



1993

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ**

**BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ**

**TIP FAKÜLTESİ**

**Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı**

**PREİNVAZİV SERVİKAL LEZYONLAR ve İNVAZİV SKUAMOZ**

**HÜCRELİ KANSERDE p16<sup>INK4a</sup>'NİN EKSPRESYONU ve KLİNİK**

**ÖNEMİ**

**UZMANLIK TEZİ**

**Dr.Gonca ÇOBAN**

**ANKARA  
2010**



1993

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ**

**BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ**

**TIP FAKÜLTESİ**

**Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı**

**PREİNVAZİV SERVİKAL LEZYONLAR ve İNVAZİV SKUAMUZ**

**HÜCRELİ KANSERDE p16<sup>INK4a</sup>'NİN EKSPRESYONU ve KLİNİK**

**ÖNEMİ**

**UZMANLIK TEZİ**

**Dr.Gonca ÇOBAN**

**TEZ DANIŞMANI**  
**Prof. Dr. Ali AYHAN**

**ANKARA**

**2010**

Bu tez Başkent Üniversitesi araştırma fonu tarafından desteklenmiştir.

Proje No: KA09/414

## TEŞEKKÜR

Kadın Hastalıkları ve Doğum uzmanlık tezimi sunarken, uzmanlık eğitimimde çok önemli yeri olan ve tezimin hazırlanmasında bana yol gösteren, tez danışmanım Prof. Dr. Ali Ayhan'a, uzmanlık eğitimim boyunca yetişmemde büyük emekleri olan Prof. Dr. Esra Kuşcu'ya, Prof. Dr. Hulusi Bülent Zeyneloğlu'na, Prof. Dr. Filiz Yanık'a, Doç. Dr. Göğşen Önalın'a, her zaman yanımda olduğunu hissettiren Yard. Doç. Dr. Polat Dursun'a, tezimin oluşturulması konusundaki yardımlarından dolayı Patoloji Ana Bilim Dalı'ndan Doç. Dr. Özlem Özen'e ve ekibine, bilimsel açıdan ve hayata olumlu bakışı ile etkilerini yadsıyamayacağım Uzm. Dr. Eralp Başer'e, başta; bu yola birlikte çıkıp, tüm zorluklarda yanımda olan yol arkadaşım, dostum Dr. Melike Özge Çiçek olmak üzere tüm asistan arkadaşlarıma ve klinik çalışanlarına, bu mesleği seçmemin temellerini çocuk yaşta bilmeden de olsa atan ve her zaman sevgi ve desteği ile arkamda olan ANNEM ve BABAM'a sonsuz teşekkür ederim.

Dr. Gonca Çoban

## ÖZET

Servikal kanser, tarama yöntemlerinin geliştirilip yaygınlaşmasına rağmen tüm dünyada hala önemli bir sağlık sorunu olmaya devam etmektedir. Başta serviks kanseri olmak üzere çoğu malignitelerde olduğu erken tanının ve uygun tedavinin hayat kurtarıcı olduğu bir gerçektir. Nitekim, preinvaziv servikal lezyonların teşhisi ve uygun tedavisi ile servikal kanserlerden ölüm %70 azaltılmıştır.

Her ne kadar sitolojik çalışma ile erken tanıya yönelik yaklaşımların özellikle doku bazında hangi lezyonun progrese olacağı net değildir. Bu konuda çalışmalar devam etmektedir. Ancak sitolojik bazda olmak üzere uzun süreli takipte, p16<sup>INK4a</sup>'nın progresyon olup olmadığı ile ilgili çalışmalar mevcuttur. Ancak doku bazında bu konu ile ilgili doyurucu bilgi yoktur. Bu noktadan yola çıkarak, preinvaziv lezyonlar ve invaziv kanserlerde p16<sup>INK4a</sup> dağılımı ve klinik versiyonu ile ilgili çalışma planlanıp uygulandı.

Çalışmamıza, 48 LSIL ve 46 HSIL tanısı almış toplam 94 olgu ile kontrol grubu olarak 30 invaziv skuamöz hücreli servikal hastası dahil edilmiştir. Histopatolojik materyallerde, p16<sup>INK4a</sup> pozitifliğinin ekspresyonu, klinik önemi ve HPV DNA ile ilişkisi araştırılmış olup prekürsör servikal lezyonlardan invaziv servikal kansere dönüşme riski yüksek olanları belirlemede sensitivite ve spesifiteyi artırarak p16<sup>INK4a</sup> takipte kullanılacak bir yöntem olup olmadığının araştırılması hedeflenmiştir. Sonuç olarak p16<sup>INK4a</sup> HSIL ve kanser hastalarında diffüz olarak boyanmıştır. LSIL ve HSIL tanılı olguların p16<sup>INK4a</sup> ile boyanma paternleri, farklılıklar göstermekle birlikte yüksek riskli HPV DNA ile enfekte olan LSIL hastalarında boyanma paterni yüksek grade lezyonlara benzemektedir. (p<0.001)

Preinvaziv servikal lezyonlarında özellikle hem sitoloji hem de doku bazında gerçekten p16<sup>INK4a</sup>'nın progresyon veya regresyonu göstermesi açısından kullanılması için daha fazla hasta sayısı ve uzun izlem süresine sahip prospektif randomize kontrollü çalışmalara ihtiyaç vardır.

**Anahtar kelimeler:** p16<sup>INK4a</sup>, preinvaziv servikal lezyon



## ABSTRACT

### **p16<sup>INK4a</sup> Expression in Preinvasive Cervical Lesions and Invasive Cancer, and its Clinical Value**

Although there is an important progress in cervical cancer screening methods, cervical cancer still is an important health problem worldwide. Like every malignant tumors, early diagnosis is important for the successful treatment and good prognosis in cervical carcinoma. Therefore, early diagnosis with screening methods is essential for the cervical cancer precursors and invasive cervical neoplasias prevention and early diagnosis.

The ideal screening test should distinguish women with non-progressive mild neoplasia from those with oncogenic transformation and at women with risk of developing invasive cancer in order to facilitate decision on therapy and need of follow-up. p16<sup>INK4a</sup> is one of the new diagnostic and screening marker. The aim of this study was to evaluate the p16 expression in cervical preinvasive neoplasias and invasive squamous cell carcinomas (SCC). 38 patients with low grade cervical lesions (LSIL) and 46 patients high grade cervical lesions (HSIL) and 30 patients who treated for invasive squamous cell cervical carcinoma were compared with respect to p16INK4a expression. We also assessed the relationship between p16INK4a and HPV. Presence of HPV was determined PCR method. Strong and diffuse p16INK4a expression were seen in HSIL and SCC group. Most of the patients with LSIL showed weak expression of p16INK4a. However, p16INK4a was also strong positive in patients with LSIL lesion which was caused by high risk HPV ( $p < 0.001$ ).

In conclusion, we showed a statistical significant relationship between p16INK4a overexpression in high grade cervical lesions and HPV infection. p16INK4a overexpression might be a useful marker for the prediction of low grade lesion progression into the high grade lesions. However, further studies with larger samples size and longer follow up are needed to reach clear conclusions.

**Key words:** p16<sup>INK4a</sup>, preinvasive cervical lesions

# İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

|  |      |
|--|------|
| TEŞEKKÜR.....                                | iii  |
| ÖZET.....                                    | iv   |
| İNGİLİZCE ÖZET (ABSTRACT).....               | v    |
| İÇİNDEKİLER.....                             | vi   |
| TABLolar DİZİNİ.....                         | vii  |
| ŞEKİLLER DİZİNİ.....                         | vii  |
| KISALTMALAR DİZİNİ.....                      | viii |
| 1.GİRİŞ ve AMAÇ.....                         |      |
| 2.GENEL BİLGİLER.....                        |      |
| 2.1. Servikal Kanser                         |      |
| 2.2.Risk Faktörleri                          |      |
| 2.3.HPV                                      |      |
| 2.3.1.HPV'nin Yapısı                         |      |
| 2.3.2.p16 <sup>INK4a</sup> 'nın Yeri         |      |
| 2.4.Serviksin Premalign Lezyonlarının Tanısı |      |
| 2.4.1.Sitoloji                               |      |

2.4.2.HPV DNA testi

2.5.Tedavi

### 3.GEREÇ ve YÖNTEM

3.1.Olgu Seçimi

3.2.İmmunohistokimya

3.3. p16<sup>INK4a</sup> ile Boyanmanın Yorumlanması

### 4.BULGULAR

4.1.Histopatolojik değerlendirme ve klinik veriler

4.2.İmmunohistokimyasal boyama bulguları

### 5.TARTIŞMA ve SONUÇ

### 6.KAYNAKLAR

## TABLolar DİZİNİ

**Sayfa No:**

**Tablo 4.1:**Histopatolojik tanılara göre p16 boyanma paternleri

**Tablo 4.2:**LSIL ve HSIL vakaları arasında p16 dağılımı

**Tablo 4.3:**HPV PCR sonuçları ile histopatolojik tanılar

**Tablo 4.4:**HPV PCR sonuçları ve p16 boyanma paternleri

**Tablo 4.5:**p16 dağılımı ve HPV DNA arasındaki ilişki

## ŞEKİLLER DİZİNİ

**Sayfa No:**

**Şekil 2.1:** Preinvaziv servikal lezyonların regresyon,persistans ve progresyon oranları

**Şekil 2.2/2.3/2.4:**HPV Virüsü

**Şekil 2.5:**HPV Filogenetik Ağacı

**Şekil 2.6:**HPV 16 Viral Genomu

**Şekil 2.7:**Açılan Viral Genomda E6-E7 Aktivasyonu

**Şekil 2.8:** E6 ve E7 ile p53 ve pRb ilişkisi

## KISALTMALAR DİZİNİ

|  |      |
|--|------|
| Cervical intraepitelial neoplasia        | CIN  |
| Human Papilloma Virüs                    | HPV  |
| Cyclin Kinaz 4                           | CK4  |
| Cyclin Dependent Kinaz 6                 | CDK6 |
| Low grade Servikal İntraepitelyal Lezyon | LSIL |
| High grade Sevikal İntraepitelyal Lezyon | HSIL |
| Carcinoma in situ                        | CIS  |

## RESİMLER

**Resim1:** Düşük dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon tanısı alan bir olguda p16 antikoruna ile boyanma görülmemiştir

**Resim2:** Düşük dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon tanısı alan diğer bir olguda bazal tabakada sınırlı p16 antikor pozitifliği

**Resim3:** Yüksek dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon tanısı alan bir olguda difüz kuvvetli p16 antikor pozitifliği

**Resim4:** Bir keratinize olmayan invaziv yassı epitel hücreli karsinom olgusunda kuvvetli p16 ekspresyonu

## 1.GİRİŞ ve AMAÇ

Yirminci yüzyılın ilk yarısında, ABD’de serviks kanserinden ölüm, diğer kanser türlerinden daha fazla olarak görülmekteydi. 1940’larda papanicolaou yönteminin uygulamaya girmesiyle preinvaziv lezyonların tanısı ve tedavisi mümkün hale gelmiştir. Bu gelişmelerle 20. yüzyılın sonlarına doğru ABD’de sıklık ve mortalite oranları %75’e varan oranlarda azalma göstermiştir <sup>1</sup>. İnvaziv servikal kanser intraepitelyal bir fazdan sonra meydana gelir (Prekürsör servikal lezyon/intraepitelyal neoplazi/CIN) ve prekürsör lezyonlu kadınların tümünde gelecekte invaziv kanser gelişmeyecektir.<sup>2</sup>

Bu çalışmada amaç; 48 LSIL ve 46 HSIL patolojik tanısı olan toplam 94 preinvaziv servikal lezyonlu vaka ile 30 invaziv skuamoz hücreli servikal kanserli hastaların parafin bloklarından elde edilen slaytların p16<sup>INK4a</sup> ile boyanarak, p16<sup>INK4a</sup> ekspresyonları, dağılımları ve bunun klinik önemini saptamaktır.

HPV enfeksiyonu,dünyadaki seksüel geçişli en sık rastalanan hastalık olup, CIN ve servikal kanserin ana sebebini oluşturmaktadır.<sup>2</sup> Yüksek riskli HPV tipleri servikal kanser nedeni ajan olarak saptanmıştır.Ancak çoğu enfeksiyon geçici olduğu için ve servikal kanser gelişen hastaların sadece küçük bir kısmında onkojenik HPV tipleri saptandığı için HPV saptanmasının değeri azdır.Sitoloji ile HPV testinin birlikte kullanıldığı çeşitli tarama yöntemleri düzenlenmiştir.HPV testinin sensitiviteyi artırdığı gösterilmiştir ancak primer tarama yöntemi olarak kullanıldığında spesifitesi henüz bilinmemektedir. İdeal olan test, progresif olmayan mild neoplaziler ve onkolojik transformasyonla invaziv kanser gelişme riski yüksek olan hastaları ayırt etmeyi ve onkolojik transformasyonla invaziv kanser gelişme riski yüksek olan hastaları takip etmeyi sağlamalıdır.<sup>3</sup>

Farklı HPV tipleri ,E6 ve E7 viral genlerini kodlayan onkoproteinlerin düzeylerini etkileyerek farklı derecelerde servikal kanser ile ilişkilidir.<sup>4</sup> P16<sup>INKA4</sup>,pRb ‘nin hipofosforilasyonuna ,E2F’in serbest kalmasına sebep olan ve G1 fazından S fazına geçişini hızlandıran CK4 ve CDK6’ya bağlanarak hücre siklusunu azaltan ,siklin bağımlı kinaz inhibitörü bir proteindir.Yüksek riskli HPV E7 onkoproteinleri ,p16 düzeyini negatif olarak regüle eden pRb’yi inaktive ederek yüksek riskli HPV ile enfekte neoplastik hücrelerde p16 ‘nın artmasına neden olur.<sup>2</sup> Birçok çalışmada servikal kanser ve CIN2 ve CIN3’de ,immünohistokimyasal olarak yüksek düzeylerde protein p16(p16<sup>INK4a</sup>) eksprese edildiği saptanmıştır.<sup>5</sup> Bu bulgular ışığında, p16<sup>INK4a</sup> servikal prekürsör lezyonların yeniden histopatolojik olarak sınıflandırmasını sağlayabilir ve günümüzdeki sınıflandırmanın bir

handikapı olan patolojiler arasındaki değerlendirme farkına en aza indirgeyerek olguların tedavi ve takip süreçlerini şekillendirebilir.



## 2.GENEL BİLGİLER

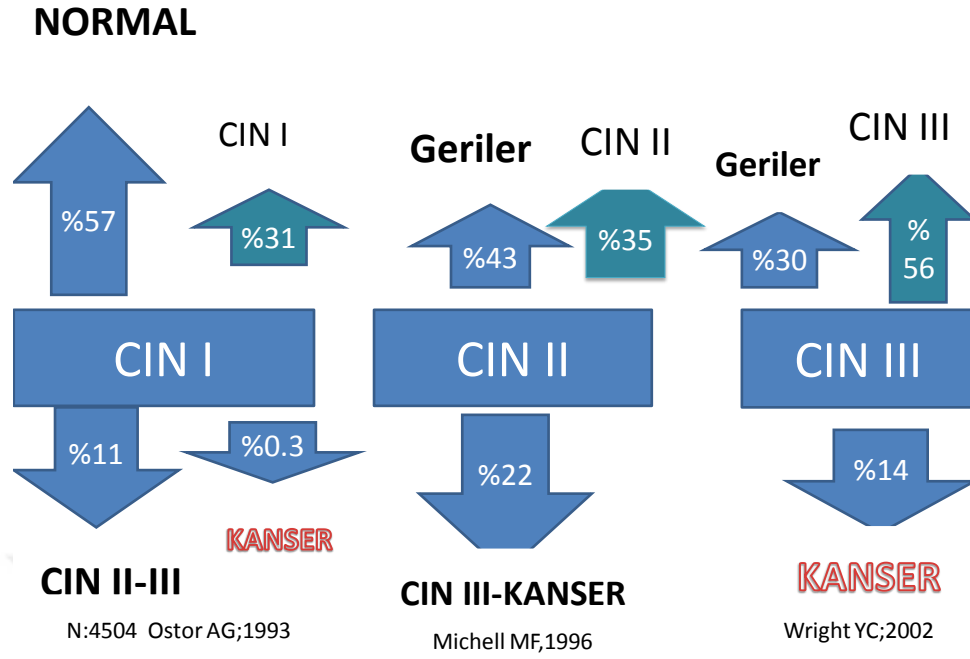
### 2.1.Servikal Kanser

Servikal kanser, kadınlarda görülen dünyadaki en sık ikinci sıradaki kanser olup, kadın kanser ölümlerinde de ikinci sıradadır. Her yıl 500.000 yeni vaka ortaya çıkmaktadır. Amerikan Kanser Cemiyeti, ABD’de 2007 yılında 3670’i ölümle sonuçlanan 11.150 yeni invaziv serviks kanseri vakasını tahmin etmektedir.<sup>6</sup> Mortalite gelişmekte olan ülkelerde gelişmiş ülkelere göre daha yüksektir (gelişmiş ülkelerde yılda 70.000, gelişmekte olan ülkelerde 200.000) Önlenebilir bir hastalık olarak kabul edilmesinin sebeplerinden biri de etiopatogeneizde rol oynayan HPV’dir. Her yıl servikal kanser tanısı alan hastaların yarısı ya Pap smear testinin kapsamının düşüklüğünden ya da testinin tanı koyma konusundaki yetersizliğinden dolayı uygun görüntülenememiştir. Bu nedenle servikal kanser taraması için alternatif yöntemler araştırılmaktadır.<sup>7</sup>

Cullen (1900) ilk kez invaziv olmayan lezyonlara dikkat çekmesi ile başlayan araştırmalar, 1988 yılında Bethesda sisteminin jinekopatolojiye girmesi ile preinvaziv lezyonlar düşük dereceli skuamoz intraepitelyal lezyonlar – LSIL (CIN1 ve HPV değişikliklerine uyar),yüksek dereceli skuamoz intraepitelyal lezyonlar – HSIL (CIN2,CIN3’e uyar), ASCUS, ASC-H ve AGUS olarak sınıflanmıştır.

Servikal kanserinin ortalama tanı yaşı 52 olmakla birlikte 35-39 yaşları arasında ve 60-64 yaşları arasında olmak üzere çift pik yapmaktadır.<sup>6</sup> Servikte ‘Carcinoma in situ’ servikal kansere göre 10 yıl önce, yani 35-40 yaşlarında görülür. Düşük dereceli servikal neoplaziler ise CIS’den daha erken yaşlarda yaklaşık 25-30 yaşları arasında teşhis edilirler. Servikal intraepitelyal lezyonların epidemiyolojisi invaziv serviks kanseri ile benzerlik gösterir.<sup>8</sup> İnvaziv servikal kanser intraepitelyal bir fazdan sonra meydana gelir (prekürsör servikal lezyon/intraepitelyal neoplazi/CIN) ve prekürsör lezyonlu kadınların tümünde gelecekte invaziv kanser gelişmeyecektir.<sup>2</sup> CIN’in invaziv kansere progresyonu 5-15 yıl alır.<sup>9</sup> Literatürdeki bir derlemede, yaklaşık 14.000 hasta 1- 20 yıl izlenmiş ve Östör CIN’in %60 regrese olacağını, sadece %10’nun karsinoma insitu’ya (CIS) ilerleyeceğini belirtmiştir. CIN III hastalarının üçte biri regrese olacaktır. Tanılar tek tek sitoloji, biyopsi veya ikisinin kombinasyonu ile konulmuştur.15.000’den fazla hastadan CIN I tanılıların %1.7’sinde invaziv kansere dönüşürken CIN III tanılıların %12’si invaziv kansere dönüşmüştür. Yaklaşık 28.000 hastanın dahil edildiği ve Melkinow ve arkadaşlarının yaptığı bir metaanalizde, 24 ayda, ASCUS tanısı alanların %7.3’ü, LSIL tanısı alanların %21’inde HSIL gelişmiştir. ASCUS’un %68’i, LSIL’in %47’si ve HSIL’in %35’i normal sitolojiye dönüşmüştür.<sup>10</sup>





Şekil.2.1 Preinvaziv servikal lezyonların regresyon,persistans ve progresyon oranları

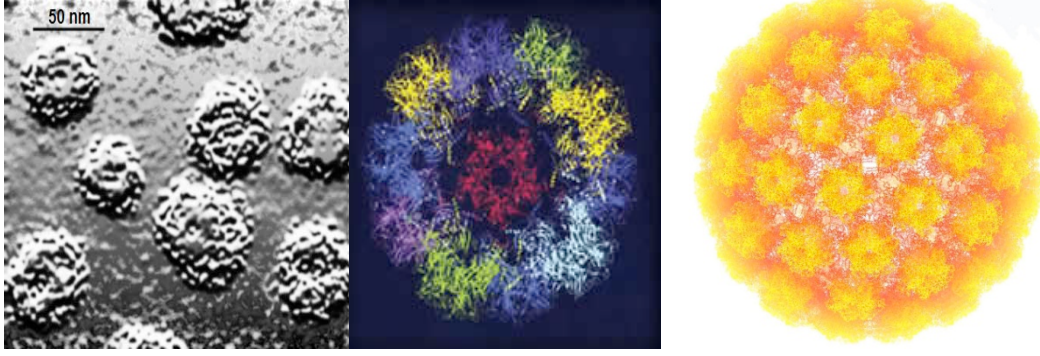
## 2.2 Risk Faktörleri

İlk koitusun erken yaşlarda gerçekleşmesi, çok eşli cinsel hayat, yüksek riskli seksüel partner, cinsel yolla bulaşan hastalık öyküsü, sigara kullanımı, fazla sayıda doğum yapmış olmak, immün supresyona yol açan durumlar, uzun süreli oral kontraseptif kullanımı, düşük sosyoekonomik düzey, siyah ırk ve HPV enfeksiyonu servikal neoplaziler için risk faktörüdür. Bu faktörlerin çoğu HPV bulaşımının sonucudur.<sup>11-17</sup> Erken yaşlarda servikal glandüler epitelin yassı epitele dönüşümünün aktif olması nedeni ile transformasyon zonu karsinojenlere daha duyarlıdır.<sup>8</sup>

## 2.3 HPV

Dünyada seksüel olarak geçişli olduğu bilinen en sık enfeksiyonlardan biri olan, Human Papillomavirus (HPV) enfeksiyonu CIN ve servikal kanserin ana sebebini oluşturmaktadır.<sup>18-21</sup>

HPV DNA preneoplastik ve neoplastik servikal lezyonların hemen hemen %100'ünde saptanmıştır.<sup>22</sup>

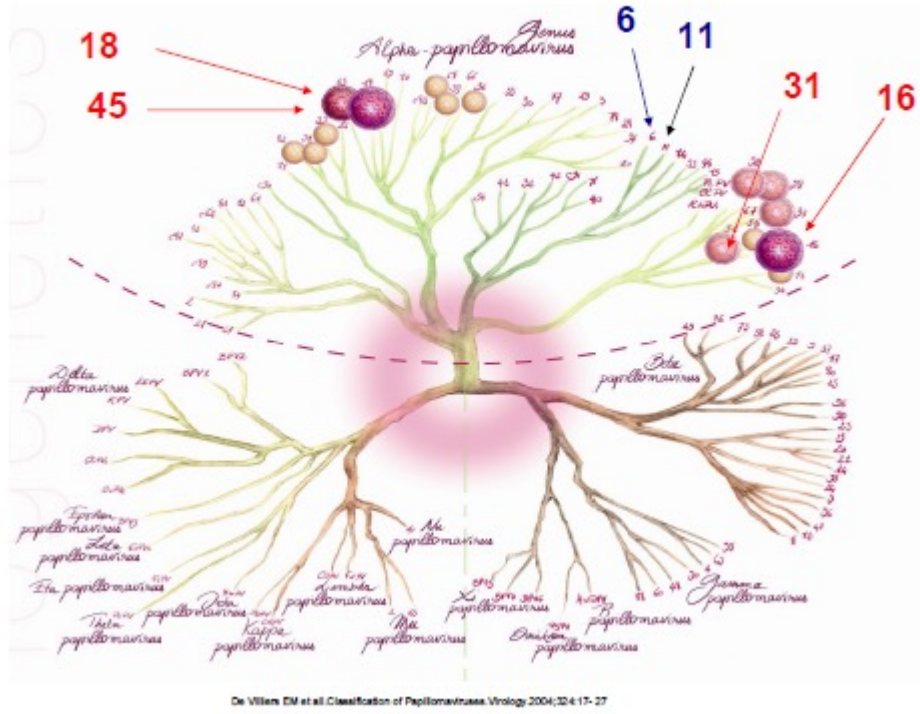


Şekil 2.2/2.3/2.4 Human papillomavirüs

Human papilloma virüsleri papovaviridae ailesinin üyeleridir. İzohedral kapsid içinde çift iplikli 7800-7900 bazdan oluşan sirküler DNA genomundan oluşan çıplak virionlardır. HPV, cilt ve mukozal membranların epitelyal hücrelerini enfekte eder. HPV genomu 3 bölge içerir. Regülatör bölgenin üst kısmı (URR) viral proteinlerin üretimini kontrol eder. İlk parça, viral enfeksiyon ve replikasyonu etkileyen E1, E2, E3, E4, E5, E6 ve E7 proteinlerini şifreler. Son kısım, sırasıyla major ve minör kapsid proteinleri olan L1 ve L2 proteinlerini kodlar. E6, E7 ve L1 gen sekuenslerinde %10'dan daha fazla farklılık ayrı bir HPV tipi oluşturur.<sup>6</sup> 120'den fazla HPV tipi tanımlanmıştır. HPV yüksek risk, orta ve düşük riskli HPV olarak sınıflanmıştır. Yüksek riskli HPV ile persiste enfeksiyon servikal kanser gelişimi ile ilişkilidir.<sup>23-25</sup>

Şu ana kadar toplanmış epidemiyolojik kanıtlar, HPV enfeksiyonun önemli olabileceğini fakat invaziv kanser gelişiminde yetersiz bir faktör olduğunu göstermiştir. Walboomer ve arkadaşları, invaziv servikal kanserde polimeraz zincir reaksiyonu ile HPV DNA'nın %99.7 pozitif olduğunu buldu. HPV 16 ve 18 hemen hemen invaziv servikal kanserlerin %67'sine neden olmaktadır.<sup>6</sup>

# HPV Filogenetik Ağaç

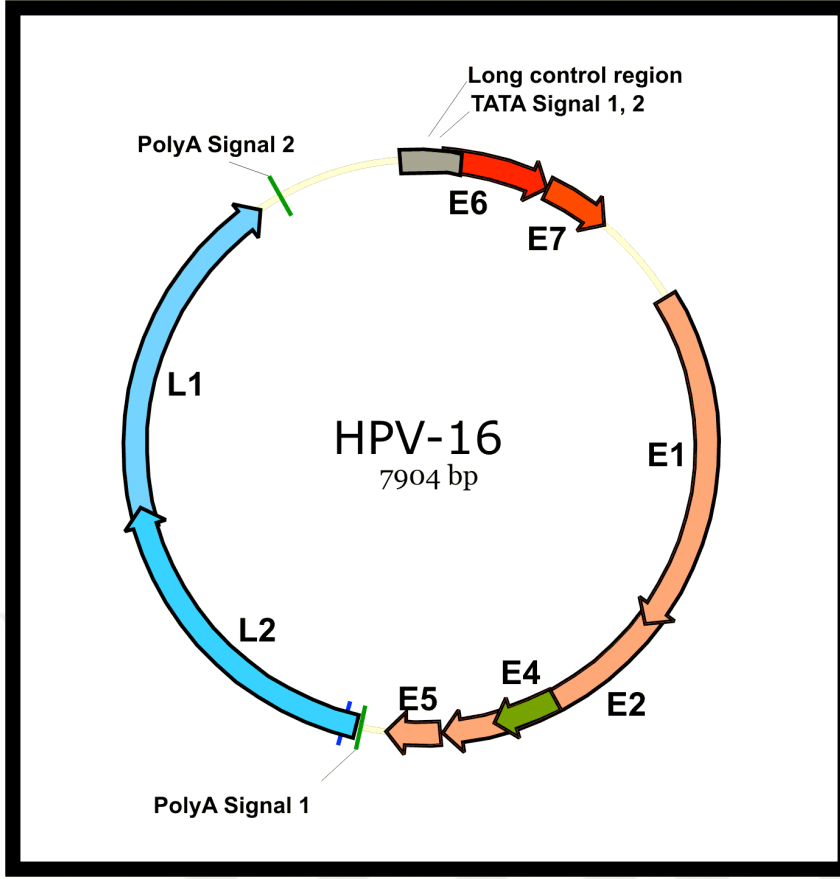


Tablo 2.5 HPV filogenetik ağacı

## 2.3.1 HPV'nin Yapısı:

HPV genomu viral gen regülasyonu ve hücre dönüşümü ile ilişkili altı erken (E), ve virüsün kapsidini oluşturan iki geç (L) proteini kodlayan DNA sekansları içermektedir. Genomun bir bölgesi de düzenleyici DNA sekanslarından oluşmaktadır.

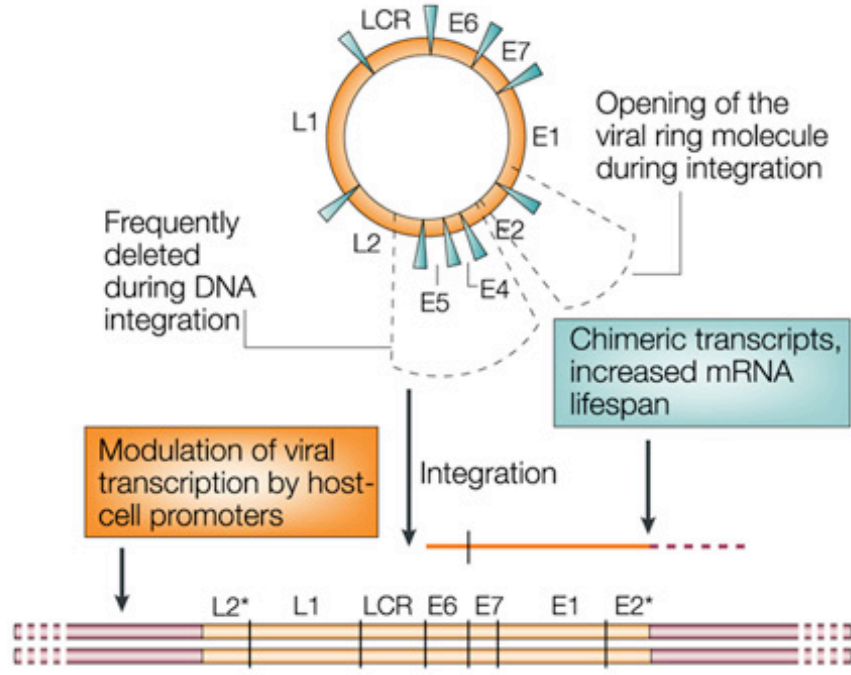
HPV enfeksiyonu, erken proteinlerin translasyonu ve transkripsiyonu ile sonuçlanır. HPV genomunun E6 ve E7'yi kodlayan parçasını açan ve okunan yapısı, enfekte hücrelerin transformasyonu ve ölümsüzleşmesinde özellikle önemlidir. E6 ve E7'yi kodlayan parçadan sentezlenen protein ürünleri, ayrı ayrı tümör süpressör genler olan p53 ve retinoblastomun(Rb) gen ürünlerine bağlanabilirler. Kondilomlarda ve düşük dereceli displazilerde, HPV DNA, E6 ve E7 transkripsiyonun regülasyonunu sağlayan bir episomal (kapalı sirküler)formunu sürdürür. Viral integrasyon, E6 ve E7 viral protein ürünlerinin bağlanmasını artırarak fazla ekspresyon ve ayrı ayrı tümör süpressör proteinlerinin inaktivasyonu ile sonuçlanır.<sup>6</sup>



Şekil 2.6 HPV 16 viral genomu

Hücresel proliferasyonda, HPV ile enfekte hücrelerde bu inhibitör etkilerin kaldırılmasıyla sonunda neoplastik transformasyona öncülük eden bir çoğalma avantajı sağladığını aklı getirir. E6 ve E7, HPV'ye bağlı anogenital malignitelerde sürekli eksprese edilir.

HPV, daha sık olarak seksüel geçişli bir hastalıktır. Seksüel aktif kadınların tahminen %75-80'ninde HPV DNA'nın, herhangi bir noktada pozitif olduğu saptanacaktır. HPV enfeksiyonları, enfeksiyonun geçişinin temel yolu olan, seksüel aktivite başladığında en sıktır. Ardarda test edildiğinde, tipik olarak virüsün temizlendiğini gösterilmektedir. Persistan enfeksiyon çok az kadında meydana gelir ve, bu kişiler prekanseröz ve invaziv lezyonlar için en riskli olan kişileri oluşturur. Displazi insidansı, hemen hemen HPV enfeksiyonu insidansından on kat daha azdır ve bu, HPV enfeksiyonlarının ana bulaş yapısını yansıtır.<sup>6</sup>



Nature Reviews | Cancer

Şekil 2.7 Açılan HPV viral genomunda E6-E7 aktivasyonu

### 2.3.2 P16<sup>INK4a</sup>'nın Yeri:

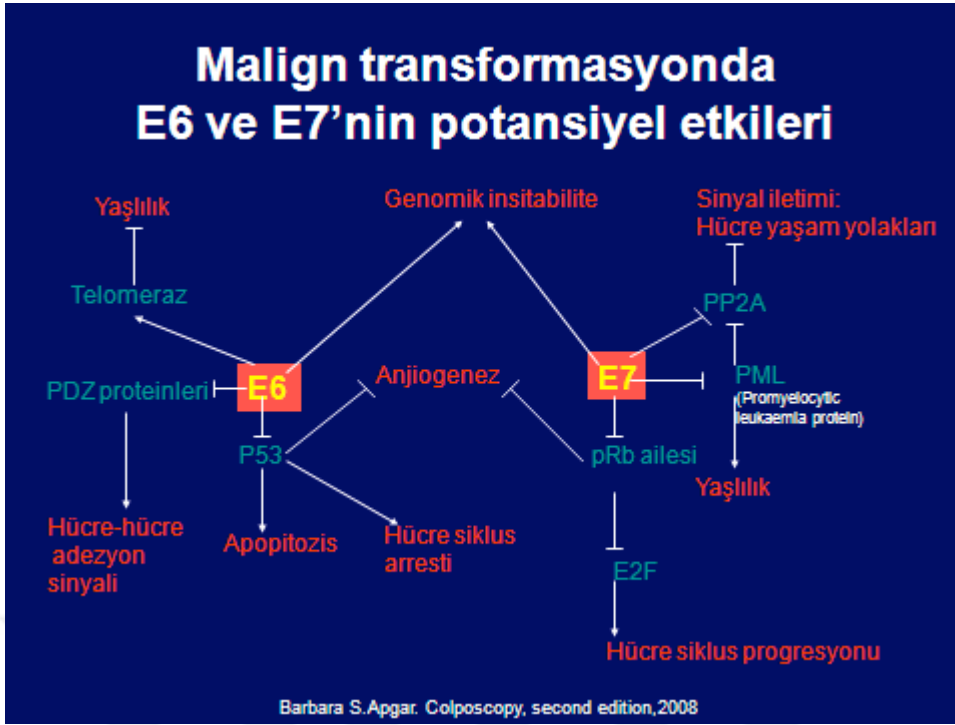
Yüksek riskli onkolojik HPV tiplerinin, CIN ve ardından servikal kanser gelişiminde önemli bir etiyolojik faktör olduğu konusunda önemli sayıda kanıt mevcuttur. Yüksek riskli HPV ile erken dönem enfeksiyon latent olmakla birlikte enfeksiyonların çoğu ilk 6 ayda regrese olur. Enfeksiyonun başlangıç fazında HPV genomu episomaldir. Viral genomun konakçı hücreye entegrasyonun çoğu CIN vakasında, en önemli tetikleyici olay olduğu ve sonuçta; konakçı hücrelerin ölümsüzleşmesiyle ve onları invazyon yapabilen kanser hücrelerine çevirerek oluşan kanser gösterilmiştir. Viral integrasyon süreci muhtemelen viral genomun E1/E2 parçasının açılıp okunması, E2 fonksiyonuna engel oluşturması ile indüklenir. Bozulmamış bir viral genomda E2, E6 ve E7 viral onkoprotein ürünlerini regüle ve süprese eder. E2 fonksiyonlarında bozulma sırasıyla, p53 ve pRb inaktive eden E6 ve E7 onkoproteinlerinin fazla ekspresyonuna yol açar. Sonuç olarak transkripsiyon faktörü E2F'nin salınmasına izin verilir, hücrenin, G1 fazındaki tek durak olan kontrol noktasından S fazına girişine izin verilir. Artan sayıda kanıt, p16<sup>INK4a</sup>'nın bir aşırı ekspresyonu olarak dönmesini sağlayan pRb inaktivasyon ve/veya E2F'in aktivasyonuna işaret eder.<sup>26</sup>

Yüksek riskli HPV tiplerinin E6 ve E7 proteinleri G1-S geçişindeki hücre siklusu proteinlerini kontrol eden P53 ve pRb proteinlerini inhibe eder.<sup>27</sup> pRb'nin etkisi ile hücrelerin siklusunun S fazına girmesi ve proliferasyonu inhibe olur.<sup>22</sup> Bu siklin D1'in diğer siklin bağımlı kinazlar (CDK4-6) ile kompleks oluşturarak fosforile olmasına neden olur. HPV onkoprotein varlığında pRb inaktive olur. Rb'nin inaktivasyonu DNA replikasyonu için gerekli olan genlerin transkripsiyonuna ve hücre siklusunun G1-S 'den S fazına geçişinin uygun olmayan şekilde hızlanmasına izin verir. pRb E7 ile inaktive olduğunda, p16<sup>ink4a</sup>'nın fazla ekspresyonuna yol açar.<sup>22, 28-29</sup>

p16, CDK4 ve CDK6'ya bağlanarak hücre siklusunu yavaşlatan, pRb'nin hipofosforilasyonuna yol açan, E2F'nin serbest kalmasını sağlayan ve G1 fazından S fazına geçişi sağlayan siklin bağımlı kinaz inhibitörüdür.<sup>30</sup> Sonuç olarak, E2F aktif formda tutulur ve hücre siklusunda G1/S-fazına geçişi indüklenir. Eş zamanlı olarak hücre siklusunun kontrolünü sağlamak için p16<sup>INK4a</sup> ekspresyonu artar, fakat E7'nin pRb üzerindeki etkisini engeller. 16<sup>INK4a</sup>'nın bu nükleer akümülyasyonu, immunohistokimyasal olarak gösterilmesini sağlar ve bu nedenle ek bir biyomarker ve HPV'nin onkojenik aktivitesinin bir ölçütü olarak kullanılma potansiyeli vardır.<sup>31-32</sup>

P16<sup>INK4a</sup>'nın belirgin overekspresyonu, monoklonal antikorlar kullanılarak immünhistokimyasal olarak gösterilebilir. Servikal kanser ve serviksin preneoplastik lezyonları, özellikle 16 ve 18 gibi yüksek riskli HPV tipleri ile yapılan çalışmaların sonuçları, bu lezyonlarda güçlü ve diffüz bir nükleer ve sitoplazmik p16INK4a immunreaktivitesini göstermiştir.<sup>22, 29, 33-35</sup>

Servikal intraepitelyal lezyonlarda p16<sup>INK4a</sup> immunohistokimyasalının kullanımı, CIN tanısında interobserver variabilite azaltılmasında uygulanabilir. CIN lezyonlarının histolojik tanısı ve derecelendirmesinde interobserver ile ilgili çalışmalar interobserverlar arası uzlaşmanın genellikle kötü olduğunu göstermiştir.<sup>36-39</sup>



Şekil 2.8 E6 ve E7 ile p53 ve pRb ilişkisi

## 2.4 Serviksin Preinvaziv Lezyonlarının Tanısı:

### 2.4.1 Sitoloji:

Pap smearin 20.yüzyılın ortalarından bu yana sitoloji bazlı servikal kanser taramasında kullanılmasındaki gelişmeler, Pap smear ve sıvı bazlı sitoloji gibi yeni sitoloji bazlı teknolojiler, servikal kanserden ikincil korunmayı sağlamaktadır. Başarı ile uygulandığında sitolojik taramanın servikal kanser hızını azalttığına etkisini gösteren karşı konulamaz ve ikna edici epidemiyolojik datalara rağmen bazı otörler, randomize kontrollü çalışmalardan kaynaklı kanıtlara dayanarak, servikal kanserde sitolojik taramanın etkisini gösteren direkt bir veri olmadığını tartışmaktadır. Son zamanlarda yayınlandığı gibi, bu güçlü kanıt, popülasyondaki servikal kanser tarama aktivitesinin insidans/mortalite eğilimi ekolojik korelasyonundan kaynaklanır.<sup>40</sup> Sitoloji subjektif bir test olup kalite kontrolü/kalite güvencesi olmayan programlarda sitolojinin klinik performansına ulaşmak ve iddia etmek hemen hemen imkansızdır. Sitoloji yoğun emektir ve bugüne kadar yüksek verimliliği olan otomatik taramaya dayanıklıydı.<sup>41</sup> Sıvı bazlı sitolojinin lojistik ve işlevsel avantajları (yorumlamadaki yüksek hız, yetersiz smear oranında azalma ve kalan sıvının yardımcı moleküler testler için kullanılabilmesi) vardır, fakat daha pahalı ve konvensiyonel sitolojiye göre histolojik olarak yüksek dereceli CIN'i saptamak konusunda ne daha sensitif ne de daha spesifiktir.<sup>42</sup> Önemli

bir nokta da premalign yada invaziv servikal kanser olgularının %20-50'sinde yapılan tek konvensiyonel pap-smearla patoloji atlanmaktadır. Pap smearın CIN1'deki sensitivitesi %30-87 arasında değişmekle birlikte ortalama %47'dir. Spesifitesi ise %85-100 arasındadır ve ortalama %95'dir. CIN2 ve yüksek dereceli lezyonlarda ise sensitivitesi daha yüksektir (%44-99), spesifitesi ise %91-98 arasındadır.<sup>8</sup>

Pap-smear yalancı negatiflik oranını belirleyen bir faktör de slayttaki anormal hücrelerin bazen sitoteknisyen tarafından tanınıp yorumlama güçlüğüdür. Computer-Asiste Screening tekniği ile anormal hücreler daha kolay tesbit edilebilir. İki metodu vardır. Autopap ile bilgisayar slayt üstündeki materyali değerlendirilir ve algoritma temeline dayalı olarak anormalik varlığına göre skora yapar. AutoCyteScreen tekniğinde bilgisayar şüpheli bulduğu hücreleri sitoteknisyene gösterir.<sup>8</sup>

#### **2.4.2 HPV DNA Testi:**

Human papillomavirus (HPV) DNA testinin klinik pratiğe girmesi ile primer tarama, triaj, tedavi sonrası takipte sağlayacağı etkinlikte daha fazla ilerleme umutları artmıştır. Günümüzde yayınlanan randomize klinik çalışmalar, HPV testinin primer taramada, sitolojiye ek olarak olduğu kadar tek primer test olarak da etkin olarak integre edilebileceğini göstermiştir. Çalışmalar ayrıca HPV DNA testinin, şüpheli sitolojik anomalili kadınların triajında da kullanılabileceğini göstermiştir ve bunun, CIN tedavisi sonrasında rezidü veya rekürren hastalığı olan kadınları ayırt etmek için potansiyel bir rolü vardır.<sup>43-45</sup> Ancak, düşük dereceli lezyonların triajında yetersiz kalır ve eğer primer tarama testi olarak uygulanırsa, kolposkopiye ihtiyacı olan hastaları ayırt etmek için hastalığa daha spesifik bir belirtece sahip olmak gerekecektir. Ayrıca tek bir HPV DNA testi virüs enfeksiyonunu konfirme etmesinin yanında, tüm servikal kanserlerin %99'nda bulunur<sup>21</sup>, geçici ve kronik enfeksiyonu ayırt edemez. Bu iki tip enfeksiyon arasındaki ayırım, persistan enfeksiyon servikal neoplaziye progresyonu predikte ettiği için ve geçici olan etmediğinden önemlidir.<sup>46</sup> Altın standart olarak sıklıkla uygulanan servikal biyopsilerin histolojik incelemesi intra ve interobserver farklılıkları nedeni ile anlamlı olarak güçleşir.<sup>47</sup> Şüpheli sonuçları olan hastalardan tedavi gerektirenlerin ayırte dilmesinde yönlendirebilecek, histolojik materyallere uygulanabilecek anlamlı belirteçler eklenmelidir.

Günümüzdeki çalışmalar, HPV enfeksiyonun oluşturduğu ve hastalığın ciddiyetini predikte eden değişimleri saptayabilen objektif biomarkerların gelişimine odaklanmıştır. Hücre tümör supressör protein olan p<sup>16INK4a</sup>, HPV enfeksiyonu değiştirdiği için bir biomarker



olarak saptanmıştır. Fizyolojik olarak p16 siklin bağımlı kinaz olan CDK4/6'nın aktivitesini bloke eder. HPV enfeksiyonun viral onkogenler olan E6 ve E7 'yi değiştirmesiyle apoptozis ve hücre siklus regülasyonunda ayrı ayrı değişiklikler olur. Daha önemli olarak, E7, E2F transkripsiyon faktörünün retinoblastom proteinine (pRb) bağlanması ve böylelikle genellikle CDK4/6 ile aktive olan moleküler yolağın hücre siklusunu indüklemesini bozar. Etkilenen hücreler irregüler hücre siklusuna karşılık olarak belirgin biçimde p16 ekspresyon ederler. Öyle ki, E2F CDK4/6 'yı etkilemediğinde, fakat E7 ile p16 ekspresyonu hücre siklusuna etki etmemektedir. Zaman içerisinde, p16 etkilenen hücrelerin nükleus ve sitoplazmalarından salınır ve immun boyama ile saptanabilir.<sup>48</sup>

## 2.5 Tedavi

Servikal intraepitelyal neoplazili kadınların konservatif tedavisi, servikal kanser riskini azaltır. Yine de, servikal peinvaziv lezyonlu kadınlar buna rağmen büyük olasılıkla genel popülasyondan fazla kanser geliştirmektedir.<sup>49</sup> Tedaviler ablatif ve eksizyonel olmak üzere iki ana başlık altında toplanmaktadır. Lazer vaporizasyon, kriyoterapi, diatermi ablatif tedavi yöntemlerini oluştururken, LEEP, soğuk konizasyon, lazer konizasyon ve histerektomi eksizyonel yöntemlerdir.

Large loop excision of the transformation zone (LLETZ), CIN tedavisinde kullanımı artan konservatif eksizyonel bir methodur. Bu yöntemin bir avantajı, eksizyon sınırının patolojik inceleme için uygun olmasıdır. Eksizyonel metoda bağlı olmaksızın tedavi sonrası CIN oranları %5-35 arasında görülmektedir.<sup>50-52</sup> Şafi ve arkadaşları, derlemelerinde LLETZ'in diğer avantajlarının yanında, CIN tedavisinde ideal yöntem olarak görüldüğü sonucuna ulaştılar.<sup>53</sup> Eksizyonel yöntemin avantajları; transformasyon zonunun kapsamlı histolojik incelenmesini sağlamak, mikroinvaziv ve glandüler hastalığı tanımlanabilir veya dışlanabilir, lezyon sınırının durumu saptanabilir, herhangi bir boyut ve tipteki transformasyon zonunun tedavisine uyum sağlar, 'gör ve tedavi et' politikasına hasta seçimine izin verir, tanı yönteminin denetimine olanak sağlar.<sup>54</sup> Bir yıl içinde rezidü hastalık oranını %3-8 arasında gösteren, çok sayıda kısa süreli gözlemsel çalışmada, LEEP'ün etkinliği kanıtlanmıştır.<sup>55-57</sup>

### **3.GEREÇ ve YÖNTEM**

#### **3.1.Olgu Seçimi**

Bu tez çalışması,Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tıp ve Sağlık Bilimleri Araştırma Kurulu'nun bilimsel ve etik açılardan onayı ( Onay no:KA09/414) alınarak planlanmıştır.Başkent Üniversitesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Ana Bilim Dalı Jinekolojik Onkoloji Bölümü'nde Şubat 2007 ile Eylül 2009 tarihleri arasında histopatolojik inceleme sonucu LSIL olan 48 vaka ile, 46 HSIL olarak raporlanmış toplam 94 hasta ve kontrol grubu olarak da 30 squamoz hücreli servikal kanser olgusu retrospektif olarak seçilmiş ve bu şekilde uygulanmıştır.Hastane bilgisayar veri tabanı ve yazılı patoloji raporlarından, 96 adet LEEP materyali ve 28 adet Tip III histerektomi materyali olmak üzere toplam 124 histopatolojik incelemeye ait kayıtlar incelenmiştir.Toplam 94 LSIL(48/33 hasta) ve HSIL(46/33 hasta) tanıli hastaların dosyasından 66 tanesinin (%70) HPV DNA PCR sonucuna ulaşılmıştır.Aynı zamanda olguların hastane arşivinde bulunan dosyaları taranarak çalışma için gerekli klinik bilgiler elde edilmiştir.

Başkent Üniversitesi Patoloji Ana Bilim Dalı Laboratuvarında, olgulara ait cerrahi materyallerden (96 LEEP materyali (2 tanesi mikroinvaziv kanser ), 28 adet Tip III Histerektomi materyali) seçilen parafin bloklardan hazırlanan örnekler, p16 immunohistokimsyal boya ile boyanmıştır.

Biyopsi örnekleri,Başkent Üniversitesi Patoloji Bölümü'nün arşivinden formalinle fikse edilmiş,parafin gömülü servikal dokulardan elde edilmiştir.

#### **3.2 İmmünohistokimya**

Formalin fiske, parafin gömülü blok halindeki biyopsi materyallerinden 4 mikronluk seri kesitler alındı ve bir tanesi histopatolojik tanının doğrulanması için H&E ile boyandı. İmmünohistokimyasal analiz için birbirini izleyen kesitler işleme tabi tutuldu. Kesitler deparafinizasyon işleminden sonra antijenin geri kazanılması için, mikrodalga fırında 110 ° C'de ,10 mM trisodyum sitrat tampon çözeltisinde (pH 6.0) 10 dakika kaynatılmıştır. Endojen peroksidaz aktivitesi, kesitlerin PBS içinde %1 hidrojen peroksizde 5 dakika

inkübasyonu ile bloke edilmiştir. Nonspesifik bağlanmaların %1,5'lük normal at serumu ile 30 dk preinkübe edilerek bloke edilmesinin ardından primer antikor (Mouse anti-human p16<sup>INK4a</sup> Antikoru, CINtec Histology Kit, mtm laboratories AG, Germany) ,oda ısısında 45 dakika uygulandı. Daha sonra, biotinlenmiş at anti-mouse veya anti-rabbit serum sekonder antikorları damlatılarak oda ısısında 30 dakika bekletildi. Takiben avidin-biotin kompleksi ile 30 dakika inkübe edildikten sonra kesitlere DAB (3,3'-diaminobenzidin) kromojen damlatıldıktan sonra çeşme suyunda yıkandı ve hemotoksilen ile 10 saniye zıt boyama yapıldı.

Pozitif kontrol olarak p16 antikoru pozitif olduğu bilinen bir serviks invaziv karsinomu kullanıldı. Negatif kontrol olarak bir kesite primer antikor uygulanmaksızın immunohistokimyasal boyama yapıldı.

### **3.3.p16<sup>INK4a</sup> ile Boyanmanın Yorumlanması**

İmmünohistokimyasal bulgular, tek bir patolog tarafından değerlendirildi ve nükleer boyanma ile birlikte sitoplazmik boyanma pozitif reaksiyon olarak kabul edildi. Negatif; <%1 hücre pozitifliği,sporadik ;izole hücreler pozitif fakat <%5,fokal; küçük hücre kümeleri fakat hücrelerin <%25 pozitif,ve diffüz;boyanan hücreler >%25 olarak sınıflandırılmıştır.

### **İstatistiksel Analiz**

Çalışma verileri,SPSS versiyon 17.0 istatistik paket programına (Statistical Package for the Social Sciences,version 17.0,SPSS Inc,Chicago,III,USA) aktarılarak analiz edilmiştir. Hastaların yaşı ortalama ; HPV varlığı; p16<sup>INK4a</sup> varlığı sayı ve yüzde açısından sunulmuştur. Tanıya göre HPV ve p16<sup>INK4a</sup> boyanma miktarı karşılaştırılmasında Ki-kare analizi kullanılmıştır.İstatistiksel anlamlılık düzeyi p<0.05 olarak kabul edilmiştir.

## 4.BULGULAR

### 4.1 Histopatolojik Değerlendirme ve Klinik Veriler

96 LEEP , 28 Tip III histerektomi materyalinin histopatolojik sonuçlarına göre toplam 124 olgu değerlendirildiğinde; LSIL histopatolojik tanısı olan 48 hastalık grubun yaş ortalaması 39.3 (minimum 24 –maksimum 61), HSIL tanılı 46 olgunun yaş ortalaması 39.9 (minimum 23- maksimum 82), invaziv skuamoz hücreli servikal kanser tanısı alan 30 hastanın yaş ortalaması 55.4 (minimum 35-maksimum 84) olup, gruplar arasında invaziv skuamoz hücreli servikal kanser tanılı olgular anlamlı olarak daha yaşlı idi.(p<0.001)

### 4.2 İmmünohistokimyasal Boyama Bulguları

Olguların 12'sinde p16<sup>INK4a</sup> negatif saptanırken (%9.7), 14'ünde sporadik p16<sup>INK4a</sup> pozitifliği (%11.3), 21'ünde fokal p16<sup>INK4a</sup> pozitifliği (%16.9), 77 olguda da diffüz p16<sup>INK4a</sup> pozitifliği (%62.1) saptanmıştır.

LSIL tanılı 48 olgudan 10'unda (%20.8) p16<sup>INK4a</sup> negatif,12'sinde sporadik pozitif (%25.0), 12'sinde fokal pozitif (%25.0), 14 tanesinde (%29.2) p16<sup>INK4a</sup> diffüz pozitif olarak boyanmıştır.

HSIL tanılı 46 vakadan sadece 1 vakada p16<sup>INK4a</sup> negatif iken (%1.9), 2'sinde sporadik pozitif(%4.3), 9'unda fokal pozitif (%19.5) ve 34 vakada da diffüz boyanma paterni izlendi.(%74).

İnvaziv skuamoz hücreli kanser olan 30 olgudan, 29 'unda p16<sup>INK4a</sup> diffüz pozitif iken (%96.7) sadece 1 olguda negatif idi.(%3.3)

Histopatolojik tanılarına göre olgular sınıflandırıldığında p16<sup>INK4a</sup> 'nın boyanma paternlerine göre dağılımı Tablo 4.1'de sunulmuştur.

**Tablo 4.1** Histopatolojik tanılarına göre p16 boyanma paternleri

| Histolojik tanı | p16 boyanma paterni |               |               |               | Total |
|-----------------|---------------------|---------------|---------------|---------------|-------|
|                 | negatif             | Sporadik      | fokal         | Diffüz        |       |
| LSIL            | n:10<br>%20.8       | n:12<br>%25.0 | n:12<br>%25.0 | n:14<br>%29.2 | 48    |
| HSIL            | n:1<br>%1.9         | n:2<br>%4.3   | n:9<br>%19.5  | n:34<br>%74.3 | 46    |
| Kanser          | n:1<br>% 3.3        | n:0<br>% 0    | n:0<br>% 0    | n:29<br>%96.7 | 30    |
| TOPLAM          | n:12<br>%9          | n:14<br>%11   | n:21<br>%18   | n:77<br>%62   | 124   |

İstatistiksel analiz yapılırken, p16<sup>INK4a</sup> boyanma düzeyleri iki gruba ayrıştırıldı. p16<sup>INK4a</sup> negatif ve sporadik pozitif olan grup p16<sup>INK4a</sup> negatif olarak adlandırılırken, fokal ve diffüz pozitiflik saptanan gruplarda p16<sup>INK4a</sup> pozitif olarak kabul edildi. 26 vakada p16<sup>INK4a</sup> negatif (%21), 98 vakada p16<sup>INK4a</sup> pozitif (%79) idi. LSIL tanısı olan 48 olgunun 22 tanesinde p16<sup>INK4a</sup> negatif (%45.8) iken 26 tanesinde p16<sup>INK4a</sup> pozitif (%54.2) idi. HSIL tanısı olan 46 olgudan sadece 3 olguda p16<sup>INK4a</sup> negatif (%6.5), 43 olguda p16<sup>INK4a</sup> pozitif (%93.5) idi. İnvaziv squamöz hücreli servikal kanser olan 30 hastadan da sadece 1 olguda p16<sup>INK4a</sup> negatif (%3.3) saptandı. Ki-kare analizi ile değerlendirildiğinde istatistiksel olarak LSIL ve HSIL olgularının p16<sup>INK4a</sup> pozitiflikleri arasında anlamlı düzeyde farklılık saptanmıştır. (p<0.001) LSIL ve kanser olguları arasında da aynı istatistiksel farklılık bulunmuştur, ancak HSIL ve kanser olguları arasında p16<sup>INK4a</sup> pozitifliği açısından anlamlı bir fark yoktur. (p<0.219)

Kanser vakaları dışarıda tutularak yapılan Ki-kare analizinde LSIL ve HSIL vakaları arasındaki p16<sup>INK4a</sup> dağılımı aşağıdaki tablo 4.2. gösterilmiştir.

**Tablo4.2.** LSIL ve HSIL vakaları arasındaki p16<sup>INK4a</sup> dağılımı

|              | LSIL n:48   | HSIL n:46  |
|--------------|-------------|------------|
| p 16 negatif | n: 22 (%88) | n:3 (%13)  |
| p16 pozitif  | n:26 (%38)  | n:43 (%62) |

p<0.001

Çalışmamızdaki LSIL ve HSIL tanımlı olan hastaların dosyaları incelendiğinde; 48 vakayı içeren LSIL grubundan 33'ünün (%70) ve 46 olgudan oluşan HSIL grubundan 33 tanesi (%70) olmak üzere toplam 66 hastanın HPV PCR verilerine ulaşıldı. Olguların HPV PCR sonuçları ile patolojik tanıların verileri tablo 4.3'de sunulmuştur.

**Tablo4.3** HPV PCR sonuçları ile histopatolojik tanımlar

| tanı | HPV                             |                                |                  | Toplam<br>n |
|------|---------------------------------|--------------------------------|------------------|-------------|
|      | Yüksek<br>riskli<br>HPV<br>n(%) | Düşük<br>riskli<br>HPV<br>n(%) | Negative<br>n(%) |             |
| LSIL | 13(%39)                         | 1(%3)                          | 19(%58)          | 33          |
| HSIL | 22(%67)                         | 0(0)                           | 11(%33)          | 33          |

LSIL olan 48 hastadan 13'ünde (%39) yüksek riskli HPV pozitifliği saptanırken, sadece 1 hastada düşük riskli HPV pozitif (%3.3) idi. HSIL grubundaki 33 hastadan 22'sinde yüksek riskli HPV'nin pozitif olduğu görülmüştür. LSIL olgularının 19'unda HPV negatif (%58) iken HSIL'li 11'inde (%33) HPV negatif idi. Düşük riskli HPV, HSIL olgularının hiçbirinde pozitif olarak saptanmadı.

Histolojik tanımları ile HPV PCR sonuçları ve p16 boyanma paternleri arasındaki ilişki Tablo 4.4'de özetlenmiştir.

| HPV           | histoloji | Sayı | P16     | P        | 16    | P16    | P16 |
|---------------|-----------|------|---------|----------|-------|--------|-----|
| Yüksek riskli |           | N    | negatif | sporadik | fokal | diffüz |     |
|               |           |      | n(%)    | n(%)     | n(%)  | n(%)   |     |
|               | LSIL      | 13   | 1(8)    | 3(23)    | 3(23) | 6(46)  |     |
|               | HSIL      | 22   | 1(4)    | 0(0)     | 3(13) | 18(83) |     |
| Düşük riskli  |           |      |         |          |       |        |     |
|               | LSIL      | 1    | 1(100)  | 0(0)     | 0(0)  | 0(0)   |     |
|               | HSIL      | 0    | 0(0)    | 0(0)     | 0(0)  | 0(0)   |     |
| HPV negative  |           |      |         |          |       |        |     |
|               | LSIL      | 19   | 4(21)   | 7(37)    | 5(26) | 3(16)  |     |
|               | HSIL      | 11   | 0(0)    | 2(18)    | 1(9)  | 8(73)  |     |

**Tablo 4.4** HPV PCR sonuçları ile p16 boyanma paternleri

Yüksek riskli HPV, histopatolojik LSIL tanısı alan 13 hastada pozitif iken, 19 hastada HPV negatif idi. LSIL tanılı sadece 1 hastada düşük riskli HPV pozitifliği bulundu. Yüksek riskli HPV pozitif olan 13 LSIL hastası p16<sup>INK4a</sup> boyanma paternlerine göre değerlendirildiğinde; 6 olguda diffüz p16<sup>INK4a</sup> pozitifliği (%46), 3 olguda fokal p16<sup>INK4a</sup> pozitifliği (%23), yine 3 olguda sporadik p16<sup>INK4a</sup> pozitifliği (%23) saptanırken, sadece 1 olguda (%8) p16<sup>INK4a</sup> negatif idi.

Düşük riskli HPV pozitifliği olan sadece 1 olgu mevcuttu. Histopatolojik olarak LSIL tanısı alan ve de p16<sup>INK4a</sup> negatif saptanan bir vaka idi.

HPV PCR sonucu negatif olan 30 olgudan histopatolojik olarak 19 tanesi LSIL, 11 tanesi HSIL idi. HPV negatif olan 19 LSIL vakasının 4 tanesinde p16<sup>INK4a</sup> negatif (%21), 7 tanesinde p16<sup>INK4a</sup> sporadik olarak pozitif (%37), 5 tanesinde p16<sup>INK4a</sup> fokal olarak pozitif (%26) ve sadece 3 tanesinde (%16) diffüz p16<sup>INK4a</sup> pozitif idi. 11 HSIL tanısı olan olgudan 8'sinde p16<sup>INK4a</sup> diffüz pozitifliği (%73), 1'inde fokal p16<sup>INK4a</sup> pozitifliği (%9), 2'sinde sporadik p16<sup>INK4a</sup> pozitifliği (%18) saptanırken hiçbirinde p16<sup>INK4a</sup> negatif değildi.

Çalışmamızda Ki-Kare istatistik analizi ile p16<sup>INK4a</sup> pozitifliği /negatifliği ve HPV DNA pozitifliği/negatifliği arasında anlamlı derecede ilişki bulunmuştur. p16<sup>INK4a</sup> pozitif olan 47 vakadan 30'unda (%64) HPV DNA pozitif iken, 17'sinde (%36) negatif idi. p16<sup>INK4a</sup>

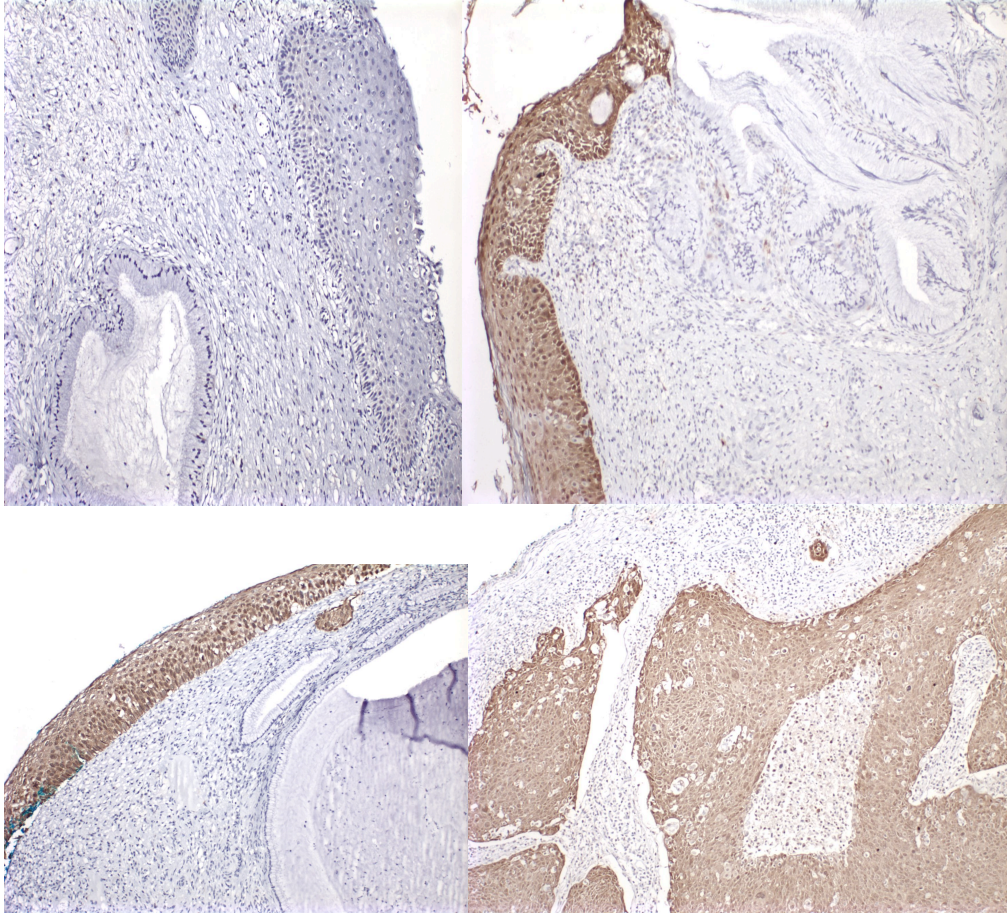
negatif olan grupta ise 13 hastada (%68) HPV DNA negatif iken sadece 6 vakada pozitif idi.( $p<0.017$ )

p16 dağılımı ile HPV DNA arasındaki ilişki tablo 4.5'te sunulmuştur.

|                                  | HPV (-)    | HPV(+)(low risk veya high risk) |
|----------------------------------|------------|---------------------------------|
| p16 <sup>INK4a</sup> negatifliği | n: 13 % 68 | n:6 %32                         |
| p16 <sup>INK4a</sup> pozitifliği | n:17 %36   | n:30 %64                        |

$p<0.017$

**Tablo4.5.** p16 dağılımı ile HPV DNA arasındaki ilişki



**Resim1:** Düşük dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon tanısı alan bir olguda p16 antikoruna ile boyanma görülmemiştir (immunoperoksidaz x 100)



**Resim2:** Düşük dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon tanısı alan diğer bir olguda bazal tabakada sınırlı p16 antikor pozitifliği (immunoperoksidaz x 100).

**Resim3:** Yüksek dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon tanısı alan bir olguda difüz kuvvetli p16 antikor pozitifliği (immunoperoksidaz x 100).

**Resim4:** Bir keratinize olmayan invaziv yassı epitel hücreli karsinom olgusunda kuvvetli p16 ekspresyonu (immunoperoksidaz x 100)



## 5. TARTIŞMA ve SONUÇLAR

Bu çalışmada, histopatolojik olarak LSIL tanısı olan 48, HSIL tanısı olan 46 olmak üzere toplam 94 preinvaziv servikal lezyonlu vaka ile invaziv skuamoz hücreli karsinom olan 30 vakanın patolojik spesmenlerinde p16<sup>INK4a</sup> boyanma düzeyleri araştırılmıştır. Aynı zamanda, hasta dosyalarından elde edilen verilerle 94 preinvaziv hastalığı olan hastalardan toplam 66'sinin HPV DNA PCR verilerine ulaşılmıştır. p16<sup>INK4a</sup> pozitifliğinin öneminin ve boyanma paterninin ve HPV DNA ile ilişkisine bakılarak prekürsör servikal lezyonlardan invaziv servikal kansere dönüşme riski yüksek olanları belirlemede sensitivite ve spesifiteyi artırarak p16<sup>INK4a</sup> takipte kullanılabilir bir yöntem olup olmadığının araştırılması hedeflenmiştir.

Servikal kanser ve prekürsör lezyonlar için biyolojik belirteçlere ihtiyaç duyulmaktadır.<sup>32</sup> PCNA( proliferen olan hücre nükleer antijeni), Ki-67 (MIB-1), Telomeraz, Cyclin E, Bcl-2, pRb, ProEx C, p16<sup>INK4a</sup> 'nin de aralarında bulunduğu birçok biyomarker literatürde değerlendirilmiştir.<sup>28-29, 32-33, 58-60</sup>

Retinoblastom gen ürünü, normal servikal skuamoz epitel ve HPV'ye bağı servikal lezyonlarda immünohistokimyasal olarak saptanmaktadır. Beklendiği gibi, HPV E7 onkoproteininin pRb üzerindeki inhibitör etkilerine bağı olarak pRb ekspresyonu, servikal neoplazinin derecesi arttıkça azalmaktadır.<sup>33</sup> Bu nedenle, çalışmalara bakıldığında CIN ve servikal karsinomlarda pRb ve p16<sup>INK4a</sup> 'nın eş zamanlı ekspresyonuyla, p16<sup>INK4a</sup> reaktivitesi artarken pRb ekspresyonunun azaldığı kanıtlanmıştır. CIN'nin karsinogenezinde HPV'nin oynadığı tamamlayıcı rol, p16<sup>INK4a</sup> , anlamlı bir potansiyeli olmakla birlikte, birçok olası biyomarker sağlamaktadır. p16<sup>INK4a</sup> 'nın immünohistokimyasal değeri, CIN ve invaziv skuamoz hücreli servikal kanserde değerlendirilmedi ve bu lezyonların interobserver farklılığını azaltmada tekrarlayan yararını göstermektedir.<sup>22, 29, 35, 61</sup>

Literatürde p16<sup>INK4a</sup> 'nın preinvaziv lezyonlardaki değeri ile ilgili daha fazla sayıda çalışma hasta yönetimine katkısının daha olası olması sebebiyle sitoloji preparatları üzerinde yapılırken, biz gerçek servikal intraepitelyal lezyon tanısını koymada altın standart olan histopatolojik tanıyla p16<sup>INK4a</sup> 'yı konfirme ettik. Ancak histopatolojik inceleme prekürsör servikal lezyonların tanısında altın standart olmasına rağmen, belirlenemeyen CIN alanları p16<sup>INK4a</sup> ile boyanarak patoloğu direkt bu alana yönlendirerek gizli lezyonların tanısını kolaylaştırır.<sup>62</sup>

Bu çalışmada, histolojik olarak LSIL tanısı olan 48 olgulardan sadece 10 tanesinde p16<sup>INK4a</sup> negatif (%20.8), sporadik 12 (%25.0) ve fokal 12 (%25.0) p16<sup>INK4a</sup> pozitifliği olan olgu saptanırken 14 vakada da p16<sup>INK4a</sup> diffüz olarak pozitif (%29.2) idi. Redman ve arkadaşlarının çalışmasında CIN 1 tanılı lezyonlarda %37 p16<sup>INK4a</sup> ekspresyonu saptamışlardır. Bizim çalışmamızda daha yüksek oranda p16<sup>INK4a</sup> pozitifliğinin saptanma sebebi, boyanma paterninin skorlamasındaki farklılıktan dolayı olabilir. Bu çalışmada sadece fokal boyanma ile diffüz boyanma karşılaştırılmıştır.<sup>63</sup> Bizim çalışmamızda ise boyanma paterni sporadik, fokal ve diffüz olarak değerlendirilmiştir. Klaes ve arkadaşlarının 2001 yılındaki çalışmasında ise CIN 1 vakalarında %61 oranında diffüz p16<sup>INK4a</sup> pozitifliği saptanmıştır.<sup>62</sup>

Bizim çalışmamızdaki CIN 1 vakalarının sinonimi olan LSIL histopatolojik tanılı lezyonlarda tüm p16<sup>INK4a</sup> pozitifliğinin %79.2 gibi yüksek bir oranda gözlenmesinin nedeni, Sano ve arkadaşlarının 1998 yılında yayınlanan çalışmalarının sonucu olarak da ortaya çıkan, lezyonun düşük riskli veya yüksek riskli HPV ile enfeksiyon sonucu gelişmesine bağlı olması olabilir.<sup>29</sup> Öyle ki, bizim çalışmamızda HPV PCR sonuçları olan grup değerlendirildiğinde; yüksek riskli HPV pozitifliği olan gruptaki 13 LSIL hastasının 6'sında (%46) diffüz boyanma izlenirken sadece 1 tanesinde p16<sup>INK4a</sup> negatif idi.

Histopatolojik incelemenin servikal lezyonlar için altın standart olarak kullanılmasında, patologlar arasında tanımlar üzerindeki anlaşmazlıklar nedeni ile bazı tartışmalar vardır.<sup>61, 64-65</sup> Fakat literatür değerlendirildiğinde, yüksek dereceli lezyonlar için tanıda uzlaşmanın daha yüksek olduğu, bu anlaşmazlığın tedavi kararını etkilemede küçük bir etkisi olduğunu ileri sürülmektedir.<sup>64-65</sup> Ordi ve arkadaşlarının 2009 yılında yayınladıkları çalışmalarında; histopatolojinin yüksek dereceli lezyonların atlanmasında da kayda değer bir riske sahip olduğunu belirtilmiştir. Biyopsi materyallerindeki lezyonların invaziv karsinoma dönüşmesindeki yüksek riski kesin olarak belirleyebilmedeki başarı primer hedef olarak, p16<sup>INK4a</sup> immün boyama, histolojik veya servikal biyopsi materyallerine uygun eklenebilecek makul bir seçenek olarak düşünülmelidir.<sup>66</sup>

Shi ve arkadaşları p16<sup>INK4a</sup>'nın yüksek dereceli servikal intraepitelyal neoplazilerde daha sensitif ve spesifik bir marker olduğunu buldular. p16<sup>INK4a</sup> için zayıf ve fokal boyanma (displastik skuamöz epitelin <%50 açık kahverengi olarak tanımladılar) 34 LSIL hastasının %12'sini oluştururken, güçlü ve diffüz boyanma (displastik skuamöz epitelin >%50 koyu kahverengi olarak boyanması) %65'ini oluşturmaktaydı.<sup>67</sup> Bu çalışma, Walts ve

arkadaşlarının çalışması ve bizim çalışmamızdan yola çıkarsak düşük dereceli servikal intraepitelyal lezyonlar farklı immünohistokimyasal boyanma paternleri gösterir.<sup>67-68</sup> Ancak yine çalışmalarımızın bulguları ışığında LSIL, HSIL, invaziv skuamoz hücreli servikal kanser vakalarının p16<sup>INK4a</sup> ile boyanma düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur.(p<0.001) Ayrıca bizim çalışmamızda preinvaziv servikal lezyonların histopatolojik değerlendirmesi yaygın olarak kullanılan CIN1, CIN2, CIN3 ile üçlü sınıflandırma yerine LSIL ve HSIL olarak ikili sınıflandırılma kullanılmıştır. Bu nedenle CIN2 vakası olup HSIL grubunda yapılmış olan değerlendirme nedeni ile HSIL grubunda izlenen 9 tane (%19.5) fokal p16<sup>INK4a</sup> pozitifliği, 2 tane (%4.3) sporadik p16<sup>INK4a</sup> pozitifliği ve 1 tane (%1.9) p16<sup>INK4a</sup> negatifliği saptanmasının sebebi olabilmektedir. Bu bulgularla HSIL tanılı olguların %74.3'ünde diffüz p16<sup>INK4a</sup> pozitifliği saptanırken invaziv kanser olgularının %96.4'ünde p16<sup>INK4a</sup> diffüz pozitifliği saptanmıştır. İstatistiksel olarak LSIL vakaları ile HSIL ve invaziv skuamoz hücreli kanser vakaları arasında anlamlı fark saptanırken (p<0.001), HSIL ve kanser vakaları arasındaki fark anlamsız bulunmuştur (p<0.219). Bu sonuç, Klaes ve arkadaşları<sup>62</sup> ile Wang ve arkadaşlarının<sup>35</sup> çalışmalarında CIN3 vakalarının %100 'nün diffüz p16<sup>INK4a</sup> pozitifliğine yakın bir değer oluşturmaktadır.

Bizim çalışmamızda HSIL histopatolojik tanılı 46 hasta ve skuamoz hücreli servikal kanser olan 30 vakadan da sadece 1/1 tanesinde (%1.9) / (%3.3) p16<sup>INK4a</sup> negatif iken, LSIL vakalarının 10'unda (%20.8) p16<sup>INK4a</sup> negatif idi. Çalışmamızda LSIL, HSIL, invaziv skuamoz hücreli karsinom arasında p16<sup>INK4a</sup> pozitifliği ve boyanma paternleri açısından anlamlı düzeyde farklılık saptanmıştır.(p<0.001). Bu sonuçlar literatürle uyumlu olmakla birlikte,1 invaziv kanser vakasında p16<sup>INK4a</sup> negatifliği bulunması çalışmada kullanılan dokuların parafin bloklardan eldesi nedeniyle olabilir. p16<sup>INK4a</sup> HPV-DNA yoğunluğuna bağlı bir belirteç olduğundan, parafin bloklardan elde edilen örnekler sensitiviteyi düşürebilir. Kaldı ki HPV DNA tespitinin en sağlıklı sonuçlarının taze dokular üzerindeki incelemeler ile elde edilebileceğini bildiren yayımlar<sup>69</sup> olduğunu gözönüne alarak bunun p16<sup>INK4a</sup> düzeyinin de etkilenmesine neden olabileceğini düşündürebilir.

Özellikle LSIL vakalarının değerlendirmesinde engel oluşturan inflamatuvar hücreler, preinvaziv servikal lezyonun takibi ve uygulanacak prosedürün kararında önem arz etmektedir. p16<sup>INK4a</sup>'nın HSIL ve servikal kanser tanısındaki etkinliği bir çok çalışmada gösterilmekle birlikte, bu belirteçin LSIL'i değerlendirmedeki etkisi hala tartışmalıdır.<sup>2,5,58,70-92</sup> Bu konuda NTCC'nin LSIL'de HPV DNA ile p16<sup>INK4a</sup>'yı karşılaştırdığı randomize kontrollü çalışmasında, ikisinin kombinasyonu konvensiyonel sitoloji ile karşılaştırıldığında

sensivite anlamlı olarak artmakla birlikte kolposkopiye refere edilen hasta sayısında anlamlı bir azalma saptanmamıştır.<sup>93</sup>

Bizim çalışmamızın da gösterdiği gibi p16<sup>INK4a</sup> pozitifliği, lezyonun derecesi ve HPV DNA pozitifliği ile anlamlı olarak artmaktadır ve lezyonun ciddiyetini göstermektedir. Ancak, literatürde yapılan çok sayıda çalışma kıyaslandığında boyanma paterninin değerlendirilmesinde farklı sınıflandırmalar kullanılmıştır. Bu da p16<sup>INK4a</sup> değerlendirilmesi için bir cut-off belirlenmesinin önemini ortaya koymaktadır.<sup>94</sup>

Sonuç olarak histolojik materyallerde diffüz p16<sup>INK4a</sup> pozitifliği, hastalığın progresyonu için prediktör olabilir.<sup>35, 72, 75, 95</sup> Ancak, özellikle düşük dereceli lezyonlar olmak üzere için preinvaziv servikal lezyonların tedavi, triaj ve takibinde p16<sup>INK4a</sup> 'nın kullanılması için daha fazla hasta sayısı ve uzun izlem süresine sahip prospektif randomize kontrollü çalışmalara ihtiyaç vardır. Bu çalışmaya dahil edilen vakaların klinik takibi devam etmekte ve uzun dönem sonuçları önümüzdeki süreçte ortaya koyulacaktır.

## KAYNAKLAR

1. Rock JA, Jones HW, Te Linde RW. Te Linde's operative gynecology. 10th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins; 2008.
2. Focchi GR, Silva ID, Nogueira-de-Souza NC, Dobo C, Oshima CT, Stavale JN. *Immunohistochemical expression of p16(INK4A) in normal uterine cervix, nonneoplastic epithelial lesions, and low-grade squamous intraepithelial lesions.* J Low Genit Tract Dis. 2007 Apr;11(2):98-104.
3. Norman I, Brismar S, Zhu J, Gaberi V, Hagmar B, Hjerpe A, et al. p16(INK4a) immunocytochemistry in liquid-based cervical cytology: is it feasible for clinical use? Int J Oncol. 2007 Dec;31(6):1339-43.
4. Godoy AE, Mandelli J, Oliveira FH, Calegari S, Moura LB, Serafini EP. p16INK4 expression in precursor lesions of squamous cell cervical cancer related to the presence of HPV-DNA. Braz J Med Biol Res. 2008 Jul;41(7):583-8.
5. Gurrola-Diaz CM, Suarez-Rincon AE, Vazquez-Camacho G, Buonocunto-Vazquez G, Rosales-Quintana S, Wentzensen N, et al. P16INK4a immunohistochemistry improves the reproducibility of the histological diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia in cone biopsies. Gynecol Oncol. 2008 Oct;111(1):120-4.
6. 10.BASKI DSOVJ. SERVİKAL KANSER. 2010:971-88.
7. Villa LL. Assessment of new technologies for cervical cancer screening. Lancet Oncol. 2008 Oct;9(10):910-1.
8. Ayhan AD, T. Günalp, S. Gürgan, T. Önderoğlu, L. Yaralı, H. Yüce, K. Servikal İnterapiyelyal neoplaziler. 2008:1193-221.
9. zur Hausen H. Human papillomaviruses and their possible role in squamous cell carcinomas. Curr Top Microbiol Immunol. 1977;78:1-30.
10. William T. Creasman MD. Preinvasive Disease of the Cervix. 2007:8-43.
11. Appleby P, Beral V, Berrington de Gonzalez A, Colin D, Franceschi S, Goodhill A, et al. Cervical cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data for 16,573 women with cervical cancer and 35,509 women without cervical cancer from 24 epidemiological studies. Lancet. 2007 Nov 10;370(9599):1609-21.
12. Anttila T, Saikku P, Koskela P, Bloigu A, Dillner J, Ikaheimo I, et al. Serotypes of Chlamydia trachomatis and risk for development of cervical squamous cell carcinoma. JAMA. 2001 Jan 3;285(1):47-51.
13. Wallin KL, Wiklund F, Luostarinen T, Angstrom T, Anttila T, Bergman F, et al. A population-based prospective study of Chlamydia trachomatis infection and cervical carcinoma. Int J Cancer. 2002 Oct 1;101(4):371-4.
14. Castle PE, Wacholder S, Lorincz AT, Scott DR, Sherman ME, Glass AG, et al. A prospective study of high-grade cervical neoplasia risk among human papillomavirus-infected women. J Natl Cancer Inst. 2002 Sep 18;94(18):1406-14.
15. Appleby P, Beral V, Berrington de Gonzalez A, Colin D, Franceschi S, Goodill A, et al. Carcinoma of the cervix and tobacco smoking: collaborative reanalysis of individual data on 13,541 women with carcinoma of the cervix and 23,017 women without carcinoma of the cervix from 23 epidemiological studies. Int J Cancer. 2006 Mar 15;118(6):1481-95.
16. Munoz N, Franceschi S, Bosetti C, Moreno V, Herrero R, Smith JS, et al. Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: the IARC multicentric case-control study. Lancet. 2002 Mar 30;359(9312):1093-101.
17. Cervical carcinoma and reproductive factors: collaborative reanalysis of individual data on 16,563 women with cervical carcinoma and 33,542 women without cervical carcinoma from 25 epidemiological studies. Int J Cancer. 2006 Sep 1;119(5):1108-24.

18. Kjellberg L, Wadell G, Bergman F, Isaksson M, Angstrom T, Dillner J. Regular disappearance of the human papillomavirus genome after conization of cervical dysplasia by carbon dioxide laser. *Am J Obstet Gynecol.* 2000 Nov;183(5):1238-42.
19. van der Graaf Y, Molijn A, Doornewaard H, Quint W, van Doorn LJ, van den Tweel J. Human papillomavirus and the long-term risk of cervical neoplasia. *Am J Epidemiol.* 2002 Jul 15;156(2):158-64.
20. Bosch FX, Lorincz A, Munoz N, Meijer CJ, Shah KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol.* 2002 Apr;55(4):244-65.
21. 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 Sep;189(1):12-9.
22. Murphy N, Ring M, Killalea AG, Uhlmann V, O'Donovan M, Mulcahy F, et al. p16INK4A as a marker for cervical dyskaryosis: CIN and cGIN in cervical biopsies and ThinPrep smears. *J Clin Pathol.* 2003 Jan;56(1):56-63.
23. Bosch FX, Manos MM, Munoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. *J Natl Cancer Inst.* 1995 Jun 7;87(11):796-802.
24. Lorincz AT, Reid R, Jenson AB, Greenberg MD, Lancaster W, Kurman RJ. Human papillomavirus infection of the cervix: relative risk associations of 15 common anogenital types. *Obstet Gynecol.* 1992 Mar;79(3):328-37.
25. Pfister H. Human papillomaviruses and genital cancer. *Adv Cancer Res.* 1987;48:113-47.
26. zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer.* 2002 May;2(5):342-50.
27. Slebos RJ, Lee MH, Plunkett BS, Kessiss TD, Williams BO, Jacks T, et al. p53-dependent G1 arrest involves pRB-related proteins and is disrupted by the human papillomavirus 16 E7 oncoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Jun 7;91(12):5320-4.
28. Wang JL, Zheng BY, Li XD, Nokelainen K, Angstrom T, Lindstrom MS, et al. p16INK4A and p14ARF expression pattern by immunohistochemistry in human papillomavirus-related cervical neoplasia. *Mod Pathol.* 2005 May;18(5):629-37.
29. Sano T, Oyama T, Kashiwabara K, Fukuda T, Nakajima T. Expression status of p16 protein is associated with human papillomavirus oncogenic potential in cervical and genital lesions. *Am J Pathol.* 1998 Dec;153(6):1741-8.
30. Cotran R KV, Robbins SL. Neoplasia. In: Cotran R, Kumar V, Robbins SL, . 2003 2003:182-6.
31. Wang JL, Zheng BY, Li XD, Angstrom T, Lindstrom MS, Wallin KL. Predictive significance of the alterations of p16INK4A, p14ARF, p53, and proliferating cell nuclear antigen expression in the progression of cervical cancer. *Clin Cancer Res.* 2004 Apr 1;10(7):2407-14.
32. Keating JT, Ince T, Crum CP. Surrogate biomarkers of HPV infection in cervical neoplasia screening and diagnosis. *Adv Anat Pathol.* 2001 Mar;8(2):83-92.
33. Tringler B, Gup CJ, Singh M, Groshong S, Shroyer AL, Heinz DE, et al. Evaluation of p16INK4a and pRb expression in cervical squamous and glandular neoplasia. *Hum Pathol.* 2004 Jun;35(6):689-96.
34. 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 Jul;16(7):665-73.
35. Wang SS, Trunk M, Schiffman M, Herrero R, Sherman ME, Burk RD, et al. Validation of p16INK4a as a marker of oncogenic human papillomavirus infection in cervical biopsies from a population-based cohort in Costa Rica. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2004 Aug;13(8):1355-60.
36. Ismail SM, Colclough AB, Dinnen JS, Eakins D, Evans DM, Gradwell E, et al. Observer variation in histopathological diagnosis and grading of cervical intraepithelial neoplasia. *BMJ.* 1989 Mar 18;298(6675):707-10.

37. de Vet HC, Knipschild PG, Schouten HJ, Koudstaal J, Kwee WS, Willebrand D, et al. Interobserver variation in histopathological grading of cervical dysplasia. *J Clin Epidemiol*. 1990;43(12):1395-8.
38. McCluggage WG, Walsh MY, Thornton CM, Hamilton PW, Date A, Caughley LM, et al. Inter- and intra-observer variation in the histopathological reporting of cervical squamous intraepithelial lesions using a modified Bethesda grading system. *Br J Obstet Gynaecol*. 1998 Feb;105(2):206-10.
39. Grenko RT, Abendroth CS, Frauenhoffer EE, Ruggiero FM, Zaino RJ. Variance in the interpretation of cervical biopsy specimens obtained for atypical squamous cells of undetermined significance. *Am J Clin Pathol*. 2000 Nov;114(5):735-40.
40. Parkin DM, Sanghvi LD. Cancer registration in developing countries. *IARC Sci Publ*. 1991(95):185-98.
41. Goldie SJ, Gaffikin L, Goldhaber-Fiebert JD, Gordillo-Tobar A, Levin C, Mahe C, et al. Cost-effectiveness of cervical-cancer screening in five developing countries. *N Engl J Med*. 2005 Nov 17;353(20):2158-68.
42. Arbyn M, Bergeron C, Klinkhamer P, Martin-Hirsch P, Siebers AG, Bulten J. Liquid compared with conventional cervical cytology: a systematic review and meta-analysis. *Obstet Gynecol*. 2008 Jan;111(1):167-77.
43. Arbyn M, Buntinx F, Van Ranst M, Paraskevaïdis E, Martin-Hirsch P, Dillner J. Virologic versus cytologic triage of women with equivocal Pap smears: a meta-analysis of the accuracy to detect high-grade intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst*. 2004 Feb 18;96(4):280-93.
44. Paraskevaïdis 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 Apr;30(2):205-11.
45. Arbyn M, Paraskevaïdis E, Martin-Hirsch P, Prendiville W, Dillner J. Clinical utility of HPV-DNA detection: triage of minor cervical lesions, follow-up of women treated for high-grade CIN: an update of pooled evidence. *Gynecol Oncol*. 2005 Dec;99(3 Suppl 1):S7-11.
46. Ho GY, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ, Burk RD. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med*. 1998 Feb 12;338(7):423-8.
47. Stoler MH, Schiffman M. Interobserver reproducibility of cervical cytologic and histologic interpretations: realistic estimates from the ASCUS-LSIL Triage Study. *JAMA*. 2001 Mar 21;285(11):1500-5.
48. Wentzensen N, von Knebel Doeberitz M. Biomarkers in cervical cancer screening. *Dis Markers*. 2007;23(4):315-30.
49. Soutter WP, de Barros Lopes A, Fletcher A, Monaghan JM, Duncan ID, Paraskevaïdis E, et al. Invasive cervical cancer after conservative therapy for cervical intraepithelial neoplasia. *Lancet*. 1997 Apr 5;349(9057):978-80.
50. Mitchell MF, Tortolero-Luna G, Cook E, Whittaker L, Rhodes-Morris H, Silva E. A randomized clinical trial of cryotherapy, laser vaporization, and loop electrosurgical excision for treatment of squamous intraepithelial lesions of the cervix. *Obstet Gynecol*. 1998 Nov;92(5):737-44.
51. Mohamed-Noor K, Quinn MA, Tan J. Outcomes after cervical cold knife conization with complete and incomplete excision of abnormal epithelium: a review of 699 cases. *Gynecol Oncol*. 1997 Oct;67(1):34-8.
52. Paraskevaïdis E, Lolis ED, Koliopoulos G, Alamanos Y, Fotiou S, Kitchener HC. Cervical intraepithelial neoplasia outcomes after large loop excision with clear margins. *Obstet Gynecol*. 2000 Jun;95(6 Pt 1):828-31.
53. Shafi MI JJ, Singer A. The management of cervical intraepithelial neoplasia. In: *The Cervix* Jordan JA, Singer A, Jones H, Shafi MI (eds) Oxford: Blackwell publications. 2006:465.
54. W.Prendiville. The treatment of CIN: what are the risks? 2009.



55. Prendiville W, Cullimore J, Norman S. Large loop excision of the transformation zone (LLETZ). A new method of management for women with cervical intraepithelial neoplasia. *Br J Obstet Gynaecol.* 1989 Sep;96(9):1054-60.
56. Dobbs P AT, Nuns D et al. Does histological incomplete excision of CIN following LLETZ increase recurrence rates? A six-year cytological follow-up. *Br J Obstet Gynaecol.* 2000;107:1298-301.
57. Flannelly G, Langhan H, Jandial L, Mana E, Campbell M, Kitchener H. A study of treatment failures following large loop excision of the transformation zone for the treatment of cervical intraepithelial neoplasia. *Br J Obstet Gynaecol.* 1997 Jun;104(6):718-22.
58. Guimaraes MC, Goncalves MA, Soares CP, Bettini JS, Duarte RA, Soares EG. Immunohistochemical expression of p16INK4a and bcl-2 according to HPV type and to the progression of cervical squamous intraepithelial lesions. *J Histochem Cytochem.* 2005 Apr;53(4):509-16.
59. Kelly D, Kincaid E, Fansler Z, Rosenthal DL, Clark DP. Detection of cervical high-grade squamous intraepithelial lesions from cytologic samples using a novel immunocytochemical assay (ProEx C). *Cancer.* 2006 Dec 25;108(6):494-500.
60. Shroyer KR, Homer P, Heinz D, Singh M. Validation of a novel immunocytochemical assay for topoisomerase II-alpha and minichromosome maintenance protein 2 expression in cervical cytology. *Cancer.* 2006 Oct 25;108(5):324-30.
61. Klaes R, Benner A, Friedrich T, Ridder R, Herrington S, Jenkins D, et al. p16INK4a immunohistochemistry improves interobserver agreement in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Surg Pathol.* 2002 Nov;26(11):1389-99.
62. Klaes R, Friedrich T, Spitkovsky D, Ridder R, Rudy W, Petry U, et al. Overexpression of p16(INK4A) as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int J Cancer.* 2001 Apr 15;92(2):276-84.
63. Redman R, Rufforny I, Liu C, Wilkinson EJ, Massoll NA. The utility of p16(Ink4a) in discriminating between cervical intraepithelial neoplasia 1 and nonneoplastic equivocal lesions of the cervix. *Arch Pathol Lab Med.* 2008 May;132(5):795-9.
64. Malpica A, Maticic JP, Niekirk DV, Crum CP, Staerker GA, Yamal JM, et al. Kappa statistics to measure interrater and intrarater agreement for 1790 cervical biopsy specimens among twelve pathologists: qualitative histopathologic analysis and methodologic issues. *Gynecol Oncol.* 2005 Dec;99(3 Suppl 1):S38-52.
65. Parker MF, Zahn CM, Vogel KM, Olsen CH, Miyazawa K, O'Connor DM. Discrepancy in the interpretation of cervical histology by gynecologic pathologists. *Obstet Gynecol.* 2002 Aug;100(2):277-80.
66. Ordi J, Garcia S, del Pino M, Landolfi S, Alonso I, Quinto L, et al. p16 INK4a immunostaining identifies occult CIN lesions in HPV-positive women. *Int J Gynecol Pathol.* 2009 Jan;28(1):90-7.
67. Shi J, Liu H, Wilkerson M, Huang Y, Meschter S, Dupree W, et al. Evaluation of p16INK4a, minichromosome maintenance protein 2, DNA topoisomerase IIalpha, ProEX C, and p16INK4a/ProEX C in cervical squamous intraepithelial lesions. *Hum Pathol.* 2007 Sep;38(9):1335-44.
68. Walts AE, Bose S. p16, Ki-67, and BD ProExC immunostaining: a practical approach for diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. *Hum Pathol.* 2009 Jul;40(7):957-64.
69. Lukaszuk K, Liss J, Gulczynski J, Nowaczyk M, Nakonieczny M, Piatkowski M, et al. Predictive value of HPV DNA in lymph nodes in surgically treated cervical carcinoma patients--a prospective study. *Gynecol Oncol.* 2007 Mar;104(3):721-6.
70. Ozgul N, Cil AP, Bozdayi G, Usbutun A, Bulbul D, Rota S, et al. Staining characteristics of p16INK4a: is there a correlation with lesion grade or high-risk human papilloma virus positivity? *J Obstet Gynaecol Res.* 2008 Oct;34(5):865-71.

71. Yildiz IZ, Usubutun A, Firat P, Ayhan A, Kucukali T. Efficiency of immunohistochemical p16 expression and HPV typing in cervical squamous intraepithelial lesion grading and review of the p16 literature. *Pathol Res Pract.* 2007;203(6):445-9.
72. Omori M, Hashi A, Nakazawa K, Yuminamochi T, Yamane T, Hirata S, et al. Estimation of prognoses for cervical intraepithelial neoplasia 2 by p16INK4a immunoexpression and high-risk HPV in situ hybridization signal types. *Am J Clin Pathol.* 2007 Aug;128(2):208-17.
73. Nam EJ, Kim JW, Kim SW, Kim YT, Kim JH, Yoon BS, et al. The expressions of the Rb pathway in cervical intraepithelial neoplasia; predictive and prognostic significance. *Gynecol Oncol.* 2007 Jan;104(1):207-11.
74. Iaconis L, Hyjek E, Ellenson LH, Pirog EC. p16 and Ki-67 immunostaining in atypical immature squamous metaplasia of the uterine cervix: correlation with human papillomavirus detection. *Arch Pathol Lab Med.* 2007 Sep;131(9):1343-9.
75. Hariri J, Oster A. The negative predictive value of p16INK4a to assess the outcome of cervical intraepithelial neoplasia 1 in the uterine cervix. *Int J Gynecol Pathol.* 2007 Jul;26(3):223-8.
76. Eleuterio Junior J, Giraldo PC, Cavalcante DI, Goncalves AK, Eleuterio RM. [Association between high risk HPV viral load, p16ink4a expression and intra-epithelial cervical lesions]. *Rev Assoc Med Bras.* 2007 Nov-Dec;53(6):530-4.
77. Bahnassy AA, Zekri AR, Saleh M, Lotayef M, Moneir M, Shawki O. The possible role of cell cycle regulators in multistep process of HPV-associated cervical carcinoma. *BMC Clin Pathol.* 2007;7:4.
78. Queiroz C, Silva TC, Alves VA, Villa LL, Costa MC, Travassos AG, et al. P16(INK4a) expression as a potential prognostic marker in cervical pre-neoplastic and neoplastic lesions. *Pathol Res Pract.* 2006;202(2):77-83.
79. Lambert AP, Anschau F, Schmitt VM. p16INK4A expression in cervical premalignant and malignant lesions. *Exp Mol Pathol.* 2006 Apr;80(2):192-6.
80. Ishikawa M, Fujii T, Saito M, Nindl I, Ono A, Kubushiro K, et al. Overexpression of p16 INK4a as an indicator for human papillomavirus oncogenic activity in cervical squamous neoplasia. *Int J Gynecol Cancer.* 2006 Jan-Feb;16(1):347-53.
81. Ekalaksananan T, Pientong C, Sriamporn S, Kongyingyoes B, Pengsa P, Kleebkaow P, et al. Usefulness of combining testing for p16 protein and human papillomavirus (HPV) in cervical carcinoma screening. *Gynecol Oncol.* 2006 Oct;103(1):62-6.
82. Bulten J, van der Avoort IA, Melchers WJ, Massuger LF, Grefte JM, Hanselaar AG, et al. p14ARF and p16INK4A, two products of the same gene, are differently expressed in cervical intraepithelial neoplasia. *Gynecol Oncol.* 2006 Jun;101(3):487-94.
83. Benevolo M, Mottolese M, Marandino F, Vocaturo G, Sindico R, Piperno G, et al. Immunohistochemical expression of p16(INK4a) is predictive of HR-HPV infection in cervical low-grade lesions. *Mod Pathol.* 2006 Mar;19(3):384-91.
84. Andersson S, Wangsa D, Flores-Staino C, Safari H, Mints M, Hjerpe A, et al. Expression of p16(INK4a) in relation to histopathology and viral load of 'high-risk' HPV types in cervical neoplastic lesions. *Eur J Cancer.* 2006 Nov;42(16):2815-20.
85. Qiao X, Bhuiya TA, Spitzer M. Differentiating high-grade cervical intraepithelial lesion from atrophy in postmenopausal women using Ki-67, cyclin E, and p16 immunohistochemical analysis. *J Low Genit Tract Dis.* 2005 Apr;9(2):100-7.
86. 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 Apr;97(1):35-40.
87. Lorenzato M, Caudroy S, Bronner C, Evrard G, Simon M, Durlach A, et al. Cell cycle and/or proliferation markers: what is the best method to discriminate cervical high-grade lesions? *Hum Pathol.* 2005 Oct;36(10):1101-7.

88. Lin Z, Gao M, Zhang X, Kim YS, Lee ES, Kim HK, et al. The hypermethylation and protein expression of p16 INK4A and DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase in various uterine cervical lesions. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2005 Jun;131(6):364-70.
89. Kim HJ, Kim MH, Song MH, Song DE, Yu E. [Immunohistochemical study of p53 mutation and p16, p14 alterations encoded by INK4a-ARF in mucin-hypersecreting bile duct tumor]. *Korean J Gastroenterol*. 2005 Mar;45(3):189-94.
90. Kalof AN, Evans MF, Simmons-Arnold L, Beatty BG, Cooper K. p16INK4A immunoexpression and HPV in situ hybridization signal patterns: potential markers of high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Surg Pathol*. 2005 May;29(5):674-9.
91. Yuan JR, Li Y, Hu SJ, Li P. [Methylation and aberrant expression of the p16 gene in cervical carcinoma]. *Yi Chuan*. 2005 Jan;27(1):39-43.
92. Dray M, Russell P, Dalrymple C, Wallman N, Angus G, Leong A, et al. p16(INK4a) as a complementary marker of high-grade intraepithelial lesions of the uterine cervix. I: Experience with squamous lesions in 189 consecutive cervical biopsies. *Pathology*. 2005 Apr;37(2):112-24.
93. Carozzi F, Confortini M, Dalla Palma P, Del Mistro A, Gillio-Tos A, De Marco L, et al. Use of p16-INK4A overexpression to increase the specificity of human papillomavirus testing: a nested substudy of the NTCC randomised controlled trial. *Lancet Oncol*. 2008 Oct;9(10):937-45.
94. 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 May;35(3):210-20.
95. Negri G, Vittadello F, Romano F, Kasal A, Rivasi F, Girlando S, et al. p16INK4a expression and progression risk of low-grade intraepithelial neoplasia of the cervix uteri. *Virchows Arch*. 2004 Dec;445(6):616-20.