

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

KOLPOSKOPİ UYGULANAN HASTALARDA
REAL- TIME PCR İLE HUMAN PAPİLLOMAVİRUS (HPV) ve
HPV TİP 16 TANISI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SİBEL UNURLU

Tez Danışmanı

Yrd. Doç. Dr. Gülendârn BOZDAYI

ANKARA

Eylül 2007

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onayı	I
İçindekiler	II
Şekiller ve Resimler	III
Tablolar	IV
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1. HPV'nin Tarihçesi	3
2.2. HPV'de Sınıflandırma	4
2.3.Virusun Özellikleri	9
2.3.1. Yapısal Özellikleri	9
2.3.2. Genomik Yapı	9
2.3.2.1. Düzenleyici Bölge	9
2.3.2.2. Open Reading Frames	9
2.3.2.2.1. Erken Bölge	10
2.3.2.2.2. Geç Bölge	11
2.3.2.3. Replikasyon	11
2.3.2.4. Bulaş Yolları	13
2.4. HPV'nin Patogenezi	14
2.5. HPV'nin Epidemiyoloji ve Risk Faktörleri	16
2.6. HPV'nin Onkogenezi	24
2.7. HPV'nin Tanı Yöntemleri	29
2.7.1. Fizik muayene	29
2.7.2. Kolposkopi	29
2.7.3. PAP Smear Testi	30
2.7.4. Histolojik Tanı	35
2.7.5. Mikrobiyolojik Tanı	35
2.7.5.1. Elektron Mikroskopi	35
2.7.5.2. İmmunoflorasan Yöntemi	36
2.7.5.3. HPV DNA Tayini	36
2.7.5.3.1. Non-Amplifiye DNA Testleri	37
2.7.5.3.1.1. Southern Blot Hibridizasyon	37
2.7.5.3.1.2. Dot/Slot Blot	38
2.7.5.3.1.3. İn-Situ Hibridizasyon	38
2.7.5.3.2. Amplifiye DNA Testleri	38
2.7.5.3.2.1. Hibrid Yakalama	39
2.7.5.3.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu	40
2.7.5.3.2.2.1. Real Time PCR	41
2.8. HPV'nin Tedavisi	42
2.9. HPV'den Korunma ve Aşı Çalışmaları	44
2.9.1. Profilaktik HPV Aşılar	44
2.9.2. Terapötik HPV Aşıları	46
3.GEREÇ ve YÖNTEMLER	47

3.1. Çalışma Grupları	47
3.2. Araç ve Materyaller	48
3.2.1. Laboratuvar Araç-Gereçleri	48
3.2.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	49
3.2.3. Hazırlanılarak Kullanılan Solüsyonlar	51
3.3. Yöntem	52
3.3.1. DNA'nın Elde Edilmesi (Ekstraksiyon)	52
3.3.2. DNA'nın Çoğaltılması (Amplifikasyon)	53
3.3.3. Real Time PCR	54
4.BULGULAR	54
5.TARTIŞMA	59
6.SONUÇ	70
7.ÖZET	71
8.SUMMARY	72
9.KAYNAKLAR	73
10.ÖZGEÇMİŞ	87

ŞEKİLLER ve RESİMLER

Şekil.1. HPV'nin DNA virusları arasındaki yeri	5
Şekil.2. HPV'nin yaşam döngüsü	13
Şekil.3. HPV'ye bağlı hastalığın tipik gelişimi	17
Şekil.4. HPV ile ilişkili klinik açıdan anlamlı hastalık ve tanılarının, tüm dünyadaki yıllık olgu sayıları	19
Şekil.5. Serviks kanserindeki olası gelişim şeması	21
Şekil.6. HPV'nin skuamöz epitelyum bazal hücrelerinde meydana getirdiği farklılaşma	25
Şekil.7. Sirküler HPV DNA'nın konak hücre DNA'sına entegrasyonu	28
Resim.1. Koilositoz hücre görünümü	30
Resim.2. Normal hücre görünümü	30
Resim.3. Sitolojik olarak değişmiş hücrelerin görünümü	35
Resim.4. HPV partikülünün elektron mikroskobu görüntüsü	36

TABLÖLAR

Tablo.1. HPV tipleri ve klinik varyantları	8
Tablo.2. Servikal kanser ve prekürsörlerindeki risk faktörleri	22
Tablo.3. Sitolojik klasifikasyon sistemlerinin karşılaştırması	34
Tablo.4. HPV enfeksiyonlarında tedavi seçenekleri	43
Tablo.5. Araştırma grubunda kolposkobik bulgulara göre Real-Time PCR ile HPV tip16, HPV 16 dışındaki tiplerin DNA varlığının dağılımı	55
Tablo.6. Araştırma grubunda gebelik sayısına göre Real-Time PCR ile HPV tip16 ve HPV 16 dışındaki tiplerin DNA varlığının dağılımı	56
Tablo.7. Araştırma grubunda yaşa göre Real-Time PCR ile HPV tip16 ve HPV 16 dışındaki tiplerin DNA varlığının dağılımı	57
Tablo.8. . Araştırma grubunda PAP smear test sonucuna göre Real-Time PCR ile HPV tip16 ve HPV 16 dışındaki tiplerin DNA varlığının dağılımı	58
Tablo.9. Araştırma grubunda medeni duruma göre Real-Time PCR ile HPV tip16 ve HPV 16 dışındaki tiplerin DNA varlığının dağılımı	59
Tablo.10. Yeni bir HPV ve sitolojik tarama programı algoritması	65

1. GİRİŞ

Servikal kanser, yıllık 420.000 olgu ile dünyaca yaygın bütün yeni kanserlerin yaklaşık %10'dan sorumlu olup, kadınlarda en yaygın kanser sıralamasında ikinci sırada yer almaktadır ve kadınlarda kanserin sebep olduğu bütün ölümlerin yaklaşık 1/6'sından sorumludur^{45, 115}.

Yaşa bağlı insidansı, gelişmiş ülkelerde yaklaşık 10/100.000 iken gelişmekte olan ülkeler için bu oran yaklaşık 40/100.000 olarak değişmektedir. Human papillomavirus enfeksiyonları, gelişmekte olan ülkeler için önemli bir sağlık problemi olarak karşımıza çıkmaktadır⁴⁵.

Servikal kanser biyopsilerinin yaklaşık %84-100'de HPV DNA'sı tespit edilmesi, bir zamanlar HPV'nin servikal kanseri başlatan olay olduğunu düşünülürken ancak, şimdi sadece kanser gelişiminde en önemli etkenlerden biri olduğu belirlenmiştir^{2, 9, 37, 43, 67, 89, 106, 107, 110, 114, 118, 122, 128, 144}. Servikal kanserin etyolojisinde için HPV'nin onkojenik tip veya tiplerinin varlığı, ilk cinsel ilişki yaşının küçük olması (<16 yaş), çok sayıda seksüel partner, korumasız cinsel ilişki, oral kontraseptif kullanımı, sigara içimi, ırk, immunolojik durum, geçirilmiş Klamidya öyküsü, çok sayıdaki gebelik ve düşük sosyoekonomik düzey gibi bir çok risk faktörleri rol oynar^{7, 10, 11, 41, 64, 71, 88, 106, 108, 118, 127, 128}.

Human papillomavirus tip 16, invaziv kanserli kadınlarda yaklaşık %12-47 prevalans ile en sık görülen HPV tipi olup, onu HPV tip 18, 45, 31 ve 33 takip eder^{7, 11, 16, 30, 57, 67, 74, 84, 89}.

Human papillomavirus, ABD'de en yaygın seksüel geçişli viral hastalık olarak tanımlanırken, dünyada ise hem erkek hem de kadınlarda görülebilen cinsel yolla bulaşan en yaygın hastalık nedenlerinden biri olduğu bildirilmiştir^{81, 115}.

Serviks kanseri, diğer kanser türlerinden "önlenebilir" bir kanser çeşidi olması ile ayrılır⁶⁹.

Papanikolau smear testi (PAP) servikal kanserler için en yaygın tarama testlerinden biridir²⁹. Papanikolau smear testi, 1941'de Papanikolau ve 1947'de Ayre tarafından uygulanmaya başlanmış ve prekanseröz ve kanseröz lezyonların teşhisinde kullanılmaktadır^{29, 39, 78}. Papanikolau smear testi 1950'den beri servikal kanser insidansını %79, mortaliteyi ise %70 oranında azaltmıştır⁸.^{9, 29, 37, 39, 38, 54, 106, 140} Kullanım kolaylığı ve ekonomik olmasından dolayı, gelişmekte olan ülkeler için avantajlı bir yöntem olmuştur⁹.

Tarama programları sonucunda her 5 yılda bir %15–30 servikal kanserin insidansında bir azalma gözlenmiştir^{39, 106}. Papanikolau smear testi birçok avantajına rağmen, bazı sınırlara sahiptir^{8, 29, 67}. Yanlış negatif oranının yaklaşık %20-70 kadar yüksek olduğu bildirilmiştir. Yanlış negatif sonuçlar örnekleme, preperat hazırlama ve yorumlama aşamasında olur. Papanikolau smear testlerinin yaklaşık %8'i yetersiz örnek içermekte iken, toplanan hücrelerin yaklaşık %10-20'sinden daha azı ancak lama aktarılabilmektedir^{29, 93}. Örneğin yetersiz olması, hazırlanan lamın uzun süre havada kurutulması, servikal örneğin; bakteri, maya veya kan ile teması yanlış negatif sonuçlara neden olmaktadır. Ortalama bir PAP smear testi 50.000 ile 300.000 hücre içermesi gerekmektedir^{29, 67}. Papanikolau smear testinin yaklaşık spesivitesi %14-97 olarak bildirilmesine karşın, sensitivitesi beklenenden oldukça düşük olup yaklaşık %11-61.3 olarak tespit edilmiştir^{79, 47}. Bu da, test sadece bir kez yapıldığında birçok kadında var olan servikal lezyonların gözden kaçacağı anlamına gelir. Papanikolau smear testinin sınırlı sensitivitesine rağmen, test üç kez arka arkaya tekrarlandığı zaman, üç sonuçta negatifse hastada servikal anormallik olma şansı %1 'den azdır. Papanikolau smear testi, HSIL'de amaca iyi hizmet etmesine karşın, LSIL tespitinde oldukça zayıftır^{47, 96}. Gelişmekte olan ülkelerde taramaların düzensiz ve yetersiz olması programın amacına ulaşmasına engel olmuştur⁹. Sağlık Hizmetleri ve Politikası Araştırma Merkezi konvansiyonel servikal sitoloji teknikleri ve yanlış negatiflik oranını azaltmak için geliştirilmiş yeni teknolojiler hakkında bir literatür derlemesi yapmıştır^{16, 29, 37, 38, 47, 54, 67, 81, 91, 100}. Bu sonuçlar göz önüne alındığı takdirde HPV ile ilişkili enfeksiyonlarda tarama, erken teşhis ve erken tedavinin önemi artmaktadır.

Henüz HPV ile ilgili immunolojik çalışmalar yeterli düzeye ulaşamamıştır. Aynı zamanda HPV'nin bugüne kadar in-vitro kültürü yapılamamıştır. Enfeksiyonun dıştan gözlenebilmesi mümkün olmadığından HPV DNA'sının direkt gösterebileceği mikrobiyolojik tanı yöntemleri önem kazanmıştır^{116, 133}.

Human papillomavirus'da DNA varlığının direkt gösterilebilmesi gerekliliğinden dolayı mikrobiyolojik tanı yöntemlerinden olan PCR sınırlı miktardaki DNA'yı artırma temeline dayalı bir tanı yöntemi olarak rutinde kullanılmaya başlanmıştır^{29, 81, 122}.

Bu çalışma, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'nda kolpökopik muayene alınan ve herhangi nedenle jinekolojik muayeneye gelen hastalarda muayene sırasında alınan serviks sürüntü örneklerinde Real-Time PCR ile HPV ve HPV tip 16 varlığını araştırarak, risk faktörü olarak tanımlanan birkaç parametreyle ilişkisini incelemek için yapılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. HPV'nin Tarihçesi

Genital sigillerin bir sağlık problemi olarak görülmeye başlanması M.S. 500'lere kadar uzanmaktadır⁷⁸. Eski Yunan ve Roma Çağlarından beri sigiller bilinmektedir. "Kondilom" Latince'de "incir benzeri" anlamına gelerek genital sigilleri ifade etmektedir. Yine Antik Yunan ve Roma çağında seksüel olarak aktif olan özellikle homoseksüeller arasında kondiloma prevalansındaki bir artışa dikkat çekilmiştir. On altıncı yüzyılda kondiloma latum ile sifiliz arasında bir ilişki kurulmuş ve 1800'lü yılların sonuna kadarda genital sigillerin sifiliz ve gonoreyle ilişkili olduğu fikri devam etmiştir⁴⁷. Yirminci yüzyılın başlarında ise genital sigil ve deride meydana gelen sigillerin benzerliği fark edilerek, genital sigillerin veneryal bulaşımı araştırılarak, sorgulanmaya başlanmıştır^{47, 123}.

Ciuffo ve ark.'ları 1907'de, sigilden aldığı örneği özüt haline getirerek, gönüllü bir insana inoküle etmiş ve insandan insana bulaşımı göstermiştir. Bu deney daha sonra Serra ve ark.'ları tarafından 1908'de, Wile ve Kingrey tarafından ise 1919'da tekrarlanmıştır 1930'da Shope tarafından tanımlanan viral yapı 1860'da ancak elektron mikroskobu ile viral partikül olarak gösterebilmiştir¹²³.

Shope ve ark.'ları tarafından 1930'da yapılan çalışmada, tavşanın kuyruk kısmındaki sigilden alınmış örneği ekstrakte ederek, başka bir tavşanın kuyruğuna enjekte edip, sigil oluşumunu göstermiştir. "Pamuk, kuyruk papillomavirus" ile yapılan bir çalışma sayesinde ilk kez papillomavirusu bir tavşan türünde tespit edilmiş. "Bovine papillomavirüs (BPV) ile de çalışmalar yapılmıştır^{78, 123}.

Kore Savaşı sonrası 1980'de eve dönen askerlerde penil sigilleri oluşmuş ve eşlerinde de vulvar sigillerin gözlenmesi, ilk kez sigillerin bulaşıcı bir enfeksiyon olduğunu düşündürmüştür. Ayrıca deri sigilleri ile genital sigillerin benzerliği göz önüne alındığında, bu sigillerin ancak enfeksiyöz bir ajanla taşınabileceği fikri, bulaş yollarının araştırılmasını gündeme getirmiştir^{47, 56}.

Kanser hakkındaki en erken epidemiyolojik çalışmalardan biri olan 1842 yılında Rigoni Stern ve ark.'ları tarafından yapılan bir araştırma, rahibeler arasında serviks kanser insidansının düşük olmasına ilgi çekmiştir⁵⁶. servikal kanser ve enfeksiyöz ajan arasında 1950'de bir bağlantı kurulabilmiştir⁸⁶.

Kass ve Durfee isimli araştırmacılar 1956'da enfeksiyon bölgesindeki hücrelerde histolojik ve sitolojik değişiklikler gözlemiş ve bu içi boş görünümlü hücrelere "Koilositik A tipi" demişler ve ancak 20 yıl sonra Meisels ve Fortin isimli araştırmacılar bu değişikliği HPV ile ilişkilendirmiştir⁷⁸. Zur Huasen ve ark.'ları 1976'da, o zamana kadar ortaya çıkmış çok miktarda epidemiyolojik, histolojik ve mikrobiyolojik kanıtlarla servikal kanseri HPV ile ilişkilendirmiş ve HPV'yi cinsel yolla bulaşan bir karsinojenik ajan olarak tanımlamıştır¹²².

Bütün insan sigillerinin (örneğin, deri, genital) 1970'den önce aynı papilloma tipi tarafından oluşturulduğu düşünülürken 1970'lerde moleküller hibridizasyon teknolojisinin gelişmesiyle HPV ve servikal kanser arasında ilişki kurulmuş ve HPV 6, 11, 16, 18, 33, 41, 45, 51, 56, 59 tiplerinin varlığı tespit edilmiştir^{78, 86}.

Human papillomavirus'unun in-vitro kültürü yapılamadığından moleküler yöntemler geliştirilerek, klinik olarak virusun yapısı, patogenezi gibi birçok özelliğinin araştırılmasına olanak sağlanmıştır⁷⁸.

2.2. HPV'de Sınıflandırma

İnsan papillomavirusu, DNA tümör virusları olarak isimlendirilen Papomaviridae ailesine aittir. Bu aile, genom kompleksliği ve gen ekspresyonunun farklı düzenlenmesinden dolayı Polyomavirinae, Papillomavirinae olarak iki alt aileye ayrılır. Virus genusunda bulunur^{29, 86, 123, 125, 136, 142}.

Papillomavirinae (Papovaviridae) alt ailesi papillomavirus, polyomavirus ve vakuol oluşturan ajan olarak adlandırılan simianvirus olmak üzere üç genus içermektedir ve Papovaviridae alt ailesi, ismini bu genuslarının ilk iki harfin toplamından almıştır^{86, 125, 126, 136, 142}.

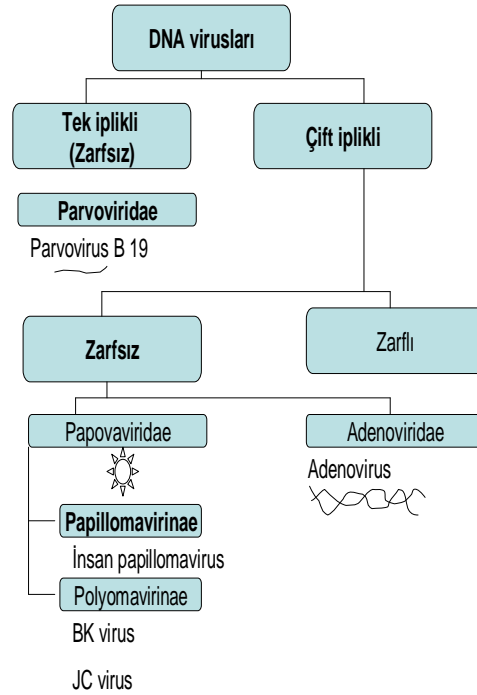
Papovaviruslar; zarfsız, tam sarmallı, ikozahedral nukleokapsitli, çift iplikli, çembersel DNA viruslarıdır (Şekil 1)^{26, 29, 86, 111, 123, 125, 126, 136, 142}.

İnsan papillomavirusları, insanlarda dahil olmak üzere bir çok canlıyı enfekte etmekle birlikte, cinse spesifik olup, türler arasında geçiş henüz bilinmemektedir. Konakta hiperplastik epitelyal lezyonlar oluşturarak, benign veya malign tümörlere neden olurlar^{29, 126}.

Human papillomavirus'ların tiplendirilmesinde serotip değil, genotip göz önüne alınır. Keşfedilme sıraları numaralandırılma esasını oluşturur^{26, 111}.

Yeni bir virusun isimlendirilmesinde yine genotipik benzerlik araştırılır. Yeni bir HPV tipi belirlenirken, ORFs’indeki E6, E7 ve L1 genlerinin nükleotid dizilimi belirlenerek, bilinen HPV tiplerindeki bu genlere ait dizilimlerle karşılaştırılır. Karşılaştırıldığı HPV tipleri ile nükleotid dizilim benzerliği %90’nın üzerinde ise benzediği HPV tipinin ismini alırken, bu oran %90’dan az ise yeni bir HPV tipi olarak tanımlanır^{29, 111, 136}.

Human papillomavirus’lar sadece deri ve mukoz mebranların epitel yüzeylerini enfekte ettikleri için epitelyotrofik olup, doku ve hücre spesifikliği gösterirler. Oluşan lezyonlar HPV tipleri için spesifik olup, HPV tipleri informal olarak iki gruba ayrılır; keratinize olan doku epitelini enfekte edenler “keratinize tip (kutanöz)” olarak adlandırılırken, keratinize olmayan mukoza epitelini enfekte edenler ise “mukozal tip” şeklinde isimlendirilir. Kutanöz tip (flat siğiller, plantar siğiller, yaygın siğiller) el ve ayaklarda da sık lezyon oluştururken, mukozal tip ise ağız, soluk borusu veya anogenital epitelyumde enfeksiyon oluşturmaktadır^{123, 124, 126}.



(124) Şekil 1.HPV’nin DNA virusları arasındaki yeri

Araştırmacılar 230 kadar farklı HPV tipinin var olabileceğini söylemelerine karşın sadece 100’den fazla HPV tipinin DNA dizilimleri tam olarak gösterilebilmiştir. Bilinen tiplerin yaklaşık %30-40’ı genital sistemi enfekte etmekte olup, %20’den fazlası servikal kansere eşlik etmektedir.

Ayrıca yeni genotip olma potansiyeline sahip 120 izolat bulunmaktadır^{29, 90, 110, 126}.

Filogenetik çalışanlar, HPV tiplerini ayırt etmek için evrimsel bağları temel alan ve nükleotid dizilim benzerliklerini göz önünde bulunduran bir sistematik araç kullanmaktadır. Papillomaviridae, evrim çalışmaları için iyi bir kaynak oluşturan DNA virus familyalarındandır²⁶.

İnsan papillomavirus'ları servikal displazi, servikal karsinom respiratör papillomatis, deri ve genital siğiller gibi geniş bir enfeksiyon spektrumunu sergiler. İnsan papillomavirus türlerinin neden oldukları enfeksiyonları taşıdıkları riskler açısından değerlendirdiğimizde üç basamaklı bir tablo kaşımıza çıkar.

I) 15 HPV tiplerinden oluşan yüksek riskli grup^{40, 50, 97, 117}. Risk açısından aynı olsa da oluşturdukları enfeksiyon çeşidi açısından iki alt gruba ayrılırlar.

a) HPV 16, servikal intra epitelyal lezyon (SIL), CIN II, CIN III ve karsinomların en sık etkenidir^{29, 39, 43, 67, 89, 110, 128}.

b) HPV 18, 45, 56 tipleri yüksek riskli enfeksiyonlara sebep olur. Bunların çoğunluğunu invaziv ve adenokarsinomlar, aynı zamanda CIN II, CIN III ve servikal intraepitel lezyonlara (SIL) sebep olmaktadır^{39, 29, 67, 89, 110}.

II) Tip 31, 33, 35, 51, 52, 58 ise orta dereceli riskli HPV grubudur. Bu tipler intra epitelyal lezyonların çoğundan, daha az oranda ise kanserlerden sorumludur^{29, 67, 93}.

III) On iki HPV tipi düşük riskli gruba girmektedir. HPV 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 ve CP6108 benign genital lezyonların %20'sinden sorumlu olup, SIL'de gözlemlendikleri gibi non-onkojeniktirler. Flat kondilomun ekzofitik kondilomanın, zayıf dizplazinin en sık rastlanan etkenleridir^{29, 67, 123}.

Verruca karsinomu gibi invaziv karsinomun etkeni olan HPV 6 ve HPV 11 dışındaki diğer tiplerin hiçbiri invaziv karsinom etkeni değildir. Larengeal papilloma ekzofitik kondiloma ve giant kondilomalardan düşük riskli HPV grubunun sorumlu olduğu düşünülmektedir. Tüm enfeksiyonlar içerisinde HPV 6 ve HPV 11 tiplerinin birlikte görülme sıklığı %5 iken, sadece HPV 6'nın görülme sıklığı HPV 11'in üç katıdır^{29, 30, 50, 67, 69, 74, 84, 87, 89, 110, 123}.

HPV'nin oluşturduğu enfeksiyonlar genel olarak, anogenital, oral, baş-boyun ve deri olmak üzere geniş bir yayılım gösterir²⁹.

Hedef hücreler yassı epiteller olup, keratin tabakasının kalınlaşması hiperkeratoza yol açar. Deride verruka, papillom ve skuamöz hücreli kanser meydana getirirler. Birçok yeni HPV genomları, “epidermo dysplasia verruciformis (EV)” ile ilişkilidir. Evli hastaların çoğunda HPV 5 ve HPV 8 izole edilmektedir. Bebeklik ve çocukluk döneminden başlayıp ömür boyu süren bir hastalıktır. Tüm vücutta yaygın polimorfik lezyonlar oluşturur. Lezyonların birleşme eğilimi olup, güneş ışığında bu lezyonlardan malign transformasyon odakları gelişir, yavaş büyüyen, metataz yapmayan, skuamöz karsinomlara dönüşür. Siğil, papillom, skuamöz kanser ve karsinom gözlenmektedir. En sık rastlanan etkenler ise HPV 11, 6, 32, 7’dir ^{26, 29, 133}. Anogenital bölgede ise siğil ve kanser görülmektedir. Kondiloma accuminatumda HPV6/11 en sık etken olarak karşımıza çıkar. Serviks, vagina, vulva ve penisteki karsinomların en sık nedeni HPV16 ve HPV18’dir (Tablo 1) ^{76, 113, 115}.

(115) Tablo 1. HPV tipleri ve klinik varyantları

Klinik hastalık	HPV tipleri
Mukozal tutulum	
Kondiloma akkuminata	6,11
Servikal intraepitelyal neoplazi (CIN)	
Düşük riskli	6,11
Yüksek riskli	16,18
Bowenoid papülozis	16
Servikal kanser	16,18
Buschke ve Löwenstein'in dev kondilomu ve diğer verrüköz karsinomalar	6,11
Oral / Laringeal papillomatozis	6,11
HIV hastalarında görülen verrukalar	7, 72, 73
Oral fokal epitelyal hiperplazi (Heck)	13,32
Kutanöz tutulum	
Verruka plantaris	1,2
Verruka vulgaris	2,4
Renal transplant hastalarında görülen verrukalar	75 –77
Verruka plan	3,10
Epidermodisplasia verrusiformis	5,8,9,10,12,14,15,17,20
Skuamöz hücreli karsinom veya aktinik keratoz	16
Keratoakantoma	37
İmmun yetmezlikli hastada skuamöz hücreli karsinom	48, 60
Melanom	16,18,35,36
Bowen hastalığı	16
'Myrmecia' tipi verruka plantaris	63
Pigmente verruka	65
Epidermal kist	57,60
Özefagial papillom	6,20
Özefagial karsinom	16,18
Konjunktiva papillomu ve kanseri	6,11,18
Tonsiller karsinom	16
Histolojik olarak normal deri	80

2. 3.Virusun Özellikleri

2.3.1. Yapısal Özellikleri

Papillomaviruslar, zarfsız, 5×10^6 Dalton ağırlığında, 8.000 baz çiftinden oluşan, çift sarmallı, sirküler bir DNA'dan meydana gelmiş olup, 52-55 nm çapında, ısıya dayanıklı bir genoma sahiptir^{29, 86, 93, 97, 111, 126}.

İkozahedral (20 yüzlü) bir simetriye sahip olup, 72 subunit ve kapsomerden oluşmuştur^{93, 97}. Papovavirus viriyonların ağırlığının yaklaşık %80-90'nını kapsid proteini oluşturur. Major ve minor olarak iki adet kapsid proteini içermektedir. Major kapsid proteinleri viral proteinlerin %50-80'nini oluştururken, moleküler ağırlığı ise 56.000 Dalton'dur. Major kapsid proteinleri, antikor oluşumuna sebep olduğu için aşı çalışmaları açısından önemlidir. Minor kapsid proteinlerini moleküler ağırlığı ise 76.000 Dalton olup viral proteinlerin daha az bir kısmını oluşturur^{29, 86, 126}.

Geniş PH aralığında sabit olup, radyasyona dirençlidir. Zarfsız viruslar olduğundan eter ve klorofom gibi lipid etkili kimyasallara ve fiziksel uygulamalara da dirençlidir. 50 C° saf suda 1 saat içerisinde enfeksiyöz iken, bu ortama 1 MM Cl₂ eklendiğinde enfektivitesini kaybetmektedir. Bundan dolayı kontamine olan özel eşyalar, mekanlar aracılığıyla enfeksiyon kaynağı olarak işlev görebilirler. Bunlar enfeksiyondan korunma yolları hakkında önemli fikirler vermektedir⁵.

2.3.2. Genomik Yapı

Genomik yapı, iki bölgeden oluşur.

2.3.2.1. Düzenleyici Bölge (Non-coding Upstream Regulatory Region/URR): Kodlama yapmaksızın düzenleyici etkisi olup, uzun kontrol bölgesi (LCR) veya üst düzenleyici bölge olarak isimlendirilir. Kompleks bir yapı olup, 400-1.000 baz çiftinden oluşmuştur. Viral proteinlerin düzenlenmesinde önemli bir görevi vardır. mRNA'nın sentezini aktive ederek veya baskılayarak ORFs'in transkripsiyonunu kontrol eder ve DNA replikasyonunu başlatan ve bitiren promotor bölge p97'yi içerir. Ayrıca bu bölge viral genomun en yüksek derecedeki varyasyonu içerir^{93, 29}.

2.3.2.2. Open Reading Frames (ORFs / Açık Okuma Alanları): Viral replikasyonda ve onkogeneze yer alan gen bölgelerini içeren, iki alt birimden oluşmaktadır.

2.3.2.2.1. Erken Bölge (Early ORFs / EORFs): Viral proteinleri kodlayan transkripsiyon birimlerden oluşmuş DNA segmentleri olup, altı adet ORFs'den ibarettir. Bu bölge enfeksiyonun erken safhasını ifade ettiğinden "erken bölge" adını almıştır. Bu genler enfeksiyon, entegrasyon, viral replikasyonda ve hücrel transformasyon ile ilgili önemli rol oynayan proteinleri kodlar. Bu ORFs'ler ise E1, E2, E4, E5, E6, E7 olarak isimlendirilmiş olup, replikasyon ve onkojeniteden sorumludurlar. Her birinin fonksiyonu diğerinden farklıdır.

Özellikle E6 ve E7 gen ürünlerinin karsinogenez sürecinde önemli olduğu, E6 ve E7 gen ürünlerinin tek başına hücreleri transforme etmek için yeterli oldukları bildirilmiştir^{45, 85, 93}. Günümüzde HPV'nin diğer erken proteinlerinin (örneğin E1, E2, E4 gibi) malign değişime katkısı henüz gösterilmemiştir. HPV 16'nın E6 proteini, 150 aminoasitten oluşmuş olup, E7 eşliğinde HFK'yi (Human Foreskin Keratinocytes) ölümsüzleştirirler^{70, 85}. Song ve ark.'larının fareler üzerinde yaptıkları çalışmada, E6 salınımı epitel tabakanın aşırı proliferasyonuna neden olmuş ve ileri düzeyde epitelyum tabakasının diferansiye olarak benign veya malign tümör şekline dönüştüğünü bildirmişler⁸⁵. Virus, hücre kültüründe üretilmemektedir. E6 ve E7 onkoproteinleri transfekte hücre dizilerinde tespit edilebilirken, geç protein olan L1 ve L2 prekanseröz ve malign hücrelerde eksprese edilememektedir. Servikal kanserli kadınların yaklaşık %20'sinde E7'ye karşı oluşmuş ölçülebilir antikor tespit edilmiştir^{59, 67, 85, 95}.

Human papillomavirus, hücreye girdiğinde viral DNA hücre DNA'sına entegre olur. Entegrasyonda daima E1 ve E2 ORFs'leri içermesine karşın E2 ORFs'nin fonksiyonu bozulur. E2 kopyalamayı hızlandırmada, E6 ve E7'nin baskılanmasında ve URR'yi regüle eden major proteinleri kodlamasından sorumludur. E2 URR'ye bağlanarak E6 ve E7'yi baskılar. Virusun bulunduğu ancak tam yaşam döngüsünü tamamlayamadığı durumlarda (non-productive enfeksiyonlarda) yalnızca erken genlerin transkribe olduğu gözlenmektedir^{67, 85, 93}.

Yeni viral DNA hücre DNA'sına entegre olduğunda E2 fonksiyonu bozularak, URR'ye bağlanmaz ve E6 ve E7'yi baskılayamadığından E6 ve E7 aktifleşir. Hücre içerisinde E6 ve E7 ORFs'leri proliferasyon ve transformasyonu aktive eden proteinleri kodlar^{123, 29}.

Rb, bir tümör supresör geni olan retinoblastoma'nın bir ürünüdür. Rb hücre mitozunu inaktive etmekle görevlidir. E7 ORFs'nin üzerindeki baskı kalktığında, E7 proteini ve Rb proteini birleşerek hücre üzerindeki inaktive olan mitoz baskısını kaldırarak hücre proliferasyonuna sebep olur^{29, 85, 123}. E6'da p53 ile birleşerek p53'ün yok olmasına neden olur^{83, 123, 142}. Enfeksiyon geçiren bireyin kanındaki E7'ye karşı oluşan antikor, riskin değerlendirilmesi açısından anlamlıdır. Örneğin servikal kanserli kadınların %20'sinde E7'ye karşı oluşmuş antikor seviyesi ölçülebilir^{29, 95, 138}.

2.3.2.2.2. Geç Bölge (Late ORFs): Viral partiküllerin montajında görev alan proteinlerin sentezinden sorumlu, L1 ve L2 olmak üzere iki önemli ORFs içerir. Yalnızca farklılaşmasını tamamlamış hücrelerde eksprese edilir ve virusun yapısal proteinlerini kodlarlar. Major kapsid proteinini L1 tarafından kodlanırken, L2 ise minör kapsid proteinlerini kodlar. Majör kapsid proteini tüm HPV'lerde aynıdır. Anti-HPV kapsid antikor, majör kapsid proteinin antijenine karşı hazırlanmıştır⁹³. Minor kapsid proteini türe özgü olduğundan spesifik antikor oluşumunda, antijen olarak kullanılır. Hücre içinde replikasyon hızlandıkça L1 ve L2 ORFs'nin üzerindeki baskı kalkarak transkripte olmaları sağlanır. Sonunda epitelin en üst tabakasında kapsid proteinleri ve virus proteinleri üretilir^{29, 45, 67, 93, 142}.

E6, E7 ve E1 ORF'leri klasifikasyon açısından önem taşırlar. E6, E7 ve L1 ORF'leri karşılaştırıldığında %90'dan daha az homoloji gösterdikleri zaman yeni bir genotip olarak isimlendirilir. Farklı onkojenik potansiyel ve spesifik doku tropizmini yansıtmalarından dolayı, E6, E7 ve L1 klasifikasyonda önemlidir^{20, 29, 93}.

Genital sistemi enfekte ederek mukozaya afinite gösteren HPV tipleri, onkojenik potansiyel açısından, düşük riskli HPV tipleri (HPV 6, 11, 42, 44) ve yüksek riskli HPV tipleri (HPV 16, 18, 31, 33) arasında belirgin farklar vardır^{34, 35, 69, 75, 128}. Düşük riskli HPV tipleri (HPV tip 6, 11) hafif seyirli enfeksiyonlara neden olup, genelde kendi DNA'sını konakçı DNA'sına entegre etmezler. Yüksek riskli HPV tipleri ise ağır seyirli enfeksiyonlardan sorumlu olup, onkoproteinleri olan E6 ve E7 mukoza hücrelerinde hücre siklusunu etkileyerek, hücrelerin kromozom yapısında ve sayısında bozulmalara neden olur. Virus konak hücre kromozomunun sabit yapısını bozar ve stabilitesini kaybetmiş konak hücre genomuna viral genomu entegre ederek non-homolog bir rekombinasyon oluşturur. Sitopatolojik etki ile hücre içerisinde sitoplazmik boşluk, nüklear atipiyeye neden olurlar. Bu durum mukoza epitelyum tabakasının transformasyona uğramasına neden olur. Özellikle yüksek riskli HPV tiplerinin büyük bir çoğunluğu replikant tip olup genomlarını konakçı hücre genomunun bazı bölgelerine entegre ederler^{83, 123, 142}. Karsinogenezde önemli olduğu düşünülen E7/pRB bağlanması, yüksek riskli HPV alt tipleri olan 16/18'de düşük riskli HPV alt tipleri olan 6/11'e göre 5-10 kat daha etkin olarak gerçekleşmektedir³⁴.

2.3.2.3. Replikasyon

Human papillomavirus, deri ve mukoz epitel tabakaların üst yüzeyine doğru bulunan hücre çekirdeğinde replike olur⁸⁵.

Erken (E) bölge proteinleri, konak hücre sentez mekanizmasını kontrol altına alarak HPV-spesifik proteinlerini üretmesi için indükler. Geç (L) bölgenin kodladığı proteinler ise, konak hücreyi viral kapsid proteinlerini sentezlenmesi için indükler⁴⁷. Sadece deri ve mukoza da replike oldukları için hücre kültüründe üretilmemiştir. Fakat deri organ kültüründe replikasyonu gerçekleştirilmiştir^{4,47}.

Farklılaşan üst yüzey epitelinde replikasyon siklusunu tamamlar ve epitel yüzeyin deskuamasyonu viriyonlar serbest kalır⁴⁷. Virüsler, mikrolezyonlar yoluyla epitelyuma girer ve bazal epitelyal hücreleri enfekte ederek, her bir hücrede 50–100 genomluk bir kopya oluşturur. Hücre çoğalması sırasında yeni epitel hücreleri enfekte etmeyi sürdürerek, hücrelerin farklılaşma sürecini başlatırlar. Yeni hücreler, viral DNA sentezi için gerekli replikasyon mekanizması ve enzimleri olmadığı veya az olduğu için, terminal farklılaşmaya programlanmış bir hücre yüzeyini G1 fazından S fazına stimüle etmeye ihtiyaç duyar. Genomlar S fazında replikasyona geçer ve geç (L ORF) genini aktifleştirerek, kapsid proteinlerini sentezletirler. Enfekte olmuş hücreler farklılaştıkça bazaldan uzaklaşarak dış yüzeye yaklaşır. Viral DNA ise granüler tabakada çoğalırken, kapsid proteinlerini üreterek replikasyon son aşamasına gelir ve viral partiküller toplanarak son bulur. Bu sırada enfekte hücreler dışarı doğru itilerek dökülmesi sağlanır. Bu olay en önemli bulaş kaynağını oluşturur⁸⁵.

Human papillomavirus tipleri replikasyon tiplerine göre; episomal replikasyon yapmayan, episomal replikasyon yapabilen, entegre olarak replike olabilen şekilde üç gruba ayrılır:

a) Episomal replikasyon yapmayan HPV tipleri, organizmayı enfekte ettikten sonra hücre içerisinde inaktif ekstrakromozomal partikül olarak kalır ve ancak DNA testleriyle saptanabilir.

b) Episomal replikasyon yapabilen HPV tipleri, DNA replikasyonu gerçekleştirerek viral partikülleri oluşturur ve klinik olarak saptanabilir. Lezyonlar meydana gelir, enfekte hücre içinde perinükleer vakuolizasyonlar gözlenir. Yani koilosit (boş hücre) görülür.

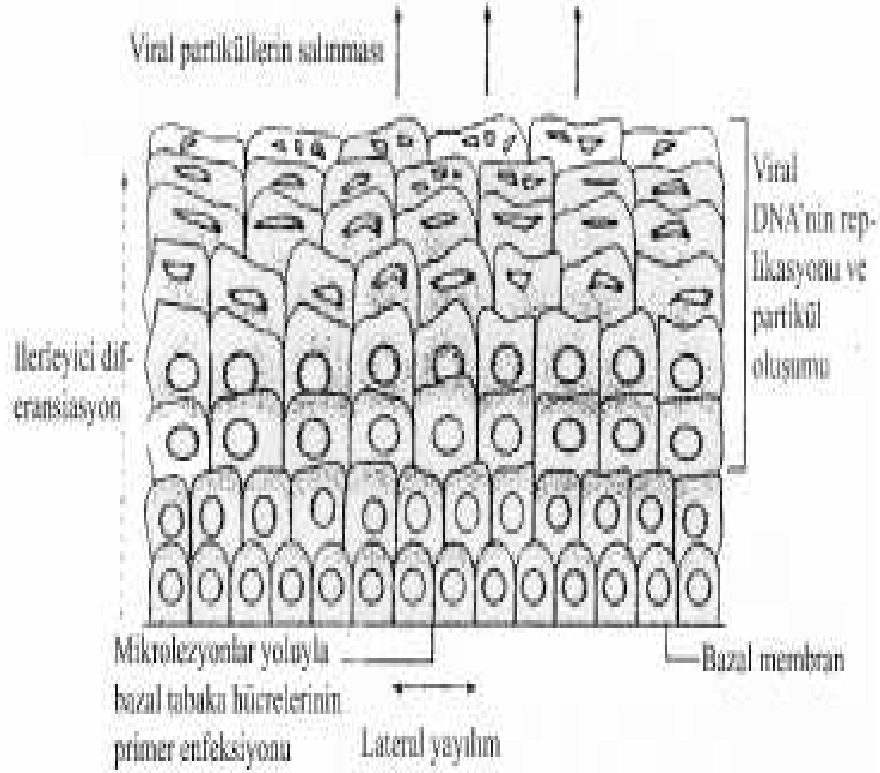
c) Yüksek riskli HPV tipleri entegre olarak replike olurlar. Viral genom konakçı DNA'sına entegre olmadan önce lineer hale geçerek, konak hücre DNA'sına entegre olur⁷⁷.

Replikatif HPV tiplerinde, replikasyon üç basamaklıdır (Şekil 2)⁹:

-HPV'ler konağa özgün olduklarından skuamöz epitel hücrelere afinite gösterir. Başlangıçta skuamöz epitelin bazal hücresinde genom plazmid şeklinde bulundurulur ve bu aşamada çok az sayıda kopyası vardır.

-Viral replikasyon aşaması, bulunduğu epitelin daha altlarındaki proliferen olan hücreler mitoz bölünme gerçekleştirirken aynı zamanda da viral genomun kopya sayısını da artırırlar. Enfekte keratinositler farklılaşmayı sürdürken, konak hücrede viral genom, hücre başına binlerce kopya düşecek şekilde sayısını artırmıştır

-Montaj aşamasında, virus L genlerini kodlar ve viral kapsid proteinlerini sentezler, daha sonra virionları meydana getirmek üzere genom ve kapsid proteinleri montaj edilir¹³³.



(9) Şekil 2. HPV'nin yaşam döngüsü

2.3.2.4. Bulaş Yolları

Human papillomavirus’larda asıl bulaş yolu cilt ciltte temasdır. Human papillomavirus direnç mekanizmalarından dolayı enfektivitelerini sürdürerek, kişisel eşyalar, en sık deri temasıyla bulaş gerçekleşir. Erişkinlerde cinsel temas en sık bulaş şeklidir^{29, 67, 89}.

Yapılan bazı çalışmalar ortak kullanılan banyo, yüzme havuzu, sauna gibi ıslak zeminler aracılığıyla genital HPV enfeksiyonlarının geçişinin mümkün olmadığını göstermiştir¹⁰³.

Yaygın şekilde HPV’nin kan yoluyla bulaşmadığı kabul edilmesine karşın, bazı çalışmalar kan ile bulaş olabileceğini göstermiştir¹⁹.

Doğum sırasında, doğum kanalında geçerken bebeğe genital veya oral HPV enfeksiyonunun bulaşma ihtimali zayıf olmasına karşın, bazı araştırmacılar nasıl olduğuna dair kanıt olmaksızın vaginal veya servikal sekresyon aracılığı ile vertikal geçiş olabileceğini bildirmişlerdir. Ayrıca birçok çalışma plasantanın HPV enfeksiyonunun fetusa geçmesini sınırladığını ve düşük riskli HPV enfeksiyonlarında anormal fetal karyotip riskinde oldukça yüksek olduğunu bildirmiştir^{46, 109}.

Yeni kandidomlar eskisine göre daha çok DNA içerdiğinden daha enfektiftir. HPV 6, 11 non-genital olarak da bulaşabilmektedir HPV 6 ve HPV 11 çocuklarda larengeal papillom oluşturabilirler².

2.4. HPV’nin Patogenezi

Papillomaviruslar, mukoz membran ve derinin, skuamöz epitel hücrelerine tropizm gösterirler. Bazal keratinositleri hedef alan virus, replikasyon zincirinde, skuamöz epitelin stratum granulozumun ve stratum spinosum tabakasında farklılaşan keratinositlerde ortaya çıkar⁸⁵.

Papillomaviruslar, epitel hücrelerinin farklılaşmasını kullanarak bazal tabakadaki kök hücrelerinde virus DNA’sını replike eder. Bazal tabaka dışındaki bütün epidermal tabaka aşırı proliferasyona uğrar. Bütünlüğü bozulmuş bu sınırlı dokuda meydana gelen hiperplazi “verruka ve papillom” olarak adlandırılır. Virusların, hafif doku travmaları sonrası vücuda girdikleri düşünülüyor. Etkenin vücuda girmesinden enfeksiyonun oluşmasına kadar geçen süre 3 haftadan 2 yıla kadar değişebilir⁴⁷.

Klinik olarak HPV enfeksiyonları; latent, subklinik ve klinik enfeksiyon şeklinde üç tipe ayrılır:

a) Latent enfeksiyonda, klinik olarak hiçbir bulgu yokken, etken DNA'sı dokularda biyolojik olarak tespit edilebilir ve hücrelerde farklılaşmaya neden olabilir.

b) Subklinik enfeksiyonda, belirgin bir semptom olmamasına karşın, kolposkobik muayene gibi küçük büyütme oranlarıyla dahi hücre düzensizliği görülebilir. CIN'in tiplerine bu dönemde rastlanır.

c) Klinik enfeksiyon, lezyonlar gözle görülebildiği gibi semptomlarda belirgindir. Kondilomlar ve invazif kanserler, klinik enfeksiyonlardır ¹¹⁶.

Enfeksiyonların çoğu semptomatiktir. Latent dönem çok uzun sürebilir ve bu süre; sigara kullanımı, beslenme, immun sistemi, genetik faktörler gibi çeşitli etkenlere bağlıdır. Genellikle enfeksiyon 2 haftadan 8 aya kadar latent olarak kalabilir. Bazen üç klinik formda aynı anda görülebilir. Dokunun bir kısmında enfeksiyon semptom verirken, diğer kısmında ise HPV enfeksiyonu latent olarak kalabilir. Latent enfeksiyonlu dokuda, virus aktif hale geçebilir ve bu nedenle tedavi sonrasında da nöksler gerçekleşebilir. (Keobner Fenomeni) ⁶⁹.

Epidermis ve dermisi tutan lezyonlar sık görülür; verruca vulgaris (HPV 2 ve HPV 4), veruca plantaris (HPV 1) ve condyloma decuminatum (HPV 6) bunlara örnek teşkil eder.

Yüzeyel tabakalarda, virus morfolojik hücre değişikliğine neden olur. Bu sitopatik etki sonucu, sitoplazmada vakuolizasyon ve nükleer düzensizlik, irregüler kromatin kümeleri ve hiperkromazi ile kendini gösteren "koilositoz" HPV enfeksiyonları için tanımlanan bir mikroskopik görünümdür. Koilositler, düşük riskli HPV grupları tarafından oluşturulup, malign dönüşümü göstermeyen, ölü stratum granulozum hücreleridir. Koilositoz dışında akantozis, hiperkeratoz da oluşabilir ¹²³.

İmmun sistem defekti HPV enfeksiyonunun reaktive olmasına neden olur. İmmun sistemin, HPV'ler üzerinde nasıl bir etki oluşturduğu henüz tam olarak açıklanamamıştır ⁶⁹.

Erken proteinler, geç proteinler ve konakçı organizmadaki tümör süpressör genler, patogeneze sorumlu en önemli faktörlerdir.

Yüksek riskli HPV grupları, replikant varyantlardır. Virus DNA'sını, konakçı hücrenin DNA'sına entegre eder. Entegrasyon E1, E2 ve E7 ORFs'nin üzerindeki baskıyı kaldırır.

Erken protein olan E6 proteini p53 ile birleşerek parçalanmasına sebep olurken E7'de R6'yı bağlayarak, tümör baskılayıcı genlerin kodladığı bu proteinler işlev yapamaz hale gelir. Böylece hücre apoptozu inaktif olarak, hücre proliferasyon fazına geçer. Bu bölgede E6 ve E7 transformasyonu hızlandırdıklarından dolayı onkojenik etkin proteinler olarak adlandırılır^{85, 123}.

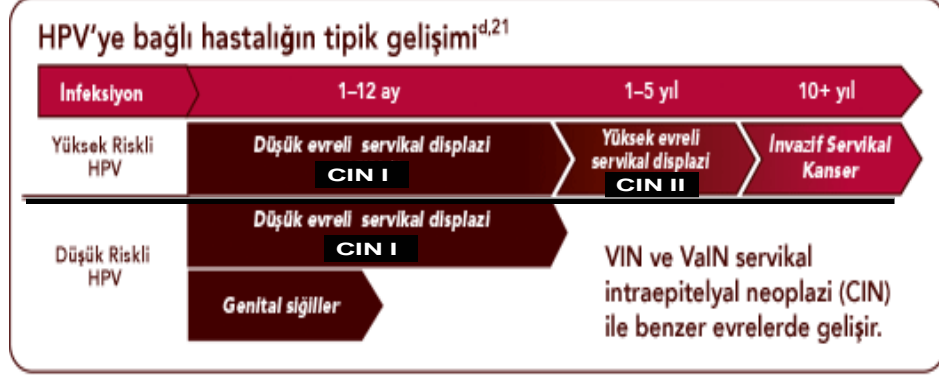
Düşük riskli HPV grupları, epizomal replikasyon yapamayan viruslardan oluşur. Virus konakçı hücreye girdiğinde DNA'sı, epizomal olarak yeni ekstrasözomal plazmid şeklinde kalıp, entegre olamadıklarından replikasyon gerçekleşmez^{47, 116}.

2.5. HPV'nin Epidemiyoloji ve Risk Faktörleri

Human papillomavirus, erkek ve kadınlarda sık görülen, cinsel yolla bulaşan en yaygın hastalık nedenlerinden biridir^{9, 29, 37, 57, 67, 74, 81, 106, 114, 115, 123}. Human papillomavirus enfeksiyonu olan kadınların erkek partnerlerinin %5-80'inde HPV ile enfekte penil lezyonlar gözlenmiştir^{15, 122, 124, 137}. Cinsel olarak aktif her erkek ve kadının yaklaşık %50-85'i hayatlarında en az bir kez HPV'nin herhangi bir tipiyle karşılaşır^{9, 32}. Human papillomavirusun 230'dan fazla tipi olduğu düşünülmekte olup, sadece 100'den biraz fazlası tanımlanmıştır. Bilinen tiplerin yaklaşık %30-40'ı genital sistemi enfekte etmekte olup, %20'den fazlası da servikal kansere eşlik etmektedir^{29, 65, 90, 106, 114, 128}. Servikal kanser biyopsilerinin yaklaşık %84-100'de özellikle yüksek riskli HPV 16, 18, 31, 45 tipleri baskın olmak üzere HPV etkeni olarak izole edilmiştir^{9, 14, 37, 43, 67, 89, 106, 107, 110, 114, 118, 122, 128, 144}. Çeşitli epidemiyolojik çalışmalar servikal kanserin seksüel davranışlarla ilişkili olduğunu göstermiştir^{29, 57, 123, 128}.

Human papillomavirus 6 ve 11 genital kondülom ve hafif CIN olgularıyla ilişkilidir. Human papillomavirus tip 16 ve tip 18 karsinomların ve şiddetli displazilerin en önemli etkeni olup, servikal kanserlerin yaklaşık %62-83'ünde tespit edilmiştir^{32, 43, 45, 67, 110, 127, 137}. Human papillomavirus tip 16 en sık olarak invaziv kanser, CIN II ve III etkeni olup biyopsi örneklerinin yaklaşık %47-60'ında baskın tip olarak tespit edilmiş olmasına karşın, normal sitolojisi olan kadınlarda da görülebilir (Şekil 3)^{29, 39, 43, 67, 89, 110, 128, 141, 143}.

Yapılan PCR çalışmalarında, CIN II-III lezyonu olan kadınların %45-96'sının servikal sürüntü örneklerinde yüksek riskli HPV tiplerinin (tip 16, 18, 31, 33, 35 gibi) en az bir ya da birkaçının DNA'sına raslanmıştır^{29, 43, 39, 67, 89, 110, 128}. Ancak CIN I lezyonu olan kadınların ise %74-88'inin servikal sürüntü örneklerinde ise düşük riskli HPV tiplerinin DNA'sına rastlanılmıştır⁶⁴.



(141) Şekil 3. HPV'ye bağlı hastalığın tipik gelişimi

Yüksek riskli HPV enfeksiyonları en sık seksüel aktif genç kadınlarda görülmektedir. Yapılan bir çalışmada kadınların %40'a kadarında yüksek riskli HPV enfeksiyonu tespit edilmiş bunların %10'dan fazlasında persiste HPV enfeksiyonu gelişmiş ve bu persiste enfeksiyonların %8-38'nin 5-6 yıl takip sonunda CIN'nin çeşitli dereceli lezyonlarına gelişim göstermiş ve persiste olguların servikal kansere dönüşümünün ise 15-20 yıl sürdüğünü göstermiştir^{9, 69, 122, 128, 138}. Yapılan birçok çalışmada kadınlardan alınan servikal örnekler belirli aralıklarla tekrar test edildiğinde kümülatif HPV prevalansı % 80 olarak bulunmuştur. Bazen pozitif çıkan örnek daha negatif çıkabilir, bu dalgalanma; kişinin HPV enfeksiyonundan kurtulması veya yeniden enfekte olması, HPV DNA'sının replikasyon durumu, tespitite kullanılan yöntem, hormonal ve immün durumu gibi çeşitli faktörlerle açıklanabileceği bildirilmiştir¹³⁹.

Epidemiyolojik hesaplamalar, onkojenik tipte HPV ile enfekte kadınların yaklaşık %1-5'inde kanser gelişmekteyken, onkojenik olmayan bir HPV tipi ile enfekte olan kadınlarda ise bu risk yaklaşık 5-10 katı azalmaktadır^{12, 29, 105, 122}. Birçok HPV enfeksiyonları geçici olup 4 ay-5 yıl arasında kendiliğinden geriler^{29, 128}. İmmün sistem sayesinde HPV'nin onkojenik yeteneğine rağmen, birinci yılın sonunda yaklaşık %70-70.2 kadında HPV enfeksiyonunu tamamen yok olurken, ikinci yılın sonunda ise bu oran %81-90'e yükselmektedir^{9, 91, 93, 123, 136, 139}.

Yirminci yüzyılın ilk yarısında, PAP smear test yönteminin uygulamaya girmesiyle öncül lezyonların tanısı ve tedavisi mümkün hale gelmiş olup, ABD'de etkin sitolojik tarama programları başlamıştır. Yirminci yüzyılın sonuna doğru servikal kanser insidansında ve ona bağlı olarak mortalitede yaklaşık %75'in üzerinde bir düşüş gözlenmiştir. Fransa'da 1975'ten beri servikal kanser vaka sayısı her yıl yaklaşık %3 düşmektedir^{9, 37, 38, 54, 106, 140}. Özellikle gelişmiş ülkelerdeki servikal kanser vaka sayılarındaki bu düşme

serviks kanserinin, “önlenebilir kanserler” kategorisine girmesini sağlamıştır. Papanikolau smear testinin spesivitesi yaklaşık %14-97 olarak bildirilmesine karşın, sensivitesi beklenenin aksine oldukça düşük olup yaklaşık %11-61.9 olarak tespit edilmiştir. Test bir kez yapıldığında birçok kadında var olan servikal lezyonlar gözden kaçacağı için, test üç kez tekrar edilerek sensivite ortalama %86,8’e yükseltilmiş olur^{8, 9, 16, 29, 37, 38, 47, 54, 67, 79, 100, 106}. Sınırlı sensivitesinden dolayı PAP smear testi servikal kanserde beklenen düşüşü gerçekleştirilememiş olup, bugün ABD’de her yıl yaklaşık 12.200-15.000 yeni servikal kanser vakası ortaya çıkmakta ve bunların yaklaşık 4.100’ü kaybedilmektedir^{8, 55, 67, 122}. ABD’de, PAP smear testi yaptırmamış kadınların yaklaşık %15-50’den fazlası 5 yıl içinde ilerlemiş servikal lezyonlar ile karşımıza çıkmaktadır^{33, 90, 106}.

Servikal kanser tüm dünya kadınlarını etkileyen en yaygın malign hastalıklardan biri olup, her yıl yaklaşık 200.000 kişinin ölüm nedenidir^{33, 98}. Dünya Sağlık Örgütü (WHO)’nun 1995 yılı verilerine göre, tüm dünyada 330 milyon tedavi edilebilir, cinsel yolla bulaşan enfeksiyon vakası bildirmiş olup, HPV enfeksiyonu ise bunun %30-60’dan sorumludur. Ayrıca her yıl yaklaşık 30 milyon yeni genital HPV enfeksiyonu meydana gelmekte olup, bu enfeksiyonların ise yaklaşık %80-91’nin gelişmekte olan ülkelerde olduğu tahmin edilmektedir^{9, 106, 114, 137}. Her yıl yaklaşık 370-493 bin serviks kanseri olgusu ve 45.000 yüksek dereceli premalign lezyon tespit edilmektedir (Tablo 3)^{6, 9, 39, 44, 31}.

Geçen yüzyılda serviks kanseri ABD ile birlikte dünyada, kadınlar arasında en sık görülen kanserdir. ABD’nin 20 milyon nüfusu HPV ile enfekte olup, buna her yıl yaklaşık 1-5,5 milyon kişi eklenmektedir^{14, 29}. ABD’de HPV enfeksiyonları, cinsel yolla bulaşan hastalıklar sıralamasında Klamidya ve Trichomonas enfeksiyonundan sonra, üçüncü sırada yer almaktadır (Şekil 4)^{137, 141, 143}.



(141) Şekil 4. HPV ile ilişkili klinik açıdan anlamlı hastalık ve tanıların, tüm dünyadaki yıllık olgu sayıları

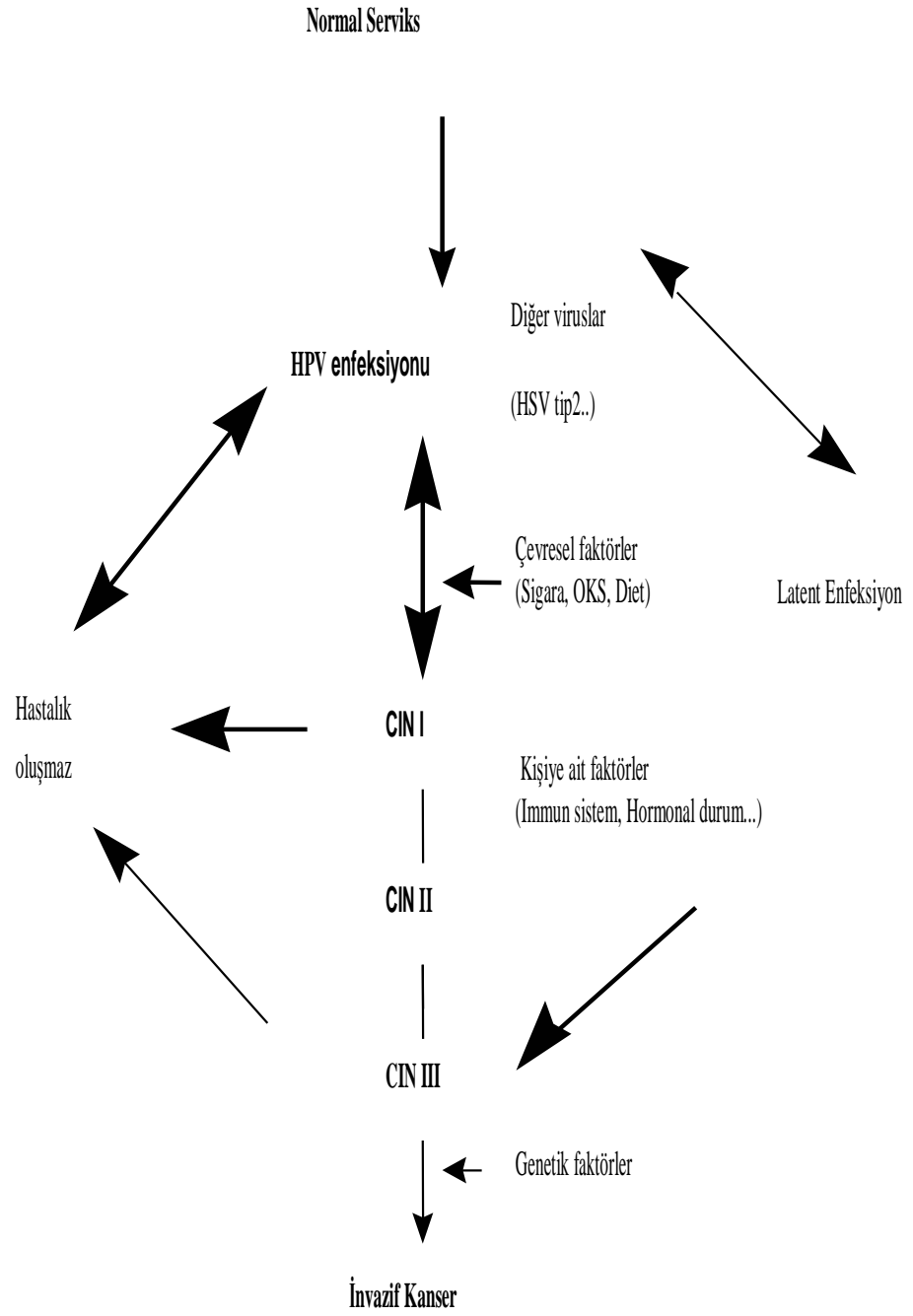
Servikal kanser, kadınlarda görülen tüm kanserlerin yaklaşık olarak %20-25'ni oluşturmaktadır^{29, 90, 110}. Servikal kanserin mortalitesi yaklaşık %50'den fazla olup, dünyada kansere bağlı ölümler arasında ikinci sırada yer almaktadır^{39, 47, 67, 106, 122}. Avrupa Topluluğunda kadınlarda 8. en sık rastlanan kanser türü olup prevalansı ülkelere göre değişebilir. Serviks kanser prevalansı incelendiğinde ilk sırada Afrika, ikinci sırada Latin Amerika yer almakta olup, Kolombiya, Hindistan, Vietnam'ın da prevalansı oldukça yüksek bulunmuştur. Hindistan'da 2002'de yapılan çalışmada, 103.000 yeni vaka meydana geldiğini ve bu sayının ise dünyadaki bütün servikal kanserlerin yaklaşık %25'ini oluşturduğunu göstermiştir. Buna karşın Avrupalı ve Finlandiyalı kadınlarda prevalans daha düşük iken en düşük prevalansa ise Çin'de rastlanılmıştır^{21, 55, 143}.

Sağlık Bakanlığı, 1999 istatistik verilerine göre Türkiye'deki servikal kanser insidansı yaklaşık olarak 3.96-0.95/100.000 olup, görülme sıklığı açısından 7. sırada yer almaktadır^{9, 135}. Globocan verilerine göre ülkemizde kadın ölümleri nedeni arasında serviks kanseri 5. sırada yer almaktadır^{9, 53}. Son yapılan çalışmalar, birçok HPV enfeksiyonlarının alt yaş sınırının düşme eğiliminde olduğunu göstermiştir^{122, 123}.

Genital HPV enfeksiyonu yaygın olmasına rağmen çoğu latent olup belirti vermez ancak PAP smear testi ile sitolojik değişiklikler sonucunda enfeksiyondan fark edilir. HPV enfeksiyonu, aktif cinsel dönemdeki genç kadınlarda (18-25 yaşlarında) yaklaşık %55 prevalans ile en yüksek seviyede iken, yaş ile birlikte cinsel partner sayısındaki azalma veya muhtemelen kazanılmış bağışıklık gibi sebeplerden enfeksiyon prevalansında keskin bir düşüş olduğu belirtilmektedir^{93, 123, 137}. Epidemiyolojik çalışmalarda servikal kanserin LSIL'ın erken 20'li yaşlarda en sık görülürken, HSIL ise geç yirmili yaşlar ile erken otuzlu yaşlarda en yüksek prevalansa sahipken, invaziv kanserler ise en sık 40-50 yaşlarda görülmektedir^{93, 123}. Serviks kanserinin ortalama görülme yaşı 52,2 olup; kadın yaşamında 35-39 ve menapoz ve immünitadaki değişikliklere bağlı olarak 55-64 yaşları arasında 2 pik dönemi vardır^{67, 66, 93, 123}.

Kanser hakkındaki en erken epidemiyolojik çalışmalardan biri 1842 yılında Rigoni Stern ve ark.'ları tarafından yapılmıştır^{43, 56}. Zur Hausen ve ark.'ları 1970'li yılların ortalarında HPV'nin genital sistem neoplazilerindeki rolünü ilk kez araştırmıştır^{29, 67, 78, 122}. Böylece epidemiyolojik çalışmalar HPV-servikal kanser ile sigara içimi, oral kontraseptif kullanımı, vitamin eksikliğinin, seksüel aktivite, gebelik sayısı gibi bağımsız risk faktörleriyle olan ilişkisinin çok anlamlı olduğu bulunmuştur^{29, 33, 67, 78, 123}. Serviks dışında vulva, vagina ve anüsün displastik veya neoplastik lezyonları da kanser riski taşımaktadır ancak, HPV serviks epitelyumunu vulva, vagina ve anüs epitelinden daha sık enfekte ettiği için serviks kaserine daha sık rastlanır. Bir zamanlar servikal kanserin tek nedeni olarak HPV sorumlu tutulurken, birçok çalışma serviks kanseri için HPV'nin sadece majör bir risk faktörü olduğunu göstermiştir^{3, 9, 53, 137}.

Bununla birlikte HPV'ye maruz kalma ile kanser gelişmesi arasındaki sürenin çok uzun olması ve HPV'ye maruz kalanların çok az bir bölümünde SIL veya kanser gelişmesi, servikal neoplazi patogenezinde başka faktörlerin gerektiğini düşündürmektedir. Literatürdeki birçok epidemiyolojik çalışma, serviks kanseri ile birçok bağımsız faktörler arasında pozitif bir birliktelik olduğu bildirilmiş ve bu kofaktörlerin servikal kanser olasılığını artırdığını göstermiştir^{9, 43, 69, 122, 128}. Yapılan birçok çalışma serviks kanserinin, ilk ilişki yaşının küçük olması (16 yaş), seksüel aktivite, seksüel partner sayısı, seksüel partnerde siğil varlığı, sigara içimi, gebelik sayısı, ırk, yaş, immunolojik durum, Klamidya öyküsü gibi cinsel yolla bulaşan başka hastalık öyküsü, oral kontraseptif kullanımı, düşük sosyoekonomik durum, genetik yatkınlık ve diyet gibi birçok bağımsız risk faktörleriyle ilişkisinin oldukça anlamlı olduğunu göstermiştir (Şekil 5)^{7, 10, 11, 29, 41, 64, 71, 89, 93, 94, 106, 108, 111, 114, 118, 122, 123, 128}.



(93) Şekil 5. Serviks kanserindeki olası gelişim şeması

Bütün bu risk faktörleri dışında; PAP smear testini hiç yaptırmamak veya düzenli yaptırmamak servikal kanser için en önemli risktir. Dünyada servikal kanser vaka sayısının ve ölüm oranının azaldığı her yerde düzenli bir tarama programı mevcuttur (Tablo 2) ^{43, 66, 67}.

(66) Tablo 2. Servikal kanser ve prekürsörlerindeki risk faktörleri

T	<u>Demografik faktörler</u> -İleri yaş -Düşük sosyoekonomik sınıf -Düşük eğitim seviyesi <u>Davranış ve seksüel faktörler</u> -Multipl seks partneri -İlk koitusun erken yaşta olması -Sigara -Uzun süreli oral kontraseptif kullanımı -Dietle düşük folate, karoten ve C vitamini alınması -Medikal/Jinekolojik faktörler -Multiparite -İlk gebeliğin erken yaşta olması
H	-Cinsel temasla bulaşan hastalık hikâyesi -Spesifik HPV tipleri ile enfeksiyon -Rutin sitolojik tarama yapılmaması -İmmünoşüpresyon (Herhangi bir sebeple)

Human papillomavirus enfeksiyonlarında, gebelik sayısının artmasına paralel olarak, servikal intraepitelyal neoplazma ve servikal kansere dönüşüm hızı da artmaktadır. Serviks durumu gebelikte değişikliğe uğrayarak steroid hormonlarının seviyesinde bir artışa neden olur ki bu artış viral replikasyon elementleriyle ilişkilidir. International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer grubu ve Eppel tarafından yapılan çalışmada gebelik sayısı artıkça serviks kanser riskinde arttığını bildirmiştir ^{29, 43, 46, 58, 101, 106, 123}.

Uzun dönemli oral kontraseptif kullanımının, serviks kanseri oluşumunda önemli bir risk faktörü olmadığını sadece düzenli kontrollere olanak verdiği için hastalığa erken tanı konmasına olanak sağladığını bildiren çalışmalar

olmasına karşın bugün birçok araştırma, oral kontraseptif kullanımına bağlı östrojen salınımı ile HPV 16 onkogenleri arasında sinerjistik bir ilişki olduğunu göstermiştir^{43, 47, 101, 122, 127}. Beş yıldan az oral kontraseptif kullananlar için ORs yaklaşık 0.46-2.8, 5-9 yıl arası kullananlar için ORs yaklaşık 1.36-5.46 iken, 10 yıl ve daha uzun süre kullananlar için bu oran yaklaşık 2.24-9.36 olarak tespit edilmiştir^{61, 101, 106, 127}.

İlk kez Winkelstein ve ark.'ları tarafından 1977 yılında, sigara kullanımının serviks kanseri için yüksek bir risk faktörü olduğunu bildirmiştir. Sigara içenlerde preinvaziv ve invaziv hastalık riski yaklaşık 1.9-2.3 kat artmıştır, özellikle şu anda sigara kullanan, uzun süredir sigara kullanan, yoğun sigara içen, ve filtresiz sigara içenlerde bu risk daha fazladır. Seksüel faktörler sabit tutulsa bile sigara içimi bağımsız bir risk faktörüdür. Sigara kullanımının nasıl bir etkiye sahip olduğu kesin olarak bilinmemesine karşın, aktif veya pasif içicilerde nikotine bağlı servikal mukus seviyesinde bir artış olduğu ve artmış olan salgının ise immun sistemdeki Langerhan's hücrelerinin sayısını azaltarak kansere zemin hazırladığı düşünülmektedir^{11, 47, 58, 91, 114, 123}.

Servikal kanser gelişimi için en kuvvetli risk faktörlerinden biride seksüel partner sayısıdır. Seksüel partner sayısı 20'den fazla olanlarda servikal kanser riski 5 kat artmaktadır^{29, 43, 47, 136}.

Yapılan birçok çalışma, ilk cinsel ilişki ve ilk gebelik yaşına bakıldığında 25 yaş ve altına düşmesi özellikle 16-18 yaşlarda servikal kanser riskinin belirgin olarak arttığını saptamıştır^{29, 43, 47, 58, 69, 136}. Araştırmalar, 18-30 seksüel aktif kadınların yaklaşık %20-25'inin onkojenik HPV tipleri ile enfekte olduğunu ve invaziv serviks kanserlerinde en sık hayatın 4. veya 5. dekadındaki kadınlarda görüldüğünü bildirmiştir^{67, 85, 114, 128}.

İmmun baskılayıcı birçok durum karsinojenik süreci hızlandıran risk faktörleri arasında sayılabilir^{58, 91, 122}. Herpes virus enfeksiyonlarının da papillomaviruslar ile sinerjistik rol oynayarak servikal karsinom oluşumunu indüklediği düşünülmektedir. IARC çalışmalarında, Klamidya, Trichomonas veya HSV-2'ye karşı antikorlar varsa riskin 2.1 kat arttığı belirlenmiştir^{6, 58, 91, 120}. Human papillomavirus ile HIV arasında kısmi bir ilişki tanımlanmış ve HIV'a maruz kalan kadın veya erkeklerde HPV pozitifliği ile HPV lezyonları arasında pozitif bir korelasyon bulunmuştur^{21, 41, 117, 121}.

Beslenme ve diyet alışkanlıklarından kaynaklı vitamin eksikliğinin, servikal kanseri de içine alan bazı malignitelere rolü olduğu düşünülmektedir. Bu konudaki en ayrıntılı analiz Garcia-Closas ve ark.'ları tarafından yapılmış olup, özellikle vitamin A, beta-karoten, folik asit, retinol, vitamin E, vitamin C, B12, likopin gibi maddelerin CIN'a karşı korunmada önemli olduğunu göstermiştir^{43, 47, 58}.

Bazı çalışmalar, genetik yatkınlığın kanser gelişiminde önemli bir unsur olabileceğini bildirmişler. Özellikle Afrika ve Güney Amerikalılarda serviks kanseri insidansının daha yüksek olması sosyoekonomik statülerinin daha düşük olmasıyla ilgilidir ^{29, 43, 47, 94}.

2.6. HPV'nin Onkogenezi

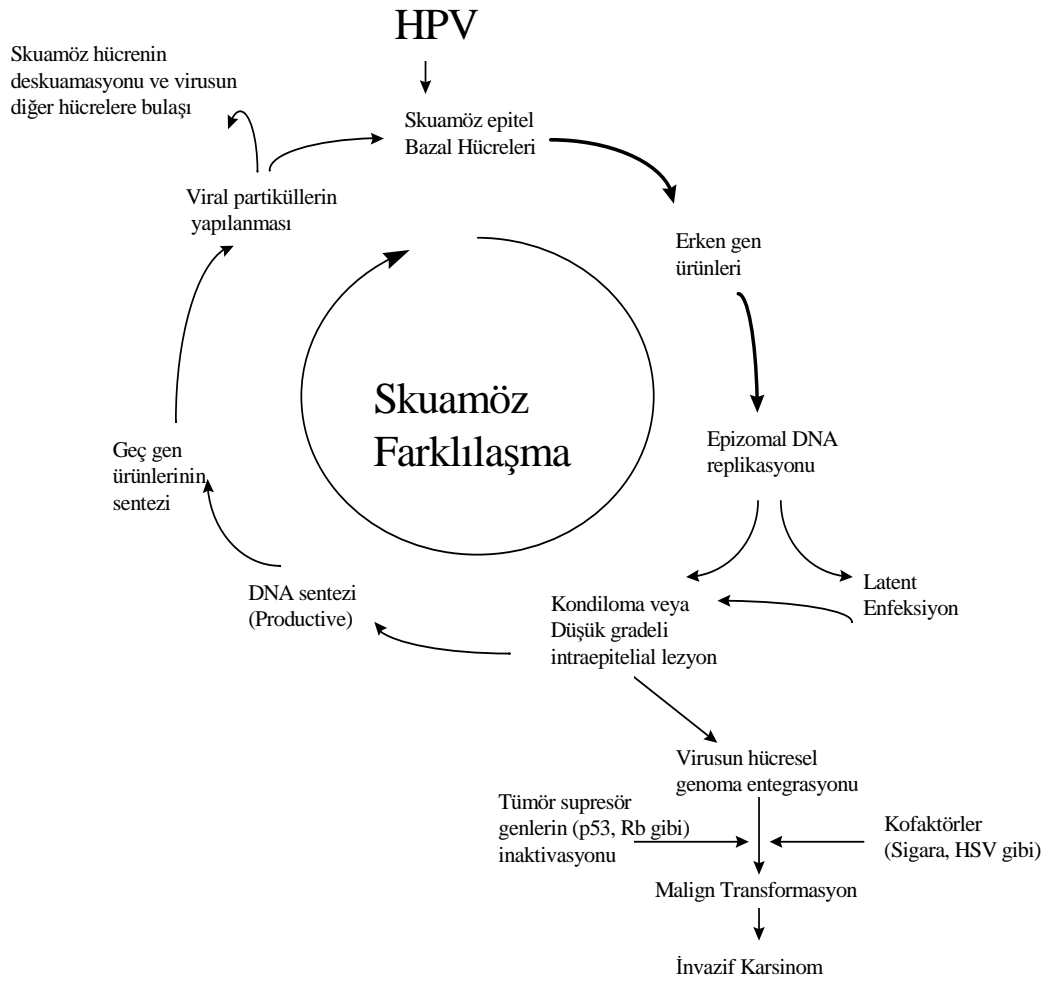
Kanserden, hücrelerin çoğalmalarını, farklılaşmalarını ve ölümlerini düzenleyen genlerdeki (onkogenler, tümör supresör genler, apopitoz genleri... gibi) değişiklikler sorumludur. Onkogenler hücre çoğalmasını aktive eden, tümör supresör genler ise baskılayan genleri kodlarken, apopitoz genleri ise programlanmış hücre ölümünden sorumlu genleri kodlamaktadır. Bu genlerin dışında son yıllarda DNA tamiri ile ilgili genlerin de kanser gelişimi ile ilgili oldukları belirlenmiştir. Protoonkogenler, normal büyüme ve farklılaşmaya yardım eden onkogenlere dönüşen genler olup, bu dönüşüm somatik mutasyonlarla olmaktadır. Bu mutasyonlar ise, nokta mutasyon, translokasyon ve aşırı ekspresyon şeklindedir ¹¹⁶.

İnsanda tümöre neden olan 20 kadar DNA virusu vardır ve HPV bu viruslarından. İnsan papillomavirus enfeksiyonlarının serviks kanseri ve diğer anogenital kanserler için primer risk faktörü olarak kabul edilmesi, karsinogenez ile viruslar arasındaki ilişki anlamaya yönelik çalışmaların çoğunun serviks kanseri üzerinde odaklanmasına neden olmuştur ^{28, 47, 76}. Skuamöz serviks kanserlerinin daha önceki çalışmalarda %70'inde HPV DNA'sı bulunurken, şimdiki çalışmalarda HPV'nin alt tiplerinin daha iyi tanımlanmasından dolayı serviks kanserlerinin neredeyse % 84-100'den sorumlu olduğu bildirilmiştir ^{2, 9, 14, 37, 43, 67, 89, 106, 107, 110, 114, 118, 122, 128, 144}.

Her geçen gün yeni üyelerin eklendiği HPV ailesinde, her HPV tipinin kendine özgü bir doku ve hastalık spektrumu vardır. Gerek hücresel, gerekse moleküler biyolojik çalışmalarla HPV tip 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 54, 55, 56, 58, 59 ve 68'in servikal karsinogenez ile ilgili olabileceği ve özellikle HPV tip 16, 18, 31 ve 45'in ise en önemli yüksek riskli viruslar olduğu bildirilmiştir. Human papillomavirus enfeksiyonlarının yaklaşık %62-83'ünde sadece HPV tip 16 ve 18 sorumlu olduğundan diğerlerine kıyasla daha yüksek onkogenik potansiyele sahip oldukları bildirilmiştir ^{32, 43, 45, 67, 110, 127, 137}. Skuamöz karsinomlarda en sık tip HPV tip 16 tespit edilirken, adenokarsinomalarda ise HPV tip 18'e daha sık rastlanılır ^{67, 95}.

İnsan papilloma virusları skuamöz epitel hücrelerine yüksek tropizm gösterir ve yalnız bu tip epitel içinde tam olarak replike olabilir. Papilloma virusun epitel hücreleri içindeki üreme döngüsü dönemlere ayrılır ve bu dönemler epitel hücre farklılaşma basamaklarına bağlıdır. Skuamöz epiteldeki bazal hücrelerde hücresel DNA sentezi ve hücre bölünmesinin tamamlanabilmesi için gerekli koşullar vardır ⁸⁵.

Bu koşullar HPV için de uygun olduğundan, bazal hücrelerde kalıcı bir viral enfeksiyon oluşabilir. Ancak, bazal hücrelerde yalnızca virusun erken genleri eksprese olabilir ve HPV enfeksiyonu olan bir hücre bazal tabakadan granüler tabakaya doğru göç ederse farklılaşma programı başlar. Papillomavirus geç gen ekspresyonları da skuamöz epitel hücrelerinin farklılaşma basamakları ile çok yakından ilgilidir. Viral DNA sentezi ve kapsid proteinlerinin (geç gen ürünlerinin) ekspresyonu ancak farklılaşmasını tamamlamış epitel hücrelerinde gerçekleşir (Şekil 6) ⁸⁵.



(85) Şekil 6. HPV'nin skuamöz epitelyum bazal hücresinde meydana getirdiği farklılaşma

Tümör supresör genler hücre proliferasyonunu inhibe eden proteinleri kodlar ve inhibisyonu veya kaybı hücre proliferasyonunda artışa sonuçlanabilir.

Rb (retinoblastoma) geninin kodladığı protein, nükleusta yer alır ve transkripsiyonu baskılayıcı bir proteindir. Mutasyon sonucu genin fonksiyonu bozularak kansere neden olur. Kansere oluşumu için genin her iki allelinde de mutasyon olmalıdır.

P53 genin kodladığı protein, bir transkripsiyon faktörüdür. p53 gen ürünü (normal p53 proteini) DNA'daki transkripsiyonal regülatör elemanlara bağlanarak hücre proliferasyonunu inhibe eder. p53'ün DNA'ya bağlanması ile hücre siklusunun ilerlemesini sağlayan pek çok gen bloklanır ve hücre proliferasyonu inhibe olur. Genetik hasar halinde ise p53 DNA tamirinin gerçekleşebilmesi için hücre döngüsünü G1 fazında durdurması gerekir. DNA hasarı onarılamayacak kadar büyükse apoptoz olarak bilinen programlanmış hücre ölümü gerçekleşir. Dolayısıyla p53 kaybı veya inaktivasyonu durumunda hücre proliferasyonu kontrolü bozulacak, hücreler DNA hasarı olsa bile canlı kalacak ve kontrolsüz çoğalmayı sürdürecektir. Fizyolojik olarak hücre içindeki p53 miktarı düşük düzeydedir. p53 geninde meydana gelen mutasyonlar -direkt ya da indirekt- sonucu p53'ün homozigot kaybında neden olduğu ve oluşan DNA hasarı tamir edilemediğinden kansere oluşturma düşünülmektedir. p53 varlığı ile invaziv serviks kanseri arasında ters bir ilişki olduğu gösterilmiştir^{9, 39}. Çalışmalarda serviks kanserlerinin yaklaşık %84-100'de HPV etkenine rastlanılmasına rağmen, bu kanserlerde p53 mutasyonları nadirdir. p53 mutasyonları genelde PAP smear testi normal kadınlardaki kanserlerde saptanmaktadır^{2, 9, 14, 37, 43, 67, 89, 106, 107, 110, 114, 118, 122, 128, 144}.

Tümör progresyonunun kompleksliği gözönüne alındığında serviks kanseri gelişiminde de başka genetik değişikliklerin olduğu açıktır. Serviks skuamöz hücreli karsinomu haricinde servikal adenokarsinomlarda da HPV 16 ve 18 varlığı belirlenmiştir. Human papillomavirus tip 18 servikal adenokarsinomlarda daha fazla görülmektedir⁶⁷. Viral protein olan E6'nın p53, E7'nin retinoblastoma tümör supresör geni ürününe (pRb) ve onunla ilişkili p107, p130 proteinlerine bağlanarak hücreleri transforme ettikleri belirlenmiştir. Viral protein olan E6, E6AP isimli bir hücre proteinini uyarmakta ve p53 proteinine bağlanmasını sağlayarak, p53'ün yıkımını gerçekleştirmektedir^{70, 85, 123}. Viral protein olan E6 ekspresyonu olan hücrelerde fonksiyonel p53 bulunmamakta, buna bağlı olarak da DNA hasarı gibi p53'ün normal hücresel yanıt oluşturmaya gereken durumlarda p53 görevini yapamamakta ve oluşan hasar onarılamamaktadır³⁴. Ayrıca bu bağlantı HPV ile enfekte hücrelerde kromozomal instabiliteye yol açmaktadır. Ek olarak E6'nın telomerase aktivitesinde artışa neden olduğu ve bu etkisinin p53'den bağımsız olduğu da gösterilmiştir⁷⁵.

Düşük riskli HPV tiplerinde E6, p53 ile viral DNA'nın etkileşimini bozar ve p53'ün transkripsiyonunu baskıdan kurtarır, p53 proteolizi gerçekleştirememekte fakat p53'ün C-terminal ucuna bağlı kalmaya devam etmektedir. Viral protein olan E6'nın C-terminale nasıl bağlandığı henüz açığa kavuşmamıştır²⁹.

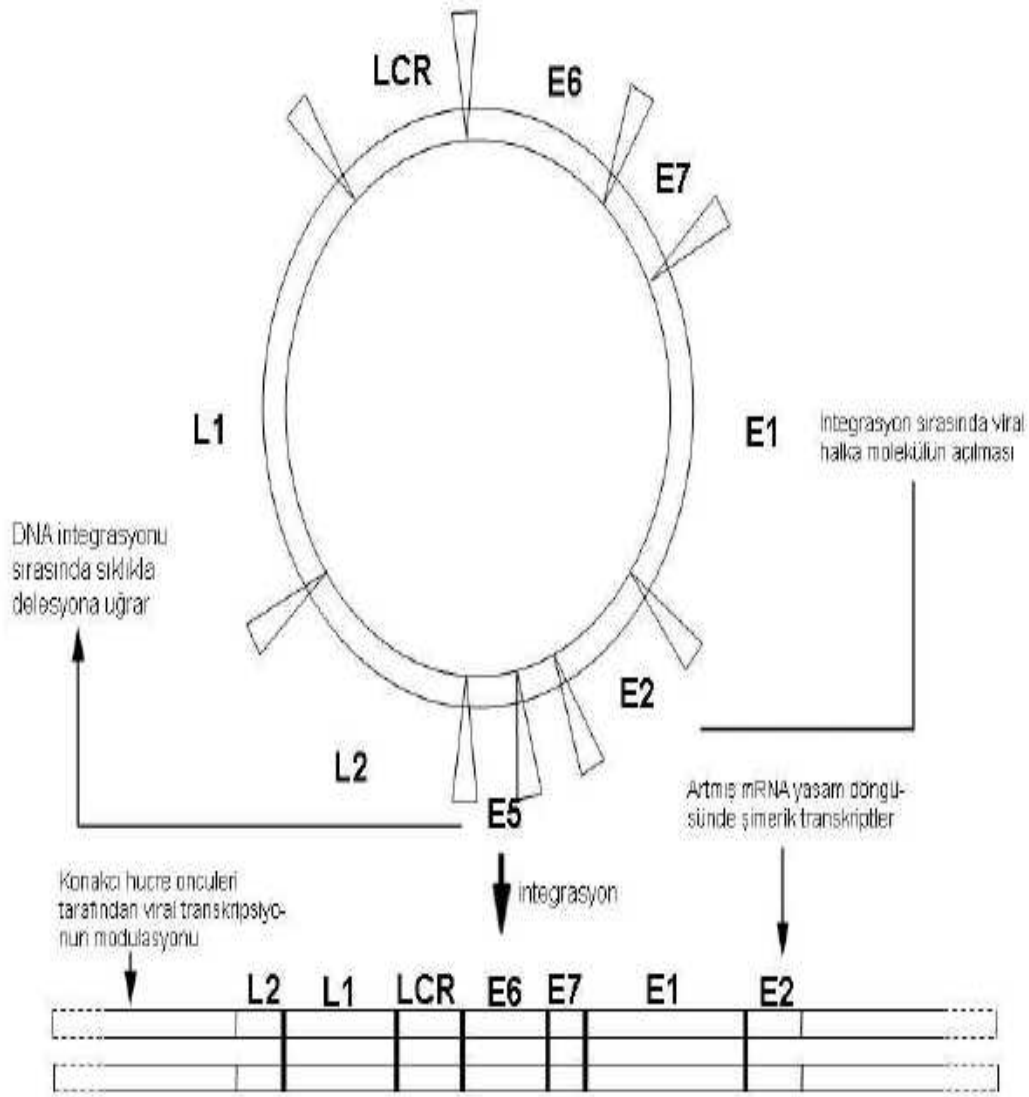
Yüksek riskli HPV'ler tarafından kodlanan E7 proteininin Adenovirus E1A, SV40 büyük T antijeni ile sekans homolojisi gösterdiği ve bu proteinler gibi retinoblastoma tümör supresör geni ürününe (pRb) ve bu protein ile ilgili p107, p130 gibi diğer proteinlere bağlandığı belirlenmiştir⁷⁰. p107, p130 proteinleri E2F ailesinin diğer proteinlerine bağlanır ve bu diğer proteinler Rb'den farklı noktalarda hücre siklus progresyonunda görev alırlar.

Human papillomavirus'larının E7 proteini, pRb'nin hipofosforile şekline bağlanarak, normalde E2F transkripsiyon faktörlerine etkileyerek pRb'ye bağlanamaz, böylece pRb'nin fonksiyonu bozularak, transkripsiyon faktörlerinin serbest kalmasına neden olarak, hücre döngüsünün G1'den S evresine doğru ilerler. Ayrıca, E7 hücre çoğalmasını Rb'den bağımsız olarak da düzenler^{70, 116}.

Bu bağlanma sonucunda viral genom konakçı genomuna entegre olduğunda, çembersel genom E1 ve E2 gen bölgesinden açılarak, bir transkripsiyon faktörü olan E2 ile pRb kompleksi oluşumunu engellediği ve bu nedenle serbest kalan E2 hücre siklusunun progresyonu ile ilgili genlerin aktivasyonuna neden olduğu saptanmıştır³⁵. Yüksek riskli HPV alt tipleri olan 16/18'de E7/pRb bağlanması HPV 6/11'e göre 5-10 kat daha etkin olarak gerçekleşmekte, bunun karsinogenezde önemli olduğu düşünülmektedir (Şekil 7)^{34, 70}.

Malign HPV (HSIL) etkeni konakçı hücre genomuna entegre olduğunda E2'nin çalışmasını bozarak E6/E7 genleri üzerindeki baskının kalkmasına neden olur. Sonuçta E6 ve E7'nin aşırı eksprese olmasına neden olur. Bening (LSIL) hücrelerde ise viral genom epizomal olduğundan E6 ve E7 aşırı eksprese edilmez. Buda E6 ve E7 gen ürünlerinin malignant potansiyeli ile direkt ilişkili olduğunu gösterir⁶⁹.

E6 ve E7 gen ürünleri p53 ve RB gen ürünleriyle bağlanırlar. p53 ürünü ve pRb hücre çoğalmasını kontrol eden proteinler olduğundan, fonksiyonları bozulduğunda hücre kontrolsüz çoğalır. E7 gen ürünü pRb bağlayarak fenotipik olarak normal olan hücrelerde anormal sentrozom dublikasyonuna neden olurken E6 proteinin p53'ü bağlaması çok çekirdeklilik veya anormal çekirdek oluşumundan kaynaklı anormal sentrozom sayıları oluştururlar^{17, 48}.



(70) Şekil 7. Sirküler HPV DNA'nın konak hücre DNA'sına entegrasyonu

Bunlardan başka onkogenler ve büyüme faktörlerine ek olarak servikal kanser oluşumunda rol aldığı düşünülen diğer tümör supresör genler vardır. Bunlar: siklin bağımlı kinazlar (cdks), siklinler, p21, p27, MDM2 bcl-2'dir¹¹⁹. bcl-2 apoptozu inhibe ettiği için aşırı ekspresyonunda hücre yaşam süresi uzar^{130, 145}.

Mikrosatellitler, servikal kanser oluşumunda rol aldığı düşünülen diğer bir genetik instabilite nedenidir ve yapılan çalışmalarda serviks kanserlerinin % 14-30'unda mikrosatellit instabilite tespit edilmiştir¹⁴².

Serviks kanserlerinde sıklıkla 3, 6, 11 ve 17. kromozomlarda delesyonlar saptanması bu bölgelerde tümörogenezi için önemli genlerin bulunabileceğini düşündürmüştür⁵⁶.

Daha sonraki moleküler genetik çalışmalar ile submikroskopik kayıplar belirlenmiştir.^{104, 141, 142}

Viral genom, öncül lezyonlarda epizomal (hücresel genoma entegre olmamış) formda, servikal kanserlerde ise hücresel genoma entegre formda bulunduğu belirlenmiştir⁴⁷.

2.7.HPV'nin Tanı Yöntemleri

Serviks kanseri 'önlenebilir' nitelikte olan çok az kanser türünden biridir. Serviks kanserinin önlenmesine yönelik stratejiler günümüzde benign ve prekanseröz lezyonların erken tanısı ve tedavisine dayanmaktadır. Servikal smear'de rastlanılan morfolojik bozukluklarda daha ayrıntılı inceleme için kolposkopi uygulanmakta ve prekanseröz lezyonların erken dönemde tedavisi yapılmaktadır. Serviks kanserinde erken tanı ile etkin koruma sağlanabileceği için bu amaca yönelik birçok tanı yöntemleri geliştirilmiştir^{42, 46}.

2.7.1. Fizik muayene

Spesivitesi ve sensivitesi az olmasına rağmen iyi bir ışıklandırma ile tecrübeli klinisyen tarafından teşhis koydurucu en basit tanı yöntemlerinden biridir. Hastaya uygun ve rahat bir pozisyon verildikten sonra, perianal ve anal bölge, labialar, vajen ve özellikle serviks muayene edilir^{42, 46}.

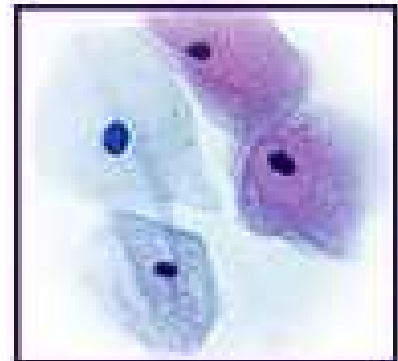
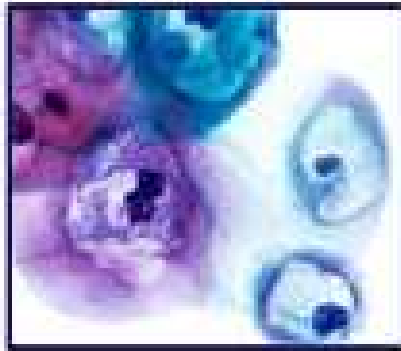
2.7.2. Kolposkopi

Kolposkopinin kelime anlamı vagina içine bakmaktır (colpo ve scope). Kolposkop, Hans Hinselman ve ark.'ları tarafından ilk kez 1925 yılında icat edilmiştir. Coppelsan, Kolstad, Stahl, Townsed ve Burghardt gibi araştırmacılar 1960'ların sonu ve 1970'lerin başlarında kolposkopi ile ilgili terminoloji ve nomenklatürü genişleterek değiştirmişlerdir. Bu gelişimi takiben servikal lezyonların tanı ve izlenmesinde kolposkopi, giderek daha sık kullanılır olmuştur^{11, 29, 122}.

Servikal kolposkopinin amacı, transformasyon zonunda, serviks üzerinde ya da servikal kanalda bulunan lezyonların tanımlanması, prekanseröz serviks lezyonlarının varlığının araştırılması ve anormal PAP smear testi sonucunda biyopsi yapılacak alanların tesbit edilmesidir. Transformasyon zonu skuamöz hücreli kanserlerin bu noktada gelişmeye başlamasından dolayı incelenmesi önemlidir. Kolposkop, parlak ışıkta, serviksin 6–40 kez büyütülerek direkt incelenmesini sağlayan stereoskopik bir mikroskoptur ^{11, 29, 122}. Kolposkopi uygulanmadan önce servikse %3-5'lik asetik asit uygulanarak, hücrelerin sitoplâzmasında dehidratasyona neden olur. Benign metaplastik veya malign epitelyum gibi daha fazla nükleer yoğunluğu olan bölgeler, ışığı alttaki stromaya geçirmek yerine daha fazla yansıtarak, pembe veya kırmızı yerine beyaz (aseto-beyaz) olarak görünür. Nükleer dansitenin arttığı, yüksek dereceli CIN lezyonlarında epitel, diğer lezyonlarda görüldüğünden daha opak olarak gözlenir. Aynı zamanda atipik damarlanmalar nedeniyle vasküler değişiklikler olduğundan, kolposkopide atipik damarlanmalar, noktalanmalar veya mozaik bir görünüm oluşabilir ¹²². Sitoloji ve kolposkopi birbirini tamamlayıcı yöntemlerdir. Kolposkopi ise pozitif sitolojik bulguların değerlendirilmesinde kullanılır. Şüpheli alanlardan biyopsi yapılır. Sonuç olarak sitolojik, kolposkopik ve histolojik verilerin birlikte incelenmesiyle hastaya en doğru yaklaşım yapılmış olur. Kolposkopik muayenede HPV ile ilişkili olmayan lezyonlarda incelenebilir ^{67, 122}.

2.7.3. PAP Smear Testi

Dökülen normal hücreler ve hastalık nedeniyle sitolojik olarak değişmiş hücrelerin incelenmesine dayanan bir testtir. Gecikmiş maturasyon nükleer atipi, parakeratozis, hiperkeratozisin yanı sıra yüksek dereceli sitolojik değişiklikleri yansıtması açısından invaziv serviks kanserlerinde tanı koydurucudur (Resim1-2) ^{29, 47, 122}. Bu sitopatik etki sonucu, sitoplazmada vakuolizasyon ve nükleer düzensizlik, irregüler kromatin kümeleri ve hiperkromazi ile kendini gösteren “koilositoz” HPV enfeksiyonları için tanımlanan bir mikroskobik görünümdür.



(29) Resim1. Koilositoz hücre görünümü (29) Resim 2. Normal hücre görünümü

Serviks uterusun diagnostik sitolojisi bugün en iyi bilinen sitolojik yöntem olarak, tüm dünyada yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. İlk defa 1942 yılında Papanicolaou vaginal smearden servikal kanseri teşhis etmede yararlanılabileceğini göstermiştir⁶⁷. Papanikolau testi 1950'den beri servikal kanser insidansını %79, mortaliteyi %70 oranında azaltmıştır^{7, 29, 67}.

Sitolojik yöntem, hızlı ve kolay tanıma olanağı sağlar, dokuya zarar vermez ve sık olarak hücre örneği alabilme açısından elverişlidir⁴⁷. Sitoloji, sadece tarama testi olup, mevcut hastalığın en son kanıtı değil, sadece diğer tekniklerle birlikte (kolposkopi ve histoloji) irdelenmesi gereken bir tanı yöntemidir⁶⁷.

Buna göre konvansiyonel sitoloji tekniklerinin servikal kanser prekürsör lezyonları saptamadaki sensitivitesi %11-61.3'dir. PAP smear testindeki yanlış negatiflik oranı %20 olarak oldukça yüksek olduğu için üç test sonrasında ancak sensitivite yükseltilebilir. Bu nedenle negatif sonuçlar en az 3 yıl süreyle yıllık olarak tekrarlanmalıdır. Yanlış negatif sonuçlar örnekleme, preparat hazırlama ve yorumlama aşamasında olur^{16, 29, 37, 38, 47, 54, 67, 81, 90, 91, 100, 122}. Son zamanlarda American College of Obstetricians and Gynecologists tarafından yayınlanan bültende, 30 yaş ve üstü olan kadınlarda HPV DNA testi ve servikal sitolojik muayanesi negatif olan kadınların servikal malignansinin değerlendirilmesi için üç yıllık bir aralığın yeterli olduğunu, üç yıldan daha kısa bir aralığa gerek olmadığını bildirmişlerdir. Ancak yaklaşık olarak yıllık tarama programlarından geçmiş HPV DNA testi pozitif ancak servikal sitolojik muayanesi negatif olan kadınların %15'i beş yıl içinde anormal PAP smear testi ile karşımıza gelmektedir⁹⁰.

Seksüel aktif 30 yaş altı kadınlarda 30 yaş ve üstü kadınlara göre daha sık geçici enfeksiyonla karşılaştıkları için servikal kanser ve öncül lezyonların tespiti açısından 30 yaş ve üstü kadınların taranması daha anlamlıdır⁷⁹.

Yapılan araştırmalara göre, HPV enfeksiyonları genellikle kendiliginden gerilemektedir. Yinede PAP smear testinde atipik skuamöz intraepitelyal lezyonlar (ASCUS) tespit edilen ve yüksek riskli HPV DNA testi pozitif olan bütün kadınlar biran önce kolposkopi yapılmalıdır çünkü bu grubun %10-15'inde HSIL gelişmiştir. Bu görüşe rağmen diğer araştırmacılara göre ise HPV DNA testi servikal tarama programlarının hassasiyetini artırmakta olup, anormal PAP smear testi sonucu tespit edilen kadına HPV DNA testi yapılmalıdır. ASCUS tespit edilen bir kadında yüksek riskli HPV tipleri için HPV DNA testi yapılarak kolposkopinin gerekli olup olmadığına karar verilir eğer HPV DNA testi negatif ise kolposkopi takip için yılda bir kez yapılır. Sonuç olarak, ASCUS tespit edildiği zaman HPV testi, yüksek dereceli displazinin tespitinde, tek başına tekrar tekrar yapılan PAP smear testlerinden daha sensitiv olup, böylece gereksiz kolposkopi uygulamalarını azaltmaktadır⁹⁰.

Human papillomavirus enfeksiyonların bir kısmı sadece moleküler yöntemlerle teşhis edilmesine rağmen LSIL, CIN I, koiklositik atipi içeren lezyonlar ve flat kondilom gibi HPV enfeksiyonları sitopatolojik muayane ile tespit edilebilir. Genellikle HPV etkeninin neden olduğu kutanöz siğillerdeki gibi moleküler ve patolojik değişiklikler zamanla geriler¹³.

Koutsy'a göre moleküler teknikler her ne kadar gelişmiş olsalar dahi sitolojik muayeneden tamamen vazgeçilmemelidir. Örneğin nereden alınacağı ve HPV ile neoplazinin ilişkisini derecesinin araştırılması açısından kolposkopi ve el büyüteci gibi sitolojik inceleme yöntemlerinin yeri doldurulamaz⁷⁶.

Tüm hastalarda rutin tarama yapılması uygun değildir. Servikal veya vulva neoplazisi olan kadınların hekime her muayeneye gittiklerinde PAP smear test yapılması rutin takibin önemli bir parçasıdır. Bu artmış kanser riski hastaların ömürleri boyunca mevcuttur. ABD'de standart uygulamada 3-5 yılda bir yapılan PAP smear testi esasına dayanan tarama programları mevcuttur¹¹.

Amerika Kolposkopi ve Servikal Patoloji Derneği, 2001 yılında anormal servikal sitoloji değerlendirmesine rehber oluşturmak için yapılan çalışma ile elde edilen bilgiler değerlendirilerek Bethesda 3 terminolojisi kullanıldı. ASCUS'lu kadınlar 1) 2 kere PAP smear testi tekrarı ve anomali görüldüğü takdirde kolposkopiye refere edilmeyi içeren bir program 2) acil kolposkopi 3) yüksek riskli HPV tiplendirmesi için değerlendirilmelidir. Sıvı bazlı sitoloji kullanıldığında, HPV DNA tespiti için test yapılması tercih edilen yöntemdir. Pozitif olan kadınlarda kolposkopi uygulanmalı ve negatif olanlar yıllık olarak sitolojiye devam etmelidir¹¹.

Cuzick ve ark.1995'te yaptığı derlemede HPV serotipleri 16, 18, 31 ve 33 tespiti için PCR ve PAP smear testi ile 2009 kadını değerlendirmişler. Yüksek riskli HPV DNA tespitinin PCR yöntemiyle (%75) PAP smear testine (%40) göre daha sensitiv olduğunu belirtmişlerdir. Her iki yöntem kombine edildiğinde ise duyarlılığın %96'ya çıktığını ve bu nedenle iki testin birlikte kullanımının servikal tarama programının esasını teşkil etmesi gerektiği vurgulanmaktadır. Human papillomavirus DNA testi öncelikle yapılması takiben kolposkopi ve sitolojiyi içeren yeni bir yaklaşım geliştirmişler³⁷.

Servikal sitolojik değerlendirmede ikinci bir yeni teknoloji olan AutoPap Tarama Sistemi (1995), FDA (Gıda ve İlaç Yönetimi) tarafından primer tarama olarak kabul edilmiş ve daha önce normal olarak değerlendirilmiş örneklerin yeniden taranması için onaylanmıştır. Bu teknikte, özel bir dijital kameraya bağlı otomatik bir mikroskop kullanılır. Sistem, lamaları tarar ve lamdaki her görüntü alanını analiz etmek için kompüterize görüntüleme tekniği kullanır. Bilgisayar algoritmaları daha sonra her lamı bir anomali içermeye olasılığına göre değerlendirmek üzere kullanır.

Seçilen lamalar daha sonra bir sitoteknolog veya sitopatolog tarafından kontrol edilir. Henüz yaygın kullanıma girmemiştir^{67, 29, 122}.

Yapılan bazı çalışmalarda, tarama programlarına daha çok katılımı sağlayabilmek için, hekim odaklı tarama programlarına bir alternatif olarak, hastanın kendi kendine servikal örnek toplayabileceği bir yöntem geliştirmişler ve servikal örnekleme testinin uygulanmasıyla servikal kanser prevalansında önemli bir düşüş sağlanacağını bildirilmişlerdir^{55, 79, 128}.

Richart ve Barron isimli araştırmacılar tarafından 1968 yılında displazi sınıflaması modifiye edilerek, invaziv karsinom ile ilişkili lezyonların hepsi “Servikal İntraepitelyal Neoplazi” (CIN) olarak tek ortak kategoriye alındı. CIN hafif displazi olarak klasifiye edilen iyi diferansiye bir neoplaziden başlayıp, invaziv karsinomla sonlanan intraepitelyal değişikliklerin bir spektrumudur. WHO, displaziyi “epitelin kalınlığının değişen oranlarında atipi gösteren hücrelerle yer değiştirdiği bir lezyon” olarak tanımlar^{29, 67}.

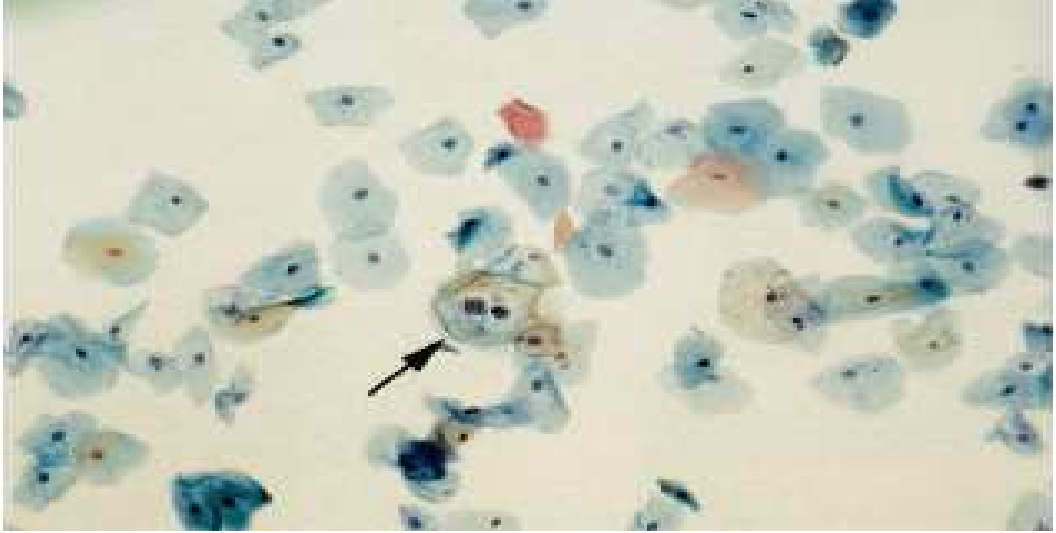
Papanikolau testinin servikal sitolojideki anormallikleri tanımlamasından bu yana klasifikasyon sisteminde pek çok değişiklikler yapılmıştır. Klinisyen ile sitoloğun anlaşmasında ve histolojik terminoloji ile uyum sağlamada Papanicolaou ve CIN sınıflamasının yetersiz kalmaya başladığı farkedildikten sonra geliştirilen bir diğer sistemde Bethesda Sistemidir. 12-13 Aralık 1988’de ABD’de Bethesda’da National Cancer Institute’nün önderliği altında bir komite toplanarak yeni ve deskriptif bir rapor sistemi hazırlanmıştır. 1991 yılında Bethesda II sistemi olarak yeniden düzenlenmiştir^{47, 54, 91, 122}. Bu sınıflama 2001 yılında değiştirilerek Bethesda 3 sistemi geliştirilmiştir ve bu sisteme göre premalign skuamöz lezyonlar 3 kategoriye ayrılır: atipik skuamöz hücreler (ASC), düşük dereceli skuamöz intraepitelyal lezyonlar (LSIL) ve yüksek dereceli skuamöz intraepitelyal lezyonlar (HSIL), (Tablo 3)^{29, 46, 67, 122}.

(46) Tablo 3. Sitolojik klasifikasyon sistemlerinin karşılaştırması

Bethesda Sistem	Dispazi / CIN Sistemi	Papanikolau
Normal limitler içerisinde	Normal	Class I
Enfeksiyon (organizma tespit edilmeli)	İnflamatuvar atipi	Class II
Reaktif ve reperatif değişiklikler Skvamöz hücre anormallikleri Atipik skuamöz hücreler 1) önemi belirsiz (ASC-US) 2) yüksek dereceli lezyonların ekarte edilmesi gereken grup (ASC-H)	Skvamöz atipi	Class II
Düşük dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon (LSIL)	HPV atipisi Hafif displazi (CIN I)	Class III
Yüksek dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon (HSIL)	Orta derecede dispazi (CIN II)	Class IV
Skvamöz hücreli karsinom	Skvamöz hücre'li karsinom	Class V

2.7.4. Histolojik Tanı

Kesin tanı için gerekli olan, tarama ve muayene sonucu şüpheli bölgeden konizasyon, LEEP (Loop Electrosurgical Excision Procedure), endoservikal küretaj, LETZ (Large Loop Excision of the Transformation Zone), punc biyopsi yöntemleriyle alınan doku örneğinin patolojik olarak incelenmesi esasına dayanan bir yöntemdir. Histolojik bulgular klinik tipi ile yakından ilişkili olup, HPV tipi hakkında kesin bir bilgi vermez. Koilositoz HPV infeksiyonlarının tipik histopatolojik bulgusudur. Ayrıca lezyonun yerleşimi ve klinik tipe bağlı olarak histopatolojide çeşitli derecelerde papillomatoz, akantoz, hiperkeratoz, parakeratoz, bazal hücre hiperplazisi ve nükleer atipi de görülebilir (Resim 3) ²⁹.

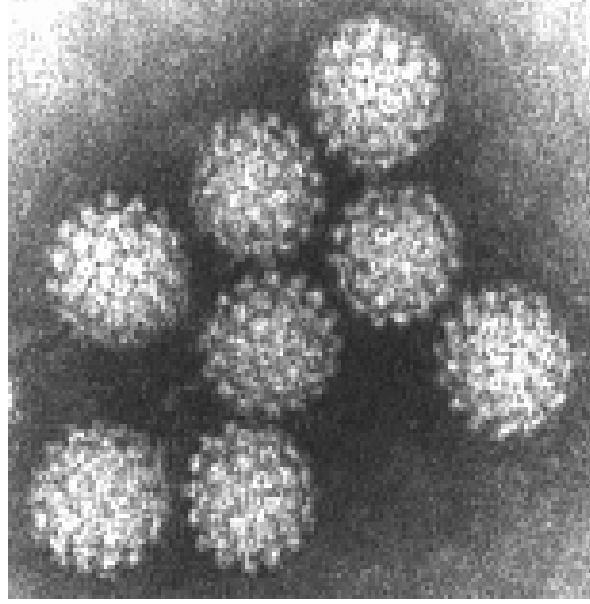


(29) Resim 3. Sitolojik olarak değişmiş hücrelerin görünümü

2.7.5. Mikrobiyolojik Tanı

2.7.5.1. Elektron Mikroskopisi: Bu yöntemle enfekte keratinositler içindeki virionlar, nükleus içinde dizilmiş 55 nm çaplı kristalize partiküller şeklinde saptanabilir.

Ancak sensitivitesinin düşük olması, ekonomik olmayışı ve lezyonun tamamen taranması pratik olmadığından kullanımı yaygın değildir (Resim 4) ⁴².



(42) Resim 4. HPV partikülünün elektron mikroskobu görüntüsü

2.7.5.2. İmmunoflorasan Yöntem: Biyopsi örneklerinde HPV'nin major kapsid proteininde (L1) bulunan epitoplara karşı oluşmuş olan poliklonal antikorlar kullanılır. Spesifitesi yüksek (%30-50) olmasına karşın, prekanseröz ve kanseröz lezyonlarda L1 ve L2 tespit edilemediğinden duyarlı olduğu söylenemez^{5, 51, 95}.

2.7.5.3. HPV DNA Tayini: Virus DNA'sının saptanması temeline dayanan bir yöntem olup yüksek riskli HPV varlığını saptamada ve CIN II-CIN III tanısı koymada sitolojik tanı yöntemlerinden daha duyarlı olduğu kabul edilmektedir^{29, 81, 122}. Hibridizasyon yöntemleri ve nükleik asit amplifikasyon tekniklerini ile gerçekleştirilir. Sensivitesi, klasik yöntemlere göre daha yüksek olup, seçilen yönteme ve çalışılan örneğe göre değişebilir. Biyopsi örneklerinde, sürüntü örneklerine göre daha yüksek oranda pozitiflik bulunmuştur^{8, 21, 29, 37, 123, 136, 139, 144}.

Sitolojik tanı yöntemlerine göre ucuz olması, daha basit bir prosedür olup, daha az teknik beceri gerektirmesi HPV DNA testinin kullanımı yaygınlaşmıştır²³. FDA (American Food and Drug Administration) 30 yaş üstü kadınlarda yapılan kanser taramalarında HPV DNA testinin PAP smear testi ile birlikte kullanımını onaylamıştır^{10, 90}. Kısa dönemli HPV DNA tespitinde ardışık testlerde HPV DNA tespitinde dalgalanmalar görülebilir ve HPV enfeksiyonu pek çok vakada asemptomatik olup CIN gelişiminde en önemli etkidir¹³⁹. Tarama testlerinde anormal sitoloji tespit edilen hastaların mutlaka HPV DNA testi ve genotiplenmesi yapılarak hastalığın kesin tanısı, tedavisi ve prognozu hakkında yol göstermektedir.

Bu yaklaşımla hastalara gereksiz invaziv girişimler önlenmekte ve ülke ekonomisine önemli bir katkı sağlanmış olmaktadır^{67, 73}. HPV DNA testleri teknik özelliklerindeki farklılıklar nedeni ile “Non-amplifiye DNA testleri” ve “Amplifiye DNA testleri” olarak iki gruba ayrılır.

2.7.5.3.1. Non-Amplifiye DNA Testleri: Southern blot, Dot blot, In-situ hibridizasyon gibi bazı DNA testleri amplifikasyon teknikleri içermeyerek, hibridizasyon esasına göre çalışır ki bu tekniğe “amplifikasyonsuz DNA testleri” denir. Bu teknikler özellikle gelişmekte olan ülkelerde, geniş kitlesel tarama programlarında kullanılmakta olup, oldukça zaman alıcı, sensitivitesi düşük, özel donanım ve beceri gerektiren metotlardır.

2.7.5.3.1.1. Southern Blot Hibridizasyon: Non-amplifiye DNA testlerinden biridir. Southern blot, Edward M. Southern isimli araştırmacı tarafından, Edinburgh Üniversitesinde 1970’de geliştirilmiş bir yöntemdir. Human papillomavirus DNA tiplendirilmesinde altın standart olarak kabul edilir. Genellikle yeni viral tiplerin sınıflandırılmasında kullanılmaktadır. En önemli dezavantajı zaman alıcı ve karmaşık bir işlem sürecine sahip olmasından ve teknik beceri gerektirmesinden kaynaklanmaktadır⁸¹. Southern blot tekniği temelde DNA’nın agaroz jelde yürütülüp radyoaktif işaretli problarla hibridizasyonuna dayanmaktadır. Doku örneklerinden veya eksfoliy hücrelerden HPV DNA’sı izole edilir. İzole edilen DNA’yi spesifik nükleotid sıralarından kesen bakteriyel bir enzim olan restriksiyon endonükleaz enzimleriyle kesilerek farklı uzunluklarda DNA parçaları oluşur. Agaroz jel üzerinde bulunan DNA parçaları bazik bir solüsyon içinde bekletilerek denatüre olmaları sağlanır. Böylece DNA parçaları tek zincirli hale geçerler. Bundan sonra tek zincirli DNA’lara Southern blot uygulanabilir. DNA parçaları agaroz jel elektroforezinde yürütülmesiyle parçaların moleküler büyüklüklerine göre birbirinden ayrılması sağlanır. Agaroz jel bir elek işlevi görür ve parçaların büyüklüklerine göre hareket olanağı sağlar. Küçük olan parçalar daha önde giderken büyük parçalar daha yavaş hareket eder ve orjine daha yakın bulunurlar. DNA’da komplementeri bulunan yaklaşık 2 kb büyüklüğündeki problar radyoaktif madde (örneğin radyoaktif S³⁵ içinde bekletilerek) ile işaretlenir. Ethidium bromür ile jel boyanır. Görülebilir hale gelen bantlar, farklı HPV tiplerini vermek için DNA restriksiyon endonükleazlarla kesilir. En sık kullanılan endonükleaz enzimi PST I, HPV 16’yı bant büyüklükleri 200–2800 bp’e kadar değişen 6 kez keserken, HPV 6’yı ise 960–3800 bp’e kadar değişen büyüklüklerde 4 banda ayırır. Jelde ayrılma gerçekleştikten sonra DNA bir filtreye aktarılır. En son olarak yıkanmış naylon membran ışık geçirmeyen bir kaptaki X ışını film tabakasının üzerine yerleştirilir. Işıma yapan bölgeler radyoaktif proba hibridizasyon yapmış hedef bölgelerdir. Southern blot hibridizasyon HPV DNA’sının hücrelerdeki fiziksel durumunun (entegre veya epizomal olup olmadığının) değerlendirilmesine olanak sağlar^{81, 92, 107}.

2.7.5.3.1.2. Dot/Slot Blot: Kullanımı kolay ve ucuz olan bu yöntem sadeleştirilmiş fakat daha az spesifik bir Southern blot yöntemidir. Bazı viruslarla çapraz reaksiyona girerek ayırtedememe, yalancı negatiflik başlıca olumsuzluklarındandır⁷⁰.

Southern blot'tan farklı olarak elektroforez aşamasını içermediğinden DNA'yı büyüklüğüne göre ayırt edemez ve bu nedenle Southern blot hibridizasyon gibi subtiplendirme yapamaz^{42,70}.

Ayrıca HPV DNA'sının fiziksel durumu hakkında da bilgi vermez⁹². Non-amplifiye DNA testlerinden biridir⁸¹. Önceleri Digene Corporation tarafından üretilmekte olan 7 problu (Digene diagnostics-Silver spring, MD) kit artık mevcut değildir²³. Şimdi ise yaygın kullanımda, ViraPap ve Viratype (LifeTechnologies Inc., Gaithersburg, MD) olarak iki kit bulunmaktadır⁸¹. Southern blot hibridizasyon ile ViraPap'ın spesifitesi karşılaştırıldığında; sırasıyla %95,2 ve %96,3 olarak bulunmuştur³⁶.

Yeni kitte düşük riskli olan HPV 6 ve 11'e 42, 43, 44; orta ve yüksek riskli olan HPV 16, 18, 31, 33, 35'e ise 45, 51, 52, 56 eklenmiştir. Fakat bu kitte problemler radyoaktif işaretli değildir²³. Fenol kloroform ile izole edilen DNA daha sonra denatüre edilir. Kuru nitroselüloz membrandan geçirilirken filtreden slot (yarık) veya dot (leke) şeklinde geçerek, işaretli prob ile hibridize edilir.

Viral DNA'nın belirlenme ihtimali çalışılan örnekteki DNA miktarına bağlı olduğundan fazla miktarda DNA ile çalışılmalıdır⁹². Çalışılan yöntemlere bağlı olarak HPV DNA prevalansı da farklılıklar gösterebilmektedir. Bir çalışmada rutin jinekolojik muayene için başvuran 122 kadında, Dot blot hibridizasyon yöntemi ile %40 oranında pozitiflik saptanırken, NISH ile %90 oranında pozitiflik saptanmışken, spesivite göstergesi olarak hücre başına düşen viral kopya sayısı Dot blot'ta 50.000 iken NISH ile bu 5-12 kopyadır¹³¹.

2.7.5.3.1.3. In-Situ Hibridizasyon: Diğer hibridizasyon tekniklerinin aksine DNA dokudan izole edilmeden, parfine yerleştirilmiş dokularda HPV problemlerinin kullanıldığı bir yöntemdir. Bu yöntem ile dokudaki HPV DNA varlığı ve lokalizasyonu gösterilebilir. Protein belirleme metotlarıyla benzerlik gösterir (immünofloresan, immünoperoksidaz). Human papillomavirus enfeksiyonunda alınan örnekte, entegre viral genomu göstermek için nükleer bölgeyi koyu, epizomal replike olmuş viral genomu göstermek için ise sitoplazmayı homojen koyulukta boyayarak çalışır²¹³.

Sensivitesinin düşük olması nedeniyle rutinde kullanılmamaktadır. Hücre başına 20-50 virus saptayabilir. Klinik açıdan sadece pozitif sonuçlar anlamlı iken, yalancı negatiflik oranında oldukça yüksektir²³.

Non-amplifiye tipler arası çapraz reaksiyon olması nedeniyle türe özgü spesifitesi çok yüksek olmayıp özellikle virus kopya sayısının çok fazla olması spesifiteyi oldukça düşürür. Bu yöntemin en önemli avantajı ise retrospektif (geçmişe dönük) çalışma olanağı sağlamasıdır^{92, 136}. Mikroskop kullanılan bir süreçtir⁸¹. Proteinaz K ile hücre duvarı geçirgenliği artırılır, sellüler DNA alkali ile denatüre edilerek, biotinize veya radyoaktif (genellikle P³²) maddeyle işaretlenmiş proplarla hibridizasyonu sağlanır^{81, 92, 136}. Görünür hale gelen işaretli proplar mikroskopla gözlenir. Kreatech kit, Kreatech Biotechnology B.V. (Amsterdam, The Netherlands)'nın geliştirdiği ve HPV tip 1, 2, 6, 11, 16, 18, 31, 33'nin tespiti için kullanılan HPV proplarını içeren bir kittir⁸¹.

In-Situ Hibridizasyon (ISH) yöntemi; HPV DNA tespit yöntemlerinden direkt prob metodu esasıyla çalışır. Bazı çalışmalar PCR'dan daha az sensiviteye sahip olduğunu göstermiştir²⁴.

2.7.5.3.2. Amplifiye DNA Testleri: Bu testler amplifikasyon esasına dayalı olup, içerdikleri amplifikasyon çeşidi açısından üç kategoriye ayrılır; (1) Amplifikasyon sırasında hedef gen bölgesini tanıyan işaretli proplar ile hedefle hibridizasyon sonrası sinyalin güçlendiği *sinyal amplifikasyon* yöntemi olup, Hibrit yakalama ve bDNA metodu bu yöntemlere örnek teşkil eder. (2) DNA/RNA üzerinde spesifik gen bölgelerinin hedef alındığı *hedef (target) amplifikasyon*, DNA analiz tekniklerinden en esnek ve en hassas olan yöntemdir; PCR da buna bir örnektir (3). Hedef ile hibridize olan problemlerin çoğaltıldığı *prob amplifikasyon* yöntemi; LCR (ligase chain reaction) bu esasa dayanan bir metottur^{62, 81}.

2.7.5.3.2.1. Hibrid Yakalama (Hybrid Capture): Sık kullanılan, ekonomik amplifiye DNA testlerinden, sinyal amplifikasyon esasına dayanan bir yöntemdir. Digene Corporation tarafından geliştirilmiş ilk nesil ürün olan Hibrit Capture Tube (HCT)'un yanı sıra yakın zamanlarda ise yeni nesil Hibrit Capture II (HC II) üretmiştir. Her ikisi de özellikle yüksek riskli (16, 18, 31, 33, 35, 45, 51, 52 ve 56) HPV tiplerinin tespitinde kullanılmaktadır^{62, 81, 136}. HCT 1995'te, HC II ise 1999'da FDA tarafından onaylanmıştır. HC II'ya yüksek riskliler kategorisine HPV 39, 58, 59 ve 68'de eklenmiştir. HC II, radyoaktif olmayan, tüp yerine 96 kuyucuklu mikropate kullanılan HCT'e göre daha 10 kat (5 saat), hızlı kullanışlı bir metottur⁴⁰.

HC II'nin tespit seviyesi, örnek başına 5.000 viral kopya veya 1 pg HPV-DNA/ml iken, HCT ise örnek başına 50.000 viral kopya, 10 pg HPV-DNA/ml'dir⁸¹. DNA hedef dizinlerini tanıyan RNA propları kullanılır. Hibridizasyon katı bir yüzeyde RNA/DNA heterodubleks için çok spesifik ve sensivitesi yüksek olup, bir monoklonal antikorun bağlandığı kuyu veya tüplerde gerçekleşmektedir. Monoklonal antikor mikrotitre kuyucuğa bağlanarak katı yüzeyde hibridizasyonu gerçekleşmiş problemleri yakalar.

Yıkama hibridizasyonu gerçekleşmeyen problemleri ortamdaki uzaklaştırır. Sonra, hedef hibridler alkalen fosfatazla reaksiyona girerek ortama eklenen substratla birlikte renkli ürünler oluşturur¹³⁶. Luminometrede okunan bu sinyal, HPV DNA varlığını veya yokluğunu gösterir. Eğer HPV DNA'sı varsa tiplendirme yapmadan yüksek riskli veya düşük riskli HPV grupları şeklinde tanımlanır. HCT'in sensitivitesi oldukça yüksek olmasına karşın spesifik değildir²³. Bazı çalışmalar HC II'nin 30–35 yaş ve üstü kadınlarda yüksek riskli displazinin tespitinde %80–90 başarı göstererek PAP smear testine iyi bir alternatif olmasına karşın çalışmalara göre sensitivitesi %57–89 arasında değişmektedir⁸¹. Sensitivitesinin düşük olmasından dolayı PAP smear testiyle birlikte kullanıldığında teşhis şansı %95-100'e kadar yükseltilebilir^{40, 62, 107}. Human papillomavirus DNA testleri ile PAP smear testin eksik yönleri göz önüne alınarak tarama programlarında bu iki testin kombinasyonu ile yeniden bir tarama programı tasarlanmalıdır⁸¹.

2.7.5.3.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR/PCR): Kary Mullis ve ark.'ları tarafından 1980'lerin ortalarında geliştirilmiş ve isimlendirilmiş olsada temelleri daha öncelere (Khorana 1971–1974) dayanan bir metottür. Hedef (target) amplifikasyon yöntemlerinden olup, kolay, otomatize ve tip ayırımında oldukça iyidir. Nükleik asitlerin in-vitro koşullarda replikasyonu için geliştirilmiş çok yaygın olarak kullanılan bir test tüp sistemidir. Hedef DNA/RNA'ın selektif olarak amplifikasyonuna izin verir. In-vivo koşullarda hücre çoğalması sırasında gerçekleşen DNA replikasyonunun bir tüp sisteminde gerçekleştirilmesi sağlanır fakat farklı olarak sadece belirli gen bölgelerinin replike olması sağlanır.

PCR'da öncelikle çeşitli yöntemlerle DNA elde edilir. Sonra DNA'nın iki zincirinin yüksek ısı ile birbirinden ayrılmasını (denatürasyon); daha sonra sentetik oligonükleotidlerin hedef DNA'ya bağlanmasını (amplifikasyon); sonra zincirin uzamasını (polimerizasyonu) (çift iplikçikli DNA'ların sentezi) ve bu siklusların belirli sayıda tekrarlanmasına dayanır. Bu üç adım (denatürasyon / primer bağlanması / DNA sentezi) bir PCR siklusunu oluşturur. Her adım farklı ısılarla gerçekleştirilir (Sırasıyla Denatürasyon 92°C–95°C 30-60 sn; Amplifikasyon 45°C–65°C 30-60 sn; Extension (uzatma) 72 °C 30-90 sn).

Bu teknikte; bir DNA hedefini 10^6 – 10^{12} arasında çoğaltmak mümkündür. Yöntemin temeli, çoğaltılmak istenen bölgenin iki ucuna özgü, bu bölgedeki baz dizilerine tamamlayıcı bir çift sentetik oligonükleotid primer (18–25 olup genellikle 30 baz uzunluğunda) kullanılarak; bu iki primer ile sınırlandırılan genin enzimatik olarak sentezlenmesine dayanır. Alınan örnek, seçilen bölge, primerler ve polimeraz enzimleri testin başarısını etkileyen en önemli faktörlerdir. Taze doku ve hücrelerden izole edilen DNA ile çalışılabilir. PCR'ın en önemli avantajı yüksek sensitivitesinin yanı sıra oldukça esnek bir yöntemdir, bir HPV tipini veya tüm HPV tiplerinin tespiti

için özel olarak düzenleme yapılabilir. Klasik yöntemlerde sensivite ve spesivite açısından en uygun olan L1 bölgesinden seçilmiş primerler ile çalışılır. Karlsen ve ark.'larının yaptığı bir çalışmada, HPV L1 geninin PCR amplifikasyonunun pozitif sonuçlanabilmesi için viral kopya sayısının 6000'den fazla olması gerektiğini bildirmişlerdir. Çapraz kontaminasyondan kaynaklı yanlış pozitif oranı oldukça yüksek olduğu gibi, işlem sırasında DNA veya RNA'nın ortamdaki uzaklaştırılması, yanlış primer kullanımı gibi sebeplerden yalancı negatiflik verebilir. PCR yöntemi geliştirilerek yeni alt tipleri ortaya çıkmaktadır, Real Time PCR bu yeni metotlardan biridir^{40, 62, 80, 81, 92, 136}.

2.7.5.3.2.2.1. Real Time PCR (Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu):

Klasik PCR yöntemleriyle karşılaştırıldığında daha güvenilir, geniş bir uygulama alanı, yüksek sensivite, yüksek spesivite ve doğru kuantifikasyon imkânı sunar. Real Time PCR, bizi klasik PCR sonrası yapılması zorunlu diğer değerlendirme çalışmalarından kurtardığı (jel elektroforez) gibi, inhibitörlerin varlığından ve kontaminasyon riskinden kaynaklı yalancı pozitiflik gibi olumsuzluklardan kurtularak güvenilirliği yüksek bir yöntem olarak karşımıza çıkmıştır^{42, 62, 80}.

Viral DNA'nın çoğaltılması ve görüntülenmesi kapalı bir sistemde gerçekleştiği için kontaminasyon ihtimali çok düşüktür^{42, 80}.

Real Time PCR TaqMan, FRET (Floresan Rezonans Enerji Transferi) ve Moleküler Beacon sistemlerinden oluşur. Sistemlerin temelini, floresan içeren problemlerin bağlanmasına bağlı gerçekleşen ışınımın tespiti ve miktarının belirlenmesi (bilgisayar ekranında görüntülenme) oluşturur. Sinyal artışı PCR ürün artışıyla direkt orantılıdır. Her bir PCR döngüsündeki floresan ışınımının kaydedilmesi ile başlangıçtan itibaren ürün artışında hangi noktaya ulaşıldığı, eş zamanlı (real time) izlenebilir. Nükleik asit hedef molekülünün çok sayıdaki kopyasının oluşturulabildiği andan itibaren artan miktarda ışınım gözlenir. Real Time PCR oldukça kısa sürede kantitatif sonuç verdiği gibi, kapalı bir sistem içerisinde çalışılarak tüpler açılmadan sonuç değerlendirilmesi yapıldığından kontaminasyonu engelleyerek güvenilirliği yüksek etkin bir metottur. Ölçülebilir ışınım 3-15 döngüde oluşur. Real Time PCR'ın sensivitesinin en az Southern blot metodu kadar olduğu bildirilmiştir. Oldukça sık kullanılan ve pek çok HPV tipi için spesifik olduğu düşünülen primer dizileri MY09/11 şeklinde olup, farklı primerlerle çalışılabilir. Önemli artış işaret eden eşik değer kullanıcı tarafından ayarlanabilir. Real Time PCR yönteminde MY09/11 primerleri kullanıldığı zaman yüksek dereceli ve karsinomların en sık etkeni olan HPV 16'nın varlığını erime eğrisindeki farkla tespit etmesi önemli bir avantajdır. Şüpheli olgularda aynı anda HPV tip 16'nın ve diğer HPV tiplerinin tayinine olanak sağlayarak maliyeti de oldukça düşüren bir yöntemdir^{62, 80, 81}.

2.8.HPV'nin Tedavisi

Günümüzde HPV tedavisi, direkt virüsün ortadan kaldırılması esasına dayalı olmayıp, hastalığın eradikasyonuna yönelik olmasına karşın tamamen HPV enfeksiyonlarını eradike eden bir tedavi yöntemi mevcut değildir. Klinik olarak belirgin lezyonların ortadan kaldırılmasının cinsel yolla bulaşmayı ve kanser riskini azalttığı kabul edilmekte olmasına karşın her iki riski de tamamen ortadan kaldırmamaktadır^{29, 47}. Cerrahi eksizyon lazer vaporizasyon, topikal kemoterapi ve kimyasal destruksiyon yöntemleri virüsü tamamen ortadan kaldırmadığından tedavi sonrası rekürrens yüksek seviyededir¹¹⁵.

Kondilomlar sıklıkla persistant ve rekürrens olup özellikle de genital kondilomlardaki rekürrenslerin bütün tedavi yöntemlerinde yüksek olması, (aslında bunların rekürrens mi, yoksa reenfeksiyon mu olduğunu çok açık değildir) sürekli yeni tedavi modellerinin geliştirilmesini gündeme getirmektedir. Bu nedenle hasta düzensiz cinsel aktivite veya sigara içme gibi olumsuzluklar sonrası siğil rekürrensiyle karşılaşabileceği konusunda bilgilendirilmelidir. External genital kondilomların tedavisinde özellikle düz kondilomlarda kriyoterapi tedavi yöntemi olarak kabul edilebilir^{29, 47, 78, 93}. Kriyoterapi, ucuz olması ve iyi klinik cevap nedeniyle küçük ekzofitik kondilomların tedavisinde kullanılır¹¹⁵.

Dıştan, Salisilik asit, 5-FU, Podophyline uygulamaları ise hastaların evde kendilerinin tatbik edebilecekleri yöntemler olması kullanımını yaygınlaştırmıştır. İnterferon antiviral, antiproliferatif ve immun cevabı düzenleyici etkileri bulunan bir molekül olup bir çalışmada genital ve perianal verrukalarda güvenli ve etkili bir tedavi seçeneği olduğu kanıtlanmıştır. İnterferonların nasıl etki ettiği henüz açık değildir^{78, 93}.

Friedman ve ark.'larının yaptığı bir çalışmada 86 HPV (+) hastaya interfereon tedavisi uygulanmış 18 ay takip edildikten sonra %25'inde HPV DNA (+) bulunmuş. İnterferon topikal, lezyon içi veya sistemik olarak uygulanır. Sistemik interferon subklinik HPV enfeksiyonlarında üstün olsada yan etkileri fazladır^{29, 78}. Yapılan bazı araştırmalara göre özellikle yeni immünomodülatör tedaviler ve aşılama genital siğillerin tedavisinde gelecekte oldukça ümit veren yaklaşımlardır^{29, 47, 115}.

Kimyasal ablasyon, fiziksel ablasyon, cerrahi yöntemler, lokal kemoterapi, immunoterapi ve gelişmekte olan tedavi yöntemleri gibi birçok tedavi seçeneği vardır. Tedavi metodunun seçiminde hastanın yaşı, hastalık süresi, klinik tablonun yaygınlığı, hastanın immun sisteminin durumu, hasta uyumu gibi kriterler göz önüne alınarak yapılır (Tablo 4)^{47, 78, 93, 115}.

(115) Tablo 4. HPV enfeksiyonlarında tedavi seçenekleri

Kimyasal ablasyona dayalı yöntemler <ul style="list-style-type: none">· Diklorasetik asit· Formaldehit· Gluteraldehit· Kantaridin· Laktik asit· Monoklorasetik asit· Salisilik asit· Triklorasetik asit (TCA)	Lokal kemoterapi yöntemleri <ul style="list-style-type: none">· 5-Florourasil· Bleomisin· Podofilin· Podofilotoksin· Retinoik asit
Fiziksel ablasyon yöntemleri <ul style="list-style-type: none">· Elektrodesikasyon· Kriyoterapi· Lazer	İmmünoterapi Yöntemleri <ul style="list-style-type: none">· Dinitroklorobenzen (DNCB)· Difenilsiklopropenon (DPCP)· Skuarik asit dibütül ester (SADBE)· Imikuimod (Aldora)
Cerrahi yöntemler <ul style="list-style-type: none">· Küretaj· CO2 laser· Cerrahi eksizyon,· Loop elektro eksizyon	Geliştirme aşamasındaki yöntemler <ul style="list-style-type: none">· Fotodinamik tedavi· İmmünizasyon

2.9. HPV'den Korunma ve Aşı Çalışmaları

Human papillomavirus, cinsel yolla bulaşan en yaygın hastalık nedenlerinden biridir^{9, 29, 37, 57, 67, 74, 81, 106, 114, 115, 123}. Cinsel aktif kişilerin yaklaşık %50-85'i hayatlarında en az bir kez HPV'nin bir tipiyle karşılaşır^{9, 32}. Sosyokültürel ve ekonomik düzeyden bağımsız her kadın risk altındadır³². Etkenin HPV tip 16 olduğu enfeksiyonlarda serviks kanseri gelişim riski 434 kat fazla iken, HPV tip 18 için serviks kanser riski 248 kat artmaktadır. Oysa sigara içiciliğilerinde sigara kullanmayanlara göre akciğer kanseri gelişme riski 8 kat büyüktür³⁹.

Serviks kanserlerinde HPV en önemli etken olduğu için, serviks kanserinin gelişiminin önlenmesi HPV enfeksiyonunun erken tanı veya tedavisi anlamına gelir³⁹. Human papillomavirus enfeksiyonu ile serviks kanseri arasında ki pozitif korelasyon ve serviks kanserinin 'önlenebilir' olan çok az kanser türünden biri olması, HPV enfeksiyonlarına karşı aşı çalışmalarının yoğunlaşmasına neden olmuştur. Human papillomavirus DNA testleri ile PAP smear testlerinin birleştirilerek kullanılması, serviks kanseri benign veya prekanseröz lezyonlarının erken tanısına olanak sağlamış ve birçok olguda prognozu değiştirmiştir^{10, 90}. Tarama programları sayesinde gelişmiş ülkelerde serviks kanseri insidansında belirgin bir azalma gözlenirken, gelişmekte olan ya da az gelişmiş ülkelerde tarama programlarının düzenli olmaması nedeniyle aynı başarı sağlanamamıştır^{9, 39, 95, 106, 114, 137}.

Human papillomavirusunun bütün tipleri gözönüne alındığında monovalan aşı etkisi yetersiz olacaktır. Bu nedenle HPV enfeksiyonlarına karşı; kanser öncesi lezyonların ve servikte gelişmiş olan tümörün geriletmesini sağlayan yani henüz başlangıç evresinde olan HPV enfeksiyonunu önleyici profilaktik aşular ile enfekte kişilerde virüsün çoğalmasını önleyen yani preinvaziv veya invaziv HPV ilişkili neoplazileri tedavi eden terapötik aşular olmak üzere iki tipte aşı geliştirilmiştir^{85, 123}. Aşı maddesi düşük miktarda genetik teknoloji tarafından üretilen ve hastalığı yaratan virusa benzer (virus-like particules: VLP) şekilde oluşan dört protein moleküllerinden oluşmaktadır. Ancak bu moleküller HPV'nin genetik bilgilerini içermemektedir, böylece de aşı maddesinden dolayı bir enfeksiyon olmamaktadır^{85, 107}.

2.9.1. Profilaktik HPV Aşular

Profilaktik aşular, sağlıklı kişilerde HPV enfeksiyonunun ve HPV'ye bağlı lezyonların gelişimini önlemek üzere hazırlanmışlardır. Profilaktik aşısı ile ilgili en önemli gelişme, HPV VLPs (virüs like particles/virus benzeri proteinler) ile nötralizan antikor oluşturmak için bireylerin immunizasyonudur. Bu aşular, serviks sekresyonunda nötralizan antikor miktarını artırma yoluyla, virusun buradan içeri girmesini immunolojik olarak önlemektedir. HPV VLPs aşuları üç çeşit olup, Tip1 sadece L1'den oluşan VLP, Tip2 L1 ve L2 füzyon proteinlerinden oluşan VLPs, Tip3 VLPs dış yüzey

peptidlerinden oluşmuştur. Virus benzeri parçalar, morfolojik olarak virüse benzedikleri gibi hücre yüzeyine de yapışabilmektedir. Tip2 aşıları birçok genital HPV tipine karşı çapraz koruma sağlayabilir. Elde edilen bağışıklık uzun süreli ve oldukça özgün olmaktadır. Human papillomavirus VLPs morfolojik ve yapısal özellikleri açısından adjuvan yokluğunda dahi yüksek litrede nötralizan antikor oluşturmadaki yetenekleriyle enfeksiyon ajanını taklit eder. Virus benzeri parçalar maya hücrelerinde ya da Baculovirus'la enfekte böcek hücreleri içerisinde üretilmektedir^{25, 85}. Virus benzeri parçalar enfeksiyöz ve onkojenik özellikte olmayıp hiç viral DNA içermedikleri için bireylerde enfeksiyon oluşturmayıp oldukça zararsızdırlar. Merck firması tarafından ilki monovalan (faz I) ve devamında tetravalan (faz III) ve Glaxo-Smith-Kline firması tarafından bivalan (faz II) olmak üzere üç VLPs profilaktik aşı çalışması tamamlanmıştır. Çalışmaların ortak sonuçları ise HPV VLPs aşılarının yüksek oranda immunojenik olduğu ve iyi tolere edildiği, yüksek antikor titrelerini sağladıkları, bivalan aşı ile sağlanan antikor titrelerinin daha uzun süreli olması ve persistan HPV enfeksiyonlar ve HPV ile ilişkili enfeksiyonların azaltılmasında önemli olmasıdır. Aday aşılardan faz III çalışmaları halen devam etmektedir. Aşılardan alınan serumlarda HPV 16 yalancı-virionları nötralize edilebilmiştir^{10, 39, 51, 60, 85, 99}.

Gelişmiş ülkelerde, bir görüşe göre, HPV aşılması ile birlikte taramaların kombine edilmesinin en iyi maliyet-yarar sonuçlarını vereceği saptanmış olmasına rağmen, sadece HPV aşılmasına dayanan bir korunma stratejisi ile serviks kanseri olgularının elimine edilmesinin imkânsız olduğunu bildirmişler. Epidemiyolojik çalışmalar HPV enfeksiyonunun yerleşme riskinin adolesan dönemde en yüksek olduğu için, adolesan dönemde, cinsel ilişki başlamadan hemen önce HPV aşısı uygulanacak olursa kolayca ve kısa sürede etkinliğini gösterecektir. Yine bir görüşe göre, En iyi stratejinin, adolesan öncesi dönemdeki aşılama izleyerek, 30 yaşından itibaren 5 yıllık aralarla 3 kez sitolojik tarama uygulanması olacağı öngörülmektedir^{10, 32}.

Profilaktik aşılarda ilgili pek çok yanıtlanmamış soru ve uygulamada karşılaşılabilecek pek çok olası sorun bulunmaktadır. Bunlar:

- Aşının toplum tarafından kabul edilmesi
- Aşının sitolojik tarama çalışmalarını zayıflatma olasılığı
- Sağlıklı olan kişiler kullanımının ne kadar gerekli olduğu,
- Olguların çok az bir kısmının kanser olma ihtimalinin olması yinede aşılama gerektirip gerektirmemesi
- Dogal olarak yüksek riskli olan tiplere karşı olmakla birlikte kaç HPV tipinin hedefleneceğinin tam netlik kazanmamış olması

- Sağlanan koruyucu antikor titresinin kaç yıl devam edeceği ve rapel ne zaman yapılacağı belirsizliği
- İdeal aşılama yolunun ve aralığının belirsizliği
- Hangi yaş grubuna uygulanacağı
- Aşının erkeklere uygulanmasının gerekli olup olmadığı
- Serokonversiyonun korunmada yeterli bir ölçek olup olmadığı
- Maliyet-yarar oranlarının netleşmemiş olması şeklinde sıranabilir.

Bütün bu belirsizliklere rağmen, Haziran 2006 itibariyle FDA, ABD’de adolesan dönemden başlayarak VLPs bivalent HPV aşılarının uygulanmasını onaylamıştır ^{10, 18, 39, 51, 60, 99, 136}.

2.9.2. Terapötik HPV aşılar

Human papillomavirus ile enfekte kişilerde enfeksiyonun tedavisi için ve servikal kanser gelişimini önlemek amacıyla kullanılan aşılardır. Prekanseröz ve kanseröz lezyonlardaki bazal epitelyal hücrelerde L1 ve L2 eksprese edilemediğinden, VLP aşıları oluşmuş enfeksiyonlar için uygun değildir. ^{5, 39, 51, 95}.

Virusun çoğalmasını engelleyen terapötik HPV aşıları; sekonder profilaktik aşılar olarak kabul edilir. Human papillomavirus ile enfekte kişilerde, virusun hücre içinde çoğalmasını engellemektedir. Lezyondaki bazal epitelyal tabakalar içindeki HPV’nin hücre içinde çoğalabilmesi için E1 ve E2 proteinleri gereklidir. Rekombinant yolla elde edilmiş aşılar, E1 ve E2 proteinlerini içererek hücresel bağışıklık sistemini uyararak çoğalmaya çalışan virusların gelişimini durdurur ^{10, 39}.

Serviks kanseri tedavisi için terapötik HPV aşıları; prekanseröz ve kanseröz lezyonlarda, HPV onkogenleri olan E6 ve E7’nin sürekli ekspresyonu ile lezyon malign bir fenotip kazanır. E6 ve E7 gen ürünleri immun sistemi için hedef spesifik tümör antijenleridir. Terapötik HPV aşıları E6 ve E7 proteinlerini içeren rekombinant aşılar olup, vücuda verildiklerinde CD4+ ve CD8+ T hücrelerini uyararak sitotoksinite ve sitokinler ile E6 ve E7 proteinlerini aşırı üreten enfekte hücreler yıkımına neden olarak törepatik etki gösterirler. Viral E6 ve E7 proteinlerine dayalı DNA aşıları, mutasyona uğrama potansiyellerinden dolayı aşı ile ilgili çelişkili görüşler vardır ^{10, 39, 99, 107}.

Yeni ve özellikli aşular üzerinde çalışmalar devam etmesine karşın profilaktik aşulara gelinen aşama terapötik aşularla kıyaslanamayacak kadar ileridedir¹⁰.

Gardasil [Quadrivalent Human Papillomavirüs (Tip 6, 11, 16, 18) Rekombinant Aşu] isimli, Glaxo-Smith-Kline firması tarafından İngiltere’de üretilen HPV aşısı, Sağlık Bakanlığı tarafından 23.02.2007 tarihinde kullanımı onaylanmıştır. Aşının hedeflediği 9-26 yaş arasındaki kız ve kadınlarda:

-HPV tip 16 ve 18’in neden olduğu: servikal kanser, servikal adenokarsinoma in-situ (AIS), servikal intraepitelyal neoplazi (CIN) evre 2 ve evre 3, vulvar intraepitelyal neoplazi (VIN) evre 2 ve evre 3, vajinal intraepitelyal neoplazi (ValN) evre 2 ve evre 3’ün önlenmesinde

-HPV tip 6, 11, 16 ve 18’in neden olduğu: servikal intraepitelyal neoplazi (CIN) evre 1, genital siğiller, HPV enfeksiyonlarının önlenmesinde endikedir.

Rekombinant HPV aşısı, 0.5 ml’lik deltoid kasına veya uylugun üst yanındaki kasa IM (intra müsküler) olarak, 3 ayrı (0.2.6. ay) doz şeklinde uygulanmakta olup; 1. doz belirlenen tarihte, 2. doz birinci dozdan 2 ay sonra, 3. doz birinci dozdan 6 ay sonra uygulanır. Raf ömrü 36 ay olup, servikal kanser olgularının azalması için oldukça önemli bir adımdır⁷².

Aşının koruyuculuğu % 100 olmayıp, aşıda bulunmayan diğer HPV tiplerine ve mevcut HPV enfeksiyonlarına karşı koruma sağlamaz. Aşının sadece genç kızlara uygulanmasına karşın, orta ve ileri yaş kadınlar da serviks kanseri bakımından risk altındadır. Bu nedenlerden ötürü HPV aşısı, risk altındaki kadınlar için tek korunma yöntemi olan rutin sitolojik tarama programlarının yerini tutamaz.^{18, 72}

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışma Grupları

Çalışmamıza, Gazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum polikliniğine Mart-Haziran 2006 tarihleri arasında başvurmuş olan 12.730 hastadan 20’si kontrol grubu olarak araştırmamıza dâhil edilirken; muayene sonucu kolposkopi önerilen 105 hastanın, 45’i herhangi nedenle kolposkopi uygulamasını kabul etmediği veya çalışmamıza katılmak istemediği için kalan 60 hasta çalışma grubu olarak araştırmamıza dâhil edilmiştir.

Çalışma grubumuzdaki 60 hasta kliniğe; adet düzensizliği, disüri, vaginal akıntı, bel ve kasık ağrısı, postkoital kanama şikâyetleriyle başvurmuş ve fizik muayenelerinin değerlendirilmesi ile kolposkopi uygulanmaya karar verilmiştir. Hastalardan kolposkopi uygulanması sırasında steril eküvyon ile asetik asit uygulanması öncesinde servikal sürüntü örneği alınmıştır.

Kontrol grubumuzdaki 20 hasta kliniğe; HPV'nin neden olduğu şikâyetlerle direkt ilişkili olmaksızın memede kitle, çocuk istemi, disüri, vaginal akıntı, menapoz kontrolü, rutin kontrol veya genel tarama gibi sebeplerle polikliniğe gelen 20 kişiden bir kontrol grubu oluşturulmuştur. Kontrol gurubundan da steril eküvyon ile servikal sürüntü örneği alınmıştır.

Örneklerin alındığı eküvyonlar, içinde 5 ml PBS (Steril Fosfat Buffer Saline) olan steril boğaz kültür tüplerine alınarak laboratuvarımıza getirilmiştir. Daha sonra yaklaşık 2 dakika vortekslenmiştir. Tüpten eküvyon çıkartılarak, PBS içindeki örnek 1,5 ml'lik ependorf tüplere alikotlanmıştır. Örnekler DNA'nın elde edilmesine kadar geçen sürede laboratuvarımızda -86 °C'de saklanmıştır.

Çalışma grubu kolposkopik muayeneye sonucu değerlendirilerek hastalar, kolposkopi şüpheli (kolposkopi pozitif) ve kolposkopisi normal (kolposkopi negatif) olarak iki gruba ayrıldı. Kolposkopide asetik asit (%3-5) uygulaması sonrası; beyaza dönen epitel (asetobeyaz epitel), yüzey epiteli kaybı ile birlikte oluşan düzensiz yüzey konturu (mozaik görünüm), anormal kan damarları, punktuasyon, lökoplaki, renk tonu değişiklikleri gibi kolposkopik bulgular veren hastalar kolposkopisi şüpheli (kolposkopi pozitif) gruba dâhil edilmiştir. Bu bulgulara rastlanmayan hastalar ise kolposkopisi normal (kolposkopi negatif) gruba dâhil edilmiştir.

Araştırmamıza katılan hastalardan yaş, gebelik sayısı, medeni durum ve PAP smear test sonucu ile ilgili bilgileri alınmıştır.

3.2. Araç ve Materyaller

3.2.1. Laboratuar Araç-Gereçleri

- Derin dondurucu, -86°C (Sanyo, Japonya)
- Derin dondurucu, -20°C (Bosch, Almanya)
- Buzdolabı (Philco, Türkiye)

- Otoklav (Hirayama, Japonya)
- Laminar hava akımlı kabin (Metis Biyoteknoloji, Türkiye)
- Real Time PCR cihazı (LightCycler (LC), Roche, Almanya)
- Thermal cycler cihazı (Hybaid, Birleşik Krallık)
- Vorteks cihazı (VELP, Scientifica, İtalya)
- Mikrosantrifüj (Heraeus, Almanya)
- Hassas terazi (Shimadzu, Japonya)
- 10, 100, 1000 ml'lik mikropipetler (Gilson, Fransa)
- Mikropipet uçları (CLP, ABD)
- 0,2-0,5-1,5 µL'lik ependorf tüpler (Greiner Bio-One, Almanya)
- Kuru blok (Thermolyne, ABD)
- pH metre (Fisher Scientific, ABD)
- Sıcak su banyosu (MEKA, Türkiye)

3.2.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

- Enjeksiyonluk distile su
- % 99 Etanol (Kimetsan, Türkiye)
- İzoamil alkol (AppliChem, Almanya)
- Sodyum klorür (NaCl) (AppliChem, Almanya)
- Potasyum klorür (KCl) (Merck, Almanya)
- Disodyum hidrojen fosfat (Na₂HPO₄) (Merck, Almanya)
- Potasyum dihidrojen fosfat (KH₂PO₄) (Merck, Almanya)

- Sodyum etilen diamin tetra asetik asit (Na EDTA) (Sigma, Almanya)
- Sodyum dodesyl sülfat (SDS) (Sigma, Almanya)
- Proteinaz K (Roche, Almanya)
- Kloroform (Merck, Almanya)
- Sodyum asetat (Merck, Almanya)
- %99, %70 Etil alkol (Merck, Almanya)
- Glasiel asetik asit (Sigma, Almanya)
- Sodyum hidroksit, (NaOH) (Merck, Almanya)
- Fenol (Amresco, ABD)
- Trisma hidroklorür (Amresco, ABD)
- dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Genesys, Birleşik Krallık)
- Taq DNA polimeraz enzimi (DNA mp ltd., Hants, Birleşik Krallık)
- Magnezyum klorür (MgCl₂) (Genesys, Birleşik Krallık)
- Potasyum klorür (KCl₂) (Genesys, Birleşik Krallık)
- Tris HC1 (Genesys, Birleşik Krallık)
- Primer dizileri: MY09/MY11 primer seti
- Sense:(5'-CGTCCMARRGGAWACTGATC-3') (Tıb Molbiol, Almanya)
- Antisense:(5'-CMCAGGGWCATAAYAATGG-3') (Tıb Molbiol, Almanya)
- PCR grade H₂O (Roche, Almanya)
- SYBR Green I (Roche, Almanya)
- HPV 16 LC prob miks (Cy5.0 işaretli prob (0.2 µM)
- Prob: 5'Cy5-GTTTCTGAAGTAGATATGGCAGCACA-biotin 3'

(Tıbmolbiol, Almanya).

•Real Time PCR primer miks (forward ve reverse primer) (0.5 µM)

-Forward primer:F 5' TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC 3'

(Tıbmolbiol, Almanya).

-Reverse primer: R 5' GAAAATAAACTGTAAATCATATTC 3'

(Tıbmolbiol, Almanya).

3.2.3. Hazırlanılarak Kullanılan Solüsyonlar

PBS: Hastalardan alınan örneği saklama için kullanılır. Bir litre distile su içerisinde 8 gr NaCl, 0.2 gr KCl, 1.15 gr Na₂HPO₄, 0.2 gr KH₂PO₄ karıştırılarak çözüldükten sonra pH 7.4 olacak şekilde pH metre ile ayarlanıp, otoklavlanarak +4 °C'de dolapta saklanır.

Kloroform İzoamil Alkol: Viral DNA'nın elde edilmesi aşamasında gereklidir. Kloroform ile izoamil-alkolün 24:1 oranında karışımından oluşmuş olup, kullanılmak üzere + 4 °C'de saklanır.

Fenol-Kloroform İzoamil Alkol: Viral DNA'nın elde edilmesi aşamasında gereklidir. Fenol-kloroform ve izoamil-alkolün 25:24:1 oranında karışımından oluşmuş olup kullanılmak üzere + 4 °C'de dolapta saklanır.

%70 Etanol: DNA'nın elde edilmesi aşamasında gerekli olan bu solüsyon, 70 ml mutlak etil alkol ile 30 ml distile su karışımından oluşmuş olup kullanılmak üzere buzlukta saklanır.

Lizis Solüsyonu: Viral DNA'nın elde edilmesi aşamasında gerekli olup, 50 ml distile su içerisinde; %0.1'lik SDS, 0.24 gr Trisma hidroklorür, 0.37 gr EDTA çözüldükten sonra tekrar 50 ml daha distile su ilavesi yapılır. Solüsyon pH metre kontrolünde NaOH kullanılarak, pH'sı 8 olacak şekilde ayarlanmış ve sonra solüsyon otoklavda steril edilmiştir. Otoklavdan çıkıp soğuduktan sonra solüsyonun içine Proteinaz K'dan 10 µL (0.1mg/ml) ilave edilip + 4 °C'de dolapta saklanır.

3M Sodyum Asetat: Viral DNA'nın elde edilmesi aşamasında gereklidir olup, 10 ml distile su içinde 500 µL (3 M) Sodyum asetat çözüldükten sonra pH 5.2 olacak şekilde Glasiel asetik asit ile ayarlama yapıp +4 °C'de dolapta saklanır.

3.3. Yöntem

Real Time PCR; DNA'nın elde edilmesi (ekstraksiyon), DNA'nın çoğaltılması (amplifikasyon), Real Time PCR şeklinde üç aşamadan oluşur. Çalışmamızda, 80 örnek 5 sete ayrılarak çalışılmıştır.

Bütün çalışma Laminar hava akımlı kabin içerisinde minimum kontaminasyon esasıyla, her seti çalışmaya başlamadan önce tüm kuru yüzeyler ve kullanılacak malzemeler (mikropipetler, pensler, çalışma blokları) %10'luk çamaşır suyu ile temizlendi ve 10 dakika UV açık bekletilmiştir.

3.3.1. DNA'nın Elde Edilmesi (Ekstraksiyon)

- 1) Ependorf tüplere alikotlanıp -86 °C'de saklanmış olan örnekler, oda sıcaklığında çözündürülmüştür.
- 2) Her set çalışılırken, HPV DNA'sı içeren bir adet pozitif kontrol ve örnek yerine distile su bulunan bir negatif kontrol kullanılmıştır.
- 3) Çözünen örnekler 2-3 dakika 10000 rpm'de santrifüj edilerek hücreler çöktürülerek, üstteki sıvı atılmıştır.
- 4) Pellet üzerine 500 µL Lizis solüsyonu ve 15 µL (18 mg/mL) Proteinaz K eklenerek solüsyon pipetaj uygulaması ile homojenize edilip 3 saat 55 °C'de kuru blokta bekletilmiştir.
- 5) Daha sonra su banyosunda 95 °C'de 10 dakika bekletilmiştir.
- 6) Bu işlemden sonra örneklere 500 µL Fenol-kloroform-izoamilalkol eklenip 10-15 saniye vortekslenerek, 3 dakika 12.500 rpm'de santrifüj edilmiştir.
- 7) Santrifüj işlemi sonrasında örneklerin olduğu ependorf tüpünde oluşmuş olan viral DNA içeren süpernatant başka bir ependorf tüpüne aktararak üzerine 500 µL Kloroform-izoamilalkol eklenerek, 10-15 snaniye vortekslenip 3 dakika 12.500 rpm'de santrifüj edilmiştir.
- 8) Santrifüj işleminden sonra yine oluşan süpernatant başka bir ependorf tüpüne aktararak üzerine 50 µL (3 M) Sodyum asetat ve 1000 µL Etil alkol (%99) eklenerek derin dondurucuda (-86°C) çöktürme işlemini gerçekleştirmek için bir gece bekletilmiştir.
- 9) Örnekler derin dondurucudan çıkarılarak oda sıcaklığında bir süre bekletilmiştir.

- 10) Çözünen örnekler 12.500 rpm’de 15 dakika santrifüj edilmiştir.
- 11) Santrifüj işleminden sonra ependorf tüplerdeki Etanol atık kutusuna dökülmüştür.
- 12) Tüplere 500 µL Etil alkol (%70) eklenip 10-15 snaniye vortekslenerek, 5 dakika 12.500 rpm’de santrifüj edilmiştir.
- 13) Bu işlemden sonra ependorf tüplerdeki içerik yine atık kutusuna döküldükten sonra kapakları açık bırakılarak 30 dakika laminar hava akımlı kabin içerisinde kurutulmuştur.
- 14) Ependorf tüplere 50 µL steril deiyonize su ilave edildikten sonra kuru blok üzerinde en az 55 °C’de 10 dakika bekletilmiştir.
- 15) Örnekler, çoğaltma işlemine hazır hale gelmiştir.

3.3.2. DNA’nın Çoğaltılması (Amplifikasyon)

Çoğaltma işlemi için bölgeyi sağdan ve soldan sınırlayan, çoğaltılması istenen bölgenin iki ucundaki DNA dizisini özgül olarak tanıyıp bağlanacak olan bir çift sentetik DNA parçaları olan primerler kullanılır. Çalışmamızda, pek çok HPV genotipi için ortak ve genel olan Tıbbi Molbiol firması tarafından Berlin/Almanya’da sentezletilmiş primer seti seçilmiştir:

-MY09 (5'-CGTCCMARRGGAWACTGATC-3')

-MY11(5'-CMCAGGGWCATAAYAATGG-3')

Bu primerler, HPV genomunda bulunan L1 (majör viral kapsid protein geni) gen bölgesinde 452 bp uzunluğundaki DNA segmentlerini çoğaltabilme özelliğindedir. Buz üzerinde 1,5 ml’lik reaksiyon tüpünde çoğaltma işlemi için karışım hazırlandı; 100 µM dNTP (eşit oranda dATP, dGTP, dCTP, dTTP’ dan oluşan) eklenerek denatüre edilen zincirlerin tamamlanmasında kullanılmıştır. Üzerine; 50 mM KCl₂, 4 mM MgCl₂, 10 mM Tris HCl (pH:9) içinde, 1 ünite Taq DNA polimeraz enzimi ve her iki primerden de 100 pmol içeren 45 µl olan karışım içerisine 5 µl DNA eldesi eklenerek 50 µl’ye tamamlanmıştır. Cihaz olarak ThermoHybaid (Birleşik Krallık) kullanılmıştır.

Thermalcycler programlanması; denatürasyon aşaması için 94°C 5 dakika, ardından 94 °C 20 saniye, 55 °C 45 saniye, 72 °C’de 1 dakika 35 döngü ve 72 °C’de 7 dakika olacak şekilde yapılmıştır.

3.3.3. Real Time PCR

Master miks;

- 1,4 µl MgCl₂ (4 µM)
- 0,5 µl primer miks (0,5 µM)

-Forward Primer:

F 5' TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC 3') (Tıbmolbiol, Almanya)

-Reverse Primer:

R 5' GAAAAATAAACTGTAAATCATATTC 3') (Tıbmolbiol, Almanya)

- 0,5 µl Cy5.0 işaretli Prob (0,2 µM)

-(5' Cy5 GTTTCTGAAGTAGATATGGCAGCACA-biotin 3')

(Tıbmolbiol, Almanya)

- 1 µl LC- FastStart DNA SyberGreen I master miks
- 10x (Roche Diagnostics, Almanya) şeklinde hazırlanmıştır.

Roche LightCycler sistemi kullanılmıştır. Erime eğrisi analiz programı ile Lightcycler (Roche, Almanya) cihazında yapılmıştır. Veri analizleri LightCycler Software version 3.5.3. ile yapılmıştır.

Sonuçlar ekranda eğrilerin pik durumuna göre HPV DNA varlığı pozitif olarak tanımlanmış olup; 70°C±3 değerleri HPV tip 16 açısından pozitif kabul edilirken 80°C±3 değerleri ise HPV tipleri için pozitif olarak değerlendirilmiştir.

4.BULGULAR

Kadın Hastalıkları ve Doğum Polikliniğine, adet düzensizliği, disüri, vaginal akıntı, bel ve kasık ağrısı, postkoital kanama şikâyetleriyle başvuran ve kolposkopi kararı verilen 60 hasta çalışmaya alındı. Hastaların

30'u kolposkopi şüpheli (kolposkopi pozitif), diğer 30'u ise kolposkopi normal (kolposkopi negatif) şeklinde iki gruba ayrıldı. Polikliniğine, HPV'nin neden olduğu şikâyetlerle direkt ilişkili olmaksızın; memede kitle, çocuk istemi, disüri, vaginal akıntı, rutin kontrol, genel tarama ve menapoz kontrolü gibi nedenlerle gelen 20 hasta kontrol grubu olarak çalışmaya alındı.

Araştırmamıza katılan hastalardan yaş, gebelik sayısı, medeni durum ve PAP smear test sonucu ile ilgili bilgileri alınmıştır. Real-Time PCR metoduyla HPV DNA varlığı araştırılarak elde edilen verilerin, bu parametrelerle (yaş, gebelik sayısı, medeni durum... v.s.) ilişkisi istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

Tablo 5. Araştırma grubunda kolposkobik bulgulara göre Real-Time PCR ile HPV tip16, HPV 16 dışındaki tiplerin DNA varlığının dağılımı

Hasta sayısı (n: 80)	HPV Tip 16 (+) (n: 7)	HPV 16 Dışı Tipler (+) (n: 14)	Toplam HPV (+) (n: 21)	Toplam HPV (-) (n: 59)
Kolposkopi pozitif (n: 30)	2 (% 6.7)	5 (% 16.6)	7 (% 23.3)	23 (% 76.6)
Kolposkopi negatif (n:30)	2 (% 6.7)	2 (% 6.7)	4 (% 13.3)	26 (% 86.6)
Kontrol (n:20)	3 (% 15)	7 (% 35)	10 (% 50)	10 (% 50)
Toplam (n:80)	7 (% 8.7)	14 (% 17.5)	21 (% 26.2)	59 (% 73.8)
		*P=0.001	**P=0.001	

*HPV Tip 16 (+), HPV 16 Dışı Tipler (+) ve HPV(-)'ler arasında istatistiksel karşılaştırma.

**HPV(+) ve HPV(-)'ler arasında istatistiksel karşılaştırma.

Kolposkopik muayeneye sonucu değerlendirilerek hastalar, kolposkopi şüpheli (kolposkopi pozitif) ve kolposkopisi normal (kolposkopi negatif) olarak iki gruba ayrıldı. Kolposkopi negatif, kolposkopi pozitif ve kontrol gruplarından alınan örneklerdeki HPV DNA varlığı, Real Time-PCR metoduyla araştırılmış olup, bulgular Tablo 5'de verilmiştir. Ki-kare testi ile elde edilen veriler değerlendirildiğinde, HPV tip 16 ve HPV 16 dışındaki tiplerin DNA varlığı ve HPV pozitifliği yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($X^2=8.96$, $p=0.062$) ve fark kontrol grubundan kaynaklanmaktadır ($X^2=8.43$, $p=0.014$).

Tablo 6. Araştırma grubunda gebelik sayısına göre Real-Time PCR ile HPV tip16 ve HPV 16 dışındaki tiplerin DNA varlığının dağılımı

Hasta sayısı (n: 80)	HPV Tip 16 (+) (n: 7)	HPV 16 Dışı Tipler (+) (n: 14)	Toplam HPV (+) (n: 21)	Toplam HPV (-) (n: 59)
0-2 gebelik (n:45)	5 (% 11.1)	6 (% 13.3)	11 (% 24.4)	34 (% 75.6)
3-5 gebelik (n:32)	2 (% 6.2)	7 (% 21.8)	9 (% 28.1)	23 (% 71.9)
6-10 gebelik (n:3)	0 (% 0)	1 (% 33.3)	1 (% 33.3)	2 (% 66.7)
Toplam (n: 80)	7 (% 8.7)	14 (% 17.5)	21 (% 26.2)	59 (% 73.8)
			*P=0.001	

*HPV(+) ve HPV(-)'ler arasında istatistiksel karşılaştırma.

Araştırma grubu gebelik sayısına göre sınıflandırılıp elde edilen veriler, HPV DNA pozitifliği ile kıyaslanmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 6'da özetlenmiştir. Ki-kare testi ile verilerin istatistiksel olarak analizi yapıldığında, gebelik sayısı ile HPV tip 16 ve HPV 16 dışındaki tiplerin DNA varlığı arasındaki istatistiksel ilişki, gözlerde "0" değeri olduğu için hesaplanamamıştır. HPV pozitifliği açısından gebelik sayı grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($X^2=0.21$, $p=0.899$).

Tablo 7. Araştırma grubunda yaşa göre Real-TimePCR ile HPV tip16 ve HPV 16 dışındaki tiplerin DNA varlığının dağılımı

Hasta sayısı (n: 80)	HPV Tip 16 (+) (n: 7)	HPV 16 Dışı Tipler (+) (n: 14)	Toplam HPV (+) (n: 21)	Toplam HPV (-) (n: 59)
20-24 (n:2)	0 (% 0)	1 (% 50)	1 (% 50)	1 (% 50)
25-29 (n:6)	1 (% 16.6)	0 (% 0)	1 (% 16.6)	5 (% 83.4)
30-34 (n:6)	1 (% 16.6)	0 (% 0)	1 (%16.6)	5 (% 83.4)
35-39 (n:15)	1 (% 6.6)	2 (% 13.4)	3 (% 20)	12 (% 80)
40-44 (n:7)	0 (% 0)	1 (% 14.2)	1 (% 14.2)	6 (% 85.8)
45-49 (n:18)	3 (%16.6)	4 (% 22.2)	7 (% 38.8)	11 (% 61.2)
49< (n:26)	1 (% 3.8)	6 (% 23)	7 (% 26.9)	19 (%73.1)
Toplam (n: 80)	7 (% 8.7)	14 (% 17.5)	21 (% 26.2)	59 (% 73.8)
			*P=0.001	

*HPV(+) ve HPV(-)'ler arasında istatistiksel karşılaştırma.

Araştırma gruplarına uygulanan Real Time PCR sonucunda elde edilen HPV DNA varlığı ile yaş karşılaştırılmıştır. Elde edilen dağılım, Tablo 7’de verilmiştir. Ki-kare testi ile elde edilen veriler değerlendirildiğinde, yaş ile HPV tip 16 ve HPV 16 dışındaki tiplerin DNA varlığı arasındaki ilişki gözlerde “0” değeri olduğu için istatistiksel olarak hesaplanamamıştır.

Tablo 8. Araştırma grubunda PAP smear test sonucuna göre Real-Time PCR ile HPV tip16 ve HPV 16 dışındaki tiplerin DNA varlığının dağılımı

Hasta sayısı (n: 80)	HPV Tip 16 (+) (n: 7)	HPV 16 Dışı Tipler (+) (n: 14)	Toplam HPV (+) (n: 21)	Toplam HPV (-) (n: 59)
PAP smear testi normal (n:34)	2 (% 5.8)	6 (% 17.6)	8 (% 22.5)	26 (% 77.5)
PAP smear testi patolojik (n:29)	3 (% 10.3)	6 (% 20.6)	9 (% 31)	20 (% 69)
PAP smear testi olmayan (n:17)	2 (% 11.7)	2 (% 11.7)	4 (% 22.5)	13 (% 77.5)
Toplam (n: 80)	7 (% 8.7)	14 (% 17.5)	21 (% 26.2)	59 (% 73.8)
			*P=0.001	

*HPV(+) ve HPV(-)'ler arasında istatistiksel karşılaştırma.

Araştırma grubundaki hastalar üç gruba ayrılmıştır. PAP smear test sonucu patolojik olan grup 29 hastadan, PAP smear test sonucu normal olan grup 34 hastadan ve PAP smear testi yaptırmamış olan grup ise 17 hastadan oluşmuştur. Real Time-PCR sonucunda elde edilen HPV DNA varlığı ile PAP smear test sonucu dağılımı ile karşılaştırılmış ve Tablo 8'de özetlenmiştir. Ki-kare testi ile verilerin istatistiksel olarak analizi yapılmıştır. PAP smear testi ile HPV tip 16 ve HPV 16 dışındaki tiplerin DNA varlığı arasında anlamlı bir istatistiksel ilişki bulunamamıştır ($X^2=0.75$, $p=0.687$). Her üç grupta HPV tip 16 ve HPV 16 dışındaki tiplerin DNA varlığı ve HPV pozitifliği yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($X^2=1.21$, $p=0.870$).

Tablo 9. Araştırma grubunda medeni duruma göre Real-Time PCR ile HPV tip16 ve HPV 16 dışındaki tiplerin DNA varlığının dağılımı

Hasta sayısı (n: 80)	HPV Tip 16 (+) (n: 7)	HPV 16 Dışı Tipler (+) (n: 14)	Toplam HPV (+) (n: 21)	Toplam HPV (-) (n: 59)
Evli (n:60)	5 (% 8.3)	11 (% 18.3)	16 (% 26.6)	44 (% 73.4)
Bekâr (n:20)	2 (% 10)	3 (% 15)	5 (% 25)	15 (% 75)
Toplam (n: 80)	7 (% 8.7)	14 (% 17.5)	21 (% 26.2)	59 (% 73.7)
			*P=0.001	

*HPV(+) ve HPV(-)'ler arasında istatistiksel karşılaştırma.

Araştırma grubundaki hastalar, medeni durumlarına göre evli ve bekâr (boşanmış, hiç evlenmemiş, eşinden ayrı) şeklinde gruplandırılarak, elde edilen veriler Real Time PCR ile HPV DNA varlığı açısından karşılaştırılmış ve sonuçlar Tablo 9'da özetlenmiştir. Ki-kare testi ile verilerin istatistiksel olarak analizi yapılmıştır. Hastaların medeni durum ile HPV tip 16 ve HPV 16 dışındaki tiplerin DNA varlığı arasında anlamlı bir istatistiksel ilişki bulunamamıştır (Fisher p=1.00). Ayrıca HPV tip 16 ve HPV 16 dışındaki tiplerin DNA varlığı ve HPV pozitifliği yönünden anlamlı fark bulunamamıştır ($X^2=0.15$, p=0.928).

5.TARTIŞMA

Human papillomavirus, birçok hastalıktan sorumlu olup, cinsel yolla bulaşan en yaygın hastalık nedenlerinden biridir^{9, 29 37, 57, 67, 74, 81, 106, 114, 115, 123}. Servikal kanser, dünyada her 100.000 kişiden 59.4 görülmekte olup, HPV ile ilişkili kanserler dünyada görülen tüm yaygın kanserlerin %5.2'sini oluşturmaktadır⁵⁶. ABD'de 2003 yılında yapılmış olan bir çalışmada 12.200 yeni vaka olduğunu ve 4.100 kişinin servikal kanserden öldüğünü bildirmiştir. Her yıl yaklaşık 30 milyon yeni genital HPV enfeksiyonu meydana gelmekte iken, bu olguların ise yaklaşık %80-91'inin gelişmekte olan ülkelerde var olduğu tahmin edilmektedir^{9, 106, 114, 137}. ABD'nin 20 milyon nüfusu HPV ile enfekte olup, buna her yıl yaklaşık 1-5,5 milyon kişi eklenmektedir^{14, 29}. Seksüel aktif insanların

yaklaşık %50-85'i hayatlarında en az bir kez HPV enfeksiyonu ile karşılaşmışlar^{9, 32}. Servikal kanser biyopsilerinin yaklaşık % 84-100'ü HPV DNA'sı içermektedir^{9, 14, 37, 43, 67, 89, 106, 107, 110, 114, 118, 122, 128, 144}. Servikal kanser ilk defa 1976'da Zur Hausen ve ark.'ları tarafından HPV ile ilişkilendirilmiş ve bu hipotezi desteklemek için birçok epidemiyolojik, histolojik ve mikrobiyolojik çalışmalarla elde ettiği verilerle, HPV'yi cinsel yolla bulaşan karsinojenik bir ajan olarak tanımlamıştır^{29, 67, 78, 122}.

Wheeler ve ark.'ları yaptıkları çalışmada, PCR ile Dot-blot metotlarıyla HPV prevalansını araştırmışlar. 72 kadından hem servikal swap hemde servikovajinal lavaj örnekleri alınmış ve örnekler PCR ile Dot-blot (Virapap) metodu uygulanmışlar. 10 hafta takip edilen hastalarda test tekrarlamışlar ve Dot-blot yöntemiyle kümülatif HPV prevalansı %13.9 iken PCR metoduyla ise kümülatif HPV prevalansı %58.3 olarak bulmuşlar¹³⁷.

Maria ve ark.'larının 2006 yılında yayınladıkları araştırmada, Hibrid Yakalama-2 (Digene HC-2) ile PCR (AMPLİCOR) metodlarının yüksek-riskli HPV tiplerinin tespitindeki performansı karşılaştırılmış. CIN tedavisi alan, anormal Pap smearlı, takipli 168 kadının katıldığı çalışmada, HPV DNA tespitinde PCR (%39.3) HC-2'den (%32.1) daha başarılı olmuştur. Bu sonuç PCR metodunun yüksek sensitivitesi ile açıklanmıştır. Ayrıca PCR çalışma grubundaki 7 CIN III'lü hastanın tespitinde 7/7 başarılı iken HC-2 5/7'ni tespit edebilmiştir. Bu başarısızlığın viral yüklemdeki yetersizlikten kaynaklanabileceğini bildirmişlerdir⁸¹.

Monsonogo ve ark.'larının yaptığı çalışmada CIN II, CIN III lezyonlarında HPV DNA varlığının tespitinde PCR'ın en güçlü yöntem olduğunu bildirmişlerdir⁸².

Kaynak ve ark.'larının, yaptıkları çalışmada deney grubu, kasık ağrısı, disparoni, gaita yapamama, vajinal kaşıntı, menapoz, disüri, kontrol, memede kitle gibi nedenlerle kliniğe gelen hastalardan rastgele seçilerek oluşturulmuş. Digene Hibrid Yakalama I sistemiyle 149 kadının servikal sürüntü örneğinde HPV DNA varlığı araştırılmıştır. Sonuç olarak % 6.6 (10/149) oranında HPV DNA pozitif olarak tespit edilmiş⁶⁸.

Bizim çalışmamızda; Human papillomavirus tespitinde serolojik tanı yöntemleri etkili olmadığından ve halen kültürü yapılamadığından moleküler esaslı tanı yöntemlerinden PCR yöntemi kullanılmıştır. Viral yüklemenin yüksek olmasına gerek kalmaksızın çok küçük miktarlarda bile spesifik DNA sekanslarını çoğaltılabildiği, diğer moleküler yöntemlere göre sensitivitesi, spesifitesi daha yüksek olduğu için çalışmamızda gelişmiş bir metod olan PCR yöntemi seçilmiştir.

Onan ve ark.'larının çalışmalarında Real-Time PCR ile CIN lezyonlarında HPV tip 16 ve HPV tip 18 varlığını tespit etmiş ve örneklerdeki viral yükün etkenin tespitindeki rolünü değerlendirmişlerdir. Sonuç olarak Real-Time PCR'ın HPV varlığını tespit etmede, tip ayırımında ve miktarını belirlemede diğer yöntemlere üstün olduğu bildirilmiştir. Ayrıca HPV pozitiflik oranının lezyonun şiddetine bağlı olarak arttığını fakat Real-Time PCR ile HPV varlığını tespitinin viral yüklemeye ile ilgili olmadığını bildirmişlerdir⁹⁸.

Grce ve ark.'ları, Zagreb'deki kadınlar arasında Real Time PCR yöntemi ile genital HPV'nin dağılımını değerlendirmek için bir çalışma yapmışlardır. Sitolojik olarak LSIL, HSIL tanısı almış veya kolposkopide HPV şüpheli olarak tanımlanan 1874 hastada tipe özgü primerler kullanarak PCR ile HPV tip 6, 11, 16, 18, 31 ve 33'nin HPV DNA araştırması yapılmış. Bu hastaların %35,6'sında HPV DNA negatif, %64,4'ünde ise HPV DNA pozitif bulunmuştur. HPV 6/11 (%5), HPV 16 (%12), HPV 18 (%2), HPV 31 (%5) ve HPV 33 (%3) şeklinde tiplendirmesi yapmışlar. HSIL'da HPV DNA tip 16'nın sıklığı % 17,1 olarak bulunurken LSIL'da HPV DNA tip 16'nın sıklığı % 8,5 olarak bulunmuştur. Sitolojik bulgular ile HPV tipleri arasındaki ilişkiyi incelediklerinde yüksek riskli HPV tiplerinin sıklığı artıça intraepitelyal lezyonların (SIL ve HSIL) ciddiyetinde artışı sonucuna varmışlar⁵⁷.

Çalışmamızda; şüpheli olgularda aynı anda HPV tip 16'nın ve diğer HPV tiplerinin tayinine olanak sağlayarak PCR'a göre maliyeti de oldukça düşürdüğü, yüksek sensivite ve spesivitesi ile doğru kuantifikasyon imkânı sağlayabildiği, klasik PCR sonrası yapılması zorunlu diğer değerlendirme çalışmalarından kurtardığı ve kontaminasyon riskini minimize ederek, güvenilirliği yükselttiği için ve viral yüklemenin yüksek olmasına gerek kalmaksızın çok küçük miktarda dahi DNA varlığını tespit edilebildiğinden (fentogram-pikogram arası) PCR yöntemin bir alt tipi olarak geliştirilmiş olan Real-Time PCR yöntemi tercih edilmiştir.

Human papillomavirus prevalansı, örneğin ne zaman alındığı, nasıl alındığı, öneklere nasıl bir uygulama yapıldığı, örneğin nasıl saklandığı kullanılan yöntem ve testin ne sıklıkla tekrarlandığına bağlı olarak değişmektedir. Yapılan bazı çalışmalar HPV DNA varlığının tespitinde, biyopsi örneklerinin servikal öneklere, servikal swap örneklerinin de servikovaginal lavaj örneklerine üstün olduğunu bildirmiştir^{8, 139, 144}. Human papillomavirus teşhisi için kullanılacak olan ürüne testinin, enfekte kadınların izlenmesinde ve epidemiyolojik çalışmalar için kullanışlı olabileceğini bildirmişler⁶⁵.

Bizim çalışmamızda hastalardan bir kez kolposkopi uygulaması sırasında alınan servikal sürüntü örnekleri ile çalışılmıştır. Alınan örnekler -86 °C deki dolapta saklanmıştır.

Schiff ve ark.'larının Hindistanda 326 kişinin katılımı ile yaptıkları çalışmada %34.3 oranında HPV DNA varlığı tespit etmişlerdir ¹¹².

Amrani ve ark.'larının Faslı kadınlar ile yaptıkları bir çalışmada 147 hastadan alınan biyopsi örneklerinin % 62'sinde HPV DNA varlığı tespit edilmiştir ⁸.

Kaynak ve ark.'larının yaptıkları çalışmada; Digene Hibrid Yakalama I sistemiyle 450 kadının servikal sürüntü örneğinde HPV DNA varlığı araştırılmıştır. Sonuç olarak %12 oranında HPV DNA pozitif olarak tespit edilmiş ⁶⁹.

Dinçer ve ark.'larının yaptıkları çalışmada, HPV prevalansı %23.3 olarak saptanmıştır ⁴².

Bizim çalışmamızda HPV DNA varlığını Real-Time PCR metoduyla araştırdığımızda HPV prevalansı %26.2 olarak tespit edilmiştir. Elde ettiğimiz prevalans yurtdışı çalışmalarda elde edilen HPV prevalansından farklı olması toplum yapımızın diğer popülasyonlardan farklı olmasıyla açıklanabilir. Dinçer ve ark.'ları ve Kaynak ve ark.'ları her ikisinde çalışmasında bizim çalışmamızda olduğu gibi Ankara'da, Gazi Üniversitesi, Tıp Fakültesine bağlı, Kadın Hastalıkları ve Doğum kliniğine başvurmuş hastaları araştırmışlardır. Ardışık yıllarda yapılmış olan her üç çalışmanın popülasyon yapısının aynı olması göz önüne alındığında, çalışmamızda en yüksek HPV prevalansının (%26.2) elde edilmesini toplum yapımızdaki değişikliğe bağlı olarak HPV'nin gittikçe yaygın hale gelmesiyle açıklayabiliriz. Ayrıca popülasyon özelliği bakımından benzerliği göz önüne alındığında Kaynak ve ark.'larının çalışmasında HPV prevalansı bizim elde ettiğimiz orandan daha küçüktür bu durumu PCR'in HPV DNA varlığını tespit etmedeki üstünlüğü ile açıklayabiliriz.

Grce ve ark.'ları, Zagreb'deki kadınlar arasında Real Time PCR yöntemi ile genital HPV'nin dağılımını değerlendirmek için bir çalışma yapmışlar. Sitolojik olarak LSIL, HSIL tanısı almış veya kolposkopide HPV şüpheli olarak tanımlanan 1874 hastada tipe özgü primerler kullanarak PCR ile HPV tip 6, 11, 16, 18, 31 ve 33'nin HPV DNA araştırması yapılmış. Bu hastaların % 64,4'ünde HPV DNA pozitif bulunmuştur.

Dinçer ve ark.'larının yaptıkları çalışmada, kolposkopi şüpheli grupta HPV prevalansı %50, HPV tip 16'nın prevalansı %30 iken, HPV 16 dışındaki tiplerin prevalansı ise %20 olarak saptanmıştır.

Bizim çalışmamızda Tablo.5'te özetlendiği gibi kolposkopi şüpheli grupta, HPV prevalansı %23.3, HPV tip 16'nın prevalansı %6.7 iken, HPV 16 dışındaki tiplerin prevalansı ise %16.6 olarak tespit edilmiştir. HPV tip 16'nın prevalansında farklılık vardır. Kolposkopi şüpheli grupta (%23.3) HPV DNA

varlığının belirgin olarak Kolposkopi negatif gruptan (%13.3) yüksek olması şüpheli kolposkopik bulgular ile HPV pozitifliği arasında yakın bir ilişki olduğu göstermektedir. Kolposkopi önerilen 105 kişiden sadece 60'ının çalışmaya alınabilmesi HPV prevalansımızdaki farklılıkları açıklayabilir. 105 kişiden 45'sinin kolposkopik muayeneye katılmamasını HPV ve serviks kanseri hakkında yeterli bilgiye sahip olmamalarıyla ilgili olabileceğini düşünmekteyiz.

Çalışmamızda; kontrol grubunda HPV prevalansının %50 olarak tespit edilmesi, HPV'nin normal sitolojili kadınlarda da ne kadar sık bulunduğunu gösterdiği gibi, bu durum cinsel aktif bireylerin yaklaşık %50-85'inin hayatları boyunca en az bir kez HPV ile enfekte olmaları ile de açıklanabilir. Ayrıca koilosit atipi gibi latent HPV enfeksiyonlarının tespitinde moleküler yöntemlerin sitolojik yöntemlerden daha üstün olduğunu söyleyebiliriz.

Ter Harmsel ve ark.'larının yaptıkları bir çalışmada, HPV tip 16 varlığı ile CIN gelişim riski arasındaki ilişkiyi araştırmışlar. HPV 16 DNA PCR pozitif olan 54 kişi çalışmaya katılmış. Yaş ortalaması 37 olan hastalar her altı ayda bir PCR testi tekrarlanmış ardışık üç PCR pozitif persistan HPV 16 enfeksiyonu, ardışık üç PCR'dan biri pozitif diğer ikisi negatif ise bunu da HPV 16 geçici enfeksiyonu olarak kabul etmişler. Hastalar, 29 geçici enfeksiyonlu ve 25 persistan enfeksiyonlu olarak iki alt gruba ayırmışlar. Persistan HPV 16 enfeksiyonlu çalışma grubu (11/25), geçici enfeksiyonlulara (6/29) göre önemli ölçüde CIN gelişimi göstermiş. Ayrıca, persistan enfeksiyonlu CIN gelişimi göstermiş kişilerde (6/11'de CIN III gelişmiş) oluşan lezyonlar geçici enfeksiyonlu CIN gelişimi göstermiş kişilere (1/6'de CIN III gelişmiş) göre daha şiddetlidir. Sonuç olarak, HPV tip 16 etkenli persistan enfeksiyonlu kişiler CIN gelişimi ve daha ileri lezyonları açısından yüksek risk altında olduklarını bildirmişlerdir ¹²⁸.

Martin ve ark.'larının yaptığı çalışmada, servikal hücrelerdeki HPV tip 16'nın yüksek titredeki varlığının servikal karsinoma in-situnun gelişimi için önemli bir risk faktörü olarak tanımlanmıştır. HPV tip 16'nın titre seviyesindeki değişime bakılarak enfeksiyonun, daha şiddetli bir displaziye mi dönüştüğüne ya da enfeksiyonda bir gerileme mi gerçekleştiğine karar verilebileceğini bildirilmiştir ¹³⁸.

Grce ve ark.'ları, Zagreb'deki kadınlar arasında Real Time PCR yöntemi ile genital HPV'nin dağılımını değerlendirmek için yaptıkları çalışmada yüksek riskli olarak tanımlanmış olan HPV tip 6, 11, 16, 18, 31 ve 33 tipleri gözönüne alındığında HPV DNA varlığı LSIL'da %54,5 iken, bu oran HSIL'da %78,4'de yükselmiştir. Sonuçların istatistiksel olarak oldukça anlamlı olduğunu ve Hırvat kadınlar için HPV enfeksiyon etkenlerinden özellikle HPV tip 16'nın sağlığı tehdit eden önemli bir etken olduğunu vurgulamışlardır ⁵⁷.

Türkiyede servikal kanserli olgularla yapılan bazı çalışmalarda, Erkmen ve ark.'ları HPV tip 16'nın prevalansını % 54.5 olarak saptarken, Polat ve ark.'ları ise prevalansı % 18.2 olarak tespit etmişlerdir^{49, 102}.

Tuncer ve ark.'larının yaptığı bir çalışmada alınan biyopsi örnekleri ile yapılan PCR taraması sonucunda; HPV tip 16, normal sitolojili olan kadınlarda %12.5, CIN I %19.4, CIN II-III %46.3 ve invaziv kanserlerde %83.3 olarak tespit edilmiştir¹³⁴. Lorincz ve ark.'larının yaptığı bir çalışmada HPV tip 18 invaziv kanseri olan kadınların %23'ünde, CIN II-III 'ü olan kadınların %5'inde, CIN I'i olan kadınların %5'inde, negatif bulguları olan kadınların %2'sinden daha azında görülür. İnvaziv tümörlerde HPV 18, HPV 16'dan daha spesifik olduğu düşünülmektedir⁶⁷.

Castle ve ark.'ları yaptıkları bir çalışmada; HPV tip 16'nın etken olduğu, ASCUS veya LSIL lezyonlarının 2 yıl içinde CIN III veya kansere dönüşme riski olduğunu ve bu riskin, HPV tip 16 dışındaki diğer tiplerle kıyaslandığında 5 kat fazla olduğunu bildirmişlerdir⁸².

Dinçer ve ark.'larının yaptıkları çalışmada, HPV tip 16'nın prevalansı % 12.2 olarak saptanmıştır⁴².

Bizim çalışmamızda tedavi açısından oldukça önemli olan ileri lezyon ve kanserden birincil olarak sorumlu olduğu ve diğerlerine kıyasla daha sık karşılaştığımız için sadece HPV tip 16 için tip ayrımı yapılırken, HPV 16 dışındaki tipler için sadece grup ayrımına gidilmiştir. En riskli ve en kanserojen olarak tanımlanan HPV tip 16'nın spesifik olarak tanımlanması çalışmamızın avantajlarından biridir. Ayrıca çalışmamızda HPV tip 16 dışındaki HPV'lerin tespiti yapılmasa da Real Time PCR yöntemi bize sekans analizi yaparak tip tanımlaması yapabilmemize olanak sağlar. Human papillomavirus DNA varlığını Real Time PCR metoduyla araştırdığımızda HPV tip 16 %8.7 ve HPV 16 dışındaki tiplerin prevalansı % 17.4 olarak saptanmıştır. Elde ettiğimiz veriler arasında istatistiksel olarak bir fark bulunamamıştır. Prevalanstaki farklılıklar çalışmanın yapıldığı popülasyonun özelliğine, örneklerin nasıl, ne zaman alındığına, nasıl saklandığına bağlı olarak değiştiği gibi HPV DNA varlığını tespitinde kullanılan yöntemle bağlı olarakta prevalans değişiklik göstermektedir. Ayrıca, çalışmamızda olgu sayısının az olmasının sonuçlarımızı etkilediğini düşünmekteyiz.

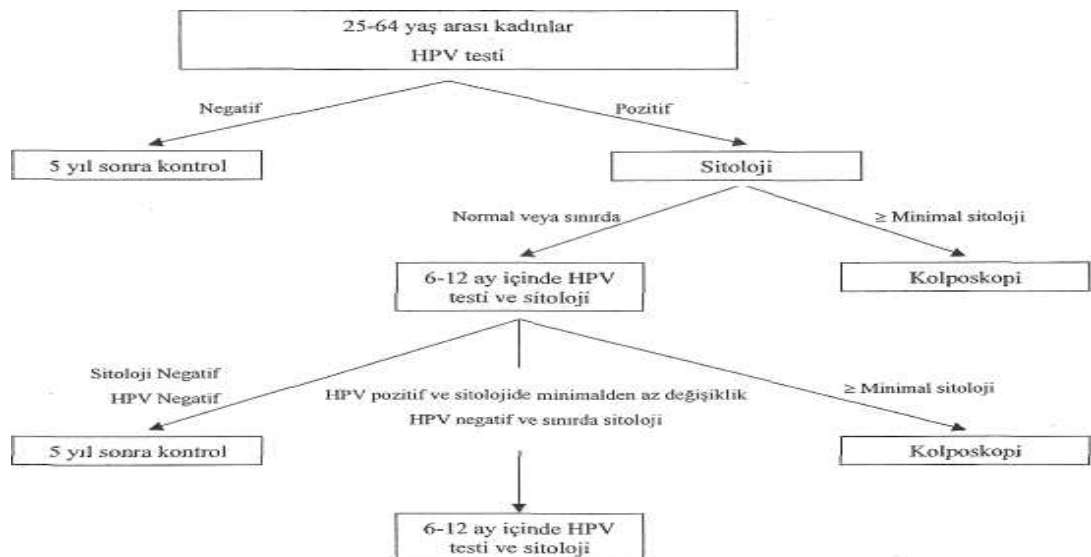
Kulasingam ve ark.'ları PAP smear testi ile ASCUS teşhisi almış kadınlarda HPV DNA testinin kullanılabilirliğini anlamak için CIN (I, II, III) veya servikal kanser tespitinde HPV DNA testinin performansını değerlendirmişler. Washington'da, 4075 kadının katıldığı çalışmada, alınan örneklerle PAP smear testi (thin-layer) ve HPV DNA tespiti için PCR ile HC uygulamışlar. CIN III ve servikal kanser prevalansı %3.2 olarak tespit etmişler. Servikal kanserli ve CIN III kadınların tespitinde kullanılan metodların sensitiviteyi kıyaslandığında en

yüksekten en düşüğe doğru; HC (%90.8), PCR (% 88.2), PAP smear testi (% 61.3) olarak bulmuş olmalarına karşın, spesivitelelerini ise PAP smear testi (% 82.4), PCR (% 78.8), HC (%72.6) şeklinde sıralamışlar. ASCUS veya daha ileri seviyeli lezyonu olan kadınların kolposkopi sonuçları HC ile elde edilen sonuçlarla kıyaslandığında, sensiviteleleri sırayla % 61.3 ve % 60.3 olup fark anlamlı olmasada, HC'nin spesivitesini (% 88.9) kolposkopiden (% 82.9) daha yüksek olarak tespit etmişler. Sonuç olarak; uygulanan HPV DNA testleri PAP smear testine göre 30 yaş ve üstü kadınlar için daha spesifik olmasına karşın düşük sensiviteye sahiptir. Human papillomavirus DNA testleri, tarama programlarının uzun aralıklarla veya düzenli olarak yapılmadığı yerlerde doğurganlık çağındaki kadınların sitolojik esaslı taranması yöntemine karşı iyi bir alternatif yöntem olarak kullanılabilir⁷⁹.

C uzick 2002 yılında “Klinik Çalışmalarda HPV Testinin Rolü” ismi ile yayınladığı derlemesinde HPV DNA tespitinde moleküler yöntemler ve sitolojik yöntemlerin her ikisinin sınırlılığından yola çıkarak kombine kullanılan tarama programının ancak başarı oranının yükseltilebileceğini bildirmiştir. Cuzick'e göre Tablo 10'da görüldüğü gibi 25-64 yaş grubundaki kadınların her beş yılda bir taranması esasına dayanan yeni bir tarama programı algoritması geliştirmiştir. Öncelikle HPV DNA testi uygulanır, pozitif çıktığı takdirde sitolojik muayene takiben kolposkopi uygulaması içeren yeni bir programdır (Tablo 10)³⁷.

Ancak bizim çalışmamızda bu algoritma takip edilmemiş olup öncelikle hastalara kolposkopi uygulanmış takibinde Real Time PCR ile HPV DNA varlığı araştırılmıştır.

Tablo 10. Yeni bir HPV ve sitolojik tarama programı algoritması



Adolesanlar HPV gibi seksüel geçişli enfeksiyonların en önemli risk grubunu oluşturmaktadır. Genital HPV prevalansı, viral tespitite kullanılan yöntem ve çalışılan populasyonun büyüklüğüne bağlı olarak, %10.9-43 arasında değişmektedir⁷⁹. Genital HPV enfeksiyonunun prevalansı adolesan çağıdaki genç kadınlarda en yüksek düzeyde ve hayatın beşinci dekadında %5'den az bir orana iner¹⁴³.

Amrani ve ark.'larının Faslı kadınlar ile yaptıkları bir çalışmada 147 hastadan alınan biyopsi örneklerinin %62'sinde HPV DNA varlığı tespit edilmiş. HPV varlığının yaş gruplarına dağılımını incelemişler 30-39 yaş grubunda HPV prevalansı artmaya başlarken 40-49 yaş grup kadınlarda ise prevalans %39.5 ile en yüksek seviyeye ulaşmış ve 60-69 yaş ve sonrası kadınlarda ise prevalansta belirgin bir düşüş gözlemişler. Sonuç olarak bu prevalans eğrisini Fas'ta genç hastaların düzenli kontrollere giderek jinekolojik muayaneleri ciddiye almalarıyla açıklamışlardır⁸.

Geniş çaplı populasyon çalışmaları 20-25 yaş grubu normal sitolojik smeare sahip kadınların neredeyse %20'sinde HPV DNA'sı tespit edilmiş. Bu kadınların %14 HPV tip 16'yı barındırmaktadırlar. Bu oran yaş artıkça azalmaktadır. Danimarkanın Deft bölgesinde normal sitolojili 35-50 yaş arası kadınlara yapılan tarama programı sonucunda HPV prevalansı %5 iken HPV 16 prevalansı ise %2 olarak bulunmuş¹²⁸.

Kaynak ve ark.'larının yaptıkları çalışmada; Digene Hibrid Yakalama I sistemiyle 450 kadının servikal sürüntü örneğinde HPV DNA varlığı araştırılmıştır. HPV DNA pozitiflerin yaş ortalaması 38.93 iken ise yaş ortalaması 37.06 olarak tespit etmişler ve pozitif ve negatif hasta grupları arasında yaş bakımından anlamlı bir farklılık bulunmadığını bildirmişlerdir⁶⁹.

Sellers ve ark.'larının yaptıkları bir çalışmada Kanadalı kadınlar arasında Hibrid Yakalama II testi ile HPV prevalansını yaş grupları ile ilişkili olarak değerlendirmişler. 955 kadının katıldığı çalışmada 15-19 yaş grubunda %15.7 olan prevalans artarak 20-24 yaş grubunda %24 ile en yüksek orana ulaşırken ilerleyen yaş ile görülme sıklığıda düşmekte olup sırasıyla 25-29 yaş grubunda %16,4, 30-34 yaş grubunda %12,3, 35-39 yaş grubunda %9,6, 40-44 yaş grubunda %8,3 ve 45-49 yaş grubunda %3,4 oranında HPV DNA pozitifliği bildirmişler¹¹⁴.

HPV prevalansı ile yaş grupları arasındaki ilişki değişken olup, HPV prevalansı direkt yaşa bağlı olmayıp yaşa ilişkin seksüel alışkanlıklarla ilişkilidir¹²⁷.

Bizim çalışmamızda Tablo.7'de özetlendiği gibi HPV tipleri yaş ile ilişkilendirildiğinde istatistiksel olarak değerlendirilememiştir. 20-24 yaş grubunda %50, 25-29 yaş grubunda %16.6, 30-34 yaş grubunda %16.6, 35-39

yaş grubunda %20, 40-44 yaş grubunda % 14.2, 45-49 yaş grubunda %38.8 ve 49< yaş grubunda ise %26.9 oranında HPV DNA varlığı tespit edilmiştir. Serviks kanserinin ortalama yaşı 52.2 dir, 35-39 yaşlar ve 45-64 yaşlar arasında iki pik dönemi vardır ^{8, 58, 67, 114}. Çalışmamız literatür ile uyumlu olup ilk pik 20-24 yaş kadınlarda ortaya çıkarken ikinci pik 45-49 yaş grubunda görülmektedir. HPV enfeksiyonları yaş parametresine göre oldukça değişkendir bunun en temel nedeni, seksüel alışkanlıkların toplumun sosyokültürel, ekonomik ve değer yargılarına bağlı aynı yaşa sahip kişilerin farklı cinsel eğilimleri ortaya çıkmaktadır. Ülkemizdeki prevalans değerinin Avrupa ülkelerine göre farklı oluşunu konservatif bir kültüre sahip olmamızla ilişkilendirebiliriz.

Kaynak ve ark.'larının, yayınladıkları çalışmada gebelik sayısı ile HPV DNA pozitifler ile negatifler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark bulamamışlardır ⁶⁹.

Sellers ve ark.'ları Hibrid Yakalama testi II testi ile HPV prevalansını canlı doğum sayısı ile ilişkili olarak değerlendirmişler. Üç ve daha fazla canlı doğum yapmış kadınlarda % 6,5 iken, iki canlı doğumu olan kadınlarda % 8,7, bir canlı doğum yapmış kadınlarda % 12,7 ve hiç canlı doğum yapmamış kadınlarda % 17,1 olarak tespit etmişler. Sonuç olarak canlı doğum sayısı ile HPV DNA pozitifliği arasında ters bir orantı tespit etmişlerdir ¹¹⁴.

Bizim çalışmamızda Tablo.6'da özetlendiği gibi HPV DNA varlığı ile gebelik sayısı arasındaki istatistiksel olarak değerlendirilememiştir. 2 ve daha az doğum yapmışlarda %24.4 oranında, 3-5 sayıda doğum yapan kadınlarda % 28.1 oranında ve 6-10 sayıda doğum yapmış kadınlarda ise % 33.3 oranında pozitiflik saptanmıştır. Bizim çalışmamızda elde edilen veriler literatür ile uyumlu olup, parite ile HPV enfeksiyonuna yakalanma riski arasında doğru bir orantılı bir ilişki olduğunu göstermektedir.

Servikal kanser gelişimi için en kuvvetli risk faktörlerinden biri seksüel partner sayısı ve partnerin HPV pozitif olmasıdır. Seksüel partner sayısı 20'den fazla olanlarda servikal kanser riski 5 kat artmaktadır ^{29, 43, 47, 58, 136}.

Kjaer ve ark.'larının yaptıkları bir çalışmada, servikal lezyon gelişiminin virjinlerde ve monogamik çiftlerde ilişki başlaması ile ortaya çıktığını ve partner sayısı artması ile de riskin arttığını bildirmiştir ^{69, 58}.

Ünsal ve ark.'larının yaptıkları çalışmada jinekoloji kliniğinde HPV enfeksiyonu tanısı konulan 44 kadının 44 erkek partneri çalışmaya alındığında, erkek partnerin %57'sinde HPV enfeksiyonu tespit edilmiştir. Sonuç olarak, HPV ile enfekte kadınların erkek partnerlerinin yarısından fazlasında HPV enfeksiyonu mevcut olduğunu, enfekte partnerlerin virus için bir enfeksiyon kaynağı görevi yaptığını bildirmişlerdir. Bu nedenle enfeksiyonun yok

edilebilmesi için eşlerin birlikte değerlendirilip tedavi edilmeleri gerektiğini saptamışlardır¹³⁷.

Schiff ve ark.'larının Hindistanda 326 kişinin katılımı ile yaptıkları çalışmada %34.3 oranında HPV DNA varlığı tespit edilmiş olup, bunun %56.3'ü evli veya partneri olan hastalar oluştururken %43.7'sini de bekâr (boşanmış, hiç evlenmemiş, eşinden ayrı) hastalar oluşturmuştur¹¹².

Çalışmamızda, Tablo.9'da özetlendiği gibi hastalar medeni durumların göre evli ve bekâr olarak gruplandırılarak, elde edilen veriler Real Time-PCR ile HPV DNA varlığı açısından karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak değerlendirme yapılamamıştır. Çalışmamızda %26.2 oranında HPV DNA varlığı tespit edilmiş olup, bunun %76'sını evli hastalar oluştururken %24'nü ise bekâr (boşanmış, hiç evlenmemiş, eşinden ayrı) hastalar oluşturmuştur. Kişilerin partner sayısını sorgulayamadığımız durumlar bu oranları açıklayabileceğini düşünmekteyiz. Toplum yapımızdan kaynaklı olarak görünürde evli olmak tek eşlilik olarak yorumlayabildiğimiz gibi, bekarlığında çok sayıda partner olarak yorumlayabiliriz. Yinede bu durum çelişkili olduğundan terside geçerli olabilir. Konservatif yaşam kültürümüz ve sosyo-kültürel yapımızdan dolayı kişiler partner sayısı konusunda daha tutucu davranmakta olup tek eşlilik yaygındır. Bu durumun Ülkemizdeki HPV prevalansının neden Avrupa'daki oranlardan oldukça farklı olduğuna açıklık getireceğini düşünmekteyiz.

Sellers ve ark.'larının Hibrid Yakalama testi ile yaptığı çalışmada, anormal sitolojik tanısı olan hastalarda %25,9 oranında pozitiflik saptanırken, daha önceki sitoloji raporu normal olan kadınlarda %9,2 oranında pozitiflik saptanmıştır¹¹⁴.

Kaynak ve ark.'larının yaptıkları çalışmada; Digene Hibrid Yakalama I sistemini uygulamışlardır. Anormal sitolojik bulgusu olan kadınların %25.3'ünde, normal sitolojik bulgusu olan kadınların ise %9.3'ünde HPV DNA'sına rastlamışlardır⁶⁹.

Fife ve ark.'larının, Hindistanda, yaptıkları bir çalışmada alınan servikovajinal lavaj örneklerine PCR uygulanmış anormal sitolojik bulgusu olan kadınların %35'inde normal sitolojik bulgusu olan kadınların ise %9'unda HPV tip 16 DNA'sına rastlamışlar⁵².

Çalışmamızda ASCUS, LSIL, CIN I, CIN II, CIN III olarak bildirilen hastalar PAP smear testi patolojik grupta ele alınırken herhangi bir patoloji bildirilmemiş olan hastalar ise PAP smear test normal grup olarak çalışılmıştır. PAP smear test sonucu patolojik olan hastalardaki HPV prevalansı (%31) diğer gruplara göre yüksek olup, HPV 16 dışındaki tiplerin prevalansı %20.6, HPV tip 16 prevalansı % 10.3 oranında olarak saptanmış ve sonuçlarımız

literatürle uyumludur. Çalışmamız, HPV prevalansı ile PAP smear test sonucu arasında yakın bir ilişki olduğunu göstermektedir.

Çalışmamızda, Tablo.8’de özetlendiği gibi PAP smear test sonucu normal olan hasta grubunda HPV tip 16 prevalansı %5.8 iken, PAP smear test sonucu patolojik olan hasta grubunda ise %10.3 oranında tespit edilmiştir. Bu durum PAP smear testinin patolojik olması ile HPV tip 16’nın prevalansı arasında yakın bir ilişki olduğunu göstermektedir. Çalışmamız literatür ile uyumludur. Ayrıca oranlardaki farklılık PAP smear test sonuçlarının yanlış yorumlanmasından veya smear alımındaki dikkatsizlikten kaynaklanabilir.

2005 yılında Dünya Sağlık Örgütünün Asya, Afrika, Avrupa ve Amerika kıtalarındaki ayrı 10 ülkede yaptığı çalışma neticesinde yayınladığı HPV raporuna göre servikal karsinomlardaki en önemli etken HPV tip 16 ve HPV tip 18 olup sırayla görülme sıklıkları; %25.7-73.5 Asya, %17-67.6 Afrika, %64.4-71.5 oranında ise Avrupa ve Amerika’dır. Yapılan araştırmada HPV enfeksiyonunun prevalansı %1.4 Barselona (İspanya), %1.6 Hanoi (Viyetnam), %25.6 Nijerya şeklinde ülkeler arasında yaklaşık 20 kat oranında bir çeşitlilik göstermiştir. En yüksek HPV prevalansa Afrikada en düşük prevalansa ise Çin’de rastlamışlar. Aynı zamanda HPV prevalansı ülkedeki şehirlere göre de farklılık göstermiş örneğin; Viyetnam’da Ho Chi Minh şehrinde HPV enfeksiyonu ve servikal kanser prevalansı Hanoi kentinden 6 kat kez daha büyüktür. HPV prevalansının ülkeler hatta aynı ülkedeki şehirlerarasında dahi değişiklik göstermesindeki en önemli sebepler; kültürel farklılıklar, hızlı değişen sosyal yaşam veya kentleşme, seksüel alışkanlıklar, tarihsel geçmiş, dini inançlar gibi çeşitli faktörlere bağlı olarak değişmektedir. Ülkemizdeki HPV tipleri ve neden olduğu hastalıklar konusunda yeterli veri bulunamamasına rağmen bazı epidemiyolojik çalışmalarda HPV prevalansı %12-23.3 olarak tespit ederken, servikal kanserli olgularla yapılan çalışmalarda ise, HPV tip 16’nın prevalansı %18.2-83.3 olarak tespit edilmiştir. HPV prevalansı düşük olan Çin, Moğolistan ve Türkiye özellikle hızlı değişen yaşam tarzı, sosyokültürel yapının değişmesi, kentleşmeden dolayı prevalans hızının artması açısından oldukça risk altında olan ülkelerdir^{8, 42, 49, 57, 69, 102, 134, 143}.

HPV ile ilgili bilgilerimiz yeterli olmayıp, popülasyondaki HPV tiplerinin dağılımının bilinmesi ve her bir tipin ayrıntılı olarak tanımlanması gerekmektedir²⁶.

6.SONUÇ

Bu gün dünyada her iki dakikada bir kadının ölümüne neden olan serviks kanseri, değişen yaşam koşulları ve kısıtlı kaynaklar nedeniyle ülkemiz içinde artık önemli bir sağlık problemidir. Bu durum bizleri teşhis koymada daha duyarlı, daha ekonomik, kullanım kolaylığına sahip yeni yöntemleri araştırmaya itmektedir.

DNA testleri son yıllarda oldukça yaygın kullanıma sahip olan fakat henüz yeteri kadar geliştirilemediğinden tek başına teşhis koymada yeterli değildir. Birçok yöntemle HPV DNA varlığı araştırılmıştır. Çalışmamızda, bir DNA testi olan Real Time PCR yöntemi ile kolposkopi hastalarında HPV DNA prevalansı ve tedavi açısından oldukça önemli olan ileri lezyonlar, servikal kanserden birinci dereceden sorumlu olduğu ve diğer HPV tiplerine kıyasla daha sık karşılaştığımız için HPV tip 16 prevalansı araştırılmıştır.

Çalışmamıza araştırmaya katılan hasalardan yaş, gebelik sayısı, PAP smear testi sonucu ve medeni durum ile ilgili bilgi alınarak ve kolposkopik bulguları ile HPV ve HPV tip 16 prevalansı arasındaki ilişki incelenmiştir. Medeni durum ve PAP smear test sonucu ile HPV ve HPV tip 16 arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamamasına rağmen; kolposkopi grubu ile HPV ve HPV tip 16 arasında istatistiksel olarak kontrol grubundan kaynaklı anlamlı bir fark bulunmuştur. Yaş grupları ve gebelik sayısı ile HPV ve HPV tip 16 arasındaki ilişki gözlerdeki "0" değeri nedeniyle istatistiksel olarak değerlendirilememiştir. Çalışmamızda gösterilemese de genel olarak yaş, medeni hal, gebelik sayısı gibi kriterlerin servikal kanser gelişimine yardımcı faktörler olarak kabul görmektedir.

Real Time PCR, klasik PCR yöntemlere kıyasla güvenilir, kontaminasyon ihtimali düşük, spesivite ve sensitivite oranı yüksek bir yöntem olup gerçekçi tanı imkânı sağlamaktadır. Aynı anda birçok tipin ayırımına olanak sağlayarak PCR'a göre maliyetide düşürmektedir. Geniş bir uygulama alanı olup HPV dışında başka etkenlerin tespiti için de kullanılabilir. Ayrıca; oldukça esnek bir yöntem olduğu için bir HPV tipini veya tüm HPV tiplerinin tespiti için özel olarak düzenleme olanağı vermektedir. Şüpheli olgularda aynı anda HPV tip 16'nın ve diğer HPV tiplerinin tayinine olanak sağlayarak maliyeti oldukça düşüren bir yöntem olup, öncül lezyonlar ve servikal kanserin teşhis ve prognozu hakkında fikir verdiği için, rutin kullanımda faydalı olacağı kanısındayız.

Real Time PCR üstün bir yöntem olup, geliştirilmesi için daha ileri bilimsel araştırmalara ihtiyaç olduğunu düşünmekteyiz.

7.ÖZET

Servikal kanser dünya için önemli bir sağlık problemi olup mortalitenin önemli bir nedenidir. Skuamöz servikal kanserin % 84-100'den HPV sorumludur. Servikal kanserin potansiyel olarak önlenebilir olması nedeniyle, servikal kanser risk faktörleri hakkında kişilerin bilgilendirilmesi, premalign lezyonların erken tanı ve tedavisi prognozu etkileyecek en önemli faktörlerdir.

Hastanemiz olan Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'na adet düzensizliği, disüri, vaginal akıntı, bel ve kasık ağrısı, postkoital kanama şikâyetleriyle polikliniğe başvurmuş hastalara uygulanan fizik muayenelerinin değerlendirilmesi ile kolposkopi uygulanmaya karar verilen 60 hastada kolposkopik muayeneye alınmıştır. Kolposkopi uygulanma sırasında hastalardan servikal sürüntü örneği alınmıştır. Çalışma grubu kolposkopik bulgulara göre 30 kolposkopi pozitif, 30 kolposkopi negatif grup olarak ayrılmıştır. HPV'nin neden olduğu şikâyetlerle direkt ilişkili olmaksızın memede kitle, çocuk istemi, disüri, vaginal akıntı, menapoz kontrolü, rutin kontrol veya genel tarama gibi sebeplerle polikliniğe gelen 20 kişiden bir kontrol grubu oluşturulmuş ve hastalardan servikal sürüntü örnekleri alınmıştır.

Servikal kanserle çok yakın ilişkili olduğu için yüksek riskli grup olan HPV tip 16 ve diğer HPV tipleri Real Time PCR yöntemi ile araştırılmıştır. Serviks kanseri etiolojisinde önemli risk faktörleri olarak tanımlanan yaş, gebelik sayısı, medeni durum, anormal kolposkobik bulgular, PAP smear test sonucu ile HPV prevalansı Real Time PCR yöntemi ile araştırılmıştır.

Çalışmamızda HPV varlığı ve HPV tip 16 prevalansı tespit edilerek elde edilen sonuçların yaş, gebelik sayısı, medeni durum, anormal kolposkobik bulgular, PAP smear sonuçları gibi parametrelerle ilişkisi istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

Bizim çalışmamızda kolposkopi negatif grupta Real Time PCR ile HPV tip 16 % 6.7, Tip 16 dışı tipler % 16.6 oranında pozitif bulunmuştur. Kolposkopi pozitif grupta ise Real Time PCR ile HPV tip 16 % 6.7 iken HPV tip 16 dışı tipler % 6.7 oranında pozitif bulunmuş. Kontrol grubunda da Real Time PCR ile HPV tip 16 % 15, HPV tip 16 dışı tipler % 35 oranında pozitif bulunmuştur. Kolpskopi grubu ile HPV ve HPV tip 16 arasında istatistiksel olarak kontrol grubundan kaynaklı güçlü bir ilişki vardır.

Medeni durum ve PAP smear test sonucu ile HPV ve HPV tip 16 arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamamıştır.

Yaş ve gebelik sayısı ile HPV ve HPV tip 16 arasındaki ilişki istatistiksel olarak değerlendirilememiştir.

Kolposkopik bulgular ile HPV prevalansı arasında oldukça güçlü bir ilişki vardır. Real Time PCR sensitivitesi yüksek bir yöntem olmasına rağmen geliştirilmesi için daha ileri bilimsel araştırmalara ihtiyaç vardır.

8.SUMMARY

Determination of HPV and HPV type 16 by Real-Time PCR of women referred to colposcopy

Cervical cancer, which is a severe health problem in the world, is an important reason of mortality. HPV are the cause of 84-100% of Skuamöz cervical cancers sorumludur. Cervical cancer is potentially preventable thus, providing information for the people on cervical cancer risk factors as well as early diagnosis and treatment of the premalign lesions are important factors to affect prognosis.

Following the evaluation of the physical examination of the patients who applied to Gynecology and Maternity Department of Gazi University Medical School Hospital with complaints such as irregular menstruation, disüri, vaginal discharge, pain in waist and crotch, postkoital bleeding, it was decided to apply colposcopy on 60 patients. During the colposcopy, cervical smear samples were from the patients. According to the coloscopic findings from the study group, the study group was divided as 30 patients coloscopy positive and 30 patients coloscopy negative. A control group was established from 20 patients applied to the polyclinics with reasons different from HPV complaints, but complaints about breast mass and vaginal discharge as well as pregnancy demand, disüri, with the aim of menopause control, routine control and general scanning.

Because they have close relation with cervical cancer, high risk group HPV type 16 and other types of HPV were analysed by using Real Time PCR method. Factors such as age, number of pregnancies, marital status, abnormal coloscopic findings, smear results and HPV prevalence is analysed by using PCR method.

In our studies, prevalence of HPV and type HPV 16 have been determined. The relation of the findings with the parameters such as age, number

of pregnancies, marital status, abnormal coloscopic diagnoses, smear results have been statistically evaluated.

In our studies, HPV type 16 was found 6.7% types other than HPV type 16 was found 16.6% positive in coloscopy negative groups with Real Time PCR method. HPV type 16 was found 6.7% types other than HPV type 16 was found 16.6% positive in coloscopy positive groups with Real Time PCR method. In the control group, HPV type 16 was found 15% types other than HPV type 16 was found 35% positive with Real Time PCR method. There is a statistically strong association between coloscopy groups and HPV, HPV type 16, types other than HPV type 16 because of coloscopy positive groups.

There was not a statistically association between marital status, PAP smear results and HPV, HPV type 16, types other than HPV type 16.

It was not statistically evaluated association between age, number of pregnancies and HPV, HPV type 16, types other than HPV type 16.

There was a strong association between coloscopic findings with prevalence of HPV. Real Time PCR which need advance researched is a high sensitivity method.

9.KAYNAKLAR

1. [Abramson AL](#), [Steinberg BM](#), [Winkler B](#), et al. Laryngeal papillomatosis: clinical, histopathologic and molecular studies. [Laryngoscope](#) 1987; 97(6): 678-85.
2. Adam E, Berkova Z, Daxnerova Z, Icenogle J, Reeves WC, Kaufman RH, et al. Paapillomavirus detection: Demographic and behavioral characteristics influencing the identification of cervical disease. American Journal of Obstetrics and Gynecology. 2000; 182: 257-264.
3. Adams M, Borysiewicz L, Fiander F, et al. Clinical studies of human papilloma vaccines in pre-invasive and invasive cancer. Vaccine 2001;19: 2549-56.
4. Agency for Health Care Policy and Research. The summary evidence report/technology assessment number 5: Evaluation of cervical cytology. Rockville: AHCPR Publication; 1999.

5. Akan E. Genel ve Özel Viroloji. 3. nd ed. İzmir: Saray Medikal Yayıncılık Tic.Ltd.Şti. 1994.
6. American Cancer Society. Cancer facts and figures 2005. Atlanta, GA: American Cancer Society; 2005.
7. Ammatuna P, Giovannelli L, Giambelluea D, Mancuso S, Rubino E, Colletti P, Mazzola G, Belfiore P, Lima R, et al. Presence of human papillomavirus and Epstein- barr virüs in the cervix of women infected with the human immunodeficiency virüs. J Med Virol 2000; 62: 410-415.
8. Amrani M, Lalaoui K, El Mzibri M, Lazo P, Belabbas M A, et al. Molecular detection of human papillomavirus in 594 uterine cervix samples from Moroccan women (147 biopsies and 447 swabs). Journal of Clinical Virology 2003; 27: 286-295.
9. Akhan SE. Ülkemizde servikal kanser epidemiyolojis ve HPV serotipleri, ANKEM Derg 2007; 21: 96-98.
10. Arvas M, Gezer A, et al. Human papillomavirus vaccines, J Turkish-German Gynecol Assoc 2006; 7: 250-255.
11. Atasü T, Aydınli K, editors; Jinekolojik Onkoloji. 2 nd ed. İstanbul: Logos Yayıncılık Tic.Ltd.Şti. 1999.
12. Atasü T, Aydınli K. Jinekoloji ve obstetrik pratiğinde kolposkopi. In: Atasü T, Aydınli K, editors. Jinekolojik Onkoloji. 1 nd ed. İstanbul: Logos Yayıncılık Tic.Ltd.Şti; 1996.p.13-211.
13. Ayhan A. Temel kadın hastalıkları ve doğum bilgisi. In: Kışnişçi HA, editors. Jinekolojik Onkoloji. 6 nd ed. Ankara: Güneş Kitabevi; 1996.p.851-957.
14. Balakrishnan L, Clauson R, Weiland T, Bianco M, Milavetz B, et al. Sexually transmitted human papillomavirus type variations resulting in high grade cervical dysplasia in north-east north dakota and north-west minnesota. Virology Journal 2006; 3: 46-50.
15. Barrasso R, de Brux J, Croissant O, et al: High prevalence of papillomavirus-associated penile SIL in sexual partners of women with cervical SIL. N Engl J Med 1987; 317: 916-923.
16. Benedet JL. Progress in gynecologic cancer detection and treatment. International Journal of Gynecology and Obstetrics 2000; 70: 135-147.

17. Berchuck A, Rodriguez G, Kamel A, Soper JT, Clarke-Pearson DL, Bast RC, et al. Expression of the epidermal growth factor receptor and her-2/neu in normal and neoplastic cervix, vulva and vagina. *Obstet and Gynecol* 1990; 71: 381-387.
18. Bilir N. Serviks kanseri kontrolü çalışmaları ve HPV aşısı, Halk Sağlığı Uzmanları Derneği Teknik Raporları No: 03 / 2007 [online]. 2007 [09.08.2007]. Available from: URL:<http://www.hasuder.org/doc/teknikrapor%5B1%5D.03.07HPV.doc>
19. Bodaghi S, Wood LV, Roby G, Ryder C, Steinberg SM., Zheng Z, et al. Could Human papillomaviruses be spread through blood?. *J Clin Microbiol* 2005; 43 (11): 5428–5434.
20. Bonnez W. Papillomavirus. In: Richman DD, Whitley RJ, Hayden FJ, editors. *Clinical Virology*. 2nd ed. Washington: American Society for Microbiology Press; 2002.p.557-596.
21. Bosch FX, Munoz N, Sanjose S, et al. Human papillomavirus and other risk factors for cervical cancer. *Biomed and Pharmacother* 1997; 51: 268-275.
22. Bosch FX, Munoz N, et al. The viral etiology of cervical cancer. *Virus Res* 2002; 89: 90-183.
23. Bovicelli A, Bristow RE, Montz FJ, et al. HPV Testing: Where are we now?. *Anticancer Research* 2000; 20: 4673-4680.
24. Brennan MM, Lambkin HA, Sheehan CD, Ryan DD, O'Connor TC, Kealy WF, et al. Detection of high-risk subtypes of human papillomavirus in cervical swabs: routine use of the Digene Hybrid Capture assay and Polymerase Chain Reaction assay. *British Journal of Biomedical Science* 2001; 58: 24-29.
25. Breitburd F, Kirnbauer R, Hubbert NL, et al. Immunization with viruslike particles from cottontail rabbit papillomavirus (CRPV) can protect against experimental CRPV infection. *J Virol* 1995; 69: 3959-3963.
26. Brown DR, Bryan JT, Cramer H, Fife KH, et al. Analysis of human papillomavirus types in exophytic condylomata acuminata by hybrid capture and southern blot techniques. *J. Clin. Microbiol.*1993; 31: 2667-2673.
27. Bryant-Greenwood P. Molecular diagnostics in obstetrics and gynecology. *Clinical Obstetrics and Gynecology* 2002; 45: 605-621.
28. Bulay OM. Tümör bilimi ders kitabı. 1 nd ed. Ankara: Antıp A. Ş; 1995.
29. Burd EM. Human papillomavirus and cervical cancer. *CMR* 2003; 16:1-34.

30. Carozzi F, Ronco G, Confortini M, Noferini D, Maddau C, Ciatto S, Segnan N, et al. Prediction of high-grade cervical intraepithelial neoplasia in cytologically normal women by human papillomavirus testing. *British Journal of Cancer* 2000; 83: 1462-1467.
31. Cates W. The American Social Health Association Panel. Estimates of the incidence and prevalence of sexually transmitted diseases in the United States. *Sex Transm Dis* 1999; 26: 52–57.
32. Ceyhan M. İnsan papilloma virusu (HPV) aşısı uygulamasında ülkemizde mevcut problemler. *ANKEM Derg* 2007; 21: 102-104.
33. Ceylan A, Ertem M, Kilinc N, Uzunlar A.K, Özkaynak V, et al. An implementation for integration of cervical smear screening with family planning services in the district of Diyarbakir province of Turkey 2001. *Middle East Journal of Family Medicine* 2005; 3: 1-8.
34. Chambers SK. Gynecologic cancer. In: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA editors. *Cancer: principles and practice of oncology*. 5 nd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 1997.p.1427–1433.
35. Chellapan S, Kraus VB, Kroger B, et al. Adenovirus E1A, simian virus 40 tumor antigen and HPV E7 protein share the capacity to disrupt the interaction between transcription factor E2F and the retinoblastoma gene product. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 45–49.
36. Chimera JA, Anderson SM, Noell H, Rizk V, et al. Comparison of nucleic acid hybridization and cytologic examination for detection of human papillomavirus infection, with evaluation of two commercially available hybridization kits. *Clin Chem* 1991; 37 (2): 260-262.
37. Cuzick J. Role of HPV testing in clinical practice. *Virüs Research* 2002; 89: 263-269.
38. Cuzick J, Sasieni P, Davies P, Adams J, Normand C, Frater A, Ballegooijen M, Akker E, et al. A systematic review of the role of human papillomavirus (HPV) testing within a cervical screening programme: summary and conclusions. *British Journal of Cancer* 2000; 83: 561-565.
39. Da Silva DM, Eiben GL, Fausch SC, Wakabayashi MT, Rudolf MP, Velders MP, Kast WM, et al. Cervical cancer vaccines: emerging concepts and developments. *Journal of Cellular Physiology* 2001; 186: 169-182.

40. Davies P, Kornegay J, Iftner T, et al. Current methods of testing for human papillomavirus. *Best Practice and Research Clinical Obstetrics and Gynaecology* 2000; 15: 677-700.
41. Delmas MC, Larsen C, van Benthem B, Hamers FF, Bergeron C, Poveda JD, Anzen B, van den Hoek A, Meier F, Pena JM, Savonius H, Sperandeo D, Suligoi B, Vernazza PL, Brunet JB, et al. Cervical squamous intraepithelial lesions in HIV-infected women: prevalence, incidence and regression. *European Study Group on Natural History of HIV Infection in Women. AIDS* 2000; 14: 1775-1784.
42. Dinç B. Kolposkopi uygulanan hastalarda Real-Time PCR ile Human papillomavirus (HPV) tanısı. *Uzmanlık Tezi. Ankara: Gazi Üniversitesi; 2005.*
43. Disaia PJ, Creasman WT. *Klinik jinekolojik onkoloji: Ayhan A, editors. 6 nd ed. Ankara: Güneş Kitabevi; 2003.p.3-61, 633.*
44. Eileen M, Henry B, et al. Human papillomavirus and cervical cancer, *Clinical Microbiology Reviews* 2003; 16: 1–17.
45. Eppel W, Worda C, Frigo P, Ulm M, Kucera E, Czerwenka K, et al. Human papillomavirus in the cervix and placenta. *Obstet Gynecol* 2000; 96: 337-341.
46. Erdem K. Servikovajinal smear sonuçları premalign tanısı alan olgularda kolposkopik tanı ve tedavi sonuçlarının değerlendirilmesi. *Uzmanlık Tezi. İstanbul: Sağlık Bakanlığı İstanbul Bakırköy Kadın Doğum ve Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi; 2005.*
47. Erkılnçoğlu M. Endometriyum karsinomunun tanısında histeroskopinin yeri. *Uzmanlık Tezi. İstanbul: TC Sağlık Bakanlığı Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniği; 2004.*
48. Erkmen E, Şimşek M, Sapmaz E, et al. Bölgemizdeki serviks kanseri vakalarında HPV 16 ve 18 genomlarının PCR yöntemi ile araştırılması. *Jinekolojik Onkoloji Dergisi* 2002;5: 75-9.
49. Farthing A, Masterson P, Mason WP, Vousden KH, et al. Human papillomavirus detection by Hybrid Capture and its possible clinical use. *J Clin Pathol* 1994; 47: 649-652.
50. Feng Q, Kiviat NB. Human papillomavirus. In: Murray PR, editors. *Manual of clinical microbiology. 8 nd. ed. Washington: Washington DC 2003.p.1512-1523.*

51. Fife KH, Gramer HM, Schroeder JM, Brown DR, et al. Detection of multiple Human papillomavirus types in the lower genital tract correlates with cervical dysplasia. *Journal of Medical Virology* 2001; 64: 550-559.
52. Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM, et al. *Globocan 2002 cancer incidence. Mortality and prevalence worldwide*, IARC Cancer Base No.5 version 2.0. Lyon: IARC Pres; 2004.
53. Franco LE, Duarte-Franco E, Ferenczy A, et al. Cervical cancer: epidemiology, prevention and the role of human papillomavirus infection. *CMAJ* 2001; 164: 1017-1025.
54. Garcia F, Barker B, Santos C, Brown EM, Thomas N, Anna G, John D, et al. Cross-sectional study of patient- and physician-collected cervical cytology and Human papillomavirus. *Obstet Gynecol* 2003; 102: 226-272.
55. Garland SM, Faulkner-Jones BE, Fortune DW, Quinn MA, et al. Cervical cancer- what role for human papillomavirus?. *The Medical Journal Of Australia* 1992; 156: 204-212.
56. Grce M, Husnjak K, Bozиков J, Magdic L, Zlacki M, Lukac J, Fistic I, Sikanic N, Pavelic K, et al. Evaluation of genital human papillomavirus infections by polymerase chain reaction among croatian women. *Anticancer Research* 2001; 21:579-584, 127: 940-945.
57. Güner H, Taşkıran Ç, et al. Serviks kanseri epidemiyolojisi ve human papillomavirüs, 2007; 4: 11-19.
58. Harald zur Hausen. Papillomavirusus and cancer: from basic studies to clinical application. *Nature Publishing Group* 2002; 2: 342-350.
59. Harper DM, Franco EL, Wheeler C, et al. GlaxoSmithKline HPV vaccine study group. Efficacy of a bivalent L1 virus-like particle vaccine in prevention of infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: a randomised controlled trial. *Lancet* 2004; 364: 1757-65.
60. Hills E, Lavery CR, et al. Elektron mikroskopy of cells showing viral cytopathic effects in selected koilocytotic cells in a routine cervical smear. *Acta Cytol* 1979;23: 53-56.
61. Hubbard RA. Human papillomavirus testing methods. *Arch Pathol Lab Med*. 2003; 127: 940-945.

62. Infanolino C, Fabris P, Infanolino D, Biasin M R, Venza E, Tositti G, Minucci D, et al. Usefulness of human papillomavirus tesling in the screening of cervical cancer precursor lesions: a retrospective study in 314 cases. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology* 2000; 93: 71-75.
63. Jacobs MV, Walboomers JMM, Beek J, Voorhorst FJ, Verheijen RHM, Meijer CM, Brule AJC, Holmerhorst TJM, Snijders PJF, et al. A quantitative Polymerase Chain Reaction-enzyme immunoassay for accurate measurements of Human papillomavirus type 16 DNA levels in cervical scrapings. *British Journal of Cancer* 1999; 81: 114-121.
64. Jacobson DL, Womack SD, Peralta L, Zenilman JM, Feroli K, Maehr J, Daniel RW, Shah KV, et al. Concordance of human papillomavirus in the cervix and urine among inner city adolescents. *The Pediatric Infectious Disease Journal* 2000; 19: 722-727.
65. [Jemal A](#), [Thomas A](#), [Murray T](#), [Thun M](#), et al. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2002; [52 \(1\): 6-7](#).
66. Jonatan S.B. Novak Jinekoloji: 13 nd ed. Ankara: Nobel Tıp Kitabevi 2004.
67. Jones C. Cervical cancer: is Herpes simplex virus type 11 a cofactor?. *Clin Microbiol Rev* 1995; 8: 549-556.
68. Kaynak F, Türet S, Kadioğlu İ, Taner Z, Memiş L, et al. Servikal örneklerde karsinojenik human papillomavirus tiplerinin hibrit capture yöntemi ile araştırılması ve diğer parametrelerle kıyaslanması. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2004; 34: 107-113.
69. Kelley MK, Keiger KE, Lee CJ, Huibregtse JM, et al. The global transcriptional effects of the human papillomavirus E6 protein in cervical carcinoma cell lines are mediated by the E6AP ubiquitin ligase. *J Virol* 2005; 79: 3737–3747.
70. Kessler I. Venereal factors in human cervical cancer. *Cancer* 1977; 39: 1912–1919.
71. Kısa ürün bilgileri [online]. 2006 [09.08.2007]. Available from: URL: <http://www.İegm.Gov.Tr/Fiyatlandırma/Documents/K%C3%9cb%20gardas%C4%B0l.Pdf>
72. Kim JJ, Wright TC, Goldie SJ. Cost-effectiveness of alternative triage strategies for atypical squamous cells of undetermined significance. *JAMA* 2002; 287: 82-90.

73. Kjaer SK, Chackerian B, Van-Den Brule AJC, Svare EI, Paull G, Walbomers JMM, Schiller JT, Bock JE, Sherman ME, Lowy DR, Meijer CLM, et al. High-risk Human papillomavirus is sexually transmitted: evidence from a follow-up study of virgins starting sexual activity (intercourse). *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev* 2001; 10: 101-106.
74. Klingelutz AJ, Foster SA, Mc Dugall JK, et al. Telomerase activation by E6 gene product of HPV type 16. *Nature* 1996; 380: 79–82.
75. Koutsky LA. Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *American Journal of Medicine* 1997; 102: 3-8.
76. Koytsky LA, Kiviat N, et al. Genital papillomaviruses. In: Holmes K, Mardh P, Sparling P, editors. *Seksuually transmitted disease*. New York: McGraw-Hill; 1999.p. 347-360.
77. Koutsky LA, Wolner-Hanssen P, et al. Genital papillomavirus infections: current knowledge and future prospects. *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America* 1989; 16: 541-564.
78. Kulasingam SL, Hughes JP, Kiviat NB, Mao C, Weiss NS, Kuypers JM, et al. Evaluation of human papillomavirus testing in primary screening for cervical abnormalities: comparison of sensitivity, specificity, and frequency of referral. *JAMA* 2002; 288: 1749-1757.
79. Mackay IM, Katherine AE, Nitsche A, et al. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res* 2002; 15: 1292–1305.
80. Malloy C, Sherris J, Herdman C, et al. HPV DNA testing: technical and programmatic issues for cervical cancer prevention in low-resource settings. *PATH* 2000: 1-24.
81. Maria TS, Paola L, Elvira B, Patrizia DO, Laura Z, Francesca MC, Patrick M, Rita P, Michela S, et al. Comparison of the digene hc2 assay and the roche amplicor Human papillomavirus (HPV) test for detection of high-risk hpv genotypes in cervical samples. *Journal of Clinical Microbiology* 2006; 44: 2141–2146.
82. Massimi P, Banks L, et al. Repression of p53 transcript oral by the HPV E7 proteins, *Virology* 1997; 227: 255-259.

83. Matos E, Loria D, Amestoy GM, Herrera L, Prince MA, Moreno J, Kranfly C, Van-Den Brule AJC, Meijer CJL M, Munoz N, Herrero R, et al. Prevalence of Human papillomavirus Infection among women in Concordia, Argentina: a population-based study. *Sexually Transmitted Diseases*. Lippincott 2003; 27: 593-599.
84. Mc Murray HR, Nguyen D, Westbrook TF, Mcance D, et al. Biology of Human papillomaviruses. *International Journal of Experimental Pathology* 2001; 82: 15-33.
85. Michael P. PCR screening for human papillomavirus infections, and evaluation of the estimated infection prevalence for a population of females. degree of Master. Ontario: School of Graduate Studies Laurentian University; 1999.
86. Milde-Langosch K, Riethdorf S, Löning T, et al. Association of human papillomavirus infection with carcinoma of the cervix uteri and its precursor lesions: theoretical and practical implications. *Virchows Arch* 2000; 437: 227-233.
87. Miwa K, Miyamoto S, Kato H. The role of p53 inactivation in human cervical cell carcinoma development. *Oncogene* 1995; 10: 219-222.
88. Moberg M, Gustavsson I, Gyllenstein U et al. Real-Time PCR-based system for simultaneous quantification of Human papillomavirus types associated with high risk of cervical cancer. *Journal of Clinical Microbiology* 2003; 41: 3221-3228.
89. Monk BJ, Wiley DJ. Human papillomavirus infections: truth or consequences. *Cancer* 2004; 100: 225-227.
90. Monsonego J, Bosch FX, Coursaget P, Cox JT, Franco E, Frazer I, Sankaranarayanan R, Schiller J, Singer A, Wright T, Kinney W, Meijer C, Linder J, et al. Cervical cancer control, priorities and new directions. *Int J Cancer* 2004; 108: 329-333.
91. Moscicki AB. Human papillomavirus infections. *Advances in Pediatrics* 1992; 39: 257-281.
92. Moscicki AB. Human Papillomavirus infection in adolescents. *Pediatric Clinics of North America* 1999; 46: 783-807.
93. Mouron SA, Abba MC, Güerci A, Gomez MA, Dulout FN, Golijow CD, et al. Association between activated K-ras and c-erbB-2 oncogenes with "high risk" and "low risk" Human papillomavirus types in preinvasive cervical lesions. *Mutation Research* 2000; 469: 127-134.

94. Muderspach L, Wilczynski S, Roman L, Bade L, Felix J, Small LA, Kast WM, Fascio G, Marty V, Weber J, et al. A phase 1 trial of a Human papillomavirus (HPV) peptide vaccine for women with high-grade cervical and vulvar intraepithelial neoplasia who are HPV 1 positive. *Clinical Cancer Research* 2000; 6: 3406-3416.
95. Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, et al. For the international agency for research on cancer multicenter cervical cancer study group. epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003; 348: 518–527.
96. Murray P R, Rosenthal K S, Kabayashi G S, Pfaller M A: *Papovaviruses: Medical Microbiology*. Murray P R, Rosenthal K S, Kabayashi G S, Pfaller M A (ed), USA 2002, S. 458-466.
97. Murray CJL, Lopez AD, et al. *Global health statistics*. Harvard School of Public Health on behalf of WHO and the World Bank, (Global Burden of Disease and Injury Series). Boston: Mass; 1996.
98. [Onan MA](#), [Taskiran C](#), [Bozdayi G](#), [Biri A](#), [Erdem O](#), [Acar A](#), [Gunaydin G](#), [Rota S](#), [Ataoglu O](#), [Guner H](#), et al. Assessment of human papilloma viral load of archival cervical intraepithelial neoplasia by real-time polymerase chain reaction in a Turkish population. *Eur J Gynaecol Oncol* 2005; 26 (6): 632-5.
99. Perrons C, Kleter B, Jelley R, Mal H, Quint W, Tedder R, et al. Detection and genotyping of Human papillomavirus DNA by SPF10 and MY09/11 primers in cervical cells taken from women attending a colposcopy clinic. *Journal of Medical Virology* 2002; 67: 246-252.
100. Plummer M. International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer, Cervical carcinoma and reproductive factors: collaborative reanalysis of individual data on 16,563 women with cervical carcinoma and 33,542 women without cervical carcinoma from 25 epidemiological studies. *Int J Cancer* 2006; 119: 1108-24.
101. Polat A, Aydın Ö, Düşmez D, et al. Mersin ilinde 1989-1999 yılları arasında görülen kadın genital sistem tümörlerinin dağılımının değerlendirilmesi. *Türk Patoloji Derg* 2000; 16: 34-8.
102. Puranen M, Syrjänen K, Syrjänen S, et al. Transmission of genital human papillomavirus infections is unlikely through the floor and seats of humid dwellings in countries of high-level hygiene. *Scand J Infect Dis* 1996; 28(3): 243-246.

103. Rader JS, Gerhard DS, Sullivan MJ, Li Y, Li L, Liapis H, Huettner PC, et al. Cervical intraepithelial neoplasia iii shows frequent allelic loss in 3p and 6p. *Cancer* 1998; 22: 57-65.
104. Reid R, Campion MJ, et al. The biology and significance of Human papillomavirus infections in genital tract. *Yale J Biol Med* 1988; 61: 307–325.
105. Riethmuller D, Gay C, Bertrand X, Bettinger D, Schaal JP, Carbillet JP, Lassabe C, Arveux P, Seilles E, Mougin C, et al. Genital Human papillomavirus infection. among women recruited for routine cervical cancer screening or for colposcopy determined by Hybrid Capture and Polymerase Chain Reaction. *Diagnostic Molecular Pathology* 1999; 8: 157-164.
106. Rock CL, Michael CW, Reynolds RK, Ruffin MT, et al. Prevention of cervix cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 2000; 33: 169-185.
107. Rotkin, ID. A comparison review by key epidemiologic studies in cervical cancer related to current searches for transmissible agents. *Cancer Res* 1973; 33: 1353–1365.
108. Ruffin MT, Bailey JM, Roulston D, Lee DR, Tucker RA, Swan DC, Unger ER, et al. Human papillomavirus in amniotic fluid. *BMC Pregnancy and Childbirth* 2006; 6: 1-3
109. Sánchez-Anguiano LF, Esquivel CA, Reyes-Romero MA, Carrera-Rodríguez M, et al. Human papillomavirus infections in women seeking cervical Papanicolaou cytology of Durango, Mexico: prevalence and genotypes. *BMC Infectious Diseases* 2006; 6: 27-33.
110. Sanclemente G, Gill DK, et al. Human Papillomavirus molecular biology and pathogenesis. *JEADV* 2002;16:231-240.
111. Schiff M, Becker TM, Masuk M, Asselt-King L, Wheeler CM, Altobelli K, North CQ, Nahmias AJ, et al. Risk factors for cervical intraepithelial neoplasia in southwestern american indian women. *American Journal of Epidemiology* 2000; Vol. 152: 716-726.
112. Sellors JW, Law C, et al. Anogenital Human papillomavirus infection changes in understanding and management. *Canadian Family Physician* 1994; 40: 93-101.
113. Sellors JW, Mahony JB, Kaczorowski J, Lytwyn A, Bangura H, Chong S, Lorincz A, Dalby DM, Janjusevic V, Keller JL, et al. Prevalence and predictors of human papillomavirus infection in women in Ontario, Canada. *CMAJ* 2000; 163: 503-508.

114. Sellors JW. Anogenital Human Papillomavirus infection. *Canadian Family Physician* 1994; 40: 93-101.
115. Tedaviye dirençli verruka vulgaris ve verruka plantaris olgularında skuarik asit dibütül ester tedavisinin etkinliği. Uzmanlık Tezi. İstanbul: T.C. Sağlık Bakanlığı Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Deri ve Zührevi Hastalıklar Kliniği; 2005.
116. Shah KV, Solomon L, Daniel R, Colin S, Vlahov D, et al. Comparison of PCR ana Hybrid Capture methods for detection of Human papillomavirus in injection drug-using women at high risk of Human immunodeficiency virüs infection. *Journal of Clinical Microbiology* 1997;35: 517-519.
117. Silverberg SG. Molecular diagnosis and prognosis in gynecologic oncology. *Arch Pathol Lab Med* 1999; 123: 1035-1040.
118. Skomedal H, Kristensen GB, Lie AK, Holm R, et al. Aberrant expression of the cell cycle associated proteins TP53, MDM2, p21, p27, cdk4, Cyclin D1, RB, and EGFR in cervical carcinomas. *Gynecol Oncol* 1999; 73: 223-228.
119. Smith JS, Munoz N, Herrero R, Eluf- Note J, Ngelangel C, Franceschi S, Bosch FX, Walboomers JM, Peeling RW, et al. Evidence for Chlamydia trachomatis as a Human papillomavirus cofactor in the etiology of invasive cervical cancer in Brazil and the Philippines. *J Infect Dis* 2002; 185:324-331.
120. Spinillo A, Debiaggi M, Zara F, De Santolo A, Polatti F, Filice G, et al. Human immunodeficiency virüs type I- related nucleic acids and papillomavirus DNA in cervicovaginal secretions of immunodeficiency virüs-infected women. *Obstetrics and Gynecology* 2001; 97: 999-1004.
121. Spitzer M, Krumholz BA, et al. Human Papillomavirus-related diseases in the female patient. *Urologic Clinic of North America* 1992; 19: 71-82.
122. Stoler MH. Human papillomaviruses and cervical neoplasia: a model for carcinogenesis. *International Journal of Gynecological Pathology* 2000; 19:16-28.
123. Strand A, Rylander E, Wilander E, et al: HPV infection in male partners of women with squamous intraepithelial neoplasia and/or high-risk HPV. *Acta Derm Venereol* 1996;75: 312.
123. Strauss JH, Strauss EG. DNA-containing viruses. In: Strauss JH, Strauss EG, editors. *Viruses and human disease*. 6 nd ed. California: Academic Pres; 2002.p.265-269.

124. Strohl WA, Rouse H, Fisher BD. Lippincott's illustrated reviews: Mikrobiyoloji. 6 nd ed. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevi; 2006.
125. Technology Planning and Management Corporation. Report on Carcinogens Background Document for Human Papillomaviruses: Genital-Mucosal Types. Durham: 2003.
126. Ter Harmsel B, Smedts F, Kuijpers J, Van Muyden R., Oosterhuis W, Quint W, et al. Relationship between Human papillomavirus type 16 in the cervix and intraepithelial neoplasia. *Obstetrics and Gynecology* 1999; 93: 46-50.
127. Thomas C, Wright LD, Louise K, Amy PAL, et al. HPV DNA testing of self-collected vaginal samples compared with cytologic screening to detect cervical cancer. *JAMA* 2000; 283:81-86.
128. Tjalma W, De Cuyper E, Weyler J, Van Marck E, De Pooter C, Albertyn G, Van Dam P, et al. Expression of bcl-2 in invasive and in situ carcinoma of the uterine cervix. *American Journal of Obstetrics Gynecology* 1998; 178: 113-117.
129. Troncione G, Anderson SM, Herrington CS, de Angelis ML, Chimera JA, McGee J O'D, et al. Comparative analysis of Human papillomavirus detection by dot blot hybridisation and non-isotopic in situ hybridisation. *J Clin Pathol* 1992; 45: 866-870.
130. Tjalma W, Weyler J, Goovaerts G, De Pooter C, Van Marck E, Van Dam P, et al. Prognostic value of bcl-2 expression in patients with operable carcinoma of the cervix. *J Clin Pathol* 1997; 50: 33-36.
131. Tuncer S: İnsan Papillomavirusları. In: Ustaçelebi Ş, editors. Temel ve klinik mikrobiyoloji. 1 nd ed. Ankara: Güneş Kitabevi; 1999.p.797-802.
132. Tuncer S, Ustaçelebi Ş, et al. Servikal biyopsi örneklerinde insan papillomavirüsleri tip 16 ve 18'in polimeraz zincir reaksiyonu ile saptanması. *Flora* 1996; 1: 40-44.
133. Türkiye'de bölgelere ve cinsiyete göre kanser olguları [online]. 1999 [09.03.2007]. Available from: URL: <http://www.saglik.gov.tr>
134. Unger ER, Duarte-Franco E. Human papillomaviruses into the new millennium. *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America* 2001; 28: 653-666.

135. Ünsal A, Çimentepe E, Sağlam R, et al. Human papillomavirüs ile enfekte kadınlarda partner çalışması: enfeksiyonun sıklığı ve tedavisi. Türk Üroloji Dergisi 2001; 27 (2): 197-201.
136. Vinokurova S, Wentzensen N, Eienkel J, Klaes R, Ziegert C, Melsheimer P, Sartor H, Horn LC, Höckel M., Von Doeberitz M.K, et al. Clonal history of papillomavirus-induced dysplasia in the female lower genital tract. Journal of the National Cancer Institute 2005; 97: 1816-1821.
137. Wheeler CM, Greer CE, Becker TM, Hunt WC, Anderson S, Manos MM, et al. Short-term fluctuations in the detection of cervical Human papillomavirus DNA. Obst and Gynecol 1996; 88:261-268.
138. Weidman C, Schaffer P, Hedelin G, et al. L' incidence du cancers du col de l' utérus regresse régulièrement en France. Bull epidémiol Hebd 1998; 5: 17-20.
139. Wistuba II. Montellano FD, Milchgrub S, Virmani AK, Behrens C, Chen H, Ahmadian M. Nowak JA, Muller C, Minna JD, Gazdar AF, et al. Deletions of chromosome 3p are frequent and early events in the pathogenesis of uterine cervical carcinoma. Cancer Res 1997; 57: 3154-3158.
140. Wolf JK, Ramirez PT, et al. The Molecular biology of cervical cancer. Cancer Investigation 2001; 19: 621-629.
141. World Health Organization. Report of the consultation on Human papillomavirus vaccines world health organization. Geneva: WHO; 2005.
142. Yang YY, Koh LW, Tsai JH, Wong EFC, Lin SJ, Yang CC, et al. Correlation of viral factors with cervical cancer in Taiwan. J Microbiol Immunol Infect 2004; 37: 282-287.
143. Zhang H, Hannon GJ, Beach D. P21- containing cyclin kinases exist in both active and non-active states. Genes Dev 1994; 8: 1750-1758.

10.ÖZGEÇMİŞ

Adı: Sibel

Soyadı: UNURLU

Doğum Yeri ve Tarihi: Adana 09.03.1981

Eğitimi (tarih sırasına göre yeniden eskiye doğru):

-2004 yılından beri Gazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans öğrencisiyim.

-2006 yılında Çukurova Üniversitesi, Eğitim Fakültesi, Tezsiz Yüksek Lisans mezunuyum

-2003 yılında Çukurova Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü mezunuyum.

-1999 Mersin 70. Yıl Sağlık Meslek Lisesinden mezun oldum.

Yabancı Dili: İngilizce (KPDS:86, ÜDS:77)

Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar:

Bilimsel Etkinlikleri (aldığı burslar, ödüller, projeleri):

-TUBİTAK bilim adamı yetiştirme programı dahilinde yurtiçi lisans bursu.