

← Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya
(sol yandaki gibi) olacak .



← Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak

← Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(YÜKSEK LİSANS)

**JİNEKOLOJİ KLİNİĞİNE BAŞVURAN HASTALARDA
HUMAN PAPİLLOMAVİRUS SIKLIĞININ
ARAŞTIRILMASI**

M.OSMAN KÖKSAL

**DANIŞMAN
PROF.DR. ALİ AĞAÇFİDAN**

**MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI**

İSTANBUL-2007

TEZ ONAYI

Aşağıda tanıtımı yapılan tez, jüri tarafından başarılı bulunarak Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

31 / 07 / 2007

Prof.Dr.Emine Kökoğlu
Enstitü Müdürü

Kurum : İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Program Adı : Mikrobiyoloji
Programın seviyesi : Yüksek Lisans ☒ Doktora ☐
Anabilim Dalı : Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD
Tez Sahibi : M.Osman Köksal
Tez Başlığı : Jinekoloji Kliniğine Başvuran Hastalarda Human Papilloma Virus Sıklığının Araştırılması
Sınav Yeri : Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD.
Sınav Tarihi : 27 / 07 / 2007

Tez Sınav Jürisi

Ünvanı Adı Soyadı Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı

1.Prof.Dr Bülent Gürler	İstanbul Tıp Fak. Mikrobiyoloji AD
2.Prof.Dr Emel Bozkaya	İstanbul Tıp Fak. Mikrobiyoloji AD
3.Prof.Dr Ali Ağaçfıdan (danışman)	İstanbul Tıp Fak. Mikrobiyoloji AD
4.Prof.Dr Mü zeyyen Mamal	Cerrahpaşa Tıp Fak Mikrobiyoloji AD
5.Prof Dr Dilek Yaylalı	Diş Hekimliği Fak. Mikrobiyoloji AD

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

M.Osman KÖKSAL

Ailem'e.....

TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesi ve yürütülmesi de dahil olmak üzere, buradaki eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım, ilgi ve hoşgörüsünü esirgemeyen değerli hocam Sayın Prof. Dr. Ali Ağaçfıdan'a teşekkürlerimi sunarım.

Daima yakın ilgi ve desteklerini gördüğüm değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Emel Bozkaya ve Sayın Prof. Dr. Selim Badur'a teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım değerli hocam, Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Bülent Gürler'e içtenlikle teşekkür ederim.

Bilgi ve deneyimlerinden faydalanma olanağı bulduğum değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Rahmiye Berkiten, Sayın Prof. Dr. Ergene Bütet, Sayın Prof. Dr. Şengül Derbentli, Sayın Prof. Dr. Mine Anğ Küçüker, Sayın Prof. Dr. Nezahat Gürler, Sayın Prof. Dr. O. Şadi Yenen, Sayın Prof. Dr. Yıldız Yeğenoğlu, Sayın Prof. Dr. Gülden Yılmaz, Sayın Prof. Dr. Salih Türkoğlu, Sayın Prof. Dr. Çiğdem Bal, Sayın Prof. Dr. Betigül Öngen, Sayın Prof. Dr. Meltem Uzun, Sayın Prof. Dr. M. Derya Aydın, Sayın Prof. Dr. Ali Öner, Sayın Prof. Dr. Zayre Erturan, Sayın Doç. Dr. Özden Büyükbaba Boral'a teşekkürü bir borç bilirim.

Laboratuvar ve bilgi konusundaki deneyimlerini benimle paylaşan ve her zaman öneri ve yardımlarıyla yanımda olan Dr. Hayati Beka, Dr. Mustafa Önel'e teşekkür ederim.

Yardım ve desteklerini gördüğüm Dr.Seyhan Selvi Arslan, Uzm. Derya Önel, Lab. Zeycan Çınar, Uzm. Mürvet Bozacı, Dr. Fahriye Keskin, Dr. Sevgi Çiftçi ve Lab. Aslı Erdoğan'a teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda eğitimime başladığım ilk günden beri dostluklarını esirgemeyen, tüm içtenlikleriyle yol gösteren, tezimin hazırlanması sırasında da çok büyük yardımlarını gördüğüm, Dr. Emel Topal, Biyo. Kutay Sarsar, Biyo. Pınar Artun, Biyo. Mehmet İlkaç, Uzm. Seyda İğnak'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Değerli arkadaşlarım Biyo. Haluk Camcı, Biyo. İlhan Yılmaz, Biyo. Gökalep Erkan, Biyo. Elif Özdamar, Tıb. Biyo. Feriha Başoğlu, Mat.İbrahim Memiş ve ayrıca birlikte çalıştığım tüm arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım süresince bana her konuda destek olan Biyo. Hüdân Şen'e, yetişmemde büyük özveri göstererek bugünlere gelmemi sağlayan, sevgi ve desteklerini hep hissettiğim annem, babam, ablalarım ve kardeşime sonsuz teşekkürlerimi sunarım .

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: T976/06102006

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	
HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.	
BEYAN	iii
İTHAF	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar LİSTESİ	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ	x
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	xi
ÖZET	xiii
ABSTRACT	xiv
1. GİRİŞ VE AMAÇ:.....	1-2
2. GENEL BİLGİLER:.....	1
2.1.TARİHÇE:.....	3-4
2.2.SINIFLANDIRMA:.....	5-9
2.3.VİRUSUN GENEL ÖZELLİKLERİ:.....	10
2.4.HPV GENOMU VE REPLİKASYON:.....	11-12
2.5.EPİDEMİYOLOJİ:.....	12-14
2.6.MOLEKÜLER PATOGENEZ:.....	14-18
2.7.İMMÜNİTE:.....	18-19
2.8.KLİNİK SENDROMLAR:.....	20-28
2.9.LABORATUVAR TANISI:.....	28-31
2.10.AŞI.....	31-32
2.11.TEDAVİ:.....	33

3. GEREÇ VE YÖNTEM:.....	34-43
4. BULGULAR:.....	44-47
5. TARTIŞMA:.....	48-53
6.KAYNAKLAR:.....	54-63
ETİ KURUL KARARI:.....	64
ÖZGEÇMİŞ.....	66

TABLolar LİSTESİ

Tablo 2-1. HPV cins,tür,tipleri ve onların biyolojik özellikleri.....	s.8
Tablo 3-1. 0.5 ml reaksiyon tüpleri için ampifikasyonun programlama cetveli.....	s.43
Tablo 3-2. 0.2 ml reaksiyon tüpleri için amplifikasyon programlama cetveli.....	s.43
Tablo 4-1. Jinekolojik onkoloji kliniğinden alınan örneklerdeki HPV tiplerinin dağılımı.....	s.47
Tablo 4-2. HPV tiplerinin yaşlara göre dağılımı.....	s.49
Tablo 4-3. Birden fazla tiple oluşan infeksiyonların dağılımı.....	s.49
Tablo 4-4. HPV DNA pozitifliğinin semptomlu ve semptomsuz hastalardaki dağılımı.....	s.50

ŞEKİLLER LİSTESİ

- Şekil 2-1.** 118 papillomavirus tipini gösteren soy ağacı.....s.7
- Şekil 2-2.** Virusun elektron mikroskopi görüntüsü.....s.11
- Şekil 2-3.** Cryo-elektron mikroskopi analizi ile virusun üç boyutlu görüntüsü...s.11
- Şekil 3-1.** Görüntüleme metodu.....s.40
- Şekil 3-2.** HPV tip 6,11,18,53 pozitif bir örneğin, okuyucu tarafından görüntülenen sonuç tablosu s.45
- Şekil 4-1.** Çip üzerinde bulunan spesifik HPV proplarının yerleşim düzeni.....s.49
- Şekil 4-2.** HPV tip 16 pozitif örneğin çipteki görünümü.....s.49
- Şekil 4-3.** Karışık enfeksiyonun (HPV tip 11,61,70) çipteki görünümü.....s.49

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

Özl.- Özellekle

CIN- Cervical intraepitelial neoplasia

HPV- Human papillomavirus

EV- Epidermodysplasia verruciformis

PV- Papillomavirus

ICTV- International council on taxonomy of viruses

PCR- Polimeraz zincir reaksiyonu

Cand- candidate=aday

DNA- Deoksiribo nukleik asit

RNA- Ribo nukleik asit

Kd- Kilodalton

ORF- open reading frame

URR-Upstream regulatory region

mRNA- messenger RNA

HIV- Human İmmunodeficiency virus

HSV 2- Herpes simplex virus tip 2

E- Erken protein

L- Geç protein

E6AP- Hücresel ubiquitin ligaz

PDZ- PSD-95/Discs large/ZO-1

TGF- β - Transforming growth factor β

Rb- Retinoblastoma proteini

Cdk- Siklin bağımlı kinaz

HDAC- Histon deasetilaz

RFLP- Restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi

LMP-2- Latent membran proteini-2

TAP-1-Transport ile ilişkili protein-1

IFN α - İnterferon α

IFN β - İnterferon β

IL-18- İnterlökin 18

SIL- Sküamöz İntraepiteliyal lezyon

CIS- Karsinoma-in situ

RRP- Recurrent Respiratory Papilloma

HLA- Human leukocyte antigen

NMSC- Nonmelonoma Skin Cancer

BCC- basal cell carcinomas

SCC- Skuamöz hücre karsinomaları

AIDS- Acquired Immunodeficiency syndrome

CDC- Center for Disease Control and Prevention

EBV- Epstein-Barr virus

bDNA- branched DNA

HC2- Hybrid capture 2

AT- Array tube

NaCl- Sodyum klorür

ÖZET

Koksal OM.(2007). Jinekoloji kliniğine başvuran hastalarda Human papillomavirus infeksiyonlarının sıklığının araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Çalışmamızda İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Jinekoloji Bilim Dalına başvuran ve kolposkopi muayeneleri yapılan hastalarda Human papillomavirus infeksiyonlarının sıklığı araştırılmıştır. Human papillomavirus infeksiyonları ve servikal kanser arasında güçlü bir bağ bulunmaktadır. Günümüzde, kadınlarda en sık görülen ikinci kanser türünün servikal kanser olması dolayısıyla, servikal kanser ve prekürsör infeksiyonlarında, HPV DNA araştırılması bir zorunluluk haline gelmiştir.

Bu amaçla Kasım 2006-Mayıs 2007 tarihleri arasında İstanbul Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Jinekolojik Onkoloji Kliniğine başvuran 103 anormal sitolojili ve 23 normal sitolojili olmak üzere toplam 126 hastadan servikal sürüntü alınmış ve Human papillomavirus varlığı açısından incelenmiştir. Alınan örneklerden HPV DNA ekstraksiyonu yapıldıktan sonra izole edilen DNA, amplifiye edilmiş ardından DNA çip yöntemi ile tipleri belirlenmiştir. Yüzyirmialtı hastanın kırkdokuz (%38,9)'unda HPV DNA pozitifliği saptanmış olup bu hastalardan ondördünde (%11,1) HPV tip 16, beşinde (%3,96) HPV tip 18, altısında (%4,46) HPV tip 6, beşinde (%3,96) HPV tip 66, ikişer hastada (%1,58) HPV tip 31, 51, 53, birer hastada (%0,79) HPV tip 58, 59, 61, 84 ve dokuz (%7,14) hastada birden fazla tipler oluşan infeksiyon gözlemlenmiştir. Birden fazla tipler oluşan infeksiyonların durumuna bakıldığında iki hastada (%1,59) HPV tip 16 ve HPV tip 18, birer hastada (%0,79) HPV tip 16 ve 66, HPV tip 61 ve 84, HPV tip 6 ve 59, HPV tip 11, 61 ve 70, HPV tip 6, 11, 18 ve 53. Çalışmamızda, semptomlu hastalar ve HPV pozitifliği arasında güçlü bir korelasyon bulunmuştur ($\chi^2_y=15,95$, $p < 0,001$).

Anahtar Kelimeler: HPV, serviks kanseri, moleküler tanı, DNA çip

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: T976/06102006

ABSTRACT

Koksal OM. (2007). Frequency of Human papillomavirus (HPV) infection among women attending to gynecology clinic , İstanbul University , Health Sciences Institute, Department of Microbiology and Clinic Microbiology Master of Science Thesis.

In our research, we determine the frequency of the human papillomavirus in patients who applied to İstanbul School of Medicine, Department of Obstetrics and Gynecology, Section of Gynecology-Oncology for colposcopy. There is a strong correlation between HPV infection and cervical cancer. Recently the second most common cancer case in woman is cervical cancer. Therefore, in cervical cancer and in its precursor infections searching for HPV DNA is necessary.

In between November 2006 and May 2007, we collected total 126 pap smears from patients of gynecology department. 103 cytologically abnormal pap smears and 23 cytologically normal pap smears were collected and all the samples were observed for Human papillomavirus. First DNA was extracted, amplified and then applied onto the DNA chip (microarray) to find out the types of Human papillomavirus. 49 patients out of 126 (38.9%) were determined to be HPV positive. Fourteen (11.1%) of these HPV DNA positive patients had HPV 16, five (3.96%) HPV 18, six (4.46%) HPV 6, five (3.96%) HPV 66, two (1.58%) patients each had HPV 31, 51, 53 and one (0.79 patients each HPV 58, 59, 61, 84. Nine (7.14%) patients were infected with multiple HPV types. In this multiple HPV infection case two (1.59%) patient had HPV 16 and HPV 18, while one (0.79%) had HPV 16 and HPV 66, one (0.79%) had HPV 61 and 84, one (0.79%) had HPV 6 and 59, one (0.79%) had HPV 11, 61 and 70, one (0.79%) had HPV 6, 11, 18 and 53. In our research, we determined strong correlation between positive results and clinical symptoms ($\chi^2_y=15,95$, $p < 0,001$).

Key Words: HPV,Cervix Cancer, Molecular diagnosis, DNA chip

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University.
Project No. T976/06102006

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Papillomaviridae ailesi içinde yaklaşık 40 tanesi genital mukozayı infekte edebilen 100'den fazla virus tipi bulunmaktadır (27). Papillomaviruslar küçük zarfsız ikosaedral simetrikli, replikasyonlarını skuamöz epiteliyal hücrelerde gerçekleştiren DNA viruslarıdır.

Düşük risk HPV tipleri (özl. HPV tip 6, 11) tipik olarak benign siğillerle çok nadir olarak malignitelerle ilişkilidir (110, 112). Buna karşın yüksek risk HPV tipleri, (özl. HPV tip 16, 18, 31, 33, 45) baş ve boyun kanserleri (19), servikal kanser ve diğer genital malignitelerin gelişimi ile bağlantılıdır (69, 112). Servikal HPV enfeksiyonu sık rastlanılan bir cinsel yolla bulaşan enfeksiyondur. Birçok kadın ilk ilişkisinden kısa bir süre sonra HPV ile infekte olur (79).

Dünya üzerindeki kadınlar arasında HPV enfeksiyonu populasyon prevalansı tahminen %2 ile %44 arasında değişmektedir (11)

Servikal kanser, dünya çapında kadınlarda en sık görülen ikinci kanser türüdür (79). Vakaların büyük çoğunluğu gelişmekte olan ülkelerde görülür. Bu ülkelerde servikal kanser, mortalitesi en yüksek kanser türüdür. Gelişmiş ülkelerin çoğunda bir süredir serviks skuamöz hücre karsinoma insidansı düşmektedir, fakat serviks adenokarsinoma insidansı artmaktadır (14, 79).

Bulaş, cinsel ilişki ile olmaktadır (deri teması), perinatal bulaşma olasılığı nadir de olsa bulunmaktadır. Bağışıklığı baskılanmış bireylerde bulaş çok daha kolay gerçekleşebilir (32, 41, 50).

Epidemiyolojik ve laboratuvar bazlı çalışmalar, 15 yüksek risk veya onkojenik HPV tiplerinin herhangi biriyle enfeksiyon gerekliliğini göstermiştir. Ancak servikal kanser oluşumu için yüksek risk HPV ile enfeksiyon tek başına yeterli değildir (30, 84, 112). HPV tip 18, serviks adenokarsinoması ile en çok ilişkili olan tiptir. HPV tip 16 ve daha sonra HPV tip 18 skuamöz hücre karsinomasında en sık rastlanılan tiplerdir (70, 101).

Servikal kanserin iyi tanımlanmış premalignant fazı vardır. Bu fazda; servikal hücrelerin sitolojik incelenmesi ve servikal örneğin histolojik incelemesi ile tanı

konulabilir. Bu prekanseröz değişiklikler CIN-1, CIN-2 ve CIN-3'e kadar değişebilen histolojik anormallikleri içerir. Prekanseröz servikal değişikliklerin tedavisi terapötik olarak etkili görünse de prosedür olarak etkisizdir.

Günümüzde, Genital Human papillomavirus tiplerinin, servikal kanserler ve prekürsör lezyonları ile olan ilişkisi bilinmektedir. HPV ile infekte olmuş hastaların tespit edilmesi, servikal kanser ilişkili HPV tipleri ile infekte hastaların belirlenmesi, gerekli tedavilerinin yapılması, muhtemel servikal kanser vakalarının engellenmesi açısından önem taşımaktadır.

Bu alışma İstanbul Tıp Fakóltesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Jinekolojik Onkoloji Kliniğine başvuran ve kolposkopi muayeneleri yapılan hastalarda, Human papillomavirus infeksiyonlarının bulunuş sıklığı belirlemek amacıyla yapılmıştır. Bu amaçla Kasım 2006 – Haziran 2007 tarihleri arasında İstanbul Tıp Fakóltesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Jinekolojik Onkoloji kliniğine başvuran ve kolposkopi muayeneleri yapılan 126 hastadan servikal sürüntü örneği alınmıştır. Alınan örnekler ekstraksiyon, amplifikasyon ve hibridizasyon uygulamalarının ardından tiplendirilmeleri yapılarak tanımlarının yapılmasına çalışılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe:

Human Papillomavirusların etken olduğu siğillerin varlığı ve bulaşıcı tabiatıta oldukları Antik Yunan ve Roma'dan beri bilinmekteydi. Ancak 19.yüzyılın başlarına kadar genital siğillerin, sifiliz veya gonoreenin bir formu olduğu düşünülmekteydi (50).

1898 yılında M'Fadyan ve Hobday karakterize edilen tüm izole edilmiş bakterileri de göz önünde bulundurarak papilloma filtratlarıyla köpek siğillerinin bulaşının gerçekleşmesi ile ilgili detayları yayımlamışlardır, bununla birlikte siğillerin, gerçek birer tümör olarak ele alınmadıkları bu yayına ilgi çok az olmuştur.

1907'de Roma'da, Cuiffo tarafından yürütülen araştırmalarda insan siğillerinden alınan hücresiz ekstraktlar ile inokülasyon deneyleri yapılarak ekstraktların inokülasyon bölgesinde kutanöz siğilleri oluşturduğu gözlemlenmiştir.

İlk kez 1922'de Basel'de Lewandowski ve Lutz tarafından rapor edilen bir sendromun tanımı bu düşüncenin yavaş yavaş değişmesini sağlamıştır. Bu araştırmacılar geniş verrukozlar (büyük çoklu siğiller) ile karakterize Epidermodysplasia verruciformis 'i kalıtsal bir durum olarak tanımlamışlardır. Bu hastalarda alın, yüz, eller gibi güneşe maruz kalan bölgelerde papillomatöz lezyonların bazıları skuamöz karsinomaya dönüşmektedir (111).

1933'te Richard E. Shope pamuk kuyruk tavşanı papillomalarında keratinli dokuya inoküle edildiğinde siğil oluşumunu indükleyen ve filtreden geçebilen etkeni keşfetti. Shope bu virusu karakterize etmiş ve 65°C'ye, 30 dk. maruz bırakılmayı tolere edebildiğini ve olağanüstü ısı stabilitesine sahip olduğunu bildirmiştir.

1934'te Rous ve Bernard özellikle evcil tavşanların bir çoğunda ilk papillomanın skuamöz hücreli karsinomaya dönüştüğünü, bu enfeksiyonun malignant potansiyele sahip olduğunu keşfetmişlerdir. Takip eden yıllar süresince Rous ve arkadaşları bu sistem üzerinde çalışmaya devam etmişler ve özellikle kimyasal karsinojenler ile bu virus enfeksiyonunun etkileşimini incelemişlerdir. Hatta bu virusun sistemik uygulamalarından sonra enfeksiyon ve hasarlı deri veya belirli kimyasal karsinojenlerle

muamele edilen deri ile karsinoma gelişimi arasında olağanüstü derecede bir sinerjizm görmüşlerdir (111).

1950- 1960'lı yıllarda yapılan çalışmalar çok yoğun olmamakla beraber, bu dönemde papillomavirus replikasyonu ile infekte epitelyumun farklılaşma işlemi arasındaki ilişkinin ispatlanması, papillomavirus virionunun fizikokimyasal analizini de içeren bazı önemli ilerlemeler gerçekleşmiştir (50).

1961'de İto ve Evans karsinomanın infeksiyöz papillomavirus DNA'sı içerdiğini göstermişlerdir. İnsan papillomatöz lezyonlarının virus infeksiyonları ve karsinogenez ile ilişkisinin anlaşılması çok yavaş olmuştur. İnsan siğillerinin bulaşıcı etiyolojisinin hücresiz bulaşmaya dayandığı açıkça kanıtlandı, onlara esasen kozmetik bir kusur gözüyle bakılıyordu ve herhangi önemli bir sağlık sorununa yol açmadığı düşünülmekteydi (111).

Lutz 1946'da ve Jablonska ve Millewski 1957'de inokülasyon deneyleriyle bu siğillerdeki viral etiyolojiyi ispatladılar. Bu siğillerde görülen partiküllerin deride skuamöz hücreli kanserin gelişimine neden olma potansiyeline sahip olduğunu esasen Jablonska gösterdi (74).

Orth ile arkadaşları başarılı bir şekilde skuamöz hücre karsinoma biyopsilerinde ve Epidermodysplasia verruciformis lezyonlarında çoğu HPV tip 5 olan yeni birçok papillomavirus varlığını göstermişlerdir. Epidermodysplasia verruciformis görülen hastalarda, kutanöz skuamöz hücre kanserlerinden izole edilen ilk papillomavirus infeksiyonu HPV tip 5 olarak saptanmıştır. Ancak, sendromun nadirliği, geniş çalışmalar için gerekli klinik materyal elde etmekteki zorluklar ve bu karsinomalardan elde edilen kültür dizilerinin yokluğu nedeniyle bu konuya olan ilgi sınırlı kalmıştır (74).

Papillomavirus araştırmaları, orofaringeal kanser altkümeleri diğer anogenital kanserler ve serviks kanserine neden olan spesifik HPV tiplerinin izolasyonu ile sonuçlanmıştır. Genital siğillerden, HPV tip 6 DNA'sının izolasyonu 1980 yılında, laringeal siğillerden HPV tip 11 izolasyonu 1982 yılında başarılmıştır (111).

2.2. Sınıflandırma:

1950 ortalarından 1960'lı yıllara kadar, Papillomaviruslar (PV) ve Polyomavirusların temel nükleik asit analizleri ve elektron mikroskopisi incelemelerine başlanmasıyla, sadece bu iki grubun çift iplikli sirküler DNA genomuna sahip ve ikosahedral simetrik zarfsız partiküller olduğu gözlemlenmiştir. Sonuç olarak çok benzer oldukları düşünülerek bu viruslar, Papovaviridae ailesi adı altında tek bir aile içerisinde dahil edilmişlerdir (10).

Danos 1982'de yaptığı sekans analizi ve fonksiyonel çalışmalarla, bu benzerliklerin çok yüzeysel olduğu göstermiştir (25).

Tüm polyomavirusların genom büyüklükleri 5 kb civarında iken, Papillomavirusların 8 kb civarındadır. Papillomaviruslarda transkripsiyon sadece bir yönde meydana gelirken, polyomaviruslar iki transkripsiyon alt birimi içerirler ve bunlar birbirini izleyerek okuma gerçekleştirir. En önemlisi Polyomaviruslar ve Papillomaviruslar; T-antijenleri ve E1 genindeki çok küçük homolog segment dışında herhangi önemli bir nükleotid veya aminoasit dizi benzerliği içermemektedir.

Doğal ilişkilerin yansıtıldığı taksonomik sınıflandırmadan sonra bu virusların farklı ailelerden olduğu sonucuna varılmıştır. Yakın bir süre önce bu aile International Council on Taxonomy of Viruses (ICTV) tarafından resmen papillomaviridae ailesi olarak tanımlanmaya başlamıştır (27).

L1 ORF (Open reading frame)'si genomdaki en iyi korunmuş gen bölgesidir ve bu yüzden 15 seneyi aşkın bir süredir yeni PV tiplerini izole edilmesinde bu bölge kullanılmaktadır. Yeni PV örneği tam genomu kopyalanmış ve bilinen PV tiplerinin L1 ORF' sinin DNA dizilerinden %10'dan daha fazla farklılık içeriyorsa yeni bir tip, farklılık %2–10 arasında ise subtip, %2'den az ise varyant olarak isimlendirilir. Genomu, geleneksel klonlama tekniklerinden ziyade PCR (Polymerase Chain Reaction=polimeraz zincir reaksiyonu) tarafından üretilen Human papillomavirus tipleri numaralarının önüne “cand” (candidate=aday) kısaltmasının eklenmesiyle tanımlanırlar. (örn; candHPV 86)(27).

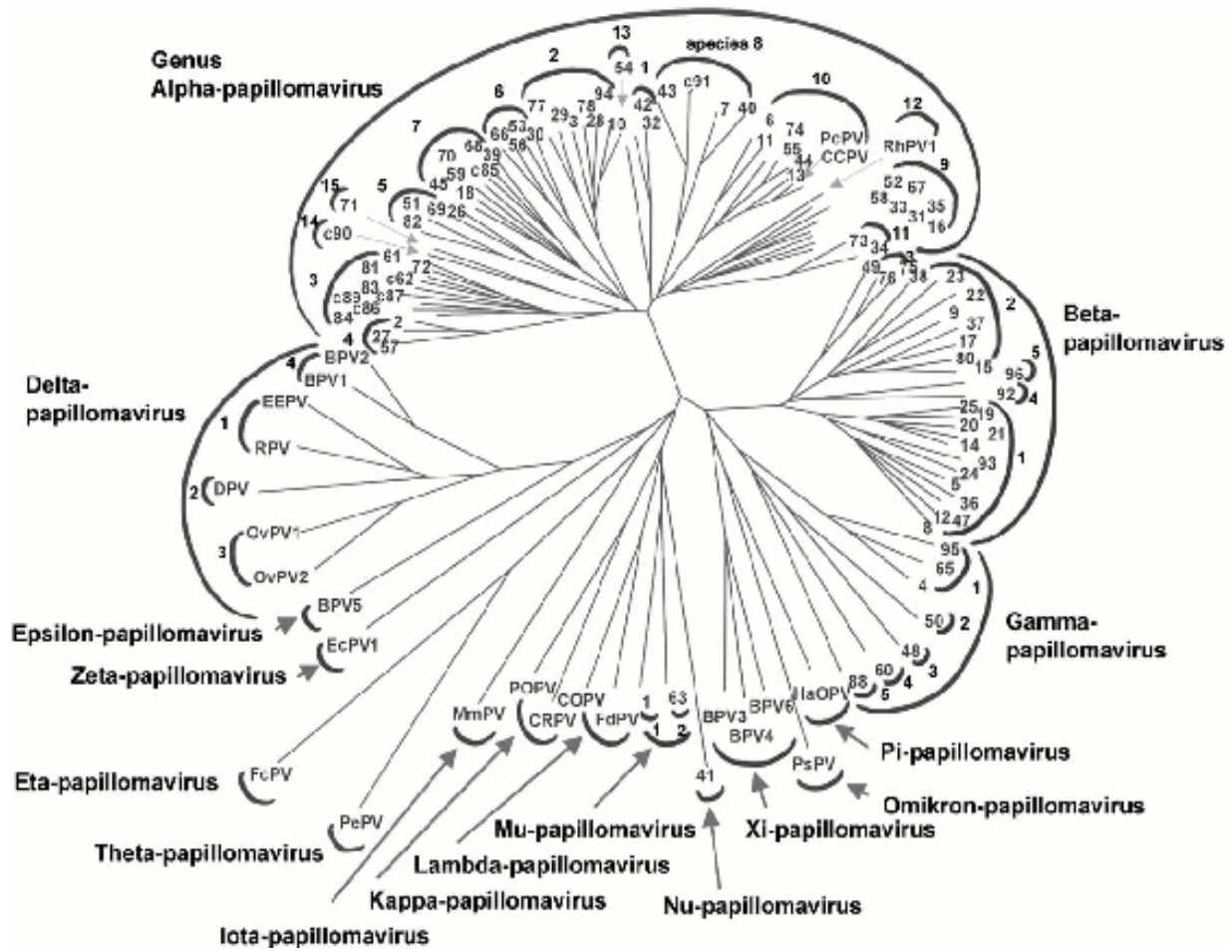
Sadece kısmi PCR ampikonları ile tanımlanan olası HPV tipleri numaralandırılmış tip olamazlar, ancak orijinlendikleri laboratuvarı gösteren bir

kısaltmayla tanımlanırlar (örn; Luisa Villa X 100 için LVX100 olarak). Bu tanımlama 1995'te Quebec'de Uluslararası Papillomavirus Workshopunda Papillomavirus taksonomisi ve tanısında çalışan tüm bilim adamları tarafından kabul edilmiştir (27).

Bu sınıflandırmada başlıca 3 hedef vardır;

- 1) Papillomavirus tipleri arasında ilişkiler kurabilmek
- 2) Virolojide sık sık uygulanan ve tüm biyolojik organizmaların sistematiikleri için kullanılan cins ve tür taksonomik terimlerine karşı Papillomavirus tip terimini benzetmek
- 3) Virusun patolojik ve biyolojik özellikleri, taksonomik sınıflandırma ile arasındaki ilişkiyi araştırabilmek.

Sınıflandırmada esasen L1 geninin 291 bp'lik küçük bir parçası kullanılır. Genomu tamamlanmış 118 PV'in arasında dizi karşılaştırmaları, virusların arasında yüksek derecede çeşitliliği göstermektedir. L1 ORF dizileri karşılaştırıldığında buna benzer bir dağılma bulunmuştur. Filogenetik ağaç, 96 HPV tipi ve 22 hayvansal papillomavirus tipinin tam L1 ORF'leri temel alınarak oluşturulmuştur (Şekil 2-1) (27).



Şekil 2-1. Filogenetik ağaç 118 papillomavirus tipinin sekanslarını içermektedir. Her bir dalın uç kısmındaki sayılar tanımlanmış HPV tiplerini göstermektedir. c-numara ise aday HPV tiplerinden söz etmektedir. Diğer tüm kısaltmalar hayvan papillomaviruslarını göstermektedir. En dıştaki yarım dairesel sembol, izole edilmiş papillomavirus cinsini (örneğin; cins alfa-papillomavirus), içteki yarım dairesel sembollerdeki numaralar, papillomavirus türünden söz etmektedir. Yukarıdaki şekilden örnek vermek gerekirse HPV tip 7, 40, 43 ve cand91 birlikte alfa-papillomavirus cinsinde yer alan HPV tür 8 içinde yer almaktadırlar (27).

Cins	Tür	Tip(ler)	Özellikler
Alfa-Papillomavirusler	4	HPV 2,HPV 7,HPV 57	Yaygın deri siğilleri, sıkça çocuk genital siğilleri
	5	HPV 26,HPV 51,HPV 69, HPV 82	Yüksek risk malignant ve benign mukozal lezyonlar
	6	HPV 53,HPV 30,HPV 56, HPV 66	Yüksek risk malignant ve benign mukozal lezyonlar
	7	HPV 18,HPV 39,HPV 45, HPV 59, HPV 68,HPV 70	Yüksek risk malignant mukozal lezyonlar, Servikte, skuamöz karsinomadan daha sık adenokarsinoma.
	8	HPV 7,HPV 40,HPV 43	Düşük risk mukozal ve kutanöz lezyonlar, HPV-7 kasap siğil virusu olarak bilinir.
	9	HPV 16,HPV 31,HPV 33, HPV 35, HPV 52,HPV 58,HPV 67	Yüksek risk malignant mukozal lezyonlar, servikte,adenokarsinomadan daha sık skuamöz karsinoma.HPV tip 16 e sık rastlanan tip.
	10	HPV 6,HPV 11,HPV 13,HPV 44, HPV 74	Benign mukozal lezyonlar. HPV 6, HPV 11 erkek ve kadında genital siğil, servikte Condiloma accuminata.
Beta- Papillomavirusler	1	HPV 5,HPV 8 (Zengin genusta en sık rastlananlar)	Bağıışıklığı-zayıf ve EV'li hastalarda kutanöz malign ve benign lezyonlar.
Gamma-Papillomavirusler	1	HPV 4,HPV 65 (Zengin genusta en sık rastlananlar)	Kutanöz benign lezyonlar
Delta- Papillomavirusler	4	BPV 1 (Genusta en sık rastlanan)	Sığırlarda fibropapilloma, Atlarda sarkoidler
Kappa- Papillomavirusler	1	Cottontail Rabbit papillomavirus (CRPV)	Kutanöz lezyonlar, önemli bir hayvan modeli
Mu- Papillomavirusler	1,2	HPV 1,HPV 63	Kutanöz lezyonlar, Sıklıkla ayak siğilleri
Nu- Papillomavirusler	1	HPV 41(Hiçbir HPV tipi ile ilişkisi yok)	Kutanöz lezyonlar
Xi- Papillomavirusler	1	BPV 3,BPV 4,BPV 6	Yemek borusunda papillomalar.

Tablo 2-1. En sık rastlanan papillomavirus tipleri ve bu tiplerin biyolojik özellikleri (10).

Şu anda bilinen insan ve hayvan papillomavirusları, Yunan harfleri ile betimlenen 16 cinsi oluşturur. Bu cinslerin beşi, sadece HPV tiplerinden ve bazı maymunlardan izole edilen papillomavirus tiplerinden oluşur. Bütün diğer cinsler, çeşitli memeli ve kuşlarda bulunan tipleri içerir (10).

Klinik yönden en önemli cins, alfa- papillomavirus' tur. Bu cins, mukozal ve genital lezyonlarla ilişkili tüm HPV tiplerini içerir.

Genomik dizileri temel alınarak, bütün HPV tipleri alfapapillomavirus cinsi içinde 15 türü oluşturur. 15 HPV tipinin 12'si son yıllarda yapılan epidemiyolojik çalışmalarla yüksek risk olarak sınıflandırılmıştır. Servikal kanser oluşumu ile ilişkili iki türün HPV-tür 7 (HPV tip 18, HPV tip 39, HPV tip 45, HPV tip 59 ve HPV tip 68) ve HPV-tür 9 (HPV tip 16, HPV tip 31, HP tip 33, HPV tip 35, HPV tip 52, HPV tip 58 ve HPV tip 67) oldukları gösterilmiştir (70).

Betapapillomaviruslar, Epidermodysplasia verruciformis (EV) ile ilişkili tüm HPV tiplerini kapsar. EV, kutanöz neoplastik bir hastalıktır (81).

Genetik yönden yatkın olmayan taşıyıcılarda, beta-papillomavirus ve gamma-papillomaviruslar ile ilgili infeksiyonlar genellikle asemptomatik seyirlidir ve henüz resmen tanımlanmış olmayan birçok HPV tipini içerir (3).

Bu iki cinste bulunan virusların bir kısmının, bağışıklığı bastırılan bireylerde deri kanseriyle ilişkili oldukları saptanmıştır, HPV infeksiyonu ve malignant neoplazi arasında potansiyel bir sebep-sonuç ilişkisi olup olmadığı, hala araştırılmaktadır (28).

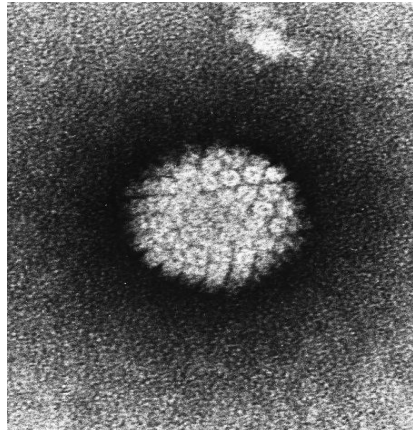
Papillomaviruslar hakkındaki tüm sekans bilgisi sadece GenBank gibi merkezi veritabanlarından değil internette halka açık bir veritabanında yorumlanmış şekliyle bulunmaktadır (HPV Sequence Data Base; Farmer 1995).

2.3. Virusun Genel Özellikleri:

Papillomaviruslar küçük, zarfsız, ikosahedral simetridir, replikasyonlarını skuamöz epiteliyal hücrelerde gerçekleştiren DNA viruslarıdır (Şekil 2-2). Papillomavirus partiküllerinin sedimentasyon katsayısı 300'dür. Papillomavirus partikülü yaklaşık 52-55 nm çapındadır. Virion partikülü 72 kapsomerden oluşan kapsid içerisinde yaklaşık 8000 baz çifti büyüklüğünde çift zincirli sirküler DNA'dan oluşur. Cryo-elektron mikroskopi analizi ile virion partikülü yapısının üç boyutlu şekli oluşturulduğunda virusların 72 pentamerik kapsomerden oluştuğu gözlemlenmiştir (Şekil 2-3) (50).

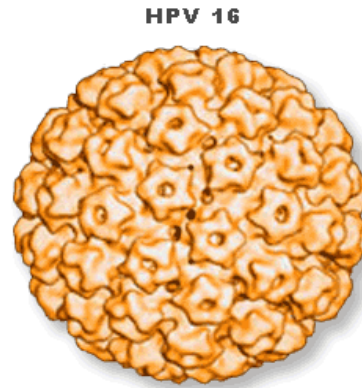
Kapsomerler, morfolojik olarak iki tiptir. 72 kapsomerden 60 tanesi 6 komşu kapsomerle çevrelenen hekzonlardan, 12 tanesi ise 5 komşu kapsomerle çevrelenen pentonlardan oluşur (67).

Papillomavirus kapsidi 2 yapısal protein içermektedir. Majör kapsid proteini L1'in molekül ağırlığı, yaklaşık 55kd'dur ve toplam viral proteinin yaklaşık % 80'ini oluşturmaktadır (34). Minör proteini L2'nin moleküler büyüklüğü, yaklaşık 70 kd'dur. Guanozin-sitozin içeriği birçok papillomavirus genomunda yaklaşık % 42'dir. Viral DNA virion ağırlığının yaklaşık olarak % 12'sini oluşturur (34, 50).



Şekil 2-2.

Virusun elektron mikroskopi görüntüsü.



Şekil 2-3.

Cryo-elektron mikroskopi analizi ile virusun üç boyutlu görüntüsü.

2.4. Genom ve Replikasyon:

Papillomavirus genomunda 8-10 arasında Open Reading Frame (ORF) ve bir düzenleyici bölge (bu kısım düzenleyici elementlere sahiptir) bulunmaktadır. Genel ve spesifik birçok hücre düzenleyici faktör kodlanmayan kısma bağlanmaktadır. Viral genler, infeksiyon esnasında ne zaman eksprese edildiklerine bağlı olarak erken (E, early) ya da geç (L, late) olmak üzere ikiye ayrılırlar (30).

HPV bir DNA tümör virusudur ve genomu üç bölgede düzenlenir: Erken genler (E1'den E7'ye), geç gen bölgesi (L1 ve L2) ve üst regülatör bölge (URR). Erken ve geç gen bölgelerinin her ikisi de protein kodlama yeteneğindedir ancak URR protein kodlayamaz. URR birçok transkripsiyon aktivatörü ve represörüne bağlanma bölgesine sahiptir. Spesifik HPV tiplerinin konak alanlarına bağlanmada rolü olduğu ileri sürülmektedir (30, 50).

Viral proteinlerin eksprese edilmesi hücre farklılaşmasına bağlı olarak sıkı bir şekilde kontrol edilir. Yaralanma veya diğer travmalar sonucu epitel hücrelerinin bütünlüğünün bozulması ile papillomavirus bazal epitelyum hücrelerini infekte eder. Viral genom, epizom (konak genomuna kendini integre edebilir) olarak bazal hücrelerde hayatını devam ettirir. Düşük kopya sayısına sahip olan epizomlar hücre kromozomu ile birlikte replike olarak gelecek virionlar için gerekli malzemeyi sağlamış olurlar (6, 50).

E1, virus genom ve replikasyonunun devamı için gerekli olan proteinleri, E2 ise viral yaşam siklusunun tamamlanmasında ve ekstrakromozomal DNA replikasyonu için çok önemli proteinleri kodlar. E2 ayrıca iki protein daha kodlar. Birincisi erken bölgenin transkripsiyonunu inhibe ederken, diğeri erken bölgenin transkripsiyonunu artırır. Viral E2 proteininin ekspresyonunun azalması HPV ile ilişkili servikal karsinoma için çok önemlidir (50, 87).

E4 ORF tarafından kodlanan proteinlerin görevi tam olarak bilinmemekle birlikte, sitokeratin ağını bozarak HPV ile infekte hücrelerin karakteristik görünümü olan koilositotik (anormal görünümlü) hücrelere sebep oldukları bilinmektedir. Ayrıca mRNA dengesini de kontrol ettiği tahmin edilmektedir. Transforme edici bir özelliği olup olmadığı bilinmemektedir (99).

E5 protein hidrofobik membranla ilişkide olan bir proteindir. E5 proteini ayrıca epidermal büyümeden sorumlu reseptörleri aktive ederek hücre büyümesini teşvik eder. Bunun dışında E5 proteini, p21 tümör baskılayıcı geninin ekspresyonunu inhibe eder ve buna bağlı olarak hücre döngüsünü etkiler (50).

E6 ve E7 proteinleri HPV'nin temel onkoproteinleridir ayrıca infeksiyon esnasında viral epizomun devam ettirilmesinden sorumlu oldukları da kanıtlanmıştır.

Geç bölgede ise L1 ve L2 virion toplanmasının geç evresi boyunca viral kapsid proteinlerini kodlar. L1 tarafından kodlanan protein farklı papillomavirus türleri arasında yüksek derecede korunmuştur. L1 ORF minor kapsid proteininin kodlanmasından sorumlu iken, L2 ORF major kapsid proteininin kodlanmasından sorumludur (50).

2.5. Epidemiyoloji:

Genital HPV infeksiyonu, gelişmekte olan ülkelerin gençlerinde en sık rastlanılan cinsel temasla bulaşan hastalık etkenidir. Her yıl dünyada 30 milyon yeni genital HPV vakası ortaya çıkmaktadır. Amerika Birleşik Devletleri'nde yaklaşık 20 milyon kişinin HPV ile infekte olduğu ve bu kişilerin %50'sinin 15-24 yaş arasında olduğu ileri sürülmektedir. Buna ilaveten 15-44 yaş erkek ve kadınlarda her yıl 6.2 milyon yeni vaka saptanmaktadır (103).

HPV; siğil, birçok invaziv servikal kanser ve prekanseröz lezyonla ilişkili seksüel yolla bulaşma gösteren bir ajandır. Çoğu infekte bireyde virus elimine edildiği halde, herhangi bir klinik belirti vermezken, nadir olarak da HPV ile infekte bireylerde invaziv kanser gelişebilir.

İnsanda anogenital sistemi infekte edebilir. Servikal kanser gelişimine neden olan 15 yüksek risk HPV tipi, 3 olası yüksek risk HPV tipi, 12 düşük risk HPV tipi ve 3 tane tanımlanamamış HPV tipi mevcuttur (70).

2.5.1. Prevalans:

Dünya üzerindeki kadınlar arasında HPV infeksiyonu populasyon prevalansı tahminen %2 ile %44 arasında değişmektedir (11). Tahminlerdeki büyük farklılık, çoğunlukla populasyon çalışmalarında yaş oranlarındaki farklılıklar ve HPV infeksiyonlarının saptanmasında kullanılan HPV DNA testlerinin duyarlılıklarının farklı oluşundan kaynaklanmaktadır. Bu DNA temelli çalışmalarla birlikte, HPV kapsid

antijenine karşı tipe spesifik antikor ölçümü yapılarak, çoğu seksüel açıdan aktif (> %50) kadınların bir veya birden fazla genital HPV tipi ile infekte olduğu gösterilmiştir.

Amerika Birleşik Devletleri'nde yaş ortalaması 25 olan, evlenme çağındaki kişilerde yapılan çalışmada, yüksek risk HPV infeksiyon prevalansı %27,4 bulunmuştur (59). Benzer prevalans oranları Kanada ve Amerika Birleşik Devletleri'nde kadın üniversite öğrencileri arasında da bulunmuştur.

İskoçya'da yapılan bir çalışmada yaş ortalaması 36,6 olan kadınlardan alınan rutin servikal örneklerde, PCR ile HPV DNA'sı aranmış, yaklaşık % 20,5 HPV DNA pozitifliği bulunmuş ve bu hastalarında %15,7'sinde yüksek risk HPV tipleri saptanmıştır (24).

HPV tip 16 sitolojisi, normal kadınlar arasında en fazla rastlanan tiptir, ayrıca HPV tip 16 servikal kanser olgularında da en sık rastlanan tiptir (38, 48, 70, 106).

2.5.2. Bulaş:

HPV bulaşının epidemiyolojik zincirinde, infekte partnerle seksüel ilişki çok önemlidir. Bununla birlikte bulaş için penisin vajinaya tam olarak girişi gerekli değildir. Stokastik model çalışmalar, HPV bulaş riskinin, cinsel yönden aktif kişiler için çok yüksek olduğunu, HIV veya HSV-2 gibi diğer seksüel yolla bulaşan viral infeksiyonlardan kat kat yüksek olduğunu ileri sürülmektedir (16). Bununla birlikte kondom kullanımının tam anlamıyla bir koruyuculuk sağlamadığı bilinmektedir (65).

Peno-vajinal ilişkinin yanı sıra; peno-anal ilişki, digital-vajinal seks, oral seks, seks oyuncakları gibi diğer seks pratikleri HPV bulaşını kolaylaştırır (32, 41, 89). Ayrıca nadir olarak perinatal bulaşda söz konusudur (4).

2.5.3. Yaş:

HPV infeksiyon prevalansı genç kadınlar arasında en yüksek orandadır ve yaş arttıkça görülme sıklığı azalır (11). Birçok HPV infeksiyonu, seksüel aktivitelerin başlamasından hemen sonra meydana gelir. Birçok çalışma, yaş ile HPV prevalansında azalma olduğunu işaret ediyorken, az sayıdaki çalışmada ise; birkaç farklı uluslararası bölgedeki 25 yaşın altındaki kadınlarda HPV prevalansının zirve yaptığı, 35-54 yaş arasında bu oran azalırken, 55 yaş üzerinde ikinci pik görüldüğü ileri sürülmüştür (46). Bu yaş gruplarındaki HPV prevalansı artışı destekleyici bir etkiden veya latent virus aktivasyonundan olabileceği düşünülmüştür.

Erkeklerde kadınlardaki gibi yaygın ve sık bir şekilde HPV çalışmaları yapılmamasına rağmen, HPV infeksiyonları erkeklerde sık görülen bir infeksiyon gibi görünmektedir. Genital örneklerde PCR analizi kullanılarak yaş ortalaması 19,8 olan 285 askere alınan Finli gençten %16,5'inde (47); yaş ortalaması 20,5 olan 318 Amerikalı üniversite öğrencisinde %32,7 HPV pozitifliği saptanmıştır (102).

Erkeklerdeki HPV prevalansı ülkelere göre büyük ölçüde değişiyor gibi görünmektedir (37). Bununla birlikte çalışmalar arasında karşılaştırmalar yapmak zordur çünkü erkeklerden alınan genital örnekler farklı metodlar uygulanmıştır. Bazı çalışmalarda sadece iki genital bölgeden alınmış örnekler ile çalışılırken bir başka çalışmada 6 genital bölgeden fazla alınan örnek ile çalışılmıştır.

2.6. Moleküler Patogenez:

Human Papillomaviruslar, ikosahedral simetrik kapsid içerisinde çift iplikli çembersel bir DNA'ya sahiptir. Viral DNA farklı HPV tipleri arasında çok ufak büyüklük farkları olmasına rağmen tipik olarak yaklaşık 8000 baz çifti içerir (HPV tip 16 için 7904 kb GenBank) ve 8-9 ORF kodlar (67).

HPV infeksiyonlarında ilk infeksiyon için, infeksiyöz partikülün bazal tabakadaki hücrelere girişi gereklidir. Bunun su veya çevresel faktörler ile aşınmış veya mikrotravmalar gibi şartlar altında olabileceği düşünülmüştür. Lezyonun devamlılığı için virusun, epitelial kök hücreleri infekte etmesi gerekliliği ileri sürülmüştür (80).

Virusun girişindeki doğal reseptörün ne olduğu hakkındaki tartışmalar devam etmektedir. Heparan sülfatların ilk tutunmada rol oynayabileceği düşünülmüştür. Bazı viruslar gibi HPV'nin de etkili bir infeksiyon oluşturabilmek için ikinci bir reseptöre ihtiyaç duyduğu iddia edilmiş, $\alpha 6$ -integrin molekülünün bunda rol oynayabileceği düşünülmüştür (12, 33, 66).

Viral genom, epitelyumdaki bazal hücrelerde replikasyonunu düşük bir düzeyde tutar, bazalda E1 ve E2 eksprese edilir, bununla birlikte viral onkoproteinler olan E6 ve E7'nin bazal hücrelerde eksprese edilip edilmediği kesin değildir. Viral genomun bazal tabakada hücre başına 10-200 kopya civarında ve düşük düzeyde erken protein (E1, E2, E6 ve E7) eksprese ederek varlığını sürdürdüğü ileri sürülmüştür. Bazal tabakadan ayrılan hücreler epitelyumun yüzeyine doğru ilerledikçe farklılaşır. Suprabazal bölgede E1, E2, E4 ve E5 proteinlerinin çok yüksek düzeyde sentez edilmesi ile viral genom

sayısında artış olur. Epitelyumun üst katmanlarında viral kapsid proteinleri olan L1 ve L2'nin sentezleri gerçekleşir daha sonra nukleusta paketlenme yapılır. Epidermisin yüzeyinden virus yüklü keratinositlerin dökülmesiyle virus salınır (108).

Yüksek risk HPV'lerde E6 proteini yaklaşık 150 amino asit ve 2 çinko motif içermektedir (6, 20). E6 HPV ile infekte keratinositlerin hem nukleusunda hemde sitoplazmasında bulunur (6, 20). En önemli fonksiyonu hücre siklusu regülatörü p53'ün aktivitesini inhibe etmektir.

p53 tümör baskılayıcı bir proteindir ve hücre siklusunu G1/S ve G2/M fazlarında denetleyerek regülasyonu sağlar (74). p53 olası bir DNA hasarı veya hücrel strese bağlı olarak apoptozis ve/veya hücre siklusunu engelleyici birkaç regülatörün transkripsiyonunu aktive eder. Yüksek risk HPV E6'sı p53'e bağlanır ve hücrel ubikülin ligaz (E6AP) ile üçlü bir kompleks oluşturarak p53'ün parçalanmasını sağlar (49, 52). Bu şekilde sabit p53 seviyesinin azalmasına neden olur böylece hücrel DNA sentezini sınırlayıp viral replikasyona olanak sağlar. E6 transkripsiyonal koaktivatör CBP/p300'e bağlanarak parçalanmasını sağlamasından bağımsız olarak, p53'e bağlı transkripsiyonun regülasyonunu inhibe eder (95,109).

E6 PSD-95/discs large/ZO-1 (PDZ) ilmeği içeren proteinlerle de etkileşime girebilir. PDZ proteinleri hücre sinyal iletimi ve hücre-hücre adezyonu gibi fonksiyonlarda görev alırlar. HPV tip 18 ve HPV tip 16 E6'sının birçok PDZ proteinine bağlanarak parçalandığı gösterilmiştir (hDlg, MUPP-1, MAGI ve hScribble) (58).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, HPV tip 18 E6'sının PDZ proteinlerinden TIP-2/GIPC'ı parçaladığı ve bunun sonucunda TGF- β 'ya bağımlı olarak büyüme durdurucu etkinin inhibe olduğu görülmüştür (35). Yüksek risk E6 proteinlerinin bir diğer önemli fonksiyonu, infekte hücrelerde telomeraz aktivasyonudur. Normal hücrelerde tekrarlanan DNA replikasyonları sonucunda telomeraz kısalır, bir süre sonra kromozomal istikrarsızlık ve hücrel yaşlanma gelişir. Yüksek risk HPV tip E6 proteinlerinin, epiteliyal hücrelerde, enzim telomerazın katalitik alt birimini aktive ederek telomerik uzunluğu arttırdığı gözlemlenmiştir (97).

E7 proteini 98 Amino asitten oluşur ve 3 korunmuş bölgesi bulunmaktadır. Bunlar CR1, CR2 ve CR3'tür. CR1 ilmeği Amino termino ucunu kapsarken, CR2 ilmeği tümör-baskılayıcı protein 1 ailesinden olan retinoblastomaya bağlanmasını düzenleyen LXCXE motifini içerir, CR3 ise iki çinko motif içermektedir. Ayrıca E7,

kazein kinaz 2 fosforilasyon kısmı içerir. Bu hücre siklusunun G1 / S fazı süresince E7'nin fosforilasyonunu sağlar. Bu aktivitenin viral yaşam siklusundaki önemi tam olarak anlaşılamamış olsa da, HPV pozitif hücre dizilerinde kazein kinaz 2 inhibisyonu ve E7'nin fosforilasyonu azaltıldığında hücre büyümesinin sekteye uğradığı görülmüştür (54, 64).

E7'nin HPV yaşam siklusundaki ana görevlerinden biri Rb proteinine tutunarak parçalanmasını sağlamaktır. Rb proteini hücre döngüsünün en önemli regülatörlerindendir.

Normal hücrelerde S fazı genlerinin transkripsiyonuna ve E2F'nin salınımına, Rb'nin fosforilasyonunu yapan cdk-siklin kompleksi kılavuzluk eder. E7 proteozoma bağımlı yoldan, Rb parçalaması suretiyle sürekli E2F salınımı sağlayarak normal hücre siklusunu bozabilir (56, 72).

E7'nin Rb'ya bağlanma ve parçalama kabiliyeti, onkoproteinin iki ayrı bölgesi aracılığıyla olmaktadır.

E7, Rb'ye bağlanabilmek için CR2 ilmeğinde bulunan LXCXE motifine ihtiyaç duyar. Halbuki Rb parçalanması için önemli artıklar N-terminal ucunda bulunmaktadır. Rb'nin yüksek risk E7'ler tarafından parçalanmasının servikal karsinogeneze yardımcı olduğu düşünülmektedir. Ayrıca E7, Rb ailesinin diğer üyeleri p107 ve p130'a da bağlanarak E2F fonksiyonlarına yaptığı etki ile aynı etkiyi göstermektedir.

E7'nin Histon deasetilaz sınıf 1 (HDAC) ile etkileşimi gösterilmiştir. HDAC histonların deasetilasyonunu sağlayarak kromatinlerin şekil değiştirmesini indükleyen bir transkripsiyonal korepresör gibi rol alır. E7 çinko motiflerindeki diziler aracılığıyla indirekt olarak Mi2 β (15) ile etkileşime girerek HDAC'lara bağlanır. Farklılaşmış hücrelerde E7'nin HDAC'a bağlanmasıyla E2F2'ye bağımlı transkripsiyon düzeylerinin önemli bir biçimde arttığı gözlemlenmiştir. Bu şekilde hücreler sentez (S) fazında kalırlar.

E7'lerin, cdk (siklin bağımlı kinaz) inhibitörleri gibi siklin kinaz komplekslerine bağlandıkları görülmüştür. E7 direkt olarak siklin A/cdk2'ye bağlanabilirken, indirekt olarak Rb ailesinden p107 yoluyla siklin E/cdk2 kompleksi ile etkileşime girebilir. Buna ilaveten E7, epitelial hücrelerde siklin A ve siklin E düzeylerini arttırabilir (85). Bu siklin komplekslerinin her ikisi de Rb'yı fosforilleyebilir ve bu suretle Rb'ya bağımlı

transkripsiyonal baskılama azaltılır. Siklinler - E7 etkileşimi siklin kinazların aktivitesinin artmasına yardımcı olur. E7 ayrıca p53-indükleyebilen CKI p21^{cip1} gibi CKI p27^{kip1}'e (39) de bağlanarak hücre siklusunun inhibisyonuna engel olur.

E1 ve E4 kopyaları HPV yaşam siklusu boyunca eksprese edilirler. Bununla birlikte en yüksek ekspresyon düzeyi farklılaşmış suprabazal tabakalarda gerçekleşir (29). E1 ve E4 proteinleri başlıca sitoplazmada lokalize olmuştur ve son c-terminal kalıntılarıyla etkileşim yoluyla multimerler oluşturdukları düşünülmüştür (99). E1 ve E4'ün viral yaşam siklusundaki görevi hala tam olarak bilinmemektedir. E4 N-terminaldeki LLXLL motifi sayesinde sitokeratinlere bağlandığı görülmüştür. Aşırı ekspresyonun sağlandığı deneylerde bu durum sitokeratin ağının çökmesi ile sonuçlanmıştır. Bu durum proteinin, virusun hücreden dışarı çıkışında role sahip olduğunu düşündürmüştür. Fakat HPV lezyonlarında sınırlı çöküş gözlemlenmiştir. E1 ve E4 proteinlerinin ekspresyonları L1 proteininden hemen önce (epitel stratanın üst katmanlarında) genom amplifikasyonu ile eş zamanlı gerçekleşmektedir. Bu durum E1 ve E4'ün viral genom amplifikasyonunda rol alabileceğini akıllara getirmektedir.

E5 ORF'si 83 aminoasitlik membranda lokalize olan bir proteini (golgi, endoplazmik retikulum ve az miktarda plazma membranında bulunan) kodlar (22). Hücre kültüründe zayıf transforme edici etkisi olmasına rağmen, E6 ve E7 'nin transforme edici etkisini artırıcı bir etkisi olduğu gösterilmiştir. HPV E5 proteininin potansiyel bir hedefi epidermal büyüme faktörü reseptörüdür (EGF). Ayrıca endozomal olgunlaşma üzerindeki E5 aracılı etkinin konak hücrenin antijen sunumundaki değişimle ilgisi olduğu gösterilmiştir (5). Ayrıca E5 eksprese eden hücrelerde MHC sınıf 2 molekülleri tarafından antijen sunumu da değişir. Normal HPV infeksiyonunda E5'in fonksiyonuna ilişkin çok az şey bilinmektedir.

E1 ve E2 proteinleri HPV replikasyonu için gerekli moleküllerdir ve tüm HPV tiplerinde iyi bir şekilde korunmuştur. E1, HPV yaşam döngüsü boyunca eksprese edilir. Bununla birlikte en yüksek ekspresyon düzeyi viral yaşam döngüsünün vejetatif fazın süresince ve geç promotör aktive olduğunda meydana gelmektedir (75). E1 DNA'nın spesifik bir bölgesine bağlanan, ATPaz aktivitesi gösteren bir proteindir. ATP'ye bağımlı helikaz aktivitesi göstererek DNA'nın çift sarmalının çözülmesini katalizler. E1 erken transkripsiyonun başlatma bölgesinin yanındaki Adenin-Timin'den

zengin dizilere bağlanarak viral DNA replikasyonunu başlatır ancak E1'in DNA'ya bağlanması çok zayıftır (87).

E2 proteininin, HPV replikasyonunda rolü olduğu gibi transkripsiyonunun regülasyonunda da rolü bulunmaktadır. Yüksek düzeyde E2 konsantrasyonu transkripsiyonu baskımlarken düşük düzeyde E2 konsantrasyonu transkripsiyonu aktive eder. Viral kopya sayısını kontrol eden E2'nin, E6 ve E7'ye bağımlı hücre döngüsü aktivitesinin majör regülatörü olduğu da bilinmektedir. E2 ekspresyonunun azalması ile paralel olarak, E6 ve E7 tarafından indüklenen hücresel proliferasyonun artmasının servikal karsinomaya yol açtığı ileri sürülmüştür.

2.7. İmmünite:

Bütün virus infeksiyonlarında olduğu gibi HPV infeksiyonunda da immün sistemin hücresel ve humoral cevabı hücrenin virusa karşı savunmasında oldukça önemlidir (107). Genellikle virus ve virus ile infekte olan hücreler doğal immün sistem tarafından yok edilirler fakat HPV başarılı bir şekilde immün sistemden kaçabilir.

İnfeksiyon esnasında, mukozal bölgede HPV virionları başlangıçtaki infeksiyon bölgesinden diğer bölgelere yayılmadan kalırlar ve infekte olmuş hücrenin immün sistem tarafından yok edilmesini engellerler. Normal replikasyon sırasında, epitel tabakasının yüzeye yakın katmanlarındaki hücrelerde değişime kadar antijenik kapsid proteinleri eksprese edilmezler, böylece dentritik hücreler, infekte olmuş hücredeki virusa ulaşp onları yok etmeyi başaramazlar.

HPV erken genleri de (özellikle E6 ve E7) etkili bir biçimde interferon (INF) ve nuklear faktor KB (NF-κB) seviyesini düşürmek suretiyle immün sisteme karşı savaşırlar (71, 78). HPV ile infekte olmuş hücreler NK (natural killer=doğal katil) ve makrofajlara karşı dayanıklı olmasına rağmen sitokin ile aktive olmuş NK ve makrofajlara karşı dayanıklı değildirler. Böylece immün sistemden uzun bir süre kaçmayı başarabilirler.

Doğal yanıt kısa bir sürede gerçekleşirken Yüksek risk HPV tiplerine karşı antikorlarla serokonversiyon 6 aydan 1 yıla kadar zaman alabilir. Bu sürede HPV DNA dokuda bulunabilir (17, 104). Kapsid proteinlerine karşı serokonversiyon meydana gelmesi birkaç ayı bulurken antikor düzeylerinin takip eden 10-15 yıldan fazla bir süre boyunca sabit kaldığı görülmüştür.

Hızlı IgM ve IgA yanıtının hemen ardından, aynı derecede hızlı bir şekilde IgM'nin ortamdan kaybolması ve IgA'da yavaş bir azalma görülmesi ve sabit IgG molekülünün ortaya çıkması izler.

Servikal mukusta tipe spesifik IgA ve IgG bulunmaktadır. Ayrıca IgG pozitifliği kişinin hayatındaki cinsel partner sayısı ile ilişkilidir. Bununla birlikte HPV DNA'nın varlığı yeni olmuş cinsel partner sayısı ile daha çok ilişkilidir. Antikor sunumu, enfeksiyon yayılmasının ve reinfeksiyonun önlenmesi açısından önemlidir. Bununla birlikte, güçlü bir hücresel yanıt virustan temizlenmeyi gerçekleştirebilir (91, 105).

Bu yanıt profesyonel antijen sunumu yapan hücrelerin (APC), yardımcı-T hücreleri, sitolitik-T hücreleri ve kostimülatör moleküllerin etkileşimi ile gerçekleşir.

HPV, MHC sınıf I ve MHC sınıf II komplekslerinin her ikisinde sunumunu engelleyebilmektedir (73). Viral E5 ve E7 gen bölgelerinin ürünleri MHC sınıf I ağır zincir promoterlerinin aktivitesini baskılamasının yanı sıra, hücre yüzeyinde etkili bir antijen sunumu için gerekli olan transport proteinleri; latent membran proteini (LMP-2) ve transport ile ilişkili proteinin (TAP-1) ekspresyonlarını bozar.

E5 ve E7 proteinlerinin ayrıca MHC sınıf II sunumunu bastırdığı ileri sürülmüştür. E5 proteini normal endozomal trafiği bozarken, Langerhans hücrelerindeki E7'nin gereğinden fazla ekspresyonu Langerhans hücrelerinin antijen sunucu hücre fonksiyonlarını azaltır. Buna ilaveten HPV onkoproteinleri IFN- α ve IFN- β aktivitesini ve IL-18 gibi hücresel yanıtın kolaylaştırılması için mutlaka gerekli sitokinleri hedef alabilir.

Şu ana kadar bu regülasyonu bozucu faaliyetlerin çoğunlukla yüksek risk HPV tiplerinde olduğu kaydedilmiştir. Bu da yüksek risk HPV tiplerinin immün sistemden kaçma ve malignant transformasyon yeteneğiyle bir bağlantısı olduğunu düşündürmektedir.

2.8. Klinik Sendromlar:

2.8.1. Servikal Kanseri:

Servikal kanser, serviksin transformasyon zon epitelinin normal olan olgunlaşmasının yavaş yavaş bozulmasıyla başlar. Bu anormal değişikliklerin olduğu süreç başta servikal epitelde sınırlıdır. Displazi, CIN veya SIL olarak bilinen preinvaziv lezyonlar asemptomatiktir ve Pap smear testiyle sitolojik inceleme sayesinde saptanabilir ve kolposkopik inceleme ve biyopsi ile doğrulanabilir. Eğer tedavi edilmezse, bu düşük dereceli lezyonlar servikal epitelin tamamının kalınlaşmasına kadar ilerler (CIS) ve bazal membran tarafından oluşturulan duvarı geçerek invaziv olur. Bu süreç on yılları veya daha uzun bir süreyi gerektirebilir fakat sonuçta CIS'lı hastaların önemli bir bölümünde gerçekleşir. İnvaziv kanserdeki gibi, bu lezyon büyüyüp, küçük kan ve lenfatik damarlara ulaşır çeşitli vücut bölgelerine metastaz yapabilir (50).

İnvaziv kanserli kadınların çoğunda tekrarlayan sistit, ekzofitik ve ülserleşmiş servikal lezyonlar ve cinsel ilişki sonrası kanama gibi semptomlar görülür. Pelvik lenf düğümlerinin invazyonu ile birlikte hastalık klinik olarak daha kötü olur ve orijinal lezyon parametriumuna infiltre olduğunda ve üreterleri tıkağında renal yetmezlik ve üremiye neden olabilir. Sinir gövdelerine ve sakral pleksusa yapılan basınç persistan ağrıya neden olur (2, 38, 50, 57)

Yüksek risk HPV enfeksiyonu, bu enfeksiyonun belirli bir süre persistansı, prekanseröz lezyonlara ilerleme ve son olarak invazyonu içerir. HPV stratifiye skuamöz epitelini enfekte eder ve hücre proliferasyonunu uyarır. Enfekte hücrelerde benign hiperplaziden, displaziye ve invaziv neoplaziye kadar birçok değişiklik görülür. Yukarıdaki son aşama gerçekleşmezse süreç geri dönüşebilir. Yani HPV enfeksiyonu enfekte olan kadınların çoğunda görüldüğü gibi temizlenebilir ve prekanseröz oluşumlar gerileyebilir.

HPV enfeksiyonlarının büyük bir bölümü geçicidir, çok az bir kısmı persistan olur. Enfeksiyonun pik yaptığı yaşa göre prekürsör ve invaziv lezyonlar arasındaki farklar klinik öncesi fazın süresiyle ilgili önemli ipuçları verir. CIS'in insidans oranı invaziv kanser insidans oranına göre yaşla birlikte daha fazla bir artış gösterir. CIS insidansı 25–29 yaşlarda pik yapar ve daha sonra giderek azalır. Oysa invaziv kanser insidansı 40–44 yaştan sonra azalır. Yani, CIS ve invaziv kanserin insidans piki arasında yaklaşık 15 yıllık bir fark vardır (38, 50).

Gelişmekte olan ülkelerde servikal kanser insidansı ile ilgili epidemiyolojik verilerin çoğunun merkezde ve kentlerde yapılan populasyon bazlı kayıtlardan elde edilmiş olması önemlidir. Merkezdeki servikal kanser riski ücra köşedeki riske göre daha azdır. Dolayısıyla bir ülke için verilen ortalama oran daha düşüktür ve bu kentlerde yapılan taramalarda gösterilmiştir. Bu yüzden, dünya çapındaki servikal kanser oranı tahmin edilenden daha fazladır.

Servikal kanser ve prekürsörleri, skuamöz veya glandüler servikal epitelden orijinlenmesine göre histolojik olarak 2 çeşittir. Skuamöz hücre karsinoması ile karşılaştırıldığında, adenokarsinoma çok daha enderdir. Adenokarsinomalar, 1973'den 1987'ye kadar bildirilen invaziv servikal kanserlerin %13,4'ünü oluşturur. Adenoskuamöz ve glandüler tip arasında etiyoloji açısından, tanısı açısından ve korunma açısından farklılıklar vardır (50).

2.8.2. Anogenital siğil:

Anogenital siğillerin % 90'ından fazlasının sorumlusu HPV tip 6 ve HPV tip 11'dir. Servikal HPV infeksiyonlarında olduğu gibi kondilomlar gençlerde ve seksüel olarak aktif yetişkinlerde görülür, kondilomların oluşma sıklığı ise diğer seksüel yolla bulaşan hastalıklara paraleldir (7). Amerika Birleşik Devletleri'nde, seksüel bakımdan aktif olan 15-49 yaşları arasındaki populasyonda hastalığa yakalanma oranı %1'dir. 1960'lı yıllar ortasında kondilom bulaşma riski seksüel aktivitenin rastgele yapılması sebebiyle 4 kat artış göstermiştir. Genellikle peniste olusan lezyonlar ve servikal intraepitelyal neoplazi'ye (CIN) sahip olan kadınlarla seksüel temas ile bulaşır fakat klinik belirti göstermeyebilir (13).

Kondilomlar genellikle çok sayıda ekzofitik lezyonlar halinde bulunurlar ve dış genital bölgelere rastgele dağılmış şekilde gözlemlenirler. Erkeklerde genellikle penis ve anüs çevresinde görülürken, kadınlarda perenium ve anüste görülür. Anüsteki lezyonlar anüs kanalını çevreleyecek şekilde birleşebilirler. Genellikle kondilomlar kendiliğinden ya da tedavi sonucunda gerileme gösterebilirler. Diğer HPV infeksiyonlarında olduğu gibi hücresel immünite yönünden zayıflamış olan hastalarda tedavi oldukça güçtür. Bu olaylar hamilelikten doğan immün-zayıflık ile de bağlantılıdır.

HPV tip 6 ve HPV tip 11 birbirleriyle ilişkili olup genital siğillerin %90'ına sebep olurlar. Lezyonlar içerisinde HPV tip 16'da dahil olmak üzere diğer HPV

tiplerine de rastlamak mümkündür (44). Bowenoid siğillerde lezyonlar genellikle Bowen'in hastalığına benzer ya da in situ şartlarda skuamöz hücreli karsinomaya benzer lezyonlar oluştururlar. Çocuklarda görülen genital siğiller seksüel bakımdan taciz edilmelerinden dolayı oluşabilmekle birlikte belirgin olarak doğum esnasında veya kutanöz siğillerden de oluşabilmektedir.

Yetişkinlerdeki anogenital lezyonlara zıt olarak çocuklarda görülen genital siğiller HPV'nin genital olmayan tiplerinden kaynaklanmaktadır. Bu sonuç muhtemelen çocuklardaki genital bölgenin, yetişkinlere oranla farkı olmasından kaynaklanmaktadır.

2.8.3. Vulvar,vajinal ve penis maligniteleri:

Genital HPV, stratifiye skuamöz epitel içeren diğer genital bölgeleri de infekte edebilir. Diğer genital bölgelerdeki HPV'ye dayanan infeksiyon riski, servikal infeksiyon riski ile aynı orandadır. HPV DNA'sı vulva,vajina ve penis kanserine sebep olabilir. Buschke-Lowenstein tümörü olarak da adlandırılan Dev condyloma accuminata düşük dereceli, penis dahil olmak üzere dış genital bölgeyi bölgesel olarak kaplayan skuamöz hücre karsinomasıdır. Bunlar düşük riskli HPV tipleri tarafından oluşturulmaktadır (HPV tip 6 ve 11).

Genç kadınlarda görülen, en hızlı şekilde yayılan vulvadaki skuamöz hücre karsinoması HPV DNA'sı içermektedir (özellikle HPV tip 16). Sigara alışkanlığı ve Herpes simpleks tip 2 ile infeksiyonun, vulva kanseri ihtimalini arttırdığı gözlemlenmiştir. Vulvar ve vajinal displazi, servikal displazi geçmisi olan kadınlarda daha çok gözlemlenir (50).

2.8.4. Anal Kanseri:

Anal kanser ve servikal kanser önemli benzerlikler gösterirler ve kadınlar erkeklere oranla daha çok anal kansere yakalanmaktadır. Amerika Birleşik Devletleri'nde bu oran senede 2700 kadına karşılık 1900 erkeğe denk gelmektedir.

Kadınlardaki anal kanser 1980'li yıllarda artış göstermiş ve daha sonra sabit kalmıştır. Erkeklerde ise 1980'li yıllardan itibaren artış devam etmektedir. Anal HPV enfeksiyonu genellikle kadın erkek arası anal seksüel ilişki ya da erkekler arası homoseksüel ilişki sonucunda bulaşmaktadır. Bazı anal infeksiyonlar ise diğer genital organlardan yayılabilmektedir.

Anal ve servikal infeksiyonlar sıklıkla aynı HPV tipinden kaynaklanır. Anal HPV infeksiyonu üzerinde servikal infeksiyonuna oranla daha az araştırma yapılmasına rağmen HPV ile oluşan anal infeksiyon oranı ile servikal infeksiyon oranı hemen hemen aynıdır. Servikal kanserde olduğu gibi, yüksek risk HPV'lere anal kanserlerde de rastlanabilir (HPV tip 16). Birçok anal kanser skuamöz epitel ve kolumnar epitel arasında oluşur. İskandinav'da yapılan büyük bir araştırmaya göre HPV pozitif tümörlerin %83'ü HPV tip 16 içermektedir. Erkeklerde bulunan tümörlerin %69'u HPV pozitif bulunurken kadınlarda bulunan tümörlerin %93'ü HPV pozitifdir. Buna bağlı olarak kadınlarda gözlemlenen kanserin HPV ile ilişkili infeksiyon olmasına rağmen, erkeklerdeki anal kanser HPV ile ilişkili olmayabilir.

Sebebi tam olarak bilinmemekle birlikte, servikal kanser ve anal kanser arasındaki en büyük fark anal kanserin servikal kanserden daha az görülmesidir. Gelişmiş ülkelerdeki etkili kanser tarama programlarının varlığı servikal kanser oluşumu ile anal kanser oluşumu arasındaki farkın daha azmış gibi görünmesine sebep olur. Yeni gelişmekte olan ülkelerde ise papsmear taramasının olmaması nedeni ile daha doğal gözlemler yapılabilmekte ve bu sonuçlara göre kadınlarda anal kanser olma riskinin servikal kanser olma riskine oranının 1/10 olduğu gözlemlenmektedir (50).

Anal kanser riski, HIV-pozitif kisilerde özellikle HIV-pozitif erkek homoseksüellerde çok daha yüksektir. Amerika Birleşik Devletleri'ndeki AIDS Kanser Derneğinin çalışmasına göre HIV infeksiyonu invaziv kanser için göreceli bir risk oluşturmaktadır (kadınlarda 6,8, erkeklerde 37,9). HIV ile infekte olmuş kadın ve erkeklerde HPV infeksiyon riski oldukça fazladır. San Francisco'da yapılan çalışmaya göre HIV ile infekte olmuş homoseksüel erkeklerde %93 oranında HPV infeksiyonu (HIV negatif homoseksüellerde bu oran %61'dir) HIV ile infekte olmuş kadınlarda HPV infeksiyon oranı %76'dır. Buradan da anlaşılacağı gibi anal seks HIV ve HPV infeksiyonları ile ilişkilidir. Bu yüzden homoseksüel popülasyonlarda anal skuamöz epitel lezyon taraması yapılır(50).

2.8.5. RRP (Recurrent Respiratory Papilloma=Tekrarlayan solunum papillomasi):

Son yıllarda düşük risk HPV tipleriyle HPV infeksiyonu (özl. HPV tip 6 ve HPV tip 11) solunum yolu siğillerine ve tekrarlayan solunum papillomatozise neden olmaktadır. Çocuk ve yetişkin formları tanımlanmıştır. Bununla birlikte, genellikle çocuklarda görülür ve solunum yollarını tehlikeye atar. Lezyonların büyük çoğunluğu

eksternal genital siğillerle ilişkili olan HPV tipleriyle, özellikle tip 6 ve 11 ile bağlantılıdır.

Larinksteki ses telleri en çok infekte olan alan olmasına rağmen, papillomalara trake, ciğerler, burun ve oral kavitede de rastlanabilir. Lezyonlar tek ya da çok olabilir. Semptomatik papillomalar genellikle ameliyatla alınabilirler fakat hastalık sürekli kendini yenilediğinden sürekli ameliyat gerektirir. Tekrarlayan solunum papillomasına (RRP) sahip olan hastalarda ameliyattan kaçınılması gerekir, çünkü papillomalar trakeostomi dokusu ile büyürler. Amerika Birleşik Devletleri'nde 2000 yılında başlangıç RRP'ye sahip genlerde tedavi 200.000 dolar ve genel masraf 40 - 123 milyon dolar arasındadır (50).

Epidemiyolojik çalışmalara göre RRP'nin gelişim ile ilgili iki değişik modu bulunmaktadır. Birincisi çocuklarda gözlemlenirken ikincisi yaşlılarda gözlemlenir. RRP herhangi bir yaşta oluşabilmekle birlikte ilerleme riski 5 yaşından itibaren artar. Eğer annede genital siğil var ise bu çocukta RRP görülme riskini artırır. Genital siğille infekte olmuşlarda genç yaşta ilk doğum riski arttırırken, sezeryan ile doğum riski azaltmaktadır. HLA sınıf II antijen polimorfizmi de etkileyici bir faktör olabilir.

Çocuklarda görülen birçok RRP doğum esnasında anneden geçmektedir. Bebeğin uterusu iken hastalık kapma riski de bulunmasına rağmen bu risk oldukça düşüktür. Yetişkinlerde ise bu risk oral ve genital sekse bağlıdır (50).

Genital siğillerde genellikle HPV tip 6 görülmesine rağmen RRP'de daha çok HPV tip 11 gözlemlenir. Doğum esnasında çocuğa bulaşan RRP, 5 yıl boyunca kendisini göstermez ve bu konu kesinlikle araştırılması gereken bir konudur. Virusun latent fazına girmesi bunun olası bir açıklaması olabilir. Latent faz, RRP'ye sahip olan hastaların larinksinde de gözlemlenmiştir.

RRP'nin bronşiolelere ve ciğere sıçraması, ilerleyerek ağır displaziye dönüşmesi düşük bir olasılıktır. Bu risk papilomaların X-ışınına maruz kalmaları ile artar (1940'lı yıllarda genel RRP tedavisi X-ışını ile yapılmaktaydı). Servikal kansere zıt olarak RRP'de görülen baskın tip başta HPV tip 11 olmak üzere, HPV tip 6 ve 11 ağır displazi ve kanser ile ilişkilidir. HPV tip 16'ya bazen laringeal kanserde rastlanmaktadır (50).

2.8.6. HPV ile İlgili Deri hastalıkları:

Genital olmayan siğiller iyi huylu olup vücudun her tarafında gözlenebileceği gibi genellikle el ve ayakta görülür. Genellikle çocuklarda ve gençlerde rastlanır. Yapılan bazı anketlere göre okul çağındaki çocukların %10'unda genital olmayan siğiller görülmektedir. PV kurumaya karşı dayanıklıdır, çevrede uzun süre yaşamlarını devam ettirip bulaşabilirler. Derideki çatlaklar ve yıpranmış bölgeler, PV'in bazal hücrelere ulaşarak infekte etmesine uygun bir ortam hazırlarlar. Normalde her yerde oluşmayan bu lezyonlar otoinokülasyon ile bulaşır. Enfeksiyonlar takip eden birkaç ayda gelişme gösterebilir, gelişme gösteren enfeksiyon 2 yıl içinde ise gerileme gösterir, bazen çok nadir de olsa ömür boyu kalabilirler (50).

Kesin olmamakla birlikte klinik lezyonlar ve HPV tipleri arasında bir paralellik gözlemlenir. HPV tip 1, 2, 4, 27, 57 ve HPV tip 65 genellikle genel siğiller ve plantar (kabarık) siğiller ile ilişkili iken, HPV tip 3, 10, 28 ve 41 düz siğillerde görülür. Kasaplar ve etle ilgili iş yapanlarda el siğilleri sıkça görülür. Fakat bu siğillerin hayvanlara ait PV tarafından oluşturulduğuna dair bir kanıt yoktur. Bu siğillerde genellikle HPV tip 7'ye rastlanır ve el ile yapılan işlemlerin çokluğundan el derisinin dejenere olmasına bağlı olarak enfeksiyon gerçekleşir.

Hastalığın gerilemesi immün sistemle ilgili olabilir hastalığın yaşlılarda görülmemesi de onların immün sistemlerinin bu hastalığa zamanla direnç kazanmalarından kaynaklanabilir (50).

2.8.6.1. Epidermodysplasia verruciformis

Bu hastalık kutanöz HPV enfeksiyonuna karşı hassas olan kişilerde görülür. Siğil genellikle çocukluk döneminde başlar, gerilemez ve bazı hastalarda da skuamöz hücre kanserine dönüşebilir. İki farklı lezyona rastlanır hatta bu iki farklı lezyon aynı hastada oluşabilir. Bazı lezyonlar düz siğiller şeklinde gözlemlenir, bazen de düz pullanmış, kırmızı kahverengi lekeler şeklinde gözlemlenir. HPV tip 3 ve 10 düz siğillerin oluşmasından sorumludur. Pullu lezyonlar, Epidermodysplasia verruciformis HPV tip 5 ve HPV tip 8 gibi spesifik HPV tipleri ile ilişkilidir (50).

İnfekte olmuş hastaların yarısında oluşan EV kalıtsal bozukluktan kaynaklanır. Bu kalıtsal bozukluk birçok ailede otozomal resesiftir ancak yalnızca bir ailede X'e bağlı kalıtmadan kaynaklandığı rapor edilmiştir. Otozomal resesif olan

durumlarda bu gen heterojendir. Çünkü farklı ailelerde yapılan gen haritalarında bu gen kromozom üzerinde iki ayrı lokusta gözlemlenmiştir (50).

EV'ye sahip olan hastalar, mukozal HPV ya da genel siğillere yol açan HPV'de dahil olmak üzere diğer klinik infeksiyonlara karşı hassasiyet göstermezler. Birçok sağlıklı insanın EV için spesifik HPV tiplerini sağlıklı derilerinde barındırdıkları gözlemlenmiştir. Bu hastalar, klinik olarak açıkça belli olan lezyonlara sahip değildirler. Hastalardaki lezyonlar normal tedavi yöntemlerine karşı dirençlidirler. EV'ye sahip olan bütün hastalarda olmamakla birlikte, hastaların birçoğunun hücresel immün sistem bozukluğuna sahip oldukları gözlemlenmiştir. Buna ek olarak bu hastalarla HIV ile infekte olmuş hastalar arasında bir ilişki bulunmaktadır ve spesifik HPV tipine bağlı olan lezyonlar diğer bağışıklığı baskılanmış hastalarda da görülür (50).

Hastaların 1/3'ünde lezyonlara bağlı olan cilt kanseri gözlemlenir. Genellikle iyi huylu tümörler yayılma göstermezler fakat bazen bölgesel ve uzak bölgelere yayılabilirler. İyi huylu tümörün yayılması Pitriyazis-benzeri lezyonlarla (EV tipini içeren lezyonlar) sınırlıdır.

En çok kansere sebep olan HPV tipleri HPV tip 5 ve HPV tip 8'dir. Cilt kanserinin %90'ında bu iki tipten birine rastlanır. Cilt kanseri genellikle güneş ışınlarına maruz kalmış kısımlarda gözlemlenmesi EV ile oluşan kanserlerin HPV tipi ile çevresel UV ışınlarının kombinasyonunun rol aldığı kanıtıdır. Mukozal kanser HPV ile ilişkilidir buna zıt olarak p53 mutasyonları EV'ye bağlı kanserler ile ilişkilidir (50).

2.8.6.2. Non-melanoma Cilt Kanseri:

Melanoma olmayan (Nonmelanoma) kanserleri (NMSC: Nonmelanoma Skin Cancer) çok yaygın olarak görülür ve bazal hücre karsinomaları (BCC: basal cell carcinomas) ve Skuamöz hücre karsinomaları (SCC) olmak üzere iki kısma ayrılırlar. Non-melanoma kanserleri güneş ışınlarına maruz kalmaktan kaynaklanırlar genellikle bölgesel olarak yayılma göstermekle birlikte diğer alanlara sıçramazlar. İmmün sistemi baskılanmış olan hastalar, güneşe maruz kalan bölgelerde siğillerin, premalignant lezyon ve NMSC (özellikle SCC) oluşması bakımından yüksek risk altındadırlar (50).

HPV özellikle SCC'nda potansiyel kanserojendir. Efektif tekniklerle (nested PCR) NMSC'e sahip olan ve normal immün sistemi olan hastaların %30- 40'ı HPV pozitif olabilmektedir bu oran immün sistemi baskılanmış hastalarda 2 katına kadar

çıkılmaktadır. Genellikle HPV pozitif olan durumlarda EV tiplerine de rastlanır fakat bu tümörlerde HPV'ye patojenik rol yüklenip yüklenemeyeceği kesin değildir. EV ile ilgili kanserlerde ya da mukozal kanserlerin HPV ile ilişkisi kesin olmasına rağmen, NMSC'e sahip olan hastalarda dominant olan HPV tiplerinin kesin olarak tanısı yapılmamıştır. Çok az da olsa bazı NMSC'ler HPV DNA yüksek kopya sayısı taşırlar (50).

2.8.7. HPV ve HIV ilişkisi:

HIV ile infekte hastalarda immün sistemin baskılanmış olması dolayısıyla immün sistem bütün mikroorganizmalara açık bir hale gelir. Genital HPV infeksiyon riski HIV ile infekte olmuş kişilerde daha yüksektir, çünkü cinsel ilişki ile bulaşan hastalıklar diğer cinsel yolla bulaşan hastalık riskinin artmasına yol açar. Buna bağlı olarak HIV'e seksüel olarak maruz kalma riskine sahip olan kişilerde HPV'ye maruz kalma riski de artar (50).

Servikal HPV infeksiyonu, HIV pozitif kadınlarda HIV negatif kadınlara oranla daha fazladır ve hatta HIV pozitif kadınlarda, HPV infeksiyonu ısrarcı, sitolojik anormallikler ve yüksek risk displaziye sebep olur.

Yüksek risk HPV tipleri ile infekte olmuş kadınlar arasında New York'da yapılan bir çalışmada; HIV pozitif kadınlarda HPV DNA pozitifliğine, HPV DNA negatif hastalara oranla neredeyse iki kat daha fazla rastlandığı bildirilmiştir (%56'ya karşılık %31). HIV pozitif kadınlarda ısrarcı infeksiyon 6 kat daha fazla gözlemlenmiştir (%24'e karşılık %4). Ayrıca HIV pozitif kadınlarda low-grade (düşük dereceli) displazi, HIV negatif kadınlara oranla 3 kat daha fazla (%13'e karşılık %4) ve high-grade (yüksek dereceli) displazi 7 kat fazla gözlemlenmiştir (%7 ye karşılık %1). HIV pozitif kadınlardaki düşük CD4 hücre sayımı ise bağımsız bir risk faktörüdür(50).

Bütün bu özellikler HIV ile infekte olmuş kadınların servikal kansere yakalanma riskinin daha fazla olduğunu kanıtlamaktadır. Geçmiş yıllarda New York'da yapılan çalışmalara göre, 50 yaşından genç olan ve servikal kanser teshisi konmuş kadınların büyük çoğunluğunun HIV pozitif olduğu gözlemlenmesi sonucu Center for Disease Control and Prevention (CDC hastalık kontrol ve engelleme merkezi) 1993 yılında servikal kanseri Akut immünyetmezlik sendromu(Acquired Immunodeficiency syndrome =AIDS)'nun teşhisinde kullanmaya başlamıştır. HIV infeksiyonu, HPV ile ilişkili habis tümörlerde vulva, penis ve anüs kanseri de dahil olmak üzere yüksek risk

faktörüdür. Daha önce belirtildiği gibi anal kanser özellikle HIV ile infekte olmuş homoseksüellerde büyük risk oluşturur (47).

Yüksek derece aktif anti-retroviral terapi (HAART), Kaposi sarkoma ile ilgili Herpes virus ilişkili tümörleri ve Epstein-Barr virus (EBV) ilişkili non-Hodgkin lenfomayı azaltmasına rağmen, HPV ile ilişkili displazi ve HPV ile ilişkili kanserlerde bu etki görülmemiştir.

2.9. Laboratuvar Tanısı:

HPV saptanması için temel olarak kullanılan 3 nükleik asit hibridizasyon yöntemi vardır. Bunlar direkt nükleik asit prop yöntemleri, hibridizasyon sinyal amplifikasyon ve hedef amplifikasyon metodlarıdır.

2.9.1. Direkt Prop metodları:

HPV çalışmalarında ilk kullanılan teknik olan Southern Blot hibridizasyon, HPV genom analizinde altın standarttır. Bir başka HPV direkt prop yöntemi ise İn-situ Hibridizasyon (İSH) yöntemidir. İSH, immünohistokimyasal bir yöntem olup antijen ekspresyonunu histopatolojik olarak saptama esasına dayanmaktadır.

İSH ile histopatolojik olarak, hedef nükleik asit veya gen ekspresyonunun varlığı saptanır. İSH'de kullanılan nükleik asit propları biotinle türevlenmiştir. Saptama genellikle streptavidin-kromojen komplekslerini içeren bir sandviç yaklaşımıyla başarılmıştır (51).

Direkt prop metodlarının dezavantajları, duyarlılığının düşük olması, zaman alıcı olması ve oldukça yüksek miktarda DNA'ya gereksinim duymasıdır.

Fikse edilmiş dokuda formalinin, DNA çapraz bağlanmasını katalize etmesi, DNA parçalanması ile sonuçlandığından dolayı bu dokularda Southern-blot hibridizasyon veya RFLP-PCR uygulaması mümkün değildir. Direkt prop metodları arasında İSH klinik örneklerdeki HPV dizilerinin saptanmasında en düşük özgüllüğe sahiptir. Kondilomatöz lezyonlarda ortalama özgüllük %72, invaziv kanser hücrelerinde %30'dur (18).

2.9.2. Sinyal Amplifikasyon:

Sinyal Amplifikasyon yöntemleri direkt prop tekniklerinin bir uzantısı konumundadır. Saptama yöntemlerindeki gelişmelerle duyarlılıkta artış sağlanmıştır. Bu yöntemlerde DNA propları üzerindeki mültimerik haberci moleküllerin kullanılması duyarlılığı arttırmıştır. Sinyal amplifikasyonun bir diğer örneği dallı DNA (bDNA) dir. Bu yöntem Bayer tarafından piyasaya sürülmüştür (51).

Hybrid capture 2 tekniğinde saptanacak HPV genotiplerinden oluşan DNA dizilerine direkt olarak yönlendirilen antikorları içerir. Mikrotitre kuyucuğu içinde RNA-DNA hibrid yakalanması, spesifik monoklonal antikorlar ve kemilüminisan substrat ile saptanır; HPV DNA'nın semi-kantitatif ölçülmesi sağlanır. Servikal kanserlerle ilişkisinin kuvvetine bağlı olarak HC2 Aşağıdaki risk grupları şeklinde sınıflandırılabilir.

İki farkı prop kokteyli kullanılmaktadır. Bunlardan birinde 5 Düşük risk genotip probu (6, 11, 42, 43 ve 44) ve diğeri ise 13 Yüksek risk genotip probu (HPV tip 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 ve 68) bulunmaktadır (68). HPV Hybrid Capture 2 testindeki kokteyl yaklaşımı, pap testinde minör sitolojik anormallik gösteren hastaların aciliyetine göre sıralanması için çok iyi bir metod olmasını sağlar. Fakat bu test spesifik HPV tiplerini tayin edemez. Saptama limiti 5000 genom'a karşılık gelmektedir ve bu haliyle PCR 'dan daha az duyarlıdır, İki prop kokteyli çapraz reaksiyon gösterip pozitif sonuçların klinik uygunluğunu azaltabilir (68).

2.9.3. Hedef Amplifikasyon:

En önemlisi PCR olan hedef nükleik asit amplifikasyonları HPV tanısının tüm yönleri için ümit vadetmektedir (86). PCR, DNA'nın belli bölgelerinin in vitro çoğaltılmasını sağladığından ve bu şekilde tanıyı mümkün kıldığından dolayı oldukça değerli bir yöntemdir.

Hedef amplifikasyonu, tüm DNA analiz teknikleri içerisinde en esnek ve en duyarlı olanıdır. Bu teknoloji tanıda, viral yük saptamada, DNA dizilenmesinde ve mutasyon analizinde kullanılabilir (51). Bu yöntemler birden fazla hedef DNA dizisinin aynı anda analiz edilmesini sağlayan multipleks PCR şeklinde de modifiye edilmiştir. Hedef amplifikasyon yöntemleri invitro olarak hedef DNA dizilerinin sentezini sağlayarak duyarlılığı artırır.

Sadece araştırmalarda kullanılabilen çoğu PCR yöntemlerinde patenti alınmış HPV dizilerinin kullanılması beraberinde yasal kısıtlamaları getirmektedir. Dolayısıyla bu yöntemlerin in vitro tanıda kullanımı kısıtlıdır. Buna ek olarak, in house PCR testlerinde laboratuvarlar arası standardizasyon yoktur. PCR’da daha önceki örnekte çoğaltılan amplikonlar bir sonraki negatif örneği kontamine edebileceğinden dolayı yalancı pozitif sonuçlar alınabilir. Çoğu laboratuvarı bu olasılık N-Glikosilaz (AMPaz) enzimi içeren enzimatik olarak amplikon elimine eden sistemler kullanılarak elimine edilir (51).

2.9.4. HPV Genotiplerini Saptamada Kullanılan Laboratuvar Metodları:

HPV tanısı ile ilgili elden edilen çoğu klinik veri, hastaları düşük veya yüksek riskli olarak sınıflandıran HC2 kitinin kullanılması ile edinilmiştir. Bu test hastaların aciliyetine göre sıralanmasında oldukça kullanışlı iken örnekte hangi bireysel HPV tipinin olduğuna dair spesifik bir bilgi vermez (93). Filogenetik olarak yüksek risk tiplerinin, servikal hastalık sonuçları için rölatif riskinin ne olduğu bilinmemektedir. Ve bazı HPV genotiplerinin onkojenik potansiyel açısından değişkenlik gösterebileceğinin bulunması, servikal örneklerdeki HPV genotipinin saptanmasının risk gruplandırmasında mantıklı olabileceğini göstermiştir (58,59).

Tipe spesifik dizilerin çeşitli bölgelerinde değişkenlik olabilir fakat major kapsid proteinini kodlayan L1 geninin son bölgesi en yüksek polimorfizm gösterir (23, 43, 57). Buna ek olarak, E6 ve E7 geninin başlangıç kısmında da dizi polimorfizmi vardır (57, 92). Bu dizi farklılığı, bireysel HPV tiplerinde farklı onkojenik transformasyon potansiyelinin olmasına neden olur. L1 gen segmenti, genellikle PCR temelli genotipleme yöntemlerinde kullanılır. Primerler, polimorfik tip spesifik dizilerin yanındaki korunmuş dizilerden seçilir.

PCR teknolojisi tüm genotipleme metodlarının ana kapısıdır. Consensus primerlerinin kullanılmaya başlanmasıyla birlikte, bireysel genotiplerin saptanması RFLP, revers hibridizasyon gibi yöntemlerle mümkün olmuştur (100). Alternatif olarak, E6 ve E7 polimorfizmine bağlı olarak bireysel HPV tiplerinin identifiye edilmesinde kullanılan genotip spesifik PCR primerleri kullanılabilir.

Klinik örneklerdeki HPV tiplerinin etkili bir biçimde gösteren genel veya consensus primerlerine bağımlı PCR yöntemleri geliştirilmiştir (23). Bu testler, çoğu anogenital HPV tiplerinde bulunan primer çiftlerini kullanırlar. Farklı HPV consensus

primerlerinin dizileri de bildirilmiştir. GP5+/GP6+, SPF10, MY09/11 gibi bu primerler HPV tiplerinin büyük bir kısmını saptayabilir ve genotipleyebilir (83).

Line prob yöntemlerinde, naylon membranlar üzerinde immobilize edilmiş oligonükleotidler ile selektif hibridizasyon yöntemi kullanılarak amplifiye edilmiş spesifik DNA'nın saptanması sağlanır. Bu teknik ve sonuçları, Western Blot yöntemine çok benzer. Line prop assay tekniklerini kullanarak bireysel HPV genotipleri oldukça yüksek duyarlılıkla, 100 attogram seviyesinin altında, sınıflandırılabilir. Bu seviyedeki ayırım karışık infeksiyonlardaki tiplerin genotiplendirilmesinde önemlidir (10, 83).

RFLP metodları PCR-consensus primeri kullanılarak yapılan amplifikasyon sonrası, PCR ürünlerinin dizi kompozisyonunun restriksiyon enzimleri kullanılarak incelenmesi esasına dayanır. Çoğu analizde kullanılan restriksiyon enzimleri BamHI, DdeI, HaeIII, HinfI ve PstI dir. İnsan HPV RFLP verilerinin yorumlanması özellikle karışık infeksiyon varsa zordur. Buna ilaveten, restriksiyon fragmentleri spesifik hibridizasyon (Southern Blot) ile pozitif olarak identifiye edilemediğinden dolayı sahte (taklit) bantlar genotipin belirlenmesinde belirsizliğe neden olabilir.

Klinik örneklerdeki HPV genotiplerini ayırt etmede kullanılabilecek bir diğer yöntem ise PCR ürünlerinin direkt dizinlemesidir. Bu teknoloji, henüz keşfedilmemiş HPV genotipleri ile ilgili bilgi edinmede ümit vadetmektedir. Fakat bu araştırma temelli sistemlerin in vitro tanı yöntemi olarak kullanılması oldukça kısıtlıdır (98).

2.10. Aşı:

HPV aşıları; viral nötralizan antikor oluşturulması hedef alınarak hazırlanan ve yeni infeksiyonlara karşı bireyi koruyucu profilaktik aşılar ve HPV ile infekte epitelyal hücrelerde, hücrel immüniteyi arttıran terapötik aşılar şeklinde ikiye ayrılabilir (96).

Terapötik aşıların keşfedilmesinde erken bir evredeyiz ve çalışmalar limitli olarak başarı göstermiştir..

Profilaktik aşılar ise, rekombinant DNA teknolojisinin ürünleridir

1- Profilaktik aşılar nötralizan antikor oluşturmak için L1 viral kapsid proteininden oluşan virus benzeri parçacıkları (VLP) kullanırlar.

2- Terapötik aşılar viral E6 ve /veya E7 onkogenlerini hedef alan spesifik T hücrelerini üretmeyi amaçlar.

2.10.1. Profilaktik HPV Aşıları:

Profilaktik aşılar, sonradan ortaya çıkabilecek bulaşlardan bireyi koruyan ve virusun L1 ve daha az oranda da L2 proteinlerine karşı nötralizan antikor gelişimini hedef alan aşılardır. Hücre kültürleri yapılamadığı için canlı HPV aşısı geliştirilememektedir, aşının yapımında rekombinant DNA teknolojisi kullanılmaktadır (96).

Denatüre monomerik L1, nötralizan antikor oluşturmamaktadır, ancak L1 proteini rekombinant bakulovirus veya mantar gibi vektörlerle sunulunca, kendiliğinden virus benzeri parçacıklara (VLP) dönüşmektedir. VLP gerçek virion yapısına benzer, immunojeniktir, ancak viral genom içermediği için zararlı değildir (96). Yüksek titrede antikor sentezi sağlar.

Koruyucu aşıların özelliği tip spesifik olmasıdır. VLP'ler sadece nötralizan antikor oluşturmamakta aynı zamanda hücresel yanıtı da uyarmaktadır (100). VLP aşıları yüksek titrede nötralizan serum antikoruna ortaya çıkartır ve koruma seviyesi ile serum antikor titresi arasında korelasyon olduğundan bahsedilmektedir (100).

2.10.2. Terapötik HPV aşıları:

HPV enfeksiyonuna karşı koruyucu olmak üzere geliştirilmekte olan aşılar oldukça heyecan verici olsa da uzun yıllardan beri HPV ile enfekte olmuş ve benign ve malign HPV ile ilişkili hastalıklara maruz kalan kişilerin sayısı giderek artmaktadır. Varolan HPV enfeksiyonlarına çözüm olmazsa gelecek 20 yılda şimdiki enfekte olan 5 milyon servikal kanserli hastanın kaybedileceği bilinmektedir. Bu nedenle etkin immünoterapiler araştırılmaktadır.

HPV enfeksiyonlarında karsinojenik etkiye yol açtığı düşünülen proteinler E6 ve E7'dir. Terapötik aşıların direkt olarak iki olası antijenik hedefi de bu proteinlerdir. E6 ve E7 Terapötik aşılama amaç hücresel immünitenin uyarılmasıdır. CD4+ ve CD8+ T hücreleri uyarılarak sitotoksikite ve sitokinler aracılığı ile viral DNA'ya entegre olmuş ve E6 ve E7 proteinlerini üreten enfekte hücreler yıkılır. İlerlemiş servikal hastalığın kontrolünde HPV tip 16 spesifik T-hücre cevabıyla ilgili INF- γ 'nın önemli rolü olduğuna dair kanıtlar vardır (88, 104).

2.11. Tedavi:

Papillomavirusler ile oluşan verruka lezyonları genellikle kendiliğinden iyileşerek kaybolurlar. Geleneksel tedavi yöntemleri olarak Kimyasal ablasyona dayalı yöntemler, lokal kemoterapi yöntemleri, fiziksel ablasyon yöntemleri, immüno terapi yöntemleri, eksizyon gibi cerrahi yöntemler yer almaktadır. Bu yöntemlerin uygulanması ile kür oranı %90'ı geçmesine rağmen Human Papillomaviruslar latent kalabilir ve tekrar lezyon oluşumuna yol açabilirler. Solunum yolları papillomlarında interferonun sınırlı faydası görölmüştür (50).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

İstanbul Tıp Fakültesi Kadın hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalındaki jinekolojik onkoloji kliniğine başvuran ve kolposkopi muayeneleri yapılan 126 hastadan servikal sürüntü örnekleri alınmış ve Human Papillomavirus varlığı yönünden araştırılmıştır.

3.1. Gereçler:

3.1.1. Cam ve plastik malzemeler:

- Steril tüpte pamuklu eküvyon çubuğu
- Tek kullanımlık eldivenler
- Değiştirilebilir uçlu filtreli pipetler
- Buz parçalarıyla dolu çukur kap
- Otoklavlanmış eppendorf tüpleri (1.5 mL)
- 1.5 mL'lik tüpler için tüp stantları
- 0.5 mL/ 0.2 mL'lik tüpler için tüp stantları

3.1.2. Ekipman:

- Mikrosantrifüj (Eppendorf, A.B.D)
- Termal dönüştürücü (Takara thermocyclers, Japonya)
- Ekstraksiyon laboratuvarında kullanılmak üzere üç ayarlanabilir mikropipet (1-20 µl, 20-200 µl and 200-1000 µl) (Eppendorf, A.B.D)

- Görüntüleme laboratuvarında kullanılmak üzere üç ayarlanabilir mikropipet (1-20 µl, 20-200 µl and 200-1000 µl) (Eppendorf, A.B.D)
- Eppendorf benzeri tüplere uyumlu ve ayarlanabilir çalkalama mekanizmalı termoblokler (37°C, 55°C ve 100°C’de) (Eppendorf , A.B.D)
- Vorteks (karıştırıcı, VF 2500 devir/dakika)
- Vakum sistemi
- Array tüp okuyucu(Genomica, İspanya)

3.1.3. HPV Tiplendirme Kiti:

3.1.3.1. Ekstraksiyon ve saflaştırma reaktifleri

- 2 ml tüpe adapte edilmiş saflaştırma kolonları
- 2 ml toplama tüpleri
- Buffer T1
- Buffer B1
- Buffer B2
- Buffer B5
- Buffer BW
- Buffer BE
- Liyofilize Proteinaz K (4 °C’de saklanmıştır.)

3.1.3.2. Amplifikasyon tüpleri:

AT (Genomica-İsp.), kullanıma hazırdır. 0.2 ml tüplerde aynı miktarda (45 µl) reaksiyon karışımı içerir fakat yağ bulunmaz.

3.1.3.3. Görüntüleme reaktifleri:

- Array tüpleri (spesifik problemler içerir).
- DC (Konjugat solüsyon). 4 °C’de saklanmıştır.
- CJ (Konjugat). 4 °C’de saklanmıştır.
- TL (5X yıkama solüsyonu). 4 °C’de saklanmıştır.

3.2. Yöntem:

3.2.1. Örneklerin alınması ve saklanması:

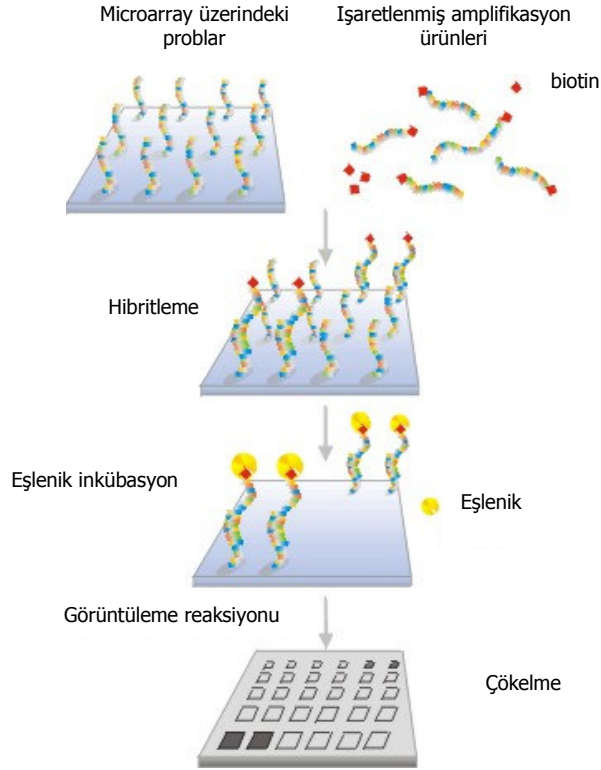
Kasım 2006 - Haziran 2007 tarihleri arasında İstanbul Tıp Fakültesi Kadın hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalındaki jinekolojik onkoloji kliniğine başvurmuş kolposkopi muayenesi yapılan 126 hastadan klinisyenler tarafından steril kuru pamuklu eküvyon yardımıyla servikal sürüntü örneği alınarak laboratuvarımıza ulaştırılmıştır. 7 gün içerisinde işleme tabi tutulacaksa +4°C’de, tutulmayacaksa -20°C’de saklanmıştır. Ayrıca dondurma/çözme işleminin virusun DNA saptanmasında olumsuz etkileyebileceğinden örneklerin bir defada işleme sokulmasına dikkat edilmiştir.

3.2.2. DNA çip metoduyla tiplendirme:

AT (Genomica-İspanya), ependorf tüpün alt kısmında mikroçip sisteminin kullanılmasına olanak sağlayan basit bir prensibe dayanır. Bu teknoloji çoklu moleküler markerların eş zamanlı olarak tesbit edilmesine olanak sağlar.

PCR prosedürü boyunca amplifiye edilen ürünler biotin ile işaretlenir. Bu etiketlenmiş ürünler mikroçipte hibridizasyon boyunca spesifik problemlara bağlanır ve immobilize (sabitlenir) edilir. Bunlar daha sonra streptavidin ve biotin etiket arasındaki reaksiyon yoluyla amplifiye olmuş ürüne bağlanan streptavidin-peroksidaz

eşleniği ile inkübe edilir. Daha sonra, 3, 3' ve 5, 5'-tetrametilbenzidin (TMB) varlığında, eşleniğin peroksidaz aktivitesi mikroçipin hibridizasyon bölgesinde çöken çözünmez ürünün görünmesini indükler.



Şekil 3-1. Görüntüleme metodu. Mikroçip üzerine immobilize olmuş proplar biotin ile işaretlenmiş spesifik amplifikasyon ürünlerini yakalar. Eşlenik eklenir (streptavidin peroksidaz). Bu eşleniğin streptavidin komponenti ve biotin arasındaki reaksiyon sayesinde eşlenik amplifikasyon komplekse bağlanır. TMB üzerindeki peroksidaz aksiyonu sayesinde çözünmez çökelti görüntüleme alanında şekillenir.

3.2.2.1. DNA Ekstraksiyonu:

A-

- Eküvyon içeren tüpe 1.5 ml. tuz çözeltisi ilave edilmiş (0.9% NaCl) ve vorteksle 1 dakika çalkalanmıştır.
- Üst sıvı, 1.5 ml'lik steril tüp içerisine dekante edilmiştir.
- Numuneler 10 dakika 12.000 rpm'de santrifüjlenmiş ve bütün sıvı mikropipet yardımıyla uzaklaştırılmıştır. Çökeleğin taşınmaması için dikkatli olunmuştur.
- Çökelek 180 µl T1 (liziz tamponu) çözeltisinde tekrar çözünmüştür.

B- 25 µl proteinaz K çözeltisi eklenmiştir ve vorteksle çalkalanmıştır. 56°C'de sıcak su banyosu içerisinde 1-3 saat çalkalanarak, örnek tamamen kaybolana kadar bekletilmiş, çalkalanan örnek en azından 15 dakikada bir vortekslenmiştir.

C- Örneğin yok olmasının her bir tüpe ardından 200 µl B3 çözeltisi eklenmiş, vorteksle karıştırıldıktan sonra termomikserde (çalkalanmadan) 70°C'de 10 dakika bekletilmiştir.

D- Her bir örneğe 210 µl 96% etanol çözeltisi eklenmiş ve hemen vortekslenmiştir.

E- Her bir örnek için saflaştırma kolonu hazırlanmış ve 2 ml mikrosantrifüj tüpe yerleştirilmiştir. Örnekler eklendikten sonra 12.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiş, eğer sıvı tamamen membrandan geçmemişse santrifüj işlemi tekrarlanmıştır. Süzülen akışkan atılmıştır.

F- 500 µl BW çözeltisi kolona eklenmiştir.12.000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilir.Sıvı süzüntü atılmıştır

G- 600 µl B5 çözeltisi kolona eklenmiştir.12.000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilmiş,sıvı süzüntü atılmıştır.

H- B5 çözeltisinin olası kalıntılarının uzaklaştırılması için 12.000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilmiştir.

I- 1.5 ml mikrosantrifüj tüpe temiz kolon yerleştirmiş, DNA önceden 70°C ısıtılmış 100 µl BE çözeltisi ile ayrılmıştır. Kolona koyduktan sonra bu solüsyon oda sıcaklığında 1 dakika bekletilmiş, ardından 12.000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilmiştir.

J- Tüpteki süzüntü geri alınmış (yaklaşık 100µl).5 µl’si amplifikasyon reaksiyonu için kullanılmış ve kalan kısım –20°C’ta saklanmıştır.

3.2.2.2. Amplifikasyon Reaksiyonu:

- Herbir örnek için reaksiyon tüpü eritilmiş ve buzda saklanmıştır.Eritme işleminde 37°C üzerinde sıcaklık kullanılmamıştır
- Reaksiyon tüpü santrifüj edilmiş, böylece tüm sıvı alta geçirilmiştir.
- Reaksiyon tüpüne, 5 µl ekstrakte edilmiş DNA eklenmiş (Eger 0.5 ml tüp içerisindeyse yağ tabakası delinerek alınır) ve pipetlenmiştir.
- Termocycler programlanması.

1 cycle	95°C 9 dak.
45 cycles	94°C 1 dak. 55°C 1 dak. 72°C 1 dak.
1 cycle	72°C 9 dak.
20°C (korunan) tüp toplamı kadar (opsiyonel)	

Tablo 3-1. 0.5 ml reaksiyon tüpleri için ampifikasyonun programlama cetveli.

1 cycle	95°C 9 dak.
45 cycles	94°C 0.5 dak. 55°C 1 dak. 72°C 1.5 dak.
1 cycle	72°C 8 dak.
20°C (korunan) tüp toplamı kadar (opsiyonel)	

Tablo 3-2. 0.2 ml reaksiyon tüpleri için amplifikasyon programlama cetveli.

- Program başlatılmış ve reaksiyon tüpleri blok 90°C ısıya ulaştığında buz içerisinden alınarak, Thermocycler içerisine yerleştirilmiştir. Amplifikasyon işlemi sonraki 4 saat devam etmiştir.

3.2.2.3. Amplifiye ürünün görüntülenmesi:

- **Denaturasyon:** PCR amplifikasyon ürününün denatürasyonu için thermocycler kullanılmıştır. Bunun için tüpler thermocycler içerisine yerleştirilip ve 95°C 10 dakika bekletilmiştir. Denatürasyonun ardından thermocyclerın aynı sıcaklıkta kalması için 15 dakikaya ayarlanmıştır. Çıkarılan tüpler hemen buz içerisine alınmıştır.
- TL çözeltisini hazırlanmıştır (48 örneklilik kit kullanıldığından, 54 ml distile suya 6ml TL çözeltisi eklenmiştir).
- **Array tüpün ön yıkaması:** Herbir tüpe 300 µl TL çözeltisi eklenmiş ve 4-5 defa çalkalanmıştır. Sonra bu çözelti pipet veya vakum yardımıyla uzaklaştırılmıştır. Bu tüpler örnek koyulmadan önce yıkanmıştır. Tüpler yıkama solüsyonundan arındırılmış, kapakları kurulanmıştır.
- **Hibridizasyon:** SH çözeltisi kullanılmadan önce oda sıcaklığına getirilmiştir. Herbir array tüpe 100 µl SH çözeltisi eklenmesinin (köpüklenmeden kaçınılmıştır) ardından, array tüplere 5 µl denatüre edilmiş amplifiye ürün eklenmiş ve örneğin iyice karışması için belirli aralıklarla çalkalanmıştır. 55°C'de 1 saat 550 rpm de termomikserde bekletilmiştir. Bu aşamanın ardından, tüpler alınmış ve SH çözeltisi pipet veya vakum yardımıyla uzaklaştırılmıştır. Termomikser 6.aşamada kullanılmak üzere 30°C'ye ayarlanmıştır.
- **Yıkama:** Array tüp içerisine 300 µl TL çözeltisi eklenmiştir ve 5-10 defa ters çevrilmiş sonrasında çözelti pipet veya vakum yardımıyla uzaklaştırılmıştır. Eğer termomikser 30 °C değerinde değilse TL çözeltisi AT içerisinde bekletilmiştir.
- **Konjugatın bloklanması ve eklenmesi:** CJ çözeltisi hazırlanmıştır. Herbir örnek için tüplere 100 µl DC ve ardından 0.75 µl CJ çözeltisi eklenmiştir. (Çözelti fazladan 10 array tüp için hazırlanmıştır. Bu sayede pipetleme hatalarının önüne geçilmesini sağlamıştır). CJ çözeltisi 4°C'ta saklandığı taktirde 4 saat stabil kalabilir. Herbir array tüp için 100 µl CJ solüsyonu

eklenmiştir. 30°C'ta 15 dakika 550 rpm'de çalakanarak bekletilmiştir. Sonra hızlı bir şekilde array tüplerdeki sıvı pipet veya vakum yardımıyla uzaklaştırılmış ve Termomikserin ısısı 8. basamakta kullanılmak üzere 25 °C'ye ayarlanmıştır. Herbir array tüpe 300 µl TL çözeltisi eklenmiş ve 5-10 defa ters çevrilmek suretiyle karıştırılmış, ardından çözelti pipet veya vakum yardımıyla uzaklaştırılmıştır. Eğer bu yıkama işlemi hızlı gerçekleştirilmezse okunma iyi bir şekilde gerçekleşmeyebilir.

- **Yıkama:** Bu oldukça önemli bir yıkama işlemidir. Herbir array tüpe 300 µl TL çözeltisi eklenmiş ve 5-10 defa ters çevrilmek suretiyle karıştırılmıştır. Bu CJ çözeltisinin ortamdaki uzaklaştırılması için yapılmıştır. Eğer çözelti içinde kalırsa RE çözeltisi ile reaksiyona girecek ve spesifik olmayan sinyal oluşmasına neden olacaktır.
- **RE çözeltisinin kullanılmasının gelişimi:** TL çözeltisi uzaklaştırılmış, herbir array tüpüne 100 µl RE çözeltisi eklenmiş ve 25°C sıcaklıkta 10 dakika çalkalanmadan bekletilmiştir.

Bu basamak herbir AT tüp ile hızlı bir şekilde tekrarlanmıştır, Şöyle ki:

- TL çözeltisi 1. tüpten uzaklaştırılmıştır
- 100 µl RE çözeltisi eklenmiştir
- 10 dakika süre başlatılmıştır
- Aynı işlemler 2. tüptede gerçekleştirilir: TL çözeltisi uzaklaştırılmıştır, 100 µl RE çözeltisi eklenmiştir ve 25°C'ta bekletilmiştir. Aynı işlemler her tüpte tekrarlanmıştır.
- 10 dakikanın ardından, tüpler RE solüsyonu eklenmiş olarak aynı sırayla okunmaya başlanmıştır.
- Grup analizi modunda okunmuştur. Bu modun kullanılmasıyla tüm tüplerdeki görüntü elde edilmiş ve sonra analiz edilmiştir. Her bir analizden elde edilen verilerin işlenmesi tamamen otomatiktir. Okuma/analiz ekipmanı bir sonuç raporu sağlamaktadır. Monitörde, üç sütunlu bir tablo görünür. Sol sütun saptanabilecek HPV genotiplerini gösterir, orta sütun her bir genotip için pozitif veya negatif sonucu gösterir ve sağ sütun geçerli amplifikasyon ve DNA kontrollerini gösterir.

Virus	Result	Controls
Type 6	POSITIVE	Passed
Type 11	POSITIVE	Passed
Type 16	Negative	Passed
Type 18	POSITIVE	Passed
Type 26	Negative	Passed
Type 31	Negative	Passed
Type 33	Negative	Passed
Type 35	Negative	Passed
Type 39	Negative	Passed
Type 40	Negative	Passed
Type 42	Negative	Passed
Type 43	Negative	Passed
Type 44	Negative	Passed
Type 45	Negative	Passed
Type 51	Negative	Passed
Type 52	Negative	Passed
Type 53	POSITIVE	Passed
Type 54	Negative	Passed
Type 56	Negative	Passed
Type 58	Negative	Passed
Type 59	Negative	Passed
Type 61	Negative	Passed
Type 62	Negative	Passed
Type 66	Negative	Passed
Type 68	Negative	Passed
Type 70	Negative	Passed
Type 71	Negative	Passed
Type 72	Negative	Passed
Type 73	Negative	Passed
Type 81	Negative	Passed
Type 82	Negative	Passed
Type 83	Negative	Passed
Type 84	Negative	Passed
Type 85	Negative	Passed
Type 89	Negative	Passed

RESULT	VIEW
Papilloma Virus Test	
Test reference:	XX
ArrayTube no :	14152421040204
Array tube :	Endpoint detection
Date/Time :	2007-01-11 15:57
Assay number: 040204	

Şekil 3-2. HPV tip 6,11,18,53 pozitif bir örnek. Monitörde, üç sütunlu bir tablo görünür. Sol sütun saptanabilecek HPV genotiplerini gösterir, orta sütun her bir genotip için pozitif veya negatif sonucu gösterir ve sağ sütun geçerli amplifikasyon ve DNA kontrollerini gösterir.

4. BULGULAR

Çalışmamızda İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Jinekolojik onkoloji kliniğine Kasım 2006-Mayıs 2007 tarihleri arasında başvuran ve kolposkopi muayeneleri yapılan 126 hastadan alınan servikal sürüntü örneklerinde, Human Papillomavirus varlığı yönünden incelenmiş ve tip profili araştırılmıştır.

Tablo 4-1. Jinekolojik onkoloji kliniğinden alınan örneklerdeki HPV tiplerinin dağılımı.

	ASCUS	LSIL	HSIL	Serviks Kanseri	Atipik	Normal	Toplam (n=126)	Oran(%)
HPV 6	2	1	1	-	2	-	6	%4,76
HPV 16	3	4	5	2	-	-	14	%11,1
HPV 18	-	2	-	-	3	-	5	%3,96
HPV 31	-	-	-	1	1	-	2	%1,58
HPV 51	-	2	-	-	-	-	2	%1,58
HPV 53	-	2	-	-	-	-	2	%1,58
HPV 58	-	1	-	-	-	-	1	%0,79
HPV 59	-	1	-	-	-	-	1	%0,79
HPV 61	1	-	-	-	-	-	1	%0,79
HPV 66	-	2	-	-	3	-	5	%3,96
HPV 84	-	1	-	-	-	-	1	%0,79
Karş. İnf.	1	1	1	1	5	-	9	%7,14
Toplam	7	17	7	4	14	-	49	%38,9

Bölümümüze steril tüp içerisine alınmış olarak gelen eküvyonlar, içlerine 1,5 ml %0,95'lik tuzlu su çözeltisi konduktan sonra yaklaşık 10 dakika santrifüj işlemi uygulanmıştır, üst sıvı dikkatlice ortamdaki uzaklaştırılmış ve tüpün dibindeki pelet ile ekstraksiyon işlemimiz gerçekleştirilmiştir. Daha sonra bu örnekler, termalcycler içerisine konularak amplifiye olması sağlanmış olup, sonraki aşamada 5µl amplifiye ürün çipli tüplere aktarılmış ve hibridizasyondan sonra görüntüleme aşamasına geçilmiştir.

Çalışmamızda, yirmidokuz ASCUS'lu, yirmiyük LSIL'li, onyediy HSIL'li, dört servikal kanserli, otuz atipik sitolojili ve yirmiyük sitolojisi normal olan hastadan alınan yaklaşık yüzymialtı servikal sürüntü örneği HPV DNA'sı yönünden incelenmiş ve tiplendirilmeleri yapılmıştır. Çalışılan yüzymialtı hastadan, kırkdokuz (%38,9)'unda HPV DNA pozitifliği saptanmış olup bu hastaların ondört örnekte HPV tip 16 (%11,1), beş örnekte HPV tip 18 (%4), altı örnekte HPV tip 6 (%4,76), beş örnekte HPV tip 66 (%3,96), ikişer örnekte HPV tip 31, 51, 53 (%1,58), birer örnekte HPV tip 58, 59, 61, 84 (%0,79) ve dokuz örnekte karışık infeksiyon (%7,14) gözlemlenmiştir.

ASCUS (Atypical squamous cells of undetermined significance-Atipik skuamöz hücreler)'lu yirmidokuz hastadan, yedi (%24,1) tanesinde, LSIL (Low-grade intraepitheial lesion)'li yirmiyük hastadan onyediy (%73,9) tanesinde, HSIL (high-grade intraepithelial lesion)'li onyediy hastadan yedi (%41,17) tanesinde, servikal kanserli dört hastanın dört (%100)tanesinde de HPV DNA pozitifliği saptanmıştır, sitolojileri atipik olan otuz hastadan ondört (%46,6)'ünde HPV DNA pozitifliği saptanırken, sitolojisi normal olan yirmiyük kontrol grubu hastasının tamamında, HPV DNA pozitifliğine rastlanmamıştır.

Çalışmamıza katılan yaş ortalaması 35,5 olan 126 hastanın yaş dağılımına bakarsak, pozitifliklerin 40 yaş altındaki hastalarda daha fazla olduğunu gözlemleyebiliriz (%30,1). 40 yaş üstü hastalarda bu oran daha düşüktür (%8,7). 20-30 yaş grubunda 18 (%14,3) pozitiflik saptanırken, 31-40 yaş grubunda 20 (%15,8), 41-50 yaş grubunda 8 (%6,3) ve 51-60 yaş grubunda 3 (%2,3) örnekte pozitiflik saptanmıştır.

Tablo 4-2. Yaşları 20 - 59 arasında ve yaş ortalaması 35,5 olan 126 hastanın yaşlara göre tip dağılımı tablodaki gibidir.

Y \ T	HPV 6	HPV 16	HPV 18	HPV 31	HPV 51	HPV 53	HPV 58	HPV 59	HPV 61	HPV 66	HPV 84	Karışık İnf.	Toplam (n=126)	Oran(%)
20-30	2	4	2	-	2	-	1	-	-	3	-	4	18	%14,3
31-40	3	7	3	1	-	-	-	-	-	2	1	3	20	%15,8
41-50	-	3	-	1	-	1	-	1	1	-	-	1	8	%6,34
51-60	1	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	1	3	%2,38

Y: Yaş grubu , T: Tip

Çalıştığımız yüzyirmialtı örnekten 9 (%7,14) tanesinde karışık infeksiyon gözlemlenmiştir. Bu hastalardan iki (%1,59) tanesinde HPV tip 16 ve HPV tip 18 karışık infeksiyonu görülürken, karışık infeksiyon saptanan örneklerden beş (%3,96) tanesinde iki tip ile karışık infeksiyon görülürken, üç (%2,38) tanesinde üç tip ile karışık infeksiyon, bir (%0,79) tanesinde dört tip ile karışık infeksiyon görülmüştür(Tablo 4-3).

Tablo 4-3. Birden fazla tiple oluşan infeksiyonların dağılımı.

Tipler	Toplam(n=126)	Oran(%)
HPV16-HPV18	2	%1,58
HPV16-HPV66	1	%0,79
HPV61-HPV84	1	%0,79
HPV6-HPV59	1	%0,79
HPV11-HPV61-HPV70	1	%0,79
HPV6-HPV53-HPV58	1	%0,79
HPV6-HPV31-HPV53	1	%0,79
HPV6-HPV11-HPV18-HPV53	1	%0,79
Toplam	9	%7,14

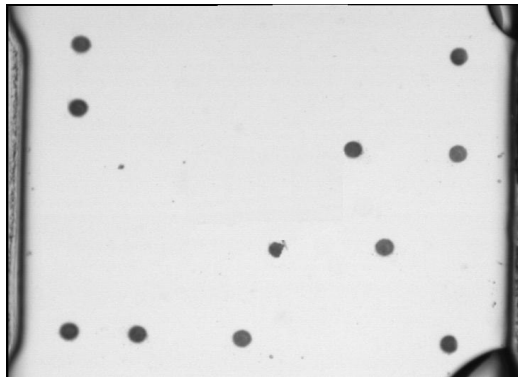
Çalışmamıza katılan 23 normal sitolojili kontrol hastalarından HPV DNA pozitifliği saptanamamıştır.

K \ S	HPV DNA (+)	HP DNA (-)	Toplam
Semptomatik Hasta	49	54	103
Aseptomatik Hasta	0	23	23
Toplam	49	77	126

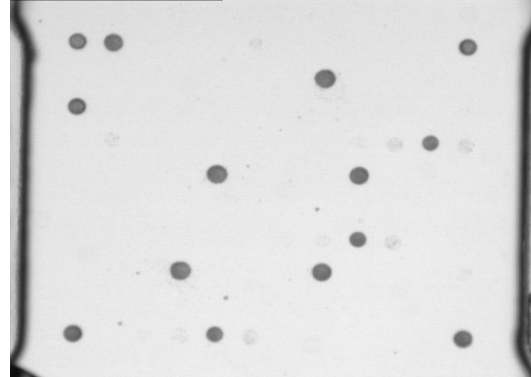
Tablo 4-4. HPV DNA pozitifliğinin semptomlu ve semptomsuz hastalardaki dağılımı. Çalışmamızda, pozitif sonuç ve semptomlar arasında güçlü bir korelasyon bulunmuştur ($\chi^2_y=15,95$, $p<0,001$).

	70	71	72	73	81	82	83	84	85	89	
51	52	53	54	56	58	59	61	62	66	68	
	18	26	31	33	35	39	40	42	43	44	45
	81	82	83	84	85	89	intern	CDNA	6	11	16
54	56	58	59	61	62	66	68	70	71	72	73
31	33	35	39	40	42	43	44	45	51	52	53
82	83	84	85	89	intern	CDNA	6	11	16	18	26
56	58	59	61	62	66	68	70	71	72	73	81
	39	40	42	43	44	45	51	52	53	54	
	intern	CDNA	6	11	16	18	26	31	33	35	

Şekil 4-1. Çip üzerinde bulunan spesifik HPV proplarının yerleşim düzeni.



Şekil 4-2. HPV tip 16 pozitif örnek



Şekil 4-3. Karışık enfeksiyon (HPV tip 11,61,70)

5. TARTIŞMA

Human Papillomavirus bütün dünyada servikal kanserin primer etiyolojik ajanı olarak kabul edilmektedir. İlk kez 1977 yılında Harald Zur Hausen'in, Human Papillomavirus ve servikal kanser arasındaki ilişki olabileceğine dair hipotezinden sonra bu virus türü tıbbın pek çok dalının özel ilgi odağı haline gelmiştir. HPV epiteliotropik bir virus olup vulvar, vajinal, penil ve anal kanser, ayrıca deride yaygın siğiller, anogenital siğiller, oral, faringeal papilloma ve tekrarlayan respiratuvar papillomatozis gibi deri ve mukozada çeşitli benign ve malign tümörlerin gelişmesi ile de ilişkilidir (50). Günümüze kadar servikal neoplazi ve servikal kanser ile Human Papillomavirus arasındaki ilişkiyi araştıran birçok çalışma yapılmıştır.

Çalışmamızda İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Jinekolojik onkoloji kliniğine başvuran ve kolposkopi muayeneleri yapılan 126 hastadan alınan servikal sürüntü örneklerinde, İnsan Papilloma virus varlığı yönünden incelenmiş ve tip profili araştırılmıştır. Bizim çalışmamızda örnekler ekstraksiyon, amplifikasyon ve hibridizasyon aşamalarından sonra görüntülemeye geçilmiş ve 126 hastanın 49'unda (%38,9) HPV DNA pozitifliği saptanmış olup bu hastaların 14 örnekte HPV tip 16 (%11,1), 5 örnekte HPV tip 18 (%4), 6 örnekte HPV tip 6 (%4,76), 5 örnekte HPV tip 66 (%3,96), 2'şer örnekte HPV tip 31, 51, 53 (%1,58), 1'er örnekte HPV tip 58, 59, 61, 84 (%0,79) ve 9 örnekte karışık enfeksiyon (%7,14) gözlemlenmiştir (Tablo 4-1).

Ülkemizde Beka ve ark. (9) yaptığı çalışmada 418 hastadan alınan servikal sürüntü örneklerinde HPV DNA'sı araştırılmış olup, bu örneklerden 35 (%8,3)'inde HPV DNA düşük risk grubu, 57 (%13,6)'sinde HPV DNA yüksek risk grubu pozitif bulunmuştur. Hastaların 17 (%4) 'sinde ise HPV DNA'nın hem düşük hem de yüksek risk grubu pozitif bulunmuştur. Bu çalışmada Hybrid capture yöntemi kullanılmıştır ve yüksek ve düşük riskli HPV tipleri saptanmış olup, genotiplendirme yapılmamıştır.

Özçelik ve ark. (76) 230 hasta ile yaptıkları çalışmada bu hastaların 14 (%6,1)'ünde HPV DNA pozitifliği saptamışlardır. Bu çalışmada HC 1 sistemi kullanılmış olup, genotiplendirme yapılmamıştır.

Öztürk ve ark. (77) 2004 yılında yaptıkları çalışmada Jinekoloji kliniğine gelen ve rastgele seçilen 206 hastada Hybrid Capture metodu kullanılarak HPV DNA pozitifliği araştırmış ve bu oranı %4,9 olarak saptamışlardır.

Ağaçfıdan ve ark. (1) İstanbul'da yaptığı çalışmada Pap smear'larında atipik sonuç elde edilmiş 470 kadın ve asemptomatik 179 kadın incelemeye alınmış Hybrid Capture 2 sistemi kullanılarak incelenmiş, incelenen 420 örneğin 71 (%16,9) tanesinde HPV DNA yüksek risk grubu pozitiflik saptanırken, 14 (%3,3) tanesinde HPV DNA düşük risk grubu pozitiflik bulunmuştur. Asemptomatik hastalardan alınan 179 örneğin 11 (%6,1)'inde HPV DNA yüksek risk grubu pozitif sonuç ve 9 (%5)'unda HPV DNA düşük risk grubu pozitif saptanmıştır.

Rassu ve ark. (82) 2005 yılında yaptıkları çalışmada Kuzeydoğu İtalya'da servikal sitolojileri anormal olan 1335 hastadan aldıkları servikal sürüntü örneklerinde HPV genotip prevalansı araştırmış ve 471 HPV DNA pozitif olgu ile karşılaşmışlardır (% 35,3). Bu hastalardan 182 tanesinde HPV tip 16 bulunmuştur (%13,63), 52 tanesinde HPV tip 31 (%3,9), 52 tanesinde HPV tip 58 (%3,9), 31 tanesinde HPV tip 6 (%2,32), 23 tanesinde HPV tip 53 (%1,72), 18 tanesinde HPV tip 33 (%1,35) ile çalışma kapsamında en sık rastlanılan tiplerdir. Rassu ve ark.'larının çalışmasıyla çalışmamız pozitiflik ve baskın tür açısından paralellik göstermektedir.

Ho ve ark. (48) 2005 yılında yaptıkları çalışmada multiplex PCR metoduyla, servikal sitolojileri anormal olan 149 hastadan 87 (% 59)'sinde yüksek risk HPV bulmuştur. Ho ve ark. yaptığı çalışmada, toplamda 42 (%28) pozitif örnekle HPV tip 16 en sık rastlanılan HPV tipi olmuştur.

Sun ve ark. (94) 2005 yılında Tayvan'da Hybrid Capture yüksek risk kokteyli ve line blot yöntemleriyle gerçekleştirdikleri çalışmada, servikal sitolojileri anormal olan 1264 hastanın, 691 (%68,9)'inde HPV DNA pozitifliği saptamışlardır. Bu örneklerden %22,1'inde HPV tip 16, %19,7'sinde HPV tip 52, %15,9'unda HPV tip 58, %7,6 HPV tip 33, %6,1'inde HPV tip 51, %6,1'inde HPV tip 53 saptanmıştır. Sun ve ark. çalışmasında kullanılan metodlar ve primer dizileri dolayısıyla sadece yüksek risk HPV tipleri araştırılmış olup, çalışmada düşük risk HPV tipleri ile ilgili bir veri bulunmamaktadır.

De paula ve ark. (26) 2007 yılında Brezilya'da yaptıkları çalışmada servikal sitolojileri anormal olan 250 hastadan aldıkları servikal sürüntü örneklerinde

Chlamydia trachomatis DNA ve HPV DNA'sını PCR metoduyla araştırmış ve 100 örnekte HPV DNA pozitifliği saptamışlardır (%40). De paula ve arkadaşlarının yaptıkları çalışma ile çalışmamız arasında HPV DNA pozitifliği açısından yakın sonuçlar bulunmuştur.

Garguilo ve ark. (40) 2007 yılında İtalya'da yaptıkları çalışmada servikal sitolojileri anormal olan 213 hastadan aldıkları servikal sürüntü örneklerinde HPV genotiplendirme yapılmış ve baskın olan tipler araştırılmıştır. Bu örneklerden 181(%84,9)'inde HPV DNA pozitifliği saptamış olup, pozitif örneklerin, %61,2 'sinde HPV tip 16 , %16,1'inde HPV tip 52, %12,9'unda HPV tip 18 ve %9,6'sında HPV tip 31 bulunmuştur.

Beerens ve ark. (8) 2005 yılında yaptıkları çalışmada, servikal sitolojileri anormal olan 780 hastadan aldıkları servikal sürüntü örneklerinde line prob yöntemiyle HPV genotipleme yapılmış ve 513 örnekte HPV DNA pozitifliği saptamışlardır (%65,8). HPV pozitifliği saptadıkları örneklerden 143 (%18,3) tanesinde HPV tip 16, 72 (%9,2) tanesinde HPV tip 51, 61(%7,8) tanesinde HPV tip 53, 59 (%7,6) tanesinde HPV tip 52, 57 (%7,3) tanesinde HPV tip 31, 38 (%4,8) tanesinde HPV tip 18, 44 (%5,6) tanesinde HPV tip 66, 26 (%3,3) tanesinde HPV tip 6 ile çalışma kapsamında en sık rastlanılan tiplerdir.

Lee ve ark. (60) 2005 yılında yaptıkları çalışmada servikal sitolojileri anormal olan 400 hastadan aldıkları servikal sürüntü örneklerinde, HC2 ve DNA çip yöntemiyle yüksek risk HPV genotip prevalansı araştırılmış ve bu hastalardan 110 (%27,5) tanesinde HPV tip 16, 45 (%11,25) tanesinde HPV tip 58, 37 (%9,25) tanesinde HPV tip 18, 35 (%8,75) tanesinde HPV tip 52 ile çalışma kapsamında en sık rastlanılan tipler olmuştur. Lee ve ark. çalışmasında öncelikle HC2 yöntemi yardımıyla yüksek risk HPV tipleri saptanmış, daha sonra bu örneklerde genotiplendirme yapılmıştır, çalışmada düşük risk HPV tipleri ile ilgili bir veri bulunmamaktadır.

Finan ve ark. (36) 2001 yılında yaptıkları çalışmada normal ve anormal sitoloji gösteren 126 hastadan aldıkları servikal örneklerde HPV DNA genotipleme araştırmış olup, bu örneklerden 55'inde HPV DNA pozitifliği bulmuşlardır(%43) ve HPV DNA pozitifliği saptadıkları örneklerden 35 (%63,64) tanesinde HPV tip 16, 5 (%9,09) tanesinde HPV tip 18, 4 (%7,27) tanesinde HPV tip 33, 2 (%3,64) tanesinde HPV tip 6, 1 (%1,82) tanesinde HPV tip 11, 3 (%5,45) tanesinde HPV tip 16 ve HPV

tip 18 karışık enfeksiyonu, 2 (%3,64) tanesinde HPV tip 16 ve HPV tip 33 karışık enfeksiyonu, 1 (%1,82) tanesinde HPV tip 16 ve HPV tip 6 ve 2 (%3,64) tanesinde de HPV DNA pozitif ancak HPV 6, 11, 16, 18 veya 33'den farklı bir tip bulmuşlardır. Finan ve ark. çalışmasında da sadece ikisi düşük risk, üçü yüksek risk toplam 5 tip pozitiflik yönünden araştırılmıştır.

Lee ve ark. (61) 2007 yılında G.Kore'de yaptıkları çalışmada, anormal sitoloji gösteren 2358 hastadan aldıkları servikal sürüntü ve biyopsi örneklerinde HPV DNA genotiplemesi araştırmış olup bu örneklerden 967.(%41)'sinde yüksek risk HPV DNA pozitifliği saptamışlardır. HPV DNA pozitifliği saptadıkları örneklerden 386 (%16,36) tanesinde HPV tip 16, 166 (%7,04) tanesinde HPV tip 58, 110 (%4,66) tanesinde HPV tip 18, 89 (%3,77) tanesinde HPV tip 53, 74 (%3,14) tanesinde HPV tip 33, 61(%2,59) tanesinde HPV tip 31 bulgularından bazılarıdır.

Sowjanya ve ark. (90) 2005 yılında Hindistan'da servikal karsinomali ve normal hastalar üzerinde PCR temelli line blot assay kullanarak yaptıkları çalışmada, 41 servikal kanserli hastanın 36 (%87,9)'sında HPV DNA pozitifliği saptamışlardır. HPV DNA pozitif olan hastaların %66,7'sinde HPV tip 16, %19,4'ünde HPV tip 18, %5,6'sında HPV tip 33, %5,6'sında HPV tip 35 ve %5,6'sında HPV tip 45, %2,8'inde HPV tip 52, %2,8'inde HPV tip 58 bulmuşlardır. 185 Normal hastadan ise %10,3'ünde HPV DNA pozitifliği bulmuşlardır.

Ghaffari ve ark. (42) 2006 yılında İran'da yaptıkları çalışmada 7'si servikal karsinomali, 50'si anormal sitoloji ve 77 normal sitoloji gösteren hastalardan oluşan toplam 134 hastadan alınan servikal örneklerde HPV DNA pozitifliği aranmış anormal sitoloji gösteren 50 hastanın 30 (%60)'unda HPV DNA pozitifliği saptanmış, HPV DNA pozitif olan hastaların %76'sında HPV tip 16, %12,7'sinde HPV tip 18 ve %8,5'inde HPV tip 11 saptanmıştır. Normal gruptaki 77 hastada ise 10 (%13) HPV DNA pozitifliği saptanmıştır. Servikal karsinomali 7 hastadan 5'inde HPV tip 16, bir hastada HPV tip 16 ve HPV tip 18'in oluşturduğu, bir hastada HPV tip 16 ve HPV tip 31'in oluşturduğu karışık enfeksiyon saptanmıştır.

Lee ve ark. (62) 2007 yılında Amerika Birleşik Devletlerinde yaptıkları metodoloji çalışmasında, nested PCR metoduyla, 513 serviko-vajinal örnekte 107 örneğin HPV DNA pozitif olduğunu bulmuşlardır, pozitif bulunan 107 örneğin 29 (%27,2)'unda HPV tip 16, 9 (%8,5)'unda HPV tip 58 bulmuşlardır.

Anguiano ve ark. (2) Meksika’da yaptıkları prevalans ve genotiplendirme çalışmasında 498 hastadan alınan örneklerde HPV DNA PCR metoduyla 24 (%4,8) hastada HPV DNA pozitifliği saptamış olup bu 24 örneğinde 18 (%75)’inin HPV tip 16 saptandığı, bu 18 hastadan 2 (%8,3)’sinde HPV tip 18 ile koenfeksiyon bulunduğu, kalan 6 hastanın ise HPV tip 16, HPV tip 18 ve HPV tip 33 tipleri açısından negatif sonuç verdiğini göstermişlerdir. Anguilo ve ark. çalışmasında örnekler sadece HPV tip 16,18 ve 33 pozitifliği açısından araştırılmış olup sadece bu üç tipin pozitiflik oranları verilmiştir.

Hwang ve ark. (53) 2004 yılında G.Kore’de yaptıkları çalışmada 861’i anormal sitolojili,1609’u normal sitolojili hastadan alınan servikal örneklerde, DNA çip yöntemini kullanarak HPV DNA pozitifliği yönünden araştırmışlar ve bu hastaların 1106 (%44,8)’sında HPV DNA pozitifliği saptamışlardır. Bu hastalardan 204 (%8,3)’ünde HPV tip 16, 110 (%4,5)’inde HPV tip 52, 110 (%4,5)’inde HPV tip 58, 88 (%3,6)’inde HPV tip 51, 161 (%6,5)’inde düşük riskli tipler ve 180 (%7,3) diğer tipler olarak bulunmuştur. Genelde yapılan çalışmalardan farklı olarak Hwang ve arkadaşları HPV 18’e çok sık rastlamamışlardır.

Lombart ve ark. (63) 1998 yılında servikal kanserli 297 hastada yaptıkları çalışmada, HPV DNA’sı aramış bu hastalardan 246 (%83)’sında HPV DNA pozitif sonuca ulaşılmıştır. Bu örneklerden 150 (%50,5)’si HPV tip 16, 31 (%10,4) hastada HPV tip 18 ile baskın olan tipler olmuşlardır.

Dünyanın farklı bölgelerinde yapılmış çalışmalarda servikal sürüntü örneklerinden HPV DNA izolasyon oranları %30’lardan %85 ‘lere kadar değişen sonuçlar vermektedir.Bu kadar değişken sonuçlar çıkmasının nedenleri;

Jinekoloji kliniğinden alınan örneklerin deney yapılabilecek kalitede olmamasından (Alınan servikal sürüntü örneği bolca hücre içermelidir, iyi alınmamış örnekler DNA izolasyonu oranını ciddi şekilde düşürmektedir) veya genomik amplifikasyonda ortaya çıkan problemlerden olabileceğini düşünmekteyiz. Genomik amplifikasyonun sakıncalarından biri yalancı negatiflerin görünmesidir. Düşük kaliteli DNA örnekleri (çok az miktarda DNA, DNA bozunması veya ekstraksiyon boyunca DNA kaybı) ve DNA polimeraz inhibitörlerinin (hemogloblin, parafin blok kalıntıları, tuzlar vb.) varlığı gibi etkenlerin DNA izolasyonu ve amplifikasyonuna bağlı olarak çalışmaların etkilenebileceğini düşünmekteyiz.

Sonuç olarak ülkemizde bu ve benzer çalışmaların özellikle risk gruplarında arttırılarak yapılması HPV infeksiyonlarının gerçek prevalansı ve risk tiplerinin dağılımı konusunda ayrıntılı bilgi elde edilmesi için önem taşımaktadır. Ayrıca tanı yöntemlerinde görülen gelişmeler ve buna paralel olarak maliyeti ucuz, hızlı sonuç veren, çok sayıda muayene maddesini incelemeye imkan tanıyan testlerin geliştirilmesi ve standardizasyonu HPV infeksiyonlarının tanısında ve kontrol altında tutulmasında önemli rol oynayacaktır.

KAYNAKLAR

1. Aaçfıdan A,Beka H,Önel M,Bilgin M,Önel D,Badur S.Kadınlarda insan papillomavirus(HPV) ve Chlamydia trachomatis araştırılması.*Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti 70.Yıl Bilimsel toplantısı konferanslar ve simpozyumlar kitabı*.s.325(2001)
2. Anguiano LFS, Esquivel CA, Romero MAR, Rodríguez MC. Human papillomavirus infections in women seeking cervical Papanicolaou cytology of Durango, Mexico: prevalence and genotypes. *BMC Infectious Diseases* 2006, 6:27
3. Antonsson A, Forslund O, Ekberg H, Sterner G, Hansson BG. The ubiquity and impressive genomic diversity of human skin papillomaviruses suggest a commensalic nature of these viruses. *J Virol* 2000;74:11636–41.
4. Armstrong LR, Preston EJ, Reichert M, et al. Incidence and prevalence of recurrent respiratory papillomatosis among children in Atlanta and Seattle. *Clin Infect Dis*. 2000;31:107-109
5. Ashrafi GH, et al. E5 protein of human papillomavirus type 16 selectively downregulates surface HLA class I. *Int J Cancer* 2005; 113: 276–283.
6. Barbosa MS, Lowy DR, Schiller JT. Papillomavirus polypeptides E6 and E7 are zinc-binding proteins. *J Virol* 1989; 63: 1404–1407.
7. Baseman JG , Koutsky LA The epidemiology of Human Papilloma Virus infection. *J Clin Virol* 2005;32 (Suppl 1) 16-24
8. Beerens E, Van Renterghem L, Praet M, Sturtewagen Y, Weyers S, Temmerman M, Depypere H, Claeys P, Cuvelier CA. Human papillomavirus DNA detection in women with primary abnormal cytology of the cervix: prevalence and distribution of HPV genotypes. *Cytopathology* 2005, 16, 199–205
9. Beka H, Önel M,Önel D,Berkman S,Aaçfıdan A,Badur S,Bozkaya E. Jinekoloji kliniğine başvuran hastalarda HPV DNA'nın Nükleik asit Hibridizasyon yöntemi ile araştırılması.*1.Ulusal Viroloji kongresi Konferanslar ve Bildiriler kitabı*.s.343(2003)
10. Bernard H-U.The clinical importance of nomenclature,evolution and taxonomy of Human papillomaviruses. *J. Clin. Virol.* 32S (2005) S1–S6
11. Bosch FX, de Sanjose S. Chapter 1: human papillomavirus and cervical cancer—burden and assessment of causality. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2003(31):3–13.

12. Bossis, I. Roden, R. B., Gambhira, R. et al. (2005) Interaction of tSNARE syntaxin 18 with the papillomavirus minor capsid protein mediates infection. *J. Virol.* **79**, 6723–6731
13. Boxman IL, Berkhout RJ et al. Detection of human papillomavirus types 6 and 11 in pubic and perianal hair from patients with genital warts. *J Clin Microbiol* 1999;37:2270-2273
14. Bray F, Carstensen B, Moller H, Zappa M, Zakelj MP, Lawrence G, Hakama M, Weiderpass E. Incidence trends of adenocarcinoma of the cervix in 13 European countries. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **14**, 2191–2199 (2005).
15. Brehm A, et al. The E7 oncoprotein associates with Mi2 and histone deacetylase activity to promote cell growth. *EMBO J* 1999; 18: 2449–2458.
16. Burchell AN, Richardson H, Mahmud SM, et al. Modeling the sexual transmissibility of human papillomavirus infection using stochastic computer simulation and empirical data from a cohort study of young women in Montreal, Canada. *Am J Epidemiol.* 2006;163:534-543.
17. Carter JJ, Koutsky LA, Hughes JP et al. Comparison of human papillomavirus types 16, 18, and 6 capsid antibody responses following incident infection. *J Infect Dis* 2000;181:1911–9.
18. Caussy D, Orr W, Daya AD, Roth P, Reeves W, Rawls W. Evaluation of methods for detecting human papillomavirus deoxyribonucleotide sequences in clinical specimens. *J Clin Microbiol.* 1988;26:236–243.
19. Chen R, Aaltonen L-M, Vaheri A. Human papillomavirus type 16 in head and neck carcinogenesis. *Rev Med Virol* 2005
20. Cole ST, Danos O. Nucleotide sequence and comparative analysis of the human papillomavirus type 18 genome: phylogeny of papillomaviruses and repeated structure of the E6 and E7 gene products. *J Mol Biol* 1987; 193: 599–608.
21. Collins S, Mazloomzadeh S, Winter H, Blomfield P, Bailey A, Young LS, Woodman CB. High incidence of cervical human papillomavirus infection in women during their first sexual relationship. *BJOG* **109**, 96–98 (2002).
22. Conrad M, Bubb VJ, Schlegel R. The human papillomavirus type 6 and 16 E5 proteins are membrane-associated proteins which associate with the 16-kilodalton pore-forming protein. *J Virol* 1993; 67: 6170–6178.

23. Coutlee F, Gravitt P, Kornegay J, et al. Use of PGMY primers in L1 consensus PCR improves detection of human papillomavirus DNA in genital samples. *J Clin Microbiol.* 2002;40:902–907.
24. Cuschieri KS, Cubie HA, Whitley MW, Seagar AL, Arends MJ, Moore C, et al. Multiple high-risk HPV infections are common in cervical neoplasia and young women in a cervical screening population. *J Clin Pathol* 2004a;57(1):68–72.
25. Danos O, Katinka M, Yaniv M. Human papillomavirus 1a complete DNA sequence: A novel type of genome organization among papovaviridae. *EMBO J* 1982;1:231–6.
26. de Paula DF, Fernandes AP, do Carmo BB, Vieira DC, Dutra MS, dos Santos CGM, Souza MC, Andrade TCA, Vago AR, Fernandes PA. Molecular Detection of Chlamydia trachomatis and HPV Infections in Cervical Samples With Normal and Abnormal Cytopathological Findings. *Diagnostic Cytopathology*, Vol 35, No 4(2007)
27. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology* 2004;324:17–27
28. de Villiers E-M. Human papillomavirus infections in skin cancer. *Biomed Pharmacother* 1998;52:26–33.
29. Doorbar J, et al. Characterization of events during the late stages of HPV16 infection in vivo using high-affinity synthetic Fabs to E4. *Virology* 1997; 238: 40–52.
30. Doorbar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Science* (2006) **110**, 525–541
31. Dyson N, Howley PM, Munger K, Harlow E. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* 198
32. Edwards S, Carne C. Oral sex and the transmission of viral STIs. *Sex Transm Infect.* 1998;74:6-10
33. Evander, M., Frazer, I. H., Payne, E., Mei Qi, Y., Hengst, K. and McMillan, N. A. J. (1997) Identification of the $\alpha 6$ integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. *J. Virol.* **71**, 2449–2456
34. Favre M, Breitburd F, Croissant, et al. Structural polypeptides of rabbit, bovine and human papillomaviruses. *J. Virol* 1975;15:1239-1247.

35. Favre-Bonvin A, et al. Human papillomavirus type 18 E6 protein binds the cellular PDZ protein TIP-2/GIPC, which is involved in transforming growth factor beta signaling and triggers its degradation by the proteasome. *J Virol* 2005; 79: 4229–4237.
36. Finan RR, Hakime N, Tamim H, Sharide HE, Daccache JL, Almawi WY. Detection of human papillomavirus (HPV) genotypes in cervico-vaginal scrapes of women with normal and abnormal cytology. *Clin Microbiol Infect* 2001; 7: 688–692
37. Franceschi S, Castellsague X, Dal Maso L, Smith JS, Plummer M, Ngelangel C, et al. Prevalence and determinants of human papillomavirus genital infection in men. *Br J Cancer* 2002;86(5):705–11.
38. Franco EL, Franco ED, Ferenczy A. Cervical cancer: epidemiology, prevention and the role of human papillomavirus infection. *CMAJ* 2001;164(7):1017-25
39. Funk JO, et al. Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein. *Genes Dev* 1997; 11: 2090–2100.
40. Gargiulo F, De Francesco MA, Schreiber C, Ciravologo G, Salinaro F, Valloncini B, Manca N. Prevalence and distribution of single and multiple HPV infections in cytologically abnormal cervical samples from Italian women. *Virus Research* 125 (2007) 176–182
41. Gervaz P, Allal AS, Villiger P, Buhler L, Morel P. Squamous cell carcinoma of the anus: another sexually transmitted disease. *Swiss Med Wkly.* 2003;133:353-359.
42. Ghaffari SR, Sabokbar T, Mollahajian H, Dastan J, Ramezanzadeh F, Ensari F, Yarandi F, Mousavi-Jarrahi A, Mohaghegi MA, Moradi A. Prevalence of human papillomavirus genotypes in women with normal and abnormal cytology in Iran. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2006 Oct-Dec;7(4):529-32
43. Gravitt PE, Peyton CL, Alessi TQ, et al. Improved amplification of genital human papillomaviruses. *J Clin Microbiol.* 2000;38:357–361.
44. Greer CE, Wheeler CM et al. Human papillomavirus type distribution and serological response to HPV-6 virus like particle in patients with genital warts. *J Clin Microbiol* 1995;33:2058-2063
45. Hagensee ME, Olson NH, Baker TS, et al. Three-dimensional structure of vaccinia virus-produced human papillomavirus type 1 capsids. *J Virol.* 1994;68:4503-4505

46. Herrero R, Hildesheim A, Bratti C, Sherman ME, Hutchinson M, Morales J, et al. Population-based study of human papillomavirus infection and cervical neoplasia in rural Costa Rica. *J Natl Cancer Inst* 2000;92(6):464–74
47. Hippelainen M, Syrjanen S, Koskela H, Pulkkinen J, Saarikoski S, Syrjanen K. Prevalence and risk factors of genital human papillomavirus (HPV) infections in healthy males: a study on Finnish conscripts. *Sex Transm Dis* 1993;20(6):321–8.
48. Ho GY, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ, Burk RD. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med* 1998;338(7):423–8.
49. Ho L, Terry G, Londesborough P, Cuzick J, Lorenzato F, Singer A. Human Papillomavirus DNA Detection in the Management of Women With Twice Mildly Abnormal Cytological Smears. *Journal of Medical Virology* 69:118–121 (2003)
50. Howley PM, Lowy DR. Papillomaviruses. In: Fields virology fifth edition volume 2 chapter 62. Lippincott Williams & Wilkins, A Wolters Kluwer Business 2007
51. Hubbard R. Human Papillomavirus Testing Methods. *Arch Pathol Lab Med*—Vol 127, August 2003
52. Huibregtse JM, Scheffner M, Howley PM. A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18. *EMBO J* 1991; 10: 4129–4135.
53. Hwang HS, Park M, Lee SY, Kwon KH, Pang MG. Distribution and Prevalence of Human Papillomavirus Genotypes in Routine Pap Smear of 2,470 Korean Women Determined by DNA Chip. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004;13(12).
54. Hwang SG, et al. Human papillomavirus type 16 E7 binds to E2F1 and activates E2F1-driven transcription in a retinoblastoma protein-independent manner. *J Biol Chem* 2002; 277: 2923–2930.
55. Jacobson DL, Womack SD, Peralta L et al. Concordance of human papillomavirus in the cervix and urine among inner city adolescents. *Pediatr Infect Dis J* 2000;19:722–8.
56. Jones DL, Thompson DA, Munger K. Destabilization of the RB tumor suppressor protein and stabilization of p53 contribute to HPV type 16 E7- induced apoptosis. *Virology* 1997; 239: 97–107.
57. Karlsen F, Kalantari M, Jenkins A, et al. Use of multiple PCR primer sets for optimal detection of human papillomavirus. *J Clin Microbiol.* 1996;34:2095– 2100.

58. Kim SK. Polarized signaling: basolateral receptor localization in epithelial cells by PDZ-containing proteins. *Curr Opin Cell Biol* 1997; 9: 853–859.
59. Kulasingam SL, Hughes JP, Kiviat NB, Mao C, Weiss NS, Kuypers JM, et al. Evaluation of human papillomavirus testing in primary screening for cervical abnormalities: comparison of sensitivity, specificity, and frequency of referral. *JAMA* 2002;288(14):1749–57.
60. Lee GY, Kim SM, Rim SY, Choi HS, Park CS, Nam JH. Human papillomavirus (HPV) genotyping by HPV DNA chip in cervical cancer and precancerous lesions. *Int J Gynecol Cancer* 2005, 15, 81-87
61. Lee HS, Kim KM, Kim SM, Choi YD, Nam JH, Park CS, Choi HS. Human papillomavirus genotyping using HPV DNA chip analysis in Korean woman. *Int J Gynecol Cancer*. 2007 Mar-Apr;17(2):497-501
62. Lee SH, Vigliotti VS, Vigliotti JS, Pappu S. Routine human papillomavirus genotyping by DNA sequencing in community hospital laboratories. *Infectious Agents and Cancer* 2007, 2:11
63. Lombard I, Vincent A, Validire P, Zafrani B, Clough K, Favre M, Pouillart P. Human papillomavirus a major determinant of the course of cervical cancer. *J Clin Oncol*. 1998 Aug;16(8):2613-9
64. Longworth MS, Wilson R, Laimins LA. HPV31 E7 facilitates replication by activating E2F2 transcription through its interaction with HDACs. *EMBO J* 2005; 24: 1821–1830.
65. Manhart LE, Koutsky LA. Do condoms prevent genital HPV infection, external genital warts, or cervical neoplasia? A meta-analysis. *Sex Transm Dis*. 2002;29: 725-735.
66. McMillan, N. A., Payne, E., Frazer, I. H. and Evander, M. (1999) Expression of the $\alpha 6$ integrin confers papillomavirus binding upon receptor-negative B-cells. *Virology* 261, 271–279
67. Modis, Y., Trus, B. L. and Harrison, S. C. (2002) Atomic model of the papillomavirus capsid. *EMBO J*. 21, 4754–4762
68. Molijn A, Kleter B, Quint W, Jan van Doorn L, Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections *Journal of Clinical Virology* 32S (2005) S43–S51
69. Monsonego J, et al. Cervical cancer control, priorities and new directions. *Int J Cancer* 2004; 108: 329–333.

70. Munoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, et al. Epidemiological classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003;348:518–27.
71. Nees M, Geoghegan JM, Hyman T, Frank S, Miller L, Woodworth CD. Papillomavirus type 16 oncogenes downregulate expression of interferon-responsive genes and upregulate proliferation-associated and NF-kappaB responsive genes in cervical keratinocytes. *J Virol* 2001; 75:4283–96.
72. Nguyen DX, Westbrook TF, McCance DJ. Human papillomavirus type 16 E7 maintains elevated levels of the cdc25A tyrosine phosphatase during deregulation of cell cycle arrest. *J Virol* 2002; 76: 619–632.
73. O'Brien PM, Saveria Campo M. Evasion of host immunity directed by papillomavirus-encoded proteins. *Virus Res* 2002;88:103–17.
74. Oren M. Decision making by p53: life, death and cancer. *Cell Death Differ* 2003; 10: 431–442.
75. Ozbun MA, Meyers C. Human papillomavirus type 31b E1 and E2 transcript expression correlates with vegetative viral genome amplification. *Virology* 1998; 248: 218–230
76. Ozelik B, Serin IS, Gökahmetoğlu S, Başbuğ M, Erez R. Human papillomavirus frequency of women at low risk of developing cervical cancer : a preliminary study from a Turkish university hospital. *Eur J Gynaecol Oncol.* 2003;24(2):157-9
77. Ozturk S, Kaleli I, Kaleli B, Bir F. Investigation of human papillomavirus DNA in cervical specimens by hybrid capture assay. *Mikrobiyol Bul.* 2004;38(3):223-32
78. Park JS, Kim EJ, Kwon HJ, Hwang ES, Namkoong SE, Um SJ. Inactivation of interferon regulatory factor-1 tumor suppressor protein by HPV E7 oncoprotein. Implication for the E7-mediated immune evasion mechanism in cervical carcinogenesis. *J Biol Chem* 2000; 275:6764–9.
79. Parkin, D. M. & Bray, F. Chapter 2: the burden of HPV related cancers. *Vaccine* **24** (Suppl. 3), S11–S25 (2006).
80. Patterson, N. A., Smith, J. L. and Ozbun, M. A. (2005) Human papillomavirus type 31b infection of human keratinocytes does not require heparan sulfate. *J. Virol.* **79**, 6838–6847

81. Ramoz N, Rueda LA, Bouadjar B, Montoya LS, Orth G, Favre M. Mutations in two adjacent novel genes are associated with epidermodysplasia verruciformis. *Nat Genet* 2002;32:579–81.
82. Rassa M, Bertolini G, Mengoli C, Peron A, Benedetti P, Palu G. HPV genotype prevalence in cervical specimens with abnormal cytology: A report from north-east Italy *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 2005; 37: 476- 481
83. Reesink-Peters N, Burger MP, Kleter B, Quint WG, Bossuyt PM, Adriaanse AH. Using a new HPV detection system in epidemiological research: change of views on cervical dyskaryosis? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2001;98:199– 204.
84. Roden, R. & Wu, T. C. How will HPV vaccines affect cervical cancer? *Nature Rev. Cancer* 6, 753–763 (2006).
85. Ruesch MN, Laimins LA. Human papillomavirus oncoproteins alter differentiation-dependent cell cycle exit on suspension in semisolid medium. *Virology* 1998; 250: 19–29.
86. Schiffman MH, Bauer HM, Lorincz AT, et al. Comparison of Southern blot hybridization and polymerase chain reaction methods for the detection of human papillomavirus DNA. *J Clin Microbiol.* 1991;29:573–577.
87. Sedman T, Sedman J, Stenlund A. Binding of the E1 and E2 proteins to the origin of replication of bovine papillomavirus. *J Virol* 1997; 71: 2887–2896.
88. Smyth LJ, Van Poelgeest MI, Davidson EJ et al: Immunological responses in women with human papillomavirus type 16 (HPV-16) associated anogenital intraepithelial neoplasia induced by heterologous primeboost HPV-16 oncogene vaccination, *Clin Cancer Res* 2004;10(9):2954-61.
89. Sonnex C, Strauss S, Gray JJ. Detection of human papillomavirus DNA on the fingers of patients with genital warts. *Sex Transm Infect.* 1999;75:317-319.
90. Sowjanya AP, Jain M, Poli UR, Devi RR, Gravitt PE. Prevalence and distribution of high-risk human papilloma virus (HPV) types in invasive squamous cell carcinoma of the cervix and in normal women in Andhra Pradesh, India. *BMC Infectious Diseases* 2005, 5:116
91. Stanley MA. Immunobiology of papillomavirus infections. *J Reprod Immunol* 2001;52:45–59.

92. Stephen AL, Thompson CH, Tattersall MH, Cossart YE, Rose BR. Analysis of mutations in the URR and E6/E7 oncogenes of HPV 16 cervical cancer isolates from central China. *Int J Cancer*. 2000;86:695–701.
93. Sun CA, Lai HC, Chang CC, Neih S, Yu CP, Chu TY. The significance of human papillomavirus viral load in prediction of histologic severity and size of squamous intraepithelial lesions of uterine cervix. *Gynecol Oncol*. 2001;83:95– 99
94. Sun CA, Hsiung CA, Lai CH, Chen CA, Chou CY, Ho CM, Twu NF, Feng-WL, Chuang MH, Hsiyeh CY, Chu TY. Epidemiologic Correlates of Cervical Human Papillomavirus Prevalence in Women With Abnormal Pap Smear Tests: a Taiwan Cooperative Oncology Group (TCOG) Study. *Journal of Medical Virology* 77:273–281 (2005)
95. Thomas MC, Chiang CM. E6 oncoprotein represses p53-dependent gene activation via inhibition of protein acetylation independently of inducing p53 degradation. *Mol Cell* 2005; 17: 251–264.
96. Tjalma WA, Arbyn M, Paavonen J, Waes TR, Bogers JJ : Prophylactic human papillomavirus vaccines: the beginning of the end of cervical cancer, *Int J Gynecol Cancer* 2004;14(5):751-61.
97. Veldman T, et al. Transcriptional activation of the telomerase hTERT gene by human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein. *J Virol* 2001; 75: 4467–4472.
98. Vernon SD, Unger ER, Williams D. Comparison of human papillomavirus detection and typing by cycle sequencing, line blotting, and hybrid capture. *J Clin Microbiol*. 2000;38:651–655.
99. Wang Q, et al. Functional analysis of the human papillomavirus type 16 E1-E4 protein provides a mechanism for in vivo and in vitro keratin filament reorganization. *J Virol* 2004; 78: 821–833.
100. Wang TS, Chou HF, Liu WM, Choo KB. Semiautomated typing of human papillomaviruses by restriction fragment length polymorphism analysis of fluorescence- labeled PCR fragments. *J Med Virol*. 1999;59:536–540.
101. Wang, S. S., Sherman, M. E., Hildesheim, A., Lacey, J. V. Jr & Devesa, S. Cervical adenocarcinoma and squamous cell carcinoma incidence trends among white women and black women in the United States for 1976–2000. *Cancer* **100**, 1035–1044 (2004).

102. Weaver BA, Feng Q, Holmes KK, Kiviat N, Lee SK, Meyer C, et al. Evaluation of genital sites and sampling techniques for detection of human papillomavirus DNA in men. *J Infect Dis* 2004;189(4):677–85.
103. Weinstock H, Berman S, Cates W Jr. Sexually transmitted diseases among American youth: incidence and prevalence estimates, 2000. *Perspect Sex Reprod Health* 2004;36:6–10.
104. Welters MJ, de Jong A, van den Eeden SJ et al: Frequent display of human papillomavirus type-16 E6-specific memory T-helper cells in the healthy population as witness of previous viral encounter, *Cancer Res* 2003;63(3):636-41.
105. White WI, Wilson SD, Bonnez W, Rose RC, Koenig S, Suzich JA: In vitro infection and type-restricted antibody-mediated neutralization of authentic human papillomavirus type 16, *J Virol* 1998;72(2):959-64.
106. Woodman CB, Collins S, Winter H, Bailey A, Ellis J, Prior P, et al. Natural history of cervical human papillomavirus infection in young women: a longitudinal cohort study. *Lancet* 2001;357(9271):1831–6.
107. Woodworth CD. HPV innate immunity. *Front Biosci* 2002;7:d2058–71.
108. Yarkın F. 32. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Kongre kitabı s.234-236
109. Zimmermann H, et al. The human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein can down-regulate p53 activity by targeting the transcriptional coactivator CBP/p300. *J Virol* 1999; 73: 6209–6219.
110. Zur Hausen H. Human papillomaviruses. *Annu Rev Biochem* 1994; 48: 427–447.
111. Zur Hausen H., Copyright _ 2006 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim *Infections Causing Human Cancer*.
112. Zur Hausen, H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nature Rev. Cancer* 2, 342–350 (2002).

ETİK KURUL KARARI



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
DEKANLIĞI
Yerel Etik Kurulu



Sayı : 1813

Tarih : 11/09/2006

Konu : Prof.Dr.Ali Ağaçfıdan hk.

Sayın Prof.Dr.Ali Ağaçfıdan
Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji
Anabilim Dalı Öğretim Üyesi

İlgi : 19.06.2006 tarih ve 436 sayılı yazınıza cevaben.

Sorumlu araştırmacılığını üstlendiğiniz Yüksek Lisans Öğrencisi Osman Köksal'ın yürüteceği 2006/1521 protokol numaralı "Jinekoloji kliniğine başvuran hastalarda HPV Enfeksiyonlarının sıklığının araştırılması" başlıklı tez çalışması kurumumuzun 20.09.2006 tarihli,09 sayılı toplantısında onaylandığına ilişkin tutanağımız ekte sunulmuştur.
Bilgilerinize saygılarımla rica ederim.

Prof.Dr. Zafer ARI
İstanbul Tıp Fakültesi
Etik Kurul Başkanı

Eki: Tutanak



**İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
YEREL ETİK KURUL TUTANAĞI**

Toplantı Tarihi : 20/09/2006

Toplantı Yeri : Behçet Kütüphanesi Pembe Salon

Toplantı Sayısı : 9

Sorumlu araştırmacılığını Fakültemiz Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof.Dr. Ali Ağaçfıdan'ın, üstlendiği ve Yüksek Lisans Öğr. Osman Köksal'ın yürüteceği 2006/1521 protokol numaralı "Jinekoloji kliniğine başvuran hastalarda HPV enfeksiyonlarının sıklığının araştırılması" başlıklı tez çalışması kurulumuzda incelendi etik yönden bir sakınca taşımadığı görüldü, uygulamaya konulabileceğine karar verildi.

Prof.Dr. Zafer ARI

Etik Kurul Başkanı (Dekan Yardımcısı)

Prof.Dr. A.Yağız ÜRESİN

Farmakoloji ve Kli.F. A.D

Prof.Dr. Ahmet GÜL

İç Hast. A.D, Romatoloji Bilim Dalı

Prof.Dr. Berrin UMMAN

Kardiyoloji A.D.

Prof.Dr. Cahide GÖKKUŞU

Biokimya A.D

Prof.Dr. Kamil PEMBEÇİ

Anesteziyoloji A.D.

Prof.Dr. Nuran YILDIRIM

Tıp tarihi ve Deontoloji A.D.

Prof.Dr. Oğuzhan COBAN

Nöroloji A.D.

Prof.Dr. Pınar SAİP

I.Ü. Onkoloji Enstitüsü

Prof.Dr. Sevinç EMRE

Çocuk Sağ. Ve Hast. A.D

Prof.Dr. Ümit TÜRKOĞLU

Biokimya A.D

Prof.Dr. Veli UYSAL

Patoloji A.D.

Prof.Dr. Yeşim ERBİL

Genel Cerrahi A.D.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	M.Osman	Soyadı	KÖKSAL
Doğ.Yeri	ÜSKÜDAR	Doğ.Tar.	15.04.1982
Uyruğu	T.C.	TC Kim No	
Email	muammerosmankoksal@gmail.com	Tel	0542 497 20 57

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.		
Lisans	İstanbul Üniversitesi Biyoloji Bölümü	2003
Lise	Trabzon Lisesi	1998

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.			-
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	İyi	İyi	İyi		

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı			
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Word	İyi
Excel	İyi
PowerPoint	İyi

Yayımları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Özel İlgi Alanları (Hobileri): Basketbol,Futbol,Yüzme,Kitap okumak