



TÜRKİYE BİLİMSEL VE
TEKNİK ARAŞTIRMA KURUMU

THE SCIENTIFIC AND TECHNICAL
RESEARCH COUNCIL OF TURKEY

1997-278

TÜRKİYE BİLİMSEL VE
TEKNİK ARAŞTIRMA
KURUMU KÜTÜPHANESİ

*PROSTAT VE MESANE DOKULARINDA
PZR(POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU) İLE
İNSAN PAPİLLOMAVİRÜS (HPV) TANISI*

PROJE NO: SBAG-AYD-6

Tıp Araştırma Grubu

Medical Sciences Research Grant Committee

1995-00132

P

1997-278
TÜRKİYE BİLİMSEL ve
TEKNİK ARASTIRMA
KURUMU KÜTÜPHANESİ

PROSTAT VE MESANE DOKULARINDA
PZR(POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU) İLE
İNSAN PAPİLLOMAVİRÜS (HPV) TANISI

PROJE NO: SBAG-AYD-6

Marmara Ün. Tıp F.
Tıbbi Biyoloji ve Genetik
ABD.

PROF. DR. BEYAZIT ÇIRAKOĞLU
DR. İLTER GÜNEY
DR. ULUHAN SİLİ

Say. 9
Ref. 20

MART 1996
İSTANBUL

Bağış- Hacıoğlu. 1996

20227

ÖNSÖZ

Papova virüs ailesinden olan papiloma virüslerinin, ilk önceleri sadece siğil (verruko vulgaris) ve kondiloma akümünata gibi selim deri lezyonlarına neden olduğu düşünülmekteyken, şu anda değişik malignansilerin etkeni olabileceğine de inanılmaktadır. Farklı klinik bulgulara sahip olan 70' in üzerinde HPV genotipi belirlenmiştir. Özellikle anogenital bölge malignansilerinden servikal kansere neden olduğuna inanılan HPV tipleri üzerindeki çalışmalar yoğunlaştırılmıştır. 6 ve 11 tipleri selim anogenital bölge kondiloma akümünatalarına veya düşük-derece SIN (servikal intraepitelital neoplasia) lezyonlarına yol açtığı için düşük-risk HPV tipleri olarak, 16 ve 18 tipleri de, daha çok yüksek-derece SIN ve servikal karzinomlarda bulunduğu için yüksek-risk HPV tipleri olarak tanımlanmıştır. Bütün bu ilerlemelere rağmen, hala geniş epidemiyolojik çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

Bu çalışmada ürogenital bölgede görülen kanser tiplerinden prostat, mesane ve testis kanserlerinde HPV pozitifliği saptanmaya çalışıldı.

Bu ve benzeri çalışmaların artmasıyla birlikte, gelecekte ürogenital bölge kanserlerine daha duyarlı tanı konulabilecek ve prognoz daha iyi değerlendirilip uygun tedavi yöntemlerinin belirlenmesinde HPV tiplendirmesinin önemini ortaya çıkacaktır.

Bu proje Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu, Sağlık Bilimleri Araştırma Grubu tarafından Araştırma Altyapısını Destekleme fonu ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

Sayfa	1. Giriş ve Genel Bilgiler
	2. Amaç
	3. Materyal ve Metod
	6. Bulgular
	7. Tartışma
	8. Kaynaklar

ÖZ

HPV'nin onkogenik tiplerinin kadınlarda serviks kanserinin gelişmesinde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Bu çalışmada ürogenital bölge kanserlerinden mesane, testis ve prostat kanserleri HPV açısından değerlendirilmiştir. Örnek olarak mesane kanserli dokunun kültürü, testis kanserli ve prostat kanserli dokuların da parafin kaplı patolojik bloklarından alınan kesitleri kullanılmıştır. Bu örneklerden uygun yöntemler ile DNA izole edilerek, PZR (polimeraz zincir reaksiyonu) ile HPV pozitifliği ve negatifliği tespit edilmiştir. PZR'de kullanılan primerler HPV-L1 bölgesine özel olup tüm HPV tiplerini saptayabilmektedir.

Alınan ilk sonuçlarda testis kanserli örneklerden sadece bir tanesinde HPV pozitifliği saptandı. Mesane ve prostat kanserli örneklerde ise HPV pozitifliğine rastlanmadı. Sonuçların epidemiyolojik anlam kazanabilmesi için örnek sayıları arttırılacak, aynı zamanda HPV tiplendirmesi de yapılacaktır.

ANAHTAR KELİMELER

HPV, PZR, Prostat kanseri, Testis kanseri, Mesane kanseri

PROSTAT VE MESANE DOKULARINDA PCR YÖNTEMİ İLE İNSAN PAPİLLOMA VİRÜSÜ (HPV) TANISI

1. GİRİŞ VE GENEL BİLGİLER

19. yüzyılın başlarından itibaren, özellikle servikal kanser gelişiminde cinsel yolla bulaşan bir etkenin rolü olabileceği düşünülmüş ve araştırmalar bu yönde yoğunlaştırılmıştır. Bazı insan papilloma virüs (HPV) tiplerinin servikal kanser gelişiminde en önemli etken olduğu ilk olarak 1976 yılında Zur Hausen tarafından ileri sürülmüştür (Zur Hausen,1976). Daha sonraki çalışmalar ve biriken veriler, birçok servikal tümörün ve tümörlü hücre serilerinin HPV dizilerini içerdiğini (Durst,1983; Boshart, 1984) ve normal servikslerin nadiren enfekte olduklarını (Mc Cance, 1985) ortaya koymuştur. Günümüzde epidemiyolojik bulgular çok daha karmaşık olmasına rağmen, bazı HPV tiplerinin oluşturduğu enfeksiyonlar, belirgin olarak servikal kanser gelişimine yol açmaktadır.

HPV enfeksiyonu ile servikal neoplazi arasındaki ilişki, hem kadın hem de erkek genital sistem lezyonlarında insan papilloma virüsünün rolünü araştırmaya yöneltmiştir. Son yüzyılda HPV'ye bağlı lezyonlardaki belirgin artış (Brown) ve virüsün cinsel yolla bulaştığını gösteren araştırmalar (Scheinder,1987) erkek genital sistemini içerecek çalışmalarında HPV-kanser ilişkisini aydınlatacağını ortaya koymuştur. Böylece virüs-kanser ilişkisinde iyi bir model olan HPV'nin tüm genital sistem lezyonlarında araştırılmasına önem verilmiştir (Pao, 1994; Reid, 1991)

PAPILLOMAVİRÜSLER

Papillomavirüsler epiteliyotrofik, çift zincirli, yaklaşık 8 kilobaz (kb) uzunluğunda ve 5×10^6 dalton(D) molekül ağırlığına sahip DNA virüsleridir. Çift zincirli genomu 72 kapsomerden oluşmuş 55 nm çapından bir ikozahedral kapsidle çevrelenmiştir. Papilloma virüsler daha önceleri polioma ve SV 40 virüsleri ile beraber papova virüsler sınıfına sokulurken, günümüzde ayrı bir sınıf olarak değerlendirilmektedir.

Tüm papilloma virüslerinin sınıflandırılması, bilinen ve yeni tiplerin nükleik asit dizi homolojisiindeki farklılıklara dayanmaktadır. Papilloma virüsünün nükleik asit dizisi daha önceki tiplere göre %50'den daha az benzerlik gösteriyorsa, yeni bir tip olarak numaralandırılır. %50'den daha fazla benzerlik gösteren tiplerde aynı numara altında alt gruplara ayrılırlar (Crum, 1991). Bugüne kadar 70'in üzerinde değişik tip HPV tanımlanmıştır.

HPV INCELEME METODLARI

Genital sisteme ait kondilomların, yassı hücreli prekanseröz lezyonların ve invaziv yassı hücre karsinomlarının çoğunluğu HPV içermektedir. Bu lezyonlarda, değişik inceleme metodları ile değişik oranlarda HPV pozitifliği saptanmakta ve iki veya daha fazla metodun birarada kullanılmasıyla da %100'e varan oranlarda HPV pozitifliği bulunmaktadır. Son yıllarda geliştirilen inceleme metodları yardımıyla HPV ile genital prekanseröz ve kanseröz lezyonlar arasındaki ilişki araştırılmıştır.

HPV'nin belirlenmesinde sitolojik ve histolojik incelemenin oldukça yetersiz kalması nedeniyle (Nuovo, 1990; Eavin, 1992) günümüzde HPV'nin belirlenmesindeki tek geçerli uygulama nükleik asit inceleme metodlarıdır.

Bu metodlar başlıca iki gruba ayrılabilir (Carlson, 1992).

1. Nükleik asitlerin dokulardan saflaştırılmasını gerektiren metodlar:

Ör: Southern blot, dot blot, Northern blot ve ters hibridizasyon metodları, PZR (polimeraz zincir reaksiyonu)

2. Doğrudan klinik örnekler üzerinde uygulanan metodlar:

Ör: Filtre in situ hibridizasyon (FISH) ve DNA/RNA in situ hibridizasyon teknikleri.

Ayrıca bu tekniklere son yıllarda geliştirilmiş olan ve bu iki grubun ortak kullanımı sayılabilecek in situ PCR tekniği de eklenmiştir.

Yukarıdaki teknikler HPV DNA veya RNA'sını belirlemekte ve duyarlılık, özgüllük ve diğer faktörler yönünden birbirinden ayrılmaktadır. Bu teknikler içinde polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) çok az miktarda DNA gerektiren en duyarlı metottur ve tıp alanında yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır (Thibodeau, 1994)

2. AMAC

Son yıllarda yapılan çalışmalarla insan neoplazilerinde ve özellikle serviks karsinomunda insan papilloma virüsü (HPV)'nin önemli bir etken olduğu anlaşılmıştır. Bugün 70'in üzerinde tipi bulunan HPV'ler değişik klinik tablolar oluşturdıklarından, bu virüslerin normal ve hastalıklı doku örneklerinde saptanması ve tiplendirilmesi çok önemlidir.

Bu çalışma, HPV'nin ürogenital sisteme ait değişik dokularda polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi ile yüksek duyarlılıkta tanısını gerçekleştirmeyi amaçlamaktadır. Böylece virüsün belirlenmesinde en duyarlı metod olarak kabul edilen PCR yöntemi bu amaçla rutin olarak kullanılacaktır ve gelecekte daha kapsamlı epidemiyolojik çalışmalar yapılabilir.

2

3. MATERYAL VE METOD

MATERYAL

Çalışmada 5 adet mesane kültür örneği, 15 adet prostat kanseri ve 10 adet normal prostat dokusuna ait biyopsi materyali, 10 adet de testis kanserine ait biyopsi materyali kullanıldı. Tüm materyaller Marmara Üniversitesi Üroloji ve Patoloji kliniklerinden alındı.

METOD

DNA ELDESİ

MESANE KÜLTÜR Örnekleri

Kültürler Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı'ndan alındı. Mesane tümörü nedeniyle opere edilen hastalardan alınan tümör örnekleri steril şartlarda +4 °C'da Ringer laktat/gentamisin solüsyonu içerisinde laboratuvara ulaştırılmış ve hücre kültürleri yapılana kadar materyal +4 °C'da saklanmıştı. Mikroorgan kültürü hazırlamak üzere tümör dokuları PBS içinde yıkanmış. Daha sonra 1 mm³ boyutlarında ufak parçalara ayrılmış ve doku kültür plaklarına yerleştirilmiştir. Yaklaşık 5 dakika süre ile doku parçalarının tabana yapışması beklenmiş, ardından 2.5 ml kültür solüsyonu ortama eklenmiştir. Bu işlemi takip eden 48 saat boyunca tümörün yerinden ayrılmasını engellemek amacı ile kültür plaklarına hiç dokunulmamış ve hareket ettirilmemiştir. Bu süre sonunda tümör hücrelerinin ekplanttan dışarı doğru ilerlediği ve monolayer halini aldığı, bunların çoğunun da canlı olduğu saptanmıştır. Bu şekilde elde edilen kültür materyalinin bir kısmı içinde 10 ml. transport solüsyonu bulunan 20 ml'lik kapaklı steril tüplere aktarıldı ve -20 °C'de saklandı.

DNA ekstraksiyonu için iyice karıştırılan tüpten 250µl örnek 1,5 ml.lik mikrosantrifüj tüpüne aktarıldıktan sonra, 5 dakika 5000 rpm'de santrifüjlendi ve süpernatant atılarak pellete 250 µl NaCl (%0,9) eklendi. Tekrar 5 dakika 5000 rpm'de santrifüjlenen örneğin süpernatantı atılıp üzerine taze hazırlanmış 100µl kesim tamponu kondu 5 saniye kadar vortekslenen örnek, 1 saat 55 °C'de derecede inkübe edildikten sonra, tekrar vortekslendi ve 10 dakika 95 °C'de bekletilip bir kez daha vortekslenerek DNA eldesi tamamlandı.

Örneklerden 5-100 µg kromozomal DNA elde edildi. DNA miktarının kantitatif ve kalitatif tayini spektrofotometre ve agaroz jel elektroforezi ile gerçekleştirildi. DNA konsantrasyonu, 50 µg çift zincirli DNA'nın 260 nm'deki absorpsiyonunun 1.0 olduğu düşünülerek hesaplandı. A260/A280 oranı DNA örneğinin saflığının tayin edilmesini sağladı ve 1.6-1.8 arasında bir değere sahip olan örnekler saf olarak kabul edildi.

PARAFİN KAPLI PROSTAT VE TESTİS Örnekleri

Parafin bloktan alınan 10µm kalınlığındaki prostat kesitleri 1.5ml lik steril mikrosantrifüj tüpüne konup steril iğne yardımı ile parçalandı. Lam üzerinde bulunan testis örnekleri ise steril bistüriler yardımıyla kazınarak yine aynı şekilde 1.5ml lik tüplere aktarıldı. Bu aşamadan sonra her iki grup örneğe de aynı protokol uygulandı.

Örnekler 1 dak. 11000 rpm de santrifüjlendikten sonra 500µl ksilen eklendi ve 15 dak. karıştırıldı. 3 dak. 11000 rpm de santrifüj uygulandı ve örnekten ksilen atıldı. Ksilen aşaması bir kez daha tekrar edildikten sonra 500µl %100 etanol eklendi ve örnek 3 dak. 11000 rpm de santrifüjlendi. Etanol işlemi bir kez daha tekrarlanarak, tüpe 10µl HPLC-GRADE dereceli aseton ilave edildi ve örnek 55 °C'deki etüvde kurutuldu. Daha sonra tüpe 200µl kesim tamponu konup 55 °C'de inkübe edildi. Ertesi gün örnek 10 dak. 95 °C'de bekletilerek proteinaz K inaktive edildi ve DNA eldesi tamamlandı. DNA miktarının tayini mesane kültür örneklerindeki gibi yapıldı.

POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU

Mesane Kültürü

HPV / b-Globulin için hazırlanan her dNTP den 10mM içeren dNTP karışımı, 50pmol her HPV-L1 ortak primeri (MY09 ve MY11) 5pmol her b-Globin primeri (PC04 ve GH20) ve 5 ünite Taq polimeraz (Promega) içeren toplam 100µl hacmindeki PCR reaksiyon karışımına 1mg DNA örneği eklendi ve tüpün üzerine 100µl mineral yağ kondu. Aşağıdaki PCR protokolu uygulandı.

Denatürasyon	95°C	1dak.
Primer bağlaması	55°C	1dak.
Uzama	72°C	1dak.
Toplam döngü sayısı 35.		

Parafin Kaplı Prostat ve Testis Örnekleri

Parafin dokular için mesane kültüründe kullanılan PCR karışımı aynen uygulandı ve 1 µg DNA örneği kullanıldı. Aşağıdaki PCR protokolu uygulandı.

Denatürasyon	95°C	1dak.
Primer bağlaması	55°C	1dak.
Uzama	72°C	1dak.
Toplam döngü sayısı 40.		

Ayrıca her grup içinde birinci döngüden önce 85 °C'de 2 dak. ılık bir ısıtma dönemi ve son döngüden sonra son uzama aşamasının tamamlandığından emin olmak için 72 °C'de 5 dak. ılık ek bir süre daha uygulandı.

AGARoz JEL ELEKTROFOREZİ

İncelenecek DNA parçalarının uzunluğuna bağlı olarak %1.6'lık agaroz jeller 1x TBE tampon çözeltisi içinde kaynatılarak hazırlandı ve jel solüsyonuna, son konsantrasyonu 0.5 mg/ml olacak şekilde etidyum bromür eklendi. Marker, örnek, pozitif ve negatif kontrol, distile su ile seyreltilmiş 10x yükleme tampon çözeltisi ile karıştırılarak jele yüklendi ve oda ısısında jele bir saat süreyle 100 V'luk akım uygulanarak elektroforez gerçekleştirildi.

SOUTHERN BLOT ANALİZİ

Örnekler için Southern transfer gerçekleştirildi.

Bir Whatman 3MM filtre kağıdı uygun şekilde kesilip, cam bir levhanın etrafına sarılarak, dikdörtgen şeklindeki bir plastik kabın üzerine boylamasına yerleştirildi. Plastik kab 1/4 oranında 20xSSC ile dolduruldu ve filtre kağıdı aynı solüsyon ile ıslatıldı.

PCR ürünlerinin bulunduğu %1.6'lık agaroz jel, içinde denatürasyon tampon çözeltisi bulunan bir plastik kaba konuldu ve 1/2 saat karıştırıcının üzerinde bırakıldı. Daha sonra denatürasyon tampon çözeltisi boşaltılıp, kaba, jel nötralizasyon tampon çözeltisi konuldu ve 15 dakika karıştırılarak inkübe edildi. Taze jel nötralizasyon tampon çözeltisi ile aynı işlem bir defa daha tekrarlandı.

Daha sonra jel filtre kağıdının üzerine yerleştirildi. 20x SSC'nin buharlaşmasını önlemek için, saran rap ile cam ve plastik kab tamamen kaplandı. Jelin sınırlarından saran rap kesilerek jelin üzerinde kalan kısım çıkarıldı ve jel büyüklüğünde kesilen naylon nükleik asit transfer membranı (Hybond N+, Amersham) jelin üzerine dikkatlice konuldu.

Jel büyüklüğünde kesilen üç filtre kağıdından ikisi membranın üzerine, üçüncü filtre kağıdı ise distile su ile ıslatıldıktan sonra en üste yerleştirildi. Bunların üzerine, bol miktarda kağıt havlu, kağıt havluların üzerine de bir cam levha konuldu ve bu cam levhanın üstüne konulan ağırlıklar ile düzenek tamamlandı. Transfer için 18-22 saat beklendi.

Sürenin sonunda membranın üzerindeki her teker teker kaldırıldı, ve membran uçlarından dikkatlice tutularak, içinde 2x SSC bulunan plastik bir kaptaki 1 dakika yıkandı. Böylelikle jel parçacıkları membrandan uzaklaştırıldı. Daha sonra membran, filtre kağıtları arasında kurutuldu ve DNA yüzü yukarı gelecek şekilde saran rape yerleştirildi. Membrana 1.5 dakika süre ile UV uygulandı ve böylece transferi tamamlanan DNA membrana fikse edildi.

Membran, saran rape sarılarak ve işaretlenerek hibridizasyon yapılmak üzere oda ısısında saklandı.

4. BULGULAR

Mesane Kültür Materyali :

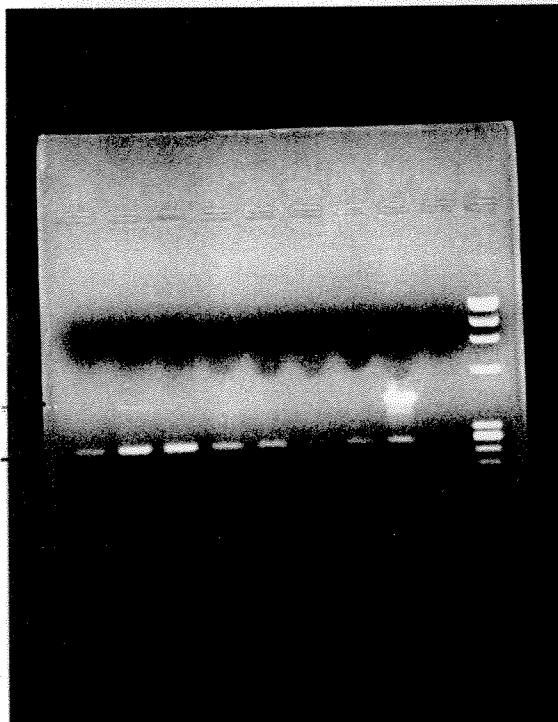
Çalışmaya dahil edilen beş adet mesane kültür örneğinin hepsinde DNA izolasyonu başarıyla yapıldı. Polimeraz zincir reaksiyonu ile incelenen örneklerin tamamında beta-globin gen amplifikasyonu (+), HPV (--) bulundu. Pozitif ve negatif kontrol örnekleri çalıştı.

Parafin Kaplı Prostat Örnekleri :

Çalışmaya alınan 15 adet prostat kanseri ve 10 normal prostat dokusuna ait biyopsi materyali deparafinize edildikten sonra DNA izolasyonu tüm örneklerde başarıyla tamamlandı. Daha sonra uygulanan polimeraz zincir reaksiyonu sonucunda negatif kontrol örneğinde HPV pozitifliği görülmesi nedeniyle bloklardan tekrar kesit alınarak çalışmanın tekrarına karar verildi. Bu nedenle testis örnekleri de çalışmaya dahil edildi.

Parafin Kaplı Testis Örnekleri :

Çalışılan 10 testis kanseri örneği deparafinize edildikten sonra, bu örneklerin tümünde DNA izolasyonu başarıyla yapıldı. Polimeraz zincir reaksiyonu ile incelenen örneklerin dokuzunda beta-globin gen amplifikasyonu (+) bulundu. Değerlendirmeye alınan bu dokuz örneğin birinde HPV pozitifliği saptandı (Şekil 1). Çalışmadaki pozitif ve negatif kontrol örnekleri çalıştı. Daha sonra jeldeki örnekler, southern transfer yöntemi ile naylon membrana aktarıldı ve tipe özgü problarla hibridize edilmek üzere oda ısısında saklandı.



1. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8. 9. 10.

Şekil 1: HPV-L1(MY09-MY11, 450 bp) ve b-globin (PC04-GH20, 286 bp) bölgelerine uygulanan polimeraz zincir reaksiyonunun sonuçlarının % 1,6'lık agarose gelinde görüntülenmesi.

1-7 no'lu kayular, parafin kaplı testis kanseri örneklerini; 8 no'lu kayu, (+)kontrolü ; 9 no'lu kayu , blank'i içermektedir.

10 no'lu kayuda DNA markırı olarak kullanılan PhiX174 / Hae III (1353,1078,872,603,310,281,271,194,118,72) vardır.

2no'lu kayudaki örnek HPV-L1 bölgesi için (+) gözüklemektedir.

5. TARTIŞMA VE ÖNERİLER

Bu çalışma ile, genito-uriner sisteme ait değişik dokulardan DNA izolasyonu ve PCR yöntemi ile HPV tanısı gerçekleştirilmiştir. Hem mesane kültür örneklerinde, hem de parafinle kaplı örneklerde DNA izolasyonu başarı ile yapılmıştır. Arşiv materyalinde, örnek yaşına, kullanılan fiksatifin özelliklerine ve fiksasyon zamanına bağlı olarak sonuçların değiştiği bilinmektedir (Chaw, 1980; Radosevich, 1991; Greer 1991a; Greer, 1991b). Özellikle parafin fiksasyon zamanının uzaması, DNA zincirleri arasında çapraz bağların oluşmasında yol açmakta ve bu durum da sonuçları etkilemektedir.

Polimeraz zincir reaksiyonu yönteminde, HPV primerlerinin yanısıra alınan materyalin çalışmaya uygun olup olmadığını kontrol amacıyla beta-globin geninin 268. bc'lik bir bölümünü amplifiye eden bir çift primerde kullanılmıştır (Bauer, 1991; Milde- Langosch, 1993). Internal kontrol olarak kullanılan beta-globin amplifikasyonu ile dokunun yeterliliği ve örnekte inhibitör bir maddenin bulunup bulunmadığı kontrol edilmekte ve negatif sonuçlardan emin olunmaktadır. Böylelikle internal kontrol geni amplifiye edilemeyen örnekler analiz yönünden negatif değil, yetersiz olarak değerlendirilmektedir (Saiki, 1993). Bu çalışmada polimeraz zincir reaksiyonu uygulana beş mesane kültür örneği ile on testis kanseri örneğinden sadece bir testis örneğinde beta globin gen amplifikasyonu negatif bulunmuş ve bu örnek değerlendirme dışı bırakılmıştır. Böylece toplam 14 örnek HPV pozitifliği yönünden değerlendirilmiştir.

Çalışmaya alınan prostat örneklerine uygulanan polimeraz zincir reaksiyonu sonucunda, negatif kontrol örneğinde HPV pozitif bulunmuş ve bu sonuç, kesit alınırken oluşan kontaminasyona bağlanmıştır. Daha sonra aynı örneklerden yeni kesit alınmış ve çalışmaya başlanmıştır.

Southern transfer yöntemiyle membrana aktarılan testis örnekleri ve çalışma tamamlandığında prostat örnekleri, HPV 6,11,16,18,31,33,35,39 tiplerine özgü non-radyoaktif işaretlenmiş probiar kullanılarak tiplendirilecektir. Sonuç olarak her gruptaki örnek sayıları artırarak daha doğru ve ayrıntılı sonuçlara ulaşabilecek ve toplumumuza özgü veriler elde edilebilecektir. Ayrıca insan papillomavirusu'nun genitouriner sistem tümörleri etiolojisindeki giderek artan önemi doğrultusunda, laboratuvarımızda HPV'nin PCR yöntemi ile rutin olarak belirlenmesi sağlanacaktır.

7

6. KAYNAKLAR

1. Bauer, H.M., Ting, Y., Greer, C.E., Chambers, J.C., Tashiro, C.J., Chimera, J., Reingold, A., Manos M.M.: Genital human papilloma virus infection in female university students as determined by a PCR-based method. *JAMA* 265:472-477, 1991.
2. Bavin, P.J., Giles, J.A., Hudson, E., Williams, D., Crow, J., Griffiths, P.D., Emery, V.C., Walker, P.G.: Comparison of cervical cytology and the polymerase chain reaction for HPV 16 to identify women with cervical disease in a general practice population. *J. Med. Virol.* 37:8-12, 1992
3. Boshart, M., Gissmann, L., Ikenberg, H., Kleinheinz, A., Sheurlen, W., zur Hausen, H.: A new type of papillomavirus type DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *EMBO J.* 3:1151-1157, 1984.
4. Brown, D.R., Fife, K.H.: Human papilloma virus infections of the genital tract. 1455-1479
5. Carlson, J.W., Twigg, D., Twigg, L.B.: Clinical applications of molecular biologic screening for human papillomavirus: diagnostic techniques. *Clin. Obstet. Gynecol.* 35:13-21, 1992
6. Chaw, Y.F.M., Crane L.E., Lange, P., Shapiro, R.: Isolation and indentification of cross-links from formaldehyde-treated nucleic acids. *Biochemistry* 19:5525-5531, 1980.
7. Crum, C.P., Nuova, G.J.: Genital papillomaviruses and related neoplasms, Raven Press. 10-11, 1991.
8. Durst, M., Gissman, L., Ikenberg, H., Zur Hausen, H.: A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80:3812-3815, 1983
9. Greer, C.E., Peterson, S.L., Kiviat, N.B., Manos, M.M.: PCR amplification from paraffin-embedded tissues: effects of fixative and fixation time. *Am. J. Clin. Pathol.* 95:117-124, 1991a.
10. Greer, C.E., Lund, J.K., Manos, M.M.: Per amplification from paraffin-embedded tissues: recommendations on fixatives for long term storage and prospective studies. *PCR methods and Applications* 1:46-50, 1991 b.
11. Mc Cance, D.J., Campion, M.J., Clarkson, P.K., Chesters, P.M., Jenkins, D., Singer, A.: Prevalence of human papillomavirus type 16 DNA sequences in cervical intraepithelial neoplasia and invasive carcinoma of the cervix. *Brit. J. Obstet. Gynecol.* 92:1101-1105, 1985.
12. Milde-Langosch, K., Schreiber, C., Becker, G., Löning, T., Stegner, H.: Human papillomavirus detection in cervical adenocarcinoma by polymerase chain reactions. *Hum. Pathol.* 24:590-594, 1993.
13. Nuovo, G.J.: Human papillomavirus DNA in genital tract lesions histologically negative for condylomata. *Am. J. Surg. Pathol.* 14:643-651, 1990.
14. Pao, C.C., Hor, J.J., Fu, Y.L.: Genital human papillomavirus infections in young women with vulvar and vestibular papillomatosis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* Vol.13: 433-436, 1994.
15. Radosevich, J.A., Maminta, L.D., Rosen S.T., Gould, V.E.: The ammount of paraffin-embedded tissue needed for DNA molecular analysis: A rapid extraction procedure. *Lab. Med.* 22:543-546, 1991.

8

16. Reid, R., Greenberg, M.: Human papillomavirus— related diseases of teh vulva . Clinical obstetrics and gynecology, Volume 34, 630—650, September 1991.
17. Saiki, R.K., Scharf, S., Fallona, F.: Enzymatic amplification of B-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science 230: 1350-1354, 1985.
18. Schneider, A., Sawada, E., Gissmann, L., Shah, K.: Human papillomaviruses in women with a history of abnormal papanicolaou smears and in their male partners. Obstet Gynecol 69:554,1987
19. Thibodeau, S.N: Recent applications of PCR in clinical laboratory medicine. Clin. Chem. 40:681-682, 1994.
20. zur Hausen, H.: Condylomata acuminata and human genital cancer. Cancer Res. 36:794,1976.

10/10/94

10/10/94

10/10/94

10/10/94

10/10/94

10/10/94

10/10/94

10/10/94

10/10/94

10/10/94

10/10/94

10/10/94

10/10/94

10/10/94

10/10/94

10/10/94

10/10/94

10/10/94

10/10/94

10/10/94

10/10/94

10/10/94

10/10/94

10/10/94

10/10/94

10/10/94

10/10/94

10/10/94

10/10/94

10/10/94

2

BİBLİYOGRAFİK BİLGİ FORMU	
1- Proje No: SBAG-AYD-6	2- Rapor Tarihi: 19/3/1996
3- Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: Ağustos 1994 - Ağustos 1995	
4- Projenin Adı: PROSTAT ve MESANE DOKULARINDA PCR YÖNTEMİ İLE İNSAN PAPİLLOMAVİRÜS (HPV) TANISI	
5- Proje Yürütücüsü ve Yardımcı Araştırmacılar: Prof.Dr.Beyazıt ÇIRAKOĞLU, Dr.İlter GÜNEY, Dr.Uluhan SİLİ	
6- Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi: MARMARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ TIBBİ BİYOLOJİ ve GENETİK ABD HAYDARPAŞA 81320 İSTANBUL	
7- Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi: TÜRKİYE BİLİMSEL ve TEKNİK ARAŞTIRMA KURUMU SAĞLIK BİLİMLERİ ARAŞTIRMA GRUBU Atatürk Bulvarı No:211 Kavaklıdere 06100 ANKARA	
8- Öz (Abstract): HPV'nin onkogenik tiplerinin kadınlarda serviks kanserinin gelişmesinde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Bu çalışmada ürogenital bölge kanserlerinden mesane, testis ve prostat kanserleri HPV açısından değerlendirilmiştir. Örnek olarak mesane kanserli dokunun kültürü, testis kanserli ve prostat kanserli dokuların da parafin kaplı patolojik bloklarından alınan kesitleri kullanılmıştır. Bu örneklerden uygun yöntemler ile DNA izole edilerek, PZR (polimeraz zincir reaksiyonu) ile HPV pozitifliği ve negatifliği tespit edilmiştir. PZR' de kullanılan primerler HPV-L1 bölgesine özel olup tüm HPV tiplerini saptayabilmektedir. Alınan ilk sonuçlarda testis kanserli örneklerden sadece bir tanesinde HPV pozitifliği saptandı. Mesane ve prostat kanserli örneklerde ise HPV pozitifliğine rastlanmadı. Sonuçların epidemiyolojik anlam kazanabilmesi için örnek sayıları arttırılacak, aynı zamanda HPV tiplendirmesi de yapılacaktır.	
Anahtar Kelimeler: HPV, PZR, Prostat kanseri, Testis kanseri, Mesane kanseri	
9- Proje ile ilgili Yayın/Tebliğlerle ilgili Bilgiler Henüz yayın yapılmadı.	
10- Bilim Dalı: TIBBİ BİYOLOJİ Doçentlik B. Dalı Kodu: Uzmanlık Alanı Kodu:	101.01.01 ISIC Kodu:
11- Dağıtım (*) : ☐ Sınırlı ☒ Sınırsız	
12- Raporun Gizlilik Durumu : ☐ Gizli ☒ Gizli Değil	

(*) Projenizin Sonuç Raporunun ulaştırılmasını istediğiniz kurum ve kuruluşları ayrıca belirtiniz