, Choo K-B. High prevalence of human papillomavirus infection and possible association with Betel Quid cheving and smoking in oral epidermoid carcinomas in Taiwan. *J Med Virol* 1989; 28: 57-61.
- 8- Cole ST, Danos O. Nucleotid sequence and comparative analysis of the human papillomavirus type 18 genome. *J Mol Biol* 1987; 193: 599-608.
- 9- Cox M, Eveson J, Scully C. Human papillomavirus type 16 DNA in an odontogenic keratocyst. *J Oral Pathol Med* 1991;20: 143-145.

- 10- Cox MF, Scully C, Maitland N. Virus in the aetiology of oral carcinoma? Examination of the evidence. *Br J Oral and Maxillofac Surg* 1991; 29: 381-387.
- 11- Cox M, Maitland N, Scully C. Human herpes simplex-1 and papillomavirus type 16 homologous DNA sequences in normal, potentially malignant and malignant oral mucosa. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 1993 :29:215-219.
- 12- Crawford L. *The molecular pathology of cancer*. New York : Cold Spring Harbor Lab. Press, 1993: 215-227.
- 13- Dalglish A G. *Viruses and Cancer*. *British Medical Bulletin* 1991:47: 21-46.
- 14- Dean M, Vande Woude G F. Principles of molecular cell biology of cancer: Introduction to Methods in Molecular Biology. In: De Vita VT , Helmann S, Rosenberg SA. *Cancer principles & practice of oncology* . Third edn. Philadelphia: JB Lippincott company, 1989:14-30.
- 15- De Villiers EM, Weidauer H, Otto H, Zur Hausen H. Papillomavirus DNA in human tongue carcinomas. *Int J Cancer* 1985:36:575-78.
- 16- De Villiers EM. Heterogeneity of the Human papillomavirus group. *J Virol* 1989: 63: 4898-903.
- 17- Eversole LR, Laipis PJ, Green TL. Human papillomavirus type 2 DNA in oral and labial verruca vulgaris. *J Cutan Pathol* 1987:14:319-325.
- 18- Fukushima K, Ogura H, Watanabe S, Yabe Y, Masuda Y. Human papillomavirus type 16 DNA detected by the polymerase chain reaction in non-cancer tissues of the head and neck. *Eur Arch Otol Rhinol Laryngol* 1994:251:109-112.
- 19- Galloway DA. Papillomavirus capsids : a new approach to identify serological makers of HPV infection. *Nat Cancer Inst* 1994:86:474-475.
- 20- Gassenmaier A, Hornstein OP. Presence of human papillomavirus DNA in benign and precancerous oral leukoplakias and squamous cell carcinomas. *Dermatologica* 1988: 176: 224- 233.

- 21- Ghirardini C, Ghinosi P, Raisi O, Portolani M. Human papillomavirus DNA detection in papanicolaou-stained cervical smears with a nonradioactive in situ hybridization assay. *Acta Cytol* 1992; 36: 183 - 188.
- 22- Gissman L, Boshart M, Durst M, Ikenberg H, Wagner D, Zur Hausen H. Presence of human papillomavirus in genital tumors. *J Invest Dermatol* 1984; 83: 26-28.
- 23- Glick M, Goldman HS. Viral infections in the dental setting: Potential effects on pregnant. *JADA* 1993; 124: 79 -86.
- 24- Hanson BG, Forslund O, Bjerre B, Lindholm K, Nordenfelt E. Human papilloma virus types in routine cytological screening and at colposcopic examinations. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1993; 52 : 49-55.
- 25- Ho L, Chan S-Y, Chow V, Chong T, Tay S-K, Villa LL, Bernad HU. Sequence variants of human papillomavirus type 16 in clinical samples permit verification and extension of epidemiological studies and construction of a phylogenetic tree. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 1765-1772.
- 26- Howley PM. Principles of carcinogenesis. In: Devita VT, Helmann S, Rosenberg SA. *Cancer principles & practice of oncology*. Third edn. Philadelphia: JB Lippincott Company, 1989: 149- 166.
- 27- Jenison SA, Yu X-P, Valentine JM, Koutsky LA, Christiansen AE, Beckman AM, Galloway DA . Evidence of prevalent genital -type human papillomavirus infections in adults and children. *J I D* 1990; 162: 60-69.
- 28- Kahveci G, Celik H, Tasar F. Human papillomavirus DNA in oral squamous cell carcinoma . First istanbul international Symposium on Oral Biology, Istanbul, 1995.

- 29- Kashima HK , Kutcher M, Kessis T , Levin LS, De Villiers E-M Shan K. Human papillomavirus in squamous cell carcinoma leukoplakia, lichenplanus, and clinically normal epithelium of the oral cavity. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1990;99 : 55- 61.
- 30- Kellokoski JK, Syrjönen SM, Syrjönen K J, Yliskoski M. Oral mucosal changes in women with genital HPV infection. *J Oral Pathol. Med* 1990;19: 142 -148.
- 31- Kellokoski JK , Syrjönen SM, Chang F, Yliskoski M, Syrjönen KJ. Southern blot hybridization and PCR in dedection of oral human papillomavirus (HPV) infections in women with genital HPV infections. *J Oral Pathol Med* 1992 :21:459 -464.
- 32- Kleinman DV, Swango PA . Prevention and early detection: Keys to oral cancer. *JADA* 1993: 124: 81-82.
- 33- Kumar V, Cortun RS, Robins SL. *Basic Pathology*. Fifth edn. Philadelphia: WB Saunders, 1992: 171-522.
- 34- Kwok S, Higuchi R. Avoiding false positives with PCR. *Nature* 1989: 539: 237- 238.
- 35- Langford A, Kunze R, Schmelzer S, Wolf H, Pohle H.D, Reichart P Immunocytochemical detection of herpes viruses in oral smear of HIV- infected patients. *J Oral Pathol Med* 1992: 21: 49 -57.
- 36- Lawton GM, Thomas SJ, Schonrock J, Monsour FN, Frazer IH. Human papillomaviruses in normal oral mucosa: a comparison of methods for sample collection. *J Oral Pathol Med* 1992:21: 265 -269
- 37- Lewis FA, Griffiths S, Dunicliff R, Wells M, Dunding N, Bird CC. Sensitive in situ hybridisation technique using biotin-streptavidin - polyalkaline phosphatase complex. *J Clin Pathol* 1987: 40: 163 - 166.
- 38- Lu Q-L, Elia G, Lugas S, Thomas JA. Bcl-2 Proto-oncogene expression in Epstein- Barr- Virus- Associated nasopharyngeal carcinoma. *Int J Cancer* 1993: 52: 401- 404.

- 39- Lyons J. The polymerase chain reaction and cancer diagnostics. *Cancer* 1992; 69: 1527- 1531.
- 40- Maden C, Beckmann AM, Thomas DB, Mc Knight B, Sherman KJ, Ashley RL, Corey L, Daling JR. Human papillomaviruses, Herpes simplex viruses and the risk of oral cancer in men. *Am J Epidemiol* 1992; 135: 1093 -1102.
- 41- Maitland NJ, Lynas C, Bromidge T, Crane I, Flint SR, Cox MF, Prime SS, Scully C. Risk markers for oral diseases. Vol 2. First edn. Cambridge: Cambridge University Press, 1991: 317- 337.
- 42- Mao EJ, Smith CJ. Detection of Epstein-Barr Virus (EBV) DNA by the polymerase chain reaction (PCR) in oral smears from healthy individuals and patients with squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 1993 : 22: 12: -17.
- 43- Mc Dougall JK, Myerson D, Beckmann AM. Detection of Viral DNA and RNA by in situ hybridization. *J Histochem Cytochem* 1986; 34: 33-38
- 44- Migliorati CA, Jones AC, Baughman PA. Use of exfoliative cytology in the diagnosis of oral hairy leukoplakia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1993; 76: 704-710.
- 45- Miller CS, Zeuss MS, White DK. In situ Detection of HPV DNA in oral mucosal lesions. A comparison of two hybridization kits. *J oral Pathol Med* 1991; 20: 403-408.
- 46- Miller CS, Zeuss MS, White DK. Detection of HPV DNA in oral carcinoma using polymerase chain reaction together with in situ hybridization. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1994;77: 480- 486.
- 47- Nakano K. Characteristics of human papillomavirus (HPV) infection in papilloma of the head and neck, detection of HPV according to clinical features and types specificity in the head and neck. *Nippon-Jibiinkoka Gakkai-Kaiho* 1994; 97: 1381-1392.
- 48- Nuova GJ, Silverstein SJ. Comparison of formalin, Buffered formelin and Bouin's fixation on the detection of human papillomavirus Deoxyribonucleic Acid from genital lesions. *Lab Invest* 1988; 59: 720-725.

- 49- Ostwald C, Muller P, Barten M, Rutsatz K, Sonnenburg M, Mide Langosch K, Loning T. Human papillomavirus DNA in oral squamous cell carcinomas and normal mucosa. *J Oral Pathol Med* 1994; 23: 220-225.
- 50- Park M, Vande Woude GF. Principles of molecular cell biology of cancer: Oncogenes . In: De vita VT, Hellmann S, Rosenberg SA. *Cancer principles & practice of oncology*. Third edn. Philadelphia: JB Lippincott company, 1989:45-48.
- 51- Park N-H , Min B-M, Li' S-L, Huang MZ, Cherick HM, Doniger J. Immortalization of normal human oral keratinocytes with type 16 human papillomavirus. *Carcinogenesis* 1991; 12: 1627-1631.
- 52- Peng H-q, Roth P, Caussy D, Rawls W. Comparison of the cytobrush and cotton swabs in sampling cervical cells for filter in situ hybridization detection of human papillomavirus types 16 and 18 DNA . *Acta Cytol* 1987:311- 313.
- 53- Premoli - de - Percoco G, Galindo I, Ramirez JL, Perrone M, Rivera H. Detection of human papillomavirus - related oral verruco vulgaris is among Venezuelans. *J Oral Pathol Med* 1993; 22: 113 -116.
- 54- Regezi JA, Sciubba J. *Oral Pathology* Second edn. Philadelphia: WB Saunders, 1993: 93 -188.
- 55- Reid R, Greenberg M, Jenson B, Husain M, Willett J, Daoud Y, Temple G, Stanhope RC, Sherman AI, Phibbs GD, Lorines AT. Sexually transmitted papilloma viral infections. *Am J Obstet Gynecol* 1987: 156: 212 -222
- 56- Schneider A . Methods of identification of human papillomavirus. In: Syrjanen K, Gissman L , Koss LG . *Papillomaviruses and Human Disease*. edn. Heidelberg: Springer - Verlag. 1987: 27- 29
- 57- Scully C, Maitland NJ, Cox MF, Prime SS. Human papillomavirus DNA and oral mucosa. *The Lancet* 1987: 7: 336.
- 58- Scully C, Prime SS, Cox MF, Maitland NJ. Risk markers for oral Diseases Vol 2 First edn. Cambridge: Cambridge Universty Press, 1991: 96- 113

- 59- Scully C, Epstein J, Porter S, Cox M. Viruses and chronic disorders involving the human oral mucosa . *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1991; 72: 537- 544.
- 60- Scully C. Oral Cancer: New insights into Pathogenesis. *Dental Update* 1993: : 95 - 100.
- 61- Shillitoe EJ, Greenspan D, Greenspan JS, Silverman S, Immunoglobulin class of antibody to herpes simplex virus in patients with oral cancer. *Cancer* 1983: 51: 65 - 71
- 62- Shroyer KR, Greer RO Detection of human papillomavirus DNA by in situ DNA hybridization and polymerase chain reaction in premalignant and malignant oral lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1991: 71: 708-731.
- 63- Smotkin D. Virology of human papillomavirus. *Clinical Obstetrics and Gynecol* 1989: 32: 117-124.
- 64- Syrjanen K, Vayrynen M, Castren O, Mantyjarvi R, Pyrhönen S, Yliskoski M. Morphological and immunohistochemical evidence of human papillomavirus (HPV) involvement in the dysplastic lesions of the uterine Cervix. *Int J Gynaecol Obstet* 1983: 21: 261-269.
- 65- Syrjanen SM, Sryrjanen KJ, Lamberg MA, Finland K. Detection of human papillomavirus DNA in oral mucosal lesions using in situ DNA-hybridization applied on parafin sections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1986: 62: 660-667.
- 66- Takami Y, Kondoh G, Saito J, Noda K, Sudiro TM, Sjahrurachman A, Warsu UC, Yutsudo M, Hakura A. Cloning and characterization of human papillomavirus types 52 from cervical carcinoma in Indonesia. *Int J Cancer* 1991: 48: 516-522.
- 67- Tsuchiya H, Tomita Y, Shirasawa H, Tanzawa H, Sato K, Simizu B. Detection of human papillomavirus in head and neck tumors with DNA hybridization and immunohistochemical analysis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1991: 71: 721-725.
- 68- Unger ER. In situ and Northern hybridizations. *Cancer* 1992: 69: 1532-1535.

- 69- Vande Woude S, Vande Woude GF. Principles of molecular cell biology of cancer: General aspect of gene regulation. In: Devita VF, Helman S, Rosenberg SA. Cancer principles & practice of oncology. Third edn. Philadelphia: JB Lippincott company, 1989: 31-44.
- 70- Van Den Brule AJC, Snijders PJF, Raoporst MCP. General primer polymerase chain reaction in combination with sequence analysis for identification of potentially novel human papillomavirus genotypes in cervical lesions. *J Clin Microbiol* 1992;30: 1716-1721.
- 71- Villa LL, Brentani RR . Human papillomavirus Up - Date. *Int J Cancer* 1991: 48: 163-166.
- 72- Vousden KH. Human papillomaviruses and cervical carcinoma. *Cancer Cells* 1989: 1: 43-50.
- 73- Walboomers JM, Melchers WJG, Mullink H, Meijer CSLM. Sensitivity of in situ detection with biotinylated probes of human papillomavirus type 16 DNA in frozen tissue sections of squamous cell carcinomas of the cervix. *Am J Pathol* 1988: 131: 587-593.
- 74- Watts SL, Brewer EE, Fry TL. Human papillomavirus DNA types in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1991: 71: 701-707.
- 75- Welch TB, Barker BF, Williams C. Peroxidase - antiperoxidase evaluation of human oral squamous cell papillomas. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1986: 61: 603-606.
- 76- Wells M, Levis FA, Jacson P. In situ hybridization technique using an immunogold silver staining system. *Histochem J* 1989: 21: 425-4.
- 77- Woods KV, Shillitoe EJ, Spitz MR, Schantz SP, Adle -Starthz K. Analiysis of human papillomavirus DNA in oral squamous cell carcinomas. *J. Oral. Pathol. Med.* 1993;22:101-108.
- 78- Wynder EL, Bross IJ Feldam RM. A study of the etiological factors in cancer of the mouth. *Cancer* 1957;10: 1300-1323.
- 79- Yeudal WA, Campo MS, Human papillomavirus DNA in biopsies of oral tissues. *J Gen Virol* 1991;72: 173-176.

- 80- Young SK, Min KW. In situ DNA hybridization analysis of oral papillomas, leukoplakias, and carcinomas for human papillomavirus. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1991: 71: 726-729.
- 81- Yura Y, Iga H, Kondo Y, Harada K, Yanagawa T, Yoshida H, Sato M. Hepes simplex virus type 1 and type 2 infection in human oral mucosa in culture. J Oral Pathol Med 1991: 20: 68-73.
- 82- Zeuss MS, Miller CS, White DK. In situ hybridization analysis of human papillomavirus DNA in oral mucosal lesions Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1991: 71: 714-720.
- 83- Zuher M, Naib MD, Exfoliative Cytopathology. Third edn. Toronto: Little Brown and company, 1984: 384.
- 84- Zur Hausen H. Papillomaviruses in anogenital cancer as a model to understand the role of viruses in human cancer. Cancer Res 1989: 49: 4677-4681.

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

ÖZGEÇMİŞ

1965 yılında Adana'da doğmuşum. İlk, orta ve lise öğrenimimi Adana'da tamamladıktan sonra 1983 yılında İ.Ü. Dişhekimliği Fakültesine girdim. 1988 yılında mezun oldum ve aynı yıl iki ay süreyle yoğun İngilizce kurslarına katılmak üzere İngiltere'ye gittim.

1990 yılında İ.Ü. Dişhekimliği Fakültesi Ağız, Diş, Çene Hastalıkları ve Cerrahisi Ana Bilim Dalı'nda doktora öğrencisi olarak doktora çalışmalarına başladım.

1993 yılında doktora tezimle ilgili incelemelerde bulunmak üzere "King's College School of Medicine and Dentistry Department of Oral and Maxillo Facial Surgery Epithelial Cell Biology Unit"te Prof.J.D. Langdon'un davetlisi olarak Londra'ya gittim.

1995 yılında İ.Ü. Dişhekimliği Fakültesi Ağız, Diş, Çene Hastalıkları ve Cerrahisi Anabilim Dalı'nda araştırma görevlisi kadrosuna atandım.

Halen aynı Anabilim Dalı'nda görevime devam etmekteyim.

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ