



**T.C. SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
ANTALYA EĞİTİM VE ARAŞTIRMA
HASTANESİ**

KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM ANABİLİM DALI

**SERVİKAL BİYOPSİ SONUCU
NORMAL OLAN VE SERVİKAL
DİSPLAZİ OLAN HASTALARDA
DOKU NİKOTİNAMİD
FOSFORİBOZİL TRANSFERAZ
DÜZEYLERİNİN
KARŞILAŞTIRILMASI**

Dr. Eda Kayalı

ANTALYA/ AĞUSTOS 2021



**T.C. SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
ANTALYA EĞİTİM VE ARAŞTIRMA
HASTANESİ**

KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM ANABİLİM DALI

**SERVİKAL BİYOPSİ SONUCU
NORMAL OLAN VE SERVİKAL
DİSPLAZİ OLAN HASTALARDA
DOKU NİKOTİNAMİD
FOSFORİBOZİL TRANSFERAZ
DÜZEYLERİNİN
KARŞILAŞTIRILMASI**

Dr. Eda Kayalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Işın Üreyen

(UZMANLIK TEZİ)

ANTALYA/ AĞUSTOS 2021

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	II
KISALTMALAR.....	III
TABLO LİSTESİ.....	IV
ŞEKİL LİSTESİ.....	V
ÖZET.....	VI
ABSTRACT.....	VII
GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
GENEL BİLGİLER.....	4
GEREÇ VE YÖNTEM.....	45
BULGULAR.....	48
TARTIŞMA.....	59
SONUÇ.....	64
KAYNAKLAR.....	66

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca hiç bir konuda yardım ve desteğini esirgemeyen üniversitemiz anabilim dalı başkanı Sn. Prof. Dr. Aysel UYSAL başta olmak üzere, tezimin her aşamasında nazik kişiliği ile destek ve katkılarıyla yanımda olan tez danışmanım Sn. Doç. Dr. Işın Üreyen'e, eğitim sürecime olan katkılarından dolayı jinekoonkoloji kliniğimizin anabilimdalı başkanı Doç. Dr. Tayfun Toptaş hocama, baş asistan abilerim Op. Dr. Özgür Özdemir, Op. Dr. Bekir Sıtkı İsenlik, Doç. Dr. Onur Erol, Doç. Dr. Burak Karadağ'a ve Op. Dr. Burcu Aykan başta olmak üzere uzman abi ve ablalarım, bu yorucu süreci dostluklarıyla güzelleştiren yoğun iş temposunu birlikte paylaştığım sevgili asistan arkadaşlarıma, birlikte keyifle çalıştığımız başta ebe Figen Yalçın, Ayten Seyrek olmak üzere ebe, hemşire, sekreter ve yardımcı sağlık personellerimize;

Desteklerini ve sevgilerini hayatım boyunca benden esirgemeyen aileme, her şeyden önce beni düşünen, en iyi arkadaşım ve öğretmenim olan, çocukluğumu güzelleştiren bir tanecik annem; Gülperi Evin'e, varlığıyla güven veren ve her anımda koruyup kollayan, hayatımdaki en güzel pikniklere götüren canım babam Battal Evin'e, doğduğu andan itibaren hayatımdaki en tatlı şey olan, canım yakışıklı kardeşim M. Fatih Evin'e ve tanıştığım andan itibaren hayatımın iyi, kötü her anında gülümsemesiyle yanımda olan, sevgilim, eşim Uzm. Dr. Haydar Kayalı'ya en içten sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin patoloji örnekleme ve boyama aşamasında yardım ve desteklerini esirgemeyen Dr. Hülya Tosun Yıldırım hocama, verilerin toplanmasında yardımcı olan jinekoonkoloji polikliniği hemşirelerinden Fatma Sezgin'e ve Uzm. Dr. Mehmet Göksu'ya teşekkürlerimi sunarım.

Yaşadığımız pandemi sürecinde hayatını kaybetmiş olan tüm sağlık çalışanlarını bu vesileyle anıyor ve şükranlarımı sunuyorum.

Dr. Eda Kayalı

KISALTMALAR

ASC: ATYPICAL SQUAMOUS CELLS

ASCCP: AMERICAN SOCIETY FOR COLPOSCOPY AND CERVICAL
PATHOLOGY

ASCUS: ATYPICAL SQUAMOUS CELLS OF UNDETERMINED
SIGNİFİCANCE

ASC-H: ATYPICAL SQUAMOUS CELLS-CANNOT EXCLUDE HIGH-GRADE
SQUAMOUS INTRAEPITHELIAL LESION

AGC: ATYPICAL GLANDULAR CELLS

AIS: ADENOKARSİNOMA INSITU

CIN: SERVİCAL INTRAEPİTELYAL NEOPLAZİ

DNA: DEOXYRUBONUKLEİK ASİD

HPV: HUMAN PAPİLLOMA VIRUS

HGSIL: HIGH-GRADE SQUAMOUS INTRAEPITHELIAL LESION

KETEM: KANSER ERKEN TEŞHİS, TARAMA VE EĞİTİM MERKEZLERİ

LEEP: LOOP ELECTROSURGICAL EXCISION PROCEDURE

LLETZ: LARGE LOOP EXCISION OF THE TRANSFORMATION ZONE

LGSIL: LOW-GRADE SQUAMOUS INTRAEPITELIAL LESION

PAP TEST: PAPANICOLAOU TEST

PCR: POLİMERASE CHAIN REACTION

SIL: SQUAMUZ INTRAEPİTELYAL LEZYON

TABLolar

Tablo-1: Serviks kanseri histopatolojisi

Tablo-2: Histerektomi türleri

Tablo-3: Kolposkopi endikasyonları

Tablo-4: NAMPT hücre boyanma skrolama

Tablo-5: NAMPT hücre %si Skrolama

Tablo-6: Tüm Hastaların Smear Sonuç Dağılımı

Tablo-7: Tüm Hastaların HPV Tipi Dağılımı

Tablo-8: NAMPT Boyanma Yoğunluk Dağılımı

Tablo-9: Tüm Hastaların NAMPT Boyanma Yüzdesi Dağılımı

Tablo-10: Tüm Hastaların NAMPT Çarpım Skoru Dağılımı

Tablo –11: Servikal Biyopsi Sonucuna Göre Hasta Gruplarının HPV Tiplerine Göre Dağılımı

Tablo-12: Servikal Biyopsi Sonuçlarına Göre NAMPT Boyanma Yoğunluk Skorlarının Dağılımı

Tablo-13: Servikal Biyopsi Sonuçlarına Göre NAMPT Boyanma %'si Skorlarının Dağılımı

Tablo-14: Servikal Biyopsi Sonuçlarına Göre NAMPT Çarpım Skorlarının Dağılımı

Tablo-15: Farklı Çarpım Skoru Cut-off Değerlerde Sensitivite, Spesifisite, PPD (Pozitif Prediktif Değer) ve NPD (Negatif Prediktif Değer)

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil -1: SKB (Skuamokolumnar bileşke) ve t- zone

Şekil-2: LAST (The Lower Anogenital Squamous Terminology System), Bethesda Sınıflaması ve örnekleri

Şekil -3: Servikal intraepitelial neoplazi gelişimi

Şekil -5: HPV elektron mikroskop görüntüsü

Şekil -6: Koilositoz

Şekil -7: Servikal sitoloji ve Histoloji boyama görüntüleri

Şekil -8: Manşet biçimli bez ağızları

Şekil -9: Tepe/Sırt Belirtisi

Şekil- 10: Inner Border belirtisi

Şekil-11: Paçavra belirtisi

Şekil -12: P16 ile boyama

Şekil -13: Ki67 ikili boyama

Şekil -14: NAMPT Boyama

Şekil -15: Kontrol olarak kullanılan desiduadaki NAMPT ekspresyonu

Şekil-16: LSIL, (CIN1), (H&E X10)

Şekil-17: HSIL, (CIN 2-3), (H&E X10)

Şekil-18: NAMPT ekspresyonu, boyanma yok (X20)

Şekil-19: NAMPT ekspresyonu, hafif boyanma (X10)

Şekil-20: NAMPT ekspresyonu, orta derecede boyanma (X10)

Şekil-21: NAMPT ekspresyonu, ağır boyanma (HEX10)

ÖZET

Amaç: Serviks kanseri üçüncü en yaygın jinekolojik kanserdir ve dünya çapında hastalığın %85'inden fazlası, gelişmekte olan ülkelerde meydana gelir. Ektoserviks yüzeyel epitelinden kaynaklanan skuamöz hücreli karsinomlar en yaygın olanıdır. Servikste oluşan düşük dereceli lezyonların çoğunda gerileme kendiliğinden gerçekleşir, daha yüksek dereceli displaziler ise in situ karsinomaya, bu da invaziv kansere ilerler. Son yıllarda servikal preinvaziv lezyonları daha doğru saptamak için daha sensitif belirteçler bulmak birçok çalışmanın amacı haline gelmiştir. Biz mevcut çalışmada HPV pozitifliği nedeniyle kolposkopik biyopsi alınan, servikal displazili ve sonucu normal gelen hastalarda doku NAMPT seviyelerini çalışarak birincil olarak servikal displazi-NAMPT ilişkisinin varlığını, ikincil olarak da NAMPT ekspresyon düzeylerinin servikal displazi varlığı ile mi yoksa HPV varlığı nedeniyle mi arttığı sorusunu araştırmayı hedefledik.

Gereç ve yöntem: Bu çalışma prospektif tanımlayıcı bir çalışmadır. Hastanemiz jinekolojik onkoloji polikliniğinde Ağustos 2020 ile Mart 2021 tarihleri arasında HPV pozitifliği ile kolposkopiye başvuran ve kolposkopik biyopsi alınan hastaların doku örnekleri prospektif olarak incelenmiştir. Bu çalışmada örneklem sayısı hesaplanırken F tests-ANOVA uygulanmıştır ve her gruba 21 hasta olmak üzere örneklem büyüklüğü toplam 63 hasta olarak hesaplanmıştır. Kolposkopik biyopsi sonucu normal, CIN 1 ve CIN 2, 3 gelen hastaların biyopsi materyallerinde NAMPT ekspresyonu düzeyi belirlenmiş ve normal-servikal displazili doku arasında veya farklı servikal displazi dereceleri arasında NAMPT doku düzeylerinde fark ve ilişki olup olmadığı incelenmiştir.

Bulgular: Bu çalışmaya kolposkopik biyopsi sonucu normal 25 hasta, CIN 1 olan 30 hasta ve CIN 2 ve 3 olan 31 hasta, toplam 86 hasta dâhil edildi. Hastaların ortalama yaşı 40 (aralık, 19-65) idi. Alınan serviks biyopsi sonuçlarına göre yapılan 3 grupta yaş, kilo, boy, BMI, HT varlığı, DM varlığı ve sigara içiciliği açısından anlamlı fark yoktu (sırasıyla $p=0.113$, $p=0.437$, $p=0.858$, $p=0.278$, $p=0.802$, $p=0.727$ ve $p=0.066$). Çalışmamızda tüm NAMPT boyama skorlamaları, CIN 2, 3'ü CIN 1'den ayırt etmede anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p<0,001$). Biyopsi örneklerinin NAMPT boyanma yoğunluğuna bakıldığında (Tablo 12); ilk patoloji sonucu CIN 2, 3 olan 31 vakanın 28 (%90)'inde orta ve yoğun boyanma izlenmiştir.

NAMPT ile yoğun boyanmaya CIN 1 ve normal biyopsi sonuçlu vakaların hiçbirinde rastlanmamıştır. NAMPT ile boyanma yüzdesine bakıldığında (Tablo 13); CIN 2, 3 olan 31 vakanın 28 (%90)'inde %34-100 oranında boyanma görülmüştür. NAMPT ile %67-100 arasında boyanmaya CIN 1 ve normal biyopsi sonuçlu vakaların hiçbirinde rastlanmamıştır. Çarpım skoru değerleri arasından CIN 2-3 tanısının CIN 1 ve normal serviks dokusundan ayırımı için sınır (cut-off) değer olarak 2'yi seçersek, sensitivite %96,8, NPD %98, spesifite %80 ve PPD %71 olarak hesaplandı. Bu değer 4 alınırsa, sensitivite %74,2, NPD %87, spesifite %95 ve PPD %88,5 olarak hesaplandı.

Sonuç: Çalışmamızda NAMPT boyamasının CIN 2, 3'ün normal dokudan ve CIN1'den ayırımında kullanılabilecek şekilde gruplar arasında farklı olduğunu bulduk. Bu belirtecin servikal premalign lezyonların doğru tanı ve tedavisinde sensitivite ve spesifiteyi arttıracabileceğini düşünüyoruz. Ancak bu belirtecin günlük kullanıma girmesi için daha fazla destekleyici çalışmaya ihtiyaç vardır.

Anahtar kelimeler: HPV; servikal displazi; NAMPT; Visfatin; CIN 1; CIN 2; CIN 3; kolposkopi

ABSTRACT

Aim of study: Cervical cancer is the third most common gynecological cancer and more than 85% of the disease occurs in developing countries worldwide. Squamous cell carcinomas are the most common histopathological type. Regression occurs spontaneously in most low-grade lesions in the cervix, while higher-grade dysplasias progress to in situ carcinoma, which in turn progresses to invasive cancer. In recent years, it has become the aim of many studies to find more sensitive markers to detect cervical preinvasive lesions more accurately. In the current study, we aimed to investigate the existence of a relationship between cervical dysplasia and NAMPT, and secondly, whether the NAMPT expression levels increase due to the presence of cervical dysplasia or the presence of HPV by studying tissue NAMPT levels in patients with cervical dysplasia and normal results, who underwent colposcopic biopsy due to HPV positivity.

Materials and methods: This study is a prospective descriptive study. Tissue samples of patients who applied for colposcopy with HPV positivity and received colposcopic biopsy between August 2020 and March 2021 in the gynecological oncology outpatient clinic of our hospital were prospectively examined. F tests-ANOVA was applied while calculating the sample number in this study, and the sample size was calculated as 63 patients, 21 patients in each group. The level of NAMPT expression was determined in the biopsy materials of patients whose colposcopic biopsy results were normal, CIN 1 and CIN 2, 3 and whether there was a difference and relationship between normal and cervical dysplasia tissue or between different degrees of cervical dysplasia in NAMPT tissue levels was investigated.

Results: 25 patients with normal colposcopic biopsy results, 30 patients with CIN 1 and 31 patients with CIN 2 and 3, a total of 86 patients were included in this study. The mean age of the patients was 40 (range, 19-65). There was no significant difference in age, weight, height, BMI, presence of HT, presence of DM and smoking in the 3 groups performed according to the cervical biopsy results ($p=0.113$, $p=0.437$, $p=0.858$, $p=0.278$, $p=0.802$, $p=0.727$ and $p=0.066$, respectively). In our study, all NAMPT staining scores were found to be significantly higher in

differentiating CIN 2, 3 from CIN 1 ($p < 0.001$). Considering the NAMPT staining intensity of the biopsy samples (Table 12); Moderate and intense staining was observed in 28 (90%) of 31 cases whose initial pathology result was CIN 2 or 3. Intense staining with NAMPT was not observed in any of the cases with CIN 1 and normal biopsy results. Considering the percentage of staining with NAMPT (Table 13); 34%-100% staining was observed in 28 (90%) of 31 cases with CIN 2, 3. Staining between 67%-100% with NAMPT was not observed in any of the cases with CIN 1 and normal biopsy results. If we chose 2 as the cut-off value to differentiate the diagnosis of CIN 2-3 from CIN 1 and normal cervical tissue among the product score values, the sensitivity was calculated as 96.8%, NPV 98%, specificity 80% and PPV 71%. If this value is taken as 4, sensitivity was calculated as 74.2%, NPV 87%, specificity 95% and PPV 88.5%.

Conclusion: In our study, we found that NAMPT staining was different between the groups, which could be used to differentiate CIN 2, 3 from normal tissue and CIN1. We think that this marker may increase the sensitivity and specificity in the correct diagnosis and treatment of cervical premalignant lesions. However, more supportive studies are needed for this marker to enter daily use.

Keywords: HPV; cervical dysplasia; NAMPT; Visfatin; CIN 1; CIN 2; CIN 3; colposcopy

GİRİŞ VE AMAÇ

Uterin serviks kanseri, dünyada her iki dakikada bir kadın ölümüne neden olan ve gelişmekte olan ülkelerde kadınlarda meme kanserinden sonra en sık görülen ikinci kanserdir. Sosyoekonomik olarak gelişmiş ülkelere bakıldığında ise üçüncü en yaygın jinekolojik kanser olarak sayılmaktadır. Dünyada serviks kanserine bağlı mortaliteye bakıldığında ise, yılda 400.000'in üzerinde serviks kanseri olgusu görülmekte ve her yıl yaklaşık 250.000 hasta serviks kanserinden ölmektedir (1,2). Uzun bir preinvaziv evresi olması, günümüzde sitoloji tarama programlarının ve preinvaziv lezyonların erken tanı ve tedavisinin mümkün olması sebebiyle önlenabilir bir hastalık olarak tanımlanabilir (2). Servikal kanser için birçok risk faktörü vardır; ilk cinsel ilişkide genç yaş (16'dan küçük), multipartner, sigara içmek, ırk, yüksek parite, düşük sosyoekonomik durum, kronik immun supresyon gibi sebepler sayılabilir (3). İleri evre serviks kanserinin tedavisinin hasta ve toplum açısından yüksek maliyetli olması, mortalite oranlarının yüksek olması ve en önemlisi bu kanserin önlenabilir olması tanı ve tarama programlarına verilen önemi arttırmıştır. Tarama ve önleme programları sayesinde sosyoekonomik olarak zengin ülkelerde geçtiğimiz 50 yılda serviks kanseri insidansı ve mortalitesinde büyük bir düşüş (yaklaşık %75 azalma) olmuştur, ancak tarama programlarının uygulanma fırsatlarının minimal olduğu orta ve düşük gelirli ülkelerde servikal kanser insidansı ve mortalitesi daha yüksektir (4,5).

İnsan papilloma virüsü (HPV), servikal neoplazinin bilinen en büyük sebebidir ve servikal kanserlerin %99,7'sinde saptanabilir. Serviks kanserinin oluşumu için, HPV varlığı gereklidir, ancak yeterli değildir. Bugün, servikal kanser gelişimi için HPV'nin mutlaka var olması gerektiği, diğer risk faktörlerinin ya virüsle karşılaşma oranını arttırdığı ya da viral persistansın karsinojenik süreci hızlandırmada önemli olduğu konusu üzerinde durulmaktadır. HPV virüsünün etiolojideki en büyük sebep olması ve bunun saptanabiliyor olması serviks kanserinin taranabilir bir hastalık olarak tanımlamamızı sağlar, tarama testi olarak ise Pap smear ile sitoloji bakılması ve HPV tiplendirilmesi kullanılmaktadır (6).

Serviks kanseri preinvaziv evresi uzun süren (10-15 sene) ve belirli bir zaman sonra invaziv hale dönüşen bir kanser türüdür. Preinvaziv lezyonların bu süreçte saptanabilmesi invaziv lezyonun önlenmesi, hastalığın mortalitesinin azaltılabilmesi ve tedavi maliyetinin düşürülebilmesi için esas yöntemdir (7,8). Kolposkopi ve servikal biyopsi ile tarama testlerindeki anormalliklerin takibi CIN (Servikal intraepitelyal neoplazi) veya serviks kanseri teşhisi ile sonuçlanabilir. Düşük derece CIN'li hastaların servikal malignite geliştirme potansiyeli düşük iken, yüksek dereceli lezyonları olan hastalarda maligniteye ilerleme riski yüksektir. CIN tanısı ve yönetimi tedavinin daha invaziv olmasında, doğru zamanda doğru tedavi ve takibin yapılabilmesinde büyük öneme sahiptir (9). Gözlemciler arası değişkenlik nedeniyle servikal displazinin histolojik değerlendirmesi karmaşıktır. Günümüz servikal neoplazinin histopatolojik değerlendirmesinde yardımcı olarak kullanılan p16, Ki67 immünohistokimyasal boyalar, HPV varlığı gibi hücre döngüsünü arttıran durumlarda pozitif olmaları, metaplazi ve atrofik hücrelerde olduğu kadar, normal kolumnar hücrelerde de görülebilir olması gibi sebeplerden dolayı belli spesifite ve sensitivite değerlerine sahiptir. Ancak tedavi ve takip şeklinin değişmesinden dolayı, normalin herhangi bir derecedeki displaziden ayrımı ve sonra benign, çoğunlukla geçici olan CIN 1' in invaziv kansere ilerleme riski daha yüksek olan CIN 2 ve CIN 3'ten ayrımı önemlidir (10,11). Hatalı bir CIN 2, CIN 3 teşhisi yanlış tedavilere yol açabilir. Tarama testlerinin tanı spesifitesi ve etkinliğinin artırılmasında ise preinvaziv lezyon tanısındaki zorlukların azaltılması, tanı maliyetinin düşürülmesi, yüksek özgüllükteki tanı araçlarına ulaşılabilirliğin artırılması, tanı aşamasında çalışan araştırmacılar arasında tutarlılığın sağlanması büyük rol oynamaktadır. Buna yönelik daha spesifik immünohistokimya boyama yöntemleri araştırılmaktadır. Bunlardan bazıları MCM 2 ve TOP2A, AMHR-2, C-KİT, DAPT-K, HLA (DRB1 – DQB1), miR-375, CADM1 ve RARB, FAM19A4, NAMPT gibi moleküler belirteçlerdir (12-17).

B hücresi öncesi koloni güçlendirici faktör (PBEF) veya Visfatin olarak da bilinen Nikotinamid Fosforibozil Transferaz (NAMPT), 52kDa'lık bir pleiotropik molekül, NAMPT geni tarafından kodlanmış, bir enzim, bir sitokin / adipositokin ve bir büyüme faktörü olarak tanımlanmaktadır.

NAMPT / PBEF / Visfatin Serum konsantrasyonlarında artış farklı kanser türlerinde rapor edilmiştir; bunlar gliomlar, melanom, prostat, meme, over, tiroid,

kolorektal ve endometrial karsinomlardır (18-29). Moiz Vora ve arkadaşlarının çalışmasında da; servikal kanserli hastaların doku örneklerinde NAMPT seviyesi daha yüksek saptanmıştır (30). Aynı çalışmada servikal displazisi olan az sayıdaki hastada da artmış NAMPT seviyesi gösterilmiştir. Biz mevcut çalışmada HPV pozitifliği nedeniyle kolposkopik biyopsi alınan, servikal displazili ve sonucu normal gelen hastalarda doku NAMPT seviyelerini çalışarak birincil olarak servikal displazi-NAMPT ilişkisinin varlığını, ikincil olarak da NAMPT ekspresyon düzeylerinin servikal displazi varlığı ile mi yoksa HPV varlığı nedeniyle mi arttığı sorusunu araştırmayı hedefledik.

GENEL BİLGİLER

UTERİN SERVİKS ANATOMİ, FİZYOLOJİSİ VE HİSTOLOJİSİ

Serviksin Anatomisi

Serviks, endometrial boşluk ile vajina arasında kanal görevi gören tübüler bir yapıdır. Üst kısım korpus ile sürekli dir. Serviksin alt kısmı vajinaya doğru çıkıntı yapar. Bazı kadınlarda (örneğin; postmenopozal, pelvik radyasyonu takiben), serviks muayene sırasında çıkıntı yapmak yerine vajina ile aynı hizada görünebilir.

Servikal kanal, internal osta endometrial boşluğa ve eksternal osta vajinaya açılır. Ektoserviks, serviksin vajinaya doğru çıkıntı yapan yüzeyidir.

Serviks, periferde yer alan ve vajinal duvardaki kas ile miyometrium arasında sürekli bir tabaka oluşturan minimum miktarda düz kas içeren yoğun fibröz bağ dokusundan oluşur. Vajina içerisine uzanan kısmına **porsiyo vajinalis** adı verilir. Vajina üzerinde kalan bölümüne ise **porsiyo supravajinalis** adı verilir (3,31).

Serviks komşuluğunda önde mesane, lateralde kardinal ligament, parametriumlar ve üreterler, arkada rektum bulunur. Serviksin anatomik desteği, levator ani kası ve serviksin yan duvarlarını pelvis duvarlarına birleştiren bağ dokusu tabakası ile sağlanır. Serviks stroması içerisinde damar, sinir ve lenfatiklerinin olduğu fibromusküler doku bulunur. Serviksin arterleri uterin arterin servikal ve vajinal dallarıdır ve serviksin dış yüzünden saat 3 ve 9 hizasından aşağı uzanırlar. Venler arterlere paralel olarak uzanır ve hipogastrik venöz ağa drene olurlar. Serviksin lenfatikleri mukoza altı ve bağ dokusu stromasının derin kısımları olarak iki alanda birikir. Lenf akımı; parametrial (paraservikal), obturator, internal iliak, eksternal iliak, common iliak, presacral ve paraaortik lenf nodlarına doğrudur. Serviks sinirleri hipogastrik pleksustan köken alır (3,31).

Serviksin Fizyolojisi

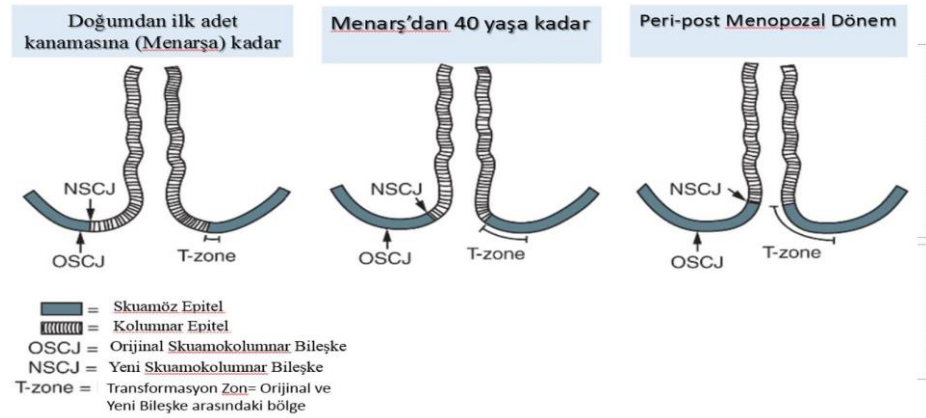
Serviksin uterus anatomisi içerisindeki fizyolojik işlevi; doğum sırasında olgunlaşıp doğum kanalını oluşturmak ve menstruasyon kan akışının sağlanmasıdır. Bu görevleri dışında primer fonksiyonu mukus sekresyonudur. Servikal mukus,

endoservikal bezlerden salgılanan berrak veya opak görünümlü gri beyaz bir sekresyondur. Servikal mukusun içeriği, seks steroid hormonlarındaki siklik değişiminden etkilenir. Postmenstruel dönemde öströjenin etkisi ile karşılaşınca bol miktarda sulu ve alkali bir hal alır. Siklusun sekizinci gününden ovulasyona kadar geçen sürede öströjenin yükselişi ile servikal mukus miktarı artar, viskozitesi düşer, böylece spermetazoanın ihtiyaç duyduğu geçirgenlik sağlanır (32). Ovulasyondan sonra ise servikal mukusun akışkanlığı düşer, miktarı azalır ve asidik pH'da olup, bol lökosit içerir. Gebelik oluştuğunda ise servikal mukus kalın ve viskozitesi güçlüdür, lökosit içeriği fazladır ve bir tıkaç oluşturarak servikal kanalı kapalı tutar (33).

Serviksin Histolojisi

Kolumnar epitel; endoservikal kanalı döşeyen, çekirdekleri koyu boyanan tek tabakalı hücrelerden oluşur. Tek katlı hücre tabakası alttaki stromanın damarlı görüntüsünün kolayca görülebilmesini sağlar. Servikal stromaya endoservikal kriptler ile çok sayıda invajinasyon olur. Skuamöz epitel ektoserviksin geniş kısmını kaplayan, nonkeratinize, yoğun glikojen içeren, çok sayıda hücre tabakasından oluşur ve soluk pembe renkli görünür. Yenidoğanlarda skuamokolumnar bileşke ektoservikse daha yakın yerleşmiştir. Pubertede artan östrojen skuamöz epitelde glikojen birikimi sağlar ve normal floradaki laktobasillerin glikojeni metabolize etmesiyle laktik asit oluşur ve pH asidik hale gelir. Asidik pH ile karşılaşan kolumnar epitelin altındaki subkolumnar hücrelerde immatur **skuamöz metaplazi** oluşur. Reprodüktif yaş aralığından perimenopozal yaş grubuna doğru metaplazinin gerçekleşmesi ile beraber, skuamokolumnar bileşke yukarı doğru ilerler ve **aktif skuamokolumnar bileşke** oluşur (32,34).

Yenidoğan çağındaki skuamokolumnar bileşke ve son oluşan aktif skuamokolumnar bileşke arasında kalan serviks alanına **transformasyon zonu** adı verilir ve bu bölge servikal neoplazilerin çoğunun kaynaklandığı kısımdır (3).



Şekil -1: SKB (Skumokolumnar bileşke) ve T- zone

Transformasyon zonunda, parabazal, intermedier ve superfisyal olmak üzere 4 tabaka görürüz. Bazal tabakadaki büyük çekirdekli ve az miktarda sitoplazmaya sahip tek immatür hücreler parabazal, intermedier ve superfisyal tabakaları oluşturmak için bölünür ve farklılaşırlar.

Bazal tabakadan süperfisyal tabakaya doğru hücre sitoplazma miktarlarında artış ve çekirdek boyutlarında küçülme, protein içeriklerinde ise azalma görülür. Superfisyal tabakayı oluşturan piknotik çekirdekli, glikojen dolu sitoplazmaları olan hücreler yaklaşık sekiz sıra oluşturur. Zamanla dökülebilen süperfisyal tabaka hücreleri Smear testinde aldığımız örnekleri oluşturur (33).

SERVİKS PATOLOJİSİ

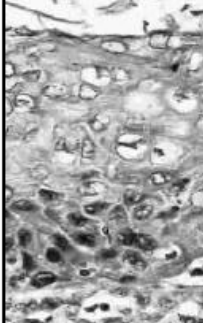
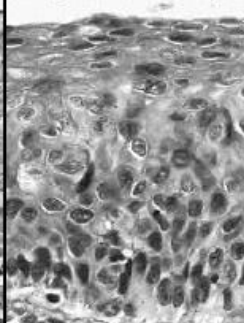
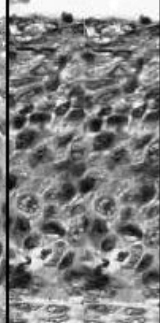
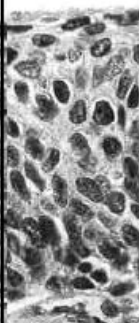
Premalign Lezyonlar

Servikal intraepitelyal neoplazi serviksin premalign durumunu belirtir. CIN tanımı skuamöz anormallikleri ifade eder. Kolposkopi ve servikal biyopsi ile tarama testlerindeki anormalliklerin takibi CIN veya serviks kanseri teşhisi ile sonuçlanabilir (34).

CIN, düşük dereceli veya yüksek dereceli olabilir. CIN 1, 2, 3 olarak ayrılır. CIN 1 düşük dereceli, CIN 2, 3 yüksek dereceli olarak adlandırılır. Düşük dereceli

CIN'li hastalarda servikal malignite geliştirme potansiyeli minimum iken, yüksek dereceli lezyonları olanlarda maligniteye ilerleme riski yüksektir.

Hemen hemen tüm CIN ve serviks kanseri vakalarının HPV enfeksiyonuna atfedilebilmesine ve genç hasta popülasyonlarında HPV enfeksiyonunun oranının yüksek olmasına rağmen, enfeksiyon ve buna bağlı servikal intraepitelyal lezyonlar bu popülasyonda sıklıkla kendiliğinden geriler (9,34). Örnek olarak, 18-29 yaşları arasındaki 2065 hastanın katıldığı bir kohort çalışmasında, yeni teşhis edilmiş, yüksek riskli HPV enfeksiyonu olan hastaların %61'inde, 12 aylık takipler sonucunda enfeksiyonun temizlendiği görülmüştür (35).

LAST System ^[1]	Cytology	LSIL	HSIL		
	Histology	LSIL	p16 staining should be performed*		HSIL
Bethesda Classification System ^[2]	Cytology	LSIL	HSIL		
	Histology	CIN 1	CIN 2	CIN 3	
Previous terminology		Mild dysplasia	Moderate dysplasia	Severe dysplasia	Carcinoma in-situ
Histologic images					

* P16-pozitif olan CIN 2, HSIL olarak sınıflandırılır. P16 negatif olan CIN 2, LSIL olarak sınıflandırılır.

Şekil- 2: LAST (The Lower Anogenital Squamous Terminology) Sistemi, Bethesda Sınıflaması ve Örnekleri

CIN 2'nin zayıf tekrarlanabilirliği nedeniyle, CIN 2 ve 3 genellikle birlikte CIN 2, 3 olarak sınıflandırılır. 2012 yılında, Amerikan Patoloji Koleji ve Amerikan Kolposkopi ve Servikal Patoloji Derneği (ASCCP)'nin Alt Anogenital Skuamöz Terminolojisi (LAST) projesi, anogenital yolun HPV ile ilişkili skuamöz lezyonlarını tanımlamak için kullanılan terminolojide değişiklikler yayınladı (34,36). LAST

sisteminde histolojik servikal bulgular, sitolojik bulgularla aynı terminoloji kullanılarak aşağıdaki şekilde tanımlanmaktadır.

- Önceki terminoloji sistemindeki CIN 1, düşük dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon (LSIL) olarak adlandırılır.

- CIN 2, kanser öncesi lezyonları belirlemek için p16 immün boyamaya göre katmanlara ayrılır. CIN 2'nin tekrarlanabilirliği zayıftır ve muhtemelen CIN 1 veya 3 olarak adlandırılacak lezyonları içeren heterojen bir karışımdır. P16 negatif olan numunelere LSIL ve p16-pozitif olan numunelere yüksek dereceli skuamöz intraepitelyal neoplazi (HSIL) adı verilir.

- CIN3, HSIL olarak adlandırılır.

Tez çalışmamızda hem CIN terminolojisi hem de LAST terminolojisi beraber kullanılmıştır, çünkü CIN terminolojisi, servikal sitolojik ve histolojik anormalliklerin değerlendirilmesi ve yönetimi için 2019 ASCCP kılavuzlarında kullanılmıştır (37).

CIN 1: CIN 1, HPV enfeksiyonunun histolojik bulgusudur. Epitelin alt üçte birinde hafif atipik hücresel değişiklikleri ifade eder. HPV sitopatik etkisi (koilositik atipi) sıklıkla mevcuttur. Enfekte hücredeki değişikliğe koilositoz olarak adlandırmak için gerekli üç kriter vardır, bunlar; piknotik nükleus, perinükleer sitoplazmik halo ve multinükleasyondur. Diskeratositler ise kalın üç boyutlu gruplar halinde çekirdekleri koilositler ile aynı özellikte olan hücrelerdir (38). CIN 1 olgularında HPV 16 daha az bulunurken onkojenik olmayan HPV tipleri sıklıkla bulunmaktadır. CIN 1 doğal seyri, CIN saptanmayan HPV pozitif ASC-US (atypical squamous cells of undetermined significance) ve LSIL ile benzerdir. Özellikle genç kadınlarda gerileme oranları yüksektir ve CIN 2'ye ilerleme sık görülmez. LAST terminolojisindeki LSIL içerisinde CIN 1 (hafif displazi) ve koilositik atipi olarak adlandırılan HPV değişiklikleri yer alır. Uzun dönem izleme çalışmaları; “koilositoz” olarak sınıflandırılan lezyonların, vakaların %14'ünde yüksek dereceli intraepitelial neoplaziye, CIN 1 olarak sınıflandırılan lezyonların ise vakaların %16'sında ağır displaziye dönüştüğünü göstermektedir. CIN 1'in doğal seyri biyopsi ile kanıtlanmış CIN 1 olan 680 hastayı (ortalama yaş 29,2 yıl) içeren retrospektif çalışmada gösterilmiştir (39-42). Altı ayda, %49'unun negatife gerilediği, %35'inde kalıcı CIN 1 ve %7'sinde yüksek dereceli lezyonlar olduğu görülmüştür. 6 ayda negatif sonuçları

olan ve 12 aya kadar takip edilen hastalar arasında %80'i negatif kalmış, %16'sında düşük dereceli lezyonlar ve %4'ünde yüksek dereceli lezyonlar görülmüştür. Kalıcı CIN 1'i 6 ayda 12 ay takip eden hastaların %50'si negatife gerilediği, %46'sında düşük dereceli lezyonlar ve %4'ünde yüksek dereceli lezyonların kaldığı görülmüştür (42).

Patoloji sonucunda CIN 1 saptanan kadınlarda gizli kalmış CIN 3 riski önceki sitoloji sonuçları ile ilişkilidir. HSIL, ASC-H (atypical squamous cells-cannot exclude high-grade squamous intraepithelial lesion) ve AGC (atypical glandüler cells) sonrası yüksektir. LSIL, HPV pozitif ASC-US sonrası saptanan CIN 1'de 5 yıl CIN3+ olma riski %3,8 HSIL sonrası saptanan CIN 1'de 5 yıl CIN3+ riski %15'tir. CIN 1 lezyonları hem düşük hem de yüksek riskli HPV tipleri tarafından gelişebilirler (42).

CIN 2: Epitelin üst kısmı matür olmasına rağmen nükleer atipi yüzeye kadar izlenebilir. Nükleer anormallikler CIN 1'den daha belirgindir. Mitozlar bazal iki bölü üçlük kısımda mevcuttur ve anormal formları görülebilir.

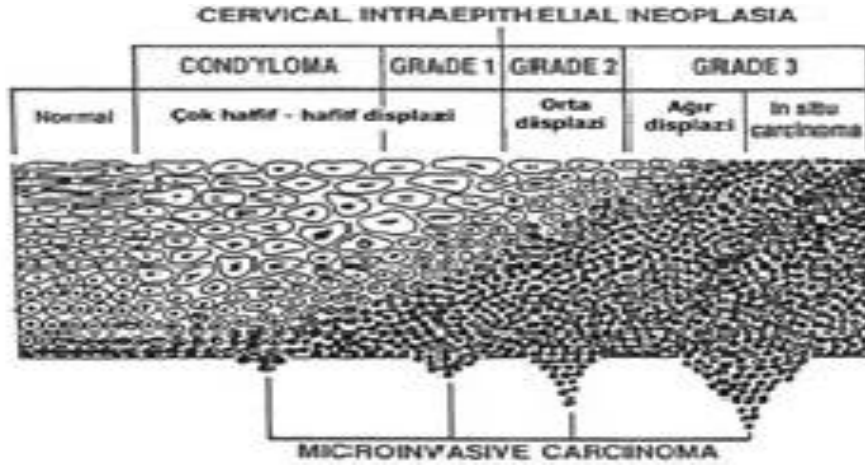
CIN 2, prekanseröz lezyonları tanımlamak için p16 immün boyamasına göre tabakalandırılır. CIN 2, CIN 1 veya 3 olarak adlandırılabilen lezyonları içeren heterojen bir karışımdır. LAST Terminolojisine göre, P16-negatif olan örnekler LSIL ve p16-pozitif olanlar HSIL olarak adlandırılır (43,44). CIN 2 için, tedavi edilmezse hastaların yaklaşık yarısında gerileme olacağı görülmektedir. CIN 2'li 3160 hastayı içeren 36 çalışmanın (hem randomize çalışmalar hem de gözlemsel çalışmalar) meta-analizinde, 24 ayda lezyonlarda hastaların %50'sinde gerileme görülmüştür, %32'sinde lezyonun devam ettiği ve %18'inde lezyonların CIN 3 ve invaziv kansere ilerlediği görülmüştür. İlerleme oranı zamanla 3. ayda %5'ten, 36 ayda %24'e yükselmiştir, lezyonun ilerleme riskinin artması beklenen bir durumdur, payda giderek küçülen ve regrese olmayan hasta grubundan oluşacaktır (43,44).

CIN 3: CIN 3'te hiç matürasyon yoktur ve üst bir bölü üçe kadar uzanmıştır. Nükleer anormallikler epitelin tamamına yakınında izlenir. Mitotik aktivite tüm tabakalarda artmış şekilde görülür. CIN 3 lezyonlarda regresyon oranı %33, progresyon oranı ise %6-74 arasında değişmektedir (45-50). Histolojik olarak doğrulanmış CIN 3'ün doğal seyri üzerine en iyi veriler, CIN 3 olan iki hasta grubunda zaman içindeki invaziv kanser insidansını değerlendiren bir çalışmadan alınmıştır (CIN 3 olan tüm hastalar tedavi görmemiştir). 143 hasta yakın takip edilmiştir ancak

tedaviyi kabul etmemiş ve izleme devam edilmiştir ve 593 hasta yeterli tedavi almıştır. Serviks / vajinal kubbenin invaziv kanserinin kümülâtif insidansı, tedavi edilmeyen ve tedavi alan hastalar karşılaştırıldığında, tedavi almayanlarda 10 yılda (%20,0'a karşı %0,3) ve 30 yılda (%31,0'a karşı %0,7) önemli ölçüde daha yüksek bulunmuştur.

Yakın takip edilen ancak küratif işlem yapılmayan 143 hastadan 92'si, CIN 3'ün ilk tanısından 6 ila 24 ay sonra kalıcı hastalığa dair sitolojik kanıta sahip olduğu, bu alt grupta, serviksin invaziv kanserinin kümülâtif insidansı 10. ve 30. yıllarda sırasıyla %31 ve 50 olarak saptandığı görülmüştür. İnvaziv kansere yüksek ilerleme hızı göz önüne alındığında, kalıcı CIN 3'ün uzun süreli takibi artık önerilmemektedir (50).

Karsinoma in situ CIN3'ün içinde değerlendirilir. Servikal epitelin tüm katmanları atipik hücrelerce tutulmaktadır sadece bazal membran intaktır. Kullanılan terime rağmen kanser değildir, metastaz yapmaz (3).



Şekil -3: Servikal intraepitelial neoplazi gelişimi

Premalign Lezyonların Tedavi Yöntemleri

Servikal intraepitelyal neoplazi, maligniteye ilerleme riskine göre düşük dereceli (CIN 1) veya yüksek dereceli (CIN 2,3) olarak sınıflandırılan serviksin premalign bir lezyonudur. CIN'li hastaların yönetiminde amaç, gerileme olasılığı olan lezyonların aşırı tedavisinden kaçınırken, invaziv kansere olası ilerlemeyi önlemektir. Düşük riskli lezyonları olan bazı hastalar için gözetim veya gözlem uygunken, yüksek riskli lezyonları olan hastalar için eksizyonel veya ablatif bir prosedürle tedavi önerilir (51-53).

Eksizyonel tedaviler, koni biyopsileri veya servikal konizasyon olarak adlandırılır ve soğuk bıçak konizasyonu, loop elektro cerrahi eksizyon prosedürü (LEEP); transformasyon bölgesinin geniş halka eksizyonu (LLETZ) olarak da adlandırılır ve lazer konizasyonu içerir. Ablatif tedaviler arasında kriyoterapi, CO₂ lazer ablasyon ve termal ablasyon bulunmaktadır. Histerektomi, CIN için birincil tedavi olarak kabul edilemez, ancak eksizyon veya ablasyon ile tam olarak tedavi edilmeyen veya tekrarlayan CIN'i olan hastalar için bir seçenektir (53-55).

Amerika Birleşik Devletleri'nde, eksizyon, özellikle elektrocerrahi eksizyon prosedürü, ablasyon uygulamasının yerini önemli ölçüde almıştır. Tedavi uygulandığında, tüm CIN dereceleri için ablasyon yerine eksizyon tercih edilir çünkü bu, bir tanısal örnek gerekli olmadığında bile incelemeyi yapabileceğimiz bir tanısal örnek sağlar. Bu, LEEP'in mevcut olduğu ortamlarda kriyoterapi yerine LEEP'i öneren Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ile tutarlıdır (51,52). Karşılaştırıldığında, ASCCP eksizyon veya ablasyonun CIN 1 için kabul edilebilir tedavi olduğunu (tedavi endike olduğunda) ancak CIN 2,3 için ablasyon yerine eksizyonu tercih ettiğini belirtmektedir. CIN 2 ve 3 birlikte tartışılmaktadır çünkü iki CIN derecesi arasındaki histolojik ayrım net değildir ve her iki kategoride de kansere ilerleme riski yüksektir. Bu artan risk göz önüne alındığında, hamile hastalar ve 25 yaşından küçük hastalar haricinde, hızla eksizyonel tedaviye yönelinilmesi önerilmektedir. CIN 2 de gebelik istemi söz konusu olduğunda sıkı klinik takip bir seçenek olarak değerlendirilebilir ancak gebelik hali haricinde CIN 3 de takip bir seçenek değildir. Gebelik durumunda lezyonda gözle görülür bir ilerleme olana dek postpartum 4. haftaya dek tedavi süresi ertelenebilir (51-55).

Gebelik isteyen hastada teorik olarak, serviksin bütünlüğünün ablasyon sonrası eksizyona kıyasla daha iyi korunduğu düşünülür ve bazı analizler ablatif prosedürlerden sonra daha düşük bir advers obstetrik sonuç sıklığı bulmuştur. Bununla birlikte advers obstetrik sonuçlara yol açabilecek tek faktör servikal yetmezlik değildir. Eksizyonel tedavi sonrası artan advers obstetrik olay riskinin bir kısmı, servikal intraepitelyal neoplaziye veya CIN gelişmesine yatkınlık yaratan hastaların özelliklerine (örneğin; sigara içme, bakteriyel vajinoz, düşük sosyoekonomik durum, HPV enfeksiyonu) atfedilmiştir. Ablasyon veya eksizyonla tedavi edilen CIN 2 ve 3'lü tüm hastalar 20 yıl takip edilmelidir (53).

SERVİKS KANSERİ

Dünya çapında servikal kanser kadınlarda kanser ölümleri içerisinde dördüncü sırada bulunmaktadır ve gelişmekte olan ülkelerdeki kadınlarda meme kanserinden sonra en sık görülen ikinci kanserdir. Sosyoekonomik olarak gelişmiş ülkelere bakıldığında üçüncü en yaygın jinekolojik kanser olarak sayılmaktadır. Dünyada serviks kanserine bağlı mortaliteye bakıldığında, invaziv kanser tanısı konmuş 604.000 olgudan 342.000'inin bu sebeple öldüğü saptanmıştır. Uzun bir preinvaziv evresi olması, günümüzde sitoloji tarama programlarının ve preinvaziv lezyonların erken tanı ve tedavisinin mümkün olması sebebiyle önlenabilir bir hastalık olarak tanımlanabilir (2). Bu bakımdan aşılama programları, tarama teknikleri, tanı işlemleri ve risk faktörlerinin saptanması önem arz etmektedir. Serviks kanseri için insidans ve mortalite tahminleri ırk / etnik kökene göre değişim göstermektedir. Dünya çapında serviks kanseri mortalitesinin siyahî kadınlar arasında en yüksek olduğu, 4,2/100.000, yeni vaka sayısının ise hispanikler arasında en fazla görüldüğü 10,9 /100.000 saptanmıştır (56).

Serviks kanseri için birçok risk faktörü vardır; 16'dan küçük ilk cinsel ilişki yaşı, multipartner, sigara, ırk, yüksek parite, düşük sosyoekonomik düzey gibi. Klamidya ve herpes gibi enfeksiyonların da kofaktör olarak rol aldığı bilinmektedir (3).

HPV enfeksiyonu, servikal neoplazi gelişimi için gereklidir, ancak HPV ile enfekte hastaların büyük çoğunluğunda yüksek dereceli servikal lezyonlar veya kanser gelişmediğinden, HPV tek başına bu bozukluklara neden olmak için yeterli değildir (57-59).

Yüksek dereceli CIN ve serviks kanseri gelişimi ile ilişkili iki ana faktör; HPV'nin alt tipi ve virüsün kalıcılığıdır. Çevresel faktörlerin (örneğin, sigara içimi) ve immünolojik etkilerin de rol oynadığı görülmektedir. Kalıcılık olasılığı en sık aşağıdaki faktörlerle ilişkilidir:

- **İleri yaş** – Yüksek riskli HPV enfeksiyonlarının %50'si 55 yaşın üzerindeki hastalarda devam ederken, 25 yaşın altındaki hastalarda sadece %20'lik kalıcılık oranı olduğu görülmüştür (59).

- **Enfeksiyonun süresi** – Bir HPV enfeksiyonu ne kadar uzun süre tanınırsa, temizlenmesi o kadar uzun sürer. ASCUS-LSIL triyaj çalışmasında, en az 18 ay boyunca gözlenen enfeksiyonların %65'i altı ay daha devam ederken, yeni gözlenen HPV enfeksiyonlarının %37'si altı ay boyunca devam etti (60).

- **Yüksek riskli onkojenik HPV alt tipi** – Yüksek riskli onkojenik HPV alt tiplerinin, düşük onkojenik tiplere göre kalıcı olma olasılığı daha yüksektir (61).

Viral enfeksiyondan sonra bir konakçı bağışıklık tepkisi gelişir. Papillomavirüslere karşı immünolojik yanıt hala tam olarak anlaşılamamıştır; bununla birlikte, yeterli bir antikor yanıtı genellikle aynı viral tipe yeniden enfeksiyonu önler. Ancak doğal enfeksiyon bağışıklık sağlamaz.

Servikal transformasyon zonunda bulunan immatür skuamöz metaplazi, HPV'nin DNA hedef bölgesidir ve malign dönüşüm için en yüksek risk taşıyan bölgedir. Bu bölge epitelinin maturasyonunun artması malign dönüşüm ihtimalini azaltır (3,62).

Serviks kanseri gelişiminde dört ana adım vardır (62,63):

- Servikal transformasyon bölgesinde metaplastik epitelin onkojenik HPV enfeksiyonu.

- HPV enfeksiyonunun kalıcılığı.

- Kalıcı viral enfeksiyondan, prekanseröz bir epitel hücre klonunun bazal membrana doğru ilerlemesi.

- Karsinom gelişimi ve bazal membrandan invazyon.

Serviks Kanseri Histopatolojisi

Serviks kanserinin histopatolojik tiplerinin sıklığına bakıldığında invaziv squamoz hücreli karsinom %85-90 oranında karşımıza çıkarken alt tiplerinden büyük hücreli non keratinize karsinom en sık görülen tipidir. Günümüzde adenokanserin squamoza oranla insidansı artmaktadır. Squamoz hücreli kanserin premalign lezyonlarında lokalizasyonu sebebi ile erken tanısının daha mümkün olması ve taramalarla daha sık fark edilebilmesi bunun sebepleri arasındadır (3,64). Serviksin rabdomyosarkomu nadirdir; tipik olarak genç hastalarda ortaya çıkar. Primer servikal lenfoma ve servikal sarkom da nadirdir (3).

Tablo-1: Serviks kanseri histopatolojisi

Serviks Kanser Histopatolojisi
A. Skuamöz hücreli karsinom
Büyük hücreli, keratinize skuamöz hücreli karsinom
Büyük hücreli, keratinize olmayan skuamöz hücreli karsinom
Verrüköz karsinom
Papiller skuamöz ve geçiş hücreli karsinom
Lenfoepitelyoma benzeri karsinom
B. Adenokarsinom
Müsinöz, endoservikal varyant
Müsinöz, bağırsak tipi, taşlı yüzük çeşidi
Müsinöz, adenoma malignum (minimal sapma varyantı)
Müsinöz, villoglandüler adenokarsinom (iyi diferansiye)
Endometrioid tipi
Papiller seröz tip

Mezonefrik tip
C. Adenoskuamöz karsinom
D. Adenoid kistik karsinom
E. Nöroendokrin (karsinoid, küçük hücreli, büyük hücreli)
F. Farklılaşmamış karsinom
G. Karışık epitelyal ve mezenkimal tümörler

Serviks Kanseri Evreleme

Serviks kanseri, doğrudan yayılma veya lenfatik veya hematojen yayılım yoluyla yayılabilir. Direkt uzanım uterus korpusunu, vajinayı, parametriumları, periton boşluğunu, mesaneyi veya rektumu içerebilir.

Serviks kanseri geleneksel olarak klinik olarak evrelendirilir, ancak cerrahi ve radyolojik değerlendirme artık evre belirlemenin bir parçasıdır. Gerek görülür ise kolposkopi, IVP (İntravenöz Pyelografi), grafiler, sistoskopi, PET (Pozitron Emisyon Tomografisi), MR (Manyetik Rezonans) gibi yöntemlerde kullanılmaktadır (65). Cerrahi ve radyolojik evreleme, tedaviyi etkileyebilecek önemli bilgiler sağlar (65-67). Bununla birlikte, Uluslararası Jinekoloji ve Obstetrik Federasyonu (FIGO) çeşitli nedenlerle klinik evrelemeyi bir seçenek olarak kullanmaya devam etmektedir. Bunun sebepleri arasında serviks kanserinin kadınlar arasında en yaygın malignite olmaya devam ettiği düşük kaynaklı ülkelerde daha erişilebilir olması ve cerrahi tedaviye aday olmayan hastalarda cerrahi müdahaleden kaçınmak için yeterli olabileceğinin düşünülmesi sayılabilir (67-74).

Tümör evresi, serviks kanserinin birincil tanısı sırasında belirlenir ve nüks etse bile değişmez. Bu kural diğer jinekolojik kanserler için de geçerlidir. Tedaviyi (cerrahi, kemoradyasyon, tek başına kemoterapi) ve prognozu belirlediğinden, serviks kanserinin tedavi öncesi doğru evrelenmesi çok önemlidir.

Uluslararası Jinekoloji ve Obstetri Federasyonu serviks kanserinin evrelemesi (2018)

I Karsinom kesinlikle serviks ile sınırlıdır (uterin korpusta uzanım göz ardı edilmelidir)

IA Maksimum invazyon derinliği ≤ 5 mm olan, sadece mikroskopi ile teşhis edilebilen invaziv karsinom

IA1 Ölçülen stromal invazyon ≤ 3 mm derinlikte

IA2 Ölçülen stromal invazyon > 3 mm ve ≤ 5 mm derinlik

IB Ölçülen en derin invazyon > 5 mm olan invaziv karsinom (Evre IA' dan daha büyük), lezyon serviks uteri ile sınırlı

IB1 İnvaziv karsinom > 5 mm stromal invazyon derinliği ve en büyük boyutta ≤ 2 cm

IB2 En büyük boyutta > 2 cm ve ≤ 4 cm invaziv karsinom

IB3 En büyük boyutta > 4 cm invaziv karsinom

II Karsinom uterusun ötesine yayılmıştır, ancak vajinanın alt üçte birine veya pelvik duvara yayılmamıştır.

IIA Parametrial tutulum olmaksızın vajinanın üst üçte ikisi ile sınırlı tutulum

IIA1 En büyük boyutta invaziv karsinom ≤ 4 cm

IIA2 En büyük boyutta > 4 cm invaziv karsinom

IIB Parametrial tutulum var ama pelvik duvara kadar değil

III Karsinom vajinanın alt üçte birini tutar ve/veya pelvik duvara uzanır ve/veya hidronefroza veya böbrek fonksiyon bozukluğuna neden olur ve/veya pelvik ve/veya para-aortik lenf düğümlerini içerir

IIIA Karsinom, vajinanın alt üçte birini içerir ve pelvik duvara uzanmaz.

IIIB Pelvik duvara uzanım ve/veya hidronefroz veya çalışmayan böbreğe (başka bir nedene bağlı olduğu bilinmiyorsa)

IIIC Pelvik ve/veya para-aortik lenf nodlarının tutulumu (mikrometastazlar dâhil), tümör boyutu ve yaygınlığından bağımsız olarak (r-radyolojik ve p-patolojik notasyonları ile)

IIIC1 Sadece pelvik lenf nodu metastazı

IIIC2 Para-aortik lenf nodu metastazı

IV Karsinom, gerçek pelvisin ötesine geçmiştir veya mesane veya rektumun mukozasını tutmuştur (biyopsi ile kanıtlanmıştır). (Mukozada büllöz ödem, bir vakanın Evre IV'e ayrılmasına izin vermez.)

IVA Komşu pelvik organlara yayılma

IVB Uzak organlara yayılma

Serviks kanserinin prognostik faktörleri; evre, lenfatik yayılım, tümörün büyüklüğü, stromal invazyon derinliği, histolojik tip, Lenfovasküler Alan İnvazyonu (LVAI) ve yaşıdır. Lenf nodu tutulumu ve evre korele olarak ilerler, en önemli prognostik faktör olarak ise hastalığın evresi gösterilmiştir (3).

Korelasyon açısından bakıldığında; invazyon derinliği arttıkça pelvik lenf nodu metastazı riski artar (65-74).

●Aşama IA1 – %0,6

●Aşama IA2 – %7,0

Serviks Kanseri Tedavi

Serviks kanserinin tedavisini planlarken hastalığı erken evre ve ileri evre hastalık olarak ayırmak mümkündür. Uterus ile sınırlı serviks kanseri erken evre hastalık olarak kabul edilir. Erken evre serviks kanseri, FIGO evre IA, IB1 ve IB2 hastalığı ifade eder. Erken evre serviks kanseri olan kadınlar için tedavi seçenekleri arasında modifiye radikal histerektomi, radikal histerektomi, doğurganlığı koruyucu cerrahi seçenekleri (trakelektomi gibi) yer alır. Tedavi seçimi tümör ve hasta faktörlerine bağlıdır. Evre IA1 – Lenfadenektomi olmadan koni biyopsisi veya ekstrasfasyal (Tip 1) histerektomi. LVAI varsa, modifiye radikal histerektomi ve Pelvik lenfadenektomi yapılmalıdır (42). Evre IA2- Pelvik lenfadenektomi ile modifiye radikal (Tip 2) histerektomi. Evre IB1 ve IB2- Pelvik lenfadenektomi ile radikal (Tip 3) histerektomi. Evre IB3- Belli koşullarda, farklı kliniklerde pelvik lenfadenektomi ile radikal (Tip 3) histerektomi tercih edilebilir.

Tablo: 2 –Histerektomi türleri

Histerektomi türleri
Piver-Rutledge-Smith Sınıflandırması [priver]
Tip I
Ekstrafasyal histerektomi: Serviks ile lenfatiklerden zengin olan serviks ve alt uterin segmentin fasyası çıkarılır.
Tip II
Modifiye radikal histerektomi: Uterus arteri üreterin üzerinden geçtiği yerde bağlanır ve uterosakral ve kardinal bağlar sırasıyla sakrum ve pelvik yan duvara tutunmalarına doğru yarı yolda bölünür. Vajinanın üst üçte biri rezeke edilir.
Tip III
Radikal histerektomi: Uterin arter, superior vezikal veya internal iliak arterden çıktığı yerden bağlanır. Uterosakral ve kardinal bağlar, sakrum ve pelvik yan duvara tutunma noktalarından rezeke edilir. Vajinanın üst yarısı rezeke edilir.
Tip IV
Radikal histerektomi: Üreter vezikouterin ligamanından tamamen diseke edilir, superior vezikal arter feda edilir ve vajinanın dörtte üçü rezeke edilir.
Tip V

Radikal histerektomi: Üreteral reimplantasyon ile mesanenin veya distal üreterin bir kısmının mesaneye ek rezeksiyonu vardır.

Günümüzde bu histerektomi sınıflamasının değişik modifiye halleri sınıflama için kullanılmaktadır.

Erken evre hastalıkta adjuvan radyoterapi veya kemoradyoterapi aşağıdaki hastalarda endikedir:

●**Orta risk faktörleri:** (tümör boyutu >4 cm, lenfovasküler alan invazyonu [LVSI] ve/veya derin servikal stromal invazyon) veya

●**Yüksek risk faktörleri:** (patolojik olarak tutulmuş lenf nodları, parametrial invazyon veya pozitif cerrahi sınırlar)

Lokal olarak ilerlemiş serviks kanseri evre IB3, II, III ve IVA hastaları içerir.

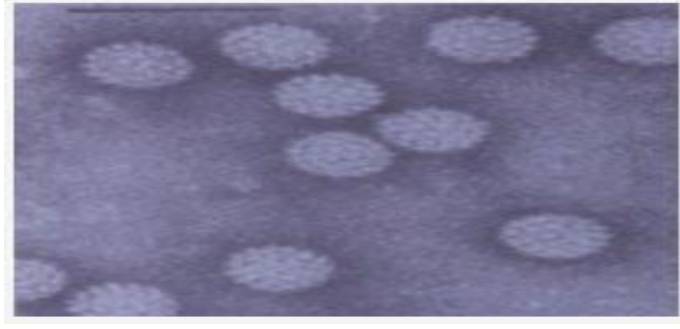
Lokal olarak ilerlemiş serviks kanseri olan kadınlar için standart tedavi primer kemoradyoterapidir. Kemoterapi, serviks kanseri tedavisi için genellikle tek ajan sisplatin veya sisplatin artı fluorourasil (FU) kombinasyonu ile uygulanır. Bunlardan RT sırasında haftalık sisplatin (40 mg/m²) önerilmektedir. Daha erken evrede (evre IB'den IIB'ye kadar) olan kadınlarda tedavinin sonraki evrelerde (evre III ila IVA) olanlara göre daha büyük yararları olduğu görülmektedir (65-69).

Evre IVB hastalıkta tedaviye sistemik kemoterapi ile başlanır, alınan cevaba göre daha çok palyatif seçeneklerle devam edilir.

HPV VE KARSİNOGENEZ

Human Papilloma Virus

Papillomavirüsler, Papillomaviridae ailesinin Papillomavirüs cinsini oluşturan çift sarmallı DNA (Deoksiribo Nükleik Asit) virüsleridir. Bu virüsler türe özeldir; insan papilloma virüsleri yalnızca insanları enfekte eder (66).



Şekil -5: HPV elektron mikroskop görüntüsü

HPV virüsleri insanların skuamöz veya metaplazik epitelyal hücrelerini enfekte ederek epitel proliferasyonuna yol açan epiteliotropik virüslerdir. HPV virüslerinin erken ve geç genlerden üretilen proteinleri vardır. Erken protein gen bölgeleri (E1, 2, 4, 5, 6, 7) ve geç protein bölgeleri (L1,2); erken proteinler alt epitelyal katmanlarda eksprese edilirler. Geç proteinler ise daha yüzeyel epitel katmanlarında eksprese edilirler (3,66).

Hücrelerde HPV gen ekspresyonu, skuamöz epitelyal farklılaşma ile eş zamanlı ve ona bağımlı olarak gerçekleşir. İnsan genomuna E1/E2 proteinleri ile bağlanır ve bağlanma sonucunda E6 ve E7 proteinleri sentezlenir. E6 ve E7 viral proteinleri insan genital epitel hücrelerinin konakçı tümör süpresör proteinleri üzerinden etki eder; E7 proteini, insan vücudunda pRB genine bağlanarak hücrenin sentez fazına girmesine ve DNA sentezinin artmasına yol açar. E6 proteini ise p53 genine bağlanarak, o genin en önemli görevi olan DNA hasarını onarma fonksiyonunu bozar. Bunların sonucu olarak hücrelerde anormal bir çoğalma fazı başlar. HPV virüsünün karsinogenezi başlatma yolağı bu şekildedir.

Servikal epiteli enfekte eden HPV'ler düşük veya yüksek riskli HPV'ler olarak sınıflandırılmıştır. Bugüne kadar yaklaşık olarak 100'den fazla HPV tipi tanımlanmıştır, onkojenitelerine göre yüksek riskli ve düşük riskli olarak sınıflandırılır. Serviks kanserinden sorumlu yaklaşık 15 tip yüksek riskli HPV bulunmaktadır. Aralarında en yüksek riskli olanı HPV 16 diğer tiplere oranla persiste olma, kronikleşme eğilimi en yüksek olanıdır. HPV 16; CIN 3 lezyonlarında %45, serviks kanserlerinde %55, anogenital sistem ve orofarenks kanserlerinde %20 oranında görülen HPV tipidir. Servikal kanserde sıklıkla görülen HPV 16, 18, 45, 31 tipleri aynı zamanda genel popülasyonda en sık karşılaştığımız tiplerdir (66,67).

Düşük riskli HPV tipleri: HPV **6, 11**, 40, 42, 43, 44, 53, 54, 61, 72, 73 ve 81 (zayıf onkojenite gösterirler ve keratonisitlerde ölümsüzlük oluşturmazlar).

Yüksek riskli HPV'ler; HPV **16, 18**, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68.

Servikal kanserde ve CIN 2,3 de en sık görülen tip HPV 16 olup tüm skuamöz hücreli servikal kanserlerin %50'sinde, serviks adenokanserlerinin ise yaklaşık %30'unda saptanır. HPV 18, ikinci sıklıkta görülen onkojenik özellikteki HPV'dir. Tip 18'in virulansının yüksek olup prekürsor lezyonları çok hızlı bir şekilde invazyona ilerlettiği düşünülmekte ve HPV 18 varlığı kötü prognostik faktör olarak gösterilmektedir. HPV 18 + kanserli hastaların ortalama yaşı, HPV 16 saptanan kanserli hastalardan 8-12 yaş daha gençtir (68,69).

Skuamöz hücreli karsinom ile ilişkili HPV alt tipleri, adenokarsinom ile ilişkili olanlardan farklıdır. 30.000'den fazla serviks kanseri derlenerek yapılan uluslararası bir çalışmada, HPV alt tiplerinin dağılımı şu şekilde tespit edilmiştir (68,69).

- Skuamöz hücreli karsinom- HPV 16 (%59), 18 (%13), 58 (%5), 33(%5), 45 (%4).

- Adenokarsinom- HPV 16 (%36), 18 (%37), 45 (%5), 31 (%2), 33 (%2).

Klinik olarak gördüğümüz HPV enfeksiyonlarının büyük kısmı sitolojik anormallik oluşturmamasından bağımsız olarak geçicidir. Bulaşın ardından HPV enfeksiyonu gelişmesi için ortalama süreç 3 ay olarak görülmüştür, 9-15 ayda hücrel immünite tarafından lezyonların çoğu baskılanır ve ortadan kaldırılır. HPV ile enfekte olan hastalara dünya genelinde bakıldığında, HPV genotiplerinin dağılımı jeografik dağılımda değişiklik göstermektedir. Normal servikal sitolojili kadınların dahil edildiği bir meta analizde dünya geneli HPV prevalansı yaklaşık %10 olarak bulunmuştur (70,71).

HPV enfeksiyonlarının çoğu, 25 yaş altı genç kadınlarda gelişmektedir. Enfeksiyonu kendiliğinden gerileyen kadınların daha genç yaşta oldukları ve daha çok düşük riskli HPV tipleri ile enfekte oldukları görülmüştür. Öncesinde enfekte olduğu bilinen ve 12 aylık takiplerine gelen kadınların %50'sinden fazlasında başlangıçta tespit edilen HPV tipleri kaybolur, 18 ay ve üzeri dönemde ise kontrole devam eden kadınların %75'ten fazlasında ilk baştaki enfeksiyonları ile karşılaşmaz (67,72). Buna karşılık, yüksek riskli HPV ile enfekte kadınların sadece %50'sinde

ikinci kontrolde enfeksiyonların temizlendiği görülmüştür. Spesifik bir HPV tipinin kişide 12 ay veya daha uzun süre persiste olması durumunda immün sistem tarafından temizlenme şansı azalır ve prekanseröz lezyon gelişim riskinde artış görülür. HPV ile ilişkili kanser riskini arttıran faktörleri şunlardır:

- Cinsel aktivitenin erken başlangıcı: 21 yaş ve üzerindeki ilk ilişki yaşı ile karşılaştırıldığında, risk 18 ile 20 yaş için yaklaşık 1,5 kat ve 18 yaşından küçükler için iki kattır.

- Çoklu cinsel partner: Bir partnerle karşılaştırıldığında, risk iki partnerde yaklaşık iki kat ve altı veya daha fazla partnerde üç kat artmıştır (67,82).

- Yüksek riskli bir cinsel partner: (örneğin; birden fazla cinsel partneri olan bir partner veya bilinen HPV enfeksiyonu).

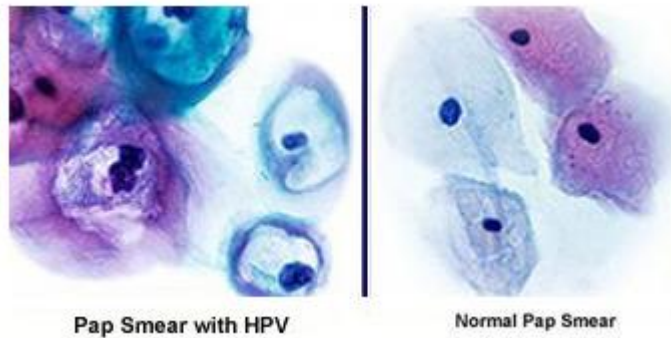
- Cinsel yolla bulaşan enfeksiyon geçmişi olması: (örneğin; Chlamydia trachomatis, genital herpes).

- İlk doğumda erken yaş (20 yaşından küçük) ve artan doğum (üç veya daha fazla tam doğum) (67,83).

- Vulvar veya vajinal skuamöz intraepitelyal neoplazi veya kanser öyküsü (HPV enfeksiyonu aynı zamanda bu lezyonların etiolojisinde rol oynar).

- İmmünsüpresyon (örneğin, HIV enfeksiyonu).

Sigara içmek, serviks kanseri riskinde artış ile ilişkilidir (72,82).



Şekil -6: Koilositoz

HPV bulaşı sonrasında hastada HPV enfeksiyonunun gelişmesinde başlıca 3 aşama vardır:

1) Latent Evre:

Kişiye genital HPV bulaşı olduktan sonra cinsel ilişkiye bağlı mikrotravmaların çok görüldüğü stratum germinatumdaki bazal hücreleri enfekte eder. Kılıfından ayrılan virus genomu hücrenin çekirdeğine ulaşır ve konak DNA'sına entegre olmadan latent olarak kalır. Bu süreç 3 hafta ile 8 ay arasında değişir, HPV test edilemeden yıllarca bu evrede kalabilir. Bu evrede hastalığın morfolojik, sitolojik ve kolposkopik görülen bir bulgusu yoktur, yalnızca ultra sensitif PCR (Polimeraz Chain Reaction) teknikleri ile HPV DNA gösterilebilir.

2) Subklinik Evre:

Hastanın immun sisteminin zayıf olmasına sekonder, virusun çoğalmasıyla ve büyüme faktörlerinin de etkisiyle subklinik evreye geçilir. Hastanın muayenesinde çıplak gözle görülmeyen hücre değişikliklerini tanımlamak için kullanılır. Bu dönemde epitel proliferasyonu, akantozis, hiperkromazi gelişir. Sıkça gördüğümüz servikal intraepitelyal neoplaziler subklinik evreye örnek olarak gösterilebilir. Stratum granulosum hücrelerinden oluşan **koilositler** yine bu dönemde tespit edilebilir. Subklinik dönemde sitoloji ve kolposkopi pozitif sonuç verebilir. HPV bu dönemde konak genomuna entegre olduğunda da olmadığında da anormal smear sonuçlarına yol açıp kolposkopik bulgu verebilir (3).

3) Klinik evre:

Kondilom ve gözle görülebilen, klinik bulgu veren kanser gelişimi ile kendini gösteren evredir.

SERVİKS KANSERİNDE TARAMA VE TANI YÖNTEMLERİ

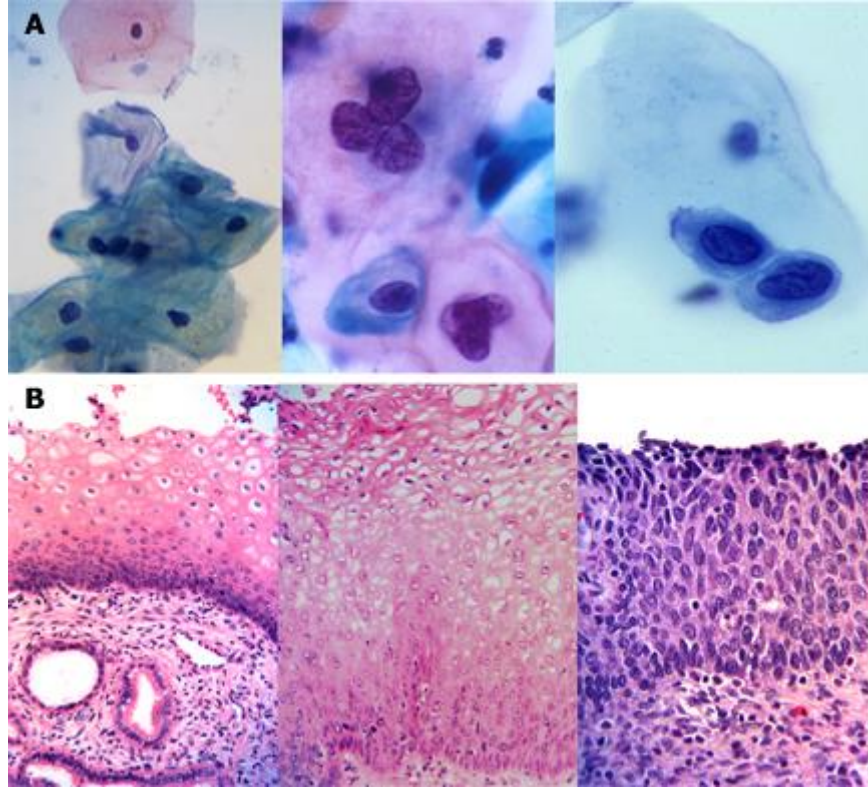
Serviksin preinvaziv lezyonları asemptomatik olabilmelerine rağmen spesifik tanı yöntemleri ile saptanabilmekte, uygun yöntemle düzenli olarak takip ve tedavi edildiğinde ise serviks kanseri gelişimi ve buna bağlı ölümler önlenebilmektedir. Sistematik servikal sitolojik tarama programı ile erken evre lezyonlarda artış görülmesine rağmen serviks kanserine bağlı ölümlerin %70 azalacağı hesaplanmaktadır (84).

Serviks kanseri taraması, serviksteki premalign değişiklikleri saptar ve genellikle serviks kanseri gelişmeden önce tedaviyi mümkün kılar. Tarama, HPV testi veya iki testin bir kombinasyonunu (co-test) kullanır. İlk defa 2003 yılında FDA

30 yaş üstü kadınlarda tarama için sitoloji ile HPV DNA taramasının kullanılmasını onaylamıştır. Günümüzde; ACS (Amerikan Cancer Society), her beş yılda bir FDA onaylı birincil HPV testi ile 25 yaşında taramaya başlanmasını önermektedir (85). HPV DNA testi ile sitolojinin beraber kullanılması HSIL lezyonlar için tanı duyarlılığını neredeyse %50'lerden %85'lere kadar yükseltir (33).

PAP SMEAR

Serviks kanseri için tarama ilk kez 1927 yılında Babas tarafından ortaya atılmış, daha sonra Papanicolaou ve Traut tarafından yaygınlaştırılmıştır (86). Servikal lezyonlar açısından bir tarama yöntemi olan servikovajinal sitoloji (Pap-smear) serviks ve vajen epitelinden dökülen normal hücreler ve hastalık nedeni ile değişmiş hücrelerin incelenmesine dayanan bir testtir. Serviks kanseri tanısı için sitolojik örnekler vajinal forniks, ektoserviks ve endoserviksten alınmalıdır. 1950'li yıllarda kullanılmaya başlanılan konvansiyonel yöntemler yerini son 10 yıldır likid (sıvı) aracılıklı yöntemlere bırakmıştır. Konvansiyonel yöntemlerin duyarlılıklarının düşük olması, alınırken ve transport sırasında birtakım kayıpların olması, değerlendirmelerinde patologlar tarafından sonuçların farklı yorumlanabilmesi belli başlı olumsuz yönleridir. Sonuçlar alınan örneğe, preparatın hazırlanmasına ve yorumlayan patoloğa bağlı olarak değişebilmektedir. Bunlara göre bu testin duyarlılığı geniş aralıklarda seyretmekte ve yüksek negatiflik oranı vermektedir (3). Konvansiyonel Pap test ile ilgili olarak yüksek dereceli lezyonlarda geniş bir sensitivite aralığı verilmiştir (%30-%87) (87-89). Metaanalizlerde bu oran ortalama %58 olarak bildirilmiştir (90). Aynı zamanda %14 ile %33 arasında değişen yanlış negatiflik oranı verilmiştir. Sitoloji, sadece bir tarama testi olup kesin tanı koyma aracı değildir.



Kolposkopik biyopsilerden, servikal sitoloji bulguları ve biyopsi histolojik bulguları; sırasıyla A1-normal sitoloji, A2-LSIL, A3-HSIL; B1-Normal servikal doku B2-CIN1, B3-CIN3; düşük dereceli ve yüksek dereceli lezyonların histolojik karşılaştırılması.

Şekil -7: Servikal sitoloji ve Histoloji boyama görüntüleri

HPV DNA

Günümüzde HPV DNA araştırmasında polimeraz chain reaction ve hybrid capture II (HCII) günümüzde geçerliliği olan iki yöntemdir. Klinik olarak kanser olan olguların incelendiği bir derlemede PCR ve HC2 yöntemleri kullanılmıştır; sensitivite ve spesifiteleri PCR için %87,4 ve %55,6 HC2 yöntemi için %92,5 ile %51,1'dir (91-95). Premalign lezyonların tanısında ise yapılan bir araştırmada, HPV genotipleme PCR kullanılarak CIN 2 veya üzerinin saptanması için sensitivite, spesifisite, pozitif prediktif değer ve negatif prediktif değer sırasıyla %96,11, %85,76, %30,94 ve %99,70 olarak bulunmuştur (95). Yine yapılan bir çalışmada HC2 yöntemi için CIN2, CIN3 ve invaziv kanser tanısında sensitivite %95,3 olarak bulunmuştur (96). Bir başka çalışmada CIN 2, CIN 3 biyopsi örneklerinde HC2 spesifitesi %95 bulunmuştur (97).

PCR ve diğer nükleik asit tanı yöntemleri ile teşhis edilen birçok servikal HPV enfeksiyonu geçici gibi görünmektedir. HPV epiteliotropiktir; epitel enfekte olduğunda, virüs sitoplazmada kalabilir veya konak genomuna entegre olabilir. HPV, epizomal entegre olmayan bir durumda kaldığında, sonuç düşük dereceli bir lezyondur. Virüs insan genomuna entegre olduğunda, yüksek dereceli lezyonlar ve kanser gelişebilir.

Tek başına HPV testinin serviks kanseri taramasında kullanımı giderek desteklenen yöntemler arasındadır. Taramada kullanılan tek başına HPV testi, PAP testinin nerdeyse iki katı duyarlılıktadır. Ancak özellikle genç kadınlarda özgüllüğü belirgin derecede düşüktür (33).

USPSTF (United States Preventive Services Task Force); 29 yaşına kadar her üç yılda bir servikal sitoloji ile 21 yaşında taramaya başlanmasını önermektedir. 30-65 yaş arasında ise USPSTF her beş yılda bir birincil HPV testi (FDA onaylı bir testle) veya her beş yılda bir birlikte test (Pap ve HPV testi); veya her üç yılda bir tek başına Pap testi önermektedir.

Eğer HPV DNA testi tek başına yapılacaksa 2015, ASCCP; 25-65 yaş arası 3 yılda bir, ACS (Amerikan Cancer Society), her beş yılda bir FDA onaylı birincil HPV testi ile 25 yaşında taramaya başlanmasını önermektedir (85).

USPSTF önerileri, bir yöntemi diğerine tercih etmezken, ACS önerileri, diğer stratejilere göre birincil HPV testini tercih eder (85,99)

Ülkemiz sosyoekonomik koşulları dikkate alındığında ise, kadınlarda 30 yaşında başlayan ve 65 yaşında biten toplum tabanlı tarama planlanmıştır. Yapılan çalışmalarda, HPV testlerinin taramada tek başına kullanılması, sitoloji ile kullanıma göre anlamlı bir dezavantaj oluşturmamıştır (100). Taramada HPV testi kullanılması önerilmektedir, HPV testi her beş yılda bir tekrarlanır. Bu yöntemde; HPV negatif ise beş yılda bir HPV DNA bakılması, HPV diğer pozitif ise sitoloji bakılması, sitolojinin anormal olması, ASCUS ve üzeri lezyon pozitifliği, halinde kolposkopi planlanması, sitoloji normal ise 1 sene sonra HPV DNA test tekrarı önerilmektedir. HPV DNA 16 ve 18 pozitifliği varsa kolposkopi önerilir (100-101).

BETHESDA SİSTEMİ

1988 yılında düzenlenen bir Ulusal Kanser Enstitüsü (NCI) çalışması sonucunda sitolojik raporların evrensel olarak tanımlanabilmesi için Bethesda sisteminin geliştirilmiştir. Bethesda sistemi son on yılda yeni tarama yöntemlerinin geliştirilmesi; sıvı bazlı kitler, HPV DNA gibi, tedavi ve aşı yöntemlerinin geliştirilmesi ile daha sonra 1991, 2001 ve 2014'te revize edilmiştir.

Bethesda 2014 revizyonunda yapılan önemli değişikliklerden bahsetmek gerekirse; sitolojide saptanan endometrial hücrelerin benign dahi olsa herhangi bir endometrial patolojinin göstergesi olabileceği, çalışmalardan yola çıkarak, post menepoz, 45 yaş üzeri hastada bu hücrelerin belirtilmesi gerektiği konusuna dikkat çekilmiştir (101).

2014 BETHESDA SİSTEMİ

Numune Tipi

Geleneksel smear (Pap smear) veya sıvı bazlı kit (Pap testi) ile diğerleri belirtilmeli.

Numune Yeterliliği

- Değerlendirme için tatmin edici (endoservikal/transformasyon bölgesi bileşeninin ve diğer kalite göstergelerinin varlığı veya yokluğu tanımlanmalı, örn. kısmen kanın gizlemesi, iltihaplanma vb.)

- Değerlendirme için yetersiz (nedeni belirtilmeli)
- Örnek reddedildi/işlenmedi (nedeni belirtilmeli)
- Örnek işlendi ve incelendi, ancak epitel anormalliğinin değerlendirilmesi için yetersiz (nedeni belirtilmeli)

Genel Kategorizasyon (opsiyonel)

- İntraepitelyal lezyon veya malignite için negatif
- Diğer: (örn. 45 yaşındaki bir kadında endometriyal hücreler)
- Epitelyal hücre anormalliği: (“skuamöz” veya “glandüler”i uygun şekilde belirtilmeli)

Yorum/Sonuç

İntraepitelyal lezyon veya malignite açısından negatif

(Neoplazinin hücresel kanıtı olmadığında, bunu yukarıdaki Genel Kategorizasyonda ve/veya İnceleme/Sonuç bölümünde belirtilmeli)

Neoplastik Olmayan Bulgular (raporlanması isteğe bağlı)

- Neoplastik olmayan hücresel varyasyonlar
- Skuamöz metaplazi
- Keratotik değişiklikler
- Tubal metaplazi
- Atrofi
- Hamilelikle ilişkili değişiklikler

Aşağıdakilerle ilişkili reaktif hücresel değişiklikler:

Enflamasyon

- Lenfositik (foliküler) servisit
- Radyasyon
- Rahim içi doğum kontrol cihazı (RİA)

Histerektomi sonrası görülebilen glandüler hücre durumu

Organizmalar

- Trichomonas vaginalis
- Morfolojik olarak Candida spp. İle uyumlu mantar organizmaları.
- Bakteriyel vajinozu düşündüren floradaki kayma
- Bakteriler morfolojik olarak Actinomyces spp.
- Herpes simpleks virüsü ile uyumlu hücresel değişiklikler
- Sitomegalovirüs ile uyumlu hücresel değişiklikler

Epitel Hücre Anormallikleri

Skuamöz Hücreler

Atipik skuamöz hücreler

- Belirsiz öneme sahip (ASC-US)
- HSIL hariç tutulamaz (ASC-H)

Düşük dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon (LSIL)

(Kapsayan: HPV/hafif displazi/CIN-1)

Yüksek dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon (HSIL)

(Kapsayan: orta ve şiddetli displazi, karsinoma in-situ; CIN-2 ve CIN-3)

İnvazyon Şüphesi

Skvamöz hücre karsinomu

Glandüler Hücreler

Atipik

- Endoservikal hücreler
- Endometrial hücreler
- Glandüler hücreler

Atipik

- Endoservikal hücreler, neoplastik lehine
- Glandüler hücreler, neoplastik lehine

Endoservikal adenokarsinoma in situ

Adenokarsinom

- Endoservikal
- Endometrial
- Ekstrauterin

Diğer Malign Neoplazmalar (belirtiniz)

Kolposkopi

Servikal kolposkopinin amacı; vajende, ektoservikte, transformasyon zonunda ya da servikal kanalda bulunan lezyonların tanımlanması, prekanseröz lezyonların varlığının araştırılması ve anormal Pap-smear ve/veya HPV pozitifliği sonucunda biyopsi yapılacak alanların tespit edilmesidir (3).

Kolposkopinin birçok çeşidi vardır, ancak hepsi benzer prensiple çalışır. Lezyonu büyötmek ve aydınlatmak, daha görünür kılmak, ışık kontrastı ve boyalar ile dokuyu ve doku altını daha iyi gözlemlemeyi sağlar. Kelime anlamına bakıldığında kolposkopi vajina içine bakmak demektir (colpo ve scope). Kolposkop, Hans Hinselman tarafından 1925’ te bulunmuştur. 1960’ların sonu ve 1970’lerin başlarında özellikle Coppersan ve arkadaşları Kolstad, Stahl, Townsed

ve Burghardt gibi yazarların kolposkopi ile ilgili terminolojiyi geliştirerek değiştirmeleri, bu arada eğitim kursları dñzenlenip kolposkopinin asistanlık eğitimine sokulmasıyla, serviks, vajina, vulva, perine hatta penis ve scrotumdaki lezyonların tanı ve izlenmesinde kolposkopi, giderek artan derecede kullanıma girmiştir. Kolposkopi araçları görüntüyü 6 ile 40 kat arasında büyütebilirler, ancak daha çok 10' luk büyütmeye çalışılır. Servikal kolposkopinin amacı, transformasyon zonunda, serviks üzerinde ya da servikal kanalda bulunan lezyonların tanımlanması, biyopsi yapılabilecek prekanseröz serviks lezyonlarının varlığının araştırılması ve anormal pap-smear sonucunda parça alınacak alanların tespit edilmesidir (3,33).

Tablo: 3 Kolposkopi endikasyonları

Kolposkopi endikasyonları
• Anormal Pap Smear sonucu • LSIL sonucu (TBS=The Bethesda System) / Hafif diskaryozis/borderline çekirdek değişiklikleri (BSCC=British Society for Clinical Cytology) • HSIL sonucu / orta veya şiddetli diskaryozis (anormal çekirdek görünümü) • Glandüler anormal hücre varlığı • İnvaziv neoplazi şüphesi • Yüksek riskli HPV varlığı • Çıplak gözle görülebilen Cx-vajen Ca şüphesi • Tekrarlayan yetersiz smear sonuçları • Verilen tedaviye rağmen sürekli inflamatuvar hücreler • Postkoital kanama, kanlı vajinal akıntı öyküsü • Hipertrofik T/Z görülmesi • CIN tedavisinin takibinin yapılması • VIN veya VaIN'li hastaların değerlendirme ve takibinin yapılması • Fetal hayatta DES'e maruz kalma öyküsü

Kolposkopinin Uygulanışı

Hasta rahat olacak bir şekilde modifiye litotomi pozisyonuna alınıp dış genital sistem incelendikten sonra, serviksi tamamen ortaya koyacak tarzda spekulum vajinaya yavaşça yerleştirilir. Serviks incelenir, gereklilik halinde smear tekrarlanır.

Serviksin normal squamöz epiteli, kolposkopide, özelliksiz, pürüzsüz ve soluk pembe renkte görülür. Kan damarları bu tabaka altında uzanır, görünmez veya sadece kapiller bir ağ olarak görülür. Müsin salgılayan kolumnar epitelin ince olması, damarların yüzeye yakın yerleşmesi, sebebi ile kırmızı renklidir, polipoid bir görünümü vardır. Kolposkopi ile biyopsi yapılacak doğru alan yani high-grade

neoplaziyi içeren alan bulunmaya çalışılır. Bu amaçla birkaç derecelendirme sistemi oluşturulmuştur. En iyi bilineni Reid derecelendirme sistemidir. Ancak bu sistemde yer alan 4 ana kriterin (periferik sınır, vasküler patern, renk, lugol ile boyanma) her biri 0-2 arasında skorlanır ve bu kolposkopiste göre subjektif sayılabilecek bir puanlama sistemidir. Bu sebeple aşağıda ayrıntılı olarak bahsedilecek olan, Uluslararası Servikal Patoloji ve Histoloji Federasyonu tarafından 2011 de daha objektif bulgular derecelendirmeye eklenmiş, Reid sistemine göre sıfıra denk gelen düşük derece lezyonlar minör (grade 1), yüksek dereceli lezyonlar majör (grade 2) olarak derecelendirilmiştir.

2011 IFCPC, Serviks kolposkopik değerlendirme terminolojisine göre raporda bulunması gerekenler;

Genel değerlendirme: Sebep açısından yeterli veya yetersiz (örn. serviksin iltihaplanma, kanama, yara izi nedeniyle kapanması)

Skuamokolumnar bileşke görünürlüğü: tamamen görünür, kısmen görünür, görünmez.

Transformasyon bölgesi türleri 1, 2, 3

Normal kolposkopik bulgular

Orijinal yassı epitel: olgun, atrofik, kolumnar epitel, ektopi/ektropion, Metaplastik yassı epitel,

Nabothi kistleri, kript (bez) açıklıkları, Hamilelikte desiduo

Anormal kolposkopik bulgular

Genel Bilgiler

Lezyonun yeri: transformasyon zonunun içinde veya dışında, saat konumuna göre lezyonun yeri

Lezyonun boyutu: lezyonun kapladığı servikal kadran sayısı, serviks %'si olarak lezyonun boyutu

Grade 1 (minör):

- Hafif aseto beyaz epitel,
- İnce mozaik görünüm,
- İrregüler coğrafi sınır

- İnce punktuasyon

Grade 2 (majör):

- Dens, çabuk beyazlayan aseto beyaz epitel
- Kaba mozaik görünüm
- Keskin sınır
- Kaba punktuasyon
- Manşet biçimli bez (kript) ağızları (cuff cyrpt openings)
- Tepe Belirtisi (ridge sign)
- İnternal sınır belirtisi (inner border sign)

Spesifik olmayan: lökoplaki (keratoz, hiperkeratoz), erozyon

Lugol boyaması (Schiller testi): lekeli veya lekesiz

İnvazyon için şüpheli bulgular

Atipik damarlar, kırılğan damarlar, düzensiz yüzey, ekzofitik lezyon, nekroz, ülserasyon (nekrotik), tümör veya büyük neoplazm.

Ek bulgular

Konjenital transformasyon bölgesi, kondilom, polip (ektoservikal veya endoservikal), inflamasyon, stenoz, konjenital anomali, tedavi sonrası sonuç, endometriozis.

Klasik kolposkopi tekniği; ilk tanımlanan ve en çok kullanılan tekniktir. Spekulum yerleştirildikten sonra üst vajina ve serviks giderek artan büyütme ile incelenir. Servikal epitel **serum fizyolojik** ile temizlendikten sonra, **%3- 5'lik asetik asit** solüsyonu servikse uygulanıp 60-90 saniye kadar beklenir. Serviks, lezyonlar ve vasküler paternler açısından tekrar incelenir. Beyaz alanlar asetowhite alan olarak isimlendirilir, bu şüpheli alanların beyaz rengi dokunma ile uzaklaşmaz (3,33).

Bu aşamadan sonra serviks ve üst vajinaya **Schiller solüsyonu** (lugol solüsyonu; %1 iyot, %3 potasyum iyodür karışımı) uygulanabilir. Glikojenden zengin dokuları koyu renkte boyayan Schiller solüsyonu, anormal epitel hücrelerini

glikojenden fakir oldukları için açık renkli alanlar olarak gösterecektir. Teste göre glikojen içermeyen, iyodu tutmayan bölgeler iyot negatif (Schiller pozitif), iyodu tutan, koyu kahverengi boyanan bölgeler ise iyot pozitif (Schiller negatif) olarak isimlendirilir.

Asetobeyaz Epitel

Asetik asit uygulanması, sitoplazma ve çekirdek proteinlerini koagüle eder ve koagüloproteinler de opak veya beyaz görünür. Artan nükleer dansitenin asetik asit uygulaması ile belirlenmesine bağlı geçici patolojik bir bulgudur. Anormal transformasyon zonunun en yaygın bulgusu olarak kabul edilse de CIN için spesifik değildir. Normal yüzeyden kabarık bir izlenim verir. Asetik asit glikojen üreten matür epitel etkilemez, bu hücreler kolposkopi esnasında pembe görünür. Displastik hücreler asetik asit uygulamasından en çok etkilenen kısımlardır. Çünkü anormal miktarda kromatinli, büyük çekirdeklere sahiptirler. Asetik asit uygulandıktan sonra kolumnar villuslar şişer ve hücreler daha kolay görünür. İmmatür metaplastik hücreler daha büyük çekirdekli olup, bunlar da asetik asitle etkileşirler.

Punktuasyon

Kolposkopi sırasında görülebilen bu vasküler görünüm yol göstericidir. Uçlardan nokta koleksiyonu olarak başlayan ve yüzeyde dilate olarak sonlanan kapillerler kolposkopik olarak nokta nokta bir görünüm alır. Buna punktuasyon denir. Transformasyon zonunda peteşi sahaları şeklinde göze çarpar. Eğer bu damarlar iyi sınırlanmış asetowhite epitel altında yer alıyorsa, anormal hücreli epitele, çoğunlukla da CIN'e işaret eder.

Mozaik patern

Bir araya gelen asetobeyaz epitel bloklarını dairesel veya çok yönlü çevreleyen terminal kapillere mozaik adı verilir; çünkü bunların görünümleri mozaığe benzemektedir. Anormal epitel blokları etrafında bir ağ oluşturan bu damarlar, birçok punktuasyon gösteren terminal damarın birleşmesinden veya servikal salgı bezi ağızlarını çevreleyen damarlardan meydana gelebilir.

Atipik damarlanma

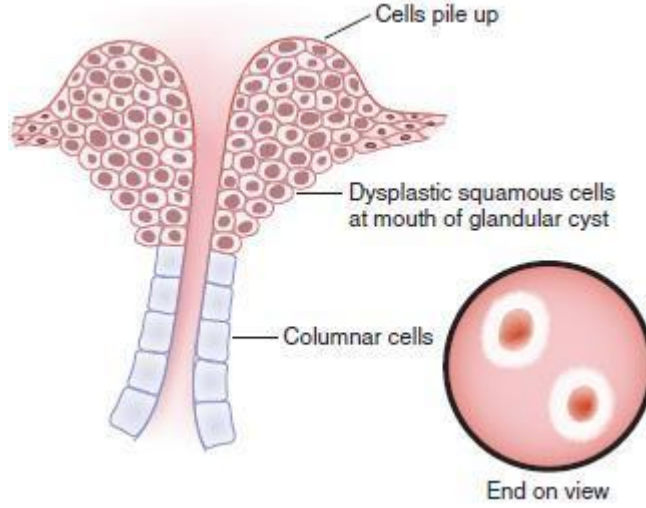
Fizyolojik damarlanmanın tersine, damar yapıları irregüler olup simetrilerini kaybetmişlerdir. Kapiller damarlar çoğunlukla bir ağ oluşturarak yumak şeklinde görülürler. Daha çok yüksek gradeli CIN, mikroinvaziv ve invaziv servikal kanserin karakteristiğidir. Neoplastik sürecin artmış oksijen ve besin gereksinimi ile tümör ve lokalize dokunun ürünü olan büyüme faktörleri ve diğer sitokinler sayesinde anjiogenez oluşur. Bunlar da küçük alana sığamadığından kanser hücreleri tarafından yüzeye doğru itilir ve kıvrımlanmaları artar. Anormal kan damarları keskin açılı ve bazen künt sonlanımla uzanan ve bazen de dallandıktan sonra genişleyen yapılardır.

Kolposkopik bulguların sadece bu bulgularla derecelendirilmesi, çoğu lezyonun derecesi subjektif olduğundan yanlış negatif ve pozitif sonuçlara açıktır. Kolposkopik inceleme yıllar ilerledikçe daha objektif yeni bulgularla tanımlanmıştır. 444 hastada yapılan bir çalışmada cuffed crypt openings (manşet biçimli bez ağızları), Ridge sign (tepe/sırt belirtisi), Inner border sign (sınır içinde sınır), Rag sign (paçavra belirtisi) bulgularından herhangi ikisinin beraber bulunması, subjektif bulguların herhangi bir kombinasyonda varlığına göre HSIL ile daha ilişkili bulunmuştur (104). CIN 2 ve üzeri lezyonların %90'ında belirtilen objektif bulguların en az birinin varlığı gösterilmiştir. Yine 335 hasta arasında yapılan bir çalışmada tepe (ridge sign) bulgusu genç yaşa daha spesifik görünmekle beraber rag sign, inner border sign, ridge sign bulgularından 3ünden 2 sinin varlığının HSIL için pozitif prediktif değeri yüksektir (103). Bu lezyonların tanısında sadece var ya da yok olarak tanımlanması, tanınabilirliğini ve objektif olarak tanımlanabilmesini kolaylaştırmıştır.

Uluslararası Servikal Patoloji Federasyonu ve Kolposkopi terminoloji belgesinde (2011) yukardaki çalışmalarda objektif bulgu olarak belirtilen inner border sign, ridge sign ve cuffed crypt openings bulguları majör bulgular arasında sınıflanmıştır.

Manşet Biçimli Bez Ağızları (cuffed crypt openings)

Transformasyon zonunda, ince, metaplastik asetobeyaz epitel halkası ile çevrili bez ağızlarının görülmesi lezyon için tanı koydurucudur (106).



Şekil – 8: Manşet biçimli bez ağızları

Tepe / Sırt belirtisi (Ridge Sign)

Skvamokolumnar bileşkeye çok yakın izlenen, içe doğru uzanan opak asetowhite alanların görülmesi lezyon için tanı koydurucudur (105).



Şekil -9: Tepe/Sırt Belirtisi

Lezyon İçinde Lezyon (inner border belirtisi)

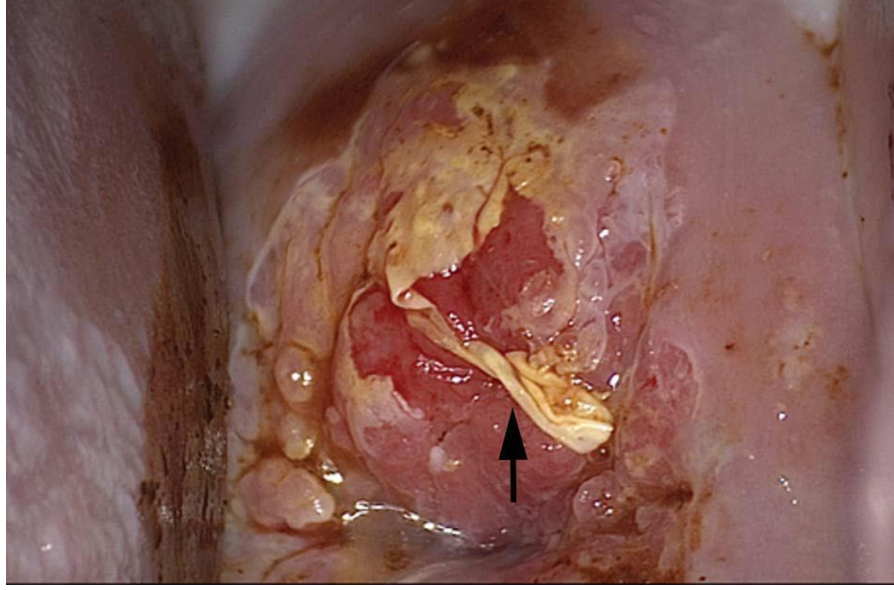
Aynı lezyon içinde ince ve dens asetobeyaz sahalara arasındaki keskin demarkasyon hattına verilen isimdir (102).



Şekil-10: İnnner border belirtisi

Paçavra Belirtisi (The rag sign)

Squamokolumnar junctionda mekanik travma ile (sitoloji veya HPV testi için örnek alımı, asetik asit uygulaması, Lugol solüsyonu uygulaması) yerinden ayrılan opak asetobeyaz sahalara verilen isimdir. Paçavra belirtisinde (the rag sign), epitelin bir kısmı kabuk gibi soyulur veya altta belirgin erozyon çıkar veya epitel bir paçavra gibi yerinden kalkar (104).



Şekil- 11: Paçavra belirtisi

BİYOPSİ MATERYALLERİNİN İNCELENMESİ

Boyama Yöntemleri

Kadın genital yolundaki diğer bölgelerden alınan biyopsilerde olduğu gibi, immünohistokimya artık tanıya yardımcı olarak servikal patolojide giderek daha fazla kullanılmaktadır. İmmünohistokimyanın rutin morfolojik incelemeye ek olarak kullanılması gerektiği ve hiçbir belirtecin belirli bir lezyon için tamamen spesifik veya duyarlı olmadığı vurgulanmaktadır (11-30).

Gözlemciler arası değişkenlik nedeniyle servikal displazinin histolojik değerlendirmesi karmaşıktır. Normalin herhangi bir derecedeki displaziden (CIN) ayrımı ve sonra iyi huylu, çoğunlukla geçici olan CIN 1' in invaziv kansere ilerleme riski daha yüksek olan CIN 2 ve CIN 3 ten ayrımı önemlidir (11). Hatalı bir CIN2, CIN3 teşhisi yanlış tedavilere yol açabilir. Daha az sıklıkla, gerçekten prekanseröz veya yüksek dereceli lezyonlar, negatif olarak yanlış sınıflandırılabilir; bu ayrımın zorluğu, özellikle reaktif veya metaplastik değişiklikler durumunda görülür veya bir biyopsi yapıldığında parçalanmış doku alınması veya altta yatan küçük lezyonunun zayıf bir şekilde örneklenmesinde yatar. Teşhis hataları hastalığın ilerleyişinin doğru öngörülmesini engellemesi nedeniyle invaziv kanserin daha ileri evrede tespitine sebep olabilir.

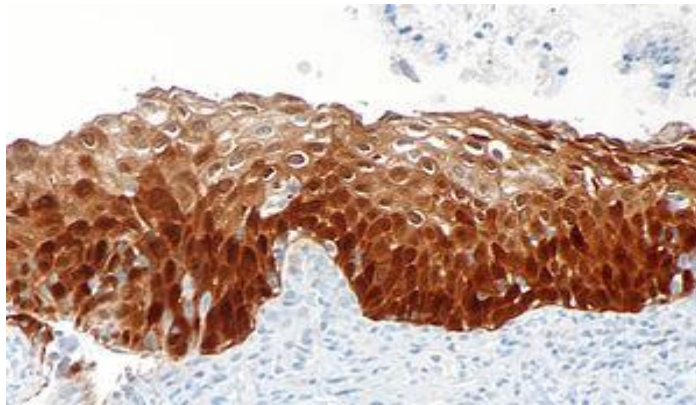
Tedavinin aşırıya kaçmaması ya da eksik bırakılmaması için prekanseröz durumun tespiti önem arz etmektedir. En sık kullanılan immünohistokimyasal markerlar arasında olan p16, yüksek riskli HPV varlığı ile yakın ilişkisinden dolayı sıklıkla tercih edilmektedir.

P16 İmmünohistokimya Boyama

P16 hücre siklusunda regülatör bir protein olup G1-S fazında hücre proliferasyonuna neden olur. P16 retinoblastom proteini ile ters işlevde çalışan bir proteindir. Retinoblastom proteini inaktivasyonu ile p16 protein artışı olur, bu durum HPV ile enfekte hücrede izlenir. IHC (immünohistokimya) test yöntemleri kullanılarak ışık mikroskopisiyle nitel olarak konsantrasyonu belirlenebilir. Bununla birlikte, p16 aşırı ekspresyonu tubal metaplazi ve atrofik hücrelerde olduğu kadar, normal kolumnar hücrelerde de görülebilir ve bu da zayıf özgülüğe yol açar (11-30).

p16 skorlaması genellikle hem nükleer hem de sitoplazmik boyamayı içerir.

0 (boyama yok), 1 (nadir tek tek dağılmış hücreler boyama), 2 (düzensiz ama güçlü boyama, genellikle taban zarından sürekli değildir) ve 3 (güçlü ve dağınık boyama, genellikle taban zarından sürekli boyama ve orantılı olarak yukarı doğru uzanma) şeklinde skorlandırılır.



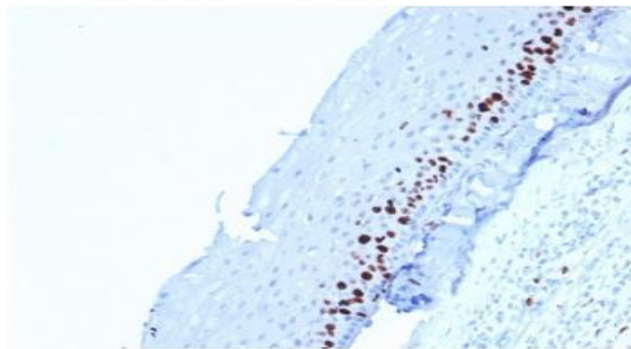
Şekil-12: P16 İle Boyama

Ki-67 İmmünohistokimya Boyama

Ki-67 ise nükleer ve nükleoler protein olup sadece aktif hücre siklusunda (G1, S, G2, M fazında) salgılanır. Ki-67 yüksek hücresel proliferasyonda artar. HPV enfeksiyonları da enfekte hücrelerde epitelyal hücre proliferasyonuna yol açarak dokuda Ki67 artışına yol açar. IHC test yöntemleri kullanılarak ışık mikroskopisiyle nitel olarak Ki-67 konsantrasyonu belirlenebilir. Ki-67 skoru sadece nükleer boyamayı içerir. 0 (boyama yok), 1 (1-2 kat bazal / parabazal boyama), 2 (alt üçte birlik veya yüzeysel boyama, ancak genellikle parabazal ve üst arasında atlama alanları olan bölgeler) ve 3 (epitelin alt üçte birlik kısmından daha büyük sürekli boyama) şeklinde skorlanır (105,106).

Yapılan çalışmalarda nonneoplazik biyopsilerin tamamında Ki67 ile sadece bazalde boyanma görülürken, displazisi bulunan biyopsilerin %66,6'sında Ki67 ile yüksek boyanma izlenmiştir. Ki67 ile yüksek boyanma izlenen vakaların %57,5'i HSIL, %42,5'i LSIL olarak değerlendirilmiş vakalardır. Buna göre, lezyonun derecesi arttıkça, Ki67 ile boyanma oranı artmaktadır. Ki67'nin yüksek dereceli displazik skuamöz epitelde duyarlılığı %86,9 oranında, seçiciliği %100 oranında, olumlu öngörü değeri %100 oranında bulunmuştur.

Çoğunlukla p-16 ile dual boyama yöntemi kullanılır. Bir hücre içinde p16 ve Ki-67'nin eşzamanlı ekspresyonu, servikal kansere ilerleyebilen epitel hücre dönüşümünün daha spesifik bir belirteci olabilir. Özellikle tanıda güçlük yaratan lezyonların ayrımında, p16 ve Ki67 ekspresyonunun değerli olduğu görülmüştür. İkisinin birlikte kullanılmasının, histopatolojik incelemede doğru tanı oranını arttıracakları belirlenmiştir (107). Bu sebeple serviks biyopsilerinde tanıya yardımcı olması için p16 / Ki-67 ikili boyama kullanılabilmektedir.



Şekil -13: Ki-67 ile boyama

NAMPT İmmünohistokimya Boyama

Yeni çalışmalarda daha az maliyetli, daha sensitif ve pratik bir boyama yöntemi arayışları sürdürülmektedir. Bunlardan biri olan; B hücresi öncesi koloni güçlendirici faktör (PBEF) veya visfatin olarak da bilinen nikotinamid fosforibozil transferaz (NAMPT), 52kDa'lık bir pleiotropik molekül, NAMPT geni tarafından kodlanmış, bir enzim, bir sitokin / adipositokin ve bir büyüme faktörü olarak tanımlanmaktadır.

NAMPT / PBEF / visfatin serum konsantrasyonlarında artış farklı kanser türlerinde rapor edilmiştir; bunlar gliomlar, melanom, prostat, meme, over, tiroid, kolorektal ve endometrial karsinomlardır (18-30).

HPV'nin onkojenik potansiyelinde büyük ölçüde etkili olan iki viral protein olan E6 ve E7; p53 ve retinoblastom proteini dâhil birçok hücresel hedefi bağlar ve bu proteinlerde bozulma ile hücre döngüsü kontrolünü ortadan kaldırır, telomeraz aktivitesini arttırırlar. Bu şekilde somatik mutasyonları arttırır ve karsinogenezi hızlandırır. HPV enfeksiyonu aynı zamanda STAT3 protein kinaz ekspresyonu ve aktivitesini arttırarak karsinogeneze neden olur. STAT3 protein kinaz ise NAD⁺ üretiminde hız kısıtlayıcı basamak olarak görev alan NAMPT üretimini indükler. Yüksek NAMPT üretimi hücre büyümesini ve hayatta kalmayı teşvik eder, DNA sentezinde ve anjiyojenik süreçlerde artışa sebep olur, sonuç olarak malign transformasyonda rol oynar. NAMPT'ın solid organ malignitelerinde; gliomlar, melanom, prostat, meme, over, tiroid, kolorektal ve endometrial karsinomlarda yükseldiği gösterilmiştir (18-30).

Moiz Vora ve arkadaşlarının çalışmasında; servikal kanserli hastaların doku örneklerinde NAMPT seviyesi daha yüksek saptanmıştır. Az sayıdaki servikal displazili hastada, CIN 1 vakalarında, bugün rutin olarak bakılan p16 ile %54 oranında boyanma gösterirken, P16 ile boyanma olmayan preparatlar dâhil tüm CIN 1 preparatlarında normal servikal epitelyum preparatlarına göre NAMPT ekspresyon düzeyinin 2 katına çıktığı gösterilmiştir. Servikal displazi derecesindeki artışla NAMPT ekspresyonundaki artışın da korele olduğu görülmüştür (30).

NAMPT Boyanması formalinle fikse edilip parafine gömülmüş doku kesitlerinde ve frozen kesitlerde, ilişkili antijen varlığının, IHC test yöntemleri

kullanılarak ışık mikroskopisiyle nitel olarak konsantrasyonu belirlenmesiyle değerlendirilir.

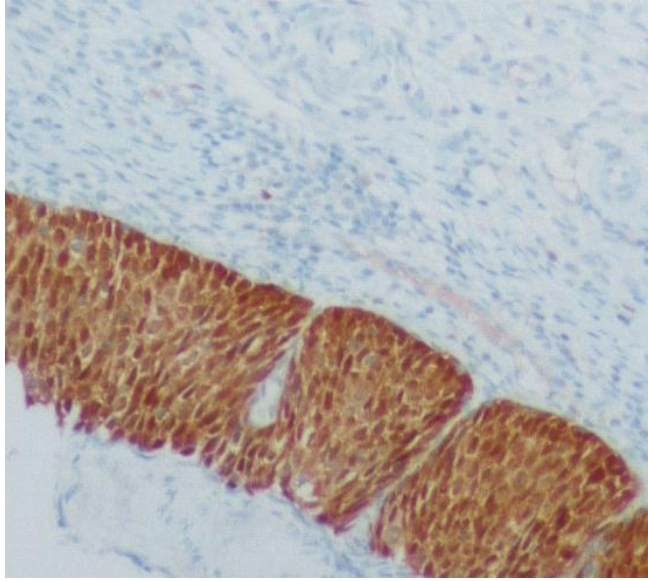
NAMPT immünoreaktif boyamanın skorlanması; kesitler ışık mikroskopu altında iki büyütmede değerlendirildi (x100 ve x400). NAMPT ekspresyonu gösteren hücrelerdeki boyanma yoğunluğu ve NAMPT pozitif hücrelerin yüzdesi skorlanır.

Tablo-4: NAMPT ile Boyanma Skoru

NAMPT PROTEİN BOYANMA YOĞUNLUK SKORU	BOYANMA DURUMU
0	Boyanma yok
1	Hafif boyanma
2	Orta derecede boyanma
3	Yüksek derecede boyanma

Tablo-5: NAMPT Pozitif Hücre %'si Skorlama

NAMPT BOYANMA 'Sİ SKORU	POZİTİF HÜCRELERİN 'Sİ (Boyanma %'si)
0	0
1	%1-%33
2	%34-%66
3	%67-%100



Şekil -14: NAMPT Boyanma

Ve ardından nihai skor iki sonuç çarpılarak çarpım skoru olarak bulunur. 0 ila 9 arasında bir puanlama yapılır (30).

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu araştırma, Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Antalya ve Eğitim Araştırma Hastanesi, Jinekolojik Onkoloji Cerrahisi Kliniği tarafından tıpta uzmanlık tezi olarak hazırlanmış bir prospektif tanımlayıcı çalışmadır. Tez çalışması Tıpta Uzmanlık Eğitim Kurulu'nun (TUEK) 26.11.2020 tarihli toplantısında tez çalışması yapılabilir onayını aldıktan sonra T.C Sağlık Bilimleri Üniversitesi Antalya Eğitim ve Araştırma Hastanesi yerel etik kuruluna sunuldu ve etik kurul onayı alındı. Tüm hastalardan işlem öncesi onam alındı.

Hastanemiz jinekolojik onkoloji polikliniğinde Ağustos 2020 ile Mart 2021 tarihleri arasında HPV pozitifliği ile kolposkopiye başvuran ve kolposkopik biyopsi alınan hastaların doku örnekleri prospektif olarak incelendi. Kolposkopik biyopsi sonucu normal, CIN 1 ve CIN 2,3 gelen hastaların biyopsi materyallerinde NAMPT ekspresyonu düzeyi belirlendi ve normal-servikal displazili doku arasında veya farklı servikal displazi dereceleri arasında NAMPT doku düzeylerinde fark ve ilişki olup olmadığı incelendi. İşlem öncesi tüm hastalara form doldurtularak hastaların yaşları, kilosu, boyu, DM, HT varlığı, vücut kitle indeksleri ve sigara içicilik durumları da öğrenilerek kaydedildi.

Kolposkopi sırasında hasta rahat bir şekilde modifiye litotomi pozisyonunda yatırılıp dış genital sistem incelendikten sonra, serviksi tamamen ortaya koyacak tarzda spekulum vajinaya yerleştirildi. Spekulum yerleştirildikten sonra üst vajina ve serviks giderek artan büyütme ile incelendi. Servikal epitel serum fizyolojik ile temizlendikten sonra, %3-5'lik asetik asit solüsyonu servikse uygulanıp 60-90 saniye kadar beklendi. Serviks, lezyonlar ve vasküler paternler açısından tekrar incelendi. Bunların sonucunda şüpheli görülen alanlardan patoloji için biyopsi alındı.

Daha sonra hastaların kolposkopik biyopsi örnekleri patoloji bölümünde servikal displazi varlığı ve doku NAMPT ekspresyon düzeyi açısından değerlendirildi. Patoloji sonuçları kaydedildi. Patoloji sonuçları Bethesda sistemine göre sınıflandırılıp normal, CIN 1, CIN 2,3 olarak gruplandırıldı.

Bu çalışmada örneklem sayısı hesaplanırken F tests-ANOVA uygulanmıştır. Etki büyüklüğü (effect size) 0.406, güç 0.8, tip II hata oranı 0,05 olarak alındığında yeterli örneklem sayısı 63 gelmiş olup, patolojik inceleme sırasında ve diğer süreçlerde olası hasta kayıpları göz önünde bulundurularak 86 hasta çalışmaya dahil edilmiştir.

Hasta Seçimi

Çalışmaya Dahil Etme Kriterleri:

1. HPV pozitifliği için kolposkopiye yönlendirilen hastalar
2. Kolposkopi sonucunda anormal bulgusu olup biyopsi alınan hastalar
3. 18-70 yaş arası hastalar

Çalışmadan Hariç Tutulma Kriterleri

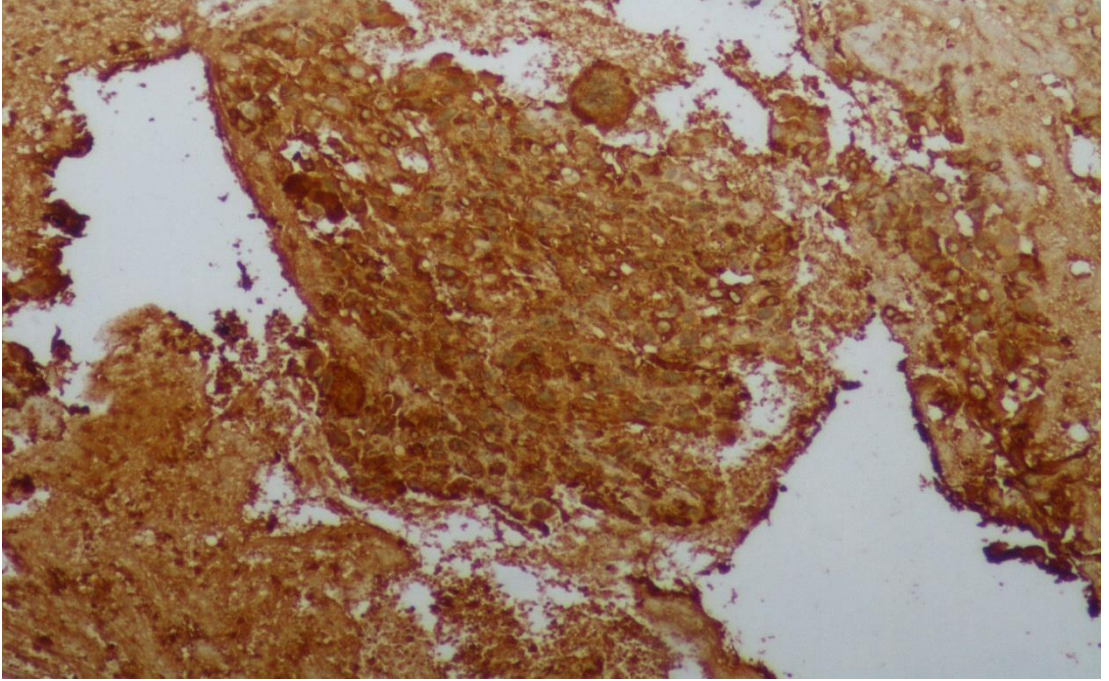
1. Önceden histerektomi geçirmiş hastalar
2. Daha önce kendisinde kanser öyküsü olan hastalar

NAMPT immünoreaktif boyama

Lezyonu en iyi yansıtan ve İmmunohistokimyasal (İHK) boyama için en uygun olan lamalar seçildi. Daha sonra parafin bloklardan poly-lizinli lamlara 4 mikrometre kalınlıkta kesitler alınarak streptavidin biotin peroksidaz yöntemiyle (Invitrogen, 85-9043, CA, USA), NAMPT antikorlarıyla manuel boyandı. Kesitler 1 gece 60°C'lik etüvde bekletildi. Bir saat ksilen içerisinde oda ısısında bekletildi. Konsantrasyonu giderek azalan (%95, %90, %80, %70) etil alkol serilerinden geçirildi. Distile suda 10 dakika yıkandı. Hidrojen peroksitte 15 dakika tutuldu. Distile suda 5 dakika süreyle yıkandı. Sitrat tampon (pH:6.0) içerisinde, kapağı kapalı plastik şalelerde 40 dakika süreyle mikrodalga fırında 400 Watt'ta ısıtıldı. Oda ısısında soğuyuncaya dek beklendi. Distile suda 10 dakika yıkandı. PBS (pH:7,4) içinde 10 dakika bekletildi. Lamlar üzerindeki dokular sınırlayıcı kalemle çerçeveselendi. Blokan solüsyonda 5 dakika bekletildi. Yıkama yapılmadan primer antikorlar NAMPT (NAMPT Polyclonal Antibody, Invitrogen, USA), 1/100 dilüsyonda uygulandı. 1 saat lamaların kurumaması için altına ıslak kâğıt yayılmış plastik boyama kabında lamlar bekletildi. PBS tampon solüsyonu içinde 10 dakika yıkandı. Anti polivalent biotinli antikor oda ısısında 20 dakika uygulandı. PBS tampon solüsyonu içinde 10 dakika yıkandı. Bayır

turbu peroksidazı (horseradish peroxidase) eklenmiş streptavidin solüsyonuyla kaplanan kesitler oda ısısında 20 dakika bekletildi. PBS tampon solüsyonu içinde 10 dakika yıkandı. Diaminobenzidin (DAB) hidrojen peroksitli hazır solüsyonu 1/20 oranında sulandırıldı ve lamalar üzerinde 10 dakika tutuldu. Distile suda yıkandı. Harris hematoksilen ile 15 saniye zemin boyama yapıldı. Akar çeşme suyunda yıkandı. Konsantrasyonu giderek artan (%70, %80, %90, %95) etil alkol serilerinden geçirilip havada kurutuldu. Ksilen içinde 30 dakika bekletildi ve kapama maddesi damlatılıp lamelle kapatıldı.

Boyalı preparatlar ışık mikroskopisinde tanısını bilmeyen tek patalog tarafından (HTY) değerlendirildi. NAMPT için hücrelerde sitoplazmik boyanma yoğunluğu ve şiddeti değerlendirildi. NAMPT için desidua dokusundaki hücrelerde izlenen sitoplazmik boyanma, pozitif kontrol olarak kullanıldı (şekil-15).



Şekil -15: Kontrol olarak kullanılan desiduada NAMPT ekspresyonu

NAMPT immünoreaktif boyamanın skorlanması; kesitler ışık mikroskopu altında iki büyütmede değerlendirildi (x100 ve x400). NAMPT ekspresyonu gösteren hücrelerdeki boyanma yoğunluğu ve NAMPT pozitif hücrelerin yüzdesi skorlandı.

İmmünohistokimyasal olarak boyanan kesitlerde çok katlı yassı epitelde NAMPT protein ekspresyonunun varlığı değerlendirildi. NAMPT antikoru için

immünohistokimyasal boyanma değerlendirilirken her olguda kesitin tamamı mikroskopun x10'luk büyütmesinde taranarak, pozitif boyanmanın olup olmadığına bakıldı. Pozitif kontrol vakasına kıyasla boyanma şiddeti skorlandı. 0 boyanma yok, 1 hafif boyanma, 2 orta şiddette boyanma ve 3 yüksek şiddette boyanma şeklinde skorlandı. Ayrıca Işık mikroskobunda, immünopozitif hücrelerin sayısı, sayılan toplam hücrelerin sayısına bölünerek ekspresyon düzeyi yüzde olarak hesaplandı ve semikantitatif olarak değerlendirildi: Negatif, %1-33 arası 1, %34-66 arası 2, >%67-100 arası 3 olarak skorlandı. Ve ardından nihai skor iki sonuç çarpılarak çarpım skoru olarak bulundu. 0 ila 9 arasında bir puanlama yapıldı.

İstatistiksel Analiz

Veriler bilgisayar ortamında sınıflandırıldı ve IBM Statistical Package for the Social Sciences versiyon 22 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) programı kullanılarak analiz edildi. Sürekli değişkenlerin dağılımı Kolmogorov-Smirnov testi ile değerlendirildi. Gruplar arasında karşılaştırma yapılırken parametrik veriler için ANOVA testi, non-parametrik veriler için Kruskal-Wallis testi, oranların karşılaştırılmasında Ki-Kare testi kullanıldı. NAMPT bazında sensitivite, spesifisite, pozitif prediktif değer (PPD) ve negatif prediktif değer (NPD) Galen ve Gambino formülleri ile hesaplandı: Sensitivite= Gerçek Pozitif/ (Gerçek Pozitif+Yanlış Negatif); Spesifisite= Gerçek Negatif/ (Gerçek Negatif + Yanlış Pozitif); PPD=Gerçek Pozitif/ (Gerçek Pozitif+Yanlış Pozitif); NPD= Gerçek Negatif/ (Gerçek Negatif+Yanlış Negatif). P değeri <0.05 ise istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Ağustos 2020 ile Mart 2021 tarihleri arasında 86 hasta çalışmaya dahil edildi. Bu hastaların 25 (%29)'ünün kolposkopik biyopsi sonucu normaldi, 30 (%35)'unun sonucu CIN 1'di ve 31 (%36)'ının sonucu CIN 2, 3 (HSIL) idi. Hastaların ortalama yaşı 40 (aralık, 19-65) idi. Ortalama boy, kilo ve vücut-kitle indeksi (BMI) sırasıyla, 162,5 cm (aralık, 136-180), 65 kg (aralık, 46-96) ve 24 kg/m² (aralık, 17-36) idi. Hastaların yaklaşık %5'inde hipertansiyon hastalığı vardı. Hastaların %6'sının Diyabetes Mellitus tanısı mevcuttu. Hastaların %42'si sigara içicisiydi. Hastaların smear sonuçlarının dağılımı Tablo 6'da gösterildi. Hastaların %70'inin smear sonucu normaldi. Hastaların HPV tipi dağılımı Tablo 7'de gösterildi.

Tablo-6: Tüm Hastaların Smear Sonuç Dağılımı

Patoloji Sonucu	Örnek Sayısı (n)	Yüzdesel Karşılığı (%)
Yetersiz	1	%1,2
NILM	60	%69,8
ASCUS	12	%14,0
LSIL	8	%9,3
ASC-H	4	%4,7
AGC	1	%1,2
Toplam	86	%100,0

Tüm hastalar değerlendirildiğinde NAMPT için boyanma yoğunluk dağılımı, boyanma yüzdesi dağılımı, çarpım skoru dağılımı Tablo 8, Tablo 9 ve Tablo 10'da gösterildi.

Tablo-7: Tüm Hastaların HPV Tipi Dağılımı

HPV Tipi	Örnek Sayısı (n)	Yüzdesel Karşılığı (%)
Alt Tiplendirme Yapılamamış	3	%3,5
HPV16+/- HPV Diğer	22	%25,6
HPV18+/- HPV Diğer	13	%15,1
HPV16+18+/- Diğer	26	%30,2
HPV Diğer	22	%25,6
Toplam	86	%100,0

Tablo-9: Tüm Hastaların NAMPT ile Boyanma Yüzdesi Dağılımı

Tablo-8: NAMPT ile Boyanma Yoğunluk Dağılımı

	Örnek Sayısı (n)	Yüzdesel Karşılığı (%)
Boyanma Yok	20	%23,3
Hafif Boyanma	30	%34,9
Orta Boyanma	31	%36,0
Yoğun Boyanma	5	%5,8
Toplam	86	%100,0

Boyanma Yüzdesi	Örnek Sayısı (n)	Yüzdesel Karşılığı (%)
Boyanma Yok	20	%23,3
%1-33	33	%38,4
%34-66	21	%24,4
%67-100	12	%14,0
Toplam	86	%100,0

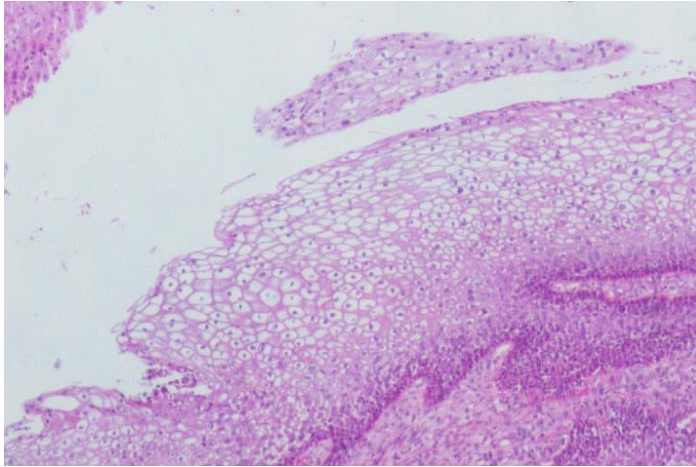
Tablo-10: Tüm Hastaların NAMPT Çarpım Skoru Dağılımı

Skor	Örnek Sayısı (n)	Yüzdesel Karşılığı (%)
0	20	%23,3
1,0	24	%27,9
2,0	16	%18,6
4,0	13	%15,1
6,0	9	%10,5
9,0	4	%4,7
Toplam	86	%100,0

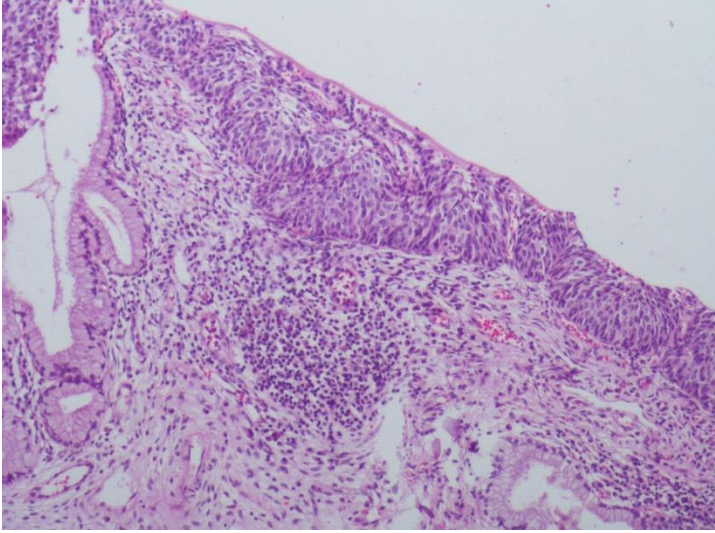
Kolposkopik alınan servikal biyopsi sonuçlarına göre hastalar Normal, CIN1, CIN 2-3 olarak 3'e ayrıldığında, bu üç gruptaki HPV dağılımı Tablo 11'te gösterilmiştir. CIN 2, 3'te en sık HPV 16 +/- diğer suşu baskın görüldü, %48,4. CIN 1 de en yaygın suş HPV 16+18+/- diğer olarak bulundu, %36,7.

Tablo-11: Servikal Biyopsi Sonucuna Göre Hasta Gruplarının HPV Tiplerine Göre Dağılımı

İlk Patoloji Sonucu	HPV Tipi (n, %)				
	Alt Tip Yok	HPV16+/- HPV Diğer	HPV18 +/-HPV Diğer	HPV16+ 18+Diğer	HPV Diğer
Normal	0 %0	4 %16,0	4 %16,0	7 %28,0	10 %40,0
CIN 1	2 %6,7	3 %10,0	7 %23,3	11 %36,7	7 %23,3
CIN 2-3	1 %3,2	15 %48,4	2 %6,5	8 %25,8	5 %16,1
Toplam Sayı	3 %3,5	22 %25,6	13 %15,1	26 %30,2	22 %25,6



Şekil-16: LSIL, (CIN1), (H&E X10)



Şekil-17: HSIL, (CIN 2-3), (H&E X10)

Servikal Biyopsi sonuçlarına göre ayrılan 3 grupta hipertansiyon varlığı oranı grup 1, 2, 3'te sırasıyla %4, %6,7 ve %3,2 idi ($p=0.802$). Üç grupta diyabet hastalığı varlığı oranı grup 1, 2, 3'te sırasıyla %8, %6,7 ve %3,2 idi ($p=0.727$). Sigara içenler grup 1'in %24'ü iken, grup 2'nin %43'ünü ve grup 3'ün %55'ini oluşturuyordu ($p=0.066$). Hasta grupları arasında DM, HT, sigara içiciliği arasında anlamlı farklılık yoktu. Üç grup arasında yaş, kilo, boy, BMI açısından anlamlı fark yoktu (sırasıyla $p=0.113$, $p=0.437$, $p=0.858$, $p=0.278$).

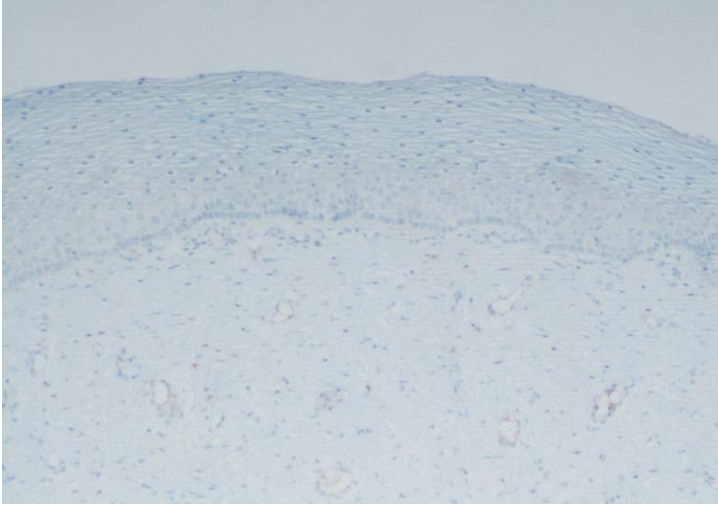
Üç grubun NAMPT boyanma yoğunluk skoru açısından dağılımı Tablo 12'de verilmiştir ($p<0.001$). Biyopsi örneklerinin NAMPT boyanma yoğunluğuna bakıldığında; ilk patoloji sonucu CIN 2, 3 olan 31 vakanın 28 (%90)'inde orta ve yoğun boyanma izlenmiştir. NAMPT ile yoğun boyanmaya CIN 1 ve normal biyopsi sonuçlu vakaların hiçbirinde rastlanmamıştır.

Tablo-12: Servikal Biyopsi Sonuçlarına Göre NAMPT Boyanma Yoğunluk Skorlarının Dağılımı

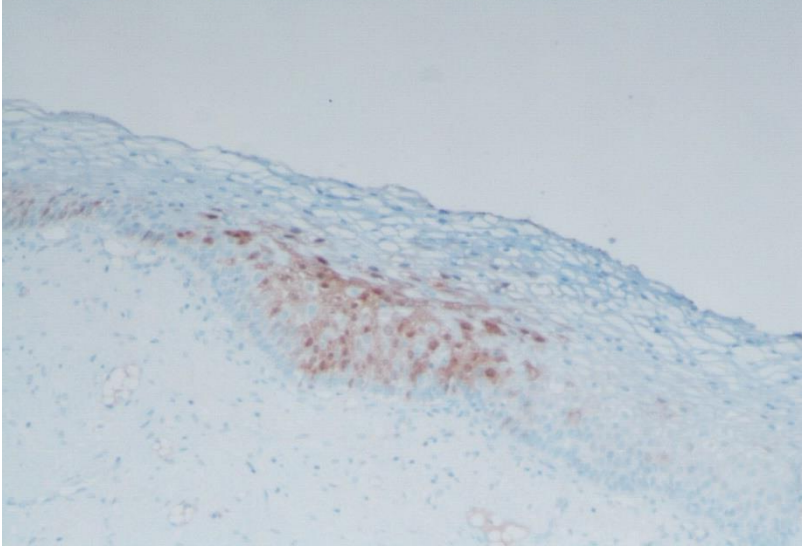
Yoğunluk Skoru	İlk Patoloji Sonucu (n, %)			Total
	Normal	CIN1	CIN2-3	
Boyanma Yok	16 %80,0	3 %15,0	1 %5,0	20 %100,0
Hafif Boyanma	8 %26,7	20 %66,7	2 %6,7	30 %100,0
Orta Boyanma	1 %3,2	7 %22,6	23 %74,2	31 %100,0
Yoğun Boyanma	0 %0,0	0 %0,0	5 %100,0	5 %100,0
Toplam Sayı	25 %29,1	30 %34,9	31 %36,0	86 %100,0

Grupların NAMPT boyanma %'si skoru açısından dağılımı Tablo 13'te verilmiştir ($p<0.001$). NAMPT ile boyanma yüzdesine bakıldığında; CIN 2, 3 olan 31 vakanın 28 (%90)'inde %34-100 oranında boyanma görülmüştür. NAMPT ile %67-100 arasında boyanmaya CIN 1 ve normal biyopsi sonuçlu vakaların hiçbirinde rastlanmamıştır.

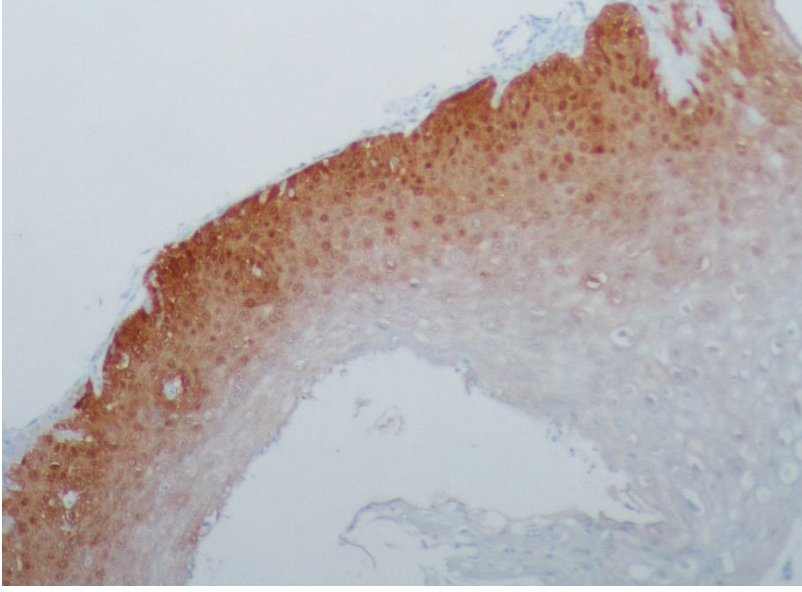
Grupların NAMPT çarpım skoru açısından dağılımı Tablo 14'te verilmiştir ($p<0.001$). NAMPT çarpım skoruna bakıldığında; CIN 2, 3 olan 31 vakanın 30 (%97)'unda çarpım skoru 2 ve üstündedir. NAMPT çarpım skoru CIN 1 ve normal biyopsi sonuçlu vakaların 43 (%78)'ünde 2'nin altındaydı.



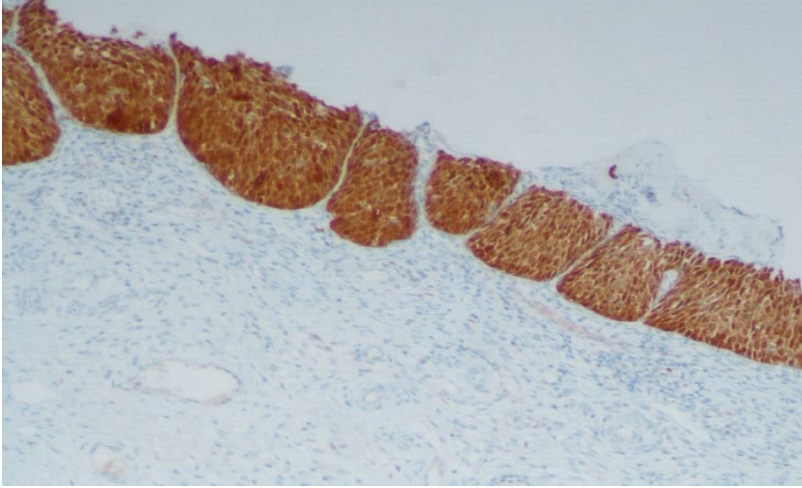
Şekil-18: NAMPT ekspresyonu, boyanma yok (X20)



Şekil-19: NAMPT ekspresyonu, hafif boyanma (X10)



Şekil-20: NAMPT ekspresyonu, orta derecede boyanma (X10)



Şekil-21: NAMPT ekspresyonu, yoğun boyanma (HEX10)

Tablo-13: Servikal Biyopsi Sonuçlarına Göre NAMPT Boyanma %'si Skorlarının Dağılımı

Boyanma oranları	İlk Patoloji Sonucu (n, %)			Total
	Normal	CIN1	CIN2-3	
Boyanma Yok	16 %80,0	3 %15,0	1 %5,0	20 %100,0
%1-33	8 %24,2	21 %63,6	4 %12,1	33 %100,0
%34-66	1 %4,8	6 %28,6	14 %66,7	21 %100,0
%67-100	0 %0,0	0 %0,0	12 %100,0	12 %100,0
Toplam Sayı	25 %29,1	30 %34,9	31 %36,0	86 %100,0

Tablo-14: Servikal Biyopsi Sonuçlarına Göre NAMPT Çarpım Skorlarının Dağılımı

Boyama Çarpım Skoru	İlk Patoloji Sonucu (n, %)			Total
	Normal	CIN1	CIN2-3	
0	16 %80,0	3 %15,0	1 %5,0	20 %100,0
1	8 %33,3	16 %66,7	0 %0,0	24 %100,0
2,0	0 %0,0	9 %56,3	7 %43,8	16 %100,0
4,0	1 %7,7	2 %15,4	10 %76,9	13 %100,0
6,0	0 %0,0	0 %0,0	9 %100,0	9 %100,0
9,0	0 %0,0	0 %0,0	4 %100,0	4 %100,0
Toplam Hasta Sayısı	25 %29,1	30 %34,9	31 %36,0	86 %100

Çarpım skoru değerleri arasından CIN 2-3 tanısının ayırımına yardımcı olacak bir sınır (cut-off) değer bulmak için tüm çarpım skoru değerleri için sensitivite, spesifite, pozitif prediktif değer (PPD) ve negatif prediktif değerler hesaplandı (NPD) ve Tablo 15’te gösterildi. NAMPT çarpım skoru için cut-off olarak 2’yi seçersek, sensitivite 96,8, NPD %98, spesifite %80 ve PPD %71 olarak hesaplandı. Bu değer 4 alınırsa, sensitivite %74,2, NPD %87, spesifite %95 ve PPD %88,5 olarak hesaplandı.

Tablo-15: Farklı Çarpım Skoru Cut-off Değerlerde CIN 2,3 için Sensitivite, Spesifite, PPD (Pozitif Prediktif Değer) ve NPD (Negatif Prediktif Değer)

Çarpım Skoru Sınır Değer	Sensitivite	Spesifite	PPD	NPD
≥ 1 (0 ve 1,2,4,6,9)	%96,8	%36	%45,5	%95
≥ 2 (0,1 ve 2,4,6,9)	%96,8	%80	%71	%98
≥ 4 (0,1,2 ve 4,6,9)	%74,2	%95	%88,5	%87
≥ 6 (0,2,4 ve 6,9)	%41,9	%100	%100	%75
≥ 9 (0,1,4,6 ve 9)	%13	%100	%100	%67

TARTIŞMA

Serviks kanseri, dünya genelinde kadın hastalarda en sık görülen üçüncü jinekolojik kanserdir. Serviks kanseri tanısı alanların %99,7 sinde saptanan HPV enfeksiyonu, çeşitli risk faktörleriyle birleşerek invaziv kansere neden olabilmektedir (2). HPV enfeksiyonunun saptanabilir ve önlenabilir olması, preinvaziv lezyondan invaziv kansere kadar olan sürenin 10-15 sene sürmesi, bu süreçte serviks kanserini önlemek ve erken evrede saptamak için tarama ve tanı yöntemleri geliştirilmesine olanak sağlamıştır. Preinvaziv lezyon tanısı, tedavi yönetimi için önem arz ettiğinden, normalin herhangi bir derece displaziden ayrımında sensitivite ve spesifiteyi arttırmak için birçok yeni belirteç üzerinde çalışılmaktadır. Bunlardan biri olan NAMPT'ın serum konsantrasyonlarında artış farklı kanser türlerinde tespit edilmiştir; bunlar gliomlar, malign melanom, prostat, meme, over, tiroid, kolorektal ve endometrial karsinomlardır (18-29).

Biz mevcut çalışmada HPV pozitifliği nedeniyle kolposkopik biyopsi alınan, biyopsi sonucu servikal displazinin değişik evreleri veya normal gelen hastalarda doku NAMPT seviyelerini çalışarak birincil olarak servikal displazinin derecesi ile NAMPT doku düzeyinin korele olup olmadığı, ikincil olarak da NAMPT ekspresyon düzeylerinin servikal displazi nedeni ile mi yoksa salt HPV enfeksiyonu nedeniyle mi arttığı sorusunu araştırdık. Çalışmamızda NAMPT boyanma yoğunluğu, boyanan hücre yüzdesi ve bu iki parametreden elde edilen boyanma çarpım skorlarının HPV pozitif normal dokuya göre displazili dokularda, artan displazi derecelerine korele olarak, anlamlı derecede yükseldiğini gösterdik ($p<0.001$). HPV pozitif normal dokuda ise boyanma yoğunluğunun yok ya da hafif, boyanma yüzdesinin yok ya da %1-33 arasında kaldığını, CIN 1, 2 ve 3'e oranla anlamlı derecede düşük boyandığını gördük. Bu konuda yapılmış literatürdeki tek çalışma olan Moiz Vora ve arkadaşlarının çalışmasında da; servikal kanserli hastaların doku örneklerinde artan grade ile korele olarak NAMPT seviyesi daha yüksek saptanmıştır (30). Aynı çalışmada ikincil bulgu olarak servikal displazisi olan az sayıdaki hastaya bakılmış ve az sayıdaki hastada artan displazi derecesi ile uyumlu artmış NAMPT seviyesi gösterilmiştir (30).

Çalışmamızda biyopsi örneklerinin NAMPT boyanma yoğunluğuna bakıldığında; ilk patoloji sonucu CIN 2, 3 olan 31 vakanın 28 (%90)'inde orta ve yoğun boyanma izlenmiştir. NAMPT ile yoğun boyanmaya CIN 1 ve normal biyopsi sonuçlu vakaların hiçbirinde rastlanmamıştır. NAMPT ile boyanma yüzdesine bakıldığında; CIN 2, 3 olan 31 vakanın 28 (%90)'inde %34-100 oranında boyanma görülmüştür. NAMPT ile %67-100 arasında boyanmaya CIN 1 ve normal biyopsi sonuçlu vakaların hiçbirinde rastlanmamıştır.

Günümüzde servikal preinvaziv lezyon tanısında rutin hematoksilen eozin boyamasına yardımcı olarak kullanılan Ki-67 ve p16 belirteçlerine bakıldığında; Alseid ve ark.'larının çalışmasında CIN 2 tanılı hastaların p16 ile boyanma oranının %54 olduğu, CIN 3 tanılı hastalarda ise %85 olduğu, p16 ile boyanma yüzdesinin servikal displazinin artan dereceleri arasında anlamlı oranda farklılık arz ettiği gösterilmiştir (108). Ki- 67 belirteci için ise, CIN 2 tanılı vakaların %86'sında, CIN 3 tanılı vakaların ise %50'sinde güçlü boyanma izlenmiştir. Mandal ve ark.'larının çalışmasında CIN 2 tanılı vakaların %58,1 inde, CIN 3 tanılı vakaların %73,8'inde p16 yüksek pozitifliği izlenmiştir. Ki-67 ile p16 boyanması ise CIN 3 tanısı almış vakaların %60,5'inde görülmüştür (109). Başka bir çalışmada ise CIN 2, 3 tanılı vakaların %81,3'ünde p16 ile güçlü pozitiflik, %75'inde ise Ki-67 ile güçlü pozitiflik gösterdiği görülmüştür (110). Yine başka bir çalışmada Ki67 ile yüksek boyanma izlenen vakaların %57,5'i CIN 2,3 olarak değerlendirilmiştir (107). P16 ve Ki -67 belirteçlerinin kullanımındaki handikaplara bakıldığında; inflamasyon, gebelik ve atrofi gibi benign hücrel süreçlerde de prekanseröz servikal lezyonları taklit edebilecek şekilde doku ekspresyonu görülebilir (107-109).

Literatürde NAMPT boyanmasının değerlendirilmesi için standart bir yöntem belirtilmemiştir, bazı çalışmalarda boyanma yüzde skoru ve boyanma yoğunluk skoru toplamından elde edilen bir skor, bazı çalışmalarda bu iki parametrenin çarpımından oluşan çarpım skoru kullanılmıştır (30,121). Biz çalışmamızda çarpım skorunu tercih ettik. Çarpım skorunu kullanarak, tedavi eşiğimizi oluşturan CIN 2, 3'ü CIN 1 ve normal dokudan ayırt etmek için farklı cut-off değerleri olarak sensitivite, spesifite, PPD ve NPD değerlerini hesapladık (Tablo 15). NAMPT boyasını kullanım amacımıza göre cut-off olarak 2 ve 4 alınabilecek değerler olarak belirlenmiştir. Cut-off 2 alınırsa sensitivite (96,8) ve NPD (%98) artarken yanlış pozitiflik de artmaktadır

yani spesifite (%80) düşmektedir, 4 alınırsa spesifisite (%95) ve PPD (%88,5) artarken yanlış negatiflik de artmakta yani sensitivite (%74,2) düşmektedir. Cut-off 2 alınırsa CIN 2, 3 tanısının atlanma olasılığı azalırken, gereksiz invaziv işlem yapma olasılığı artmaktadır, 4 alınırsa CIN 2, 3'ün tanısını koyabilme ihtimalimiz azalırken, gereksiz invaziv işlem ihtimali azalmaktadır. Alshenawy ve ark.'larının çalışmasında, CIN 2, 3'ün CIN 1'den ayrımında p16 ile boyanmanın sensitivitesi %67, spesifitesi %73 olarak saptanmıştır. Ki-67 belirtecinin CIN 2, 3'ün CIN 1'den ayrımında sensitivitesi %100, spesifitesi %60 bulunmuştur (108). Mandalve ark.'larının çalışmasında; p16 yüksek pozitifliğinin CIN 2, 3 lezyonu saptamada sensitivitesi %62,2, spesifitesi %92,6 olarak bulunmuştur. Ki-67 ile boyanmanın CIN 2, 3 tanısında sensitivite değeri %27,9 spesifite değeri ise %100 bulunmuştur. Pozitif prediktif değer (PPD) p16 ile boyanma için %92, Ki-67 ile boyanma için ise %100 olarak görülmüştür (109).

Servikal displazinin tanısı için çalışılan diğer belirteçlerden günlük rutin kullanıma girebilen yoktur. Bunlardan biri olan TOP-IIA (topoizomerez IIa)'nın preinvaziv lezyonlarda ve invaziv kanser olgularında ekspresyon düzeyinin arttığı gösterilmiştir. CIN 3 olgularında %23-25 oranında pozitiflik saptanmıştır, ancak invaziv kanser gelişimi ile TOP-IIA ekspresyonunda azalma olduğu gösterilmiştir, bu durum preinvaziv lezyon takibinde kullanılacak bir belirteç için çok uygun bulunmamıştır (111).

DNA replikasyonunda rol oynayan protein ailesinden bir belirteç olan MCM protein ailesi, MCM 3 ve MCM 4 proteinlerinin serviks kanserli ve CIN 3 lezyonlarda artmış olduğu saptanmıştır (112).

Survivin isimli marker, hücrede apoptozu inhibe eden protein olarak görev almaktadır. Bir çalışmada CIN 2, 3 olgularında %87,5 ve invaziv servikal kanserde %100 oranında pozitiflik saptanmıştır (113).

Hücre proliferasyonu kontrolünde rol alan MYBL2 isimli belirteç, 36 vaka üzerinde yapılan bir çalışmada CIN1, CIN 2, 3 ve invaziv kanser vakalarının tümünde güçlü pozitif boyanma göstermiştir. Normal servikal dokuda ve HPV negatif dokuda ise boyanma saptanmamıştır. CIN ve invaziv kanserli vakaların patoloji preparatlarındaki hücrelerin %5-6'luk bir fokusunda daha da güçlü bir immün reaksiyon görülmüştür. Tüm derecelerde pozitif olması durumunu araştırmacılar

MYBL2 proteininin servikal kanser kök hücre benzeri hücrelerde bulunan bir protein olabileceği yönünde bir hipotez ile açıklamaya çalışmışlardır (114).

Hücre siklusunda görev alan bir başka marker Geminin; histolojik olarak normal dokularda negatif, CIN 2, 3 olgularında ise %90 oranında pozitif saptanmıştır. CIN 1 (LSIL) ve CIN 2, 3 (HSIL) arasındaki ayırımı spesifitesi %86,7 bulunmuştur. Aynı çalışmada bu oran p16 için %75,6, Ki-67 için %64,4 olarak bulunmuştur. CIN 2, 3 tanısında pozitif prediktif değeri p16 ve Ki-67'ye göre daha yüksek bulunmuştur (115).

Çalışmaya dahil edilen vakalardaki HPV dağılımına bakıldığında, CIN 2, 3 tanılı hastalarda %74 (23/31) oranında HPV 16'nın tek başına veya diğer HPV tipleri ile beraber pozitif olduğu görülmüştür. Literatürde HPV 16'nın; CIN 3 lezyonlarında %45, serviks kanserlerinde %55 oranında bulunarak bu lezyonlardaki en baskın HPV tipini oluşturduğu gösterilmiştir (66,67). Çalışmamızda oran daha yüksek bulunmuştur. Bunun nedeni sadece HPV pozitif olan hastaların dâhil edilmesi olabilir.

NAMPT doku ve serum konsantrasyonu yüksekliği daha önce birçok çalışmada insülin direnci, obezite, tip 2 diyabet, hipertansiyon ve kardiyovasküler hastalık ile ilişkilendirilmiştir (116). Lopez-Bermejo ve meslektaşları, tip 2 diyabetli deneklerde serum NAMPT ile insülin salgılanması arasındaki ilişkiyi inceledi. Tip 2 diyabetli deneklerde kontrollere kıyasla daha yüksek dolaşım serum NAMPT konsantrasyonları bildirilmiştir (117). Seo ve ark.'da yüksek kan basıncı olan hipertansif kadınlarda plazma NAMPT konsantrasyonlarının arttığını bildirmiştir (118). Chang ve meslektaşları bu meta-analizde, aşırı kilolu ve obez kişilerde plazma NAMPT'nin arttığını göstermiş ve BMI ile orantılı şekilde NAMPT seviyesinin yükseldiği görülmüştür (119). Bizim çalışmamızda ise normal biyopsi sonuçlu, CIN 1 ve CIN 2, 3 grupları arasında yukarıda belirtilen NAMPT yüksekliği ile ilişkili hastalıkların görülme sıklığı açısından anlamlı farklılık bulunmamaktadır. Bu sebeple gruplar arasındaki NAMPT seviyesi farklılıkları bu hastalıkların ve diğer faktörlerin dağılımından etkilenmemiştir ve servikal örneklerdeki NAMPT ile boyanma farklılıklarının bu çalışmada servikal displazi düzeyiyle ilişkili olduğu söylenebilir.

Sigara içiciliği ve serviks kanseri ilişkisi açısından literatüre bakıldığında aktif sigara içiciliği ile hiç maruz kalmayanlar arasında yüksek riskli HPV enfeksiyonu ve CIN 2, 3 lezyonları arasında; odds ratio (OR) sırasıyla 1,45 (p=0,05 güven aralığı 1,1-1,91) ve 1,89 (p=0,05 güven aralığı: 1.03-3.44) olarak anlamlı bulunurken; pasif içiciliğin sadece yüksek riskli HPV enfeksiyonu ile ilişkili olduğu görülmüştür (120). Diğer bir çalışmada da aktif sigara içiciliği CIN 2, 3 gelişimi ile ilişkili bulunmuş, sigara bırakıldığı andan itibaren geçen zamanın riskin azalması ile korele olduğu görülmüştür (122).

Mevcut çalışmada sigara içiciliği oranları açısından gruplar arasında istatistiksel anlamlı bir fark yoktur ancak sigara içenler grup 1'in %24'ü iken, grup 2'nin %43'ünü ve grup 3'ün %55'ini oluşturmaktadır ve p değeri istatistiksel anlamlılığa yaklaşmaktadır (p=0.066). Hasta sayısı daha yüksek çalışmalarda bu fark anlamlı hale gelebilir.

Çalışmamızın en önemli avantajı prospektif bir çalışma olmasıdır. NAMPT düzeyini etkileyebilecek yaş, BMI, kilo, DM ve HT varlığı gibi faktörlerin gruplardaki oranları belirlenebilmiş ve gruplar arasında dağılımında farklılık olmadığı görülmüştür. Tüm hastalardaki NAMPT boyanmaları tek bir patolog tarafından değerlendirilmiştir. Her grupta olması gereken örnek sayısı çalışma öncesi hesaplanmış, çalışma sonunda bu örnek sayısına ulaşılabilmiştir.

HPV pozitifliğinin NAMPT üzerinde olabilecek etkisinden dolayı çalışmamıza HPV negatif olan hastalar alınmamıştır. Ancak bu nedenle çalışmamızda HPV pozitif ve HPV negatif normal doku arasında NAMPT düzeyi açısından bir karşılaştırma yapılamamıştır.

Çalışmamızda NAMPT boyamasının CIN 2, 3'ün normal dokudan ve CIN1'den ayırımında kullanılabilecek şekilde gruplar arasında farklı olduğunu bulduk. Ancak çalışmamız her ne kadar anlamlı sonuçlansa da, bu ve bunun gibi anlamlı bulunan belirteçlerin günlük pratiğe girmesi için daha çok destekleyici çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Ayrıca bulunan belirteçlerin kolay ulaşılabilir ve uygulanabilir olması, toplum düzeyinde uygulandığında maliyet etkin olması, araştırma merkezleri ve araştırmacılar arasında yorumlanma farklılığının minimal düzeyde olması, bu markerların günlük pratiğe girip girmeyeceğini belirleyecektir.

SONUÇ

Gelişmemiş ülkelerde kadınlar arasında meme kanserinden sonra en sık görülen ikinci kanser olan serviks kanseri, dünya genelinde en sık görülen üçüncü jinekolojik kanserdir. Etiyolojisinde büyük oranda yer alan kronik HPV enfeksiyonu ve risk faktörlerinin birleşmesi sonucunda oluşan premalign lezyonlar, 10-15 senelik zaman zarfı içerisinde tanı koyulabildiğinde erken tedavisi mümkündür. Bu nedenle premalign lezyonların erken tanısı invaziv serviks kanserine bağlı morbidite ve mortaliteyi azaltmada önemli bir yere sahiptir.

Premalign lezyonlarda erken tanı ve tedavi sürecinin iyileştirilmesi amacıyla; tanı sensitivitesi ve spesifitesini arttırmada yeni belirteçler araştırılmaktadır. Biz de çalışmamızda NAMPT belirtecini, HPV pozitif hastalar üzerinde premalign lezyonların tanısındaki yerini araştırdık. Çalışmamıza Ağustos 2020 ile Mart 2021 tarihleri arasında HPV pozitifliği nedeniyle kolposkopiye yönlendirilmiş, demografik özellikleri ve komorbiditeleri benzer olan patoloji sonucu normal 25 hasta, CIN 1 olan 30 hasta ve CIN 2 ve 3 olan 31 hasta, toplam 86 hastayı dahil ettik.

Çalışmamızda tüm NAMPT boyama skorlamaları, CIN 2, 3 ü CIN 1’den ayırt etmede anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p=0,001$) Biyopsi örneklerinin NAMPT boyanma yoğunluğuna bakıldığında (Tablo 12); ilk patoloji sonucu CIN 2, 3 olan 31 vakanın 28 (%90)’inde orta ve yoğun boyanma izlenmiştir. NAMPT ile yoğun boyanmaya CIN 1 ve normal biyopsi sonuçlu vakaların hiçbirinde rastlanmamıştır. NAMPT ile boyanma yüzdesine bakıldığında (Tablo 13); CIN 2, 3 olan 31 vakanın 28 (%90)’inde %34-100 oranında boyanma görülmüştür. NAMPT ile %67-100 arasında boyanmaya CIN 1 ve normal biyopsi sonuçlu vakaların hiçbirinde rastlanmamıştır. Çarpım skoru değerleri arasından CIN 2-3 tanısının CIN 1 ve normal serviks dokusundan ayrımı için sınır (cut-off) değer olarak 2’yi seçersek, sensitivite 96,8, NPD %98, spesifite %80 ve PPD %71 olarak hesaplandı. Bu değer 4 alınırsa, sensitivite %74,2, NPD %87, spesifite %95 ve PPD %88,5 olarak hesaplandı.

Bizim çalışmamızın prospektif olmasının avantajıyla, NAMPT’ı arttıran diğer sebepler büyük oranda dışlanabilmiş, demografik özellikler ve diğer komorbiditeler (DM, HT, obezite) açısından gruplar arasında anlamlı bir farklılık ya da ilişki görülmemiştir. Bu sayede servikal premalign lezyonlarda doku NAMPT artışı özel olarak değerlendirilebilmiştir.

Premalign serviks lezyonları, invaziv kanser aşamasına gelmeden yakalandığında az morbidite ile tedavi edilebilen bir hastalıktır. Çalıştığımız belirtecin serviks kanserinde premalign lezyonların doğru tanı ve tedavisinde sensitivite ve spesifiteyi arttırabileceğini düşünüyoruz. Ancak bu belirtecin günlük kullanıma girmesi için daha fazla destekleyici çalışmaya ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

1. Ege S., Gebe Kadınlarda Human Papilloma Virüs Sıklığının Araştırılması, Tıpta Uzmanlık Tezi, Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, 2014.
2. Hyuna sung, Jacques Ferlay, Rebecca Siegel, Mathieu Laversanne, Isabelle Soerjomataram, Ahmedin Jemal, Freddie Bray. Global Cancer Statistics 2020: Globocan Estimates Of Incidence And Mortality Worldwide For 36 Cancers in 185 Countries, Cancer J Clin.,2021 Mayıs; 71(3):209-249. Doi: 10.3322/caac.21660. 2021 4 Şubat
3. Hatch KD, Hacker F: İnterapitelial disease of the cervix, vagina, and vulva. In Berek JS (ed) Novak's Gynecology 12th ed. Baltimore, USA. Williams and Wilkins, 1996, 447-486.
4. Peirson L, Fitzpatrick-Lewis D, Ciliska D, Warren R. , Screening For Cervical Cancer: A Systematic Review And Meta-Analysis. Syst. Rev. 2013; 2:35.
5. Whitlock Ep, Vesco Kk, Eder M, Et Al. Liquid-Based Cytology And Human Papillomavirus Testing To Screen For Cervical Cancer: A Systematic Review For The U.S. Preventive Services Task Force. Ann Intern Med 2011; 155:687.
6. Demirel G, Gölbaşı Z. Kadın Sağlığı Taramasında Güncel Durum. Gümüşhane Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi, 2015; 4:638–59.
7. Doorbar J. Molecular Biology Of Human Papillomavirus İnfection And Cervical Cancer. Clin Sci (Lond) 2006; 110:525.
8. Aref-Adib M, Freeman-Wang T. Cervical Cancer Prevention And Screening: The Role Of Human Papillomavirus Testing. The Obstet Gynaecol 2016; 18:251–63. <https://doi.org/10.1111/Tog.12279>.
9. Montz Fj. Management Of High-Grade Cervical İnterapitelial Neoplasia And Low-Grade Squamous İnterapitelial Lesion And Potential Complications. Clin Obstet Gynecol 2000; 43:394.
10. Mccluggage, W. G., Immunohistochemistry As A Diagnostic Aid İn Cervical Pathology. Pathology, (2007). 39(1),97–111. Doi:10.1080/00313020601123961
11. N. Wentzensen, C. Bergeron, F. Cas, D. Eschenbach, S. Vinokurova, D.M. Von Knebel, Evaluation Of A Nuclear Score For P16ink4a-Stained Cervical Squamous Cells İn Liquid-Based Cytology Samples, Cancer-Am. Cancer Soc. 105 (2005); 461–467

12. Hu Jm, Sun Q, Li L, Liu Cx, Chen Yz, Zou H, Pang Lj, Zhao J, Yang L, Cao Yw, Cui Xb, Qi Y, Liang Wh, Zhang Wj, Li F. *Int J Clinical Pathology Ecollection*, 2014 Aug 15;7(9):6165-71.
13. Dong Dd, Yang H, Li K, Xu G, Song Lh, Fan Xl, Jiang Xl, Yie Sm. *Reprod Sci*. 2010 Aug;17(8):718-23. Doi: 10.1177/1933719110369183. Epub 2010 May 5.
14. Xian Lan Zhao , Zhi Ying Meng , Yu Huan Qiao , Hui Li Zhang, Promoter Methylation Of Dapk Gene In Cervical Carcinoma. *Clin. Epig.*, 2008 Sep;27(9):919-23.
15. Roosmarjin Lutter, Lise Ma De Stropper, Fam19a4 Methylation Analysis In Self-Samples Compared With Cervical Scrapes For Detecting Cervical (Pre)Cancer In Hpv-Positive Women, *Br J Cancer*. 2016 Aug 23; 115(5): 579–587.
16. Iris Babion¹, Lise M A De Strooper¹, Roosmarijn Luttmer¹ Complementarity Between Mirna Expression Analysis And Dna Methylation Analysis In Hrhpv-Positive Cervical Scrapes For The Detection Of Cervical Disease. *Epigenetics*, 2019 Jun; 14(6):558-567.
17. Timothy Nacarelli , Takeshi Fukumoto , Joseph A Zundell , NAMPT Inhibition Suppresses Cancer Stem-like Cells Associated with Therapy-Induced Senescence in Ovarian Cancer, *Med. Chem.* , 2020 Feb 15;80(4):890-900.
18. Xiaoqun Lv , Lingyun Zhang , Yanyan Zhu , Harun M. Said , Jimin Shi ve Guoxiong Xu Regulative Effect Of Nampt On Tumor Progression And Cell Viability In Human Colorectal Cancer, *Journ. Of Cancer*. 2015; 6(9): 849-858.
19. Hans Ikenberg , Christine Bergeron , Dietmar Schmidt , Henrik Griesser , Francisco Alameda , Claudio Angeloni , Johannes BOGERS , Roger Dachez , Karin Denton , Celil Hariri , Screening For Cervical Cancer Precursors With P16/Ki-67 Dual-Stained Cytology: Results Of The Palms Study, *J Natl Cancer Inst*. 2013 16 Ekim; 105(20): 1550–1557.
20. Maria Dalamaga, Gerasimos Socrates Christodoulatos, Christos S. Mantzoros. The Role Of Extracellular And Intracellular Nicotinamide Phosphoribosyl-Transferase In Cancer: Diagnostic And Therapeutic Perspective Sand Challenges: Receiveddate: 16 October 2017 Accepteddate: 4 January 2018

21. Galli M, Van Gool F, Rongvaux A, Andris F, Leo O. The Nicotinamide Phosphoribosyl Transferase: A Molecular Link Between Metabolism, Inflammation, And cancer. *Cancerres.* 2010;70: 8–11.
22. Tia W, Zhu Y, Wang Y, Et Al. Visfatin, A Potential Biomarker And Prognostic Factor For Endometrial Cancer. *Gynecoloncol.* 2013;129: 505–12
23. Trayhurn P, Wood Is. Adipokines: Inflammation And The pleiotropic Role Of White Adipose Tissue. *Br J Nutr* 2004; 92: 347–55
24. Chang Yh, Chang Dm, Lin Ck, Et Al. Visfatin In Overweight/Obesity, Type 2 Diabetes Mellitus, Insulin Resistance, Metabolic Syndrome And Cardiovascular Diseases: A Meta-Analysis And Systemic Review. *Diabetes Metab Res Rev, Diabetes. Metab.,* 2011; 27: 515–27.
25. Aigner E, Bachofner N, Klein K, Et Al. Retinol-Binding Protein 4 In polycystic Ovary Syndrome, Association With Steroid Hormones And Response To Pioglitazone Treatment. *J Clin. Endocrinol. Metab.* 2009; 94: 1229–35.
26. Hlavna M, Kohut L, Lipkova J, Et Al. Relationship Of Resist In Levels With Endometrial Cancer Risk. *Neoplasma,* 2011; 58: 124–8
27. Rausch Me, Weisberg S, Vardhana P, Tortoriello Dv. Obesity In c57bl/6j Mice Is Characterized By Adipose Tissue Hypoxia And Cytotoxic T-Cell Infiltration. *Int J Obes* 2008; 32: 451–63.
28. Trayhurn P, Wang B, Wood Is. Hypoxia In Adipose Tissue: A Basis For The Dysregulation Of Tissue Function In Obesity, *Br J Nutr* 2008;100:227–35.
29. Agueda M, Lasa A, Simon E, Et Al. Association Of Circulating Visfatin Concentrations With Insulin Resistance And Low Grade Inflammation After Dietary Energy Restriction In Spanish Obese non-Diabetic Women: Role Of Body Composition Changes. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 2012; 22: 208–14.
30. Moiz Vora¹, Lubna A. Alattia¹, Junaid Ansari², Menchu Ong¹, James Cotelingam¹, Domenico Coppola³ And Rodney Shackelford¹ Nicotinamide Phosphoribosyl Transferase A Reliable Marker Of Progression In Cervical Dysplasia, *Anticancer Res.* 2017, September; 37(9):4821-4825.
31. Delancey Jo, Anatomic Aspects Of Vaginal Eversion After Hysterectomy. *Am J Obstet Gynecol* 1992; 166:1717.
32. Prendiville W, Sankaranarayanan R. Lyon, Chapter 2. Anatomy Of The Uterine Cervix And The Transformation Zone, Colposcopy And Treatment Of Cervical

- Precancer Iarc Technical Report, No. 45. (Fr): International Agency For Research On Cancer; 2017.
33. Hoffman, Schorge, Bradshaw. Williams Jinekoloji, Jinekolojik Onkoloji, Bölüm 30; Serviks Kanseri, 2016 Sayfa (771-780)
 34. Darragh Tm, Colgan Tj, Thomas Cox J, Heller Ds, Henry Mr, Luff Rd, Mccalmont T, Nayar R, Palefsky Jm, Stoler Mh, Wilkinson Ej, Zaino Rj, Wilbur Dc; The Lower Anogenital Squamous Terminology Standardization Project For Hpv-Associated Lesions: Background And Consensus Recommendations From The College Of American Pathologists And The American Society For Colposcopy And Cervical Pathology. Int J Gynecol Pathol 2013; 32: 76
 35. Schmeink Ce, Massuger Lf, Lenselink Ch, Et Al. Prospective follow-up of 2,065 young unscreened women to study human papillomavirus incidence and clearance, Int J Kanser 2013; 133:172.
 36. Waxman Ag, Chelmow D, Darragh Tm, Et Al. Revised terminology for cervical histopathology and its implications for management of high grade squamous intraepithelial lesions of the cervix. Obstet Jineköl 2012; 120:1465.
 37. Perkins Rb, Guido Rs, Castle Pe, Et Al. 2019 Asccp Risk-Based Management Consensus Guidelines For Abnormal Cervical Cancer Screening Tests And Cancer Precursors. J Low Genit Tract Dis 2020; 24: 102.
 38. The Ritu Nayar, David C. Wilbur, Bethesda System For Reporting Cervical / Vaginal Cytological Diagnoses. National Cancer Institute Workshop, 2015, 295-300.
 39. Winer Rl, Lee Sk, Hughes Jp, Et Al. Genital human papillomavirus infection: incidence and risk factors in a cohort of female university students. J Epidemiol 2003; 157:218.
 40. Moscicki Ab, Hills N, Shiboski S, Et Al. Risks for incident human papillomavirus infection and low-grade squamous intraepithelial lesion development in young females, Jama 2001; 285:2995.
 41. Schmeink Ce, Massuger Lf, Lenselink Ch, Et Al. Human Papillomavirus Persistence in Young Unscrened Women, a Prospective Cohort Study, Int J Kanser 2013; 133:172.
 42. Bansal N, Wright Jd, Cohen Cj, Herzog Tj. Natural history of established low grade cervical intraepithelial (CIN 1) lesions, Gyn. Onc. 2008; 28: 1763.

43. Tainio K, Athanasiou A, Tikkinen Kao, Et Al. Clinical course of untreated cervical intraepithelial neoplasia grade 2 under active surveillance: systematic review and meta-analysis, *Bmj* 2018; 360: K499.
44. Nucci Mr, Crum Cp. Redefining early cervical neoplasia: recent progress, *Adv. Anat. Pathol.* 2007; 14: 1.
45. Chan Jk, Monk Bj, Brewer C, Et Al. HPV infection and number of lifetime sexual partners are strong predictors for 'natural' regression of CIN 2 and 3, *Br J Cancer* 2003; 89: 1062.
46. Woodman CB, Collins S, Winter H ACOG Practice Bulletin number 66, September 2005. Management of abnormal cervical cytology and histology, *Lancet* 66,2005; 106:645.
47. McIndoe Wa, Mclean Mr, Jones Rw, Mullins Pr. The invasive potential of carcinoma in situ of the cervix, *Obstet Gynecol* 1984; 64: 451.
48. Gustafsson L, Adami Ho. Natural history of cervical neoplasia: consistent results obtained by an identification technique *Br J Kanser* 1989; 60: 132.
49. Peto J, Gilham C, Fletcher O, Matthews Fe. The cervical cancer epidemic that screening has prevented in the UK. *Lancet* 2004; 364:249.
50. Mccredie Mr, Sharples Kj, Paul C, Et Al. Natural history of cervical neoplasia and risk of invasive cancer in women with cervical intraepithelial neoplasia 3: a retrospective cohort study, *Lancet Oncol* 2008; 9: 425.
51. Nancy Santesso, Holger Schuneman, Julia Gage. *Who Guidelines: Use Of Cryotherapy For Cervical Intraepithelial Neoplasia*. Geneva: World Health Organization; 2011. Accessed April 23, 2020.
52. Martin-Hirsch Pp, Paraskevaidis E, Bryant A, Dickinson Ho. Surgery For Cervical Intraepithelial Neoplasia. *Cochrane Database Syst Rev* 2013; Cd001318.
53. Paraskevaidis E, Arbyn M, Sotiriadis A, Et Al. The Role Of Hpv Dna Testing In The Follow-Up Period After Treatment For C_{in}: A Systematic Review Of The Literature. *Cancer Treat Rev* 2004; 30:205.
54. D'alessandro P, Arduino B, Borgo M, Et Al. Loop Electrosurgical Excision Procedure Versus Cryotherapy In The Treatment Of Cervical Intraepithelial Neoplasia: A Systematic Review And Meta-Analysis Of Randomized Controlled Trials. *Gynecol Minim Invasive Ther* 2018; 7: 145.

55. Martinelli F, Schmeler Km, Johnson C, Et Al. Utility Of Conization With Frozen Section For Intraoperative Triage Prior To Definitive Hysterectomy. *Gynecol Oncol* 2012; 127:307.
56. Thomas R., Ronald L. Moolenaar, Christine G. Casey, Racial And Ethnic Disparities, Cdc, United States Cancer Center, Cancer Types Grouped By Race, Supplement / Vol. 62 / No. 3 November 22, 2013
57. Moscicki Ab, Shiboski S, Hills Nk, Et Al. Regression of low-grade squamous intra-epithelial lesions in young women, *Lancet* 2004; 364:1678
58. Zielinski Gd, Snijders Pj, Rozendaal L, Et Al. HPV presence precedes abnormal cytology in women developing cervical cancer and signals false negative smears, *Br J Kanser* 2001; 85: 398.
59. Bosch X, Harper D. Prevention strategies of cervical cancer in the HPV vaccine era. *Gynecol Oncol* 2006; 103: 21
60. Plummer M, Schiffman M, Castle Pe, Et Al. A 2-year prospective study of human papillomavirus persistence among women with a cytological diagnosis of atypical squamous cells of undetermined significance or low-grade squamous intraepithelial lesion, *J Infect Dis* 2007; 195:1582.
61. Ho Gy, Bierman R, Beardsley L, Et Al. Natural History of Cervical Intraepithelial Lesions in woman. *N Engl J Med* 1998; 338:423.
62. Snijders Pj, Steenbergen Rd, Heideman Da, Meijer Cj. HPV-mediated cervical carcinogenesis: concepts and clinical implications, *J Pathol* 2006; 208:152.
63. De Villiers Em. Relationship between steroid hormone contraceptives and HPV, cervical intraepithelial neoplasia and cervical carcinoma, *Int J Kanser* 2003; 103:705.
64. Colditz GA, Wolin KY, Gehlert S. United States, United States Cancer Center: 2009 Cancer Types Grouped By Race, *Cancer*. 22 Şubat 2013 / 62(07);113-118
65. Pecorelli S, Zigliani L, Revised FIGO Staging System, Odicino F. *Int J Gynaecol Obstet* 2009; 105:107.
66. Siegel RL, Miller Kd, Fuchs He, Jemal A. Cancer Statistics, 2021. *Ca Cancer J Clin* 2021; 71: 7.
67. Khan Mj, Partridge Ee, Wang Ss, Schiffman M. Socioeconomic Status And The Risk Of Cervical Intraepithelial Neoplasia Grade 3 Among Oncogenic Human P

apillomavirus Dna-Positive Women With Equivocal Or Mildly Abnormal Cytology. *Cancer* 2005; 104: 61.

68. Josefsson Am, Magnusson Pk, Ylitalo N, Et Al. Viral Load Of Human Papilloma Virus 16 As A Determinant For Development Of Cervical Carcinoma In Situ: A Nested Case-Control Study. *Lancet* 2000; 355:2189.
69. Kurman Rj, Schiffman Mh Analysis Of Individual Human Papillomavirus Types In Cervical Neoplasia. *Am J Obstet Gynecol* 1988 159;293-6
70. Bruni L, Diaz M, Castellsagué X, Ferrer E, Bosch Fx, De Sanjosé S. Cervical Human Papillomavirus Prevalence In 5 Continents: Meta-Analysis Of 1 Million Women With Normal Cytological Findings. *J Infect Dis.* 2010 Dec 15;202(12):1789-99
71. Benard Vb, Watson M, Castle Pe, Saraiya M. Cervical Carcinoma Rates Among Young Females In The United States. *Obstet Gynecol* 2012; 120:1117.
72. Jill Koshiol , ^{bir} Lila Finney-Rutten , ^b Richard P. Moser , ^c ve Nicola Hesse ^d Association Of Reproductive Health Professionals. Clinical Proceedings. Human Papillomavirus (Hpv) And Cervical Cancer, Association Of Reproductive Health Specialists, *Infect. Diseas.* March, 2009 Haz; 14(4): 331–345.
73. Jemal A, Bray F, Merkez Mm, Et Al. Cancer Statistics. *Ca Kanser J Clin* 2011; 61: 69.
74. Sutton Gp, Bundy Bn, Delgado G, Et Al. S Ovarian metastases in stage IB carcinoma of the cervix: A Gynecologic Oncology Group study 8,9, *Ben J Obstet Gynecol* 1992; 166: 50.
75. Pilleron Jp, Durand Jc, Hamelin Jp. Prognostic value of node metastasis in cancer of the uterine cervix. *Ben J Obstet Gynecol* 1974; 119:458.
76. Metcalf Ks, Johnson N, Calvert S, Peel Kr. Invasive cervical cancer: Staging and evaluation of lymph nodes. *Int J Jinekolo Cancer* 2000; 10:411.
77. Lee Yn, Wang Kl, Lin Mh, Et Al. Radical hysterectomy with pelvic lymph node dissection for treatment of cervical cancer: a clinical review of 954 cases. *Gynecol Oncol* 1989; 32: 135.
78. Lagasse Ld, Creasman Wt, Shingleton Hm, Et Al. Results and complications of operative staging in cervical cancer: experience of the Gynecologic Oncology Group, *Gynecol Oncol* 1980; 9: 90.

79. Arends Mj, Buckley Ch, Wells M. Aetiology, pathogenesis, and pathology of cervical neoplasia. *J Clin Pathol* 1998; 51: 96.
80. Hughes Rr, Brewington Kc, Hanjani P, Et Al. Radiological Evaluation of Lymph Node Metastases in Patients With Cervical Cancer A Meta-analysis. *Gynecol Oncol* 1980; 9: 153.
81. Sevin Bu, Nadji M, Averette He, Et Al. Microinvasive carcinoma of the cervix , *Gyneco. Onc.* 1992; 70: 2121.
82. Doorbar J. Molecular Biology Of Human Papillomavirus Infection And Cervical Cancer. *Clin Sci (Lond)* 2006; 110:525.
83. Parkin Dm, Pisani P; Ferlay J. Estimates Of The Worldwide Incidence Of Eighteen Major Cancers In 1985. *Int J Cancer* 1993; 54: 594-606
84. Gökaslan Hüsnü; Elif Esra Uyar, Screening Servikal Cancer With Pap Smear, *Turkish Journal of Family Medicine*, 2004
85. Fontham Eth, Wolf Amd, Church Tr, Et Al. Cervical cancer screening for individuals at average risk: 2020 guideline update from the American Cancer Society, *J Clin* 2020; 70: 321.
86. Perkins, Rebecca B. MD, MSc ¹; Guido, Richard S. MD ²; Castle, Philip E. Dكتورا ³; Chelmow, David MD, 2019 Asccp Risk-Based Management Consensus Guidelines For Abnormal Cervical Cancer Screening Tests And Cancer Precursors , *J Low Genit Tract Dis.* Nisan 2020 - Cilt 24 - Sayı 2 - s 102-131
87. Schiffmann M, Wheeler C, Dasgupta A, Solomon D, Castle P Efor The Alts Group: A Comparison Of A Prototype Pcr Assay And Hybride Capture 2 For Detection Of Carcinogenesis Hpv Dna In Women With Equivocal Or Mildly Abnormal Pap Smears, *Lancet Infect.* 20 Kasım 2006; 95(10): 1384-1389
88. Hildesheim A, Schiffman Mh, Grovit Pe, Class Ag, Grrr Ce, Zhong T. Persistence Of Type-Specific Human Papillomavirus Infection Among Cytologically Normal Women. *J Infect Dis* 1994; 169: 235-40
89. Sanjose S, Diaz M, Castellsague X, Clifford G, Bruni L, Muñoz N, Bosch Fx. Worldwide Prevalence And Genotype Distribution Of Cervical Human Papillomavirus Dna In Women With Normal Cytology: A Meta-Analysis. *Lancet Infect. Dis.* 2007; 7: 453

90. Iftner T & Villa Ll. Human Papillomavirus Technologies. J Natl Cancer Inst. Monogr 2003; 31: 80-88
91. Bruni L, Diaz M, Castellsagué X, Ferrer E, Bosch Fx, De Sanjosé S. Cervical Human Papillomavirus Prevalence In 5 Continents: Meta-Analysis Of 1 Million Women With Normal Cytological Findings. J Infect Dis. 2010 Dec 15;202(12):1789-99
92. Franco El, Villa Ll, Sobrinho Jp, Prado Jm, Rousseau Mc, Désy M, Rohan Te. Epidemiology Of Acquisition And Clearance Of Cervical Human Papillomavirus Infection In Women From A High-Risk Area For Cervical Cancer. J Infect Dis. 1999 Nov;180(5):1415-23
93. Ergünay K, Mısırlıoğlu M, Fırat P, Tuncer S. Z, Tuncer S, Yıldız I, Ustaçelebi G. Sitolojik Atipi İzlenen Servikal Örneklerde İnsan Papilloma Virusunun Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve Hibridizasyon Yöntemleriyle Saptanması Ve Tiplendirilmesi. Mikrobiyoloji Bülteni, 2008; 42: 273-300
94. Ardıç N, Öztürk O, Ergünay K, Sezer O. Servikal Sürüntü Örneklerinde Yüksek Riskli İnsan Papilloma Virus Tiplerine Ait E6/E7 Mrna'larının Ticari Otomatiza Bir Nasba Sistemiyle Araştırılması. Mikrobiyoloji Bülteni, 2009; 43: 463-469
95. Benard Vb, Watson M, Castle Pe, Saraiya M. Cervical Carcinoma Rates Among Young Females In The United States. Obstet Gynecol 2012; 120:1117.
96. Fang Zhou, Rajiv Pulinthanathu , Paul Elgert, Joan Cangiarella , Aylin Simsir, Surepath™ Hpv Hybrid Capture II (Hrhpv Hc2) test prediction of servical high-grade lesions, Diagn. Gynepath. 2015 Mayıs;43(5):381-7.
97. Ergünay K, Mısırlıoğlu M, Fırat P, Tuncer S. Z, Tuncer S, Yıldız I, Ustaçelebi G. Sitolojik atipi İzlenen Servikal Örneklerde İnsan Papilloma Virusunun Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve Hibridizasyon Yöntemleriyle Saptanması Ve Tiplendirilmesi. Mikrobiyoloji Bülteni, 2008; 42: 273-
98. Victoria N Nyaga, Nancy Santesso, Andrew Bryant, Pierre Pl Martin-Hirsch, Reem A Mustafa, Holger Schünemann, Evangelos Paraskevaidis, Marc Arbyn. Cytology Versus Hpv Testing For Cervical Cancer Screening In The General Population, Cochrane Library, 2017 Ağustos; 2017(8)
99. Curry Sj, Krist Ah, Et Al. Abd Screening for Cervical Cancer US Preventive Services Task Force Recommendation Statement, Vaccine, Jama 2018; 320:674.

100. Marc Arbyn, Guglielmo Ronco, Ahti Anttila, Chris J L M Meijer, Mario Poljak, Gina Ogilvie, George Koliopoulos, Pontus Naucler, Rengaswamy Sankaranarayanan, Julian Pe Regarding Human Papillomavirus Testing In Secondary Prevention Of Cervical Cancer, Marc Arbyn, Guglielmo Ronco, Ahti Anttila, Chris J L M Meijer, Mario Poljak, Gina Ogilvie, George Koliopoulos, Pontus Naucler, Rengaswamy Sankaranarayanan, Julian Pe Regarding Human Papillomavirus Testing In Secondary Prevention Of Cervical Cancer, 2012 Kasım 20; 30 Ek 5: F88-99
101. Ritu Nayar David C. Wilbur Editors. The 2015 Bethesda System For Reporting Cervical / Vaginal Cytological Diagnoses. National Cancer Institute Workshop. Springer International Publishing Switzerland 2015, 295-300
102. J Sláma , The New Colposcopic Signs--Ridge Sign And Inner Border, Article In Czech, Affiliations Expand. 2012 Şubat; 77(1):22-4.
103. Giuseppe F. Vercellino, Md, Evrim Erdemoglu, Md, Vito Chiantera, Md, Katharina Vasiljeva, Md, Inka Drechsler, Md, Guenter Cichon, Md, Achim Schneider, Md, And Gerd Böhmer, Md, Mph, Validity Of The Colposcopic Criteria Inner Border Sign, Ridge Sign, And Rag Sign For Detection Of High-Grade Cervical Intraepithelial Neoplasia By The American College Of Obstetricians And Gynecologists: Obstetrics & Gynecology, november 2014
104. J. V. Narsinga Rao¹, U. Sujatha Patnaik², & Mohammed Atiya³, Correlative Study of Colposcopy and Histopathology in Cases of Cervical Lesions. J Turk Ger Gynecol Assoc. 2019, July, 23(2), 10-15.
105. Lu-Lu Yu , ¹Wen Chen , ¹Xiao-Qin Lei Evaluation Of P16/Ki-67 Dual Staining In The Detection Of Cervical Precancer And Cancer In China, Oncotarget, 19 Nisan 2016; 7(16): 21181–21189.
106. Hans Ikenberg ¹, Christine Bergeron , Dietmar Schmidt' .Screening For Cervical Cancer Precursors With P16/Ki-67 Dual-Stained Cytology: Results Of The Palms Study, J Natl Cancer Inst. 2013 16 Ekim; 105 (20): 1550-7
107. Gülbin Özuyar, Uzmnalık Tezi. Serviks Biopsilerinde P16 ve Ki67 Ekspresyonunun Ayırıcı Tanıdaki Yeri- İstanbul 200
108. Hanan Alsaied Alshenawy, Original Article Evaluation Of P16, Human Papillomavirus Capsid Protein L1 And Ki-67 In Cervical Intraepithelial Lesions:

Potential Utility In Diagnosis And Prognosis, 2014 Aralık; Pathol Res Pract 210 (12): 916-21

109. Rananjit Mandal, M.D., Ishita Ghosh, M.D., Dipanwita Banerjee, M.S., Srabani Mittal, Ph.D., D.P.H., Richard Muwonge, Ph.D., Chinmayi Roy, M.D., Chinmay Panda, Ph.D., Manisha Vernekar, M.D., Lucien Frappart, M.D., And Partha Basu, M.D., Ph.D. Correlation Between P16/Ki-67 Expression And The Grade Of Cervical Intraepithelial Neoplasias, Gynecological Pathology, Temmuz 2020- Cilt 39- Sayı 4 – s: 384-390
110. Xiaoying Qiao, Md, Phd,¹ Tawfiqul A. Bhuiya, Md,¹ And Mark Spitzer, Differentiating High-Grade Cervical Intraepithelial Lesion From Atrophy In Postmenopausal Women Using Ki-67, Cyclin E, And P16 Immunohistochemical Analysis Md2 , Journal of Lower Genital Tract Disease, 2005 Nisan;9(2):100-7.
111. Davidson, B., Goldberg, I., Lerner-Geva, L., Gotlieb, W. H., Ben-Baruch, G., Novikov, I., & Kopolovic, J. Expression Of Topoisomerase II And Ki-67 In Cervical Carcinoma- Clinicopathological Study Using Immunohistochemistrynote. *Apmis*, 108(3), 209–215. Doi:10. 1034/J.1600-2000
112. Yukio Ishimi, Isao Okayasu, Chieko Kato, Hyun-Ju Kwon, Hiroshi Kimura, Kouichi Yamada, Si-Young Song ,Enhanced Expression Of Mcm Proteins In Cancer Cells Derived From Uterine Cervix Expression Of Survivin In Cln And Invasive Squamous Cell Carcinoma Of Uterine Cervix. *Eur J Biochem*. 2003 Mart; 270(6):1089-101
113. Kim HS¹, Shiraki K, Park SH Expression of survivin in CIN and invasive squamous cell carcinoma of uterine cervix. *Anticancer Research*, 2002; 22 (2A): 805-8
114. Katharine Astbury, Mrcog, Lynda Mcevoy, Bsc, Hayes Brian, Mb, Bch, Bao, Cathy Spillane, Bsc, Orla Sheils, Phd, Cara Martin, Phd, And John J. O'leary, Phd Mybl2 (B-Myb) In Cervical Cancer: Putative Biomarker, *Basic Science*, 2011; 21: 206-212.
115. Yan Xing, MD, Chaojun Wang, MD, and Jie Wu, MD, PhD Expression Of Geminin, P16, And Ki67 In Cervical Intraepithelial Neoplasm And Normal Tissues. *Nampt-Mediated Na^{d+} Biosynthesis Is Indispensable For Adipose*

Tissue Plasticity And Development Of Obesity, *Medicine* (Baltimore). 2017 Jun; 96(26): e7302.

116. Karen Nørgaard Nielsen, ^{1,2,6} Julia Peics, ^{1,6} Tao Ma, ^{1,2,6} Iuliia Karavaeva, ^{1,2} Morten Dall, Sabina Chubanava, Astrid L. Basse, Oksana Dmytriyeve, Jonas T. Treebak and Zachary Gerhart-Hines NAMPT-mediated NAD⁺ biosynthesis is indispensable for adipose tissue plasticity and development of obesity, *Mol Metab.* Volume 11, May 2018, Sayfalar 178-188
117. Abel López-Bermejo ¹, Berta Chico-Julià, Mercè Fernández-Balsells, Mònica Recasens, Eduardo Esteve, Roser Casamitjana, Wifredo Ricart, José-Manuel Fernández-Real Serum visfatin increases with progressive beta-cell deterioration, *Diabetes*. 2006 Oct;55(10):2871-5.
118. Seo J. A., Jang E. S., Kim B. G., Et Al. Plasma Visfatin Levels Are Positively Associated With Circulating Interleukin-6 In Apparently Healthy Korean Women. *Diabetes Research And Clinical Practice. Diabetes Res Clin Pract.* 2008; 79 (1):108–111. Doi: 10. 1016/J.Diabres.2007.04.016.
119. Yu-Hung Chang ¹, Dao-Ming Chang, Kun-Cheng Lin, Shyi-Jang Shin, Yau-Jiunn Lee Visfatin in overweight/obesity, type 2 diabetes mellitus, insulin resistance, metabolic syndrome and cardiovascular diseases: a meta-analysis and systemic review. *Diabetes Metab Res Rev.* 2011 Sep;27(6):515-27.
120. Rui-Mei Feng, Shang-Ying Hu, Fang-Hui Zhao, Rong Zhang, Xun Zhang, Asya Izraelit Wallach, You-Lin Qiao 1Role Of Active And Passive Smoking In High-Risk Human Papillomavirus Infection And Cervical Intraepithelial Neoplasia Grade 2 Or Worse, *J Gynecol Oncol.* 2017 September;28(5): e47.
121. Shao-Jie Zhou¹, Tie-Qiang BII, Chun-Xin Qin¹ , Xiao-Qing Yang¹ And Kai Pang, Expression Of Nampt Is Associated With Breast Invasive Ductal Carcinoma Development And Prognosis Departments Of 1 Thyroid And Breast Surgery And 2 Statistics, *Oncol Lett*, 2018 May;15(5): 6648-6654.
122. Huilan Xua, Sam Eggerb, Louiza S Velentzisz, Dianne L O’connella, Emily Bankse, Jessica Darlington-Brownb, Karen Canfella, Freddy Sitasa Hormonal Contraceptive Use And Smoking As Risk Factors For High-Grade Cervical Intraepithelial Neoplasia In Unvaccinated Women Aged 30–44 Years: A Case-Control Study In New South Wales, Australia, *Cancer Epidemiology*, 2018 August; 55: 162-169.