

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**ATİPİK SKUAMÖZ HÜCRE (ASC=ASC-US+ASC-H)
BULUNDURAN KONVANSİYONEL PAP SMEAR
PREPARATLARINDA YÜKSEK RİSKLİ HPV PREDİKTÖRÜ
OLARAK KABUL GÖREN p16 PROTEİNİ VARLIĞININ
ARAŞTIRILMASI VE SONUÇLARIN HİSTOPATOLOJİK
TANILAR İLE KARŞILAŞTIRILMASI**

Dr. Emre PABUÇCU

**KADIN HASTALIKLARI ve DOĞUM ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN:
Prof. Dr. Ruşen AYTAÇ**

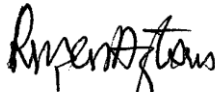
**ANKARA
2010**

KABUL VE ONAY

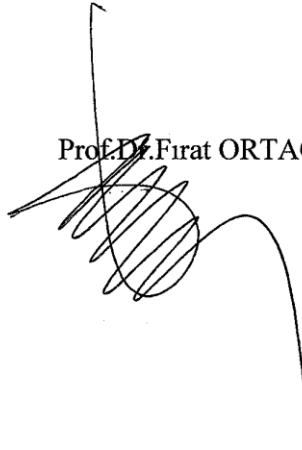
TEZ DEĞERLENDİRME JÜRİSİ RAPORU

Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı araştırma görevlilerinden Dr.Emre G. PABUÇCU'nun tezi ile ilgili " Tez Değerlendirme Jürisi " raporu:

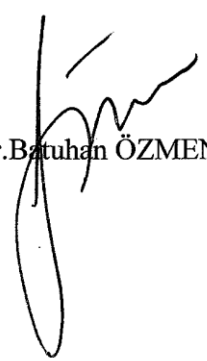
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığının 10.11.2010 tarih ve B.30.2.ANK.0.20.71.01.900 / 26082 sayılı yazısı üzerine, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı araştırma görevlilerinden Dr.Emre G. PABUÇCU'nun "Atipik Skuamöz Hücre (ASC=ASC-US+ASC-H) Bulunduran Konvansiyonel PAP Smear Preparatlarında, Yüksek Riskli HPV Prediktörü Olarak Kabul Gören p16 Proteini Varlığının Araştırılması ve Sonuçlarının Histopatolojik Tanıları ile Kıyaslanması" konulu tezin sözlü savunması 07/12/2010 tarihinde öğretim üyelerine ve araştırma görevlilerine açık bir toplantıda gerçekleştirilmiştir. Prof.Dr.Ruşen AYYAÇ, Prof.Dr.Fırat ORTAÇ ve Doç.Dr.Batuhan ÖZMEN'den oluşan Tez Değerlendirme Jürisi anılan toplantıyı takiben bir araya gelmiş ve adayın tezini incelemiştir. Tezin kabul edilmesine oybirliği ile karar verilmiştir.



Prof.Dr.Ruşen AYYAÇ



Prof.Dr.Fırat ORTAÇ



Doç.Dr.Batuhan ÖZMEN

ÖNSÖZ

Bu tezin gerçekleşmesi için benden desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen başta tez danışmanım Prof. Dr. Ruşen AYTAÇ'a, tezin bütün aşamalarında emeği olan Prof. Dr. Mete GÜNGÖR'e, gerek olgu seçimi gerekse boyanma ve değerlendirme aşamalarındaki yardımlarından dolayı Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Patoloji Bölümü Klinik Şefi Doç. Dr. Hüseyin ÜSTÜN'e, tezin istatistik aşamasında emeği olan Biyoistatistik Anabilim dalında görevli Zeynep BIYIKLI'ya, ihtisas sürem boyunca bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan bütün değerli hocalarım, uzmanlarım ve bütün asistan arkadaşlarıma, benim bugünlere gelmemde büyük pay sahibi olan anneme, hayatım ve mesleğim ile ilgili yoluma daima ışık tutmuş, meslektaşları olacağım için de gurur duyduğum babama teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Dr. Emre Göksan PABUÇCU

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	i
ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	v
ŞEKİLLER ve RESİMLER DİZİNİ	vii
TABLolar DİZİNİ.....	viii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Serviks Kanseri	3
2.1.1. Serviks Kanseri Risk Faktörleri	5
2.2. İnsan Papilloma Virüsü (HPV)	12
2.2.1. Genel Bilgiler	12
2.2.2. HPV-Servikal İnterapitelial Neoplazi-Kanser İlişkisi.....	14
2.3. Servikal Kanseri Taraması	16
2.3.1. Bethesda Sınıflama Sistemi.....	19
2.4. Hücre Siklusu	23
2.5. P16 proteini	25
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	30
3.1. Olgu Seçimi.....	30
3.2. Olguların P16 Antikoru İle İmmünohistokimyasal İncelenmesi.....	30
3.3. Olguların P16 Antikor Boyanmalarına Göre Değerlendirilmesi	31
3.4. İstatistiksel Analiz.....	32
4. BULGULAR	35

5. TARTIŞMA	40
6. SONUÇLAR.....	59
ÖZET	60
SUMMARY.....	61
KAYNAKLAR	62

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ACOG:	American College of Obstetricians and Gynecologists
AGC:	Atipik glandüler hücre
AIDS:	Kazanılmış İmmün Yetmezlik Sendromu
ALTS:	ASCUS/LSIL Triage Study
ASC:	Atipik skuamöz hücre
ASC-US:	Önemi belirlenemeyen atipik skuamöz hücre
ASC-H:	Yüksek dereceli servikal intraepitelyal lezyonun ekarte edilemediği önemi belirlenemeyen atipik skuamöz hücre
Ca:	Kanser
CDK:	Siklin bağımlı kinaz
CIN:	Servikal intraepitelyal neoplazi
CIS:	Karsinoma İn-situ
DNA:	Deoksiribonükleik asit
EF:	Transkripsyon faktörü
HGSIL:	Yüksek dereceli servikal intraepitelyal lezyon
HIV:	İnsan immün yetmezlik virüsü
HLA:	İnsan lökosit antijeni
HPV:	İnsan papilloma virüsü

HR-HPV:	Yüksek riskli insan papilloma virüsü
IARC:	International Agency for Research on Cancer
LGSIL:	Düşük dereceli servikal intraepitelyal lezyon
LR:	Likelihood ratio-Test sonucu olasılık oranı
NPV:	Negatif prediktif değer
PPV:	Pozitif prediktif değer
Rb:	Retinablastoma
SCC:	Skvamöz hücreli kanser
WHO:	Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİLLER ve RESİMLER DİZİNİ

Şekiller

Şekil 1:	Yaş gruplarına göre HPV prevalansı.....	13
Şekil 2:	Hücre siklusu	23
Şekil 3:	p16 proteininin hücre döngüsünde regülatör rolü	26
Şekil 4:	p16 proteininin hücre döngüsünde regülatör rolü	27

Resimler

Resim 1:	E6H4 p16 antikoruna pozitif boyanma göstermiş çalışma olgusu.....	32
Resim 2:	Nükleer ve sitoplazmik olarak p16 antikoruna boyanmış bir hücre	33
Resim 3:	E6H4 p16 antikoruna pozitif boyanma göstermiş çalışma olgusu.....	33
Resim 4:	E6H4 p16 antikoruna pozitif boyanma göstermemiş çalışma olgusu	34

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1:	Amerikan Kanser Derneği'nin 2010 yılı için öngördüğü kanser vakaları ve muhtemel ölüm oranları	3
Tablo 2:	Kadınlarda yaş gruplarına göre invaziv servikal kanser riskleri	4
Tablo 3:	Servikal skuamöz hücreli karsinom ve adenokarsinom için risk faktörleri.....	5
Tablo 4:	Onkojenik risk potansiyeline göre HPV tip sınıflaması.....	8
Tablo 5:	Servikal kanserde genetik değişiklikler	9
Tablo 6:	Servikal kanserde moleküler belirteçler	10
Tablo 7:	Servikal intraepitelyal neoplazilerin seyri	11
Tablo 8:	E6 ve E7 onkoproteinlerinin hücrede muhtemel hedefleri	12
Tablo 9:	Doku tropizmlerine göre HPV sınıflaması ve olası sonuçları	14
Tablo 10:	Servikal kanser ve HGSIL olgularında HPV oranları ve ilk 2 sıklıktaki HPV alt tipleri	15
Tablo 11:	Papanicolaou sınıflaması	18
Tablo 12:	Anormal sitoloji oranları	21
Tablo 13:	100 adet ASC olgusunun histopatolojik sonuçları.....	35
Tablo 14:	ASC-US ve ASC-H alt gruplarına göre doku tanılarının dağılımı.....	35
Tablo 15:	ASC-US ve ASC-H alt gruplarının p16 ile boyanma oranları ve boyanma gösteren olguların histopatolojik dağılımları.....	36
Tablo 16:	p16 ile boyanma göstermiş toplam 21 adet ASC olgusuna karşılık gelen histopatolojik tanıların dağılımı.....	37

Tablo 17: Histopatolojik tanılara karşılık gelen ASC olgularının boyanma yüzdeleri	37
Tablo 18: Smearlerinde p16 pozitifliği gösteren ve göstermeyen genel ASC olgularının biopsi sonuçları.....	37
Tablo 19 : ASC-H olgularında, CIN 2+ lezyon saptamak için, p16 antikor varlığının klinik performansı	38
Tablo 20: ASC olgularında, CIN 2+ lezyon saptamak için, p16 antikor varlığının klinik performansı	39
Tablo 21: Servikal kanser ve HSIL olgularında HPV saptanma oranları ve ilk 2 sıklıktaki HPV alt tipleri.....	40
Tablo 22: ASCUS olgularında HR-HPV oranları.....	42
Tablo 23: ASC-US olgularında, histolojik olarak saptanmış CIN 2+ lezyon oranları	43
Tablo 24: Sitolojik çalışmalarda p16 pozitifliği için eşik değerler, ve kategorilere göre p16 pozitiflik yüzdeleri.....	49
Tablo 25:. Sitolojik olgularda p16 ile triaj çalışmaları.....	51
Tablo 26: ASC-US/LGSIL olgularında CIN 2 ve üzeri lezyon prediksyonu için p16 proteini ile HPV-DNA (hc2) metodlarının karşılaştırılması.....	53
Tablo 27: ASC-H olgularında p16 pozitiflik oranları.....	55

1. GİRİŞ

Serviks kanseri, dünyada kadınları etkileyen kanserler arasında meme kanserinden sonra ikinci sırada gelmektedir. Her yıl yaklaşık 500.000 yeni tanı konulmakta ve yıllık olarak yaklaşık 275.000 kadın hayatını kaybetmektedir. Servikal prekanseröz lezyonları taramada Pap smear testinin kullanılmaya başlanmasından beri, kanser insidansında anlamlı bir düşüş yaşanmışsa da, teknik sorunlar ve gözlemciler arası yorum farklılıkları testin etkinliğine engel durumlardır. Bethesda sisteminin 1989 yılında kullanıma girmesi ile birlikte, servikal patolojilerde yeni bir tanımlama sistemi ortaya çıkmıştır. Özellikle de, 1998 sınıflamasına göre 'önemi belirlenemeyen atipik yassı hücreler' (ASCUS), 2001'den sonra ise ASC-US olarak adlandırılan özel grubun izlemi oldukça tartışma yaratmıştır. ASC-US olguları, rutin sitolojik smear'lerin yaklaşık %5'inde izlenmekle beraber, bu grubun biopsi ile doğrulanmış servikal intraepitelyal lezyon (CIN) 2 veya servikal intraepitelyal lezyon 3 bulundurma oranı %5-17 arasında, invaziv kanser oranı ise %0,1- 0,2 arasında değişmektedir. ASC-US grubunda 3 farklı yönetim şeması kullanılmaktadır: tekrar sitoloji, HPV DNA testi ve kolposkopik inceleme. Her grupta, klinik olarak önemli lezyon yakalamak için farklı sensitivite ve spesifite değerleri bildirilmektedir.

Onkojenik Human Papilloma Virüs (HPV) tiplerinin, konak genomuna integrasyonu, malign neoplastik süreç için en kritik basamaktır. Kanser olgularının büyük çoğunluğunda onkojenik HPV DNA'sı saptanmaktadır. Fakat HPV DNA testi ile enfeksiyon varlığı doğrulansa da, bu enfeksiyonun klinik olarak önemli lezyona neden olup olmayacağı öngörülememektedir.

Servikal intraepitelyal neoplazilerin, regrese mi olacağı yoksa persiste edip invaziv kansere mi dönüşeceği konusunda net bir yorum yapılamamaktadır. Bu aşamada geçici veya kalıcı hastalık ayrımı yapabilmeye başarılı bir testin varlığı sorgulanmaktadır. p16 proteini, hücre döngüsünde kontrol mekanizması rolünde bir gen ürünüdür. Prekanseröz

displastik lezyonlarda ve HPV ile indüklenen servikal kanserlerde p16 proteininin fazla üretildiğini gösteren çalışmalar olduğu gibi, özellikle lezyonların derecesi ile p16 sentezi arasında korelasyon olduğunu ortaya koyan birçok veri de mevcuttur.

Bu çalışmada, Pap smear sonucu Atipik Skuamöz Hücre (ASC=ASC-US+ASC-H) olarak değerlendirilmiş ve doku biyopsileri alınarak histolojik olarak da incelenmiş olgularda, geriye dönük olarak sitoloji örnekleri p16 antikoru ile incelemeye tabi tutulmuş, boyanma özellikleri ile sonuç histopatolojik tanıları karşılaştırılmış ve klinik olarak önemli lezyon tanısını predikte etmek için atipik skuamöz hücre tanılı sitolojik spesimenlerde, p16 antikoru ile triajın yeri araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.Serviks Kanseri

Serviks kanseri, dünyada kadın kanserleri arasında meme kanserinden sonra ikinci sırada görülen, yıllık 500.000 yeni tanı ve 275.000 insanın hayatını kaybetmesi nedeni ile dünya genelinde önemli bir sağlık sorunudur.¹ İnsidansı bölgelere göre değişiklik göstermekle birlikte, Ortadoğu'da 100.000'de 4.8 iken Doğu Afrika'da 100.000'de 44.3'tür. Amerika Birleşik Devletleri'nde (A.B.D.) yılda 13.000 kişi yeni tanı almakta ve 4500 kişi serviks kanseri nedeniyle hayatını kaybetmektedir.² Ölüm sıklığı akciğer, meme, kolon, pankreas, over, lenf nodu ve hematolojik malignitelerden sonra gelmektedir.

Tablo 1: Amerikan Kanser Derneği'nin kadınlarda 2010 yılı için öngördüğü kanser vakaları ve muhtemel ölüm oranları.⁷

Malignite Tipi	Vaka Sayısı	Ölüm
Meme	207.90	39.840
Gastrointestinal	125.790	60.570
Akciğer	105.770	71.080
Uterus	43.470	7950
Over	21.880	13.850
Serviks	12.200	4210

A.B.D.'de tarama olmayan bölgelerde hayat boyu serviks kanseri riskinin %3.67, mortalite riskinin %1.26 olduğu belirtilmektedir³. Türkiye'ye ait geniş veri tabanı olmamasına rağmen, elde edilen verilere göre, kadınlarda ölüme neden olan kanserler arasında 5. sırada yer almaktadır. Sekiz ilde yapılan geniş bir çalışmaya göre serviks kanseri görülme sıklığı 3,96/

100,000 olarak bildirilmiştir.⁴ Türkiye’de Sağlık Bakanlığı’nın 1999 verilerine göre en sık saptanan jinekolojik malignitenin serviks kanseri olduğu bildirilmektedir.⁵

A.B.D. verilerine göre; 15-24 yaş grubu kadınların Pap test taramasına ve takibine yıllık olarak 2.9 milyar dolar, invaziv serviks kanseri tedavisine 108 milyon dolar ve anogenital siğil tedavisine ise 124 milyon dolar harcanmaktadır⁶. Bütün bu gelişmelerden dolayı servikal kanser insidansı, son otuz-kırk yıllık zaman diliminde azalma göstermiştir.

Serviks kanserinin mortalite oranında da, diğer sık görülen meme, kolon ve lenfoma gibi malignitelerde de gözlemlendiği üzere, yıllar içerisinde azalma izlenmektedir. 1991-2006 yılları arasında mortalitesinde %30.69’luk bir azalma izlenmiştir.⁷

Tablo 2: Kadınlarda yaş gruplarına göre invaziv servikal kanser riskleri (2004-2006 A.B.D. verileri referans alınmıştır.)

Yaş grubu	İnvaziv kanser riski
1-39	1/648
40-59	1/374
60-69	1/755
70 ve üzeri	1/552
<u>Hayat boyu</u>	<u>1/145</u>

1995-2005 yılları arasında, tanı anında servikal kanserlerin evresini ortaya koymak için yapılan çalışmaya göre; vakaların %50’si lokal, %35’i rejyonel ve %11’i uzak organ metastazı yapmış halde saptanmıştır. 5 yıllık sağkalım oranları 1999-2005 yılı verileri göz önünde bulundurularak %72 olarak saptanmış, bu oran 1975-1977 yılları verilerindeki %70’lik orandan anlamlı olarak farklı bulunmuştur.⁸

2.1.1. Serviks Kanseri için risk faktörleri

Literatürdeki birçok araştırma, serviks kanseri ile birçok bağımsız sosyal faktör arasında ilişki olduğunu ortaya koymuştur. Sosyo-ekonomik durumun düşük olması erken yaşta evlenme ve anne olma ile birliktelik gösterdiğinden, bu durum risk artışı ile sonuçlanmaktadır. Artan sayıda veri, kadının erken yaşta cinsel aktiviteye başlama ya da birden fazla partnerinin bulunma özellikleri ile, cinsel partneri aracılığı ile risk altında bulunduğunu göstermektedir.⁹

Demografik Riskler	Etnik köken, düşük sosyo-ekonomik durum, yaş
Davranışsal Riskler	Yetersiz tarama, erken yaşta cinsel aktivite, fazla sayıda cinsel partner, sigara içimi, beslenme
Medikal Riskler	Yüksek riskli HPV enfeksiyonu, parite, immünsupresyon

Tablo 3: Servikal skuamöz hücreli karsinom ve adenokarsinom için risk faktörleri.¹⁷

Risk faktörleri	Skvamöz hücreli Ca-RR (Kontrol grubuna göre)	Adeno Ca-RR (Kontrol grubuna göre)
Partner sayısı		
1	1	1
2-5	2	1.63
>6	2.98	2.64
İlk ilişki yaşı		
>21	1	1
18-20	1.60	1.50
<18	2.24	2.06
Gebelik sayısı		
Nullipar	0.69	0.94
1-2	1.0	1.0
3-4	1.50	1.36
>5	2.08	1.61

İlk doğum anında yaş		
Nullipar	0.85	1.14
>25	1.0	1.0
20-24	1.66	1.44
17-19	2.16	2.1
<17	2.72	2.01
OKS* Kullanımı		
Halen kullanan	1.08	1.07
Bırakalı 2-9 yıl	1.03	1.03
Bırakalı >10 yıl	0.98	1.02
Vücut kitle indeksi		
20-25	1.0	1.0
25-30	1.05	1.24
>30	0.94	1.13
<20	1.14	0.97
Sigara		
Hiç içmemiş	1.0	1.0
Bırakmış	1.01	0.74
İçiyor	1.5	0.86
HPV durumu		
Negatif	1.0	1.0
HPV (+) herhangi	114	65
HPV (+) yüksek risk	189	110

*OKS: Oral kontraseptif

Sigaranın HPV enfeksiyonundan bağımsız olarak, serviks epitelinde DNA hasarına yol açtığı gösterilmiştir. Uzun süreli ve fazla miktarda kullanım ile risk daha da artmaktadır. 25,000 olgunun incelendiği bir analizde, pasif içicilik ile riskin 2,1 kat arttığı saptanmıştır¹⁰. HPV pozitif hastalarda, sigara içmenin özellikle persistans yönünden önemli bir faktör olduğu düşünülmüştür.¹¹ Sigara ile ilişkilendirilmiş çok sayıda kimyasal madde mevcuttur. Bunlar arasında en çok bilinenler, benzil preniler, polisiklik aromatik hidrokarbonlar ve tütüne özel nitrozaminlerdir. Bu maddeler daha çok kofaktör olarak görev yapmaktadırlar. Sigara içenlerin servikal mukusunda, normal popülasyona göre, bu maddelere daha çok rastlanmaktadır.¹² Sigara ile daha fazla ilişkilendirilmiş olan kanser türü

skuamöz hücreli tiptir ve adenokanser ile sigara arasındaki ilişki net değildir. Toplam 12 epidemiyolojik çalışmanın değerlendirilip skuamöz hücreli kanser ve adenokanser olguları için risk faktörlerinin karşılaştırıldığı meta-analizde (tablo 3), sigara içmenin skuamöz hücreli kanser riskini artırdığı ancak adenokanser için aynı risk artışının izlenmediği dikkat çekmektedir.¹⁷

Toplum bazlı çalışmalar, uzun dönem kombine oral kontraseptif kullananların, servikal kanser için daha fazla risk altında olduğunu ortaya koymuşsada, bu konu hakkında çelişkili sonuçlar mevcuttur. İn-vivo ve in-vitro çalışmalar, estradiol ile progesteron'un, E6-E7 gen ekspresyonlarını artırdığını ve malign oluşumu indüklediğini öne sürmüşlerdir. Aynı zamanda hormon kullanımı ile kan folat düzeyleri azalmakta ve buna bağlı olarak epitelde megaloblastik değişiklikler meydana gelmektedir. Smith ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada, 12,531 servikal kanser olgusu değerlendirilmiş; 5 yıl, 5-9 yıl ve 10 yıl ya da üzeri oral kontraseptif kullanımında riskin sırasıyla 1,1-1,6 ve 2,2 kat arttığı saptanmıştır.¹³ Yeni yapılan bir çalışmada Marks ve ark., 20-37 yaş aralığındaki HIV negatif 1070 kadını analiz etmişler, özellikle 6 yıldan fazla oral kontraseptif kullanımının, herhangi bir HPV tipi ile infeksiyon olasılığını artırdığını göstermişlerdir.¹⁸ Diğer bir yayında, beş yıldan az kullanımın riski arttırmadığı ancak 5-9 yıl kullanımın riski 2.72 kat, 10 yıl ve üzeri kullanımın ise riski 4.48 kat arttırdığı vurgulanmıştır.¹⁶

Serviks kanseri ve doğurganlık arasındaki ilişki, ilk tanımlanan kavramlardandır. Plummer ve ark.'nın yaptığı bir analizde, 16.563 invaziv kanser ve preinvaziv lezyonlu olgu ile 33,542 kontrol grubu karşılaştırılmıştır ve term gebelik oranları arttıkça riskin de buna paralel arttığı saptanmıştır.¹⁴ İlk ilişki yaşı ve partner sayısına göre veriler standardize edildiğinde bile 7 ve üzeri term gebelik için rölatif riskin 2.39 olduğu saptanmıştır.^{14,15}

Serviks kanseri riski; immunsupresyon (malignite, transplantasyon ve immün supresif ilaç) durumlarında artmaktadır. İmmunsupresyonun görüldüğü bir diğer hastalık, insan immün yetmezlik virüsü (HIV) enfeksiyonudur. Yapılan çalışmalarda HIV pozitif olgularda CIN görülme oranı 10 kat yüksek bulunmuştur. Ayrıca, HIV pozitif olgularda servikal kanser varlığı, AIDS tanısı için bir parametre olarak da kullanılmaktadır.

Hastaların sağkalım süreleri kısa olduğundan sonuçlar çelişkilidir ancak genel olarak immün supresyon karsinojenik süreci hızlandırmaktadır.¹⁹

Toplam 12 epidemiyolojik çalışmanın değerlendirilip skuamöz hücreli kanser ve adenokanser olguları için risk faktörlerinin karşılaştırıldığı meta-analizde (tablo 3), özellikle yüksek riskli HPV suşları ile enfeksiyonun, her iki kanser türü için de en belirgin risk faktörü olduğu vurgulanmıştır. Servikal kanserlerde olası etkenleri saptamak adına, HPV'ye odaklanmış çalışmalar 1970'li yıllarda başlamış olup, 1980'lerde ilk kez HPV tip 16 ve 18 servikal kanser dokusundan izole edilmiştir. 1995'de Dünya Sağlık Örgütü (WHO), HPV 16 ve 18'in serviks kanserinden sorumlu olduğunu bildirmiştir. HPV'nin, servikal onkogenezdaki en önemli ajan olmasının yanısıra, seksüel geçişli vulvar kondiloma akuminata, vulvar ve vaginal skuamöz hücreli karsinom, deri ve müköz membranların skuamöz tümörleri ve proliferatif lezyonların gelişiminde de rol oynar.²⁰

DNA'daki genomik farklılıklara göre 200'den fazla HPV tipi tanımlanmıştır ve bu tiplere göre de kutanöz ve muköz alanlarda enfeksiyon durumlarına göre sınıflandırılırlar. Servikal kanser ve prekürsör lezyonları ile bağlantıları tespit edildikten sonra yüksek, orta ve düşük riskli olarak da sınıflandırılmışlardır.²¹

Tablo 4: Onkojenik risk potansiyeline göre HPV tip sınıflaması

Düşük Riskli	6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81
Orta Riskli	26, 53, 66
Yüksek Riskli	16, 18, 45, 31, 33, 35, 39, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82

Bulaş genellikle cinsel yol ile olmaktadır. Bunun bir kanıtı olarak, daha önce cinsel deneyimi olmamış kadınlarda yüksek riskli HPV (HR-HPV) saptanamamaktadır. Oral-genital, el-genital temas sonrası bulaş da olabilmekte, ancak daha az sıklıkta izlenmektedir. Konjenital olarak, anneden çocuğa vertikal bulaş nadir de olsa izlenmektedir. Konjunktival, laringeal, vulvar ve perianal bulaş genellikle doğum esnasında veya 1-3 yıl sonra

perinatal enfeksiyon varlığında izlenebilmektedir. Enfeksiyonlar:

- **Latent**
- **Eksprese**

formlar halinde sonuçlanmaktadır. Eğer enfeksiyon latent kalacak ise, virüs çoğalmaz, doku etkisi izlenmez ve sessiz bir tablo oluşur. Bu durum hakkında net bilgi bulunmamakta, insidansı ve natürü hakkında pek az şey bilinmektedir. Eğer enfeksiyon eksprese olursa 2 şekilde sonuçlanır:

1- Prodüktif Süreç: HPV DNA'sı, konak hücre genomuna entegre olmadan kalır ve çok az miktarda onkogen salarak malign potansiyel oluşturmaz. Kondilomların ve özellikle düşük dereceli servikal intraepitelial lezyonların (LGSIL), HPV'nin prodüktif süreç sonuçları oldukları düşünülmektedir.

2- Neoplastik Süreç: Sirküler HPV genomu, konakçı kromozomuna entegre olarak E6 ve E7 onkogenlerinin sentezini sağlayacak transkripsyonu gerçekleştirir. Takiben Rb ve p53 tümör supresör moleküller inaktive olurlar ve hücre siklus kontrolü kaybedilerek malign transformasyona gidiş süreci başlar.

Tablo 5: Servikal kanserde genetik değişiklikler.⁴⁸

GENETİK DEĞİŞİKLİK	MEKANİZMA	FONKSYON
HPV E6, E7	Konak genoma integrasyon	Apopitozisin inhibisyonu
Kromozomal bozukluk	Global anöploidideğişikliği	Gen fonksiyon kaybı
Epigenetik modifikasyon	Aberran metilasyon	Gen fonksiyon kaybı

Yukarıdaki tabloda da izlendiği üzere, servikal kanserlerde birtakım genetik değişiklikler izlenmektedir. Karsinogenez sürecinde, birtakım moleküler değişiklikler olmakta ve hücre siklusu esnasında bu moleküllerin bir kısmı fazla, bir kısmı ise az sentezlenmektedir. Her geçen gün artan sayıdaki moleküler çalışmalar ile daha fazla sayıda belirteç kullanım alanına girmektedir. Aşağıdaki tabloda servikal karsinogenez sürecindeki moleküller

ve muhtemel görevleri özetlenmiştir.

Tablo 6: Servikal kanserde moleküler belirteçler.⁴⁸

Molekül	Fonksiyon	Prognoz üzerine etkisi
Siklin D1	Hücre siklus regülasyonu	CIN'de azalmış, invaziv kanserde artmış ekspresyon
P16	Hücre siklus regülasyonu	Displazi ve servikal kanserde artmış ekspresyon
PTEN	Tümör supresör gen adayı	Servikal kanserde epigenetik değişiklik ve gen ekspresyon kaybı
ciAP1	Apopitozis supresyonu	Kanser hücrelerinde artmış ekspresyonu, hastaliksız sağkalımın bağımsız belirteci
COX-2	Siklooksijenaz aktivite indüktörü	CIN 3'te ve kanserlerde artmış ekspresyon, düşük sağkalım
EGFR	Tirozi kinaz reseptörü	COX-2 ile birlikte artmış ekspresyonu sonucunda hastaliksız sağkalımda azalma
HLA	HLAa201,HLAB27	Konak immün cevabında değişkenlik

Serviko-İntaepitelyal Neoplazi (CIN): İnvaziv serviks kanserinin öncü lezyonlarının varlığı ilk kez 1886 yılında, invaziv skuamöz hücreli kanser hücrelerinin komşuluğunda bulunan ve invaziv olmayan anormal epitel hücrelerinin fark edilmesi ile ortaya koyulmuştur. Schiller 1927'de yaptığı çalışmalar ile preinvaziv neoplazi kavramını desteklemiştir.

Servikal karsinoma in-situ, kansere göre yaklaşık 10 yıl erken çıkan bir kavramdır. LGSIL ise ortalama 15-20 yıl önceki prekürsördür. Bu lezyonların bir kısmı uzun bir hastalık evresini izleyerek serviks kanseri gelişimine sebep olmaktadır.²² Serviksin premalign ve malign lezyonlarının büyük kısmı transformasyon bölgesinden köken almaktadır. Bu bölge, kolumnar epitelden

skuamöz epitele geçişin olduğu yerdir ve metaplastik epitelin varlığı ile karakterizedir. Lezyonların az bir kısmı ise orjinal skuamöz epitelten köken almaktadırlar.

Servikal intraepitelyal neoplazinin özellikleri; nükleer anormallikler, artmış mitotik faaliyetler, hücrel immaturite ve hücrel düzensizliktir. CIN'ler, iyi diferansiye bir neoplaziden başlayıp insitu karsinom'a kadar gidebilen değişikliklerin bir spektrumudur. CIN lezyonlarında derecelendirme, neoplastik hücrelerle yer değiştiren epitel oranına ve hücrel atipi derecesine göre yapılır. Bütün lezyonlarda bazal membran bütünlüğü vardır ve eğer epitelin tamamı neoplastik hücreler tarafından işgal edilmiş ise karsinoma in situ (CIS) adını alır. 1973'de Dünya Sağlık Örgütü (WHO) sitolojik tanı için sınıflandırma sistemi belirlemiştir. Bu sisteme göre hafif displaziler (CIN 1), orta displaziler (CIN 2) ve şiddetli displaziler ise (CIN 3) olarak isimlendirilirler.

Tablo 7:Servikal intraepitelyal neoplazilerin seyri.²⁵

	Regresyon	Persistans	CIN 3'e gidiş	İnvaziv kanser
CIN 1	%57	%32	%11	%1
CIN 2	%43	%35	%22	%5
CIN 3	%33	<%56	-	> %12

Serviks kanseri süreci, epitelde metaplastik olayların gelişimi ile başlar ve CIN 1-2-3 evrelerini takiben mikroinvaziv kanser gelişimi ile devam eden bir süreç gösterir. Yapılan bir çalışmada, CIN 1 lezyonlarında %18 ilerleme, %18 persistans, %62,7 regresyon ve %1 invaziv kanser izlenmiştir.²³ CIN 2 olgularında regresyon %40, persistans %40, progresyon %20 ve invaziv kansere dönüşüm %5 oranında görülebilmektedir. CIN 3 için regresyon %33, invaziv kansere dönüşüm ise %12'den fazladır.²⁴

2.2. Human Papilloma Virüs (HPV)

2.2.1. Genel Bilgiler

Servikal neoplazinin süreci ile ilişkili olan ve cinsel yolla bulaştığı düşünülen etken yıllar boyu araştırmalara konu olmuştur. Genital sistemde bulunan her madde yıllar boyunca suçlanmıştır. Ancak araştırmacılar, CIN tanısı almış olguların koilositik atipi gösteren hücrelerinde, intranükleer HPV varlığını ortaya koymuşlardır.

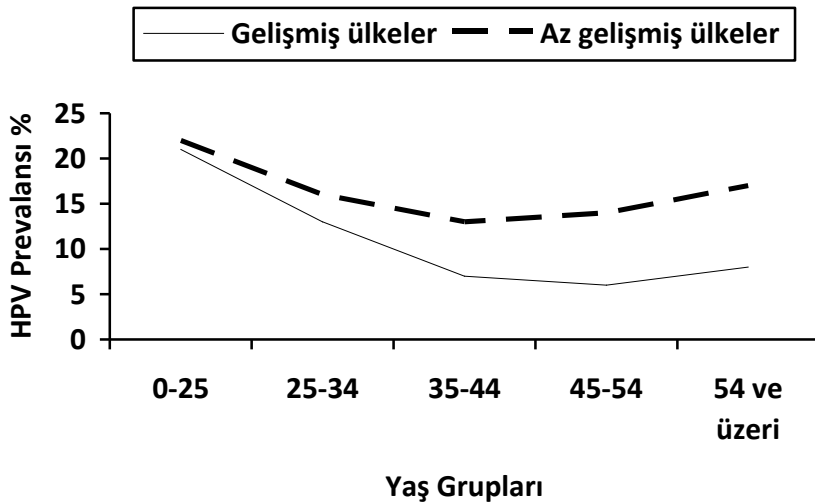
HPV çift sarmallı, dairesel, 8000 baz çifti içeren, zarfsız bir DNA virüsüdür. Toplamda 200'den fazla sayıda HPV tipi tanımlanmış, düşük, orta ve yüksek riskli olarak gruplandırılmıştır. Virüs prevalansı, örneklenen topluma, yaşa ve kullanılan tekniğin sensitivitesine göre değişiklik göstermektedir. Enfeksiyon çoğunlukla geçici olduğundan gerçek rakamlar tam olarak tespit edilememektedir. A.B.D.'de kapsamlı araştırmalar yapılmış ve HPV enfeksiyonunun en sık seksüel geçişli hastalık olduğu bildirilmiştir.²⁶ Yıllık insidansın 5.5 milyon olduğu ve toplumun %15'nin bu virüsle enfekte olduğu düşünülmektedir.²⁷

Tablo 8: E6 ve E7 onko-proteinlerinin hücrede muhtemel hedefleri.⁴⁸

E6 onkoprotein	E7 onkoprotein
p53	Rb
Paxillin	p107
Bak	p130
IRF-3	E2F/Siklin A
PDZ proteinleri	Siklin E
p300-CBP	p21

Deri ve mukoza bütünlüğünün bozuk olduğu durumlarda HPV maruziyeti var ise enfeksiyon meydana gelir. Hücre içine girmiş olan HPV, hem yatay hem de dikey olarak ilerlemeye başlar. Viral genlerin aktive olması sonucunda viral partiküller üretilmeye başlanır ve oluşan yeni virüs diğer

hücreleri de enfekte etmek için salınır. Enfeksiyonun benign prekürsör bir sürece mi yoksa invaziv kansere gidecek bir sürece mi gireceği, onkojenik HPV gen ürünlerinin kromozomal entegrasyonuna bağlıdır. Eğer viral DNA konak kromozomuna entegre olursa karsinojenik süreç, olmaz da epizomal olarak kromozom dışında çoğalırsa sıklıkla benign süreçler karşımıza çıkmaktadır. Bütün HPV tipleri en az 7 adet erken (E1-7) ve 2 adet geç (L1-2) gen içermektedirler. Entegrasyon genellikle E1/E2 bölgesinde meydana gelmekte ve virüs transkripsiyonu ve replikasyonu için gerekli ürünleri kodlamaktadır. Özellikle HPV tip 16 ve 18'de E1/E2 aktivasyonu sonucunda E6 ve E7 gen aktivasyonları oluşur. Bu basamak viral onkogenezdaki en önemli basamaklardan birisidir. Oluşan E6 proteini, p53 tümör baskılayıcı proteine bağlanır ve yıkımına neden olur. E7 proteini ise bir başka tümör baskılayıcı protein olan retinoblastom (pRb) ile etkileşir ve onu fosforile hale getirip onun hücreyi S fazına sokan E2F transkripsiyon proteini üzerindeki inhibisyon etkisini ortadan kaldırır. HPV ile enfeksiyonun ve gen ürünlerinin net etkisi hücrenin kontrolsüz olarak S fazına girişidir ve neoplastik sürecin başlamasıdır.²⁸



Şekil 1: Yaş gruplarına göre HPV prevalansı.⁶⁴

2.2.2. HPV-Servikal İntraepitelyal Lezyon ve İnvaziv Kanser İlişkisi

Yıllar içerisinde teknik olanakların gelişmesi ve HPV için daha çok alt tipin tanımlanması ile servikal kanserlerde HPV daha da ön planda yer almaya başlamıştır. Günümüzde, servikal kanserlerde %99, CIN'lerde %94 ve sitolojik olarak normal olgular da ise yaklaşık %46'ya varan oranlarda HPV-DNA pozitifliğini bildiren çalışmalar vardır.²⁹ Özellikle yüksek riskli tiplerden 16 ve 18, invaziv servikal kanser olgularının yaklaşık %85'inde izole edilmektedir ve kanser riskini yaklaşık 200 kat arttırmaktadır. Yüksek dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon (HGSIL) olarak adlandırılan ve histopatolojik olarak CIN 2 ve CIN 3'e karşılık gelen olgularda etken yine yüksek riskli HPV suşlarıdır³⁰ ve tedavi edilmediklerinde spontan regresyon oranları düşüktür.³¹

Tablo 9: Doku tropizmlerine göre HPV sınıflaması ve olası sonuçları (SCC: skuamöz hücreli kanser)

Grup	HPV Tipi	Hedef bölge	Akut hastalık	Kronik hastalık
Kutanöz	1,2	Cilt	Siğil	-
Kutanöz (yüksek risk)	5,8	Cilt	Yaygın siğil	İnvaziv kanser
Mukozal	6,11	Anogenital mukoza	Siğil	-
Mukozal (yüksek risk)	16,18,31,33,45	Anogenital ve oral mukoza	Yaygın siğil	İnvaziv kanser

Bosch ve ark., 22 ülkeden 1000 invaziv servikal kanserin biopsi örneklerini içeren bir çalışma yapmışlar, örneklerin %93'ünde HPV-DNA saptamışlardır³². Lorincz ve ark., 2627 kadında sık görülen 15 HPV tipi ile servikal displazi arasındaki ilişkiyi incelemişler; invaziv kanser olgularının

%84'ünde DNA izole etmişler ve bu izolasyonun %90 kadarını yüksek risk grubundan özellikle de tip 16,18,45 ve 56 olduğunu saptamışlardır.³³ HR-HPV DNA pozitif bulunan, normal sitoloji sonuçlu bireylerde, %30'a kadar CIN 2 veya CIN 3 gelişimi özellikle takip eden 4 yıl içerisinde izlenmektedir. Tedavi sonrası nüks oranları da özellikle HPV pozitifliği devam eden olgularda daha yüksek saptanmıştır.³⁴ Reeves ve ark., 759 invaziv kanser olgusunda %62 oranında HPV tip 16-18 ve %17 oranında HPV tip 6-11 saptamışlardır.³⁵ Meanwell ve ark., 47 invaziv kanser olgusunda HPV tip 16 prevalansını %66, kontrol grubunda ise %35 olarak saptamışlardır.³⁶ Kaufman ve ark., 1128 olguda, HPV DNA varlığını CIN 1 için %39, CIN 3 için %59 oranında saptamışlardır.³⁷

Tablo 10: Servikal kanser ve HSIL olgularında HPV saptanma oranları ve ilk 2 sıklıktaki HPV alt tipleri.⁶⁶

Skvamöz Hücreli Kanser (SCC)			HGSIL	SCC:HSIL	
HPV tipi	sayı	%HPV	sayı	%HPV	Prevalans oranı
Tüm tipler	8550	<u>87.6</u>	4338	<u>84.2</u>	1.04
Tip 16	8594	54.3	4338	45	1.21
Tip 18	8502	12.6	4338	7.1	1.79

Tablo 10, HPV'nin preinvaziv ve invaziv lezyonlarda ne kadar etkili olduğunu ortaya koymaktadır. Skvamöz hücreli kanser (SCC) için 8594 olguyu kapsayan 78 çalışmanın, HGSIL için ise 4338 olguyu kapsayan 53 çalışmanın ele alındığı meta-analizde; kanser olgularında %87.6 ve HGSIL olgularında ise %84.2 oranında HPV prevalansı saptanmıştır. Özellikle HPV tip 16'nın sıklığı göze çarpmaktadır.⁶⁶

Kjaer ve ark.'nın⁶⁸ prospektif kohort çalışmasında, HPV varlığının ne derece risk teşkil ettiğini ortaya koymak için 8656 genç (22-32) ve 1578 yaşlı (40-50) olgu ele alınmıştır. Sitolojik olarak normal ancak HR-HPV pozitif

olgularda, 10 yıl içerisinde CIN 3 veya kanser riski genç grupta %13.6, yaşlı grupta ise %21.2 olarak saptanmıştır. Özellikle 40-50 yaş grubunda sitolojileri normal olsa da, HR-HPV pozitif olan kadınların, daha fazla risk altında olduğunun altı çizilmiştir. Sonuç olarak; HPV'nin preinvaziv ve invaziv lezyonlardaki rolü artık netlik kazanmış bir gerçektir.

2.3. Servikal Kanser Tarama Programı

Servikal epitelde tanınabilen preinvaziv bir değişiklik olması kavramı, servikal kanserin gelişiminin ve doğal seyirinin anlaşılmasında önemli bir adım olmuştur. Papanicolaou ve Trout tarafından pratik sitolojinin temellerinin atılması ve sonradan klinik kullanıma kazandırılması, yakınıması olmayan kadınlara invaziv ve preinvaziv servikal neoplazi açısından tarama yapılmasını sağlayan ikinci önemli gelişmedir.

Gelişmekte olan ülkelerde hem yıllık servikal kanser insidansı, hem de bu kanserden ölüm oranları daha fazladır. Bunun nedeni tarama programlarının yaygın kullanılmamasıdır. Yıllık Pap smear testi ile bir kadının serviks kanserinden ölme riski 4/1000'den 5/10.000'e indiği tahmin edilmektedir. Dünya Sağlık Örgütü, 10 yılda bir sıklıkta tarama programı ile servikal kanser insidansında %64'lük azalma sağlanacağını rapor etmiştir³⁸.

Optimal tarama için öncelikle olabildiğince geniş bir popülasyonun yararlanmasını sağlamak ve bu popülasyonda taramanın periyodik olarak yapılmasına olanak sağlamak esas kabul edilmektedir. Cochrane ve Holland, taramalar için gerekli kriterleri şöyle belirtmişlerdir:

- **Kolaylık:** Testler paramedikal ve diğer personel tarafından uygulanabilir kolaylıkta olmalıdır.
- **Kabul edilebilirlik:** Yeterli gönüllü sağlanması için kişilerce kabul edilebilir olmalıdır.
- **Doğruluk:** Testler araştırılan katılımcıların doğru ölçümünü verebilmelidir.
- **Maliyet:** Taramanın maliyeti, hastalığın erken tanısından doğacak yararlarla karşılanabilir düzeyde olmalıdır.

- **Kesinlik:** Testler tekrarlayan uygulamalarda tutarlı sonuçlar vermelidir.
- **Sensitivite:** Testler hastalıklı popülasyonun tüm üyelerini saptayacak nitelikte olmalıdır.
- **Spesifite:** Testler bütün hastaliksız kişileri doğru saptayacak nitelikte olmalıdır.

Bütün jinekolojik hastalardan alınan yaymaların incelendiği sitoloji laboratuvarlarında, 'klinik olarak kanser kuşkusu bulunmadığı halde' sitoloji ile kanser saptanan olguların oranı %0.8-1 arasında değişmektedir. O halde, taramaya ne zaman başlanacağı, ne sıklıkla tarama yapılacağı ve nasıl bir yaklaşımın sergileneceği konuları akılda soru işareti uyandırmaktadır. Bu soruların cevapları, yıllar içerisinde servikal kanser ile ilgili araştırmalar ve veriler arttıkça değişmeye başlamıştır. 'Bugün cinsel aktif olan veya geçmişte olmuş veya 18 yaşına gelen tüm kadınlar yıllık taramadan geçirilmelidir' görüşü hakimdir ancak unutulmamalıdır ki, Pap smear testinde yanlış negatif sonuçlar da elde edilebilmekte ve oranın %1,1 ile %30 arasında değiştiği bilinmektedir. Yanlış negatifliğin nedenlerini araştıran çalışmalarda, %70-100'e varan oranlarda teknik hatalar, %30 oranında ise patoloğa bağlı değerlendirme hataları saptanmıştır. Bu hataların azaltılması için Amerikan Obstetrisyen ve Jinekologlar Derneği (ACOG) önerileri yayınlanmıştır.³⁹

- Hücreler muayeneden önce alınmalıdır.
- Lubrikan madde kullanılmamalıdır.
- Örnekleme, infeksiyon varlığında alınacak kültür öncesi yapılmalıdır.
- Örnek alınırken tüm porsyo görülmelidir.
- Alınacak örnek hemen fikse edilmelidir.

ACOG Kriterleri: ³⁹

1. Hayatı boyunca herhangi bir dönemde veya halen seksüel olarak aktif olan veya 21 yaşına gelmiş olan tüm kadınlar yıllık pelvik muayene ve Pap testi yaptırmalıdır.

2. 30 yaş üzeri ve 3 kereden fazla ardışık yıllık normal pelvik muayene ve Pap testi sonrasında, düşük risk gurubu kadınlarda (HIV pozitifliği, intrauterine DES ile karşılaşma ve immün yetmezlik olmaması) hekimin değerlendirmesi ile kontroller daha uzun aralarla yapılabilir:

- HIV pozitifliği varsa ilk yıl 6 ayda bir, daha sonra yılda 1 kez
- Geçmişte CIN 2 veya CIN 3 nedeniyle tedavi veya servikal kanser varsa yılda 1 kez
- Daha önceki smear sonuçları negatif olan hastanın şimdiki smear testinde endoservikal hücreler görülememiş veya kan hücreleri ile kontamine olmuş ise yılda 1 kez taramaya devam edilmelidir

3. Total histerektomi geçirmiş ve HGSIL anamnezi olmayan kadınlar taramadan çıkartılabilir.

- Histerektomi geçirmiş, ancak HGSIL anamnezi olan kadınlar, 3 kez yıllık smear sonucu negatif olarak saptandıktan sonra taramadan çıkartılabilir
- Histerektomi geçirmiş ve daha öncesinde HGSIL nedeniyle tedavi alıp, 3 kez yıllık smear sonucu negatif olarak saptanmış olan kadınlar taramadan çıkartılabilir

Tablo 11: Papanicolaou sınıflaması

Klas 1	Normal, atipik hücre yok
Klas 2	Negatif. Benign değişiklikler
Klas 3	Şüpheli. Hafif, orta yada şiddetli displazi. Kesin olarak kanser hücresi olmayan anormal hücreler
Klas 4	Karsinoma in situ. Büyük olasılıkla malign hücreler
Klas 5	Kuvvetli pozitif. Çok sayıda malign hücre

Servikal ve vajinal patolojik değişiklikleri rapor etmek için 1988'de Bethesda sistemi oluşturulmuş, 1991'de terminoloji ve standart tanısal raporlar elde edilmesi için tekrar gözden geçirilmiştir. 2001 yılında Bethesda sistemi, komitenin literatürü tekrar gözden geçirmesi, uzman görüşlerinin talepleri ve önerilen değişikliklerin sanal ortamda tartışılmasını takiben bir dizi işlemler sonrasında yeniden oluşturulmuştur.

2.3.1.Genel Sınıflandırma (Bethesda 2001/Bethesda III)

A-İntraepitelyal lezyon veya malignite yönünden negatif:

1-Organizmalar

- T.vaginalis
- Kandida türleri ile uyumlu fungal organizmalar
- Bakteriyel vajinoz ile uyumlu florada kayma
- HSV ile uyumlu hücresel değişiklikler

2-Diğer non-neoplastik değişiklikler (rapor edilmesi opsiyonel):

- *Reaktif hücresel değişiklikler (1.inflamasyona bağlı 2.radyasyon 3.intrauterin araç)
- *Histerektomi sonrası glandüler hücrelerin durumu
- *Atrofi

B-Epitelyal hücre anormallięi:

1-Skuamöz hücreler

- Atipik skuamöz hücreler (ASC)
- Önemi belirlenemeyen (ASC-US)
- ASC, HGSIL tanısı dışlanamayan (ASC-H)
- Düşük dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon (LGSIL)
- Yüksek dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon (HGSIL)
- Skuamöz hücre karsinomu (SCC)

2-Glandüler hücreler

- Atipik glandüler hücreler (AGC)
- Endoservikal
- Endometriyal

-Glandüler (AGC-NOS/neoplastik hücre benzeri/endoservikal adenokarsinoma in-situ (AIS)/adenokarsinoma)

Atipik Skuamöz Hücreler (ASC): Yıllar içerisinde çok sayıda tartışmaya neden olan ve yeniden gözden geçirilip değişime uğrayan sitolojik tanılardan biri de atipik skuamöz hücre olarak adlandırılan gruptur. Bu grup, 2001 yılında önemi belirsiz atipik skuamöz hücre (ASC-US) ve yüksek dereceli skuamöz intraepitelial lezyonun ekarte edilemediği atipik skuamöz hücre (ASC-H) olmak üzere 2 gruba yeniden klasifiye edilmiştir. Yeni sınıflama sonucunda, 2001'den önce 'ASCUS-favor reactive' olarak tanı almış olguların önemli bir kısmı ASC-US ve bir kısmı ise malignite ve intraepitelial lezyon yönünden negatif (NILM) olarak yeniden değerlendirilmiştir. Yeni sisteme göre NILM olarak değerlendirilen bu olguların ne kadarında histolojik olarak önemli lezyonun atlanabileceği konusu da gündeme gelmiştir. Thrall ve ark.⁴¹, önceden ASCUS tanısı almış 535 olguyu yeni 2001 sistemine göre değerlendirdiklerinde, 169 (%32) olgu bu kez NILM olarak tanı almıştır. NILM tanısı alan olgular, diğer tanılara göre daha düşük HR-HPV oranı (%11'e karşı %30) ve histolojik olarak daha az CIN 2 ve 3 (%5'e karşı %10) göstermişlerdir ancak araştırmacılar, yeni sistem ile birçok ASCUS olgusuna gereksiz ileri incelemenin önüne geçilebildiği gibi, NILM olarak tanı almış bir kısım olguda ise HR-HPV ve histolojik olarak CIN 2 ve 3 olabileceğinin altını da çizmişlerdir.

Yeni sınıflamanın kullanıma girmesi ile, tartışmaların odaklandığı bir diğer sitolojik grupta ASC-US'tur. Bu tanının konulabilmesi için gerekli sitolojik kriterler:

1- Nükeer genişleme mevcut: normal intermedier skuamöz hücre nükleuslarının 2.5-3 katı arasında, nükleus/sitoplazma oranı hafifçe artmıştır.

2- Nükleer büyüklük ve şekil bakımından varyasyon, binükleasyon görülebilir.

3- Hafif hiperkromazi olabilir, kromatin granülaritesi değişir.

4- Nükleer çevre düzgün ve regülerdir. Limitli irregülarite görülebilir.

Standart tanısal yöntemler kullanıldığında, ASC-US insidansı ortalama %3-5 arasında değişmektedir.⁴² Tüm dünyada ortalama 2 milyondan fazla ASC-US olgusunun olduğu tahmin edilmekte ve bunların 1,5 milyon kadarında kolposkopik incelemede klinik önemli lezyon varlığının olduğu düşünülmektedir⁶⁷. ASC-US varlığında, biopsi materyallerinde %10-20 CIN 1, %3-5 CIN 2 veya 3 izlenmektedir.⁴² Bu olgularda, %0.1-0.2 oranında invaziv kanser varlığı bildirilmiştir. CIN 1 olgularının benign HPV ile ilişkili oldukları ve %60 olguda spontan regresyona uğradıkları göz önünde bulundurulur ise, sitolojik triaj çalışmalarının odaklanması gerektiği grup CIN 2 ve üzeri lezyonlardır. ASC-US grubu ile ilgili sorunlardan biri, sonuçlar için gözlemciler arası değişkenliklerdir. ASCUS/LSIL Triage Study (ALTS)⁴⁵ tarafından daha önce ASC-US olarak değerlendirilmiş 3488 adet olgu, Patoloji Kalite Kontrol Grubu ile tekrar değerlendirilmiş, sonuç olarak olguların %55'inin aynı kalıp, %31'inin normal'e gerilediği, %11'inin SIL ve %3'ünün ise HSIL'a yükseldiği bildirmiştir.

Tablo 12: Anormal sitoloji oranlarının dağılımı.⁸⁸

Sitolojik tanı	Oran %
ASC-US	3.5
AGUS	0.5
LGSIL	0.9
HGSIL	0.3
Total displazi	5.2

ASC-US olarak rapor edilen olguların triaji ile ilgili de tartışmalar devam etmektedir. Bilindiği gibi, Amerikan Kolposkopi ve Servikal Patoloji

Cemiyeti (ASCCP) önerilerine göre bu kategori smear'lerin yönetimi için 3 farklı metod mevcuttur:

1-Kolposkopi

2-Tekrar sitoloji

3-HPV-DNA testi

HPV-DNA testinin klinik pratikte daha fazla sayıda ASC-US olgusu için kullanılması, ALTS⁴⁵ çalışmasının sonuçlarının açıklanması ile ivme kazanmıştır. Bu çalışmada 3488 ASC-US olgusu, 3 farklı triaj için randomize edilmiştir. Çalışma sonucunda CIN 2 ve üzeri lezyon referans alındığında, HPV-DNA testi %95.9 sensitif, CIN 3 ve üzeri lezyonlar için ise %96.3 sensitif saptanmıştır. Bu oranlar tekrar sitoloji kolunda ASC-US ve üzeri olgular için sırasıyla %85 ve %85.3 olarak bulunmuştur. Hemen kolposkopi ve HPV-DNA testini takiben kolposkopi incelemesi sonucunda saptanan toplam 131 adet CIN 3 ve üzeri lezyonun 125'inde (%96) HR-HPV pozitif saptanmıştır. Bu oran HGSIL ve üzeri sitoloji için %44.1'de kalmaktadır. Sonuç olarak, ASC-US olgularında hc2 metodu ile HR-HPV saptanarak, toplam ASC-US olgularının %43.9'una gereksiz kolposkopi yapılmamış olunacağından, hem maliyet açısından hem de sensitivite göz önünde bulundurularak etkin bir triajın sağlanacağı bildirilmiştir.

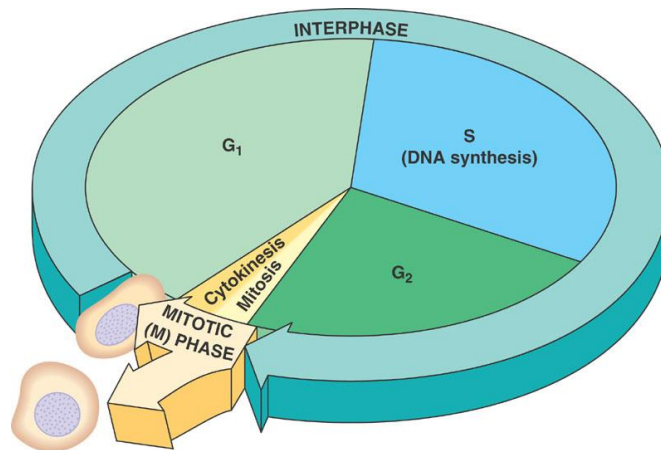
Hemen kolposkopi, hızlı tanı imkanı vermesi ve olası atlanacak olguları önleyebilmesi açısından değerli ancak invaziv olması, yüksek maliyeti, aşırı tedaviye yol açabilmesi açısından ise dezavantajlı olarak değerlendirilmektedir. ALTS çalışmasında hemen kolposkopi yapılan grupta CIN 3 lezyonlarına %100 tanı konulmasına rağmen, Amerika'da kolposkopi maliyetinin HPV testine göre 3-4 kat daha fazla olması nedeniyle çok pahalı bir tetkik olarak değerlendirilmektedir.

ASC-H grubu, ASC'lerin yaklaşık %5-10'unu oluşturmaktadır. Bu tanıyı almış olgularda olgularda HPV pozitiflik oranı %70-86 arasında değişmekte, CIN 2 ve CIN 3 oranı ise %24-94 arasında saptanmaktadır. Çalışmalarda ASC-H alt grubunun CIN 2 ve üzeri lezyonlar için ASC-US ve HGSIL arasında değere sahip olduğu gösterilmiştir.

ASC-H tanısı almış olguların başlangıç tetkiki, CIN 2 ve üzeri lezyon bulundurma olasılığı daha fazla olduğundan, kolposkopi olarak önerilmektedir. Kolposkopide, herhangi bir lezyon gösterilemezse, kolposkopik-histolojik-sitolojik tetkiklerin tekrar gözden geçirilmesi önerilmektedir. Gözden geçirme sonrasında tanı aynı ise, 6 ay ara ile sitoloji tekrarı veya 12 ay sonra HPV DNA testi yapılabilir.

2.4. Hücre Siklusu

Çoğalmak üzere uyarılmış hücrede gerçekleşen olaylar dizisine hücre siklusu adı verilmektedir. Bir sıklusa giren hücre, morfolojik ve genetik olarak birbirine benzeyen iki hücre oluşumuyla döngüsünü tamamlar. Gerekli bölünme uyarısı öncesinde hücre dinlenme fazı olan G₀ fazında bekler. Ancak hücre bölünme sinyali alır ise, sinyal ileti kaskadı adı verilen sistem devreye girer ve interfaz adı verilen (G₁-S-G₂) dönemlere sırası ile girilir⁴⁶. G₁ fazı, hücre siklusunun süresi açısından en değişken fazdır ve bu fazın süresi siklusun en önemli belirleyicisidir. Bu dönemde hücre bölünme, diferansiyasyon ya da hücre ölümü için karar verir ve bazı genlerde değişiklikler başlar.



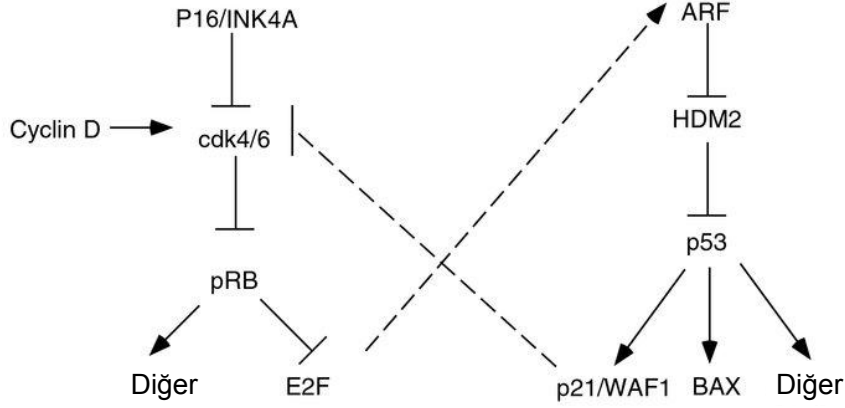
Şekil 2: Hücre Siklusu

Hücre, S fazında, DNA'sını hızlıca replike eder. Hızlı olmasının nedeni, DNA iplikçiklerinin birbirinden ayrılması esnasında bazlar, çeşitli ilaçlar veya mutajenler gibi dış ajanların etkisine açık halde bulunurlar. Bu nedenle işlem hızlı olmalıdır. G2 fazında, bir önceki fazda replike olmuş DNA ve kromatin proteinleri kondanse olurlar ve paketlenirler. M fazında, kromatidler düzgün bir şekilde aynı hizaya gelirler ve ardından çeşitli aşamalardan geçerek hücre ikiye bölünür. Siklusda interfaz 24 saatlik dönemin 23 saatini doldururken mitoz safhası sadece 1 saat sürer.⁴⁷ Hücre siklusu, siklusa özgü bir takım proteinler olan siklinler, siklin-bağımlı kinazlar (CDK) ve siklin-bağımlı kinaz inhibitörleri (CDI) tarafından özgün olarak kontrol edilir. Siklinler, CDK ve CDI'lerinin düzeyleri hücre siklusunun çeşitli aşamalarında farklılık gösterir ve oldukça karmaşık bir düzen içinde siklusun ilerlemesini düzenlerler. Çeşitli siklinler, siklusun farklı aşamalarında artış gösterip görev yaparlar; örneğin siklin A; CDK1 ve 2'ye bağlanarak S fazında aktive kompleks oluşturur. Siklin B; CDK2 ile etkileşime girer ve kompleksin anafazda yıkılmasıyla birlikte hücre mitozdan çıkıp G1'e tekrar geri döner. Siklin E, CDK2'yi regule eder, G1/S fazlarının sınırında geçici olarak sentez edilir ve hücre S fazına girdiği anda hızla yıkılır. Burada ki kilit roldeki moleküllerden biri de, siklin-D'dir. Bu siklin grubu, başlama siklinleri olarak adlandırılır ve büyüme faktörleri ile mitojenlere yanıt olarak sentez edilirler. Mitojenler ortamdaki uzaklaştırıldığında ise hızla yıkılırlar. Hücre siklusunda ilk artan siklinlerdir ve D1, D2, D3 olarak 3 formu bulunur. Hücre siklusunun G1 fazı boyunca CDK4'e bağlanırlar ve aktive olarak siklin D-CDK4 kompleksi oluşur. Bu kompleks, Rb fosforilasyonunda kilit role sahiptir. Henüz fosforile olmamış (hipofosforile) Rb, çoğalmayı indükleyen E2F transkripsiyon faktörü ile inaktif kompleks halindedir ve bu aşamada hücre çoğalmasını baskılar. Fakat Rb'un fosforilasyonu ile bu kompleks çözülür ve E2F transkripsiyon aktivitesinin inhibisyonu ortadan kalkar. Böylece Rb fosforilasyonu ile, hücre siklusunda bölünmenin ana engeli ortadan kalkmış olur ve hücre çoğalmaya başlar⁴⁷. Normal hücre siklusunda, M fazında fosfat grupları Rb'dan ayrılır ve Rb hipofosforile hale döner.⁴⁹

Siklin bağımlı kinaz inhibitörleri (CDI), siklinler, CDK'ların kendisi yada siklin-CDK komplekslerine bağlanarak CDK'ların aktivitelerini inhibe ederler. İki CDI ailesi saptanmıştır. Bunlardan ilki KIP ailesidir ve 2 proteinden meydana gelir (p27 ve p57), diğeri INK4 ailesidir ve 4 proteinden oluşmaktadır (p15, **p16**, p18,p19). INK4 ailesi, siklin D/CDK4 ile siklin D/CDK6 üzerine selektif etkiye sahiptir ve kontrolsüz hücre bölünmesi varlığında, engelleme mekanizması oluşturmak için fazlaca sentez edilirler. Siklin D veya CDK4 ile ilgili normal dışı durumlar, neoplastik süreçlerde sıkça karşımıza çıkar. Siklin B, siklin E ve diğerk CDK'ları ilgilendiren mutasyonlar bazı malign tümörlerde görülmesine karşın, siklin D/CDK4'ü ilgilendirenlerden daha seyrek olarak izlenmektedirler.⁵⁰

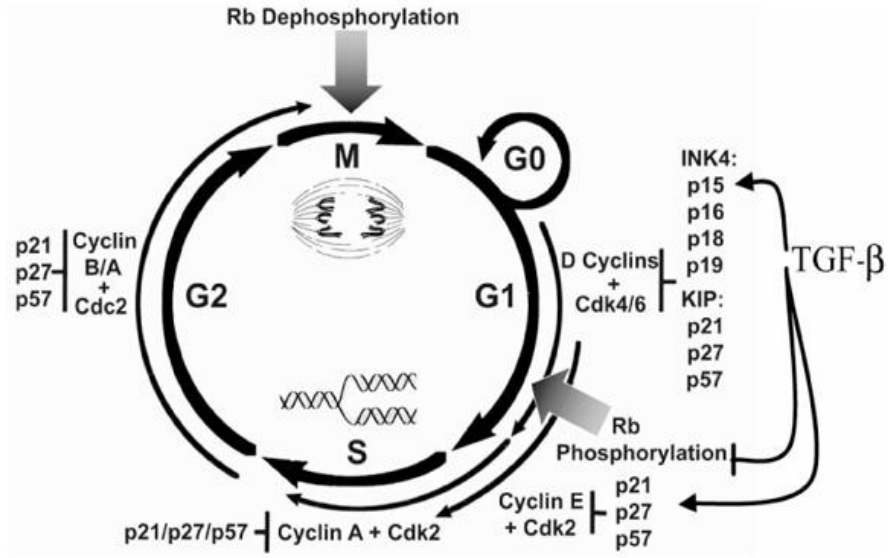
2.5. P16 Proteini

CDI grubuna dahil olan p16 (INK4A) proteini, tümör supresör gen olarak kabul edilmektedir. Kromozom 9p21'de kodlanmakta ve pek çok kanser türünde mutasyon, delesyon veya hipermetilasyon yoluyla inaktivasyonu yaygın olarak izlenmektedir. CDK4 ile CDK6'ya bağlanarak aktif siklin D-CDK kompleksinin oluşumunu engeller ve bu şekilde hücre siklusunda kontrolsüz çoğalmanın önüne geçmeye çalışır. Dolaylı olarak Rb fosforilasyonunu inhibe ettiğinden, Rb'un tekrar aktivasyonu yolu ile E2F'e bağlanmasını sağlar ve proliferasyonu kontrol altına almaya yardımcı olur.^{49,51}



Şekil 3: p16 proteininin hücrede regülatör rolü

Hücre siklusunda, hipofosforile Rb'un kilit rol üstlenmesi ile kontrolsüz proliferasyon engellenmektedir. Ancak Rb'da mutasyon, delesyon veya direkt inaktivasyon olursa, siklus kontrolsüz bir şekilde çoğalma yönüne kayacaktır. Burada örnek olarak HPV ile enfeksiyon durumları gösterilebilir. Hücre içine girmiş virüs, konakçı DNA'sına entegrasyon veya ekstra kromozomal olarak epizomal form halinde seyir gösterir. Entegre olacak ise, bu işlem viral E1-E2 bölgesinde meydana gelmektedir. E2'nin ayrışması sonucunda, E6 ve E7 transformasyon genleri kontrolsüz olarak sentezlenmeye başlar. Onkojenik HPV E7 geni, CDK bağımlı fosforilasyon ile pRb proteininin fonksiyonlarını inhibe eder. Sonuçta aktive olmuş transkripsiyon faktörü E2F serbest kalır ve S fazına giriş tetiklenir. HPV DNA entegrasyonuna sekonder oluşmuş hücre siklusunda, E2F aktivasyonuna yanıt olarak, CDI olan p16 proteini fazla miktarda sentezlenir,⁵² böylelikle HPV pozitif premalign lezyonlarda p16 protein artışı izlenmektedir. Bu olay, tümörögenizde oluşan en erken olaydır⁽⁵³⁾. Düşük riskli HPV tiplerindeki E7 proteininin Rb afinitesi, yüksek riskli HPV tiplerinden daha düşüktür, bu nedenle düşük riskli tipler ile enfekte olgularda, p16 proteininin aşırı sentezi görülmez.⁵⁴



Şekil 4: p16 proteininin hücrede regülatör rolü

Özellikle histolojik spesimenlerde, servikal displazinin şiddeti ve p16 proteini ile boyanma arasındaki ilişkiyi ortaya koymak adına Klaes ve ark. birçok çalışma yapmışlardır. HR-HPV pozitif CIN ve kanser olguları ile p16 proteini arasındaki ilişkiyi ortaya koymak için yaptıkları çalışmalarında, düşük risk HPV saptanan olguların dışında kalan CIN 1 olgularının tamamının, CIN 2-3 olgularının tamamının ve kanser olgularının 58/60'ünün hem HR-HPV pozitif olup hem de p16 ile kuvvetli-diffüz boyanma gösterdiği belirtilmiştir.⁵⁵ Murphy ve ark.'nın 2001'deki çalışmasında, serviksin skuamoz ve glanduler lezyonları için, p16 antikoru ile triaj çalışmasının sensitivitesi %99,9, spesifitesi ise %100 olarak rapor edilmiştir. Araştırmacılar servikal diskaryozis için de p16'nın tanıda önemini vurgulamışlardır.⁵⁷ Lambert ve ark., premalign ve malign servikal lezyonlarda, p16 ekspresyonunu ortaya koyan çalışmalarında, boyanma oranlarını LSIL için 1/3 , HSIL için 18/19 ve kanser vakalarında ise 26/26 (%100) olarak rapor etmişlerdir.⁵⁸ Benzer şekilde Agoff ve ark. çalışmasında, p16 ekspresyonunun derecesi ile hem servikal lezyonlar arasında hem de HR-HPV varlığı arasında anlamlı korelasyon saptandığı vurgulanmış, düşük riskli HPV ile enfekte olguların daha az p16 ekspresyonu gösterdikleri belirtilmiştir.⁵⁶

Klaes ve ark.'nın ileri sürdüğü bir diğer görüş ise, p16 antikorunun özellikle sitolojik çalışmalarda da kullanılabilirliği.⁵⁵ P16 antikorunun sitoloji alanında etkinliği ile ilgili çalışmalar, aslında 2000'li yılların başından beri mevcuttur. Nieh ve ark.'nın, 2004 yılında yaptıkları bir çalışmalarında; 66 ASCUS olgusu hem HPV DNA hem de p16 yönünden incelenmiş, sonuçlar doku tanıları ve dokudaki p16 varlığı ile karşılaştırılmıştır. Sonuçta, smear'lerin p16 ile zayıf veya kuvvetli boyanması ile doku tanıları arasında anlamlı ilişki saptanmış, smear'lerde p16 pozitifliği ile HR-HPV varlığı arasındaki yakın ilişki vurgulanmıştır.⁶⁰ Haidapoulos ve ark.'nın 2009 yılında yaptığı bir çalışmada 62 anormal smear olgusunun biopsi sonuçları değerlendirilmiş, yüksek dereceli lezyonlarda (HSIL) p16 antikor ile boyanma sensitivitesi %75, kanser olgularında ise %100 olarak saptanmıştır. Araştırmacılar, p16 ile boyanmanın özellikle CIN 2 ve üzeri lezyonlar ile kanser saptamada sensitif bir parametre olabileceğini vurgulamışlardır.⁶¹ Wentzensen ve ark.'nın bir çalışmasında, 137 ASC-US ve 88 LGSIL olgusu doku biopsileri ile birlikte değerlendirilmiş, smear'ler p16 ile özel bir skorlama yapılarak boyanmış, sonuç olarak > 2 nükleer boyanma skoru için yüksek evre servikal lezyon yakalamada sensitivite ve spesifite sırasıyla %96 ve 83 olarak rapor edilmiştir.⁶² Negri ve ark.'nın, sıvı bazlı smearlerde p16 proteini ile yaptıkları çalışmalarında, ASC-H için %90, LGSIL için %70 ve HGSIL için %100 p16 boyanma oranları saptamışlar ve bunlarda boyanma yoğunluğunun, displazinin şiddeti ile birlikte korelasyon gösterdiğinin altını çizmişlerdir.⁵⁹

P16 antikoruna ile yapılan bütün çalışmalar; boyanma gösteren olguların, muhtemelen yüksek riskli HPV ile enfekte olan olgular olduğunu düşündürmektedir. Artmış onkojenik HPV yükü, enfeksiyonun persiste etmesine, konak tümör süpressör proteinleri üzerine olan etkileri nedeniyle konak hücre siklus kontrolünün bozulmasına, hücresel DNA hasarına ve hücre büyüme kontrolünün bozulmasına neden olarak kansere gidişe sebep olmaktadır.

Çalışmalar göstermiştir ki yüksek riskli HPV'nin pozitif saptandığı lezyonlarda p16 proteini daha kuvvetli olarak ortaya koyulmaktadır. Özellikle

triajları konusunda tartişmaların devam ettiği sitolojik olgularda, geçici veya kronik hastalığı predikte etmeye yarayan bir metodun varlığı sorgulanmakta, özellikle p16 molekülünün bu ayrımı yapabilmeye etkin olup olmadığı tartişma konusu olarak karşımıza çıkmaktadır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1.Olgu Seçimi

Çalışmaya, 2007-2009 yılları arasında, Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Kadın hastalıkları ve Doğum polikliniklerinde, rutin servikal kanser taraması için Pap smear incelemesi yapılan ve sonucu atipik skuamöz hücre (ASC=ASC-US + ASC-H) olarak değerlendirilen, takiben lezyondan direkt biopsi veya kolposkopi eşliğinde biopsi incelemesi yapıp histopatolojik olarak da incelenmiş 100 adet olgu dahil edilmiştir.

A-) 100 adet atipik skuamöz hücre tanısı almış Pap smear olguları **p16 (E6H4 klonu) antikoru ile boyanma varlığına** göre 2 gruba:

1-Boyanma var

2-Boyanma yok

B-)100 adet atipik skuamöz hücre tanısı almış Pap smear olgularının **histolojik** sonuçları da toplam 3 gruba ayrılmıştır:

1-reaktif değişiklikler veya servisit (toplam 79 olgu)

2-CIN 1 (toplam 13 olgu)

3-CIN 2 ve CIN 3 (toplam 8 olgu)

(CIN 2 üzeri lezyonlar, CIN 2+ olarak ifade edilmiştir.)

3.2. İmmünohistokimyasal İnceleme

100 adet konvansiyonel olarak hazırlanmış Pap smear preparatının herbiri için aşağıdaki işlemler uygulanmıştır:

- 1000 cc %70'lik alkol ile 5 cc hidroklorik asitten hazırlanmış asit-alkol solüsyonu vasıtasıyla Papanicolaou boyası ile boyanmış Pap smear olgusunun soldurulması- dekolorize edilmesi
- Preparatların, alkol inkübasyonu ve rehidrasyon aşaması için %50'lik etanol banyosunda yaklaşık 10 dakika inkübasyonu ve

üzerlerindeki fazla sıvının alınarak deionize su ile muamele edilmesi

- Epitop uzaklaştırma solüsyonu (ERS) içeren kap ve onun da içine konulduğu su banyosunun 95-99C'ye kadar ısıtılmasını takiben preparatların ERS dolu ısıtılmış kaba batırılması ve 10 dakika inkübasyonu. Takiben 20 dakika soğutulmaya bırakılması
- Preparatların otomatik boyama cihazına yerleştirilmeleri
- Yıkamayı takiben 200 microL peroksidaz bloke edici ajan ile 5 dakika muamele
- Yıkamayı takiben p16 (E6H4) antikoruna ile 30 dakika muamele
- Yıkamayı takiben vizualizasyon ajanı ile 30 dakika muamele
- Yıkamayı takiben 200 microL substrat kromogen solüsyonu ile 5 dakika muamele (arka arkaya 2 kez)
- Deiyonize suya tüm preparatların batırılması
- Preparatların hematoksilen banyosunda 2-10 dakika bekletilmesi ile ters boyanma işlemi ve fazla hematoksilenin temizlenmesi
- Preparatların boyanma açısından incelenmesi:

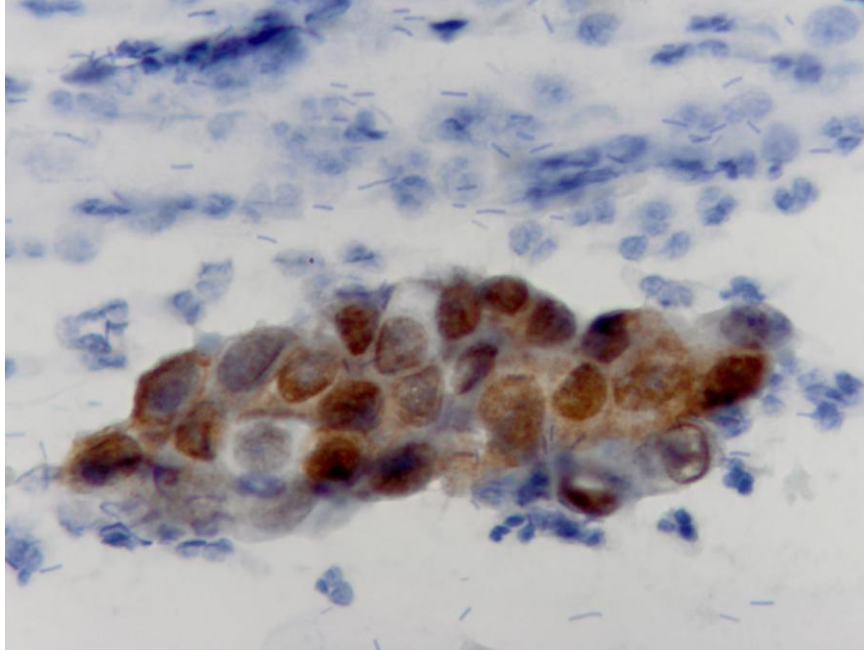
3.3. İmmünohistokimyasal Değerlendirme:

Değerlendirme için literatür bilgisi dahilinde boyanma kriterleri kabul edilmiş ve olgular, p16 antikoruna ile boyanıp boyanmama durumlarına göre ayrıştırılmıştır.

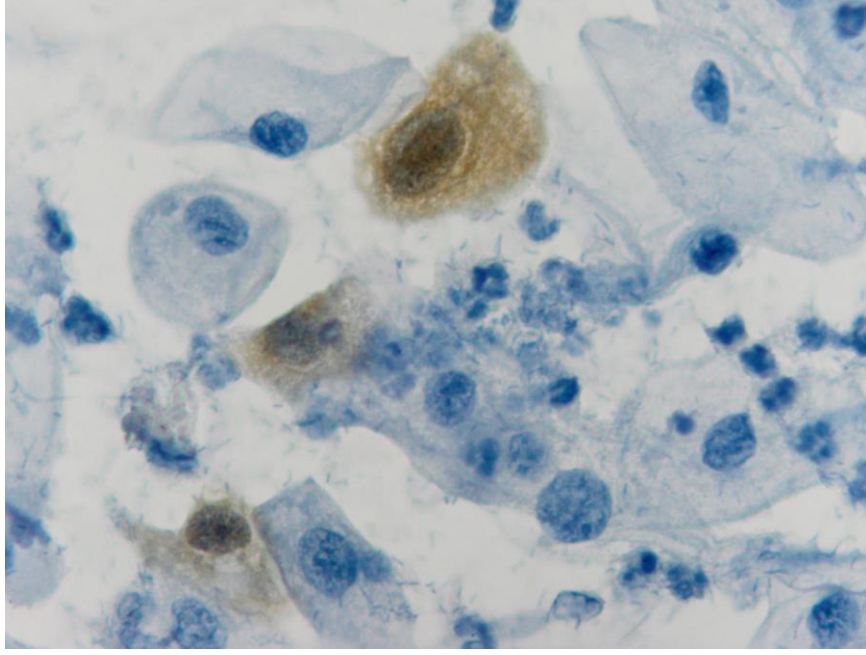
- Her bir preparatın içerdiği hücreler, nükleer ve/veya sitoplazmik olarak p16 antikoruna ile boyanmasına göre değerlendirilmiş, preparat başına >5 atipik hücre, nükleer ve/veya sitoplazmik olarak boyanma paterni göstermiş ise, olgu boyanma açısından pozitif olarak kabul edilmiştir.

3.4. İstatistiksel Analiz

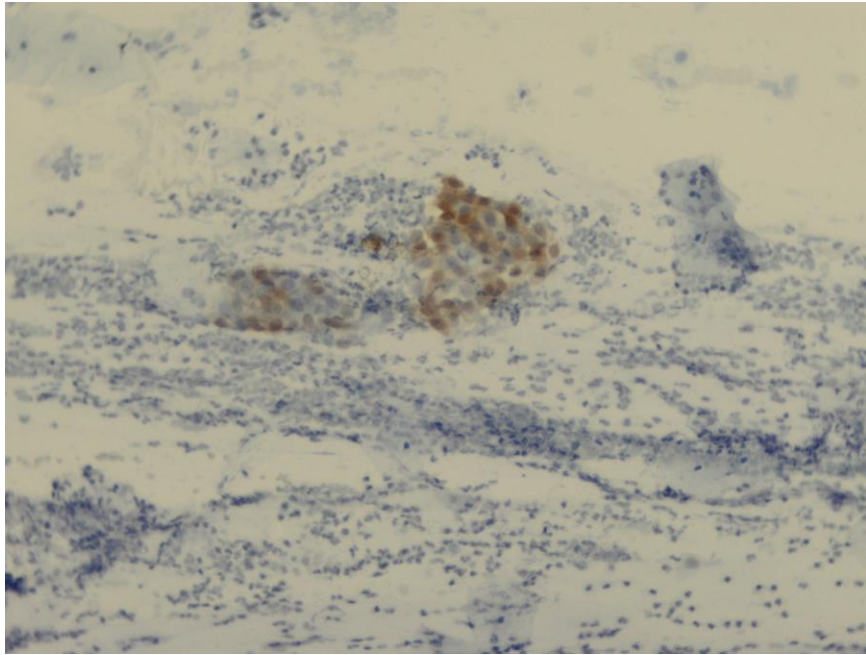
Verilerin analizi 'SPSS for Windows 15,0 paket programında yapılmıştır. Tanımlayıcı istatistikler olgu sayısı, (%), median (min-maks), Mean± Std. Deviation olarak gösterilmiştir. Gruplar arasında ortalama karşılaştırırken dağılım normal olmadığında Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. Gruplar arasında yüzde karşılaştırırken ki-kare test yapılmıştır. Teste ait sensitivite, spesifite, pozitif ve negatif prediktif değerler hesaplanmıştır. $p < 0,05$ için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.



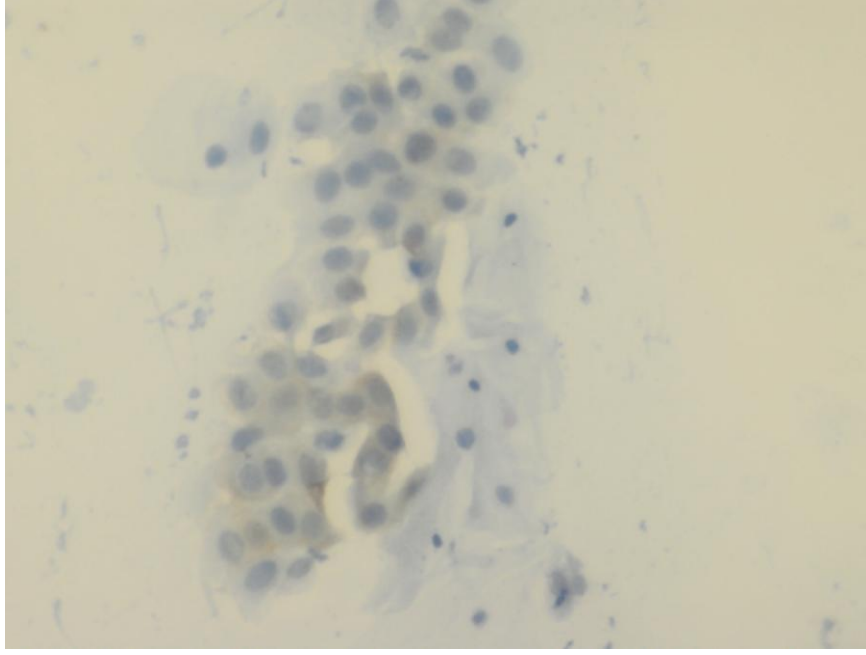
Resim 1: E6H4 p16 antikoruna pozitif boyanma göstermiş çalışma olgusu



Resim 2: Nükleer ve sitoplazmik olarak p16 antikoruna ile boyanmış bir hücre



Resim 3: E6H4 p16 antikoruna ile pozitif boyanma göstermiş çalışma olgusu



Resim 4: E6H4 p16 antikoru ile pozitif boyanma göstermemiş çalışma olgusu

4. BULGULAR

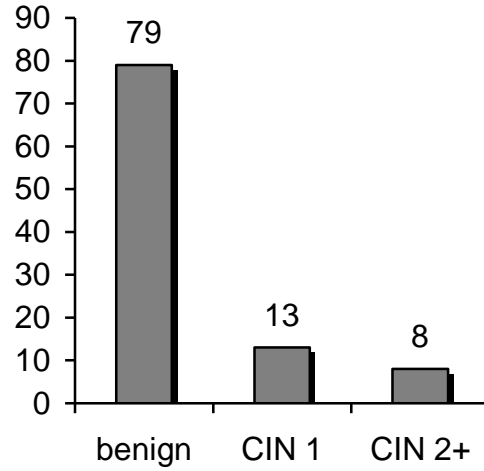
Sitolojik Tanılar İçin;

- ASC-US tanısı alan toplam 73 olgunun yaş ortalaması 31 (20-48)
- ASC-H tanısı alan toplam 27 olgunun yaş ortalaması 42 (21-61)

Histolojik Tanılar İçin;

- Reaktif değişiklikler veya servisit tanısı olan toplam 79 olgunun yaş ortalaması 32 (18-50)
- CIN 1 tanısı alan 13 olgunun yaş ortalaması 32
- CIN 2+ lezyon tanısı alan 8 olgunun yaş ortalaması 43

Tablo 13: 100 adet ASC olgusunun histopatolojik sonuçları



Tablo 14: ASC-US ve ASC-H alt gruplarına göre doku tanılarının dağılımı

Histopatolojik Tanılar	ASC-US (73 olgu)	ASC-H (27 olgu)
Reaktif değişiklikler	65 (%89)	14 (%51,8)
CIN 1	8 (%11)	5 (%18,5)
CIN 2+	0	8 (%29,6)

ASC-US olgularının %90'ında histopatolojik tanı reaktif değişiklikler iken ASC-H olgularının %48'i reaktif değişiklikler olarak rapor edilmiştir. CIN 2+ tanılı olguların tamamı, smear sonucu ASC-H olarak rapor edilen grupta saptanmıştır.

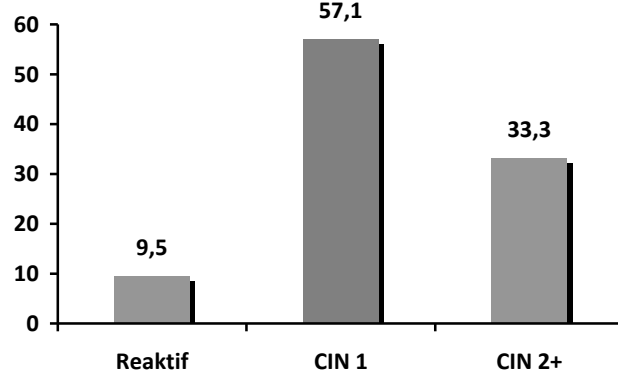
Tablo 15: ASC-US ve ASC-H alt gruplarının p16 ile boyanma durumları ve boyanma gösteren olguların histopatolojik dağılımları

	ASC-US (73)	ASC-H (27)
p16 ile boyanma (21 olgu)	8 (%11)	13 (%48)
Reaktif Değişiklikler	1/65	1/14
CIN 1	7/8	5/5
CIN 2+	-	7/8

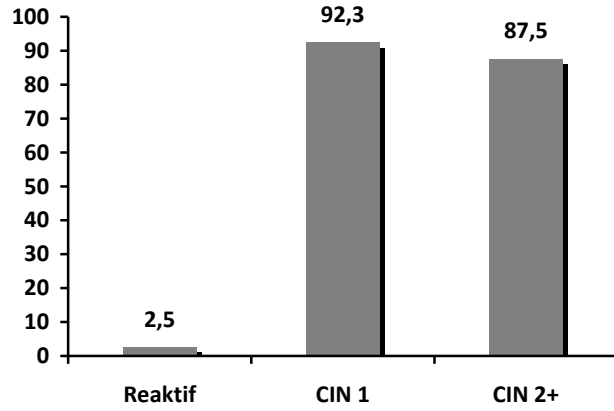
Toplam 100 adet ASC olgusunun sadece 21 tanesi p16 antikoru ile boyanma göstermiştir (%21). Bu 21 adet boyanma gösteren olgunun;

- 8 tanesi ASC-US grubundandır, tüm ASC-US olgularının %11'i p16 ile boyanma göstermiştir. Boyanma gösteren ASC-US olgularına karşılık gelen histopatolojik tanıların 1 tanesi reaktif değişiklik, kalan 7 tanesi CIN 1 olarak rapor edilmiştir.
- 13 tanesi ASC-H grubundandır, tüm ASC-H olgularının %48'i p16 ile boyanma göstermiştir. Boyanma gösteren ASC-H olgularına karşılık gelen histopatolojik tanıların 1 tanesi reaktif değişiklik, 5 tanesi CIN 1 ve 7 tanesi ise CIN 2+ olarak rapor edilmiştir. Sonuçlar, p16 ile boyanmada ASC-H lehine (%11 vs %48) anlamlı farklılık göstermektedir ($p < 0,001$ ki-kare testi).

Tablo 16: p16 ile boyanma göstermiş toplam 21 adet ASC olgusuna karşılık gelen histopatolojik tanıların dağılımı



Tablo 17: Histopatolojik tanılarına karşılık gelen ASC olgularının boyanma yüzdeleri



Tablo 18: Smearlerinde p16 pozitifliği gösteren ve göstermeyen genel ASC olgularının biopsi sonuçları

P16	Reaktif Değişiklik	CIN 1	CIN 2+
+	2 (%2,5)	12 (%92.3)	7 (%87.5)
-	77	1	1

Tablo 18'e bakıldığında:

- Histopatolojik tanısı reaktif değişiklikler olarak rapor edilen genel ASC olgularının p16 ile boyanma oranı %2,5 olarak saptanmış, histopatolojik tanısı CIN 1 olarak rapor edilmiş olgularda ise bu oran %92.3 olarak saptanmıştır. Sonuçlar arasında anlamlı farklılık vardır ($p<0.001$).
- Histopatolojik sonuçları CIN 1 ve CIN 2+ gruplarına karşılık gelen smear olgularının, p16 ile boyanma durumu karşılaştırıldığında ise (%92,3 ve %87,5) anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p>0,05$).
- p16 ile boyanmayan olgularda, reaktif değişiklik histopatolojik sonucu anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p<0,001$).

Tablo 19: ASC-H olgularında, CIN 2 ve üzeri lezyon saptamak için, p16 antikor varlığının klinik performansı

Prevalans (CIN 2+)	% 29.6
Sensitivite	% 87.5 (%95 CI:0,5291-0,9776)
Spesifite	% 68 (%95 CI:0,4601-0,8464)
PPV	%53.8 (%95 CI:0,3411-0,7253)
NPV	%92.8 (%95 CI:0,7458-0,9881)
+LR	2,7
-LR	0,18

Tablo 20: Genel ASC (ASC-US+ASC-H) olgularında, CIN 2 ve üzeri lezyon saptamak için, p16 antikor varlığının klinik performansı

Prevalans (CIN 2+)	%8
Sensitivite	%87.5 (%95 CI:0,5291-0,9776)
Spesifite	%84.7 (%95 CI:0,7606-0,9071)
PPV	%33,3 (%95 CI:0,2441-0,4355)
NPV	%98.7 (%95 CI:0,9335-0,9989)
+LR	5,7
-LR	0,15

5. TARTIŞMA

Serviks kanseri, kadınlarda memeden sonra en sık görülen kanserdir ancak çeşitli ülkelerin tarama programlarının verileri değerlendirildiğinde, taramalar sonucunda bu kanserin hem insidansı hem de mortalitesi için yaklaşık %60-70'lik azalmadan bahsedilmektedir. Serviks, vulva, vajen ve anal kanal neoplazilerinde etyolojide rol oynayan önemli ajanlardan biri HPV'dir. Tüm dünyadaki kanser olgularının yaklaşık %5,2 kadarı HPV ile ilişkilidir.⁶³ HPV, özellikle servikal kanser etyogenezinde en önemli parametredir. Toplam 78 çalışmanın dahil edildiği, 157.879 kadın üzerinde yapılan bir meta-analizin sonuçlarına göre,⁶⁴ smear sonucu normal kadınlarda ortalama HPV prevalansı %10.4 olarak saptanmıştır. Bu oran Afrika için %22.1, Amerika ve Meksika için %20.4, Kuzey Amerika için 11.3, Avrupa için %8.1 ve Asya için %8 olarak bildirilmiştir. Aynı çalışmada, tüm bölgeler için HPV prevalansı en yüksek yaş dilimi 35 olarak saptanmış ve yaş ilerledikçe prevalansın azaldığı ortaya konulmuştur. Bu çalışmada en sık izlenen 5 HPV alt tipi: 16, 18, 31, 58 ve 52 olarak bildirilmiştir. Bölgelerin geneline bakıldığında ise en sık HPV tip 16 göze çarpmaktadır. Özet olarak; dünya çapında 291 milyon kadın bugün koşulları ile infektedir ve bunların %32'sini tip 16, %23'ünü tip 18 oluşturmaktadır. Premalign ve malign lezyonların önemli kısmından sorumlu olan bu iki HPV tipinin yaygınlığı, aslında bize tarama ve aşılama programlarının ne kadar önemli olduğunu hatırlatmaktadır.

Tablo 21: Servikal kanser ve HSIL olgularında HPV saptanma oranları ve ilk 2 sıklıktaki HPV alt tipleri.⁶⁶

HPV tipi	Skvamöz Hücreli Kanser (SCC)		HSIL		SCC:HSIL
	sayı	%HPV	sayı	%HPV	Prevalans oranı
Tüm tipler	8550	87.6	4338	84.2	1.04
Tip 16	8594	54.3	4338	45	1.21
Tip 18	8502	12.6	4338	7.1	1.79

Skvamöz hücreli kanser için 8594 olguyu kapsayan 78 çalışmanın, HSIL için ise 4338 olguyu kapsayan 53 çalışmanın ele alındığı bir meta-analizde; kanser olgularında HPV prevalansı %87.6 ve HSIL olgularında %84.2 olarak yayınlanmıştır. Özellikle HPV tip 16'nın sıklığı göze çarpmaktadır.⁶⁶

Kjaer ve ark.'nın⁶⁸ prospektif kohort çalışmasında, HPV ile servikal lezyonlar arasındaki ilişkiyi ortaya koymak için 8656 genç (22-32) ve 1578 yaşlı (40-50) olgu ele alınmıştır. Sitolojik olarak normal ancak HR-HPV pozitif saptanan olgularda, 10 yıl içerisinde CIN 3 veya kansere yakalanma için genç grupta oran %13.6 iken, yaşlı grupta %21.2 olarak saptanmıştır. Özellikle 40-50 yaş grubunda sitolojileri normal olsa da, HR-HPV pozitif olan kadınların, daha fazla risk altında olduğunun altı çizilmiştir. Sonuç olarak; HPV'nin kanserde ve premalign lezyonlardaki rolü artık netlik kazanmıştır. Tarama programlarının yaygınlaşması ve her geçen gün daha fazla sayıda bireyin taranması sonucunda, sitoloji alanındaki terminolojik karmaşanın netleştirilmesi konusu da daha önemli hale gelmiştir. Bethesda sınıflamasını takiben bu sorun her ne kadar çözümlenmiş gözükse de, birtakım tanımlar için gerek inceleme düzeyinde gerekse de takip-tedavi düzeyinde tartışmalar devam etmektedir. Bu tanımlardan bir tanesi de daha önce ASCUS olarak adlandırılan ancak 2001 yılındaki revizyondan sonra ASC (ASC-US, ASC-H) olarak düzenlenen gruptur. İleri evre servikal lezyon ve invaziv servikal kanser etyolojisinde bu kadar etkin bir virüs olan HPV, ASC-US olgularında da tartışma konusu olmuş ve bu grubun triajı konusunda birçok çalışmada ele alınmıştır. ASC-US'lu olguların yönetimi için sensitivitesi ve spesifitesi yüksek bir metod arayışı sürecinde öncelikle HPV'nin, bu olguların ne kadarında bulunduğu konusunu irdelemek gerekmektedir.

Tablo 22: ASC-US olgularında HR-HPV oranları

Çalışma	ASC-US (n)	HR-HPV
Stany 2005 ⁸¹	40.870	16.667 (%40.8)
Kendall 2005 ⁸⁰	7334	2493 (%34.1)
ALTS 2001 ⁴⁵	3488	1766 (%50.6)
Manos 1999 ⁷⁹	973	384 (%39.5)
Sherman 2003 ⁶⁵	476	274 (%57.6)
Samarawardana 2010 ⁶⁹	158	103 (%65)
Samama 2008 ⁷³	84	39 (%46.4)
Benevolo 2008 ⁷²	66	47 (%71.2)
Nieh 2004 ⁶⁰	66	49 (%74)
Meyer 2007 ⁷⁰	49	26 (%55)
Pientong 2003 ⁷¹	40	15 (%37.5)

Tablo 22’de, ASC-US olgularında HR-HPV oranları verilmiştir. Oranların %37-74 arasında değiştiği ancak birçok çalışmada %50’ler civarında olduğu göze çarpmaktadır. Bu bilgiler ile, ortalama 100 ASC-US olgusundan 50 tanesi, ileri evre bir servikal lezyon ve kanser için risk altındadır yorumu yapılabilir. Kalan 50 tanesinin ise, bu bilgilere dayanarak persiste etmeyeceği veya regrese olacağı düşünülebilir. LGSIL olgularının yaklaşık %83 kadarında HR-HPV saptanması, ancak CIN 2 ve üzeri lezyon tanı oranlarının sadece %17-20’lerde kalması nedeni ile, bu olguların triajında HPV-DNA kullanışlı bir metod olarak kabul edilmemektedir. Bu olgular eğer reproduktif dönemde iseler, kolposkopiye referans edilmektedir. Bunun nedeni olarak da reproduktif dönem kadınlarındaki yüksek HR-HPV oranları gösterilmektedir. Ancak, ASC-US olgularında HR-HPV oranları %50’lerde seyretmekte ve bu nedenle yönetimleri konusunda tartışmalar

devam etmektedir. Etkin bir triaj arayışı kapsamında, ASC-US'lu olgularda sitoloji-histoloji sonuçlarını karşılaştıran çalışmalar da yapılmıştır. Rosetti ve ark.'nın çalışmasında, ASC-US olgularının %75'inde kolposkopik herhangi bir bulgu saptanamamış, %10.4'ünde kolposkopik bulgu saptanmış ancak histolojik korelasyon saptanamamış, %19.1'inde ise kolposkopik ve histolojik korelasyon ortaya konulmuştur.⁴³ Dvorakk ve ark.'nın çalışmasında ise ASCUS tanılı olguların %54'ünde CIN 1, %18'inde CIN 2 ve CIN 3 saptanmıştır.⁴⁴

Tablo 23: ASC-US olgularında, histolojik olarak saptanmış CIN 2 ve üzeri lezyon oranları

Çalışma	ASC-US (n)	Histopatolojik örnekleme (n)	CIN 2 ve üzeri (n)
ALTS ⁴⁵	3488	2254	333 (%14.7)
Denton 2010 ⁷⁴	385	385	81 (%21)
Smarawardana 2010 ⁶⁹	198	198	45 (%22.7)
Meyer 2007 ⁷⁰	49	15	1 (%6.6)
Benevolo 2008 ⁷³	66	23	5 (%21)
Nieh 2004 ⁶⁰	66	66	21 (%31)

Sitoloji ve histoloji arasındaki ilişkiyi ortaya koymak için 22.439 olgu üzerinde yapılmış bir diğer çalışma da Amerikan Patoloji Derneğinin ele aldığı 'Q-Probe' çalışmasıdır.⁷⁵ Bu çalışmada, ASC-US olgularının %13'ü, LGSIL olgularının %18'i ve HGSIL olgularının da %77'sinde CIN 2 ve üzeri patoloji saptanmıştır.

Bizim çalışmamızda toplam 100 adet atipik skuamöz hücre (ASC) olgusu ele alınmıştır. Bunların 73 tanesi ASC-US, 27 tanesi ise ASC-H kategorisinde değerlendirilmiştir. 100 adet olgunun tamamında histolojik tanımlar mevcuttur. Bu tanımlar kolposkopi eşliğinde ya da lezyondan direkt biopsi şeklinde alınmış örneklerin tanımlarıdır. Toplam 100 olgunun 8'inde

(%8) histolojik olarak CIN 2+ lezyon saptanmıştır. Bu saptanan lezyonların tamamı ASC-H grubundandır. ASC-US grubunda en ileri evre lezyon, toplam 8 adet ile CIN 1'dir. Literatürde, ASC-US olgularının %15-20'sinin histolojik değerlendirmede CIN 2+ lezyon tanısı aldığı bilinmektedir. Bizim çalışmamızda toplam ASC-US tanılı olgu sayısının sınırlı olması (73 adet) nedeni ile bu grupta CIN 2+ lezyon saptanamaması durumu açıklanabilir. Bu nedenle, sensitivite ve spesifite triaj çalışmaları, ASC-US alt grubu için yapılamamış, **ASC** grubu geneli ve **ASC-H** alt grupları için yapılmıştır. Çalışmada, CIN 2+ lezyonlarının tamamının ASC-H grubunda saptanması, özellikle bu grubun ileri evre lezyon için daha yüksek riskli olduğunu, klinisyenin bu ayrıma dikkat etmesi gerektiği sonucunu bir kez daha irdelenmektedir.

Gerek Pap testinin düşük sensitivitesi, gerekse gözlemciler arası değerlendirmede değişkenlikler, servikal kanser taramasının etkinliğini azaltan olumsuz faktörlerdir. HPV-DNA testinin kullanıma girmesi ile tarama, triaj ve tedavi sonrası izlem sürecinde daha etkin bir dönem başlamıştır. Bu test, primer taramaya eklenebilir, belirsiz anormal sitolojilerin triajında veya CIN tedavisi sonrasında rekürens takibi için kullanılabilir. Ancak, düşük evre lezyonların takibinde istenilen etkinliği gösterememektedir. Sensitivite parametreleri yüksektir ancak spesifite parametreleri istenilen düzeyde değildir. Özellikle kolposkopiye yönlendirilecek grubun yönetiminde bu konu önem kazanmaktadır. Bilindiği üzere servikal kanserlerin %99'unda HPV enfeksiyonu mevcut kabul edilmektedir. Ancak her enfekte vakanın kansere yakalanmadığı da bilinen bir gerçektir. Aynı zamanda HPV enfeksiyonlarının büyük kısmının regrese olduğu da bilinmektedir. Elimizdeki HPV-DNA testleri, yüksek riskli alt tipleri belirleyebilmekte ancak geçici veya kronik enfeksiyon ayrımını yapamamaktadır. Bu aşamada HPV enfeksiyonunun geçici veya kronik ayrımını yapmak en önemli hedef olarak gözükmektedir. Günümüzde bu amaca yönelik birtakım belirteçler üzerinde durulmaktadır. Bunlardan bir tanesi de tümör supresör protein olan **p16 (INK4a)'dır**. Çeşitli çalışmalar, p16 proteininin özellikle persiste etme sürecine girmiş hücrelerde daha fazla sentezlendiğini ortaya koymuştur. Progresif hastalık ayrımı için ve

özellikle de ASC grubu gibi tartışmalı olguların triajında bu proteinin kullanımı önem kazanmaktadır.

P16 proteini ile ilgili çalışmalar, 2000'li yılların başından itibaren mevcuttur. Doku üzerinde yapılan çalışmalarda alınan olumlu sonuçlar ve de özellikle ileri evre lezyonlarda, bu proteinin yüksek oranda boyanma göstermesi ile çalışmalar hız kazanmıştır. Klaes ve ark., servikal lezyonlarda p16 boyanma oranlarını incelemişler, CIN 1 grubunda düşük risk HPV pozitif saptanan olgularda boyanma izlememişlerdir. Ancak geri kalan CIN 1 (47/54), CIN 2 (32/32), CIN 3 (60/60) ve kanser olgularında (58/60) boyanma saptamışlardır⁵⁵. Hu ve ark.'nın çalışmasında, adölesan grupta servikal lezyonlarda HPV varlığı ve p16 ekspresyonu incelenmiştir. Servisit olgularında p16 ile boyanma veya HR-HPV saptanmamıştır. CIN 1 olgularında %44, CIN 2'de %93, CIN 3 'te ise %100 boyanma izlenmiştir. Hem HR-HPV pozitifliği, hem de p16 ile pozitif boyanma oranları ise CIN1, 2 ve 3 için sırasıyla %39,%100 ve %100 olarak saptanmıştır. Özellikle de CIN 3 grubunun %68'i diffüz ve tam kat boyanma paterni göstermiştir⁷⁶. Tsoumpou ve ark.'nın histolojik tanılarda p16 varlığını ortaya koyan ve toplam 40 çalışmayı dahil ettikleri meta-analizlerinde; birçok CIN 3 olgusu %100 diffüz boyanma göstermiş, havuzlanmış veri olarak CIN 2 olgularında ortalama boyanma %68, CIN 3 olgularında ortalama boyanma %82 olarak bildirilmiştir.⁷⁸

Histolojik incelemelerde özellikle de CIN 2+ lezyonlarda oldukça yüksek boyanma özelliği ile dikkatleri çeken p16 proteininin özellikle triaji uzun süre tartışma konusu olmuş ASC-US olgularında klinisyene nasıl bir yol göstereceği de araştırmacılar tarafından sorgulanmıştır. Nieh ve ark., bu konuyu aydınlatmak üzere 66 ASC tanısı almış olgu üzerinde bir çalışma planlamışlardır. Bu olgularda p16 varlığını araştırmışlar, aynı olgularda HPV-DNA araştırması yapmışlar ve sonuçları histolojik tanılar ile karşılaştırmışlardır. Sonuçta; 49 olguda (%74) HR-HPV pozitifliği, 40 olguda (%61) ise p16 pozitifliği saptanmıştır. Histolojik olarak reaktif rapor edilen olguların 1/21'i, CIN 1 olgularının 19/24'ü, CIN 2 ve üzeri olguların 20/21'i (%95) p16 ile zayıf veya kuvvetli pozitif boyanma göstermiştir. Ancak HPV-

DNA pozitifliği, reaktif grupta 13/21, CIN 1 grubunda 17/24, CIN 2 ve üzeri grupta ise 18/21 olarak rapor edilmiştir. Araştırmacılar, özellikle p16 ile negatif boyanma göstermiş grubun, skuamöz intraepitelyal lezyon gelişimi açısından, HPV-DNA yöntemine kıyasla daha az risk altında olduğunu, sensitivite için ise p16 ile triajın en az HPV-DNA kadar potansiyeli olduğunu ileri sürmüşlerdir. Bu çalışmada, ASCUS olguları için, CIN 2 ve üzeri lezyon predikte etmede, p16 antikorunun HPV-DNA'ya kıyasla istatistiksel olarak daha yüksek spesifite gösterdiği ve daha fazla pozitif prediktif değere sahip olduğu vurgulanmıştır. Bu çalışmanın bir başka özelliği ise, çalışmaya dahil edilen smearlerin sıvı bazlı değil konvansiyonel smearler olmasıdır. Araştırmacılar Pap smear olgularını önce %1'lik asit alkol ile dekolorize etmişler takiben p16 antikorunu ile boyamışlardır⁶⁰. Teknik olarak bu çalışmaya benzer şekilde bizim çalışmamız da da 100 adet konvansiyonel Pap smear olgusu önce asit-alkol ile dekolorize edilmiş, takiben p16 ile boyanma özelliklerine göre araştırılmıştır. Konvansiyonel Pap smear preparatlarının dekolorizasyon, boyanma ve değerlendirilme aşamalarında herhangi bir teknik sorun ile karşılaşılmamıştır.

Meyer ve ark., LGSIL sitolojik tanı olgularda HR-HPV pozitiflik oranı %80 kadar yüksek iken, bu olgularda CIN 2 ve CIN 3 oranının sadece %25 olduğu bilgisinden yola çıkarak, 398 Pap smear olgusunu çalışmaya dahil etmiş, 6 aylık takipte histolojik incelemede yapmış ve klinik olarak önemli lezyon prediksyonu için HPV-DNA ile p16 antikorunun sensitivite ve spesifite değerlerini karşılaştırmıştır. 398 olgunun 49 tanesi ASC-US, 6 tanesi ASC-H, 57 tanesi LGSIL ve 51 tanesi de HGSIL tanısı almış olgulardır. Çalışmanın sonucunda, genel popülasyonda CIN 2 ve üzeri lezyon saptamada, p16 için %81 sensitivite %62 spesifite ve HPV-DNA için %100 sensitivite ve %15 spesifite değerleri bildirilmiştir. Araştırmacılar, p16'nın özellikle ASC-US ve LGSIL grubunda yüksek spesifite gösterdiğinin altını çizmişlerdir.⁷⁰

Benevolo ve ark., primer taramada CIN 2 ve üzeri lezyon saptamak için p16 antikorunun yerini araştırmışlardır. 471 pap smear olgusunu incelemişler, 320 adet normal, 66 adet ASC-US, 58 adet LGSIL, 22 adet HGSIL ve 5 adet kanser olgusu saptamışlar ve bunların 129'una biopsi

yapmışlardır. Sonuçta toplam 30 olgu normal, 64 olgu CIN 1, 27 olgu CIN 2-3 ve 8 olgu skuamöz hücreli kanser olarak sonuçlanmıştır. Genel olarak HPV-DNA testi ile p16 karşılaştırıldığında, CIN 2 ve üzeri lezyon saptamak için p16 %77 sensitivite %57.4 spesifite göstermiş, bu değerler HPV-DNA için sırasıyla %94 ve %37 olarak saptanmıştır. Araştırmacılar, p16 antikorunun taramada henüz birincil olarak kullanılmaması gerektiğini, genel taramadan ziyade ASC-US ve LGSIL olgularının triajında yardımcı bir parametre olarak daha etkin şekilde kullanılabileceğini vurgulamıştır.⁷²

Bose ve ark., 107 Pap smear olgusunu incelemişler, 23 normal, 29 ASC-US, 5 ASC-H, 34 LGSIL ve 16 HGSIL saptamışlardır. ASC-US olgularının %21'i (6 adet), LGSIL olgularının %21'i (7 adet) ve ASC-H olgularının %80'i (4 adet) p16 pozitif saptanmıştır. P16 boyanmayan 1 adet ASC-H olgusunda HPV-DNA saptanmamıştır. Kalan 3'ünde HR-HPV (%75) saptanmıştır. P16 ile boyanma gösteren toplam 6 adet ASC-US olgusunun 2 tanesinde HR-HPV, 1 tanesinde LR-HPV saptanmış ve kalan 3 tanesinde ise HPV izlenmemiştir. P16 pozitifliği gösteren 33 olgunun, %81'i HGSIL ve %80'i ASC-H grubundandır. Araştırmacılar, p16 ile triajın LGSIL'de etkin olmadığını, özellikle HGSIL ve ASC-H grubunda etkin olduğunu vurgulamıştır.⁷⁸

Bizim çalışmamızda ASC genelinde p16 pozitifliği %22, ASC-US grubunda %11 ve ASC-H grubunda %48 olarak saptanmıştır ve literatüre benzer şekilde ASC-H grubunda p16 ile boyanma, ASC-US grubuna göre daha yüksek olarak değerlendirilmiştir (%48'e karşı %11).

Samama ve ark. ise, HPV ile konak hücre genom ilişkisini farklı sitolojik tanılarda araştırmıştır. Bu çalışmada toplam 241 olgu incelenmiş ve 101 normal smear, 35 LGSIL, 21 HGSIL ve 84 ASC-US olgusu p16 ve HPV-DNA yönünden araştırılmıştır. Bu çalışmadaki önemli ayrıntı, neoplastik progresyona aday olgularda virüsün DNA entegrasyonu ile o hücrenin p16 ekspresyon durumunu ayrıca değerlendirmiş olmasıdır. Çalışmacılar, özellikle HR-HPV ile enfekte olgularda, virüsün konak hücre DNA'sına entegrasyonu ile o hücrenin neoplastik sürece girebileceğinden yola çıkarak çalışmayı dizayn etmişlerdir. 84 adet ASC-US olgusunun 44'ü p16 pozitif

değerlendirilmiştir. Bu 44 olgunun HPV-DNA incelemesinde; 25 tanesinde HR-HPV'nin konakçı genoma entegrasyonu, 4 tanesinde HR-HPV epizomal enfeksiyon ve 15 tanesi HPV negatif saptanmıştır. 40 adet p16 negatif olgunun 30 tanesi HPV negatif kalan 10 tanesi de HR-HPV epizomal enfeksiyon olarak değerlendirilmiştir. HGSIL grubunda p16 pozitifliği %100 olarak bulunmuş ve bunların tamamında HR-HPV'nin konakçı genoma entegrasyonu izlenmiştir. Bu çalışmada, ASC-US ve LGSIL grubunun yaklaşık %30 kadarında p16 pozitifliği ve HR-HPV'nin konakçı genoma entegrasyonu saptanmıştır. Primer tarama olarak p16 antikoru kullanılır ise, ASC-US grubundaki toplam 10 adet HR-HPV ile epizomal enfeksiyonlu olgu, p16 ekspresyonuna göre negatif olarak değerlendirilecek, tüm çalışmanın genelinde toplam 33 olgu, HR-HPV ile epizomal şekilde enfekte iken atlanacaktır. Bu nedenle araştırmacılar, epizomal form dahi olsa, HR-HPV enfeksiyonunu servikal lezyonlar için risk olarak değerlendirmekte ve p16 ile triajın ancak HPV-DNA testine ek olarak kullanılır ise etkinliğinin artacağını vurgulamaktadır.⁷³

ASC-US grubunda p16 araştırması yapan bir diğer grup Samarawardana ve ark.'dır. 403 adet sitolojik spesimen incelenmiş, 164 ASC-US ve 34 ASC-H saptanmıştır. ASC-US olgularının %32.3'ünde (53/164) ve ASC-H olgularının %38.2'sinde (13/34) p16 pozitifliği saptanmıştır. P16 pozitif ASC-US grubunda CIN 2 ve üzeri lezyon oranı %5.5 iken bu oran p16 pozitif ASC-H grubunda %26.5 olarak saptanmıştır. Araştırmacılar, olguyu p16 yönünden pozitif kabul etmek için slayt başına boyanma göstermiş 30 anormal hücre şartı aramışlardır. Literatürde, p16 pozitifliği için örneklem başına 5-20 arasında boyanma göstermiş hücrenin kabul edildiği izlenmektedir. Bu çalışmada boyanma için eşik değer yüksek tutularak metodun spesifitesinin artırıldığı yorumu yapılmıştır.⁶⁹

Boyanma kriteri olarak henüz bir ortak görüş birliği mevcut değil iken, hangi sayının bize en iyi sonucu vereceği daha fazla sayıda çalışma ile mümkün gözükmemektedir. Bizim çalışmamızda p16 pozitifliği için eşik değer slayt başına boyanma göstermiş 5 ve üzeri anormal hücre olarak belirlenmiştir.

Tablo 24: Sitolojik çalışmalarda p16 pozitifliği için eşik değerler ve kategorilere göre p16 pozitiflik yüzdeleri ⁷⁷

Çalışma	p16 kriterleri			Gruplarda p16 pozitifliği %			
	Olgu sayısı	n veya c	Pozitiflik kriteri	N	ASC-US	LGSIL	HGSIL
Bibbo 2002	47	n+c	>10 AH	0	NA	74	96
Saqi 2002	40	n±c	>10 hücre	21	50	74	90
Bibbo 2003	30	n+c	>10 AH	NA	NA	NA	63
Murphy 2003	27	-	-	0	100	86	100
*Pientong 2003	150	n+c	≥3 hücre	0	57	33	93
Akpolat 2004	77	n±c	≥%10 hücre	0	10	NA	42
Guo 2004	210	n±c	≥5 AH	NA	NA	58	97
*Pientong 2004	165	n+c	≥10 hücre	0	53	54	100
Sahebali 2004	291	n+c	-	NA	NA	NA	NA
Trunk 2004	90	-	-	11	67	79	100
Yoshida 2004	98	n+c	≥1 AH	NA	13	58	100
*Bose 2005	107	n+c	>10 hücre	13	29	21	81
*Filho 2005	199	-	herhangi	49	56	NA	NA
Moore 2005	34	-	>30 AH	0	14	44	100
*Nieh 2005	66	-	herhangi	NA	61	NA	NA
Wentzensen 2005	210	n±c	NS>2	1	NA	10	98

*Ekalaksananan 2006	186	-	≥10 hücre	7	63	60	100
Holladay 2006	400	n veya c	≥1 AH	0	35	42	80
*Negri 2006	81	n veya c	NA	13	56	67	100
Sahebali 2006	200	n + c	-	NA	NA	NA	NA
*Bollanca 2007	137	n±c	≥%1 hücre	2	NA	35	96
Carozzi 2007	283	-	-	35	50	40	80
Crydis 2007	46	-	>10 hücre	10	NA	NA	NA
Liu 2007	75	n±c	>10 hücre	20	NA	50	82
Meyer 2007	394	n±c	≥1 AH	9	18	42	81
Monsonogo 2007	248	n veya c	herhangi	36	55	28	88
Wentzensen 2007	225	n	NS>2	NA	27	24	NA
Havuzlanmış veri				12	45	45	89
(%95 CI)				7-17	35-54	37-57	84-95

(AH: atipik hücre, n: nükleer boyanma, c: sitoplazmik boyanma, NA: uygulanabilir değil, - :belirtilmemiş, NS: nükleer skorlama, *: Konvansiyonel smear çalışması).

Tsoumpou ve ark.'nın sitolojik spesimenlerde p16 immün boyanmasını inceledikleri meta-analizlerinin özeti tablo 24'de sunulmaktadır.⁷⁷ Çalışmalardaki olgu sayıları, 27-400 arası değişmektedir. Ancak bu

çalışmaların büyük kısmı genel tarama için verilmiştir. ASC-US alt grubu için p16 antikoruna ile yapılmış çalışma sayısı az olmakla birlikte, konvansiyonel Pap olgularında dekolorizasyon ve p16 ile boyanma varlığının incelenmesi, teknik olarak kabul edilebilir özellikler göstermekte ve sıvı bazlı sistemler ile yapılmış çalışmalar ile benzer sonuçlar vermektedir.

Bir olguyu p16 yönünden pozitif kabul etmek için örnek başına boyanma gösteren hücre sayısı ve boyanmanın lokalizasyonu (nükleer ve/veya sitoplazmik) oldukça önemlidir ve günümüzde bu konu ile ilgili görüş birliği henüz mevcut değildir. Tablo 19'da çok çeşitli eşik değerler göze çarpmaktadır. Tartışmaların özellikle odaklandığı ASC-US ve LGSIL olgularında, Wentzensen ve ark., nükleer skorlama sistemi geliştirmişler, hücreleri morfolojik olarak da değerlendiren bu skorlamada 0-4 aralığında olguları skorlamışlar, ASC-US/LGSIL olgularında özellikle >2 skorlarda, CIN 2+ lezyon saptamada p16 ile triajın %96 sensitivite ve %83 spesifite gösterdiğini saptamışlardır.⁶²

Tablo 25: Sitolojik olgularda p16 ile triaj çalışmaları

	Meyer 2007	Samarawardana 2010	Benevolo 2008	Guo 2004	Denton 2010	Wentzensen 2006 (NS>2)	Nieh 2005	*Çalışma 2010
Grup	Genel	Genel	Genel	LGSIL	ASC- US	ASC-US	ASC- US	<u>ASC</u>
Sayı	398	403	471	214	810	137	66	100
Sens.%	81	81	77.1	92	92.6	94.7	95	87.5
Spes.%	62	78	57.4	49	63.2	83.4	96	84.7
PPV	-	41.2	40.3	33	-	48.6	91	33.3
NPV	-	95.8	87.1	96	-	99.0	98	98

Literatür incelendiğinde, CIN 2+ lezyon saptamak için p16 antikoruna ile triaj uygulanırsa, sensitivite değerleri %77-94 ve spesifite değerleri %49-96 arasında değişmektedir. Tablo 20'de de izlendiği üzere, p16 antikor triajı ile

özellikle negatif prediktif değerlerdeki yükseklik dikkat çekmektedir. Bizim çalışmamızda p16 ile triajın negatif prediktif değeri ASC olgularının genelinde %98.7 ve ASC-H olgularında %92 olarak saptanmıştır. Literatürde, özellikle ASC-US ve LGSIL olgularını içeren çalışmalarda, p16 antikorunun HPV-DNA testinden biraz düşük veya benzer sensitivite gösterdiği ancak belirgin yüksek spesifitesinin olduğu göze çarpmaktadır. Her ne kadar çalışmaların olgu sayıları, istatistiksel anlamlı bir analize sınırlı imkan tanısında, çok sayıda çalışmada benzer sonuçlar verilmektedir. Bugünkü koşullarda, ASC-US olguları için HR-HPV prevalansı ortalama %40-50 arasında bildirilmektedir. Bu olgulara eğer HPV-DNA testi yapılırsa, yaklaşık %40-50 olgu kolposkopiye yönlendirilecektir. HR-HPV'nin özellikle yüksek oranda saptandığı grup 20-30 yaş grubudur. Bu kolposkopilerin sonucunda ileri evre bir hastalık saptama oranlarının yaklaşık %8-12 olduğu da bilinen bir gerçektir. Bu nedenle, 20-30 yaş grubundan birçok olguya gereksiz kolposkopi yapılacaktır. Bu bilgiler ışığında, benzer sensitivite ve daha yüksek spesifite gösterdiği her geçen gün daha çok sayıda çalışma ile desteklenen p16 proteini, dikkatleri ASC-US ve LGSIL grubuna özellikle çekmektedir. P16 ile ilgili yapılmış triaj çalışmalarındaki bir diğer konu da taranan grup ile ilgilidir. Birçok çalışma genel popülasyonda triaj çalışması yaparken, LGSIL grubunda, ASC genelinde, ASC-US grubunda ve ASC-H grubunda da çalışmalar mevcuttur. Günümüzde hangi grubun bu triajdan en fazla yararlanabileceğini net ortaya koymuş bir çalışma henüz bulunmasa da, yönetimleri konusu tartışmalı olan ASC-US olgularında ve özellikle reproduktif dönem kadınlarında oldukça yüksek HR-HPV prevalansı yüzünden kolposkopi ile yönetilen LGSIL olgularında bu molekül daha fazla incelenmektedir. Son zamanlarda ASC-H grubu ile ilgili de p16 antikor triaj çalışmaları yapılmaktadır.

Bizim çalışmamızda ASC olguları ele alınmıştır. Hedeflenen lezyon olan CIN 2 ve üzeri olguların tamamının ASC-H grubunda saptanması sonucunda ASC-US grubu için sensitivite ve spesifite değerleri hesaplanamamıştır. Hem ASC grubu geneli hem de ASC-H alt grubunda, CIN 2 ve üzeri lezyon prediksyonu için p16 proteinin klinik performansı

araştırılmıştır. Her ne kadar ASC-US popülasyonunda %6-30 oranında CIN 2 ve üzeri lezyon yakalansa da, bizim çalışmada olgu sayısının 100 ile sınırlı kalması, diğer hedef grup olan ASC-US olgularında p16 triajı yapılamamasının nedeni olarak açıklanabilir.

Literatürde CIN 2 ve üzeri lezyon prediksyonu için HPV-DNA ile p16 protein yöntemleri karşılaştırıldığında, farklı sitolojik ve histolojik alt gruplar için farklı sonuçlar göze çarpmaktadır.

Tablo 26: ASC-US/LGSIL olgularında CIN 2 ve üzeri lezyon prediksyonu için p16 proteini ile HPV-DNA (hc2) metodlarının karşılaştırılması

çalışma	grup	hedef	test	Sens.%	Spes.%	PPV%	NPV%
Guo 2004 ⁸²	LGSIL	CIN 2 +	p16	92	49	33	96
			hc2	100	7	21	100
Meyer 2007 ⁷⁰	LGSIL	CIN 2 +	p16	80	52	27	92
			hc2	100	17	21	100
Samarawardana 2010 ⁶⁹	ASC-US	CIN 2 +	p16	75	69.9	17	97
			hc2	100	37.7	11.7	100
Nieh 2005 ⁶⁶	ASC-US	CIN 2 +	p16	95	96	91	98
			hc2	86	31	37	82
Benevolo 2008 ⁷³	Genel	CIN 2 +	p16	77	57.4	40.3	87
			hc2	94.3	37.2	35.9	94.6

Tablo 26'de, özellikle ASC-US/LGSIL olgularında, HPV-DNA testi ile p16 yöntemi karşılaştırıldığında, benzer sensitivite değerleri göze çarpmaktadır. Ancak spesifite ve pozitif prediktif değerleri p16 antikoru lehine yükseklik göstermektedir. Bir ölçümde pozitif prediktif değerlerin artması için ya gerçek pozitif olgu sayısı artmalı ya da yalancı pozitif olgu sayısı azalmalıdır.

P16 ile yapılan triaj çalışmalarında özellikle yalancı pozitif olgu sayılarında düşüş gözlenmekte, bu da PPV değerlerine ve dolaylı olarak da spesifite değerlerine artış olarak yansımaktadır. Özellikle 20-30 yaş grubunda, HR-HPV'nin yüksek prevalansı ancak altta yatan ileri evre servikal displazinin düşük prevalans göstermesi sonucunda, HPV-DNA ile yalancı pozitiflikler artmakta, bu da metodun PPV ile spesifitesini düşürmektedir. P16 antikorunun HPV-DNA testi ile karşılaştırılabilir sensitivite göstermesinin yanı sıra daha yüksek spesifite ve pozitif prediktif değer özellikleri ile tartışma konusu olan ASC-US ve LGSIL olgularında klinisyene yol gösterici olmaktadır.

Tartışmaların odaklandığı bir diğer alt grup ASC-H'dir. Tüm Pap testlerin %0,27-0,6'sı bu sitolojik tanıyı almaktadır ^{86,87}. ASCCP şemasına göre, ASC-H olguları kolposkopi ile yönetilmektedir. HR-HPV oranları değişkenlik göstermekle birlikte %37,5-85 arasında bildirilmektedir. ALTS çalışma grubunca, özellikle yaşın bu ilişkide önemli bir parametre olduğu, 35 yaş ve altı ASC-H grubunda HR-HPV oranı %85 iken, 35 yaşın üzerinde %40'a gerilediği bildirilmiştir. ALTS grubu ASC-H tanısı almış bir olgunun, biopside CIN 2+ lezyon tanı şansını %40,5 olarak değerlendirmiş, 35 yaş üzeri grupta, HPV DNA testinin etkinliği artıracak çalışmalara gereksinimi işaret etmiştir.

Nicholson ve ark.,⁸³ 132 ASC-H olgusunu incelemişler, HR-HPV prevalansını %54, histolojik örneklemelerde HSIL/Adenokarsinoma in situ oranını %30 olarak bildirmişlerdir. Sung ve ark. ⁸⁴, 105 adet ASC-US/ASC-H olgusunda, HR-HPV ve p16 incelemesi yapıp, sonuçları histolojik veriler ile karşılaştırmışlar, ASC-US grubunda %30, ASC-H grubunda ise %60 p16 pozitifliği saptamışlardır. Her iki grup içinde, p16 ekspresyonu ile HSIL+ lezyon arasında anlamlı ilişki saptayan araştırmacılar, ASC-US grubunda %60 sensitivite %76,5 spesifite, ASC-H grubunda ise %100 sensitivite ve %80 spesifite bildirmişlerdir. Sonuç olarak da, ASC-US grubundan ziyade ASC-H olgularında, HR-HPV enfeksiyonu ve SIL saptamak için p16'nın etkin bir metod olduğunu ve zamanla pahalı bir tetkik olan HPV DNA testinin yerini alabileceğinin altını çizmişlerdir. Samarawardana ve ark.⁶⁹ ise p16 triajı ile

ASC-H olgularında CIN 2+ lezyon için, %80 sensitivite, %81 spesifite bildirmişlerdir.

Bizim çalışmamızda, ASC-H olgularının p16 ile boyanma oranı %48, bu olgularda CIN 2+ lezyon oranı ise %29,6 olarak bulunmuştur ve p16 ile ASC-H olgularında, CIN 2+ lezyon saptamak için **%87,5** sensitivite ve **%68** spesifite oranları saptanmıştır.

Tablo 27: ASC-H olgularında p16 pozitiflik oranları

Araştırmacı	p16 pozitiflik yüzdesi (%)
Sung ⁸⁴	60
Monosego ⁸⁵	52
Samarawardana ⁶⁹	38,2
Negri ⁵⁹	81,3
Bose ⁷⁸	80
Çalışma*	48

P16 proteini ile HPV'nin yakın ilişkisi bilinmektedir. Özellikle HPV-E7 onkogeni ile artmış p16 ekspresyonu, o hücrenin persistan yüksek riskli bir HPV ile infekte olduğunun göstergesi olarak kabul edilmektedir. Ancak literatürde, HR-HPV varlığı ispatlanmış birtakım olguların p16 antikoruna ile boyanma göstermedikleri, bunun tersi olarak da, kuvvetli p16 pozitifliği gösteren birtakım olguların HR-HPV açısından negatif bulunduğu bilinmektedir. Aradaki bu uyumsuzluk için birtakım teoriler ortaya atılmıştır. Benevolo ve ark.'nın⁷³ çalışmasında, normal sitoloji grubunda %16 p16 pozitif-HPV negatif grup ve %14 p16 negatif-HPV pozitif grup, ASC-US grubunda ise sırasıyla %9 p16 pozitif-HPV negatif grup ve %36 p16 negatif-HPV pozitif grup saptanmıştır. Bu ASC-US olgularının %17'sinde CIN 2-3 saptanmıştır. Bose ve ark.⁷⁸, p16 pozitif saptanan olguların %63'ünde HR-

HPV, HR-HPV saptanan olguların ise %39.6'sında p16 pozitifliği saptanamamışlardır. Samama ve ark.⁷³ 241 olguyu değerlendirirken 106 olguyu HPV pozitif, 135 olguyu ise HPV negatif saptamışlardır. 135 adet HPV negatif olgunun 42 tanesinde p16 pozitif, HR-HPV saptanan 33 olguda ise p16 negatif saptanmıştır. Araştırmacılar, bu diskordansı, hem normal hem de ASC-US popülasyonunda ortalama %30 olarak bildirmişlerdir. Bu çalışmadaki tüm HGSIL vakalarında, hem p16 hem de entegre form HR-HPV saptanmıştır. İleri evre olgularda ve anogenital/ tonsiller/servikal kanser olgularında p16 ile entegre form HR-HPV birlikteliği zaten aşıkardır. Ancak, çalışmacıların HR-HPV pozitif, p16 negatif olgular için yorumu, özellikle entegre formdan ziyade, epizomal olarak konakçı DNA'da bulunan HPV'nin o hücreden belirgin olarak p16 proteinini eksprese ettirmediği, zamanla regrese olabilecek bir latent enfeksiyon oluşturduğu şeklindedir. Bu durum akıllara subklinik bir enfeksiyon halini getirmektedir. Ancak HR-HPV nedeniyle oluşmuş epizomal enfeksiyonlar dahi, CIN 2 ve üzeri lezyonlar için belirli bir risk oluşturmaktadır. Sitolojik olarak normal ancak HPV-DNA testinde HR-HPV pozitif saptanan olgularda, CIN 2+ lezyon gelişebilmektedir. O halde, HR-HPV bulunan, p16 negatif olgular için bir başka yorum; HR-HPV'ye sekonder hiperfosforile retinoblastom (Rb) proteini yolu dışında, başka mekanizmalar ile p16 sentezindeki birtakım bozukluklar veya gen mutasyonu sonucu p16 proteinin sentez bozukluğunun olabileceğidir. Bu teoride, konakçı hücreye HR-HPV DNA'sı entegre olup Rb fosforilasyonu yapsa dahi, p16 proteini sentezlenememektedir.

Akıllarda soru işareti uyandıran bir diğer grup; HR-HPV negatif olup p16 proteini pozitif değerlendirilen gruptur. Samama ve ark.'nın çalışmasında bu uyumsuzluğun oranı normal smear'ler için %30 ve ASC-US grupları için %20 olarak bildirilmiştir. Boyanma ve değerlendirme tekniğindeki deneyimsizlikler sonucunda, hangi olgunun gerçekten p16 pozitif kabul edileceğinin net bir tanımı henüz mevcut değildir. Nükleer ve/veya sitoplazmik boyanma **normal servikal epitelyal hücrelerde, endoservikal hücrelerde, metaplastik hücrelerde (tubal metaplazi), radyasyona maruz kalmış keratinositlerde, yara iyileşmesi aşamalarında, enfeksiyon**

hallerinde de izlenmekte ve HPV olmaksızın birtakım olgularda yalancı pozitif p16 antikoru varlığı olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu faktörler, henüz standart bir değerlendirme yaklaşımının oluşturulamamış olmasının en önemli nedenleri olarak sayılabilir.

Bizim çalışmamızda, p16 antikor varlığının pozitif kabul edilmesi için kriter, preparat başına nükleer ve/veya sitoplazmik boyanma göstermiş, 5 adetten fazla atipik hücre olarak alınmıştır. Bu şekilde 100 ASC olgusu değerlendirildiğinde, toplam 21 adet preparat p16 antikoru açısından pozitif boyanmış olarak kabul edilmiştir. Literatürdeki ASC-US olgularının p16 pozitiflik oranları %35-54 arasında değişmektedir. Bizim çalışmamızda, ASC-US grubunda CIN 2+ lezyon saptanmadığından, bu grup için sensitivite ve spesifite değerlendirilmesi yapılamamıştır. Yeterli olgu sayısı ile bu grupta da triaj çalışmalarının yapılabileceği düşünülmektedir. ASC-US tanısı almış olgular için p16 ile boyanma oranı %11, ASC-H olguları için %48 olarak saptanmıştır. Tüm ASC olgularında (ASC-US+ASC-H) boyanma oranı %21'dir. Pozitif boyanma göstermiş ancak anormal olarak değerlendirilmeyen hücreler varlığında, hücre sayısı 5'den fazla olsa bile olgu pozitif olarak kabul edilmemiştir. Sadece boyanma varlığı kriter kabul edilse idi, çalışmada p16 ile boyanma oranları her 2 grup için de artış gösterebilirdi. Ancak, enfeksiyona ikincil değişiklikler, yara iyileşmesi durumları hatta normal epitelyal hücreler de pozitif boyanma gösterebileceğinden ve yalancı pozitif olgu sayısını artırbileceğinden sadece boyanmış olan atipik hücreler değerlendirmeye alınmıştır.

Bizim çalışmamızda, CIN 2+ lezyonların tamamı ASC-H grubunda saptanmıştır ve bu gruptaki 8 CIN 2+ olgunun 7 tanesi ise p16 pozitif olarak değerlendirilmiştir. Genel ASC olgularında, CIN 2+ lezyon saptamak için p16 triajı ile PPV:%33.3 ve NPV:%98 olarak saptanmıştır. PPV değerinin %33.3'de kalmasının nedeni, histopatolojisi CIN 1 olarak tanımlanan ASC-US grubunun yüksek oranda p16 pozitifliği göstermesidir. Eğer bu grupta daha az pozitiflik saptansa idi, bu triajın pozitif prediktif değeri daha yüksek olabilirdi. Bu aşamada boyanma kriterleri tekrar önem kazanmaktadır. Bir hücrenin, nükleer veya sitoplazmik yada her ikisinin de boyanması durumu ile olgunun

p16 yönünden pozitiflik durumu direkt ilişkilidir. Boyanma yeri, boyanan hücre sayısı, kullanılan antikorun niteliği de bu aşamada önemlidir. Bu nedenle zaman içerisinde görüş birliğine varılarak oluşturulacak evrensel kriterler ile daha net sonuçlar ortaya konulabilir ve daha objektif gerçek pozitif olgular ile daha doğru triajlar yapılabilir. Çalışmada, p16 pozitifliğinin CIN 2+ lezyonlar için klinik performansını saptamada, ASC-H grubu için de ayrı bir değerlendirme yapılmıştır. Bu grupta p16'nın performansı için sensitivite %87.5, spesifitede %68 olarak saptanmıştır. Spesifite değeri, genel ASC olgularına göre daha düşük bulunmuştur.

Bu çalışmanın bir diğer önemli farkı, konvansiyonel Pap smear olgularında p16 protein varlığını araştırmasıdır. Bunun için öncelikle dekolorizasyon denilen soldurma işlemi yapılmış takiben antikor ile boyanma işlemi uygulanmıştır. Bu süreçte, preparata uygulanacak işlemler dışında hastaya herhangi bir müdahale yada invaziv ek bir girişim yapılmamaktadır. Triaj çalışması sadece yeniden değerlendirilecek olan materyal ile sınırlıdır.

Sonuç olarak, konvansiyonel Pap smear ile tarama yapılan ülkelerde, atipik skuamöz hücre tanısı almış olguların yönetiminde p16 antikoru, mevcut triajlara alternatif olabilecek kadar maliyet etkinliği göstermekte, sadece materyal üzerinde uygulanabilirliği ile hasta dostu bir işlem olarak gözükmekte, HPV-DNA testi ile benzer sensitivite ancak ondan daha yüksek spesifite ve pozitif prediktif değerler göstermesiyle de aynı zamanda güvenilir bir yöntem olarak tartışılmaktadır. P16 proteini, atipik skuamöz hücre tanısı almış olguların triajında, HPV-DNA testine ek olarak kullanılabilmesi gibi, yapılacak daha fazla çalışma ile tanısız sorunlar ortadan kaldırılır ise, yakın gelecekte tek başına kullanımı ile de gündeme gelebilir.

6. SONUÇLAR

- Çalışmaya, sitolojik olarak atipik skuamöz hücre (ASC) tanısı almış toplam 100 adet olgu dahil edildi. 100 adet ASC olgusunun 73 tanesi ASC-US, 27 tanesi ASC-H grubuna dahil idi.
- Histolojik olarak, toplam 100 olgunun 79 tanesi benign, 13 tanesi CIN 1 ve 8 tanesi ise CIN 2 ve üzeri lezyon olarak değerlendirildi.
- 73 adet ASC-US olgusunun 65 tanesi histolojik olarak benign, 8 tanesi ise CIN 1 tanılı idi. 27 adet ASC-H olgusunun 14 tanesi benign, 5 tanesi CIN 1 ve kalan 8 tanesi ise CIN 2 ve üzeri lezyon tanılı idi. Çalışmadaki CIN 2 ve üzeri lezyon tanılı olguların tamamında sitolojik tanı ASC-H idi.
- 100 adet ASC olgusunun 21 tanesi p16 antikoru ile pozitif boyanma gösterdi (%21). ASC-US grubunda %11, ASC-H grubunda ise %48 olgu pozitif boyanma gösterdiği için, pozitif boyanma ASC-H grubunda anlamlı daha fazla olarak değerlendirildi ($p<0.001$).
- ASC-US grubunda, histopatolojik tanısı CIN 1 olan 8 olgunun 7'si, ASC-H grubunda histopatolojik tanısı CIN 1 olan 5 olgunun tamamı ve CIN 2 ve üzeri lezyon olan 8 olgunun 7'si p16 pozitifliği gösterdi.
- Sitolojik tanısı ASC-H olan olgularda, CIN 2 ve üzeri lezyon saptamak için p16 antikoru pozitifliğinin sensitivitesi %87.5, spesifitesi %68, pozitif prediktif değeri %53, negatif prediktif değeri %92 olarak saptandı.
- Sitolojik tanısı ASC olan olgularda, CIN 2 ve üzeri lezyon saptamak için p16 antikoru pozitifliğinin sensitivitesi %87.5, spesifitesi %84.7, pozitif prediktif değeri %33.3, negatif prediktif değeri %98.7 olarak saptandı.

ÖZET

Atipik Skuamöz Hücre (ASC=ASC-US+ASC-H) Bulunduran Konvansiyonel Pap Smear Preparatlarında, Yüksek Riskli HPV Prediktörü Olarak Kabul Gören p16 Proteini Varlığının Araştırılması ve Sonuçların Histopatolojik Tanılar İle Karşılaştırılması

Amaç: Servikal kanser tarama programında, atipik skuamöz hücre (ASC-US+ASC-H) saptanmış olgularda, p16 antikor varlığını değerlendirerek, olguda alta yatması muhtemel klinik olarak önemli histopatolojik lezyonu öngörmek ve bu olgularda p16 antikoru ile triajın klinik etkinliğini belirlemek amaçlanmaktadır.

Gereç ve Yöntem: Papanicolaou yöntemi ile boyanarak atipik skuamöz hücre (ASC=ASC-US+ASC-H) tanısı almış toplam 100 olgu, öncelikle dekolorize edildi ardından p16 (E6H4 klonu) antikoru ile boyandı. Olgunun boyanma gösterip göstermediği değerlendirilerek, sonuçlar histopatolojik inceleme sonuçları ile karşılaştırıldı.

Sonuçlar: Toplam 73 olgu ASC-US, 27 olgu ASC-H olarak değerlendirildi. P16 pozitifliği tüm olguların %21'inde izlendi. Pozitif boyanma ASC-H grubunda istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha fazla olarak değerlendirildi. Histopatolojik karşılaştırmada, CIN 2 ve üzeri lezyonların tamamının ASC-H sitolojiye sahip olduğu izlendi. Bu nedenle ASC-US olgularında CIN 2 ve üzeri lezyon saptamak için p16 ile triaj çalışması yapılamadı. Çalışma, ASC olgularının geneli ve ASC-H olguları için yapıldı. Genel ASC olgularında dekolorizasyon ve p16 triajı ile CIN 2 ve üzeri lezyon saptamak için sensitivite %87.5, spesifite %84.7, pozitif prediktif değer %33.3, negatif prediktif değer %98 olarak bulundu. ASC-H alt grubu için CIN 2 ve üzeri lezyon saptamada bu değerler sırasıyla %87.5, %68, %53 ve %92 olarak bulundu.

Yorum: Persistan, yüksek riskli HPV infeksiyonlarında ekspresyonunun arttığı bilinen p16 proteininin, özellikle yönetimleri konusunda tartışmaların sürdüğü atipik skuamöz hücre (ASC-US+ASC-H) tanılı olguların triajında kullanıma girmesi ile hem invaziv olmayan hem de mevcut yöntemler ile karşılaştırılabilir sensitivite ve spesifite değerleri gösteren bir yöntemin varlığı tartışılır hale gelmiştir.

Anahtar Sözcükler: ASC-H, ASC-US, Pap smear, p16, servikal intraepitelyal neoplazi

SUMMARY

Expression of p16 Protein in Papanicolaou Smears Containing Atypical Squamous Cells (ASC=ASC-US+ASC-H) and Comparison of the Results with Available Histologic Data

Intention: This study aims to verify the clinical performance of p16 immunocytochemistry as a biomarker to predict clinically significant lesion (CIN 2+) that underlying among those with an ASC result in Papanicolaou cytology.

Method: p16 (E6H4 clone) immunostains were performed on 100 conventional Pap smears signed out as ASC and the results were correlated with available histological data.

Results: Of the 100 Pap smears containing ASC, 73 were classified as ASC-US and 27 as ASC-H. P16 immunosatining was detected in 21% of all cases. Significantly higher expression of p16 protein was observed in ASC-H categorized cytology. Histopathological correlation showed that all CIN 2+ lesions were detected in the ASC-H group, therefore the triage study among ASC-US categorized cytology could not be performed. P16 immuno-cytochemistry revealed a diagnostic sensitivity of 87.5%, specificity of 84.7%, positive predictive value of 33.3% and negative predictive value of 98% for detecting CIN 2+ lesions among ASC categorized cytology. Among the ASC-H cytology, values were noted as 87.5%, 68%, 53% and 92% respectively.

Comment: While p16 protein is associated with persistent high risk HPV infection, immunosatining of this protein among ASC cytology has the potential to provide high sensitivity and specificity rates for the presence of underlying CIN 2+ lesions. Consequently, p16 may further improve the current approach for triaging ASC cytology and may provide a cost effective triage tool with its less invasive nature.

Key Words: ASC-H, ASC-US, cervical intraepithelial neoplasia, Pap smear, p16

KAYNAKLAR

1. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2005; 55:74-108.
2. Jemal A, Thomas A, Murray T. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2002; 52:23-47.
3. Myers ER, McCrory DC, Nanda K, Bastian L, Matchar DB. Mathematical model for the natural history of human papillomavirus infection and cervical carcinogenesis. *Am J Epidemiol* 2000; 151:1158-1171.
4. Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM. Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide. In: *Globocan 2002*, Lyon, 2004, IARC Press 1-24.
5. Zemheri E, Koyuncuer A. Servikal kanserlerin erken tanısında Pap testin önemi. *STED* 2005; 14:1-4.
6. Chesson HW, Blandford JM, Gift TL, Tao G, Irwin KL. The estimated direct medical cost of sexually transmitted diseases among American youth 2000. *Perspect Sex Reprod Health* 2004; 36:11-19.
7. Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Smigal C, Thun MJ. American Cancer Society Cancer Statistics. *CA Cancer J Clin* 2006; 56:106-130.
8. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. American Cancer Society Cancer Statistics 2010. *CA Cancer J Clin* 2010 ;5:277-300
9. Di Saia, Creasman. *Clinical Gynecologic Oncology* 7th edition. Philadelphia: Elsevier Company, 2006.
10. Trimble CL, Genkinger JM, Burke AE. Active and passive cigarette smoking and the risk of cervical neoplasia. *Obstet Gynecol* 2005; 105:174 -181.

11. Cheney J. Cervical cancer and screening. IARC Handbooks of Cancer Prevention, Cervix Cancer Screening. Lyon, 2005, IARC Press 1-57.
12. Prokopczyk B, Cox JE, Hoffman D, Waggoner SE. Identification of tobacco specific carcinogen in the cervical mucus of smokers and nonsmokers. J Natl Cancer Inst 1997; 89:868-873.
13. Smith JS, Green J, Berrington dG, Appleby P, Peto J, Plummer M, Franceschi S, Beral V. Cervical cancer and use of hormonal contraceptives: a systematic review Lancet 2003; 361:1159-1167
14. Plummer M. International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer. Cervical carcinoma and reproductive factors: collaborative re-analysis of individual data on 16,563 women with cervical carcinoma from 25 epidemiological studies. Int J Cancer 2006; 119:1108-1124.
15. Güner H, Taskiran Ç. Serviks kanseri epidemiyolojisi ve human papilloma virus. TJOD Dergisi 2007; 4:11-19.
16. International Agency for Research on Cancer. IARC Handbook of Cancer Prevention. Cervix Cancer Screening. Lyon: IARC Press, 2005
17. International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer. Comparison of risk factors for invasive squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the cervix: collaborative reanalysis of individual data on 8,097 women with squamous cell carcinoma and 1,374 women with adenocarcinoma from 12 epidemiological studies. Int J Cancer 2006; 120:885-891.
18. Marks M, Gravitt PE, Gupta SB, Liaw KL, Kim E, Tadesse A. The association of hormonal contraceptive use and HPV prevalence. Int J Cancer 2010 (epub-ahead of print)

19. Palefsky JM, Holly EA. Chapter 6: Immun suppression and co-infection with HIV. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2003; 41-46
20. Armstrong BK, Munoz N, Bosch FX. Epidemiology of cancer of the cervix. *Gynecol Oncol* 1992; 3:11-12
21. Franco EL, Villa LL, Sobrinho J Pet al. Epidemiology of acquisition and clearance of cervical human papillomavirus infection in women from a high-risk area for cervical cancer. *J Infect Dis* 1999; 180:1415–1423.
22. Koss LG, Stewart FW, Foote FW, Jardon MJ, Bader GM, Day E. Some histologic aspects of behavior of epiderrnoid carcinoma in situ and related lesions of the uterine cervix *Cancer* 1963; 16:1160–1211.
23. Duggan MA, Mc Gregor SE, Stuart GC, Morris S, Chang-Poon V. The natural history of CIN 1 lesions. *Eur J Gynaecol Oncol* 1998; 19:338–344
24. ACOG Practice Bulletin number 66, Semptember 2005. Manegement of abnormal cervical cytology and histology. *Obstet Gynecol* 2005; 106: 645–664,
25. Östör AG et al. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review. *Int J Gynecol Pathol* 1993; 12:186-192.
26. Cates W Jr. Estimates of the incidence and prevalence of sexually transmitted diseases in the United States. American Social Health Association Panel. *Sex Transm Dis* 1999; 26:2-7
27. Ratcliffe J. Estimation of HPV incidence in the US population. Report for American Social Health Association (ASHA) 1998.
28. Frazer IH. Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination. *Nat Rev Immunol* 2004; 4:46-54

29. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999; 189:12–19
30. Arends MJ, Buckley CH, Wells M. Aetiology, pathogenesis, and pathology of cervical neoplasia. *J Clin Pathol* 1998; 51:96-103.
31. Melnikow J, Nuovo J, Willan AR, Chan BK, Howell LP. Natural history of cervical squamous intraepithelial lesions: a meta-analysis. *Obstet Gynecol* 1998; 92:727-735.
32. Bosch FX, Manos MM, Munoz N. Prevalance of HPV in cervical cancer. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87:796-802
33. Lorincz AT, Reid R, Jenson AB, Greenberg MD, Lancaster W., Kurman RJ. HPV infection of the cervix: relative risk association of 15 common anogenital types. *Obstet Gynecol* 1992; 79:328-335
34. Paraskevaidis E, Arbyn M, Sotiriadis A, Diakomanolis E, Martin-Hirsch P, Koliopoulos G et al. The role of HPV-DNA testing in the follow-up period after treatment for CIN: a systematic review of the literature *Cancer Treat Rev* 2004; 30:205–211.
35. Reeves WC, Brinton LA, García M, Brenes MM, Herrero R, Gaitán E et al: Human papillomavirus infection and cervical cancer in Latin America. *N Engl J Med* 1989; 320:1437
36. Meanwell CA, Cox MF, Blackledge GB, Maitland NJ: HPV 16 DNA in normal and malignant cervical epithelium: Implications for the aetiology and behaviour of cervical neoplasia. *Lancet* 1987; 1(8535):703-707
37. Kaufman RH, Adam E, Icenogle J, Lawson H, Lee N, Reeves KO et al: Relevance of human papilloma virus screening in management of cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Obstet Gynecol* 1997; 176:87-92

38. Soler ME, Gaffikin L, Blumenthal PD. Cervical Cancer Screening in developing countries. *Prim Care Update Ob Gyns* 2000; (7) 3:118-123
39. ACOG Practice Bulletin. Cervical Cytology Screening. *Int J Gynaecol Obstet* 2003; 83:237-247
40. Saslow C, Runowicz CD, Solomon D, Moscicki AB, Smith RA, Eyre HJ et al. American Cancer Society guideline for the early detection of cervical neoplasia and cancer. *CA Cancer J Clin* 2002; 52:342-362
41. Thrall MJ, Pambuccian SE, Stelow EB, McKeon DM, Miller L, Savik K et al. Impact of the more restrictive definition of atypical squamous cells introduced by the 2001 Bethesda System on the sensitivity and specificity of the Papanicolaou test: a 5-year follow-up study of Papanicolaou tests originally interpreted as ASCUS, reclassified according to Bethesda 2001 criteria. *Cancer* 2008; 25; 114(3):171-179.
42. Berek S.J. Berek and Novak's Gynecology. 14th edition. Lipincott Williams and Wilkins, 2007.
43. Rossetti D, Gerli S, Saab JC, Di Renzo GC. Atypical squamous cells of undetermined significance (ASCUS), low-grade squamous intraepithelial lesion (LSIL), high-grade squamous intraepithelial lesion (HSIL) and histology. *J Med Liban* 2000; 48:127-130.
44. Dvorak KA, Finnemore M, Maksem JA. Histology correlation with atypical squamous cells of undetermined significance (ASCUS) and low-grade squamous intraepithelial lesion (LSIL) cytology diagnoses: An argument to ensure ASCUS follow-up that is as aggressive as that for LSIL. *Diagn Cytopathol* 1999; 21:292-295.
45. Solomon D, Schiffman M, Tarone R. Comparison of three management strategies for patients with atypical squamous cells of undetermined significance: Baseline results from a randomized trial. *J Natl Cancer Inst* 2001;93:293–299

46. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. The cell cycle and programmed cell death. In: Molecular biology of the cell. 4th ed. New York: Taylor and Francis Group; 2002.983–1026
47. Cotran RS, Kumar V, Collins T. Robbins Pathologic Basis of Disease, 6th edition. Philadelphia: Saunders Company, 1999.
48. Schorge J, Schaffer J, Halvorson L, Hoffman B, Bradshaw K, Cunningham G. Williams Gynecology. The McGraw-Hill Companies, 2008.
49. Khleif SN, Degregori J, Yee CL. Inhibition of cyclin D-CDK4/CDK6 activity is associated with an E2F-mediated induction of cyclin kinase inhibitor activity. Cell Biology 1996; 93:4350–4354.
50. Kumar V, Abbas A.K, Fausto N. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease, 7th edition. Philadelphia: Saunders Company, 2005.
51. Vernell V, Helin K, Müller H. Identification of target genes of the p14INK4A-Prb-e2f PATHWAY. J Biol chem 2003; 278:46124- 46137.
52. McCluggage WG. Immunohistochemistry as a diagnostic aid in cervical pathology. Pathology 2007; 39:97-111
53. Carozzi F, Cecchini S, Confortini M, Becattini V, Cariaggi MP, Pontenani G et al. Role of P16 (INK4a) expression in identifying CIN 2 or more severe lesions among HPV-positive patients referred for colposcopy after abnormal cytology. Cancer 2006; 108:119-123.
54. Dray M, Russell P, Dalrymple C, Wallman N, Angus G, Leong A et al. p16 (INK4a) as a complementary marker of high-grade intraepithelial lesions of the uterine cervix: Experience with squamous lesions in 189 consecutive cervical biopsies. Pathology 2005; 37:112-124.
55. Klaes R, Friedrich T, Spitkovsky D, Ridder R, Rudy W, Petry U et al. Overexpression of p16(INK4A) as a specific marker for dysplastic and

neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int J Cancer* 2001; 15:92 (2) 276–284.

56. Agoff SN, Lin P, Morihara J, Mao C, Kiviat NB, Koutsky LA. p16 (INK4a) expression correlates with degree of cervical neoplasia: a comparison with Ki-67 expression and detection of high-risk HPV types. *Mod Pathol* 2003; 16:665–673.
57. Murphy N, Ring M, Killalea AG, Uhlmann V, O'Donovan M, Mulcahy F et al. P16INK4A as a marker for cervical dyskaryosis: CIN and cGIN in cervical biopsies and ThinPrep™ smears. *J Clin Pathol* 2003; 56:56–63.
58. Lambert AP, Anschau F, Schmitt V. P16INK4a expression in cervical premalignant and malignant lesions. *Exp Mol Pathol* 2006; 80:192–196.
59. Negri G, Moretto G, Menia E, Vittadello F, Kasal A, Mian C, et al. Immunocytochemistry of p16INK4a in liquid-based cervicovaginal specimens with modified Papanicolaou counterstaining. *J Clin Pathol* 2006; 59:827–830.
60. Nieh S, Chen SF, Chu TY, Lai HC, Lin YS, Fu E et al. Is p16 (INK4A) expression more useful than human papillomavirus test to determine the outcome of atypical squamous cells of undetermined significance-categorized Pap smear? A comparative analysis using abnormal cervical smears with follow-up biopsies. *Gynecol Oncol* 2005; 97:35–40.
61. Haidopoulos D, Partsinevelos GA, Vlachos GD, Rodolakis A, Markaki S, Voulgaris Z et al. P16INK4A Is a Strong Biomarker for Cervical Intraepithelial Neoplasia and Invasive Cervical Carcinoma: A reappraisal. *Reprod Sci* 2009;16(7):685-693.
62. Wentzensen N, Bergeron C, Cas F, Vinokurova S, von Knebel

- Doeberitz M. Triage of Women With ASCUS and LSIL Cytology
Cancer Cytopathology 2007; 111:58-66
63. Parkin DM. The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *Int J Cancer* 2006; 118:3030–3044.
64. De Sanjosé S, Diaz M, Castellsagué X, Clifford G, Bruni L, Muñoz N. et al. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical HPV DNA in women with normal cytology: A meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2007;7:453-459
65. Sherman ME, Lorincz AT, Scott DR, Wacholder S, Castle PE, Glass AG et al. Baseline cytology, human papillomavirus testing, and risk for cervical neoplasia: a 10-year cohort analysis. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95:46–52
66. Clifford GM, Smith JS, Aguado T, Franceschi S. Comparison of HPV type distribution in high grade cervical lesions and cervical cancer: a meta-analysis. *Br J Cancer* 2003; 89:101-105
67. Scheurer ME, Tortolero-Luna G, Adler-Storthz K. Human papillomavirus infection: biology, epidemiology, and prevention. *Int J Gynecol Cancer* 2005; 15:727–746.
68. Kjaer S, Høgdall E, Frederiksen K, Munk C, van den Brule A, Svare E, The Absolute Risk of Cervical Abnormalities in High-risk Human Papillomavirus–Positive, Cytologically Normal Women Over a 10-Year Period. *Cancer Res.* 2006; 1;66(21):10630-10636
69. Samarawardana P, Dehn DL, Singh M, Franquemont D, Thompson C, Gaido L et al. P16 INK4a is superior to high risk HPV testing in cervical cytology for the prediction of underlying high grade dysplasia. *Cancer Cytopathol* 2010; 118:146-56

70. Meyer JL, Hanlon DW, Andersen BT, Rasmussen OF, Bisgaard K. Evaluation of p16INK4a expression in Thin Prep cervical specimens with the CINtec p16INK4a assay. *Cancer* 2007; 111:83-92
71. Pientong C, Ekalaksananan T, Kongyingyoes B, Kritpetcharat O, Swadpanich U, Pengsa P, et al. Immunocytochemical staining of p16INK4a protein from conventional Pap test and its association with human papillomavirus infection. *Diagn Cytopathol* 2004; 31:235–242.
72. Benevolo M, Vocaturo A, Mottolese M, Mariani L, Vocaturo G, Marandino F et al. Clinical role of p16 expression in liquid based cervical cytology. *Am J Clin Pathol* 2008; 129:606-612
73. Samama B, Schaeffer C, Boehm N. P16 expression in relation to HPV in liquid based cervical smears. *Gynecol Oncol* 2008;109:285-290
74. Denton KJ, Bergeron C, Klement P, Trunk MJ, Keller T, Ridder R. et.al. The Sensitivity and Specificity of p16INK4a Cytology vs HPV Testing for Detecting High-Grade Cervical Disease in the Triage of ASC-US and LSIL Pap Cytology Results *Am J Clin Pathol* 2010; 134:12-21
75. Jones BA, Novis DA. Cervical biopsy–cytology correlation. A College of American Pathologists Q-Probes study of 22,439 correlations in 348 laboratories. *Arch Pathol Lab Med* 1996; 120:523–553.
76. Hu L, Guo M, He Z, Thornton J, McDaniel LS, Hughson MD. Human papillomavirus genotyping and p16INK4a expression in cervical intraepithelial neoplasia of adolescents. *Mod Pathol* 2005; 18:267–273.
77. Tsoumpou I, Arbyn M, Kyrgiou M, Wentzensen N, Koliopoulos G, Martin-Hirsch P et al. p16 (INK4a) immunostaining in cytological and histological specimens from the uterine cervix: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Treat Rev* 2009; 35:210-220.
78. Bose S, Evans H, Lantzy L, Scharre K, Youssef E. P16INK4a is a surrogate biomarker for a subset of human papilloma virus-associated

- dysplasias of the uterine cervix as determined on the pap smear. *Diagn Cytopathol* 2005; 32:21–24.
79. Manos MM, Kinney WK, Hurley LB, Sherman ME, Shieh-Ngai J, Kurman RJ, et al. Identifying women with cervical neoplasia using human papillomavirus DNA testing for equivocal papanicolaou results. *JAMA* 1999; 281:1605–1610.
80. Kendall BS, Bush AC, Olsen CH, Zahn CM. Reflex high-risk human papillomavirus testing for women with atypical squamous cells of undetermined significance in cytologic smears. *Am J Clin Pathol* 2005; 123:524–528.
81. Stany MP, Bidus MA, Reed EJ, Kaplan KJ, McHale MT, Rose GS et al. The prevalence of HR-HPV in ASC-US Pap smears: a military population study. *Gynecol Oncol* 2006; 101:82-85
82. Guo M, Hu L, Baliga M, He Z, Hughson MD. The predictive value of p16INK4a and hybrid capture 2 human papillomavirus testing for high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Clin Pathol* 2004; 122:894–901.
83. Nicholson M, Gatscha R, Riedl E, Lin O. Atypical Squamous Cells, Cannot Exclude High Grade Intraepithelial Lesion (ASC-H): Does HPV Matter? *Diagn Cytopathol* 2007; 35:1–5.
84. Sung C, Kim S, Oh Y, Song S. The Use of p16INK4a Immunocytochemistry in “Atypical Squamous Cells Which Cannot Exclude HSIL” Compared With “Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance” in Liquid-Based Cervical Smears. *Diagn Cytopathol* 2010; 38:168–171
85. Monsonego J, Pollini G, Evrard MJ, Sednaoui P, Monfort L, Quinzat D, et al. P16 (INK4a) immunocytochemistry in liquid-based cytology

samples in equivocal Pap smears: Added value in management of women with equivocal Pap smear. *Acta Cytol* 2007; 51:755–766.

86. Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M et al. The 2001 Bethesda System: Terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA* 2002; 287:2114–2119.
87. Selvaggi SM. Reporting of atypical squamous cells, cannot exclude a high-grade squamous intraepithelial lesion (ASC-H) on cervical samples: Is it significant? *Diagn Cytopathol* 2003; 29:38–41
88. Ayhan A, Durukan T, Günalp S, Gürkan T, Önderoğlu L, Yaralı H, Yüce K. *Temel Kadın Hastalıkları ve Doğum Bilgisi 2.Baskı*. Ankara; Güneş Kitabevi, 2008.