

MESANE KANSERLİ HASTALARDA İNSAN PAPİLLOMAVİRUS İNFEKSİYONU SIKLIĞININ TESBİTİ

ASSESSMENT OF FREQUENCY OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS INFECTION AT PATIENTS WITH BLADDER TUMOR

ÇAŞKURLU, T*., ÇAŞKURLU, H**., SEVİN, G*., TAŞCI, A.İ*., ÖZTÜRK, R., RESİM, S*.

ÖZET

Son yıllarda yapılan yayınlarda insan papillomavirüs (HPV) infeksiyonu sıklığı ile mesane tümörü gelişimi arasında bağlantı olduğuna dair bulgular elde edilmiştir. Bu ilişkinin var olup olmadığını ortaya koymak için geçirilmiş veya halen aktif HPV infeksiyonu anamnezi olmayan 15 mesane tümürlü ve 15 kontrol hastada HPV DNA'sı araştırılmıştır. Bu amaçla tip 6/11, 16/18, 31/33 HPV infeksiyonlarının tümürlü hastalardaki ve normal kontrollerdeki sıklığını ve HPV infeksiyonunun malign transformasyon riskini artırıp artırmadığını tesbit için 15 mesane kanserli, 15'de kontrol olmak üzere 30 hasta çalışmaya alınmıştır. HPV DNA'ları HPV dot blot typing test tekniği kullanılarak araştırılmıştır. Sonuçta HPV DNA'sı 15 tümürlü hastadan 3'ünde (%20) tip 16/18 HPV DNA'sı pozitif olarak tesbit edilirken 15 kontrol hastasının hiçbirisinde pozitiflik bulunmamıştır. Pozitiflik bulunan 3 hastadan 2'si kadındı ve birisinde Grade 1, pT2 diğ erinde Grade 2, pT1, papiller tipte mesane tümörü, erkek olan hastamızda da yine papiller tipte Grade 2, pT1 mesane tümörü mevcuttu.

Sonuç olarak klinik geçirilmiş bir HPV infeksiyonu bulunmasa da mesane tümürlü hastalarda HPV DNA'sının %20 oranında tesbit edilmesi tümör oluşumu açısından bu infeksiyonun önemli bir risk faktörü olduğu izlenimi vermektedir.

SUMMARY

Recent literature indicates a relationship between Human Papillomavirus (HPV) infection and bladder tumor. In order to investigate the validity of this hypothesis, HPV DNA was assessed in 15 patients with bladder tumor and 15 patients without any active or past HPV infection. In order to find out the prevalence of type 6/11, 16/18, 31/33 HPV infections in tumor patients and normal controls and to find out if HPV infections increase malignant transformation risk; 15 bladder cancer and 15 control patients were included in the study. HPV DNA was assessed with HPV dot blot typing test technique. Results revealed that type 16/18 HPV DNA was positive at 3 of 15 patients with bladder tumor while non of the patients in the control group was found to be positive. 2 of 3 patients with positive results were female and had Grade 1 pT2, other Grade 2, pT1 papillary bladder tumors and the male patient had papillary Grade 2 pT1 tumor.

As a result, HPV infection seems to be an important risk factor as indicated by high prevalence (20%) of HPV DNA at patients with bladder cancer though HPV infection may not be clinically significant.

(*) Vakıf Gureba Hastanesi Üroloji Kliniği

(**) Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

ANAHTAR KELİMELEER: Mesane, tümör, HPV, dot blot hibridizasyon.

KEYWORDS: Bladder, tumor, HPV, Dot blot hybridization.

GİRİŞ

Human papillomavirüs (HPV) papovaviridae ailesinden bir DNA virüsüdür. Toplumda yaygın olarak görülen bu virüs infeksiyonu deri ve mukozalarda epitelyal tümörler oluşturur, özellikle de genital sistem kanserleri ile yakından ilgilidir (1). İnsan türüne özgün bir virüs olup çapraz-tür infeksiyonu deneysel şartlarda bile oluşmaz. HPV infeksiyonu epidemiyolojisi tam olarak anlaşılamamıştır çünkü seroepidemiolojik değerlendirme teknikleri halen yetersizdir (1,2). Kutenöz HPV infeksiyonu batı toplumlarında yaygın olarak görülür (3). Anogenital wart (siğil)lar Amerika Birleşik Devletleri'nde en sık görülen viral seksüel geçişli hastalıktır ve insidensi her geçen gün artmaktadır (4). İngiltere'den bildirilen istatistiklerde de 1981'den 1986'ya bildirilen yeni olgu sayısı %127 artmıştır (5). Her yıl ortalama yarım milyon insanın semptomatik genital siğil infeksiyonu edindiği tahmin edilmektedir (6).

Son zamanlarda HPV DNA'sının mesane tümörlerinde normal kansersiz kontrollere göre daha yüksek oranlarda rastlanması HPV ile mesane kanseri ilişkisini araştırma ihtiyacı doğurmuştur. Herhangi bir geçirilmiş veya aktif bir HPV infeksiyonu olmaksızın mesane kanserli hastalarda HPV DNA'sı varlığı bildirildiği (7) gibi genital HPV infeksiyonu geçirmiş veya aktif HPV infeksiyonu geçiren hastalarda mesane karsinogenezinde rol oynadığını bildiren yayınlar da mevcuttur (8). Bizim prospektif bu çalışmamızda HPV infeksiyonu hikayesi olmayan mesane kanserli ve normal kontrol hastaların ürotelyumlarında HPV DNA'sının tesbit sıklığı araştırılarak mesane kanserinde etyolojik bir faktör olarak HPV'nün rol alıp almadığı araştırılmıştır.

MATERYAL VE METOD

Kasım 1993-Haziran 1994 tarihleri arasında değişik evre ve grade'li 15 mesane kanserli ve başka bir hastalık nedeniyle operasyona alı-

nan 15 kontrol grubu hastadan ameliyathane şartlarında ve steril olarak tümör veya ürotelyal doku parçası alınarak steril tüplere yerleştirilip -20 derecede saklanmaya alındı. HPV DNA'larının varlığı Biohit HPV dot blot tiplendirme test kiti ile tip 6/11, 16/18, 31/33 araştırıldı. Bu amaçla şu basamaklar uygulandı. 1. HPV DNA'sının çıkartılması, 2. DNA'nın filtre üzerine yerleştirilmesi, 3. DNA'nın denatürasyonu, 4. Filtre üzerindeki DNA'nın sabitleştirilmesi, 5. Sabitlenmiş DNA'nın biyotinle işaretlenmiş HPV probunun hibridizasyonu, 6. Kolorimetrik reaksiyonlarla hibritlerin tesbiti.

Deneğin Yapılışı: Dokular oda ısısına çıkarıldıktan sonra kit içerisindeki filtrelerde işaretlenir. -20 derecede de bekleyen test kitindeki solusyonlarda oda ısısında bir süre bekletilerek çözümleri sağlanır. Doku örnekleri kontrol ve çalışma grubu olarak herbirisi ayrı ayrı numaralanmış 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine konulup üzerlerine 0.5 ml 0.10M HCl eklenir ve tüpler bir gece 37 derecelik etüvde bekletilir. Ertesi gün 150 mikroL ice-cold doymuş NaCl eklenip, 15 saniye karıştırılır, 10 dakika 12000 g'de santrifüj edilir. Üstteki kısım atıldıktan sonra 1 ml doymuş ethanol ilave edilip 10 dakika daha 12000 g'de santrifüj edilir. Üstteki kısım atılıp tüpün alt kısmında kalan DNA'nın üzerine 30 mikroL steril distile su ilave edilir ve 30 dakika beklenir. Herbirisinde 20 örnek çalışabilen filtrelerden her bir tüpleme için bir filtre kullanılarak tümör dokularından ve kontrol dokularından üçer adet ayrı ayrı filtrelere 10 mikroL konulur. Konulan bu damlaların oda ısısında kuruması sağlanır. DNA'ların denatürasyonu için deney kitinden çıkan tepsilerin içine 2.5 ml denatürasyon solusyonu (0.6 N NaOH) konularak özel filtre kağıdı tepsilere bırakılır. Daha sonra tepsilerden çıkartılan filtre kağıtları absorban kağıtla kurulanır. Filtre tepsisindeki 2.5 ml nötralizasyon solusyonuna (2M NH4Ac) konulup 5 dakika beklenir. Filtre çıkartılıp tepsi yıkanır ve kurutulur. Hibri-

dizasyon işlemi için filtre kağıtlarının üzerine 4 ml prehibridizasyon solüsyonu (Formamide, bloke edici ajan ve stabilizör karışımı) konularak havanın kabarcığı oluşmamasına dikkat ederek plastik bir örtüyle kapatılır. Fazla sıvılar tepsi kenarından akuttan sonra 50 derecede 15 dakika inkübe edilir. Prehibridizasyon sıvısı dökülerek tepsi içerisine 4 ml hibridizasyon solüsyonu (herbir tip için farklı sıvı) konularak ve 50 derecede bir gece bekletilir. Ertesi gün yıkama sıvıları ile filtreler yıkanır. Filtreler temiz tepsilere konularak üzerlerine 4 ml blokama sıvısı eklenir. Üzerleri plastik örtüyle örtülüp 65 derecede bir saat bekletilir ve sıvı havayla kurutulup üzerlerine 4 ml belirleme solüsyonu konularak, üzerleri örtülüp 20 dakika oda ısısında bekletilir, örtü çıkartılıp sıvı geri alınır. Filtre başka bir tepsiye konularak özel yıkama solüsyonları ile yıkanır. Yıkamadan sonra 4 ml substrat solüsyonu (5-bromo-4-chloro-3-indolyolphosphate BCIP in diethanol amine buffer) konularak üzeri örtülür. Bir saat oda ısısında ve karanlıkta bekletilir. Süre sonunda üç kez distile su ile yıkama yapılarak reaksiyon durdurulur. Filtreler havada kurutulup sonuçlar değerlendirilir. filtreler üzerindeki koyu mor-mavi pozitif kontrolü, daha zayıf mor-mavi orta dereceli pozitif kontrolü ve silik mavi-mor zayıf pozitif kontrolü gösterir. Negatif kontrol ise renksizdir.

Test sonuçları alındıktan sonra sonuçların istatistik anlamlılığı Fisher'in kesin X^2 testi ile test edildi.

BULGULAR

Hastaların yaşları 38 ila 86 (ortalama: 58.8 yaş) arasında değişiyordu. Hastaların 9'u erkek 6'sı kadın, kontrol grubunun 8'i erkek, 7'si kadındı. Hastaların hiçbirisinin hikayesinde geçirilmiş HPV ile hastalık anemnezi mevcut değildi. Hastaların %60'ı (9 hasta) en az günde bir paket sigara içiyordu. kontrol grubundaki doku örneklerinin hiçbirisinde HPV DNA'sı tesbit edilmedi. Mesane tümörlü hasta grubunda ise ikisi kadın 3 hastada (%20) tip 16/18 HPV DNA'sı ile pozitiflik elde edildi. Diğer tiplerle pozitif reaksiyon oluşmadı. Pozitiflik bulunan 3 hastadan 2'si kadındı ve birisinde Grade 1, pT2 diğerinde Grade 2, pT1,

papiller tipte mesane tümörü, erkek olan hastamızda da yine papiller tipte Grade 2, pT1, mesane tümörü mevcuttu. Mesane tümörlü hasta grubundaki bulgular Tablo 1'de özetlenmiştir.

Sonuçların istatistiksel değerlendirmesine göre $p=0.11$ bulundu ve bu sonuca göre gruplar arasında pozitiflik açısından anlamlı fark yoktu.

TARTIŞMA

Son yıllarda HPV enfeksiyonu ile mesane kanseri gelişimi arasında pozitif bir bağlantı bulunduğuna çeşitli yayınlarda bildirilmeye başlanmıştır. Çeşitli farklı epidemiyolojik çalışmalarda HPV lezyonları ile genital sistem maligniteleri arasında kuvvetli ilişki gösterilmiştir (9,10). HPV papovaviridae ailesinden bir DNA virüsüdür. Derideki enfeksiyonları üç farklı tablo oluşturur. 1- Siğiller, 2- Condiloma accuminatum ve 3- Seksüel geçişli hastalıklar. Seksüel geçişli hastalıklara yol açan HPV enfeksiyonu ile serviks kanseri arasındaki ilişki kesindir (9,10). Genital siğil hikayesi olan kadınlarda olmayanlara göre serviks kanseri gelişme riski 4 kat daha fazladır ve serviks kanseri bulunan hastaların %90'ında HPV tip 16,18,31 pozitifliği bulunmuştur (11).

HPV enfeksiyonunun tanısında hücre kültürleri ve serolojik testler henüz yetersizdir ve HPV DNA'sının tesbitinde ve tiplenmesinde değişik teknikler mevcuttur (12). Lezyondan alınan biopsilerde HPV antijeni ve HPV nükleik asidi belirlenebilir. Antijen belirlemede kullanılan yöntem Peroxidase-antiperoxidase immünohistokimyasal boyamadır. HPV DNA'sının tesbitinde ise radyoisotoplarla veya kimyasal reaktiflerle işaretli DNA problemleri ile hibridizasyon yöntemi kullanılır (1). Dot-blot typing test kimyasal reaktiflerle işaretli DNA problemleri ile hibridizasyon yöntemidir (13). Bu testlerin daha da gelişimi ise PCR tekniğidir. Dot blot typing test ile çok küçük miktarlarda DNA tesbit edilemezken PCR'da bu dezavantaj ortadan kalkmıştır (1). PCR ile DNA'lar kuvvetlendirilerek daha duyarlı nükleik asit tesbiti yapılır (14,15). İki test eş zamanlı olarak aynı hastada duyarlılık açısından karşılaştırılırsa Dot blot hibridizasyon testinin duyar-

Tablo 1

Adı	Cinsi	Yaşı	Patolojik Stage	Grade	HPV Tipi
Mİ	E	46	pT1N0M0	2	-
SB	K	38	pTaN0M0	1	-
MA	K	49	pT2N0M0	2	-
NBS	E	60	pT1N0M0	2	-
AK	E	75	pT2N0M0	2	-
FE	E	74	pT2N0M0	İndiferansiye	-
FT	E	86	pTaN0M0	2	-
HÇ	E	64	pT4N0M0	3	-
KÇ	K	63	pT2N0M0	2	-
İA	E	64	pT3N0M0	3	-
FS	K	45	pT2N0M0	3	-
ACB	E	44	pTaN0M0	1	-
NO	E	64	pT1N0M0	2	16/18
CK	K	54	pT1N0M0	2	16/18
GK	K	57	pT2N0M0	1	16/18

lılığı %50, PCR tekniğinininki ise %100'dür (16,17). Diğer bir çalışmada hibridizasyonla %70, PCR ile %83 oranında HPV DNA'sı aynı hasta grubunda tesbit edilmiştir (18).

Lecatsas ve arkadaşları daha önceden HPV pozitif papillomavirüs lezyonu hikayesi olan iki hastada birisi epidermoid diğeri değışici epitel hücreli iki mesane kanseri bildirmişlerdir (19). HPV'nin düşük grade'li erken stage'li mesane kanserlerinde tesbit edilmesi nedeniyle karsinogenezde başlangıçta rol aldığı ileri sürülmüştür (20). Bizim bir olgumuzda pT2 bulunması bu konuda daha ileri ve çok olgu sayılı araştırmaya ihtiyaç olduğuna işaret etmektedir. Bryant ve arkadaşları mesane kanserlerinde HPV antijenini %14 oranında tesbit etmişler ve bu virüsün mesane karsinogenezinde rol aldığını ileri sürmüşlerdir (21). Yine Shibusani ve arkadaşları %20 oranında HPV DNA'sı tesbit etmişler (7). Anwar ve arkadaşları ise mesane kanserlilerde %81 oranında normal kontrollerde ise %33 oranında HPV DNA'sını pozitif olarak bulmuşlardır (8).

SONUÇ

Sonuç olarak bizim bu çalışmamızda Biohit HPV dot blot tipleme testiyle elde ettiğimiz %20 mesane tümörlü hastadaki tip 16/18 ile olan pozitiflik mesane tümörü on-

kogenezinde bu virüs infeksiyonunun klinik olarak HPV infeksiyonunun bulgusu olmaksızın da rol oynayabileceğini ileri süren araştırmacıların verileriyle uyumludur.

KAYNAKLAR

- 1- Reichman, R.C., Bonnez, W.: Papillomaviruses. In: Principles and Practise of Infectious diseases. Edited by G.L. Mandell, J.E., Bennet, R. Dolin, Fourth ed., New York, Churchill Livingstone, pp: 1387-1400, 1995.
- 2- Syrjanen, K., Syrjanen, S.: Epidemiology of human papilloma virus infections and genital neoplasia. Scand. J. Infect Dis Suppl. 69: 7, 1990.
- 3- Bunney, M.H., Benton, C., Cubie, H.A.: Viral warts. Biology and treatment 2nd ed. Oxford: Oxford University Press, 1992.
- 4- Becker, T.M., Blount, J.F., Guinan, M.E.: Trends in genital herpes infections among private practitioners in the united States, 1966-1981., JAMA. 253: 1601, 1985.
- 5- Public Health Laboratory Communicable Disease Surveillance Center: Sexually transmitted disease in Britain: 1985-6. Genitourin Med. 65: 117, 1989.
- 6- Center for Disease Control and prevention: Divi-

- sion of STD/HIV Prevention, 1992 Annual Report., U.S. Department of Health and Human services, Public Health Service. Centers for disease Control and Prevention, Atlanta, G.A., 1993.
- 7- **Shibutani, Y.F., Schoenberg, M.P., Carpiniello, V.L., Malloy, T.R.:** Correlation of Human Papillomavirus with bladder cancer. *Urology*. 40:15, 1992.
 - 8- **Anwar, K., Naiki, H., Nakakuki, K., Inuzuka, M.:** High frequency of human papillomavirus infection in carcinoma of the urinary bladder. *Cancer*. 70(7): 1967, 1992.
 - 9- **Franchesci, S., Doll, R., Gallwey, J.:** Genital warts and cervical neoplasm: An epidemiological study. *Br. J. Cancer*. 48: 621, 1983.
 - 10- **Chuang, T., Perry, H.O., Kurland, L.T.:** Condyloma acuminatum in Rochester Minn., 1950-1978. I. Epidemiology and clinical features. *Arch Dermatol*. 120: 469, 1984.
 - 11- **Zur Hausen, H.:** Genital Papillomavirus infections. *Prog. Med. Virol*. 32: 15, 1985.
 - 12- **Schneider, A.:** Methods of identification of human papillomaviruses. In: *Papillomaviruses and Human Diseases*. Edited by K. Syrjanen, L.Gissmann, L.G., Koss. Berlin: Springer Verlag, pp 19-39, 1987.
 - 13- **Inoue, M., Duggan, M.A., Robertson, D.I., Chang-Poon, V.:** Non-isotopic detection of HPV DNA in cervical smears using dot blot hybridization. *J. Virol. Meth*. 26: 159, 1989.
 - 14- **Shibata, D.K., Arnheim, N., Martin, J.W.:** Detection of human papilloma virus in paraffin-embedded tissue using the polymerase chain reaction. *J. Exp. Med*. 167: 225, 1988.
 - 15- **Gravitt, P.E., Manos, M.M.:** Polymerase chain reaction based methods for the detection of human papillomavirus DNA. In: *The Epidemiology of Cervical Cancer and Human Papillomavirus*. Edited by N. Munoz, F.X. Bosch, K.V. Shah; IARC Scientific Publications No: 119. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 121-133, 1992.
 - 16- **Guerrero, E., Daniel, R.W., Bosch, F.X.:** Comparison of viraPap, Southern hybridization and polymerase chain reaction methods for human papillomavirus identification in an epidemiological investigation of cervical cancer. *J. Clin. Microbiol*. 30: 2951, 1992.
 - 17- **Gjoen, K., Siebke, J.C., Flikke, M., Hager, R., Ertzeid, G., Halsos, A., Ekgren, J., Norling, B., Grinde, B., Orstavik, I.:** Genital human papilloma virus infection in Oslo studied by dot blot DNA hybridization and polymerase chain reaction. *J. Med. Virol*. 34 (3): 159, 1991.
 - 18- **Thomson, C.H., Rose, B.R., Cossart, Y.E.:** Detection of HPV DNA in archival specimens of cervical cancer using in situ hybridisation and polymerase chain reaction. *J. Med. Virol*. 36: 54, 1992.
 - 19- **Lecatsas, G., Dreyer, L., Mieny, C.j., Nel, P.J.:** Successive urinary papillomavirus excretion, condylomata acuminata and urogenital epithelial malignant disease after renal transplantation. *S. Afr. Med. J*. 67: 374, 1985.
 - 20- **Roussel, F., Picquenot, J.M., Rousseau, O.:** Identification of human papillomavirus antigen in bladder tumor. *Acta Cytologica*. 35 (3): 273, 1991.
 - 21- **Bryant, P., Skelly, J., Willson, D.:** Demonstration of papillomavirus structural antigen in human urinary bladder neoplasia. *Br. J. Urol*. 60: 405, 1987.