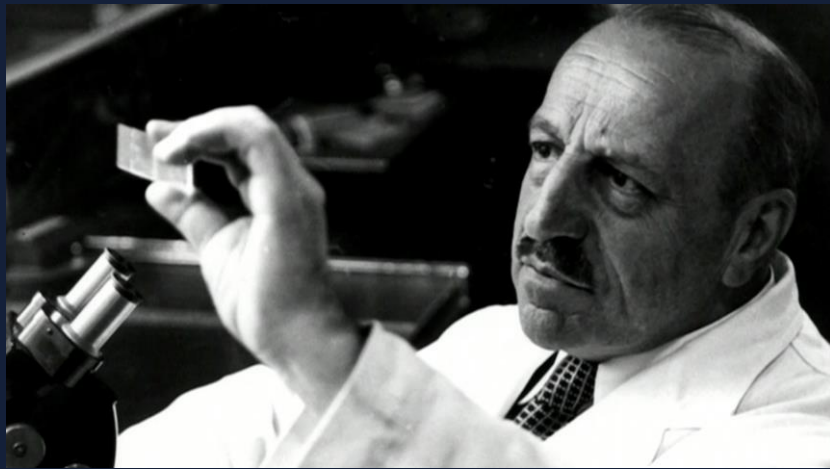
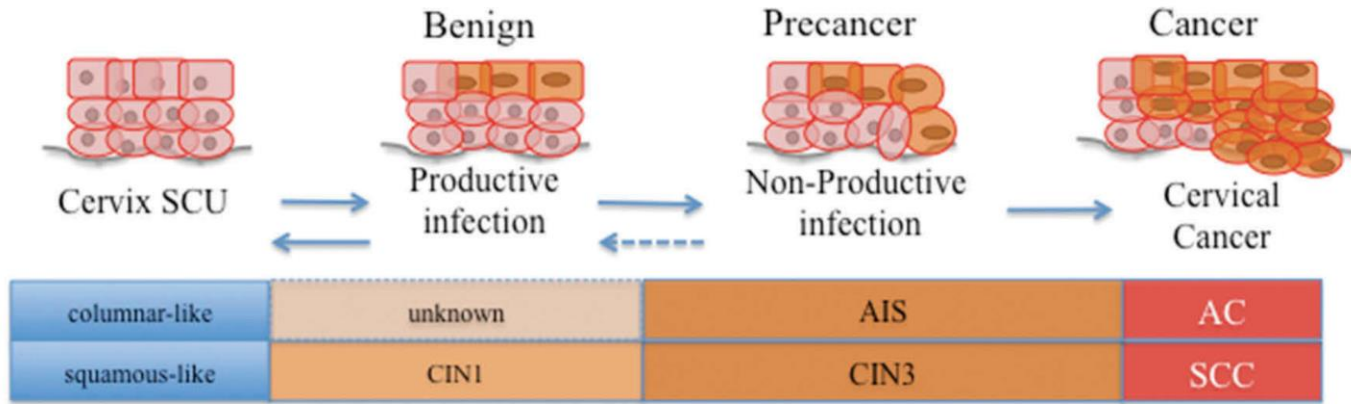


Servikal Kanser Taramaları: Biomarkerlar ve Moleküler Triage

Dr. Mehmet Mutlu MEYDANLI

Saęlık Bilimleri Üniversitesi

Dr. Zekai Tahir Burak SUAM, Ankara



Konvansiyonel Sitoloji

LBS

HPV testi

Markerlar

Aşı

1949

1996

2000

2017

Serviks kanseri taraması

- Sitoloji (PAP/LBS)
- HPV DNA
- hrHPV DNA ve HPV 16/18 DNA
- hrHPV E6/E7 mRNA
- HPV E7 onkoprotein tayini
- p16INK4a/Ki67
- Minichromosome maintenance protein 2 (MCM2) ve topoisomerase II alpha (TOP2alpha)
- HPV E4/E5 ve L1
- Konak hücre mikro-RNA
- Gen metilasyonu

Neden Moleküler Testler?

- Sitoloji ile Primer Tarama
 - Spesifisite yüksek
 - Sensitivite düşük
 - İnter ve intraobserver varyasyonlar sık
 - Tekrar edilebilirliği düşük
 - Eğitilmiş personel gerektirir
 - Maliyetli

Neden Moleküler Testler?

- HPV DNA Testi ile Primer Tarama
 - Yüksek sensitivite
 - Objektif ve tekrar edilebilir
 - SORUN:
 - Progresif premalign lezyonları tespit etmede düşük spesifisite
 - Yalancı pozitiflik nedeniyle overtreatment
- HPV DNA testi transient HPV infeksiyonunu persistant infeksiyondan ayırt edemez

Neden Moleküler Testler?

- Tarama
 - Nesnel olmalı
 - Morfoloji tabanlı olmamalı
 - Tekrar edilebilir olmalı
 - **Persiste enfeksiyonu olan kadınları belirleyebilmeli**
- Günümüzde daha sensitif ve spesifik biyobelirteçler ile servikal kanser tarama programlarında iyileşme sağlanması yönünde güçlü bir talep mevcuttur

Moleküler belirteçler ile triyaj

- Servikal kanser gelişimi için persiste hrHPV enfeksiyonu gereklidir
- hrHPV testinin CIN3+ lezyon için spesifisitesi sitoloji ile benzerdir
- hrHPV DNA (+) kadınlarda CIN3+ lezyonları tespit edebilmek için triyaj testlerine gereksinim vardır

HPV 16/18

- hrHPV (+) ancak sitoloji negatif sonuçların triyajında önerilmekte
- HPV 16/18 servikal kanserlerin en az %70'inden sorumlu
 - HPV 16/18 (+) kadınlarda CIN3+ lezyon riski daha yüksek,
 - HPV 16/18 dışı (+) olan grupta hala sitoloji triyajı gerekmektedir

Moleküler Yöntemler

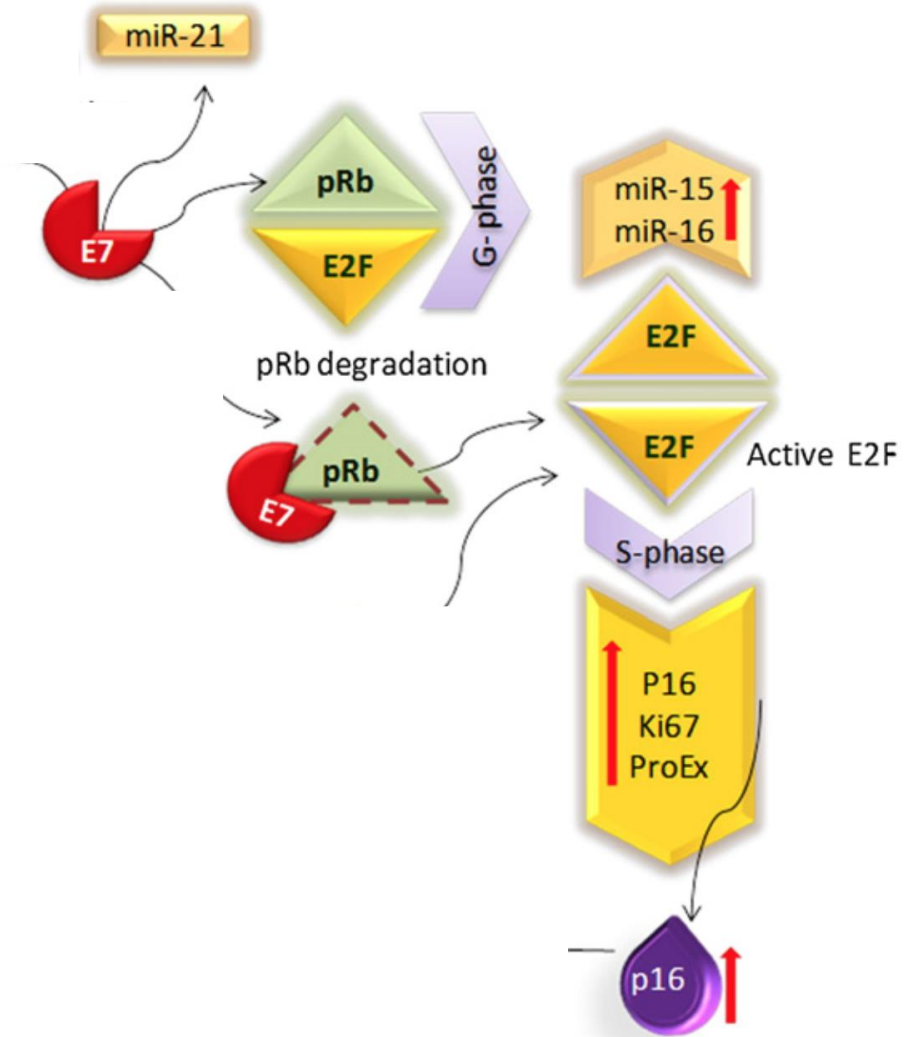
- HPV ilişkili karsinogenez basamakları bilinmeli
- Bir sonraki basamağa geçişte rol oynayan belirteçler bulunmalı
- Sonuçların yorumlanması ile prognoz tayini yapılabilmesi
- Hedefe yönelik tedaviye imkan sağlamalı

E6/E7 mRNA

- E6 ve E7 yolakları malign transformasyon için gereklidir
- E6/E7 transkripsiyon düzeyi lezyon şiddeti ile korelasyon gösterir
- hrHPV DNA (+), sitoloji normal kadınlarda
 - E6/E7 mRNA pozitifliği CIN3+ lezyonlar için risk faktörü
- Spesifisitesi yüksek ancak sensitivitesi düşük olduğundan test negatif kadınların takibi gerekir
- HPV 16/18/31/33/45/52/58 için E6/E7 mRNA kiti mevcut

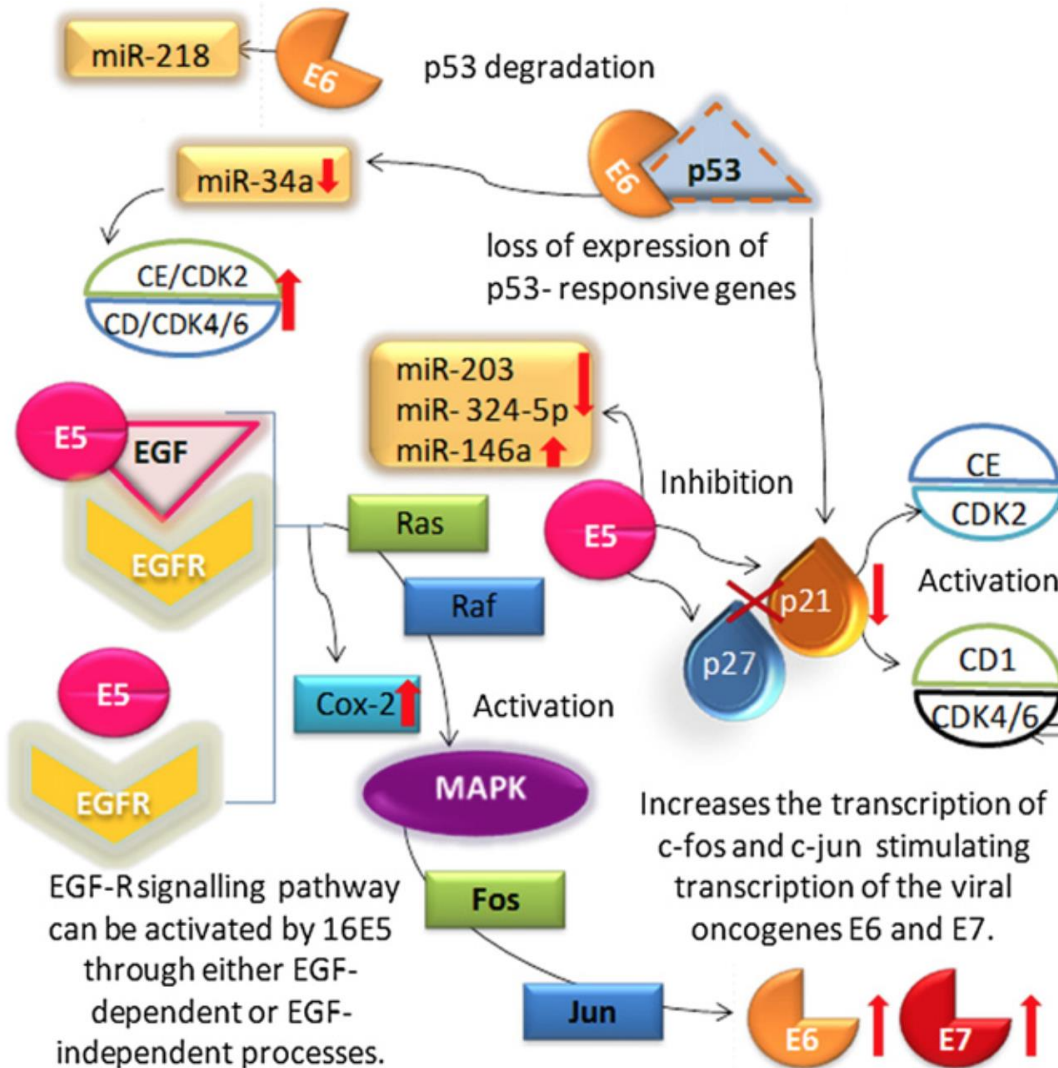
E7 YOLAĞI

- E7 pRB'ye bağlanır ve onu denature eder
- Aktif E2F disloke olur
- Böylece S fazı genleri
 - p16INK4a
 - Ki-67
 - ProExC
- Hem bazal hem de parabazal tabakalarda aktive olur



The feedback mechanism that normally results from p16 -induced inhibition of the cyclin D1/CDK4/6 complex is bypassed

E6 ve E5 yolakları



- E6 p53'e bağlanır ve onu degrade eder
- P53 degrade edildiğinde p53 yanıtı genlerin (p21, p27 gibi tümör supresor proteinler) ekspresyonunda kayıp meydana gelir
- Diğer taraftan E5 EGF bağımlı ya da bağımsız süreçler sonunda EGFR sinyal yolağını aktive eder

hrHPV E6/E7 Onkoproteinlerin Moleküler Hedefleri

- p16INK4a
- Ki-67
- ProExC
 - MMMC2
 - Top2a

HPV Viral Protein Tayini

- Onco E6 vs. Hybrid Capture 2 (High grade Lezyon)
 - Spesifiteleri
 - Onco E6 :%98.9
 - Hybrid Capture 2 :%86.8
 - Sensitiviteleri
 - Onco E6 :%63.7
 - Hybrid Capture 2 :%98
- Yüksek spesifisite nedeniyle HPV (+) kadınların triajında uygun olabilir.
- Cytoactiv testi için klinik veriler henüz yetersiz

Triyajda HPV E7 Onkoprotein Tayini

- HPV E7 onkoproteini persistan enfeksiyonu geçici enfeksiyondan ayırmada kullanılabilir
- Farklı sensitiviteye sahip kitler mevcuttur
- HPV 16/18 (+) kadınların kolposkopi için triyajında (normalde önerilen immediate kolposkopi)
 - Sitolojiye göre yüksek sensitivite, yüksek NPV
- Non 16/18 hrHPV (+) kadınların kolposkopi için triyajında (normalde önerilen sitoloji triyajı)
 - Sitolojiye göre yüksek sensitivite fakat 3.4 kat fazla kolposkopi ve yüksek maliyet

E6/E7 mRNA Tayini

| TEST | ® | Yöntem | Hedef | HPV Tipi | FDA Onayı |
|------------------------|------------|----------|-------------------------|----------------------|-----------|
| APTIMA | GenProbe | RT & PCR | E6/E7 mRNA | 14 HR HPV | + |
| OncoTect | IncellDX | RT & PCR | E6/E7 mRNA | 13 HR HPV | - |
| PreTect HPV-Proofer | Norchip | NASBA | E6/E7 transkriptleri | 16,18, 31, 33, 45 | - |
| NucliSENS EasyQ | Biomerieux | NASBA | E6/E7 transkriptleri | 16,18, 31, 33, 45 | - |

E6/E7 mRNA Tayini

- Ticari kitleri mevcut
- HPV E6 ve E7 mRNA over ekspresyonu karsinogenez ile ilişkili
- APTIMA vs. Hybrid Capture 2 (High grade lezyon)
 - ASCUS triajında
 - Sensitiviteleri eşit
 - APTIMA %19 daha spesifik
 - LSIL triajında
 - Sensitiviteleri eşit
 - APTIMA %37 daha spesifik

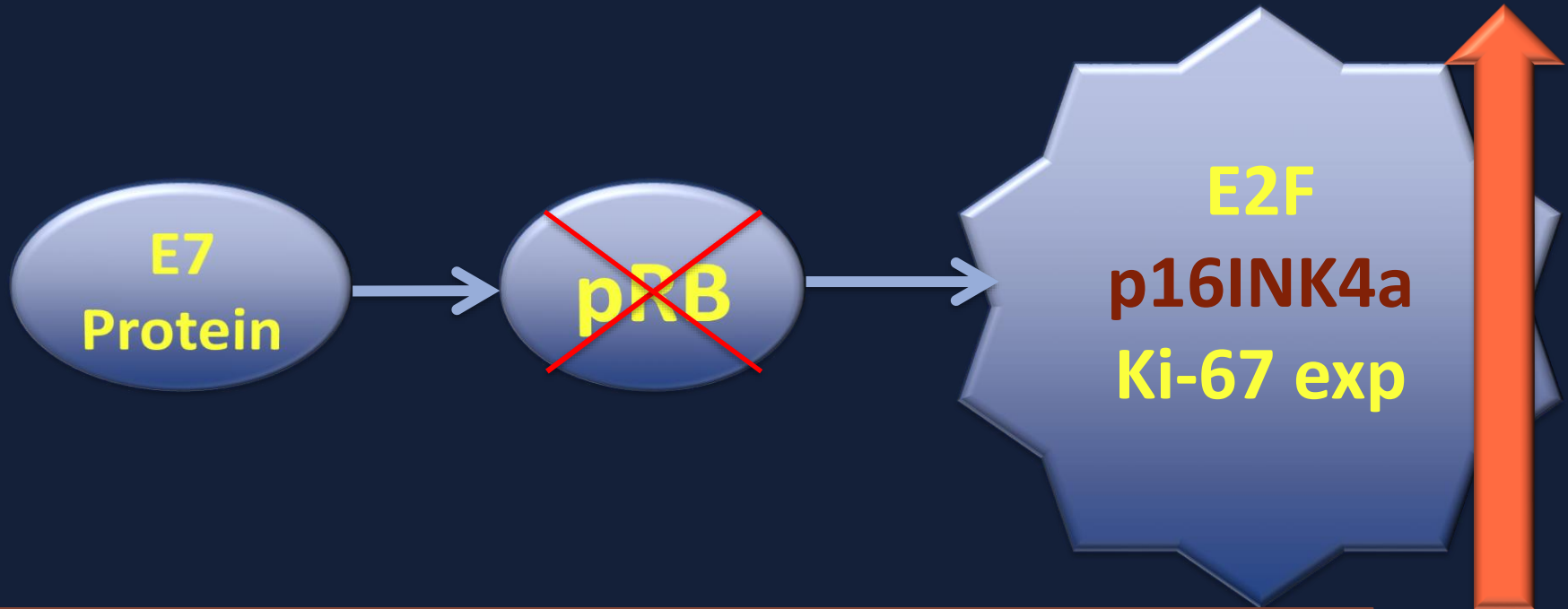
hrHPV DNA vs. E6/E7 mRNA

- Primer taramada E6/E7 mRNA kullanımı CIN3+ lezyon saptamada hrHPV testine göre daha yüksek spesifisite ve benzer sensitiviteye sahip
- Sitolojisi normal olan >30 yaş kadınlarda E6/E7 mRNA testinin spesifisitesi hrHPV testinden yüksek, sensitivitesi benzer

hrHPV E6/E7 mRNA + sitoloji kotest

- Primer taramada tek başına ya da sitoloji ile kombine olarak kullanılabilir
- hrHPV E6/E7 mRNA pozitifliği özellikle 35 yaş altında HPV 16/18 tayinine göre high grade lezyon tespitinde daha spesifik
- Genç yaşta hrHPV E6/E7 mRNA tespiti avantajlı olabilir

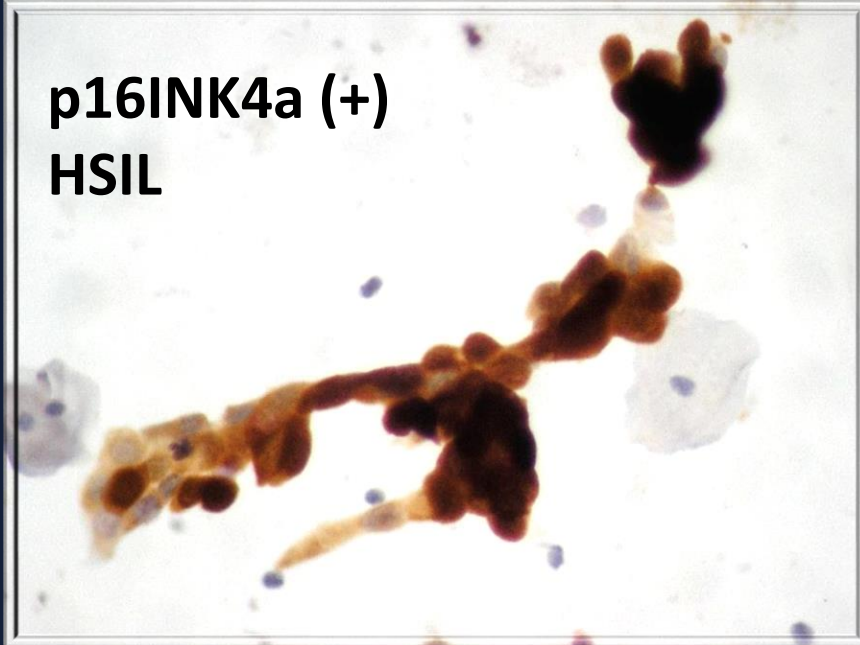
Serviks Kanserinde Hücresel Belirteçler



- P16 overekspresyonunun ELISA ya da immün boyama ile gösterilmesi
 - HPV infeksiyonunun
 - Viral onkogen aktivasyonunun
 - HPV ilişkili hücre siklus de-regülasyonunun göstergesidir
- p16INK4a immünboyaması da servikal lezyonların histopatolojik derecelendirmesinde kullanılmaktadır.

p16INK4a

- p16: hücre siklus regülatuar proteini
- CDK 4 ve 6 inhibisyonu
- G1-S fazı geçişini kontrol eder
- Hem histolojik kesitlerde hem de sitolojik preparatlarda



p16INK4a

- ASC-US triajında (High grade lezyon saptama)
 - Sensitivite: %83.2
 - Spesifite: %71
- LSIL triajında (High grade lezyon saptama)
 - Sensitivite: %83.8
 - Spesifite: %65.7
- Hybrid Capture 2 ile karşılaştırıldığında
 - ASC-US triajında
 - Relatif sensitivite: 0.95
 - **Relatif spesifite: 1.82**
 - LSIL triajında
 - Relatif sensitivite: 0.87
 - Relatif spesifite: 2.74

F.Carozzi, *Lancet Oncol.* 2008

J.Roelens, *Cancer Cytopathol.* 2012

p16INK4a

- 35-60 yaş arası HPV (+) kadınlarda

- 3 yıl içinde high grade lezyon

- p16INK4a (+) ise %8.8

- p16INK4a (-) ise %3.7

- Bu nedenle HPV (+) kadınların triajında kullanılabilir

F.Carozzi, Lancet Oncol. 2013

- Low-grade lezyonlarda

- p16INK4a(+) ise high grade lezyona progresyon

- p16INK4a(-) ise neredeyse tamamı regrese

Ozaki S, Human Pathol. 2011

p16INK4a

- HPV testinin spesifitesinin çok düştüğü 30 yaş altı kadınlarda bile yüksek spesifite ile high grade lezyonlar tanınabilir.
- Squamöz metaplazide siklus arrestine giren hücrelerde de p16 ekspresyonu artmakta!
- p16 ile Ki67 kombinasyonu ile gerçek prekanseröz lezyon ile squamöz metaplazi ayrımı yapılabilir.
- Bu amaçla Ki67/p16 kombine boyaları piyasada mevcut

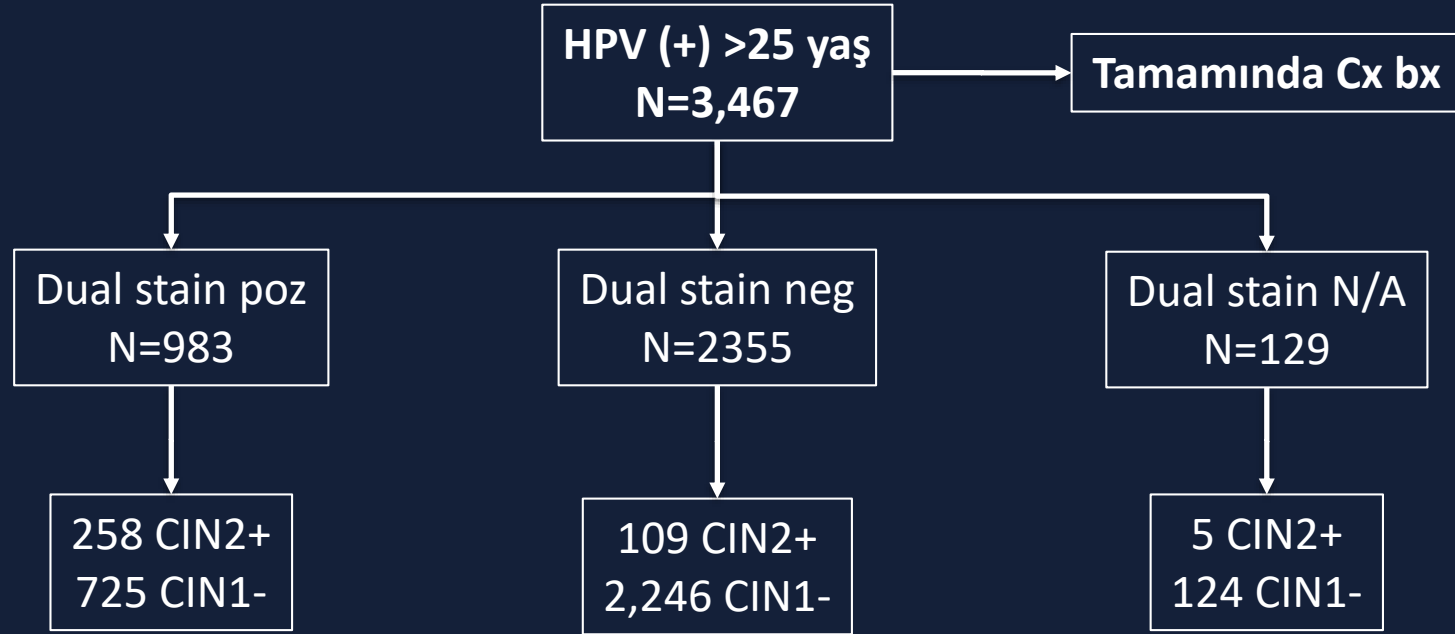
p16/Ki-67

- p16/Ki-67 ikili immunhistokimya boyası (CINtec Plus, mtm laboratories)
 - 138 konizasyon materyalinde yalnızca displastik lezyonlarda Ki-67 ekspresyonu (+)
 - p16/Ki-67 boyamanın
 - ASC-US için
 - Sensitivitesi: %92.2
 - Spesifitesi: %80.6
 - LSIL için
 - Sensitivitesi: %94.2
 - Spesifitesi: %68
- M.Reuschenbach, *Int J Cancer*. 2012
- D Schmidt, *Cancer Cytopathol*. 2011
- Sitoloji (-), HPV (+) kadınların triajında kullanılabilir

p16/Ki-67

- 5 ülke, 27.456 hasta, prospektif çalışma
 - Sitoloji
 - HPV (Hybrid capture 2, Qiagen)
 - p16/Ki-67 boyama
- Herhangi bir testte anormal sonuç: KOLPOSKOPİ
 - Yaştan bağımsız olarak p16/Ki67 boyaması high grade lezyon saptamada sitoloji kadar spesifik
 - 30 yaş üzeri kadınlarda HPV testi daha sensitif fakat daha az spesifik
 - Bu tekniklerin kombinasyonu ile arzulanan sensitivite/spesifite oranına ulaşılabilir

HPV (+) kadınların p16/Ki67 ile triyajı



- hrHPV (+) kadınlarda dual boyama sitoloji ile karşılaştırıldığında CIN3+ için sensitivitesi %74.9 vs. %51.9 ($p<0.001$). NPV %97.4 vs. %95.2 ($p<0.001$). PPV %18.5 vs. %14 ($p<0.001$). Spesifisiteleri benzer
- HPV 16/18 (+) kadınlarda dual boyama sitoloji ile karşılaştırıldığında CIN3+ için sensitivitesi %86.8 vs. %78.2 ($p<0.001$). Spesifisiteleri benzer

MCM 2 ve TOP2A

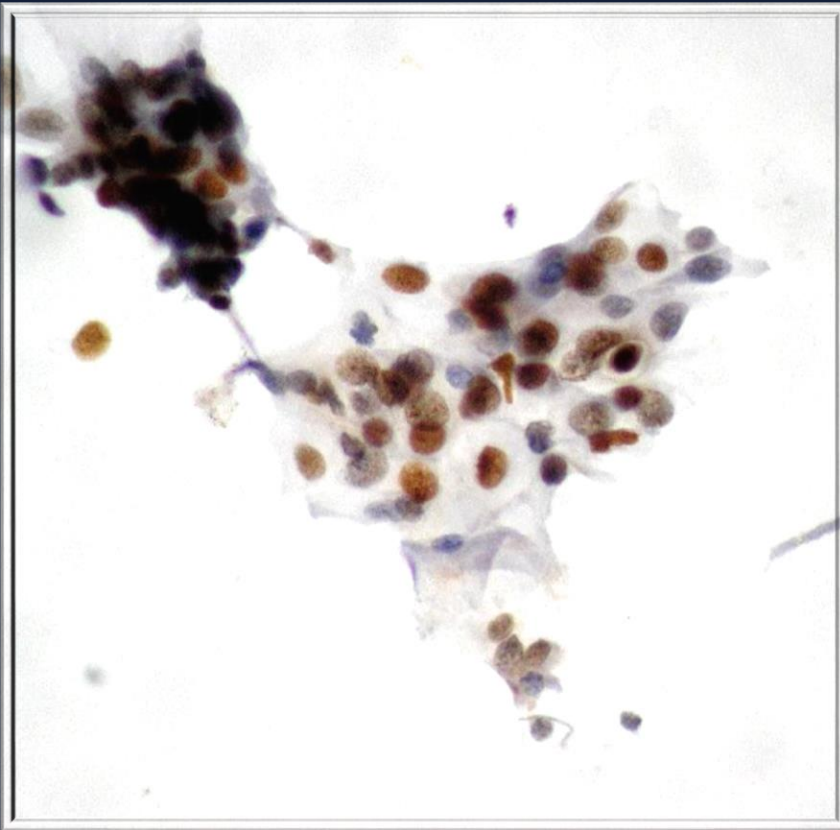
- Minichromosome maintenance protein 2 (MCM 2) ve topoisomerase II alpha (TOP2A)
 - E6 ve E7 protein ekspresyonu ile bağlantılı
 - Aberan S-fazı göstergesi
 - Normal hücrelerde de bir miktar eksprese edilir
- High-grade lezyonlarda ekspresyonu artmış
- HPV (+) kadınlarda high grade lezyonları ve serviks kanserini öngörmede değerli

MCM 2 ve TOP2A

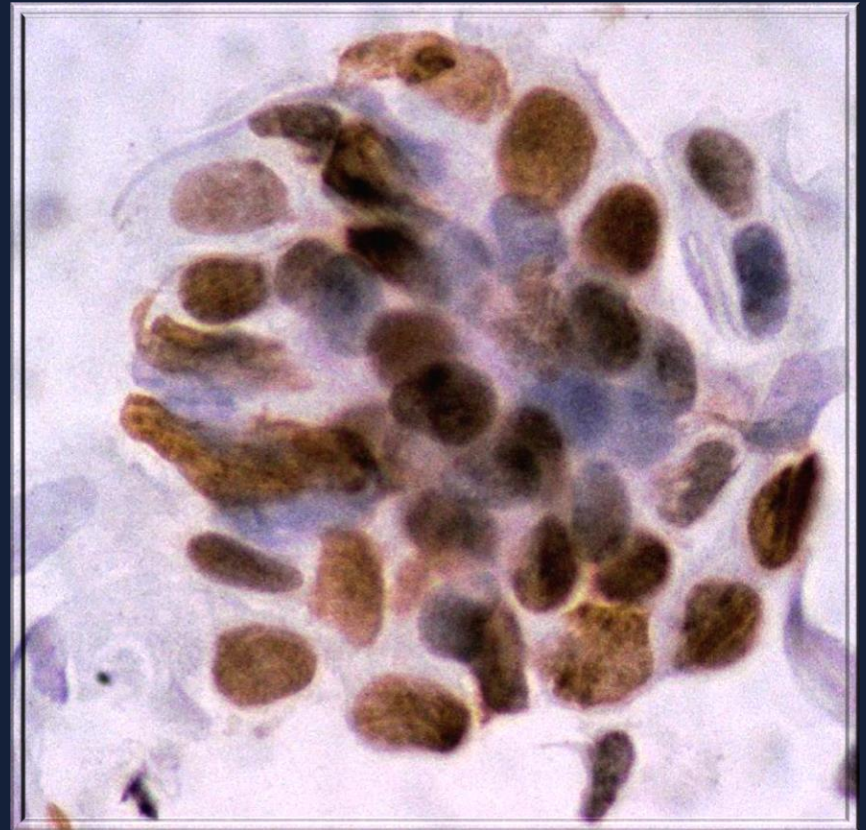
- ProExCTM (Becton-Dickinson)
 - MCM 2/TOP2A ticari spesifik antikor bağlama kiti
 - p16INK4a ile karşılaştırıldığında
 - High grade lezyon saptamada düşük spesifite
 - High-risk HPV (+) kadınların triajında kullanılırsa
 - High grade lezyon için spesifite %85'ten %98'e çıkmakta
 - Böylece kolposkopiye refere edilen olgu sayısı %55 azalır

MCM 2 ve TOP2A

ProExCTM (+) HSIL (40X)



ProExCTM (+) HSIL (100X)



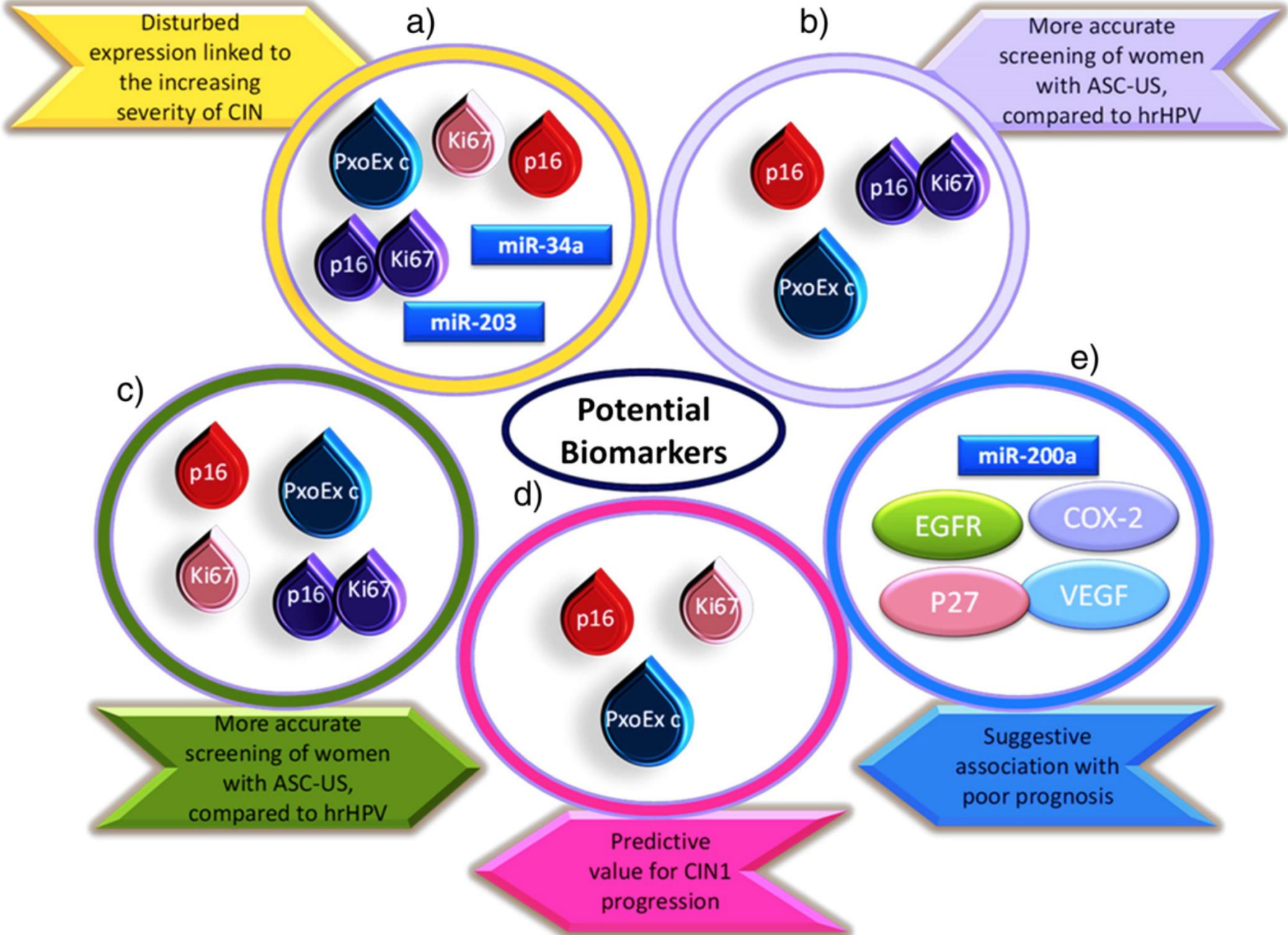
HPV E5 Onkoproteininin Moleküler Hedefleri

- Hücre Yüzey Reseptörleri
 - EGFR
- p21,p27
- CoX-2, VEGF, Cav-1

E4 ve L1

- Yalnızca HPV ile enfekte olan ve viral replikasyon kapasitesi kazanan geç dönem keratinositlerde saptanır.
- Produktif enfeksiyon göstergesidir (LSIL, CIN-1, genital wart)
- High-grade lezyonlarda yine de viral replikasyon görülebildiğinden spesifitesi düşüktür





Disturbed expression linked to the increasing severity of CIN

More accurate screening of women with ASC-US, compared to hrHPV

Potential Biomarkers

More accurate screening of women with ASC-US, compared to hrHPV

Predictive value for CIN1 progression

Suggestive association with poor prognosis

E5,E6 ve E7 tarafından Modüle Edilen Konak MikroRNA'ları

- MikroRNAlar yaklaşık 21 nükleotidten oluşan ve hedef mRNA translasyonunu suprese ederek gen ekspresyonunu düzenleyen yapılardır
 - miRNA: hücrel gen ekspresyonunu ve transkripsiyonu düzenleyen küçük, tek sarmal RNA fragmanları
 - miRNA
 - Proliferasyon
 - Apoptoz
 - Diferansiasyon
- gibi önemli süreçlerde yer alan genleri regüle ederler.

miRNA

- Konak hücrelerinde E6 etkisi
 - miR-218
 - miR-34adownregülasyonu ile ilişkilidir.
- Servikal karsinogenezin erken evresinde aktif olan E5, konak hücrelerinde
 - miR-203
 - miR-324-5downregülasyonu ile ilişkilidir.

Mikro RNA Ekspresyonu

- High risk HPV ile enfekte olan kadınlarda miR-218 düzeyinde düşüş
- Serviks kanseri dokularında miR-375 düzeylerinde düşüş
- miRNA downregülasyonu kanser progresyonu için marker olarak kullanılabilir

Gen Metilasyonu

- Anormal sitolojili ya da hR-HPV (+) kadınların triyajında kullanılabilir
- HPV L1 gen metilasyonu ile high risk lezyon arasında ilişki vardır
- **HPV 16, 18, 31 ve 45 için:**
 - **L1, L2, E2 ve E4 genlerindeki multiple CG metilasyonları high grade lezyon ile ilişkili**
- **Çalışmalar henüz primitif düzeyde**

Gen Metilasyonu

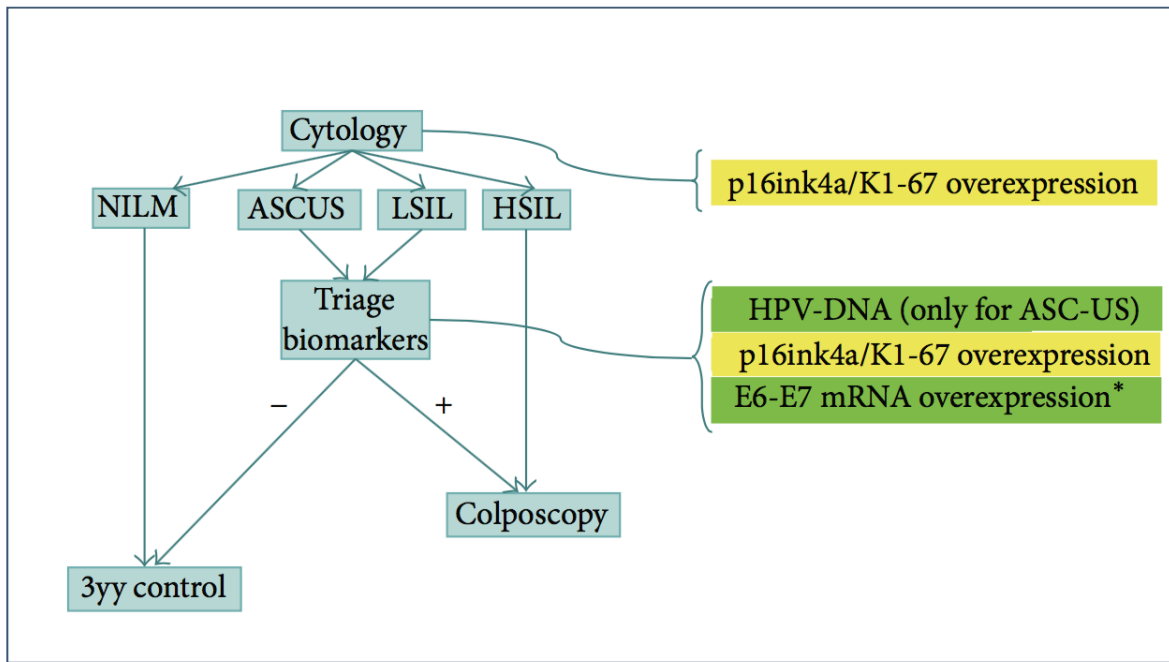
- Serviks kanserinde en çok metilasyonu gösterilen genler: DAPK1, CADM1, ve RARB
- Serviks kanseri gelişiminden 7 yıl önce servikal sitolojide bu genlerin aşırı metilasyonu saptanabilir

Gen Metilasyonu

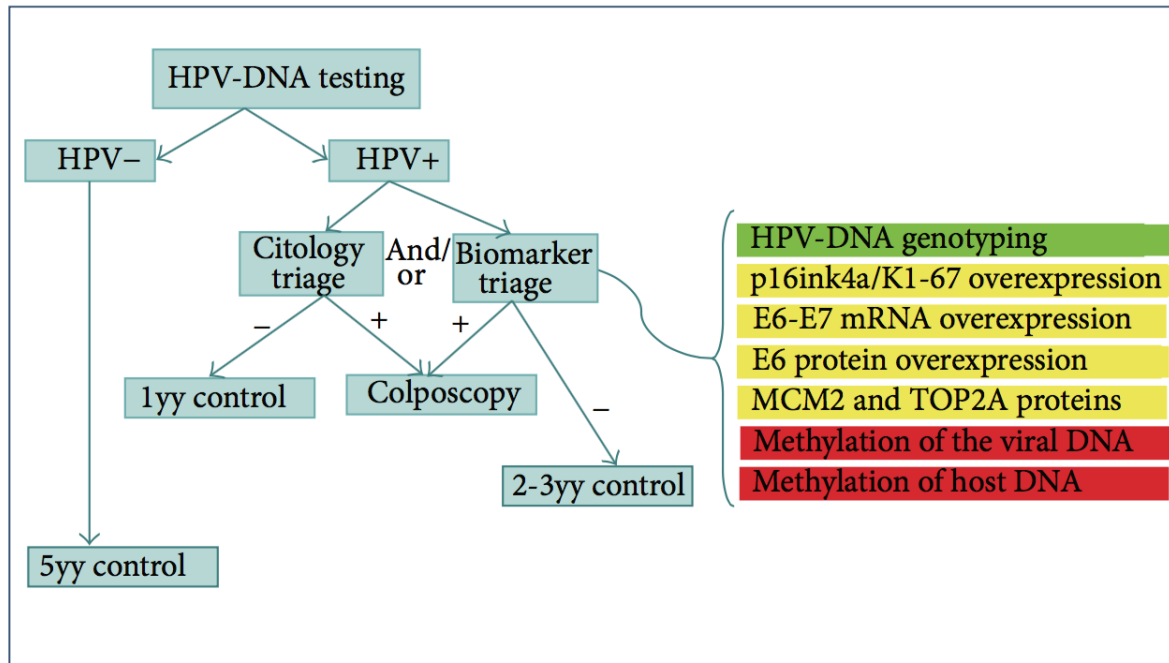
- FAM19A4 promoter metilasyonunun gösterilmesi serviks kanseri için %100'e yakın sensitivite sunmaktadır
- hrHPV (+) ya da HPV16/18 (+) kadınların triyajında kullanılabilir
- **30 yaş altı hrHPV (+) kadınların triyajında sensitivite ve spesifite değerleri 30 yaş üzeri grupla benzerdir**

HPV DNA Entegrasyonu

- HPV DNA'sının konak genomuna entegrasyonu
 - High grade lezyonlarda sıkça gözlenir
 - Takipten ziyade tedavi endikasyonu
 - Tedavi sonrası takipte ve rekürrensi öngörmede çok spesifik



(a)



SONUÇLAR

- Servikal kanser günümüzde gelişmemiş ülkelerin sorunudur.
- Gelişmemiş ülkelerde hr-HPV prevalansı çok yüksektir, bu nedenle HPV tabanlı taramanın spesifitesi düşmekte ve over-treatment sorununa neden olmaktadır
- Özellikle genç yaş HPV(+) ya da anormal sitolojisi olan kadınların triyajında daha spesifik testlere ihtiyaç duyulmaktadır.
- Yakın gelecekte moleküler yöntemlerin primer taramada kullanılabilmesi için daha çok kanıtı ihtiyaç vardır

SONUÇLAR

- Servikal kanser taramasında morfolojik tabanlı tanısal sorunlar yakın gelecekte moleküler belirteçlerin kullanımı ile ortadan kalkacaktır
- Taramada temel sorun persiste edecek ve progresyon gösterecek lezyonları saptayabilmektir
- Biyobelirteçlerin rutin kullanıma girebilmeleri için validasyon çalışmalarına ihtiyaç vardır.
- p16/Ki67, miRNA ve metilasyon çalışmaları servikal kanser taramasının geleceğinde ümit vaat eden belirteçlerdir.
- Tarama kapsamının artması ve kendi kendine örnekleme yapılması desteklenmelidir.