

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

HUMAN PAPİLLOMAVİRUS GENOTİPLERİNİN PYROSEQUENCİNG METODU İLE TESPİTİ

Serap ÖZEN

**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ
TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Fügen YARKIN**

ADANA-2016

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

HUMAN PAPİLLOMAVİRUS GENOTİPLERİNİN PYROSEQUENCİNG METODU İLE TESPİTİ

Serap ÖZEN

**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ
TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Fügen YARKIN**

Bu çalışma Çukurova Üniversitesi Rektörlüğü Araştırma Fonu TYL-2016-5213 numaralı proje olarak desteklenmiştir.

ADANA-2016

KABUL VE ONAY

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Programı Çerçevesinde yürütülmüş olan

“Human Papillomavirus Genotiplerinin Pyrosequencing metodu ile tespiti”
adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tarihi: 09 / 08 / 2016

TEZ SINAV JÜRİSİ



Prof. Dr. Fügen Yarkin
Çukurova Üniversitesi
Başkan



Prof. Dr. Fatih Köksal
Çukurova Üniversitesi
Üye



Prof. Dr. Nizami Duran
Mustafa Kemal Üniversitesi
Üye

Dr.
Üniversitesi
Üye

Dr.
Üniversitesi
Üye

Yukarıdaki Tez, Yönetim Kurulunun / / tarih ve
edilmiştir.

sayılı kararı ile kabul

Prof.Dr. Behice DURGUN
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü

T.C. ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS / DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI
ETİK BEYANI

Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesini okuduğumu ve anladığımı ve Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde ve ortaya çıkan sonuçlarda herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Tez olarak sunduğum bu çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda bu konuda hakkımda yapılacak tüm yasal işlemleri ve aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim./...../2016

İMZA

Adı Soyadı


Serap ÖZEN

Kayıtlı olunan Program : Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Tezin Konusu : Human papillomavirus genotiplerinin
pyrosequencing metodu ile tespiti

Tezin Türü : Yüksek Lisans : ☒ Doktora: ☐

Danışmanın Adı-Soyadı : Prof.Dr.Fügen YARKIN

Danışmanın İletişim Bilgileri

Telefon : 0 322 338 64 04 /3488

E-Posta : fugeny@yahoo.com

Öğrencinin İletişim Bilgileri

Telefon : 0531 454 02 62

E-Posta : serap201301@gmail.com

Adresi

:Yurt mah 71361 sok.

Özenirkent Apt. Kat:1/4

Çukurova/ADANA

**Bu belgenin Lisansüstü eğitim tezleri savunmaya alınmadan önce öğrenci tarafından doldurulup imzalanarak Enstitü Müdürlüğüne teslim edilmesi gerekmektedir.*

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın her aşamasında yakın ilgi ve desteğini gördüğüm; çalışmalarımın yönlendirilmesi ve sonuçlandırılmasında büyük emeği geçen tez danışmanım sayın Prof. Dr. Fügen YARKIN'a, ayrıca Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Fatih KÖKSAL'a, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Sayın Prof. Dr. Mehmet Ali Vardar'a Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Derya Gümürdülü'ye, değerli çalışma arkadaşlarıma, özellikle viroloji ekibine, çalışmalarım sırasında beni maddi açıdan destekleyen TÜBİTAK Bilim Adamı Yetiştirme Grubuna ve en önemlisi hayatım boyunca, eğitim ve sosyal yaşamımda gerek maddi gerekse manevi olarak benden hiçbir zaman desteğini esirgemeyen ve bugünlere gelmemde çok büyük pay sahibi olan aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Serap ÖZEN

İÇİNDEKİLER

KABUL ve ONAY	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
TABLolar DİZİNİ	vii
SİMGELER ve KISATLMALAR	viii
ÖZET	x
ABSTRACT	xi
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Human papillomavirus yapısı	3
2.2. Human papillomavirus sınıflandırılması	15
2.3. Human papillomavirus hayat siklusu	21
2.3.1. HPV tropizmi	23
2.3.2. HPV'nin hücrelere bağlanması ve hücreye girişi	26
2.3.3. HPV'nin üretken (prodüktif) ve üretken olmayan (nonprodüktif) enfeksiyonu	30
2.4. HPV patogenezi	32
2.5. HPV enfeksiyonları ve hastalığın klinik belirtileri	36
2.5.1. Mukozal papillomavirus enfeksiyonları	36
2.5.2. Kutanöz papillomavirus enfeksiyonları	39
2.6. HPV'nin laboratuvar tanısı	40
2.6.1. Hedef amplifikasyon teknikleri	41
2.6.2. Sinyal amplifikasyon teknikleri	43
2.7. HPV epidemiyolojisi	44
2.8. HPV enfeksiyonlarından korunma	45
2.8.1. Birincil korunma	46
2.8.2. İkincil korunma	52
2.8.3. Üçüncül korunma	53
3. GEREÇ ve YÖNTEM	55

3.1. HPV viral DNA ekstraksiyonu.....	55
3.2. HPV Sign PQ genotipleme testi.....	57
3.2.1. HPV real-time PCR testi.....	57
3.2.2. Pyrosequencing testi	58
4. BULGULAR.....	61
5. TARTIŞMA.....	71
6. SONUÇLAR.....	94
KAYNAKLAR	97
ÖZGEÇMİŞ	107



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No:

Sayfa No:

Şekil 1. EZ1 Advanced (Qiagen) otomatize nükleik asit izolasyon cihazı	56
Şekil 2. Örneklerin nükleik asit izolasyon cihazına yerleştirilmesi	56
Şekil 3. Rotor-Gene Q 5plex real-time PCR (Qiagen) cihazı	60
Şekil 4. PyroMark Q24 (Qiagen) cihazı.....	60
Şekil 5. Örnek plağı ve mikrop plak	60
Şekil 6. PyroMark Q24 (Qiagen) çalışma istasyonu	60
Şekil 7. PyroMark Q24 (Qiagen) kartuş.	60
Şekil 8. Toplam 1145 kadında HPV tiplerinin prevalansı.....	62



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo No:

Sayfa No:

Tablo 1. Çalışma grubundaki kadınların tanı ve yaş gruplarına göre dağılımı	61
Tablo 2. HPV pozitif ve HPV negatif kadınların yaş gruplarına göre dağılımı	62
Tablo 3. Servikal sitoloji sonuçlarının kadınların yaş gruplarına göre dağılımı.	63
Tablo 4. Normal ve anormal sitolojisi olan kadınlarda HPV pozitifliği	63
Tablo 5. HPV pozitif bulunan 229 vakaya ait servikal sürüntü örneklerinin sitoloji sonuçları	64
Tablo 6. HPV pozitif 229 hastada genotip dağılımı ve servikal sitolojik sonuçlar	64
Tablo 7. Tekli ve multiple HPV enfeksiyonlarının yaşa göre dağılımı.....	65
Tablo 8. HPV izolatlarının normal ve anormal sitolojili olan kadınlarda prevalansı	66
Tablo 9. Tekli ve çoklu HPV enfeksiyonların sitolojik tanıya göre dağılımı.....	67
Tablo 10. Tekli HPV enfeksiyonlarının sitolojik tanıya göre dağılımı	67
Tablo 11. İkili HPV enfeksiyonlarının sitolojik tanıya göre dağılımı.....	68
Tablo 12. Üçlü HPV enfeksiyonlarının sitolojik tanıya göre dağılımı.....	69
Tablo 13. Dörtlü HPV enfeksiyonlarının sitolojik tanıya göre dağılımı	70

SİMGELER ve KISATLMALAR

AIN	: Anal Intraepithelial Neoplasia
ART	: Antiretroviral Therapy
ASC-H	: Atypical Squamous Cells- cannot exclude HSIL
ASCUS	: Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance
CIN	: Cervical Intraepithelial Neoplasia
CPV	: Canine papillomavirus
CRPV	: Cottontail rabbit papillomavirus
CmPv	: Cheloniamydas papillomavirus
DNA	: Deoxyribo Nucleic Acid
E	: Early
ECM	: Extracellular Matrix
EGF	: Epidermal Growth Factor
ER	: Endoplazmik Retikulum
EV	: Epidermodysplasia verruciformis
FDA	: Food and Drug Administration
GAG	: Glycos Amino Glycans
HC2	: Hybrid Capture 2
HLA	: Human Leucoyte Antigen
HIF	: Hypoxia-inducible factor
HIV	: Human Immunodeficiency Virus
HPV	: Human Papillomavirus
HR HPV	: High Risk Human Papillomavirus
HSIL	: High Grade Squamous Intraepithelial Lesion
HSPG	: Heparan Sulfate Proteo Glycan
HSV 2	: Herpes Simplex Virus 2
Gr-ICBs	: Granular intracytoplasmic inclusion bodies
IS	: International Standardization
IFN	: Interferon
L	: Late
LBA	: Line Blot Assay

LBC	: Liquid-Based Cytology
LCR	: Long Control Region
LEEP	: Loop Elektrocerrahi Eksizyon Prosedürü
LR HPV	: Low Risk Human Papillomavirus
LSIL	: Low Grade Squamous Intraepithelial Lesion
MHC	: Major Histocompatibility Complex
MSM	: Men who have Sex with Men
NIBSC	: National Institute for Biological Standards and Control
NMSC	: Nonmelenoma Skin Cancer
NV	: Native Virion
ORF	: Open Reading Frame
PBS	: Phosphate Buffered Saline
PCR	: Polymerase Chain Reaction
PPV	: Positive Predictive Value
PsV	: Pseudovirion
QV	: Quasivirion
RNA	: Ribonucleic Acid
SIL	: Squamous Intraepithelial Lesion
TLR	: Toll-Like Receptor
TGF-β	: Tumor Growth Factor Beta
TNF-α	: Tumor Necrosis Factor Alpha
IARC	: International Agency For Research on Cancer
URR	: Upstream Regulatory Region
WHO	: World Health Organization
UV	: Ultraviyole
VLP	: Virus-Like Particle

ÖZET

Human Papillomavirus Genotiplerinin Pyrosequencing Metodu ile Tespiti

Human papillomavirus (HPV) servikal kanserin başlıca sebebidir. Bu çalışmanın amacı Çukurova Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Jinekoloji bölümüne başvuran kadınlarda HPV genotiplerinin pyrosequencing metodu ile tespitidir. Servikal sitoloji örnekleri 20-65 yaş arasındaki 1145 kadından toplanmıştır. HPV genotiplemesi için pyrosequencing metoduna dayanan HPV Sign PQ genotipleme testi (Diatech Pharmacogenetics, Italy) kullanılmıştır. Pyrosequencing PyroMark Q24 cihazında (Qiagen) yapılmıştır. HPV enfeksiyonunun prevalansı toplam 1145 kadında %20 (229) idi. Tek HPV enfeksiyonu ve çoklu HPV enfeksiyonu sırasıyla, çalışma grubunun %11.8'inde (136) ve %8.2'sinde (93) bulunmuştur. En baskın HPV genotipi HPV 16 (%9.4) olup bunu HPV 18 (%4.8) HPV 56 (%4), HPV 51 (%2.5), HPV 33 (%2.2), HPV 39 (%1.9), HPV 31 (%1.7), HPV 35 (%1.7), HPV 58 (%1.1), HPV 59 (%0.9), HPV 68 (%0.5), HPV 45 (%0.4), HPV 66 (%0.4) ve HPV 52 (%0.2) izlemiştir. Bu çalışmada en yaygın HPV tipleri olarak bulunan HPV 16 ve HPV 18 profilaktik HPV aşılarının hedefidir. Yeni jenerasyon dizi analizi metodu olan pyrosequencing test ile HPV genotiplerinin tanısı servikal kanser için risk altındaki kadınların tespitine katkı sağlayacaktır.

Anahtar kelimeler: HPV, genotip, pyrosequencing, servikal kanser, tarama.

ABSTRACT

Detection of Human Papillomavirus Genotypes by Pyrosequencing Method

Human papillomavirus (HPV) is the major cause of cervical cancer. The aim of this study was to detect HPV genotypes by pyrosequencing method among women attending the Department of Gynecology, Faculty of Medicine, Çukurova University. Cervical cytology samples were collected from 1145 women aged 20-65 years old. HPV Sign PQ genotyping test (Diatech Pharmacogenetics, Italy) based on pyrosequencing method was used for HPV genotyping. Pyrosequencing was performed on PyroMark Q24 instrument (Qiagen). The prevalence of HPV infection was 20% (229) in total 1145 women. Single HPV infection and multiple HPV infection was found in 11.8% (136) and 8.2% (93) of the study population, respectively. HPV 16 was the most prevalent HPV genotype (9.4%), followed by HPV 18 (4.8%), HPV 56 (4%), HPV 51 (2.5%), HPV 33 (2.2%), HPV 39 (1.9%), HPV 31 (1.7%), HPV 35 (1.7%), HPV 58 (1.1%), HPV 59 (0.9%), HPV 68 (0.5%), HPV 45 (0.4%), HPV 66 (0.4%) and HPV 52 (0.2%). HPV 16 and HPV 18 found as the most common HPV types in this study are targeted by prophylactic HPV vaccines. The diagnosis of HPV genotypes by pyrosequencing test which is a new generation sequencing method would contribute to identify women at risk for cervical cancer.

Key words: HPV, genotype, pyrosequencing, cervical cancer, screening.

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Human papillomavirus (HPV) servikal kanser vakalarının yaklaşık %100'ünde bulunur ve servikal kanserin primer sebebi olarak kabul edilir. Servikal HPV enfeksiyonları yaygın olarak görülmesine rağmen servikal kanser, HPV enfeksiyonunun oldukça geç ve nadir bir sonucudur. Genç kadınlardaki HPV enfeksiyonlarının çoğu, %70-90'ı geçicidir, genellikle klinik belirti görülmeden 6-12 ay içinde spontan olarak iyileşir. Vakaların az bir oranında, %10'dan azında ise persistent (kalıcı) HPV enfeksiyonu gelişir. Persistent yüksek riskli HPV enfeksiyonu, yüksek dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon (high grade squamous intraepithelial lesion; HSIL) ve servikal kanser gelişmesi için major risk faktörüdür ve neoplastik değişikliğe doğru ilk adımdır. HR HPV DNA'nın 12 aydan daha uzun süre tespiti persistent enfeksiyonun göstergesidir. HPV enfeksiyonu olanların sadece %1'inden azında servikal kanser gelişir. Dünyada her yıl yaklaşık 500.000 yeni servikal kanser vakası tanınmakta ve buna bağlı olarak 270.000 ölüm bildirilmektedir. Servikal kanser vakalarının %75-80'i servikal kanser tarama programlarının yetersiz olduğu gelişmekte olan ülkelerde görülmektedir^{1,2}.

HPV, papillomaviridae ailesine ait, 50-55 nm çapında, zarfsız, ikozahedral kapsidi olan, genomu sirküler çift sarmallı bir DNA virusudur. HPV'nin bugüne kadar 100'den fazla genotipi tanımlanmıştır. İnsanı enfekte eden 50'den fazla HPV tipi vardır. HPV genotipleri prekanseröz lezyon ve servikal kanserle ilişkilerine göre yüksek riskli (High risk; HR) ve düşük riskli (Low risk; LR) genotipler olmak üzere ikiye ayrılır. Cinsel yolla bulaşan HPV tiplerinden 14'ü yüksek riskli olup karsinojen olarak tanımlanmıştır. En önemli etken HPV 16 olup, bunu HPV 18, 45 ve 31 izlemektedir. HPV 6 ve 11 tipleri anogenital siğiller gibi benign hastalıkla ilişkilidir^{3,4}.

Cinsel olarak aktif kişilerin HPV ile enfekte olma olasılığı en az %50'dir ve kadınlarda HPV enfeksiyon prevalansı %2-44 olarak bildirilmiştir. Bu bulgu muhtemelen HPV'ye karşı gelişen adaptif immun cevabın sonraki enfeksiyonu önlemesine bağlıdır. Buna karşılık birçok çalışmada 25 yaşından küçük kadınlarda HPV prevalansında ilk pik sonrası düşüş olmuştur, ancak sonra ≥ 45 yaş ve üzeri yaşlarda ikinci pik görülmüştür. Bu ikinci pik bir veya daha fazla HPV tip spesifik immunitenin giderek kaybına bağlı hayatın erken döneminde kazanılan latent enfeksiyonların

reaktivasyonu veya hayatın geç döneminde yeni enfeksiyonların kazanılmasından kaynaklanabilir. Erken tanı önemlidir, çünkü prekanseröz lezyonlar invaziv kansere çok uzun bir sürede ilerler⁵.

Cinsel aktivitenin erken yaşta başlaması, doğum kontrol hapı kullanım sıklığının artması, immun yetmezlik, multiparite, çok sayıda cinsel partner olması ve diğer cinsel yolla geçen enfeksiyonların varlığı ve genetik predispozisyon genital HPV enfeksiyonunun artışında rol oynayan faktörlerdir. Servikal prekanseröz lezyonlar erken tanınmadığı ve tedavi edilmediği takdirde ortalama 10-15 yıl sonra servikal kanser gelişir.

Servikal prekanseröz lezyonlar sitolojik tarama testi olan Papanicolau (Pap) testi ve HPV DNA testi kullanılarak servikal hücrelerin analizi ile tespit edilebilir. Gelişmiş lkelerde Pap testinin yaklaşık 50 yıldır kullanılması ile servikal prekanseröz lezyonların erken tanısı ve tedavisi sonucu servikal kanser insidansının yaklaşık %70 oranında azalmasına karşılık bu sonuç beklenenin altındadır. Servikal kanserin tam olarak eradike edilememesinin en önemli sebebi yüksek dereceli skuamoz intraepitelyal lezyonların (HSIL) tanısı için Pap testinin sensitivitesinin oldukça düşük, %75-85 arasında olmasıdır. Oysa HSIL'i tespit etmede HPV DNA testinin sensitivitesi %84-100 arasındadır. HPV DNA testinin spesifitesi ise %64-95 olup Pap testinin spesifitesi %86-100 oranına benzer veya biraz düşüktür. Servikal kanser ve prekürsör lezyonların %99.7'sinde HPV DNA tespit edilmiştir. HPV enfeksiyonu ve servikal kanser arasındaki kuvvetli etiyolojik ilişki HPV testinin servikal kanser taramasında 30 yaş ve üstü kadınlarda servikal kanser ve prekanseröz lezyonların tespiti için sitolojiye ilaveten yardımcı bir tarama testi olarak veya Pap testine alternatif tek başına primer bir tarama testi olarak değerlendirilmesine yol amıştır^{6,7,8}.

Bu çalışmanın amacı Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Jinekoloji Bölümüne başvuran kadınlarda HPV genotiplerinin dağılımını pyrosequencing metodu ile tespit etmektir. Pyrosequencing metodu ile servikal kanser için yüksek risk altındaki kişilerin hızlı ve doğru tanısı yapılarak zamanında gerekli önlemler alınabilecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Human papillomavirus yapısı

Human papillomavirus (HPV), küçük 50-55 nm çapında, zarfsız, çift sarmallı sirküler DNA genomu olan bir virustur. DNA genomu, iki geç protein olan L1 ve L2'den oluşan ikosahedral kapsid tarafından korunur. HPV kapsid proteinlerinden kapsidin %80'ini oluşturan L1 major yapısal protein olup her virus partikülünde 360 kopyası bulunur. Beş tane monomer L1 proteini (yaklaşık 55kDa) L1 pentamerini (kapsomer) ve 72 kapsomer de virus kapsidini oluşturur. Minör yapısal protein L2 (yaklaşık 75 kDa) ise her kapsomerin merkezinde yer alır ve her partikülde 72 kopyası bulunur. L1 pentamerleri kapsidi stabilize etmek için birbirleriyle pentamer içi ve pentamerler arası disülfid bağlarıyla etkileşirler.

HPV viral genomu yaklaşık 8000 baz çiftinden oluşur ve 8 açık okuma çerçevesi (ORF; open reading frame) barındırır. Fonksiyonel olarak HPV genomu üç bölgeye ayrılır. İlk bölge, E6 ve E7 genlerinin transkripsiyonunu düzenleyici fonksiyona sahip olup kodlayıcı olmayan bölge (noncoding region; NCR), yukarı düzenleyici bölge (URR; Upstream Regulatory Region) veya uzun kontrol bölgesi (LCR; Long Control Region) olarak isimlendirilir. İkinci bölge, viral replikasyon ve onkogeneze ile ilgili yapısal olmayan proteinleri kodlayan altı ORF; E1, E2, E4, E5, E6 ve E7'den oluşan erken bölge (Early; E)'dir. Üçüncü bölge, L1 ve L2 yapısal proteinlerini kodlayan geç gen (Late; L) bölgesidir. Anogenital HPV'lerin LCR bölgesi genomun yaklaşık %10'unu temsil eder, uzunluğu 800-900 bp arası değişmektedir ve HPV tipleri arasında nükleotid sırasında büyük oranda değişiklik gösterir. HPV E6 ve E7 genleri şimdiye kadar tanımlanmış hemen hemen tüm HPV tiplerinde büyük ölçüde korunmuştur ve kanserle ilişkili HPV tiplerinin major onkojen proteinlerini kodlar⁹.

Çift sarmallı DNA'nın sadece bir sarmalı viral gen ekspresyonu için kalıp görevi görür ve birçok polisistronik mRNA transkriptini kodlar. Viral gen ekspresyonunun düzenlenmesi karmaşıktır, hücrel ve viral transkripsiyon faktörleri ile kontrol edilir. Bu düzenlemelerin çoğu transkripsiyon regülatörlerini içeren LCR bölgesinde gerçekleşir. LCR'ye, viral E2 ürününün yanı sıra birçok hücrel faktör bağlanır. Çok sayıda hücrel transkripsiyon faktörü tanınmıştır ve bazılarının disfonksiyonunun karsinogeneze önemli rol oynadığı tespit edilmiştir.

Viral promotörlerin transkripsiyon başlangıç yerleri virus tipine bağlı olarak farklılık gösterir, fakat tüm tiplerde promotör kullanımı keratinositlerin diferansiyasyonuna (farklılaşması) bağımlıdır. Replikasyon orjini ve birçok transkripsiyonu düzenleyici elementler LCR'nin yukarı kısmında bulunur. Virusun erken promotörü, diferansiyasyon bağımlı geç promotör ve iki poliadenilasyon sinyali viral genlerin üç genel grubunu tanımlar. Bu viral genler konak hücrenin diferansiyasyonu sırasında koordineli olarak düzenlenir. E6 ve E7 genleri replikasyonu sürdürürler. E1, E2, E4, E5 ve E8 virusun DNA replikasyonundan, transkripsiyonun kontrolünden, diğer bazı geç fonksiyonlardan ve L1 ve L2 ise viral partiküllerin montajından sorumludur^{10,11}.

Genital HPV'lerde geç genlerin ekspresyonunun düzenlenmesi iyi anlaşılmamıştır. Bununla birlikte, ikinci veya geç promotör, diferansiyasyon bağımlı bir şekilde uyarılır ve böylece yalnızca konağın çok tabakalı, diferansiye olan epitelyum hücrelerinde aktive olur. Aktivasyondan sonra, geç promotör birçok başlangıç yerinden transkripsiyonu yönlendirir ve L1 ve L2 proteinlerinin translasyonunu kolaylaştıracak bir dizi transkriptin sentezinde rol alır. Geç promotör aktivasyonu, viral DNA replikasyonunun hızlanmasını ve yüksek seviyelerde viral protein ekspresyonunu sağlar. Sonuç olarak, virus kopya sayısı hücre başına 50 kopyadan binlerce kopyaya yükselir. Geç promotör aktifleştğinde, genlerin ekspresyonu gerçekleşir, böylece virionları oluşturmak için kapsid montajını sağlayan yapısal proteinler L1ve L2 kodlanır¹².

HPV viruslar arasında farklı olarak eşsiz ve kompleks bir viral hayat siklusuna sahiptir. Bunun sebebi HPV viral replikasyonunun konak epitel hücrelerinin farklılaşmasına sıkıca bağlı olmasıdır. Yeni virusların üretimi için viral DNA tabakalı epitelyumdaki mitotik olarak aktif bazal hücrelere girmeli, bölünen epitelyal hücrelerde düşük kopya sayısında viral DNA'nın devamlılığı sağlanmalı ve yüksek sayıda DNA amplikonu terminal diferansiye epitel hücrelerinin bulunduğu tabakaya yönlendirilerek kapsidle çevrilmelidir¹³.

HPV replikasyon siklusunda doğal olarak gerçekleşen birçok olay ilaç keşfi için biyolojik hedeflerin geliştirilmesine yardımcıdır. HPV viral geni E2 buna bir örnektir. E2 proteini viral transkripsiyonda, çoğalmada ve viral genomun devamlılığında kritik bir rol oynar. E2 proteini transkripsiyon sırasında DNA genomunda bulunan bağlanma yerine bağlanır. Ayrıca, E2 viral DNA replikasyon faktörü E1 gibi transkripsiyonel

transaktivatör aktiviteye sahiptir. E2 geninin HPV 16'nın uzun kontrol bölgesinde dört bağlanma bölgesi vardır¹⁴.

Normal hücre siklusunda epiteliumdaki enfekte olmamış bazal hücreler suprabazal hücre tabakasına göç ettikten sonra hücre döngüsünden çıkar ve terminal olarak farklılaşır. Terminal olarak farklılaşmış olan hücreler mitotik olarak aktif değildir. Buna göre, hücrelerin DNA replikasyon aktiviteleri hücre bölünme döngüsünden çıkan farklılaşmış hücrelerde baskılanmıştır. Viral DNA replikasyonunun devamı için, HPV diferansiye hücrelerin bölünmesini aktifleştirmelidir. Bunu E6 ve E7 ekspresyonu ile yapar. E6 ve E7, HPV'nin primer onkojenidir ve hücrelerde displastik değişiklikler ve invaziv kansere ilerlemeden sorumludur. E6 ve E7, tümör baskılayıcı proteinler olan p53 ve retinoblastoma proteinini (pRB) inaktive eder ve hücrelerin HPV DNA replikasyonunu desteklemesine izin verir. Böylece E6 ve E7, HPV'ye bağlı kanser gelişiminde major faktör olarak rol oynar. E6 ve E7'nin hücrenin doğal hayat siklusunu yönetme yeteneği bu onkojenleri geliştirilecek ilaçlar için ideal hedef yapar. p53 ve pRB'nin normal fonksiyonu hücre siklusunda DNA'nın devamlılığını sağlamaktır. p53'ün fonksiyonu, hücre döngüsünün G1 fazında hücreleri durdurmak ve konak DNA tamirine izin vermek için apoptozisi uyarmaktır. E6 ve E7'nin p53 veya pRB'nin inaktivasyonunu bozabilen bir ilaç HPV ilişkili enfeksiyonları önlemede mükemmel bir terapötik değere sahip olacaktır. Ayrıca E7, siklin bağımlı kinaz inhibitörleri olan p21 ve p27'ye bağlanır ve bu proteinlerin fonksiyonu kaybolur. Böylece aktif hale gelen siklin bağımlı kinazların pRB'yi fosforile etmesiyle hücrenin transkripsiyon faktörü olan E2F'ler serbest kalır. E2F'lerin hücrelerin S fazına girişi için gerekli siklin E, siklin A, CDK2 ve DNA polimeraz gibi proteinlerin sentezini uyarmasıyla hücreler virusun replikasyonunu sağlamak için sürekli çoğalmaya devam eder.

Antikor oluşumunu uyaran HPV proteinleri aşı yapımında kullanılmıştır. HPV ile enfekte dokunun üst tabakalarında iki geç yapısal protein, L1 ve L2 eksprese edilir. L1 antijeni günümüzde kullanılan HPV aşılarında bulunur. L2 de sıklıkla profilaktik aşı gelişimi için iyi bir aday olarak tanımlanmıştır, çünkü L2 spesifik antikorlar çeşitli HPV tiplerine karşı çapraz nötralizan aktiviteye sahiptir^{15,16}.

Genel olarak, HPV'nin sekans bazlı filogenetik analizi hastalık ilişkisiyle ilgili yararlı bilgiler sağlar. HPV 4, 65 ve 95 Gammapapillomavirus 1 türüne dahil edilmiştir. Örneğin, HPV 4 ve 65 özellikle palmoplantar veya el ve ayakların yan yüzeyinde

pigmentli siğil benzeri lezyonlara sebep olurken, HPV 95 öncelikle plantar yüzeylerde daha az belirgin pigmentsiz papüllere sebep olur. HPV 6 ve 11 Alfapapillomavirus 10 türü içerisinde yer alır. İkisi de benzer görünümde papillomlara sebep olmalarına rağmen, ağız bölgesinde en çok görülen tip HPV 11 ile kıyaslandığında, HPV 6 genital bölgeler için belirgin bir eğilim göstermektedir. Mukozal lezyonlara sebep olan HPV 40 ve deride özellikle ellerde "kasap" siğillerine sebep olan HPV 7 ise Alphapapillomavirus 8 türünde bulunur. Bu tip tropizm farklılıkları, viral gen fonksiyonu ve ekspresyonundaki farklılıklar, gen ekspresyonunun paternleri ve vücudun farklı yerlerindeki epitelyal regülasyon farklılıklarından kaynaklanır. Belki de en önemli faktör yüksek riskli HPV tipleri ile ilişkili kanser riskindeki farklılıklardır. HPV 16, 31 ve 35'in hepsi Alfapapillomavirus 9 türü içinde yer alır ve Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (International Agency For Research on Cancer; IARC) tarafından "insanlar için kanserojen" olarak sınıflandırılmıştır. HPV 16 ve servikal kanser arasındaki ilişki HPV 31 veya HPV 35 ile olan ilişkiden 10 kat daha güçlüdür, ancak bu üç tipten HPV 16 farklı olarak orofaringeal bölgedeki tümörler ile de ilişkilidir. Bunu açıklamak için bu özel epitel bölgesinde virus spesifik gen ekspresyonunun incelenmesi gerekir¹⁷.

Viral patojenite virusun genotipi, virus enfeksiyonunun hücre tropizmi ve konak immunitesinin durumunu da içeren birçok faktöre bağlıdır. Günümüzde, tropizmin hücreye virusun girişinden ziyade, öncelikle viral gen ekspresyonu ile kontrol edildiği düşünülür ve LCR içindeki regülatör elementlerin farklı HPV tiplerinin doku tropizmini belirlemede kilit önemi vardır. Enfektivitede farklılıkların da bir katkısı olabilir ve bunun kutanöz ve mukozal HPV virusları arasındaki hücre yüzeyine bağlanmadaki farklılıklar ile ilişkili olabileceği öne sürülmüştür. Spesifik HPV tiplerinden kaynaklanan hastalıklar bazen atipik alanlarda gerçekleşmesine rağmen bu yaygın değildir, bu tür lezyonlar genellikle atipik morfoloji ve patoloji gösterir. Papillomavirusların prodüktif hayat siklusunu tamamlamak için evrimleştiği ve daha az çoğaldıkları veya hiç çoğalmadıkları epitelyal bölgelere sahip oldukları fikri, türler arası enfeksiyonun çok az olmasını destekler. E6 ve E7 proteinleri, viral transkripsiyon faktörü E2 ile birlikte kanser fenotipinin gelişimi için son derece önemlidir. Viral onkogeneze çalışmalarında polyomavirus ve adenovirusların kansere nasıl sebep olduğunu anlamak için hayvan modelleri kullanarak çok sayıda araştırmalar yapılmıştır.

Adenoviruslar için, E1A ve E1B proteinleri ve polyomaviruslar için T antijenleri deneysel sistemlerde tümör gelişiminde rol alırlar ve bu proteinler yüksek riskli papillomavirusların E6 ve E7 proteinleriyle benzerlik göstermektedir. Güncel bilgiler, özel epitelyal bölgelerde neoplazi gelişiminden sorumlu yüksek riskli E6 ve E7 proteinlerinin ekspresyonunun bozulduğunu desteklemektedir ve bu enfeksiyonlar viral gen ekspresyon düzeyinin ve paterninin uygun olarak kontrol edildiği üretken enfeksiyonlardan ziyade “abortif veya nonproduktif enfeksiyonlar” olarak kabul edilir. Hücre tipi, hormon ve enflamatuvar sitokinler gibi birçok faktörün viral gen ekspresyonunu kontrol ettiği bildirilmiştir. Betapapillomavirus genusundaki HPV tipleri, popülasyonda normal deri ve mukozadaki asemptomatik enfeksiyonlarda ve doğumdan hemen sonra oluşan enfeksiyonlarda yaygın olarak görülür.

İlginç olarak, enfeksiyonu takiben genellikle semptomatik lezyonlarla ilişkili bazı papillomaviruslar enfeksiyon yerinde persiste edebilir ve sonra immun sistemin zayıflaması ile tekrar reaktif olabilir. Alphapapillomavirus ve betapapillomavirus tipleri için immun sistem viral gen ekspresyonunun düzeyini kontrol etmede önemlidir ve viral gen ürünlerinin aşırı ekspresyonu bazı beta HPV tiplerinin yanısıra yüksek risk alfapapillomavirus enfeksiyonunun ardından kansere ilerlemeyi kolaylaştırır.

Cinsel olarak aktif kadınların çoğunluğu yaşamları boyunca mukozal HPV tipleri ile enfekte olur. Bu enfeksiyonların çoğu asemptomatiktir ve 6-18 ayda immun sistem tarafından ortadan kaldırılır. Sadece kadınların bir kısmında HPV enfeksiyonu kalıcıdır ve bir latensi sürecinden sonra düşük ve/veya yüksek dereceli CIN’e (Cervical Intraepithelial Neoplasia) dönüşebilir ve ardından bu lezyonlar geriler veya invaziv servikal kansere ilerler. Özellikle E6 ve E7 onkoproteinlerin yüksek ekspresyon düzeyi HPV ilişkili kanserlerin en önemli özelliğidir. HPV 16 pozitif invaziv servikal kanserlerin bir kısmında viral DNA sadece epizomlar olarak bulunmaya devam etmesine rağmen servikal kansere ilerleme esnasında viral DNA epizomal halden konak genomuna entegre forma geçebilir. Birçok epidemiyolojik çalışmada sigara, cinsel davranışlar, oral kontraseptifler ve genetik yatkınlık HPV ilişkili hastalığa ilerlemede ek risk faktörleri olarak kabul edilmiştir. Ayrıca, immunité bozukluğu kalıcı bir enfeksiyonun oluşmasını ve neoplastik lezyonun gelişimini kolaylaştırır. Organ nakledilen veya immunitesi zayıflamış HIV pozitif bireyler sağlıklı bireylerden daha yüksek oranda tekli veya çoklu HPV enfeksiyonuna sahiptir.

HPV 16 ve HPV 18 bütün dünyada servikal kanserde en sık görülen tipler olarak bulunduklarından dolayı virolojik çalışmalar ağırlık olarak bu tiplere odaklanmıştır. Bu çalışmalar E5, E6 ve E7'nin doğrudan hücre transformasyonunu uyardığını ve immun cevapla ilişkili yolları değiştirmesinin yanı sıra birçok hücre proteinini hedefleyerek de hücre transformasyona sebep olduğunu açıkça göstermiştir. Viral ve hücre protein etkileşiminin önemli bir örneği, E7 ile cep proteinleri olarak adlandırılan pRb, p107 ve p130 hücre proteinleri ile bir kompleks oluşumudur. Bu proteinler hücre bölünmesinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynar ve bölünmeyen hücrelerde E2F ailesinin üyeleri (E2F1-5) dahil birçok transkripsiyon faktörüne direkt bağlanarak aktivitelerini inhibe ederler. Çoğalan hücrelerde, aktifleşen siklin bağımlı kinazlar (Cyclin dependent kinase; CDK) pRb'nin fosforilasyonuna yol açar ve buna bağlı olarak E2F'ler serbest bırakılarak aktif hale gelir. HPV 16 E7 proteinini pRb'nin hipofosforile edilmiş formuna bağlanır ve böylece ubikuitin-proteazom yolu aracılığıyla pRb'nin degradasyonunu uyarır ve hücrelerin S fazına ilerlemesi gerçekleşir¹⁸.

HPV 16 E6'nın en karakteristik özelliği proteazom yolu ile tümör baskılayıcı protein p53'ü inaktive etmesidir. p53, stres veya DNA hasarına cevap olarak aktive edilen ve hücre döngüsünün durmasını veya apoptozisin kontrolünde rol oynayan genlerin ekspresyonunu olumlu yönde düzenleyen bir transkripsiyon faktörüdür. HR HPV E6 proteinini, ubikuitin ligaz (E3) enzimi olarak işlev gören 100 kDa'lık bir hücre protein, E6AP (E6 ilişkili protein) ile etkileşime girer. Sonra E6/E6AP kompleksi p53'e bağlanarak hızla ubikuitinasyona uğrar ve proteazomlara giderek yıkım gerçekleşir. p53'ün major rolü hücre döngüsünün durmasını veya apoptozisi uyararak genom bütünlüğünü korumak olduğundan, HPV 16 E6 eksprese eden hücrelerde, kromozomal instabilite görülür ki, bu durum HPV ile enfekte hücrelerin maligniteye ilerleme olasılığını büyük ölçüde artırır. Şimdiye kadar E6 ve E7'nin birçok hücre hedefi tanımlanmıştır. Bu hücre proteinlerinin çoğu çoğalma, yaşlanma, apoptozis, diferansiyasyon ve immun yanıt gibi temel olayların kontrolünde rol oynar. p53 ve pRb'ye benzer şekilde, E6 ve E7'nin hücre hedefleriyle etkileşimlerinin çoğu, bazı proteinlerin örneğin, pro-apoptotik protein Bak ve hTERT'in (human telomerase reverse telomerase; insan telomerase ters transkriptaz) negatif transkripsiyonel regülatörü olan NFX1-91 gibi proteinlerin yıkımına sebep olur. İlginç bir şekilde, farklı HPV

tipleri arasında karşılaştırmalı analizler HR HPV için spesifik olan E6 ve E7'nin özelliklerinin tanınmasını sağlamıştır¹⁹.

Papillomavirusların üretilmesinde organotipik raft kültür, HPV'nin doğal ortamı olan diferansiye epitelyumda çoğalmasına izin veren ksenograft sistemi dışındaki tek sistemdir. Bu in vitro sistemde ksenograft sistemdeki gibi hayvan kullanmadan diferansiyasyon boyunca meydana gelen moleküler olaylar korunur. Organotipik sistemde, HPV'nin viral genomunu stabil bir şekilde devam ettiren insan keratinositleri, kollajen matrikste gömülü fibroblast hücrelerden yapılmış dermise benzer bir yapının üzerinde üretilir. Keratinositler hücre kültür besiyerinin altındaki dermis benzeri yapıdan difüzyon yoluyla beslenir. Doku 10-20 günlük bir süre sonrasında toplanır ve virus stoğu oluşturmak için homojenize edilir. Bu sistem, mutasyona uğrayabilen ve keratinositlere elektropore olabilen genomların ve ayrıca raft kültürde mutant virionların üretimi ile doğal hayat siklusunda oluşan genetik mutantların çalışılmasına izin verir. Bu sistemin dezavantajı virion üretiminin maliyetinin yüksek olmasıdır. Ayrıca, viral partiküllerin üretilmesi birkaç gün yerine raft kültür sisteminde 3-4 hafta sürer. Genel olarak, bu sistem viral genomun amplifikasyonu, geç gen ekspresyonu, virion montajı, olgunlaşma ve enfektiviteyi içeren viral hayat siklusunun tüm aşamalarının incelenmesine izin verir.

Hem in vivo hem de in vitro sistemden elde edilen virionlarla ilişkili artan maliyet ve teknik zorluklar sebebiyle rekombinant sistemin geliştirilmesi ihtiyacı doğmuştur. Rekombinant partikül üretiminin temelinde, virus benzeri partiküllerin (virus-like particle; VLP) montajında ya L1'in tek başına ya da L1 ve L2'nin birlikte ekspresyonu vardır. PsV'lerin (pseudovirions) üretimi için kapsid proteinlerine ilaveten GFP (green fluorescent protein) veya diğer bir reporter (haberci) kodlayan reporter plazmid kotransfekte edilir. Bu partiküller hücresel enfektivenin araştırılmasında kullanılır. Son olarak, tüm HPV genomu kapsid proteinlerini kodlayan ekspresyon vektörleri ile birlikte hücrelere transfekte edildiğinde oluşan partiküller "quasivirion" (QV) olarak adlandırılır. VLP'ler, PsV'ler ve QV'ler tek tabakalı kültürde 48 saat sonra toplanır ve doğal olgunlaşma sürecinden geçmesi gerekmez. QV'ler, doğal virionlara en çok benzeyen (Native Virion; NV) rekombinant partiküllerdir. QV partikülleri yüzeyinde yapısal epitopların çoğunu barındırır. Rekombinant partiküller ve doğal

virionlar arasında varsa herhangi bir yapısal farklılığın virusun biyolojisini etkileyip etkilemediği net değildir.

Rekombinant partikül sisteminde, bütün rekombinant partiküllerdeki L1'in amino asit dizisi, birçok papillomavirusun L1 N-ucu ORF'sinde bulunan konsensus metiyoninden başlar. Buna karşılık, HPV 16 ve HPV 18 gibi bazı HPV tipleri, yapısal olarak birden fazla L1 proteininin üretimine izin veren metiyoninleri içerir. Özellikle, HPV 16'nın yukarı (upstream) bölgesinde bulunan metiyonin, konsensus metiyoninden başlayan L1'e göre 26 amino asit daha uzun bir L1 üretimine izin verir ve HPV 18 ise konsensus metiyoninden üretilen L1'e göre 61 ve 26 amino asit daha uzun L1 proteininin üretimini sağlayan yukarı bölgede iki metiyonine sahiptir. Bu metiyoninler rekombinant sistemde kullanılan L1 ekspresyon plazmidlerinden çıkarılmıştır. Çünkü, sadece konsensus metiyoninden L1'in üretimi, L1 ekspresyonunun etkin olmasını ve partikül üretimini sağlar. Yukarı metiyoninden konsensus metiyonine kadar olan bölgenin eksik olduğu HPV 18 NV35 amino asit delesyon mutanlığı üretilmiştir ve HPV 18 VLP'ler-H18.K2 ve H18.J4 kullanılarak üretilen konformasyonel bağımlı iki antikoruyla nötralizasyon için test edilmiştir. Delesyon mutanlığının H18.K2 antikoru ile nötralizasyon özelliği kaybolmuştur, fakat yine de konformasyon bağımlı H18.J4 antikoru tarafından nötralize edilir. H18.K2 antikoru VLP'lere karşı üretilmiştir ve bu yüzden bağlanma yeri yukarı kısımda 35 amino asit içermez. Bu durum, yukarı bölgedeki 35 amino asitin HPV 18 kapsidinde yapısal değişiklikleri indüklediğini gösterir. Organotipik raft kültürde üretilen HPV 16 virionlar SDS-PAGE jelde yürütüldüğünde, western blotta L1 için iki bant tespit edilir. Buna karşılık, HPV 16 QV için yapılan western blotta virionlar sadece bir L1 formu içerdiğinden dolayı sadece bir bant gözükür. Bu, tek tabakalı hücrelerde üretilenlerle diferansiye epitelyumda üretilen kapsidler karşılaştırıldığında kapsidler arasında potansiyel bir konformasyonel ve yapısal farklılık olduğunu gösterir.

Tam enfeksiyöz virionların gelişme sürecinde birçok virus, olgunlaşma olarak adlandırılan yapısal değişiklikler geçirir. Raft kültür sisteminde virionlar doku içinde 10-20 günlük bir süre içerisinde olgunlaşır. Buna karşılık, rekombinant partiküller hücrelerden serbest bırakıldıktan sonra 24 saatlik bir sürede olgunlaşır. Sünnet derisi epitelyal raft kültüründe 10 günden sonra kapsidasyonu tamamlanmış enfeksiyöz virionlar oluşur, buna karşılık bir 10 gün sonra virionlar daha da olgunlaşır, stabiliteleri

artar, böylece ultrasantrifüj ile fraksinasyon sonucu strese karşı direnci artar. Olgun PsV'lerin de tripsin ile sindirime ve kimyasal yıkıma karşı direncinin arttığı gösterilmiştir. Daha stabil ve olgun fenotipe ilaveten 20 günlük doğal virionlar, 10 günlük virionlardan iki kat daha bulaşıcıdır ve hem L1 hem de L2 antikoru tarafından antikor nötralizasyonu için artan bir duyarlılığa sahiptir. Hem olgun hem de olgun olmayan PsV kapsidleri birçok L1 ve L2 antikoruyla eşit derecede nötralize edilir, bu NV partiküllerinin montaj ve olgunlaşma sırasında önemli epitoplarını değiştirdiğini gösterir.

Hem 10 günlük hem de 20 günlük doku kesitlerinin analizi, virionların lokalizasyonunda farklılık olduğunu; 10 günlük virionların baskın olarak suprabazal hücrelerin nükleusunda yerleştiğini, oysa 20 günlük virionların özellikle epiteliumun kornifiye tabakasında bulunduğunu göstermiştir. İnsan epiteliumunun alt kısmı indirgen bir ortam iken üst tabakaları oksidan bir ortama sahiptir. Bu doğal redoks gradiyenti immatür ve matür virionların lokasyonlarıyla çakıştığından virion matürasyonu, virionların indirgeyici ortamdan oksitleyici çevreye taşındığında oluşur. Okside edici etken olan oksitlenmiş glutatyon (Glutathion disulfide; GSSG) virion üretimi sırasında dokuya eklendiğinde, 10 günlük virionların olgunlaşması artar. Bu, oksidan ortama girmenin viral kapsidde değişiklikleri indüklediğini, virionları daha stabil ve matür fenotipe dönüştürdüğünü desteklemektedir^{20,21}.

Partikül oluşumu için gerekli olmamasına rağmen, L1 ve L2 moleküllerinde disülfid bağları hem pentamer içi hemde pentamerler arası etkileşimleri oluşturarak partikülleri stabilize eder ve nükleaz ve proteaza bağlı etkilere karşı partikülleri daha dirençli hale getirir. Epiteliumda, disülfid bağı oluşumunun oksitleyici bir ortamda virion olgunlaşması sırasında yavaş gerçekleştiği düşünülmektedir. Birçok HPV tipinde L1'de 12 tane korunmuş sistein rezidüsü vardır. Kriyo-elektron mikroskobu ile bovine papillomavirusların (BPV) değerlendirilmesi iki ayrı disülfid bağının olduğunu göstermiştir. Ancak bunların sadece biri human papillomaviruslarda korunmaktadır. Hem doğal hem de rekombinant viral partiküllerin disülfid bağlarını içerdiği bildirilmiştir. HPV 16'da disülfid bağı iki komşu kapsomer arasında pentamerler arası bağ oluşturan, sistein rezidüleri C175 ve C428'te bulunur. HPV 18 VLP'ler için kütle spektrometresi verilerine göre disülfid bağları homolog sisteinler C175 ve C429 arasında oluşur. Ayrıca, HPV 16 ve HPV 33 PsV'lerin hem genetik hem de

biyokimyasal analizi partiküllerin yapısal bütünlüğünde bu korunmuş sisteinlerin önemini göstermektedir. Çünkü HPV 16 PsV’de sisteinlerdeki mutasyon, partiküllerin matürasyonunu önler. HPV 16 VLP’lerdeki 12 korunmuş sisteinin mutasyonu ve analizi ile potansiyel olarak disülfid bağları olan C175, C185 ve C428 sisteinleri belirlenmiştir. C428’in mutasyonu elektron mikroskopuyla sadece kapsomerler görüldüğünden dolayı özellikle kapsid oluşumunu bozar. C175S mutasyonu tübüler yapılar üretir ve C185S mutasyonu daha küçük kapsidleri oluşturur. Bu sistein mutasyonları, diferansiye epitelyumda üretilen doğal virionlarda da değerlendirilmiştir. C175S hem 10 günlük hem de 20 günlük virionların üretimini ciddi şekilde azaltırken, C428S, C185S ve C175S, C185S çiftli mutasyonları sadece 20 günlük virionları etkiler. C428S PsV mutantının aksine C428S NV mutantı için partikül formasyonu gözlenmiştir. Bu, diferansiye epitelyumda bu sisteinlerin olgun doğal virion formasyonu için önemli olduğunu gösterir.

İnterpentamerik disülfid bağında rol oynamayan HPV 16’daki diğer korunmuş sisteinler de incelenmiştir. HPV 16 VLP’lerde C161, C229 ve C379’daki sistein mutasyonları yerine serin mutasyonlarının olması durumunda triptik proteolize yüksek duyarlılığı olan partiküller üretilir. HPV 16 NV’de sisteinden serine mutasyonlar triptik proteolize çok duyarlı partiküllerin oluşumuna sebep olmuştur. HPV 16 NV’de benzer sisteinden serine değişiklikler enfektif olmayan virionları oluşturan sadece C229S mutantıyla tabakalı epitelde endonükleaza dirençli genomların birikimini engeller. Bu, sisteinlerin kapsidi olgun forma yönlendirme aşamasında ve montajın erken döneminde geçici disülfid bağlarının oluşturulmasında rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Bu sisteinlerin HPV kapsidindeki öneminin tam bilinmesi HPV kapsidinin stabilitesinin daha iyi anlaşılmasını sağlayacaktır²².

L1’deki disülfid bağlarına ek olarak, L2, kapsid oluşumu ve stabilizasyonda önemli bir rol oynar. L2, kapsid içinde L1 ile heterotipik etkileşimler oluşturmasının yanı sıra diğer L2 molekülleri ile homotipik etkileşimler de oluşturur. L1’de disülfid bağları oluşturulamadığında, sadece L1’den oluşan kapsomerler kapsid haline dönüşmez. Ancak, L2 olduğunda VLP’ler oluşur. L2 terminal ucunda son derece korunmuş iki sistein bulunur ve bunlar PsV’lerde mutasyona uğradığında, nonenfeksiyöz partiküllerin oluşumuna yol açar. Partikül formasyonunda L2 sisteinlerinin önemi, diferansiye epitelyumda üretilen NV’lerde değerlendirilmiştir.

HPV 16 PV ve QV'nin kullanıldığı önceki çalışmalardan farklı olarak, sisteinlerin bir veya ikisi mutasyona uğradığı zaman enfeksiyöz NV'ler hem 10 günlük hem de 20 günlük dokularda üretilmiştir. Vahşi tip ile karşılaştırıldığında, üretilen mutant virusların değerlendirilmesi mutantların daha bulaşıcı, ancak daha az stabil olduğunu göstermiştir. Bu, kapsidde daha avantajlı bir bağlanma yerinin ortaya çıkmasına veya kapsid stabilitesinin azalmasına bağlı olarak hücreye girişten sonra viral genomun daha etkili serbest bırakılmasına bağlı olabilir. Bu L2 sisteinleri aşı gelişimi için birçok HPV tiplerine karşı çapraz nötralizan epitop için uygun bir aday olan eksternal loop'un çok yakınında bulunur. Bu loop muhtemelen virus olgunlaşmasının son aşamalarında ortaya çıkar, çünkü sadece 20 günlük virionlar L2 spesifik antikör RG-1 ile daha etkili nötralize edilir. Bu loop'u hedefleyen diğer antikörler da 20 günlük virionları etkili bir şekilde nötralize etmiştir. Bu veriler kapsidin stabilitesinde L2'nin önemini ve tek tabakalı epitelyum ile diferansiye epitelyumda montaj olan virionlar arasında önemli yapısal farklılığı gösterir.

HPV montajı ve yapısının bilinmeyenlerinden biri de viral kapsidde L2 konsantrasyonudur. L1 tek başına kapside montaj olabilir, buna karşılık, L2 rekombinant partiküllere eklendiğinde kapsid stabilitesinde, DNA'nın kapsidasyonunda ve partiküllerin enfektivitesinde artış gözlenmiştir. Doğal BPV 1'in kriyo-elektron mikroskopisi, pentamerik kapsomerlerin merkezinde her kapsidde L2'nin 12 kopyası olduğunu göstermiştir. Ancak, doğal HPV 1 partiküllerinin SDS-PAGE ile analizi, HPV 11 L1 pentamerlerinin L2 ile ko-immunopresipitasyonu ve ayrıca HPV 16 PsV'nin kriyo-elektron mikroskopisi her kapsomerin merkezinde L2'nin 72 kopyasının olduğunu göstermektedir. Doğal sistemde üretilen L1 ve L2 miktarlarının regülasyonu yapılır. Ancak, rekombinant partikülleri üretmede kullanılan ekspresyonun fazla olduğu bir sistemde, protein üretiminin düzenlenmesi yoktur ve bu yüzden partikül oluşumu için uygun L1 ve L2'nin oranı muhtemelen hatalıdır. Bu, rekombinant partiküllere daha fazla L2 eklenmesine yol açar²³.

Organotipik raft kültürü, sadece tek bazın değiştiği mutant virionların değil, aynı zamanda doğal diferansiye dokuda farklı HPV tiplerinin farklı bileşenlerinden oluşan kimerik HPV'lerin üretilmesine de izin verir. Bu tüm gen değiştirme (replasman) metodu komplementasyon deneyleriyle farklı HPV tiplerindeki korunmuş alanları göstermeyi amaçlar. HPV 18/16 olarak adlandırılan bir kimerik virus, HPV 18'deki

HPV 18 L1 ve L2'nin yerine HPV 16'nın L1 ve L2 ORF'si ile oluşturulmuştur. İki geç gen ORF'nin değiştirilmesi hücrelerde viral genomun devamlılığını etkilememiştir ve raft kültürlerinde kapsid gen ekspresyonu ve virion morfogenezisi gibi geç gen fonksiyonlarının gerçekleştiği gözlenmiştir. Ek olarak, raft kültürden saflaştırılmış kimerik virionlar keratinositleri enfekte edebilmiştir. Beklenildiği gibi, kimerik HPV 18/16, HPV 18 poliklonal antiserum tarafından nötralize edilememiştir, fakat HPV 16 poliklonal antiserum tarafından nötralize edilmiştir. HPV 45, 39, 31, 33, 11, 6b, 1a, CRP ve BPV1 gibi genetik olarak daha farklı HPV tiplerinin L1 ve L2'lerinin değiştirilmesiyle oluşturulan birçok kimeralar da elde edilmiştir. Buna karşılık, bütün kimeralar enfeksiyöz virionlar üretmesine rağmen, titreleri vahşi tip HPV 18'den daha düşüktür. Bu veriler, farklı HPV tipleri arasında korunmuş biyolojik fonksiyonlar olduğunu göstermektedir. Benzer çalışmalar her iki kapsid proteininin birbirlerinin yapısında rol oynadığını ve bunun virionun genel yapısını ve davranışını etkileyebildiğini göstermiştir. Hem L1 hem de L2'nin HPV biyolojisinde önemli bir rol oynadığı açıktır.

L1 ve L2'ye ek olarak, viral DNA ve histonları da içeren birçok komponent viral kapsidi oluşturur. Doğrudan veya dolaylı olarak kapsidin son yapısını ve/veya oluşumunu etkileyen diğer bazı viral ve hücrel bileşenler vardır. Bu bileşenler E2, E4, E5 ve E7 gibi HPV erken proteinleri veya şaperonlar veya karyoferinler gibi hücrel proteinleri içerebilir. Doğal virionların montajı için gerekli şüphesiz ki bilinmeyen viral ve/veya hücrel faktörler de vardır. Bu proteinler, hücre içinde virusun uygun lokalizasyona yönlendirilmesinde, kapsid proteinlerin ilk etkileşiminde, disülfid bağlarının geçici oluşumunda ve kapsid proteininin ekspresyonunun düzenlenmesinde rol alabilir²⁴.

Papillomaviruslar cilt, anogenital yol ve ağız boşluğu dahil birçok farklı anatomik bölgede hayat sikluslarını tamamlayabilirler, fakat her zaman klinik olarak belirgin lezyonlar oluşturmazlar, bazen üretken olmayan latent enfeksiyonlar olarak epitelyumda persiste ederler. Viral genom *Cheloniamydas* papillomavirus type 1 (CmPV1) için 6953 bp'den, Canine papillomavirus type 1 (CPV1) için 8607 bp'e değişen uzunlukta sirküler çift sarmallı bir DNA epizomudur. Viral genom, genellikle transkripsiyon faktörü bağlayıcı yerler ve replikasyon orijini içeren URR veya LRC olarak tanımlanan bir regülatör bölge ile erken (Early; E) ve geç (Late; L) olarak

adlandırılan iki ORF grubu içerir. CVP gibi bazı papillomavirus tipleri erken bölgenin sonu ve geç bölgenin başlangıcı arasında ikinci bir düzenleyici bölge içerir. ORF'lerin uzunluğu ve sayısındaki çeşitliliğe rağmen, bütün papillomavirus üyelerinde URR ve dizi analizi bilinen bütün papillomavirus tiplerinde ise yüksek derecede korunan bir grup protein bulunur.

HPV'nin erken proteinlerinden E1 ve E2 viral replikasyon için gerekli olup L1 ve L2 geç proteinleri kapsidi oluşturur. Diğer erken genler (E6, E7, E5) tabakalı epitelyumda replikasyonu kolaylaştırıcı "aksesuar" genler olarak kabul edilir. Bu erken gen ürünleri genellikle, hem işlevsel olarak hem de primer amino asit sekans seviyesinde, E1 ve E2'den daha farklıdır ve bütün papillomavirus tiplerinde mevcut değildir. İlginç bir şekilde, viral E4 proteini, bütün papillomaviruslarda olmasa bile çoğunda bulunur, fakat aynı zamanda primer amino asit sırasının değişken olması farklı bir fonksiyonu olduğunu gösterir. Buna karşılık, E4'ün kornifiye epitelyal tabakalardan virusun salınmasında anahtar rol oynadığı ve evrimsel süreçte, epitelyal yapının diferansiye olduğu farklı anatomik yerlerde fonksiyonunu yapmak üzere E4'ün farklılaştığı düşünülmektedir. L1, virus kapsidinin major yapısal proteinini kodlar, minör kapsid proteini L2 de sirküler viral DNA'ya bağlanarak optimal genom kapsidasyonunu kolaylaştırır. E2, viral transkripsiyon, replikasyonda ve genomun ayrışmasında işlev görürken, E1 virus spesifik DNA helikazı kodlar. Geriye kalan genler (E6, E7 ve E5) hücre ortamı değiştiren proteinleri kodlar ve birçok durumda yeni virionların üretimini destekleyen ve virulansı etkileyen farklı papillomavirusların hayat siklusu sırasında benzer, fakat gerekli olmayan fonksiyonları vardır. Böylece, virus tropizminin majör belirleyicisinin hem bu aksesuar genlerin fonksiyonu hem de regülasyonu olduğu düşünülmektedir²⁵.

2.2. Human papillomavirus sınıflandırılması

Papillomaviruslar insan ve hayvanları enfekte eden virusların farklı bir grubudur. Kökenleri en az 350 milyon yıl önce meydana gelen atasal konaklarının epitelyumundaki değişimlere bağlıdır. O zamandan beri, türler arasında çok az çapraz transferle farklı konakları evölüsyon geçirirken birlikte evrimleşmişlerdir. Günümüzde papillomaviruslar kuşlar, sürüngenler, keseliler ve diğer memelilerde bulunur ki bu, virusların başlangıçta düşünüldüğünden daha erken bir evrim geçirdiğini gösterir.

Ancak, son filogenetik analiz “ortak” atasal papillomavirusların atalarına benzer bir evrimsel yolu izlememiş olabileceğini, fakat tüylerin varlığı veya yokluğu ya da ter bezlerinin evrimi gibi konağın yapısı veya davranışlarının evrimi ile paralel olduğunu göstermektedir. Bu konak adaptasyonlarının, konaklarıyla birlikte türleşerek viral çeşitliliği devam ettiren papillomavirusların kolonizasyonu için yeni ekolojik nişler oluşturduğu düşünülmektedir. Bu doğrultuda, papillomaviruslar büyük bir epitel tropizm çeşitliliği ile birlikte belirgin bir tür spesifitesi geliştirmiştir. Papillomavirusların 240 farklı tipinin 37 genus içinde sınıflandırılmasıyla, papillomaviruslar omurgalılarıdaki virusların en büyük ailelerinden biri olarak kabul edilebilir¹⁷.

Papillomavirusların sınıflandırılması, antijenik yapıdan ziyade nükleotid sekanslarının karşılaştırılmasına dayanır ve böylece genotipler olarak bilinen spesifik HPV’ler tanımlanır. Aşı çalışmalarından elde edilen veriler, yakın ilişkili genotipler hariç virusların yüzeyinde bulunan son derece değişken loop’lar içeren majör kapsid proteinleri (L1) arasında antikörlerin çapraz reaktivitesinin sınırlı olduğunu göstermiştir. L1 geni papillomavirus sınıflandırması için başlangıçta standart olarak seçilmiştir ve bazı papillomavirus tipleri için bu bölgenin dışında sekans bilgisi azdır. Farklı HPV tipleri olarak sınıflandırmak için, her bir HPV izolatının L1 nükleotid sekansında en az %10 farklılık olmalıdır. Papillomavirus tipleri, Yunan harfleri ile adlandırılan büyük filogenetik genuslar içerisinde bulunan ve bir sayı ile gösterilen türler içinde yer alır. Böylece, Alfapapillomavirus 9 türü içinde HPV 16, 31, 35, 33, 52, 58 ve 67 tipleri bulunur. İdeal olarak, papillomavirusların sınıflandırılması sadece genomik sekans analizine veya genomik fragmanların analizine dayanmasından ziyade filogeni, genom organizasyonu, biyoloji ve patojenisiteyi de içermelidir. Ancak, bu filogenetik tür konsepti, potansiyel olarak kullanışlı olmasına rağmen uygulanması karmaşıktır ve çoğu papillomavirus tipleri hakkında detaylı bilgi yetersizdir.

HPV sadece epitel hücrelerini enfekte eder ve HPV genotipleri enfeksiyon yerine göre kutanöz ve mukozal HPV tipleri olmak üzere ikiye ayrılır. Alfapapillomavirus genusu, genital yolun mukozasını enfekte eden yaklaşık 30 HPV tipini ve deride yaygın siğillerden sorumlu olan HPV 2 gibi birçok kutanöz HPV tipini içerir. Mukozal HPV tiplerinin başlıca benign siğillerle ilişkili düşük riskli HPV’ler ve servikal kanser ve diğer bazı kanserlere sebep olan yüksek riskli HPV’ler olmak üzere

iki grubu vardır. Kutanöz HPV tiplerinin büyük bir grubu Betapapillomavirus genusunu oluşturur ve UV radyasyonu ile birlikte, non-melanom cilt kanserinin (NMSC; non-melanoma skin cancer) gelişimiyle ilişkili olduğundan şüphelenilmektedir. Diğer genuslar; gamapapillomavirus, mupapillomavirus ve nupapillomavirus genellikle kutanöz papillomlar ve siğillerin gelişimiyle ilişkili kutanöz HPV tiplerini içermektedir.

Benign siğillerin sebebi olarak HPV'nin ilişkisi zaten bilinirken, insanlarda kanser ve belirli HPV tipleri arasındaki ilişkinin ilk muhtemel kanıtı Zur Hausen ve arkadaşları tarafından 1974-1977 yıllarındaki çalışmalarla ileri sürülmüştür¹⁰. Daha sonraki epidemiyolojik ve moleküler çalışmalar, servikal kanserin ve diğer epitelyal tümörlerin gelişiminde birçok mukozal HPV tipinin direkt rolünü doğrulamıştır. Epidemiyolojik çalışmalar, servikal kanserle ilişkili HPV 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73 ve 82 olarak isimlendirilen 18 farklı yüksek riskli HPV tipini göstermiştir. HPV 16 ve 18 bu grup içinde en karsinojenik tiplerdir, servikal kanserin yaklaşık olarak sırasıyla %50 ve %20'sinden sorumludurlar. Anal, penil, vulvar, vajinal ve orofaringeal kanserler de yüksek riskli HPV enfeksiyonuyla ilişkilidir. Bu kanserler de çoğunlukla HPV 16 ile ilişkilidir, örneğin HPV pozitif orofaringeal kanserlerin %90'ından daha fazlasında HPV 16 bulunur^{26,27}.

Betapapillomavirus genusundaki HPV tiplerinin onkogenik potansiyeli için ilk kanıt Epidermodysplasia verruciformis (EV) olarak isimlendirilen nadir bir genetik hastalığı olanların ciltlerinden virusun izolasyonu ile elde edilmiştir. EV hastalarının immun sistemi zayıftır ve ciltte yaygın ve kalıcı HPV enfeksiyonuna karşı duyarlılığı yüksektir. Sonuç olarak hastalarda yaygın düz siğiller gelişir ve güneşe maruz bölgelerde vakaların yaklaşık %30-60'ında multifokal skuamöz hücreli karsinoma gelişir. Buna göre, immun sistemi baskılayıcı tedavi altındaki organ nakli alıcıları 50-100 kat daha fazla non-melanom cilt kanseri gelişme riskine sahiptir ve ciltlerinde beta HPV tiplerinin yüksek pozitifliği tespit edilir. Daha sensitif tanı testlerinin kullanımıyla, günümüzde sağlıklı bireylerin cildinde de beta HPV enfeksiyonu yüksek sıklıkta bulunur. Ancak genel popülasyonda NMSC gelişimindeki katkıları halen tam bilinmemektedir.

Kantitatif PCR ile beta HPV viral yük testi cilt kanseri hücrelerinin sadece çok azının viral DNA içerdiğini göstermiştir. Mantıklı bir hipotez, beta HPV tiplerinin karsinogenezin ilk aşamasında rol aldığı ve neoplastik fenotipin devamlılığı için sonraki

aşamalarda gerekmediğidir. Bu durum tüm karsinogenik süreç boyunca sürekli olarak viral onkojenlerin eksprese edildiği servikal kanserde mukozal yüksek riskli HPV tipleri için olandan farklıdır. Bu, biraz tartışmalı kabul edilmesine rağmen, NMSC patogenezinde beta HPV'nin rolü için bir "vur ve kaç" mekanizması gibi yeni bir senaryo olduğu anlamına gelebilir. UV ışınları geri dönüşü olmayan DNA hasarına sebep olan cilt kanseri için en iyi bilinen bir risk faktörüdür. Bu yüzden, beta HPV tipleri UV kaynaklı DNA mutasyonlarının birikimini kolaylaştırıcı olarak davranabilir, ancak kanserin ilerlemesi için gerekli değildir²⁸.

Cottontail rabbit papillomavirusun (CRPV) primer hedef hücrelerinin saç folikülündeki kök hücreleri ile kolokelize olduğu gösterilmiştir. E6 ve E7 transkriptleri belirgin bir hastalık olmamasına rağmen enfeksiyondan 11 gün sonra tespit edilmiştir ve bu genlerin ekspresyonu enfeksiyonun erken bir göstergesidir. Bu enfekte kıl köklerinden izole edilen canlı keratinosit klonlarının CRPV mRNA pozitif olduğunun bulunması, lokasyonu kıl kökü olduğu şüphelenilen replikasyon yetkin kök hücrelerinin enfeksiyonunu gösterir. Benzer bir hücresel hedef ve epitelyal tropizm epidermodysplasia verruciformis (EV) ile ilişkili HPV tipleri için de öne sürülmüştür. Bu HPV tipleri genellikle Betapapillomavirus genusundan gelmektedir ve farklı vücut bölgelerinden koparılmış kılta tespit edilebilir. EV, cilt karsinomasının yüksek riskiyle ilişkili nadir otozomal resesif bir hastalıktır. Birçok vakada hastalık, endoplazmik retikulum (ER)'da eksprese edilen iki gendeki (EVER1 ve EVER2) mutasyonlara bağlıdır. EVER1 ve EVER2 proteinleri çinko-taşıyıcı-1 (zinc-transporter; ZnT-1) ile bir kompleks oluşturur ve böylece çinko dengesi kontrol edilir. Lezyonlar genellikle el sırtı ve alından başlar ve giderek ekstremiteler, boyun ve gövdeye yayılır. Ancak mukoza epiteli enfekte olmaz. EV cilt lezyonları, epitelyumda sıklıkla bulunsalar bile palmoplantar ciltte nadiren görülür. Klinik düzeyde, EV ile ilişkili Betapapillomavirus tiplerinin bazı anatomik bölgeleri öncelikli olarak seçtiği kesindir. Koparılmış kılta EV-HPV'nin (epidermodysplasia verruciformis-human papillomavirus) sıklıkla bulunması kıl kökünün EV-HPV için önemli bir yer olduğunu göstermektedir²⁹.

HPV 1 ve 63 Mupapillomavirus genusunun üyeleridir ve palmoplantar ciltteki ekrin kanallarını hedef alır. HPV 1 avuç içi ve ayak tabanında tipik "myrmecia" siğillere sebep olur ve palmoplantar bölge dışındaki yerleri enfekte etmesi ve lezyonlar oluşturması bu HPV tipi için son derece nadirdir. En karakteristik histolojik özellik,

epidermin üst tabakalarında daha büyük ve daha çok sayıda bulunan ve bu virus ile enfeksiyonun patognomonik bir belirtisi olan eozinofilik granüler intrasitoplazmik inklüzyon cisimcikleridir (Gr-ICBs; eosinophilic granular intracytoplasmic inclusion bodies). HPV 1 enfeksiyonu, enfeksiyon yerinin klinik belirtilerini ve viral gen ekspresyonunu nasıl etkilediğine dair iyi bir örnektir. Lezyonlar avuç içi ve ayak tabanındaki cilt yüzeyinde gelişir. Erken lezyonların histopatolojik çalışmaları ve in situ hibridizasyon analizi hem HPV 1 ilişkili hastalık patolojisinin hemde in situ DNA pozitifliğinin ekrin kanallarla yakın ilişkili olduğunu göstermiştir.

Diğer bir mupapillomavirus tipi HPV 63, filamantöz inklüzyon cisimleri olarak adlandırılan koyu boyanan tonofibril benzeri yapıların varlığıyla karakterize minik benekli siğillere sebep olur. HPV 63'e bağlı siğillerin sadece ayak tabanında bulunduğu bildirilmiştir. HPV 63 DNA varlığı, HPV enfeksiyonuyla hipertrofiye uğramış olan acrotyngiums'un (intraepidermal ekrin kanalı) çevresindeki keratinositlerde ve ekrin dermal kanalın üst kısmında da tespit edilmiştir.

Betapapillomavirus cinsinden kasık ve kaştan koparılan kılda tespit edilen EV-HPV'lerin aksine, sekans sırası %85 benzer olan ve aynı HPV türünde (Alfapapillomavirus 2) bulunan HPV 6 ve 11 genital siğili olan hastaların sadece kasık ve perianal bölgesinden koparılan kılda tespit edilebilir, fakat aynı hastaların kaşında bulunmaz. HPV 6 ve 11'in epitelyal dağılımının daha sınırlı olduğu ileri sürülmüştür. Bunun aksine, bir çalışmada sağlıklı bireylerden koparılan kaşta dört genital HPV'nin (HPV 6, 11, 31 ve 58) varlığının gösterilmesi, bu virusların daha yaygın olduğunu, fakat lezyonların tercihen anagenital veya oral bölgelerde geliştiğini destekler. HPV 6 ve 11 condyloma acuminatum için en iyi bilinen etiyolojik ajandır ve pubik ve perianal kıl foliküllerinde tespit edilir. Aslında, kıl folikülleriyle ilişkili papüller kıl foliküllerinin yaygın bulunduğu birçok epitelyal bölgede, anogenital bölgede daha büyük belirgin lezyonlarla birlikte bazen gözlenir. İlginç olarak, histolojik çalışmalar HPV 6/11 DNA'sının kıl köklerinin yanısıra ter bezlerinin yakınında da histolojik değişikliklerle birlikte tespit edildiğini göstermiştir. HPV 6 ve 11 ayrıca, hedef hücreleri belirsiz olmasına rağmen laringeal papillomatozisten sorumludur. HPV 6 ve HPV 11'e bağlı papillomatozislerin görüldüğü vokal kord; skuamoz epitelyum, yalancı çok katlı epitelyum ve bir transformasyon zonundan meydana gelir ki bu bölgede bulunan kök hücre benzeri hücrelere girişi kolaylaştırabilir.

HPV 16, 18, 31 ve 33 gibi yüksek riskli mukozal HPV'ler, düşük riskli papillomaviruslarla ortak olmayan birçok farklı özellikleri kazanmak üzere evrim geçirmiştir. Bu öncelikle E5, E6 ve E7 gen ürünlerinin fonksiyonu ve ekspresyonlarını yöneten düzenleyici mekanizmalar ile ilişkilidir. Birçok çalışma, bu proteinlerin viral hayat siklusundaki rolünden ziyade kanser gelişimine katkıda bulunması üzerine yoğunlaşmıştır. Yüksek ve düşük riskli papillomavirusların hayat sikluslarında bu proteinlerin rolünün detaylı olarak karşılaştırıldığı çalışmalar sürmektedir. Yüksek riskli HPV E6 proteinlerinin başlıca özelliği hücresel p53 proteinine bağlanma ve yıkıma uğratma yeteneği olan C-terminal PDZ-bağlanma motifinin (Post synaptic density protein; PSD95, Drosophila disc large tumor suppressor; Dlg1 ve Zonula occludens-1 protein; zo-1) bulunmasıdır. Ayrıca, yüksek riskli HPV tiplerinin E6 ve E7 proteinleri tek bir promotör tarafından eksprese edilir. Oysa, Alfapapillomavirus genusunda bulunan düşük riskli HPV tiplerinin E6 ve E7 ekspresyonunu düzenleyen farklı promotörler vardır. Papillomavirusların bu grupları arasında önemli farklılıklar olmasına rağmen, bu özelliklerin yüksek riskli virus patogeneğinde önemli bir etkiye sahip olduğu bilinmektedir. Yüksek riskli HPV tiplerinin bu ek fonksiyonlardan kazandığı avantajlar belirsiz olmasına rağmen, enfeksiyonun belirli bölgelerde olması ve bu bölgelerdeki üretken enfeksiyon için farklı stratejilerle ilişkili olabilir. Yüksek riskli HPV virusları mukozada normal viral hayat sikluslarının sürmesi için önemli olan hücre döngüsünü başlatarak hücre çoğalmasını uyarırlar. Yüksek riskli HPV'lerle ilişkili kanserler, başlıca servikal ve anal transformasyon zonunda ve ayrıca viral gen ekspresyonunun zayıf bir şekilde kontrol edildiği düşünülen bölge olan orofarinks kriptlerinde gelişir. Farklı papillomavirusların doku dağılımına bakıldığında, belirli HPV tiplerinin üretken enfeksiyonu desteklemeyen ya da az destekleyen alanları enfekte etmesi şaşırtıcı değildir. Bu durum, serviks veya anüs ile karşılaştırıldığında penis, vajina ve vulva bölgelerinde kanser riskinin farklı olmasını açıklar. Ayrıca, farklı HPV tipleriyle (örneğin; HPV 16, 18, 45) ilişkili kanser gelişme risklerinin farklı olması, Alfapapillomavirus 7 ve 9 türlerinin tropizmleri veya doku spesifitelerinin farklılığından ve genlerinin farklı yollarla eksprese edilmesinden ve bu farklı epitelyal bölgelerde etkilerini göstermesinden kaynaklanabilir. Bu genital alanlarda enfeksiyona ilaveten bazı yüksek riskli HPV tipleri diğer kutanöz alanlarda tespit edilir ki "Bowenoid papulosis"e sebep olurlar^{30,31}.

2.3. Human papillomavirus hayat siklusu

HPV'nin hayat siklusu epitelyumun bazal tabakasındaki kök hücrelerin enfeksiyonuyla başlar. Hücre içine girişten sonra, düşük viral genom kopya sayısının devamlılığı için E1 ve E2 genlerinin ekspresyonu gerçekleşir. Bu proteinler viral replikasyon orjinine bağlanır ve DNA replikasyonu için gerekli hücresel DNA polimerazları ve diğer proteinleri toplar. Suprabazal tabakada E1, E2, E5, E6 ve E7 genlerinin ekspresyonu viral genomun devamlılığına katkıda bulunur ve hücre çoğalmasını indükler, epitelyumda enfeksiyöz virionların üretildiği HPV ile enfekte hücrelerin sayısı artar. Epitelyumun bu tabakasinda bulunan daha diferansiye hücrelerde diferansiyasyon bağımlı promotör aktive olur ve E1, E2, E6 ve E7'nin gen ekspresyonu sürdürülür. Ayrıca viral genom replikasyonunu indükleyen ürün için E4 geninin ekspresyonu aktive edilir. Aynı zamanda L1 ve L2 genlerinin de ekspresyonuyla hücre başına virus kopya sayısı fazlasıyla artar. Epitelyumun üst tabakalarında geç genlerin kodladığı viral kapsidin majör ve minör proteinleri, sırasıyla L1 ve L2 üretimiyle viral kapsidin montajı olur ve epitelyumun kornifiye tabakasına ulaşan virionlar salınır³².

HPV'nin hayat siklusu DNA'nın devamlılığının sağlandığı faz ve diferansiyasyon bağımlı faz olmak üzere iki kısma ayrılır:

1. DNA'nın devamlılığının sağlandığı faz

HPV virionları mikrotravmalara maruz kalan epitelyumda oluşan yarıklardan bazal tabaka hücrelerine ulaşır ve bu hücreleri enfekte eder. Viral kapsid ilk olarak bazal hücrelere bağlanır. HPV genomu, viral replikasyonun nonproduktif olarak gerçekleştiği bazal hücrelerin nükleusunda replike olur ve virus, konak DNA replikasyon mekanizmasını kullanarak düşük kopya sayısında epizomlar oluşturur. Böylece, viral proteinler farklılaşmamış hücrelerde çok düşük seviyelerde eksprese edilir ve bu immuniteden kaçışa ve enfeksiyonun persiste etmesine katkıda bulunur.

Bazal hücrelerde viral epizom viral hayat siklusunun erken fazında bulunur. E6, E7, E1 ve E2'nin ekspresyonu epizomal formun devamlılığı için gereklidir. E1 ve E2 viral DNA replikasyonunu başlatmak için birlikte çalışır. Oysa E6 ve E7 uzun süreli replikasyonun devamı için hücre döngüsü regülatörlerini modüle eder. E2 proteini muhtemelen bu aşamanın major düzenleyicisidir. Çünkü kendi ekspresyonunu ve aynı zamanda E6, E7 ve E1'in ekspresyonunu düzenleyen erken viral promotörün hem pozitif hem de negatif kontrolünü yapabilir.

Enfeksiyonun başlangıç aşamasının ardından, viral DNA konak hücre kromozomlarıyla koordineli olarak replike olur ve virus genomları yeni hücrelere dağıtılır. Bununla birlikte, epitel dokunun suprabazal tabakasının diferansiye keratinositlerinde virus, rolling-circle DNA replikasyonu fazına geçerek yüksek DNA kopya sayısına ulaşılır, kapsid proteinleri sentezlenir ve viral partikül montajı yapılır.

Konak hücre faktörleri HPV genomunun LCR bölgesi ile etkileşime girdiğinde ve erken viral genlerinin transkripsiyonu, özellikle E6 ve E7'nin transkripsiyonunun başlamasıyla HPV replikasyonu başlar. Viral E6 ve E7 gen ürünleri, terminal olarak farklılaşmış ve hücre döngüsünden ayrılan bir hücrede viral replikasyonu kolaylaştırmak için hücre siklusunun regülasyonunu bozarlar^{33,34}.

2. Diferansiyasyon bağımlı faz

Diferansiye olmamış hücrelerde DNA'nın devamlılığının sağlandığı fazda viral proteinler son derece düşük düzeylerde eksprese edilir. Buna karşılık, HPV ile enfekte hücreler bazal tabakadan ayrılırken, diferansiyasyona uğrarlar ve viral proteinlerin sentezi yüksek düzeylerde indüklenir. Viral protein sentezinin son derece diferansiye hücrelere sınırlı olması viral antijenlerin ekspresyonunu geciktirerek konak immün cevabına daha az duyarlı olan bölgelerde oluşmasına sebep olur.

HPV gen ekspresyonunun epitelyumun farklı bölgelerinde yapılması uzun süreli enfeksiyonu sürdürmek için önemlidir, ancak virus için bazı sorunlar yaratmaktadır. Bunu çözmek için virus hücreyi, diferansiye hücrelerde prodüktif çoğalmayı sağlayan hücre döngüsünde aktif kalmaya zorlar. Viral protein E7, farklılaşmış hücrelerde replikasyon yeterliliğini sürdürmekle sorumludur ve bunu pRb ailesinin üyelerini inaktive ederek kısmen gerçekleştirir. Konak hücrenin farklılaşması sonucu geç viral promotörün aktivasyonu epitelyumun spinöz tabakasının yakınında meydana gelir ve virus protein ekspresyonunun yüksek düzeyinden sorumludur. Bunun sonucunda, virus kopya sayısı hücre başına 50-200 kopyadan binlerce kopyaya çıkarılır.

Viral proteinler E1, E4 ve E5 diferansiyasyon için geç viral fonksiyonların aktivasyonuna katkıda bulunur. E6 ve E7 transkripsiyonunun E2 aracılığıyla azaltılması p53 ve pRb hücresel proteinlerin salınımı ile sonuçlanır ve konak hücrenin normal farklılaşma sürecine izin verir. Daha sonra geç promotör, kapsid genleri L1 ve L2'yi aktive eder. Son olarak, viral partiküllerin nükleusta montajı yapılır ve kornifiye epitel

katmanları döküldüğü zaman tam virionlar serbest bırakılır. Virionlar lizis veya nekroz olmadığından pul pul dökülen deskuame hücrelerle çevreye salınır ve bu ayrıca enflamasyondan kaçınmak için virusun persiste olmasına katkıda bulunur.

Spesifik bir HPV tipi ile enfekte kadınların çoğu 6-12 ay sonra aynı HPV tipini barındırmaz. HR HPV ile LR HPV'nin enfeksiyon süreleriyle ilgili olarak bazı çalışmalar benzer sürede olduğunu gösterirken diğerleri HR HPV tipleri için enfeksiyonun daha uzun süreli olduğunu ortaya koymuştur. HR HPV'nin, özellikle HPV 16'nın temizlenmesi için uzun bir zaman (16-18 ay) gerektiği ve inatçı persistent enfeksiyon gelişme olasılığının daha yüksek olduğu bildirilmiştir^{35,36}.

2.3.1. HPV tropizmi

HR HPV epitel hücrelerinin çeşitli tiplerini enfekte edebilir, fakat uterusun serviksinde daha sık kansere sebep olur. Servikal kanser tercihen ektoserviksin skuamoz epitelyumu ve endoserviksin kolumnar epitelyumu arasındaki sınırda bulunan servikal transformasyon zonunda (TZ) ortaya çıkar. TZ'deki bazal hücreler virion üretimi için gerekli özellik olan farklılaşma (diferansiyasyon) yeteneğindedir. TZ'deki bazal hücreler HPV enfeksiyonuna karşı daha duyarlıdır. Ayrıca, menstrüasyon ve doğum sırasında servikal değişiklikleri düzenleyen östrojen ve progesteron gibi hormonların varlığı, hem HPV enfeksiyonuna hem de kanser gelişimine yardımcı olabilir³⁷.

Serviksin bazal tabakasında iki hücre tipinin olduğu bildirilmiştir. Birinci tip terminal diferansiyasyon geçirebilen çoğalabilen hücreler olan çoğalan geçiş (Transit amplifying; TA) hücreleridir. TA hücreleri bölünür, farklılaşır ve suprabazal tabakada hücrelerin çoğunluğunu oluşturur. Bazal hücrelerin ikinci tipi sınırsız çoğalma potansiyeline sahip, ancak dokunun uzun süreli devamlılığını sürdürmek için “rezerv hücreler” (yedek hücreler) olarak görev gören TA havuzunu doldurmak için nadiren bölünen kök hücreleridir. Kök hücresi bölünerek bir yavru hücreden TA hücre oluşurken diğerleri kök hücre olmaya devam eder. Bazal tabakadaki hangi hücrelerin HPV enfeksiyonunun hedefi olduğu belirsizdir ve belki her iki hücre de enfekte olabilir. Bu gerçekse, kök hücrelerinin enfeksiyonu uzun süreli kalıcı enfeksiyona yol açabilir, oysa TA hücrelerin enfeksiyonu kısa süreli enfeksiyona sebep olur ve ardından iyileşir.

In vitro ve in vivo çalışmalar HPV partiküllerinin hücre yüzeyi reseptörü olan heparan sülfat proteoglikan'a (HSPG) bağlanması için L1 majör kapsid proteininin

majör determinant olduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca Laminin-5, epitel hücre dizilerinde viral kapsidin hücre dışı matrikse (Extracellular matrix; ECM) bağlamasına katkıda bulunabilir.

In vivo olarak, bu bölgelerde epitelyum mekanik veya kimyasal travmaya maruz kaldıktan sonra viral partiküller bazal membrana (BM; basal membrane) etkili bir şekilde bağlanır. L1 kapsid proteini epitelyumda travma sonrası ortaya çıkan BM segmentlerinde HSPG'lere bağlanır. Bundan sonra L1 konformasyonel değişikliğe uğrar ve L2 minör kapsid proteininin N-terminal ucu meydana çıkar ve bu bölge furin veya yakın ilişkili protein konvertaz (protein convertase; PC) 5 ve 6 tarafından ayrıştırılır. L2 proteolizi L1'in önceden kaplı olan yüzeyini ortaya çıkarır ve bu bölge travmanın olduğu yerdeki BM'den göç eden keratinositlerde tanımlanmamış hücre yüzey reseptörüne bağlanır. Bu reseptör halen bilinmemektedir, ancak in vitro çalışmalar, $\alpha 6$ -integrin'i olası bir aday olarak göstermiştir. L2'nin ayrışması epitelin sağlam yüzeyinin kapside bağlanmayan sülfatlanmış yapılar içermesinden dolayı gerekebilir.

Kapsidler keratinositteki yüzey reseptörü yoluyla hücreye bağlanır ve daha sonra hücre içine girer. Enfeksiyonda ilk aşama genellikle hücre yüzeyine bağlandıktan 2-4 saat sonra meydana gelen internalizasyondur. Penetrasyon ve hücre içi trafikte yollar hala belli değildir, ancak yavaş ve asenkron olarak birkaç saatlik bir zaman dilimi içinde olduğu kabul edilir. Klatrin aracılı endositozun HPV tiplerinin çoğunluğunda endositik yol olduğuna dikkat çekilmiştir. Buna karşılık, HPV 16'nın ilk olarak klatrin kaplı çukurlar aracılığı ile hücreye girdiği ileri sürülmüştür, fakat endoplazmik retikuluma ulaşılması kaveozom'lar aracılığıyla gerçekleşir. Ayrıca, kapsidlerin tetraspanin'den zengin mikrodomanleri içeren yeni bir yol aracılığıyla penetrasyonu öne sürülmüştür^{38,39}.

Kapsidin soyulması hücre yüzeyine bağlanmadan 8-12 saat kadar sonra oluşur ve L2'nin endozomdan dışarı çıkmada kritik bir role sahip olduğu belirtilmiştir. Mikrotübüllerle sitoplazmada taşınma protein kompleksi ile bağlanır ve L2'nin hücreye girişi esnasında motor proteini dinein aracılığıyla mikrotübül ağıyla etkileşimde olduğu bulunmuştur. Nükleusa viral genomun girişinden sonra kompleksler, en çok ND10 cisimciklerinde veya promiyelositik lösemi (PML) onkogenik domainler olarak belirlenmiş farklı noktasal nükleer alanlarda yerleşir. Nükleusta viral genomun replikasyonu için hücre bölünmesinin gerekli olduğuna dair kanıtlar vardır.

Endositozdan sonra endozomal lümenin asidifikasyonu viral kapsidin ayrılmasını sağlar ve viral replikasyonun meydana geldiği nükleusa transport oluşur. L1'in çoğu siklofilinler yardımıyla L2-DNA kompleksinden ayrıştırılır. Hem HaCaT (keratinocyte cell line) hem de HeLa hücrelerinin kullanılması, L1-L2-DNA kompleksinin, endozomdan golgiye hücrel yüklerin taşınmasından sorumlu bir kompleks olan retromer aracılığıyla golgiye gittiğini göstermiştir. HPV enfeksiyonu için retrograd trafik (golgiden ER'ye) gereklidir ve HPV 16 L2'nin endozomdan çıkışına aracılık eden bir retromer'e doğrudan bağlandığı gösterilmiştir. BPV PsV kullanıldığında, ER ve golgi cisimciği arasındaki veziküllerin trafiğine aracılık eden Syntaxin 18'in de L2-DNA kompleksinin nükleusa gidişinde rol oynadığı gösterilmiştir. L2-DNA kompleksi daha sonra γ -sekretaz aracılığıyla ER'ye yol alır. γ -sekretaz inhibisyonu endozomdan çıkıştan sonra golgiye varıştan önce HPV enfeksiyonunu bloke eder. HPV'nin hücreye girişi ile ilgili iki ayrı siRNA ile yapılan taramalar ile giriş sırasında sayıları artan ER komponenti olduğu tanımlanmıştır. Ayrıca, hem spesifik ER proteinlerinin yıkımı hem de ER fonksiyonunu bozan kimyasal inhibitörlerin kullanılması HPV enfeksiyonunu inhibe eder. Ancak, ER kolokalizasyonuna ilişkin çelişkili çalışmalar vardır, bir çalışmada enfeksiyon esnasında ER markerlarıyla HPV kolokalizasyonu bildirilmiş, oysa diğer bir çalışma ER kolokalizasyonunu gözlemede başarısız olmuştur. Son olarak, L2-DNA kompleksi mitoz boyunca nükleer zarfın bozulması esnasında nükleusa gider. Çekirdeğe HPV genomunun taşınmasını kolaylaştıran L2 minör proteini enfeksiyon için gereklidir. Özellikle, L2 içerisindeki üç GxxxG motifinin bulunduğu transmembran bölgenin enfektivite için gerekli olduğu gösterilmiştir. Araştırmaların çoğu nonviral psödogenomu barındıran Pseudovirion kullanılarak yapılmıştır. Bu, çok daha hızlı bir tarama yöntemine izin verirken, sonuçlar doğal virionlar kullanılarak doğrulanmalıdır⁴⁰.

Doğal bir enfeksiyonda HPV keratinositleri enfekte eder. Ancak, in vitro deneyler primer keratinositleri nadiren kullanmaktadır. Bu durum, rekombinant partiküllerin primer hücreleri son derece düşük düzeyde enfekte etmesinden kaynaklanır. Aksine doğal virionlar primer hücreleri oldukça iyi enfekte eder. HPV 31 ve HPV 45'in HaCaT hücreleri kadar primer hücreleri verimli bir şekilde enfekte ettiği ve HPV 16'nın HaCaT hücreleri ile karşılaştırıldığında daha büyük bir verimlilikle primer hücreleri enfekte ettiği gösterilmiştir. HPV 18 ise, HaCaT hücrelerin

enfeksiyonu ile kıyaslandığında daha düşük verimle primer hücreleri enfekte eder. Bu, diğer hücrelere kıyasla primer hücreler üzerinde bulunan bağlanma veya giriş reseptörlerinin ekspresyonundaki bir farklılık sebebiyle olabilir. Rekombinant partiküller veya doğal virionlar kullanılarak HPV'nin bağlanma ve enfeksiyonu ile ilgili verilerin çoğu, birçok hücre dizisi kullanılarak elde edilmiştir, sadece HaCaT hücreleri, HeLa hücreleri, 293TT hücreleri ve CHO (Chinese hamster ovary) hücreleri ile sınırlı değildir. Hem bağlanmaya hem de enfektiviteye bakıldığında deneyler arasında tutarlı bir hücre hattı kullanımının eksikliği çelişen bazı verilerden muhtemelen sorumludur.

Viral enfektivite çalışmalarında virus nötralizasyon testlerinin yapılması, özellikle enfeksiyonu önlemede HPV aşısında VLP'lerinin kullanımından dolayı önemlidir. HPV için oluşturulmuş antikorların hemen hepsi rekombinant partiküller kullanılarak yapılmıştır. H16.V5 ve H16.E70 gibi geliştirilen bu antikorların çoğunun hem rekombinant partikülleri hem de doğal virionları nötralize ettiği gösterilmiştir. Ancak, H16.U4 gibi bazı antikorların rekombinant partikülleri nötralize etmede oldukça etkili olduğu ancak, doğal virionları nötralize edici özellikte olmadığı gösterilmiştir. Ayrıca, partikülleri nötralize eden farklı antikorların mekanizmaları aydınlatılmaya çalışılmaktadır. Örneğin, H16.V5 ve H16.E70 partiküllerin hücre yüzeyine bağlanmasına izin verir, fakat hücre içine girişi ve ECM (extracellular matrix) ile ilişkiyi bloke eder. Buna karşılık H16.U4, hücre yüzeyine bağlanmayı önler, ancak ECM'ye bağlanmayı önlemez. Bu nötralizasyon çalışmaları rekombinant partiküller ve doğal virionlar arasındaki yapısal farklılıkları ve doğal virionlar kullanarak verilerin doğrulanmasının önemini vurgular^{41 42}.

2.3.2. HPV'nin hücrelere bağlanması ve hücreye girişi

Rekombinant partiküllerin kullanılmasıyla, çoğu papillomavirusların L1 aracılığıyla bazal membran veya hücre yüzeyinde bir glikozaminoglikan (GAG), heparan sülfat'a (HS) bağlanmasıyla enfeksiyonun gerçekleştiği gözlenmiştir. Bu bağlanma olayı L2 N-terminal ucunda konformasyonel bir değişikliği uyarır. Böylece, L2 N-terminali furin veya PC5/6 gibi bir proprotein konvertaz tarafından ayrıştırılır. İlaveten, bu konformasyonel değişiklikler kapsid üzerinde diğer HS bölgeleriyle etkileşim, virionun reseptör veya reseptör kompleksine transferi ve hücreye giriş sırasında diğer hücresel proteinlerle etkileşim için önemli olabilecek saklı epitopların

ortaya çıkmasına izin verebilir. Bağlanma reseptörü olarak GAG'ların katılımı ilk kez HPV 11 L1 VLP'ler ve HaCaT hücreleri kullanılarak gösterilmiştir. L1'in GAG'larla etkileşimlerinin GAG tip spesifik olduğu ileri sürülmüştür. HS bağımlı etkileşim hem HPV 16 hem de HPV 33 PsV'lerde gösterilmiştir. Buna karşılık, HPV 11 VLP'lerle gösterilen aksine, hem HPV 16 hem de HPV 33 PsV bağlanması GAG moleküllerinin farklı bir dizisinde gerçekleşir. Bu, ya VLP'ler ve PsV'ler arasında bir farklılığı veya HPV tipleri arasında bir farklılığı göstermiştir. Heparan sülfat proteoglikan (HSPG)'a ilk bağlanmanın tüm PV'ler için evrensel bir adım olduğu ileri sürülmesine rağmen, dokudan elde edilen HPV 31 NV ve HPV 16 NV'lerin HSPG'lerin yokluğunda insan keratinositlerine bağlandığı ve enfeksiyonunun meydana geldiği gösterilmiştir. HaCaT hücreleri, n-TERT-1 hücreleri ve primer keratinositlerin HPV31 NV ile enfeksiyonu eksojen heparin rekabetiyle ve hücre yüzeyindeki HS'nin enzimatik olarak kaldırılmasıyla bloke edilememiştir. Buna karşılık, COS-7 hücreleri ve transforme C33A hücrelerinin enfeksiyonu her iki yöntem ile etkili bir şekilde bloke edilmiştir. Bu veriler, bir virusun hücre tipine bağlı olarak konak hücre içine girmek için birden fazla reseptörü ve/veya giriş yolunu kullanabildiğini göstermektedir. HPV 31 için farklı bulguların gözlemlendiği ilginçtir ki, HPV 31 NV'nin bağlanma için HSPG'ye bağımlı olmadığı ve HPV 31 PsV'nin ise hücrelere bağlanmak için HS bağımlı olduğu gösterilmiştir. Diğer bir çalışma ise hücre yüzeyinde non-HSPG molekül olan laminin-332 bulunması durumunda hem HPV 16 PsV hem de HPV 31 PsV'nin hücreye bağlanma ve enfeksiyon oluşturmaları için HSPG'lerden bağımsız olduğunu ileri sürmüştür. Bu çelişkili bulgular çalışılan HPV tipi, olgunlaşma ve montajdaki farklılıklara bağlı olarak NV ve PsV arasındaki muhtemel yapısal varyasyon ve kullanılan hücre tiplerine bağlı olabilir⁴³.

Farklı virus tipleri arasındaki küçük yapısal farklılıklar sebebiyle ekstraselüler matriks ve hücre yüzeyine bağlanma ve etkileşimin HPV tip spesifik olabilmesi mümkündür. L1 proteini tam sekans homolojisi ve yapısal konformasyon göstermesine rağmen, pentamerin yüzeyindeki halka (loop) yapılarında hem yapısal çeşitlilikler hem de farklılıklar HPV 11, 16, 18 ve 35 tipleri için gözlenmiştir. ECM ve hücre yüzeyine dört farklı HPV tipi için VLP bağlanmasını araştıran bir çalışmada, bazı farklılıklar ortaya konmuştur. Doğal virion ve PsV'ler kullanılarak yapılan iki çalışmada ECM ve hücre yüzeyine bağlanmada HPV tip bağımlı farklılıklar bulunmuştur. Farklı HPV tiplerinin

çok az değişen yapıları spesifik bir GAG/GAG modifikasyonuna, laminin-332 veya diğer tanımlanamamış reseptörlere virusun bağlanmasını kolaylaştırabilir ve sonraki hücreye girişi uyarabilir. Yakın ilişkili polyomaviruslar için, farklı tiplerin enfeksiyon için farklı reseptörleri kullandığı gösterilmiştir. Bu yüzden, hücrelere bağlanma için tüm HPV tiplerini kapsayan genel bir hipotez mümkün değildir.

HPV'nin hücreye giriş süreci, hücre yüzeyindeki birçok reseptörlerle etkileşim ve konformasyonel değişiklikler sebebiyle yavaştır. HPV 16 PsV ve HPV 18 PsV enfeksiyonunun HaCaT hücrelerinde ortalama giriş yarılanma süresinin 12 saatte gerçekleştiği bildirilmiştir. Benzer şekilde, HPV 31 NV'nin yanı sıra HPV 31 QV için bu sürenin yaklaşık 14 saatle yavaş olduğu tespit edilmiştir. Aksine, HPV 16 QV'nin HaCaT hücrelerinde ortalama giriş yarılanma süresi 4 saat ile daha hızlıdır. Bu veriler HPV enfeksiyonlarındaki farklılıkların hem HPV tipine hem de kullanılan sistemin modeline bağımlı olduğunu göstermiştir. Birçok rapor, hücre yüzeyindeki HSPG'lere bağlanma sonrası, HPV 16 PsV partiküllerinin internalizasyon için bir veya daha fazla non-HSPG reseptörleri ile etkileşime ihtiyacı olduğunu ileri sürmektedir. Bağlanma sonrasında, ilk olarak hücre yüzeyinde HSPG'ler ile kapsidlerin ko-lokalizasyonu gerçekleşir. Ancak, bu ko-lokalizasyon partiküller hücre içi veziküller içerisine alındığında kaybolur ki bu, partiküllerin bir non-HSPG reseptörü ile transfer edildiğini gösterir. Diğer reseptörlerin varlığına güçlü bir kanıt ise, furin ile önceden ayrıştırılmış virionların HSPG negatif hücrelere bağlanabilmesi ve enfekte edebilmesidir. Endositoz için biyokimyasal inhibitörler kullanıldığında, HPV 16 PsV ve HPV 58 PsV'nin COS-7 hücrelerine klatrin aracılı endositoz yoluyla girdiği, oysa HPV 31 PsV'nin penetrasyonunun kaveola bağımlı olduğu ileri sürülmüştür. Ancak yapılan bir çalışmada farklı olarak HPV 31 PsV'nin hem COS-7 hem de 293TT hücrelerinde klatrin aracılı endositozu kullandığı bildirilmiştir. QV (quasivirion) kullanımıyla, kaveola aracılı giriş HPV 31 için gösterilmiştir ve HPV 16 QV girişine klatrin kaplı ceplerin aracılık ettiği öne sürülmüştür. HPV 16 PsV enfeksiyonunda da kaveolin-1 aracılı girişin ardından, partiküller ER'ye gider. Başka bir sistemde bu kez, dominant negatif inhibitörler ve siRNA yıkımının kullanılmasıyla HeLa, 293TT ve HaCaT hücrelerinde HPV 16, HPV 18 ve HPV 31 PsV'lerin giriş yolunun "makropinositozdan farklı olarak klatrin, kaveolin, lipid raft, flotillin, kolesterol ve dynamin bağımsız mekanizma" ile olduğu açıklanmıştır. Yolak, bütün partiküllerin geç endozomlara gidişinde aktin

polimerizasyonu ve tetraspanin mikrodomanlerinin gerekli olmasıyla tanımlanmıştır. Birçok HPV tiplerinin çalışılması, kullanılan hücre tipi ve ayrıca deneysel yaklaşım dikkate alındığında, HPV girişinde rol alan birçok yol tanınmıştır. Çok sayıda farklı HPV tipi, virus tropizmi ve birçok HPV ilişkili hastalık olduğu dikkate alındığında ise farklı HPV tiplerinin hücre tipine bağlı olarak giriş yolunu değiştirebilen benzer veya benzer olmayan reseptörler vardır. Bağlanma deneyleri rekombinant partiküller kullanarak gerçekleştirildiğinde, sıklıkla her hücreyi enfekte eden ortalama virus sayısının yüksek olması sebebiyle (yüksek “multiplicity of infection; MOI”, genellikle binlerce) partiküller normalde tipik olarak kullanılmayan yollar aracılığıyla hücre içine girebilir. Buna karşın, doğal virionlarla çalışmalarda genellikle 100'den daha az MOI kullanılır. Keratinosit hücre dizilerinin yanı sıra primer keratinositlerde PsV, QV ve NV kullanılarak çeşitli HPV tiplerinin daha detaylı bir analizi hem benzerlikleri gösterir hem de tipler arasındaki farklılıkları vurgular ve literatürde çelişkili verilerin artmasına yol açar⁴⁴.

Günümüze kadar, potansiyel primer ve sekonder HPV internalizasyon reseptörleri olarak birçok reseptör tanımlanmıştır. İlk tanımlananlardan biri, epitelyal adezyon proteini $\alpha 6$ -integrin'dir. $\alpha 6$ -integrin spesifik monoklonal antikoru, HPV 6b L1 VLP'nin hücre yüzeyine bağlanmasını %60 kadar bloke edebilir. İlaveten, 10 farklı hücre dizisinin kullanıldığı bir çalışmada HPV 16 L1 VLP'nin bağlanması $\alpha 6$ -integrin ile ilişkilidir. Buna karşılık, $\alpha 6$ -integrin olmayan hücrelere HPV 16 L1 VLP bağlanabilir ve HPV 11 NV, $\alpha 6$ -integrin eksprese eden hücrelere benzer seviyelerde $\alpha 6$ -integrin negatif hücreleri enfekte eder. VLP'ler için bilinenin aksine, $\alpha 6$ -integrin ile birlikte $\beta 4$ -integrin'in HPV16 PsV ile HaCaT hücrelerinin enfeksiyonu için gerekli olduğu bulunmuştur. Tüm HPV tipleri için tamamen gerekli olmasa da, $\alpha 6$ -integrin enfeksiyon etkinliğini artırmada katkıda bulunabilir. $\alpha 6$ -integrin'e bağlanmayla aktifleşen özellikle Ras/MAPK ve PI3K hücre içi sinyal yolları hücresel proliferasyonunu artırarak enfeksiyonu desteklemede işlev görebilir. Büyüme faktörü reseptörleri (Growth factor receptor; GFR) kadar hem epidermal büyüme faktörü reseptörü (Epidermal growth factor receptor; EGFR) hem de keratinosit büyüme faktörü reseptörünün (Keratinocyte growth factor; KGFR) rolü olduğu bildirilmiştir. HPV-HSPG kompleksinin GFR'lere doğrudan bağlandığı ileri sürülmüştür. EGFR'nin bloke edilmesi hem HPV 16 PsV, HPV 31 PsV hem de HPV 31 QV ile HaCaT hücrelerinin

enfeksiyonunu inhibe etmesine rağmen EGFR'nin gerçek rolü henüz belirlenmemiştir. EGFR doğrudan hücreye girişe katılabilir veya sadece sinyal yolunun aktivasyonundan sorumlu olabilir. Diğer bir aday, hücre yüzeyi üzerinde eksprese edilen kalsiyum ve fosfolipid bağlayıcı bir protein olan Anneksin-A2'dir ki bu, S100A10 dimeri ile ilişkili iki Annexin-A2 monomerinden oluşan heterotetramerin (A2t) bir parçasıdır. Ko-immunopresipitasyon ile gösterildiği gibi, hem HPV 16 VLP'ler hem de HPV16 PsV'ler doğrudan A2t ile etkileşir. shRNA (small hairpin RNA) tarafından Anneksin-A2 yıkımı HPV 16 VLP'lerin hücreye girişinde ve HPV 16 PsV enfeksiyonunda önemli bir azalma sağlar. Ayrıca, A2t'ye bağlanma için önemli olduğu gösterilen L1'de bir bölgenin mutasyonunun HPV 16 PsV'nin bağlanmasını ve enfeksiyonunu azalttığı gösterilmiştir. HPV 16 PsV'nin Anneksin-A2 eksik HepG2 hücrelerini enfekte edebilmesi başka bir alternatif enfeksiyon yolunun kullanıldığını gösterir. HPV için giriş için reseptörlerinin keşfi önemli olmasına rağmen HPV tipi, viral sistem ve kullanılan hücre dizisinin dikkate alınması gerekir⁴⁵.

2.3.3. HPV'nin üretken (prodüktif) ve üretken olmayan (nonprodüktif) enfeksiyonu

Papillomavirus enfeksiyonları genellikle epitelyumda oluşan travma sonucu virus partikülleri bazal hücrelere veya kök hücrelerine girdiğinde meydana gelir. Her durumda, virionların ilk olarak HSPG'nin GAG zincirlerine bağlandığı ve virionda konformasyonel değişiklikleri uyarıp L2'nin amino ucunda furin/proproteaz için bir ayrışma bölgesinin ortaya çıkmasına sebep olduğu düşünülür. Genellikle virus girişinin henüz kesin olarak tanımlanmamış sekonder bir reseptörle etkileşimi gerektirdiği düşünülmektedir. En önemlisi, HPV 16 enfeksiyonunun murin (fare) serviko-vajinal modelde bu erken HSPG-bağımlı olayların hedef bazal hücrelerin yakınında ekstraselüler bazal membranda (BM) gerçekleştiği gösterilmiştir.

Papillomavirus ile enfeksiyondan sonra genom amplifikasyonunun ilk fazı gerçekleşir ve enfekte bazal hücrelerde epizomal viral DNA kopya sayısı düşük düzeyde devam ettirilir. Viral replikasyon proteinleri E1 ve E2'nin ilk amplifikasyon için gerekli olduğu düşünülmektedir, fakat E1, kopya sayısı bir kez 50-100'de sabitlendiğinde replikasyonun devamı için zorunlu olmayabilir. E2, genomun ayrışması, replikasyon ve viral gen ekspresyonunda rol alır. Deneysel sistemlerde in vitro viral

genom amplifikasyonu için gerekli olan E1, E2 ve hücrel DNA replikasyon proteinleri ile genom amplifikasyonu süresince viral kopya sayısında en az iki log'luk bir artış gösterilmiştir. Tavşanlarda prodüktif enfeksiyonlarda gösterildiği gibi genom amplifikasyonu in vivo enfeksiyon sırasında daha yüksek (4 log artış) olabilir. Viral hayat siklusunda E6 ve E7'nin temel görevi, öncelikle üst epitelyal tabakaları S fazına tekrar yönlendirerek viral genom amplifikasyonuna izin vermek için hücrel ortamı değiştirmektir. Genom amplifikasyonu diferansiyasyon tamamlanmadan önce enfekte hücrelerin S fazından G2-like fazına geçmesiyle meydana gelir. Yüksek riskli HPV tipleri ile enfeksiyonlarda, E6 ve E7'nin bazal ve parabazal tabakalarda da hücre çoğalmasını artırdığı görülmektedir. Buna karşın, düşük riskli HPV tipleri ile enfeksiyon durumunda (HPV 6, HPV 11 ve benign lezyonlara sebep olan diğer HPV tipleri) enfekte bazal hücrelerdeki bu proteinlerin kesin rolü belirsizdir. Aslında, E6 ve E7'deki fonksiyonel farklılıklar HPV tipleri arasında hastalık patojenitesinin majör belirleyicisi olarak gösterilir. Virus hayat siklusu boyunca, E5 proteini de epidermal büyüme faktörü (Epidermal Growth Factor; EGF) reseptörünü stabilize etmesi ve mitojen-aktif protein olan MAP'ın kinaz aktivitesini artırması sebebiyle viral amplifikasyona katkıda bulunur. E5 proteini ayrıca, hem hücre dışı sinyal düzenleyici kinaz 1/2'yi (extracellular signal-regulated kinase ERK 1/2; ERK 1/2) hem de EGF reseptöründen bağımsız olarak p38'i modüle eder. İlginç bir şekilde, E1'deki nükleer lokalizasyon ve eksport sinyalleri bu MAP kinazlar tarafından fosforillenir ve sonuçta genom amplifikasyonu için gerekli E1 proteinin nükleer lokalizasyonunu artırır. Epitelyumun üst tabakalarında, viral genomlar, majör (L1) ve minör (L2) virus kapsid proteinlerinden üretilen virus partikülleri içerisine paketlenir. Virus sentezini destekleyen hücrelerde çok yüksek seviyede biriken E4 proteini, virusun salınmasında primer fonksiyona sahiptir, fakat virus genom amplifikasyonunu optimize etmek için de çalışır. Yüksek riskli HPV tiplerinde, E4 proteini keratin yapıyı ve kornifiye membranın yapısını bozabilen amiloid fibriller oluşturur. Henüz kesin olarak tanımlanmamasına rağmen, E4 amiloid fibrilleri üst epitelyal tabakadan virionun salınmasına ve böylece enfektivite ve bulaşmaya katkıda bulunabilir.

Yüksek riskli HPV enfeksiyonları yaygın olmasına rağmen enfeksiyonların çoğu klinik belirti göstermeden konak tarafından temizlendiğinden servikal kanser nadiren ortaya çıkar. Anogenital siğillerin gerilemesi, hayvan modellerinde de görülen CD4+T

hücresi baskın olan Th1 cevabıyla birlikte oluşur. Genel olarak, HPV enfeksiyonlarında viral hayat siklusu tamamen intraepitelyal olduğundan, viremi olmadığından, hücre lizisi veya enflamasyon olmadığından HPV hem adaptif hem de doğal immun cevaptan kaçır. Persistent enfeksiyon sırasında, pro-enflamatuvar sitokinler salınmaz. Langerhans hücreleri ve dendritik hücrelerin aktivasyonu ve göçü için sinyaller genellikle bulunmamaktadır. Aslında, viral geç gen ekspresyonunu destekleyen ve viral proteinleri yüksek düzeyde barındıran hücreler epitelyum yüzeyinden dökülerek immun sistemden kaçır. Genelde, etkin bir immun cevabın gelişmesindeki başarısızlık persistent enfeksiyonla ve invaziv kansere doğru ilerleme ihtimalinin artmasıyla ilişkilidir^{46,47,48}.

2.4. HPV patogenezi

HPV, prodüktif hayat siklusunun tamamlanmadığı bölgelerde yüksek dereceli lezyonlar oluşturur ve bu enfeksiyonlar abortif enfeksiyonlar olarak adlandırılır. Yüksek dereceli lezyonlarda normal hücrelere göre daha uzun bir proliferatif faz vardır ve virus partiküllerinin üretilmesi desteklenmemekte veya az desteklenmektedir. Prodüktif lezyonların HSIL'a ilerlemesinde anahtar olay E6 ve E7 proteinlerinin ekspresyonunun deregülasyonu olabilir. Transformasyon zonu veya skuamokolumnar kavşak servikal kanser gelişimi için özellikle duyarlı bir bölgedir. HPV 16 gibi yüksek riskli HPV tiplerinin bu bölgede hayat siklusunu tamamlayamadığı ve bazen abortif enfeksiyonlara sebep olduğu kabul edilir. HSIL'dan kansere ilerleme genellikle E7 ekspresyonunun artmış olduğu viral genomun konak genomuna entegre olduğu lezyonlarda meydana gelir⁴⁹.

HR HPV enfeksiyonları genellikle 12-18 ay sürer ve sonunda bağışıklık sistemi tarafından temizlenir. Ancak, kadınların yaklaşık %10'unda HPV enfeksiyonu temizlenemez ve kalıcı (persistent) enfeksiyon gelişir. HR HPV ile persistent enfeksiyonun başlıca sonucu neoplastik lezyonların gelişimidir ve HR HPV ile persistent enfeksiyon servikal kanser gelişimi için en önemli risk faktörünü oluşturur. HPV enfeksiyonu olanların sadece %1'inden azında servikal kanser gelişir.

HPV enfeksiyonunun temizlenmesi ile sonuçlanan immun yanıt ile ilgili detaylar henüz tam bilinmemektedir. HPV temizlenmesi, aynı HPV tipi ile reenfeksiyona karşı uzun süreli koruyucu humoral ve/veya hücresel immunité ile sonuçlanır, koruyuculuğun

ömür boyu olup olmadığı bilinmemektedir. Duyarlı testler kullanılarak HPV artık tespit edilmediğinde "temizlenme" terimi kullanılmasına rağmen HPV tamamen temizlenemeyebilir, çünkü HPV'nin latent durumu hala az bilinmektedir. Hatta belirgin immunsupresyon yokken bile latensi halinden HPV'nin yeniden ortaya çıkması yaygındır, ancak çoğu vakalar büyük olasılıkla benigndir. Temizlenen HPV enfeksiyonlarının aksine persistent HPV enfeksiyonlarında kanser riski dramatik olarak artar.

Aynı HPV tipi ile yeniden enfeksiyon nadir olarak görülse de, persistent HPV enfeksiyonunu re-enfeksiyon sonrası oluşan persistent enfeksiyondan ayırt etmek zordur. Birçok çalışmada 4-6 ay arayla iki kez HPV tespit edilmişse HPV enfeksiyonu persistent olarak kabul edilir. Ancak, farklı bölgelerde yapılan çalışmalarda HPV testlerinin arasındaki süre değiştiğinden ve HPV'nin doğal seyri ile ilgili pek çok bilinmeyen olduğundan dolayı, kalıcı ve geçici enfeksiyonları ayırt etmek zordur. Ayrıca, saptanamayan bir HPV enfeksiyonu, konakta HPV düzeylerinin temizlenmiş olduğunu belirtmesinden ziyade, virusun latensi döneminde olduğunu gösterebilir, çünkü HPV DNA düzeyi mevcut HPV DNA testlerinin saptayabildiği eşik değerin altında olabilir.

Persistent HPV enfeksiyonu ve viral DNA'nın hücrenin genomuna entegrasyonu ile oluşturulan genomik instabilite yüksek dereceli ve malign lezyonların riskinin artmasına sebep olur. E6 ve E7, sentrozomal anormallikleri uyarır. Ayrıca, p53 ve pRB aile üyelerinin hedeflenmesi ile hücre döngüsü kontrol noktalarının iptali hücrelerde kromozomal anormalliklerinin birikmesine yol açar. Bu, uzun bir süre boyunca biriken genetik değişikliklerin genetik anormalliklerle sonuçlanmasıyla kanser gelişimine izin verir.

Benign ve malign HPV lezyonlarında hücresel proliferasyon, besin ve oksijen ihtiyacını artırır. Bu kısıtlamanın üstesinden gelmek için, hem HR HPV hem de LR HPV E7 proteinleri transkripsiyon faktörü olan Hypoxia-inducible factor-1'in (HIF-1) düzeyini artırır, aynı zamanda hipoksi ortamında HIF-1 hedef genlerin ekspresyonunun artışı uyarır. HIF-1 aktivitesinin artması anjiyogenezisi destekleyen bir grup transkripsiyon geninin artışıyla sonuçlanır ve anjiyogenezisin bu indüksiyonu HPV lezyonlarının persistensi ve büyümesi ile sonuçlanır^{50,51}.

Papillomavirus ilişkili hastalık gelişiminin yalnızca epitelyal bazal hücrenin enfeksiyonunu gerektirmediği, ayrıca daha spesifik bir şekilde çok katlı kutanöz veya mukozal yerlerde epitelyal doku kök hücrelerini gerektirdiği ileri sürülür. Genel olarak, papillomavirus ile ilişkili enfeksiyonlar yıllar boyu persiste eder. Epitelyal dokunun yenilenmesi, bazal tabakadaki kök hücre veya kök-benzeri hücrelerin proliferasyonu ile sağlanır ve sınırlı bir proliferatif kapasiteye sahip çoğalan geçiş hücreleri (transit amplifying; TA) oluşur ki daha sonra terminal olarak diferansiye hücrelere dönüşürler. Bir kez diferansiyasyon tamamlandığında, bu hücreler alt tabakalardaki yeni hücrelerin üretimi ile hücre yüzeyine doğru itilirler ve sonunda tamamen farklılaşmış skuamöz hücreler olarak epitelyum yüzeyinden dökülürler. Bu süreç papillomavirus enfeksiyonunun yaşam süresinden daha kısa bir zamanda meydana gelir. Böylece, papillomavirusların kök hücre-benzeri özelliği olan bazal hücreleri hedef aldığı veya yüksek riskli HPV'lerin enfekte ettikleri hücrelere bu tip özellikleri verdiği varsayılır. Papillomavirusların genellikle enfeksiyonun ardından epitelyal kök hücrede kaldığı fikri, latensi ve virusun latensiden reaktivasyonu ve papillomavirusların kökeninin yıllar önceye dayandığı bilgimizle uyumludur. Aslında, hayvan modellerindeki çalışmalarda CRPV'nin öncelikle epitelyal kök hücrelerinin bulunduğu saç kökünün "bulge" (çıkıntı) bölgesini hedeflediği ve servikal neoplazide ise uzun süre epitelyal "rezerv hücrelerin" servikal hastalığın kaynaklandığı hedef hücreler olduğu kabul edilmiştir, ancak halen tartışmalıdır.⁵²

Epitelyal doku epidermis, dermis ve subepidermal doku olmak üzere üç tabakadan oluşur. Epidermis birçok keratinosit tabakadan oluşur ve papillomavirusların hedefidir. İlaveten, cilt; kıl kökleri, yağ bezleri, ekren ve apokrin ter bezleri, parmak ve ayak tırnaklarının yanı sıra içeriye uzanan (inter-appendageal) epidermisi içerir. Bazı epitelyal bölgeler ağız boşluğunun tükürük bezleri ve orofarinksin bademcik kripti gibi ek yapılar içerir. Papillomaviruslar için, bu özel yapılar özellikle duyarlı yerlerdir, çünkü genellikle epitelyum gibi iyi bir bariyer fonksiyonu yoktur. Çok tabakalı epitelyum ile kolumnar epitelyumun birleştiği bölge olan transformasyon zonu da yüksek riskli HPV ile ilişkili neoplazinin öncelikle geliştiği bölge olarak kabul edilir. Yüksek riskli HPV tiplerinin çoğu servikal transformasyon zonunda ortaya çıkan servikal kanserlerin (>%99) büyük bir çoğunluğu ile ilişkilidir. Anal kanserlerin %90'dan fazlası da anal transformasyon zonundan kaynaklanır. Özafagus ve mide

arasındaki sınır gibi, diğer anatomik yerlerdeki transformasyon bölgeleri de HPV ile ilişkili neoplaziye karşı duyarlı kabul edilebilir, fakat bu alanlarda enfeksiyon, lokasyondan dolayı nadiren meydana gelir. Servikste, transformasyon zonunda “rezerv hücre” olarak bilinen özel bir hücre tipi bulunur ve muhtemelen küboidal hücreler de skuamokolumnar kavşakta yerleşmiştir. Bu hücrelerin ekstraselüler ortama bağlı olarak endoserviksin kolumnar epitelyumunu veya transformasyon zonunun çok katlı epitelyumunu devam ettiren kök hücreleri olduğu ileri sürülür. Ayrıca, bu hücrelerin ektoserviksin çok katlı (stratifiye) epitelyumunun kaynağı olan klasik epitel kök hücreleriyle karşılaştırıldığında komşu epitel hücrelerden ve dermisten gelen sinyallere farklı şekilde yanıt verdiği düşünülmektedir. İlk olarak skuamokolumnar kavşakta servikal neoplazi gelişir, çünkü bu hücreler üretken bir enfeksiyondan ziyade üretken olmayan veya abortif enfeksiyonu destekler. Bu durumda, düzensiz viral gen ekspresyonu, üretken bir enfeksiyonu artık desteklemeyen enfekte hücrede genetik hataların birikmesini kolaylaştırır ve sonunda kanser gelişir. Servikal reserve hücreleri ile kıyaslandığında kutanöz epitelyal bölgelerde bulunan kök hücreleri, daha iyi karakterize edilmiştir ve saç folikülünün “bulge” bölgesinde bulunduğu bilinmektedir.

Kök hücreleri, hasarlı interfoliküler epidermisin onarımına aracılık edebilir, interfoliküler kök hücrelerinin bazen foliküler kök hücreleri tarafından düzenli olarak desteklendiği düşünülmektedir. Ancak, bir çalışma kıl köklerindeki kök hücrelerinin epidermal dengeye katkı sağlamadığını, fakat interfoliküler epidermal kök hücrelerinin varlığını göstermiştir. Bu fikir, farenin interfoliküler epidermisi ve maymunun avuç içi epidermisindeki bazal tabaka boyunca yerleşmiş yavaş siklusu olan farklı hücrelerin gözlenmesiyle desteklenmiştir. Buna karşılık, insan cildinde, in situ yaklaşımlar kullanarak yavaş sikluslu hücreleri belirlemedeki yetersizlik ve spesifik kök hücre markerlarının eksikliği sebebiyle interfoliküler epidermal kök hücrelerin tanısı ve lokasyonunun belirsizliği sürmektedir. Ekrin ter bezi kanalından kaynaklanan hücrelerin hasarlı epidermisi onarabildiği genellikle kabul edilmesine rağmen, epidermal kök hücrelerinin diğer bir lokasyonu olan ter bezlerine ilgi az olmuştur⁵³.

2.5. HPV enfeksiyonları ve hastalığın klinik belirtileri

2.5.1. Mukozal papillomavirus enfeksiyonları

Kondilom akuminatum: Genital bölgedeki HPV enfeksiyonun en yaygın klinik belirtilerinden biridir. Papüller, nodüler veya yumuşak, filiform, pembemsi, sapsız veya saplı olarak gelişim gösterir. Erkeklerde, genital kondilom yaygın olarak koronal sulkus, penis bezleri ve penil shaftında bulunur. Kadınlarda, lezyonlar genellikle dış genital bölgede ve serviksde gözlenir. Hastalık genellikle cinsel yolla bulaşır ve HPV 2, 16, 18, 30-33, 35, 39, 41-45, 51-56 ve 59 dahil olmak üzere diğer genotipler izole edilmesine rağmen, sıklıkla HPV 6 ve 11 gibi düşük riskli HPV'lerden kaynaklanır. Benign genital siğillere sebep olan HPV tipleri lokalizasyonları sebebiyle tedavisi zor olabilen oral bölgelerde papillomlara sebep olabilirler.

Fokal epitelyal hiperplazi: Çocuk ve kadınlarda daha yaygın görülen oral mukozanın HPV ile ilişkili nadir bir hastalığıdır. Lezyonlar çoğunlukla alt dudakta bulunur, ancak daha az sıklıkta üst dudak, dil, oral mukoza, orofarinks, damak ve ağız tabanını etkileyebilir. HPV 13 ve HPV 32 en yaygın etkenlerdir⁵⁴.

Servikal neoplazi ve servikal kanser: Prekanseroz servikal lezyonlar farklı derecelerde CIN1, 2 ve 3 olarak sınıflandırılır. CIN1 patolojisi, Bethesda sınıflandırma sisteminde kullanılan LSIL'a CIN2 ve CIN3 ise yüksek dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon olan HSIL'a eşdeğerdedir. Neoplazinin ciddiyeti bazal hücre benzeri hücrelerin (nükleer/sitoplazmik oranı yüksek olan az diferansiye hücreler), epitelyal yüzeye doğru ilerlemesi ve suprabazal hücrelerin bölünmesine göre değişir. Düşük dereceli lezyonların tipik olarak suprabazal hücre tabakalarında koilositlerin varlığıyla üretken viral enfeksiyonu göstermesi CIN1/LSIL'nin temel belirleyicisi olarak kabul edilmektedir. HPV servikal kansere ilerleyen sitolojik anormallikler ve displazi arasında değişen servikal anormalliklerin %90-100'ünde tespit edilir.

HPV DNA servikal kanser etiyolojisinde önemli bir rol oynar. Hindistan'da yapılan popülasyon bazlı bir çalışmada HR HPV tipleri PCR tabanlı Line Blot Assay kullanılarak, skuamöz hücreli karsinomaların (squamous cell carcinoma; SCC) %87.8'inde bulunmuştur ve HPV tipleri sırasıyla HPV 16 (%66.7), HPV 18 (%19.4), HPV 33 (%5.6), HPV 35 (%5.6), HPV 45 (%4.6), HPV 52 (%2.8), HPV 58 (%2.8), HPV 59 (%2.8) ve HPV 73 (%2.8) olarak tanımlanmıştır. HR HPV enfeksiyonu

CIN1'le sonuçlanmasına rağmen vakaların çoğunda spontan gerileme tespit edilmiştir. Ancak, yüksek viral yüklü HPV 16 ya da HPV 18 pozitif CIN daha uzun süre kalıcıdır ve sonunda CIN2/3'e ilerler. Bu bakımdan, HPV 16 viral yükünün HPV 18, 31 ve 33'ün yüklerine göre lezyonların kalıcılığı için daha güçlü bir belirleyici olduğu bildirilmiştir. Servikal neoplazinin ciddiyeti HPV 16 viral yüküyle ölçülebilir. Çalışmalar HPV 16 viral yükünün artan lezyon derecesiyle birlikte yükseldiğini göstermiştir. Viral genomik DNA'nın yükü, servikal kanser gelişmesi için risk altındakileri belirlemede HPV ile ilişkili potansiyel bir göstergedir. HPV yükünü belirlemek için kullanılan kantitatif real-time PCR testlerinin spesifik ve tekrarlanabilir olduğu gösterilmiştir.

HPV genotiplerinin tanısal değeri radyoterapiyle tedavi edilen servikal kanser hastalarında da çalışılmıştır. Sadece radyoterapi veya eş zamanlı kemoradyasyon tedavisi alan servikal kanserli 327 hastada HPV genotiplerinin önemi değerlendirilmiştir ki hastaların %98.8'inde tespit edilen 22 genotipten, en yaygın genotipler olarak HPV 16, 58, 18 ve 33 tespit edilmiştir. HPV 18 ve HPV 58 pozitif tümörlü hastaların kemoradyoterapi alanlarında önemli bir iyileşme bildirilmiştir. Bir diğer çalışmada, HPV 16 varlığı ve E2 geninin bütünlüğü radyasyon yanıtının bir göstergesi olarak değerlendirilmiştir. L1 bölgesi için spesifik primerler kullanılarak yapılan PCR ile HPV 16 varlığı değerlendirilmiş ve tüm E2 geninin çoğaltılmasıyla E2'nin bozulduğu tespit edilmiştir. HPV 16 E2 negatif tümörlerin artış göstermesi (%75), HPV 16 L1 (%20) ile karşılaştırıldığında ileri evre hastalıkta gözlenmiştir. Bozulmamış HPV 16 E2, radyoterapi alanlara kıyasla tedavi edilmeyen hastalarda daha sık gözlenmiştir. E2 bozulması, 50 Gy radyoterapi dozu alan hastaların %75'inde bildirilmiştir, bu sebeple viral DNA'nın durumu radyasyon tedavisinin optimizasyonu için yardımcı bir belirleyici olabilir⁵⁵.

Vulvar, vajinal, penil ve anal kanser gibi diğer anogenital kanserler: Vulvar kanserlerin çoğu (%92) sadece keratinize SCC'dir. HPV prevalansı vulvar intraepitelyal neoplazi ve bazaloid veya siğil kanserlerinde %90'dır, ancak keratinize skuamoz hücreli karsinoma'da sadece %6'dır. HPV 16 vulvar kanserde en baskın tip olup HPV 18, 21, 31, 33 ve 34 tipleri daha düşük oranlarda tespit edilir. Ayrıca HPV vajinal kanserlerin %85'inden sorumlu olup HPV 16 invaziv tümörlerin %60'ında bulunur. HPV penisin bazaloid ve siğilimsi kanserinde (warty cancer) de tespit edilir, ancak penisin keratinize SCC ve verrüköz kanserlerinde nadir olarak görülür. İnvaziv penil kanserinde HPV 16

en yaygın (%40-70) tiptir, bunu HPV 6 (%22), HPV 52 (%15) ve HPV 11 (%4) takip eder. HPV anal kanserin %80-96'sında bulunur ve en baskın tip HPV 16'dır.

Anal kanserlerin gelişiminde HPV'nin rolü iyi bilinmektedir. Ancak bu oldukça nadir kanserin sıklığındaki artış son birkaç on yılda bildirilmiştir. Anal kanser için yüksek risk eşcinsel erkeklerde, insan bağışıklık yetmezliği virusu (Human Immunodeficiency virus; HIV) pozitif hastalar gibi bağışıklık sistemi baskılanmış olanlarda ve anal siğil öyküsü olan kişilerde bildirilmiştir. Anal intraepitel neoplazi'nin (AIN) anal kanserin prekürsörü olduğu kanıtlanmıştır ve servikal kanserin aksine bu sonuç genellikle 5-10 yıllık takip süresi olan küçük çalışmalardan elde edilmiştir. AIN'in anal kansere ilerlemesini değerlendiren ve tedavinin sonuçlar üzerindeki etkisini inceleyen daha kapsamlı çalışmalar gerekmektedir.

HPV ilişkili diğer kanserlere benzer şekilde, vulvar kanserlerin insidansında da bir artış özellikle genç kadınlarda bildirilmiştir ve bu hastalarda servikal kanserlerin gelişimindeki benzer mekanizmalar belirlenmiştir. Sistemik bir incelemede vulvar intraepitelyal neoplaziden vulvar SCC'ye ilerleme oranının %3,3 olduğu bildirilmiştir⁵⁶.

Baş ve Boyun Kanseri: HPV baş ve boyun skuamoz hücreli kanserin (HNSCC; head and neck squamous cell cancer) gelişiminde majör risk faktörü olarak kabul edilmektedir. Bir meta-analiz çalışması, HNSCC'de HPV prevalansının 2000 yılında %41'den 2004 yılında %72'ye arttığını göstermiştir. HPV prevalansı oral kavitedeki kanserlerdekine göre orofarinks SCC'de önemli ölçüde daha yüksek olup diğer anatomik bölgelere göre de tonsillerde daha yüksek prevelanstadır. HPV ilişkili kanserler diğer HNSCC'lerden farklı klinik ve moleküler özellikler göstermektedir. HPV pozitif kanserli hastalarda 5 yıllık hayatta kalma oranı en az %50 olup yaklaşık %30 mutlak sağkalımla eşdeğerdedir. HNSCC'nin prognozunu değerlendirmede HPV'nin tespiti artık rutin tanısal prosedürün bir parçasıdır. HPV 16 HNSCC'de bulunan en yaygın tiptir, ancak HPV 18, 31, 33 ve 35 gibi başka HPV tipleri de tespit edilebilir.

HPV kaynaklı oral enfeksiyon orofaringeal kanserin bağımsız bir sebebi olarak kabul edilmektedir. Genel popülasyonda oral HPV'nin insidansı düşük (%4.5) bulunmasına rağmen, çalışmalar HPV ile ilişkili baş ve boyun kanserlerinin %95'inin HPV 16 ile ilişkili olduğunu göstermiştir. HPV ilişkili orofaringeal kanserler genellikle dilin tabanına yakın ve tonsillerde gelişir. Orofaringeal kanserlerin %42-63'ünde HPV

enfeksiyonu bulunmaktadır. HPV ile ilişkili orofaringeal kanserlerin yüksek insidansı cinsel partnerlerin sayısındaki artış ve genç popülasyon ile ilişkilidir. Kadınlara kıyasla erkeklerde 4 kat daha yüksek sıklıkta gözlenmiştir ve servikal kanserli hastaların cinsel partnerlerinde HPV ilişkili orofaringeal kanser gelişme riski daha yüksektir⁵⁷.

2.5.2.Kutanöz papillomavirus enfeksiyonları

Basit (yaygın) siğiller: Tek veya birden fazla ve farklı boyutlarda olabilir. Birçok alanda oluşur, ancak çocuklarda yaygın bir enfeksiyon yeri olan dizlerde ve genellikle el sırtında ortaya çıkabilir. Prevelans okul çağındaki çocuklarda %30 iken yetişkinlerde %3.5 olarak bildirilmiştir. İmmun sistemi baskılanmış hastalarda lezyonlar daha çok sayıda ve daha inatçı olup insidans artar. HPV 1, 2, 4, 27 ve 57 en yaygın tiplerdir. HPV 7, elleri mesleği sebebiyle kronik olarak nemli ve soğuk olan kişilerin basit siğillerinde bulunur.

Plantar siğiller: Özellikle çocuklarda ayak tabanında oluşur. HPV 1 ve 4 en sık etken olup HPV 57, 60, 63, 65 ve 66 tipleri de sebep olabilir. HPV 1 genellikle ağrılı, hiperkeratotik halkayla çevrili keratotik lezyonlara sebep olur. HPV 4 kaldırım taşı görünümünde daha çok yüzeysel lezyonlar olan mozaik siğillere sebep olabilir ve siğiller genellikle ağrısızdır. Kalıcı plantar lezyonlar çok nadiren verrüköz karsinom gelişimi ile ilişkili olabilir.

Düz siğiller: Düz, pürüzsüz veya hafif pürüzlü yüzeyi olan cilt rengine veya pigmentli biraz yüksek lezyonlardır. Yüz ve ellerin sırtı siğillerin en sık görüldüğü bölgeler olup bu lezyonlarda en yaygın tespit edilen tipler HPV 3 ve 10'dur.

İpliksi (filiform) siğiller: Cilt yüzeyinden dik veya eğik yönde çıkan saplı lezyonlardır. Yüz ve boyun hastalığının en sık görüldüğü yerlerdir. Basit (yaygın) siğillerde bulunan aynı HPV tipleri ve özellikle HPV 2 tespit edilmiştir.

Pigmentli siğiller: Siyahımsı kahverengi ve gri arasında değişir. Eller, ayaklar, el ve ayak parmakların palmoplantar veya lateral yüzeylerinde yer almaktadır. Bu tür lezyonlarda en yaygın HPV tipleri HPV 4, 60 ve 65'tir.

Epidermoid kistler: HPV tip 57 ve 60 sıklıkla plantar epidermoid kistlerde tespit edilir. Bilinmeyen bir HPV tipi gövde ve kafa derisinin epidermoid kistlerinde bildirilmiştir. Bu tip lezyonların dermal ektrin kanalla ilişkili olandan farklı olduğu, ancak epidermisin suprabazal hücrelerine benzediği ileri sürülmektedir. Palmoplantar

epidermoid kistlerin bazı durumlarda HPV enfeksiyonu sonrası ektrin kanalların epidermoid metaplazisinin bir sonucu olarak ortaya çıkabildiği ileri sürülmüştür⁵⁸.

Cilt kanseri: Bowen hastalığı (Bowen disease; BD) deride oluşan SCC'dir. Olguların %3-5'inde ise invaziv karsinomaya ilerleyebilen metastaz gelişebilir. Mukozal HPV tipleri genellikle ekstrasjenital BD'nin lezyonlarında, sıklıkla periungual bölgede tespit edilir. HPV 2, 6, 11, 54, 58, 61, 62 ve 73'ü içeren diğer HPV tipleri de nadiren BD'de bulunmuştur.

HPV ile non-melanom cilt kanseri, SCC ve bazal hücreli karsinoma (basal cell carcinoma; BCC) arasındaki ilişki, immunsuprese kişiler ve bazı genetik duyarlılığı olanlar dışında net değildir. Özellikle HPV 16 gibi mukozal HPV tipleri, bazen deri SCC ve BCC'de tespit edilebilir, buna karşılık HPV 2, 31, 34, 35, 58, 61 ve 73 daha nadir gözlenir. Beta HPV proteinin fonksiyonu, moleküler analizi ve serolojisi immunsuprese kişilerde SCC'nin gelişiminde belirli Beta HPV tiplerinin (HPV 8, 20, 38 gibi) rolünü göstermiştir^{58,59}.

2.6. HPV'nin laboratuvar tanısı

Son 30 yılda, servikal kanser insidansı ulusal servikal kanser tarama programlarının girişiyle özellikle gelişmekte olan ülkelerde sürekli olarak azalmıştır. Buna karşılık, tarama programlarının yapılmadığı ülkelerde ise servikal kanser kadınlarda birinci ya da ikinci kanser olmaya devam etmektedir. Konvensiyonel Pap smear veya sıvı bazlı sitolojik metotlar servikal kanser taraması için en sık kullanılan yaklaşımlardır ve servikal eksfoliyasyon hücrelerinin morfolojik analizine dayanır. Bu tarama yöntemlerinin performansı özellikle personel eğitimine bağlıdır. Pap testinin henüz uygun bir şekilde uygulanmadığı ülkelerde bu tip tarama metodları sıklıkla yanlış tanıya sebep olur. Bağımsız çalışmalar, birincil tarama olarak kullanılan HPV DNA testinin geleneksel Pap smear veya sıvı bazlı sitolojik metotlara göre preinvaziv hastalık tespiti için daha yüksek duyarlılığa ve negatif prediktif değere sahip olduğunu göstermiştir. HPV testi, Pap testiyle kıyaslandığında yaklaşık %50 daha fazla servikal intraepitelyal neoplaziyi tespit edebilir. Buna ek olarak, Hindistan'da yapılan bir çalışma hayatta bir kez HPV DNA testinin kullanılmasıyla invaziv servikal kanserden ölümlerin yaklaşık %50 azaldığını göstermiştir. HPV ve sitoloji testinin birlikte kullanımı ile negatif prediktif değer çok yüksektir ve özellikle servikal kanser taramasında maliyet etkin

olduğu tespit edilmiştir. Klinik ve epidemiyolojik çalışmalarda daha yaygın olarak kullanılan bir HPV genotipleme yöntemi, PCR tabanlı olmayan ticari sıvı hibridizasyon deneyi Hybrid Capture 2 (HC2)'dir (Digene) ve 13 yüksek riskli HPV tipini (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 ve 68) ve 5 düşük riskli HPV tipini (6, 11, 42, 43 ve 44) tespit edebilir. Ancak bu yöntem HPV tipini belirlemeden sadece HPV enfeksiyon varlığını tespit edebilir. Servikal örneklerde HPV tiplerinin tanısı için LINEAR ARRAY HPV genotipleme (Roche Molecular Diagnostics) testi ve INNO-LIPA HPV genotipleme (Innogenetics) testi gibi farklı ticari testler geliştirilmiştir. Bütün HPV tanı testlerinin dezavantajı düşük pozitif prediktif değer vermesidir, morfolojik değişiklikleri olan ve olmayan HPV pozitif enfeksiyonların ayırıcı tanısı yapılamaz. HPV enfeksiyonları, özellikle genç kadınlarda sıklıkla bulunabilir, buna karşılık vakaların çoğunluğunda bu enfeksiyonlar kalıcı değildir ve lezyonlara sebep olmadan immün sistem tarafından temizlenir.

HPV tanı testlerinin düşük pozitif prediktif değer vermesinden dolayı, HPV pozitif verilerin yorumlanması belirli bir dikkat ve ileri analiz gerektirir. HPV tanı testlerinin pozitif prediktif değerinin artması için ilave testlerin yapılması gerekir. Birçok çalışma viral yük, HPV transkriptleri ve/veya spesifik konak genlerinin analizinin servikal lezyonlarla ilişkili HPV enfeksiyonlarının tanısını kolaylaştıracağını ileri sürmüştür. Ancak ilk bulguların doğrulanması ve rutin klinik uygulamada kullanıma uygun stratejiler geliştirmek için ilave çalışmalar gereklidir^{60,61}.

Aşırı eksprese edilen p16^{INK4a} HPV ile indüklenmiş hücre transformasyonunun bir biyomarkerı olarak tanımlanmıştır. Özellikle HPV pozitif servikal kanser lezyonlarında, CIN1 ve enfekte olmamış dokuya kıyasla, CIN2/3'ün servikal biyopsisinde SUMO konjugasyon enzimi Ubc9 önemli bir artış gösterir.

Servikal karsinomalarda birçok genomik değişikliklerin daha önce bilinmeyen somatik mutasyonlara bağlı olması, yeni terapötik stratejiler ve/veya biyomarkerların yakın gelecekte bu hastalığın patogenezinde ve/veya tedavisinde kullanılabileceğini gösterir⁶².

2.6.1.Hedef amplifikasyon teknikleri

Hedef amplifikasyon tekniği, hedeflenen bir gen sekansına ait DNA fragmanlarının çoğaltılmasına dayanır.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase chain reaction): En önemli yöntem polimeraz zincir reaksiyonu olup viral kapsid L1 genini hedefleyen primerler kullanılır. Yaygın olarak kullanılan L1 primerleri PGMY09/11, GP5⁺/6⁺ ve SPF 10'dur. Bunu, tip spesifik DNA sekansını hedefleyen HPV genotipinin amplifikasyonu için yapılan tip spesifik polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) reaksiyonu izler. HPV'nin farklı tipleri tespit edilebilir.

Amplicor Human papillomavirus testi (Roche Diagnostics, Germany): Bu yöntem PCR tabanlıdır ve 13 yüksek riskli HPV tipini tespit edebilir. Bu sistem, DNA amplifikasyonuna ve ardından nükleik asit hibridizasyonuna dayanır.

Linear array human papillomavirus genotipleme testi (Roche Diagnostics, Germany): Bu yöntem 37 yüksek ve düşük riskli HPV genotipinin tespiti için kalitatif bir testtir. Böylece, bu testin hasta örneklerinin %35'inde görülen multiple (çoklu) enfeksiyonları tespit etme özelliği vardır.

PapilloCheck (Greiner Bio-One, Germany) : Bu test 24 HPV tipinin kalitatif tespiti için in vitro diagnostik test olarak Avrupa'da onaylanmıştır. PapilloCheck, 18 yüksek risk ve 6 düşük riskli HPV tiplerinin hepsini %98'lik bir duyarlılıkla tespit edebilir.

Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Real-time polymerase chain reaction): Bu teknik, HPV viral yükünü ölçmeye yardımcıdır. HPV 16 viral yük ve servikal displazi arasında bir ilişki bulunmuştur. Buna karşılık, birkaç çalışma başlangıçta bulunan düşük virus yükünün radyoterapi ile tedavi edilen servikal kanserli hastalarda kötü prognoza sebep olduğunu göstermiştir⁶³.

APTIMA Human papillomavirus testi (Hologic, USA): Bu test servikal kanser taramasında gelecek nesil testi olarak kabul edilebilir. Yanlış pozitifliği en aza indirir ve hastaları kolposkopiye yönlendirmede klinisyenlere yardımcı olur. İntraepitelyal lezyon veya malignitenin olmaması ve APTIMA HPV RNA testinin negatif olması durumunda, bu test hibrit yakalama (hybrid capture) testi ile karşılaştırıldığında %24 daha az yalancı pozitif sonuçlar vermiştir. Bu test, Pap testi için rutin olarak kullanılan thin prep sıvı sitoloji örnekleriyle yapılır ve DNA tespit eden diğer HPV testlerinin aksine karsinogenezisle ilişkili viral onkogen E6 ve E7 mRNA tespitine dayanır. Fransa, Paris'te yapılan bir çalışmada 5006 kadında CIN3'lü grupta APTIMA HPV testinin duyarlılık ve özgüllüğü sırasıyla %95.7 ve %90.3 iken sıvı bazlı sitoloji testinin %73.3

ve %90.8 ve hibrit yakalama 2 (HC2; Hybrib Capture2) testinin %95.3 ve %84.9 olduğu bildirilmiştir^{50,64}.

2.6.2.Sinyal amplifikasyon teknikleri

Bu teknik DNA sinyalini saptanabilir düzeye çıkartmak için DNA teknolojisini veya hibrid yakalamayı kullanır.

Hibrid yakalama 2 (Hybrid capture 2; HC2) (Qiagen, USA) testi: Bu test uzun sentetik RNA problemlerinin HPV DNA ile bir çözeltide hibridizasyonuna dayanır ve 13 yüksek riskli HPV (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 ve 68) ve 5 düşük riskli HPV (6, 11, 42, 43 ve 44) tipini tespit edebilir.

Cervista (Hologic, USA): Gıda ve İlaç Dairesi'nin (Food and Drug Administration; FDA) onayladığı ilk genotipleme testi olup 14 yüksek riskli HPV tipini tespit edebilir. Bu teknik, iki simultane izotermal reaksiyonu kullanan sinyal amplifikasyon tekniğini içerir. Güvenilir sonuçlar için yeterli DNA varlığını belirlediğinden hibrit yakalama testine göre daha avantajlıdır.

Genital HPV tiplerini tespit etmede PCR ve HC2 testleri yaygın olarak kullanılır. Ancak, gelişmekte olan ülkelerde bu testlerin tarama amaçlı yaygın kullanımı sınırlıdır^{50,65}.

Pyrosequencing Metodu (Diatech Pharmacogenetics, Italy): PCR reaksiyonundaki forward primerler biyotinli olup sentezlenen biyotinli amplifikasyon ürünleri streptavidin ile kaplı sefaroz boncuklara bağlanarak tek sarmallı DNA ayrıştırılır. Tek sarmallı DNA'nın sentezi için gerekli olan deoksiniükleotid monofosfat (dNMP) ortama deoksiniükleotid trifosfat (dNTP) şeklinde konur. Bir fosfatlı nükleotit (dNMP) DNA polimeraz enzimi yardımıyla DNA sentezinde kullanılırken pirofosfat denilen iki fosfatlı yapı açığa çıkar. Pyrosequencing testinin amacı açığa çıkan pirofosfatın luminesans deneyiyle tespit edilmesidir.

Sentez sırasında ortama salınan pirofosfat, sülfirilaz enzimi ve adenozin 5' fosfosülfat yardımıyla ATP'ye çevrilir. ATP, lusiferini lusiferaz enzimi yardımıyla okside edip oksilusiferin'e çevirir. Böylece oksilusiferin enerji vererek ortama görünür ışık yayar. Bu reaksiyonla oluşan ışık kamerada okunur ve pik olarak belirir. Ortama salınan bir nükleotid reaksiyona girmişse cihazda bir pik oluşur. Eğer iki nükleotid reaksiyona girmişse iki pik üst üste binerek yüksek bir pik oluşturur. Reaksiyona

girmeyen ATP'ler ve nükleotitler apiraz enzimi yardımıyla yıkılır. Nükleotid trifosfatlar, apiraz enzimi ile önce nükleotid difosfata sonra da nükleotid monofosfata dönüştürülür. Ayrıca reaksiyona girmeyen ATP yine apiraz ile adenozin difosfat ve adenozin monofosfata çevrilir⁶⁶.

2.7. HPV epidemiyolojisi

HPV cinsel yolla bulaşan en yaygın viruslardan biridir. Kadınların en az %75'i cinsel yaşamlarında genital HPV enfeksiyonuna yakalanır. Bir meta-analiz araştırmasında normal sitolojili 157.879 kadında onkojenik HPV prevalansının %10 kadar yüksek olduğunu bildirilmiştir ki böylece bütün dünyada yaklaşık 600 milyon kişinin enfekte olduğu tahmin edilebilir.

HPV servikal kanserin major sebebidir. HPV enfeksiyonu servikal kanser için gerekli, fakat tek başına yeterli bir sebep değildir. Bütün dünyada her yıl yaklaşık olarak 530.000 servikal kanser vakası tanınmaktadır (yaklaşık 270.000 ölüm) ve çoğu (vakaların %86'sı ve ölümlerin %88'i) gelişmekte olan ülkelerde görülür. Anal kanserlerinin yaklaşık % 90'ı ve diğer kanserlerin de (orofaringeal, penil, vajinal, vulvar) daha az bir oranı (<%50) HPV'ye bağlıdır. Global kanser insidansının yaklaşık %4.8'i (2008'de) HPV enfeksiyonlarına bağlıdır, ancak coğrafik bölgeye göre önemli farklılıklar bulunmuştur. HPV'ye bağlı kanserlerin büyük çoğunluğu (%85-90) servikal kanserdir ki 2012 yılında kadınlar arasında dünyada en yaygın dördüncü kanser olarak bildirilmiştir. Servikal kanser vakalarının yaklaşık %84'ü (445.000 vaka) daha az gelişmiş bölgelerde (özellikle Sahra Altı Afrika, Asya ve Güney/Orta Amerika) görülmektedir. Etkin tarama programlarının uygulandığı ülkelerde servikal kanser insidansında azalmalar gözlenmiştir. Bununla birlikte, örneğin Doğu Avrupa'da, muhtemelen HPV enfeksiyonuna artan maruziyetin ve sınırlı taramanın bir sonucu olarak servikal kanser insidansında artış eğilimleri gözlenmiştir. Sahra Altı Afrika ülkeleri de (Uganda, Zimbabwe) dahil olmak üzere gelişmekte olan ülkelerde benzer şekilde yükselen oranlar görülmüştür. Serviks dışındaki HPV ile ilişkili diğer kanserler için insidans ve mortalite oranları düşüktür, ancak bazı popülasyonlarda anal ve orofaringeal kanserlerde yakın zamanda artışlar rapor edilmiştir.

Anagonital mukozayı enfekte eden 40 HPV tipinden yaklaşık 15 tipi onkojeniktir. HPV 16 ve HPV 18 servikal kanser vakalarının %70'inden ve özellikle

diğer kanserlerin büyük bir kısmından ise HPV 16 sorumludur. Bu sebeple, bu genotipleri hedef alan profilaktik aşılamanın, servikal kanser yükü ve diğer HPV ile ilişkili kanserler üzerinde önemli bir etkiye sahip olması beklenmektedir. Son 50 yılda, Papanicolaou (Pap) sitoloji testinin düzenli uygulanması gelişmiş ülkelerin çoğunda servikal kanserde büyük bir düşüşe (yaklaşık %70) sebep olmuştur. Bununla birlikte, kaynak yetersizliği veya yetersiz altyapı sebebiyle birçok ülke tarama yoluyla servikal kanser mortalitesini azaltmada başarısız olmuştur. HPV DNA testi son zamanlarda birincil tarama için Pap sitolojisinin yerini almıştır. İnsan hatasına daha az eğilimli ve yüksek dereceli servikal lezyonların saptanmasında Pap testinden daha duyarlıdır. Ulusal aşı programlarına sahip ülkeler için HPV testi, uzun vadeli aşı etkinliğini izlemek için düşük maliyetli bir strateji olarak da hizmet edebilir. İyi organize edilmiş aşılama ve tarama programlarının tanıtımı tüm ülkeler için öncelik olmalıdır. Tarama programlarında HPV aşısı ve HPV tabanlı testlerin kombine kullanımı servikal kanserin azalmasını hızlandırarak HPV ile ilgili hastalıkların yükünü azaltacaktır^{67,68}.

HPV ayrıca genital siğiller, deride yaygın siğiller, oral ve faringeal papilloma ve laringeal papillomatosis gibi benign hastalıklarla da ilişkilidir.

2.8. HPV enfeksiyonlarından korunma

Cinsel olarak aktif bireyler için mevcut HPV'den korunma yöntemleri sınırlıdır. Bu kısmen HPV enfeksiyonunun belirti ve semptomlarının eksikliğinden ve halkta HPV enfeksiyonunun yayılımı hakkında genel bilgi eksikliğinden kaynaklanmaktadır. HPV cinsel ilişki sırasında derinin deriye teması ile epitelyumda oluşan mikrotravmalar sonucu oluşan mikroyarıklardan bulaşır. HPV prezervatifin kapladığı alan dışında da bulunabildiğinden prezervatif kullanımı kısmen koruyucudur.

HPV enfeksiyonundan sonra servikal kanserin uzun sürede (10-15 yıl) gelişmesi ve böylece prekanseröz lezyonların sitolojik tarama testi olan Pap testi ve HPV DNA testi ile erken tanısı ve tedavisi ile servikal kanser büyük oranda (>%90) önlenabilir bir hastalıktır. Son 10 yılda da HPV'ye karşı konağın immun cevabı hakkında kazanılan bilgiler etkili profilaktik aşılamanın gelişmesini sağlamıştır. Terapötik HPV aşısı ise araştırma aşamasındadır⁶⁹.

2.8.1.Birincil korunma

Aşı, enfeksiyon riskini azaltmak ve hastalığa sebep olan ajanların (HPV) prevelansını en aza indirmek için yaygın olarak kullanılan halk sağlığı stratejilerinden biridir. Hemen hemen tüm servikal kanser vakaları (%99.7) human papillomavirus'dan kaynaklanır, özellikle HPV tip 16 ve 18 tüm prekanseröz servikal lezyonların ve servikal kanserlerin %70'ine sebep olur. HPV en yaygın cinsel yolla bulaşan enfeksiyonlardan biridir, cinsel olarak aktif insanların %75'e varan kadarının hayatları boyunca bir kez enfekte olduğu tahmin edilmektedir. İki aşı kullanım için onaylanmıştır. GlaxoSmithKline tarafından üretilen Cervarix adlı bivalan aşı HPV tip 16 ve 18'e karşı korur. Merck tarafından pazarlanan tetravalan (4vHPV) bir aşı olan Gardasil HPV tip 16 ve 18 ve ayrıca genital siğillerin %90'ına sebep olan tip 6 ve 11'e karşı korur. Bu iki HPV aşısı, adjuvanların niteliğiyle farklıdır; Cervarix alüminyum hidroksit ve monofosforil lipid A (MPL) içerirken, Gardasil adjuvan amorf alüminyum hidroksifosfat sülfat ile formüle edilir⁷⁰.

HPV aşıları nötralize edici antikor üretimini uyarak enfeksiyonu önlemektedir. Ancak, bu aşılar diğer yüksek riskli HPV tiplerine karşı etkin bir şekilde koruyucu değildir. Bu sebeple, 2014 yılı sonunda lisans alan diğer bir HPV aşısı Gardasil 9 denilen 9 valanlı aşı (9vHPV) HPV 6, 11, 16 ve 18'in yanı sıra 5 HPV tipini (31, 33, 45, 52 ve 58) hedefler. HPV aşısının 2006 yılının ortalarından itibaren ABD'de (Amerika Birleşik Devletleri) kadınlarda ve 2011 yılından bu yana erkeklerde kullanılması tavsiye edilmiştir; 2014 yılına kadar kullanılan hemen hemen tüm aşılar 4vHPV aşısıdır.

HPV enfeksiyonu genellikle cinsel aktivite başladıktan kısa bir süre sonra ortaya çıktığından, aşılama kampanyaları ilk cinsel deneyim öncesinde 9-13 yaşındaki gençleri hedef almalıdır. İlk cinsel aktivitenin başlamasından 2 yıl içinde kadınların genellikle %35'inden fazlası enfekte olur. Aşılar altı ay boyunca üç tam doz verildiğinde aşısındaki HPV tipinin sebep olduğu HPV enfeksiyonunu önlemede %95'in üzerinde etkilidir. DSÖ (Dünya Sağlık Örgütü, World Healthy Organization; WHO) 2014 yılından bu yana 9-13 yaş (kuadrivalan aşı) veya 9-14 yaşlarındaki (bivalan aşı) kız ve erkek çocuklarda iki doz aşı rejimini (0-6. ay) önermektedir^{71,72}.

DSÖ ulusal immunizasyon programlarına HPV aşısının eklenmesini tavsiye etmektedir. Ne yazık ki, HPV aşısı birçok Afrika ülkesinde henüz kullanılmamaktadır. HPV aşısı dünyada 194 ülkeden 67'sinde (%34.5) ulusal immunizasyon programına

girmiştir. Bu ülkelerin çoğunluğu yüksek gelirli ülkeler olmakla birlikte, Ruanda, Güney Afrika, Lesoto ve Uganda dahil olmak üzere Afrika'nın orta gelirli ülkelerinde de ulusal HPV aşılması uygulanmaktadır. Küresel Aşı ve Aşılama Birliği olan GAVI (Global Alliance for Vaccines and Immunizations) 2013'te ilk Kenya'da HPV aşısının uygulanması için destek vermeye başlamıştır ve 2015 yılının sonuna kadar 19 ülkede öncelikle Sahra Altı Afrika'da HPV aşısını tanııtma projelerini desteklemiştir. Ancak, aşı güvenliği ile ilgili kaygılar, HPV ve servikal kanser arasındaki ilişkinin sınırlı farkındalığı ve HPV aşısının yapılmasını bazı ebeveynlerin onaylamaması gibi faktörler bütün dünyada aşılamanı olumsuz etkilemektedir. Genç erkeklerin aşılmasına ilgi daha azdır, ancak aşılama HPV ile reenfeksiyon riskini azaltarak kızların dolaylı olarak korunmasına yardımcıdır ve penil kanser, anal kanser, orofaringeal kanser ve genital siğiller gibi erkeklerde görülen diğr HPV ile ilişkili hastalıkları önler^{63,73}.

HPV enfeksiyonunu ve servikal kanseri azaltmak için diğr birincil önleme stratejilerine cinsel ilişki başlama yaşını geciktirmek, ömür boyu cinsel partner sayısını azaltmak ve kondom kullanımının artırılması dahildir. HIV kazanımı ve bulaşmasının azaltılmasının yanı sıra, erkeklerin sünneti de erkeklerde HPV için koruyucudur ve kadınlar arasında HPV'nin ilk enfeksiyon veya reenfeksiyon riskini de azaltır.

Günümüzdeki HPV aşılarının HPV enfeksiyonundan korunmada etkinliği gösterilmiştir. Servikal kanser vakalarının %90'ından sorumlu HPV tip 16, 18, 31, 33, 45, 52 ve 58'i içeren ve genital siğillerin %90'ına sebep olan HPV tip 6 ve 11'i içeren HPV aşıları mevcuttur. Aşıların güvenilir, üretimi kolay ve stabil olduğı kabul edilir. Ancak, aşı pahalıdır ve 9-26 yaş grubuna ilk cinsel ilişkiden önce uygulanması önerilmektedir. Ayrıca, kondom kullanımının HPV bulaşmasını önlemede etkisi sınırlıdır, çünkü kondomlar penisi ve perianal bölgeyi tamamen kaplamamaktadır, böylece cinsel ilişki sırasında derinin deriye teması ile HPV bulaşması gerçekleşebilir. HPV'ye karşı korunmada diğr önlemler araştırılmalıdır, özellikle aşı kapsamında olmayan HPV tiplerini hedef alan terapötik bileşikler geliştirilebilir.

Şimdiye kadar, HPV aşıları özellikle servikal kanserin önlenmesinde kullanılmıştır. Aşılar önceden HPV tip 16 ve 18 ile enfekte cinsel olarak çok aktif kadınlarda az fayda sağlar. Dolayısıyla, aşılama için ideal zaman HPV enfeksiyonuna maruz kalmadan önce olmalıdır. Bu sebeple, günümüzde bu aşının 9-13 yaşındaki kızlar veya aşılanmamışsa 14-26 yaş grubundakilere uygulanması önerilir. Her iki aşı üç doz 6

ay içinde verilir. HPV aşıları ABD ve İngiltere’de hem erkeklerde hem de kadınlarda kullanılması için onaylanmıştır. Servikste HPV’nin sebep olduğu enfeksiyonlar veya lezyonlar daha önce bildirilmiş ise aşı etkili değildir⁷⁴.

HPV aşılarının 5, 6.4 ve 9.4 yıl gibi uzun süreli aşı etkinlik çalışmaları bivalan ve kuadrivalan aşının HPV 16 ve 18 ile ilişkili CIN2+ lezyonlara karşı etkinliğinin %100 olduğunu göstermiştir⁷⁵. Servikal tarama kadınlarda aşı uygulanmışsa bile yapılmalıdır. Bu aşılardan sadece yaygın genotipler olan HPV 16 ve 18’e karşı etkinliği kanıtlanmıştır, ancak HPV 33 ve diğer daha az yaygın onkojenik tipler gibi diğer genotiplere karşı etkinliği tartışmalıdır. Böylece, diğer koruyucu ve maliyet etkin stratejiler özellikle gelişmekte olan ülkelerde önemli bir rol oynamaya devam etmektedir. FDA tarafından servikal kanserin önlenmesinde kullanımı onaylanmış iki HPV aşısı, Gardasil ve Cervarix diğer endikasyonlar için de onaylanmıştır. Gardasil, genital siğiller ve anogenital bölgede HPV ile ilişkili prekanseröz lezyonlara karşı koruyucu olmasının yanı sıra vulvar, vajinal ve anal kanserlerden korunmak için kullanımı onaylanmıştır. Cervarix, servikal kanser ve HPV enfeksiyonunun sebep olduğu prekanseröz servikal lezyonları önlemede kullanımı onaylanmıştır. Bu aşılardan penil veya orofaringeal kanseri önlediği henüz FDA tarafından onaylanmış değildir⁵⁰.

Persistent HPV enfeksiyonlarının tedavisi için terapötik aşılarda geliştirilmektedir. Bu aşılarda virüsün hayat siklusu boyunca eksprese edilen E6 ve E7 onkoproteinlerini hedefler.

HPV aşılarının enfeksiyonların ve lezyonların gelişmesini önlemede son derece etkili olduğu gösterilmesine rağmen, yüksek maliyet geliştirmekte olan ülkelere kullanımlarını kısıtlar. Ayrıca aşılama oranı bazı gelişmiş ülkelere düşüktür. Bu yüzden, birçok HPV tipine karşı koruma sunacak daha ucuz mikrobisitlerin geliştirilmesi kadınlarda HPV enfeksiyonuna yakalanmaya karşı ek bir koruma sağlayacaktır. HPV’nin konak hücreye bağlanması ve enfeksiyonunda rol alan GAG’lar (glikozaminoglikan), özellikle HS’yi (heparan sulfat) hedefleyen antiviraller için büyük bir ilgi vardır. Hem yüksek molekül ağırlıklı sülfatlanmış veya sülfonatlanmış polisakkaritler hem de selüloz sülfat, dekstran sülfat ve polistiren sülfonat gibi polimerler hücresel toksisite göstermeden fare hücrelerinde BPV1’e ve insan A431 hücrelerinde HPV 11 ve HPV 40’a karşı virosidal etki göstermiştir. Kırmızı algden üretilmiş yüksek düzeyde sülfatlanmış polisakkarit olan karragenan’ın in vitro olarak

yüksek riskli HPV tiplerinin enfeksiyonunu etkili bir şekilde engellediği gösterilmiştir ki, bu çalışmada, enfeksiyonun önlendiğini belirlemek için PsV'ler kullanılmıştır. Ancak NV ile test edildiğinde, karragenan 100 µg/ml'ye varan konsantrasyonlarda, HPV 16 enfeksiyonunu önlemede başarısız olmuştur. Buna karşın önemli inhibisyon düzeyleri doğal HPV 18 için 1 µg/ml kadar düşük konsantrasyonda gözlenmiştir. Farklı HPV PsV tiplerinin karragenan ile inhibisyonu için IC₅₀ ng/ml (IC; inhibitory concentration) ölçü birimi kullanılır. Buna karşılık, HPV 18 enfeksiyonu için NV ile benzer titreler kullanıldığında %50 inhibisyon için en az 10 µg/ml karragenan gerekirken HPV 16 enfeksiyonu inhibe olmamıştır. HPV 31 NV'nin de karragenan ile inhibisyona karşı duyarlı olduğu ve HPV 45 ile enfeksiyonun ise karragenan varlığında doz bağımlı azalma göstermediği bulunmuştur. Bu bulgulara göre karragenan'a karşı NV ve PsV'nin direnç ve duyarlılığında bir farklılık olduğu ve aynı zamanda farklı HPV tiplerinin reseptör olan GAG tipleri için çok seçici olduğu bildirilmiştir. Karragenan varlığında virionların hücre yüzeyine bağlanması analiz edilmiştir. HPV 16 NV'nin hücre yüzeyine tutunması karragenan'ın varlığından etkilenmemiştir. Aksine, HPV 18 NV'nin bağlanması karragenan'ın varlığında tamamen bozulmuştur. İlaveten, HPV 31 NV'nin bağlanması biraz azalırken HPV 45'in bağlanması önemli ölçüde azalmamıştır. Bu veriler, antiviraller test edildiğinde elde edilen sonuçların doğal virionlar kullanarak doğrulanmasının gerektiğini gösterir. Ayrıca, bu veriler her HPV tipinin farklı bağlandığını gösterdiğinden çoklu HPV tipleri kullanarak da bu sonuçların doğrulanması gerekir⁷⁶.

İlk HPV aşılarının kanserin önlenmesinde önemli bir klinik amacı olmasına rağmen, aşı etkinliğini optimize etmek için birçok faktörün düzeltilmesi veya geliştirilmesine ihtiyaç vardır.

HPV tiplerinin spesifitesi önemli sınırlamalardan biridir. Aslında aşı etkinliği onkojenik HPV tiplerine karşı herhangi bir kayda değer çapraz koruma olmadan sadece seçilen HPV tiplerine yöneliktir. Bu yüzden, hem Gardasil hem de Cervarix HPV ilişkili kanserlerin %20-30'unu kapsamaz. Ayrıca, bu aşılarda yüksek maliyeti, aşılarda servikal kanserin sıklıkla görüldüğü düşük ve orta gelirli ülkelerde yaygın uygulanmasını engellemektedir. Üretim maliyetlerini düşürmek için VLP'lerin modifikasyonu değerlendirme aşamasındadır. Ek olarak, devam eden çalışmalarda aşının immunojenitesini geliştirmek için adjuvanlar ve bağışıklık sistemi güçlendiricileri gibi

yeni antijenik komponentler kullanılmaktadır. Bu, viral enfeksiyona karşı uzun ömürlü korunma ve tam bir korunma için gerekli olan doz sayısını azaltmaya katkıda bulunacaktır^{77,78}.

Her iki L1 aşısının da zaten enfekte kadınlarda hiçbir tedavi edici etkisi yoktur. Premalign ve malign servikal lezyonların çoğunluğunda yalnızca HPV E6 ve E7 genleri eksprese edildiğinden, çoğu terapötik aşı bu iki virus proteinine karşı immun yanıtı hedefler. Son yıllarda, oldukça umut vaat eden sonuçlar elde edilmiş olup yüksek dereceli vulvar intraepitelyal neoplazi görülen hastalarda, bütün HPV 16 E6 ve E7 dizilimlerini kapsayan bir peptit havuzu kullanılmıştır. Ancak, başka araştırmalarla HPV terapötik aşılardan etkinliğini tam olarak değerlendirmek gerekmektedir⁷⁹.

Aşı girişinden sonraki 6 yıl içerisinde, 14-19 yaş arası kızlarda aşıda bulunan 4vHPV tipi (HPV 16, 18, 6 ve 11) sıklığında %64 ve 20-24 yaş arasında %34 azalma olmuştur⁸⁰.

Aşı etkinliği çalışmalarında 4vHPV tipi görülme sıklığındaki en büyük düşüş 14-19 yaşındakiler için rapor edilmiş olup aşı kapsamı ile tutarlıdır. Dikkat çekici bir şekilde NHANES'in (National Health and Nutrition Examination Survey) çalışmasında 2009-2012'de (%51) en az 1 aşı dozu aldığı bildirilen 14-19 yaş arası kızların oranı ulusal aşı kapsamı çalışmalarında elde edilen verilere benzerdir. En az 1 doz aşının uygulandığı Gençlerde Ulusal Aşılama Programı'nda (National Immunization Survey Teen) 13-17 yaş arasındaki kızlarda 2009-2012 yılları arasında aşı kapsama oranı %44.3 ile %53.8 arasında değişmiştir. Ulusal anketlerden 18 yaş ve üzeri kişiler için veriler elde edilmemesine rağmen, 2012 Ulusal Sağlık Halk Anketi (National Health Interview Survey) 19-21 yaş grubundaki kızların %44'ünün ve 22-26 yaş arası kızların %28'inin en az 1 doz HPV aşısı aldığını göstermiştir. NHANES 2009-2012 taramasında, 20 ile 24 yaş arası kızların %33'üne en az 1 doz aşı yapıldığı belirtilmiştir⁸¹.

Aralarında çarpaz koruma olduğu düşünülen 3 HPV tipinin prevalansına bakıldığında aşının yapıldığı dönemde 14-19 yaş aralığındaki kızlarda HPV 31, 33 ve 45 tipleri için prevalans benzer bulunmamıştır. Aşı öncesi dönemle karşılaştırıldığında da istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş gözlenmemiştir. Aşı yapılan 14-24 yaş arası kızlarda bu her üç tipe karşı aşının etkinliği gösterilmemiştir. Aşı onaylanmadan önce hem kuadrivalan hem de bivalan aşının klinik çalışmalarında aşıda bulunmayan yüksek riskli HPV tiplerine bağlı persistent enfeksiyon ve servikal intraepitelyal neoplaziye

karşı çapraz koruma incelenmiştir. Bivalan HPV aşısının 4vHPV aşısına göre daha fazla çapraz koruma sağladığının kanıtları bulunmuştur. Aşılama sonrası çapraz koruma ile ilgili çalışmalar yapılmıştır. Bivalan HPV aşısının uygulandığı İngiltere ve İskoçya’da HPV 16, HPV 18 ve ilişkili tiplerin azaldığı gözlenmiştir. Tetravalan aşının (4vHPV) uygulandığı Avustralya’da 18-24 yaş arası kadınlarda prevalans %37.6’dan %6.5’e düşmüştür. HPV 31, 33 ve 45 için aşı öncesi ve aşılama dönemi sırasında önemli istatistiksel fark bulunmamıştır. Buna karşılık aşı yapılan bölgede %58’lik önemli bir etkinlik gözlenmiştir. NHANES verilerinin sonraki analizleri HPV aşılama kapsamı arttıkça ABD’de HPV sıklığı değişikliklerini değerlendirecektir. Ancak 9vHPV aşısının girişi, 2015’ten sonra 4vHPV aşısının bu 3 HPV tipine karşı verdiği potansiyel çapraz korumaya bağlı değişikliklerin değerlendirilmesini zorlaştıracaktır⁸².

Sonuç olarak, 9vHPV aşısına ilave edilen 5 HPV tipinin prevalansı incelendiğinde aşı öncesi dönemde sırasıyla, 14-19 ve 20-24 yaş arası kadınlarda %8.4 ve %16.5 olup bu yaş gruplarındaki HPV 16 ve 18 prevalansına benzer bulunmuştur. Bu 5 HPV tipi HPV16 ve 18’den önemli ölçüde daha az kansere sebep olur, çünkü kanser ilerleme oranı daha azdır. ABD’de servikal kanserlerin %66’sının HPV 16 ve 18 ve %15’nin 9vHPV aşısına eklenen 5 HPV tipiyle ilişkili olduğu bildirilmiştir. Aşı öncesi ve aşı dönemine kıyasla 9vHPV aşısına eklenen 5 HPV tipinin prevalansında veya aşı döneminde 14-24 yaş arası aşılanmış ve aşılanmamış cinsel olarak aktif kadınlar karşılaştırıldığında prevalansta istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Aşı öncesi ve aşı dönemleri arasındaki 4vHPV aşısında bulunmayan her tipin prevalansında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmasına rağmen, bu karşılaştırmalar dikkatle yorumlanmalıdır^{83,84}.

HPV aşısının uygulanmaya başlanmasından sonra aşı tipi prevalansında düşüş 3 doz aşılama kapsamına dayanarak beklenenden daha fazladır. Bu sonuç, “herd” immunité ve aşı dozu serisinin etkinliğine bağlı olabilir. Herd immunité toplumun büyük bir kısmının aşılama ile hastalıktan korunması ve böylece bu kişilerden virüsün bulaşmasının önlenmesi sonucu aşılama alanların da korunmasıdır. Birçok ülkede HPV aşılarının toplumdaki etkisi üzerine veriler birikmektedir. Aşıda bulunan HPV tiplerinin prevalansındaki düşüşler daha çok ABD’den daha fazla aşılama kapsamı olan ülkelere gelmektedir. NHANES’ten elde edilen veriler, HPV aşısının etkisi

üzerine kanıtların artmasına katkı sağlamaktadır ve ABD’de aşı kapsamının artması ve aşı politikasındaki değişiklikler oldukça önemli bilgileri sunmaya devam edecektir⁸⁵.

2.8.2.İkincil korunma

Erken tanı ve tedavi için tarama ikincil korunmanın temel taşıdır. Servikal kanser taramasının rutin olduğu yüksek gelirli ülkelerde servikal prekanseröz lezyonların erken tanı ve tedavisi, servikal kanserlerin %80’e varan kadarını önlemektedir. Yüksek gelirli ülkelerde, servikal intraepitelyal neoplaziyi tespit etmek için servikal hücrelerin incelendiği servikal sitoloji testi (Pap smear) 1940’larda rutin tanının bir parçası haline gelmiştir. Anormal sitoloji pozitif bulunan kadınlarda premalign servikal lezyon (CIN) olduğunu histolojik olarak doğrulamak için kolposkopi gereklidir. Ancak servikal sitoloji, pek çok Afrika ülkesinde uygun bir tarama metodu değildir, bunun sebebi tıbbi ve laboratuvar altyapısı ve eğitilmiş personel ihtiyacı olması, uygun bir hasta izleme sistemi ile çok sayıda geri dönüş ziyaretlerinin gerekliliği ve genellikle bu hizmetlerin başkentlerde kullanılmasıdır. Sahra Altı Afrika’da üç yıllık bir sürede pelvik muayene ve Pap testi yaptıran kadınların oranı çok düşük iken (Etiyopya’da %1 ve Güney Afrika’da %23.2), Tunus’da %40 ve Malavi’de ise kadınların %94’ü hiç pelvik muayene olmamıştır^{86,87}.

Düşük gelirli ülkelerde daha uygun ve DSÖ onaylı, servikal kanser taraması stratejisiasetik asit veya Lugol iyot ile görsel incelemedir. Servikse doğrudanasetik asit veya Lugol iyodu uygulandıktan sonra, prekanseröz ve kanserli lezyonlar beyaz renge dönüşerek çıplak gözle görünür hale gelir. Bu yöntem HIV ile enfekte ve enfekte olmayan kadınlarda yüksek duyarlılığa sahiptir. Sonuçlar hemen alınır, böylece prekanseröz lezyonlar için pozitif bulunan kadınlara aynı ziyaret sırasında kriyoterapi tedavisi yapılabilir veya sağlık kurumunun kapasitesi varsa "tarama ve tedavi" yaklaşımı sunulabilir. Bu ‘tarama ve tedavi’ stratejisinin maliyet etkin olduğu, ziyaretlerin yükünü azalttığı ve tedavide gecikmeleri önlediği gösterilmiştir.

Kriyoterapi, minimum materyal desteği ile kriyoterapi yapmak için eğitilmiş hemşire veya ebe gibi sağlık uzmanları tarafından birinci basamak sağlık kurumlarında yapılabilir. Gelişmiş ülkelerde, kriyoterapi 1 yıl süreyle CIN’in tüm sınıfları için yaklaşık %90 etkilidir. Kanser öncesi lezyonlar için en sık kullanılan tedavi seçeneği lokal anestezi gerektiren loop elektrocerrahi eksizyon prosedürü (Loop Electrosurgical

Excision Procedure; LEEP) kullanarak veya kriyoterapi ile etkilenen dokuyu dondurarak hastalıklı dokuyu kaldırmaktır. LEEP veya kriyoterapi ile tedavi edilemeyen lezyonları kaldırmak için bistüri ile yapılan soğuk konizasyon kullanılabilir⁸⁸.

Servikal taramanın optimal sıklığı tarama yöntemine bağlı olarak her 3-5 yılda bir veya HIV pozitif kadınlar için en az 3 yıldır. Bir kadın hayatında sadece bir kez taranabilecekse, en stratejik yaş 30 ve 39 arasındadır. Servikal kanser tarama oranları birçok Afrika ülkesinde tam bilinmemekte, ancak birkaç çalışmaya göre tarama oranlarının düşük (%8.3-64), fakat HIV tedavisinde olan kadınlarda biraz daha yüksek (%9.4-80) olduğu bildirilmiştir. Gelişmekte olan 57 ülkede 2008 yılında yapılan topluma dayalı bir çalışmada kadınların %19'unun önceki üç yıl içinde servikal kanser açısından tarandığı belirtilmiştir. Altyapı ve gelir ile ilgili engellerin yanı sıra, üreme çağındaki kadınlarda servikal kanser ile ilgili farkındalık düşüktür ve sağlık hizmeti verenlerin az kısmı yüksek kaliteli tarama yapmak için eğitilmiştir. Birçok ülkede HIV pozitif olanlarda servikal kanser taraması için girişimde bulunulmuştur, ancak rutin tarama hala sınırlıdır. HPV DNA testi servikal kanserin erken teşhisi için önemli bir stratejidir. HPV DNA testinin Afrika ülkelerinde yaygın kullanımı için maliyeti düşürülmelidir⁸⁹.

2.8.3.Üçüncül korunma

Prekanseroz lezyon veya invaziv servikal kanser tanısı konduğunda tedavi gerekir. Tanısı konulmamış veya tedavi edilmemiş ciddi servikal displazi invaziv kansere dönüşebilir. Ne yazık ki, Kenya, Tanzanya ve Nijerya'da kadınların önemli bir bölümüne (%56-80.6) servikal kanserin ileri evresinde tanı konmuştur.

İnvaziv servikal kanserin ciddiyetini ve evresini belirlemek için vajina, parametrium, mesane ve rektumun klinik ve endoskopik değerlendirilmesi gerekir. İnvaziv servikal kanser için tedavi histerektomi, radyoterapi ve kemoterapi kombinasyonunu içerebilir. Bu seçeneklerin kullanılabilirliği birçok Afrika başkenti ile sınırlıdır. Semptomları hafifletici palyatif tedavi, servikal kanserin son aşamasında veya daha az ilerlemiş hastalığı olan kadınlar için bir seçenek olabilir.

Düşük gelirli ülkelerde servikal kanser sebebiyle ölüm oranları yüksek gelirli ülkelere yaklaşıp üç kat daha yüksektir. Afrika ülkelerinde servikal kanser için hayatta kalma verileri sınırlıdır. Yedi Afrika ülkesinde 2005-2009 yılları arasında

servikal kanserli kadınlar için tahmin edilen 5 yıllık sağkalım %56.3 (%19.5-96) idi. Tedavi (radyoterapi ve/veya cerrahi) alan kadınlar arasında, tanı sonrası bir yıllık hayatta kalma olasılığı %73.9-90.4 arasında değişmiştir ve dört yıla kadar %32.5'e düşmüştür. Tedavi edilmezse, gözlenen sağkalım 1 yılda %58.6'dan ve 4 yılda % 31.1'e düşmektedir⁹⁰.



3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışmada Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Balcalı Hastanesi Kadın Hastalıkları polikliniğine başvuran ve servikal tarama testi olan Pap testi uygulanan 20-65 yaş arası 1145 kadından özel fırça ile servikal hücre örneği alınıp fosfat tamponlu tuzlu su (Phosphate Buffered Saline; PBS) içerisine konuldu. Servikal hücre örnekleri 5000 rpm’de 5 dakika süre ile santrifüj edildi. Servikal sürüntü örneklerinde real-time PCR ve pyrosequencing metodu kullanılarak (HPV Sign PQ genotipleme testi, Diatech Pharmacogenetics, Italy) yüksek risk HPV tipleri araştırıldı.

Çalışma için Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul Başkanlığı’ndan “Etik Kurul Onayı” alındı.

3.1. HPV viral DNA ekstraksiyonu

Servikal sürüntü örneklerinden viral DNA eldesi için yapılan ekstraksiyon işlemi EZ1 virus mini kit v2 (Qiagen, Germany) ile EZ1 Advanced (Qiagen) otomatize nükleik asit izolasyon cihazında (Şekil 1) yapıldı. DNA ekstraktları real-time PCR işleminde kullanılmak üzere -20°C’ye kaldırıldı. DNA ekstraksiyonu üretici firmanın önerilerine göre aşağıdaki gibi yapıldı.

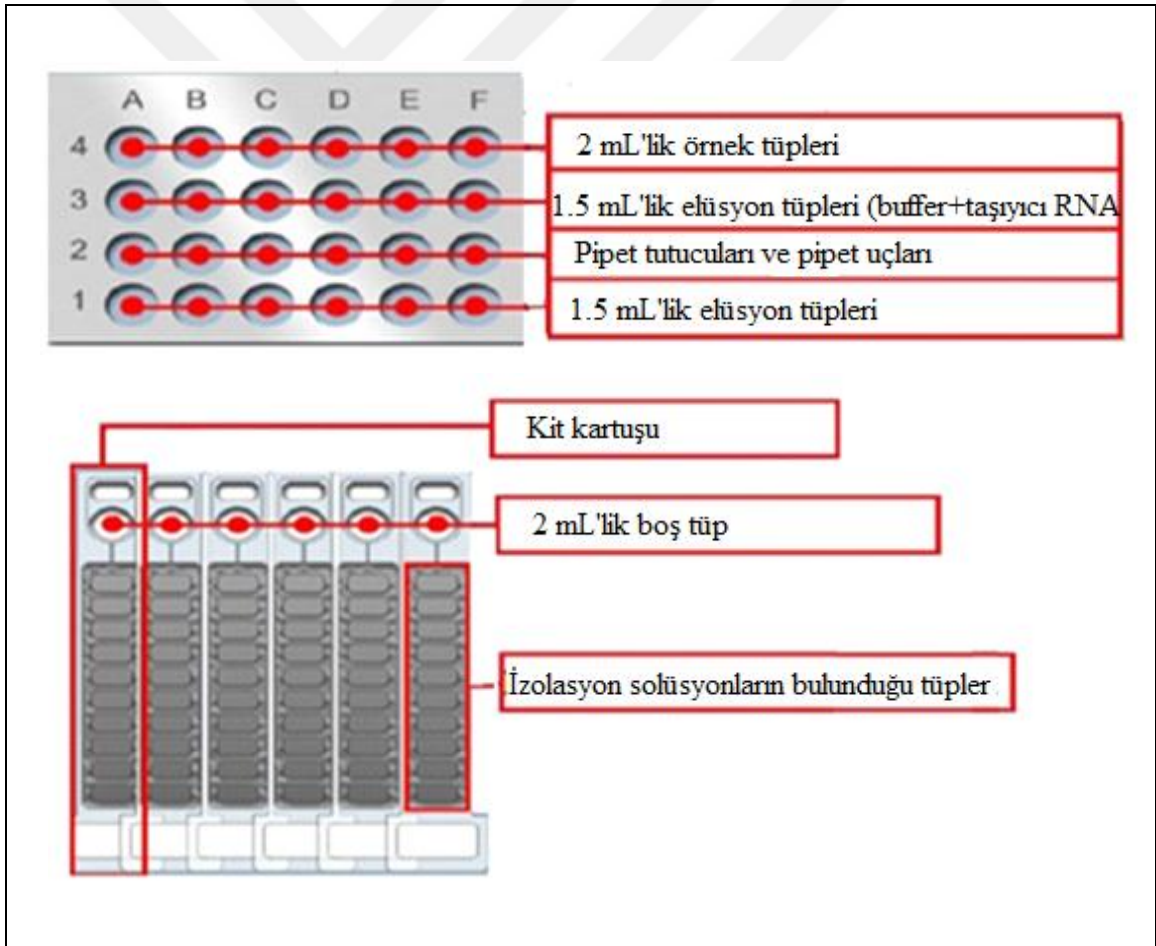
1. Cihazın çalışma bloğunun A1 sırasına 1.5 mL’lik boş elüsyon tüpleri numaralandırılarak yerleştirildi. İşlem sonunda DNA ekstraktları bu tüplerde toplandı. (Şekil 2)
2. Pipet tutucuları içine pipet uçları yerleştirilerek A2 sırasına konuldu. (Şekil 2)
3. Çalışma bloğunun A3 sırasında bulunan her bir 1.5 mL’lik elüsyon tüplerine 4 µL taşıyıcı (carrier) RNA ve 56 µL elüsyon buffer eklendi.
4. A4 sırasına yerleştirilen 2 mL’lik tüplere ise 400 µL serikal sürüntü örnekleri eklendi.

Kartuş bloğuna her bir örnek için bir DNA izolasyon kartuşu, bloğun üzerindeki ok yönünde yerleştirildi. (Şekil 2) Kartuşun üstündeki boş kuyulara 2 mL’lik boş tüpler konuldu. Hazırlanan kartuş ve çalışma bloğu cihaza uygun bir şekilde yerleştirilerek cihaz çalıştırıldı.

Yaklaşık 45 dakika sonra DNA ekstraktları elde edildi ve ardından ultraviyole ışığı 20 dakika süreyle çalıştırılarak cihazın dekontaminasyonu sağlandı. DNA ekstraktları real-time PCR işleminde kullanılmak üzere -20°C'ye kaldırıldı.



Şekil 1.EZ1 Advanced (Qiagen) otomatize nükleik asit izolasyon cihazı



Şekil 2. Örneklerin nükleik asit izolasyon cihazına yerleştirilmesi

3.2. HPV Sign PQ genotiplleme testi

HPV Sign PQ genotiplleme testi (Diatech Pharmacogenetics, Italy), HPV real-time PCR testi ve pyrosequencing olmak üzere 2 aşamadan oluşmaktadır. HPV real-time PCR testi, HPV pozitif örneklerin tespiti için kullanıldı. Daha sonra HPV tiplerinin tespiti (16 yüksek riskli HPV, 7 orta riskli HPV ve 11 düşük riskli HPV) için PCR testinde pozitif bulunan ürünlerin spesifik sekans primerleri kullanılarak pyrosequencing metodu ile dizi analizi yapıldı. Çalışmamıza servikal kanser taramasında önemi olan sadece yüksek riskli HPV tiplerinin sonuçları dahil edilmiştir.

3.2.1. HPV real-time PCR testi

Real-time PCR ana reaksiyon karışımları kontaminasyonun engellenmesi için ekstraksiyon işleminin yapıldığı ayrı bir kabinde hazırlandı. PCR reaksiyonunda ısı iletiminden kaynaklanabilecek sorunların en az düzeye indirilmesi için ince duvarlı DNase ve RNase enzimlerinden arındırılmış steril 0.2 mL'lik PCR tüpleri (Qiagen, thin-walled PCR tüpleri) kullanıldı. Real-time PCR cihazı olarak Rotor-Gene Q 5plex real-time PCR (Qiagen) (Şekil 3) kullanıldı.

HPV DNA'nın amplifikasyonu:

1. HPV real-time PCR kiti buzdolabından çıkarıldıktan sonra reagenlerin çözünmesi beklendi. Ardından vortekslenip kısa bir süre spin atıldı. Her bir hasta örneği, pozitif ve negatif kontroller için içinde EvaGreen Dye bulunan 25µL PCR master mix HRM (High resolution master mix, Qiagen), 13 µL saf su ve 2 µL HPV/β-Globulin primer solüundan oluşan toplam 40 µL karışım hazırlanarak steril 0.2 mL'lik PCR tüplerine eklendi.
2. PCR mix üzerine sırasıyla hastalara ait DNA ekstraktlarından 10 µL, negatif kontrolden 10 µL ve pozitif kontrollerden (sırasıyla HPV 31, 16 ve 39 için HPV 1/2, HPV 3 ve HPV 4 nolu pozitif kontroller) 10 µL eklendi.
3. Toplam 50 µL PCR reaksiyon karışımı içeren PCR tüpleri Rotor-Gene Q 5plex cihazının (Şekil 3) karusel (Carousel) aparatına yerleştirildi ve cihaz 95°C'de 3 dakika ve 50 siklus olmak üzere 95°C'de 30 saniye, 44°C'de 30 saniye ve 72°C'de 30 saniye olmak üzere ısı döngüsü programında çalıştırıldı. Ardından

ısı 72°C'den 1°C artırılarak 95°C'ye yükseltildi ve pre-melting için 90 saniye bekletildi ve örnekler 5 saniye FAM (yeşil) kanalında bekletildi. Test başladıktan yaklaşık 3 saat sonra sonuçlar değerlendirildi.

HPV pozitifliği için cut-off değeri 1.6 olup β -Globulin geni için 0.5'tir.

HPV PCR test sonuçları FAM kanalında (yeşil) değerlendirildi ve eşik değerin üstündeki değerler pozitif kabul edildi.

3.2.2. Pyrosequencing testi

PCR reaksiyonundaki forward primerler biyotinli olup sentezlenen biyotinli amplifikasyon ürünleri streptavidin ile kaplı sefaroze boncuklara bağlanarak tek sarmallı DNA'ya ayrıştırıldı ve sekans primerleri ile pyrosequencing analizi yapıldı. HPV pozitif çıkan örnekler HPV genotiplerine yönelik 4 farklı sekans primeri kullanılarak PyroMark Q24 (Qiagen) cihazında (Şekil 4) pyrosequencing metodu ile dizi analizi gerçekleştirildi. Bu işlem sırasında 6 örneğin çalışılabildiği 24 kuyucuklu (3 satır, 8 sütun) örnek plağı (sample plate) ve yine 24 kuyucuklu farklı bir mikropak (Şekil 5) kullanıldı. Her bir hasta için 4 kuyucuk kullanıldı.

Pyrosequencing test aşamaları:

1. Bir kuru ısı bloğu 90°C'ye ve diğer kuru ısı bloğu 60°C'ye ayarlandı. Real-time PCR yapılan örneklerden pozitif olanlar erimesi için dolaptan çıkarıldı. Buzdolabında -20°C'de saklanan sekans primerleri ve +4°C'de bulunan annealing buffer, binding buffer, sefaroze ve su (MB Water, Diatech Pharmacogenetics, Italy) test aşamalarında kullanılmak üzere kabin içerisine konuldu.
2. PyroMark Q24 (Qiagen) çalışma istasyonunun (Şekil 6) uygun bölmelerine +4°C'de tutulan solüsyonlar olan SEQ denatürasyon solüsyonu (Diatech Pharmacogenetics, Italy), su (SEQ water), SEQ washing buffer ve %70'lik etanol eklendi. Örnek plağı ve mikropak, buzluaktaki metal blok ile kabine getirildi. Binding mix hazırlarken örnek plağı soğuk metal blokta tutuldu. Mixler hazırlanırken Sefaroze hariç (sefaroze boncuklarının çökmemesi için) tüm malzemelere spin atıldı.

3. Binding mix hazırlama: Her bir kuyucuk için 40 µL SEQ binding buffer, 18 µL saf su, 2 µL sepharose beads'ten oluşan binding mix 24 kuyucuklu örnek plağının her bir kuyucuğuna 60 µL konuldu ve üzerine 10 µL DNA ekstraktı eklendi. Örnek plağının üzeri foil ile kaplanıp, çalkalama cihazında 1400 rpm'de 15 dk bekletildi.
4. Annealing mix hazırlama: Dört adet sekans primeri için 4 tüpe 144'er µL SEQ annealing buffer konuldu. Tüplere sırasıyla sekans primeri 1, 2, 3 ve 4'ten 6 µL eklendi. Her hasta örneği için hazırlanan mixlerden farklı bir 24 kuyucuklu mikroplağın 4 kuyucuğuna sırasıyla sekans primer mix 1, 2, 3 ve 4'ten 25 µL eklendi.
5. Örnek plağı çalkalama cihazından alınıp çalışma istasyonuna (Şekil 6) yerleştirildi. Cihazı çalıştırdıktan sonra cihazın taraklı kısmı örnek plağı üzerine yerleştirildi. Tarağa 15 sn süreyle örnek çekildi. Tarağa örneği çektikten sonra tarak %70'lik etil alkolde 5 sn, denatürasyon solüsyonunda 5 sn ve washing buffer'da 10 sn bekletildi. Cihazı kapattıktan sonra tarakta bulunan örnek, içinde primer mix'leri bulunan mikroplağa aktarıldı.
6. Isı bloklarında önce 90°C'de 2 dk, sonra 60°C'de 10 dk bekletilen mikroplak PyroMark Q24 cihazına (Şekil 4) yerleştirildi.
7. PyroMark Q24 kartuşuna (Şekil 7) adenin, timin, guanin, sitozin, enzim ve substrat (120 µL enzim ve 120 µL substrat ve herbiri 94 µL olmak üzere dATPαS, dTTP, dCTP ve dGTP) eklendikten sonra kartuş PyroMark Q24 (Qiagen) cihazına yerleştirildi.
8. PyroMark cihazı kurulan pyrosequencing programına göre çalıştırıldı.
9. Yaklaşık 66 dakika sonra sonuçlar elde edildi.



Şekil 3. Rotor-Gene Q 5plex real-time PCR cihazı



Şekil 4. PyroMark Q24 (Qiagen) cihazı



Şekil 5. Örnek plağı ve mikropalak



Şekil 6. PyroMark Q24 (Qiagen) Çalışma istasyonu



Şekil 7. PyroMark Q24 (Qiagen) Kartuş

4. BULGULAR

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Jinekoloji Bölümüne başvuran ve servikal kanser tarama testi olan Pap testi yapılan kadınlarda onkojenik HPV genotiplerinin dağılımının tespiti için 1145 kadın çalışmaya dahil edildi. Hastaların yaşı 20-65 arasında olup 119'u (%10.4) 20-29 yaş arası, 381'i (%33.3) 30-39 yaş arası, 388'i (%33.9) 40-49 yaş arası, 194'ü (%16.9) 50-59 yaş arası, 63'ü (%5.5) 60-65 yaş arasında idi.

Hastaların 23'ü (%2) serviks uterusinin displazisi, 192'si (%16.8) serviks uterusinin erozyon ve ektropiyonu, 58'i (%5.1) serviks uterusinin enflamatuvar hastalığı, 29'u (%2.5) anormal uterus ve vajina kanaması tanısı ile kliniğe başvurmuştur. Ayrıca hastaların 775'i (%67.7) sağlıklı olarak tanımlanmış ve 68'i de (%5.9) dismenore, menapozal bozukluklar, vulva ve vajina kandidiyazı, genital siğil, abdominal ve pelvik ağrı, düzensiz menstruasyon, infertilite, malign neoplazm, gelişimsel over kisti ve enflamatuvar olmayan hastalık gibi diğer hastalıklar sebebiyle izlenmiştir. (Tablo 1)

Tablo 1. Çalışma grubundaki kadınların tanı ve yaş gruplarına göre dağılımı

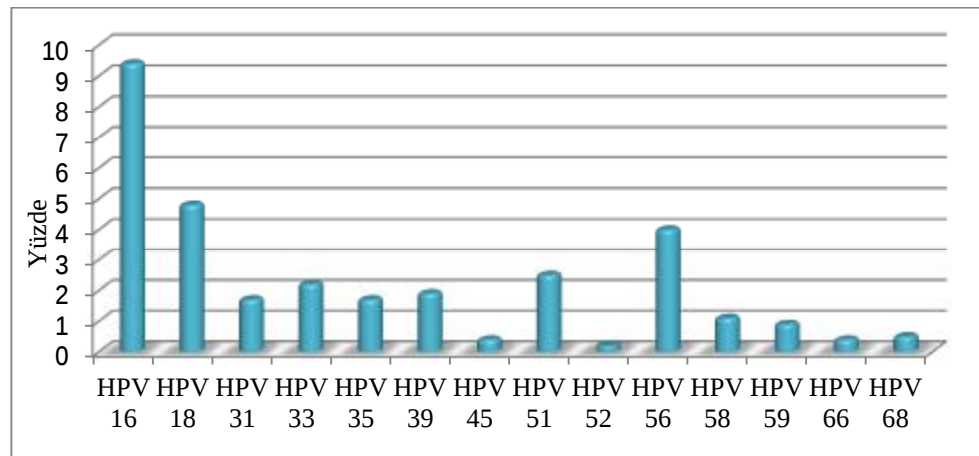
Tanı	20-29 yaş Sayı %	30-39 yaş Sayı %	40-49 yaş Sayı %	50-59 yaş Sayı %	60-65 yaş Sayı %	Toplam Sayı %
Serviks uterusinin displazisi	2 0.2	10 0.8	8 0.7	2 0.2	1 0.1	23 2
Serviks uterusinin erozyon ve ektropiyonu	17 1.5	75 6.6	71 6.2	19 1.7	10 0.9	192 16.8
Serviks uterusinin enflamatuvar hastalığı	4 0.4	17 1.5	22 1.9	12 1	3 0.3	58 5.1
Anormal uterus ve vajina kanamaları	1 0.1	8 0.7	16 1.4	4 0.3	- -	29 2.5
Sağlıklı	90 7.9	248 21.6	245 21.4	146 12.8	46 4	775 67.7
Diğer	5 0.4	23 2	26 2.3	11 1	3 0.3	68 5.9
Toplam	119 10.4	381 33.3	388 33.9	194 16.9	63 5.5	1145 100

HPV genotipleme real-time PCR testi sonrası vakaların 916'sı (%80) HPV negatif ve 229'u (%20) HPV pozitif olarak tespit edildi. Toplam 1145 kadının HPV negatif olan 92'si (%8) 20-29, 291'i (%25) 30-29, 320'si (%27.9) 40-49, 158'i (%13.8) 50-59 ve 55'i (%4.8) 60-65 yaş aralığında idi. HPV pozitif olan 27'si (%2.4) 20-29, 90'ı (%7.9) 30-39, 68'i (%5.9) 40-49, 36'sı (%3.1) 50-59 ve 8'i (%0.7) 60-65 yaş aralığında idi. (Tablo 2)

Tablo 2. HPV pozitif ve HPV negatif kadınların yaş gruplarına göre dağılımı

Yaş grubu	HPV Negatif sayı	%	HPV Pozitif sayı	%	Toplam sayı	%
20-29	92	8	27	2.4	119	10.4
30-39	291	25.5	90	7.9	381	33.3
40-49	320	27.9	68	5.9	388	33.9
50-59	158	13.8	36	3.1	194	16.9
60-65	55	4.8	8	0.7	63	5.5
Toplam	916	80	229	20	1145	100

Kadınlarda tekli veya multiple enfeksiyon şeklinde 108'inde (%9.4) HPV tip 16, 55'inde (%4.8) HPV 18, 19'unda (%1.7) HPV 31, 25'inde (%2.2) HPV 33, 19'unda (%1.7) HPV 35, 22'sinde (%1.9) HPV 39, 5'inde (%0.4) HPV 45, 29'unda (%2.5) HPV 51, 2'sinde (%0.2) HPV 52, 46'sında (%4) HPV 56, 13'ünde (%1.1) HPV 58, 11'inde (%0.9) HPV 59, 5'inde (%0.4) HPV 66 ve 6'sında (%0.5) HPV 68 bulundu. (Şekil 8)



Şekil 8. Toplam 1145 kadında HPV tiplerinin prevalansı

Çalışma grubundaki 1145 hastanın servikal sürüntü örnekleri sitolojik olarak incelendiğinde 1067'sinde (%93.2) normal sitoloji tespit edilmiş olup anormal sitoloji bulunan 78 örnekten (%6.8) 45'inin (%4) LSIL, 19'unun (%1.6) HSIL, 14'ünün (%1.2) ASCUS olduğu tespit edildi. (Tablo 3)

Tablo 3. Servikal sitoloji sonuçlarının kadınların yaş gruplarına göre dağılımı

	20-29		30-39		40-49		50-59		60-65		Toplam	
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
Normal	108	9.4	356	31.1	363	31.7	179	15.5	61	5.3	1067	93.2
LSIL	8	0.7	13	1.1	14	1.2	9	0.8	1	0.1	45	4
HSIL	1	0.1	8	0.7	7	0.6	3	0.3	-	-	19	1.6
ASCUS	2	0.2	4	0.4	4	0.4	3	0.3	1	0.1	14	1.2
Toplam	119	10.4	381	33.3	388	33.9	194	16.9	63	5.5	1145	100

Normal sitolojisi olan 1067 kadının 180'inde (%16.8) HPV pozitif bulundu. Anormal sitolojisi olan 78 hastanın 49'unda ise (%62.8) HPV DNA bulundu. Bu gruptan LSIL tanısı alan 45 hastanın 27'si (%60), HSIL tanısı alan 19 hastanın 16'sı (%84.2), ASCUS pozitif olan 14 hastanın 6'sı (%42.8) HPV DNA pozitif tespit edildi. (Tablo 4)

Tablo 4. Normal ve anormal ve sitolojisi olan kadınlarda HPV pozitifliği

	20-29 yaş		30-39 yaş		40-49 yaş		50-59 yaş		60-65 yaş		Toplam	
	sayı	%	sayı	%	sayı	%	sayı	%	sayı	%	sayı	%
Normal (1067)	19	1.7	72	7.2	52	4.8	28	2.6	8	0.7	180	16.8
LSIL (45)	6	13.3	7	15.6	9	20	5	11.1	-	-	27	60
HSIL (19)	1	5.3	8	42.1	5	26.3	2	10.5	-	-	16	84.2
ASCUS (14)	1	7.1	2	14.3	2	14.3	1	7.1	-	-	6	42.8
Toplam (1145)	27	2.4	90	7.9	68	5.9	36	3.1	8	0.7	229	20

HPV pozitif bulunan 229 vakanın servikal sürüntü örneklerinin sitoloji sonuçları incelendiğinde 180'inin (%78.6) normal 27'sinin (%11.8) LSIL, 16'sının (%7) HSIL ve 6'sının (%2.6) ASCUS olduğu bulundu. (Tablo 5)

Tablo 5. HPV pozitif bulunan 229 vakaya ait servikal sürüntü örneklerinin sitoloji sonuçları

Patoloji	20-29 yaş sayı %	30-39 yaş sayı %	40-49 yaş sayı %	50-59 yaş sayı %	60-65 yaş sayı %	Toplam sayı %
Normal	19 8.7	77 31.5	52 22.7	28 12.2	8 3.5	180 78.6
LSIL	6 2.6	7 3.1	9 3.9	5 2.2	- -	27 11.8
HSIL	1 0.4	8 3.5	5 2.2	2 0.9	- -	16 7
ASCUS	1 0.4	2 0.9	2 0.9	1 0.4	- -	6 2.6
Toplam	27 12.1	90 39	68 29.7	36 15.7	8 3.5	229 100

HPV pozitif 229 hastanın genotip dağılımına bakıldığında tekli veya çoklu enfeksiyon şeklinde 108'i (%47.1) HPV 16, 55'i (%24) HPV 18, 19'u (%8.2) HPV 31, 25'i (%10.9) HPV 33, 19'u (%8.2) HPV 35, 22'si (%9.6) HPV 39, 5'i (%2.1) HPV 45, 29'u (%12.6) HPV 51, 2'si (%0.8) HPV 52, 46'sı (%20) HPV 56, 13'ü (%5.6) HPV 58, 11'i (%4.8) HPV 59, 5'i (%2.1) HPV 66 ve 6'sı (%2.6) HPV 68 olarak tespit edildi. HPV 16 pozitif kadınlardan %37.6'sında normal sitoloji %3.5'inde LSIL, %3.9'unda HSIL ve %2.1'inde ASCUS tespit edildi. (Tablo 6)

Tablo 6. HPV pozitif 229 hastada genotip dağılımı ve servikal sitolojik sonuçlar

HPV Tipi	Normal (1067) Sayı %	LSIL (45) Sayı %	HSIL (19) Sayı %	ASCUS (14) Sayı %	HPV pozitif (229) Sayı %
HPV 16	86 37.6	8 3.5	9 3.9	5 2.1	108 47.1
HPV 18	49 21.4	4 1.7	2 0.9	- -	55 24
HPV 31	17 7.4	1 0.4	1 0.4	- -	19 8.2
HPV 33	15 6.5	6 2.6	2 0.9	2 0.9	25 10.9
HPV 35	16 7	1 0.4	1 0.4	1 0.4	19 8.2
HPV 39	20 8.7	2 0.9	-	- -	22 9.6
HPV 45	4 1.7	- -	1 0.4	- -	5 2.1
HPV 51	18 7.8	8 3.5	1 0.4	2 0.9	29 12.6
HPV 52	1 0.4	1 0.4	- -	- -	2 0.8
HPV 56	38 16.6	6 2.6	1 0.4	1 0.4	46 20
HPV 58	8 3.5	4 1.7	- -	1 0.4	13 5.6
HPV 59	9 4	1 0.4	1 0.4	- -	11 4.8
HPV 66	3 1.3	1 0.4	1 0.4	- -	5 2.1
HPV 68	5 2.2	- -	1 0.4	- -	6 2.6

Toplam 1145 kadından 136'sında (%11.8) tekli HPV enfeksiyonu, 61'inde (%5.3) ikili, 22'sinde (%2) üçlü ve 10'unda da (%0.9) dörtlü HPV enfeksiyonu tespit edildi. Böylece 229 (%20) hastada tekli veya multiple HPV enfeksiyonu bulundu. Multiple HPV enfeksiyon oranının ise %8.2 (93) olduğu tespit edildi. HPV DNA pozitif 229 hastanın 136'sında (%59.4) tekli ve 93'ünde (%40.6) ise multiple enfeksiyon görüldü. (Tablo 7)

Tablo 7. Tekli ve multiple HPV enfeksiyonlarının yaşa göre dağılımı

HPV enfeksiyonu	20-29 yaş		30-39 yaş		40-49 yaş		50-59 yaş		60-65 yaş		Toplam	
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
Tekli	15	1.3	55	4.8	38	3.3	23	2	5	0.4	136	11.8
İkili	9	0.8	20	1.7	20	1.7	10	0.9	2	0.2	61	5.3
Üçlü	3	0.3	9	0.8	6	0.5	3	0.3	1	0.1	22	2
Dörtlü	-	-	6	0.5	4	0.4	-	-	-	-	10	0.9
Toplam	27	2.4	90	7.8	68	5.9	36	3.2	8	0.7	229	20

HPV genotiplerinin prevalansı incelendiğinde HPV 16 normal sitoloji, LSIL, HSIL, ASCUS ve grubunda sırasıyla %0.8, %17.7 %47.3 ve %35.7 bulundu. HPV 18 ise LSIL, HSIL, ASCUS ve normal sitolojide grubunda sırasıyla %8.8 %10.5 %0 ve %0.4 bulundu. (Tablo 8)

Tablo 8. HPV izolatlarının normal ve anormal sitolojili olan kadınlarda prevalansı

HPV Tipi	Normal (1067)		LSIL (45)		HSIL (19)		ASCUS (14)		Toplam (1145)	
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
HPV 16	86	0.8	8	17.7	9	47.3	5	35.7	108	9.4
HPV 18	49	0.4	4	8.8	2	10.5	-	-	55	4.8
HPV 31	17	1.6	1	2.2	1	5.2	-	-	19	1.6
HPV 33	15	1.4	6	13.3	2	10.5	2	14.3	25	2.2
HPV 35	16	1.5	1	2.2	1	5.2	1	7.1	19	1.6
HPV 39	20	1.9	2	4.4	-	-	-	-	22	1.9
HPV 45	4	0.4	-	-	1	5.2	-	-	5	0.4
HPV 51	18	1.7	8	17.7	1	5.2	2	14.3	29	2.5
HPV 52	1	0.1	1	2.2	-	-	-	-	2	0.2
HPV 56	38	3.6	6	13.3	1	5.2	1	7.1	46	4
HPV 58	8	0.7	4	8.8	-	-	1	7.1	13	1.1
HPV 59	9	0.8	1	2.2	1	5.2	-	-	11	1
HPV 66	3	0.3	1	2.2	1	5.2	-	-	5	0.4
HPV 68	5	0.5	-	-	1	5.2	-	-	6	0.5

LSIL grubundaki 45 kadının %35.6'sında (16) tekli, %24.4'ünde (11) ise çoklu enfeksiyon ve HSIL grubunda 19 kadının %68.4'ünde (13) tekli, %15.8'inde (3) ise çoklu enfeksiyon görüldü. ASCUS grubunda %28.5'inde (4) tekli, %14.3'ünde (2) çoklu HPV enfeksiyonu, normal sitolojili grupta ise %9.6'sında (103) tekli ve %7.2'sinde (77) çoklu enfeksiyon tespit edildi. HPV pozitif anormal ve normal sitolojili kadınlarda çoklu enfeksiyon oranları ise normal sitolojili HPV pozitif 180 kadında %42.7 (77/180) LSIL sitolojili HPV pozitif 27 kadında %40.7 (11/27), HSIL sitolojisi olan HPV pozitif 16 kadında %18.7 (3/16) ve ASCUS pozitif ve HPV pozitif 6 kadında %33.3'tür (2/6). (Tablo 9)

Tablo 9. Tekli ve multiple HPV enfeksiyonların sitolojik tanıya göre dağılımı

Sitolojik Tanı	Tekli		İkili		Üçlü		Dörtlü		TOPLAM
Normal (1067)	103	9.6	54	5.1	15	1.4	8	0.7	180 16.8
LSIL (45)	16	35.6	6	13.3	5	11.1	-	-	27 60
HSIL (19)	13	68.4	1	5.3	2	10.5	-	-	16 84.2
ASCUS (14)	4	28.5	-	-	-	-	2	14.3	6 42.8
Toplam (1145)	136	11.8	61	5.3	22	2	10	0.9	229 20

Tekli HPV pozitif 136 örneğin 60'ında (%44.2) HPV 16, 23'ünde (%16.9) HPV 18, 14'ünde (%10.4) HPV 56 ve 11'inde (%8.1) HPV 33 olarak bulundu. Diğer 28 örnekte (%20.4) ise HPV 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 58, 59, 66 ve 68 tipleri gözlemlendi. (Tablo 10)

Tablo 10. Tekli HPV enfeksiyonlarının sitolojik tanıya göre dağılımı

HPV tipi	Normal		LSIL		HSIL		ASCUS		Toplam	
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
HPV 16	46	33.9	3	2.2	8	5.9	3	2.2	60	44.2
HPV 18	18	13.2	4	3	1	0.7	-	-	23	16.9
HPV 31	6	4.4	-	-	1	0.7	-	-	7	5.1
HPV 33	6	4.4	3	2.2	1	0.7	1	0.7	11	8.1
HPV 35	4	3	-	-	1	0.7	-	-	5	3.7
HPV 39	6	4.4	1	0.7	-	-	-	-	7	5.1
HPV 45	1	0.7	-	-	-	-	-	-	1	0.7
HPV 51	-	-	1	0.7	-	-	-	-	1	0.7
HPV 52	1	0.7	-	-	-	-	-	-	1	0.7
HPV 56	12	8.9	2	1.5	-	-	-	-	14	10.4
HPV 58	1	0.7	1	0.7	-	-	-	-	2	1.5
HPV 59	1	0.7	-	-	-	-	-	-	1	0.7
HPV 66	1	0.7	1	0.7	1	0.7	-	-	3	2.2
HPV 68	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Toplam	103	75.8	16	11.8	13	9.4	4	3	136	100

İkili HPV enfeksiyon bulunan 61 hastanın 8'inde (%13) HPV 16 ve HPV 18 koenfeksiyonu varken, 21'inde (%34.5) HPV 16 ve diğer tipler ve 13'ünde (%21.3) HPV 18 ve diğer HPV tipleri ile birliktelik bulundu. (Tablo 11)

Tablo 11. İkili HPV enfeksiyonlarının sitolojik tanıya göre dağılımı

HPV tipi	Normal		LSIL		HSIL		AS-CUS		Toplam	
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
HPV 16, 18	8	13	-	-	-	-	-	-	8	13
HPV 16, 31	1	1.6	1	1.6	-	-	-	-	2	3.3
HPV 16, 35	2	3.3	-	-	-	-	-	-	2	3.3
HPV 16, 39	2	3.3	-	-	-	-	-	-	2	3.3
HPV 16, 51	2	3.3	2	3.3	-	-	-	-	4	6.6
HPV 16, 56	5	8.2	1	1.6	-	-	-	-	6	9.8
HPV 16, 58	1	1.6	1	1.6	-	-	-	-	2	3.3
HPV 16, 66	1	1.6	-	-	-	-	-	-	1	1.6
HPV 16, 68	2	3.3	-	-	-	-	-	-	2	3.3
HPV 18, 31	5	8.2	-	-	-	-	-	-	5	8.2
HPV 18, 33	1	1.6	-	-	-	-	-	-	1	1.6
HPV 18, 51	2	3.3	-	-	-	-	-	-	2	3.3
HPV 18, 56	4	6.6	-	-	-	-	-	-	4	6.6
HPV 18, 59	1	1.6	-	-	-	-	-	-	1	1.6
HPV 33, 35	1	1.6	-	-	-	-	-	-	1	1.6
HPV 33, 39	1	1.6	-	-	-	-	-	-	1	1.6
HPV 35, 39	3	5	-	-	-	-	-	-	3	5
HPV 35, 56	2	3.3	-	-	-	-	-	-	2	3.3
HPV 33, 59	1	1.6	-	-	-	-	-	-	1	1.6
HPV 39, 51	1	1.6	-	-	-	-	-	-	1	1.6
HPV 31, 56	1	1.6	-	-	-	-	-	-	1	1.6
HPV 39, 56	2	3.3	1	1.6	-	-	-	-	3	5
HPV 51, 56	2	3.3	-	-	-	-	-	-	2	3.3
HPV 51, 59	1	1.6	-	-	1	1.6	-	-	2	3.3
HPV 51, 58	2	3.3	-	-	-	-	-	-	2	3.3
Toplam	54	88.6	6	9.8	1	1.6	-	-	61	100

Üçlü HPV enfeksiyonu bulunan 22 hastanın 7'sinde HPV 16 diğer HPV tipleri ile bulunurken 3'ünde HPV 18 ve diğer HPV tipleri birlikte bulundu. Ayrıca hastaların 3'ünde de HPV 16 ve HPV 18 ile diğer tiplerden sırasıyla HPV 66, 51 ve 58 ile birlikte bulundu. Kalan 9 kadında HPV 33, 35, 51 ve 56 gibi HPV tipleri tespit edildi. (Tablo 12)

Tablo 12. Üçlü HPV enfeksiyonlarının sitolojik tanıya göre dağılımı

HPV Tipi	Normal Sayı %	LSIL Sayı %	HSIL Sayı %	AS-CUS Sayı %	Toplam Sayı %
16, 18, 66	1 4.5	- -	- -	- -	1 4.5
16, 45, 56	1 4.5	- -	- -	- -	1 4.5
16, 39, 56	1 4.5	- -	- -	- -	1 4.5
16, 31, 51	1 4.5	- -	- -	- -	1 4.5
16, 51, 56	1 4.5	- -	- -	- -	1 4.5
16, 39, 68	1 4.5	- -	- -	- -	1 4.5
16, 18, 51	1 4.5	- -	- -	- -	1 4.5
16, 45, 68	- -	- -	1 4.5	- -	1 4.5
16, 18, 58	1 4.5	- -	- -	- -	1 4.5
16, 58, 59	1 4.5	- -	- -	- -	1 4.5
18, 51, 58	1 4.5	- -	- -	- -	1 4.5
18, 33, 56	- -	- -	1 4.5	- -	1 4.5
18, 33, 39	1 4.5	- -	- -	- -	1 4.5
51, 56, 59	1 4.5	1 4.5	- -	- -	2 9
35, 56, 51	1 4.5	- -	- -	- -	1 4.5
33, 56, 51	- -	1 4.5	- -	- -	1 4.5
35, 51, 58	- -	1 4.5	- -	- -	1 4.5
33, 51, 58	- -	1 4.5	- -	- -	1 4.5
33, 56, 59	1 4.5	- -	- -	- -	1 4.5
33, 35, 56	1 4.5	- -	- -	- -	1 4.5
35, 51, 52	- -	1 4.5	- -	- -	1 4.5
Toplam	15 47.5	5 22.5	2 9	- -	22 100

Dörtlü HPV enfeksiyonuna sahip 10 hastanın 9’unda HPV 16 ve diğer HPV tipleri bulunurken, 5’ine HPV 18 eşlik etmektedir. Bir hastada ise HPV 33 ve HPV 35 diğer tiplerle birlikte bulundu (Tablo 13)

Tablo 13. Dörtlü HPV enfeksiyonlarının sitolojik tanıya göre dağılımı

HPV tipi	Normal		LSIL		HSIL		ASCUS		Toplam	
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
16, 18, 35, 56	1	10	-	-	-	-	-	-	1	10
16, 51, 56, 58	-	-	-	-	-	-	1	10	1	10
16, 33, 35, 51	-	-	-	-	-	-	1	10	1	10
16, 33, 51, 56	1	10	-	-	-	-	-	-	1	10
16, 18, 31, 59	1	10	-	-	-	-	-	-	1	10
16, 45, 58, 59	1	10	-	-	-	-	-	-	1	10
16, 18, 31, 39	1	10	-	-	-	-	-	-	1	10
16, 18, 39, 68	1	10	-	-	-	-	-	-	1	10
16, 18, 33, 68	1	10	-	-	-	-	-	-	1	10
33, 35, 51, 56	1	10	-	-	-	-	-	-	1	10
Toplam	8	80	-	-	-	-	2	20	10	100

5. TARTIŞMA

Dünya genelinde her yıl yaklaşık yarım milyon yeni servikal kanser vakası tanınmakta ve yaklaşık yarısı ölümlle sonuçlanmaktadır. Hastalık servikal kanser taramasının ve aşılamanın olmadığı ülkelerde yaygındır. Servikal kanser için 50 yıldan fazla bir süredir taramanın yapıldığı ABD’de bu kanser yaygın değildir ve 2014 yılında 12.360 yeni vaka ve 4020 ölüm görülmüştür. Yeni invaziv servikal kanser tanısı alan kadınların yaklaşık %50’sine daha önce hiç tarama yapılmamıştır. HPV’nin servikal kanserin patogeneziindeki en önemli etken olduğu tespit edilmiştir. HPV öncelikli olarak skuamöz hücreli karsinoma ve adenokarsinomalar olmak üzere bütün servikal kanserlerin %99.7’sinde bulunmuştur. Bütün dünyada HPV servikal kanser dışında anal (%88), vulvar (%43), penil (%50), vajinal (%70) ve orofaringeal (%13-56) kanser ile ilişkilidir⁹¹.

HPV çift sarmallı ikozahedral kapsidi olan bir DNA virusudur. HPV’nin 100’den fazla tipi vardır ve en az 40 tipinin genital bölgeyi enfekte ettiği bilinirken 15 tipi kanser oluşturma potansiyeline sahiptir. Bütün dünyada servikal kanserlerin %90’ına 9 HPV tipi sebep olurken, 16 ve 18 tipleri vakaların üçte ikisinden sorumludur.

Servikal kanser tipik olarak skuamokolumnar kavşaktan köken alan HR HPV ile enfekte hücrelerden gelişir. HPV’nin viral proteinleri E6 ve E7 hücre apoptozisini azaltır ve kontrolsüz hücre çoğalmasına sebep olur. HPV enfeksiyonu ve servikal kanser gelişimi arasındaki etiyolojik ilişki ilk olarak, HR HPV tipleri 16 ve 18’i izole ederek Nobel ödülü kazanan Dr. Harald zur Hausen tarafından 1984 yılında tespit edilmiştir. Sonraki çalışmalarda 14 HR HPV tipi tanımlanmıştır. HPV 16 ve 18 en yaygın tiplerdir ve servikal kanserlerin yaklaşık %70’inden sorumludur⁹².

HPV ile enfekte olan her kadında prekanseröz lezyonlar veya kanser gelişmez. Genç kadınların çoğunda, yaklaşık %90’ında HPV immun sistem tarafından 1-2 yıl içerisinde temizlenir. HPV’nin tespit edilemeyen düzeylerde latent kalması mümkün olsa da, tip spesifik enfeksiyona karşı uzun süreli koruma sağlayan anti-HPV antikorları oluşur. Persistent HPV enfeksiyonu prekanseröz lezyon veya servikal kansere ilerlemede çok daha fazla riske sahiptir. Bu lezyonlar tespit edildiğinde, servikal eksizyonel prosedürler preinvaziv hastalığı ortadan kaldırmada oldukça (%90-95) etkilidir⁹³.

Dr. George Papanicolaou 1920'lerde New York'da Weill Medical College'da servikovajinal sürüntü örnekleri üzerinde çalışmaya başlamış ve ilk kez 1941 yılında ortağı Dr. Herbert Traut ile yayın yapmıştır. Bu test, daha sonra "Pap smear" olarak bilinecektir. Kapsamlı randomize kontrollü çalışmalar testin etkinliğini doğrulamamıştır ve bu sebeple, servikal sitoloji bir tarama testi olarak uygulanmadan önce hiç resmi olarak değerlendirilmemiştir. Ancak, global epidemiyolojik çalışmalar inandırıcı bir şekilde kanser önleme stratejisi olarak etkinliğini göstermiştir. Servikal sitolojinin uygulandığı bölgelerde, servikal kanserin mortalite ve morbiditesi önemli ölçüde (yaklaşık %70) azalmıştır^{92,94,95}.

Geleneksel sitoloji testinin (Pap) yalnızca %51 (%30-87) sensitiviteye ve %98 (%86-100) spesifiteye sahip olduğu gösterilmiştir⁹⁶. Ek olarak, Pap testinin subjektif doğasına bağlı olarak sitolojinin yorumlanmasında gözlemciler arasında önemli farklılık vardır ki bu farklı sensitivite ve spesifite oranlarına ayrıca katkıda bulunur. Yıllık tarama servikal sitolojinin bu düşük sensitivitesini (yani, yanlış negatiflik oranı) yenebilmektedir. Spence ve arkadaşları yaptıkları bir meta-analizde yaygın tarama programları yapılmasına rağmen kadınlarda nasıl servikal kanser geliştiğini anlamaya çalışmıştır. Bu çalışmada 1950 yılından 2007'ye kadar 42 çalışma incelendiğinde invaziv servikal kanseri önlemedeki başarısızlığın yaklaşık %29'unun (%21-40) yanlış negatif sitolojiye bağlı olduğu sonucuna varılmıştır⁹⁷.

Sitolojik taramanın düşük sensitivitesi (%50-75) ile ilişkili kısıtlılığın belirlenmesiyle, HR HPV DNA testi başlangıçta geleneksel taramaya yardımcı bir test olarak geliştirilmiştir. FDA'nın 1999 yılında onayıyla, HR HPV DNA testi, kolposkopi için önemi belirsiz atipik skuamöz hücreleri (atypical squamous cells of undetermined significance; ASCUS) olan hastaların yönlendirilmesinde refleks test olarak önerilmiştir⁹⁸. Ulusal Sağlık Kanser Enstitüsü (National Institute of Health National Cancer Institute), Amerikan Kolposkopi ve Servikal Patoloji Derneği (American Society for Colposcopy and Cervical Pathology; ASCCP) ve Amerikan Kanser Derneği (American Cancer Society; ACS) 2004 yılında toplanmış ve 30 yaş ve üzeri kadınlarda yüksek sensitivite ve spesifite gösteren HR HPV DNA testinin sitoloji testiyle birlikte kullanımını önermiştir. HPV testi, sitoloji ile karşılaştırıldığında daha yüksek bir sensitiviteye ve daha yüksek negatif prediktif değerler ile tekrarlanabilirliğe sahiptir, bu

yüzden servikal kanser taraması için primer test olarak HPV testi kullanılmaya başlanmıştır⁹⁹.

Human papillomavirus aşıları birincil korunmayı sağlar. FDA tarafından ilk HPV aşısı, Gardasil 2006 yılında onaylanmıştır. Gardasil servikal, vulvar ve vajinal lezyonlara sebep olan HPV 6, 11, 16 ve 18'e karşı oldukça yüksek bir düzeyde koruma sağlamıştır¹⁰⁰. HPV 16 ve 18'in sebep olduğu CIN'i hedef alan bivalent aşı Cervarix 2009'da FDA tarafından onaylanmıştır. Her iki aşının da etkinliği virusa maruz kalmadan önce verilirse çok yüksektir. Gardasil'in erkek ve kadın hastalarda anal intraepitelyal lezyonlara karşı koruma sağladığı onaylanmıştır. İmmünizasyon Uygulamaları Danışma Kurulu (The Advisory Committee on Immunization Practices; ACIP), Amerikan Kadın Hastalıkları ve Doğum Uzmanları Birliği (American College of Obstetricians and Gynecologists; ACOG) ve Amerikan Pediatri Akademisi (American Academy of Pediatrics) 11-12 yaşlarındaki çocuklara rutin 3 doz aşılanmayı tavsiye etmiştir. Gardasil erkek ve kadın hastalarda, Cervarix ise sadece kadın hastalarda onaylanmıştır. İmmünizasyon 9 yaşındaki çocuklara ve 26 yaşına kadar 3 doz aşılamayı tamamlamamış olanlara uygulanmalıdır. FDA, Aralık 2014'te Gardasil aşısındaki 4 HPV tipine ek olarak HPV 31, 33, 45, 52 ve 58 tiplerine karşı koruyucu olan Gardasil 9 aşısını onaylamıştır. HPV 16 ve 18 tiplerine ilaveten bu 5 HPV tipi birlikte servikal kanserin %90'ından sorumludur^{100,101}.

Servikal sitolojinin ABD'de yaygın kullanımı servikal kanser insidansında dikkat çekici bir azalma göstermesine rağmen, CIN2+ (CIN2 ve daha ileri lezyonlar) tanısında sadece Pap testinin sensitivitesi sınırlıdır ve yapılan birçok çalışmada %51-55 arasında olduğu tahmin edilmektedir. Bununla birlikte Pap testinin güvenilirliği %50-78 ile oldukça düşüktür. Ayrıca, sitoloji adenokarsinomayı tespit etmede yetersizdir. Pap testi düşük sensitiviteye sahip bir test olmasına rağmen kadınlarda hayat boyunca periyodik olarak tekrarlandığından başarılı olmuştur. Çalışmalar CIN3+'ün kümülatif riskinin önceki taramaya bağlı olmaksızın negatif sitolojik bir testten 3 yıl sonraya kadar %0.17-0.5 olduğunu göstermiştir¹⁰².

Çalışmalarda tek başına sitolojiyle kıyaslandığında HPV testinin daha yüksek sensitiviteye ve negatif prediktif değere sahip olduğu tutarlı bir şekilde görülmektedir.

Katki ve arkadaşları, Kaiser Permanente Northern California (KPNC) sisteminde sitoloji ve HPV DNA testi ile taranmış 300.000'den fazla kadının dahil edildiği

çalışmada, sadece sitolojik test ile 5 yılda CIN3+'ün kümülatif insidansını %4.7 olarak bulmuştur. Diğer taraftan, sitolojiye bakılmaksızın HPV pozitif olanlarda kümülatif insidans %7.6 idi. Başlangıçta sitolojik test negatif olup, ancak HR HPV testi pozitif olanların %5.9'unda 5 yılda CIN3+ gelişmiştir¹⁰³.

Ranco ve arkadaşları, sitoloji veya HPV bazlı tarama için rastgele seçilmiş 176.000'den fazla kadını kapsayan Avrupa'daki 4 çalışmanın verilerini analiz etmiştir. HPV grubuna, kotest ve sadece HPV testi ile tarananlar dahil edilmiştir. Servikal kanser oranları 2.5 yıl sonra sadece sitoloji ve HPV grubu arasında uyumlu olmasına rağmen, HPV testi ile taranan grupta sadece sitoloji testi yapılanlara kıyasla sonraki 5.5 yıl içerisinde kanser %60-70 oranında daha az görülmüştür. HPV bazlı test grubunda prekanseröz lezyonların erken tanısı tedavinin erken yapılmasını ve invazyonun önlenmesini sağlar¹⁰⁴.

Serviksin skuamoz hücreli karsinoma oranı ABD'de azalmasına rağmen, adenokarsinoma yükselişte gibi görünmektedir. Skuamoz hücreli karsinoma gibi adenokarsinoma da HPV ilişkili bir hastalıktır. Skuamoz hücreli karsinomadan sorumlu HPV tipi vakaların %50-60'ında bulunan HPV 16'dır ve HPV 18 vakaların yalnızca %10-20'sinde bulunur. Adenokarsinoma'da bu oran HPV 16 için %30 ve HPV 18 için ise %40-60 ile tam tersidir¹⁰⁵. HPV testinin adenokarsinoma in situ (AIS) ve adenokarsinomayı tespit etmede sitolojiden önemli ölçüde daha etkili olduğu bulunmuştur. Oysa AIS lezyonlarının %60'ı ve adenokarsinomanın %85'i sitoloji negatifken, sırasıyla sadece %20 ve %22'si yüksek riskli HPV için negatif tespit edilmiştir¹⁰³.

Sitolojiye HPV DNA testinin eklenmesiyle sağlanan sensitivitede artış taramaların güvenli bir şekilde daha uzun süreli aralıklarla yapılmasını sağlar. HPV DNA testiyle sitolojiyi kıyaslayan Avrupa'daki bir çalışma 6 ülkede 24.000 kadında CIN3+ için riskin negatif Pap testinden 3 yıl sonra %0.51 ve negatif HPV testinden 6 yıl sonra %0.27 olduğunu göstermiştir⁹⁸. Diğer bir çalışma CIN3+ için kümülatif riskin yalnızca negatif sitolojiden 5 yıl sonra %0.26 ve her iki testin negatif olması durumunda ise 5 yıl sonra %0.08 olduğunu göstermiştir¹⁰⁶. Bunun sonucu olarak 5 yıllık aralarla sitoloji ve HPV testi ile tarama yapılması, sadece sitoloji ile 3 yıl aralarla yapılan taramaya göre daha iyi bir koruma sağlamıştır. İlaveten, bu yöntemle adenokarsinoma ve adenokarsinoma in situ'nun tanısı kolaylaşır.

Yüksek riskli HPV tespiti için FDA onaylı ve klinik olarak geçerli testlerin kullanımı önerilir. Bu testlerin performans özellikleri CIN2, CIN3 ve kanserli vakalarla yapılan büyük randomize klinik çalışmalar baz alınarak açıklanmıştır. Yüksek riskli HPV tanısı için FDA onaylı Hybrid Capture 2, Cervista, Cobas ve Aptima olmak üzere 4 test vardır. Her test ile 13 veya 14 yüksek riskli HPV tipi tespit edilebilir. Bu 4 HPV testi ASCUS sitolojisi olanlarda refleks testi olarak ve 30 yaş ve üzeri kadınlarda servikal kanser taramasında sitoloji ile birlikte ABD’de klinik kullanımı onaylanmıştır. FDA, 25 yaş ve üzeri kadınlar için primer taramada Cobas HPV testinin kullanımını Nisan 2014’te onaylamıştır. ATHENA çalışması sitolojisi negatif, fakat HPV 16 pozitif kadınlarda CIN3+ riskinin %12 ve HPV 16 ve 18 pozitif kadınlarda riskin %10 olduğunu göstermiştir¹⁰⁷. FDA, Cobas testi ile HPV 16 veya HPV 18 pozitif bulunan hastalara direkt kolposkopi yapılmasını onaylamıştır. Diğer 12 yüksek riskli HPV tipinden 1 veya daha fazlası için pozitif olan hastalara sitolojik testin yapılması önerilir. Bu algoritma 25 yaş ve üzeri kadınlarda CIN2 ve CIN3 veya daha ileri lezyonların tespiti için uygundur.

Servikal kanser taramasına cinsel aktivite yaşına bakılmasının 21 yaşında başlanmalıdır. Bu öneri, adolesan ve genç kızlarda görülen displaziye ve HPV enfeksiyonunun doğal seyrine dayanır. Bir üniversitede kız öğrencilerde yapılan bir çalışmada 24 ay süresince HPV enfeksiyonunun kümülatif insidansı %32.3 bulunmuştur¹⁰⁸. Bu yüksek orana rağmen 20 yaşından önceki servikal kanser oranı oldukça düşük 100.000’de 0.1’dir, çünkü bu yaş grubunda HPV enfeksiyonlarının çoğunluğu (%90) kendiliğinden geriler. Yine bir üniversitede kız öğrencilerinin katıldığı benzer bir çalışmada 36 ayda HPV enfeksiyonunun kümülatif insidansı %43 ve enfeksiyonun ortalama süresi 8 aydı. HPV enfeksiyonunun tanısından 12 ay sonra kadınların %70’i artık enfekte değildi ve 24 ay sonra ise sadece %9’u enfekte olmaya devam etmiştir¹⁰⁹.

Adolesan ve genç yaş grubunda HPV enfeksiyonları yüksek oranda kendiliğinden temizlenmesine rağmen, ACOG bu yaş grubuna korunmalı cinsel ilişkiyi ve HPV aşısının yapılmasını önermektedir¹¹⁰.

Tarama aralıkları 21–29 yaş arasındaki kadınlar için sadece sitoloji kullanıldığında her 3 yılda bir yapılmalıdır. Üç yıllık aralarla tarama için bu öneri, yıllık taramaların servikal kanser riskini azaltmada minimal fayda sağladığını ve aynı

zamanda kolposkopik incelemelerin sayısını artırdığını gösteren çalışmalara dayanır. Sitoloji ve HPV testinin birlikte uygulanması bu yaş grubu için tavsiye edilmemiştir, bunun sebebi 30 yaş öncesi grupta yüksek riskli HPV enfeksiyonunun yüksek insidansla görülmesine rağmen enfeksiyonların çoğunun temizlenmesidir. FDA 25 yaşından sonra Cobas HPV testini primer tarama testi olarak onaylamıştır¹¹¹.

Tarama seçenekleri, 30-64 yaş arasındaki kadınlar için her 3 yılda bir sitolojik testin yapılması veya 5 yıllık aralarla sitoloji ile HPV testinin birlikte uygulanmasıdır. ACS, ASCCP ve Amerikan Klinik Patoloji Derneği (American Society for Clinical Pathology) öncelikle 5 yıllık aralarla kotest (sitoloji ve HPV testi) yapılmasını ancak, HPV testi mevcut değilse diğer bir tarama metodu olarak 3 yıllık aralarla sitolojik testin yapılmasını önerir⁹³.

Önceden yeterli taraması yapılan ve 20 yaşına kadar CIN2+ öyküsü olmayan kadınlar 65 yaşında taramadan çıkarılmalıdır. Yeterli tarama, taramadan çıkmadan önceki 10 yıl içinde 3 ardışık negatif Pap testi veya 2 ardışık negatif HPV testi sonucunun alınması, ancak yapılan en son testin son 5 yıl içinde yapılması olarak tanımlanmıştır. Bu gruptaki kadınlara birçok sebepten dolayı taramayı bırakması önerilir. Menapoz sonrası kadınlarda HPV enfeksiyon prevelansı düşer. İlaveten, çalışmalar HPV'den CIN3'e ve invaziv hastalığa ilerlemenin viral enfeksiyonun olduğu yaşa bakmaksızın uzun sürede gerçekleştiğini göstermektedir. Bu sebeple ileri yaştaki kadınlar HPV ile enfekte olsa bile yaşamlarının kalan kısmında invaziv kanser gelişme riski daha azdır. Bu yaş grubunda bildirilen düşük dereceli sitolojik anormallikler büyük bir olasılıkla yanlış pozitif tanıdır. Çünkü bu grupta hastalığın insidansı düşüktür ve aynı zamanda atrofik değişiklikler yanlışlıkla atipik lezyon olarak tanımlanır. Böylece, yanlış pozitif test sonuçları olan postmenapozal kadınların kolposkopiye gönderilmesi masraflı, muhtemelen ağırlı ve endişe verici olup yararı az olacaktır⁹³.

Diplazisi (CIN2+) olmayan ve başka bir sebepten histerektomi yapılan kadınlarda servikal kanser taramasına devam edilemez. CIN2+ lezyonların tedavisinden sonra ise taramaya devam edilmelidir. Prekanseroz lezyonların tedavisinden sonra servikal kanser riski çok düşük olmasına rağmen, tedaviden 20 yıl sonra normal popülasyonda görülen riske göre yüksektir. Bu sebeple tarama 65 yaşını aşısa da, tarama 20 yıl boyunca devam ettirilmelidir.

Genel popülasyon için tarama önerileri yeniden düzenlense de HIV pozitif kadınlar için düzenlemeler son 10 yılda değişmemiştir. HIV pozitif ve solid organ transplantasyonu yapılan kadınlar gibi immun yetmezliği olanlar tanı konulan yılda 2 kere ve sonra yıllık tarama yaptırmalıdır¹¹².

HPV aşısı yapılmış kadınlarda servikal kanser taraması için öneriler değiştirilmemiştir. Aşılar sadece profilaktiktir. Bu sebeple virusa maruz kaldıktan sonra aşılananlar, virusa maruz kalmadan önce aşılananlara göre önemli ölçüde daha az korunur. Cinsel aktivite başlamadan önce aşılanmalıdır¹¹³.

Avustralya'da 2007 yılında okullarda ücretsiz HPV aşılama programı başlatılmıştır. O zamandan beri 15-17 yaşlarındaki kızların %70-72'sine 3 doz aşılama yapılmıştır. Erkekler de 2013'te programa dahil edilmiştir. İmmünizasyon programının başlamasından sonraki dönemde Gardasil aşısıyla HPV 6 ve HPV 11 tiplerinin sebep olduğu genital siğillerde %61 azalma görülmüştür. CIN2 ve CIN3'de de azalma görülmüştür¹¹⁴. Diğer aşılarla benzer şekilde HPV aşısına bağlı ciddi yan etki nadiren görülmesine rağmen bazı ebeveynler güvenlik kaygısı sebebiyle kızlarını aşılatmamıştır. HPV hakkında bilgilerinin olmadığını, kızlarının cinsel olarak aktif olmadığını ve bu sebeple kızlarının aşıya ihtiyacı olmadığını belirtmişlerdir. Üç dozdan daha az aşılanmanın etkinliği ve 9 valanlı yeni HPV aşısının etkinliği ile ilgili devam eden araştırmalar, aşı sonrası dönemde tarama protokollerinin yeniden düzenlenmesine hiç şüphesiz ki katkıda bulunacaktır.

HPV enfeksiyon prevalansı ve HPV genotip dağılımı ile ilgili yapılan çalışmalardan Iftner ve arkadaşları Almanya'da 2010 yılında yaptıkları çalışmada yaşları 10-30 arasında olan 1692 kadında HPV prevalansını ve genotip dağılımını tespit amacıyla Hybrid Capture 2 (HC2) test, PapilloCheck (Greiner Bio-One GmbH) ve SPF₁₀ HPV LiPA₂₅, version 1 (Labo Bio-Medical Products) testlerini uygulamışlardır. HC2 testi ile 377 (%22.28) kadında HPV pozitif sonuç elde edilmiştir. HPV pozitif kadınların oranı %28.3 ile 20-22 yaş grubunda en yüksek bulunmuştur. Baskın HPV tipleri PapilloCheck ile sırasıyla HPV 16 (%23.8), HPV 42 (%19.1), HPV 51 (%16.71) olup diğer HPV tipleri LR HPV 42 (%19.1), HR HPV 51 (%16.7), HR HPV 56 (%10.3) ve HR HPV 31 (%8.8)'dir. Servikal kanserde ikinci en yaygın HPV tipi olan HPV 18 oranı ise %3.2'dir. SPF₍₁₀₎ / LiPA₍₂₅₎ ile ise baskın tipler HPV 16, 51 ve 31 olarak tanımlanmıştır¹¹⁵.

Meloni ve arkadaşları tarafından Güney İtalya'da Cagliari şehrinde 2008-2011 periyodunda 15-76 yaş arası, 650 kadında INNO LiPA HPV genotiplleme testi kullanılarak HPV prevalansı araştırılmıştır. Genel HPV prevalansı %52.6'dır. HPV pozitif kadınlarda HR HPV %68.9 ve multiple (çoklu) enfeksiyon %36.1 oranlarında bulunmuştur. En yaygın tipler HPV 52 (% 23.4), HPV 53 (%15.7), HPV 16 (%15.4) ve HPV 6'dır (%12.4). Anormal sitolojik tanısı olan kadınlar arasında, HPV DNA %49.4 oranında saptanmıştır ve bunların %93.7'si yüksek riskli HPV genotipleridir. ASCUS grubunda HPV 53 (%21.4), LSIL grubunda HPV 52 (%22.5), HSIL grubunda HPV 16 (%27.3) en sık görülen tipler olmuştur¹¹⁶.

Grozdanov ve arkadaşlarının Bulgaristan'da normal ve anormal sitoloji ile kadınlar arasında HPV prevalansı ve HPV tiplerinin dağılımını belirlemek amacıyla 2014 yılında yaptıkları çalışmada 355 kadından alınan servikal sürüntü örnekleri Roche Lineer Array HPV Genotiplleme testi kullanılarak test edilmiş ve 217'sinde (% 61) HPV DNA bulunmuştur. HPV pozitif örneklerin 164'ünde tekli (bütün hastaların %46'sı ve HPV DNA pozitif hastaların %76'sı) ve 53'ünde birden fazla (bütün hastaların %15'i ve HPV DNA pozitif hastaların %24'ü) HPV tipi tespit edilmiştir. En yaygın HPV tipi 61 örnekte bulunan HPV 16'dır. Sonraki en yaygın HPV tipi ise örneklerin 14'ünde bulunan HPV 33 olmuştur. HPV enfeksiyonunun %61 ile yüksek oranda görüldüğü ve HPV aşılı ile servikal kanserden primer korunmanın yanı sıra tarama ile ikincil korunmanın da önemi vurgulanmıştır¹¹⁷.

Salcedo ve arkadaşları, Meksika'da HPV tiplerinin yaygınlığını belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada 2956 servikal örnekte genel HPV prevalansı %67.1'dir. Toplam 40 HPV tipi bulunmuştur. HPV pozitif örneklerin % 39.4'ünde HPV 16 bulunmuş olup bunu HPV 18 %7.5, HPV31 %7.1, HPV 59 %4.9 ve HPV 58 %3.2 oranlarla izlemiştir. HPV 16 en çok HPV 31, 33, 45, 52 ve 58 ile yüksek birliktelik göstermiştir. HPV genotiplerinin belirlenmesinin aşılamanın başlamasında ve gelecekteki servikal kanser önleme stratejilerin etkisini değerlendirmede önemli olduğu belirtilmiştir¹¹⁸.

Yousefzadeh ve arkadaşlarının 2014'de İran'da yaptıkları çalışmada jinekoloji kliniğine başvuran yaşları 18-65 arasında değişen toplam 851 kadında HPV prevalansının tespiti için PCR ve Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) kullanılmıştır. Örneklerin %31.1'inde 19 farklı HPV tipi tespit edilmiştir. Genel HPV

enfeksiyonu yanı sıra HR HPV tipleri ile enfeksiyon 18-25 yaş grubundaki kadınlarda en yüksek oranda olup yaşla birlikte azalmıştır. HPV 16 ve HPV 18 prevalansı sırasıyla %7.3 ve %2.8 bulunmuştur ve kadınların %20.2'si HPV 16 ve/veya HPV 18 dışındaki HR HPV tipleri ile enfektidir. HPV koenfeksiyon prevalansı HPV pozitif hastalarda %29.1 bulunmuştur ve LSIL grubunda %18.2 iken HSIL grubunda % 3.9 oranla daha düşüktür¹¹⁹.

Moga ve arkadaşları Romanya'da Ocak 2012 ve Mayıs 2013 tarihleri arasında Braşov'da jinekoloji kliniğine başvuran 1000 kadında HPV genotiplerinin prevalansını belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada Linear Array HPV Genotipleme testi ile 35 farklı HPV genotipi servikal sitoloji örneklerinin %39.6'sında tespit edilmiştir. En yaygın görülen HPV tipleri sırasıyla HPV 16 (%26.01), HPV 6 (%13.38), HPV 31 (%12.2), HPV 53 (%12.2), HPV 51 (%10.35), HPV 62 (%9.34), HPV CP6108 (%9.34), HPV 18 (%8.58), HPV 54 (%8.58) ve HPV 84 (%8.58) bulunmuştur. HPV enfeksiyonlarının anormal servikal sitolojinin de en yüksek orana ulaştığı 25 yaşın ($p<0.0001$), altındaki genç kadınlarda en yüksek (%54.93) olduğu gözlenmiştir. HPV 16 veya HPV 18 ile enfekte hastalarda anormal servikal sitoloji en yüksek prevalansta idi. HPV pozitif 396 hastadan 121'inde (%30.55) anormal sitoloji görülmüştür. Anormal servikal sitoloji genel prevalansı (ASCUS, LSIL, HSIL) %19.9 idi. Anormal sitolojili 199 kadının 96'sı (%48.2) HR HPV tipleri ile enfekte iken % 3'ten azı sadece LR HPV tipleri ile enfekte idi. HR HPV tipleri ile enfekte hastalarda ASCUS, LSIL ve HSIL prevalansı, sırasıyla %15.5, %10.34 ve %7,24 iken sadece LR HPV tipleri ile enfekte hastalarda ise %6.8, %4.54 ve %2.27 idi. HR HPV tipleri 26 ve 35 yaş arası kadınlarda en yüksek prevalans (%75.5) ile en yaygın tiplerdi (genel HPV prevalansının %73.23) ve sonradan yaşa bağlı bir azalma göstermiştir. Tek bir HPV tipi ile enfeksiyon olguların %42.93'ünde (170/396 pozitif örnek) gözlenmiştir. Birden fazla HPV genotipi ile koenfeksiyon (bir örnekte farklı HPV tiplerinin sayısı 9'a ulaşan) olguların %57.07'sinde (226/396 pozitif örnek) bulunmuştur. HPV koenfeksiyonu oranının 25 yaş altındaki kadınlarda pik (%68.87) yaptığı gözlenmiştir. Tekli HR HPV enfeksiyonu 16 olguda, çoklu HR HPV tiplerinin kombinasyonları 20 olguda bulunmuştur. Böylece 15 olguda 2 HR HPV tipi, 3 olguda 3 HR HPV tipi ve birer olguda da 4 ve 5 HR HPV tipi bulunmuştur. Koenfeksiyonlarda en yaygın görülen HR HPV tipi HPV 16 idi. Romanya'da kadınlar arasında yüksek riskli HPV prevalansının diğer coğrafi

bölgelerdeki çalışmalara kıyasla daha yüksek olduğu belirtilmiştir. Böylece, HR HPV enfeksiyonların sıklığında artış olduğu yerlerde, HPV genotiplemesinin 18 ile 45 yaş arasındaki tüm kadınlara yapılması ve yüksek riskli HPV enfeksiyonu olan kadınlarda önceden normal servikal sitoloji olsa bile 6 ayda bir Pap testi yapılması önerilmiştir¹²⁰.

Lewis-Bell ve arkadaşları 2010 yılında Jamaika’da yaptıkları çalışmada 16-49 yaş arası 852 kadında HPV tiplerinin prevalansını araştırmak için yaptıkları çalışmada HPV DNA 852 kadından 460’ında (%54) tespit edilmiştir. Onkojenik HPV prevalansı ise %34.9 (297/852) olarak belirlenmiştir. HPV 16/18 %10.1 oranla 86 kadında bulunmuştur. En sık görülen HPV tipleri: HPV 16 (%6.2), HPV 35 (%6), HPV 62 (%5.5) ve HPV 83 (%5.5), HPV 61 (%5.4)ve HPV 58 (%5.4), HPV 84 (%4.7), HPV 18 (%4.3), HPV 66 (%4.2) ve HPV 81 (%4.2) olarak tespit edilmiştir. HPV 52 %3.6, HPV 45 %3.5, HPV 51 %3.3, HPV 31 %2.7, HPV 68 %2.3, HPV 56 %2.2, HPV 59 %2.2 ve HPV 33 %1.4 oranlarında bulunmuştur¹²¹.

Lindemann ve arkadaşları 2010 yılında İspanya’da 1001 kadında HR HPV prevalansını tespit için Hybrid capture assay (Digene Corp. Gaithersburg, MD) kullanmıştır. Kadınların 198’i normal sitoloji, 498’i LSIL ve 205’i HSIL sitolojisine sahipti. HPV 16 normal sitolojisi olan kadınlarda %17.8, LSIL grubunda % 22.3 ve HSIL grubunda %60 oranları ile üç grupta da en yaygın HR HPV tipi olarak bulunmuştur. HPV 18 tüm gruplarda çok düşük prevalansda gözlenmiştir. HPV 31, HPV 58 ve HPV 52 gibi diğer HR HPV tipleri HSIL hastalarında önemli oranlarda bulunmuştur. Normal sitolojili hastalarda en yaygın HR HPV tipleri HPV 16 (%17.8), HPV 31 (%12.8) ve HPV 52 (%12.4)’dir. LSIL grubunda ise HPV 16 (%22.3), HPV 53 (%15.9) ve HPV 51 (%14.1)’dir. HSIL sitolojili kadınlarda en yaygın HR HPV tipleri HPV 16 (%60), HPV 31 (%15.1), HPV 58 (%12.2) ve HPV 52 (%9.3) idi. Karsinojenik HPV tiplerinin prevalansında coğrafik varyasyon olabileceği ve HPV testleri ve aşı tasarımı için dikkate alınmasının gerekliliği belirtilmiştir¹²².

De Jonge ve arkadaşlarının HPV genotip dağılımını tespiti için yaptıkları çalışmaya Almanya’da 2008-2010 döneminde 3381 kadın dahil edilmiştir. Genel HPV pozitifliği normal sitolojili kadınlarda %29.8, ASCUS grubunda %49.5, ASC-H (Atypical squamous cells, cannot rule out high grade squamous intraepithelial lesion; HSIL ekarte edilemeyen atipik skuamoz hücreler) grubunda %63.2, LSIL grubunda %89.8 ve HSIL grubunda %93.9 oranlarında iken HR HPV pozitifliği normal sitolojili

kadınlarda %26, ASCUS grubunda %43.2, ASC-H grubunda, %62.1, LSIL grubunda %78.9 ve HSIL grubunda %91.9 bulunmuştur. En yaygın HPV tipleri normal sitolojili kadınlarda HPV 51 (%6.8), HPV 16 (%4.9) ve HPV 42 (%4.9), ASCUS grubunda LR HPV 42 (%9.9) olup bunu HR HPV 51 (%8.6) izlemiştir. ASC-H grubunda HPV 16 (%28.7) ve HPV 31 (%12.6), LSIL grubunda HPV 42 (%23.8) ve HPV 16 (%17.5) ve HSIL grubunda HPV 16 (%34.4), HPV 51 (%19) ve HPV 31 (%16.2) bulunmuştur. HPV 16 ve 18 ile enfeksiyonlar ASCUS (%10) ve LSIL (%21.1) ile karşılaştırıldığında HSIL (%39.7) ve ASC-H (%32.2) grubunda daha yaygındı. Multiple HPV enfeksiyonu normal sitolojili kadınlarda %10.7, ASCUS grubunda %16.7, ASC-H grubunda %21.8, LSIL grubunda %42.4 ve HSIL grubunda %46.2 oranlarında bulunmuştur¹²³.

Heard ve arkadaşları Fransa'da 2013 yılında yaptıkları çalışmada PapilloCheck genotiplleme testi kullanarak 6189 kadında HPV tiplerinin dağılımını araştırmıştır. Kadınların servikal sitoloji sonucu 3023'ünde (%40.1) normal, 1070'inde (%35.2) ASCUS, 1179'unda (%32.1) LSIL, 867'sinde (%37.1) HSIL ve 50'sinde (%48.2) kanser idi. HPV 16 ve/veya 18 (diğer HR HPV tipleri ile veya olmadan) prevalansı HSIL grubunda %47.2, LSIL grubunda %20.2 ve normal sitoloji kadınlarda %3.9 idi. Genel HR HPV oranları normal sitolojili kadınlarda %13.7, ASCUS grubunda %48.3, LSIL grubunda %68.9 ve HSIL grubunda %84.4 bulunmuştur. HPV 16 bütün servikal lezyonlarda en yaygın tip olup normal sitolojili kadınlarda %3 ve ASCUS grubunda %14.7, LSIL grubunda %20.9 ve HSIL grubunda %50.9 arasında değişmiştir¹²⁴.

Aguilar-Lemarroy ve arkadaşları 2015 yılında Meksika'da yaptıkları çalışmada jinekoloji kliniğine başvuran 18-87 yaş arası 822 kadında tip spesifik HPV enfeksiyon oranları araştırılmıştır. HPV tespiti için Linear Array genotiplleme testi kullanılmıştır. HPV enfeksiyonu kontrol grubunda %12.4, CIN1 olanlarda %46.3 ve CIN3 veya servikal kanseri olanlarda %100 bulunmuştur. HPV 16 tüm gruplarda en yaygın tip olmuştur. Servikal kanserde en çok bulunan HPV tipleri 16, 18, 45, 52, 58 ve 39 idi. Kontrol grubu kadınlarda ise HPV 16, 62, 51, 84, 18, 53 ve CP6108 en yaygın görülen HPV tipleri idi. Sadece HPV pozitif örnekler göz önüne alındığında, koenfeksiyonlar kontrollerde (%63) ve servikal kanser (%26) olanlardakine göre daha fazla sıklıkta idi. Kontrol grubu kadınlarda HPV 16 ile koenfeksiyonlar en çok HPV 62, 51 ve 84 ile görülürken servikal kanser grubunda ise HPV 18, 39 ve 70 ile idi. Sonuç olarak, servikal kanserde HPV 16, 18, 45, 39, 58, 52 ve 71 tipleri %78 oranında bulunmuştur.

Bunlar arasında, %65'inden sadece HPV 16 ve HPV 18 sorumlu idi. Bu sebeple, yeni aşıların tasarımında bu HPV tiplerinin dikkate alınması ve öncül lezyonlarda HPV 16 ile koenfeksiyon yapan belirli HPV tiplerinin kanserin ilerlemesi ve regresyonundaki rolünün olup olmadığının belirlenmesi savunulmuştur¹²⁵.

Ülkemizde HPV prevalansı ve genotip dağılımlarının araştırıldığı çalışmalardan Fındık ve arkadaşları Konya'da 2012'de yaptıkları çalışmada 250 servikal örnekten 29'u (%11.6) sadece yüksek riskli, 12'si (%4.8) sadece düşük riskli ve 7'si (%2.8) yüksek ve düşük riskli HPV birlikte pozitif olmak üzere toplam 48 (%19.2) örnekte HPV DNA saptanmıştır. Yüksek riskli HPV genotiplerinden HPV 16 %18.7 ve HPV 30'lar ve HPV 50'ler birlikte %12.5 oranında tespit edilmiştir. Böylece hastaların %14.4'ünde (36) HR HPV bulunduğu gözlenmiştir. Multiple HR HPV enfeksiyonu 11 (%22.9) vakada bulunmuştur. Tek başına veya multiple enfeksiyon şeklinde HPV 16 prevalansı %6.4 (16/250) iken HPV 18 prevalansı ise %0.4 (1/250) bulunmuştur. Sonuç olarak çalışmada yüksek riskli tiplerden olan HPV 16 en yüksek oranda saptanırken diğer tipler ise farklı sıklıklarda belirlenmiştir. Ülkemizde HPV DNA ve HPV tiplerinin prevalansının saptanması ve HPV aşısının kapsadığı popülasyonun belirlenmesi için benzer demografik özelliklere sahip hasta ve kontrol gruplarının katıldığı ve standart bir yöntemin kullanıldığı geniş kapsamlı çalışmalara ihtiyaç olduğu savunulmuştur¹²⁶.

Yüce ve arkadaşlarının Ankara'da 2012'de yaptığı çalışmaya Hacettepe Üniversitesi hastanesine başvuran kadınlarda HPV prevalansını araştırmak amacıyla ortalama yaşı 39.5 (20-70 yaş) olan 890 hasta dahil edilmiştir. HPV genotiplemesi için Seeplex HPV 18-Plex genotipleme testi kullanılmıştır. HPV tespiti ile eşzamanlı olarak Pap testi için sıvı bazlı sitoloji kullanılmıştır. HPV prevalansı %25.7 iken HR HPV prevalansı ise %23 bulunmuştur. HPV pozitif kadınların %89.5'inde en az bir yüksek riskli HPV tipi tespit edilmiştir. En yaygın HPV tipleri sırasıyla HPV 16, HPV 31 ve HPV 51'dir. Anormal servikal sitoloji oranı %11.6'dır. HPV pozitiflik oranı, normal sitolojili kadınlara (%22) kıyasla anormal servikal sitolojisi olan kadınlarda (%54.4) anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Normal sitolojisi olan 640 kadında HPV pozitifliği %21.4 (137), HR HPV pozitifliği %19.7 (126) ve multiple HPV pozitifliği %3.4 (22) olup bu oranlar anormal servikal sitolojisi olan 80 kadında sırasıyla %48.8 (39), %43.8 (35) ve %10 (8)'dur. HR HPV prevalansı %23 iken (205), LR HPV %4.9 (44), HR HPV ve LR HPV %2.2 (20), multiple HPV %6.1 (54) ve multiple HR HPV %4.7 (42)

oranlarındadır. En baskın tip HPV 16 %11.9 (106) oranında olup bunu sırasıyla HPV 31 %4.4 (39), HPV 51 %4.4 (39), HPV 33 %2 (18), HPV 52 %1.2 (11), HPV 18 %1.1 (10), HPV 68 %1.1 (10), HPV 56 %0.7 (6), HPV 39 %0.6 (5), HPV 58 %0.4 (4), HPV 35 %0.3 (3), HPV 59 %0.3 (3), HPV 66 %0.2 (2), HPV 45 %0.1 (1) ve HPV 53 %0.1 (1) izlemiştir. Sonuç olarak servikal HPV enfeksiyonunun hastane bazlı bu verilere göre önemli olduğu bildirilmiştir¹²⁷.

Özcan ve arkadaşları Ankara’da, 2011’de yaptıkları çalışmada 501 kadında HR HPV prevalansı Digene Hybrid Capture 2 testi ile %4.2 (21) bulunmuştur. HR HPV pozitifliği anormal sitolojik sonucu olan kadınlarda %19 olup normal sitolojik sonucu olan kadınlara (%3.5) göre anlamlı derecede yüksek tespit edilmiştir¹²⁸.

Şahiner ve arkadaşlarının 2012’de Ankara’da yaptığı araştırmada MY09/11 konsensus real-time PCR ve tip spesifik RT-PCR olmak üzere iki farklı yöntemle 356 servikal sürüntüde 2 LR HPV ve 11 HR HPV DNA’nın varlığı analiz edilmiştir. Toplam 142 farklı izolattan 95’i HR HPV ve 39’u LR HPV olup sekiz izolat tanımlanmamıştır. Böylece toplam 109 (%30.6) örnek iki yöntemden en az biri ile pozitif bulunmuştur. HPV pozitif örneklerde yüksek riskli HPV tiplerinin prevalansı; HPV 16; 32 (%33.7), HPV 52; 12 (%12.6), HPV 58; 11 (%11.6), HPV 18; 7 (%7.4), HPV 31; 7 (%7.4), HPV 35; 7 (%7.4), HPV 68; 6 (%6.3), HPV 33; 4 (%4.2), HPV 82; 4 (%4.2), HPV 39; 3 (%3.2) ve HPV 45; 2 (%2.1) bulunmuştur. Sitopatolojik incelemeye göre örneklerin 84’ünde (% 23.6) sitolojik atipi tespit edilmiştir. Tanımlanamayan izolatlar hariç 101 servikal örneğin 72’sinde (%71.3) tek HPV tipi bulunurken 29’unda (%28.7) çoklu HPV enfeksiyonu tespit edilmiştir. HPV 18, HPV 33 ve HPV 35, sırasıyla, tekli enfeksiyonlarla kıyaslandığında çoklu enfeksiyonlarda sırasıyla 7.4, 3.7 ve 3.0 kat daha yüksek tespit edilmiştir. Ülkemizde prevalans verilerinin büyük ölçekli çalışmalarda yeni nesil tarama ve tanı testleri kullanarak sürekli güncelleştirilmesi gerektiği belirtilmiştir¹²⁹.

Yine Şahiner ve arkadaşlarının Ankara’da 2014 yılında yaptığı çalışmada MY09/11 konsensus real-time PCR ve 20 farklı HPV tipini tespit eden TaqMan tabanlı tip spesifik real-time PCR yöntemi ile jinekoloji kliniğine başvuran 654 kadında %34.1’i (223/654), en az bir yöntemle HPV DNA pozitif bulunmuştur. MY09/11 PCR ve tip spesifik PCR testlerinin duyarlılıkları sırasıyla %80.7 (180/223) ve %97.8 (218/223) idi. Toplam 352 farklı HPV izolatu (66 düşük riskli ve 286 yüksek riskli veya

olası yüksek riskli tipleri) 218 örnekte tespit edilmiştir, ancak konsensus PCR ile pozitif 5 örnekte genotip tanısı yapılamamıştır. Yüksek riskli veya olası yüksek riskli 286 HPV tipinin dağılımı; %24.5 HPV 16, %8.4 HPV 52, %7.7 HPV 51, %6.3 HPV 39, %6.3 HPV 82, %5.6 HPV 35, %5.6 HPV 58, %5.6 HPV 66, %5.2 HPV 18, %5.2 HPV 68 ve %19.6 oranla diğer 8 HPV genotipleri olarak rapor edilmiştir. Tekli HPV enfeksiyonu örneklerin %57.3'ünde (125/218) ve çoklu HPV enfeksiyonu ise kalan %42.7'sinde (93/218) bulunmuştur. MY09/11 PCR testi ile yanlış negatif oranları tekli enfeksiyonlarda %17.4, çoklu enfeksiyonlar %23.3 ve 3 veya daha fazla HPV tiplerini içeren çoklu enfeksiyonlarda ise %34.6 olarak bulunmuştur. Bu verilere göre sadece konsensus PCR testinin kullanılması durumunda önemli veri kaybı olabileceği ve servikal kanser tarama sırasında tip spesifik PCR testleri ile daha doğru ve güvenilir sonuçlar sağlayabileceği bildirilmiştir¹³⁰.

Şahiner ve arkadaşlarının Ankara'da 2014 yılında servikal sürüntü örneklerinde HPV DNA varlığının MY09/11 konsensus PCR, TaqMan tabanlı tip spesifik real-time PCR ve SYBR Green tabanlı multipleks PCR olmak üzere üç farklı yöntem kullanılarak araştırıldığı diğer bir çalışmada ise toplam 315 örneğin %21.6'sında (68/315) üç yöntemden en az biri ile HPV DNA pozitif bulunmuştur. MY09/11 PCR, tip spesifik PCR ve multipleks PCR testlerinin göreceli duyarlılıklarının sırasıyla %86.8 (59/68), %91.2 (62/68) ve %91.2 (62/68) olduğu tespit edilmiştir. HPV DNA pozitif 68 örneğin 62'sinde genotipleme analizi yapılabilmektedir. Genotipleme analizi sonucu tanınan 77 izolatin 8'inin LR HPV ve 69'unun HR HPV olduğu belirlenmiştir. Toplam 69 yüksek riskli HPV suşunun genotip dağılımına bakıldığında HPV 16 %37.7, HPV 52 %13, HPV 58 %11.6, HPV 18 %7.2, HPV 31 %7.2, HPV 68 %7.2, HPV 35 %4.3, HPV 39 %4.3, HPV 82 %4.3, HPV 33 %1.4 ve HPV 45 %1.4 oranlarında tespit edilmiştir. Sadece konsensus PCR testinin kullanılmasının önemli epidemiyolojik veri kaybına sebep olabileceği ve SYBR Green tabanlı multipleks PCR testinin daha duyarlı olduğu ve tip spesifik PCR testine göre maliyetin daha düşük olduğu bildirilmiştir. Ayrıca tip spesifik HPV DNA testi ile taramanın daha güvenilir sonuçlar verebildiği, ancak testin tip spektrumu yeterince büyük değilse konsensus PCR testi ile kombine kullanılması önerilmiştir¹³¹.

Tuncer ve arkadaşlarının Ankara'da yaptığı retrospektif çalışmada Hacettepe Üniversitesi Hastanesi'nde 2002 ve 2009 yılları arasındaki 1797 servikal örneğin HPV

sonuçları incelenmiştir. INNO-LiPA HPV genotiplleme testi ve Seeplex HPV 18-plex genotiplleme testi HPV tiplerini belirlemek için kullanılmış ve HPV DNA 1797 örneğın 404'ünde (%22.4) tespit edilmiştir. Ayrıca 194 örnekte HPV DNA tanınmış, ancak genotiplleme sonucu mevcut değildir. En baskın genotipin %49 (103) oranla HPV 16 olduğu gözlenmiştir¹³².

Eren ve arkadaşlarının çalışmasında İstanbul'da 2008 yılında 1 Mayıs ve 31 Ağustos arasında toplam 492 kadından alınan servikal sitolojik örnekler 35 HPV tipini tespit edebilen Clinical Arrays Papillomavirus kit (Genomica, Madrid, Spain) ile test edilmiştir. HPV prevalansı %16.5 (81/492) olup enfekte kadınların %35.8'inde (29/81) multiple HPV genotipleri bulunmuştur ve 81 HPV tipinin %75'inin (61/81) HR HPV olduğu tespit edilmiştir. Böylece HR HPV prevalansı ise %12.4 (61/492)'dür. HPV 16 prevalansı % 34 (28) olup HPV 6 %12 (10); HPV 53 %11 (9); HPV 59, HPV 35 ve HPV 66 tiplerinin her biri %10 (8) oranlarında bulunmuştur. Diğer HPV tipleri HPV 58 %6 (5), HPV 31 %5 (4), HPV 51 %5 (4), HPV 52 %5 (4), HPV 56 %4 (3), HPV 18 %4 (3), HPV 33 %1 (1) ve HPV 45 %1 (1) oranlarındadır. İki HPV tipi, 23 kadın (%79.3) ve 3 HPV tipi 4 kadında (%13.8) bulunmuştur. Beş ve 6 HPV tipi 2 kadında (%6.9) tespit edilmiştir. Multiple enfeksiyonlarda en yaygın HPV tipleri HPV 16 (%34.5), HPV 59 (%27.6) ve HPV 53 (% 21)'dür. Multiple enfeksiyonların çoğu %62 (18/29) sadece HR HPV tipleri ile oluşmuştur. LR HPV tipleri ile çoklu enfeksiyonlar olguların sadece 2'sinde (%6.9) görölmüştür. Enfekte kadınların %79'u normal sitolojiye sahip olup %3.7'sinde ASCUS, %10'unda LSIL ve %6'sında HSIL tespit edilmiştir. En yüksek enfeksiyon oranları 20 ile 30 yaş arası kadınlar için %36 iken 31 ve 40 yaş grubu için %35'dir. Türkiye'de HPV tiplerinin prevalansı ile ilgili bilgilerin aşılama programlarının geliştirilmesine rehberlik edebileceğı bildirilmiştir¹³³.

Tezcan ve arkadaşlarının Mersin'de 2014 yılında yaptığı çalışmada 476 servikal sitoloji örneğinin 106'sı (%22.3) nested PCR testi ile HPV pozitif bulunmuştur. Nested PCR testinde konsensus primerler MY09 ve MY11 ve inner primerler GP5+ ve GP6+ kullanılmıştır. Genotipin tespiti için BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) ile dizi analizi yapılmıştır. Ayrıca HPV16, 18, 31, 33 ve 45-E6 / E7 mRNA ekspresyonu için tip spesifik real-time NASBA testi (NucliSENS EasyQ, HPV v1.1) kullanılmıştır. HPV varlığının LSIL (%42.9, 6/14), ASC-US (%29.7, 22/74) ve normal sitoloji (%18.9, 72/380) ile karşılaştırıldığında

HSIL örneklerinde (%75, 6/8) ($p < 0.001$) anlamlı olarak daha yüksek olduğu gözlenmiştir. En yaygın genotipler, HPV pozitif örnekler arasında azalan sıklık sırasına göre HPV 66 (%22.6, 24/106), HPV 16 (%20.8, 22/106), HPV 6 (%14.2, 15/106), HPV 31 (%11.3, 12/106), HPV 53 (%5.76, 6/106), HPV 83 (%4.7, 5/106), HPV 18 (%1.9, 2/106) HPV 45 (%1.9, 2/106) ve HPV 58 (%0.9, 1/106) olarak bulunmuştur. Böylece HR HPV prevalansının %14.5 olduğu (69/476) gözlenmektedir. HPV E6/E7 onkogen mRNA pozitifliğinin (12/476, %2.5) DNA pozitifliğine (38/476, %7.9) göre daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak HPV 66, HPV 16, HPV 6, HPV 31, HPV 53 ve HPV 83'ün baskın tipler olduğu bulunmuştur¹³⁴.

Kasap ve arkadaşları 2011'de İzmir'de 642 kadının (anormal servikal sitolojili 96 kadın ve normal sitolojili 546 kadın) dahil edildiği çalışmada HPV tanısı için MY09/11 ve GP5+/GP6+ primerlerinin kullanıldığı nested PCR testini takiben genotipleme için reverse hibridizasyon Line-probe assay kullanmıştır. HPV DNA prevalansı çalışma popülasyonunda %38.9 bulunmuştur. HPV DNA servikal kanseri olan kadınların %78.3 ve HSIL olan kadınların %76.9'unda tespit edilmiştir. Anormal servikal sitoloji, HPV DNA pozitif olguların %30'unda ve HPV DNA negatif olguların %5.4'ünde gözlenmiştir. HPV DNA pozitif 250 örneğin genotiplemesi sonucu 51 örnekte HR HPV ve 199 örnekte LR HPV tanınmıştır. Normal sitolojili 546 kadının 130'unda (%23.8), ASCUS tanılı 9 kadının 6'sında (%66.6), ASC-H tanılı 4 kadının 3'ünde (%75), LSIL tanılı 34 kadının 24'ünde (%70.5), HSIL tanılı 26 kadının 19'unda (%73) ve servikal kanser tanılı 23 kadının 17'sinde (%73.9) HR HPV bulunmuştur¹³⁵.

Demir ve arkadaşlarının normal sitolojili kadınlarda HPV tiplerinin prevalansını tespiti için yaptığı araştırmada Şubat 2010 ve Ocak 2011 arasında Türkiye'nin dört farklı bölgesinden beş merkezden yaşları 15 ile 68 arasındaki 582 klinik olarak sağlıklı kadından servikal sürüntü örnekleri alınmıştır. Normal sitolojisi olan 530 kadın çalışmaya dahil edilmiştir. Pozitif örnekler Line Blot test ile 37 farklı HPV genotipi için analiz edilmiştir. HPV, sitolojisi normal kadınların %17.9'unda pozitif bulunmuştur. HPV prevalansı 25-29 yaş (%31.8) yaş grubunda en yüksek iken artan yaşla birlikte azalmıştır. En yaygın tip HPV 16 olup (%3.6) bunu HPV tip 6 (%2.6) ve HPV tip 45 (%2.2) izlemiştir. HPV tip 11 ve 18 (sırasıyla %0.6 ve %0.4) düşük oranlarda bulunmuştur. Normal Pap smear olan kadınlarda HPV'nin yaşa spesifik dağılımı Avrupa ülkeleri ve ABD'de görülenin aksine U-şeklinde bir eğri göstermemiştir¹³⁶.

Aslan ve arkadaşları Eskişehir’de 2016 yılında servikal kanser taraması için iki farklı moleküler yöntemle kadınlarda HPV DNA varlığını araştırmak için yaptıkları çalışmada Kanser Erken Teşhis Tarama ve Eğitim Merkezi’ne (KETEM) başvuran yaşları 30-65 arasında değişen 1081 kadına ait servikal örnekler ilk aşamada Hybrid Capture 2 (HC2; Qiagen, Germany) metod ile test edilmiştir. Çalışmanın ikinci bölümünde, konsensus real-time PCR (Takara Bio Inc. Japonya) ile HC2 pozitif ve rastgele seçilmiş negatif örneklerden toplam 152 örnek analiz edilmiştir. Ardından pyrosequencing metod (Diatech Pharmacogenetics S.R.L, Italy) ile HPV genotipleri tespit edilmiştir. Çalışmanın ilk bölümünde, HC2 testi ile kadınların % 3’ü (32/1081) pozitif bulunmuştur. Çalışmanın ikinci bölümünde seçilen 152 örneğin 32’si (%21.1) HC2 testi ile pozitif, 40’ı (%26.3) Pap smear pozitif ve 53’ü (%34.9) konsensus RT-PCR ile pozitif idi. HC2 pozitif olan 32 örneğin tümü RT-PCR ile pozitif ancak, 21 örnek HC2 testi ile negatif, RT-PCR ile de pozitif idi. Pap smear pozitif (anormal sitoloji) olan 40 örnek arasında, HPV DNA 9’unda (%22.5) RT-PCR ile pozitif olup, HC2 testi ile ise 5’inde (%12.5) pozitifdir, ancak HPV DNA her iki test ile de 31 örnekte (%77.5) saptanmamıştır. Genotipleme 44 örnekte yapılmıştır ve en yaygın tip HPV tip 16 (15, %34.1) olup ardından HPV 90 (11, %25) ve HPV 18 tip (%9.1) izlemiştir. Pap smear testinin sensitivite, spesifite, pozitif ve negatif prediktif değerleri, HC2 sonuçlarına göre, sırasıyla %16.1, %96, %10.6 ve %97.5 olarak bulunmuştur. Buna ek olarak, HC2 ve konsensus RT-PCR yöntemleri arasında uyum yüksek tespit edilmiştir (Cohen's kappa: 0.665). Servikal kanser taramasında Pap smear testine ek olarak moleküler tanı yöntemlerinin uygulanması gerekliliği bildirilmiştir¹³⁷.

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Jinekoloji bölümüne başvuran 1145 kadında HPV genotip prevelansını pyrosequencing testi ile araştırdığımız çalışmanın sonuçlarına göre HR HPV prevalansı %20 (229) olarak tespit edildi. Toplam 1145 kadının HPV pozitif olan %7.9’u 30-39 ve %5.9’u 40-49 yaş gruplarında bulunmuş olup diğer yaş gruplarına göre daha yüksek oranlarda görüldü. (Tablo 2)

Servikal sürüntü örnekleri sitolojik olarak incelendiğinde kadınların %6.8’inin anormal sitolojisi olup; %4’ünün LSIL, %1.6’sının HSIL, %1.2’sinin ASCUS ve %93.2’sinin normal sitolojili olduğu tespit edildi. (Tablo 3)

Anormal sitolojisi olan 78 hastanın %62.8’inde ve normal sitolojisi bulunan 1067 kadının %16.8’inde HPV DNA bulundu. Bu gruptan LSIL pozitif hastaların

%60'ı, HSIL pozitif hastaların %84.2'si, ASCUS pozitif hastaların %42.8'i HPV DNA pozitif tespit edildi. (Tablo 4)

Kadınlarda tekli veya multiple enfeksiyon şeklinde %9.4'ünde HPV tip 16, %4.8'inde HPV 18, %1.7'sinde HPV 31, %2.2'sinde HPV 33, %1.7'sinde HPV 35, %1.9'unda HPV 39, %0.4'ünde HPV 45, %2.5'inde HPV 51, %0.2'sinde HPV 52, %4'ünde HPV 56, %1.1'inde HPV 58, %0.9'unda HPV 59, %0.4'ünde HPV 66 ve %0.5'inde HPV 68 bulundu. (Şekil 8)

HPV pozitif bulunan 229 vakanın servikal sürüntü örneklerinin sitoloji sonuçları incelendiğinde %78.6'sının normal, %11.8'inin LSIL, %7'sinin HSIL, %2.6'sının ASCUS olduğu tespit edildi. (Tablo 5)

HPV pozitif 229 hastanın genotip dağılımına bakıldığında tekli veya çoklu enfeksiyon şeklinde %47.1'i HPV 16, %24'ü HPV 18, %8.2'si HPV 31, %10.9'u HPV 33, %8.2'si HPV 35, %9.6'sı HPV 39, %2.1'i HPV 45, %12.6'sı HPV 51, %0.8'i HPV 52, %20'si HPV 56, %5.6'sı HPV 58, %4.8'i HPV 59, %2.1'i HPV 66 ve %2.6'sı HPV 68 olarak bulundu. HPV 16 pozitif kadınlardan %3.5'inde LSIL, %3.9'unda HSIL, %2.1'inde ASCUS ve %37.6'sında normal sitoloji gözlemlendi. (Tablo 6)

Toplam 1145 kadından %11.8'inde tekli HPV enfeksiyonu, %5.3'ünde ikili, %2'sinde üçlü ve %0.9'unda da dörtlü HPV enfeksiyonu tespit edildi. Böylece 229 (%20) hastada HPV tekli veya multiple enfeksiyon bulundu. Multiple HPV enfeksiyon oranının ise %8.2 olduğu tespit edildi. (Tablo 7)

HPV genotiplerinin prevalansı incelendiğinde HPV 16 LSIL, HSIL, ASCUS ve normal sitoloji grubunda sırasıyla %17.7, %47.3, %35.7 ve %0.8 idi. HPV 18 ise LSIL, HSIL, ASCUS ve normal sitolojide grubunda sırasıyla %8.8, %10.5, %0 ve %0.4 bulundu. (Tablo 8)

LSIL grubundaki 45 kadının %35.6'sında tekli, %24.4'ünde ise çoklu enfeksiyon ve HSIL grubunda 19 kadının %68.4'ünde tekli, %15.8'inde ise çoklu enfeksiyon görüldü. ASCUS grubunda %28.5'inde tekli, %14.3'ünde çoklu HPV enfeksiyonu, normal sitolojili grupta ise %9.6'sında tekli ve %7.2'sinde çoklu enfeksiyon tespit edildi. HPV pozitif anormal ve normal sitolojili kadınlarda çoklu enfeksiyon oranları ise LSIL sitolojili HPV pozitif 27 kadında %40.7, HSIL sitolojisi olan HPV pozitif 16 kadında %18.7, ASCUS pozitif ve HPV pozitif 6 kadında %33.3 ve normal sitolojili HPV pozitif 180 kadında %42.7 idi. (Tablo 9)

Tekli HPV pozitif 136 örneğin %44.2'si HPV 16, %16.9'u HPV 18, %10.4'ü HPV 56 ve %8.1'i HPV 33 pozitif bulundu. Diğer örneklerde (%28.5) ise HPV 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 58, 59, 66 ve 68 tipleri gözlemlendi. (Tablo 10)

Çalışma grubumuzda bulduğumuz %20 oranındaki HR HPV prevalansı, Şahiner ve arkadaşlarının Ankara'da 2014 yılındaki %21.6, Yüce ve arkadaşlarının Ankara'da 2012 yılındaki %23 ve Tuncer ve arkadaşlarının Ankara'daki %22.4 oranına benzer, Şahiner ve arkadaşlarının Ankara'da 2012 ve 2014 yıllarında sırasıyla bildirdiği %30.6 ve %34.1 oranlarından düşük ve Eren ve arkadaşlarının İstanbul'da bulduğu %12.4, Tezcan ve arkadaşlarının Mersin'deki %14.5, Fındık ve arkadaşlarının Konya'daki %14.4 ve Özcan ve arkadaşlarının Ankara'daki %4.2 bulgularından yüksektir^{126-130, 131,133,134}.

Bölgemizde hastaneye başvuran 1145 kadında HPV genotiplerinin dağılımını incelediğimizde tekli ve multiple enfeksiyon şeklinde en yaygın görülen HPV tipi %9.4 oranla HPV 16 (108/1145) olup bunu HPV 18 %4.8, HPV 56 %4, ve HPV 51 %2.5 oranla izlemiştir. Ülkemizdeki çalışmalardan Konya'da Fındık ve arkadaşları %6.4 (16/250) ve Ankara'da Yüce ve arkadaşları da %11.9 (106/890) oranlarla HPV 16'yı baskın tip olarak tespit etmişlerdir^{126,127}. Ankara'da bulgularımızdan farklı olarak ikinci sırada HPV 31 %4.4 ve HPV 51 %4.4 oranlarla bildirilmiştir. Oysa çalışmamızda ikinci yaygın tip HPV18 idi¹²⁷.

HPV pozitif 229 hastada HPV tiplerinin prevalansına baktığımızda ise sırasıyla HPV 16 %47.1, HPV 18 %24, HPV 56 %20, HPV 51 %12.6 ve HPV 33 %10.9 oranlarında idi. Şahiner ve arkadaşlarının Ankara'da yaptığı 3 çalışmada %33.7, %24.5 ve %37.7, Tuncer ve arkadaşları Ankara'da %49, Eren ve arkadaşları İstanbul'da %34 oranlarla HPV 16'yı, bu çalışmalardan farklı olarak ise Tezcan ve arkadaşları %22.6 oranla HPV 66'yı en baskın tip olarak bildirmişlerdir¹²⁹⁻¹³⁴. Çalışmamızdaki %47.1'lik HPV 16 oranı Tuncer ve arkadaşlarının %49'luk oranına benzerken diğer çalışmalardaki oranlardan daha yüksektir. Şahiner ve arkadaşları üç çalışmada HPV 52'yi %12.6, %8.4 ve %13'lük oranlarla ikinci sırada bulurken, bizim ikinci sırada %24 oranla bulduğumuz HPV 18 tipi ise bu üç çalışmada sırasıyla %7.4, %5.2 ve %7.2 oranlarında tespit edilmiştir¹²⁹⁻¹³¹. Eren ve arkadaşları bizim bulgularımızdan farklı olarak İstanbul'da ikinci sırada HPV 53 (%11) ve üçüncü sırada HPV 35 (%10), HPV 59 (%10) ve HPV 66'yı (%10) bulmuştur¹³³. Yine Tezcan ve arkadaşları da Mersin'de

farklı olarak sırasıyla ikinci sırada HPV 16 (%20.8) ve ardından HPV 31'i (%11.3) bulmuştur¹³⁴. Oysa HPV 18'i %1.9 oranla bizim %24'lük oranımızdan daha düşük bulmuştur.

Çalışmamızda HPV DNA pozitif 229 hastanın %40.6'sında (93/229) multiple enfeksiyon bulunmuştur. Bu bulgumuz Şahiner ve arkadaşlarının 2014 yılında Ankara'da bildirdiği %42.7 oranına benzer, buna karşılık Konya'da Fındık ve arkadaşlarının %22.9, Şahiner ve arkadaşlarının Ankara'da 2012'de bildirdiği %28.7 ve İstanbul'da Eren ve arkadaşlarının %29.5 oranlarından yüksektir^{126,129,130,133}.

Çalışmamızda normal ve anormal sitolojili kadınlarda HPV enfeksiyon oranlarına baktığımızda normal sitolojili kadınlarda %16.8 (180/1067) iken ASCUS grubunda %42.8 (6/14), LSIL grubunda %60 (27/45) ve HSIL grubunda ise %84.2 (16/19) oranlarla bulunmuştur. Böylece hücrelerde anomalite derecesi arttıkça HPV enfeksiyon oranlarının da giderek arttığı gözlenmiştir. Anormal sitolojili kadınlarda HPV enfeksiyon prevalansı %62.8 (49/78) tespit edilmiştir. Normal sitoloji grubunda bulduğumuz %16.8'lik HPV enfeksiyon oranı Mersin'deki %18.9, Ankara'daki Demir ve arkadaşlarının %17.9 ve yine Ankara'da Yüce ve arkadaşlarının %19.7 oranlarıyla benzerdir^{127,134,136}. Ancak İzmir'de Kasap ve arkadaşlarının normal sitolojili grupta bulduğu %23.8'lik orandan düşüktür¹³⁵. Yine Tezcan ve Kasap'ın çalışmasında da en yüksek oranlar HSIL grubunda %75 ve %73 oranlarında tespit edilmiştir^{134,135}. ASCUS ve LSIL grubundaki %42.8 ve %60'lık oranlarımız Tezcan ve arkadaşlarının sırasıyla %29.7 ve %42.9 oranlarından yüksek, buna karşılık İzmir'de Kasap ve arkadaşlarının bildirdiği %66.6 ve %70.5 oranlarından düşüktür^{134,135}.

Çalışmamızın sonuçlarını yurtdışında yapılan çalışmalarla kıyasladığımızda çalışma grubumuzda yüksek risk HPV prevalansı %20 olup Almanya'daki %22.2 oranına benzer, İtalya, Bulgaristan ve Meksika'da sırasıyla %52.6, %61 ve %67.1 oranlarından oldukça düşük, İran'da, Romanya'da ve Jamaika'da sırasıyla %31.1, %39.6 ve %34.6 oranlarından biraz düşüktür¹¹⁵⁻¹²¹. En baskın HPV tipi çalışmamızda %9.4 oranla HPV 16 olup, Almanya'da İftner ve arkadaşlarının %23.8, Bulgaristan'da Grozdanov ve arkadaşlarının çalışmasında %17.1, Meksika'da Salcedo ve arkadaşlarının çalışmasında %39.4 ve Romanya'da Moga ve arkadaşlarının çalışmasında %26 oranlarla yine en baskın tip HPV 16 olup oranlar bulgumuzdan yüksektir^{115,118,120}. Ancak yine HPV 16'nın baskın tip olarak bulunduğu İran'da

Yousefzadeh ve arkadaşlarının %7.3 ve Jamaika’da Lewis-Bell ve arkadaşlarının %6.2’lik oranlarından ise yüksektir^{119,121}. İtalya’da Meloni ve arkadaşları HPV tip 52’yi %23.4 oranla en baskın tip olarak bulurken sırasıyla HPV 53’ü %15.7 ve HPV 16’yı %15.4 oranlarla ikinci ve üçüncü sırada bulmuştur¹¹⁶. Almanya’da HPV 51 %16.7, Bulgaristan’da HPV 33 %3.9, Romanya’da HPV 31 12.2 ve Jamaika’da HPV 33 %6 oranlarla ikinci sırada bulunmuştur^{115,117,120,121}. Benzer şekilde Meksika’da %7.5 ve İran’da %2.8 oranla yine HPV 18 ikinci sırada tespit edilmiştir^{118,119}.

HPV ile enfekte 229 kişideki multiple enfeksiyon oranımız %40.6 olup, İtalya’daki Meloni ve arkadaşlarının %36.1 oranına benzer, Romanya’daki Moga ve arkadaşlarının %57’lik oranından düşük ve İran’daki %29.1 ve Bulgaristan’daki %24’lük oranlardan yüksektir^{116,117,119,120}.

Çalışmamızda HR HPV prevalansı normal sitolojili kadınlarda %16.8 (180/1067) olup, ASCUS grubunda %42.8 (6/14), LSIL grubunda %60 (27/45) ve HSIL grubunda ise %84.2’ye (16/19) yükselmiştir. Normal ve anormal sitolojili kadınlarda HPV genotiplerinin prevalansını incelediğimizde normal sitolojili kadınlarda HPV 56 %3.6 oranla en yaygın tip olup bunu HPV 39 %1.9, HPV 51 %1.7 ve HPV 31 %1.6 oranlarıyla izlemiştir. Prekanseroz lezyonlarda ve servikal kanserde baskın tip olarak gözlenen HPV 16 ise %0.8 oranında bulunmuştur. ASCUS grubunda sırasıyla HPV 16 %35.7 oranında bulunup HPV 33 %14.3 ve HPV 51 %14.3 oranlar ile ikinci sırada ve HPV 35, HPV 56 ve HPV 58 her biri %7.1 oranlarla izlemiştir. LSIL grubunda ilk sırada HPV 16 (%17.7) ve HPV 51 (%17.7) gözlenirken ikinci sırada HPV 33 (%13.3) ve HPV 56 (%13.3) ve üçüncü sırada HPV 18 (%8.8) ve HPV 58 (%8.8) bulunmuştur. HSIL grubunda ise yine HPV 16 en baskın tip olup %47.3 ile diğer gruplara oranla oldukça yüksek tespit edilmiştir. İkinci sıraya HPV 18 (%10.5) ve HPV 33 (%10.5) yerleşmiştir.

HPV pozitif normal ve anormal sitolojili kadınlarda bulduğumuz multiple enfeksiyon oranları ise normal sitolojili HPV pozitif kadınlarda %42.7 (77/180), ASCUS pozitif ve HPV pozitif kadınlarda %33.3 (2/6), LSIL pozitif ve HPV pozitif kadınlarda %40.7 (11/27) ve HSIL pozitif ve HPV pozitif kadınlarda ise %18.7 (3/16) ile diğer gruptakilere göre daha düşük gözlendi. İspanya’da Lindemann ve arkadaşlarının çalışmasında normal sitolojili kadınlarda bulgularımızdan farklı olarak HPV 16 %17.8 ile birinci sırada bulunurken ardından HPV 31 %12.8 ve HPV 52 %12.4

oranlarında izlemiştir¹²². LSIL grubunda ise bulgumuza benzer şekilde HPV 16 %22.3 ile en baskın tip olup ikinci sırada HPV 53 %15.9 ve üçüncü sırada HPV 51 %14.1 oranlarında bulunmuştur. HSIL grubunda ise HPV 16 prevalansı %60'a yükselmiş olup HPV 31 %15.1 ve HPV 58 %12.2 oranlarında izlemiştir¹²².

Almanya'dan De Jonge ve arkadaşlarının çalışmasında ASCUS, LSIL ve HSIL grubundaki HR HPV prevalansı sırasıyla %43.2, %78.9 ve %91.9 olup çalışma grubumuzdaki sırasıyla %42.8, %60 ve %84.2 oranları ile uyumludur. Normal sitolojili kadınlarda HR HPV prevalansı ise %26 olup aynı gruptaki bulgumuz %16.8'den yüksektir. Normal sitolojili kadınlarda HPV 51 (%6.8), HPV 16 (%4.9) ve HPV 42 (%4.9) en yaygın HPV tipleri olarak bildirilmiştir¹²³. Çalışmamızda ise normal sitolojili kadınlarda HPV 56 %3.6 oranla en baskın tip bulunmuş olup bunu HPV 39, HPV 51 ve HPV 31 izlemiştir. Almanya'da ASCUS grubunda sırasıyla düşük riskli tip olan HPV 42'yi %9.9 ve yüksek riskli HPV 51'i ise %8.6 oranlarında ve LSIL grubunda yine düşük riskli HPV 42 %23.8 ve ardından HPV 16 ise %17.5 oranla ikinci sırada tespit edilmiştir. HSIL grubunda ise birinci sıraya HPV 16 %34.4 oranla yerleşmiş ve HPV 51 %19 oranla ikinci sırada bulunmuştur¹²³. Yine araştırmacıların multiple enfeksiyon oranları normal sitolojili kadınlar, ASCUS, LSIL ve HSIL grubunda sırasıyla %10.7, %16.7, %42.4 ve %46.2 olup bizim bulgularımıza göre sırasıyla normal sitolojili kadınlardaki %42.7 ve ASCUS grubundaki %33.3'lük bulgulardan düşük, LSIL grubundaki %40.7'ye benzer ve HSIL grubundaki %18.7'den yüksektir¹²³. Fransa'da Heard ve arkadaşları HR HPV oranlarını normal sitolojili kadınlarda %13.7, ASCUS grubunda %48.3, LSIL grubunda %68.9 ve HSIL grubunda %84.4 tespit etmiştir. Normal sitolojili kadınlarda bulgumuzdan farklı olarak HPV 16'yı 3 oranla en yaygın tip olarak tespit ederken ikinci sırada HPV 51 %2.8 oranda tespit edilmiştir ki biz HPV 51'i %1.7 oranıyla daha düşük oranda üçüncü sırada tespit ettik¹²⁴. Fransa'da ASCUS grubunda yine HPV 16 %14.7 oran ile bulgularımızla uyumlu olarak en yaygın tip olup, ancak %35.7'lik oranımızdan düşüktür. İkinci sırada ise HPV 53 %9.2 ve üçüncü sırada HPV 31 %8 oranında tespit edilmiştir. LSIL grubunda HPV 16 % 20.9 ile birinci sırada bulunmakta olup bunu HPV 53 %16.9, HPV 56 %16.2 ve HPV 51 %15.9 oranlarında izlemiştir. Oysa yüksek olması beklenen HPV 18 çok daha düşük %4.2 oranında bulunmuştur. HSIL grubunda ise sırasıyla HPV 16 (%50.9), HPV 31 (%12.2), HPV 51 (%9.6) ve HPV 52 (%7.6) izlenmiştir. Fransa'daki çalışmada da normal sitolojili

kadınlarda %3'lük HPV 16 oranı prekanseröz lezyoların ciddiyetinin artmasıyla HSIL grubunda %50.9'a çıkmıştır¹²⁴. Meksika'da Aguilar-Lemarroy ve arkadaşlarının çalışmasında ise normal sitolojisi olan kadınlarda HPV prevalansı %12.4 ile bizim %16.8 oranımızla benzerdir. Normal sitolojili kadınlarda buldukları %63'lük multiple enfeksiyon oranı ise bizim aynı gruptaki %42.7'den oldukça yüksektir¹²⁵.



6. SONUÇLAR

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Jinekoloji Bölümüne başvuran 1145 kadında HPV genotiplerinin dağılımını tespit etmek amacıyla yapılan bu çalışmanın sonuçları;

1. Hastaların yaşı 20-65 arasında olup %10.4'ü 20-29 yaş arası, %33.3'ü 30-39 yaş arası, %33.9'u 40-49 yaş arası, %16.9'u 50-59 yaş arası, %5.5'i 60-65 yaş arasında idi.
2. Hastaların %2'sine serviks uterusunun displazisi, %6.8'ine serviks uterusunun erozyon ve ektropiyonu, %5.1'ine serviks uterusunun enflamatuvar hastalığı, %2.5'ine anormal uterus ve vajina kanaması tanısı konmuştur. Ayrıca hastaların %67.7'sine sağlıklı olarak tanımlanmış ve %5.9'u da dismenore, menapozal bozukluklar, vulva ve vajina kandidiyazı, genital siğil, abdominal ve pelvik ağrı, düzensiz menstruasyon, infertilite, malign neoplazm, gelişimsel over kisti ve enflamatuvar olmayan hastalık gibi diğer hastalıklar sebebiyle izlenmiştir.
3. Servikal sürüntü örnekleri sitolojik olarak incelendiğinde kadınların %6.8'inin anormal sitolojisi olduğu tespit edilmiş olup; %4'ünün LSIL, %1.6'sının HSIL, %1.2'inin ASCUS ve %93.2'sinin ise normal sitolojili olduğu tespit edildi.
4. Anormal sitolojisi olan hastaların %62.8'inde ve normal sitolojisi bulunan kadınların %16.8'inde HPV DNA bulunmuştur. Bu gruptan LSIL tanısı alan hastaların %60'ında, HSIL tanısı alan hastaların %84.2'sinde, ASCUS pozitif olan hastaların %42.8'inde HPV DNA pozitif tespit edildi.
5. HPV genotipleme real-time PCR testi sonrası vakaların %80'i HPV DNA negatif ve %20'si HPV DNA pozitif olarak tespit edildi. Toplam 1145 hastanın HPV pozitif olan hastaların %7.9'u 30-39 ve %5.9'u 40-49 yaş grupları arasında idi.
6. Kadınlarda tekli veya multiple enfeksiyon şeklinde %9.4'ünde HPV tip 16, %4.8'inde HPV 18, %1.7'sinde HPV 31, %2.2'sinde HPV 33, %1.7'sinde HPV 35, %1.9'unda HPV 39, %0.4'ünde HPV 45, %2.5'inde HPV 51, %0.2'inde HPV 52, %4'ünde HPV 56, %1.1'inde HPV 58, %0.9'unda HPV 59, %0.4'ünde HPV 66 ve %0.5'inde HPV 68 bulundu.

7. HPV pozitif bulunan 229 vakanın servikal sürüntü örneklerinin sitoloji sonuçları incelendiğinde %78.6'sının normal, %11.8'inin LSIL, %7'sinin HSIL, %2.6'sının ASCUS olduğu bulundu.
8. HPV pozitif 229 hastanın genotip dağılımına bakıldığında tekli veya çoklu enfeksiyon şeklinde %47.1'i HPV 16, %24'ü HPV 18, %8.2'si HPV 31, %10.9'u HPV 33, %8.2'si HPV 35, %9.6'sı HPV 39, %2.1'i HPV 45, %12.6'sı HPV 51, %0.8'i HPV 52, %20'si HPV 56, %5.6'sı HPV 58, %4.8'i HPV 59, %2.1'i HPV 66 ve %2.6'sı HPV 68 olarak tespit edildi. HPV 16 pozitif kadınlardan %3.5'inde LSIL, %3.9'unda HSIL, %2.1'inde ASCUS ve %37.6'sında normal sitoloji tespit edildi.
9. Toplam 1145 kadından %11.8'inde tekli HPV enfeksiyonu, %5.3'ünde ikili, %2'sinde üçlü ve %0.9'unda dördü HPV enfeksiyonu tespit edildi. Böylece 229 (%20) hastada tekli veya multiple HPV enfeksiyonu bulundu. Multiple HPV enfeksiyon oranının ise %8.2 olduğu tespit edilmiştir. HPV DNA pozitif 229 hastanın %59.4'ünde tekli ve %40.6'sında ise multiple enfeksiyon gözlemlendi.
10. HPV genotiplerinin prevalansı incelendiğinde HPV 16 LSIL, HSIL, ASCUS ve normal sitoloji grubunda sırasıyla %17.7, %47.3, %35.7 ve %0.8 bulundu. HPV 18 ise LSIL, HSIL, ASCUS ve normal sitolojide grubunda sırasıyla %8.8, %10.5, %0 ve %0.4 bulundu.
11. LSIL grubundaki 45 kadının %35.6'sında tekli, %24.4'ünde ise çoklu enfeksiyon ve HSIL grubunda 19 kadının %68.4'ünde tekli, %15.8'inde ise çoklu enfeksiyon görülmüştür. ASCUS grubunda %28.5'inde tekli, %14.3'ünde çoklu HPV enfeksiyonu, normal sitolojili grupta ise %9.6'sında tekli ve %7.2'sinde çoklu enfeksiyon tespit edildi. HPV pozitif anormal ve normal sitolojili kadınlarda çoklu enfeksiyon oranları ise LSIL sitolojili HPV pozitif 27 kadında %40.7, HSIL sitolojisi olan HPV pozitif 16 kadında %18.7, ASCUS pozitif ve HPV pozitif 6 kadında %33.3'ünde ve normal sitolojili HPV pozitif 180 kadında %42.7'dir.
12. Tekli HPV pozitif 136 örneğin %44.2'si HPV 16, %16.9'u HPV 18, %10.4'ü HPV 56 ve %8.1'i HPV 33 olarak bulundu. Örneklerin %20.4'ünde ise HPV 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 58, 59, 66 ve 68 tipleri gözlemlendi.

13. İkili HPV enfeksiyonu bulunan 61 hastanın %13'ünde HPV 16 ve HPV 18 koenfeksiyonu varken, %34.5'inde HPV 16 ve diğer tipler ve %21.3'ünde HPV 18 ve diğer HPV tipleri ile birliktelik bulundu.
14. Üçlü HPV enfeksiyonu bulunan 22 hastanın 7'sinde HPV 16 diğer HPV tipleri ile bulunurken 3'ünde HPV 18 ve diğer HPV tipleri birlikte bulundu. Ayrıca hastaların 3'ünde de HPV 16 ve HPV 18 ile diğer tipler sırasıyla 66, 51 ve 58 ile birlikte bulundu. Kalan 9 kadında HPV 33, 35, 51 ve 56 gibi HPV tipleri tespit edildi.
15. Dörtlü HPV enfeksiyonuna sahip 10 hastanın 9'unda HPV 16 ve diğer HPV tipleri bulunurken, 5'ine HPV 18 eşlik etmektedir. Bir hastada ise HPV 33 ve HPV 35 diğer tiplerle birlikte bulundu.

Bölgemizde hastane bazlı yaptığımız bu çalışma 1145 kişinin katıldığı şimdiye kadar yapılan en kapsamlı çalışma olup HPV enfeksiyon prevalansı ve HPV genotiplerinin dağılımı ile ilgili elde edilen moleküler epidemiyolojik bilgiler HPV DNA testinin kullanıldığı servikal kanser tarama programlarının oluşturulmasına ve günümüzdeki profilaktik HPV aşılarının etkinliğinin izlenmesine katkıda bulunacaktır.

KAYNAKLAR

1. **Schlichte MJ, Guidry J.** Current Cervical Carcinoma Screening Guidelines. *J Clin Med*, **2015**; 4(5): 918–932.
2. **Blackadar CB.** Historical review of the causes of cancer. *World J Clin Oncol*, **2016**; 7(1): 54–86.
3. **Hussein WM, Anwar WA, Attaleb M, Mazini L, Försti A, Trimbilas RD, Khyatti M.** A review of the infection-associated cancers in North African countries. *Infect Agent Cancer*, **2016**; 11:35. doi: 10.1186/s13027-016-0083-8.
4. **Wuerthner BA1, Avila-Wallace M.** Cervical cancer: Screening, management, and prevention. *Nurse Pract*, **2016**; DOI: 10.1097/01.NPR.
5. **Fernandes JV, Fernandes TA.** Human Papillomavirus: Biology and Pathogenesis. Human Papillomavirus and Related Diseases – From Bench to Bedside– A Clinical Perspective. *In Tech*, **2012**; doi: 10.5772/2464.
6. **Chelimo C, Wouldes TA, Cameron LD, Elwood JM.** Risk factors for and prevention of human papillomaviruses (HPV), genital warts and cervical cancer. *J Infect*, **2013**; 66(3):207-17.
7. **Mateos-Lindemann ML, Pérez-Castro S, Rodríguez-Iglesias M, Pérez-Gracia MT.** Microbiological diagnosis of human papilloma virus infection. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, **2016** pii: S0213-005X(16)30117-3.
8. **Tsikouras P, Zervoudis S, Manav B, Tomara E, Iatrakis G, Romanidis C, Bothou A, Galazios G.** Cervical cancer: screening, diagnosis and staging. *J BUON*, **2016**; 21(2):320-5.
9. **Walhart T.J.** Human Papillomavirus Biology, Pathogenesis, and Potential for Drug Discovery: A Literature Review for HIV Nurse Clinical Scientists. *Assoc Nurses AIDS Care*, **2015**; 26(6):693-702.
10. **zur Hausen H.** Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer*, **2002**; 2(5):342-50.
11. **Graham SV.** Human papillomavirus E2 protein: linking replication, transcription, and RNA processing. *J Virol*, **2016**; pii: JVI.00502-16.
12. **Prétet JL, Charlot JF, Mouglin C.** Virological and carcinogenic aspects of HPV. *Bull Acad Natl Med*, **2007**; 191(3):611-23.
13. **Santos-López G, Márquez-Domínguez L, Reyes-Leyva J, Vallejo-Ruiz V.** General aspects of structure, classification and replication of human papillomavirus. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*, **2015**;53 Suppl 2:S166-71.
14. **Alp Avcı G.** Genomic organization and proteins of human papillomavirus. *Mikrobiyol Bul*, **2012**;46(3):507-15.
15. **Bristol ML, Wang X, Smith NW, Son MP, Evans MR, Morgan IM.** DNA Damage Reduces the Quality, but Not the Quantity of Human Papillomavirus 16 E1 and E2 DNA Replication. *Viruses*, **2016**;8(6). pii: E175.

16. **Wu EQ, Tang YY.** Research progress in roles of high-risk human papillomavirus E2 protein. *Bing Du Xue Bao*, **2014**;30(2):201-7.
17. **Egawa N, Egawa K, Griffin H, Doorbar J.** Human Papillomaviruses; Epithelial Tropisms, and the Development of Neoplasia. *Viruses*, **2015**;7(7):3863-90.
18. **Biryukov J, Meyers C.** Papillomavirus Infectious Pathways: A Comparison of Systems. *Viruses*, **2015**;7(8):4303-25.
19. **Wallace NA, Galloway DA.** Novel Functions of the Human Papillomavirus E6 Oncoproteins. *Annu Rev Virol*, **2015**; 2(1):403-23.
20. **Lee D, Norby K, Hayes M, Chiu YF, Sugden B, Lambert PF.** Using Organotypic Epithelial Tissue Culture to Study the Human Papillomavirus Life Cycle. *Curr Protoc Microbiol*, **2016**;41:14B.8.1-14B.8.19.
21. **Ozbun MA, Patterson NA.** Using organotypic (raft) epithelial tissue cultures for the biosynthesis and isolation of infectious human papillomaviruses. *Curr Protoc Microbiol*, **2014**; 34:14B.3.1-18.
22. **van der Weele P, van Logchem E, Wolffs P, van den Broek I, Feltkamp M, de Melker H, Meijer CJ, Boot H, King A.** Correlation between viral load, multiplicity of infection, and persistence of HPV16 and HPV18 infection in a Dutch cohort of young women. *J Clin Virol*, **2016**; 83: 6-11.
23. **Nakahara T, Kiyono T.** Regulation of human papillomavirus (HPV) genome replication in the viral life cycle and its association with the viral persistence and cancer development. *Uirusu*, **2014**;64(1):57-66.
24. **Ryndock EJ, Biryukov J, Meyers C.** Replication of human papillomavirus in culture. *Methods Mol Biol*, **2015**;1249:39-52.
25. **Chen J.** Signaling pathways in HPV-associated cancers and therapeutic implications. *Rev Med Virol*, **2015**; 25 Suppl 1: 24-53.
26. **Souho T, Benlemlih M, Bennani B.** Human papillomavirus infection and fertility alteration: a systematic review. *PLoS One*, **2015**;10(5):e0126936.
27. **Mladěnka A, Kubečková A, Sláma J.** Current knowledge about HPV infection. *Ceska Gynekol*, **2016**;81(5):369-375.
28. **Tsikouras P, Zervoudis S, Manav B, Tomara E, Iatrakis G, Romanidis C, Bothou A, Galazios G.** Cervical cancer: screening, diagnosis and staging. *J BUON*, **2016**;21(2):320-5.
29. **Yanagi T, Shibaki A, Tsuji-Abe Y, Yokota K, Shimizu H.** Epidermodysplasia verruciformis and generalized verrucosis: the same disease? *Clin Exp Dermatol*, **2006**;31(3):390-3.
30. **Husain RS, Ramakrishnan V.** Global Variation of Human Papillomavirus Genotypes and Selected Genes Involved in Cervical Malignancies. *Ann Glob Health*. **2015**; 81(5):675-83.
31. **Bravo IG, Félez-Sánchez M.** Papillomaviruses: Viral evolution, cancer and evolutionary medicine. *Evol Med Public Health*, **2015**;2015(1):32-51.
32. **McBride AA.** The papillomavirus E2 proteins. *Virology*, **2013**; 445(1-2):57-79.

33. **Ruttikay-Nedecky B, Jimenez Jimenez AM, Nejdl L, Chudobova D, Gumulec J, Masarik M, Adam V, Kizek R.** Relevance of infection with human papillomavirus: the role of the p53 tumor suppressor protein and E6/E7 zinc finger proteins (Review). *Int J Oncol*, **2013**;43(6):1754-62.
34. **McKinney CC, Hussmann KL, McBride AA.** The Role of the DNA Damage Response throughout the Papillomavirus Life Cycle. *Viruses*, **2015**;7(5):2450-69.
35. **Kajitani N, Schwartz S.** RNA Binding Proteins that Control Human Papillomavirus Gene Expression. *Biomolecules*, **2015**;5(2):758-74
36. **Wang XH, Qian YM, Miao L, Le Y, Du J.** Correlation between high risk type human papillomavirus E6/E7 mRNA and cervical cancer. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi*, **2016**; 37(7):1003-5.
37. **Tommasino M.** The human papillomavirus family and its role in carcinogenesis. *Semin Cancer Biol*, **2014**;26:13-21.
38. **Plummer M, de Martel C, Vignat J, Ferlay J, Bray F, Franceschi S.** Global burden of cancers attributable to infections in 2012: a synthetic analysis. *Lancet Glob Health*, **2016** pii: S2214-109X(16)30143-7.
39. **Buck CB, Day PM, Trus BL.** The papillomavirus major capsid protein L1. *Virology*, **2013**;445(1-2):169-74.
40. **Broniarczyk J, Massimi P, Bergant M, Banks L.** Human Papillomavirus Infectious Entry and Trafficking Is a Rapid Process. *J Virol*, **2015**;89(17):8727-32.
41. **Ghittoni R, Accardi R, Chiocca S, Tommasino M.** Role of human papillomaviruses in carcinogenesis. *Ecancermedalscience*, **2015**; 9: 526.
42. **Bjurberg M, Beskow C, Kannisto P, Lindahl G.** Cervical cancer is a clinical challenge. *Lakartidningen*, **2015**;112. pii: DIUS.
43. **Santos Filho MV, Gurgel AP2, Lobo CD, Freitas AC, Silva-Neto JC, Silva LA.** Prevalence of human papillomavirus (HPV), distribution of HPV types, and risk factors for infection in HPV-positive women. *Genet Mol Res*, **2016**;15(2). doi: 10.4238/gmr.15028315.
44. **Surviladze Z, Dziduszko A, Ozbun MA.** Essential roles for soluble virion-associated heparan sulfonated proteoglycans and growth factors in human papillomavirus infections. *PLoS Pathog*, **2012**;8(2):e1002519.
45. **Belleudi F, Leone L, Purpura V, Cannella F, Scrofani C, Torrisi MR.** HPV16 E5 affects the KGFR/FGFR2b-mediated epithelial growth through alteration of the receptor expression, signaling and endocytic traffic. *Oncogene*, **2011**;30(50):4963-76.
46. **Tota JE, Ramanakumar AV, Villa LL, Richardson H, Burchell AN, Coutlée F, Franco EL.** Cervical Infection With Vaccine-Associated Human Papillomavirus (HPV) Genotypes as a Predictor of Acquisition and Clearance of Other HPV Infections. *J Infect Dis*, **2016**; 214(5) 676-84.
47. **Hoffmann R, Hirt B, Bechtold V, Beard P, Raj K.** Different modes of human papillomavirus DNA replication during maintenance. *J Virol*, **2006**;80(9):4431-9.

48. **van der Burg SH, Piersma SJ, de Jong A.** Association of cervical cancer with the presence of CD4+ regulatory T cells specific for human papillomavirus antigens. *Proc Natl Acad Sci USA*, **2007**;104(29):12087-92.
49. **Doorbar J, Egawa N, Griffin H, Kranjec C.** Human papillomavirus molecular biology and disease association. *Rev. Med. Virol*, **2016**; 25: 2–23.
50. **Bansal A, Singh MP, Rai B.** Human papillomavirus-associated cancers: A growing global problem. *Int J Appl Basic Med Res*, **2016**;6(2):84-9.
51. **Clarke Brian Blackadar Salazar KL, Zhou HS, Xu J, Peterson LE, Schwartz MR, Mody DR, Ge Y.** Multiple Human Papilloma Virus Infections and Their Impact on the Development of High-Risk Cervical Lesions. *Acta Cytol*, **2015**; 59(5):391-8.
52. **Swanson MS, Kokot N, Sinha UK.** The Role of HPV in Head and Neck Cancer Stem Cell Formation and Tumorigenesis. *Cancers (Basel)*, **2016** ;8(2). pii: E24.
53. **Asiaf A, Ahmad ST, Mohammad SO, Zargar MA.** Review of the current knowledge on the epidemiology, pathogenesis, and prevention of human papillomavirus infection. *Eur J Cancer Prev*, **2014**;23(3):206-24.
54. **Burd EM, Dean CL.** Human Papillomavirus. *Microbiol Spectr*, **2016**;4(4). doi:10.1128/microbiolspec. DMIH2-0001-2015
55. **Denny L, Herrero R, Levin C, Kim JJ.** Cervical Cancer. Washington (DC) *The International Bank for Reconstruction and Development/The World Bank*; **2015**. Chapter 4. Third Edition (Volume 3).
56. **Benevolo M, Donà MG, Ravenda PS, Chiocca S.** Anal human papillomavirus infection: prevalence, diagnosis and treatment of related lesions. *Expert Rev Anti Infect Ther*, **2016**;14(5):465-77.
57. **Vokes EE, Agrawal N, Seiwert TY.** HPV-Associated Head and Neck Cancer. *J Natl Cancer Inst*, **2015**; 107(12):djv344.
58. **Hampras SS, Reed RA, Bezalel S, Cameron M, Cherpelis B, Fenske N, Sondak VK, Messina J, Tommasino M, Gheit T, Rollison DE.** Cutaneous Human Papillomavirus Infection and Development of Subsequent Squamous Cell Carcinoma of the Skin. *J Skin Cancer*, **2016**; 2016:1368103.
59. **Accardi R, Gheit T.** Cutaneous HPV and skin cancer. *Presse Med*, **2014**;43(12 Pt 2):e435-43.
60. **Poljak M, Kocjan BJ, Oštrbenk A, Seme K.** Commercially available molecular tests for human papillomaviruses (HPV): 2015 update. *J Clin Virol*, **2016**; 76 Suppl 1:S3-S13.
61. **Picconi MA.** Human papillomavirus detection in cervical cancer prevention. Article in Spanish *Medicina (B Aires)*, **2013**;73(6):585-96.
62. **Comparetto C, Borruto F.** Cervical cancer screening: A never-ending developing program. *World J Clin Cases*, **2015**;3(7): 614–624.
63. **Finocchiaro-Kessler S, Wexler1 C, May Maloba M, Mabachi N, Ndikum-Moffor F and Bukusi E.** Cervical cancer prevention and treatment research in Africa: a systematic review from a public health perspective. *BMC Women's Health*, **(2016)** 16:29.

64. **Burd EM.** Human Papillomavirus Laboratory Testing: the Changing Paradigm. *Clin Microbiol Rev*, **2016**; 29(2):291-319.
65. **Boehmer G, Wang L, Iftner A, Holz B, Haedicke J, von Wasielewski R, Martus P, Iftner T.** A population-based observational study comparing Cervista and Hybrid Capture 2 methods: improved relative specificity of the Cervista assay by increasing its cut-off. *BMC Infect Dis*, **2014**;14:674.
66. **Prakrankamanant P, Wongsena M.** Overview: Detection of Human Papillomavirus in Clinical Samples. *J Med Assoc Thai*, **2016**; 99 Suppl 1:S89-96.
67. **Vaccarella, S.; Bray, F.** Epidemiology and Burden of Disease Associated with HPV Infection. *Current Obstetrics and Gynecology Reports*, **2015**, 4 (4): 181–188
68. **Tota JE, Chevarie-Davis M, Richardson LA, Devries M, Franco EL.** Epidemiology and burden of HPV infection and related diseases: implications for prevention strategies. *Prev Med*, **2011** t;53 Suppl 1:S12-21.
69. **McKee SJ, Bergot AS, Leggatt GR.** Recent progress in vaccination against human papillomavirus-mediated cervical cancer. *Rev Med Virol*, **2015**;25 Suppl 1: 54-71
70. **Wilson AR, Hashibe M, Bodson J, Gren LH, Taylor BA, Greenwood J, Jackson BR, She R, Egger MJ.** Factors related to HPV vaccine uptake and 3-dose completion among women in a low vaccination region of the USA: an observational study. *BMC Womens Health*, **2016** 22; 16:41.
71. **Dobson SR, McNeil S, Dionne M, Dawar M, Ogilvie G, Krajden M, Sauvageau C, Scheifele DW, Kollmann TR, Halperin SA, Langley JM, Bettinger JA, Singer J, Money D, Miller D, Naus M, Marra F, Young E.** Immunogenicity of 2 doses of HPV vaccine in younger adolescents vs 3 doses in young women: a randomized clinical trial. *JAMA*, **2013**; 309(17):1793-802.
72. **Toh ZQ, Licciardi PV, Fong J, Garland SM, Tabrizi SN, Russell FM,** Reduced dose human papillomavirus vaccination: an update of the current state-of-the-art. *Mulholland EK.Vaccine*, **2015**; 33(39):5042-50.
73. **Seyferth ER, Bratic JS, Bocchini JA Jr.** Human papillomavirus epidemiology and vaccine recommendations: selected review of the recent literature. *Curr Opin Pediatr*, **2016**; 28(3):400-6.
74. **Armstrong EP.** Prophylaxis of cervical cancer and related cervical disease: a review of the cost-effectiveness of vaccination against oncogenic HPV types. *J Manag Care Pharm*, **2010**; 16(3):217-30.
75. **De Vincenzo R, Conte C, Ricci C, Scambia G, Capelli G.** Long-term efficacy and safety of human papillomavirus vaccination. *Int J Womens Health*, **2014**; 6:999-1010.
76. **Lisa E, Laura A.** Do Condoms Prevent Genital HPV Infection, External Genital Warts, or Cervical Neoplasia? :A Meta-Analysis *Sexually Transmitted Diseases*, **2002**; Volume 29 - Issue 11 - pp 725-735
77. **Angioli R, Lopez S, Aloisi A, Terranova C, De Cicco C, Scaletta G, Capriglione S, Miranda A, Luvero D, Ricciardi R, Montera R, Plotti F.** Ten years of HPV vaccines: State of art and controversies. *Crit Rev Oncol Hematol*, **2016**;102:65-72.
78. **Chen J, Griffiths P.** Still lots to learn about human papillomaviruses. *Rev Med Virol*, **2015**;25 Suppl 1:1. doi: 10. 1002/rmv.1829.

79. **Sankaranarayanan R.** Screening for Cancer in Low- and Middle-Income *State of The Art Review Icahn School of Medicine*, **2014**;412-7.
80. **Petrosky EY, Hariri S, Markowitz LE, Panicker G, Unger ER, Dunne EF.** Is vaccine type seropositivity a marker for human papillomavirus vaccination? National Health and Nutrition Examination Survey, 2003-2010. *Int J Infect Dis*, **2015**; 33:137-41.
81. **Williams WW, Lu PJ, O'Halloran A, Bridges CB, Pilishvili T, Hales CM, Markowitz LE; Centers for Disease Control and Prevention (CDC).** Noninfluenza vaccination coverage among adults - United States, 2012. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, **2014**; 63(5):95-102.
82. **Petrosky E, Bocchini JA Jr, Hariri S, Chesson H, Curtis CR, Saraiya M, Unger ER, Markowitz LE; Centers for Disease Control and Prevention (CDC).** Use of 9-valent human papillomavirus (HPV) vaccine: updated HPV vaccination recommendations of the advisory committee on immunization practices. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, **2015**;64(11):300-4.
83. **Serrano B, Alemany L, Tous S, Bruni L, Clifford GM, Weiss T, Bosch FX, de Sanjosé S.** Potential impact of a nine-valent vaccine in human papillomavirus related cervical disease. *Infect Agent Cancer*, **2012**;7(1):38.
84. **Saraiya M, Unger ER, Thompson TD, Lynch CF, Hernandez BY, Lyu CW, Steinau M, Watson M, Wilkinson EJ, Hopenhayn C, Copeland G, Cozen W, Peters ES, Huang Y, Saber MS, Altekruse S, Goodman MT; HPV Typing of Cancers Workgroup.** US assessment of HPV types in cancers: implications for current and 9-valent HPV vaccines. *J Natl Cancer Inst*, **2015**; 107(6):djv086.
85. **Markowitz LE, Liu G, Hariri S, Steinau M, Dunne EF, Unger ER.** Prevalence of HPV After Introduction of the Vaccination Program in the United States. *Pediatrics*, **2016**;137(3):e20151968.
86. **Gakidou E, Nordhagen S, Obermeyer Z.** Coverage of cervical cancer screening in 57 countries: low average levels and large inequalities. *PLoS Med*, **2008**;5(6):e132.
87. **Ports KA, Reddy DM, Rameshbabu A.** Cervical Cancer Prevention in Malawi: A Qualitative Study of Women's Perspectives. *J Health Commun*, **2015**;20(1):97-104.
88. **Jacob M, Broekhuizen FF, Castro W, Sellors J.** Experience using cryotherapy for treatment of cervical precancerous lesions in low-resource settings. *Int J Gynaecol Obstet*, **2005**;89 Suppl 2:S13-20.
89. **Perng P, PerngW, Ngoma T, Kahesa C, Mwaiselage J, MerajverSD.** Promoters of and barriersto cervical cancer screening in a rural setting inTanzania. *Int J Gynaecol Obstet*, **2013**;123(3):221-5
90. **U.S. Preventive Services Task Force.** Cervical Cancer Screening: Summary of Recommendations and Evidence [Internet]. **2012**. Available from: <http://www.uspreventiveservicestaskforce.org/ Page/ Topic/ recommendationssummary/cervical-cancer-screening>. Erişim: 6 July 2015.
91. **Thaxton L, Waxman AG.** Cervical Cancer Prevention Immunization and Screening. *Med Clin North Am*, **2015** 99,3: Pages 469-477.
92. **Lees BF, Erickson BK, Huh WK.** Cervical cancer screening: evidence behind the guidelines. *Am J Obstet Gynecol*, **2016**;214(4):438-43.

93. Saslow D, Solomon D, Lawson HW, Killackey M, Kulasingam SL, Cain J, Garcia FA, Moriarty AT, Waxman AG, Wilbur DC, Wentzensen N, Downs LS Jr, Spitzer M, Moscicki AB, Franco EL, Stoler MH, Schiffman M, Castle PE, Myers ER; American Cancer Society, American Society for Colposcopy and Cervical Pathology, and American Society for Clinical Pathology Screening Guidelines for the Prevention and Early Detection of Cervical Cancer *Am J Clin Pathol*, 2012;137(4):516-42.
94. Shew ML, Ermel AC, Tong Y, Tu W, Qadadri B, Brown DR. Episodic detection of human papillomavirus within a longitudinal cohort of young women. *J Med Virol*, 2015;87(12):2122-9.
95. van der Aa MA, Pukkala E, Coebergh JW, Anttila A, Siesling S. Mass screening programmes and trends in cervical cancer in Finland and the Netherlands. *Int J Cancer*, 2008 15;122(8):1854-8.
96. Nanda K, McCrory DC, Myers ER, Bastian LA, Hasselblad V, Hickey JD, Matchar DB. Accuracy of the Papanicolaou test in screening for and follow-up of cervical cytologic abnormalities: a systematic review. *Ann Intern Med*, 2000 16;132(10):810-9.
97. Spence AR, Goggin P, Franco EL. Process of care failures in invasive cervical cancer: systematic review and meta-analysis. *Prev Med*, 2007;45(2-3):93-106.
98. Strickler H, Shah K. Comparison of three management strategies for patients with atypical squamous cells of undetermined significance: baseline results from a randomized trial. *J Natl Cancer Inst*, 2001 20;93(12):951; author reply 951-2.
99. Wright TC Jr, Schiffman M, Solomon D, Cox JT, Garcia F, Goldie S, Hatch K, Noller KL, Roach N, Runowicz C, Saslow D. Interim guidance for the use of human papillomavirus DNA testing as an adjunct to cervical cytology for screening. *Obstet Gynecol*, 2004;103(2):304-9.
100. Paavonen J, Naud P, Salmerón J, Wheeler CM, Chow SN, Apter D, Kitchener H, Castellsague X, Teixeira JC, Skinner SR, Hedrick J, Jaisamrarn U, Limson G, Garland S, Szarewski A, Romanowski B, Aoki FY, Schwarz TF, Poppe WA, Bosch FX, Jenkins D, Hardt K, Zahaf T, Descamps D, Struyf F, Lehtinen M, Dubin G; Efficacy of human papillomavirus (HPV)-16/18 AS04-adjuvanted vaccine against cervical infection and precancer caused by oncogenic HPV types (PATRICIA): final analysis of a double-blind, randomised study in young women. *HPV PATRICIA Study Group. Lancet*, 2009;374(9686):301-14.
101. Zhai L, Tumban E. Gardasil-9: A global survey of projected efficacy. *Antiviral Res*, 2016;130:101-9.
102. Stoler MH, Schiffman M. Interobserver reproducibility of cervical cytologic and histologic interpretations: realistic estimates from the ASCUS-LSIL Triage Study. Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance-Low-grade Squamous Intraepithelial Lesion Triage Study (ALTS) Group. *JAMA*, 2001 21;285(11):1500-5.
103. Katki HA, Kinney WK, Fetterman B, Lorey T, Poitras NE, Cheung L, Demuth F, Schiffman M, Wacholder S, Castle PE. Cervical cancer risk for women undergoing concurrent testing for human papillomavirus and cervical cytology: a population-based study in routine clinical practice. *Lancet Oncol*, 2011; (7):663-72.
104. Ronco G, Dillner J, Elfström KM, Tunesi S, Snijders PJ, Arbyn M, Kitchener H, Segnan N, Gilham C, Giorgi-Rossi P, Berkhof J, Peto J, Meijer CJ; International HPV screening working group. *Lancet*. Efficacy of HPV-based screening for prevention of invasive cervical cancer: follow-up of four European randomised controlled trials, 2014 8;383(9916):524-32.

105. Herzog TJ, Monk BJ. Am J. Reducing the burden of glandular carcinomas of the uterine cervix. *Obstet Gynecol*, 2007;197(6):566-71.
106. Katki HA, Schiffman M, Castle PE, Fetterman B, Poitras NE, Lorey T, Cheung LC, Raine-Bennett T, Gage JC, Kinney WK. Benchmarking CIN 3+ risk as the basis for incorporating HPV and Pap cotesting into cervical screening and management guidelines. *J Low Genit Tract Dis*, 2013;17(5 Suppl 1):S28-35.
107. Wright TC Jr, Stoler MH, Sharma A, Zhang G, Behrens C, Wright TL. Evaluation of HPV-16 and HPV-18 genotyping for the triage of women with high-risk HPV+ cytology-negative results. ATHENA (Addressing THE Need for Advanced HPV Diagnostics) Study Group. *Am J Clin Pathol*, 2011;136(4):578-86.
108. Winer RL, Lee SK, Hughes JP, Adam DE, Kiviat NB, Koutsky LA. Genital human papillomavirus infection: incidence and risk factors in a cohort of female university students. *Am J Epidemiol*, 2003; 157(3):218-26.
109. Ho GY, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ, Burk RD. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women *Engl J Med*, 1998 12;338(7):423-8.
110. Committee on Gynecologic Practice, American College of Obstetricians and Gynecologists. Committee Opinion No 544: Over-the-counter access to oral contraceptives. *Obstet Gynecol*, 2012;120(6):1527-31.
111. Schiffman M, Wentzensen N. From human papillomavirus to cervical cancer. *Obstet Gynecol*, 2010;116(1):177-85.
112. Murphy J, Mark H, Anderson J, Farley J, Allen J. A Randomized Trial of Human Papillomavirus Self-Sampling as an Intervention to Promote Cervical Cancer Screening Among Women With HIV. *J Low Genit Tract Dis*, 2016 Apr;20(2):139-44.
113. Thomas TL. Cancer Prevention: HPV Vaccination. *Semin Oncol Nurs*, 2016; 32(3):273-80.
114. Harrison C, Britt H, Garland S, Conway L, Stein A, Pirotta M, Fairley C. Decreased management of genital warts in young women in Australian general practice post introduction of national HPV vaccination program: results from a nationally representative cross-sectional general practice study. *PLoS One*, 2014; 9(9):e105967
115. Iftner T, Eberle S, Iftner A, Holz B, Banik N, Quint W, Straube AN. Prevalence of low-risk and high-risk types of human papillomavirus and other risk factors for HPV infection in Germany within different age groups in women up to 30 years of age: an epidemiological observational study. *J Med Virol*, 2010;82(11):1928-39.
116. Meloni A, Pilia R, Campagna M, Usai A, Masia G, Caredda V, Coppola RC. Prevalence and molecular epidemiology of human papillomavirus infection in Italian women with cervical cytological abnormalities. *J Public Health Res*, 2014;3(1):157.
117. Grozdanov P, Zlatkov V, Ganchev G, Karagiosov I, Toncheva D, Galabov AS. HPV prevalence and type distribution in women with normal or abnormal Pap smear in Bulgaria. *J Med Virol*, 2014;86(11):1905-10.

118. Salcedo M, Pina-Sanchez P, Vallejo-Ruiz V, Monroy-Garcia A, Aguilar-Lemarroy A, Cortes-Gutierrez EI, Santos-Lopez G, Montoya-Fuentes H, Grijalva R, Madrid-Marina V, Apresa-Garcia T, Hernandez DM, Jave-Suarez LF, Romero P, Poot A, Salgado E, Ramos-Gonzalez P. Human papillomavirus genotypes among females in Mexico a study from the Mexican institute for social security. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014;15(23):10061-6.7
119. Yousefzadeh A, Mostafavizadeh SM, Jarollahi A, Raeisi M, Garshasbi M, Siavashvahi Z, Moazzami B, Shafaghi B. Human papillomavirus (HPV) prevalence and types among women attending regular gynecological visit in Tehran. *Iran. Clin Lab*, 2014;60(2):267-73.
120. Moga MA, Irimie M, Oanta A, Pascu A, Burtea V. Type-specific prevalence of human papillomavirus by cervical cytology among women in Brasov, Romania. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014;15(16):6887-92.
121. Lewis-Bell K, Luciani S, Unger ER, Hariri S, McFarlane S, Steinau M, Prieto-Lara E, Vicari AS, Irons B, Lewis MJ, Andrus JK. Genital human papillomaviruses among women of reproductive age in Jamaica. *Rev Panam Salud Publica*, 2013;33(3):159-65.
122. Lindemann ML, Sánchez Calvo JM, Chacón de Antonio J, Sanz I, Díaz E, Rubio MD, de la Morena ML. Prevalence and Distribution of High-Risk Genotypes of HPV in Women with Severe Cervical Lesions in Madrid, Spain: Importance of Detecting Genotype 16 and Other High-Risk Genotypes. *Adv Prev Med*, 2011; 269468. doi: 10.4061/2011/269468.
123. de Jonge M, Busecke G, Heinecke A, Bettendorf O. Human papillomavirus genotype distribution in cytologically screened women from northwest Germany. *Acta Cytol*, 2013;57(6):591-8.
124. Heard I, Tondeur L, Arowas L, Falguières M, Demazoin MC, Favre M. Human papillomavirus types distribution in organised cervical cancer screening in France. *PLoS One*, 2013 14;8(11):e79372.
125. Aguilar-Lemarroy A, Vallejo-Ruiz V, Cortés-Gutiérrez EI, Salgado-Bernabé ME, Ramos-González NP, Ortega-Cervantes L, Arias-Flores R, Medina-Díaz IM, Hernández-Garza F, Santos-López G, Piña-Sánchez P. Human papillomavirus infections in Mexican women with normal cytology, precancerous lesions, and cervical cancer: type-specific prevalence and HPV coinfections. *J Med Virol*, 2015;87(5):871-84.
126. Fındık D, Türk Dağı H, Arslan U, Fındık Y. Servikal örneklerde human papillomavirus sıklığı ve genotip dağılımı *Genel Tıp Derg*, 2012;22(4):116-20.
127. Yuce K, Pinar A, Salman MC, Alp A, Sayal B, Dogan S, Hascelik G. Detection and genotyping of cervical HPV with simultaneous cervical cytology in Turkish women: a hospital-based study. *Arch Gynecol Obstet*, 2012; 286(1):203-8.
128. Özcan ES, Taşkin S, Ortaç F. High-risk human papilloma virus prevalence and its relation with abnormal cervical cytology among Turkish women. *J Obstet Gynaecol*, 2011; 31(7):656-8. doi:10.3109/01443615.2011.597460.
129. Sahiner F, Gümrall R, Sener K, Yiğit N, Dede M, Yapar M, Kubar A. Investigation of HPV-DNA in cervical smear samples by two different methods: MY09/11 consensus PCR and type-specific real-time PCR. *Mikrobiyol Bul*, 2012; 46(4):624-36.
130. Şahiner F, Kubar A, Gümrall R, Ardiç M, Yiğit N, Şener K, Dede M, Yapar M. Efficiency of MY09/11 consensus PCR in the detection of multiple HPV infections. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2014;80(1):43-9.

- 131.Şahiner F, Kubar A, Yapar M, Şener K, Dede M, Gümral R. Detection of major HPVs by a new multiplex real-time PCR assay using type-specific primers. *J Microbiol Methods*, **2014**;97:44-50.
- 132.Tuncer ZS, Boyraz G, Sahin N, Alp A. Distribution of human papillomavirus types in Turkish women. *Eur J Gynaecol Oncol*, **2012**;33(2):204-6
- 133.Eren F, Erenus M, Bas E, Ahiskali R, Yoldemir T. Prevalence of HPV infection by cytologic diagnosis and HPV DNA extraction and prevalence of the HPV genotypes detected in urban Turkish women. *Int J Gynaecol Obstet*, **2010**; 109(3):235-8.
- 134.Tezcan S, Ozgur D, Ulger M, Aslan G, Gurses I, Serin MS, Giray BG, Dilek S, Emekdas G. Human papillomavirus genotype distribution and E6/E7 oncogene expression in Turkish women with cervical cytological findings. *Asian Pac J Cancer Prev*, **2014**;15(9):3997-4003.
- 135.Kasap B, Yetimalar H, Keklik A, Yildiz A, Cukurova K, Soylu F. Prevalence and risk factors for human papillomavirus DNA in cervical cytology. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, **2011**;159(1):168-71.
- 136.Demir ET, Ceyhan M, Simsek M, Gunduz T, Arlier S, Aytac R, Aycan AE, Gurbuz V. The prevalence of different HPV types in Turkish women with a normal Pap smear. *J Med Virol*, **2012**;84(8):1242-7.
- 137.Aslan FG, Us T, Kaşifoğlu N, Özalp SS, Akgün Y, Öge T. Investigation of human papillomavirus prevalence in women in Eskişehir, Turkey by Pap smear, hybrid capture 2 test and consensus real-time polymerase chain reaction and typing with pyrosequencing method. *Mikrobiyol Bul*, **2016**;50(1):73-85.

ÖZGEÇMİŞ

1989 yılında Adana’da doğdu. İlköğretim Gazeteci Adem Yavuz İlköğretim Okulunda ve ortaöğretimini Öğretmen Zeynep Erdoğan İlköğretim Okulu’nda, liseyi Seyhan Çukurova Lisesi’nde tamamladı. Mersin Gazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü’nden 2012 yılında mezun oldu. 2014 yılında Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programında eğitim almaya başladı.

