

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZI ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

İNSAN PAPİLLOMA VİRÜSÜNÜN (HPV) SERVİKAL KANSER
GELİŞİMİ ÜZERİNDE OLUŞTURDUĞU GENETİK
DEĞİŞİKLİKLERİN FLORESAN IN SITU HİBRİDİZASYON (FISH)
YÖNTEMİYLE İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

AYŞE GİZEM GIRAN

DANIŞMAN

YRD.DOÇ. DR. BEYHAN DURAK ARAS

EYLÜL - 2009

**T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZI ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI**

**İNSAN PAPİLLOMA VİRÜSÜNÜN (HPV) SERVİKAL KANSER
GELİŞİMİ ÜZERİNDE OLUŞTURDUĞU GENETİK
DEĞİŞİKLİKLERİN FLORESAN IN SITU HİBRİDİZASYON (FISH)
YÖNTEMİYLE İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

AYŞE GİZEM GIRAN

DANIŞMAN

YRD.DOÇ. DR. BEYHAN DURAK ARAS

Proje no: 2008/11027

KABUL VE ONAY SAYFASI

Ayşe Gizem GIRAN' ın Yüksek Lisans Tezi olarak hazırladığı "*İnsan Papilloma Virüsünün (HPV) Servikal Kansere Gelişimi Üzerinde Oluşturduğu Genetik Değişikliklerin Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH) Yöntemiyle İncelenmesi*" başlıklı bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddesi uyarınca değerlendirilerek "**KABUL**" edilmiştir.

28.09.2009

Üye: Prof.Dr. Sevilhan ARTAN

Üye: Prof.Dr. Emine DÜNDAR

Üye: Doç.Dr. M.Hamza MÜSLÜMANOĞLU

Üye: Yrd.Doç.Dr. Muhsin ÖZDEMİR

Üye: Yrd.Doç.Dr. Beyhan DURAK ARAS (Danışman)

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 01./10./2009.. tarih ve 199./3728... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof.Dr.Ferruh YÜCEL
Enstitü Müdürü

ÖZET

Giriş: Serviks kanseri; vajina yüzeyini döşeyen dokuyla, serviksin iç yüzeyini döşeyen dokunun kesiştiği transformasyon zonu adı verilen yerde başlayan yassı epitel hücre karsinomudur. Serviks kanseri tüm dünyada kadınlarda kansere bağlı ölümler arasında ikinci sırada yer alır. Epidemiyolojik çalışmalar, serviks kanseri için primer risk faktörünün insan papilloma virüsü (HPV) enfeksiyonu olduğunu göstermektedir.

Amaç: Çalışmamızın amacı, preinvaziv lezyon aşamaları (CIN sınıflandırması) tespit edilen ve HPV tiplendirmesi yapılan 50 hasta (HPV+) ve 10 kontrol (HPV -) olgusuna ait sıvı bazlı sitolojik örneklerle (thin prep) FISH yöntemi kullanılarak, hastalıkla ilişkilendirilmiş ve literatürde daha önce tanımlanan olan 3q26 (TERC) ve 8q24.1 (C-MYC) bölgesindeki amplifikasyonları ve 7. kromozomun anöploidileri incelemektir. Ayrıca literatürde yayınlanan diğer çalışmalarla karşılaştırarak, saptanan anomalilerin, hastalığın premalign evrelerinin takibinde tarama yöntemleri ile birlikte kullanılabilirliğini incelemektir.

Gereç-Yöntem: HPV enfeksiyonu saptanmış, preinvaziv servikal lezyon aşamaları tespit edilen 50 olgu ve 10 kontrol grubundan alınan thin prep pap smear örneği FISH analizi ile değerlendirilmiştir. FISH analizi ile 3q26 ve 8q24 bölgelerindeki amplifikasyonlar ve 7. kromozomun sayısal anomalileri incelenmiştir.

Bulgular: Olguların %28 inde (14/50) FISH analizi ile en az bir anomali gözlenmiştir. Olguların % 22 sinde (11/50) C-MYC amplifikasyonu görülmüştür. C-MYC amplifikasyonu gözlenen olguların 4 ünde TERC amplifikasyonu da görülmüştür. Olguların %6 sında (3/50) trizomi 7 tespit edilmiştir. Anomali görülen olguların %85.7 sinin (12/14) yüksek riskli HPV ile, %14.3 ünün (2/14) düşük riskli HPV ile enfekte olduğu gözlenmiştir.

Sonuç ve tartışma: En sık saptadığımız anomali C-MYC gen amplifikasyonudur (%22). C-MYC amplifikasyonlarının % 81.8 i yüksek riskli HPV tiplerinde görülmüştür ve literatür ile uyumludur (P<0.05). Çalışmamızda anomalili olguların %85.7 sinin yüksek riskli HPV ile enfekte olması (P=0,020), kromozom anomalilerinin tespitinin en az HPV tip belirlenmesi kadar hastalığın takibinde önemli olduğunu göstermiştir. Çalışmamız Türk popülasyonunda bu konuda yapılmış ilk ve tek çalışma olma özelliğini taşımaktadır.

Anahtar kelimeler: Servikal Kanser, HPV, FISH

SUMMARY

Background: Cervix carcinoma is formed at transformation zone which is the interception area of vagina surface tissue and inner surface tissue of the cervix. All over the world, cervical cancer is the second cause of death among the women. Studies that have been done are indicated that human papillomavirus (HPV) infection is the primer reason of the cervix cancer.

Aim: In our study to observe preinvasive lesion stages (CIN classification) diagnosed and HPV types done 50 cases and 10 control groups. Liquid based cytologic specimens (thin prep) are going to be observed based on the amplification in 3q26 (TERC) and 8q24.1 (C-MYC) area and the trisomy of the 7th chromosome, which are determined in literature before, by FISH technique. Also these obtain data is going to be compared with the previously printed studies and use following the premalign lesions with the scanning method will be investigated.

Methods: HPV infected (+) and preinvasive cervical lesions stages diagnosis 50 cases and 10 control thin prep pap smear specimens were determined by FISH analysis. amplification in 3q26 and 8q24 area and numerical abnormality of the chromosome 7 were examined by FISH analysis.

Results: Twenty-eight percent (14/50) of the patients were positive for at least one abnormality by FISH. C-MYC amplification were detected in %22 (11/50) of cases. Four of cases showed co-amplification C-MYC and TERC. Trisomy of 7 were detected in %6 (3/50) of cases. %85.7 (12/14) of cases abnormality detected infected with high risk HPV and %14.3 (2/14) of cases abnormality detected infected with low risk HPV were observed.

Conclusion: C-MYC gene amplification was the most frequent abnormality among our patients. %81.8 of C-MYC amplification was detected with high risk HPV types and consistent with the previous literature ($P < 0,05$). %85.7 of with abnormality cases infected with high risk HPV ($P = 0,020$), chromosome abnormality at least HPV type indicate important role of prognosis. Our study is important due to being the first study and unique at this topic in Turkish population.

Keyword: Cervical Cancer, HPV, FISH

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	v
SUMMARY	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar DİZİNİ	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Kanser Nedir?.....	2
2.2. Kanserin Gelişimi.....	2
2.3. Kanser ve Genetik.....	3
2.3.1. Tümör Baskılayıcı Genler.....	3
2.3.2. DNA Tamir Genleri.....	4
2.3.3. Onkogenler.....	4
2.3.3.1. Kromozomal Translokasyonlar.....	5
2.3.3.2. Gen Amplifikasyonları	6
2.4. Telomeraz ve Kanser	7
2.4.1. Telomeraz ve Yapısı	7
2.4.2. Telomeraz Enziminin Kanser Mekanizmasındaki Rolü.....	8
2.5. Virüs-Kanser ilişkisi	9
2.5.1. Kansere Neden Olan Virüsler.....	9

2.5.1.1. İnsan Papilloma Virüsü (HPV).....	11
2.5.1.1.1. HPV nin Yapısı	11
2.5.1.1.2. HPV Tipleri	13
2.5.1.1.3. HPV Hücreyi Nasıl Enfekte Eder?.....	13
2.5.1.1.4. Servikal Kansere HPV Epidemiyolojisi	14
2.6. Servikal Kansere	15
2.6.1. Serviks Anatomisi	16
2.6.2. Serviks Histolojisi	16
2.6.3. Premalign Lezyonlar	17
2.6.3.1. Sınıflandırma Şekilleri	17
2.6.3.1.1. CIN Sınıflandırması	17
2.6.3.1.2. Bethesda Sistemi	18
2.6.4. Servikal Kansere Neden Olan Diğer Risk Faktörleri	20
2.6.5. Belirtileri	21
2.6.6. Papanicolau (PAP) Smear Uygulaması	21
2.6.7. HPV-DNA Testi	22
2.6.8. Kolposkopi	22
2.6.9. Tedavi ve İyileşme Şansı	22
2.6.10. HPV Aşısı	23
2.6.11. Servikal Kansere ve Genetik	23
2.6.11.1. Servikal Kansere- TERC Aberasyonu	24
2.6.11.2. Servikal Kansere- Onkogen Aktivasyonu.....	24
2.6.11.3. Sayısal Aberasyonlar.....	25
2.7. Floresan In Situ Hibridizasyon.....	26

2.7.1. FISH Tekniğinde Kullanılan Problar ve Özellikleri	26
2.7.2. FISH Tekniğinin Temel Mekanizması	27
3.GEREÇ ve YÖNTEMLER	29
3.1.Gereç	29
3.1.1. Araştırma Grubu Bireyleri	29
3.1.2. Kullanılan Araçlar	29
3.1.2.1. Kullanılan Aygıtlar	29
3.1.2.2. Cam Malzemeler	30
3.1.3. Kimyasal Maddeler	30
3.1.4. Kullanılan Problar	31
3.2. Yöntem	31
3.2.1. Materyal Alımı	31
3.2.2. Moleküler Sitogenetik Analiz	31
3.2.2.1. FISH Tekniğinin Uygulanması	32
3.2.2.1.1. Preparatların ön yıkaması ve denatürasyonu.	32
3.2.2.1.2. Prob Denatürasyonu	33
3.2.2.1.3. Hibridizasyon	33
3.2.2.1.4. Hibridizasyon sonrası yıkamalar	33
3.2.2.1.5. Hibridize olan bölgelerin görüntülenmesi ...	34
3.2.2.1.6. Preparatların mikroskopta incelenmesi	34
3.2.2.1.7. Değerlendirme	34
3.3. Kullanılan Stok Solüsyonlar.....	35
3.4. İstatistik Analiz.....	38

4.BULGULAR	39
4.1. Yöntem ve Değerlendirmeye İlişkin Bulgular	41
4.2. Preinvaziv Lezyon Aşamaları Tespit Edilen ve HPV Tiplendirmesi Yapılan Olguların FISH Analiz Bulguları	45
4.2.1. TERC Gen Bölgesine Ait Aberasyonlar	45
4.2.2. C-MYC Gen Bölgesine Ait Aberasyonlar	46
4.2.3. 7. Kromozom Aberasyonu	46
4.2.4. TERC (3q26), C-MYC (8q24.1) Gen Amplifikasyonları ve Kromozom 7 Aberasyonları ile HPV Tipleri Arasındaki İlişki	49
4.3. Çalışmaya İlişkin İstatistik Verileri.....	51
5.TARTIŞMA	53
5.1. Yöntem ve Değerlendirmeye İlişkin Karşılaştırmalar	53
5.2. FISH Yöntemi ile Saptanan Anomalilerle Literatür Bilgilerinin Karşılaştırılması.....	57
5.2.1. TERC Gen Amplifikasyonunun FISH Yöntemi Sonuçları ile Literatür Bilgilerinin Karşılaştırılması.....	57
5.2.2. TERC ve C-MYC Genlerinin FISH Yöntemi Sonuçları ile Her İki Genin Beraber Çalışıldığı Literatür Bilgilerinin Karşılaştırılması.....	62
5.2.3. C-MYC Gen Amplifikasyonlarının FISH Yöntemi Sonuçları İle Literatür Bilgilerinin Karşılaştırılması	63
5.2.4. Kromozom 7 nin FISH Yöntemi Sonuçları İle Literatür Bilgilerinin Karşılaştırılması	65
5.3. HPV Enfeksiyonu ile Saptanan Anomalilerin Literatür Bilgileriyle Karşılaştırılması.....	68
5.3.1. TERC Gen Amplifikasyonu ile HPV Enfeksiyonu Arasındaki İlişkinin Literatür Bilgileriyle Karşılaştırılması.....	68

5.3.2. C-MYC Gen Amplifikasyonu ile HPV Enfeksiyonu Arasındaki İlişkinin Literatür Bilgileriyle Karşılaştırılması.....	70
5.3.3. TERC ve C-MYC Gen Amplifikasyonu ile HPV Enfeksiyonu Arasındaki İlişkinin Literatür Bilgileriyle Karşılaştırılması.....	71
5.3.4. Kromozom 7 ile HPV Enfeksiyonu Arasındaki İlişkinin Literatür Bilgileriyle Karşılaştırılması.....	72
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	73
7. KAYNAKLAR	75

ÖZGEÇMİŞ

TABLolar DİZİNİ

Tablo	Sayfa
Tablo 2.1. Risk oluşturma potansiyellerine göre HPV tipleri.....	13
Tablo 3.1. Carnoy's fiksatif solüsyonu.....	35
Tablo 3.2. n yıkama solüsyonları.....	35
Tablo 3.3. Denatürasyon solüsyonları.....	36
Tablo 3.4. Hibridizasyon sonrası solüsyonlar.....	36
Tablo 3.5. Görüntüleme sistemleri solüsyonları.....	37
Tablo 4.1. Yaş, CIN sınıflandırması ve HPV tipine ait bilgileri.....	40
Tablo 4.2. Değerlendirilen genetik parametrelerin sıklığı.....	45
Tablo 4.3. FISH analiz sonuçları.....	47
Tablo 4.4. Görülen anomalilerle HPV tipleri arasındaki ilişki.....	50
Tablo 4.5. Hasta ve kontrol gruplarının karşılaştırılması.....	51
Tablo 4.6. TERC ve C-MYC gen amplifikasyonları ve 7.kromozomun trizomisinin preinvaziv lezyonlara göre dağılımı.....	52
Tablo 4.7. TERC ve C-MYC gen amplifikasyonları ve 7.kromozomun trizomisinin HPV risk tiplerine göre dağılımı.....	52
Tablo 5.1. TERC ve C-MYC gen amplifikasyonları ve trizomi 7 sonuçlarının literatür verileri ile karşılaştırılması.....	57

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Tüm dünyada HPV enfeksiyonuyla meydana gelen kanser türleri...	10
Şekil 2.2. HPV genomu.....	12
Şekil 2.3. Uterus ve kısımları.....	16
Şekil 2.4. Servikal kanser oluşumunda HPV ye bağlı pre-invaziv aşamalar.....	19
Şekil 4.1. Normal hücrelere sahip 7 numaralı olgunun FISH görüntüsü.....	42
Şekil 4.2. Trizomi 7 tespit edilen 30 numaralı olgunu FISH görüntüsü.....	42
Şekil 4.3. Trizomi 7 tespit edilen 13 numaralı olgunun FISH görüntüsü.....	43
Şekil 4.4. TERC ve C-MYC gen amplifikasyonları görülen 11 numaralı olgunun FISH görüntüsü.....	43
Şekil 4.5. TERC ve C-MYC gen amplifikasyonları görülen 31 numaralı olgunun FISH görüntüsü	44
Şekil 4.6. C-MYC gen amplifikasyonu görülen 33 numaralı olgunun FISH görüntüsü.....	44

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
ACOG	Amerikan Obstetrik ve Jinekoloji Koleji
ACS	Amerikan Kanser Derneği
ASC-H	Ekarte Edilemeyen Yüksek Riskli Skuamöz Intraepitelyal Lezyon
ASCUS	Atipik Skuamöz Intraepitelyal Lezyon
ATP	Adenin Tri Fosfat
bp	Baz Çifti
CEP	Sentromer Probu
CGH	Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon
CIN	Servikal Intraepitelyal Neoplazi
DAPI	4',6'-diamino-2-fenilindol
DM	Double-Minute Kromozom
DNA	Deoksiribonükleik Asit
ENV	Zarf Proteini
ERB-B	Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FISH	Floresan In Situ Hibridizasyon
GAG	Grup-Spesifik Antijen
Gr	Gram
HCL	Hidroklorik Asit
HIV	İnsan Bağışıklık Yetmezlik Virüsü
HPV	İnsan Papilloma Virüsü
HSIL	Yüksek Riskli Intraepitelyal Lezyon
HSR	Homojen Olarak Boya Alan Bölgeler
IHK	İmmünohistokimyasal
ISH	In Situ Hibridizasyon
kb	Kilobaz

KRF 1	Keratinositik Spesifik Transkripsiyon Faktörü
LCR	Uzun Kontrol Bölgesi
LSIL	Düşük Riskli Intraepitelyal Lezyon
M	Molar
mCA	Mikro-Invaziv Karsinoma
ml	Mililitre
µl	Mikrolitre
MYC	Myelositomatozis
NaOH	Sodyum Hidroksit
NCI	Ulusal Kanser Enstitüsü
Nm	Nanometre
PAP	Papanicolaou
POL	Polimeraz Ters Transkriptaz
Rb	Retinoblastoma
RNA	Ribonükleik Asit
SCC	Skvamöz Servikal Karsinoma
SSC	NaCl ₇ Trisodyum Sitrata
TEP 1	İnsan Telomerazı Protein Komponenti
TERC	İnsan Telomerazı RNA Komponenti
TERT	İnsan Telomerazı Revers Transkriptazı
URR	Yüksek Regülatör Bölge
VLP	Virüs Benzeri Partikül

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Servikal kanser dünyada kadınlar arasında 3. sıklıkta görülen jinekolojik tümördür (38). Kadınlarda kansere bağlı ölümler arasında ise 2. sırada yer almaktadır (2). Görülme yaşı 20-80 yaş gibi geniş bir aralığa sahiptir (56).

Hastalık invaziv aşamaya gelmeden önce premalign lezyon (CIN I, CIN II, CIN III) aşamalarından geçtiği bilinmektedir. CIN I spontan olarak gerileyebilmekte, çok az bir kısmı CIN II ve CIN III e ilerlemektedir. Yaklaşık % 10-20 CIN II-III premalign lezyonun invaziv kansere dönüştüğü tahmin edilmektedir (29).

İnsan papilloma virüsü (HPV), servikal kanser karsinogenezinde en önemli etiyojik faktördür. Özellikle HPV 16 ve 18 yüksek riskli onkogenik tipler olarak bilinmektedir (24). İnsan papilloma virüsleri değişik dokularda epitel hücreleri enfekte eder. Bunlardan bazıları siğil şeklinde iyi huylu tümörleri oluştururken, bazıları başta serviks kanseri olmak üzere pek çok anogenital kansere neden olurlar (44).

Servikal kanser gelişiminde görülen genetik değişiklikler, HPV enfeksiyonunun yanında spesifik kromozom anomalilerinin de bulunabildiğini göstermektedir (27). Servikal kanserde en sık tekrarlayan yapısal anomaliler TERC gen (3q26) ve C-MYC gen (8q24) amplifikasyonlarıdır. Bazı kromozomların trizomileri (7.ve1. kromozomlar) de bildirilmektedir (13,15,19,27,29,57). Ayrıca 3, 6, 11, 17. kromozomlara ait trizomi ve polizomiler bulunmuştur (13).

Çalışmamızda FISH yöntemi kullanılarak, genomik değişiklikler incelenmiştir. Ayrıca literatürde yayınlanan diğer çalışmalarla karşılaştırarak saptanan anomalilerin, hastalığın premalign evrelerinin takibinde, tarama yöntemleri ile birlikte kullanılabilirliği incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser nedir?

Kanser, hücrenin çoğalması, farklılaşması, sağkalımı ve ölüm gibi normal işlevini düzenleyen mekanizmanın kaybolup, kendi kendine kontrolsüz bir şekilde çoğalmasıyla meydana gelir. Batı toplumunda her yıl yaklaşık 300 kişiden biri kansere yakalanmaktadır. Ülkemizde kesin istatistikler bulunmamaktadır ancak insidansın bunun yarısı kadar olduğu tahmin edilmektedir (21).

2.2. Kanserin gelişimi

Kanser çok aşamalı bir olaydır. Hücrelerin birbirini izleyen bir dizi değişiklik sonucu malign hale dönüşmesiyle meydana gelmektedir.

Kanser patolojisinde benign ve malign tümörleri birbirinden ayırmak çok önemlidir. Benign tümörler, çevresindeki doku ve organlara yayılmazken, malign tümörler hem çevredeki doku ve organlara hem de vücudun diğer bölgelerine yayılmaktadırlar (21).

Orijin alan hücre tipine göre kanserler üç gruba ayrılır:

- 1- Karsinomlar: Bağırsak mukozası, bronşlar veya meme duktusları gibi epitel hücrelerinden kaynaklanırlar. İnsan kanserlerinin %90'ını oluştururlar (21,52).
- 2- Sarkomlar: Kemik, kas ya da konnektif doku gibi mezenşimal dokulardan kaynaklanırlar (21,52).
- 3- Hematopoetik: Kemik iliği, lenfatik sistem ve periferik kan boyunca yayılan lösemi ve lenfomalardır. İnsan kanserlerinin yaklaşık %7'sini oluştururlar (52).

2.3. Kanser ve Genetik

Hücre bölünmesini, farklılaşmasını ve apoptozu kontrol eden genler bulunmaktadır. Bu genlerde meydana gelen mutasyonlar kansere neden olmaktadır. Mutasyonlar tek bir somatik hücrede oluşup daha sonra çoğalarak kansere neden olurlar (52).

Kansere neden olan genler;

1-Tümör Baskılayıcı Genler

2-DNA Tamir Genleri

3-Onkogenler (21,74)

2.3.1. Tümör Baskılayıcı Genler

Tümör baskılayıcı genler normal koşullarda hücre çoğalmasını ve tümör gelişimini baskılar. Bir çok tümörde bu genler hasar görür ya da inaktive olur. Dolayısıyla hücre çoğalmasını negatif yönde düzenleyen etki kaybolur ve tümör hücreleri anormal olarak çoğalmaya başlar (21).

İlk tümör baskılayıcı gen retinoblastomun (RB) incelenmesiyle tanımlanmıştır. Alfred Knudson 1971 yılında retinoblastom gelişmesi için iki mutasyonun gerekli olduğunu öne sürmüştür. Yani normal bir diploid hücredeki homolog kromozomlarda bulunan RB geninin iki sağlam kopyasının da ortadan kalkması gerektiğini belirtmiştir.

İkinci olarak tanımlanan tümör baskılayıcı gen P53 tür. Lösemi, lenfoma, sarkom ve beyin tümörleri ile meme, barsak ve akciğer karsinomlarında sıklıkla işlevini kaybetmektedir (21).

2.3.2. DNA Tamir Genleri

DNA birçok çeşitli kimyasal reaksiyonlardan geçer. DNA hücre genomunun kalıcı kopyası olduğu için yapısındaki değişiklikler, diğer hücre komponentleri olan RNA ya da proteinlere göre çok daha önemli sonuçlara neden olur. Başkalaşım, DNA replikasyonu sırasında yanlış bazların DNA ya katılması nedeniyle oluşur. Ayrıca DNA da spontan veya kimyasal ajanlara, radyasyona maruz kalma durumunda da çeşitli kimyasal değişiklikler ortaya çıkar. Hücre genomunun bütünlüğünün korunabilmesi için hücreler harap olan DNA'yı tamir etmek için mekanizmalar geliştirmek durumundadırlar. Bu DNA tamir mekanizmaları iki ana gruba ayrılır:

1. DNA hasarından sorumlu kimyasal reaksiyonun direkt olarak önlenmesi
2. Hasar olan bazların DNA'dan çıkarılması (21,52).

DNA tamir genlerinde meydana gelen mutasyonlar, diğer hücresel genlerde artmış mutasyon sıklığına neden olmakta ve bu mutasyonlardan bazıları, hücre proliferasyonunu denetleyen genleri etkilemekte ve de kansere dönüşümü hızlandırmaktadır (21).

2.3.3. Onkogenler

Onkogenler ilk kez yüksek derecede onkojenik virüslerin izolasyonu sonucu elde edilmiştir. Retroviral onkogenlerin oluşmasına öncülük eden hücresel genlere 'protoonkogen' adı verilmiştir. Onkogenler yine tümör virüsleri ile yapılan çalışmalar da, hücreleri transforme edebildikleri gösterilerek, kanserin moleküler temelleri hakkında ilk bulguların ortaya konmasını sağlamışlardır.

Protoonkogenler, genellikle hücrenin normal siklusunu denetleyen sinyal yollarında rol alan genlerdir. Onkogenler ise protoonkogenlerin mutant formlarıdır. Normal hücresel proteinlere göre yapısal ve işlevsel açıdan değişiklik gösteren

proteinler kodlarlar. Hücre bölünmesi ya da proliferasyonunu uyararak tümör oluşumuna neden olurlar (21).

Protoonkogenler sinyal iletiminde üç noktada görev alır:

- 1- GDP/GTP döngüsünde rol alır. Örn: RAS ailesi protoonkogenleri
- 2- ATP nin fosfat grubunun transferi ile proteinlerin serin, treonin ve tirozin aminoasitlerinin fosforillenmesini ve protein konfigürasyonunu düzenler. Ayrıca protein kinaz özelliğini aktive eden ve sinyal iletiminde rol alan proteinlerin bağlanmasını sağlar. Örn: Epidermal büyüme faktör ailesi protoonkogenleri
- 3-Gen ekspresyonu, DNA replikasyonu ve hücre döngüsünü kontrol eder. Örn: Nükleus içindeki proteinler (55).

Onkogen proteinlerinin çoğu büyüme faktörlerinden gelen uyarılar doğrultusunda hareket ederler. Hücre çoğalmasını ve sağkalımını denetleyen sinyal yollarında görev alırlar.

İnsan tümörlerinde en sık bulunan nükleer onkogen MYC genidir. Normal hücrelerde MYC proteini mitojenik uyarılara bağlı sinyal yollarında görev yapan bir transkripsiyon faktörüdür. Büyüme faktörleri tarafından kontrol edilir. Özellikle hücre çoğalması ve farklılaşmasından sorumludur (20,21). Bu genin aktivasyonu bazı yollarla insan kanserlerine neden olmaktadır.

2.3.3.1. Kromozomal translokasyonlar

Kromozomal translokasyonu sonucu onkogen aktivasyonuna ilişkin tanımlanmış ilk örnek C-MYC genidir (21). Burkitt lenfomalarında 8. kromozomun bir parçası translokasyon sonucu 2,14 ya da 21. kromozom üzerindeki immünglobulin lokuslarından birine taşınır. Sekizinci kromozomun kırılma noktasında C-MYC onkogeninin yer aldığı görülmüştür. Bu genin kontrolsüz ekspresyonu hücreyi sürekli çoğalmaya iter ve tümör oluşumuna neden olur (20,21).

2.3.3.2. Gen Amplifikasyonları

Gen amplifikasyonları, insan tümörlerinde onkogen aktivasyonuna neden olan bir mekanizmadır. Gen amplifikasyonu, genlerin hızlı ve aşırı eksprese olmasına neden olur. Amplifiye genler tümör hücrelerinde normal hücrelere göre bin kat fazla görülmektedir. Onkogen amplifikasyonu, birçok tümörün daha hızlı gelişmesine ve malign özellik kazanmasına neden olur.

Genellikle homojen olarak boya alan bölgeler (HSR) ya da double-minute (DM) olarak bilinen kromozomlar karyotipik bozukluklara neden olurlar. Double-minute kromozomlar sentromer içeren veya içermeyen minik kromozom kırıklarındır. Homojen olarak boya alan bölgeler ise kromozom üzerinde koyu ve açık boyanan bantların normal görüntüsünden farklı olan kromozom segmentleridir. Homojen olarak boya alan bölgelerin (HSR) ve double-minute kromozomların (DM), genin birkaç binden fazla kopya sayısında genomik DNA bölgeleri içerdiği gösterilmiştir (46,55).

Pek çok solid tümörde ve çeşitli insan kanserlerinin hücre hatlarında C-MYC geninin amplifiye olduğu tespit edilmiştir. Yapılan bazı çalışmalarda pek çok epitel karsinomda gen amplifikasyonunun C-MYC geninin aşırı ekspresyonuna dayandığı tespit edilmiştir. Proteinin aşırı ekspresyonu sıklıkla daha agresif tümörlerde görülmekle birlikte premalign lezyonlarda da tespit edilmiştir (62).

Meme kanserinde %80, kolon kanserinde %70 ve jinekolojik kanserlerde ise % 90 C-MYC gen amplifikasyonu görülmektedir (20).

Onkogen amplifikasyonunun en bilinen örneklerinden biri de nöroblastomlarda görülen N-MYC genidir. Tümör hücrelerinde N-MYC geninin kopya sayısında artış gözlemlendiği bildirilmiştir (21).

2.4. Telomeraz ve Kanser

Kromozom uçlarında yer alan yapılara telomer adı verilmektedir. Telomerler heterokromatik yapılardır. İlk defa 1938 yılında Müller tarafından keşfedilmiştir. Kromozom stabilitesinde, nükleer yapılaşma, gen ekspresyonunda, hücre bölünmesinde, yaşlanma ve tümör oluşumunda rol oynamaktadırlar.

Telomerik DNA, hücre siklusuna bağlı olarak kaybolur ve daha sonra yeniden kazanılır. Bu olaya “Telomer Dinamiği” denir. Bu özellik telomeri kromozomun diğer kısımlarından farklı kılmaktadır. Her hücre siklusunda kaybedilen telomerik DNA miktarı yeni sentezlenen DNA miktarından fazladır. Dolayısıyla hücre her siklusta terminal uçtan bir miktar DNA kaybetmektedir. Bu kısalmalar hücresel yaşlanmaya yol açmaktadır. Bu hipotez ilk kez 1973 te Olovnikov tarafından ileri sürülmüştür (18).

2.4.1. Telomeraz ve Yapısı

İnsanda telomeraz aktivitesi, ilk kez servikal kanser hücre hattı olan HeLa da saptanmıştır (11).

Telomeraz, ribonükleoprotein yapıda özel bir DNA polimerazdır. Kendi RNA sını kalıp olarak kullanarak sentezlediği heksomerik parçaları kromozom uçlarına ekler, kromozomal uçlardaki kaybı dengeler. Telomeraz enzimini diğer reverse transkriptazlardan ayıran en önemli özelliği kendi RNA alt birimini (TERC/hTR) kalıp olarak kullanmasıdır. Telomeraz erişkin kök hücrelerinde ve embriyonik hücrelerde aktiftir. Normal somatik hücrelerde görülmez ancak kanser hücrelerinde tekrar aktif hale geçer (18).

İnsan telomeraz enzimi üç alt birime ayrılır:

1- TERC / hTR (İnsan Telomerazı RNA Komponenti): Üçüncü kromozomun uzun kolunda (3q26.3) bulunmaktadır. Telomer DNA sına komplementer olan 8-30

bazlık bir bölümünü sentezde kalıp olarak kullanır. İlk kez 1995 te Fengue ve ark (65) tarafından klonlanmıştır. İnsan Telomerazı RNA Komponentinin mRNA ekspresyonuna hem kanserli hem de normal dokularda rastlanmaktadır.

2- hTERT / hTRT (İnsan Telomerazı Revers Transkriptazı) : İnsan Telomerazı Revers Transkriptazını kodlayan gen ilk kez 1997 de klonlanmıştır. Yedi ekson içerir. Telomeraz aktivitesi regülasyonundan sorumlu olduğu düşünülmektedir.

3- TEP1 / TP1 (İnsan Telomerazı Protein Komponenti): Telomeraz kompleksinin düzenleyici komponentidir. Telomerazın RNA alt birimine bağlanır. Enzimatik aktivitenin regülasyonundan sorumlu olduğu düşünülmektedir (18).

2.4.2. Telomeraz Enziminin Kanser Mekanizmasındaki Rolü

İnsanlarda görülen hücrel yaşlanmada M1 (mortalite evresi1) ve M2 (mortalite evresi 2) olmak üzere iki evre bulunmaktadır. Telomerlerde belirgin bir kısalma olduktan sonra M1 evresi başlar. Bu durum P53 ve PRB tümör baskılayıcı proteinler tarafından kontrol edilir. Ancak bu proteinleri inaktif hale getiren E6 gibi viral onkoproteinler, telomerik erozyonun tanınmamasına neden olur. Dolayısıyla bu hücreler M2 evresine geçer (18).

Telomerazın tekrar aktive olduğu hücreler M2 den kaçarak ölümsüz hale gelir. Kromozomal kırılmalara ve füzyonlara yatkın hale gelerek onkogen aktivasyonuna neden olurlar. Sonuçta premalign hücrelerin invaziv kansere dönüşümünü hızlandırır. Şimdiye kadar incelenen farklı tip tümörlerin %85 inden fazlasında telomeraz aktivitesi tespit edilmiştir. Bu da ölümsüz tümör hücrelerinde telomerazın yeniden aktive olduğunu göstermektedir (18).

2.5. Virüs- Kanser İlişkisi

Tümör gelişimi çok aşamalı bir süreçtir. Dolayısıyla birçok faktör kanser oluşumuna neden olabilmektedir. Bu etkenlerden birisi virüslerdir. Virüsler gerek hayvanlarda gerekse insanlarda tümör oluşturabilmektedir. Virüslerin neden olduğu kanserlerden en önemlileri karaciğer ve serviks kanseridir. Bu iki kanser türü dünyada görülen kanserlerin % 10-20 sini oluşturmaktadır (21).

Tümör virüsleri, onkogeneizde genellikle ko-faktör olarak rol oynamaktadırlar. Hücrelerin kanserleşmesinde genetik değişikliklerden sorumludurlar. Bulundurdukları stimülatör / inhibitör genlerle ya da hücrede bulunan benzer genlerin ekspresyonunu değiştirerek kansere neden olmaktadır (44).

2.5.1. Kansere Neden Olan Virüsler

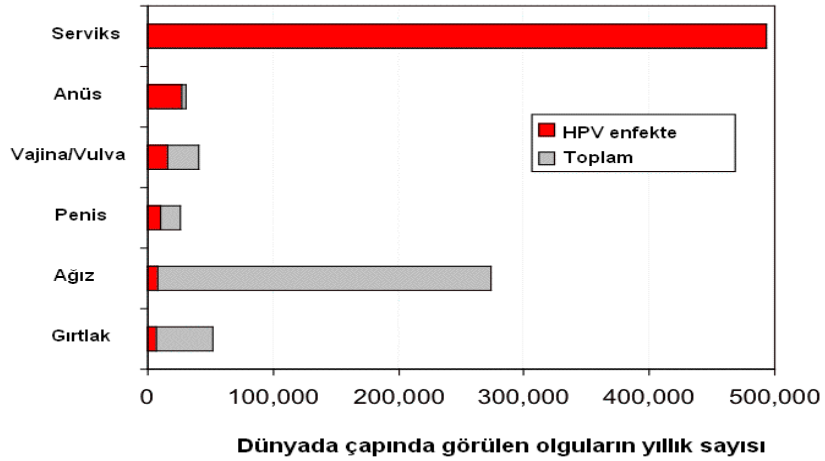
a) Hepatit B ve C Virüsleri: Hepatit B virüsü yaklaşık 3 kb lık genoma sahiptir. Bir çok canlı türünde karaciğer hücrelerini enfekte eder. Hepatit C virüsü ise 10 kb lık RNA virüsleridir. Her ikisinin de etkisiyle kronik doku hasarı ortaya çıkar ve hücreler sürekli çoğalarak kansere neden olur.

b) Adenovirüsler: Genom boyutları yaklaşık 35 kb olan DNA virüsleridir. Adenovirüsler, doğal insan ve hayvan kanserleri ile ilişkili değildirler. Ancak konak hücreleri enfekte eder ve başta RB ve P53 tümör baskılayıcı genlerin işlevini bozarak sinyal iletim sistemini etkileyip transformasyona neden olurlar.

c) Herpesvirüsler: Genomları 100-200 kb arası değişmektedir. Genom yapısı oldukça karmaşıktır. Bu nedenle replikasyon mekanizmaları ve transformasyona nasıl yol açtıkları tam olarak bilinmemektedir. Herpesvirüs ailesinin iki üyesi olan kaposi-sarkomu ilişkili herpesvirüs ve Epstein-Barr virüsleri insan kanserlerine neden olmaktadır.

d) Retrovirüsler: İnsan ve diğer canlılarda tümör oluşturabilirler. İnsan bağışıklık yetmezlik virüsü (HIV) retrovirüs ailesinin bir üyesidir. Retrovirüslerin onkogen aktivasyonları türlerine göre değişiklik gösterir. Çoğu retrovirüste, virüs replikasyonu için gerekli olan ancak transformasyonda bulunmayan gag, pol ve env genleri bulunur. Bazılarında ise hücre transformasyonuna ve kansere neden olan belirli genler bulunmaktadır (21).

e) Papilloma Virüsler: İnsanda ve diğer canlılarda benign ve malign tümörler oluştururlar (21). Bugüne kadar 100 den fazla tipi tanımlanmıştır (24,44). İnsan papilloma virüsleri değişik dokularda epitel hücreleri enfekte eder. Bunlardan bazıları siğil şeklinde iyi huylu tümörleri oluştururken, bazıları başta serviks kanseri olmak üzere pek çok anogenital kansere neden olmaktadır (21,44).



Şekil 2.1. Tüm Dünyada HPV enfeksiyonuyla meydana gelen kanser türleri (<http://tr.wikipedia.org> sitesinden modifiye edilerek alınmıştır).

2.5.1.1. İnsan Papilloma Virüsü (HPV)

İnsan papilloma virüsü (HPV), genital bölge ve mukoza enfeksiyonları yapan, “condyloma acuminatum” adı verilen siğil şeklinde kitlelerin oluşumuna neden olan ve servikal kanserle ilişkili olduğu saptanmış bir virüstür (33).

2.5.1.1.1. HPV Yapısı

İnsan papilloma virüsü; küçük, zarfsız, 72 kapsomerli, kapsüllü, 45-50 nm boyutlarında, 6.500-8000 bp lik bir DNA virüsüdür (26,44,63).

HPV genomu fonksiyonel olarak 3 bölgeye ayrılmaktadır:

Long Control Region (LCR) ya da Upper Regulatory Region (URR) Bölgesi:

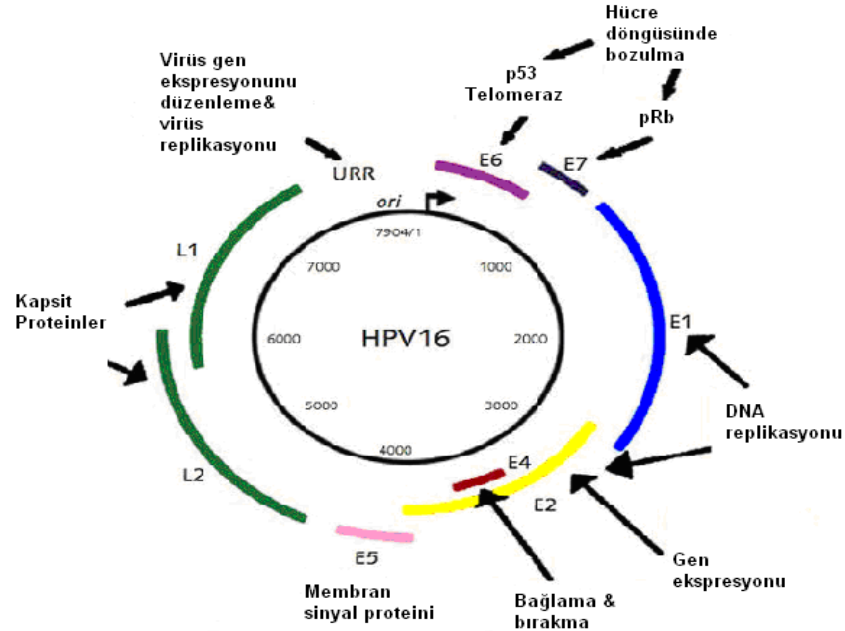
Genomun yaklaşık 400-1000 bp lik kısmını kapsar (61). Viral DNA replikasyonunu regüle eder. Erken bölge genlerinin transkripsiyonunun yapıldığı bölgedir (61). LCR bölgesi tam olarak aydınlanmamıştır ancak keratinositik spesifik transkripsiyon faktör (KRF1) ve aktivatör rol oynamaktadır (44,61).

Erken Bölge: Erken bölgede E1, E2, E3, E4, E5, E6 ve E7 olmak üzere yedi açık okuma çerçevesi proteini bulunmaktadır. Bu proteinler, virüsün erken yaşam döngüsünde çok önemlidirler. Bu bölgede bulunan genler, viral genomun, konak genomla yeni viral DNA oluşturmak üzere ilişkisini sağlayan proteinlerin transkripsiyonundan sorumludurlar. Erken bölge genleri, viral replikasyon işlemini kontrol eder. Ayrıca, bu bölgede bulunan E6 ve E7 genleri normal hücrelerin neoplastik hücrelere dönüşümüne neden olan proteinleri kodlamaktadırlar (61).

Geç Bölge: Bu bölgede L1 ve L2 olarak bilinen iki açık okuma çerçevesi bulunmaktadır. Bunlar majör ve minör kapsid proteinlerini kodlarlar. L1 tarafından kodlanan protein kapsidde bulunan temel proteindir ve tüm HPV tiplerinde benzer olan

proteindir. L2 tarafından kodlanan proteinler ise tüm HPV tiplerinde farklıdır. Dolayısıyla HPV tipleri arasındaki antijenite farklılığını sağlar.

Geç bölgede transkribe olan bütün proteinler sadece skuamöz epitel hücrelerinde üretilir. Geç bölge genleri tarafından kodlanan kapsid proteinlerinin miktarı, epitelium terminal matürasyon ile oldukça ilgilidir. Kondilom gibi iyi differansiye HPV tarafından oluşturulan lezyonlar, kapsid proteinlerce zengindir ancak az differansiye olan lezyonlarda kapsid protein az miktarda bulunur (61).



Şekil 2.2. HPV Genomu

(<http://www.microbiologybytes.com/virology/Papillomaviruses.html>/sitesinden modifiye edilerek alınmıştır)

2.5.1.1.2. HPV Tipleri

HPV nin farklı genotipte 100 den fazla tipi tanımlanmıştır. Bunlardan çoğu zararsız, herhangi bir belirti ya da semptom vermez ve kendiliğinden yok olur. Otuzdan fazlası cinsel yolla geçer, anüs ve genital bölge çevresinde etkili olur. Bazı düşük riskli tipler cilt siğillerine neden olur. Özellikle de HPV 6 ve 11 genital siğillere neden olmaktadır (32).

Başta HPV 16 ve 18 (onkogenik HPV tipleri) olmak üzere toplam 15 yüksek riskli tipi vardır. Bu yüksek riskli tipler öncelikle servikal kanser ve preinvaziv lezyonlar olmak üzere diğer genital kanserlere de neden olmaktadır (32,51).

Tablo 2.1. Risk Oluşturma Potansiyellerine Göre HPV Tipleri (51)

<i>RİSK</i>	<i>HPV TİPİ</i>
YÜKSEK RİSK	16,18,31,33,35,39,45,51,52,56,58,59,68,73,82
OLASI YÜKSEK RİSK	26,53,66
DÜŞÜK RİSK	6,11,40,42,43,44,54,61,70,72,81,CP108

2.5.1.1.3. HPV Hücreyi Nasıl Enfekte Eder?

HPV nin enfekte edebilmesi için, epidermal ya da mukozal epitelyal hücrelerin proliferere olabilmesi gerekmektedir. Öncelikle virüsün erken bölge genleri (E5, E6, E7) eksprese olur. Hücreler enfekte oldukça proliferasyon ve yayılma meydana gelir. Alt tabakaya doğru yayıldıkça geç bölge genlerinin ekspresyonu başlar. Viral genom çoğalır ve yapısal proteinleri oluşur. Yapısal proteinlerin oluşumuyla viral partiküller oluşur. Bu oluşan partiküller çoğalır ve yüzeyden diğer dokuları enfekte eder (23,26,48).

Düşük riskli lezyonlarda, viral DNA hücrenin çekirdeğinde epizomal formda bulunur. Ancak yüksek riskli HPV lerce enfekte olan hücrelerde (ağır displazi ya da kanserlerde) virüs kendi DNA sını konak DNA ya entegre etmektedir. Erken bölge genlerinin ürünleri olan E6 ve E7 kanserli hücrelerde sentezlenir ve bunlar HPV yi transforme edici özelliktedir (67). Bunlardan E6 geninin P53 e, E7 nin ise RB tümör baskılayıcı gene afinitesiyle bilinmektedir (13,67,68).

HPV-E6 P53 e bağlanarak hücreleri transforme eder ve P53 proteininin bir ubiquitin ligaz tarafından degradasyonuna neden olur. Erken bölge geni (E6), E6AP (E6-bağlı protein) denilen bir proteini uyarmakta ve buna bağlı olarak P53 ün proteolizi gerçekleşmektedir. Sonuçta P53 ün DNA hasarı gibi normal hücresel yanıt oluşturmaya gereken durumlarda görevini yapamamaktadır (24,60,69).

Retinoblastom proteini hücre siklusunun G1/S fazında durdurucu etkiye sahiptir. İnterfazın G1 evresinde E2F e (S fazına geçiş için gerekli olan proteinleri kodlayan gen) bağlanır ve S fazı genlerini bloke eder. Ancak HPV E7, RB proteinine bağlanıp, fosforile eder ve RB proteininin yıkımına neden olur. Dolayısıyla E2F serbest kalır ve hücre siklusu kontrolsüz bir şekilde devam eder (24,45,71).

2.5.1.1.4. Servikal Kanser – HPV Epidemiyolojisi

İnsan papilloma virüsü, servikal kanserin karsinogenezinde en önemli etiyolojik faktör olduğu bildirilmektedir. Özellikle CIN II- III ve hemen hemen tüm servikal invaziv skuamöz hücre karsinomalarında yüksek riskli onkogenik HPV 16 ve 18 enfeksiyonu söz konusudur (13,29).

İnsan papilloma virüsü asıl cilt temasıyla bulaşmaktadır. Servikal kanserdeki enfeksiyonu da seksüel temasla gerçekleşmektedir. Çoklu seksüel partner ve partnerin çok eşli olması en önemli risk faktörleridir. Bunun dışında cinsel temasla bulaşan hastalıklar, anormal pap smear bulgusu, genital siğillerde enfeksiyon riskini artırmaktadır. Enfeksiyon en çok seksüel aktivitesi olan genç kadınlarda görülür. 30

yaşından sonra görülme sıklığı azalır. Buna karşılık servikal kanser en sık 35 yaş sonrası kadınlarda görülmektedir (14,17).

Ülkemizde 2007 yılında yayınlanan, 1353 kadın taranarak yapılan bir çalışmada katılımcıların %20 sinde HPV virüsü saptanmış olup, %0.7 sinde ise HPV nin neden olduğu preinvaziv servikal lezyonlar tespit edilmiştir. Türkiye de servikal HPV kolonizasyonu sıklığı %2.1 olarak belirtilmektedir (41).

2.6. Servikal Kanser

Servikal kanser, tüm dünyada görülen kadın kanserleri içerisinde meme ve rektum kanserinden sonra 3. sıklıkta görülenidir. İkibiniki yılında yapılan bir araştırmada 493.000 yeni olgu tespit edildiği ve 274.000 hastanın ise kaybedildiği bildirilmiştir. Efektif tarama programları sayesinde; gelişmiş ülkelerde ölüm oranı, gelişmekte olan ülkelere göre daha düşüktür (2,38).

Ülkemizde epidemiyolojik veriler çok iyi olmamakla beraber Globokan verilerine göre Türkiye’de servikal kanser sıklığı 100.000 de 4.5 olarak tespit edilmiş, kadınlarda ölüme sebep olan 5. kanser türü olduğu belirtilmiştir (2).

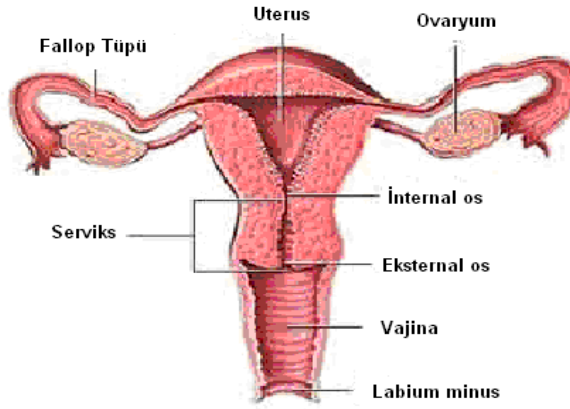
Rigoni Stern tarafından 1842 yılında yapılan en erken epidemiyolojik çalışmada; servikal kanserin evli kadınlarda olduğu, bekar kadınlarda hemen hemen hiç görülmediği belirtilmektedir. Başka araştırmacılara göre de kanserin cinsel ilişkiye girmeyen kadınlarda hiç ortaya çıkmadığı belirtilmektedir (61).

Serviks kanserinin %85-90 ı skuamöz hücreli, %10-15 i ise adenokarsinomlardır. Görülme yaşı 20-80 yaş gibi geniş bir aralığa yayılır. Ülkemizde serviks kanserinin %65 i 40-60 yaş arası görülmektedir (56).

2.6.1. Serviks Anatomisi

Serviks, uterusun silindirik ve dar olan alt bölümüdür. Ortalama 3-4 cm uzunluğundadır. Uterus ve serviksin birleştiği noktaya da isthmus adı verilir. Alt intravajinal kısım ise mukoz membranla kaplıdır (56).

Serviksin eksternal os a doğru olan kısmı ektoserviks, eksternal os un proksimalinde olan kısmı endoserviks olarak adlandırılır. Eksternal ve internal os un arasında kalan kısımda endoservikal kanal denir. Endoservikal kanalın uzunluğu ve eni yaş ve hormonal duruma göre değişiklik gösterir (42,56).



Şekil 2.3. Uterus ve kısımları (<http://medicineworld.org/news/cervixnews.html> den modifiye edilerek alınmıştır)

2.6.2. Serviks Histolojisi

Serviks skuamöz epitel ve kolumnar epitel ile örtülüdür. Skuamo-kolumnar bileşkede ise her iki hücre tipide görülmektedir (56).

Skvamöz Epitel Hücre Yüzeyi

Çok katlı tabaka halindedir ve pembe görünümlüdür. Serviksin intravajinal kısmını oluştururlar. Skvamöz epitel hücrelerinin en alt tabakasını, bazal membranla bitişik, yuvarlak, tek sıralı hücreler oluşturur.

Bazal hücrelerin üzerinde, büyük ve çok katlı parabasal hücreler yer alır. Bu hücrelerin ileri derecede matürasyonu ve diferansiyasyonu ile yassı, küçük süperfisyal tabaka oluşur (42).

Skvamöz-kolumnar bileşke

Endoservikste alt silindirik epitelin bittiği, ektoserviksin çok katlı yassı epitelinin başladığı sınırdır. Bu kısma metaplastik değişiklik geçirmemiş servikste orijinal yassı-silindirik epitel sınır denir. Metaplazi geçirmiş servikste ise bu sınırın yeri kayar ve yeni yassı silindirik epitel sınırı adını alır. Yeni yassı silindirik epitel sınırında silindirik epitel ile yassı epitel arası değişime uğramış bir geçiş alanı bulunmaktadır. Bu geçiş alanına “transformasyon zonu” adı verilir (7). Bu bölgenin mitotik aktivitesi oldukça yüksektir ve karsinogenezin neredeyse tamamı bu bölgede gerçekleşmektedir (7,42).

2.6.3. Premalign Lezyonlar

2.6.3.1. Sınıflandırma Şekilleri

2.6.3.1.1. CIN (servikal intraepitelyal neoplazi) Sınıflandırması

İlk kez 1949 yılında Papanicolaou, invaziv aşamaya henüz gelmemiş lezyonlar için “displazi” terimini kullanmıştır. Displazi hafif, orta ve ağır displazi olarak 3 e ayrılır. Daha sonra 1968 yılında Richart ve Baron invaziv karsinom ve premalign lezyonların tümüne birden “Servikal Intraepitelyal Lezyon” adını vermiştir (7).

Servikal intraepitelyal neoplazi (CIN), hafif displazi olarak sınıflandırılan, iyi diferansiye bir neoplaziden başlayıp, invaziv karsinomla sonlanan intraepitelyal değişikliklerdir (12).

CIN I: Hafif displazi olarak tanımlanır. Çok katlı yassı epitelin 2/3 lük kısmındaki hücreler normal maturasyon gösterirken, bazal 1/3 lük kısımda nükleer anormallikler görülmeye başlar. Mitoz bulunur ancak fazla değildir.

CIN II: Epitelin üst yarısı normal maturasyon gösterir. Nükleer anormallikler CIN I e göre daha belirgindir. Bazal tabakanın 2/3 ünde mitozlar görülür.

CIN III: Maturasyon ya çok az ya da hiç yoktur. Epitelin hemen hemen tamamında nükleer anormallikler görülür. Epitelin tüm tabakalarında mitozlar görülür (7).

CIN I, spontan olarak gerileyebilmekte çok az bir kısmı CIN II ve CIN III e ilerlemektedir. Yaklaşık % 10-20 CIN II-III premalign lezyonun invaziv kansere dönüştüğü tahmin edilmektedir (29).

2.6.3.1.2. Bethesda Sistemi

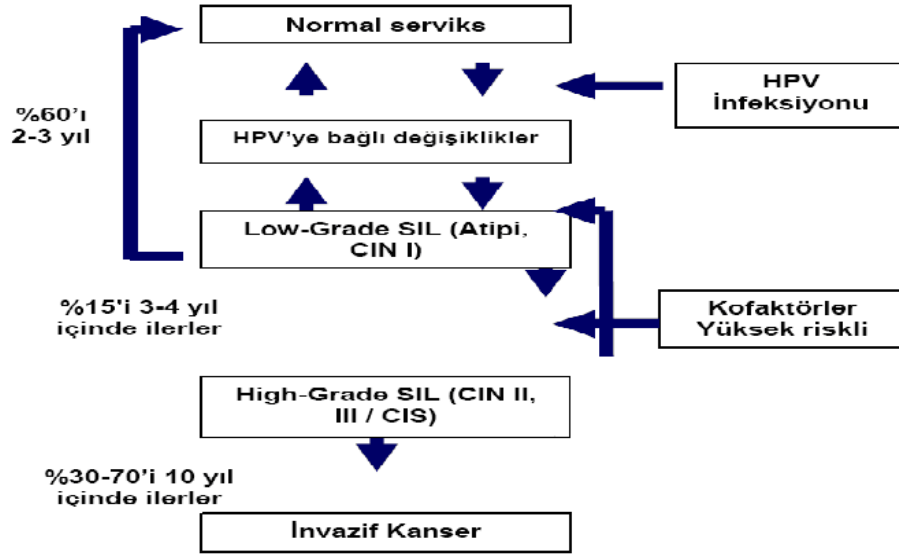
Bethesda Maryland da 1988 yılında yapılan bir Ulusal Kanser Enstitüsü (NCI) çalışması, sitolojik raporlar için Bethesda Sistemi'nin geliştirilmesiyle sonuçlanmıştır (16). Daha sonra 1991 yılında Bethesda II olarak yeniden düzenlenmiştir. Bu sınıflama 2001 yılına kadar kullanılmıştır. Üçüncü bir toplantı ile tekrar düzenlenip 2001 yılında son şeklini almıştır (8,73,58). Bu sınıflamaya göre premalign skuamöz lezyonlar 4 gruba ayrılmaktadır:

Önemi belirgin olmayan atipik skuamöz intraepitelyal lezyon (ASCUS): Düşük veya yüksek riskli skuamöz intraepitelyal lezyon kriterlerine uymayan anormal hücrelerdir. Önceleri “atipik” olarak adlandırılan küçük anormalliklerin çoğu bu grupta yer alır (10,56).

Ekarte edilemeyen HSIL (ASC-H): Smear sonuçlu hastalarda fazla miktarda orta/ağır displazi olasılığı vardır. ASCUS tan daha ciddidir.

Düşük riskli intraepitelyal lezyon (LSIL): Koilositotik atipi ve CIN I olarak adlandırılan HPV değişiklikleri bu gruba dahildir (10).

Yüksek riskli intraepitelyal lezyon (HSIL): Orta displazi, ağır displazi (CIN II ve CIN III) ve karsinoma in situ bu gruba dahildir (10).



Şekil 2.4. Servikal kanser oluşumunda HPV ye bağlı preinvaziv aşamalar (www.ukdk.org/pdf/kitap/30.pdf Türkiye'de Serviks Kanseri Durumu ve Servikal Kanser Tarama Çalışmaları sitesinden modifiye edilerek alınmıştır)

2.6.4. Servikal Kansere Neden Olan Diğer Risk Faktörleri

Epidemiyolojik çalışmalar göstermektedir ki; preinvaziv lezyonların malign transformasyonu sırasında HPV ile birlikte bazı çevresel etmenler de rol oynamaktadır. Ancak bu etmenlerin etkileri ve mekanizmaları tam açık değildir. Bunlar:

- **Sigara Kullanımı:** Sigara kullanımı, HPV enfeksiyonu pozitif olan kadınlarda servikal kanser progresyonu için önemli bir risk faktörü olduğu bildirilmektedir. Tütün de bulunan benzopren, nitrozaminler gibi aromatik hidrokarbonlar karsinogenezi etkili bir şekilde indükleyen maddelerdir. Yapılan çalışmalarda, servikal displazi görülen ve aynı zamanda sigara kullanan kadınlarda servikal mukozalarında bu maddeler tespit edilmiştir (3).
- **Oral Kontraseptif Kullanımı:** Hormonal etkilere serviksin duyarlı olması nedeniyle oral kontraseptiflerin servikal karsinomaya neden olduğu düşünülmektedir. Oral kontraseptifler, özellikle adenokarsinoma oluşumuna neden olduğu iddia edilmektedir (7).
- **Koit ve Seksüel Davranış:** Çok eşlilik enfeksiyon kapma riskini önemli ölçüde artırır. Ayrıca bir çok çalışmada ilk koitin çok erken yaşta olması (16 yaşından önce) servikal kanser riskini artırmaktadır. Bunun nedeni olarak, servikal transformasyon zonunun menarş ile 16 yaş arası enfeksiyonlara açık olması gösterilmektedir (25,59).
- **Sosyoekonomik Düzey:** Servikal kanser riskinin kırsal kesimlerdeki ve düşük sosyoekonomik düzeydeki kadınları daha çok etkilediği kabul edilmektedir. Bunun sebebi; maddi olanaklar ve erişim yetersizliği nedeniyle rutin sağlık kontrollerinin düzenli yapılamamasıdır (38).

- Diyet: Beslenme bozukluğu, yeterli meyve ve sebze tüketiminin olmaması kanser riskini artırmaktadır (38).

2.6.5. Belirtileri

Preinvaziv lezyonlar genellikle bulgu vermemektedir. Ancak invaziv kansere dönüşüm olduğunda serviksin deri kısımlarına ve diğer organlara metastaz yaptığında bulgular başlar. Servikal kanserin en erken evrelerinde kanlı ve kokulu vajinal akıntı, anormal vajinal kanamalar görülebilmektedir (37).

2.6.6. Papanicolaou (PAP) Smear Uygulaması

Servikal kanseri ve preinvaziv lezyonları tespit etmeye yardım eden bir tarama yöntemidir. Pap smear sayesinde erken tanı yapılabilen ve prognoz tayinine anlamlı ölçüde katkı sağlanmaktadır. Amerika Birleşik Devletleri'nde yılda yaklaşık olarak 16.000 yeni invaziv servikal kanser tanısı konmakta ve bunun 5.000 inde ölüm beklenmekte iken 2006 yılında tarama programlarının başarısı sayesinde yeni beklenen vaka sayısı 9710, beklenen ölüm 3700 e düşmüştür (22,38). Amerikan kanser derneği (ACS) ve Amerikan Obstetrik ve Jinekoloji Koleji (ACOG) önerilerine göre taramanın başlangıç zamanı cinsel aktivite başladıktan 3 yıl sonra ya da en geç 21 yaşından itibaren yılda 1 kez rutin olmalıdır (38).

Yumuşak smear fırçası ile serviksten yeterli miktarda döküntü hücreler toplanır ve mikroskopta incelenmek üzere patoloji laboratuvarına gönderilir. Bu testin pozitif olması halinde anormal hücrelerde yüksek riskli HPV olup olmadığı araştırılmak için HPV-DNA testi ve daha ayrıntılı inceleme için kolposkopi yöntemi uygulanır (37).

Normal pap smear testlerinde serviksten alınan hücre döküntüleri lam üzerine direkt yayılmaktadır. Ancak bu işlem sırasında hücreler, ezilir, katlanır ve de kanlı, koyu akıntı içerisinde kalmaktadır. Yeni geliştirilmiş Thin Prep (sıvı bazlı sitolojik uygulama) tekniğinde ise örnek tamponlanmış alkol dolu bir kap içerisine toplandıktan

sonra özel bir filtre sisteminden geçirilerek, akıntı ve iltihap hücrelerini ortamdan uzaklaştırır ve sadece servikse dökülen hücrelerin incelenmesini sağlar. Bu yöntemin dört kat daha fazla duyarlı olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (31,36).

2.6.7. HPV-DNA Testi

Virüsün genetik materyalinin (DNA) saptanmasına dayanan bir analizdir. Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA), 2003 yılında 30 yaş üstü kadınlarda yapılan kanser taramalarında HPV-DNA analizinin, HPV testi ve pap smear ile birlikte aynı zamanda uygulanmasını onaylamıştır. Tarama testlerinde anormal sitoloji tespit edilen hastaların, HPV-DNA testi ile bulguların kesinleştirilmesi; hastalığın kesin tanısı, prognozu ve tedavisi hakkında yol göstermektedir (34).

2.6.8. Kolposkopi

Tarama yöntemi değildir. Ayaklı bir mikroskop olan kolposkop ile 4-60 kez büyütme yaparak, dışarıdan rahim ağzına kadar tüm vajinanın detaylı görünmesini sağlayan bir yöntemdir. Muayene sonrasında gözlenen anormal dokulardan parçalar alınarak patoloji laboratuvarına gönderilir (35).

2.6.9. Tedavi ve İyileşme Şansı

Servikal kanserin tedavisinde; kanserin derecesi ve evresi önemli rol oynar. Tedavi lokal ya da sistemiktir. Lokal tedaviler; bir bölgedeki kanser hücrelerinin cerrahi yöntemlerle ya da radyasyon ile temizlenmesidir. Sistemik tedavi ise; vücudun diğer kısımlarına yayılmış olan anormal hücreleri kontrol altına almak için uygulanır.

Hastalığın iyileşme oranı; kanserin tipi ve yerleşimi, evresi, metastaz hızı, hastanın yaşı ve genel durumu ve tedaviye yanıt verip vermediğiyle ilgilidir. Servikal

kanserin tüm evreleri göz önüne alındığında, 5 yıllık sağ kalım oranı %72 olarak belirtilmektedir (37).

2.6.10. HPV Aşısı

Günümüzde HPV enfeksiyonu olan kadınlarda viral enfeksiyonun ilerlemesini yavaşlatabilecek ya da yok edebilecek antiviral tedavi yoktur. Bu nedenle aşılar üzerinde çalışılmaya başlanmıştır (53). İki tip aşı geliştirilmiştir:

Profilaktik Aşılar: Sonradan ortaya çıkabilecek enfeksiyonlara karşı koruma sağlamaktadır. Virüsün L1 ve L2 proteinlerine karşı nötralize antikor gelişimini hedef alırlar. Aşı virüs benzeri partikül (VLP) kullanılarak geliştirilmiştir. Koruyucu aşının özelliği tipe spesifik olmasıdır. HPV 16 L1 VLP ile yapılan aşılama, sadece HPV 16 enfeksiyonuna karşı koruma sağlar, diğer tipler için koruyucu olmayabilir. Şu anda VLP aşıları sadece yüksek riskli tipler olan HPV 16 ve 18' i içermektedir (53).

Terapötik Aşılar: HPV ile enfekte olan epitel hücrelerde, hücrel immüniteyi artıran aşılardır. CD4+ ve CD8+ T hücreleri uyarılarak viral DNA yı entegre etmiş E6 ve E7 proteinlerini aşırı üreten hücreler yıkılır (53).

Günümüzde Gardasil ve Cervarix isimli iki aşı bulunmaktadır. Aşının en yüksek düzeyde etkili olması için, henüz cinsel aktivitesi başlamamış bayanlarda kullanılması önerilmektedir. Bu nedenle ABD de Haziran 2006 da 9 yaşındaki kızlarda rutin Gardasil kullanımı onaylanmıştır (37).

2.6.11. Servikal Kanser ve Genetik

Epidemiyolojik ve moleküler çalışmalar göstermiştir ki; insan papilloma virüsü malign lezyonların gelişiminde majör risk faktörüdür. Özellikle viral onkoproteinler E6 ve E7 malign transformasyonun başlıca komponentleridir (1).

Invaziv servikal kanser, servikal displazinin ilerleyen aşamalarında görülür. Ancak erken aşama displastik lezyonların sadece %15 i düzenli gelişim gösterir. Bu yüzden hastalık gelişiminde genetik markerların tanımlanması klinik açıdan çok önemlidir. Servikal kanser gelişiminde görülen genetik değişiklikler, HPV enfeksiyonunun yanında spesifik kromozom anomalilerinin de görüldüğünü göstermektedir (27).

2.6.11.1. Servikal Kanser - TERC Aberasyonu

Servikal kanserde en sık tekrarlayan yapısal anomali 3q26 artışıdır. Bu bölge TERC genini içerir. Bu aberasyon en sık invaziv karsinomada ve yüksek riskli premalign lezyonlarda görülmektedir. Ancak spontan olarak gerileyen lezyonların hiçbirinde 3q artışı görülmemektedir (27,29). Lezyonların histopatolojik derecesi ile TERC geninin ve viral onkogenlerin ekspresyonundaki artış arasında önemli ölçüde bağlantı olduğu tespit edilmiştir. Preinvaziv lezyonlarda TERC geninin ilave kopyasının görülmesi, displazinin teşhisi için yeterli bir bilgi olmadığı, ancak lezyonun seyri hakkında önemli veriler sağlayabileceği belirtilmektedir (27).

2.6.11.2. Servikal Kanser - Onkogen Aktivasyonu

Protoonkogenler birkaç farklı yolla onkogene dönüşmektedirler. Protoonkogenler, nokta mutasyonu, kromozom translokasyonları ve gen amplifikasyonları şeklinde onkogen aktivitesi kazanırlar. Solid tümörlerde gen amplifikasyonu onkogen aktivitesi için dominant mekanizmadır. Servikal kanserde CGH yöntemiyle birkaç amplifikasyon bölgesi tanımlanmıştır (76).

Zhang ve arkadaşlarının 2000 yılında yaptıkları bir çalışmada HPV(+) olan servikal tümör hücrelerinin PIK3CA (3q26.3) bölgesinde %43, TERT (5p15.33) bölgesinde %33, 20q13.2 bölgesinde %30, ERBB 2 (17q21.2) bölgesinde %29,

CCND1 (11q13.3) bölgesinde %12 ve C-MYC (8q24) bölgesinde %25 oranında amplifikasyon tespit edilmiştir (76).

Hücre proliferasyonunu düzenlemede, farklılaşmasında ve apoptozisinde C-MYC protoonkogeni önemli ölçüde etkilidir. Özellikle RAS sinyal ağı ve MYC/MAX/MAD matrix sinyal yolları arasında kritik bir noktada görev alır. Dolayısıyla genital tümörlerde HPV-DNA sının bu bölgeye entegre olması bu genin farklı onkogen aktivasyonlarına neden olabilir. Özellikle yüksek riskli HPV-18 in %30 u 8q24 üzerinde bulunan C-MYC geninin yakınına entegre olmaktadır (19). Son yapılan çalışmalarda gen amplifikasyonunun HPV kaynaklı servikal karsinomalara neden olduğu tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalarda; C-MYC onkogeni servikal kanser gelişimi için potansiyel bir marker olduğu düşünülmektedir. Epitelyal karsinomaların büyük çoğunluğunda gen amplifikasyonunun, C-MYC geninin aşırı eksprese olmasından kaynaklandığı ve proteinin aşırı ekspresyonunun da daha agresif tümörlerle ilişkili olduğu saptanmıştır (1).

2.6.11.3. Sayısal Aberasyonlar

En sık karşımıza çıkan sayısal aberasyonlar 7. kromozomun ve 1. kromozomun trizomisidir. Kromozom 7 nin trizomisinin tümör progresyonunda önemli olabileceği belirtilmektedir. Epidermal büyüme faktör reseptörünün (onkogen ERB-B) 7. kromozom üzerinde bulunması, tümör gelişiminde önemli bir etken olabileceğini düşündürmektedir (57).

FISH yöntemiyle yapılan çalışmalarda, displazinin derecesi arttıkça trizomili hücrelerin sayısının arttığı tespit edilmiştir. Kromozom 7 trizomisinin erken evrelerde görülmesi displastik dönüşümler için erken teşhis olanağı sağlayabileceğini düşündürmektedir. Aksine trizomi 1 yüksek riskli lezyonda daha sık görülmektedir ve premalign lezyonlar için marker olabileceği ileri sürülmektedir (57). Ayrıca 3, 6, 11, 17. kromozomlara ait trizomi ve polizomiler rapor edilmiştir (13).

2.7. Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH)

Moleküler sitogenetik, işaretli DNA problemleri kullanarak interfaz ya da metafaz plaklarının mikroskopik analizidir (6,9).

In situ hibridizasyon (ISH), spesifik RNA ve DNA sekanslarının doku kesitlerindeki her hücrede, kromozom preparasyonlarında ve interfaz nükleuslarında morfolojik olarak gösterilmesi ve nükleik asitlerin kendi ortamlarında incelenmesini sağlayan bir tekniktir (6).

FISH ise probun haptenler veya florokromlarla işaretlenip florokrom maddelerle görüntülenerek floresan veren sinyallerin değerlendirilmesiyle yapılan bir ISH tekniğidir (6).

Başlarda ISH radyoaktif maddeler kullanarak uygulanmıştır. Ancak radyoaktif maddelerin pahalı olması, yarı ömürleri, toksik etkisi ve uzaklaştırılmasındaki zorluklar nedeniyle kullanımı azalmıştır. Moleküler klonlama teknikleri 1970 yıllarında geliştirilmiştir. Daha sonra 1975 te biotin-avidin sisteminin bulunması hapten ile işaretlenmiş problemlerin florokrom enzim ya da koloidal altınla belirgin hale getirilmesini sağlamıştır. Daha sonra da biotinin yanında digoxigenin ve florescein ile işaretleme, farklı florokrom moleküllerinin birlikte kullanımı ikili ve üçlü işaretleme imkanı vermiştir. Yöntemin geliştirilmesiyle 1986 yılında non-radyoaktif işaretli problemler kullanılarak, FISH yöntemi ortaya çıkmıştır (6).

2.7.1. FISH Tekniğinde Kullanılan Problemler ve Özellikleri

FISH tekniğinin uygulanmasında prob seçimi en önemli basamaktır. Kullanılacak probun, incelenecek materyale, değerlendirilecek anomalinin tipine ve bölgesine uygun olması gerekir (5).

Prob; örnekte incelenecek olan genetik materyale (RNA ya da DNA) komplementer, radyoaktif veya non-radyoaktif işaretli RNA ve DNA segmentidir. FISH tekniğinde sitogenetik alanda kullanılan başlıca problemler şunlardır:

- a. Tekrarlayan dizi problemleri (satellit problemler)
- b. Banda özgü problemler
- c. Lokusa özgü problemler
- d. Tüm kromozomu boyayan problemler
- e. Telomer bölgesine spesifik problemler

2.7.2. FISH Tekniğinin Temel Mekanizması

FISH tekniği 6 aşamada gerçekleşir:

- 1- Preparat hazırlanması
- 2- Preparatların ön yıkaması
- 3- Prob- hedef DNA denatürasyonu
- 4- Prob- hedef DNA hibridizasyonu
- 5- Hibridizasyon sonrası yıkamalar
- 6- Görüntüleme ve inceleme

Hibridizasyonda üç temel aşama önemlidir:

- 1- Hedef dizilerin hibridizasyon sırasında geçirgenliklerini korumaları
- 2- Problemlerin hedefin yüksek etkinlikle birbirlerine bağlanması
- 3- Hibridizasyon spesifik aktivitesi yüksek bir raporör ile en az zemin sinyali olacak şekilde en parlak halde görüntülenmesidir (4).

Bir hibridizasyon reaksiyonunda tolere edilebilen yanlış eşleşme derecesi 'stringency' olarak ifade edilir. Yüksek stringency koşullarında, sadece hedef sekansla tam homolog olan problemler stabil hibridler oluştururlar. Düşük stringency koşullarında ise prob sadece % 70–90 homoloji gösteren sekanslara bağlanabilir. Bu spesifik

olmayan sinyaller, hibridizasyon sonrası yıkamalarda yüksek stringency koşullarının (yüksek ısı + düşük tuz konsantrasyonu) sağlanmasıyla ortamdan uzaklaştırılır.

FISH sonrası problardan elde edilen sinyaller epifloresan mikroskopta incelenirler. Kullanılan florokromların gözlenebilmesi için doğru prob setleri ve uygun filtrelerin seçilmesi gerekmektedir. Birden fazla hedef dizinin görüntülenmesi gerektiğinde doğru filtreler ile yeşil, kırmızı ve mavi florokromlar gözlenebilmektedir (4).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Gereç

3.1.1. Araştırma Grubu Bireyleri

Çalışmamızda Eylül 2008-Mart 2009 tarihleri arasında İstanbul Patoloji Grubu ve Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Patoloji Anabilim Dalı'nda preinvaziv lezyon aşamaları (CIN sınıflandırması) tespit edilen ve İstanbul Genetik Laboratuvarı'nda HPV tiplendirmesi yapılan 50 hasta (HPV+) ve 10 kontrol (HPV-) olgusuna ait thin prep smear örneğinde FISH analizi yapılmıştır.

Çalışmamız Osmangazi Üniversitesi Rektörlüğü Araştırma Fonu 2008/11027 numaralı "İnsan Papilloma Virüsünün (HPV) Servikal Kansere Gelişimi Üzerinde Oluşturduğu Genetik Değişikliklerin Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH) Yöntemiyle İncelenmesi" isimli proje ile desteklenmiştir.

3.1.2. Kullanılan Araçlar

3.1.2.1. Kullanılan Aygıtlar

Ben-mari (Heto-DT Hetoterm)

Buzdolabı (Arçelik- 415)

Cam Kalem

Conta

Deep-Freeze (Heraeus)

Enjektör

Etüv (Friocell MMM Med Center)

Floresan Mikroskop (Olympus BX-61)

Image Analyser (Applied Imaging)

Kronometre

Mikropipet (Eppendorf)

Mikrosantrifüj (Eppendorf Centrifuge-5415)

PH metre (Orion)

Pipet Uçları

Termometre

Vortex (Janke and Kunkel, UF-2)

Zaman Ayarlı Santrifüj (Heraeus)

3.1.2.2. Cam Malzemeler

Beher (500 ml, 1000 ml)

Erlenmayer (500 ml, 1000 ml)

Lam

Lamel

Mezür

Santrifüj Tüpü

Yatay ve Dikey Şale

3.1.3. Kimyasal Maddeler

Absolü Etanol (Merck)

Antifade (Vector)

DAPI (Sigma)

Distile Su

Glasiyal Asetik Asit (Merck)

HCL (Merck)

Immersion Yağı (Merck)

Metanol (Merck)

NaOH (Merck)

Parafilm (Pechlney)

Rubber Cement (Sanford 00491)

Tween 20 (Sigma)

3.1.4. Kullanılan Problar

KB-10704 Poseidon Kreatech Cervial Cancer Probe hTERC (3q26), C-MYC (8q24), CEP 7 (1032 LG Amsterdam The Netherlands).

3.2. Yöntem

Preinvaziv lezyon aşamaları (CIN sınıflandırması) tespit edilen ve İstanbul Genetiks Laboratuvarı'nda HPV tiplendirmesi yapılan 50 hasta (HPV+) ve 10 kontrol (HPV-) olgusuna ait thin prep yöntemiyle alınan smear örneklerine FISH analizi yapılmıştır.

3.2.1. Materyal Alımı

Preinvaziv lezyon aşamaları (CIN sınıflandırması) tespit edilen ve İstanbul Genetiks Laboratuvarı'nda HPV tiplendirmesi yapılan 50 hasta (HPV+) ve 10 kontrol (HPV-) olgusuna ait thin prep yöntemiyle alınan smear örnekleri Anabilim Dalımız Moleküler Sitogenetik Laboratuvarına ulaştırılmıştır.

3.2.2. Moleküler Sitogenetik Analiz

Araştırmamızda özel solüsyon içerisinde gelen materyaller pre-fiksasyon ve fiksasyon aşamalarından geçirilip yeterli miktarda pellet elde edilmiştir. Daha sonra elde edilen pellet temiz bir lama yayılmıştır. Yayma işlemi sırasında plastik conta ile

yayılacak bölge sınırlandırılarak hücrelerin dağılması engellenmiştir. Böylece analiz için yeterli miktarda hücre sayısına ulaşılmıştır.

Hazırlanan preparatlar 1 gece oda ısısında bekletilerek hücrelerin yaşlanması sağlanmıştır.

3.2.2.1. FISH Tekniğinin Uygulanması

FISH tekniğinde Rieder ve arkadaşları tarafından geliştirilen protokol uygulanmıştır (72).

3.2.2.1.1. Preparatların Ön Yıkaması ve Denatürasyonu

- Preparatlar her biri 1 dakika olmak üzere sırasıyla % 100–70–50–30 luk alkol serisinden geçirilerek dehidre edilip daha sonra 1 dakika 0.1XSSC solüsyonunda bekletilmiştir.
- Preparatlar hemen 70 °C deki 2XSSC solüsyonuna alınmış ve bu ısıda 30 dakika bekletilmiştir.
- 30 dakika sonunda 2XSSC solüsyon ısısının 37 °C ye gelmesi beklenmiştir.
- Daha sonra preparatlar 0.07 M lık NaOH solüsyonunda denatüre edilmiştir.
- Denatürasyonu takiben her biri 1 dakika olmak üzere sırasıyla +4 °C de 1XSSC – +4 °C de 2XSSC de bekletilmiştir.
- Preparatlar % 30 – 50 – 70 – 100 lük alkol serisinde dehidre edilip, kurumaya bırakılmıştır.

3.2.2.1.2. Prob Denatürasyonu

Problar benmaride 10 dakika 74 °C de bekletilerek denatüre edilmişlerdir.

3.2.2.1.3. Hibridizasyon

Probun bulunduğu ependorf tüpü santrifüj edilerek tüm probun dibe çökmesi sağlanmıştır.

-Denatüre edilen preparatlarda belirlenen alana prob (5 µl) eklenmiş ve üzerlerine 24mm lik lamel kapatılmıştır.

- Lamel çevresi su girmemesi için rubber cement ile yalıtılmıştır.

- Preparatlar 37 °C de bir gece nemli ortamda hibridizasyona bırakılmıştır.

3.2.2.1.4. Hibridizasyon Sonrası Yıkamalar

Bu yıkamalarda spesifik olarak bağlanmayan prob DNA sının ortamdan uzaklaştırılması ve olgu DNA sına tam komplementer olan (% 80–100) dizilerin hedef bölgede sabit hale getirilmesi amaçlanmaktadır. Aşamaları:

-Hibridizasyonu tamamlanan preparatlar etüvden çıkartılarak lamellerin çevresindeki yalıtım maddesi dikkatlice temizlenmiştir.

- Preparatlar, oda ısısındaki 2XSSC solüsyonunda hafifçe karıştırılarak lameller preparatlardan uzaklaştırılmıştır.

- Preparatlar 1XSSCsolüsyonu ile 74 °C de 7-8 dakika bekletilmiştir.

- Sonrasında 2XSSC/T–20 solüsyonunda 5 dakika bırakılmıştır.

3.2.2.1.5. Hibridize Olan Bölgelerin Görüntülenmesi

Bu aşamada prob ve nukleus DNA sının hibridize olduğu bölgelerin görünür hale getirilmesi amaçlanmaktadır.

Hibridizasyon sonrası yıkamaları yapılan preparatlar 4XSSC/DAPI solüsyonunda 2 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda 15 µl antifade eklenmiş ve lamel ile kapatılmıştır. İnceleme aşamasına kadar – 20°C de ve karanlıkta bekletilmişlerdir.

3.2.2.1.6. Preparatların Mikroskopta İncelenmesi

Preparatlar Olympus BX-61 Floresan mikroskobunda uygun filtrelerle incelenmiştir. Floresan mikroskoba bağlı soğutmalı kamera ve görüntü analiz sistemi (Applied Imaging) aracılığıyla her olguya ilişkin FISH analiz verileri fotoğraflanmış ve arşivlenmiştir.

3.2.2.1.7. Değerlendirme

Çalışmamızda preinvaziv lezyon aşamaları (CIN sınıflandırması) tespit edilen ve HPV tiplendirmesi yapılan 50 hasta (HPV+) ve 10 kontrol (HPV-) olgusuna ait thin prep smear testi ile alınan sıvı bazlı sitolojik örneklerle FISH analizi yapılmıştır. Her olguda her prob için 50-180 hücre değerlendirilmiştir. Her hücre için hedef gene ya da kromozom sentromerine ait sinyaller sayılmıştır. Atipik hücrelerle beraber normal hücrelerde sayılmıştır. Yanlış pozitiflikten kaçınmak için değerlendirilen tüm parametreler için cut off değerini %20 olarak her olguda 50-180 arası hücre analiz edilmiştir (27,29). Değerlendirilen hücrelerde 3q26 ve 8q24 bölgeleri için 3-5 kopya bulunması halinde “amplifikasyon pozitif” olarak değerlendirilmiştir. Kromozom 7 nin sayısal aberasyonları için değerlendirilen hücrelerin %20 ve üzerinde 3 sinyal görüldüğünde “trizomi 7” olarak değerlendirilmiştir (50).

3.3. Kullanılan Stok Solüsyonlar

Tablo 3.1. Carnoy's Fiksatif Solüsyonu

Metanol	3 kısım
Glasiyal Asetik Asit	1 kısım

Tablo 3.2. Ön Yıkama Solüsyonları

<u>20XSSC Solüsyonu</u>	
NaCl (3 M)	175,3 gr
Tri Sodyum Sitrata (0,3 M)	88,24 gr
Distile su	1000 ml
HCl ile pH 7.0 a ayarlanır.	
<u>2XSSC Solüsyonu</u>	
20XSSC	40 ml
Distile su	360 ml
HCl ile pH 7.0 a ayarlanır.	

Tablo 3.3. Denatürasyon Solüsyonu

<u>0,1XSSC Solüsyonu</u>	
20XSSC	3 ml
Distile su	597 ml

0,07 M NaOH	14 ml
Distile su	200 ml

Tablo 3.4. Hibridizasyon Sonrası Solüsyonlar

<u>0,1XSSC Solüsyonu</u>	
20XSSC	10 ml
Distile su	190 ml

2XSSC/Tween-20 Solüsyonu

20XSSC	20 ml
Tween 20	100 µl
Distile su	180 ml

Tüm solüsyonlar HCl ile pH 7.0 a ayarlanır.

2XSSC Solüsyonu

20XSSC	20 ml
Distile su	180 ml

Tablo 3.5. Görüntüleme Sistemleri Solüsyonları

DAPI/Antifade Solüsyonu

2XSSC	20 ml
DAPI	100 µl
Distile su	80 ml

3.4. İstatistik Analiz

Analizlerde SPSS 16.0 İstatistik programı kullanıldı. Saptanan anomalilerle pre invaziv evreler ve hasta grubu ile kontrol grubu arasındaki ilişkiler Fisher's Exact X^2 testi ile incelendi. Saptanan anomaliler ile HPV risk tipleri arasındaki ilişki ise X^2 ile incelendi. $P < 0.05$ düzeyi istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Çalışmamızda Eylül 2008-Mart 2009 tarihleri arasında İstanbul Patoloji Grubu ve Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Patoloji Anabilim Dalı'nda preinvaziv lezyon aşamaları (CIN sınıflandırması) tespit edilen ve İstanbul Genetik Laboratuvarı'nda HPV tiplendirmesi yapılan 50 hasta (HPV+) ve 10 kontrol (HPV-, thin prep smear sonucu normal) olgusuna ait sıvı bazlı sitolojik örnekler ile FISH analizi yapılmıştır.

İncelemeye alınan sıvı bazlı sitolojik örneklerle sahip 50 olgunun yaş ortalaması 30.44 ± 6.81 (17-57) olarak tespit edilmiştir. Olgularımızın 28 i CIN I, 15 i ASCUS, 3 ü normal, 1 i kondilom, 1 i kondilom/ CIN I, 2 si CIN I/II olarak tespit edilmiştir. Kontrol grubunu ise thin prep smear incelemesi normal ve HPV enfeksiyonu bulunmayan örnekler oluşturmaktadır.

Olgularımızın 23 ü yüksek riskli HPV, 15 i düşük riskli HPV, 7 si olası yüksek riskli HPV, 4 ü birden fazla HPV tipleri ile enfektedir. Olgulardan 1 inin HPV risk tipi bilinmemektedir (HPV 90).

Olguların yaş, CIN sınıflandırması ve HPV tipine ait bilgiler Tablo 4.1. de verilmiştir.

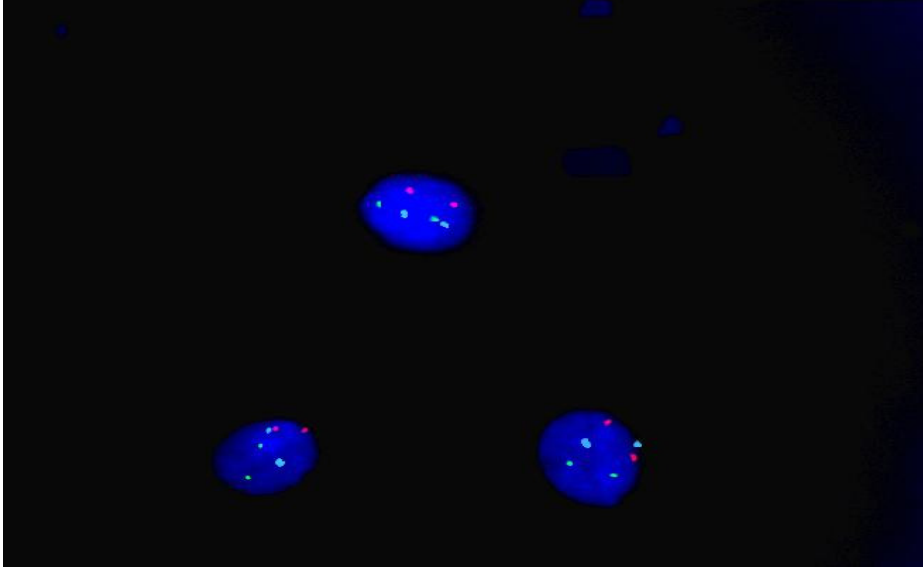
Tablo 4.1. Olguların Yaş, CIN sınıflandırması ve HPV Tipine Ait Bilgileri

HastaNo	Yaş	HPV TİPİ	CIN sınıflandırması
01	38	31	CIN I
02	27	70	ASCUS
03	29	16	CIN I
04	26	16	ASCUS
05	31	53	ASCUS
06	26	16	ASCUS
07	33	58	CIN I
08	40	81	ASCUS
09	33	81	NORMAL
10	26	11	ASCUS
11	32	16/53/61	ASCUS
12	27	16	CIN I
13	28	18	CIN I
14	30	16	NORMAL
15	28	70	CIN I
16	28	40	CIN I
17	27	53	CIN I
18	28	6	CIN I
19	34	66	CIN I
20	28	6/11	ASCUS
21	30	16	ASCUS
22	31	16	CIN I
23	29	56	CIN I
24	38	59	CIN I
25	28	90	CIN I
26	26	58	ASCUS
27	21	16	CIN I/ II
28	33	56	CIN I
29	32	66	CIN I
30	23	56	CIN I
31	25	18	CIN I
32	26	31	CIN I
33	24	33	CIN I
34	23	53/61	CIN I
35	37	6	ASCUS
36	29	56	CIN I
37	39	53	NORMAL
38	33	58	CIN I
39	25	6	ASCUS

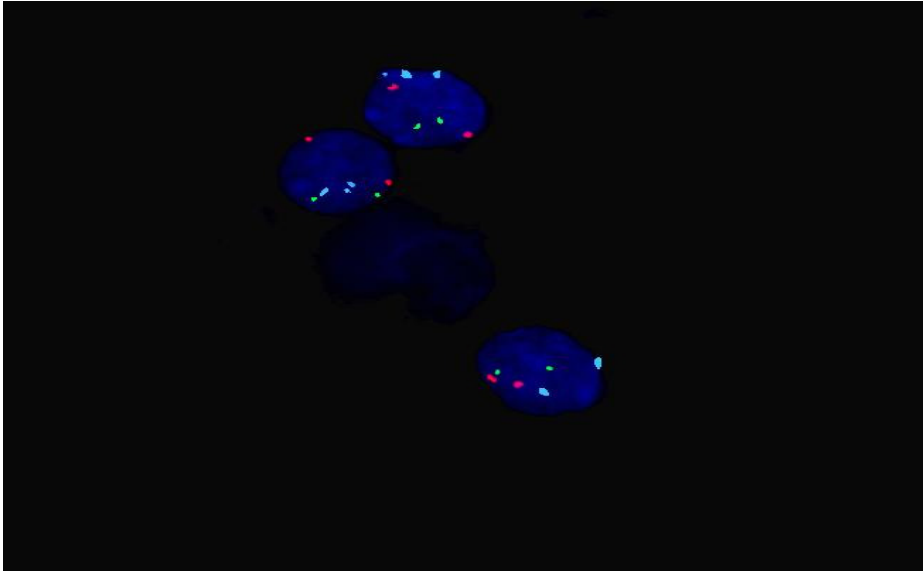
HastaNo	Yaş	HPV TİPİ	CIN sınıflandırması
40	43	66	CIN I
41	28	6	CIN I/ II
42	24	6	ASCUS
43	34	18	ASCUS
44	36	11	KONDİLOM
45	21	6	KONDİLOM/CIN I
46	17	58	CIN I
47	30	61	ASCUS
48	57	35/58	CIN I
49	40	61	CINI I
50	41	53	CIN I

4.1. Yöntem ve Değerlendirmeye İlişkin Bulgular

Çalışmamızda thin prep smear testi ile alınan 50 hasta ve 10 kontrol olgusuna ait sıvı bazlı sitolojik örnekler kullanılmıştır. Değerlendirilen hücre sayısı, hücre yoğunluğu ve sinyal kalitesine bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Her prob için 50-180 arası hücre değerlendirilmiştir. Değerlendirilen hücrelerde 3q26 ve 8q24 bölgeleri için 3-5 kopya bulunması halinde “amplifikasyon pozitif” olarak değerlendirilmiştir. Kromozom 7 nin sayısal aberasyonları için değerlendirilen hücrelerin %20 sinden fazlasında 3 sinyal görüldüğünde “trizomi 7” olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 4.1. Normal hücrelere sahip 7 numaralı olgunun FISH görüntüsü

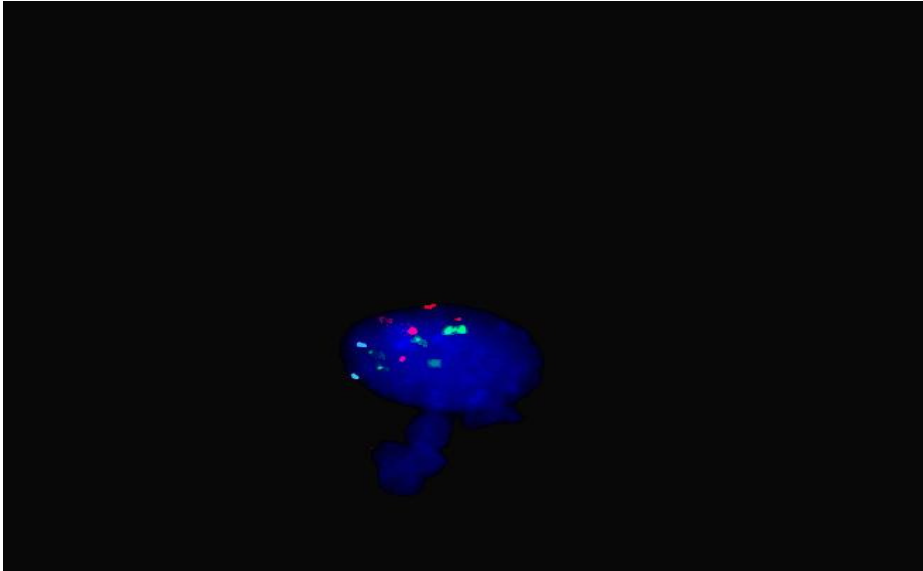


Şekil 4.2. Trizomi 7 tespit edilen 30 numaralı olgunun FISH görüntüsü

* TERC kırmızı sinyal, C-MYC yeşil sinyal, CEP 7 aqua sinyal

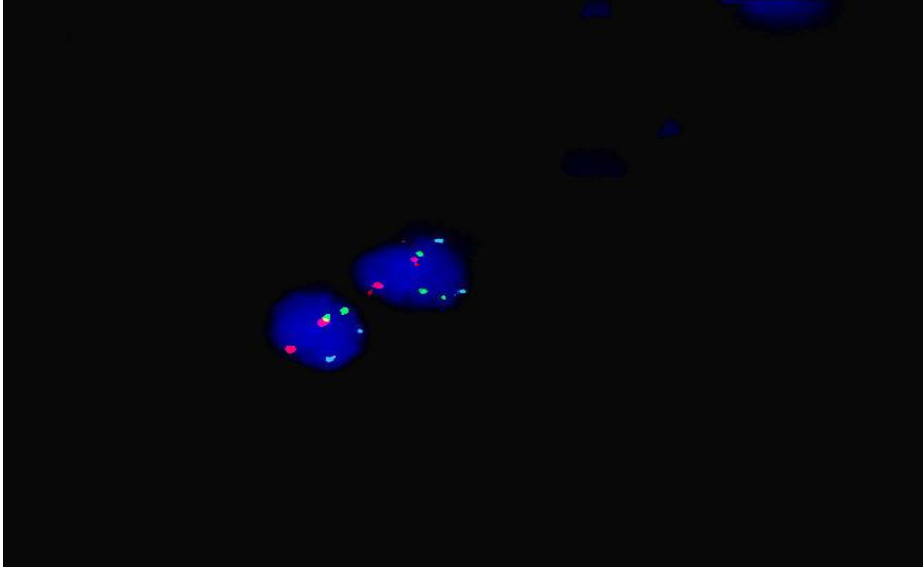


Şekil 4.3. Trizomi 7 tespit edilen 13 numaralı olgunun FISH görüntüsü

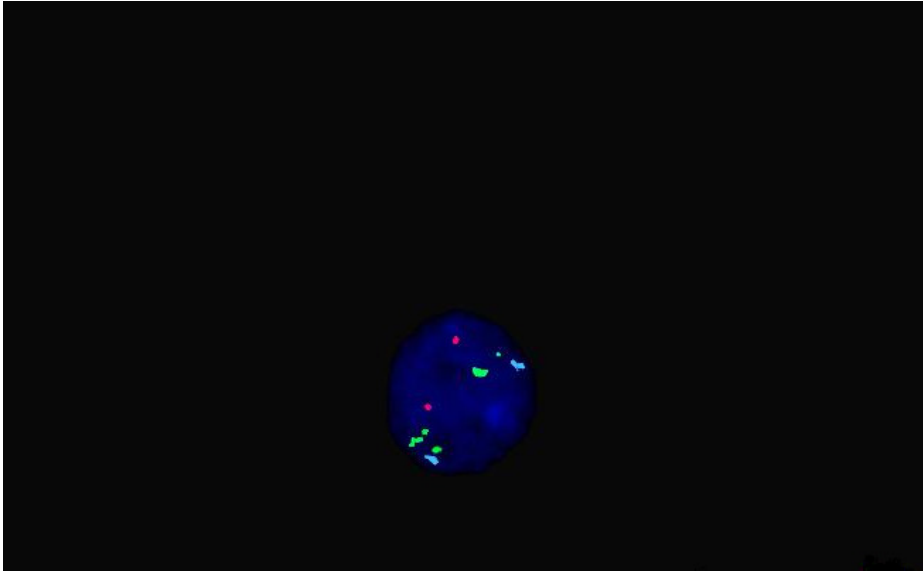


Şekil 4.4. TERC ve C-MYC gen amplifikasyonu görülen 11 numaralı olgunun FISH görüntüsü

* TERC kırmızı sinyal, C-MYC yeşil sinyal, CEP 7 aqua sinyal



Şekil 4.5. TERC ve C-MYC gen amplifikasyonu görülen 31 numaralı olgunun FISH görüntüsü



Şekil 4.6. C-MYC gen amplifikasyonu görülen 33 numaralı olgunun FISH görüntüsü

* TERC kırmızı sinyal, C-MYC yeşil sinyal, CEP 7 aqua sinyal

4.2. Preinvaziv Lezyon Aşamaları Tespit Edilen ve HPV Tiplendirmesi

Yapılan Olguların FISH Analiz Bulguları

Yapılan FISH analizinde olguların % 72 sinde (36/50) tüm problemler için normal sonuç bulunurken, % 28 inde (14/50) ise FISH analizi ile en az bir anomali tespit edilmiştir. Değerlendirmeye alınan kontrol grubu (n=10) olgularında ise FISH ile anomali tespit edilmemiştir. Tablo 4.2 de anomalilerin görülme oranı verilmiştir:

Tablo 4.2. Değerlendirilen Genetik Parametrelerin Sıklığı

GENETİK ABERASYON	Yüzde (Oran)
TERC AMPLİFİKASYONU	% 8 (4/50)
C-MYC AMPLİFİKASYONU	% 22 (11/50)
TERC&C-MYC AMPLİFİKASYONU	% 8 (4/50)
TRİZOMİ 7	% 6 (3/50)

4.2.1. TERC Gen Bölgesine Ait Aberasyonlar

TERC amplifikasyonları çalışma grubumuzda en sık görülen ikinci anomali olarak tespit edilmiştir. Olguların %8 inde (4/50) TERC gen bölgesine ait amplifikasyon gözlenmiştir. TERC gen bölgesine ait amplifikasyonlar izole anomali olarak görülmeyip C-MYC amplifikasyonu ile beraber gözlenmiştir. CIN I olgularının %3.5 inde (1/28), ASCUS olgularının %20 sinde (3/15) TERC ve C-MYC amplifikasyonu birlikte gözlenmiştir.

4.2.2. C-MYC Gen Bölgesine Ait Aberasyonlar

C-MYC gen bölgesine ait amplifikasyon çalışma grubumuzda en sık gözlenen anomali olarak tespit edilmiştir. Olguların %22 sinde (11/50) C-MYC gen bölgesine ait amplifikasyon saptanmıştır. ASCUS olgularının % 40 ında (6/15), CIN I olgularının % 14.2 sinde (4/28) ve CINI/II olarak belirlenen 1 olguda (1/2) C-MYC gen amplifikasyonu görülmüştür. C-MYC gen artışı olguların %14 ünde (7/50) izole anomali olarak görülürken, %8 ine (4/50) TERC gen amplifikasyonu eşlik etmiştir.

4.2.3. 7. Kromozom Aberasyonu

Kromozom 7 ye ait anomaliler çalışma grubumuzda en az görülen anomali olarak tespit edilmiştir. Olgularımızın % 6 sında (3/50) trizomi 7 izole anomali olarak görülmüştür. CIN I olgularının % 7.1 inde (2/28), ASCUS olgularının % 6.7 sinde (1/15) trizomi 7 tespit edilmiştir.

Tablo 4.3. FISH Analiz Sonuçları

SAYI	TERC	C-MYC	Kromozom 7	HPV TİPİ	CIN sınıflandırması
1	N	N	N	31	CIN I
2	N	AMP (+)	N	70	ASCUS
3	N	AMP (+)	N	16	CIN I
4	N	N	TRİZOMİ	16	ASCUS
5	N	N	N	53	ASCUS
6	N	N	N	16	ASCUS
7	N	N	N	58	CIN I
8	N	N	N	81	ASCUS
9	N	N	N	81	NORMAL
10	N	AMP (+)	N	11	ASCUS
11	AMP (+)	AMP (+)	N	16/53/61	ASCUS
12	N	N	N	16	CIN I
13	N	N	TRİZOMİ	18	CIN I
14	N	N	N	16	NORMAL
15	N	N	N	70	CIN I
16	N	N	N	40	CIN I
17	N	N	N	53	CIN I
18	N	N	N	6	CIN I
19	N	N	N	66	CIN I
20	N	N	N	6/11	ASCUS
21	AMP(+)	AMP(+)	N	16	ASCUS
22	N	N	N	16	CIN I

SAYI	TERC	C-MYC	Kromozom 7	HPV TİPİ	CIN sınıflandırması
23	N	AMP(+)	N	56	CIN I
24	N	N	N	59	CIN I
25	N	N	N	90	CIN I
26	N	AMP (+)	N	58	ASCUS
27	N	AMP(+)	N	16	CIN I/ II
28	N	N	N	56	CIN I
29	N	N	N	66	CIN I
30	N	N	TRIZOMİ	56	CIN I
31	AMP(+)	AMP(+)	N	18	CIN I
32	N	N	N	31	CIN I
33	N	AMP (+)	N	33	CIN I
34	N	N	N	53/61	CIN I
35	N	N	N	6	ASCUS
36	N	N	N	56	CIN I
37	N	N	N	53	NORMAL
38	N	N	N	58	CIN I
39	N	N	N	6	ASCUS
40	N	N	N	66	CIN I
41	N	N	N	6	CIN I/ II
42	N	N	N	6	ASCUS
43	AMP(+)	AMP(+)	N	18	ASCUS
44	N	N	N	11	KONDİLOM
45	N	N	N	6	KONDİLOM/CIN I
46	N	N	N	58	CIN I

SAYI	TERC	C-MYC	Kromozom 7	HPV TİPİ	CIN sınıflandırması
47	N	N	N	16	ASCUS
48	N	N	N	35/58	CIN I
49	N	N	N	61	CIN I
50	N	N	N	53	CINI I

* N: normal, AMP(+): amplifikasyon pozitif

4.2.4. TERC (3q26), C-MYC (8q24.1) Gen Amplifikasyonları ve Kromozom 7 Aberasyonları ile HPV Tipleri Arası İlişki

Çalışma grubumuzda %22 sinde (14/50) en az bir anomali gözlenmiştir. Görülen tüm anomalilerin %78.5 i (11/14) yüksek risk HPV, %14.2 si (2/14) düşük riskli HPV ve %7.1 i (1/14) hem yüksek riskli hem de düşük riskli HPV tiplerinden oluşan çoklu HPV ile enfeksiyonu olduğu tespit edilmiştir.

Sadece C-MYC gen amplifikasyonu görülen 7 olgunun 5 inde yüksek riskli HPV, 2 sinde düşük riskli HPV enfeksiyonu görülmüştür. Hem TERC hem C-MYC gen amplifikasyonu görülen 4 olgunun 3 ünde yüksek risk, 1 inde hem yüksek hem de düşük risk HPV tiplerinden oluşan çoklu HPV enfeksiyonu tespit edilmiştir. Trizomi 7 görülen olguların hepsinde yüksek riskli HPV görülmüştür.

Tablo 4.4. Görülen Anomalilerle HPV Tipleri Arasındaki İlişki

Aberasyon	Olgu no	HPV Tipi/ Risk
C-MYC AMP(+) %14 (7/50)	2	70 / DR
	3	16 / YR
	10	11 / DR
	23	56 / YR
	26	58 / YR
	27	16 / YR
	33	33 / YR
TERC & C-MYC AMP(+) %8 (4/50)	11	16/53/61 / Y-O-DR
	21	16 / YR
	31	18 / YR
	43	18 / YR
TRİZOMİ 7 %6 (3/50)	4	16 / YR
	13	18 / YR
	30	56 / YR

*Amp+: amplifikasyon pozitif, DR: düşük riskli HPV, YR: yüksek riskli HPV, OR: olası yüksek riskli HPV

4.3. Çalışmaya İlişkin İstatistik Verileri

Çalışmamızda söz konusu parametreler ve hedef genlerin amplifikasyon ve sayısal anomalileri için SPSS 16.0 istatistik programında χ^2 istatistik testi kullanılarak Fisher's Exact'a göre p değerleri hesaplanmıştır. Çalışmamızda 10 olguluk kontrol grubu kullanılmıştır. Hasta ve kontrol grubu arasındaki ilişkiyi incelemek için de yine Fisher's Exact testi kullanılarak p değeri hesaplandı. Saptanan anomalilerle olguların HPV risk tipi arasındaki ilişki χ^2 ile incelendi. Yüksek, orta ve düşük riskli HPV tiplerini içeren çoklu HPV enfeksiyonu bulunan 1 olgu yüksek risk grubuna dahil edilmiştir. $P < 0.05$ düzeyi istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Hasta ve kontrol grupları ile genetik yeniden düzenlenmeler arasında anlamlı bir ilişki tespit edilememiştir ($P > 0.05$) (Tablo 4.5.). TERC ve C-MYC gen bölgelerine ait amplifikasyon ve 7. kromozomun trizomisi ile preinvaziv lezyonlar arası anlamlı bir ilişki tespit edilememiştir ($P > 0.05$) (Tablo 4.6.). HPV risk tipleri ile genetik yeniden düzenlenmeler (TERC ve C-MYC gen amplifikasyonu ile trizomi 7) arasında ileri derecede anlamlı sonuç elde edilmiştir ($P = 0.020$) (Tablo 4.7.).

Tablo 4.5. Hasta ve Kontrol Gruplarının Karşılaştırılması

Grup	TERC ($p > 0.05$)			C-MYC ($p > 0.05$)			7. Kromozom ($p > 0.05$)		
	N	amp(+)	toplam	N	amp(+)	toplam	N	trizomi	toplam
Hasta									
n	46	4	50	39	11	50	47	3	50
%	92.0	8.0	100	78.0	22.0	100.0	94.0	6.0	100.0
Kontrol									
n	10	0	10	10	0	10	10	0	10
%	100.0	0	100	100.0	0	100.0	100.0	0	100.0

* n=olgu sayısı, amp(+)=amplifikasyon var, N=normal

Tablo 4.6. TERC ve C-MYC Gen Amplifikasyonları ve 7. Kromozomun Trizomisinin Preinvaziv Lezyonlara Göre Dağılımı

Evre	C-MYC (p=0.664)		C-MYC& TERC (p=0.0819)		7.Kromozom (p=1.000)		TOPLAM
	N	amp(+)	N	amp(+)	N	trizomi	
ASCUS n=15	12	3	12	3	14	1	15
CIN I n=32	28	4	31	1	30	2	32

* n=olgu sayısı, amp(+)=amplifikasyon var, N=normal

Tablo 4.7. TERC ve C-MYC Gen Amplifikasyonları ve 7.Kromozomun Trizomisinin HPV Risk Tiplerine Göre Dağılımı (P=0.020)

	C-MYC amp (+)	C-MYC& TERC amp (+)	Trizomi 7
YR HPV (n=12)	5 %71	4 %100	3 %100
DR HPV (n=2)	2 %29	0 %0	0 %0

* n=olgu sayısı, amp(+)=amplifikasyon var, YR=yüksek risk, DR=düşük risk

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda preinvaziv lezyon aşamaları (CIN sınıflandırması) tespit edilen ve HPV tiplendirmesi yapılan 50 hasta ve 10 kontrol olgusuna ait sıvı bazlı sitolojik örneklerde (thin prep smear yöntemi) FISH analizi yapılmıştır.

5.1. Yöntem ve Değerlendirmeye İlişkin Karşılaştırma

Moleküler sitogenetik analizlerde preparasyon aşaması oldukça önemlidir. Kaliteli sinyal almak ve ideal şartlarda analizi gerçekleştirmek için lamın belirli bir bölgesine yayılmış yeterli miktarda hücre bulunması gerekmektedir. Çalışmamızda hücre yoğunluğunu sağlayabilmek için plastik conta kullanıp hücrelerin lam üzerinde dağılmaları engellenmiştir (47).

Çalışmamızda thin prep smear testi ile alınan sıvı bazlı sitolojik örneklerden hazırlanan preparatlarda FISH analizi gerçekleştirilmiştir. Pap smear testi serviks kanserine bağlı ölümleri azalttığı kabul edilmiş önemli bir tarama testidir. Normal pap smear testlerinde serviksten alınan hücre döküntüleri lam üzerine direkt yayılmaktadır. Ancak bu işlem sırasında hücreler, ezilip, katlanabilmekte ve kanlı, koyu akıntı içerisinde kalabilmektedir. Thin prep tekniğinde ise örnek tamponlanmış alkol dolu bir kap içerisine toplandıktan sonra özel bir filtre sisteminden geçirilerek, akıntı ve iltihap ortamdan uzaklaştırılır ve sadece servikse dökülen hücrelerin incelenmesi sağlanır. Bu yöntemin 4 kat daha fazla duyarlı olduğu belirtilmektedir (31,36). Ayrıca thin prep için alınan örnekler pap smear yanında, başta HPV-DNA testi olmak üzere genetik araştırmalarda dahil pek çok testin yapılmasına olanak sağlamaktadır (31,36). Smear alınması son derece basit ve ağrısızdır. Dolayısıyla bu yöntemle elde edilen materyalle hem HPV risk tipinin belirlenmesi hem de genetik incelemelerin yapılabilmesi, genetik analizlerin de diğer tarama yöntemleriyle birlikte kullanılabilmesini göstermektedir.

Caravay ve arkadaşlarının (2008) yaptığı çalışmada sıvı bazlı servikovajinal preparatlar hazırlanarak, histolojik açıdan da doğrulanıp TERC (3q26) gen artışı için sadece atipik hücreler (her olgu için 25 atipik hücre) değerlendirilmiştir. Araştırmacılar ortalama 5.5 hücrede 2 den fazla sinyal gördüklerinde “amplifikasyon pozitif” olarak değerlendirmişlerdir (15). *Heselmayer-Haddad ve arkadaşlarının* (2003) yaptıkları çalışmada ince kesitlerle hazırlanan preparatlarda her olgu için 209-3903 arası hücre değerlendirilmiş ve en az bir hücrede 3q için 5 ya da 6 sinyal görülmesi durumunda “amplifikasyon pozitif” olarak değerlendirmişlerdir (28). Ancak daha sonra aynı araştırmacılar 2005 yılında pap smear örnekleriyle yaptıkları başka bir çalışmada hibridizasyon kalitesinin iyi olmaması nedeniyle yanlış pozitiflikten kaçınmak için cut off değerini %20 olarak kabul etmişlerdir (27).

Hopman ve arkadaşları (2006) parafine gömülü endoservikal ve ektoservikal biyopsilerle analiz yapmışlardır. Cut off değerini %10-20 olarak belirleyip, TERC gen artışının tespiti için 100-200 hücre değerlendirmişlerdir (29).

Seppo ve arkadaşları (2009) ise yaptıkları çalışmada sadece sıvı bazlı sitolojik örnekler kullanmışlardır. Araştırmacılar üçüncü kromozomun uzun kolundaki artışı değerlendirirken, 2 den fazla hücrede 5 ve daha fazla sinyal gördüklerinde anlamlı kabul etmişlerdir (64).

Tu ve arkadaşları (2009) hem sitopatolojik (thin prep) hem de histopatolojik inceleme yapmışlardır. Farklı üç merkezden örnek alıp incelemişlerdir. TERC gen artışı için tüm anormal sinyal patternelerinin ortalamasını alarak cut off değeri belirlemişlerdir. Her merkez için 20 kontrol grubu almışlardır. Buna göre cut off değerleri, birinci merkez için %5.2, ikinci merkez için %5.6, üçüncü merkez için %6.4 olarak belirlemişlerdir. Bu şekilde her olgudan ortalama 100 nükleus sayıp, TERC gen amplifikasyonu için hücrede 3-6 sinyal bulunması halinde düşük düzeyde amplifikasyon olarak değerlendirmişlerdir (70).

Sokolova ve arkadaşları (2007) yaptıkları çalışmada hem sitopatolojik hem de histopatolojik inceleme yaparken HPV DNA sı ile birlikte, TERC ve C-MYC gen

bölgelerini içeren bir prob seti kullanmışlardır. Böylece tek bir hücrede hem HPV enfeksiyonunu hem de gen amplifikasyonlarını görebilmişlerdir. Bu şekilde her preparatta 100 HPV pozitif hücre analiz etmişlerdir. Eğer bir hücrede hem HPV enfeksiyonu hem de herhangi bir kromozom anomalisi varsa bu hücreyi “çift-pozitif hücre” olarak isimlendirmişlerdir. Her olguda en az 4 “çift-pozitif hücre”nin görülmesini anlamlı kabul etmişlerdir (66).

Zhang ve arkadaşları (2002) ise gen amplifikasyonlarının tespiti için her örnekten en az 100 hücre sayıp %50 den fazlasında 3 ve daha çok sinyal varsa “amplifikasyon pozitif” olarak değerlendirmişlerdir (76).

Mian ve arkadaşları (1999), sayısal kromozom aberasyonlarını incelerken olguları önce sitolojik olarak gruplandırmışlardır. Daha sonra ise histolojik açıdanda değerlendirip tekrar sınıflandırmışlardır. Her olgudan 100-150 nükleus inceleyip cut off değerini %20 olarak almışlardır (50).

Bulten ve arkadaşları (1998) yaptıkları çalışmalarda sadece biyopsi materyaliyle analiz yapmışlardır. Her olguda ortalama 200 hücre değerlendirmişlerdir. Her nükleustaki kromozom kopya sayısındaki artışı nükleus sayısına oranlayarak buldukları değeri evrelerle karşılaştırarak değerlendirme yapmışlardır (13).

Görüldüğü gibi hem değerlendirme hem de kullanılan materyal bakımından literatürler oldukça değişiklik göstermektedir. Bizim çalışmamızda *Seppo ve arkadaşlarının* çalışmasında olduğu gibi invaziv bir yöntem olmaması ve temini kolay olması nedeniyle sadece sıvı bazlı sitolojik örnekler kullanılmıştır. Değerlendirme sırasında atipik hücrelerle beraber normal hücrelerde sayılmıştır. *Heselmeyer-Haddad ve arkadaşları*, *Hopman ve arkadaşları*, *Mian ve arkadaşlarının* analizlerinde olduğu gibi yanlış pozitiflikten kaçınmak için değerlendirilen tüm parametreler için cut off değerini %20 olarak her olguda 50-180 arası hücre analiz edilmiştir. *Heselmeyer-Haddad (2003)*, *Seppo* çalışmalarında yüksek riskli lezyon ve invaziv kanserli hücrelerde TERC ve C-MYC gen amplifikasyonunu 5 ve daha fazla sinyal artışı olarak görmüşlerdir. Düşük riskli lezyonlarda ise daha az sayıda kopya artışı olduğunu

belirtmektedirler (28,64). Bizim olgu grubumuzu düşük riskli lezyonlar olan ASCUS ve CIN I evrelerinin oluşturması nedeniyle değerlendirilen hücreserde 3q26 ve 8q24 bölgeleri için 3-5 kopya bulunması halinde hücreler “amplifikasyon pozitif” olarak değerlendirilmiştir.

Serviksten dökülen hücrelerden temin edilen smear örnekleri, serviksten alınan biyopsi örneğindeki kadar atipik hücreleri barındırmamaktadır. Bu nedenle *Caraway ve arkadaşları*, *Tu ve arkadaşarı*, *Sokolova ve arkadaşları*, *Mian ve arkadaşları* yaptıkları çalışmalarda örneklerini sitolojik açıdan değerlendirip aynı zamanda çalışmalarını biyopsi materyali olarak histopatolojik inceleme ile desteklemişlerdir (15,50,66,70). Çalışmamızda thin prep smear testi, temini kolay aynı zamanda basit ve ağrısız bir işlem olması nedeniyle kullanılmıştır. Ancak biyopsi materyali lezyonun derecesi hakkında daha doğru ve güvenilir bilgi verebilmektedir. Bu nedenle çalışmamızın bir sonraki aşamasında hastaların takibi sırasında, biyopsilerinde analiz edilerek, bulgularımızın histopatolojik değerlendirme ile karşılaştırılmasının yararlı olacağını düşünmekteyiz.

Tablo 5.1. TERC (3q26) / C-MYC (8q24) Gen Amplifikasyonları ve Trizomi 7
Sonuçlarının Literatür Verileri ile Karşılaştırılması

Araştırmacı ismi	Olgu Sayısı (n)	FISH		
		TERC	C-MYC	Kromozom 7
<i>Mian ve ark (99)</i>	80	–	–	% 45
<i>Zhang ve ark (02)</i>	84	–	%25	–
<i>Heselmeyer-Haddad ve ark (03)</i>	57	% 37	–	–
<i>Yong-Hua ve ark (03)</i>	63	–	% 58.7	–
<i>Heselmeyer-Haddad ve ark (05)</i>	34	% 58.8	–	–
<i>Hopman ve ark (06)</i>	37	% 40.5	–	–
<i>Caraway ve ark (08)</i>	66	% 66.6	–	–
<i>Jiang ve ark (08)</i>	301	% 13.6	–	–
<i>Seppo ve ark (09)</i>	257	% 17.8	–	–
<i>Tu ve ark (09)</i>	1033	% 14.6	–	–
Bizim Çalışmamız (09)	50	% 8	% 22	% 6

5.2. FISH Yöntemi ile Saptanan Anomalilerle Literatür Bilgilerinin Karşılaştırılması

5.2.1. TERC Gen Amplifikasyonlarının FISH Yöntemi Sonuçları İle Literatür Bilgilerinin Karşılaştırılması

Çalışmamızda servikal preinvaziv lezyonlarda FISH yöntemi ile TERC geninin amplifikasyonları araştırılmıştır. Elde ettiğimiz veriler, literatürde benzer çalışmalarla karşılaştırılmıştır.

Tablo 5.1. de görüldüğü gibi literatürlerde preinvaziv lezyonlar ve servikal kanserli olgularda TERC gen amplifikasyonunun oranları %13.6 - %66.6 gibi çok geniş bir aralık içerisinde yer almaktadır. Bizim çalışmamızda TERC gen amplifikasyonu için FISH yöntemi ile elde ettiğimiz %8 lik oran düşük olmakla birlikte *Jiang ve*

arkadaşları, Tu ve arkadaşlarının bulduğu %13.6 lık ve %14.6 lık orana yakın bir sonuç olarak değerlendirilebilmektedir. Ayrıca *Jiang, Tu ve Seppo* nun çalışmalarında thin prep yöntemiyle alınan smear örnekleri kullanılmıştır (43,64,70). Her üç literatürde de olgu sayıları yüksek olmasına rağmen diğer literatürlere göre anomali oranlarının daha düşük olması çalışmamızla uyum sağlamaktadır. Literatürüne ulaşılan ve TERC gen amplifikasyonuna bakılmış toplam 7 çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalarda farklı materyallerle (biyopsi, kesit, smear) ve farklı cut off değerleriyle araştırma yapılmıştır. Araştırmalar incelendiğinde olgu gruplarını daha çok yüksek preinvaziv lezyonların ve invaziv kanser olgularının oluşturduğu görülmektedir. Literatürlerde genetik aberasyonların daha çok düşük riskli premalign lezyonlarda ve kanser olgularında görüldüğü belirtilmektedir. Olgu grubumuzun düşük preinvaziv lezyonları bulunan hastalardan oluşması ve smear örnekleri olması %8 lik amplifikasyon oranımızın literatüre göre düşük olmasını açıklayabilmektedir. Ancak bu konuda yapılan çalışmalardan alınmış çok farklı sonuçlar olması da dikkat çekicidir. Az sayıda yapılmış olan bu çalışmalardaki bu oran farkının açıklanabilmesi için kısmen homojen gruplar ve materyallerde yapılacak geniş serilerdeki çalışma sonuçlarının karşılaştırılmasına ihtiyaç vardır. Ayrıca toplamda TERC gen amplifikasyonu oranımız düşük olmakla birlikte preinvaziv evreler düzeyinde değerlendirildiğinde literatürlerle uyumlu sonuçlar elde edilmiştir (15,28,43,70).

Caraway ve arkadaşlarının 2007 yılında FISH yöntemiyle yaptığı çalışmada sıvı bazlı sitolojik örneklerle normal 4, ASCUS 15, LSIL 20, HSIL 24 ve invaziv kanser 3 olan toplam 66 olgu değerlendirilmiştir. Ancak daha sonra yapılan biyopsi ile 20 LSIL olgunun 5 i koilositosis, 7 si CIN I ve 8 i CIN II-III olarak tespit edilmiştir. Normal sitoloji gösteren olguların hiçbirinde 3q26 artışı görülmemiştir. Buna karşılık ASCUS olgularının %20 sinde (3/15), LSIL olgularının %70 inde (14/20), HSIL ve invaziv kanser olan olgularının tümünde TERC amplifikasyonu saptanmıştır. Bununla birlikte 3q26 artışı ile sitolojik prekanseröz lezyon aşamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir sonuca ulaşmışlar, HSIL ve invaziv kanser olan olgularda, normal patoloji gösteren ve ASCUS olan olgulara göre 3q26 artışı olan hücrelerin yüzdesinin daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir (15).

Heselmayer-Haddad ve arkadaşlarının 2003 yılında yaptıkları çalışmada 68 olgudan 57 si değerlendirilebilmiştir. Normal 13, ASCUS 5, LSIL 14 ve HSIL (CIN II 8, CIN III 17) 25 olan toplam 57 olgudan ince kesitler alarak hazırlanan preparatlarında normal olguların %15.4 ünde (2/13), LSIL olguların %7.1 inde (1/14), HSIL (CIN2) %62.5 inde (5/8), HSIL (CIN III) %76.4 ünde (13/17) 3q26 artışı görülmüştür. Ancak ASCUS tanısı alan olgularda TERC amplifikasyonu görülmemiştir. Araştırmacılar 3q artışının genetik açıdan stabil olan hücrelerde de görülebileceğini, ancak kromozomal instabilitenin özellikle daha yüksek evrelerde ortaya çıktığını düşünmektedirler. Bazı olgularda 3q artışı tetraploidi olarak gözlenmiştir (3q,CEP3,CEP7). Buna göre FISH analizinde değerlendirme yapılırken pek çok kriteri göz önünde bulundurmışlardır. Araştırmacılar her olguda 3q artışı görülen hücrelerin yüzdesi ve 3q artışı olan hücrelerdeki sinyal artışının preinvaziv lezyonun ciddiyeti doğrultusunda arttığını düşünmektedirler (28).

Jiang ve arkadaşlarının 2008 yılında 301 olguyla yaptıkları çalışmalarında sıvı bazlı sitolojik preparatlar kullanılarak TERC amplifikasyonunun yüksek riskli HPV ile birlikte sitolojik ve histolojik bulguları karşılaştırılmıştır. Buna göre normal olguların %3 ünde (6/203), ASCUS olgularının %21.2 sinde (14/66), LSIL olgularının %44.4 ünde (8/18) ve HSIL olgularının da %92.9 unda (13/14) TERC amplifikasyonu tespit edilmiştir. CIN II (%75 hücrede), CIN III (%86.7 hücrede) ve SCC (skuamöz servikal karsinoma) (%100 hücrede) de CIN I e (%20 hücrede) göre daha fazla hücrede 3q26 amplifikasyonu gözlenmiştir. Yüksek riskli preinvaziv lezyonlarda TERC amplifikasyonunun tespitinin, yüksek riskli HPV tespitinden ve de sitolojik taramalardan daha önemli olabileceğini belirtmektedirler (43).

Hopman ve arkadaşlarının 2006 yılında yaptıkları çalışmada parafine gömülü endoservikal ve ektoservikal biyopsiler kullanılarak onkogenik HPV ile kromozom instabilitesi ve TERC amplifikasyonu arasındaki ilişki araştırılmıştır. Buna göre 17 CIN II/III olgusunun 3 ünde (%18), 13 CIN III /mCA olgusunun 7 sinde (%54) ve 7 invCA olgusunun 5 inde (%70) TERC artışı gözlenmiştir. Araştırmacılar TERC gen artışı bazı olgularda trizomi olarak görmüşlerdir. Ayrıca preinvaziv lezyon derecesi artışıyla, TERC gen artışı arasında önemli bir bağlantı olduğunu düşünmüşlerdir (29).

Heselmeyer-Haddad ve arkadaşlarının 2005 yılında yaptığı diğer bir çalışmada da, CIN I ve II den CIN III e ilerleyen (2 ay-2 yıl arası)12 olgunun 9 unda, normal pap smear olup 1-3 yıl içerisinde CIN III ve invaziv kansere progrese olan 12 olgunun 11 inde TERC amplifikasyonu tespit edilmiştir. Bu 11 olgunun 4 ünde pap smear tarama sonucu normalken TERC artışı görülmüştür. Araştırmacılar TERC amplifikasyonunun normal pap smear sonrası CIN III ya da invaziv kanser gelişiminde spesifik marker olarak kullanılabileceğini belirtmektedirler. CIN I ve II olup daha sonra spontan olarak gerileyen olguların (n=10) hiçbirinde TERC amplifikasyonu görülmemiştir. İstatistiksel açıdan incelendiğinde TERC amplifikasyonu ile karsinoma gelişimi arasında önemli bir ilişki olduğu tespit edilmiştir. Araştırmacılar TERC gen artışının görülmesinin sadece displazinin teşhisi için değil, aynı zamanda da lezyonların progrese olup olmayacağı konusunda bilgi sağlayabileceğini düşünmektedirler (27).

Seppo ve arkadaşlarının 2009 yılında yaptıkları çalışmada FISH analizi ile 257 likit sitolojik örnek değerlendirilmiştir. Doksan yedi normal pap smear olan olguların %3 ünde, 135 LSIL nin %22 sinde ve 25 HSIL nin de %52 sinde TERC gen amplifikasyonu tespit edilmiştir. Çalışmada 3q artışı ile preinvaziv lezyon aşamaları arasında önemli bir ilişki olduğu, ayrıca displazi derecesi arttıkça hücrede 3q kopya sayısının arttığı tespit edilmiştir (64).

Tu ve arkadaşlarının 2009 yılında 1033 sitopatolojik ve histopatolojik örneklerle yaptıkları FISH analizinde, normal (benign hücresel değişiklikler) olguların %4.6 sında, ASCUS olgularının %13.5 inde, ASC-H olgularının %28.6 sında, LSIL olgularının %25.2 sinde ve HSIL olgularının %87.7 sinde TERC amplifikasyonu gözlenmiştir (70).

Çalışmamızda ASCUS olgularının %20 sinde TERC gen amplifikasyonu görülmüştür. Bu oran *Heselmeyer-Haddad* (2003) ve *Tu* nun oranından (%13.5) yüksek bulunurken, *Caraway ve arkadaşları*, *Jiang ve arkadaşları*' nin oranlarıyla (%20, %21.2) aynı olduğu görülmüştür (15,28,43,70). CIN I olgularımızın ise %3.5 inde TERC amplifikasyonu görülmüştür. Bu oran literatür oranlarının altındadır. Buna cut off değerlerinin farklı olması ve kullanılan materyallerin değişkenlik göstermesi

(smear, biyopsi, kesit) bizim oranımızın düşük olmasını açıklayabilmektedir. Ayrıca literatürlerin çoğunda normal olgularda da TERC amplifikasyonu tespit edilmiştir. Ancak çalışmamızda normal sitoloji gösteren olgularımızın hiçbirinde TERC amplifikasyonu görülmemiştir. Buda *Caraway ve arkadaşlarının* yaptığı çalışma ile uyum sağlamaktadır.

Heselmeyer-Haddad ve arkadaşları (2003) yaptığı çalışmada preinvaziv lezyonun derecesi arttıkça (CIN I, CIN II, CIN III ve invaziv kanser) 3q artışı görülen hücrelerde sinyal sayısının da arttığını belirttiktedirler (28). Bizim çalışmamızda 3q26 kopya artışı görülen olgularda düşük düzeyde sinyal artışları saptanmıştır (olgularda tüm hücrelerde 3-5 sinyal). Bizim çalışmamızdaki ve diğer çalışmalardaki düşük lezyonlu olguların sonuçları karşılaştırıldığında verilerin uyumlu olduğu görülmüştür. *Hopman ve arkadaşlarının (2006)* yaptığı çalışmada biyopsi materyali ile yüksek preinvaziv lezyonlarda analiz yapmışlardır ve yüksek oranda TERC gen amplifikasyonu (%40.5) tespit etmişlerdir (29). TERC geni için anomali oranımızın (%8) literatürden daha düşük olmasının nedeni olgu grubumuzun düşük preinvaziv lezyonu bulunan hastalardan oluşmasıdır. Dolayısıyla çalışmamız, bu yönüyle TERC gen artışının yüksek preinvaziv lezyonlarda ve invaziv kanserde daha sık görüldüğünü doğrulamaktadır.

Heselmeyer-Haddad ve arkadaşları (2005) yaptıkları diğer çalışmalarını takipte olan hastalarla yapmışlardır. TERC amplifikasyonu progrese olan olgularda görülürken, spontan olarak gerileyen olgularda görülmemiştir (27). Çalışmamızda olgularımızın %92 sinde TERC gen amplifikasyonunun görülmemesi bu olgulardan pek çoğunun ileriki yıllarda spontan olarak gerileyebileceğini ya da bu olgularda henüz malign transformasyonun başlamadığını düşündürmekte olup takibinin gerekliliğini ortaya koymaktadır.

5.2.2. C-MYC Gen Amplifikasyonlarının FISH Yöntemi Sonuçları İle Literatür Bilgilerinin Karşılaştırılması

Çalışmamızda %22 oranında C-MYC gen amplifikasyonu tespit edilmiştir. Literatürlerin birçoğunda C-MYC geni üzerinde HPV entegresini görebilmek için metafaz plakları üzerinde çalışmalar yapılmıştır. Bunların dışında literatürüne ulaşılabilen ve preinvaziv servikal lezyonlarda FISH yöntemi ile hücre ya da doku düzeyinde C-MYC gen amplifikasyonuna bakılmış iki çalışma vardır (Tablo 5.1.). Bu çalışmalarda verilen C-MYC amplifikasyon oranları %25, %58.7 dir (75,76). *Zhang ve arkadaşlarının* yaptıkları çalışmada biyopsi materyali ile sadece invaziv kanser olguları değerlendirilmiş olmasına rağmen, bizim oranımız *Zhang ve arkadaşlarının* oranı ile uyum sağlamaktadır. Olgu grupları açısından bakıldığında ise *Zhang ve Yong-Hua* nın olgu sayısı ile çalışmamızda kullanılan olgu sayısı arasında önemli bir fark görülmemiştir. Ancak *Yong-Hua ve arkadaşlarının* çalışmalarında olgu grubunun büyük çoğunluğunu invaziv kanser olguları oluşturmaktadır. Bu nedenle araştırmacıların anomali oranları çalışmamız ile karşılaştırıldığında daha yüksek olduğu görülmüştür. Bu konuda literatürde bulunan az sayıdaki çalışma ile sonuçlarımızın yeterli şekilde tartışılmayacağı görülmekte olup geniş serilerde yapılacak araştırmalarla sonuçlarımızın karşılaştırılması gerektiği düşünülmektedir.

Zhang ve arkadaşlarının 2002 yılında FISH ve IHK ile yaptıkları çalışmada 84 tümör hücresinin (68 skuamöz, 16 adenokarsinoma) %25 inde (21/84) düşük düzeyde C-MYC amplifikasyonu tespit edilmiştir. Servikal tümörlerde amplifikasyonlar, genellikle düşük kopya artışı şeklinde görülmüş olup C-MYC amplifikasyonu tespit edilen olguların 13 ü erken evre tümör (%62), 8 i ise yüksek evre tümör (%38) olduğu bildirilmektedir (76). Ayrıca immünohistokimyasal boyama ile 17 C-MYC amplifikasyonu görülen olguların 12 sinde (%70) protein ekspresyon artışı görülmüştür. Solid tümörlerde onkogenlerin yüksek düzeyde kopya sayısı artışı görülmesine karşın servikal kanserde sadece düşük düzeyde kopya artışları görüldüğünü, HPV enfeksiyonu ve genetik değişiklik arasındaki ilişkinin servikal kanserin gelişimi süresinde ilk adım olduğunu ileri sürmektedirler (76).

Yong-Hua ve arkadaşlarının In Situ Hibridizasyon ile yaptığı çalışmada, 37 invaziv kanser olgusunun (11 i kemoterapiden sonra) %75.7 sinde, 21 CIN lezyonun %42.9 unda C-MYC ekspresyonunda artış görülmüştür. Beş normal olguda ise hiç ekspresyon artışı görülmemiştir. Kemoterapiden sonra bakılan olgularda diğer olgulara göre daha az ekspresyon artışı görmüşlerdir. Araştırmacılar C-MYC ekspresyonunun displazi derecesi arttıkça arttığını ve C-MYC geninin aşırı ekspresyonunun servikal kanser gelişiminde önemli rol oynadığını belirtmektedirler (75).

Çalışmamızda C-MYC gen amplifikasyonu en sık görülen anomali olarak karşımıza çıkmaktadır. Ayrıca ASCUS olgularının %40 ında, CIN I olgularının %14.2 sinde ve CIN I/II olan 1 olguda C-MYC gen amplifikasyonu tespit edilmiştir. *Zhang ve arkadaşları*, *Yong-Hua ve arkadaşları* tümör hücreleri ile çalışmış olmaları nedeniyle düşük lezyonlarda da anomali oranları yüksektir (%62,%42.9) (75,76). *Zhang ve arkadaşları* solid tümörlerde onkogen amplifikasyonlarını yüksek düzeyde kopya artışı şeklinde gördüğü, ancak servikal kanserde düşük düzeyde kopya artışları görüldüğünü belirtmektedirler. Dolayısıyla çalışmamız, C-MYC geni için düşük düzeyde amplifikasyonlar görülmesi bakımından *Zhang ve arkadaşlarının* bulgularıyla uyum göstermektedir. Ayrıca *Yong-Hua ve arkadaşlarının* çalışmalarında normal olgularda ekspresyon artışının görülmemesi çalışmamızla uyum sağlamaktadır. Gelecekte çalışmamızı oluşturan olgu grubu ile tümör hücreleri ya da biyopsi materyali ile değerlendirme yaparak ya da C-MYC amplifikasyonu görülen olgularda protein ekspresyonunu inceleyerek sonuçlarını karşılaştırılmasının yararlı olacağını düşünmekteyiz.

5.2.3. TERC ve C-MYC genlerinin FISH Yöntemi Sonuçları ile Her İki Genin de Beraber Çalışıldığı Literatür Bilgilerinin Karşılaştırılması

Sokolova ve arkadaşlarının 2007 yılında FISH yöntemiyle yaptıkları çalışmada servikal displastik lezyonu ve HPV enfeksiyonu olan 235 olguda, HPV enfekte hücreler ile 3q26 ve 8q24 bölgelerine ait kopya sayısındaki artış arasındaki korelasyon incelenmiştir. Çalışmada HPV pozitif olan hücreler değerlendirilmiştir. Örnekler hem

sitolojik hem de histolojik açıdan değerlendirilmiş ve TERC ya da C-MYC gen amplifikasyonu tespit edilen olguların yüzdesi şu şekilde verilmiştir: ASCUS/ CIN II %33, ASCUS/ CIN III %25, LSIL/ negatif %45, LSIL/ CIN I %56, LSIL/ CIN II %81, LSIL/ CIN III %80, HSIL/ CIN II %78, HSIL/ CIN III %86 (sitolojik/histolojik evreleme) (66).

Çalışmalarında her iki gen bölgesine ait kopya sayısındaki artışın, displazinin ciddiyeti ile doğru orantılı olarak arttığı tespit edilmiştir. Olgularda genellikle her iki gen bölgesi için de düşük düzeyde kopya artışı saptanmıştır.

Huang K.F. ve arkadaşlarının 2007 yılında CGH ile yaptıkları çalışmada 30 squamöz servikal karsinomalı olguların %46.7 sinde 3q artışı, % 20 sinde 8q artışı tespit etmişlerdir. Üç olguda (%10) ise her iki gen bölgesine de ait artış saptamışlardır. Çalışmada 3q artışı en sık görülen anomali olarak bildirilmektedir. Ayrıca TERC geni dahil 3.kromozomun uzun kolunda bulunan pek çok genin kopya sayısındaki artışın bir çok kanser türünde görüldüğünü bildirmektedirler (40).

Huang F.Y. ve arkadaşlarının yaptığı (2005) çalışmada da yine CGH analizi ile 28 servikal tümör ve 5 servikal hücre hattı ile çalışılmıştır. Örneklerin %96.4 ünde çoklu genetik değişiklikler saptamışlardır. Olguların % 32 sinde 3q, %50 sinde 8q için yüksek düzeyde kopya artışı bildirilmektedir. Beş servikal tümörde (%21.4) ve 1 servikal hücre hattında ise her iki gen bölgesine ait kopya artışı tespit etmişlerdir (39).

Çalışmamızda olguların %22 sinde (11/50) C-MYC gen bölgesine ait amplifikasyon saptanmıştır. Bunun yanında ASCUS olgularının % 40 ında (6/15), CIN I olgularının % 14.2 sinde (4/28) ve CIN I/II olarak tespit edilen 1 olguda C-MYC gen amplifikasyonu görülmüş olup, C-MYC gen artışı, olguların %14 ünde (7/50) izole anomali olarak görülürken, %8 ine (4/50) TERC gen amplifikasyonu eşlik etmiştir. Ayrıca TERC ve C-MYC gen amplifikasyonları düşük düzeyde amplifikasyonlar şeklinde görülmüştür. Bu durum *Sokolova ve arkadaşlarının* çalışması ile uyum göstermektedir. Literatürde sitolojik evreleme ile histolojik evreler arasında önemli farklar bulunmaktadır. Sitolojik evrelemede ASCUS ve LSIL görünen olgular biyopsi

sonrasında yüksek prekanseröz lezyon olarak değerlendirilmiştir (66). Bu nedenle her evrede anomali oranları oldukça yüksektir. Ancak bu çalışmalarda TERC ve C-MYC gen amplifikasyonu birlikte bakılmasına karşın iki anomalinin kaç olguda bir arada görüldüğü belirtilmemiştir. Dolayısıyla literatürle çalışmamız arasında bir karşılaştırma yapılamamıştır. FISH yöntemi ile TERC ve C-MYC gen amplifikasyonlarının bir arada incelendiği başka bir literatür bulunmadığı için CGH ile yapılan çalışmalarla karşılaştırma yapılmıştır.

Çalışmamızda her iki gen amplifikasyonunun birlikte görüldüğü olguların oranı %8 dir. Bu oran *Huang K.F. ve arkadaşlarının* oranına (%10) yakinken, *Huang F.Y. ve arkadaşlarının* oranının altındadır (%21.4) (39,40). Tümör hücreleri ve servikal hücre hatlarıyla değerlendirme yapmış olmaları anomali oranlarının yüksek olmasına neden olmuştur. Ayrıca CGH analizi ile 3q ya da 8q üzerindeki pek çok genin artışı görebilmişlerdir. Bu bölgeler üzerinde TERC (3q26) ve C-MYC (8q24) gen bölgelerindeki amplifikasyonları doğrulamak için FISH analizine ihtiyaç bulunmaktadır. İki genin birlikte amplifikasyon oranını tartışabileceğimiz kısıtlı sayıda literatür bulunmaktadır. Bu konudaki verilerin geniş serilerde yapılacak çalışmaların sonuçları ile karşılaştırılması gerektiği düşünülmektedir.

5.2.4. Kromozom 7 nin FISH Yöntemi Sonuçları ile Literatür Bilgilerinin Karşılaştırılması

Kromozom 7 ile ilgili sayısal değişiklikler özellikle de artışı çeşitli malignensilerde rapor edilmiştir (prostat kanser, kolorektal neoplazi, renal karsinoma, mesane kanseri ve orofarinks malignoma) (57). Bunun yanında *Mian ve arkadaşları*, *Pieber ve arkadaşları*, *Bulten ve arkadaşları*, *Marzano ve arkadaşları* kromozom 7 trizomisinin premalign lezyonların progresyonunun takibinde önemli olabileceğini düşünmektedirler (13,49,50,57). Ancak literatürler arasında kromozom 7 ile ilgili fikir karmaşası bulunmaktadır. Literatürlerin birçoğunda TERC gen amplifikasyonu incelenirken ploidi durumunu ekarte edebilmek için kromozom 7 kontrol probu olarak kullanılmıştır. Bunun gerekçesi olarak da bir literatürde kromozom 7 ile ilgili sayısal

değişikliklerin servikal karsinomalarda nadir görülen bir durum olduğu gösterilmektedir (28). Bizim çalışmamızda da trizomi 7 en az görülen anomali olarak karşımıza çıkmaktadır (%6). Kromozom 7 nin preinvaziv lezyonlar ve servikal kanser üzerinde oluşturduğu etkileri daha iyi anlayabilmek için daha fazla sayıda ya da yüksek preinvaziv lezyon ve invaziv servikal kanserli olguda sonuçların değerlendirilmesi gerekmektedir. Bulgularımız bize trizomi 7 nin servikal karsinomalarda az görülen bir anomali olduğunu düşündürmektedir.

Mian ve arkadaşlarının 1999 yılında FISH analiziyle yaptıkları çalışmada, örnekler sitolojik ve histolojik olarak iki şekilde evrelendirilmiştir. Sitolojik olarak 20 kontrol , LSIL 31(CIN I 10, CIN II 10) ve HSIL 29 olgu bulunmaktadır. Histolojik olarak ise CIN I 12, CIN II 16 ve CIN III 21 olarak değerlendirilmiştir. Araştırmalarında LSIL olgularının %41.7 sinde trizomi 7 saptanmıştır. Üç olgu trizomi 3 ile beraber görülmüştür. Ayrıca HSIL olan olguların %79.3 ünde trizomi 7 görülmüştür. Dokuz olguda trizomi 3 ile görülmüştür. Yapılan istatistik analizlere göre sitolojik evreleme ile trizomi 7 arasında ve trizomi 3 ve trizomi 7 arasında önemli bir korelasyon olduğu tespit edilmiştir. Araştırmacılar kromozom 7 nin trizomisinin premalign lezyonların progresyonunun takibinde önemli bir marker olabileceği kanısına varmışlardır (50).

Pieber ve arkadaşlarının 2000 yılında FISH analiziyle yaptıkları çalışmada, biyopsi materyali ile normal servikal smear 19 kadın (PAPI-II) kontrol grubu olarak alınmıştır. Ondört CIN III, 5 CIN II, 1 CIN I ve displastik değişimi olmayıp normal epitelyumu olan 1 olgu olmak üzere toplan 21 olgunun servikal smear materyaliyle çalışmışlardır. Çalışmada sonuçlar smear örneklerindeki total hücre sayısına göre değerlendirilmiştir. Her olguda trizomi 7 li hücrelerin sayısındaki artışa göre, trizomili hücrelerin sayısının CIN III ve CIN II de kontrol grubuna göre daha fazla olduğunu belirtmektedirler. Ayrıca displazinin derecesi arttıkça normal hücre sayısının azaldığı görülmüştür. Kromozom 7 trizomisinin özellikle CIN II lezyonlarda neoplastik dönüşümler için erken teşhis olabileceğini düşünmektedirler (57).

Bulten ve arkadaşlarının 1998 yılında yaptıkları çalışmada, ISH analizi ile 30 olgu çalışılmıştır (6 normal, 5 CIN I, 7 CIN II, 7 CIN III ve 5 invCA). Çalışmalarında 1,3,6,7,8,11,17,X kromozomlarındaki sayısal artışları incelemişlerdir. Kontrol grubunda hiçbir kromozom anomalisi görülmemiştir. Preinvaziv lezyon grubunun %94 ünde en az bir kromozom için aberasyon görmüşlerdir. İstatistik analizlerde CIN evreleri ve kromozom 7 arasında önemli bir korelasyon olduğu tespit edilmiştir. Kromozom anomalisi tespit edilen CIN lezyonlarının, yüksek riskli CIN lezyona ya da invaziv kansere dönüşümüne yatkın olabileceği, sayısal kromozom anomalisi olmayan evrelerin ise regrese olabileceği düşünülmektedir (13).

Marzano ve arkadaşları FISH analizi ile yaptıkları çalışmada 67 hasta (19 LSIL, 28 HSIL ve 20 invaziv kanser) ve 20 kontrol grubunda 3, 7, X kromozomları ile EGFR gen bölgesini incelemişlerdir. Çalışmalarında EGFR gen bölgesine ait amplifikasyon görülmeyip kromozom 7 aberasyonları açısından her üç grup arasında önemli bir fark olmadığını tespit etmişlerdir. Dolayısıyla araştırmacılar kromozom 7 yeniden düzenlenmelerinin erken evrelerde görülebilen aberasyonlar olduğunu belirtmektedirler. Buna karşılık kromozom 3 ve X in yüksek preinvaziv lezyondan servikal kansere dönüşüm sırasında önemli bir marker olabileceğini düşünmektedirler (49).

Çalışmamızda olguların %6 sında (3/50) trizomi 7 görülmüş olup ASCUS olguların %6.7 sinde (1/15), CIN I olguların %7.1 inde (2/28) trizomi 7 saptanmıştır. Literatürlerde trizomi 7 nin sıklıkla CIN II, CIN III ve invaziv kanser olgularında görüldüğünü belirtmektedirler. Bizim çalışmamızda olgu sayımızın az olması ve yüksek riskli preinvaziv lezyon ve servikal kanser olgularının bulunmaması anomali oranımızın düşük olmasını açıklayabilmektedir (13,50). Ayrıca *Bulten ve arkadaşları* biyopsi materyali ile yüksek preinvaziv lezyonlu ve servikal kanserli olgularla çalıştığından dolayı çalışmamızdan daha yüksek oranda anomali bulmalarını normal karşılamaktayız (13). *Piber ve arkadaşları* yaptığı çalışmada her lezyon için trizomi 7 li hücrelerin yüzdesine göre bir oran belirlemişlerdir (57). *Marzano ve arkadaşları* da yaptıkları çalışmada trizomi 7 görülen olguların sayısını belirtmemişlerdir (49). Dolayısıyla her iki literatür ile çalışmamız arasında karşılaştırma yapamamaktayız.

5.3. HPV Enfeksiyonu ile Saptanan Anomalilerin Literatür Bilgileriyle Karşılaştırılması

5.3.1. TERC Gen Amplifikasyonu ile HPV Enfeksiyonu Arasındaki İlişkinin Literatür Bilgileriyle Karşılaştırılması

Caraway ve arkadaşları 2007 yılında yaptıkları çalışmada 15 ASCUS olgunun 14 ünde HPV enfeksiyonu tespit edip, bunlardan 5 inin yüksek riskli HPV olduğunu belirtmektedirler. Ayrıca TERC gen artışı görülen ASCUS olgularının (%20) 2 sinde HPV enfeksiyonu tespit etmişlerdir (15).

Hopman ve arkadaşları (2006) displazinin derecesi arttıkça TERC gen amplifikasyonun görülme olasılığının arttığını düşünmektedirler. Ayrıca bu artışla HPV nin statüsü arasında da önemli bir bağlantı olduğunu ileri sürmektedirler. Yaptıkları çalışmada 17 CIN II/III olgunun 12 sinin HPV (+) olduğu, bunun 12 sinin epizomal formda 3 ünün entegre formunda olduğu, 13 CIN III/mCA nın hepsinin HPV(+) bunun 2 sinin epizomal form geri kalanının entegre form ve 7 invCA nın 6 sının HPV(+) bunun hepsinin entegre formda olduğu, 2 olguda da hem epizomal hem de entegre form bulunduğu yani çoklu HPV enfeksiyonu olduğu gösterilmiştir. CIN II/III te epizomal HPV dizomi ve tetrazomi ile koreleyken, entegre formun ve TERC artışının CIN III/mCA ve invCA ile korele olduğu düşünülmektedir. Bu bilgilere göre servikal displazilerin invaziv karsinomaya dönüşümünde HPV entegresi ve TERC artışı arasındaki bağlantının önemli olduğu, onkogenik HPV virüsünün epizomal formdan entegre formuna dönüşümünün önemli bir risk faktörü olduğu ve bununda TERC gen artışıyla bağlantılı olduğu ileri sürülmektedir (29).

Heselmeyer-Haddad ve arkadaşları (2005) çalışmalarında erken lezyonlarda HPV enfeksiyonunun tespitinin, hastalığın progresyonunda hangi ölçüde risk taşıdığını ayırt etmede yardımcı olabileceğini söylemektedir. Araştırmacılar HPV negatif lezyonlarda çok düşük oranda invaziv kansere dönüşüm olabileceğini, bunun yanında HPV pozitif olan lezyonların ise yüksek oranda progrese olabileceğini ifade etmektedirler. Ancak HPV enfeksiyonunun tespitinin, klinik incelemelere sınırlı şekilde yararlı olabileceğini,

preinvaziv lezyonların invaziv kansere dönüşümü sırasında genetik aberasyonlarında tespit edilmesi gerektiğini düşünmektedirler (27).

Tu ve arkadaşları (2009) FISH analizi ile yaptıkları çalışmada normal olguların %26.3 ünde, CIN I olguların %70.9 unda, CIN II olguların %83.3 ünde, CIN III olguların %97.8 inde ve invaziv kanser olguların tümünde HPV enfeksiyonu tespit etmişlerdir. Araştırmacılar TERC amplifikasyonunun HSIL olgularında LSIL olgularına göre daha yüksek oranda olduğunu ve TERC amplifikasyonu görülen olguların tümünde yüksek riskli HPV enfeksiyonu olduğunu belirtmektedirler. Bu bilgilere göre TERC amplifikasyonunun diagnostik ve prognostik marker olabileceği ve HPV DNA sının entegresinin genomik instabiliteye yol açtığı bununda servikal hücrelerde malign transformasyona neden olduğunu ileri sürmektedirler (70).

İnsan papilloma virüsü (HPV) servikal kanserle ilişkili olduğu saptanmış bir virüstür (33). Virüsün 100 den fazla tipi tanımlanmış olup bunların toplam 15 i yüksek riskli HPV tiplerini içermektedir. Servikal kansere de büyük ölçüde sebep olan bu onkogenik HPV lerdir. Çalışmamızın tüm olgularında HPV enfeksiyonu bulunmaktadır. Olgularımızın HPV tipleri büyük bir heterojenite göstermektedir. *Hopman ve arkadaşlarının* yaptıkları çalışmada HPV probu kullanılarak FISH analizi yapıp virüsün epizomal ya da entegre formu belirlenebilmiştir (29). Ancak bizim çalışmamızda HPV tipleri PCR analizi ile viral DNA kiti kullanılarak belirlenmiştir. Dolayısıyla sadece virüs enfeksiyonu hakkında bilgimiz bulunmaktadır. Displazinin ciddiyetinin artmasıyla HPV entegresinin korele olması, bizim olgularımızda HPV enfeksiyonunun epizomal formda kaldığını, TERC gen amplifikasyonu görülen olgularımızda ise entegre formda olduğunu düşündürmektedir. Ayrıca *Hopman ve arkadaşları* düşük preinvaziv lezyonlarda virüsün epizomal formda kaldığını belirtmektedirler (29). Çalışmamızda olgu grubumuzu düşük preinvaziv lezyonların oluşturması ve bununla birlikte anomali oranımızın az olması bu bilgiyi doğrulamaktadır.

Çalışmamızda ASCUS olgularının (n=15) 6 sı yüksek riskli HPV ile enfektidir. Bu olguların 3 ünde TERC gen amplifikasyonu görülmüştür. Bu oran *Caraway ve*

arkadaşlarının oranının üzerindedir (15). Ayrıca TERC gen amplifikasyonu görülen olgularımızın hepsinin yüksek riskli HPV tipleri (1 olguda hem düşük hem yüksek riskli tiplerden oluşan çoklu HPV enfeksiyonu var) ile enfeksiyonu bulunmaktadır. Bu durum *Tu ve arkadaşlarının* yaptığı çalışma ile uyum sağlamaktadır (70). Çalışmamızda TERC gen amplifikasyonunun yüksek riskli HPV ler ile birlikte görülmesi bize bu olgularda malign transformasyonun hızlı olabileceğini ve invaziv kansere dönüşüm gösterebileceğini düşündürmektedir.

5.3.2. C-MYC Gen Amplifikasyonu ile HPV Enfeksiyonu Arasındaki İlişkinin Literatür Bilgileriyle Karşılaştırılması

Servikal kanserde HPV DNA sının entegre olduğu hücre hatlarında C-MYC geninin amplifikasyonu ve aşırı ekspresyonu tespit edilmiştir (76).

Peter ve arkadaşlarının 2006 yılında FISH ve RT-PCR yöntemi kullanarak önce metafaz plaklar üzerinde 9 invaziv genital karsinoma hücre hattında HPV nin hangi bölgelere entegre olduğunu incelemişlerdir. Beş hücre hattında HPV DNA sının C-MYC (8q24) geni üzerine entegre olduğu tespit edilmiştir. Araştırmacılar bu bölgeye sadece HVP 16 DNA sının entegre olduğunu ifade etmektedirler. Daha sonra bu HPV sekansı tespit edilen hücre hatlarının 3 ünde C-MYC geninin amplifikasyonu ve aşırı ekspresyonu tespit edilmiştir. Birçok servikal kanserde HPV DNA sının tek bir bölgeye entegre olmasının tesadüf olmadığını, bu durumun hücre transformasyonunda çok önemli payı olduğunu ifade etmektedirler (54).

Zhang ve arkadaşları tüm örneklerde çoğu HPV 16 ve 18 (yüksek risk) olmak üzere %77 sinde HPV enfeksiyonu tespit etmişlerdir ve C-MYC amplifikasyonunu çoğunlukla HPV enfeksiyonu olan olgularda görmüşlerdir (20/21). Araştırmacılar çalışmalarında, servikal kansenin gelişimi sırasında, HPV enfeksiyonu ve genetik değişiklikler arasındaki ilişkinin oldukça önemli olduğunu belirtmektedirler (76).

Çalışmamızda C-MYC gen kopya artışı görülen olgularımızın %81.8 i (9/11) yüksek riskli HPV, bunlardan 4 ü HPV 16 ile enfektidir. Yüksek riskli HPV tipleri hücreleri enfekte etmekle kalmayıp kendi DNA sını hücre DNA sına entegre etmektedir. Bu da karsinogenez süresince en önemli adımlardan biridir. *Peter ve arkadaşları* çalışmalarını metafaz plakları üzerinde yaparak virüs entegresini net bir şekilde görebilmişlerdir. Sonuçlarımız HPV DNA sının C-MYC genine yatkınlığını doğrulayıp özellikle de onkogenik HPV lerin daha sık entegre olduğunu göstererek *Peter ve Zhang* ın çalışmalarıyla uyum sağlamaktadır (54,76). Bu bilgiler ışığında olgular takip edilerek ileriki yıllarda invaziv kansere dönüşüm olasılığı ile ilgili bilgilerin değerlendirilebileceği düşünülmektedir.

5.3.3. TERC ve C-MYC Gen Amplifikasyonu ile HPV Enfeksiyonu Arasındaki İlişkinin Literatür Bilgileriyle Karşılaştırılması

Sokolova ve arkadaşları (2007) HPV enfeksiyonu olan 235 olguda FISH analizi yapıp, TERC ve C-MYC amplifikasyonlarını incelemiştir. Çalışmalarında HPV DNA sına yönelik bir prob kullanarak aynı hücrede hem kromozom anomalilerini hem de HPV enfeksiyonunu görmüşlerdir. Araştırmacılar her olguda displazinin derecesi arttıkça HPV(+) olan hücrelerin sayısının da arttığını tespit etmişlerdir. Çalışmada servikal kanser gelişiminde HPV enfeksiyonun olması gerektiği ancak lezyonların malign transformasyonu için yeterli olmadığı belirtilmektedir. Yapılan araştırmada TERC ve C-MYC genleri açısından normal, ancak HPV enfeksiyonu bulunan olgularda servikal kanser gelişme olasılığının düşük olduğu, amplifikasyon olan olgularda ise servikal kansere ilerleme olasılığının yüksek olduğu ifade edilmiştir (66).

Huang F.Y. ve arkadaşlarının CGH ile yaptıkları (2005) çalışmada örneklerin %89 unun (25/28) yüksek riskli HPV (HPV16 ve 18) ile enfekte olduğu bildirilmektedir. Araştırmacılar hem 3q hem de 8q bölgelerine ait artış görülen 5 servikal tümörün hepsinin yüksek HPV tipleri ile enfekte olduğu belirtmektedirler (39).

Çalışmamızda her iki gen bölgesine (TERC, C-MYC) ait amplifikasyon görülen olguların hepsinin yüksek riskli HPV ile enfekte olması *Huang F.Y. ve arkadaşlarının* çalışması ile uyum sağlamaktadır (39). Çalışmamızda saptanan anomalilerle yüksek riskli HPV tipleri arasında istatistiksel açıdan ileri derecede önemli ilişki bulunmuştur (P=0.020).

5.3.4. Kromozom 7 ile HPV Enfeksiyonu Arasındaki İlişkinin

Literatür Bilgileriyle Karşılaştırılması

Mian ve arkadaşları (1999) sitolojik olarak değerlendirilen örneklerin %66 sında HPV ye bağlı değişiklikler saptamışlardır. Çalışmalarında LSIL olgularının %81.25 inde, HSIL olgularının %64 ünde HPV enfeksiyonunun bulunduğunu ifade etmektedirler. Ayrıca araştırmacılar HPV enfeksiyonu ve kromozomal aberasyon arasında önemli bir ilişki olduğunu, çoklu genetik değişikliklerin karsinogenez süresince en az HPV kadar etkili olduğunu belirtmektedirler (50).

Çalışmamızda trizomi 7 görülen olgularımızın tümünün yüksek riskli HPV tipleri ile enfekte olması, yüksek riskli HPV ile trizomi 7 arasında ilişki olabileceğini göstermektedir. Ancak literatürde kromozom aberasyonu saptanan olgularda hangi tip HPV bulunduğu belirtilmemiştir. Bu konuda tek bir literatürün bulunması, geniş olgu serilerinde çalışmaların yapıp sonuçların karşılaştırılıp değerlendirilmesini gerektirmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Çalışmamızda smear sonucu normal olan olgularda ve kontrol grubunda anomali görülmemiştir.
2. FISH analizi ile tüm parametreler için anomali oranımız %28 dir.
3. Olgularımızda C-MYC amplifikasyonu en sık (%22) gözlenen anomali olarak tespit edilmiştir.
4. FISH analizi ile tek başına TERC gen amplifikasyonu görülmemiştir. Dört olguda TERC ve C-MYC gen amplifikasyonu birlikte görülmüştür (%8).
5. Çalışmamızda trizomi 7 en az görülen anomali olarak tespit edilmiştir (%6).
6. Anomali görülen olgularımızın %85.7 sinde yüksek riskli HPV (12/14), % 14.3 ün de ise düşük riskli HPV (2/14) enfeksiyonu görülmüştür.
7. Sadece C-MYC gen amplifikasyonu görülen olguların %71.4 ünde (5/7) yüksek riskli HPV, %28.6 sında (2/7) ise düşük riskli HPV enfeksiyonu görülmüştür. TERC ve C-MYC amplifikasyonlarının beraber görüldüğü olguların (4/4) ve trizomi 7 tespit edilen olguların tamamında yüksek riskli HPV enfeksiyonu saptanmıştır.
8. Yüksek riskli HPV tipleri ile TERC ve C-MYC gen amplifikasyonu ile trizomi 7 arasında ileri derecede önemli ilişki bulunmuştur (P=0.020).
9. Genetik anomalilerin yüksek riskli HPV tipleri ile birlikte görülmesi, hastalığın takibinde önemlidir.
10. Çalışmamızda tek bir materyalden hem HPV risk tipi hem de kromozom anomalileri tespit edildi. HPV enfeksiyonuyla birlikte genetik aberasyonların incelenmesi, herhangi bir cerrahi müdahaleye gerek kalmadan hastalığın takibine büyük ölçüde yardımcı olacaktır.
11. Çalışmamız Türk popülasyonunda thin prep smear yöntemiyle HPV enfeksiyonu tespit edilen olgularda TERC, C-MYC ve de 7. kromozomun trizomisinin birlikte incelendiği ilk çalışma olma özelliğini taşımaktadır.

İlerleyen zamanlarda hastaların takibi ile bulgularımızın histopatolojik değerlendirme ile karşılaştırılmasının yararlı olacağını düşünmekteyiz. Dolayısıyla çalışmamız ve ileride daha geniş olgu serilerinde yapılacak olan çalışmalar, ülkemizde preinvaziv lezyonların takibinde ve servikal kanserin tedavisi amacıyla, yeni takip ve tedavi protokollerinin geliştirilmesine ve bu protokollerin klinikte kullanımlarına büyük ölçüde yardımcı olacaktır.

7. KAYNAKLAR

1. Abba, M.C., Laguens, R.M., Dulout, F.N., Golijow, C.D., 2003, The c-myc Activaiton in cervical carcinomas and HPV 16 İnfections, Elsevier 557 151-158 p.
2. Akhan, S.E., 2007, Ülkemizde servikal kanser epidemiyolojisi ve HPV serotipleri, Ankem Derg 21 (Ek2): 96-98s.
3. Alam, S., Conway, M.J., Chen, H.S., and Meyers, C., 2008, The Cigarette Smoke Carcinogen Benzo[a]prene Enhances Human Papillomavirus Synthesis, Journal of Virology 1053-1058p.
4. Artan, S., 1996, FISH tekniğinde hibridizasyon koşulları, Teorik ve Pratik Floresan In Situ Hibridizasyon, Ed.Başaran,N.; Etam, Eskişehir, 34-39s.
5. Artan, S., 1996, FISH tekniğinde kullanılan proplar ve özellikleri, Teorik ve Pratik Floresan In Situ Hibridizasyon, Ed.Başaran,N.; Etam, Eskişehir, 14-25s.
6. Artan, S., 1996, Rutin FISH uygulamaları, Teorik ve Pratik Floresan In Situ Hibridizasyon, Ed.Başaran,N.; Etam, Eskişehir, 51-59s.
7. Atasü, T., Aydınlı, K., 1999, Jinekolojik Onkoloji, ikinci baskı 178-259s.
8. Banks, E., 2002, Highlights in gynecology from the annual meeting of the American Collage and Obstetricians and Gynecologist, Medscape Genel Medicine (seria online) 1(1). Available from: URL: [http:// www.medscape.com /viewarticle/434334](http://www.medscape.com/viewarticle/434334).
9. Başaran, N., 1999, Tıbbi Genetik. 7. Baskı, Güneş ve Nobel Tıp Kitabevi, Bursa.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- 10.** Berek, S.J., Adashi, E.Y., Hillard, A.P., 1998, Novak Jinekoloji, birinci baskı 435, 458, 1111s.
- 11.** Bryan, T.M., Reddel, R.R., 1997, Telomere Dynamics and Telomerase Activity in in Vitro Immortalised Human Cells.Eur.Jor.Cancer. 33: 767-773p.
- 12.** Buckley, C.H., Butler, E.B., Fox, H., 1981, Cervical intraepithelial neoplasia, review article, 35:1-13p.
- 13.** Bulten, J., Poddighe, P.J., Robben, J.C.M., Gemmink, J.H., Peter C.M. de Wilde and Hanselaar, A.G.J.M., 1998, Interphase Cytogenetic Analysis of Cervical Intraepithelial Neoplasia, American Journal of Pathology, Vol.152, No.2 152:495-503p.
- 14.** Burk, R.D., Kelly, P., Feldman, J., Bromberg, J., Vermund, S.H., Deltovitz, J.A., and Landesman, S.H., 1996, Declining Presence of cervicovaginal human papillomavirus infection with age is independent of other risk factors.Sex.Transm.Dis. 23:333-341p.
- 15.** Caraway, N.P., Khanna, A., Dawlett, M., Guo, M., Guo, N., Lin, E., Katz, R.L., 2008, Gain of the 3q26 region in cervicovaginal liquid-based pap preparations is associated with squamous intraepithelial lesions and squamous cell carcinoma, Gynecologic Oncology, 110 37-42p.
- 16.** Cheng, X., Bian, X., Lang, J., Gai, M., Liu, X., Zhang, J., Liu, M., 2000 Apr, Papanicolaou test in pregnancy, ZhongguoYi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao, 22(2):174-6p.
- 17.** De Villez, R.L., and Slevens, C.S., 1980, Bowenoid papulosis of the genitalia. A case progressing to Bowen's disease. J.M. A cad. Dermatol.3: 149-152p.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

18. Dikmen, G., Doğan, P., 2003, Telomeraz ve kanser, T Klin Tıp Bilimleri 23:334-341s.
19. Ferber, M.J., Thorland, E.C., Brink, A., Rapp, A.K., Phillips, L.A., McGovern, R., Gostout, B.S., Cheung, T.H., Chung, T.K.H., Fu, W.Y., and Smith D.I., 2003, Preferential integration of human papillomavirus type 18 near the c-myc locus in cervical carcinoma, Oncogene 22,7233-7242p.
20. Gardner, L., Lee, L., Dang, C., July 2002, Adapted from MYC oncogene, Encyclopedia of cancer (online Access), second edition, 1-13p.
21. Geoffey, M. Coope, Robert E. Hausman, 2006, Hücre Moleküler yaklaşım, 3. baskı, Tıp Kitapevi, İzmir, 592-640s.
22. Greenlee, R.T., Hill-Harmon, M.B., Murray, T., Thun, M., Cancer Statistics, 2001, CA Cancer J Clin.2001 Jan-Feb; 51(1) 51-36.Erratum in: CA Cancer J Clin 2001 Mar-Apr; 51(2):144p.
23. Hausen, H., 2002, Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical applicaiton. Nature Publishing Group 2: 342-350p.
24. Hausen, H., 2002, Papillomaviruses causing cancer: Evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. Journal of the National Cancer Institute 92: 690-98p.
25. Hatch, K.D., 1989, Handbook of colposcopy, Diagnosis and treatment of Lower Genital Tract Neoplasia and HPV Infections. Boston: Little, Brown and Co, 7-19p.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

26. Heilmann, V., Kreienberg, R., 2002, Molecular biology of cervical cancer and its precursors, Current Science Inc 2: 27-33p.
27. Heselmeyer-Haddad, K., Sommerfeld, K., White, M.N., Chaudhri, N., Morrison, L.E., Palanisamy, N., Wang, Z.Y., Auer, G., Steinberg, W., and Ried, T., 2005, Genomic Amplification of the Human Telomerase Gene (TERC) in Pap Smears Predict the Development of Cervical Cancer, Am J Pathol 166:1229-1238p.
28. Heselmeyer-Haddad, K., Janz, V., Castle, P.E., Chaudhri, N., White, N., Wilber, K., Morrison, L.E., Auer, G., Burroughs, F.H., Sherman, M.E., Ried, T., 2003, Detection of Genomic Amplification of the Human Telomerase Gene (TERC) in Cytologic Specimens as a Genetic Test for the Diagnosis of Cervical Dysplasia, American Journal of Pathology 163: 1405-1416p.
29. Hopman, A.H.N., Theelen, W., Hommelberg, PPH., Kamps, MAF., Herrington, CS., Morrison, LE., Speel, E-JM., Smedts, F., and Ramaekers, FCS., 2006, Genomic integration of oncogenic HPV and gain of the human telomerase gene TERC at 3q26 are strongly associated events in the progression of uterine cervical dysplasia to invasive cancer, J Pathol 210: 412-419p.
30. Hopman, A.H.N., Smedts, F., Gignef, W., Ummelen, M., Sonke, G., Mravunac, M., Vooijs, G.P., Speel, EJM., and Ramaekers, FCS., 2004, Transition of high-grade cervical intraepithelial neoplasia to micro-invasive carcinoma is characterized by integration of HPV 16/18 and numerical chromosome abnormalities, Journal of Pathology, 202:23-33p.
31. [http:// www.cankatlinik.com](http://www.cankatlinik.com)
32. [http:// www.hpvinfos.ca](http://www.hpvinfos.ca)

KAYNAKLAR (devam ediyor)

33. <http://jinekoloji.net/hpv.html>
34. http://www.genitalsigil.net/hpv_genital_sigiller_tipleme.html.
35. <http://www.kadinsagligi.com/content/view/141/149/-85k>
36. <http://www.mumcu.com/html/>
37. <http://www.turkpath.org.tr/files/serviks.pdf> Patoloji Dernekleri Federasyonu
38. <http://www.ukdk.org/pdf/kitap/30.pdf> Türkiye’de Serviks Kanseri Durumu ve Servikal Kanser Tarama Çalışmaları.
39. Huang, F.Y., Kwok, Y.K., Lau, E.T., Tang, M.H., Ng, T.Y., Ngan, H.Y., 2005, Genetic abnormalities and HPV status in cervical and vulvar squamous cell carcinomas, *Cancer Genet Cytogenet* 157(1): 42-48p.
40. Huang, K.F., Lee, W.Y., Huang, S.C., Lin, Y.S., Kang, C.Y., Liou, C.P., Tzeng, C.C., 2007, Chromosomal Gain of 3q and Loss of 11q Often Associated with Nodal Metastasis in Early Stage Cervical Squamous Cell Carcinoma, *J Formos Med Assoc*, Vol 106 No: 11,894-902p.
41. Inal, M.M., Köse, Ş., Yıldırım, Y., Özdemir, Y., Töz, E., Ertopçu, K., Özelmas, İ., Tınar, Ş., 2007, The relationship between human papillomavirus infection and cervical intraepithelial neoplasia in Turkish women *International Journal of Gynecological Cancer* 17 (6), 1266-1270p.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

42. International Agency For Research On Cancer IARC Screening Group Websites.
43. Jiang, J., Tu, Z., Zhang, G., Li, JR., Zhao, LJ., Zhao, C., Cui, SH., Li, XP., Chen, Z., Wei, LH., 2008, Evaluation of genomic amplification of the human telomerase RNA component gene in the screening of cervical lesions, Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi 43(11): 849:53p.
44. Kisseljev, F.L., 2000, Virus-Associated Human Tumors: Cervical Carcinomas and Papilloma Viruses, Biochemistry (Moskow), Vol.65, No.1, 68-77p.
45. Klaes, R., Friedrich, T., Spitkovsky, D., 2002, Overexpression of p14INK4A aspesific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. Int.J.Cancer 92: 276-84p.
46. Kufe, D.M., Pollock, R.E., Weichselbaum, R.R., Bast R.C. Jr., Gansler, T.S., Holland, J.F., Frei E., 2003,Cancer Medicine 6.
47. Kurtçu, K., 2009, Akciğer Kanserli Vakalarda Bronşial Lavaj Materyalinden Elde Edilecek Hücrelerde: Genetik Markerların Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH) Yöntemiyle İncelenmesi, ESOGÜ, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 40s. (yayımlanmamış)
48. Lele, S.M., Pou, A.M., Ventura, K., 2002, et al. Molecular events in the progression of recurrent papillomatosis to carcinoma. Arch pathol lab med ;126: 1184-1188p.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

49. Marzano, R., Corrado, G., Merola, R., Sbiroli, C., Guadagni, F., Vizza, E., Del Nonno, F., Carosi, M., Galati, M., Sperduti, I., Cianciulli, A.M., 2004, Analysis of chromosomes 3, 7, X and the EGFR gene in uterine cervical cancer progression, *European Journal of Cancer* 40 1624-1629p.
50. Mian, C., Bancher, D., Kohlberger, P., Kainz, C., Haitel, A., Czerwenka, K., Stani, J., Breitenecker, G., Wiener, H., 1999, Fluorescence in Situ Hybridization in Cervical Smears: Detection of Numerical Aberrations of Chromosomes 7, 3, and X Relationship to HPV Infection, *Gynecologic Oncology* 75, 41-46p.
51. Munoz, N., Bosch, X.F., Sanjose, S., Herrero, R., Castellsagua, X., Shat, K.V., Snijders, P., and Meijer, C., 2003, Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer, *N Engl J Med*, 348:518-27p.
52. Nussbaum, R.L., McInnes, R.R., Willard, H.F., 2005, *Thompson&Thompson Tıbbi Genetik, Güneş Kitabevi*, 311-332s.
53. Özarmağan, G., Topkarcı, Z., 2006, Human Papilloma Virüs Aşılıarı, *Ankem Derg*, 20(Ek2):56-61s.
54. Peter, M., Rostly, C., Couturier, J., Radvanyi, F., Teshima, H., Sastre-Garau, X., 2006, MYC activation associated with the integration of HPV DNA at the MYC locus in genital tumors, *Oncogene* 25, 5985-5993p.
55. Peter, T., Sîan, E., 2005, *Emery's Elements of Medical Genetics, Twelfth Edition*

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- 56.** Philip, D.J., William, C.T., 2003, Klinik Jinekolojik Onkoloji, altıncı baskı 3-61, 633s.
- 57.** Pieber, D., Bauer, M., Gücer, F., Reich, O., Pickel, H., and Pürstner, P., 2000, Numerical chromosomal aberrations of chromosome 1 and 7 in dysplastic cervical smears, Life Science 67 671-678p.
- 58.** Raab, S.S., Hart, A.R., D'Antonio, J.A., Grzybicki, D.M., 2001, Clinical perception of disease probability associated with Bethesda system diagnosis. Medscape Genel Medicine (seria online) 1(1). Available from: URL: <http://www.medscape.com/viewarticle/406859>.
- 59.** Reich, O., 2005, Is early first intercourse a risk factor for cervical cancer? Gynakol Geburtshilfliche Rundsch. Oct;45(4):251-6p
- 60.** Ringström, E., Peters, E., Hasagawa, M., 2002, et al. Human Papillomavirus type 16 and squamous cell carcinoma of the head and neck. Clinical Cancer research 8: 3187-3192p.
- 61.** Rock, A.J., Jones H.W., 2006, Te Linde's Operative Gynecology Dokuzuncu Basım (Türkçe Basım) Bölüm 45-60, 1231-1254s.
- 62.** Rolland, Z.G., New research on cervical cancer (2006 Resimli Basım) http://books.google.com.tr/books?id=S8IN_6y1pacC
- 63.** Sapp, M, C. Volpers, Muller,M., and Streck,R.E., 1995, Organization of the major and minor capsid proteins in human papillomavirus type 33 virus-like particles. J. Gen. Virol. 76: 2407-2412p.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- 64.** Seppo, A., Jalali, G.R., Babkowski, R., Symiakaki, H., Rodolakis, A., Tafas, T., Tsipouras, P., Kilpatrick, M.W., 2009, Gain of 3q26: a genetic marker in low-grade squamous intraepithelial lesions (LSIL) of the uterine cervix, *Gynecologic Oncology* 114;80-83p.
- 65.** Soder, AI., Hoare, SF., Muir, S., 1997, Amplification, increased dosage and in situ expression of the telomerase RNA gene in human cancer, *Oncogene* 14,1013-1021p.
- 66.** Sokolova, I., Algeciras-Schimmich, A., Song, M., Sitailo, S., Policht, F., Kipp, B.R., Voss, J.S., Halling, K.C., Ruth, A., King, W., Underwood, D., Brainard, J., Morrison, L., 2007, Chromosomal Biomarkers for Detection of Human Papillomavirus Associated Genomic Instability in Epithelial Cells of Cervical Cytology Specimens, *J Mol Diagn*; 9(5), 604-611p.
- 67.** Stanley, M.A, 2000, Pathobiology of Human Papillomaviruses, *Viruses, Cell Transformation and Cancer*, s.129-44, Elsevier, London
- 68.** Syrja'nen, S.M., and Syrjanen, K.J., 1999, New concept on the role of human papillomavirus in cell cycle regulation. *Ann.Med.* 31: 175-187p.
- 69.** Thomas, M., D. Pim, and L. Banks, 1999, The role of the E6-P53 interaction in the Molecular Pathogenesis of HPV. *Oncogene* 18: 7690-7000p.
- 70.** Tu, Z., Zhang, A., Wu, R., Jiang, J., Li, Y., Wulan, N., Li, J., Zhang, Y., Li, Y., Chen, Z., Wei, L., 2009, Genomic amplification of the human telomerase RNA gene for differential diagnosis of cervical disorders, *Cancer Genetics and Cytogenetics* 191 10-16p.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

71. Vernell, V., Helin, K., Mler, H., 2003, Identification of target genes of the p14INK4A-Prb-e2f Pathway, J Biol chem 278 (46): 46124-46137p.
72. Wieser, R., Schreiner, U., Rieder, H., Pirc-Danoewinata, H., Gruner, H., Loncarevic, I.F., Fonatsch, C., 2003, Interphase fluorescence in situ hybridization assay for the detection of rearrangements of the EVI-1 locus in chromosome band 3q26 in myeloid malignancies, Haematologica, 88 (1) : 25-30p.
73. Williams, L., and Wilkins, 2002, Cervical neoplasia and carcinoma. In Beckman CRB et al, editors. Obstetrich and Gynecology. 4th ed.Philadelphia: 547-565p.
74. William, S., K., Cummings, M., R., Genetik Kavramlar, 2000, (ev.: ner C.), Palme Yayıncılık, Ankara, 635-636p.
75. Yong, R., Wan-Li, W., Hua-Xian, Z., Zheng-Nan, L., Bao-Yuan, L., Yun, C., 2003, Comparison and Analysis of Expression of c-myc and p16 in Cervical Carcinoma, Chinese Journal of Cancer, 22(6): 602-606p.
76. Zhang, A., Maner, S., Angström, T., Stendahl, U., Bergman, F., Zetterberg, A., and Wallin, K., 2002, Genetic alterations in cervical carcinomas: frequent low-level amplifications of oncogenes are associated with human papillomavirus infection, Int. J. Cancer 101,427-433p.

AYŞE GİZEM GIRAN

Kişisel Bilgiler :

Doğum Tarihi : 31.01.1982
Doğum Yeri : Ankara
Uyruğu : T.C.
Medeni Hali : Bekar
Adres : Dikmen cad. 129/9 Dikmen/ ANKARA

Eğitim Durumu :

<i>Yıl</i>	<i>Üniversite</i>	<i>Ortalama</i>
Yüksek Lisans 2006-2009	Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik AD	3.72 / 4
Üniversite 2000-2005	Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji bölümü	79.73 / 100
Lise 09.1995- 02.1998	Ankara Ayrancı Lisesi	3.40 / 5

Yabancı Diller :

İngilizce
(İyi Seviyede)

Katıldığı Ulusal- Uluslararası Bilimsel Toplantılar

1. VIII. Ulusal Tıbbi genetik kongresi, 2008, Çanakkale
2. Ulusal Ege Sempozyumu, 2006, Afyon