

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

**BÖLGEMİZDE SERVİKAL KANSER VE PREKANSERÖZ
LEZYONLARI OLAN KADINLARDA ONKOJENİK
HUMAN PAPİLLOMAVİRUS GENOTİPLERİNİN
PREVALANSININ BELİRLENMESİ**

Deniz YILDIRIM

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Fügen YARKIN

ADANA-2010

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Servikal kanser tüm dünyadaki kadın kanserlerinin meme kanserinden sonra 2. sıklıkta görülenidir. Gelişmekte olan ülkelerde 2. sıklıkta görülürken, gelişmiş ülkelerdeki servikal kanser tarama programlarının başarılı uygulamaları nedeni ile 6.sıraya hatta bazı ülkelerde 10. sıraya inmiştir. Dünyada her yıl yaklaşık 500.000 yeni servikal kanser vakası saptanırken, bunların yaklaşık yarısı bu hastalıktan kaybedilmekte ve ölümlerin %80'i gelişmekte olan ülkelerde olmaktadır. Servikal kanser tarama programlarının bu kanserin görülme sıklığını ve bu kanserden ölüm oranlarını azaltmak için son derece önemlidir. Türkiye'de ise Sağlık Bakanlığı verilerine göre, 1996'da 623 tane servikal kanser vakası saptanmış olup, tüm kadınların kanserleri arasında 7. sıradayken 2002 yılında bu sayı 708'e çıkmış, ancak tüm kadın kanserleri arasında 10.sıraya gerilemiştir. Servikal kanser vaka sayısı 2003 yılı verilerinde 763'e çıkarken, tüm kadın kanserleri arasında 9. sıraya yükselmiştir. International Agency for Research on Cancer'in 2002 yılında yaptığı GLOBACAN çalışmasına göre ise Türkiye'deki serviks kanser insidansı yüzbinde 4.5'dur. Aynı yıl içinde 1364 yeni serviks kanseri vakası ve serviks kanserine bağlı 726 ölüm meydana gelmiştir ^{1,2}.

Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı Kanserle Savaş Daire Başkanlığı'nın 2003 yılında Türkiye'yi temsil edeceği düşünülen 8 il çalışması yayınlanmıştır. Bu çalışmada seçilen iller; Ankara, Antalya, Edirne, Erzurum, Eskişehir, İzmir, Samsun ve Trabzon olup illerin nüfusu Türkiye nüfusunun %19.71'ini oluştururken Türkiye'de görülen kanserlerin %36.82'si bu illerde meydana gelmektedir. Bu nedenle 8 il çalışması Türkiye'deki rakamları temsil etme özelliğine sahiptir. Bu çalışmanın sonucuna göre ise serviks kanseri tüm kadın kanserleri içerisinde 10. sırada olup insidansı yüz binde 4,76'dır. Bu rakamlar göstermektedir ki Türkiye'de serviks kanserinin görülme sıklığı gelişmiş ve ulusal tarama programlarına sahip olup, bu programları çok iyi yürüten birçok dünya ülkesinin altındadır ^{3,4}.

Servikal kanserde sitolojik tarama testi olan Papanicolau (Pap) testi sayesinde erken tanı yapılabilen ve prognoz anlamlı ölçüde iyileşmektedir. Servikal kanserli hastaların ortalama tanı alma yaşı 52'dir. Bu hastalıkta iki tane pik vardır. Birincisi 35-59, ikincisi ise 60-64 yaş civarındadır. Daha önce hiç Pap testi yaptırmamış bir kadında yaşam boyu serviks kanserine yakalanma riski 1/100'dür. İstatistiklerin çok güçlü tutulduğu ABD (Amerika Birleşik Devletleri)'de yaklaşık olarak yılda 16.000 yeni invaziv servikal kanser olgusu tanı almaktadır ve bu hastalıktan 5.000 ölüm beklenmekteyken, 2006 yılında tarama

programlarının başarısı nedeniyle beklenen yeni vaka sayısı 9.710, beklenen hastalıktan ölüm ise 3.700'e düşmüştür.

Servikal kanser için en büyük risk, hiç Pap testi yaptırmamaktır. ABD gibi gelişmiş ülkelerde kadınların %85'i yaşamları boyunca en az bir kez Pap testi yaptırmışken az gelişmiş ülkelerde bu oran sadece %5'dir⁵. Servikal kanseri ortadan kaldırmada sitoloji ve kolposkopi ve son yıllarda önemi çok artan HPV DNA testi değerli araçlardır.

Günümüzde servikal kanser etyolojisinde serviksin HPV enfeksiyonu büyük önem taşımaktadır. Cinsel yolla bulaşan bu onkojenik virusun sıklıkla servikal transformasyon zonunda metaplastik epitelin kalıcı enfeksiyonuna yol açtığı kanıtı ile desteklenmektedir.

Servikal skuamöz hücreli kanserlerin %99'unda, adenokarsinomlarında %90'ında HPV DNA pozitif bulunmuştur. Preinvaziv lezyonlarda yüksek riskli onkojenik HPV tiplerinden HPV16 daha çok skuamöz hücreli karsinomlardan, HPV18 ise daha çok adenokarsinomlardan sorumludur.

Servikal kanser kadın genital sisteminde üçüncü en yaygın görülen malignensidir, bunun yanı sıra dünya genelinde kadınlarda görülen ikinci en yaygın kanserdir¹. HPV enfeksiyon oranları 25 yaşından genç olan kadınlarda %28-46 aralığında açıklanmıştır. Vakaların birçoğunda herhangi bir servikal mukozaya ait lezyon göstergesi olan belirgin bir klinik bulgu olmayıp çoğunda taşıyıcı özellik belirgindir⁸. HPV enfeksiyonuna ait olan yüksek insidansa nazaran servikal kanserin düşük prevalansa sahip olmasının nedeni olarak servikal mukozanın malign transformasyonu için diğer faktörlerin de gerekli olduğu gösterilmektedir. Servikal kanser için risk faktörleri: HPV enfeksiyonu, erken yaşta ilk cinsel ilişkide bulunmak, birden fazla cinsel partner varlığı, sigara içimi (servikal mukus içerisinde sigara ile ilişkili kimyasal maddelere rastlanmıştır. Bu maddelerin servikal hücrelerde DNA hasarına neden olarak serviks kanseri gelişiminde etkili olabilecekleri düşünülmektedir), immün süpresyon, HIV enfeksiyonu, immün süpresif ilaç kullanımı, HSV ve klamidya enfeksiyonları gibi cinsel yolla bulaşan hastalıklar, diet, yüksek parite, düşük sosyoekonomik düzey, oral kontraseptif kullanımı ve genetik predispozisyon gibi konak faktörleri olarak sıralanmaktadır.

Servikal kanser taramasında HPV DNA testleri vakaların belirlenmesinde yardımcı test olarak yaygın bir biçimde kullanılır ve 30 yaşından büyük kadınlarda servikal sitoloji testi bazında kullanımı makul olan testtir. Buna karşın, HPV DNA testi düşük dereceli sitolojik lezyonlar taşıyan kadınlar ve genç kadınlarda servikal kanser taraması açısından düşük klinik verime sahiptir.

Servikal kansere karşı sekonder korunma sitolojik tarama ve HPV DNA testi ile tespit edilen servikal prekanseröz lezyonların tedavisine dayanır. Son yıllarda servikal kanserden korunmak için HR HPV16 ve 18'i hedefleyen HPV16 ve 18 VLP (Virus Benzeri Partiküller)'den oluşan multivalan profilaktik HPV aşıları geliştirilmiştir. Bu aşıların koruyuculuğunun %70 olması beklenir. Ancak, HPV16 ve 18 prevalansı coğrafik ve demografik faktörlere göre değiştiğinden HPV aşısının etkinliğini belirlemek için popülasyonda yüksek risk HPV genotiplerinin prevalansı ve dağılımının belirlenmesi gerekmektedir.

Bu çalışmanın amacı Çukurova bölgesinde servikal kanser ve prekanseröz lezyonları olan kadınlarda onkojenik HPV genotiplerinin prevalansının belirlenmesidir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe

Genital siğillerin 19. yüzyıla kadar viral kökenli olduğuna dair bir görüş yoktu, siğillerin enfeksiyon kökenli olduğu antik Yunanlılar ve Romalılar tarafından bilinmekte idi, gonore ve sifiliz gibi genital siğiller cinsel yolla geçiş gösteren hastalıklar ile birlikte aynı gruba dahil edilmekteydi^{5,6}.

Bazı önemli gelişmeler ise 1950 ve 1960'larda viral replikasyonun, virus ile enfekte epitelyal hücrelerin farklılaşması süreci ile bağlantılı olduğu keşif edildi ki ayrıca bu süreçte papillomavirus virionların bazı fizikokimyasal analizleri de gerçekleştirildi^{7,8}. Moleküler klonlama yöntemlerinin 1970'li yıllarda geliştirilmesi papillomavirus araştırmalarında Rönesans devrinin yaşanmasına neden oldu ve bilim adamları bu teknik gelişim sayesinde papillomavirus genomunu klonlamayı başardılar. Bu bilimsel gelişmenin ardından papillomavirusun biyokimyasal ve biyolojik çalışmaları oldukça hız kazandı. Genom sekanslama sürecinin tamamlanması beraberinde genomda ORF (Open Reading Frame) bölgelerinin tanımlanmasını sağladı, bunun yanı sıra araştırmacılar viral genlerin fonksiyonları hakkında da bilgi sahibi oldu. Bu gelişmeler papillomavirus araştırmalarına ilgi yoğunlaşmasını da beraberinde getirdi^{9,10}. Bovine papillomavirus tip-1'in (BPV-1) sıçan hücrelerinde transformasyonu indüklediğinin belirlenmesi ile birlikte bu tip viruslar birçok araştırma da standart olarak kullanmaya başlamıştır^{11,12}. HPV genomunun moleküler klonlaması ile birlikte HPV genotiplerinin varlığı anlaşılmış olup bununla birlikte bazı yapısal olmayan viral proteinlerin BPV-1' de bulunan homologlarından farklı olduğu da belirlenmiştir. Böylece HPV tiplerinde klinik ve moleküler çalışmalar oldukça farklılaşmış olup hayvanlarda etkin olan papillomavirus çalışmaları ise devam etmiştir. HPV tiplerinin varlığının kabulü ile servikal kanser arasında oldukça sıkı ilişkinin bulunduğu tespit edilmiş olup bu durum HPV'nin tıp alanındaki önemini oldukça artırmıştır ve sonuç itibarı ile HPV'nin viral tümorogenez de yeni model olarak kabul edilmesi söz konusu olmuştur^{13,14}.

İnsanlarda HPV enfeksiyonuna bağlı çeşitli siğillerin (wart) tanımlanması ilk olarak İtalya'da Ciuffo tarafından 1907'de kanıtlanmıştır. Papillomatöz lezyon ve kanser arasındaki ilk bağlantı nadir kalıtsal hastalık olarak, epidermodisplazi verruciformis (EV) olarak ilk kez 1922'de rapor edilmiştir, oysa ki bu lezyonlara papillomavirusun neden olduğunun kanıtlanması bundan çok sonraki zamanlara denk gelmektedir.

Servikal kanserin insan Herpes Simplex Virus tip 2 ile bağlantılı olduğu 1968'den beri şüpheliydi. HSV-2 DNA'sının servikal kanser biyopsilerinde araştırılması sonucu negatif sonuç elde edilmesi, diğer etkenlerin araştırılmasını beraberinde getirmiştir ki epidemiyolojik olarak cinsel yolla bulaşan faktörlerin de bu adaylar arasında yer alması söz konusu olmuştur. Dolayısıyla, 1972'de bu malignensilerde Human Papillomavirusların varlığı deneysel olarak araştırılmıştır. Bazı raporlarda genital lezyonların nadiren malign tümörlere dönüştüğü bildirilmiş olup rastlanacak virusun ilk aday olduğu sanısı kesinlik kazanmaya doğru yol almıştır. Bu olgu birçok makalede hipotez olarak sunulmuştur. İki çalışma grubu 1970'de aynı anda HPV familyasından bahsetmiş olup bu aileye üye yaklaşık 100 tipin bulunduğunu iddia etmiştir. Genital lezyonlardan ve laringeal pappilloma örneklerinden 1980–1982 yılları arasında iki HPV DNA'sı karakterize edilmiştir. Her ne kadar bu karakterize edilen DNA'lara servikal kanser biyopsilerinde rastlanmasa da aynı problemleri kullanarak servikal kanser biyopsilerinde ve anogenital kanser lezyonlarının prekürsörlerinde hibridizasyon tekniğine dayalı olarak HPV16 ve 18'in belirlenmesine yönelinmiştir.

Sonrasında devam eden çalışmalarda birçok laboratuvar test edilen biyopsilerin %70'inde bu iki tipe ait DNA'ya rastladıklarını belirtmiş olup, diğer keşfedilen bazı tiplerin DNA'larının da biyopsi örneklerinde var olduğu belirlenmiştir, sonrasında ise dikkatlice analiz edilen servikal kanser biyopsilerinin tümünde HPV DNA'sının varlığı netlik kazanmıştır. Temel olarak HPV16, bununla birlikte HPV18 ve 31 veya 33 DNA'sı anogenital kanserlerde kesin enfeksiyon ajanı olarak netlik kazanmış olup bunun yanı sıra orofaringeal kanserlerin de %25-30' unda bu tiplere ait DNA bulunmuş ve enfeksiyon ajanı olarak değerlendirilmeleri netlik kazanmıştır.

2.2. Sınıflandırma

Polyomaviruslar temel olarak papillomaviruslar ile birlikte *Papoviridae* adı verilen bir ailede sınıflandırılırdı, çünkü bu viruslar 72 pentamerden oluşan ikozohedral kapsid formu, zarfsız virion, sirküler çift zincirli DNA genomu, virion oluşumu ve viral replikasyon bölgesi gibi birçok özelliği paylaşmaktadır. En büyük fark ise papillomavirusların genomu ve kapsidleri polyomaviruslarınkinden oldukça büyük olmasıdır. Diğer farklılıklar ise genomların sekanslanması ile belirlenmiştir ve sonuç itibarı ile; papillomavirus genomunun polyomavirus genomu gibi major homolog bölgeler içermediği ve papillomavirus transkripsiyonunun polyomaviruslardaki gibi tek yönlü olmadığı anlaşılmıştır. Dolayısı ile, Papillomaviruslar; virus sınıflandırması yapan uluslararası komite tarafından farklı bir aile

olarak kabul edilmiştir ve bu aileye *Papillomaviridae* adı verilmiştir¹⁵. Her bir papillomavirus enfekte ettiği türe özgü olarak değerlendirilmesi ile birlikte yüzden fazla tip tespit edilmiştir¹⁶. Bu gelişmelerden sonra ilgi özellikle servikal kanser ile sıkı ilişkisinden dolayı HPV tiplerinin genom sekanslamasında yoğunlaşmıştır ve 2004 yılı itibarı ile 96 HPV tipinin genom sekanslaması tamamlanmış olup, en az 100 farklı HPV tipinin sekanslama işlemleri devam etmektedir¹⁵.

Papillomavirusların filogenetik organizasyonu özellikle sekanslama işlemi sonrasında gerçekleştirilmiş olup sonrasında enfekte ettikleri türlere ve bağlantılı oldukları hastalıklara göre filogenetik sınıflandırma yapılmıştır¹⁶. Filogenetik düzenleme özellikle virus yapısında bulunan ve L1 proteinini kodlayan gen bölgesinin korunan ORF'sine (Open Reading Frame) göre şekillendirilmiş olup bilim adamları papillomaviruslar arasındaki filogenetik akrabalığı bu gen bölgesinin karşılaştırmalı sekans homolojisine göre dizayn etmişlerdir. Genomda benzer korunan bölgeler mevcuttur, çünkü papillomaviruslar değişen çevre koşullarına göre genetik rekombinasyon yerine nokta mutasyonlar ile cevap vermektedir¹⁷. Var olan sekansa dayalı filogenetik veriler papillomavirusların konak türlerine göre değişim sergilediklerini açıkça ortaya koymaktadır¹⁸. Her ne kadar genomda farklılık söz konusu olsa da papillomavirusların L1 DNA'sında kodları bilinen oran %40 civarındadır. Bazen sadece bir mutasyonluk farklar mevcuttur. Homolojide bu oranın bulunması şu şekilde bir sınıflandırmayı da beraberinde getirmektedir; cins, türler, alttipler ve varyantlar tanınmıştır. Şu an itibarı ile 13 genus mevcut olup bunlar eski Yunan alfabesi ile belirlenmiştir, bir genusda var olan tüm üyelerin L1 DNA'sı %60 oranında benzerlik sergilemektedir ve ayrıca bunlar diğer bir genusun genomu ile de %60 oranında benzerliğe sahiptir. Bir genus içerisinde %60-70 oranında benzerlik taşıyan papillomaviruslar türler olarak dizayn edilmiştir. Bir tür içerisindeki virus tipleri diğer türlerdeki virus tipleri ile % 70-90 arasında benzerlik göstermektedir. Bir tip içerisinde %90-98'lik benzerlik taşıyan alttipler ve %98 benzerlik taşıyan varyantlar olarak değerlendirilmektedir. HPV16 tıbbi açıdan önemi nedeni ile oldukça derin biçimde araştırılmaya tabi tutulmuştur¹⁹. HPV16'nın birçok varyantı tanımlanmış olup nerdeyse birkaç tane varyantı tespit edilmiştir¹⁸.

HPV'nin 12 genusunun 5'i alfa, beta, gamma, mu ve nu HPV (Human papillomavirus) olarak nitelendirilmekte olup, diğer kalan 7'si ise hayvan papillomavirusları olarak nitelendirilmektedir. Konak enfeksiyonu gerçekleştiren papillomavirus cinsleri evrimsel açıdan birbirlerine oldukça yakın olan türlerdir. Bu yüzden primatlarda enfeksiyona neden olan papillomaviruslar ile insanlarda enfeksiyona neden olan papillomaviruslar aynı genus içerisinde dirler ve ayrıca; birçok HPV aynı cinsteki HPV'lerden daha çok primat

enfeksiyonu yapan papillomaviruslar ile daha yakın akrabadır. HPV'ler genital ve mukozal kanserler ile yakından ilişkili olan etiyolojik ajanlardır, bu HPV'ler tıbbi açıdan oldukça önemlidirler ve özellikle alfa cinsinde sınıflandırılmaktadırlar. Bu tip papillomaviruslar genital mukoza tipleri olarak değerlendirilmektedir. Servikal kanser ise belirli HPV tipleri ile ilişkili olup bu tipler yüksek riskli tipler olarak adlandırılmaktadır ve 16, 18, 31,45 ve 52 no'lu tipler bu risk grubuna dahil edilmektedir. HPV tip 16 servikal kanser ile ilişkili olan en önemli tiplerden bir tanesidir, 9 no'lu türe bağlıdır, HPV tip 18 diğer servikal kanser ile yakından ilişkili olan tiptir ve 7 no'lu türe bağlıdır ve HPV 6 kutanöz genital siğillere sebep olan tip olarak bilinmekte olup 10 nolu türe bağlıdır. Alfa cinsinin üyeleri, HPV 2, 27 ve 57 özellikle genital olmayan deri enfeksiyonlarını meydana getirmektedirler.

Beta, gamma, nu ve mu genusunda bulunan viruslar da genital olmayan deri enfeksiyonlarına neden olabilmektedirler. Beta genusu HPV Epidermodysplasia verruciformis (EV)' i meydana getiren spesifik HPV tiplerini kapsamakta olup bu HPV tiplerini taşıyan EV'li hastaların duyarlılığının artması ve bu tip vakalarda genital olmayan lezyonların meydana gelmesi mümkün olabilmektedir. Özellikle beta ve gamma türleri dahilinde olan bazı papillomaviruslar komensal ajanlar olarak nitelendirilmekte veya bu ajanların bir diğer virusla birlikte veya karşılıklı lezyonları meydana getirdikleri bilinmektedir ki bu viruslar birçok kez sağlıklı deri veya saçdan izole edilmişlerdir^{16,20}.

Delta cinsinde bulunan papillomaviruslar BPV-1'de dahil olmak üzere fibropapilloma'ya neden olabilmektedir. Bu papillomaviruslar epitelyumda prodüktif enfeksiyonu tetiklemekte olup fibroblastlarda ise prodüktif olmayan transformasyona neden olmaktadır ve dolayısı ile dermal fibroblastlarda aşırı proliferasyon meydana gelmektedir.

2.3. Virusun yaşam siklusu ve yapısı

HPV zarfsız, çift zincirli, kapalı sirküler yapıda DNA genomu içerir, genomun büyüklüğü yaklaşık olarak 8 kilobazdır. Genom 3 bölgeden meydana gelir; üst regülatör bölge ki (URR: Upstream regulatory Region veya LCR: Long Control Region) viral genomun transkripsiyonu ve replikasyonundan sorumlu olan bölgedir; 2. bölge “early” (erken) bölge olarak tanımlanmaktadır, bazı istisnalar dışında bu bölge 6 ORF'ye sahiptir (E1, E2, E4, E5, E6 ve E7) ve “late” (geç) bölge olarak tabir edilen genom bölgesi ise major ve minör kapsid yapısal proteinleri olan L1 ve L2'yi kodlayan bölgedir. L1 virionların veya virus-benzeri partiküllerin kurulumundan sorumlu olan proteindir ve nötralize edici antikörlerin kabul ettiği konformasyonel epitop oluşumundan da aynı zamanda sorumludur. E6 ve E7 proteinleri

HPV'ye ait olan dominant onkoproteinlerdir. HPV E2 önemli erken proteinlerden bir tanesidir ve transkripsiyonel olarak E6, E7'nin baskılanmasından sorumludur, viral integrasyon süresince E2'nin kaybedilmesi E6/E7'nin transkripsiyonunda düzensizliğe yol açtığı için onkogeneze neden olmaktadır.

HPV enfeksiyonu epitelyal hücrelerle sınırlıdır ve virusun yaşam siklusu epitelyal farklılaşma gerektirmektedir, bazal/parabazal tabaka içeren serviksde skuamöz epitelyum; bazal membrana yakın olan bölge üst tabaka hücrelerini doldurmakla yükümlüdür; orta bölge ise olgun ve farklılaşmış epitelyal hücrelerden meydana gelmiştir. HPV bazal hücreleri enfekte eder ve bu enfekte epitel hücrelerin skuamöz formdan glandular forma yönelmeleri söz konusudur. Serviksde skuamoglandular bileşke HPV enfeksiyonunun en çok görüldüğü bölgedir. Bu bölgede glandular epitelyum skuamöz metaplaziye dönüşür ve sonuç itibari ile transformasyon bölgesi meydana gelir. Bazal hücrelerde, viral DNA genellikle düşük kopya sayısı ile sirküler (epizomal) formda bulunur. Viral replikasyon hücresel mekanizmaya bağlıdır ve transkripsiyon farklılaşmış hücrelerde eksprese edilen transkripsiyon faktörlerine bağlıdır, çünkü farklılaşmış hücreler normal hücre siklusunun dışına çıkarlar, aktif DNA replikasyonu bu farklılaşmış hücrelerde E6 / E7 ekspresyonu ile sağlanır ve bu süreç farklılaşmış hücrelerde tümör baskılayıcı protein olan P53 (P53) ve retinoblastoma (Rb1) proteinlerin inaktivasyonu ile ilişkilidir. Viral DNA epidermisin orta bölgesinde yüksek kopya sayısına ulaşır ve hücre yüzeyinde kapsidasyon süreci yine bu bölgede başlar. Yeni viral partiküllerin montajı üst tabaka hücrelerden başlar ve yaşayan hücrelerin lizisi ve yıkılımı olmaz. Serviks mukozasında, prodüktif HPV enfeksiyonu; servikal intraepitelyal neoplazi derece 1 (CIN1) şeklinde başlar ve koilosiozis ile karakterizedir. Prodüktif HPV enfeksiyonunun hücresel aracılı immünite ile baskılanması söz konusudur ki bu noktada CIN1'in normal görünümlü epitelyum olarak seyretmesi mümkündür.

2.3.1. HPV genel özellikleri

HPV kanser mortalite ve morbiditesi açısından önemli risk unsurlarından bir tanesidir. HPV sınıflandırılması elbetteki gereklidir, fakat kanser sebebi olması açısından yeterli değildir ki HPV ve birçok epitelyal kanser arasındaki ilişki henüz bilinmemektedir. HPV buna rağmen oral kavite, orofaringeal, penil, anal, vulvar ve vajinal kanserlerin gelişiminde rol oynamaktadır. Kanser riski ve HPV'nin moleküler mekanizması arasındaki bağlantı birçok servikal doku ve hücre hatları üzerinde çalışılmıştır ve bu çalışmalar bugün için bizim sahip olduğumuz temel bilginin kaynağıdır. Temel paradoks ise onkogenik HPV tiplerinin neden

olduğu enfeksiyonlar oldukça yaygındır ve bu enfeksiyonların çoğu ise klinik olarak dikkat çekici değildir. Yaygın görülen HPV enfeksiyonlarının malignensi ile sonuçlanması oldukça nadirdir ve net olarak konağın ve virusun kompleks interaksiyonunu gerektirmektedir. HPV biyolojisi ve onkogenez arasındaki bağlantıyı incelemek ve moleküler patogenezi ile HPV-kanser olgusunun moleküler ve epigenetik bazda incelenmesi kesinlikle gerekmektedir. Bu bilginin anlaşılmasının halk sağlığı açısından önemi ise epidemiyolojik bilgi sunması bakımından kanser olgusunda HPV rolünün anlaşılması ile ilintilidir. HPV virusu çift zincirli sirküler genoma sahiptir ve erken (E1-E7) , geç (L1-L2) ORF bölgelerine ayrılmıştır. Geç ORF bölgesi olan L1 ve L2 iki adet viral kapsid proteinlerini kodlayan bölgedir, erken ORF bölgesi ise DNA replikasyonunda ve hücre proliferasyonunda rol alan proteinleri kodlayan bölgedir. L1 ORF bölgesinin nükleotit sekans farklılığına dayalı olarak 100'den fazla HPV tipi karakterize edilmiş olup bunlardan 40'dan fazlasının servikal mukozayı enfekte ettiği bilinmektedir. Epidemiyolojik çalışmalar servikal kanser açısından bu virusları düşük riskli tipler (HPV tip 6, 11, 40, 42, 54 ve 57) ve yüksek riskli tipler (HPV tip 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66 ve 68) şeklinde kategorize etmektedir^{21,22}. Düşük riskli tipler benign lezyonlar ile ilişkilidir ve genital siğiller ile kondiloma akuminata etkenleri olarak değerlendirilmektedir, yüksek riskli tipler ise invaziv kanserinde dahil olduğu displastik lezyonların nedeni olarak değerlendirilmektedir.

CIN1'de skuamöz hücre maturasyonu yüksek seviyede HPV epizomal replikasyonunu destekleyen olgudur²³. Aksine, yüksek dereceli lezyonlar ise prodüktif olmayan enfeksiyon özelliği göstermekte olup HPV viral integrasyonu gerçekleşmektedir ve çok düşük HPV DNA kopyası mevcuttur²³. Bu faktörler, yüksek dereceli lezyonların spesifik olarak belirlenmesi noktasında moleküler stratejilerin geliştirilmesi açısından oldukça önemli faktörlerdir, çünkü; HPV'nin viral yükü, varlığı, genomik integrasyonun ve malignan transformasyonun seviyesini yansıtmaya açısından yeterli değildir. Prodüktif HPV enfeksiyonlarında, HPV DNA'sı epizomal statüde kalır ve E1/E2 ORF'leri 2 önemli onkoprotein (E6/E7) ekspresyonunu baskılar^{23,24}. Buna karşın karsinoma ve yüksek dereceli displazide ise viral genomun konak genomuna integrasyonu ile birlikte E1/E2 yaygın şekilde bozulur ve sonuç itibarıyla E6 ve E7'nin düzensiz aşırı ekspresyonu meydana gelir. E6 proteininin aşırı ekspresyonu, hücre siklus regülatör proteini olan p53'ün ubiquitin aracılıklı degradasyonuna neden olur ve sonuç olarak kontrol edilemeyen hücre siklus progresyonu meydana gelir^{21,25}. Bunun aksine E7 onkoproteini Rb (retinoblastoma) proteinine bağlanır ve degradasyon meydana getirir, sonuç olarak hücre siklus regülatörü olan Rb siklin D/p^{INK4a} yolu bozulur.

Diğer taraftan Rb geninin susturulması veya ekspresyonunun azaltılması p16^{INK4a}'nın hipometilasyonu ile sonuçlanır ve bu gende aşırı ekspresyon meydana getirir^{26,27}.

2.3.2. Strüktürel ve Aksesuar Proteinler

HPV E6 proteinin en önemli hedefi P53 proteindir, bunun yanı sıra E7 proteini ise özellikle Rb1 proteinini hedef alır ve diğer paket proteinler de bu E7 proteinin hedefleri arasındadır ki bunlar p107 ve p130 olarak adlandırılır. E6'nın P53'e bağlanması ile bu proteinin inaktivasyonu ve degradasyonu gerçekleşir. HPV E6 proteinin bağlandığı P53 ve diğer proteinler ubiquitin yolu ile degrade edilirler, degradasyona aracılık eden hücresel protein E6-ilişkili protein olarak isimlendirilmektedir (E6AP). E6AP proteini E3 ubiquitin ligase enzimidir; E3 sınıflandırılması genel olarak ubiquitin prosesinde rol alan enzimler için kullanılır ve HPV erken genleri ile karıştırılmamalıdır. E7'nin Rb1'e bağlanması ile Rb1'in fonksiyonlarının inaktivasyonu meydana gelir ve ardından E2F olarak adlandırılan transkripsiyon faktörünün serbest kalmasına neden olur ve Rb1'in destabilizasyonu meydana gelir. Özetle, E6/E7 apoptozisi engeller, genom gardiyanı P53 inaktive olur ve Rb1 inaktivasyonu ile hücre siklus kontrolü kaybedilir. Hücre siklusu ve apoptozis kontrolünde rol alan diğer birçok tümör süpressör genleri E6/E7 ve metilasyon hedefindedir.

P53'deki değişimler ve hTERT (human telomer reverse transkriptaz, revers transkriptaz özellikli telomerez katalitik komponenti) aktivasyonu ile ardından apoptozis kontrolünün kaybedilmesi, immortilizasyonun gelişmesi ve kanser ilerleyişinin nedeni olarak gösterilmektedir. HPV E6/E7 eksprese eden hücrelerde P53 degradasyonunun gerçekleşmesi immortalizasyonun oluşması için birincil olgu olup hTERT aktivasyonun bu süreç için elzem olmadığı ilk olarak McMurray ve McCance tarafından önerilmiştir. HPV onkoproteinlerinin hedef aldığı diğer önemli iki transkripsiyon faktörü ise; C-myc ve NFX1-91'dir ki bu süreçte hTERT geninin transkripsiyonel represyonu sonucu NFX1-91 harekete geçerken, C-myc ise transkripsiyonel aktivasyon sonucu harekete geçer. RNA, telomerazın katalitik olmayan komponenti hTERC'nin HPV onkoproteinleri ile direkt interaksyon geliştirdiğine dair hiçbir kanıt yoktur, bununla birlikte; Kromozom 3q oluşunda artan kopya sayısından bahsedebiliriz. hTERT'in histon modifikasyonu aracılığı ile epigenetik regülasyonunun E6, E6AP, p300 ve bir koaktivatör /asetil transferaz arasındaki interaksiyondan sonra meydana geldiği daha önce rapor edilmiştir. İlginç olanı ise, invaziv servikal kanser progresyonunda telomeraz hipermetile durumdadır, hTERT ekspresyonu ve aktivitesinin ise metilasyon ile bir korelasyonu söz konusu değildir. Proapoptotik aile üyesi olan DAP kinaz (DAPK),

Ca²⁺/kalmodulin regülasyonu, serin/threonine kinazlar ayrıca otofajik hücre ölümünü gerçekleştirebilenlerdir. DAPK'nın skuamoz hücre karsinomunda (SCC) (%47-77) ve yüksek-dereceli skuamoz intraepitelyal lezyonlarda (HSIL) %23-64 oranında metillendiği bilinmektedir, fakat normal hücrelerde (%0-8) metillenmediği ise bilinmektedir ve düşük dereceli skuamoz intraepitelyal lezyonlarda (LSIL) ise %0-8 oranında metillenmektedir. Premalignan lezyonlarda (HSIL) DAP kinaz ekspresyonunun kaybedilmesi invaziv servikal kanser progresyonuna neden olabilmektedir.

2.4. Patogenez

Papillomavirusların insanlarda onkojenik malign tümörlere neden olduğu kesinlik kazanmıştır. HPV-ilişkili olan mukozal epitelyal kanserlerden en önemlisi servikal kanserdir, kadınlarda en önemli ikinci kanserdir. Diğer HPV ilişkili kanserler ise anal, vulvar, vajinal ve anogenital bölge ile ilişkili penil kanserlerdir, ayrıca oral ve laringeal kanserlerde HPV bağlantılı olarak değerlendirilebilmektedir. Kadın ve erkeklerde HPV enfeksiyonları birçok mukozal bölgede gerçekleşir^{28,29}. Enfeksiyon çeşitliliği ise genellikle immün yetmezliği olan vakaların ortaya çıkışını beraberinde getirmektedir^{28,29,30}.

Buna ek olarak HPV kutanöz skuamoz hücre kanserlerinde de belirlenmiştir. Bu kanserlerin bazıları EV ilişkili olarak bir deri hastalığı şeklinde gelişebilmektedir, diğerleri ise immün yetmezliği olan vakalarda görülebilmektedir.

Diğer yaygın kanser türleri olan meme, akciğer, kolon, rektum, prostat ve özafagus kanserleri de HPV ile ilişkilendirilebilmektedir³¹. Bu kanserlerden, özafagus kanseri hariç diğerleri skuamoz epitel tabakadan köken almazlar.

İyi karakterize edilmiş HPV-ilişkili kanserlerde tümör enfeksiyon başlangıcından yıllar sonra özellikle epitel bölgede gelişmektedir. Sürecin invaziv kansere doğru ilerleyebilmesi için persistent enfeksiyon zorunlu olup bazı viral genlerin sürekli ekspresyonu gereklidir. Bununla birlikte bazı enfeksiyonlar benign kanser modeli olarak gelişim gösterebilir, hatta bazı persisten enfeksiyonlarda bile kansere doğru bir ilerleme söz konusu olmayabilir.

Başlangıç enfeksiyonu ile kanser oluşumu arasındaki zaman farkı ve kanserle sonuçlanan enfeksiyonların göreceli minör fraksiyonları birden çok faktörün kanserin oluşumunda etkili olduğunu göstermektedir ve bu faktörler konak veya çevre kökenli olabilmektedir ve bu faktörler lezyonların malignan sürece yönelmesinde katkıda bulunmaktadır. Çevresel faktörlere örnek olarak UV ışığa maruz kalma sonucu

karsinogenezin gelişmesi verilebilir. UV ışığı ayrıca EV içinde ko-karsinojen olabilir örneğin; EV-ilişkili kutanöz kanser türleri özellikle güneşe maruz kalmış deride gözlemlenmiştir. HPV aracılı mutagenез ve immün baskılama, HPV ile birlikte sinerji yapabilir ve bu durumda karsinogenez indüklenebilir. Diğer önemli faktörlerden biri ise konağın immün statüsüdür. İmmün fonksiyonun yetersiz olması yüksek riskli persistent enfeksiyona ve kansere neden olabilmektedir. Diğer bir konak faktörü olarak Fanconi anemisi gibi genetik hastalıklar örnek verilebilir. Bozuk DNA tamir sistemi taşıyan yetişkinler de HPV-ilişkili tümörlerin gelişme riski servikal kanser için 150 kat, baş ve boyun için 700 kat ve vulvar kanser için 4000 kat daha fazladır^{32,33}.

2.5. Onkogeneз

Onkogeneze abortif viral enfeksiyon olarak bakılabilir ki buna kanıt olarak konak hücrede virus persistensi ve normal yaşam siklusunun tamamlanmaması kanıt olarak gösterilebilir. Uzun süre persiste eden enfeksiyonlar CIN 2/3 progresyonuna yol açabilir. HPV persistensi ve CIN 2/3 ilerleyişindeki moleküler olaylar tam olarak anlaşılmış değildir. Her ne kadar P53 ve Rb1 degradasyonunun E6/ E7 aracılıklı yıkımı söz konusu olsa da aynı zamanda bu süreç genom düzensizliği de meydana getirebilmektedir. Diferansiyasyon kaybının söz konusu olması viral protein ekspresyonu ile koordinelidir ve virus/konak interaksyonu enfeksiyondan preneoplazi (CIN 2/3) ve kansere doğru süreci kaydırmaktadır ki viral DNA konak hücre genomuna integre olmakta ve sonuç itibarı ile E6/E7 proteinlerinde aşırı ekspresyon söz konusu olabilmektedir. E6 ve E7 ayrıca birçok önemli hücresel proteinlerle interaksyon geliştirerek anahtar metabolik /proliferatif yolları etkileyebilmektedir ki bu olgu birçok in-vitro çalışmalarda kanıtlanmıştır.

Epigenetik ve sitogenetik değişim kompleksinin oluşması neoplastik ilerleyişe neden olmaktadır. Serviks kanserinde, kromozom 3q da meydana gelen oluk en erken ortaya çıkan ve en sabit bulgulardan bir tanesidir. Meydana gelen epigenetik alterasyonlar DNA sekanslarında değişim olmaksızın gen ekspresyonunu regüle edebilmektedir. Bu alterasyonlara, DNA'daki sitozinin metilasyonu ve histon proteinlerinin asetilasyonu örnek olarak verilebilir. Epigenetik alterasyonlar onkogenik mekanizmada oldukça önemli adımlar olarak görülmektedir ve HPV aracılı onkogeneз bunların dışında değerlendirilemez ki bununla birlikte DNA metilasyonunun meydana gelmesi hücresel savunma olan yabancı DNA'nın transkripsiyonunun susturulması için gerekli olan mekanizmaların da susmasını beraberinde getirebilmektedir. HPV metilasyonunun olduğu bilinmektedir. En son yapılan

çalışmalar göstermektedir ki HPV tip 16 ve HPV tip 18'de metillenme uzunluğu genom bölgelerinde farklıdır ve metilasyon modellerindeki bu farklılıklar birebir olarak neoplazi gelişimi ile bağlantılı olabilmektedir. Epigenetik değişimler ayrıca metilasyonda ve kromatinin yeni model kazanmasında rol oynayan HPV ve hücrel proteinlerin direkt interaksyonu ile de gerçekleşebilmektedir ki bunlara DNA metiltransferaz, histon deasetilaz ve p300 dahildir.

Onkogeneze birincil olarak gerekli olan mekanizma erken eksprese olan E6 ve E7 proteinleri ile ilişkilidir³². Her ne kadar akrabalık kompleks bir biçimde olsada, E6 proteini daha çok p53 degradasyonu ile alakalıdır. E7 ise E2F/pRb kompleksinin bozulmasına neden olmakta ve bu sayede E2F'nin aktivasyonunu sağlamaktadır ki E2F önemli hücrel transkripsiyon faktörlerinden bir tanesidir. Netice olarak, E6 ve E7 proteinleri hücre siklusunda direnç geliştirerek hücre DNA'sının hasarlı olmasına rağmen replikasyona olanak sağlar. E6 ayrıca telomerazın aktivasyonunda önemli role sahiptir ve bu enzim telomerin uzamasından sorumlu olup epitel hücrelerin yaşam sürelerinin uzamasının sağlar. E7'nin ayrıca apoptozis blokajında rol aldığı da bilinmektedir. E6 ve E7 HPV'nin yaşam siklusunun oldukça erken safhasında eksprese edilen proteinlerdir ki özellikle bazal ve parabazal hücre tabakasında ekspresyonları söz konusudur. CIN1 gibi düşük dereceli lezyonlarda ekspresyon seviyesi oldukça düşük düzeydedir ve düşmeye de devam eder, fakat lezyon ilerledikçe E6 ve E7 ekspresyonu tüm epidermiste gerçekleşir. Yüksek dereceli lezyonlara ilerleme sürdükçe her iki proteinin ekspresyonunun devam etmesinin neticesi olarak terapötik aşılarda ana hedef bu iki proteindir. CIN 2/3'de meydana gelen morfolojik değişimler (anöploidi, değişen kromatin yapısı ve nuklear hacmin artışı) özellikle epitelyal kök hücrelerde bu viral genlerin ekspresyonu ile ilişkili olup farklılaşma kapasitesinin kaybedilmesi ile sonuçlanmaktadır³⁴. Ayrıca CIN3 lezyonlarının ve karsinomlarda HPV genomik integrasyonu yüksek oranda belirlenmiş olup, bu sayede E6 ve E7 ekspresyonu da artış gösterebilmektedir^{35,36}.

2.6. HPV ve yaptığı hastalıklar

2.6.1. Anogenital siğiller

Genital siğiller genellikle klasik olarak kondiloma akuminata olarak tanımlanır. Sivri uçlu ve saplı olanlar keratinotik siğiller, kalın, boynuza benzeyenler papüler ve düz siğillerdir ve bunlar yaygın deri lezyonlarından sorumludurlar, flat (düz) siğiller sıklıkla servikste

görülürler. Tipik olarak ekzotifik kondilomalar keratinize epitelyumda oluşur ve multiple lezyonlar birleşerek dev kondilomalar oluşturabilir³³.

Hastaların yaklaşık %50'si multiple lokalizasyonlarda lezyonlara sahiptir. Siğiller genellikle asemptomatik olmasına ve rutin pelvik muayene sırasında saptanmasına rağmen bazı hastalar kaşıntı, yanma, kanama ve vaginal akıntı şikâyetleriyle başvurabilir. Vulvo-vajinal kondilomalarda disperi (ağrılı cinsel ilişki) oluşabilir ve eğer dev kondilomalar mevcut ise üretra, vagina ve/veya rektumda obstrüktif semptomlar oluşabilir³².

Bayanlarda kondiloma akuminatanın ayırıcı tanısında mikroglandüler papillomatosiz, himen artıkları, molloskum contagiosum, kondiloma lata, nevüs, displazi ve karsinoma bulunmaktadır. Önemle belirtmek gerekir ki siğiller, displazi ve karsinomlar epitelyal lezyonlardır ve tanı için biyopsi yapılmaz ise ayırt edilemezler. Malignensi riskinin arttığı durumlar; immüsuprese hastalar, tedaviye cevap vermeyen atipik pigment lezyonlar ve 40 yaşın üstündeki hastalardır³².

HPV enfeksiyonları genç kadınlarda, seksüel açıdan aktif yetişkinlerde ve dolayısıyla kondiloma'larda oldukça yaygındır. Kondiloma'nın insidans oranı genellikle diğer seksüel geçiş koşulları ile paralellik göstermektedir^{37,38}. Amerika Birleşik Devletlerinde 15-49 yaşları arasındaki seksüel açıdan aktif popülasyondaki anogenital siğillerin oranı %1 olarak tahmin edilmektedir^{39,40}.

Anogenital siğiller genellikle eksternal lezyonlar olup çeşitli şekilde görülebilirler. Bu tip siğiller eksternal genital bölgede veya çeşitli bölgelerde gelişebilmektedir. Kadınlarda, çoğunlukla perineum ve anus, erkeklerde de penis ve anusda görülebilmektedir. Çoklu lezyonlar anus etrafında gelişebilmekte, anal kanalı çevreleyebilmektedir. Çoğu kondiloma sınırlı ve kendiğilinden sona erer veya lokal müdahale ile sonlandırılabilir. Bununla birlikte, bazı kondilomalar yıllarca persiste edebilir. Diğer HPV enfeksiyonlarında olduğu gibi genital siğiller de tıbbi müdahaleye karşı direnç geliştirebilir. Bu tip siğillerin ayrıca daha büyük hale gelmesi ve hamilelik boyunca genişlemeleri ve ardından dağılma sonucu kendiliğinden sona ermeleri mümkündür. Olayların sıralanaşı hamilelikle ilişkili olan immün sistem baskılanmasının bir yansıması olabilir.

Tüm genital siğillerin %90'ından HPV tip 6 ve 11 sorumludur ve HPV tip 6 dominanttır⁴¹. Diğer HPV tiplerinin de genital siğilde varlığı mümkündür, özellikle HPV tip 16 bu siğillerde rastlanılan diğer HPV tiplerinden birisidir. Kondilomalar normalde SCC'ye (Squamous Cell Carcinoma) benzeyen birçok küçük papüller içermektedir. Bu lezyonların çoğu HPV 16 içermektedir, malignan sürece doğru ilerleme servikal lezyonlara nazaran daha düşüktür.

2.6.2. Epidermodysplasia verruciformis (EV)

EV nadir görülen bir hastalık olup kutanöz HPV enfeksiyonlarına duyarlı olan bireylerde çok sık rastlanılmaktadır. Çocukluk çağında, genellikle siğiller gelişir, yaygınlaşmaya başlar, sonlanmaya meyilli değildir ve bazı durumlarda skuamöz hücre kanserlerine doğru gelişme mümkündür. Normalde görülen predominant karakterli iki tip lezyon vardır; her ikisinin de aynı hastada gelişmesi mümkündür. Bazı lezyonlar düz siğiller olarak görülebilmektedir, diğer lezyonlar ise kırmızı-kahverengi maküller, pullu veya düz biçimdedir. Düz siğillere sebep olan HPV tipleri genel popülasyonda düz siğilleri meydana getiren tipler ile aynıdır ki bu tipler HPV-3 ve HPV-10'dur. Pullu yapıdaki siğiller ise EV'ye özgü HPV tipleri ile aynıdır ve yaygın olarak HPV-5 ve HPV-8 bunlardan birkaçıdır. EV'li hastalar birçok HPV tipi tarafından enfekte edilebilir. EV hastaların yarısında genetik düzensizlik sonucu meydana gelmektedir. EV görülen hastaların ailelerinin birçoğunda ebeveynler akrabadır. EV otozomal resesif model olarak görülmektedir. Bununla birlikte, bir aile X kromozomu ilişkili resesif bir genetik yapıya sahiptir. Bu vakalar genetik heterojen yapıya sahiptir, çünkü farklı ailelerde iki farklı kromozomal lokus şeklinde haritalama söz konusudur. Bazı EV'li ailelerde, iki yeni gen mutasyonu tanımlanmıştır, bunlar EVER 1 ve EVER 2'dir ve bu kromozom lokuslarından birinde tanımlanmıştır (17q25)⁴².

EV hastaları diğer mikrobiyal ajanlar tarafından meydana getirilen enfeksiyonlara oldukça hassastır ve buna HPV ilişkili siğiller ve mukozal HPV enfeksiyonları da dahildir. Sadece birkaç sağlıklı bireyde EV'ye özgü HPV tipleri normal deride gözlemlenmiştir. Dolayısı ile, EV'li vakalarda bu HPV tiplerinin klinik düzeyde bir lezyon oluşturmaları alışılabilir bir durum değildir. Bu lezyonlar klasik tedavi yöntemlerine karşı oldukça dirençlidir. Bunun da ötesinde EV'li birçok hastada immün sistem fonksiyon bozuklukları da söz konusudur. Ayrıca kazanılmış EV hastalığı HIV enfeksiyonu ile birebir bağlantılı olabilmektedir, bunun yanı sıra EV'ye özgü klinik lezyonların EV'ye özgü HPV tipleri ile ilişkilendirilmesi mümkün olup genellikle immün sistemi baskılanmış vakalarda bu gözlemlenmektedir.

2.6.3. Genital olmayan deri siğilleri

Genital olmayan deri siğilleri vücudun herhangi bir tarafında olabilir^{142,143} ve sıklıkla görüldükleri yerler ayak ve ellerdir. Bu siğiller benign papillomalar olup genellikle yaşlı büyük çocuk veya genç yetişkinlerde görülürler. Bazı çalışmalar okul çağındaki çocuklarda bu tip enfeksiyonlardan etkilenme oranının %10 civarında olduğunu bildirmektedir. Bazı genital

olmayan deri enfeksiyonlarına neden olan papillomavirusların kuruluğa karşı dirençli oldukları gösterilmiştir⁴³. Genital olmayan siğillerde geçiş genellikle eşyalar vasıtasıyla olur; çevresel şartlarda papillomaviruslar uzun süre boyunca canlılığını koruyabilirler⁴⁴. Deride herhangi bir şekilde küçük yarıklar veya çizikler olması enfeksiyona maruz kalma riskini artırır, papillomavirusların bazal hücrelere ulaşması bu sayede kolaylaşır ve bu enfeksiyonun ilk adımı için gerekli olan bir süreçtir. Enfeksiyonun başlaması ile birlikte, lezyonlar görülmeye başlar. Otoinokulasyon, lezyonlara sebep olan başlıca faktörlerden bir tanesidir ki genelde mukoz membranda gelişimleri söz konusudur. Enfeksiyonun birkaç ay persiste etmesi söz konusu olup, kendiliğinden sona ermesi birkaç yıl içerisinde gerçekleşir.

Lezyonların sona ermesinde immün sistemin cevabı etkilidir. Mononükleer hücrelerin infiltrasyonu lezyonların kendiliğinden sonlanmasında rol oynayabilir, bunun yanı sıra ayak tabanında meydana gelen deri lezyonlarının kendiliğinden sona ermesinde infiltrat lenfositlerin yüksek seviyesi önemli rol oynayabilmektedir. İleri yaş grubu vakalar enfeksiyona karşı direnç geliştirebilir, fakat bunların sayısı popülasyonda oldukça az miktardadır.

Klinik lezyon tipleri ile enfeksiyonu meydana getiren HPV tipleri arasında oldukça yakın ilişkiler mevcuttur. Plantar siğiller, mozaik siğiller genellikle HPV 1, 2, 4, 27, 57 ve 65 ile ilişkilidir, düz siğiller ise genellikle HPV tip 3, 10, 28 ve 41 ile ilişkilidir. Kasaplar ve et ile ilgili kişiler diğerlerine nazaran el siğilleri açısından daha yüksek riske sahiptir. Hayvan papillomaviruslarından ise sadece HPV 7 el siğillerinde tespit edilmiştir.

2.7. HPV ve Kanser

Genital HPV enfeksiyonları cinsel yolla bulaşan en yaygın viral enfeksiyonlardan biridir^{37,44}. Çalışılan birçok popülasyonda HPV enfeksiyonlarının yaş ilişkili olduğu belirlenmiştir. En yüksek prevalans 15-25 yaşları arasındaki kadınlarda görülmektedir ki tüm enfeksiyonların %25-40'ı bu yaş aralığına aittir. Yaşın artması ile azalan enfeksiyonun nedeni HPV'ye maruz kalmanın azlığı, enfeksiyonun sınırlı doğası veya enfeksiyonun tekrarı neticesinde oluşan direnç ile açıklanmaktadır. Genital HPV enfeksiyonlarının kümülatif insidansı 3 yıllık cinsel aktivitesi kadınlarda %50 civarında olduğu tahmin edilmektedir^{37,45,46}. Yaşa özgü prevalans popülasyonlarda farklılık göstermektedir. Birçok batı popülasyonunda artan yaşa nazaran azalan risk de söz konusudur. Bununla birlikte, Güney Amerika'da popülasyonunda ileri yaşlarda HPV prevalansı yükselmektedir^{47,48}. HPV prevalansındaki bu artış orta yaş grubunda cinsel davranışların değişmesi ile açıklanmaktadır, orta yaş çağlarında seksüel davranışların değişmesi yeni HPV enfeksiyonlarına maruz kalmayı beraberinde getirmekte veya genç yaşlarda kazanılmış latent HPV enfeksiyonunun

yeniden aktive olmasına neden olmaktadır. Kadınlarda geniş yaş aralığında yapılan bir çalışmada yaşa özgü HPV insidansı araştırılmış olup 40 yaş sonrası insidansın oldukça arttığı tespit edilmiştir ve bu artışın yeni seksüel partner ile ilişkili olduğu belirlenmiştir⁴⁹. Genital enfeksiyonun doğal seyri erkeklerde kadınlardaki kadar detaylı araştırılmamıştır⁵⁰. Genel olarak, sünnetli erkeklerde enfeksiyon riski oldukça azdır ki bu sünnetli erkek, seksüel partneri olan kadınlarda da servikal kanser riskini azaltmaktadır⁵¹. Üniversite öğrencisi olan ve 18-23 yaş aralığında bulunan erkeklerdeki HPV insidans oranı % 62.4 olup izleyen 24 ay boyunca aynı kalmaktadır. Bu veri de göstermektedir ki seksüel ilişkinin başlaması ile birlikte HPV'ye maruz kalma riski artmaktadır. Aynı üniversitede yapılan çalışmada sürekli kondom kullanan kadınlardaki HPV insidansı göreceli olarak düşüş göstermektedir (yılda 100 hastada/37.8), %5'den daha az kondom kullanan kadınlarda ise göreceli olarak risk artmaktadır (yılda 100 hastada /89.3)⁵². Sürekli kondom kullanan fakat enfeksiyon taşıması söz konusu olan kadınlarda genital epitelyum yüzeyinin genişliği (skrotum, perineum ve vulva) söz konusudur ve virus geçişinden korunma mümkün olmamaktadır. İlginç bir çalışma ise üniversite öğrencisi erkeklerden alınan tırnak örneklerinde %30 oranında kümülatif 24 aylık HPV insidansı bulunmuştur bu da göstermektedirki genital-genital temas olmaksızın da virus geçişi mümkündür; bununla birlikte bakire kadınlarda HPV prevalansının oldukça düşük düzeyde olması bunun yaygın bir durum olmadığını göstermektedir.

HPV enfeksiyonu olan birçok kadında HPV anormallikleri tespit edilememektedir, genital bölgedeki HPV enfeksiyonlarının epidemiyolojisi servikal tümör epidemiyolojisi ile bir tutulmaktadır ve ilk serviks karsinomu öncüsü olan displazi de bu duruma dahildir⁵³. Servikal kanser ile HPV arasındaki güçlü bağı gösterme açısından 1960'larda sergilenen analizler birçok hatalar içermektedir. Bu tip analizler genel olarak kısa vadeli HPV DNA'sının yanlış pozitif veya yanlış negatif sonucu üzerine kurulmuştur. Sonrasında HPV DNA'sının belirlenme sürecinin gelişmesi ile birçok çalışma yüksek riskli HPV enfeksiyonlarının servikal displazi ve invaziv karsinomda major risk faktörü olarak değerlendirilmesini beraberinde getirmiştir^{53,54,55,56}.

Birçok çalışmaya ile HPV pozitif olan, fakat sitolojik olarak normal görünen kadınların HPV negatif kadınlara nazaran anormallik geliştirme risklerinin daha yüksek olduğu gösterilmiştir⁵⁷.

Genital enfeksiyonun ortalama temizlenme süresi 6 aydır ki çoğu enfeksiyonun kendiliğinden geçtiğide bilinmektedir^{37,46,58,59}. HPV enfeksiyonu bir şekilde gerileyen bir vakanın aynı zamanda yüksek dereceli servikal intraepiteltal neoplazi CIN3'e dönüşü mümkündür veya daha önce HPV enfeksiyonu olmayan bir vakanın invaziv karsinom olma

riski de yüksektir. Düşük dereceli displaziye düşük veya yüksek riskli HPV tipleri neden olabilmektedir. Yüksek riskli HPV tipleri tarafından oluşturulan persisten HPV enfeksiyonu çok az sayıda kadında görülmekte olup CIN 3 veya invaziv karsinomun gelişmesi için tek ve en önemli risk faktördür. Bir enfeksiyonun persitent olması için ne kadar süre gerektirdiği henüz net olarak anlaşılmamıştır, fakat 6 aylık bir sürecin gerektiği tahmin edilmektedir, persistens olgusu genel olarak 12 aylık süre içerisinde birbirinden farklı iki genital örnekte aynı HPV tipinin neden olduğu enfeksiyonun tespit edilmesi olarak tanımlanmaktadır. Birçok durumda, farklı HPV tiplerinin, özellikle HPV tip 16'nın persisten enfeksiyon geliştirdiği bilinmektedir⁶⁰. Bununla birlikte, tek başına persisten HPV enfeksiyonu yüksek dereceli displazinin gelişmesi için yeterli değildir ve düşük riskli HPV tipleri yüksek riskli HPV tiplerine nazaran daha az displazi olasılığı taşımaktadır⁶¹. Displazi sürecinin olasılığını belirlemek için HPV'ye ait E6 ve E7 proteinlerinin aktivitesinin varlığı önem arz etmektedir. Çalışmalar sonucunda oldukça fazla miktarda viral yük taşıyan kadınlarda yüksek dereceli displazi gelişme riskinin daha fazla olduğu belirlenmiştir, fakat tüm kanıtlar bunu destekler nitelikte değildir^{62,63,64}. Tek seferlik viral yük ölçümünün tip-spesifik kantitatif metotlarla yapılması CIN ile ilişkilendirilebilir, fakat hastalık sürecinin belirlenmesi için gerekli değildir⁶⁵. Bununla birlikte, kalıcı özellik taşıyan seri örneklerde viral yükün ölçümü virus ve lezyon persistensi ile alakalıdır⁶⁶.

Yüksek riskli HPV tiplerinin persisten enfeksiyona neden olması ve malign sürecin gelişmesi için majör risk faktörü olması ve servikal kanser taşıyan her vakada HPV DNA'sına rastlanması, servikal kanserin gelişmesi için HPV enfeksiyonunun varlığının kati şekilde olması gerektiği kararına varılmasına yol açmıştır. Tek başına persisten HPV enfeksiyonu kansere neden olmak için yeterli değildir çünkü yüksek riskli HPV persisten enfeksiyonu olası vakaların hepsinde ciddi lezyonlar gelişmez.

2.7.1. Servikal Kanser

Servikal kanserlerin çoğu transformasyon zonunda meydana gelmektedir. Bu bölge endoserviksin kolumnar epitelyum bölgesi ile ektoserviksin çok tabakalı skuamoz epitelyumun birleştiği bölgedir^{67,68}. Servikal kanserlerinin %85'i skuamoz hücre kanserleridir. %15'i ise adenokarsinomlar ile küçük hücreli nöroendokrin tümörleridir. Lezyonların malignans sürecine yıllar süren displastik değişimler eklenir ve skuamoz hücre karsinomu /squamous cell carcinoma (SCC) gelişimi ile son bulur. Skuamöz epitelyumun bazaloid

hücreler ile yer değiştirme derecesi lezyonların dağılımını belirler. Birçok displazide, bazoloid hücreler lezyonların tüm tabakası ile yer değiştirir. HPV enfeksiyonu sonrası gelişen servikal prekanseröz lezyon servikal kansere genellikle 10-15 yıl gibi uzun bir sürede ilerler. Bu sebeple servikal prekanseröz lezyonların sitolojik test olan Pap testi ile erken tespiti ve tedavisi ile servikal kanser büyük oranda (>%90) önlenir. Pap testi ile servikal hücrelerde sitoplazmik vakuolizasyon perinükleer hale ve genellikle büyük hiperkromatik nükleusun görüldüğü HPV enfeksiyonunun karakteristik sitopatik etkisi olan “koilositozis” tespit edilir. Koilos Latince boşluk anlamına gelir. Servikal kanserin histolojik sınıflandırılması CIN 1, 2, 3 şeklinde yapılmaktadır ve bu sayılar sırası ile düşük, orta ve ağır derecede displaziyi ifade etmektedir. CIN3 in situ ve invaziv karsinomu da kapsamaktadır. Bethesda Sistem Sitolojisinde⁶⁹, orta dereceli sitolojiler düşük dereceli skuamoz intraepitelyal lezyon (LSIL) olarak, daha yüksek anormallikler ise yüksek dereceli skuamoz intraepitelyal lezyon (HSIL) olarak tanımlanmaktadır. Önemi belirlenemeyen atipik skuamoz sitoloji (ASCUS; Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance) ise önemi belirsiz lezyonlar olarak tanımlanmaktadır.

Displazilerin çoğu kendiliğinden sonlanmaya eğilimlidir. Aslında, kendiliğinden sonlanmanın olasılığı displazinin düşük dereceli olması ile birebir bağlantılıdır. Genel olarak ciddi displaziler düşük dereceli displastik bölgelerden köken alır ve yıllar boyunca varlıklarını devam ettirirler^{70,71}, bazen ciddi displazinin düşük dereceli evreyi geçirmeden direkt olarak geliştiği bilinmektedir⁵⁷. İnvaziv kanserin başlangıcı ve servikal kanserin gelişimi arasındaki uzun süreden dolayı geliştirilen tarama programları sayesinde birçok servikal kanser gelişiminin durdurulması olanaklı hale gelmiştir, fakat bununla birlikte adenokarsinom ve adenoskuamoz hücre karsinomu tarama programı ile birlikte birçok ülkede sayıca artışa geçmiş durumdadır. Bu sebeple Pap testi taraması bu tümör tiplerinin prekürsörlerinin tanımlanmasında verimli olmayabilir. HPV tiplerinden 40’ı genital bölgede enfeksiyon meydana getirebilmektedir, bu tiplerden çoğu servikal kanserden sorumludur ve bu tipler genel olarak yüksek-riskli tipler olarak tanımlanmaktadır, diğerleri ise düşük risk grubuna dahil edilmektedir. Dünya genelinde 1000 servikal kanserli vakadan alınmış parafine gömülü dokularda HPV DNA içeriği %90 olarak belirlenmiştir⁷². Bu sonuçlar daha sınırlı olan servikal kanser çalışmalarının gözlemlerini doğrulamaktadır. Dört HPV tipinin (16, 18, 31, 45) HPV pozitif kanserlerin %80’ini meydana getirdiği belirlenmiştir. HPV tip 16 en yaygın tiptir. Diğer taraftan, düşük riskli HPV tipleri (6 ve 11) sadece tümörlerin ikisinde bulunmuştur. HPV negatif olarak bulunan tümörlerde çalışma tekrar edilmiş olup bu sonuçların yanlış-negatif olduğu veya var olan HPV DNA’sının aşırı derecede degradasyona

maruz kaldığı tespit edilmiştir. Servikal kanserlerin %99,9'unda HPV DNA'sının bulunduğu kesinlik kazanmıştır⁷³.

Onbir çalışmadan havuz oluşturularak elde edilen skuamoz hücre kanserlerinin uluslararası analizleri sonucunda (1918 vaka /1928 kontrol) 15 yüksek riskli ve 11 düşük riskli HPV tipi tanımlanmıştır. Vakaların %91'inde HPV pozitif bulunmuş olup HPV pozitif vakalarda 8 tip (16, 18, 31, 33, 45, 52, 58, 25) kanserlerin % 95'inde bulunmuştur. HPV virus tiplerinin (tip 70 ve 73 hariç) filogenetik ve epidemiyolojik sınıflandırması kesin netlik kazanmıştır.

HPV tip 16 ve 18 servikal kanserlerin %70'inin nedenidir, HPV tip 16 en yaygın onkojenik tiptir ve bunu HPV tip 18 takip eder. Asemptomatik HPV enfeksiyonu kadınlarda 10 yıllık bir süreci kapsamaktadır. HPV 16/18 tiplerinin her ikisi de CIN3 veya invaziv kansere neden olmakta ve diğer HPV tiplerine nazaran daha hızlı servikal kanser geliştirebilmektedir⁷⁴. HPV tiplerinin yapılan çalışmalarda meta-analizleri göstermektedir ki, düşük dereceli skuamoz intraepitelyal lezyonlardaki (LSIL) dağılım ile invaziv skuamoz hücre kanserlerindeki dağılımı benzer sonuçlar içermektedir^{75,76}.

Her ne kadar yapılan çalışmalarda skuamoz hücre kanserleri, adenokarsinomlar ve adenoskuamoz karsinomlar çok yaygın olarak görülse de^{77,78}, nöroendokrin farklılaşmasına dayalı olan karsinomların da HPV DNA'sı içerdiği bilinmektedir⁷⁹, skuamoz hücre karsinomu (SCC) olmayan sekiz vaka kontrol çalışmasından elde edilen veriler bu tümörlerin %81'inde HPV DNA'sı pozitif bulunmuştur ki bunların tamamı HPV tip 16 veya 18 ile ilişkilidir⁷⁸. Glandular tümörlerin yüksek fraksiyonunun SCC'ye nazaran HPV18 ilişkili olduğu belirlenmiştir. LR HPV tipleri yaygın olarak servikal kanser ile ilişkili değildir⁸⁰. Bazı servikal kanser vakalarından izole edilen LR HPV tip 6 ve 11'in genomlarında alterasyon taşıyabilecekleri belirlenmiş olup bu sayede onkojenik potansiyellerinin artışının mümkün olabileceği savunulmaktadır ve ayrıca onkojenik potansiyel immün sistem bozukluğu taşıyan vakalarda da artış gösterebilmektedir. Üstelik LR ve HR HPV sınıflandırmasının bütün bölgelerdeki enfeksiyonlarda belirleyici olmadığı bilinmektedir. Örneğin, düşük dereceli SCC, Buschke-Lowenstein tümörü, normalde HPV tip 6 ve 11 ile ilişkilidir ve eksternal genital bölgede invaziv özellik gösterir^{81,82}. LR tipler ayrıca laringeal kanserde de etken olup tekrar eden respiratuvar papillomatoziste de etkendirler.

Servikal karsinogenezin gelişmesi için HR HPV tiplerinin enfeksiyonu gerektiği net olsa da bu yeterli bir olgu değildir. Diğer faktörlerin de enfeksiyon ile birlikte koopere olması elzemdir ki bu süreç özellikle HPV pozitif dokudan kanserin oluşması için gereklidir. Viral DNA'nın integrasyonuna dayalı değişimler (E6 ve E7 proteinlerinin yüksek ekspresyonunun

stabilizasyonu) virusa özgü ve kanser gelişmesi sürecinde etkili öğeler olarak bilinmektedir. Hücrel genlerin genetik alterasyonu gibi değişimler, tümör baskılayıcı genlerin ve proapoptotik genlerin ekspresyonunun azalması veya proto-onkogenlerin ekspresyonunun artması gibi süreçler tümör gelişiminde kofaktör olarak rol oynamaktadır. Bu tip alterasyonlar uzun süreli viral gen ekspresyonunun yansımalarıdır ki özellikle bu durum E6 ve E7 proteinleri için söz konusudur^{83,84,85, 86}. Bu değişimler farklıdır ve bunların bazıları oldukça yaygın biçimdedir. Yüksek dereceli displazilerde ve karsinomlarla ilgili yapılan birçok araştırmada bazı genlerin epigenetik stabilizasyonu da söz konusudur^{87, 88}.

HR HPV tipleri ile enfekte ve servikal kanser gelişmiş olan birkaç kadında çevresel ve konak faktörleri net olarak çalışılmış olup servikal kanser ve prekürsör lezyon oluşumunda potansiyel etkileri araştırılmıştır. Hamilelik, uzun süreli oral kontraseptif kullanımı, sigara kullanımı, mikrobeyinler ve diğer cinsel yolla bulaşan hastalıklar gibi faktörlerin HPV enfeksiyonundan bağımsız fakat gelişimini tetikleyen biçimde servikal kanser riskini artırdığı tespit edilmiştir⁸⁹. Fakat bu kofaktörlerin ne şekilde displazilerin kanser progresyonunda rol oynadıkları net değildir. Kofaktörlerin genital enfeksiyon oluşma riskini artırma olasılıkları mevcuttur, lokal veya sistemik immüniteyi azaltmaları, HPV ile enfekte dokularda mutasyonu indüklemeleri veya HPV ile enfekte dokularda büyümeyi stimüle etmeleri temel etkileri arasında yer almaktadır. Yapılan bir çalışmada servikal mukusta var olan bütün orjinli karsinojenlerin sigara içenlerde içmeyenlere nazaran daha fazla olduğu belirlenmiştir⁹⁰. Son dönemlerde yapılan çalışmalarda kalıtımın da servikal kanser riskine katkıda bulunduğu anlaşılmıştır^{91,92}. Her ne kadar yapılan her çalışma pozitif sonuç içermese de immün cevap da spesifik rol alan bazı allel genler HPV enfeksiyonuna direnç veya duyarlılık gelişiminde önemli rol oynayabilmektedir. Bu alleller HLA (Human Leukocyte Antigen) sınıf I ve II genleri ve Killer Immunoglobulin-like Receptor (KIR) genleridir.

2.7.2.Vulvar, Vajinal, Penil ve Anal Kanser

Vulva, vajina ve penis kanserlerinin HPV DNA'sı içerdiği net olarak bilinmektedir ve genel olarak HPV16 bulunur. Vulvada bulunan invaziv SCC, morfolojik olarak siğil veya bazoloid şeklindedir ve genellikle çok genç kadınlarda vuku bulmaktadır. Bu tümörler HPV DNA'sı içermekte olup özellikle HPV tip 16 hakimdir^{44,91,92}. Vulvar kanser için muhtemel kofaktörler sigara içmek ve HSV (Herpes Simpleks Virus) tip 2 ile enfekte olmaktır. Vulvar ve vajinal displazi servikal displazi geçmişi olan kadınlarda oldukça yaygındır ve bu displastik hücrelerin servikal tümörler ile aynı orjine sahip olduklarına dair kanıtlar vardır⁹³.

Sadece birkaç vulvar SCC, bazoloid vulvar kanserin aksine HPV DNA'sı ihtiva eder ve bu tip HPV negatif tümörlerde genel olarak p53 mutasyonu mevcuttur, yaygın olarak daha yaşlı kadınlarda görülür.

Anal ve servikal kanserler arasında majör benzerliklerin olmasının yanı sıra oldukça belirgin farklılıklar da söz konusudur. Anal kanser erkeklere nazaran kadınlarda daha fazla yaygındır, Amerika Birleşik Devletlerinde vakaların sayısı her yıl kadınlarda erkeklere nazaran iki kat daha fazladır⁹⁴. Kadınlarda anal kanser olma sıklığı 1980'lerde artış göstermiştir ve herhangi bir değişim söz konusu değildir, erkeklerde ise yine 1980'lerde bir artış söz konusudur⁹⁵. Birçok durumda, HPV kökenli anal enfeksiyon cinsel yolla bulaşır, kanser riski ise anal ilişki yaşayan kadınlarda ve homoseksüel ilişki yaşayan erkeklerde daha yüksektir⁹⁶. Yine birçok durumda anal seksüel ilişki olmamasına rağmen anal enfeksiyonun genellikle diğer genital bölgelerden köken alması da mümkündür. Bu görüşü destekleyen olgulardan en önemlisi, anal ve genital enfeksiyonların aynı zaman diliminde aynı HPV tarafından gerçekleştirilmesinin gözlemlenmesidir. HPV'nin anal enfeksiyon oranı servikal kanserde var olan oran ile aynıdır. Anal kanser kolumnar ve skuamoz epitel arasında var olan transizyon zonunda meydana gelmektedir. İskandinav ülkelerinde tümörlerle ilgili bir çalışmada HPV pozitif vakalarda %83 oranında HPV tip 16 tespit edilmiş olup, kadınlarda %90'nın üzerinde ve erkeklerde %69 civarında anal kanserlere HPV'nin neden olduğu ortaya çıkmıştır. Dolayısı ile erkeklerde rastlanılan anal kanserlerin nedeni bazen HPV olmayabilmektedir, fakat kadınlarda görülen anal kanserlerin çoğunda HPV enfeksiyonu mevcuttur.

Anal kanser riski genel popülasyonda servikal kansere nazaran daha düşüktür ve henüz bu farklı oranların nedeni netlik kazanmamıştır. Servikal kanser tarama programları birçok ülkede anal ve servikal kanser arasındaki risk farkını verimli karşılaştırma olanağını henüz sağlayamamaktadır, çünkü bu tip programlar servikal kanser gelişimini korumaya yöneliktir⁹⁷. Pap testi tarama programına katılım az olduğundan özellikle gelişmekte olan ülkelere servikal kanser insidansı yüksek orana sahiptir. Bu ülkelere, anal kanser servikal kansere nazaran 10 da 1 orana sahiptir. HIV (Human Immunodeficiency Virus) pozitif vakalarda anal kanser görülme riski genel popülasyona nazaran daha fazladır ve bu risk özellikle HIV pozitif homoseksüel erkeklerde daha fazladır. AIDS –Kanser kayıt çalışması çerçevesinde ABD'de yapılan bir araştırmada HIV enfeksiyonu invaziv anal kanser riskini erkeklerde %37.9, kadınlarda ise %6.8 oranında artırabilmektedir⁹⁷. Bu oran farklılığı ise HIV-pozitif homoseksüel erkekler grubu ile ilişkilidir. Homoseksüel erkeklerde bağıntılı risk oranı HIV pozitifler için %59.5 ve intravenöz uyuşturucu kullanan erkeler için ise %5 olarak

bildirilmiştir. HIV ile enfekte olmuş erkek ve kadınların büyük bir çoğunluğunun anal enfeksiyon olduğu da raporlarda yer alan veriler arasındadır⁹⁸. San Francisco’da yapılan bir araştırmada HPV’nin neden olduğu anal enfeksiyon oranı HIV ile enfekte erkek homoseksüellerde %93 olup HIV negatif erkek homoseksüellerde ise bu oran %61’dir, HIV pozitif kadınlarda ise bu oran %76 oranında hesaplanmıştır. Dolayısı ile erkeklerde meydana gelen anal kanserin oluşum riskinin artışı, homoseksüellerde meydana gelen daha yüksek HPV enfeksiyonu ile benzeşmemektedir. Homoseksüel erkeklerde anal kanser riskinin HIV enfeksiyonu sonrasında daha yüksek görüldüğüne dair birçok kanıt mevcuttur. Homoseksüel ve biseksüel erkeklerde anal kanser oluşumunun yüksekliğinden dolayı araştırmacılar bu popülasyonun anal skuamoz epitel lezyonlar açısından taranmasını desteklemektedir.

2.7.3. Baş ve Boyun Kanserleri

Baş ve boyun kanserleri için risk oluşturan iki faktör bilinmektedir; alkol tüketmek ve sigara içmek. Baş ve boyun kanserlerinde genel olarak HPV enfeksiyonu söz konusu değildir ve şu ana kadar belirlenen kanıtlar sadece oral kanserlerin HPV pozitif olabileceğini göstermektedir⁹⁹. HPV pozitif olan oral tümörlerin %90’ı tip 16 ilişkilidir. Oral farinksde olan kanserlerin çoğu tonsil ve dil bölgesinde gelişmektedir. Her yıl için bu kanserlerin oranı 1973-1995 arasında ABD’de %2 artış göstermiştir. Bu artışın nedeni ise özellikle seksüel geçiş nedeni ile HPV enfeksiyonlarının artışı ile ilişkilidir¹⁰⁰. Bu tümörler için genital-oral seks risk faktörü olarak kabul edilmektedir. Genel olarak, HPV-pozitif tümörler bazoloid morfoloji oluşturmaya eğilimlidirler, Retinoblastoma (Rb) veya p53 mutasyonları oldukça nisbi değerlerde olup p16 ekspresyonu oldukça fazladır.

2.8. HPV enfeksiyonlarının tanısı

2.8.1 Giriş

Amerikan Kolposkopi ve Servikal Patoloji Derneğinin hazırladığı konsensus bazlı rehber; HPV testinin doğrulayıcı olarak ASCUS’lu hastalarda kullanılabileceğini, fakat diğer anormal sitolojileri taşıyan triage hastalarda bunun kullanılamayacağını belirtmektedir. Bu tip hastaların yönetiminde HPV testi kullanımı kolposkopiye eşit veya daha fazla sensitif olabileceği belirtilmiştir⁵⁰. Her ne kadar anormal servikal sitoloji örneklerinde yüksek riskli HPV oranının oldukça fazla olduğu bilirse de ASCUS sitolojisi taşıyan birçok hastada HPV

enfeksiyonuna bağlı sitolojik manifestasyonlar oldukça ılımlıdır ve bu grup hastalarda HPV testinin spesifitesini etkili biçimde sınırlamaktadır. Daha da fazlası Amerika'da, yüksek dereceli lezyonlarda yüksek prevalans ve 30 yaşın altındaki genel popülasyonda HPV enfeksiyonlarının yüksek prevalansından dolayı HPV testinin bu grupta tarama testi olarak kullanımı önerilmez⁵¹. Dolayısı ile bu noktada daha da verimli HPV test metodlarına (artmış spesifiteye sahip yüksek NPV değeri olan) ihtiyaç söz konusudur ve bu metodların diğer moleküler göstergeler ile birlikte kullanılması servikal kanser açısından yüksek risk taşıyan vakaların tanınmasında yol gösterici olacaktır.

HPV enfeksiyon tanısı HPV genetik bilgisinin toplanan enfeksiyon bölgesi örneklerinde belirlenmesini gerektirmektedir. Servikal sitolojik örnekler genellikle fosfat tamponlu tuz solusyonu ile veya PreserveCyt gibi özel besiyerleri ile toplanmaktadır. PreserveCyt metanol bazlı fiksatif olup hücre morfolojisini iyi korumaktadır, transport besiyeri ise su bazlı alifatik aminler içermekte olup DNA'nın korunmasını sağlamaktadır⁵². PreserveCyt HPV RNA'sının korunması ve belirlenmesi için gerekli koşulları taşımaktadır ve -20°C'de 1 sene süre ile koruma sađlar⁵³. Yapılan bir alışma PreserveCyt'in DNA belirlenmesinde, DNA yoğunluğunu kaybetmeden 4-5 yıl süre ile PCR testi için kullanılabileceğini göstermiřtir⁵⁴. Formalinle fikse edilmiş parafine gömülü biyopsi örneklerinin de HPV testleri için kullanışlı oldukları bilinmektedir. Fiksasyon tipi ve fiksasyon süresi parafin bloklardaki nükleik asit kalitesini etkileyebilmektedir ve dolayısıyla bu test açısından kullanım değerleri oldukça düşebilmektedir.

Günümüzde FDA iki HPV testini, Hybrid Capture Test ve HPV Invader Testini onaylamıştır ve bu testlerde klinik geçerlilik mevcuttur¹⁰⁵. Klinik geçerlilik, test performansının altın standart veya referansa göre sensitivitesini belirlemektedir. Negatif test sonucu negatif hastalık durumunu gösterir mi? Birçok HPV tanı testinin performansı kolposkopi performansına veya Hybrid Capture Assay II performansına karşı ölçülmektedir. Performans belirleyicileri hedef popülasyondaki servikal hastalıklar ve HPV'dir. HPV rutin hücre kültürlerinde üretilememektedir ve bunun yanı sıra virusun belirlenmesi ve tanımlanması immünolojik teknikler ile oldukça güçtür. şimdilerde, genital tiplerin belirlenmesinde sıklıkla ve yaygın olarak kullanılan PCR (Polymerase Chain Reaction) bir diğerisi ise Hybrid Capture 2 Assay (Digene Corp., Gaithersburg, MD, USA) olmak üzere iki test mevcuttur. PCR hedef amplifikasyon temelinde geliştirilmiş olup, kontaminasyon riskinden özellikle kaçınılması gerekmektedir. Bu sistemin avantajı birçok farklı tipteki HPV'lerin belirlenmesi olup çoklu enfeksiyonların ayrıştırılmasını sağlaması da önemlidir. Bununla birlikte, pahalı bir test yöntemi olması, aşırı derecede zaman alması ve emek yoğun

olması gibi nedenlerden dolayı sadece araştırma tekniği olarak kalması ve geniş tarama programlarında kullanılmaması söz konusudur.

Hybrid Capture Assay (HC2), uzun sentetik RNA problemlerinin solusyonda hibridizasyonu temeline dayanmaktadır. Prob B, 13 HR HPV tipinin (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 41, 52, 56, 58, 59 ve 68) genomik sekanslarına kompleter biçimde dizayn edilmiştir, diğer taraftan Prob A 5 LR HPV'nin (6, 11, 42, 43, 44) belirlenmesinde kullanılmaktadır. Bununla birlikte, bu HPV testi şu an diğer tarama testleri arasında pahalı bir test olup eğitimli test uzmanı, test ekipmanı, standartlara uygun laboratuvar ve örneklerin saklanma koşullarının uygun olması gibi bir takım koşulları gerektirmektedir.

Yeni ve hızlı olan bir test Digene Corp. tarafından geliştirilmiş olup HC2 testinin bir modifikasyonudur ve 14 farklı HR HPV tipini test belirleyebilmektedir ki bunlara HPV 66 da dahildir. Basit laboratuvar malzemeleri gerektirmektedir, küçük bir alanda basit bir şekilde kurulabilmektedir ve sağlık çalışanlarının bu sistemi çalışmaları oldukça kolaydır. Bu yeni test sistemi diğerine nazaran daha iyi performans gösterebilmekte ve popülasyon tarama testi olarak maksimum potansiyele sahip olan bir test biçimidir.

2.8.2 Sitolojik Test

Servikal sitoloji testi servikal kanser için şimdiye kadar önerilen testler arasındaki en verimli testtir, fakat düşük dereceli sitolojik anormallikler taşıyan vakalarda klinik açıdan önemli lezyonların belirlenmesinde sınırlıdır ve yüksek değerlerde yanlış negatif sonuç verme durumu yüksektir. Amerika'da her yıl 3 milyonun üzerinde vaka ASCUS tanısı almaktadır atipik skuamoz hücreler (ASCUS) ; HSIL/ASC-H, LSIL veya atipik glandular hücrelerden (AGUS; atypical squamous glandular cells of undetermined significance) şüphe açısından hariç tutulamamaktadır. Bu durumlar servikal biyopside klinik açıdan belirgin yüksek dereceli lezyonlar taşıyan hastaların daha fazla değerlendirmeye tabi tutulmasını gerektirmektedir. Her ne kadar kolposkopik biyopsi tarihsel olarak altın standart olarak görülse de son dönemdeki raporlar bu metotun yüksek dereceli hastalıklarda %33-50 arasında tanı hatası veya örnekleme yönünden yanlış sonuçlar verdiğini göstermektedir ^{105,106,107}. Sonuç olarak, yanlış negatif sonuçları ile yanlış pozitif servikal sitoloji test sonuçlarını birbirinden ayırt etmek çok güçtür. ASCUS sitolojik tanısı taşıyan hastaların %5-17 arasında servikal biyopside CIN2/3 tanısı almaları mümkündür, bunun yanı sıra ASC-H (Atypical squamous cells, cannot rule out a high grade lesion) tanısı almış olan hastaların %24-94 arasında kolposkopik biyopside CIN2/3 tanısı alma şansları vardır. LSIL'de ise, vakalara kolposkopik inceleme yapılması

tercih edilir, yüksek dereceli servikal displazileri olanların oranı (CIN2/3) %25 olarak bulunmuştur, diğer taraftan CIN1'i olan vakalar %45 ve son olarak displazi taşıyıcısı olmayanlar ise %25'in üzerinde bulunmuştur¹⁰⁸. Benzer olarak, AGC tanısı alan vakaların %9-41 arasında CIN 2/3 lezyonları taşıdıkları belirlenmiştir veya adenokarsinom *in-situ* olmaları söz konusudur, fakat yine de AGC tanısı alanların büyük bir çoğunluğu glandular veya skuamöz tabakada klinik açıdan önemi olan lezyon taşımadıkları belirlenmiştir¹⁰⁹. Servikal sitolojide yanlış negatiflik oranları oldukça değişkenlik göstermektedir, %1.28 olacağı gibi %28 de olabilmektedir^{110,111}. Daha da fazlası, invaziv servikal karsinomu olan hastalardan elde edilen servikal yaymalarda yanlış negatif servikal sitoloji tanısı alma riski de oldukça yüksektir, çünkü anormal hücrelerin nadir olması, nekrotik debris gözlemlenmesi ve inflamasyon söz konusu olması gibi durumlar buna nedendir^{112,113}. Dolayısı ile moleküler tanı ile doğrulamaya klinik açıdan oldukça ihtiyaç vardır ki bu metotlar ayrıca servikal sitolojide yüksek dereceli displazilerin ve karsinomun belirlenmesi noktasında spesifiteyi artırmaları da mümkündür ve böylece yanlış negatif servikal sitoloji test sonuçlarının azaltılması mümkündür.

2.8.3 HPV DNA Testi

Bazı çalışmalarda, lise çağındaki kadınlarda HPV DNA %70 oranında pozitif bulunmuştur^{114,115}. Testin pozitiflik oranı 30 yaşını aşkın kadınlarda kayda değer biçimde düşmekte olup buna sebep olarak kadınlardaki enfeksiyonun %90 oranında kendiliğinden sona ermesi gösterilmektedir. Gelişen ülkelerde, 30 yaşın üzerindeki kadınlardaki HPV DNA testinin pozitifliği %6-18 arasında değişkenlik göstermektedir^{116,117,118}. Dolayısı ile HPV DNA tarama testinin 30 yaş sonrası uygulanması geçici pozitif durumların hariç kılınması için mantıklıdır, bu sayede ekonomik giderlerin kısıtlanması ve kadınların boşuna anksiyete yaşamalarının önüne geçilmiş olur. HPV testleri 30 yaşın üzerinde ortalama sensitiviteye sahiptir ve NPV değeri % 97 üzerinde olup, %89-90 spesifite söz konusudur¹¹⁹. HPV DNA pozitif çıkan kadınların ardından asetik asit (VIA; visual inspection with acetic acid) veya kolposkopik gibi görüntülü teşhis tekniklerine veya direkt biyopsi gibi test tekniklerine yönlendirilmeleri mümkündür bu sayede hastalığın doğrulanması ve tedavide nasıl bir yöntem izleneceği kesinlik kazanabilecektir.

Servikal kanser tarama stratejilerinin karşılaştırmalı çalışmaları farklı epidemiyolojik profiller içeren 5 farklı ülkede yapılmış ve 35-40 yaş arası kadınlarda yaşam süreleri boyunca bir kez tarama yapılmıştır ve kanser riskinin bu sayede %25 oranında azaldığı tespit

edilmiştir, aynı zamanda bu yaş aralığındaki kadınların bir kez VIA veya iki kez HPV testi yapılması söz konusu olmuştur, diğer taraftan kanser riskinin 5 yıl içerisinde 3 kez tarama testine tabi tutulan aynı popülasyonda %50 azaldığı tespit edilmiştir¹²⁰. HPV DNA testi ve sitolojik test paralel biçimde uygulandığında, yüksek NPV değeri her iki test metodunda negatif olan kadınların uzun zaman süresince servikal kanser riski taşımayacaklarının garantisi anlamına gelmektedir.

Önemi olmayan sitolojik anormalliklerin (ASCUS) gerçekten servikal kanser prekürsörü anormallikleri taşıyan kadınlardan ayırt edilmesi için HPV DNA testi önerilir. Sitolojik tanısı LSIL olan kadınların yaklaşık %80'inin HPV DNA pozitif olduğu bilinmektedir. Çalışmalar LSIL'ı bulunan kadınlarda tedavi sürecinde HPV testinin herhangi bir değeri olmadığını göstermektedir. Amerika Kolposkopi ve Servikal Patoloji Cemiyeti (ASCCP) bu tip durumlarda kadınların HPV testi yerine kolposkopiye yönlendirilmelerini tavsiye etmektedir^{121,122}.

ASCCP konsensus yönetimi ASCUS taşıyan kadınlarda sitolojik tespitin tekrarını, hemen kolposkopiye ve opsiyon olarak HPV testini önermektedir. Buna karşın, başlangıçta şayet sıvı bazlı sitoloji (LBC/Liquid- Based Cytology) kullanıldı ise, ardından HPV testi yapılması tercih edilmektedir ve bu sayede ikinci kez kliniğe başvurmaya gerek kalmamaktadır¹²³.

Servikal kanser prekürsörleri'nin tedavisinde eksizyonel veya ablatif metotların uygulanmasının verimli ve başarılı sonuçlar vermesi olasıdır. Buna karşın, vakaların yaklaşık %5-15'inde prekürsör lezyonların persiste etmesi veya iyileştirilememesi mümkündür. Ek olarak, tedavi edilen kadınların servikal kanser açısından artan bir riske maruz kalmaları söz konusu olup genel kadın popülasyonu ile karşılaştırıldığında bu süre yaklaşık olarak 8 yıldır¹²⁴. HPV testi şu an itibarı ile persisten veya nüks eden hastalıklarla ilgili olarak iki genel tanı modeline (sitoloji ve kolposkopi) karşı alternatif olarak araştırılmaktadır. Şayet tedavi sonrası 6-8 ay içerisinde HPV DNA'sı bulunamıyorsa persisten veya nüks eden enfeksiyon yoktur. Tedavi sonrası uygulanan HPV testlerinden oluşan 10 kombine çalışma sonrası, Lorinez CIN 2/3 belirlenmesinde tedavi sonrası HPV testlerinin sensitivitesi, spesifitesi ve NPV değerlerinin sırası ile %96.5, %77.3 ve %98.8 şeklinde olduğunu belirtmiştir¹²⁵.

Servikal sürüntü örneğini fırça ile alma, servikovajinal lavaj ve vajinal tamponlar gibi birçok metodun örnek toplamada kullanılması mümkündür. Pap testi ile yapılan invaziv servikal kanser ve preinvaziv yüksek dereceli lezyonların belirlenmesi kadar toplanan örneklerde HPV testinin kullanılması da en az Pap test kadar sensitiftir ve kanıtlarda bu

yöndedir. Sitolojik taramanın müsait olmadığı durumlarda veya jinekolojik muayeneye gönüllü olmayan kadınlarda servikal hastalıkların araştırılmasında kadınların kendilerinin aldığı vajinal örneklerde HPV DNA testi yapılabilir.

2.8.3.1. Direkt Hibridizasyon testi

In situ hibridizasyon hedef bölgeye komplementer işaretli prob şeklinde dizayn edilerek servikal sürüntü örneklerinde veya parafine gömülü doku biyopsilerinde HPV nükleik asitlerinin (DNA veya mRNA) belirlenmesi temeline dayanır. Biotinle işaretli problemlerin belirlenmesinde kromojenik substratlar kullanılır ve kullanımı otomatize edilebilmektedir. Sensitivitenin güçlendirilmesi sinyal amplifikasyonu ile sağlanır, özellikle floresan işaretli prob kullanılması veya DNA veya RNA hedeflerinin gözlemlenmesi için daha verimli protokollerin kullanılması, nanoprobaların kullanılması veya kombine tekniklerin pratiğe geçirilmesi bu maksatla mümkündür^{126,127}. Buna karşın toplanan örneklerde aranan hedefin kaybolması, koruma ve saklama koşullarında var olan sınırlamalar, test tekniklerini de sınırlayabilmektedir. Ticari olarak müsait olan problemler genel olarak grup problemleri içermekte ve HPV tiplerini belirleyebilmektedir. Örneğin, Enzo Life Sciences ve DakoCytomation in-situ tarama ve tiplendirme kitleri HPV tip 16 ve 18' i belirleyebilmekte, fakat bunlar arasında bir ayırım yapamamaktadır. Bazı testler ise, tip spesifik problemler ile oligonükleotid prob kokteyli içermektedir. Örneğin, Ventana test kitleri ile HR HPV tiplerinin 13 tanesi genotiplendirebilmektedir.

In situ hibridizasyon testinin en önemli avantajlarından bir tanesi, spesifik hücrelerde HPV enfeksiyonunu belirleyebilmesidir (tümör hücreleri, normal hücrelerde veya koilositlerde) ve bunun yanı sıra fiziksel statünün belirlenmesi de mümkündür (hücresel genoma integre veya epizomal fazda). Şayet belirleme metodu kâfi derecede sensitif ise, integre HPV kopyaları daha iyi belirlenebilir. Bu testlerin maliyetleri ise en büyük dezavantajlardan bir tanesidir, multiple in-situ hibridizasyon HPV tiplendirmesinde her bir örnek için gerçekleştirilmelidir^{128,129,130,131,132}.

2.8.3.2. Sinyal Amplifikasyon Testi

HPV tanısı için FDA(Food and Drug Association /Gıda ve İlaç Dairesi) onayı almış ilk test Hybrid Capture II (HCII) testidir (Digene, Gaithersburg, Md). Bu günümüzde en çok kullanılan klinik onay almış yöntemdir. Bu yöntem solüsyon bazlı hibridizasyona dayanan

sinyal amplifikasyon metodudur. Bu yöntemde 13 yüksek riskli (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 ve 68) ve 5 düşük riskli (6, 11, 42- 44) HPV-DNA hedefleriyle reaksiyona giren RNA problemleri kullanılır. Düşük riskli tiplerin saptanması hiçbir klinik öneme sahip olmadığından dolayı test sadece yüksek riskli prob setleriyle yapılmaktadır⁶⁶. Bu DNA-RNA hibridleri monoklonal antikorlar ile yakalanır ve antihibrid antikorları ile saptanır. Çalışmalar göstermiştir ki her ikisi de bu yöntem için kullanılabilmesine rağmen Specimen Transport Medium ile toplanan örnekler PreservCyt ile toplanan örneklere göre daha spesifik sonuçlar vermektedir. HC2 testi viral yükün semikantitatif ölçümünü sağlar Yayılan ışık miktarı, örneklerin sinyal güçlerinin oranı olan relative light unit (RLU) olarak ifade edilir. Pozitif sonuçlar için FDA'in kabul ettiği kontrol değeri 1pg/ml HPV-DNA'dır ve bu yaklaşık 5000 kopya sayısına denk gelir. Bununla birlikte bu yöntem örnekte hücresel DNA miktarının kontrolünü yapamamaktadır. HC2 yöntemi sadece yüksek riskli ve düşük riskli HPV tiplerinin tanınması için dizayn edilmiştir ve spesifik tipleri belirleyemez, ancak yüksek riskli veya düşük riskli tiplerden en az birinin var olduğunu gösterebilir, bu durum yöntem için önemli bir sınırlayıcıdır, çünkü genotiplendirme yüksek riskli tiplerin varlığını belirleyebilmektedir ve bu da servikal kanser oluşumu için risk faktörüdür. Spesifik HPV tiplerine karşı tedavi şimdilik yoktur, aşı ise sadece bazı tiplere karşı koruyucudur. Bu metodun avantajları; kullanım kolaylığı olmasıdır. HC2 yöntemi, enzyme-linked immunosorbent assays (EIA) kullanımına benzer 96 kuyucuklu mikropak formatında kullanılmaktadır ve klinik laboratuvarlarında oldukça sık uygulanmaktadır^{128,132}.

2.8.3.3. Nükleik asit Amplifikasyon Testi

PCR testi ile HPV DNA'da hedef bölge amplifiye edilir. Hedef DNA bu teknik sayesinde 1 saat içerisinde milyon kat biçiminde çoğaltılabilir (amplifikasyon)¹³³. Klinik çalışmalarda PCR testi yaygın kullanılır, fakat PCR reaksiyonunun gerçekleştirileceği ve örnekten DNA ekstraksiyonunun yapılacağı farklı laboratuvar alanları mutlaka gereklidir. İki farklı PCR testi mevcuttur, bunlardan birincisi tip spesifik diğeri ise konsensus PCR testleridir. Tip spesifik test tek HPV genotipinin amplifikasyonu için kullanılır, multiple PCR reaksiyonları farklı olarak dizayn edilir, dezavantajı aşırı zaman tüketimi ve her bir örneğin genotiplendirilmesi için yapılan masraftır. Konsensus PCR ise, birçok HPV tipinin belirlenmesi için tasarlanmıştır. Primerler farklı genotiplerdeki korunan dizileri hedef alır. L1 bölgesi yüksek derecede korunan bölge özelliği taşımasının yanı sıra sekans akrabalığı taşıması yüzünden HPV tiplerinin sınıflandırılmasında da kullanılmaktadır^{127,128,134}. Dolayısı

ile HPV primerlerinin çoğu L1 bölgesini hedef almaktadır. Başlangıç olarak, dejenere primerler (MY09/11) kullanılır. Dejenere biçimde sentezlenmiş oligonükleotid primerlerin kullanılması, PCR çalışmalarında yüksek varyasyon meydana getirir. Bu duruma karşı, MY09/11 primerlerine benzer biçimde, fakat virus tiplerinin sekans homolojilerinin dikkate alındığı oligonükleotid havuzlarından elde edilen yeni primerler dizayn edilmiştir. Sonuç itibarı ile, 5 upstream bölgesi içeren oligonükleotitler PGMY11 primer havuzu şeklinde dizayn edilmiş olup, 13 downstream oligonükleotitler ise PGMY09 primer havuzu için dizayn edilmiştir¹³⁵. Bu primer seti 450 baz çiftlik (bp; base pair) fragmenti amplifiye etmek için kullanılır. GP5/6 primeri ise 150 bp'lik L1 bölgesini amplifiye eder. SPF₁₀ primerleri ise, 65 bp'lik bölgeyi amplifiye etmektedir. Bu primerler bir adet inosine nükleotidi içermekte olup, bu sayede farklı genotiplerin hedef bölgelerini maksimize eder¹³⁶. Her ne kadar bu primer setinin güçlenmiş sensitiviteye sahip olması beklense de durum böyle değildir, farklı çalışmalarda göstermektedir ki primer setlerinin uyumsuz sonuçları mevcuttur¹²⁸.

Bazıları L1 bölgesinin viral integrasyon sırasında kaybedildiğine veya bozulduğuna dair teoriler öne sürmektedir ki dolayısıyla bu durumun yanlış negatif sonuç ortaya çıkardığını savunmaktadır^{137,138}. Buna karşın, E2 ORF bölgesinin integrasyon sırasında bozulduğuna dair bulgular mevcuttur ve bu sayede transkripsiyon regülatör proteinlerinin kaybolduğuna, E6 ve E7 onkoproteinlerinin ise devam eden ekspresyonlarının var olduğuna dair bulgularıda mevcuttur^{129,139}. E6 ve E7 genom bölgelerini hedef alan primerler de kullanılabilir. Son dönemde yürütülen bir çalışmada, E7 primer havuzunun oluşturulması için 31 primer kullanılmış olup, bu havuzun geniş spektrumlu olarak HPV tiplerinin belirlenmesinde kullanılması söz konusudur. E7 bölgesindeki homoloji yüzünden bir primer seti 1'den fazla HPV tipini gösterebilmektedir. HPV tip 16 için E7 primer seti çok düşük sensitiviteye sahiptir. Daha iyi sensitivite ve düşük negatif oranlar, L1 ve E6/7 testlerinin kombine biçimde kullanılması ile sağlanabilir.

Hedef DNA bölgesinin PCR aracılığı ile amplifikasyonu sonrası, spesifik HPV tipi belirlenimi; nükleik asit hibridizasyonu, restrüksiyon endonükleaz ve sekanslama ile gerçekleştirilebilir. Nükleik asit hibridizasyonu, HPV tiplendirilmesi açısından en çok kullanılan testtir. Mikroplakta hibridizasyon için, biotin işaretli, amplifiye PCR ürünleri streptavidin kaplı 96 kuyucuklu plaklara yerleştirilir. Bundan sonra immobilize durumda olan fragmanlar denatüre edilir, ardından HPV tip spesifik sekans taşıyan digoksinin işaretli komplementer DNA probları ile inkübe edilir. Kolorometrik reaksiyon final adımdır, plak okuyucusunda optimal yoğunluk belirlenir¹⁴⁰. Line probe assay (LiPA) tekniğinde ise poly(dT) kuyruk DNA proplarının 3' ucuna enzimatik yolla bağlanır ve proplar sonrasında

nitroselüloz üzerinde immobilize hale getirilir, ardından hibridizasyon meydana gelir ve spesifik HPV tipleri bu yolla belirlenebilir. Bu test de ayrıca kolorometrik reaksiyona bağlıdır ve belirli spesifik HPV genotipleri de belirlenebilir. Yapılan birçok çalışma, revers hibridizasyon metotları ile diğer metotlar arasında yüksek değerde kolerasyonun olduğuna dair kanıtlar sunmuştur¹³⁶. Bazı çalışmalar ise, INNO-LiPA testlerinin multiple enfeksiyonlarda SPF₁₀ primerlerinin kullanımına bağlı olarak üretilen kısa PCR ürünleri nedeni ile yüksek sensitiviteye sahip olduklarına dair sonuçlar ortaya çıkarmıştır¹⁴¹. Roche Diagnostic firmasının ürettiği Amplicor HPV testi L1 konsensus biotinli primerleri (165 bp ürün) kullanmaktadır ve Linear Array line blot hibridizasyonun immobilize probalar ile birlikte dizaynı da mevcuttur. Amplicor HPV test 13 HR HPV DNA genotipinin belirlenmesini sağlayabilmekte ve insan beta hemoglobilin genini pozitif kontrol olarak kullanmaktadır^{141,142}. Servikal patolojinin belirlenmesi ve performans amacıyla kullanılan Amplicor HPV testinin sonuçlarını içeren Monsonago ve arkadaşlarının, dizayn ettiği bir çalışmada anormal servikal sitolojiye sahip 270 hasta kolposkopi için değerlendirilmiştir¹⁴³. CIN2+ belirlenmesinde, Amplicor HPV testinin sensitivitesi %95.2 olarak bulunmuştur, spesifite %42.4, NPV %6.7 değerinde hesaplanmıştır, kolposkopi karşılaştırmaları sırasıyla, %96.5, %36.3 ve %97.2'dir. Avrupa'da yapılan bir çalışmada, HC2 (Hybrid capture Assay 2) ve Amplicor HPV testi karşılaştırılmış olup bulunan sonuçların birbirine yakın değerler olduğu sunulmuştur ki Amplicor HPV testinin CIN 3 belirleniminde daha yüksek spesifiteye sahip olduğu ve biraz daha fazla doğruluk içerdiği de belirtilmiştir¹⁴⁴. Buna karşın, otoriteler 2 testin aralarında bulunan az farkın optimal klinik kullanım açısından da farklılıklar yaratacağını belirtmişlerdir. Bu test diğerlerine nazaran biraz daha fazla pahalı olup sadece yüksek yapılı laboratuvarlarda kullanımları olanaklıdır. Klaessen ve arkadaşları, HPV tipini belirleyebilen streptavidin kaplı cam tabaka üzerinde biotin işaretli immobilize HPV problemleri taşıyan bir microarray sistemi geliştirmişlerdir¹⁴⁵. Digoksinin işaretli PCR ürünleri problemler üzerine hibridize edilir, ardından kolorimetrik veya floresan belirleme sistemi kullanılır.

Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) PCR ürünü olan DNA'yı spesifik parçalara ayırabilen restriksiyon endonükleaz enzimlerinin kullanılmasını gerektirir. Her bir endonükleaz farklı uzunluklarda fragmanların oluşmasına neden olur ve spesifik HPV tiplerine ait farklı bant modelleri agaroz jel elektroforezi ile belirlenebilir. Kullanım için seçilen endonükleazın uygunluğu her bir HPV genomunun önceden hazırlanan restriksiyon haritası sayesinde belirlenir ki bu harita sayesinde seçilen endonükleazın amplifiye edilen DNA segmentinde meydana getireceği kesim sayısı da belirlenir. Örneğin, Ras I enzimi 6 farklı HPV tipinin belirlenmesinde kullanılır, enzim 1 (HPV 31) ve 4 (HPV 18) parça kesim

sağlayarak 2 ile 5 arası fragman meydana getirir. Her ne kadar RFLP ucuz olsa da 1'den fazla enzim kullanıldığında oldukça emek isteyen bir süreçtir. Çoklu enzim kesimi fazla sayıda PCR testi gerektirir, bu da her bir örnek için masrafı fazlalaştırır. RFLP'nin manuel bir teknik olmasından kaynaklı olarak her bir deneyde varyasyonlar meydana gelmesi olasıdır ve bu bir dezavantaj olarak değerlendirilir.

Direkt sekanslama, her ne kadar her hasta bazında pahalı bir metot olsa da, PCR ürünleri çerçevesinde değerlendirilebilir ve örneklerin rutin analizi için uygundur¹⁴⁶. Sekans verileri ve veri bankasında bulunan sekanslar arasında homoloji karşılaştırılması BLAST araştırması ile yapılabilir. Direk sekanslamanın en önemli dezavantajı tek örnekte birden fazla olan HPV tiplerinin saptanamaması ile alakalıdır¹³⁴. Bu test metodu oldukça fazla emek yoğunudur ve klinik örneklerde HPV genotiplendirmesi için rutin olarak kullanılamaz.

2.8.3.4. Yeni teknolojiler

Yeni teknolojiler, klinik düzeyde HPV belirlenimi ve tanımlanması için bunun yanı sıra sensitif, hızlı, düşük fiyatlı yeni teknikler geliştirme noktasında tasarlanmaktadır. Bu yeni teknolojilerden bir tanesi olan Luminex xMAP süspansiyon teknoloji ile teorik olarak 100 farklı HPV genotipiniN tip spesifik internal boya taşıyan polistiren mikrobocuklara bağlı oligonükleotidler vasıtası ile tanısı mümkündür. Biotin işaretli PCR ürünleri boncuklara bağlı olan proplar ile hibridize edilmektedir ve ardından Luminex 100 okuyucu ile kantitatif sonuçlar elde edilmektedir. Mikrobocuklar farklı spektral adreslerde sınıflandırılır ve değerlendirme yüzeyde meydana gelen hibridizasyon oranında belirlenir^{147,148}. Hibridizasyon sinyali PCR ürünlerine bağlıdır, dolayısı ile kullanılan primerler de belirleyicidir. Şayet PCR ürünleri çok büyük ise iyi hibridize olmayabilir, çünkü boncuk yüzeyinde sterik direnç meydana gelebilir. GP5/6, MY09/11 ve E7 primerleri tek ve multiple enfeksiyonların belirlenmesinde oldukça verimli sonuçlar doğurmuştur^{149,150}.

FDA Mart 2009'da iki yeni HPV testinin kullanımını onaylamıştır. Her iki invader HPV testi de izotermal sinyal amplifikasyon tekniğine dayanır. PCR ile amplifikasyona gerek yoktur. Cervista HR HPV testi servikal kanser ile ilişkili 14 HR HPV (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 ve 68) tipini tespit eder. Diğer test Cervista HPV 16/18 test spesifik olarak HPV 16 ve 18 tipini tanıır ve HPV genotiplendirmesi için onaylanan ilk HPV testidir. Cervista HPV testleri örnekte yeterli DNA varlığını tespit için internal kontrol de içerir. Böylece örnekteki yetersiz hücreye bağlı yalancı negatif sonuçları minimale indirir. Invader HPV testinin ilk fazında hedef HPV DNA'ya invader prob ve primer prob hibridize olur ve bu

aşamada invader prob hedef DNA ve primer prob arasına girer, invaze olur. Böylece 3'ü arasında tek bazlık bir çakışma meydana gelir, bu yapı cleavase enzimi tarafından tanınır ve enzimin etkisi ile primer probun 5' ucunda flap denen parça ayrışır. Serbest kalan flap testin ikinci fazında floresan rezonans enerji transferi yapan FRET kasetindeki spesifik bölgeye bağlanır ve yine cleavase enzimi etkisi ile floresan molekül işaretli parça ayrışır ve floresan sinyal oluşur. Servikal örnekte aranan HPV tipi bulunmadığında ise hedef DNA ve proplar arasında hibridizasyon ve invaziv yapı oluşmayacağından cleavase enzimi etkisini gösteremez, ayrışma meydana gelmez ve floresan sinyal oluşmaz.

Viral yük, yüksek dereceli servikal lezyon riski ile korelasyon gösterebilmektedir ve hastalığın belirlenmesinde değerli bir gösterge olmaya adaydır. Yüksek viral yük persisten enfeksiyon varlığını belirtir ve hastalığın progresyonu hakkında bilgi verir, düşük viral yük ise enfeksiyonun temizlendiğinin göstergesidir¹⁵¹. Real-Time PCR (RT-PCR) tip spesifik HPV DNA'sını belirlemede kullanılır ve servikal sitoloji örneklerinde viral kopya sayısını belirlemek için en iyi metottur¹⁵². Carcopino ve arkadaşları, RT-PCR testi ile yaptıkları araştırmada HPV16 ve 18 viral yükünün servikal lezyonların ciddiyeti ile ilişkili olduğunu ve servikal lezyonların klinik yönetiminde viral yük tespitinin faydalı olabileceğini bildirmiştir¹⁵³. HC2 testinde, viral yükün semi-kantitatif belirlenimi için kullanılabilir. Buna karşın HC2 testinde viral yükün ölçümünde düşük kopya sayısına bağlı olarak yanlış sonuçlar elde edilebilir, zira düşük viral yük hastalığın progresyonu hakkında bilgi verebilmektedir.

Bilindiği üzere, E6/E7 onkogenlerinin, p53 degradasyonunun devam etmesi için eksprese edilmeleri gerekmektedir. PreTect HPV proofer testi, sadece Avrupa'da ticari olarak mevcut olan bir testtir. Temeli ise, E6/E7 mRNA'sının real-time multipleks nükleik asit sekans bazlı amplifikasyon ve moleküler boncuk propların belirlenmesine dayanmaktadır⁹⁷. İnternal kontrol (İnsan U1 küçük nüklear ribonükleoprotein-spesifik A protein mRNA'sı) RNA degradasyonu sonucu yanlış negatif sonuçlara karşı koruma olarak kullanılır. Pozitif bir HPV-proofer testi E6/E7 integrasyonunun gerçekleştiğinin göstergesidir ve yüksek riskli persistent enfeksiyon barındıran kadınları tanımlar. Molden ve arkadaşları, Norveç'te servikal kanser tarama programı kapsamında ASCUS veya LSIL servikal sitoloji taşıyan 77 kadını 2 yıl süre ile takip etmişler ve çalışma sonucunda Pretect HPV-proofer testi ile pozitif bulunan kadınların negatif bulunan kadınlara nazaran yaklaşık 70 kat daha fazla CIN 2+ olduklarını belirlemiştir. HPV konsensus PCR testleri ile karşılaştırılma yapılmış olup, negatif sonuç alan kadınlara nazaran pozitif sonuç alan kadınların 6 kat daha fazla CIN2+ oldukları sonucu

ortaya çıkarmıştır. Bu çalışmanın bulguları, PreTect HPV-proofer testinin sensitivitesinin PCR'a eşit olduğu ortaya çıkmıştır, fakat daha yüksek spesifiteye sahiptir¹⁵⁴.

2.9. HPV İmmünolojisi

HPV enfeksiyonunun doğal seyri takip edildiğinde gerek doğal gerek ise adaptif immün cevap ile enfeksiyonun giderildiği gösterilmiştir. Birçok kadında enfeksiyonun haftalar hatta günler içerisinde kendiliğinden eradike olduğu bilinmektedir. Bunda en önemli rol ise doğal bağışıklık mekanizmasına aittir. Diğer taraftan bunun aksine, birçok kadında enfeksiyonun eradike olması aylar, hatta yıllar sürebilmektedir ki buna sebep olarak hücre aracılı adaptif immün cevap gösterilmektedir. Doğal immün sistem kompleks olarak patojeni kabul eden bir sitemdir ve buna efektör (inflamasyon ve kemotaksis) mekanizma da dahildir. Doğal immün sistemde en önemli rol dendritik ve makrofaj hücrelerinde bulunan Toll-Like Reseptörlere (TLR) aittir. Bu TLR'ler patojenlerin bir çoğunda bulunan ve patojen ilişkili moleküler modelleri tanıyıp immün cevabın gelişmesini sağlayan önemli reseptörlerdir^{155,156}. TLR aktivasyonu sonucu efektör mekanizma devreye girer ve direkt antiviral etkileri bulunan sitokinlerin üretilmesine aracılık ederler (Tip 1 interferonlar; IFN-alfa ve beta) ayrıca interlökin aracılıklı inflamasyonun başlamasına aracılık ederler (IL-1alfa, IL-1 Beta, IL-6 ve Tümör Nekrosis Faktör), kemotaksisin başlaması (IL-8) da bu süreçle alakalıdır, adaptif immün cevabın gelişmesinde de TLR'lerin rolü söz konusudur. HPV kontrolünde TLR'lerin rolü henüz bilinmemektedir, fakat yapılan in-vitro çalışmalar TLR 9 ve TLR 4'ün başlangıçta patojen kabulünde bir role sahip olduklarına dair ipuçları vermektedir^{157,158}. Diğer doğal immün cevap mekanizmasına; doğal katil hücreler tarafından enfekte olan hücrenin lizis edilmesi, MHC (Major Histocompatibility Complex) sınıf 1 proteinlerinin inhibisyonu ve Tip 1 interferonların sinyal inhibisyonu gibi faktörler de dahildir¹⁵⁹.

Servikal HPV enfeksiyonunun kontrolünde hücre aracılı immünitenin rolü üzerine deneysel kanıtlar; HPV enfeksiyonunun artan persistensi ve immun sistemi baskılanmış vakalarda servikal kanserin yüksek insidansından elde edilmektedir^{160,161}. Her ne kadar HPV'ye karşı hücre aracılı immün cevap birçok değişik yöntemle ölçülse de E6 ve E7 proteinlerine karşı CD4⁺ ve CD8⁺ T hücrelerinin cevabı HPV enfeksiyonunun ve HPV ilişkili hastalıkların hafifletilmesinde en önemli role sahiptir^{162,163}. Son zamanlarda, T-regülatör hücrelerin immün cevap sırasında azalmaları nedeniyle lezyonun ilerlemesinde potensiyel önem taşıdıklarını göstermiştir^{164,165}. E6 ve E7'nin integrasyonu bu onkoproteinlerin ekspresyonunu başlatır. Viral persistens ile birlikte viral integrasyonun olduğu kadınlarda

normal sitolojinin nasıl devam ettiğine dair bilgiler oldukça kısıtlıdır. HPV persistensi olan sağlıklı kadınlarda viral integrasyonun görülmediğine dair birçok çalışma mevcuttur¹⁶⁶. E6 ve E7 proteinlerine karşı gelişen immün kontrolün viral integrasyonu durdurduğu ileri sürülmektedir. Günümüzde ise dikkat özellikle diğer viral proteinlere karşı hücre aracılı immün sistemin ürettiği cevaba verilmektedir ki bunlar viral E2 (viral replikasyon güçlendirici, E6 ve E7 ekspresyonunu kontrol eder), E4 (sitokeratinlere bağlanır, apoptozis blokajına yardım eder), E5 (hücresele proliferasyonu indükler) ve L1 /L2 (major kapsid proteinleri) proteinleridir^{168, 169, 170, 171}.

HPV non-litiktir, dolayısı ile dendritik hücrelerin aktivasyonunu sağlayan pro-inflamatuar sinyalleri oluşturamazlar. Ek olarak, viral proteinler sekrete edilmez, enfekte hücrenin çekirdeğinde eksprese edilirler. Oldukça fazla immünojenik özellik taşıyan kapsid proteinlerinin üretimi, subepitel epitelyumdan ve bazal hücrelerden oldukça uzaklaşmış olan terminal biçimde farklılaşmış dış tabakayla sınırlıdır. Bunun neticesi olarak, L1 ve L2 kapsid proteinlerinin epitelyumda immün sistemle teması oldukça azdır.

HPV immün sistemden kaçmak için birçok mekanizmaya sahiptir. HPV'nin TLR, MCP-1(Monocyte chemoattractant protein-1) ekspresyonunu baskıladığı ve IL-8 ve IFN-alfanın fonksiyonlarını engelleyebildiği bilinmektedir. Ek olarak, HPV tip 16 ve 18'in MHC sınıf II gen ekspresyonunu azalttıkları da bilinmektedir. HPV E5 proteininin endozomlarda aısıdfkasyona yol açtığı ve ayrıca MHC ekspresyon trafiğinin eksositik ve endositik yolunu bozduğu da belirlenmiştir. HPV E7 proteini MHC sınıf I ağır zincir proteini baskılayabilmektedir.

HPV'nin lokal immün cevabı tetiklediğine dair halihazırda kanıtlar mevcuttur. Fakat bu bir sürpriz değildir, çünkü; HPV sistemik enfeksiyon meydana getirmez ve enfeksiyon kapasitesi epitel hücrelerle sınırlıdır. HPV'ye özgü sekretuvar özellikle IgA ve IgG servikal mukozada belirlenebilmektedir. Servikal örneklerden elde edilen sitokinlerden de anlaşıldığı üzere doğal ve adaptif immün cevabın servikal bölgede HPV aracılı olarak arttığı belirlenmiştir¹⁷². HPV'nin ayrıca mukozal hücrelerde immün cevaptan kaçabildiği ve bu cevabı azalttığı da bilinmektedir.

2.10. HPV aşıları

Gardasil^R (Merck &Co.Inc.; Whitehouse Station ,NJ) FDA tarafından kabul edilen koruyucu aşıardan bir tanesidir. Diğer bir aşı ise, Cervarix^R (GlaxoSmithKline Biologicals; rixensart, Belgium) Mart 2007'de FDA tarafından kabul edilmiştir. Bu her iki aşı enfeksiyöz

özellik taşımayan, rekombinant HPV virus benzeri partiküllerden (VLP) üretilmiştir. Bu ikozohedral yapıya sahip partiküller major kapsid proteini olan L1'i içermektedir. Hücrelerde L1 proteininin eksprese edilmesi ile birlikte viral kapsid şekli kendiliğinden meydana gelmektedir. Çünkü VLP kapsid yapısı DNA olmaksızın meydana gelebilmektedir ve dolayısı ile aşının enfeksiyöz özelliği söz konusu değildir. Bu VLP'lerin güçlü sistemik immün cevap meydana getirmeleri mümkün olup, hücre aracılı immünite ve antikorların nötralizasyonunu sağladıkları bilinmektedir^{173,174,175}. HPV 16 L1 VLP partikülü alan kadınların servikal sekresyonunda yüksek titreli spesifik antikorlar bulunduğu tespit edilmiştir¹⁷⁶. Buna karşın, servikal sekresyonda HPV spesifik antikorların lokal sentezden daha çok mikrotravma sonrası transüstasyon veya eksüstasyon vasıtası ile ulaştıkları bilinmektedir.

Gardasil^R dörtlü HPV VLP aşısıdır ve HPV tip 6, 11, 16 ve 18'in VLP'lerini içermektedir. VLP'ler maya hücrelerinde üretilir ve adjuvan olarak alüminyum hidrosksifosfat sulfat içerir¹⁷⁷. Gardasil'in HPV enfeksiyonuna karşı koruyuculuğu, persisten ve prekanseröz lezyon oluşumundaki önleyiciliği üzerine yayınlar henüz yeni yapılmaktadır. Gardasil veya Cervarix'in servikal kanserden koruyuculuğu için süre şimdilik az 5 yıl olarak bildirilmektedir. Çalışmalar aşının HPV enfeksiyonu, persisten HPV enfeksiyonu ve HPV ilişkili vulvar, vajinal ve servikal premalignan hastalıklardan koruma özelliği ile de ilgilidir. Bu çalışmalarda sitoloji ve HPV testi yapılan kadınlar dikkatli bir biçimde takip edilmiştir. Birçok klinisyen açısından birincil ilgi alanı CIN2/3 lezyonlarının azaltılmasıdır. Bu konu ile ilgili iki büyük çalışma dizayn edilmiştir bunlar, FUTURE I ve FUTURE II'dir (The Females United to Unilaterally Reduce Endo-ectocervical Disease). Çalışmaların amacı aşılama periyodunun tamamlanmasından sonra HPV tip 6, 11, 16 ve 18 ilişkili CIN2/3'e karşı korumanın cevaplarını araştırmaktır. Sınırlı zaman diliminde gruplar arasında farklılıkları görmek için seksüel açıdan aktif kadınlar çalışmada tercih edilmiştir. Buna karşın, enfeksiyona maruz kalmayan kadınları bulmak için seksüel partneri sınırlı olan kadınlar gerekmektedir. HPV birçok genç kadın tarafından seksüel aktivitenin başlangıcından sonra 4-5 yıl içerisinde kazanılır ve partner sayısı bu virusa maruz kalma oranını önemli ölçüde etkiler. Sonuç itibarıyla, FUTURE I VE II' deki tüm kriterler bulguların genelleştirilmesi için oldukça sınırlıdır. FUTURE I'de yaşam süresi boyunca 4'den fazla seksüel partneri olan kadınlar bulunmaktaydı ve bu kadınlarda anormal sitoloji, genital siğil veya hamilelikleri söz konusuydu. FUTURE II de ise anormal Pap testi veya genital siğil öyküsü olan kadınlar mevcuttu, yine 4'den fazla seksüel partneri olan kadınlar tercih edildi ve hamilelikleri söz konusuydu. Her iki çalışmada 15-26 yaş arası kadınlar mevcuttu. Karşılaştırma sonrası,

Amerika’da seksüel açıdan aktif olup 4 veya daha fazla seksüel partneri olan kadınların yaş ortalaması 19-21 olarak belirlendi.

Her bir protokol analizi aşuların içeriği bakımından HPV tipleri açısından naif olan kadınları da kapsamakta idi, yine aşılama süresince aşuların kapsadığı HPV tipleri açısından PCR negatif olma durumları da söz konusuydu ve vakaların her üç doz aşığı peryotlara uygun olarak almaları sağlandı (0, 2 ve 6.aylar) 3.dozdan bir ay sonrasına kadar vakalar değerlendirilmedi. Bunun nedeni ise doğru biçimde naif popülasyonun belirlenmesi amaçlı idi. Ayrıca bu sayede popülasyonda henüz seksüel ilişkiye başlamamış olanların doğru yansması da bu yolla sağlandı. Tedavi maksatlı analizler daha büyük grup için veri şeklinde genelleştirildi ki bu gruba enfeksiyona maruz kalmaları PCR ve seroloji ile sınanmış bu yüzden sadece bir veya iki doz aşı almış olan kadınlarda dahil edildi ve ilk aşılamanın ardından vakalar değerlendirilmeye başlandı.

Gardasil verimliliği, HPV tip 6, 11, 16 ve 18 ile ilişkili olan CIN2/3 lezyonlarından korunmada bu HPV tipleri açısından naif olan kadınlarda %100 sonuç vermektedir. Bununda ötesinde siğilleri de içeren vulvar lezyonlardan korunma noktasında da aşının verimliliği %100’e yakındır. Buna karşın, bu HPV tiplerine maruz kalmış, fakat aşılanmış olan kadınlarda CIN2/3’e karşı verimlilik dramatik şekilde düşmektedir. Bir partneri olan, fakat HPV kazanımı açısından yüksek bir oran taşıyan enfeksiyona yakalanma riski yüksek olan vakalarda aşılamanın başarılı bir sonuç için tek şans olduğuna karar verildi.

Çalışmada bulunan diğer bir sonuç ise tüm HPV tipleri açısından CIN 2/3 oluşumunda korunmada aşının aşırı derecede düşük verimliliğe sahip olmasıdır. HPV16 ve 18 dışındaki diğer tiplerin anormal sitolojiye neden olmaya devam edeceği umulmaktaydı. Diğer taraftan, aşının CIN 2/3 vakalarındaki koruyuculuğu %40-50 oranında beklenmekteydi ki bu değer HPV tip 16 ve 18’in neden olduğu kısım olarak lanse edilmişti. Bütün HPV tiplerinin neden olduğu ve her bir protokolda var olan CIN 2/3 oranları veri olarak sağlanmadı.

HPV enfeksiyonuna maruz kalmış gruplarda yapılan birbirine yakın çalışmalarda, spesifik tip için korumanın söz konusu olmadığı söylenmiştir. FUTURE II çalışmasından elde edilen çalışmalar ışığında, HPV tip 16/18 ilişkili CIN2/3 ve *in-situ* adenokarsinom da tedavi maksatlı grup için HPV maruziyeti geçmişi ile birlikte rapor edilmiştir. Bu grupta azalma oranı, şayet kadınların serostatüleri negatif ve DNA pozitif ise 1. günde %10.6 (%95 CI, $<$ %0-46), şayet kadınların serostatüleri pozitif ve DNA pozitiflikleri söz konusu ise 1.günde %1.2 (%95 CI, $<$ %0-35) bulunmuştur. Serostatüleri pozitif olan, fakat DNA negatif özellik taşıyan kadınlarda azalma oranı %100’dür, fakat bu değer istatistik önemi yoktur.

VLP-bazlı aşidan sonra hücrenel aracılı immün cevap artışı tespit edilmiştir, ayrıca hücrenel aracılı immün cevap nötralize edici antikor seviyesi ile doğru orantılıdır. Gardasil ile aşılama CIN lezyonları açısından herhangi bir terapötik yarara sahip değildir. Bu durum sürpriz değildir, çünkü CIN 2/3 lezyonlarında L1 ve L2 protein ekspresyonu pek fazla değildir. Cervarix VLP bazlı bivalent (HPV tip 16 ve 18) aşıdır ve böcek hücrelerinde üretilir, adjuvan olarak alüminyum hidroksit ve 3-deasetile monofosforil lipid A (AS04) kullanılır.

Son zamanlarda, GlaxoSmithKline bivalent aşısının servikal prekanseröz lezyonlar üzerindeki verimliliği ile ilgili Faz 3 çalışmalarına dair birçok veri de mevcuttur.

Analizler CIN2/3 tanısı konulan 23 vaka ile ilgili olarak faz 3 aşamasına dair veriler içermektedir. Merck çalışmalarına benzer olarak, bütün kriterlerin genelleştirilmesi noktasında bir takım sınırlamalar mevcuttur. Çalışmalar 15-25 yaşları arasında 6'dan fazla seksüel partneri olan kadınlar üzerinde yapılmıştır. Kolposkopi öyküsü olan, hamile, otoimmün sorunları olan ve immün yetmezliği bulunan kadınlar çalışmaya dahil edilmiştir. Analizlerde kişiler aşı tipleri için DNA negatif ve seronegatif olarak tespit edilmiş olup, en azından bir kez aşı dozu uygulanmıştır. Bu analiz kuadrivalent aşı çalışmasında benzer duyarlı populasyon özellikleri içermekte olup 1.doz sonrasında hesaplamalar yapılmıştır. Aşı grubunda 9258 kişi bulunup, 9267 kişi ise kontrol grubuna (bu kişiler Hepatit A aşısı olmuşlardır) dahil edilmiştir. HPV tip 16 ve 18 için %99.5 oranında seropozitiflik bulunmuştur ve titreler 7.ayda (en son aşı dozundan 1 ay sonra) doğal enfeksiyona nazaran 200-300 kat daha fazladır (ELISA ile ölçüm yapılmıştır). Bu analizde HPV tip 16 ve 18 ile ilişkili CIN2+ lezyonlara karşı aşı verimliliği %90.4 olarak tespit edilmiştir (%7.9 CI,%47-99). HPV tip 16 ve 18 'in neden olduğu CIN lezyonlarına karşı koruma sırası ile %93.3 (%7.9 CI,%47-99) ve %83.3 (%97.9 CI,%78.8-99.9) olarak belirlenmiştir. FUTURE II çalışma grubu tarafından yayınlanan benzer bir veri de Cervarix'in herhangi bir terapötik değer taşımadığı ile alakalıdır.

Cervarix ve Gardasil'in iyi tolere edildikleri bilinmektedir. Gardasil çalışmalarında, enjeksiyon bölgesi yan etkileri yaygın olan yan etkiler olarak belirlenmiş olup plasebo grubuna nazaran aşı grubunda daha çok rastlanmıştır. Eritema, ağrı ve kaşınma en çok görülen yan etkilerdir. Sistemik yan etkiler ise aşı ve plasebo grubu için benzer oranlardadır. Çalışmalarda ölüm görülmemiş olup; ciddi aşı ile ilişkili yan etkiler aşı ve plasebo grubunda benzer oranlara sahiptir. Spesifik ciddi yan etkiler FUTURE I ve II yayınlarında taslak halinde sunulmuştur^{177,178}. Hamile kadınlar çalışma haricinde tutulmuş olup, çalışma süresince hamile kalmalarına izin verilmemiştir. Buna karşın, yaklaşık 2800 kadın kombine çalışmalar sırasında hamile kalmıştır. Aşı grubundan %66, plasebo grubundan ise %63

oranında bulunan hamile kadınlar sağlıklı doğum yapmıştır. Gardasil aşısı uygulanan kadın ve 114 plasebo uygulanan kadın enjeksiyondan 30 gün sonra hamile kalmıştır. Spontan abortus sırasıyla aşı ve plasebo gruplarda %17 ve %22 oranında meydana gelmiştir, her iki grupta %23 oranında enjeksiyon sonrası hamile kalma söz konusu olmuştur. İnfantlarda görülen anomalilerin aşı veya HPV tip bağlantılı olmadığı belirlenmiştir.

Cervarix'in faz 2b çalışmasında, aşının iyi tolere edildiği ve genel olarak güvenli olduğuna dair veriler elde edilmiştir. Gardasil'e benzer olarak enjeksiyon bölgesi yan etkileri; ağrı, kızarma ve kaşınma olarak belirlenmiş ve oranların aşı grubunda plaseboya nazaran daha fazla olduğu bildirilmiştir. Sistemik veya ciddi yan etki görülen kadınlar ile otoimmün bozukluğu olan kadınların oranı her iki grupta benzer tespit edilmiştir. Ciddi yan etkiler, aşı grubunda %4 oranında, plasebo grubunda ise %5 oranında görülmüştür. Çalışmalarda ölüm gerçekleşmemiştir. Hamilelik ve kongenital anomalilere dair aşı ile ilgili veriler şu an itibarı ile belirgin değildir.

Her iki aşının güçlü sistemik immün cevap ürettiği antikor titreleri ile doğrulanmıştır. Aşının daha fazla immünojenik özellik gösterdiği yaş 9 olarak belirlenmiştir ve bu değer klinik verimlilik çalışmaları ile 15-25 yaş aralığı karşılaştırılarak elde edilmiştir. Enfeksiyon sonrası antikor titrelerinin ölçülmesinin aşının koruma özelliğinin saptanması için gerekli olmadığı belirtilmiştir ki bu durum özellikle HPV'ye karşı antikor içeren servikal kanser vakası kadınlarda kontrol grubu kadınlarına nazaran daha fazladır. Buna karşın, immünizasyon sonrası antikor titreleri de göstermektedir ki doğal enfeksiyon sonrası gelişen antikor titrelerine nazaran aşılama sonrası antikor titresi 60 kat daha fazladır.

Her bir deneyde ölçülen antikor titreleri farklı laboratuvarlarda elde edilmiştir ve farklı protokollere göre dizayn edilmiştir, dolayısı ile spesifik titreleri karşılaştırma mümkün değildir. GlaxoSmithKline şu anda Cervarix ve Gardasil'i benzer immünojenik metod kullanarak beraber çalışmaktadır. Her iki aşı da, vakalarda %98'in üzerinde serokonversiyon oranı bulunmuştur. En yüksek antikor titreleri 3. dozdan 1 ay sonra elde edilmektedir ve 18. aydan itibaren azalma görülmektedir ve titreler bu tarihten sonra stabilize konuma geçmektedir. Cervarix ile indüklenen antikor titrelerinin doğal enfeksiyon sonucu oluşan antikor titrelerine nazaran daha yüksek olduğu ve ayrıca immünizasyon sonrası antikor titrelerinin 5.5 yıl sonra hala yüksek değerde olduğu gösterilmiştir.

FUTURE II çalışması sonrası açıklanan verilerde, 2 yıl sonra HPV6 pozitif bulunanların oranı %96, HPV 11 pozitif bulunan kişilerin oranı %97 ve HPV16 pozitif olan kişilerin oranının %99 olduğu gösterilmiştir. Karşılaştırmada HPV tip 18 açısından pozitif olan kişilerin oranı luminex immünoassay ile %68 olarak belirlenmiştir. Bu antikor

indüksiyonundaki farklılıkların gösterilmesi gerekmektedir. Çünkü HPV enfeksiyonu olan bazı kadınlarda antikör oluşumu söz konusu değildir ve ayrıca aşılanan kadınlardaki antikör titreleri hakkında sorular hala mevcuttur^{177,178}.

2.11. HPV enfeksiyonlarının epidemiyolojisi

HPV, başlıca cinsel yolla, enfekte kişilerin deri veya mukoz membranlarına direk temas ile bulaşır. HPV nadiren vertikal yolla bulaşabilir ve genital HPV enfeksiyonu olan kadınlardan doğum sırasında bebeğe HPV bulaşması yeni doğanda laringeal papilloma oluşmasına sebep olabilir.

HPV enfeksiyonları cinsel yolla bulaşan en yaygın enfeksiyonlardan biridir. Cinsel olarak aktif kişilerin en azından yarısı hayatlarında HPV enfeksiyonuna yakalanır. HPV enfeksiyonu için başlıca risk faktörü cinsel partner sayısıdır. Sigara içme, genç yaş, oral kontraseptif kullanımı ve immun supresyon gibi faktörlerle riskin arttığını destekleyen veriler daha az ikna edicidir.

HPV enfeksiyonları latent, subklinik veya klinik olabilir. Latent enfeksiyonlar moleküler tekniklerle tespit edilebilir. Fakat sitolojik anomali veya klinik belirti göstermez. Subklinik enfeksiyonlar kolposkopi veya mikroskopik inceleme ile patoloji bulunan enfeksiyonlardır. Klinik enfeksiyonlar gözle görülebilen enfeksiyonlardır ve hastanın semptomları olabilir. ABD’de populasyonun %4’ünde sitolojik anomalilere sebep olan latent enfeksiyon, %10’unda subklinik genital HPV enfeksiyonu ve %1’inde de genital siğiller olduğu bildirilmiştir.

HPV ve servikal kanser arasındaki ilişki ilk kez 1977 yılında zur Hausen tarafından bildirilmiştir. HPV bütün dünyada servikal kanser vakalarının %94-99.7’sinde tespit edilmiştir. Kanser epidemiyolojisinde bu ilişki eşsizdir, şimdiye kadar tanınan en büyük ilişkidir.

Servikal kanserde en çok izole edilen yüksek risk HPV 16 ve 18 tipleridir. HPV 16 en yaygın yüksek risk HPV tipidir ve servikal skuamoz hücreli kanserde yaklaşık %55’inde bulunur. İkinci en yaygın yüksek risk HPV 18 olup servikal kanserlerin yaklaşık %16’sında bulunur. HPV 16 ve 18, bütün servikal kanserlerin % 70’inde bulunur. Servikal kanserde HPV tiplerinin dağılımını gösteren yaklaşık 14500 vakanın meta analizinde 8 en yaygın HPV tipi sıklık sırasına göre HPV 16, 18, 33, 45, 31, 58, 52 ve 35 olup dünyada bütün servikal kanserlerin yaklaşık %90’ından sorumludur. Ayrıca, yüksek risk HPV tip 16’nın beş varyantı E (European), As (Asian), AA (Asian-American), Af1 (African 1) ve Af2 (African 2)

tanınmıştır. Bazı varyantların örneğin European varyantların European olmayan varyantlara göre daha onkojenik olduğu bildirilmiştir. Servikal adenokarsinomda ise %56'ya varan oranla HPV 18 en baskın tip olup ikinci sırada HPV 16 izler. HPV 16 ve 18 servikal adenokarsinomaların %82'sinden sorumludur.

Düşük risk tipleri HPV 6 veya 11 condylomata acuminata olarak bilinen genital siğillere sebep olur ve anogenital siğillerin %90'dan fazlasında bulunur. Düşük risk HPV tipleri LSIL'da az bir oranda (%4.3-8.1), HSIL ve invaziv skuamoz karsinomada ise çok nadir bulunur (24, 25). Düşük risk HPV tipleri tekrarlayan respiratuvar papillomatozis (RRP) ile ilişkilidir.

Dünyada kadınlarda HPV enfeksiyon prevalansının %2-44 arasında değiştiği bulunmuştur. HPV prevalanslarındaki bu farklılıklar çalışılan populasyonlar ve kullanılan çeşitli HPV DNA testlerinin moleküler sensitivitesindeki farklılıklar ile açıklanabilir. En yüksek prevalans oranları en sensitif test olan PCR testinin kullanımından gelir. HPV enfeksiyonu için en çok riskte olan grup cinsel olarak aktif genç erişkinlerdir, çünkü epidemiyolojik çalışmalar HPV enfeksiyon prevalansının 18-25 arası genç kadınlarda en yüksek olduğunu göstermiştir. HPV prevalansı yaşın ilerlemesiyle birlikte azalır ve bu bulgu muhtemelen HPV'ye karşı gelişen adaptif immun cevabın sonraki enfeksiyonu önlemesine bağlıdır. Buna karşılık birçok çalışmada 25 yaşından küçük kadınlar arasında HPV prevalansında ilk pik sonrası prevalansta beklenen düşüş olmuştur, ancak sonra ≥ 45 yaş ve üzeri yıllarda ikinci pik takip etmiştir. Bu ikinci pik bir veya fazla tip spesifik immunitenin giderek kaybına bağlı hayatın erken döneminde kazanılan latent enfeksiyonların reaktivasyonu veya hayatın geç döneminde yeni partnerler ile cinsel temasa bağlı yeni enfeksiyonların kazanılmasından kaynaklanabilir.

Yeni yapılan bir meta analizde 78 çalışmanın verileri kullanılarak normal sitolojisi olan kadınlar arasında global HPV prevalansı %10.4 bulunmuştur ve bölgeye göre önemli varyasyon göstermiştir. En yüksek prevalans Afrika'da %22.1 iken Orta Amerika ve Meksika'da %20.4, Kuzey Amerika'da %11.3, Avrupa'da %8.1 ve Asya'da %8'dir. Afrika, Amerika ve Avrupa'da 45 yaş sonrası veya daha ileri yaşlarda belirgin şekilde ikinci pik gözlenmiştir. Sitolojik olarak normal kadınlarda tip spesifik prevalans verileri olan 48 çalışmaya göre en yaygın beş HPV tipi HPV 16 (%2.5), HPV 18 (%0.9), HPV 31 (%0.7), HPV 58 (%0.6) ve HPV 52 (%0.6)'dir (29). Diğer bir çalışmada 11 ülkeden yaklaşık 2500 servikal kanserli kadında toplam HPV DNA prevalansı %94.1 ve kontrol grubunda ise %15.9 bulunmuştur.

HPV 16, hem sitolojik olarak normal kadınlarda hem de servikal kanser vakaları arasında en yaygın tiptir. Ancak servikal kanser, HPV enfeksiyonunun nadir bir komplikasyonudur. Genç kadınlardaki HPV enfeksiyonlarının çoğu, %%70-90'ı geçicidir, genellikle klinik belirti görülmeden 6-12 ay içinde spontan olarak iyileşir. İmmun cevabın etkisiyle virus temizlenir. HPV enfeksiyonlarının eliminasyonundan öncelikle hücrel immunité sorumludur. LR HPV enfeksiyonlarının ortalama süresi 4.3-8.2 ay iken HR HPV tiplerinin daha uzun olup 9.8-13.5 aydır. HR HPV DNA'nın daha uzun süre tespiti ise persisten enfeksiyonun göstergesidir. HR HPV ile persisten enfeksiyon HSIL ve servikal kanser gelişmesi için major risk faktörüdür ve neoplastik değişikliğe doğru ilk adımdır. HPV enfeksiyonu olanların en fazla %1'inde servikal kanser gelişir. Buna karşılık servikal kanser gelişmesi için HPV enfeksiyonu gerekli fakat tek başına yetersiz bir sebeptir. Persisten HR HPV enfeksiyonu olan kişilerde sigara, cinsel aktivitenin erken yaşta başlaması, uzun süreli oral kontraseptif kullanımı, immün yetmezlik, multiparite, çok sayıda cinsel partner olması ve diğer cinsel yolla geçen enfeksiyonların varlığı, genetik predispozisyon gibi uygun kofaktörler varsa prekanseröz lezyonların ileri formları gelişir, erken tanımadığı ve tedavi edilmediği takdirde ortalama 15 yıl sonra servikal kansere ilerler.

HPV servikal kanser dışında diğer anogenital neoplazilerin etyolojisinde de rol alır. Diğer anogenital kanserlerde HPV'nin rolü üzerine çalışmaların sayısı sınırlıdır ve çoğunda birkaç HPV tipi araştırılmıştır. Epidemiyolojik çalışmalarda vajinal ve anal kanserlerinde HPV'nin rolünün servikal kansere benzediği gösterilmiştir. Anal kanserlerde HPV DNA %88-94'ünde tespit edilir. Vajinal kanserlerin %64-91'inde HPV DNA pozitifdir. Penil karsinomada HPV prevalansı %40-45 ve vulvar karsinomada %50'dir. HPV pozitif bütün anogenital kanserlerde şimdiye kadar HPV 16 tespit edilen en yaygın tiptir bunu 18, 31 ve 33 izler.

HPV baş ve boyun skuamoz hücreli kanserlerde önemli bir karsinojendir. Bir derlemede PCR testinin kullanıldığı 60 çalışmadan 5046 baş ve boyun skuamoz hücreli kanserine ait örnekler analiz edilmiştir. HPV prevalansı orofaringeal skuamoz hücreli kanserde oldukça yüksek %35.6, oral kanserde %23.5 ve larings kanserinde %24 olup toplam HPV prevalansı %25.9'dur. HPV 16 orafaringeal kanserlerin çoğunda %86.7, oral kanserin %68.2 ve larings kanserinin %69.2'sinde tespit edilmiştir. HPV 18 tespit edilen ikinci en sık tip olup orafaringeal kanserde %2.8, oral kanserde %34.1 ve larings kanserinde %17 oranında bulunmuştur. Diğer onkojenik HPV'lar baş ve boyun skuamoz hücreli kanserlerde nadiren tespit edilmiştir.

Kutanoz HPV tipleri melanoma olmayan deri kanserleri ile de ilişkilidir. HPV DNA immun sistemi sağlam populusyonda melanoma olmayan deri kanserlerinin %30-50'sinde tanınmıştır, bu oran immun sistemi baskılanmış organ transplant alıcılarında %90'a çıkar. Epidermodisplasia veruciformis'li hastalarda derinin güneşe maruz kısımlarında deri kanseri gelişmesinde HPV 5 ve HPV 8 bir kofaktör olarak davranır.

HPV DNA konjunktivanın benign durumları kadar displazi, karsinoma in situ ve invaziv konjunktiva kanserinde bulunmuştur. Konjunktivanın intraepitelyal neoplazisinde HPV 16 ve 18 DNA ve E6 mRNA gösterilmiştir. Gz konjunktivasının skuamoz hücreli karsinoması nadir bir tmrdr, özellikle HIV enfeksiyonu olanlarda görülür, ultraviyole ışını ve immunsupresyon ile kuvvetle ilişkilidir. İnsanlarda konjunktivada HPV'nin karsinojenitesi için sınırlı delil vardır¹⁷⁹.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Balcalı Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim dalı polikliniğine 2009 Nisan – 2009 Eylül tarihleri arasında Pap testi amacıyla başvuran 122 kadından fırça ile servikal hücre sürüntüsü alınıp fosfat tamponlu tuzlu su (phosphate Buffered Saline; PBS) içerisine konulmuştur. Ayrıca histolojik olarak servikal kanser tanısı almış 27 kadından servikal sürüntü örneği, CIN1 tanılı 18 ve CIN2/3 tanılı 16 parafine gömülü örnek çalışmaya dahil edilmiştir. Daha sonra servikal hücre örnekleri 6000 rpm'de 5 dakika süre ile santrifüj edilip, hücre çökeltisi ependorf tüplerine alınarak 200 µL TE (Tris EDTA) eklenmiştir. Örnekler test edilene kadar -70°C'de saklanmıştır. Daha sonra servikal hücre örneklerinden ve parafine gömülü doku örneklerinden DNA ekstraksiyonu yapıp yeterli DNA varlığını kontrol için beta-globin yönünden PC04 ve GH20 primerlerinin kullanıldığı PCR ile test edildi^{180,181}. HPV DNA varlığı HPV konsensus PCR ile analiz edilmiştir. HPV pozitif bulunan örnekler multipleks floresan PCR testi ile 13 yüksek risk (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 ve 68) ve 2 düşük risk (6 ve 11) HPV genotipi için tiplendirilmiştir.

Her hastanın Pap testi sonuçları ve kolposkopi ile alınan biyopsi sonuçları kaydedilmiştir. Ayrıca çalışma popülasyonunun yaş, eğitim, medeni durumu, sigara kullanımı, oral kontraseptif kullanımı, çocuk sayısı ve gebelik sayısı gibi demografik ve epidemiyolojik faktörler için bilgi formu doldurulmuştur.

3.1. HPV DNA ekstraksiyonu

DNA ekstraksiyonu High Pure Viral Nucleic Acid (Roche; kat. No: 11 858 874 001) kiti kullanılarak üretici firmanın talimatlarına göre aşağıdaki gibi yapıldı.

3.1.1. Çözeltilerin Hazırlanması

Proteinaz K hazırlanışı: Elution buffer (nükleaz olmayan steril distile su) içinde (5 ml), liyofilize 100 mg proteinaz K, çözülerek eritildi. Bu karışım ependorf tüplerinde, 1000 µl'lik hacimlere bölünerek -20 °C de saklandı.

Liyofilize halde bulunan 2 mg poly (A) taşıyıcı DNA 0.5 ml elution buffer ile çözüldü. İyice karıştırıldı ve bu karışım 50 µl'lik hacimlere bölünerek ependorf tüplerinde -20°C'de

saklandı. Çalışma sırasında bu 50 µl'lik karışıma, 2.5 ml binding buffer [6M guanidine-HCl, 10mM Tris-HCl, %20 Triton X-100 (w/v), pH 4.4 (25°C)] eklendi. Binding buffer ve poly(A) karışımı her çalışma sırasında yeniden hazırlandı.

İnhibitor removal buffer'ın 33 ml'sine [5M guanidine-HCl, 20mM Tris-HCl pH 6.6 (25 °C) etanol eklendikten sonraki konsantrasyonu], 20 ml saf etanol eklendi.

Wash buffer, [2X10 ml, 20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl, pH 7.5 (25 °C) etanol eklendikten sonraki konsantrasyonu] 40 ml saf etanol ile karıştırıldı.

3.1.2. Ekstraksiyon aşamaları

1. Saklanan 200µl'lik sürüntü örneğine 2.5 ml binding buffer ve 50µl Poli A karışımından 200 µl alınıp örneklerin bulunduğu ependorf tüplerine eklendi. Ayrıca her bir örneğin üzerine 50 µl proteinaz K (20 mg/ml) eklenip vortekslendi ve 72°C'de 10 dakika inkübe edildi. Ksilen ile parafini uzaklaştırılan doku örneklerine de aynı işlem yapıldı.
2. İnkübasyondan sonra kapakta sıvı kalmaması için kısa süreli santrifüj edildi. Üzerine 100µl binding buffer eklendi.
3. Kit içerisindeki toplama kapları ve filtrelili tüpler iç içe geçirilerek birleştirildi.
4. Örneklerin bulunduğu ependorf tüpündeki karışım, hazırlanan toplama kapları içerisine aktarıldı ve 15 saniye vortekslendi ve 8000 X g'de 1 dakika santrifüj edildi.
5. Santrifüj sonrası, toplama kabı atıldı. Filtre tüpleri yeni toplama kaplarına yerleştirildi.
6. Üzerine 500 µl inhibitor removal buffer eklenip 8000 X g'de 1 dakika santrifüj edildi.
7. Santrifüj sonrası toplama kabı atıldı. Filtre tüpleri yeni toplama kapları üzerine yerleştirildi.
8. Üzerine 450 µl Wash Buffer eklendi ve 8000 X g'de 1 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası toplama kabı atıldı. Filtre tüpleri yeni toplama kapları üzerine yerleştirildi. Bu basamak toplam iki kez yapıldı.
9. Bu işlemten sonra 13000 X g'de 10 saniye santrifüj edildi. Santrifüj sonrası toplama kabı atıldı. Filtre tüpleri 1.5 ml'lik ependorf tüplerine yerleştirildi.
10. Üzerine 50 µl Elution Buffer eklendi ve 8000 X g'de 1 dakika santrifüj edildi.
11. Ependorf tüp içindeki filtre tüpü atıldı ve daha sonra bu tüpler -70°C'de saklandı.

3.2. Konsensus PCR ile HPV DNA amplifikasyonu

Bütün örnekler HPV DNA analizinden önce ekstrakte edilen DNA'nın yeterliliğini kontrol etmek amacıyla PC04 (CAACTTCATCCACGTTCCACC) ve GH20 (GAAGAGCCAAGGACAGGTAC) primerleri ile hücrel beta-globin varlığı yönünden araştırıldı ve 268 bp'lik beta-globin geni pozitif bulunan örnekler HPV-DNA yönünden test edildi^{180,181}.

Primerler: Örnekler önce MY09 ve MY11 primerleri kullanılarak HPV-DNA'nın L1 geni içinden 450 baz çifti (bp) uzunluğundaki bölge amplifiye edildi^{182,183}. HPV DNA negatif bulunan örnekler, GP5+/6+ primerleri ile HPV DNA'nın 450bp'lik bölgesinden 150 bp uzunluğundaki bölge tekrar amplifiye edildi¹⁸².

MY 09: 5' - CGT CCM ARR GGA WAC TGA TC - 3'

MY 11: 5' - GCM CAG GGW CAT AAY AAT GG - 3'

GP 5+ : 5' - TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC - 3',

GP 6+ : 5' - GAAAAATAAACTGTAAATCATATT - 3', primerleri kullanıldı.

Amplifikasyon 10x PCR Buffer [100 mM Tris-HCl (pH 8.8), 500 mM KCl], 1.5 mM MgCl₂, herbir dNTP'den 200 µM, her bir primerden 50 pmol (1pmol/ µl), 2U *Taq* polymerase (Fermentas) ve 5 µl ekstrakte edilen örnek DNA'sı içeren toplam 50 µl PCR karışımında gerçekleştirildi. Her PCR testinde 13 örnek, 100 bp'lik DNA marker, bir pozitif kontrol ve bir negatif kontrol örneği çalışıldı.

HPV MY09/11 konsensus PCR, 95°C de 5 dakika süren ön denatürasyonu takiben aşağıda belirtilen sıklulardan oluşmuştur.

95°C de	(denatürasyon)	1 dakika	} 35 siklus
55°C de	(bağlanma)	1 dakika	
72°C de	(uzama)	1 dakika	

Son elongasyon için örnekler, 72°C de 7 dakika bekletildi.

HPV GP5+/6+ nested PCR için MY09/11 PCR ürününün 2 ul'si kullanıldı ve 95°C'de 5 dakika süren ön denatürasyonu takiben aşağıda belirtilen amplifikasyon siklusu uygulandı.

95°C de	(denatürasyon)	1 dakika	} 40 siklus
45°C de	(bağlanma)	1 dakika	
72°C de	(uzama)	1 dakika	

Son elongasyon için 72°C de 7 dakika bekletildi.

DNA ekstraksiyonu, PCR ana karışımının hazırlanması ("master mix") ve örneklerin ana karışıma eklenmesi izole edilmiş 3 ayrı odada yapıldı. PCR kontaminasyonunu

engellemek için reagenler, küçük hacimlerde tüplere bölündü. Aeresol bariyerli pipet uçların kullanımı, eldivenlerin sık sık değiştirilmesi ve yüzeylerin dekontaminasyonu için UV ışık ve sodyum hipokloritle silinmesi gibi kontaminasyona karşı genel önlemler alındı.

3.3. Amplifiye edilen PCR ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezinde gösterilmesi

Amplifikasyon ürünleri etidyum bromürlü % 2'lik agaroz jel elektroforezi ile araştırıldı. Hem tank tamponu olarak, hem de agaroz jelinin hazırlanmasında TAE tamponu kullanıldı. TAE (Tris, Asetat, EDTA) konsantre şeklinde (40xTAE) stok solusyon olarak hazırlandı ve gerektiğinde 1xTAE olacak şekilde sulandırıldı.

40xTAE tamponunun hazırlanması;

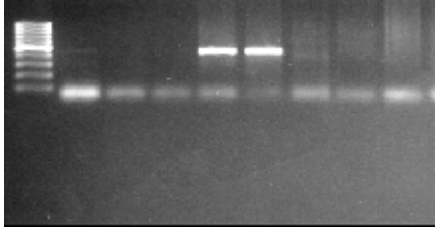
38.72 gr	Tris-Base (1.6 M) (Sigma)
21.78 gr	Na Asetat x3 H ₂ O (0.8 M)
3.04 gr	EDTA (40 M) (Sigma)

eritilip distile su ile 200 ml'ye tamamlandı (pH: 7.2). Daha sonra;

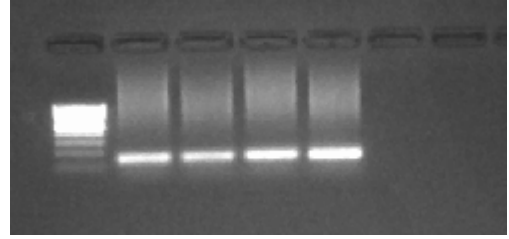
1. Elektroforez için kullanılan tampon 1xTAE solüsyonu elde etmek için 40x TAE solüsyonu distile su ile dilüe edildi.
2. Eridiğinde % 2'lik jel oluşturacak şekilde agaroz tartılıp bir balon içerisine konuldu.
3. Üzerine 1xTAE tamponu ilave edilerek mikrodalga fırında eritildi.
4. Bir süre 60°C'nin altına düşmeyecek şekilde soğutuldu.
5. İçerisine 100ml'lik jel için 5 µl etidyum bromid (10 mg/ml'lik stok) eklenerek karıştırıldı.
6. Jel, önceden hazırlanmış ve tarakları uygun olarak yerleştirilmiş kalıp tepsisinin üzerine yavaşça döküldü.
7. Oda sıcaklığında 20-30 dakika bekletilerek katılaşması sağlandı.
8. Jel kalıbı tanka (OWL Separation Systems Model B2 Mini Gel Electrophoresis System) yerleştirilerek taraklar yavaşça çıkarıldı.
9. Örneklerden 10'ar µl alınarak 1µl yükleme tamponu (%20 sükröz, %0.25 brom fenol mavisi (1xTAE ile hazırlanmış)) ile karıştırılarak, açılan her kuyuya bir örnek olacak şekilde konuldu. İlk kuyuya 100 bp'lik (Fermentas) DNA markeri yüklendi.
10. Tankın güç kaynağı (LABNET International Power Station 300) çalıştırılarak 100 V akım verildi.
11. Brom fenol mavisinin migrasyonu takip edilerek jelin 2/3'lik kısmına ulaştığında elektroforez durduruldu.

Jel tanktan çıkarıldı ve jel görüntüleme sistemi (DNR Bio-Imaging Systems Visible & Ultraviolet Transilluminator, MiniBIS Bio-Imaging System) ile görüntülenerek incelendi.

Şekil 4.1. HPV PCR ürünlerinin % 2'lik agaroz jelde gösterilmesi



A) MY09/11 primerleri ile 450 bp'lik L1 gen bölgesinin görünümü.



B) GP 5+/6+ primerleri ile 150 bp'lik L1 gen bölgesinin görünümü.

3.4. HPV'un multipleks floresan PCR testi olan f-HPV typing Kit ile genotiplendirilmesi

F-HPV typing Kit (Molgentix, Barcelona, Spain) ile 15 farklı HPV tipine ait olan E6 ve E7 gen bölgelerinin amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir. Örneklerden ekstrakte edilen DNA HPV tip 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 ve 68 ile ve internal kontrol olarak insan STR (Short Tandem Repeat) gen bölgesini hedefleyen floresan ile işaretli 16 primer kullanılarak amplifiye edildi. STR geninin tespiti örneklerdeki DNA yeterliliğini ve PCR inhibitörlerini kontrol eder. F-HPV typing Kit ile 5 farklı floresan boya kullanılarak DNA fragman analizi yapılmaktadır. Florokrom olarak; 6-FAM, VIC, NED ve PET; standart boy için GeneScan 500 LIZ boyası ile birlikte kullanılır. Floresan ile işaretli PCR ürünleri ABI (Applied Biosystems) 3130 genetic analyzer cihazında kapiller elektroforez ile analiz edildi.

Multipleks PCR testinin spesifitesini artırmak için Hot Start Taq DNA polimeraz kullanılmıştır. Enzim oda ısısında tamamen inaktif konumdadır. Bu sayede yanlış primer bağlanmaları engellenmiş olur. Enzim aktivasyonu için PCR siklusundan önce 95°C'de 15 dakika bekletmek gereklidir.

PCR protokölü; PCR miksi ve primerler birkaç saniye süre ile vortekslendi. Her bir PCR tüpüne 12,5 ul PCR mix, 7.5 ul primer mix, 5 ul ekstrakte edilen DNA örneği eklenerek son hacim 25 ul oldu.

PCR tüpleri thermalcycler cihazına yerleştirildi ve kapak kapatılarak PCR işlemi başlatıldı, PCR karışımı Taq polimeraz aktivitesi için 95°C'de 15 dakika bekletildi ve ardından amplifikasyon için 35 siklus olmak üzere 95°C' de 30 sn denatürasyon, 64°C'de 30 sn annealing ve 72°C'de 30 sn extension'dan sonra 60 °C'de 10 dk süre ile final extension işlemi tamamlandı. Final sıcaklık ise 4°C'ye ayarlandı.

PCR ürünleri kapiller elektroforez için hazırlandı.

Elektroforez Protokolü;

1-1.5 ml tüp içerisine 20 ul Hi-Di formamide (ABI PIN 4311320) ve 0.3 ul GeneScan -500 LIZ eklendi

2- Bu karışımın 20 ul'si ile 2 uL PCR ürünü karıştırıldı.

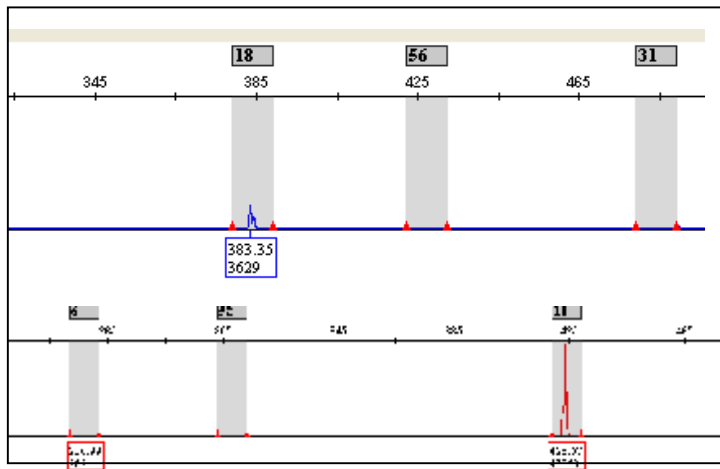
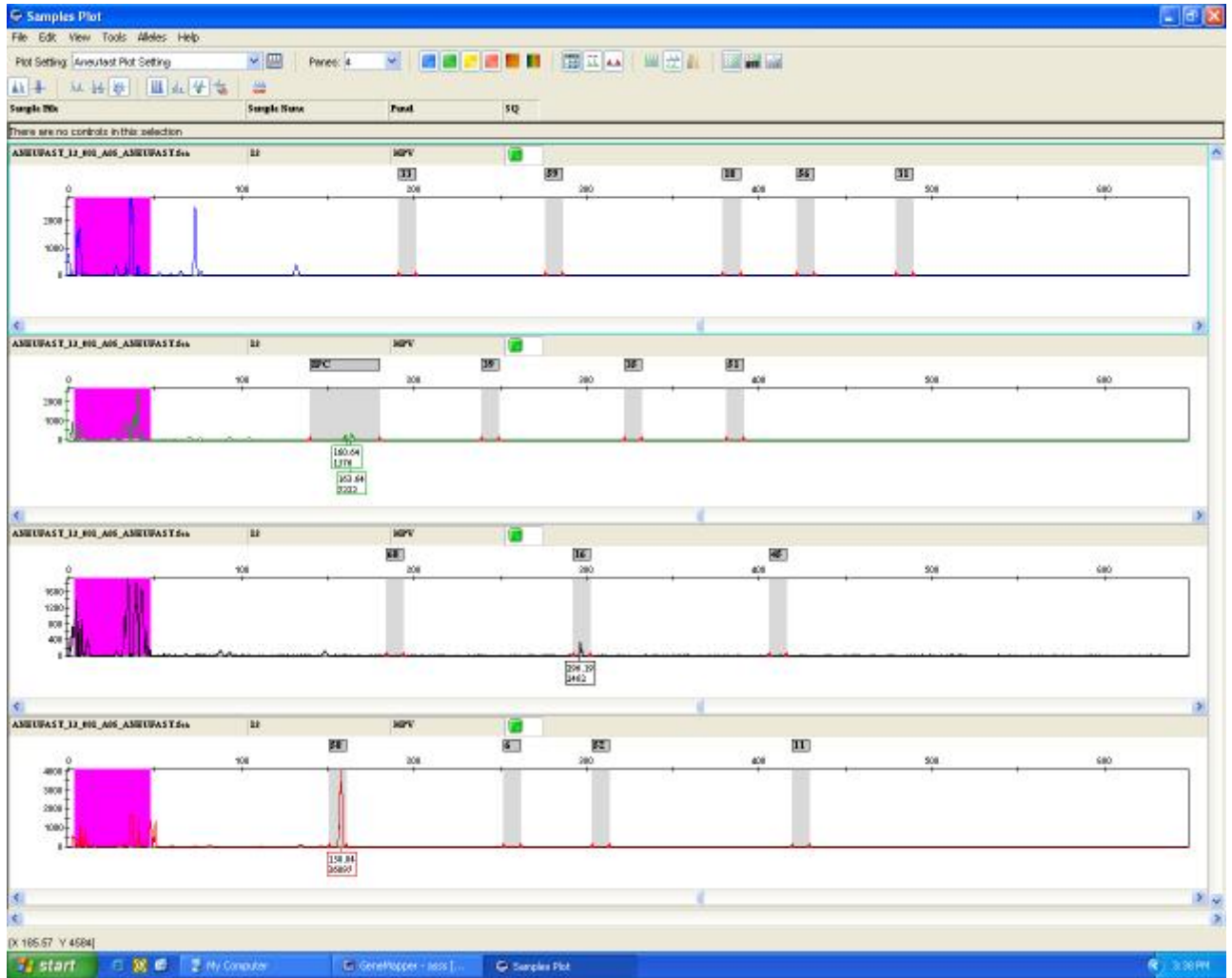
3- Ardından örnekler 96- kuyulu mikroplaklara konuldu ve 2 dk süre ile 95° C'de denatüre edildi.

4- Kullanıcı kılavuzu yönlendirmesine göre örnekler genetik analiz cihazına yüklendi.

F-HPV typing Kit 36 cm boyundaki kapillerde oldukça iyi ayrışan 156-489 bp aralığında amplikonlar sentezlenmektedir. Veriler software programı ile toplandı. Her bir HPV tipinin amplikonları büyüklük ve renk bakımından farklı olduğundan kolaylıkla ayırt edildi. FAM, VIC, NED ve PET gibi farklı florokromların kullanılmasından dolayı bu renkleri taşıyan amplikonlar sırası ile mavi, yeşil, sarı-siyah ve kırmızı renkte elektroforetogramda pikler verdi. Standart boy için LIZ boyası (turuncu) kullanıldı ve F-PCR ürünleri ile birlikte elektroforezi yapıldı. HPV pozitifliği tipe bağlı olarak pikin büyüklük ve renk bakımından farklılığı ile belirlendi. Tek pikin varlığı tek HPV tipinin göstergesi olup, 2 veya daha fazla pik mevcut ise miks enfeksiyon varlığı söz konusudur.

HPV negatifliği ise HPV tip spesifik pikin olmaması ile tespit edildi. Buna karşın negatif sonuç için internal kontrolün heterozigot/homozigot modelinin pik varlığı kesinlikle şarttır.

Şekil 4.2. HPV PCR ürünlerinin genetik analiz cihazında görüntülenmesi.



HPV18

HPV11

4. BULGULAR

Çukurova bölgesinde servikal kanser ve prekanseröz lezyonları olan kadınlarda onkojenik HPV genotiplerinin dağılımını tespit için 27 servikal kanser, 18 CIN1 ve 16 CIN2/3 tanılı kadın ve kontrol grubu olarak 122 normal servikal sitolojili kadına ait örnekler çalışmaya dahil edildi

Toplam 122 normal servikal sitolojili kadın ve 61 servikal kanser ve prekanseröz lezyonları olan kadına ait örnekler beta globin primerleri ile incelendikten sonra hepsinde yeterli DNA varlığı tespit edildi.

MY09/11 primerlerinin kullanıldığı konsensus PCR testi sonrası servikal kanser tanılı 27 örneğin 14'ü pozitif bulunurken, 13'ü negatif bulundu. Negatif bulunan 13 örnek GP5+/6+ primerleri ile tekrar amplifiye edildiğinde 11 örnekte HPV DNA varlığı tespit edildi. Böylece toplam 27 örnekten 25'i (%92.5) HPV DNA pozitif bulundu. CIN2/3 tanılı 16 örneğin 13'ünde (%81.2) ve CIN1 tanılı örneğin 12'sinde (%66.6) HPV DNA pozitif tespit edildi. Kontrol grubu olarak seçilen 122 kadından 8'i (%6.5) HPV DNA pozitif bulundu (Tablo 5.1).

Tablo 5.1. Servikal kanser, CIN1, CIN2/3 ve kontrol grubunda HPV prevalansı.

	MY09/11 PCR	GP5+/6+ PCR	Toplam	%
Servikal kanser (27)	11	14	25	92.5
CIN2/3 (16)	5	8	13	81.2
CIN1 (18)	6	6	12	66.6
Kontrol grubu (122)	3	5	8	6.5

Servikal kanser grubunda HPV tip 16 prevalansı %66.6 (18/27), HPV tip 18 %11.1 (3/27) ve HPV tip 31, 58, 59, 68 tiplerinin her biri ise %3.7 (1/27) oranında tespit edildi. Toplam 16 CIN2/3 örneğinde ise 9'u (%56.2) HPV tip 16, 2'si (%12.5) HPV tip 18, 2'si (%12.5) HPV 6 olup, HPV 45, 51, 52, 58 ve 11 tipleri 1'er örnekte %6.2 (1/16) oranında bulundu. CIN1 grubunda ise HPV tip 59 %22 (4/18), HPV tip 16 %16.6 (3/18), HPV tip 11 %11.1 (2/18) ve HPV tip 18, 31, 35'in her biri ise %5.5 (1/18) oranlarında gözlemlendi. Kontrol grubunu oluşturan 122 kadından 3'ünde %2.4 HPV tip 16, 2'sinde HPV tip 18 %1.6 ve 1'er vakada da (%0.8) oranlarla HPV 11, 31, 58 ve 59 tespit edildi. Bütün çalışma gruplarında toplamda 12 farklı HPV tipi tespit edilmiş olup bunlardan 10 tip HR HPV (HPV16, 18, 31,

35, 45, 51, 52, 58, 59 ve 68) ve diğer 2 tip ise LR HPV tipleri (HPV 6, 11) olarak belirlendi (Tablo 5.2).

Multiple HPV enfeksiyonları servikal kanser vakalarında %7.4 (2/27), CIN2/3 vakalarında %31.2 (5/16) ve CIN1 vakalarında %27.7 (5/18) oranlarında bulundu. Kontrol grubunda ise sadece bir vakada %0.8 (1/122) oranında multiple enfeksiyon vardı (Tablo 5.2).

Tablo 5.2. Servikal kanser, CIN1, CIN2/3 ve kontrol gruplarında HPV tiplerinin dağılımı

HPV tipleri		16 No	18 No	31 No	35 No	45 No	51 No	52 No	58 No	59 No	68 No	6 No	11 No	Multiple No
Servikal kanser	27	18 %66.6	3 %11.1	1 %3.7	-	-	-	-	1 %3.7	1 %3.7	1 %3.7	-	-	2 %7.4
CIN2/3	18	9 %56.2	2 %12.5	-	-	1 %6.2	1 %6.2	1 %6.2	1 %6.2	-	-	2 %12.5	1 %6.2	5 %31.2
CIN1	16	3 %16.6	1 %5.5	1 %5.5	1 %5.5	-	-	-	-	4 %22	-	-	2 %11.1	5 %27.7
Kontrol	122	3 %2.4	2 %1.6	1 %0.8	-	-	-	-	1 %0.8	1 %0.8	-	-	1 %0.8	1 %0.8

CIN1 grubunda HPV DNA pozitif bulunan 12 örneğin 4'ü (%33.3) HPV 59. 3'ü (%25) HPV 16.2'si (%16) HPV 11 ve 1'er örnekte (%8) HPV 18, 31 ve 35 tespit edildi. CIN2/3 grubunda ise HPV DNA pozitif bulunan 13 örneğin, 9'u (%69.2) HPV 16. 2'si (%15.3) HPV 18, 2'si HPV tip 6 (%15.3) ve 1'er vaka (%7,6) HPV 45, 51, 52, 58 ve 11'dir. Servikal kanser vakalarında HPV DNA pozitif bulunan 25 örneğin 18'i (%72) HPV tip 16, 3'ü (%12) HPV 18 ve 1'er vaka (%0.4) HPV 31, 58, 59 ve 68'dir. Asemptomatik çalışma grubunda HPV DNA pozitif bulunan 8 örneğin 3'ü HPV tip 16 (%37), 2'si (%25) HPV tip 18 ve 1'er vaka (%12.5) HPV tip 59, 18, 31 ve 11'dur.

Tek veya miks enfeksiyonlar şeklinde HPV16 ve HPV18 pozitifliği 27 servikal kanser vakasından %74'ünde (20/27), CIN2/3 örneklerinde %62.5 (10/16) ve CIN1'de %22.2 (4/18) oranında idi.

Servikal kanser grubunda pozitif bulunan HPV tiplerinin hepsi (%92.5) HR HPV tipi olup buna karşın CIN2/3 grubunda ise 10 örnekte (%62.5) HR HPV tipi, 2 örnekte (%12.5) LR HPV tipi ve 1 örnekte LR ve HR HPV tipi ile multiple enfeksiyon gözlemlendi (Tablo 5.3).

CIN1 grubunda ise 10 örnekte (%55.5) HR HPV tipi, 1 vakada (%5.5) tek başına LR HPV ve 1 vakada da HR HPV tipi ile birlikte LR HPV tipi tespit edildi. Kontrol grubunda sadece 1 vakada (%0.8) LR tipi tek başına bulundu (Tablo 5.3).

Tablo 5.3. Çalışma gruplarında HR HPV ve LR HPV tiplerinin dağılımı.

	HR HPV		LR HPV		LR+HR HPV		Toplam	
	No	%	No	%	No	%	No	%
Servikal kanser (27)	25	92.5	-	-	-	-	25	92.5
CIN2/3 (16)	10	62,5	2	12.5	1	6.2	13	81.2
CIN1 (18)	10	55.5	1	5.5	1	5.5	12	66.6
Kontrol grubu (122)	7	5,7	1	0.8	-	-	8	6.5

Kontrol grubunda yer alan kadınlar 25-72 yaş aralığında olup, servikal kanser ve prekanseröz lezyonları olan kadınlarda ise 30-65 yaş aralığında idi.

Normal servikal sitolojili kadınlar ve servikal kanser grubuna ait yaş, medeni hal, eğitim durumu, sigara, oral kontraseptif kullanımı, çocuk sayısı ve gebelik sayısı gibi demografik özellikler Tablo 5.4 ve Tablo 5.5’de verildi. Servikal kanser serisinde HPV DNA pozitifliği ile evli ve boşanmış, eğitim durumu düşük ve yüksek, sigara kullanan ve kullanmayan, oral kontraseptif kullanan ve kullanmayan, çocuk sayısı ve gebelik sayısı arasında farklılık bulunmadı. Normal servikal sitolojili kadınlarda ise HPV DNA pozitifliği sigara kullananlarda (%25), kullanmayanlara (%2) göre ve oral kontraseptif kullananlarda (%100) kullanmayanlara (%3.3) göre daha yüksek bulundu. Kontrol grubunda HPV DNA prevalansı %15.4 oranla 25-29 yaş grubunda en yüksek iken 30-39 yaş grubunda %9.5, 40-49 yaş grubunda %4 ve 50-59 yaş grubunda %6.2 oranlar ile 30 yaş ve sonrası azalma gözlemlendi.

Tablo 5.4: Normal servikal sitolojili kadınların demografik bilgileri

	Çalışma grubu		HPV DNA pozitif	
	Sayı	Yüzdesi	Sayı	Yüzdesi
Yaş				
25-29	13	%9	2	%15.4
30-39	21	%17	2	%9.5
40-49	48	%39	2	%4
50-59	32	%26	2	%6.2
>60	8	%9	-	-
Medeni Hal				
Evli	109	%89	7	%6.4
Boşanmış	13	%11	1	%7.6
Eğitim Durumu				
Yok	31	%25	3	%9.6
İlköğretim	62	%50	5	%8
Lise	20	%16	-	-
Üniversite	9	%9	-	-
Sigara				
Evet	24	%19.6	6	%25
Hayır	98	%80.4	2	%2
OKS kullanımı				
Evet	3	%2	3	%100
Hayır	119	%98	4	%3.3
Çocuk Sayısı				
2	18	%14	1	%5.5
2-4	43	%35	2	%4.1
>4	61	%51	5	%8.1
Gebelik Sayısı				
2	12	% 9.8	1	%8
2-4	45	%36.9	1	%2
>4	65	%53.3	6	%9

Tablo 5.5: Servikal kanserli popülasyonun demografik bilgileri

	Çalışma grubu		HPV DNA pozitif	
	Sayı	Yüzdesi	Sayı	Yüzdesi
Yaş				
25- 29	5	%18.51	-	-
30-39	2	%7.4	2	%100
40-49	7	%25.9	7	%100
50-59	10	%37	18	%90
>60	3	%11.1	3	%100
Medeni Hal				
Evli	19	%70.4	17	%89
Boşanmış	8	%29.6	8	%100
Eğitim Durumu				
Yok	6	%22.3	6	%100
İlköğretim	17	%62.9	15	%88
Lise	2	%7.4	2	%100
Üniversite	2	%7.4	2	%100
Sigara				
Evet	6	%22.2	5	%83
Hayır	21	%87.8	20	%95
OKS Kullanımı				
Evet	1	%3.7	1	%100
Hayır	26	%96.3	24	%92.3
Çocuk Sayısı				
2	5	%18.5	5	%100
2-4	10	%37	8	%80
>4	12	%44.5	12	%100
Gebelik Sayısı				
2	3	%12.1	3	%100
2-4	10	%37	10	%100
>4	14	%50.9	12	%85

5. TARTIŞMA

Servikal kanser bütün dünyada kadınlar arasında en yaygın görülen ikinci kanser olup her yıl yaklaşık 500.000 yeni servikal kanser vakası tanınmakta ve vakaların yaklaşık %50'si kaybedilmektedir. Yeni servikal kanser vakalarının %80'den fazlası gelişmekte olan ülkelerde görülür. Gelişmekte olan ülkelerde servikal kanser kadınlardaki kanserlerin %15'ini oluştururken gelişmiş ülkelerde yeni kanser vakalarının sadece %3,6'sını oluşturur¹⁸⁴. Servikal kanser insidansı gelişmekte olan ülkelerde oldukça yüksek, her 100.000'de genellikle 30'un üzerinde iken Avrupa'da 100.000'de 9-14.5 arasındadır. Ülkemizde ise daha düşük yılda 100.000'de 4.5'dur^{185,186,187}.

HPV benign lezyonlardan neoplaziye kadar değişen çeşitli hastalıklarla ilişkili epitelotropik bir virustur. HPV ilk olarak kutanöz siğillerin sebebi olarak tanınmıştır. HPV bütün dünyada servikal kanserin primer etyolojik ajanı olarak kabul edilmektedir. HPV ve servikal kanser arasındaki ilişki ilk kez 1977 yılında zur Hausen tarafından bildirilmiştir. HPV ile ilişkili diğer tümörler vajinal, vulvar, penil ve anal kanser, larings kanseri, orafaringeal kanser ve nonmelanoma deri kanseridir. Böylece HPV'un bütün kanserlerin %5'inden sorumlu olduğu tahmin edilmektedir. HPV ayrıca benign tümörlerden deride yaygın siğiller, anogenital siğiller, oral papilloma, faringeal papilloma konjunktival papilloma ve tekrarlayan respiratuvar papillomatozise sebep olur.

HPV'un servikal kanserin gelişmesi için gerekli en önemli etken olduğu bilinmektedir. HPV zarfsız, ikosahedral kapsidi olan sirküler çift sarmallı bir DNA virusu olup papillomaviridae ailesinde yer alır. Papillomaviridae ailesinde alfa, beta, gama, mu ve nu olmak üzere beş genus bulunur. Klinik olarak en önemli ve en büyük grup olan alfa papilloma genusunda mukozal lezyonlar ile ilişkili mukozal HPV tipleri ile deride yaygın siğillere sebep olan HPV 2 gibi kutanoz tipler bulunur. Diğer genuslardaki HPV tipleri deriyi enfekte eder. HPV genomu içinde en iyi korunan bölge olan L1 geninin DNA dizisine göre şimdiye kadar 100'den fazla HPV tipi belirlenmiştir ve keşif sırasına göre numaralandırılmıştır. Anogenital mukozayı enfekte eden 40'dan fazla HPV genotipi bulunur ve servikal kanser ile ilişkilerine göre yüksek risk (HR) ve düşük riskli (LR) HPV tipleri olarak sınıflandırılır. Yüksek riskli HPV tipleri olarak bilinen 15 HPV tipi HPV 16, 18 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 ve 82'dir. HPV 26, 53 ve 66 muhtemel yüksek riskli tipler olarak tanınır. Buna karşılık, HPV 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72 ve 81 gibi diğer

genotipler düşük riskli HPV tipleri olup benign lezyonlara sebep olur. Bununla birlikte, bazı genotipler ile ilgili veriler sınırlıdır ve durumu belirsizdir. Yüksek riskli ve düşük riskli HPV genotipleri arasında ayırım yeni bilgilerin elde edilmesiyle revizyona uğrayabilir ve bazı HPV tiplerinin onkojenite tanımını zamanla değiştirebilir.

HPV servikal kanserin primer sebebi olmasının yanısıra cinsel yolla bulaşan en yaygın viruslardan biridir. Cinsel olarak aktif kişilerin en azından yarısı hayatlarında HPV enfeksiyonuna yakalanır. Kadınlarda HPV enfeksiyon prevalansı %2-44 arasında değişir. HPV enfeksiyon prevalansı genel olarak 20-24 yaş arası genç kadınlarda en yüksektir ve bağışıklık oluşmasıyla ilerleyen yaş ile birlikte azalma gözlenir. Bir meta-analiz çalışmasında dünyada normal servikal sitolojisi olan kadınlarda HPV DNA prevalansı ve genotip dağılımı araştırılmış ve HPV prevalansı %10.4 bulunmuştur. HPV prevalansı Afrika, Orta Amerika ve Meksika'da nispeten yüksek (yaklaşık %20-30) ve Kuzey Amerika, Avrupa, ve Asya'da daha düşük (yaklaşık %8-11) tespit edilmiştir. Genel olarak, en yaygın HPV tipleri HPV-16, HPV-18, HPV-31 HPV-58 ve HPV-52'dir¹⁸⁸.

Genç kadınlarda görülen HPV enfeksiyonlarının çoğu geçicidir ve genellikle klinik belirtiler görülmeden %70-90'ı 1-2 yılda kendiliğinden iyileşir. HPV enfeksiyonlarının %10'undan azında ise persisten HR HPV enfeksiyonu gelişir. Persisten HR HPV enfeksiyonu HSIL ve servikal kanser gelişmesi için major risk faktörüdür ve neoplastik değişikliğe doğru ilk adımdır. HR HPV DNA'nın 12 aydan daha uzun süre tespiti persisten enfeksiyonun göstergesidir. HPV enfeksiyonu olanların %1'inden azında servikal kanser gelişir. Bu durum HPV enfeksiyonlarının kontrolünde immün cevabın oldukça etkili olduğunu gösterir. Buna karşılık servikal kanser gelişmesi için HR HPV enfeksiyonu gerekli fakat tek başına yetersiz bir sebeptir. Persisten HR HPV enfeksiyonu olan kişilerde sigara, cinsel aktivitenin erken yaşta başlaması, uzun süreli oral kontraseptif kullanımı, immün yetmezlik, multiparite, çok sayıda cinsel partner olması ve diğer cinsel yolla geçen enfeksiyonların varlığı ve genetik predispozisyon gibi uygun kofaktörler varsa prekanseröz lezyonların ileri formları gelişir ve ortalama 15 yıl sonra servikal kansere ilerler. HPV enfeksiyonundan sonra servikal kanserin uzun sürede gelişmesi servikal kanser taramasının yapılmasına izin verir. Servikal kanseri önlemenin başlıca yolu düzenli servikal kanser taramasının yapılmasıdır. Böylece genellikle asemptomatik olan servikal prekanseröz lezyonların sitolojik tarama testi olan Pap testi ile erken tanısı ve anormal servikal sitoloji bulguları olan kadınlarda kolposkopi ve biyopsi sonucuna göre bulunan lezyonların tedavisi ile servikal kanser büyük oranda (>%90) önlenir bir hastalıktır. Servikal prekanseröz lezyonlar epitelyumdaki atipik değişikliklere göre sitolojik olarak düşük dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon (LSIL; low-grade

squamous intraepithelial lesion) ve yüksek dereceli skuamöz intraepitelyal lezyonlar (HSIL; high-grade squamous intraepithelial lesion) olarak tanımlanır. Histolojik sınıflandırmada servikal intraepitelyal neoplazi (CIN; cervical intraepithelial neoplasia) CIN 1 LSIL'e, CIN 2 ve CIN 3, HSIL'e dahildir. Hafif displazik lezyonlar CIN 1, orta displazi CIN 2, ağır displazi ve karsinoma in situ CIN 3'e karşılık gelir.

Gelişmiş ülkelerde Pap testinin yaklaşık 50 yıldır kullanılması ile servikal kanser %70 oranında azalmıştır. Ancak bu sonuç beklenenin altındadır. Bunun başlıca sebebi servikal kanser tarama programına katılımın düşük olmasıdır. Gelişmiş ülkelerdeki kadınların %50-85'i oysa gelişmekte olan ülkelerde ise %5'i tarama programına katılmaktadır. Diğer bir sebep ise Pap testinin HSIL tanısı için sensitivitesinin oldukça düşük, %50-70 arasında olmasıdır. HSIL tespiti için HPV DNA testinin sensitivitesi ise %84-100 olup sitolojik teste göre daha yüksektir. Bu sebeple prekanseröz lezyonların tanısı için sitolojik test ve HPV DNA testini kombine eden yeni algoritmalar geliştirilmiştir. Ayrıca gelecekte HPV DNA testinin servikal kanser taramasında ilk tarama testi olarak kullanımı ile ilgili algoritma çalışmaları da sürmektedir.

Son 10 yılda HPV'na karşı konağın immun cevabı hakkında kazanılan bilgiler servikal kanserden korunmak için profilaktik HPV aşılarının gelişmesini sağlamıştır. Servikal kanser taramasına ilaveten toplumda daha kolay uygulanabilir olan HPV aşılarının yaygın kullanıma girmesi halinde servikal kanser insidansını azaltmada etkili olacaktır. Günümüzde kullanımda olan iki tip profilaktik HPV aşısı vardır. Her ikisi de HPV L1 virus benzeri partiküllerden oluşur. Aşılarından bivalent olanı HPV16 ve18, kuadrivalan olan dördümlü aşı ise HPV16, HPV18, HPV6 ve HPV11 enfeksiyonlarını önler.

Günümüzde geçerli aşılama stratejisi HPV16 ve HPV18 tiplerini hedeflemektedir ve böylece servikal kansere karşı %70 oranında korunma sağlanması beklenir. Ancak HPV tiplerinin prevalansı ve dağılımı, coğrafi bölge ve demografik faktörlere bağlı olarak değişmektedir. Ülkeler arasında HPV tiplerinin dağılımının farklı olması profilaktik HPV aşılarının farklı etkinlikte olmasına yol açar. Bu sebeple HPV tiplerinin prevalansı ile ilgili veriler HPV aşılarının etkinliği ve gelecekte yeni aşılarda hazırlanmasında hangi HPV tiplerinin dahil edileceği hakkında güvenilir bilgi sağlayacaktır.

Dünyada servikal kanser ve prekanseröz lezyonlarda HPV tiplerinin prevalansını ve dağılımını araştıran uluslararası birçok meta-analiz çalışması yapılmıştır. Servikal kanserde en çok bulunan HR HPV tipi %50-55 oran ile HPV16 olup ikinci sıradaki HPV18'in oranı %10-15'dir^{189,190}. Clifford ve arkadaşları dünyadan 85 çalışmanın meta-analizinin yapıldığı 2003 yılında yayınlanan çalışmada 10.058 invaziv servikal kanserli (ICC; invasive cervical cancer)

vakada (8550 skuamoz hücreli karsinoma, 1508 adenokarsinoma) HPV prevalansını %83-89 olarak bildirmiştir. Bölgeler arası HPV tip spesifik prevalans bulguları kıyaslandığında 8550 servikal skuamoz hücreli kanserde bütün ülkelerde HPV16 en yaygın tip olup Asya'da %46'dan Kuzey Amerika ve Avustralya'da %63'e değişmiştir. HPV18 bütün servikal skuamoz hücreli kanser vakalarının %10–14'ünde tespit edilmiştir. HPV16 ve 18'den sonra diğer yaygın tipler 45 (%2–8), 31 (%2–7) ve 33 (%3–5)'dür. Ancak, Asya'da HPV 58 (%6) ve HPV 52 (%4) tipleri, HPV45, 31 ve 33'e göre daha fazla oranlarda bulunmuştur. Afrika'da ise HPV45 prevalansı (%8) HPV 31 (%2.7) veya 33 (%3.2)'ün her birine göre iki kat fazla orandadır¹⁹⁰.

Yine Clifford ve arkadaşlarının 2006'da yayınlanan 25 ülkeden 12 çalışmanın meta-analiz sonuçlarına göre 3085 invaziv servikal kanser vakasında HPV DNA prevalansı %96'dır. HPV16 ve HPV 18 oranı ise gelişmekte olan bölgelerdekine (%65-72) göre gelişmiş bölgelerde biraz daha yüksek (%72-77) olmasına rağmen bütün dünyada servikal kanserlerin %70'inden HPV16 ve HPV18'in sorumlu olduğu gösterilmiştir. HPV16 ve HPV18'den sonra en yaygın altı HPV tipi bölgesel olarak biraz değişen oranlar ile HPV31, HPV33, HPV35, HPV45, HPV52 ve HPV58'dir ve hepsi dünyada servikal kanserlerin %89'unda tespit edilmiştir¹⁹¹.

Smith ve arkadaşlarının 2007'de yapılan meta-analiz çalışmasının bulgularına göre ICC'de (14.595 vaka) HPV prevalansı %87 olup bölgeler arası, %86'dan %94'e değişmiştir. HPV pozitifliği 9,494 servikal skuamöz hücreli karsinoma vakasında (SCC; squamous cell carcinoma) %90 olup 1,949 servikal adenokarsinoma vakasındaki %85 orandan daha yüksektir. SCC'de en yaygın 8 HPV tipi HPV16 (%55.2), 18 (%12.8), 45 (%4.6), 31 (%3.8), 33 (%3.7), 52 (%2.9), 58 (%2.8) ve 35 (%1.5)'dir. HPV16, servikal adenokarsinoma vakalarında (%33) SCC vakalarına göre (%55) daha düşük orandadır¹⁹².

Aynı çalışmada HSIL'da (7.094 vaka) HPV prevalansı ise %85 olup Asya'da %78 ve Avrupa'da %88'dir. Bütün HSIL vakalarında HPV16/18 kombine prevalansı %52'dir. En yaygın 8 HPV tipi HPV16 (%45.3), 18 (%6.9), 31 (%8.6), 33 (%7.3), 52 (%5.1), 58 (%7), 35 (%3.8) ve 51 (%3.6) olup HPV 45'in olmaması hariç servikal kanserdekine benzerdir. Bütün ülkelerde HSIL'da HPV16 en baskın tip olup Asya'da %34 ve Avrupa'da %52'dir. HSIL ve SCC'de HPV tip spesifik prevalans oranları karşılaştırıldığında HPV16 HSIL'da (%45.3) SCC'ye (%55.2) göre daha az (HPV16 prevalans oranı SCC: HSIL için 1.30) olup hem HPV18 (1.76) hem de HPV45 (1.54) için ise daha düşüktür. Aksine HPV tipleri 31, 33, 35, 39, 52, 56, 58, 68 ve 73'ün her biri HSIL'da ICC'ye göre 2-3 kat daha fazla bulunmuştur¹⁹². Clifford ve arkadaşları 2003 yılında yaptıkları meta-analiz çalışmasında ise HPV tiplerinin

dağılımının servikal kanser ve HSIL'da farklı olduğunu gözlemişlerdir. Böylece HPV16, 18 ve 45 HSIL'a göre skuamöz hücreli karsinomda daha fazla, oysa HSIL'da HPV 31, 33, 52 ve 58 dahil diğer onkogenik HPV tipleri daha yaygındır¹⁹³.

Bosch ve arkadaşlarının 2008 yılına ait meta-analiz çalışmasında 56 ülkeden 14.595 ICC'li kadında HPV DNA prevalansı %87.2 olup, %54.4'ünde HPV16 ve %15.8'inde HPV18 bulunmuştur. HSIL'da HPV prevalansı ise Avrupa'da %88, Asya %78, Afrika'da %85.1 ve Kuzey Amerika'da %85 oranlarında olup genel prevalans %84.9 olarak bildirilmiştir. HSIL'da HPV16 prevalansı Avrupa'da %51.8, Asya'da %33.7 ve Kuzey Amerika'da ise %46'dır. Avrupa'da HSIL'da HPV16'dan sonra ikinci sırada HPV31 %10 ve ardından HPV33 %8.6, HPV18 %6, HPV52 %3.6 ve HPV51 %3 oranlarında bulunmuştur¹⁸⁹.

Farklı çalışmalarda, LSIL'da yüksek riskli HPV DNA prevalansı % 30-100'dür. Yine, HPV16 vakaların %26'sında tespit edilerek en yaygın tip olup bunu HPV 31 (%12), HPV51 (%11), HPV53 ve HPV56 (%10) ve diğer birçok HPV tipleri takip etmiştir¹⁹⁴. HPV16/18 pozitifliği HSIL'da %41-67 ve LSIL'da %16-32 olduğu bildirilmiştir ki, böylece HPV-16/18 oranının lezyonun ciddiyeti ile arttığı vurgulanmıştır¹⁹¹.

De Vuyst ve arkadaşlarının 2009 yılında yayımlanan Avrupa'dan 14 ülkeye ait 18 çalışmanın meta-analiz sonuçlarına göre 30-64 yaş grubunda HR HPV prevalansının İspanya'da %2'den Belçika ve Fransa'da yaklaşık %12'ye değiştiği bildirilmiştir. HR HPV pozitifler arasında HPV16 %30 (%19-43) ve HPV18 %12 (%0-22) oranlarında tespit edilmiştir. Avrupa'da servikal kanser ve prekanseröz lezyonlarda HPV16 ve/veya 18 ise LSIL'da %33.3, HSIL'da %52 iken histolojik olarak tanısı doğrulanmış CIN1'de %29.4, CIN2/3'de %61 ve invaziv servikal karsinomda %76 oranında bulunmuştur. Skuamöz hücreli servikal karsinomda HPV16 prevalansı %64.5 ve HPV18 için ise %11 olup birlikte servikal kanserin %75.5'inden sorumludur¹⁹⁵.

Servikal prekanser ve kanser vakalarında HPV tiplerinin prevalansı ve dağılımı için çeşitli ülkelerde yapılan çalışmalardan ABD'de Insinga ve arkadaşları 22 çalışmanın verilerini incelediklerinde HPV prevalansı CIN1'de %84.1, CIN2/3'de %92 ve servikal kanserde %89.6'dır. Ayrıca CIN1 lezyonları arasında (224 vaka; 8 çalışma), en yaygın gözlenen beş HPV tipi, azalan prevalans sırasına göre HPV16, 31, 66, 52 ve 51 (sırasıyla %10.3, %7.8, %6.7, %6.5 ve %5.7) idi. Her çalışmada lezyonlarda multiple HPV enfeksiyon prevalansı % 0.0 ile %8.9 arasında gözlenmiştir (en az 8 HPV tipi test edilen çalışmalarda). Tek HPV tipi CIN1 lezyonları için %10'dan fazla bulunmamıştır. CIN 2/3 lezyonları için (360 vaka; 8 çalışma) ise en yaygın HPV tipleri prevalans sırasına göre HPV 16, 31, 18, 33 ve 35 (sırasıyla %54.2, %10, %5.3, % 4.7, ve %4.7) idi. Her çalışmada multiple HPV enfeksiyonları

%0.0 ile %14.4 arasında değişmiştir. İnvaziv skuamöz hücreli servikal kanser örnekleri arasında ise (1.090 vaka; 8 çalışma), en yaygın görülen 5 HPV tipinin prevalansı azalan sırası ile HPV16, 18, 33, 6 ve 31 (sırasıyla %65.9, %12.4, %4.9, %4.3 ve %4.1) idi. Her çalışmada lezyonlarda multiple HPV enfeksiyonları %0.0 ile %9.7 oranlarında gözlenmiştir. CIN1’de en yaygın iki HPV tipi HPV 16/66; %15.3, CIN 2/3 için HPV 16/31; %61.9 ve servikal kanser için HPV 16/18; %79.2 oranlarındadır. Sonuç olarak özellikle HPV tip 16 dışında HPV tipleri ile multiple enfeksiyonlarının varlığının hastalık üzerinde önemli bir etkisi olabileceği gözlenmiştir¹⁹⁶.

Fransa’da Briolat ve arkadaşları tip spesifik HR HPV prevalansını, özellikle HPV16 ile tek veya multiple HPV enfeksiyonların varlığını araştırmak amacıyla yaptıkları çalışmada 24 lezyonu olmayan vaka, 96 CIN1, 92 CIN2, 144 CIN3 ve 7 kanser vakasına ait toplam 363 servikal örnek HC II ve linear array HPV genotipleme testi (Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, NJ) ile analiz edildiğinde HPV-16 prevalansının baskın olduğu ve lezyonların ciddiyeti ile arttığı (CIN1 için %27.1; CIN3 için %65.3) gösterilmiştir. Ayrıca, çoklu enfeksiyonlar ile karşılaştırıldığında tekli enfeksiyonların prevalansının lezyon ciddiyeti ile arttığı (CIN1:%25; CIN3: %54.8) tespit edilmiştir. Sonuç olarak, bu çalışma çoklu enfeksiyonlara göre tekli enfeksiyonların CIN ciddiyeti ile ilişkili olduğunu ortaya koymaktadır¹⁹⁷.

Slovenya’da Kovanda ve arkadaşları CIN3 lezyonları olan kadınlarda aşı öncesi HPV genotiplerinin dağılımı belirlemek ve Slovenya’da profilaktik HPV aşısının potansiyel yararını değerlendirmek için yaptıkları çalışmada örnekler HPV genotipleme için Abbott RealTime High Risk HPV Assay, Innogenetics INNO-LiPA HPV Genotyping Extra Test ve in-house PGMY09/11 ve CPI/CPIIg PCR ve dizi analizi ile incelenmiştir. Toplam 261 CIN3 örneğın 253’ü (%96.9) HPV pozitifdir. CIN3 lezyonlarında en yaygın HPV genotipi HPV-16 (%59) olup ardından HPV-31 (%7.5), HPV-33 (%7.1), HPV-58 (%5) ve HPV-51 (%4) izlemiştir. Multiple HPV genotipleri örneklerin %19.4’ünde (49/253) saptanmıştır. Slovenya popülasyonunda CIN3 lezyonlarında HPV-16 ve HPV-18’in birlikte %67.4 oranında bulunmasının ulusal aşılama programında HPV’na karşı profilaktik aşıların kullanımını desteklediği belirtilmiştir¹⁹⁸.

Polonya’da Szostek ve arkadaşlarının çeşitli HPV tiplerinin varlığı ve servikal sitolojik sonuçlar arasındaki ilişkinin araştırılması için yaptıkları çalışmada 125 kadından servikal sürüntü örnekleri alınmıştır; 44 LSIL, 12 HSIL, 27 servikal kanser ve anormal sitolojisi olmayan 42 kadın kontrol grubu olarak seçilmiştir. HPV DNA amplifikasyonu ve genotipleme SPF 10 primer seti ve reverse hibridizasyon line prob assay (Inno-LIPA HPV

Genotyping, Innogenetics) ile yapılmıştır. Toplam 125 vakanın 90'ında (%72) HPV DNA tespit edilmiştir ve kontrol grubuna göre servikal kanser ve skuamöz intraepitelyal lezyonları olan kadınlarda daha yaygındır. Çalışmada 27 servikal kanser vakasının %100, 12 HSIL'in %92, 44 LSIL'in %98 ve 42 normal sitolojili kadının %21'i HPV pozitif bulunmuştur. HPV pozitif toplam 90 örnekte en yaygın tip HPV16 (%37) olup HPV51 (%28) ve HPV52 (%17) izlemiştir. Servikal kanser örneklerinde daha fazla olmak üzere pozitif olguların %51'inde tek HPV tipi saptanmıştır. Multiple HPV enfeksiyonu HSIL ve servikal kanser için %26 iken LSIL ve normal sitoloji olan kadınlarda %48 oranla daha baskındır. HPV16 prevalansı servikal anormal sitolojinin ciddiyeti ile artmıştır (LSIL %9.1, HSIL %58.3 ve servikal kanser %81.5). HPV genotiplemesinin servikal anormallikleri olan kadınların farklı risk gruplarına daha iyi sınıflandırılmasını sağladığı ve neoplazi gelişimi için riskte olan hastaların tanısını kolaylaştıracağı sonucuna varılmıştır¹⁹⁹.

İzlanda'da Sigurdsson ve arkadaşları CIN 2-3, tekrarlayan CIN 2-3 ve servikal kanserde HPV dağılımını araştırmıştır. Onkogenik 12 HPV tipinin varlığı multiplex PCR testi ile analiz edildiğinde CIN 2-3 olgularının %95 ve kanser vakalarının %92'si HPV pozitifdir. HPV 16 en yaygın HPV tipi olup ardından CIN 2-3'de HPV 33, 31, 52, 35, 18, 58, 56, 39, 45 ve 59 bulunmuştur ve invaziv servikal kanserde ise HPV 18, 33 45, 31, 39, 52, 35, 51 ve 56 izlemiştir. HPV16 ve/veya HPV 18 kanser vakalarının %60'ında tespit edilmiştir. HPV16 ve 18 kanserin yüksek riski ve HPV52 ve 31 ise daha çok CIN 3 riski ile ilişkili bulunmuştur. HPV16 hem CIN 2-3 (%51) hem de kanserde (%57) en yaygın tiptir. Ardından CIN 2-3'de HPV 33, 31 ve 52 her biri %12-15 ve kanserde HPV18 ve 33 her biri %13-15 ve diğer tipler %8'den az oranlardadır. Skuamoz hücreli karsinomada HPV16 en baskın tip olup (%62) ardından HPV33 (%17), 18(%7), 31(%5), 39 %6), HPV45, 52, 35 (%4-3) ve 51, 56 (her biri %1) bulunmuştur. Adenokarsinoma ve adenoskuamoz karsinomada ise yine HPV16 birinci sırada (%43 ve %46) bulunurken HPV18 (%39 ve %27), HPV 45 (%7 ve %18), HPV 33 (%4 ve %0) ve HPV39 (%0 ve %9) izlemiştir. Onkogenik HPV tipleri tüm persisten veya konizasyondan sonra tekrarlayan CIN 2-3 hastalarında bulunmuştur. HPV 16/18'e karşı aşılamanın CIN 2-3 oranını en az %40 indireceği ve servikal kanser oranını en az %60 azaltacağı kabul edilir. Buna karşılık, bu çalışmada test edilen 12 HPV tipinin tümünün aşya dahil edilmesi ile korunmanın sırasıyla %95 ve %92 oranlarına artırılabilceği rapor edilmiştir²⁰⁰.

Çin'de Hong ve arkadaşlarının Zhejiang eyaletinde servikal kanser ve prekürsörleri olan hastalarda HPV genotiplerinin dağılımını araştırmak için yaptıkları çalışmada servikal kanserli (181), CIN II-III (345) ve CIN I (105) tanısı alan toplam 631 hasta

değerlendirilmiştir. Servikal neoplazi olmayan 217 kadın kontrol grubu seçilmiştir. HPV genotiplerinin tanısı PCR testi, Restriction Fragment Length Polymorphism testi, Hybrid Capture II ve PCR dizi analizi ile doğrulanmıştır. HPV prevalansı servikal kanserde %95, CIN II-III'de %88.4 ve CIN I'de %73.3 iken kontrol grubunda sadece %41.9'dur. Yüksek-risk/düşük-risk HPV oranı yüksek dereceli CIN ve karsinomaya dönüşüm ile artış eğilimi göstermiştir. Servikal kanser ve öncülerinde toplam 24 HPV genotipi saptanmıştır. Bunlardan, servikal kanserde major HPV genotipleri HPV16 (%65.2), HPV18 (%9.4) ve HPV58 (%9.4) iken CIN'de HPV16 (%37.6), HPV58 (%19.1), HPV33 (%10.6), ve HPV18 (%5.4)'dir. Sonuç olarak, Zhejiang eyaletinde servikal kanser ve prekürsörü olan hastalarda baskın HPV genotipleri HPV 16, 58, ve 18, muhtemelen de HPV 33'ün servikal kanser için yüksek risk faktörleri olabileceği bildirilmiştir²⁰¹.

Kore'de Lee ve arkadaşları anormal servikal sitolojili kadınlarda HPV DNA chip testi ile (MyGene Co., Seoul, South Korea) HPV genotiplerini araştırdıklarında yüksek riskli HPV genotipleri histolojik olarak normal olan 1.650 örneğin %23.5'de ve servikal intraepitelyal neoplazi ve servikal kanser tanılı 708 örneğin %81.8'de tespit edilmiştir. CIN I'de %74.2 (124/167), CIN II/III'de %84.5 (322/381), servikal kanserde %83.4 (111/133) ve servikal adenokarsinomada %81.4 (22/27) oranında HPV pozitifliği bulunmuştur. Major yaygın yüksek riskli HPV genotipleri 381 CIN II/III örneğinde prevalans oranı sırasına göre HPV16 (%41.7), HPV58 (%17.1), HPV33 (%11.3) ve HPV31 (%7.9) olup vakaların %78'de bulunmuştur. Skuamöz hücreli karsinomali (SCC; squamous cell carcinoma) 133 örnekte ise HPV16 (%57.9), HPV18 (%12.8), HPV58 (%6.8) ve HPV33 (%3.7) vakaların %81.2'sini oluşturmuştur. HPV16 enfeksiyon oranı bütün normal, CIN ve SCC vakalarında diğer yüksek riskli HPV genotiplerinden anlamlı olarak daha yüksektir ve daha ileri skuamöz servikal lezyonlarda sırasıyla normal örneklerde %6.8, CIN I'de %19.2, CIN II/III'de %41.7 ve SCC'de %57.9 oranlar ile artmıştır. Çalışmada yüksek riskli HPV genotiplerinin dağılımında coğrafik farklılıklar olduğu belirtilmiştir²⁰².

İtalya'da Canadas ve arkadaşları 4051 kadına ait servikal örneklerde HPV prevalansını yeni geliştirilen multipleks floresan PCR testi olan f-HPV typing Kit (Molgentix, Barcelona) ile araştırdıklarında kadınların %35'i HPV pozitif bulunmuştur. HPV pozitif toplam 1429 örneğin %80'i (1145) yüksek riskli HPV ve %20'si (284) düşük riskli HPV olarak tanımlanmıştır. Yüksek riskli HPV tipi, CIN1'de %50 (234/466), CIN2'de %70 (88/126), CIN3'de %97 (35/36), skuamöz hücreli servikal kanserde %98 (118/120), adenokarsinomada %100 (25/25) ve ASCUS-AGUS'da (ASCUS; atypical squamous cells of undetermined significance, AGUS; atypical squamous glandular cells of undetermined significance) %42

(43/102) olarak tespit edilmiştir. HPV-16, LSIL (%40), HSIL(%72) ve karsinomada (%62) en yaygın tip olup HPV-31 ikinci sırada gözlenmiştir. Araştırmacılar f-HPV typing Kit'in 15 HPV tipinin tanısında hızlı ve sensitif bir test olduğunu bildirmişlerdir²⁰³.

Ülkemizde servikal kanser ve prekanseröz lezyonlarda HPV genotiplerinin prevalansı ile ilgili epidemiyolojik veriler sınırlıdır. Ankara'da Usubütün ve arkadaşları invaziv servikal kanser örneklerinde HPV tip dağılımını belirlemek amacıyla parafine gömülü ICC örneklerini incelemiştir. HPV DNA amplifikasyonu için geniş spektrumlu primer SPF-10 ile yapılan PCR ve daha sonra genotipleme için LiPA25 ((version 1: Laboratory of Biomedical Products, Rijswijk, The Netherlands) Line probe assay kullanılmıştır. ICC tanısı alan 1993 ve 2004 yılları arasında toplanan 277 örnek test edilmiştir. Histolojik değerlendirme ve örnek kalitesi için insan beta-globin gen analizi sonrası 248 vaka HPV DNA testi için uygun olarak kabul edilmiştir ve HPV prevalansı %93.5 (232/248) bulunmuştur. HPV pozitif vakalar arasında tek tip olarak beş en yaygın HPV tipi HPV16 (%64.7), HPV18 (%9.9), HPV45 (%9.9), HPV31 (%3) ve HPV33 (%2.2) bulunmuştur. HPV tip spesifik prevalans ise HPV16 için %60.5, HPV18 %9.3, HPV45 %9.3, HPV31 %2.8 ve HPV33 %2 olarak bildirilmiştir. HPV16/18 prevalansı ise %70.6'dır. Çalışmada, HPV pozitif ICC vakalarında HPV16/HPV18 oranının %75.4 olduğu ve bu bulgunun HPV aşılarının potansiyel etkilerini değerlendirmek için önemli olduğu belirtilmiştir²⁰⁴.

Yine Ankara'da yapılan bir çalışmada Dursun ve arkadaşları normal ve anormal sitolojili kadınlarda HPV tiplerinin dağılımını araştırmıştır. Toplam 403 kadına ait servikovajinal örnekte HPV tiplerinin varlığını tespit için L1 geninin 150 bp'lik bölgesine yönelik GP5 ve GP6 primerleri ile yapılan ticari real-time PCR (Fluorion, Iontek, Türkiye) kullanılmıştır. HPV genotiplemesi ise DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit (Amersham Biosciences Corp., NJ, USA) ile Iontek (Türkiye) tarafından yapılmıştır. Çalışmaya dahil edilen 403 kadından 93'ü (%23) anormal sitolojili ve 310'u (%77) normal sitolojiye sahiptir. Genel olarak kadınların %23'ü HPV pozitif bulunmuştur. Anormal sitolojili kadınlarda HPV genel prevalansı %36 olup, ASCUS'lu kadınlarda %22, LSIL'lı kadınlarda %51 ve HSIL'lı kadınlarda %60'dır. Ayrıca, HPV DNA normal servikal sitolojili kadınların %20'sinde tespit edilmiştir. Sitolojik olarak normal kadınlarda en yaygın görülen HPV tipleri; HPV16 (%36), HPV6 (%22) ve HPV18 (%13)'dir. Diğer HPV tiplerinin oranı ise HPV11 için %4.4, HPV45 %4.4, HPV90 %4.4, HPV35 %2.2, HPV67 %2.2 ve HPV81 için ise %2.2 olup multiple HPV enfeksiyonları %8.9 oranındadır. Anormal sitolojili kadınlarda en yaygın HPV tipleri ise HPV16 (%35), HPV6 (%19) ve HPV18 (%8) olarak tespit edilmiştir. Sonuç olarak bu çalışmada HPV prevalansı ve tip dağılımının dünyada

bildirilene benzer olduğu ancak, HPV prevalansının Türkiye'den bildirilen önceki çalışmalar ile karşılaştırıldığında daha fazla olduğu bildirilmiştir. Bu durumun kullanılan testlerin farklılığı, çalışma popülasyonunda anormal sitolojili kadınların yüksek oranda olması ve hastaneye başvuran kadınların değerlendirilmesi ile ilişkili olabileceği belirtilmiştir²⁰⁵.

Ankara'da yapılan diğer bir çalışmada da Özgül ve arkadaşları 13 LSIL, 22 HSIL, 23 SCC ve 25 normal parafine gömülü doku örneklerinde HPV tespiti için MY09 ve MY11 konsensus primer seti ve HPV tip 16 ve 18 için ise sırasıyla MY09 ve MY14 ile MY11 ve WD74 primer setlerini kullanmıştır. HR HPV DNA prevalansı SCC vakalarında %91.3 (21/23) bulunurken HSIL'da %59.1 (13/22), LSIL'da %15.4 (2/13) ve normal doku örneklerinde %12 (3/25) olduğu bildirilmiştir²⁰⁶.

Yine Ankara'dan Onan ve arkadaşları da servikal intraepitelyal neoplazi (CIN) tanımlı toplam 94 parafine gömülü örnekte RT-PCR (real-time polymerase chain reaction) ile HPV varlığı ve viral yükü araştırmak amacıyla yaptıkları çalışmada HPV pozitifliği 47 CIN I örneğinde %4.2, 27 CIN II örneğinde %14.8 ve 20 CIN III örneğinde %45 bulmuştur. HPV pozitifliği lezyonların ciddiyeti ile anlamlı artış gösterirken viral yük için farklılık gözlenmemiştir²⁰⁷.

İzmir'de İnal ve arkadaşları normal sitolojili ve servikal intraepitelyal neoplazili kadınlarda servikal HPV enfeksiyon prevalansının tespiti için yaptıkları çalışma Mart 2002 ve Kasım 2005 arasındaki dönemde vaka-kontrol çalışması olarak tasarlanmıştır. Bütün hastalarda HPV varlığının tanısı Hybrid Capture II test ile yapılmıştır. Reprodüktif yaştaki toplam 1.353 kadın taranmıştır ve 1.344'ü (%99.3) normal olup kalan dokuz vakada (% 0.7) çeşitli derecelerde (beş CINI, üç CINII ve bir karsinoma in situ) CIN bulunmuştur. Servikal patolojili bu dokuz vakanın hepsinde HPV bulunurken diğer grupta sadece 20 vakada (%1.5) HPV tespit edilmiştir. Bu popülasyonda servikal HPV kolonizasyonunun (%2.1) düşük sıklığına rağmen HPV ve CIN arasında güçlü bir korelasyon bulunmuştur²⁰⁸.

Özçelik ve arkadaşları Kayseri'de servikal kanser için düşük riskte olan 230 kadında HPV enfeksiyon prevalansını Hybrid Capture-I System (HC-I) testi ile %6.1 olarak tespit etmiştir²⁰⁹.

Bölgemizde servikal kanser ve prekanseröz lezyonları olan kadınlarda HPV prevalansını araştırmak amacıyla HPV DNA tespiti MY09/11 ve GP5+/6+ primerlerinin kullanıldığı konsensus PCR testi ve HPV genotipleme multiplaks floresan PCR testi olan f-HPV typing Kit (Molgentix, Barcelona, Spain) ile yapıldı. Çalışmamızda HPV prevalansı 18 CIN1 örneğinde %66,6, 16 CIN2/3 örneğinde %81.2 ve 27 skuamöz hücreli servikal kanser örneğinde %92.5 bulundu. HPV tiplerinin dağılımına bakıldığında ise servikal kanser

vakalarında HPV16 prevalansı %66.6 ve HPV18 prevalansı %11.1 olup ardından HPV31, 58, 59 ve 68 her biri %3.7 oranlarda idi. CIN2/3'de ise HPV16 prevalansı %56.2 ve HPV18 prevalansı %12.5 iken HPV45, 51, 52 ve 58 tipleri %6.2 oranlarında tespit edildi. CIN2/3'de düşük riskli HPV tipleri HPV6 %12.5 ve HPV11 %6.2 oranında gözlemlendi. CIN1 örneklerinde en baskın tip %22 oranla HPV59 olup ardından HPV16 %16.6, HPV11 %11.1 ve HPV18, HPV31 ve HPV35 ise %5.5 oranlarında bulundu.

Çalışma gruplarında multiple HPV enfeksiyonları CIN1 tanılı örneklerde % 27.7, CIN2/3'de %31.2 ve servikal kanserde %7.4 oranında idi. Tek veya miks enfeksiyonlar şeklinde HPV16 ve HPV18 pozitifliği ise 27 servikal kanser vakasından %74'ünde (20/27), CIN2/3 örneklerinde %62.5 (10/16) ve CIN1'de %22.2 (4/18) oranında tespit edildi. Kontrol grubu olarak seçilen normal servikal sitolojili 122 kadında HPV prevalansı %6.5 olarak belirlendi. Bu grupta HPV16 %2.4, HPV18 %1.6 ve HPV 31, 58, 59 ve 11 tiplerinin her biri %0.8 oranında tespit edildi. Multiple enfeksiyonlar ise sadece 1 vakada (%0.8) bulundu.

Çalışmamızda servikal kanserde bulunan %92.5'lik HPV prevalansı Smith ve arkadaşlarının bütün ülkelere ait meta-analizinde verilen %90, ABD'de %89.6, İzlanda'da %92 ve Çin'de %95 oranlarında bulunan bulgulara benzerdir^{192,200,201}. Kore'de servikal kanser vakalarında HPV varlığı daha düşük, %83.4 oranında iken Polonya'daki çalışmada bildirilen %100 ve İtalya'dan %98'lik oranlar daha yüksektir^{199,202,203}.

Yine Smith ve arkadaşlarının meta-analiz çalışmasında servikal kanserde HPV16 oranı %55.2 HPV18 oranı %12.8 olup Avrupa'da HPV16 %64.5 ve HPV18 için %11, ABD'de HPV16 %65.9 ve HPV18 %12.4, Kore'de HPV16 %57.9 ve HPV18 %12.8 bulunmuştur ki, çalışmamızdaki servikal kanser vakalarındaki HPV16 prevalansı olan %66.6 ve HPV18 prevalansı için %11.1'lik bulgulara yakındır^{192,195,196,202}. Çin'de ise yine HPV16 %65.2 oran ile en yaygın tip iken HPV18 ve HPV58 her biri %9.4 oranındadır²⁰¹. İzlanda'da ise HPV16 en baskın tip (%62) olup %17 oranla HPV33 ikinci sıradadır ve HPV18 (%7) oranı bizim bulgumuzdan daha düşüktür²⁰⁰. Bütün ülkelerde HPV16'nın baskınlığı bildirilmiştir.

Çalışmamızda CIN2/3 lezyonlarında HPV DNA %81.2 oranında saptandı. ABD'de meta-analiz çalışmasında CIN2/3'de %92, , İzlanda'da %95, Çin'de %88.4 ve Kore'de %84.5 ve Slovenya'da CIN3'de %96.9 oranlarında olup biraz yüksektir^{196,198,200,201,202}. Fransa'da CIN3'de %65.3'lik oran daha düşüktür. İtalya'da CIN2'de HPV prevalansı %70 ve CIN3'de %97'dir²⁰³. Bosch ve arkadaşlarının güncellenen meta-analizinde dünyadan kıtalara ait verilere göre kadınlarda sitolojik lezyon HSIL'da HPV prevalansı Avrupa'da %88, Asya'da %78, Afrika'da %85.1 ve Kuzey Amerika'da %85 oranlarında olup genel prevalans %84.9 olarak bildirilmiştir¹⁸⁹.

Yine çalışmamızda CIN 2/3'de HPV16 prevalansı %56.2 ve HPV18 prevalansı %12.5 iken HPV 45, 51, 52 ve 58 %6.2 oranında tespit edildi. ABD'de meta-analiz çalışmasında CIN 2/3'de en yaygın iki tip HPV 16 ve 31, (%54.2 ve %10) Slovenya HPV16 ve 31 (%59 ve %7.5), Kore'de HPV16 ve HPV58 (%41.7 ve %17.1) ve İzlanda'da HPV16 ve HPV 33 (% 51 ve %15) olup ikinci sırada bulunan HPV tipleri bizim bulgumuzdan farklıdır^{196,198,200,202}.

Çalışmamızda CIN2/3'de bulunan HPV16 prevalansı %56.2 olup HSIL'da HPV16 ortalama Avrupa prevalansına % 51.8'e benzerdir¹⁸⁹. HPV16 prevalansı HSIL'da Asya'da %33.7 iken Kuzey Amerika'da ise %46'dır¹⁸⁹. Yine çalışmamızda tespit edilen HPV18 prevalansı %12.5 iken HSIL'daki ortalama Avrupa prevalansından (%6) daha yüksektir. Avrupa'da 2. sırada HPV31 %10 ve ardından HPV33 %8.6, HPV18 %6, HPV52 %3.6 ve HPV51 %3 oranlarında izlemiştir¹⁸⁹. Çalışmamızda ise HPV16 ve 18'den sonra HPV 45, 51, 52 ve 58 %6.2 oranlarında bulunmuştur. Avrupa'da HSIL'da HR HPV genotiplerinin dağılımındaki farklılıklar öncelikle kullanılan HPV tanı testlerindeki farklılıkların yanı sıra çalışılan populasyonun farklı büyüklükte olmasından kaynaklanabilir. Ayrıca çalışmamızda kullanılan örnekler histolojik tanısı doğrulanan CIN2/3 iken Avrupa prevalans çalışmaları HSIL tanılı örnekler ile yapılmıştır.

Çalışmamızda CIN1 vakalarında HPV prevalansı %66.6'dır ve benzer çalışma gruplarında ABD'de bulunan %84.1'den düşük, Çin'de %73.3 ve Kore'de %74.2 oranlarına daha yakındır^{196,201,202}. İtalya'daki %50'lik bulgudan yüksektir²⁰³. CIN1 örneklerinde en baskın tip %22 oranla HPV59 olup ardından HPV16 %16.6, HPV11 %11.1 ve HPV18 %5.5 oranlarında bulundu. CIN1 lezyonlarında ilk iki sıradaki HPV tipleri ABD'de HPV16, 31, (%10.3, %7.8) ve Kore'de HPV 16 ve HPV58'dir^{196,202}.

Bu çalışmada multiple HPV enfeksiyon prevalansı servikal kanserde % 7.4 olup CIN1 ve CIN2/3 tanılı örneklerde sırasıyla %27.7 ve %31.2 oranlarına göre daha düşük bulunmuştur. Yine birçok çalışmada araştırmacılar multiple HPV enfeksiyon prevalansının lezyon ciddiyetinin artması ile azaldığını ve tek tip virus, özellikle HPV16'nın servikal kanserde bulunduğu gerçeğini kabul eder^{197,199}.

Çalışmamızda HPV16 prevalansı servikal lezyonların ciddiyeti ile artmakta olup CIN1'de %16.6, CIN2/3'de %56.2 ve servikal kanserde %66.6'dır. Bu sonuç diğer araştırmacıların özellikle HPV16 enfeksiyon varlığı ve servikal lezyonların ciddiyeti arasında ilişki olduğunu gösteren verilerini desteklemektedir. Fransa'da HPV16 prevalansının lezyonların ciddiyeti ile arttığı (CIN1 için %27.1; CIN3 için %65.3) gösterilmiştir¹⁹⁷. İzlanda'da da HPV16 hem CIN 2-3 (% 51) hem de kanserde (% 57) en yaygın tiptir²⁰⁰.

Çalışma serimizde HPV16 ve HPV18 tek veya miks enfeksiyonlar şeklinde, CIN1'de %22.2 (4/18), CIN2/3'de %62.5 (10/16) ve servikal karsinomali kadınlarda %74 (20/27) oranında bulundu ki Avrupa'dan HPV16 ve/veya 18 pozitifliği olan CIN1'de %29.4, CIN2/3'de %61 ve invaziv servikal karsinomadaki %76 oranları ile uyumludur¹⁹⁵. ABD'de servikal kanser vakaları arasında HPV 16/18 prevalansı %79.2, İzlanda'da %60 ve Slovenya'da %67.4 oranında tespit edilmiştir^{196,198,200}. Yine Clifford ve arkadaşlarının 2006'da yayınlanan 25 ülkeden 12 çalışmanın meta-analiz sonuçlarına göre HPV16/18 pozitifliği HSIL'da %41-67 ve LSIL'da %16-32 olduğu bildirilmiştir ki, böylece HPV-16/18 oranının lezyonun ciddiyeti ile arttığı vurgulanmıştır¹⁹¹. Usubütün ve arkadaşları ICC vakalarında HPV16 ve/veya 18 prevalansını %70.6 olarak bildirmiştir ki sonuçlarımızla koreledir²⁰⁴.

Ülkemizde servikal kanserde HPV enfeksiyonunun epidemiyolojisi ile ilgili az sayıda çalışma yapılmıştır. Ankara'da Usubütün ve arkadaşlarının 248 örneğin incelendiği invaziv servikal kanser serisinde HPV prevalansı %93.5 olup çalışmamızdaki %92.5 uyumludur. En yaygın ilk iki tip HPV16 (%60.5), HPV18 (%9.3) olup çalışmamızdaki sırasıyla, %66.6 ve %11.1'lik oranlara benzerdir²⁰⁴. Aynı çalışmada bildirilen HPV31'in %2.8'lik oranının bizim servikal kanser serimizde bulunan %3.7'lik orana benzemesi dışında diğer HPV genotiplerinin dağılımı farklıdır. Yine Ankara'dan Özgül ve arkadaşlarının 23 vakalık SCC serisinde buldukları %91.3 oranı bizim bulgumuza benzerdir²⁰⁶.

Ankara'dan Dursun ve arkadaşlarının LSIL'lı kadınlarda %51 ve HSIL'lı kadınlarda %60, Onan ve arkadaşlarının ise CINII'de % 14.8 ve CIN III'de %45 oranlarında bildirdikleri HPV prevalansı bizim CIN1'deki %66.6 ve CIN2/3'deki %81.2'lik oranlardan düşüktür^{205,207}. Araştırmacıların normal servikal sitolojili kadınlarda %20'lik HPV DNA pozitifliği bizim kontrol serimizdeki %6.5'lik orandan yüksektir. Dursun ve arkadaşları sitolojik olarak normal kadınlarda en yaygın HPV tipleri olarak HPV16 (%36), HPV6 (%22) ve HPV18 (%13)'i tespit etmiştir²⁰⁵. Çalışmamızdaki kontrol grubunda ise HPV16 %2.4, HPV18 %1.6 ve HPV 31, 58, 59 ve 11, her biri %0.8 oranında bulunmuştur.

Çalışmamızdaki kontrol grubunda HPV enfeksiyon prevalansı %6.5 olup Ankara'dan Dursun ve arkadaşlarının bildirdiği %20'den düşük iken İnal ve arkadaşlarının bildirdiği %1.5'lik orandan yüksek, Özçelik ve arkadaşlarının %6.5'lik oranına ise benzerdir^{205,208,209}. Diğer ülkelerden Polonya'dan %21, Çin'den %41.9 ve Kore'den %23.5 lik oranlar da bizim bulgumuz %6.5'dan yüksektir^{199,201,202}. Dünyada normal sitolojili olan kadınlarda HPV prevalansı %10.4 bulunmuştur¹⁸⁸.

6. SONUÇLAR

Çukurova bölgesinde servikal kanser ve prekanseröz lezyonları olan kadınlarda HPV genotiplerinin prevalansı ve dağılımını belirlemek amacıyla yaptığımız çalışmada 27 skuamoz hücreli servikal kanser tanılu kadın, 18 CIN1, 16 CIN2/3 ve kontrol grubu olarak 122 normal servikal sitolojisi olan kadına ait örnekler incelenmiştir. HPV DNA tespiti için MY09/11 ve GP5+/6+ konsensus PCR testi ve HPV genotiplemesi için multipleks floresan PCR testi olan f-HPV typing Kit (Molgentix, Barcelona, Spain) kullanılmıştır. Çalışmanın sonucunda;

1. CIN1'de HPV prevalansı %66,6, CIN2/3'de %81.2 ve servikal kanserde %92.5 bulundu.

2. HPV tiplerinin dağılımına bakıldığında servikal kanser vakalarında en yaygın tip %66.6 oranla HPV16 olup HPV18 prevalansı %11.1 ve ardından HPV31, 58, 59 ve 68 her biri %3.7 oranlarda tespit edildi.

3. CIN2/3'de HPV16 prevalansı % 56.2 olup en yüksek oranda bulunan HPV tipidir. Diğer HPV tipleri HPV18 %12.5, HPV45, 51, 52 ve 58 tiplerinin her biri %6.2 oranlarında tespit edildi. CIN2/3'de düşük riskli HPV tiplerinden HPV6 %12.5 ve HPV11 %6.2 oranında gözlemlendi.

4. CIN1 örneklerinde en baskın tip %22 oranla HPV59 olup ardından HPV16 %16.6, HPV11 %11.1 ve HPV18, HPV31 ve HPV 35 ise %5.5 oranlarında bulundu.

5. HPV16 ve/veya HPV18 pozitifliği servikal kanser vakalarının %74'ünde (20/27), CIN2/3'de %62.5 (10/16) ve CIN1'de %22.2 (4/18) oranında tespit edildi.

6. Multiple HPV enfeksiyonları ise CIN1 tanılu örneklerde % 27.7, CIN2/3'de %31.2 ve servikal kanserde % 7.4 oranında görüldü.

7. Normal servikal sitolojisi olan 122 kadında HPV prevalansı % 6.5 (8/122) olarak belirlendi. Bu grupta HPV16 %2.4, HPV18 %1.6 ve HPV 31, 58, 59 ve 11 tiplerinin her biri %0.8 oranında tespit edildi. Multiple enfeksiyonlar ise sadece 1 vakada (%0.8) bulundu.

8. Toplamda 12 farklı HPV tipi tespit edilmiş olup bunlardan 10 tip HR HPV (16,18, 31, 35, 45, 51, 52, 58, 59 ve 68) ve diğer 2 tip ise LR HPV tipleri (6, 11) olarak tanındı.

Sonuç olarak bölgemizde servikal kanser ve CIN2/3 tanılu kadınlarda HPV16 en yaygın tip olup ikinci sırada HPV18 tespit edilmiştir. HPV16 ve/veya HPV18 tiplerinin

prevalansı servikal kanserde %74 ve CIN2/3'de %62.5 olup günümüzde kullanılan profilaktik HPV aşılarının hedeflediği tiplerle uyumlu bulunmuştur. Bölgemizde servikal kanser ve prekanseröz lezyonları olan kadınlarda HPV genotiplerinin dağılımının araştırılması HPV aşılarının etkinliğini değerlendirmek için önemlidir.

7. KAYNAKLAR

1. **D.Wan Hamont, R.L.M. Bekkers, L.F.A.G. Massuger, W.J.G.Melchers.** Detection, Management, and follow-up of pre- malignan lesions and the role for human papillomavirus. *Rev Med Virol*, **2008**; 18:117-132.
2. **Thomas C., Wright Jr.** Natural History of HPV infection. *The Journal of Family Practice*, **2009**; 58:1-6.
3. **Parkin DM, et al.** Worldwide CA incidence. **1999**; 80: 827-41
4. **Pisani P, et al.** Worldwide CA mortality.**1999**; 83: 18-29
5. **Lancaster WD, Olson C.** Animal papillomaviruses. *Microbiol Rev*, **1982**; 46:191-207.
6. **Sundberg JP.** Papillomavirus infections in animals. In: Syrjanen K, Gissmann LL, Koss LG, eds. Papillomaviruses and Human Disease. *Berlin: Springer-Verlag*, **1987**
7. **Lowy DR.** History of papillomavirus research. The Papillomaviruses. New York: *Springer*, **2007**.13-28.
8. **Roden RB, Ling M, Wu TC.** Vaccination to prevent and treat cervical cancer. *Hum Pathol*, **2004**; 35; 971-82.
9. **Danos O, Katinka M, Yaniv M.** Human papillomavirus complete DNA sequence: a novel type of genome organization among papovaviridae. *Embo J* **1982**;1.231-6.
10. **Chen EY, Howley PM, Levinson AD, et al.** The primary structure and genetic organization of the bovine papillomavirus type 1 genome. *Nature*, **1982**; 299:529-34.
- 11.**Black PH, Hartley JW, Rowe WP, et al.** Transformation of bovine tissue culture cells by bovine

- papillomavirus. *Nature*, **1963**; 199:1016-8.
- 12. Dvoretzky I, Shober R, Chattopadhyay SK, et al.** A quantitative in vitro focus assay for bovine papilloma virus. *Virology*, **1980**;103:369-75.
- 13. M, Gissmann L, Ikenberg H, et al.** A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc Natl Acad Sci USA* , **1983**;80:3812-5.
- 14. Boshart M, Gissmann L, Ikenberg H, et al.** A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *Embo J*, **1984**;3:1151-7.
- 15. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, et al.** Classification of papillomaviruses. *Virology*, **2004**; 324:17-27.
- 16. Antonsson A, Erfurt C, Hazard K, et al.** Prevalence and type spectrum of human papillomaviruses in healthy skin samples collected in three continents. *J Gen Virol*, **2003**; 84:1881-6.
- 17. Chan SY, Delius H, Halpern AL, et al.** Analysis of genomic sequences of 95 papillomavirus types: uniting, typing, phylogeny, and taxonomy. *J Virol*, **1995**; 69:3074-83.
- 18. Bernard HU, Calleja-Macias IE, Dunn ST.** Genome variation of human papillomavirus types: phylogenetic and medical implications. *Int J Cancer*, **2006**; 118:1071-6.
- 19. Chen Z, Terai M, Fu L, et al.** Diversifying selection in human papillomavirus type 16 lineages based on complete genome analyses. *J Virol*, **2005**; 79:7014–23.
- 20. Boxman IL, Hogewoning A, Mulder LH, et al.** Detection of human papillomavirus types 6 and 11 in pubic and perianal hair from patients with genital warts. *J Clin Microbiol*, **1999**; 37:2270-3.

21. **Wolf JK, Ramirez PT.** The molecular biology of cervical cancer. *Cancer Invest*, **2001**;19: 621-629.
22. **zur Hausen H.** Papillomaviruses in human cancers. *Proc Assoc Am Physicians* , 1999; 111:581-587.
23. **Doorbar J.** The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol*, **2005**; 32(suppl 1): S7-15
24. **Andersson S, Hansson B, Norman I, et al.** Expression of E6/E7 mRNA from high risk human papillomavirus in relation to CIN grade, viral load and p16INK4a. *Int J Oncol*, **2006**; 29: 705-711.
25. **zur Hausen H.** Papillomavirus infections - a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta*, **1996**; 1288: F55-F78.
26. **Zhang HS, Postigo AA, Dean DC.** Active transcriptional repression by the Rb-E2F complex mediates G1 arrest triggered by p16INK4a, TGFbeta, and contact inhibition. *Cell*, **1999**; 97: 53-61.
27. **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*, **1989**; 243: 934-937.
28. **Fakhry C, D'Souza G, Sugar E, et al.** Relationship between prevalent oral and cervical human Papillomavirus infections in human immunodeficiency virus-positive and -negative women. *J Clin Microbiol*, **2006**; 44: 4479-85.
29. **Partridge JM, Hughes JP, Feng Q, et al.** Genital human papillomavirus infection in men: incidence and risk factors in a cohort of university students. *J Infect Dis*, **2007**; 196:1128-36.
30. **de Sanjose S, Palefsky J.** Cervical and anal HPV infections in HIV positive women and men. *Virus Res*, **2002**; 89: 201-11.
31. **Gillison ML, Shah KV.** Chapter 9: Role of mucosal human papillomavirus in nongenital cancers. *J Natl Cancer Inst Monogr*, **2003**:57-65.

32. **Alter BP.** Cancer in Fanconi anemia, 1927–2001. *Cancer*, **2003**;97:425-40.
33. **Lowy DR, Gillison ML.** A new link between Fanconi anemia and human papillomavirus-associated malignancies. *J Natl Cancer Inst*, **2003**;95:1648-50.
34. **Munger K, Werness BA, Dyson N, et al.** Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. *Embo J*, **1989**; 8:4099-4105.
35. **Durst M, Kleinheinz A, Hotz M, et al.** The physical state of human papillomavirus type 16 DNA in benign and malignant genital tumours. *J Gen Virol*, **1985**;66(7):1515-1522.
36. **Schwarz E, Freese UK, Gissmann L, et al.** Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature*, **1985**; 314(6006):111-114.
37. **Baseman JG, Koutsky LA.** The epidemiology of human papillomavirus infections. *J Clin Virol*, **2005**; 32 :S16-24.
38. **Partridge JM, Koutsky LA.** Genital human papillomavirus infection in men. *Lancet Infect Dis*, **2006**; 6:2131.
39. **Laukkanen P, Koskela P, Pukkala E, et al.** Time trends in incidence and prevalence of human papillomavirus type 6, 11 and 16 infections in Finland. *J Gen Virol*, 2003; 84:2105-9.
40. **Barrasso R, De Brux J, Croissant O, et al.** High prevalence of papillomavirus-associated penile intraepithelial neoplasia in sexual partners of women with cervical intraepithelial neoplasia. *N Engl J Med*, **1987**; 317:916- 23.
41. **Greer CE, Wheeler CM, Ladner MB, et al.** Human papillomavirus (HPV) type distribution and serological response to HPV type 6 virus-like particles in patients with genital warts. *J Clin Microbiol*,

1995;33:2058- 63.

42. **Ramoz N, Rueda LA, Bouadjar B, et al.** Mutations in two adjacent novel genes are associated with epidermodysplasia verruciformis. *Nat Genet*, **2002**;32:579-81.
43. **Roden RB, Lowy DR, Schiller JT.** Papillomavirus is resistant to desiccation. *J Infect Dis*, **1997**;176:1076-9.
44. **Helen Trottier, Ann N. Burchell** Epidemiology of Mucosal Human Papillomavirus Infection and associated Disease. *Public Helath Genomics*, **2009**;12:291-307.
45. **Ralph P. Insigna, Eric J. Dasbach, Elamin H. Elbasha, Kai-Li Liaw, Eliav Barr.** Incidence and Duration of Cervical Human Papillomavirus 6, 11, 16 and 18 Infections in Young Women: An Evaluation From Multiple Analytical Perspectives. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev*, **2007**;16 (4):709-715.
46. **Ho GY, Bierman R, Beardsley L, et al.** Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med*, **1998**;338:423-8.
47. **Salmeron J, Lazcano-Ponce E, Lorincz A, et al.** Comparison of HPV-based assays with Papanicolaou testis for cervical cancer screening in Morelos State, Mexico. *Cancer Causes Control*, **2003**;14:505-12.
48. **Herrero R, Hildesheim A, Bratti C, et al.** Population-based study of human papillomavirus infection and cervical neoplasia in rural Costa Rica. *J Natl Cancer Inst*, **2000**;92: 464-74.
49. **Munoz N, Mendez F, Posso H, et al.** Incidence, duration, and determinants of cervical human papillomavirus infection in a cohort of Colombian women with normal cytological results. *J Infect Dis*, **2004**;190:2077-87
50. **Partridge JM, Koutsky LA.** Genital human papillomavirus infection in men. *Lancet Infect Dis*, **2006**;6:2131.

- 51. Castellsague X, Bosch FX, Munoz N.** Environmental cofactors in HPV carcinogenesis. *Virus Res* , **2002**;89:191-9.
- 52. Winer RL, Hughes JP, Feng Q, et al.** Condom use and the risk of genital human papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med*, **2006**;354:2645-54.
- 53. Bosch FX, Lorincz A, Munoz N, et al.** The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol*,**2002**;55:244-65.
- 54. Snijders PJ, van den Brule AJ, Schrijnemakers HF, et al.** The use of general primers in the polymerase chain reaction permits the detection of a broad spectrum of human papillomavirus genotypes. *J Gen Virol* ,**1990**;71(Pt 1):173-81.
- 55. Resnick RM, Cornelissen MT, Wright DK, et al.** Detection and typing of human papillomavirus in archival cervical cancer specimens by DNA amplification with consensus primers. *J Natl Cancer Inst*, **1990**;82:1477-84.
- 56. International Agency for Research on Cancer.** Human Papillomaviruses, Vol. 64. Geneva: *World Health Organization*, **1995**.
- 57. Koutsky LA, Holmes KK, Crichtlow CW, et al.** A cohort study of the risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 in relation to papillomavirus infection. *N Engl J Med*, **1992**;327:1272-8.
- 58. Winer RL, Kiviat NB, Hughes JP, et al.** Development and duration of human papillomavirus lesions, after initial infection. *J Infect Dis*, **2005**;191:731-8.
- 59. Woodman CB, Collins S, Winter H, et al.** Natural history of cervical human papillomavirus infection in young women: a longitudinal cohort study. *Lancet*, **2001**;357:1831-6.
- 60. Liaw KL, Hildesheim A, Burk RD, et al.** A prospective study of human papillomavirus (HPV) type 16 DNA detection by polymerase chain reaction and its association with acquisition and persistence of other

HPV types. *J Infect Dis*, **2001**;183:8-15.

61. Schiffman M, Herrero R, Desalle R, et al. The carcinogenicity of human papillomavirus types reflects viral evolution. *Virology*, **2005**;337:76-84.
62. Nobbenhuis MA, Helmerhorst TJ, van den Brule AJ, et al. Cytological regression and clearance of high-risk human papillomavirus in women with an abnormal cervical test. *Lancet*, **2001**;358:1782-3.
63. Schlecht NF, Trevisan A, Duarte-Franco E, et al. Viral load as a predictor of the risk of cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Cancer*, **2003**;103:519-24.
64. Lorincz AT, Castle PE, Sherman ME, et al. Viral load of human papillomavirus and risk of CIN3 or cervical cancer. *Lancet*, **2002**;360:228-9.
65. Gravitt PE, Kovacic MB, Herrero R, et al. High load for most high risk human papillomavirus genotypes is associated with prevalent cervical cancer precursors but only HPV16 load predicts the development of incident disease. *Int J Cancer*, **2007**;121:2787-93.
66. Trimble CL, Piantadosi S, Gravitt P, et al. Spontaneous regression of high-grade cervical dysplasia: effects of human papillomavirus type and HLA phenotype. *Clin Cancer Res*, **2005**;11:4717-23.
67. Steben M, Duarte-Franco E. Human papillomavirus infection: epidemiology and pathophysiology. *Gynecol Oncol*, **2007**;107(2 Suppl 1):S2-5.
68. Wright TJ, Kurman R, Ferenczy A. Precancerous lesions of the cervix. In: Kurman R, ed. Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract. *New York: Springer-Verlag*, **1994**:229-77.
69. Kurman R, Solomon D. The Bethesda System for Reporting Cervical/Vaginal Cytologic Diagnoses. *New York: Springer-Verlag*, **1994**;28:12-17.

- 70. Josefsson AM, Magnusson PK, Ylitalo N, et al.** Viral load of human papilloma virus 16 as a determinant for development of cervical carcinoma in situ: a nested casecontrol study. *Lancet*, **2000**;355:2189-93.
- 71. Liaw KL, Glass AG, Manos MM, et al.** Detection of human papillomavirus DNA in cytologically normal women and subsequent cervical squamous intraepithelial lesions. *J Natl Cancer Inst*, **1999**;91:954-60.
- 72. Bosch FX, Manos MM, Munoz N, et al.** Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. *J Natl Cancer Inst*, **1995**; 87:796-802.
- 73. Bohmer G, van den Brule AJ, Brummer O, et al.** No confirmed case of human papillomavirus DNA-negative cervical intraepithelial neoplasia grade 3 or invasive primary cancer of the uterine cervix among 511 patients. *Am J Obstet Gynecol* **2003**;189:118-20.
- 74. Khan MJ, Castle PE, Lorincz AT, et al.** The elevated 10- year risk of cervical precancer and cancer in women with human papillomavirus (HPV) type 16 or 18 and the possible utility of type-specific HPV testing in clinical practice. *J Natl Cancer Inst*, **2005**;97:1072-9.
- 75. Clifford GM, Rana RK, Franceschi S, et al.** Human papillomavirus genotype distribution in low-grade cervical lesions: comparison by geographic region and with cervical cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **2005**;14: 1157-64.
- 76. Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, et al.** Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* , **2003**;348:518-27.
- 77. Altekruze SF, Lacey JV Jr, Brinton LA, et al.** Comparison of human papillomavirus genotypes, sexual, and reproductive risk factors of cervical adenocarcinoma and squamous cell carcinoma: Northeastern United States. *Am J Obstet Gynecol* , **2003**;188:657-63.
- 78. Castellsague X, Diaz M, de Sanjose S, et al.** Worldwide human papillomavirus etiology of cervical adenocarcinoma and its cofactors: implications for screening and prevention. *J Natl Cancer Inst*, **2006**;98:303-15.

- 79. Ishida GM, Kato N, Hayasaka T, et al.** Small cell neuroendocrine carcinomas of the uterine cervix: a histological, immunohistochemical, and molecular genetic study. *Int J Gynecol Pathol*, **2004**;23:366-72.
- 80. Grassmann K, Wilczynski SP, Cook N, et al.** HPV6 variants from malignant tumors with sequence alterations in the regulatory region do not reveal differences in the activities of the oncogene promoters but do contain amino acid exchanges in the E6 and E7 proteins. *Virology*, **1996**; 223:185-97.
- 81. Grussendorf-Conen EI.** Anogenital premalignant and malignant tumors (including Buschke-Lowenstein tumors). *Clin Dermatol*, **1997**;15:377-88.
- 82. Masih AS, Stoler MH, Farrow GM, et al.** Penile verrucous carcinoma: a clinicopathologic, human papillomavirus typing and flow cytometric analysis. *Mod Pathol*, **1992**;5:48-55.
- 83. Munger K, Baldwin A, Edwards KM, et al.** Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J. Virol*, **2004**; 78:11451-60.
- 84. Snijders PJ, Steenbergen RD, Heideman DA, et al.** HPV-mediated cervical carcinogenesis: concepts and clinical implications. *J Pathol*, **2006**;208:152-64.
- 85. 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.
- 86. Lazo PA.** The molecular genetics of cervical carcinoma. *Br J Cancer*, **1999**;80:2008-18.
- 87. SM, Kim HS, Rha SH, et al.** Promoter hypermethylation of multiple genes in carcinoma of the uterine cervix. *Clin Cancer Res*, **2001**;7:1982-6.
- 88. Sova P, Feng Q, Geiss G, et al.** Discovery of novel methylation biomarkers in cervical carcinoma by global demethylation and microarray analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **2006**;15:114-23.

- 89. Schapiro F, Sparkowski J, Adduci A, et al.** Golgi alkalization by the papillomavirus E5 oncoprotein. *J Cell Biol*, **2000**;148:305-15.
- 90. Prokopczyk B, Cox JE, Hoffmann D, et al.** Identification of tobacco-specific carcinogen in the cervical mucus of smokers and nonsmokers. *J Natl Cancer Inst* ,**1997**;89: 868-73.
- 91. Gillison ML, Shah KV.** Chapter 9: Role of mucosal human papillomavirus in nongenital cancers. *J Natl Cancer Inst Monogr* ,**2003**:57-65.
- 92. International Agency for Research on Cancer.** Human Papillomaviruses, Vol. 64. Geneva: *World Health Organization*, **1995**.
- 93. Dodge JA, Eltabbakh GH, Mount SL, et al.** Clinical features and risk of recurrence among patients with vaginal intraepithelial neoplasia. *Gynecol Oncol* , 2001;83:363-9.
- 94. Jemal A, Siegel R, Ward E, et al.** Cancer statistics, 2006. *CA Cancer J Clin* ,**2006**;56:106-30.
- 95. Lowy DR, Gillison ML.** A new link between Fanconi anemia and human papillomavirus-associated malignancies. *J Natl Cancer Inst* ,**2003**;95:1648-50.
- 96. Frisch M, Glimelius B, van den Brule AJ, et al.** Sexually transmitted infection as a cause of anal cancer. *N Engl J Med* ,**1997**;337:1350-8.
- 97. Frisch M, Biggar RJ, Goedert JJ.** Human papillomavirus associated cancers in patients with human immunodeficiency virus infection and acquired immunodeficiency syndrome. *J Natl Cancer Inst* , **2000**;92:1500-10.
- 98. de Sanjose S, Palefsky J.** Cervical and anal HPV infections in HIV positive women and men. *Virus Res* , **2002**;89:201-11.

- 99. Begum S, Cao D, Gillison M, et al.** Tissue distribution of human papillomavirus 16 DNA integration in patients with tonsillar carcinoma. *Clin Cancer Res* ,**2005**;11:5694-9.
- 100. Stoler MH.** Testing for human papillomavirus: data driven implications for cervical neoplasia management. *Clin Lab Med*, **2003**: 23: 569-583.
- 101. Cox JT.** Human papillomavirus testing in primary cervical screening and abnormal Papanicolaou management. *Obstet Gynecol Surv* , **2006**; 61: S15-S25.
- 102. Carozzi FM, Del Mistro A, Confortini M, et al.** Reproducibility of HPV DNA testing by Hybrid Capture 2 in a screening setting. *Am J Clin Pathol* ,**2005**; 124: 716-721.
- 103. Tarkowski TA, Rajeevan MS, Lee DR, Unger ER.** Improved detection of viral RNA isolated from liquid- based cytology samples. *Mol Diagn* , **2001**; 6: 125-130.
- 104. Castle PE, Solomon D, Hildesheim A, et al.** Stability of archived liquid-based cervical cytologic specimens. *Cancer*, **2003**; 99: 89-96.
- 105. Titus K.** Making a valid point about HPV tests. *CAP Today* . **2005**; 19. **106. Schiffman M, Solomon D.** Findings to date from the ASCUS-LSIL Triage Study (ALTS). *Arch Pathol Lab Med* , **2003**; 127: 946-949
- 107. Kobelin MH, Kobelin CG, Burke L, Lavin P, Niloff JM, Kim YB.** Incidence and predictors of cervical dysplasia in patients with minimally abnormal Papanicolaou testis. *Obstet Gynecol* ,**1998**; 92: 356-359.
- 108. ASCUS-LSIL Triage Study (ALTS) Group.** A randomized trial on the management of low-grade squamous intraepithelial lesion cytology interpretations [published comment appears in *Am J Obstet Gynecol* . 2003; 188: 1381-1382]. ASCUS-LSIL Triage Study (ALTS) Group. A randomized trial on the management of low-grade squamous intraepithelial lesion cytology interpretations. *Am J Obstet Gynecol* ,

- 2003; 188: 1393- 1400.
109. **Levine L, Lucci JA III, Dinh TV.** Atypical glandular cells: new Bethesda Terminology and Management Guidelines. *Obstet Gynecol Surv* ,2003; 58: 399-406.
110. **Naryshkin S.** The false-negative fraction for Papanicolaou smears: how often are “abnormal” smears not detected by a “standard” screening cytologist? *Arch Pathol Lab Med* , 1997; 121: 270-272.
111. **Guo M, Hu L, Martin L, Liu S, Baliga M, Hughson MD.** Accuracy of liquid-based Pap tests: comparison of concurrent liquid-based tests and cervical biopsies on 782 women with previously abnormal Pap smears. *Acta Cytol* ,2005; 49: 132-138.
112. **DeMay RM.** The Pap Smear. In: The art and science of cytopathology. Exfoliative cytology. *Chicago ASCP Press*, 1996; 61-205.
113. **van der Graaf Y, Vooijs GP.** False-negative rate in cervical cytology. *J Clin Pathol* , 1987; 40: 438-442.
114. **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 : 423-8.
115. **Wheeler CM, Greer CE, Becker TM, Hunt WC, Anderson SM, Manos MM.** Short-term fluctuations in the detection of cervical human papillomavirus DNA. *Obstet Gynecol*, 1996; 88 : 261-8.
116. **Bhatla N, Ramachandran S, Virmani A, Arora VK, Gulati A, Singla S, et al.** Correlation of FastHPV and cytology: Performance trial results from India. 24th International Papillomavirus Conference, Beijing, China; 2007 November 3-9,.
117. **Kuhn L, Denny L, Pollack A, Wright TC.** Human papillomavirus DNA testing for cervical cancer screening in low resource settings. *J Natl Cancer Inst*, 2000; 92 : 818-25.
118. **Bhatla N, Dar L, Sankaranarayanan R, Kumar P, Patro AR, Pati S, et al.** Age-specific human papillomavirus prevalence in north India. 24th International Papillomavirus Conference, Beijing, China,

November 3-9, 2007; PS 8-42.

119. **Sherman ME, Lorincz AT, Scott DR, Wacholder S, Castle PE, Glass AG, et al.** Baseline cytology human papillomavirus testing and risk for cervical neoplasia: a 10-year cohort analysis. *J Natl Cancer Inst*, 2003;95 : 46-52.

120. **Goldie SJ, Gaffikin L, Goldhaber-Fiebert JD, Gordillo-Tobar A, Levin C, Mahe C, Wright TC;** Alliance for Cervical Cancer Prevention Cost Working Group. Cost-effectiveness of cervical-cancer screening in five developing countries. *N Engl J Med* ,2005; 353 : 2158-68.

121. **The atypical squamous cells of undetermined significance/ low-grade squamous intraepithelial lesions triage study (ALTS) Group.** Human papillomavirus testing for triage of women with cytologic evidence of low-grade squamous intraepithelial lesions: baseline data from a randomized trial. *J Natl Cancer Inst*, 2000; 92 : 397-402.

122. **Wright TC Jr, Cox JT, Massad L, Twigg LB, Wilkinson EJ;** ASCCP-Sponsored Consensus Conference. Consensus guidelines for the management of women with cervical cytological abnormalities. *JAMA* ,2002; 287 : 2120-9.

123. **Wright TC Jr, Schiffman M, Solomon D, Cox JT, Garcia F, Goldie S, et al.** Interim guidance for the use of human papillomavirus DNA testing as an adjunct to cervical cytology for screening. *Obstet Gynecol*, 2004; 103 : 304-9.

124. **Soutter WP, de Barros Lopes A, Fletcher A, Monaghan JM, Duncan ID, Paraskevaidis E.** Invasive cervical cancer after conservative therapy for cervical intraepithelial neoplasia. *Lancet*, 1997; 349 : 978-80.

125. **Lorincz AT.** Screening for cervical cancer: new alternatives and research. *Salud Publica Mex* , 2003; 45 (Suppl 3): S376- S87.

126. **Krane JF, Granter SR, Trask CE, Hogan CL, Lee KR.** Papanicolaou smear sensitivity for the detection of adenocarcinoma of the cervix: a study of 49 cases. *Cancer*, 2001; 93: 8-15.

127. **Hopman AH, Kamps MA, Smedts F, Speel EJ, Herrington CS, Ramaekers FC.** HPV in situ

hybridization: impact of different protocols on the detection of integrated HPV. *Int J Cancer* ,**2005**; 115: 419-428.

128. Davies P, Kornegay J, Iftner T. Current methods of testing for human papillomavirus. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, **2001**; 15: 677-700.

129. Scheurer ME, Tortolero-Luna G, Adler-Storthz K. Human papillomavirus infection: biology, epidemiology, and prevention. *Int J Gynecol Cancer*,**2005**; 15: 727-746.

130. Carozzi FM, Del Mistro A, Confortini M, et al. Reproducibility of HPV DNA testing by Hybrid Capture 2 in a screening setting. *Am J Clin Pathol*, **2005**; 124: 716-721.

131. Peyton CL, Schiffman M, Lorincz AT, et al. Comparison of PCR- and hybrid capture-based human papillomavirus detection systems using multiple cervical specimen collection strategies. *J Clin Microbiol* , **1998**; 36: 3248-3254.

132. Schiffman M, Wheeler CM, Dasgupta A, Solomon D, Castle PE, and The ALTS Group. A comparison of a prototype PCR assay and Hybrid Capture 2 for detection of carcinogenic human papillomavirus DNA in women with equivocal or mildly abnormal Papanicolaou smears. *Am J Clin Pathol*, 2005; 124: 722-732.

133. Malloy C, Sherris J, Herdman C. HPV DNA testing: technical and programmatic issues for cervical cancer prevention in low-resource settings. Seattle: PATH; **2000**.

134. van Doorn LJ, Kleter B, Quint WG. Molecular detection and genotyping of human papillomavirus. *Expert Rev Mol Diagn*,**2001**; 1: 394-402.

135. Gravitt PE, Peyton CL, Alessi TQ, et al. Improved amplification of genital human papillomaviruses. *J Clin Microbiol* ,**2000**; 38: 357-361.

136. van Doorn LJ, Quint W, Iftner B, et al. Genotyping of human papillomavirus in liquid cytology cervical

specimens by the PGMY line blot assay and the SPF(10) line probe assay. *J Clin Microbiol* ,**2002**; 40: 979-983.

137. Morris BJ. Cervical human papillomavirus screening by PCR: advantages of targeting the E6/E7 region. *Clin Chem Lab Med* ,**2005**; 43: 1171-1177.

138. Brink AA,Snijders PJ,Meijer CJ,Berkhof J,Verheijen RH. HPV testing in cervical screening. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* , **2006**; 20: 253-266.

139. Fujii T,Masumoto N,Saito M, et al. Comparison between in situ hybridization and real-time PCR Technique as a means of detecting the integrated form of human papillomavirus 16 in cervical neoplasia. *Diagn Mol Pathol* ,**2005**; 14: 103-108

140. Kleter B, van Doorn LJ, ter Schegget J, et al. Novel short-fragment PCR assay for highly sensitive broad- spectrum detection of anogenital human papillomaviruses. *Am J Pathol* ., **1998**; 153: 1731-1739.

141. Gillio-Tos A,De Marco L,Ghisetti V, et al. Human papillomavirus typing with GP5+/6+ polymerase chain reaction reverse line blotting and with commercial type-specific PCR kits. *J Clin Virol* . **2006**; 36: 126-132.

142. van Ham MA,Bakkers JM,Harbers GK,Quint WG,Massuger LF,Melchers WJ. Comparison of two commercial assays for detection of human papillomavirus (HPV) in cervical scrape specimens: validation of the Roche AMPLICOR HPV test as a means to screen for HPV genotypes associated with a higher risk of cervical disorders. *J Clin Microbiol* , **2005**; 43: 2662-2667.

143. Monsonego J, Bohbot JM, Pollini G, et al. Performance of the Roche AMPLICOR human papillomavirus (HPV) test in prediction of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) in women with abnormal PAP smear. *Gynecol Oncol* , **2005**; 99: 160-168.

144. Crum CP,Genest DR,Krane JF, et al. Subclassifying atypical squamous cells in ThinPrep cervical cytology correlates with detection of high-risk human papillomavirus DNA. *Am J Clin Pathol* , **1999**; 112: 384-390.

- 145. Klaassen CH, Prinsen CF, de Valk HA, Horrevorts AM, Jeunink MA, Thunnissen FB.** DNA microarray format for detection and subtyping of human papillomavirus. *J Clin Microbiol* , **2004**; 42: 2152-2160.
- 146. Arens M.** Clinically relevant sequence-based genotyping of HBV, HCV, CMV, and HIV. *J Clin Virol*, **2001**; 22: 11-29.
- 147. Dunbar SA, Vander Zee CA, Oliver KG, Karem KL, Jacobson JW.** Quantitative, multiplexed detection of bacterial pathogens: DNA and protein applications of the Luminex LabMAP system. *J Microbiol Methods*, **2003**; 53: 245-252.
- 148. Schmitt M, Bravo IG, Snijders PJ, Gissmann L, Pawlita M, Waterboer T.** Bead-based multiplex genotyping of human papillomaviruses. *J Clin Microbiol*, **2006**; 44: 504-512.
- 149. Stillman MJ, Day SP, Schutzbank TE.** A comparative review of laboratory-developed tests utilizing Invader HPV analyte-specific reagents for the detection of high-risk human papillomavirus. *J Clin Virol*, **2009** ;45 Suppl 1:S73-7.
- 150. Harvey M, Stout S, Starkey CR, Hendren R, Holt S, Miller GC.** The clinical performance of Invader technology and SurePath when detecting the presence of high-risk HPV cervical infection. *J Clin Virol*, **2009** ;45:S79-83.
- 151. Snijders PJ, van den Brule AJ, Meijer CJ.** The clinical relevance of human papillomavirus testing: relationship between analytical and clinical sensitivity. *J Pathol* ,**2003**; 201: 1-6.
- 152. Gravitt PE, Peyton C, Wheeler C, Apple R, Higuchi R, Shah KV.** Reproducibility of HPV 16 and HPV 18 viral load quantitation using TaqMan real-time PCR assays. *J Virol Methods*,**2003**; 112: 23-33.
- 153. Carcopino X, Henry M, Benmoura D, et al.** Determination of HPV type 16 and 18 viral load in cervical smears of women referred to colposcopy. *J Med Virol* ,**2006**; 78: 1131-1140.

- 154. Molden T, Nygard JF, Kraus I, et al.** Predicting CIN2+ when detecting HPV mRNA and DNA by PreTect HPV-proofer and consensus PCR: a 2-year follow-up of women with ASCUS or LSIL Pap smear. *Int J Cancer*, **2005**; 114: 973-976.
- 155. Janeway CAJ, Medzhitov R.** Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol*, **2002**;20:197-216.
- 156. Akira S, Takeda K, Kaisho T.** Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol*, **2001**;2(8):675-680.
- 157. Hasan UA, Bates E, Takeshita F, et al.** TLR9 expression and function is abolished by the cervical cancer-associated human papillomavirus type 16. *J Immunol*, **2007** Mar 1;178(5):3186-3197.
- 158. Yan M, Peng J, Jabbar IA, et al.** Activation of dendritic cells by human papillomavirus-like particles through TLR4 and NF-kappaB-mediated signalling, moderated by TGF-beta. *Immunol Cell Biol*, **2005** Feb;83(1):83-91.
- 159. Woodworth CD.** HPV Innate Immunity. *Front Biosci*, **2002**;7(7):d2058-d2071.
- 160. Sillman FH, Stanek A, Sedlis A, et al.** The relationship between human papillomavirus and lower genital intraepithelial neoplasia in immunosuppressed women. *J Obstet Gynecol*, **1984**;150:300.
- 161. Sun XW, Kuhn L, Ellerbrock TV, et al.** Human papillomavirus infection in women infected with the human immunodeficiency virus. *NEJM*, **1997**;337:1343-1349.
- 162. Haftek M, Jablonska S, Orth G.** Specific cell-mediated immunity in patients with epidermodysplasia verruciformis and plane warts. *Dermatologica*, **1985**;170:213.
- 163. Kadish AS, Ho GY, Burk RD, et al.** Lymphoproliferative responses to human papillomavirus (HPV) type 16 proteins E6 and E7: outcome of HPV infection and associated neoplasia. *J Natl Cancer Inst*,

1997;89(17):1285-1293.

- 164. van der Burg SH, Piersma SJ, de Jong A, et al.** Association of cervical cancer with the presence of CD4⁺ regulatory T cells specific for human papillomavirus antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2007** 17;104(29):12087-12092.
- 165. Molling JW, de Gruijl TD, Glim J, et al.** CD4(+)CD25hi regulatory T-cell frequency correlates with persistence of human papillomavirus type 16 and T helper cell responses in patients with cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Cancer*, **2007** Oct 15;121(8):1749-1755.
- 166. Hudelist G, Manavi M, Pischinger KI, et al.** Physical state and expression of HPV DNA in benign and dysplastic cervical tissue: different levels of viral integration are correlated with lesion grade. *Gynecol Oncol*, **2004**;92(3):873-880.
- 167. Bontkes HJ, de Gruijl TD, Bijl A, et al.** Human papillomavirus type 16 E2-specific T-helper lymphocyte responses in patients with cervical intraepithelial neoplasia. *J Gen Virol*, **1999**;80(Pt 9):2453-2459.
- 168. Davidson EJ, Boswell CM, Sehr P, et al.** Immunological and clinical responses in women with vulval intraepithelial neoplasia vaccinated with a vaccinia virus encoding human papillomavirus 16/18 oncoproteins. *Cancer Res*, **2003** Sep 15;63(18):6032-6041.
- 169. Leykauf K, Salek M, Schluter H, et al.** Identification of membrane proteins differentially expressed in human papillomavirus type 16 E5-transfected human keratinocytes by nanoelectrospray ionization mass spectrometry. *J Gen Virol*, **2004**;85(Pt 6):1427-1431.
- 170. Tsai TC, Chen SL.** The biochemical and biological functions of human papillomavirus type 16 E5 protein. *Arch Virol*, **2003**;148(8):1445-1453.
- 171. Koutsky LA, Ault KA, Wheeler CM, et al.** A controlled trial of a human papillomavirus type 16 vaccine. *N Engl J Med*, **2002**;347(21):1645-1651.

- 172. Scott M, Nakagawa M, Moscicki AB.** Cell-mediated immune response to human papillomavirus infection. *Clin Diagn Lab Immunol*, **2001**;8(2):209-220.
- 173. Coeshott CM, Smithson SL, Verderber E, et al.** Pluronic F127-based systemic vaccine delivery systems. *Vaccine*, **2004** Jun 23;22(19):2396-2405
- 174. Pinto LA, Castle PE, Roden RB, et al.** HPV-16 L1 VLP vaccine elicits a broad-spectrum of cytokine responses in whole blood. *Vaccine*, **2005**;23(27):3555-3564.
- 175. Schreckenberger C, Kaufmann AM.** Vaccination strategies for the treatment and prevention of cervical cancer. *Curr Opin Oncol*, **2004** Sep;16(5):485-491.
- 176. Qian J, Dong Y, Pang YY, et al.** Combined prophylactic and therapeutic cancer vaccine: enhancing CTL responses to HPV16 E2 using a chimeric VLP in HLA-A2 mice. *Int J Cancer*, **2006** ;118(12):3022-3029.
- 177. Garland SM, Hernandez-Avila M, Wheeler CM, et al.** Quadrivalent vaccine against human papillomavirus to prevent anogenital diseases. *N Engl J Med*, **2007** May 10;356(19):1928-1943.
- 178. The FUTURE II Study Group.** Quadrivalent Vaccine against Human Papillomavirus to Prevent High-Grade Cervical Lesions. *NEJM*. **2007**;356(19):1915-1927.
- 179. Yarkin F.** Human papillomavirus enfeksiyonlarının virolojisi ve epidemiyolojisi. *Klinik Aktüel Tıp*, **2007**; 12(8):1-6.
- 180. Medeiros R, Soares R, Vasconcelos A, Schmitt F and Lopes C.** Glutathione S-transferase genotype GSTM1 as a predictor of elevated angiogenic phenotype in patients with early onset breast cancer. *Angiogenesis*, **2004**; 7:53-58.
- 181. Franco EL, Villa LL, Sobrinho JP and et al.** Epidemiology of acquisition and clearance of cervical , human papillomavirus infection in women from a high-risk area for cervical cancer. *Journal of Infectious Diseases*, **1999**; 180:1415-23.

- 182. Siriaunkgul S, Suwiwat S, Settakorn J and et al.** HPV genotyping in cervical cancer in Northern Thailand Adapting the linear array HPV assay for use on paraffin-embedded tissue. *Gynecologic Oncology*, **2008**; 108:555-560.
- 183. Coutlee F, Voyer H.** Effect of nonionic detergents on amplification of human papillomavirus DNA with consensus primers MY09 and MY11. *Journal of Clinical Microbiology*, **1998**; 36(4):1164.
- 184. Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM:** GLOBOCAN 2002 cancer incidence. Mortality and prevalence worldwide. In IARC Cancer Base No. 5 version 2.0 Lyon: *IARC Press*; **2004**.
- 185. Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J, Teppo L, Thomas DB, editors:** Cancer incidence in five continents. Volume III. Lyon: *IARC Scientific Publications* No. 155 IARC; **2002**.
- 186. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P.** Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*, **2005**; 55:74-108.
- 187. Arbyn M, Autier P, Ferlay J:** Burden of cervical cancer in the 27 member states of the European Union: estimates for 2004. *Ann Oncol* ,**2007**, 18:1425-1427
- 188. de Sanjosé S, Diaz M, Castellsagué X, Clifford G, Bruni L, Muñoz N, Bosch FX:** Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *Lancet Infect Dis* , **2007**, 7(7):453-9.
- 189. Bosch FX, Burchell AN, Schiffman M, Giuliano AR, de Sanjose S, Bruni L, Tortolero-Luna G, Kjaer SK, Muñoz N.** Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections and type-specific implications in cervical neoplasia. *Vaccine*, **2008**;26 Suppl 10:K1-16.
- 190. Clifford GM, Smith JS, Plummer M, Munoz N, Franceschi S.** Human papillomavirus in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. *Br J Cancer* ,**2003**;88:63-73.
- 191. Clifford G, Franceschi S, Diaz M, Munoz N, Villa LL:** HPV type distribution in women with and without

- cervical neoplastic diseases. *Vaccine*, **2006**, 24(Suppl 3):S26-34.
- 192. Smith JS, Lindsay L, Hoots B, Keys J, Franceschi S, Winer R, Clifford GM:** Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: A meta-analysis update. *Int J Cancer*, **2007**, 121:621-632.
- 193. Clifford GM, Smith JS, Aguado T, Franceschi S.** Comparison of HPV type distribution in high-grade cervical lesions and cervical cancer: a meta-analysis. *Br J Cancer*, **2003**;89:101-105.
- 194. Clifford GM, Rana RK, Franceschi S, Smith JS, Gough G, Pimenta JM:** Human papillomavirus genotype distribution in low-grade cervical lesions: comparison by geographic region and with cervical cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **2005**; 14:1157-1164.
- 195. De Vuyst H, Clifford G, Li N, Franceschi S.** HPV infection in Europe. *Eur J Cancer*, **2009** ;45(15):2632-9.
- 196. Insinga RP, Liaw KL, Johnson LG, Madeleine MM.** A systematic review of the prevalence and attribution of human papillomavirus types among cervical, vaginal, and vulvar precancers and cancers in the United States. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **2008** ;17(7):1611-22.
- 197. Briolat J, Dalstein V, Saunier M, Joseph K, Caudroy S, Pr etet JL, Birembaut P, Clavel C.** HPV prevalence, viral load and physical state of HPV-16 in cervical smears of patients with different grades of CIN. *Int J Cancer*, **2007**;121(10):2198-204.
- 198. Kovanda A, Juvan U, Sterbenc A, Kocjan BJ, Seme K, Jancar N, Vrtacnik-Bokal E, Poljak M.** Pre-vaccination distribution of human papillomavirus (HPV) genotypes in women with cervical intraepithelial neoplasia grade 3 (CIN 3) lesions in Slovenia. *Acta Dermatovenerol Alp Panonica Adriat*, **2009** ;18(2):47-52.
- 199. Szostek S, Klimek M, Zawilinska B, Kosz-Vnenchak M.** Genotype-specific human papillomavirus detection in cervical smears. *Acta Biochim Pol*, **2008**;55(4):687-92.
- 200. Sigurdsson K, Taddeo FJ, Benediktsdottir KR, Olafsdottir K, Sigvaldason H, Oddsson K, Rafnar T.**

HPV genotypes in CIN 2-3 lesions and cervical cancer: a population-based study.
Int J Cancer, **2007**;121(12):2682-7.

- 201. Hong D, Ye F, Chen H, Lü W, Cheng Q, Hu Y, Xie X.** Distribution of human papillomavirus genotypes in the patients with cervical carcinoma and its precursors in Zhejiang Province, China. *Int J Gynecol Cancer*, **2008**; 18(1):104-9.
- 202. Lee HS, Kim KM, Kim SM, Choi YD, Nam JH, Park CS, Choi HS.** Human papillomavirus genotyping using HPV DNA chip analysis in Korean women. *Int J Gynecol Cancer*, **2007**; 17(2):497-501.
- 203. Canadas P, Cirigliano V, Ordonez E, Ejarque M, Voglino G.** New high-throughput method for oncogenic human papilloma viruses genotyping by multiplex Fluorescent PCR (f-HVP typing) in 4051 cervical samples. *European Journal of Public Health, Supplement* ,**2008** Vol 16; S44.
- 204. Usubütün A, Alemany L, Küçükali T, Ayhan A, Yüce K, de Sanjosé S, Font R, Lloveras B, Klaustermeier J, Quint W, Muñoz N, Bosch FX.** Human papillomavirus types in invasive cervical cancer specimens from Turkey. *Int J Gynecol Pathol*, **2009** ;28(6):541-8.
- 205. Dursun P, Senger SS, Arslan H, Kuşçu E, Ayhan A.** Human papillomavirus (HPV) prevalence and types among Turkish women at a gynecology outpatient unit. *BMC Infect Dis*, **2009** ;9:191.
- 206. Ozgul N, Cil AP, Bozdayi G, Usubutun A, Bulbul D, Rota S, Kose MF, Biri A, Haberal A.** Staining characteristics of p16INK4a: is there a correlation with lesion grade or high-risk human papilloma virus positivity? *J Obstet Gynaecol Res*, **2008** ;34(5):865-71.
- 207. Onan MA, Taskiran C, Bozdayi G, Biri A, Erdem O, Acar A, Gunaydin G, Rota S, Ataoglu O, Guner H.** Assessment of human papilloma viral load of archival cervical intraepithelial neoplasia by real-time polymerase chain reaction in a Turkish population. *Eur J Gynaecol Oncol*,**2005**;26(6):632-5.
- 208. Inal MM, Köse S, Yildirim Y, Ozdemir Y, Töz E, Ertopçu K, Ozelmas I, Tinar S.** The relationship between human papillomavirus infection and cervical intraepithelial neoplasia in Turkish women. *Int J Gynecol Cancer*,**2007**;17(6):1266-70.

209.Ozçelik 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.

8.ÖZGEÇMİŞ

Adana'da 1979 yılında doğdu. İlköğretim eğitimini Şakirpaşa İlkokulu, Ortaöğretimi Necdet Kahraman Ortaokulu ve Lise eğitimini Adana Erkek Lisesi'nde tamamladı. Almanya'da Freie Universitat, Tıp Fakültesinde moleküler tıp teknikleri ile ilgili çalışmalarda bulundu, ardından İsrail'de Hebrew University ve Weizmann Institute'de Mikrobiyoloji çalışmalarına 3 yıl süre ile katıldı. Çukurova Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünden 2006 yılında mezun oldu. 2008 yılında Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programında eğitimi almaya başladı.

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

**BÖLGEMİZDE SERVİKAL KANSER VE PREKANSERÖZ
LEZYONLARI OLAN KADINLARDA ONKOJENİK
HUMAN PAPİLLOMAVİRUS GENOTİPLERİNİN
PREVALANSININ BELİRLENMESİ**

Deniz YILDIRIM

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Fügen YARKIN

**Bu çalışma Çukurova Üniversitesi Rektörlüğü Araştırma Fonu TF2009YL13
numaralı proje olarak desteklenmiştir**

ADANA-2010

TEŞEKKÜR

Tez konumun seçilmesinde ve hazırlanmasında, tüm pratik çalışmalarında bana yol gösteren ve her ne şekilde olursa olsun yardım ve desteğini esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Fügen YARKIN'a, ayrıca Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Fatih KÖKSAL'a, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Sayın Prof.Dr. Mehmet Ali VARDAR'a ve son olarak Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Sayın Doç.Dr. Derya GÜMÜRDÜLÜ'ye teşekkürlerimi sunarım.

Deniz YILDIRIM

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
KABUL VE ONAY	
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ	v
TABLolar DİZİNİ	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR	vii
ÖZET	viii
ABSTRACT	ix
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Tarihçe	4
2.2. Sınıflandırma	5
2.3. Virusun yaşam siklusu ve yapısı	7
2.3.1. HPV genel özellikleri	8
2.3.2. Strüktürel ve Aksesuar Proteinler	10
2.4. Patogenez	11
2.5. Onkogenez	12
2.6. HPV ve yaptığı hastalıklar	13
2.6.1. Anogenital siğiller	13
2.6.2. Epidermodysplasia verruciformis (EV)	15
2.6.3. Genital olmayan deri siğilleri	16
2.7. HPV ve Kanser	16
2.7.1. Servikal Kanser	18
2.7.2. Vulvar, Vajinal, Penil ve Anal Kanser	21
2.7.3. Baş ve Boyun Kanserleri	23
2.8. HPV Enfeksiyonlarının Tanısı	23
2.8.1. Giriş	24
2.8.2. Sitolojik Test	25

2.8.3. HPV DNA Testi	26
2.8.3.1. Direkt Hibridizasyon testi	28
2.8.3.2. Sinyal Amplifikasyon Testi	29
2.8.3.3. Nükleik asit Amplifikasyon Testi	29
2.8.3.4. Yeni teknolojiler	32
2.9. HPV İmmünolojisi	34
2.10. HPV aşıları	36
2.11. HPV enfeksiyonlarının epidemiyolojisi	40
3. GEREÇ VE YÖNTEM	44
3.1. HPV DNA ekstraksiyonu	44
3.1.1. Çözeltinin hazırlanması	44
3.1.2. Ekstraksiyon aşamaları	45
3.2. Konsensus PCR ile HPV DNA amplifikasyonu	46
3.3. Amplifiye edilen PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezinde gösterilmesi	47
3.4. HPV'un multipleks floresan PCR testi olan f-HPV typing Kit ile genotiplendirilmesi.	48
4. BULGULAR	51
5. TARTIŞMA	56
6. SONUÇLAR	69
7. KAYNAKLAR	71
8. ÖZGEÇMİŞ	94

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 4.1. HPV PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jelde gösterilmesi.	48
Şekil 4.2. HPV PCR ürünlerinin genetik analiz cihazında görüntülenmesi.	50

TABLolar DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 5.1. Servikal kanser, CIN1 ,CIN 2/3 ve kontrol grubunda HPV prevalansı.	51
Tablo 5.2. Servikal kanser, CIN1 , CIN2/3 ve kontrol gruplarında HPV tiplerinin dağılımı.	52
Tablo 5.3. Çalışma gruplarında HR HPV ve LR HPV tiplerinin dağılımı	53
Tablo 5.4. Normal sitolojili kadınların demografik bilgileri	54
Tablo 5.5. Servikal kanserli popülasyonun demografik bilgileri	55

SİMGELER ve KISATLIMALAR

ABD :	Amerika Birleşik Devletleri
ASC-H :	Atypical squamous cells- HSIL dışlanmayan
ASCUS :	Atypical squamous cells of undetermined significance
CIN :	Cervical intraepithelial neoplasia
DNA :	Deoxyribonucleic acid
EIA :	Enzyme-linked immunosorbent assays
FDA :	Food and Drug Administration
HCII :	Hybrid Capture II
HLA:	Human Leucoyte Antigen
HPV:	Human Papilloma Virus
HR HPV:	High risk Human papilloma virus
HSIL :	High grade cervical intraepithelial lesion
HSV 2:	Herpes Simplex Virus 2
İFN :	Interferon
İL :	Interleukin
İCC :	İnvazive Cell Carcinom
LCR:	Long control region
LR HPV :	Low risk Human papilloma virus
LSIL :	Low grade cervical intraepithelial lesion
mRNA:	Messenger Ribonucleic acid
MHC :	Major Histocompatibility Complex
NPV :	Negative predictive Value
ORF :	Open reading frame
pA:	polyadenylation
PCR :	Polymerase chain reaction
PPV :	Positive Predictive Value
RFLP :	Restriction fragment length polimorphism
RNA :	Ribonucleic acid
RLU:	Relative Light Unit
TLR:	Toll-Like Receptor
URR:	Upstream Regulatory Region

ÖZET

BÖLGEMİZDE SERVİKAL KANSER VE PREKANSERÖZ LEZYONLARI OLAN KADINLARDA ONKOJENİK HUMAN PAPİLLOMAVİRUS GENOTİPLERİNİN PREVALANSININ BELİRLENMESİ

Servikal kanser bütün dünyada kadınlar arasında görülen en yaygın ikinci kanserdir. Human papillomavirus (HPV) servikal kanserin primer etyolojik ajanıdır. Bu çalışma Çukurova bölgesinde servikal kanser ve prekanseröz lezyonları olan kadınlarda HPV genotiplerinin prevalansını tespit için yapılmıştır. Bu amaçla skuamoz hücreli servikal kanser tanılı 27 kadın, 18 CIN1 (cervical intraepithelial neoplasia), 16 CIN2/3 ve kontrol grubu olarak normal servikal sitolojisi olan 122 kadına ait örneklerde HPV DNA tespiti için MY09/11 ve GP5+/6+ konsensus PCR (polymerase chain reaction) testi kullanılmıştır. HPV genotipleme multipleks floresan PCR testi olan f-HPV typing Kit (Molgentix, Barcelona, Spain) ile yapılmıştır. Floresan ile işaretli PCR ürünleri ABI 3130 genetic analyzer (Applied Biosystems) cihazında kapiller elektroforez ile analiz edilmiştir. HPV prevalansı servikal kanserde %92.5, CIN2/3'de %81.2, CIN1'de %66,6 ve kontrol grubunda ise %6.5 oranında bulunmuştur. Servikal kanser vakalarında en yaygın tip %66.6 oranla HPV16 olup ardından HPV18 (%11.1) ve HPV31, 58, 59 ve 68 (her biri %3.7) izlemiştir. CIN 2/3 lezyonlarında da HPV16 (%56.2) en baskın tip olup sonraki yaygın tipler HPV18 (%12.5), HPV11 (%12.5), HPV45, 51, 52, 58 ve 6 (her biri %6.2)'dir. CIN1'de en çok bulunan tip HPV59 (%22) olup diğer tipler HPV16 (%16.6), HPV11 (%11.1), HPV18, HPV31 ve HPV 35 (her biri %5.5)'dir. HPV16 ve/veya HPV18 enfeksiyonu servikal kanser vakalarının %74'ü (20/27) ve CIN2/3 vakalarının %62.5'inde (10/16) tanınmıştır. Sonuç olarak bölgemizde servikal kanser ve CIN2/3 tanılı kadınlarda bulunan en baskın iki tip HPV16 ve HPV18 olup günümüzde kullanılan profilaktik HPV aşılarının hedeflediği tiplerdir. Bölgemizde servikal kanser ve prekanseröz lezyonu olan kadınlarda HPV genotiplerinin dağılımının araştırılması HPV aşılarının etkinliğinin değerlendirilmesi için önemlidir.

Anahtar Sözcükler: HPV, genotip, servikal kanser, prekanseröz lezyonlar, prevalans.

ABSTRACT

THE DETECTION OF PREVALENCE OF ONCOGENIC HUMAN PAPILLOMAVIRUS GENOTYPES AMONG WOMEN WITH CERVICAL CANCER AND PRECANCEROUS LESIONS IN OUR REGION

Cervical cancer is the second most common cancer among women worldwide. Human papillomavirus (HPV) is the primer etiologic agent of the cervical cancer. The aim of this study was to detect the prevalence of HPV genotypes among women with cervical cancer and precancerous lesions in Çukurova region. For this purpose, the samples from 27 women with squamous cell cervical cancer, 18 CIN1 (cervical intraepithelial neoplasia), 16 CIN2/3 and 122 women with normal cervical cytology as control group were investigated for HPV DNA by MY09/11 and GP5+/6+ consensus PCR (polymerase chain reaction) test. HPV genotyping was performed by the f-HPV typing Kit (Molgentix, Barcelona, Spain) which is multiplex fluorescent PCR test. Fluorescent PCR products were analyzed by capillary electrophoresis on ABI 3130 genetic analyzer (Applied Biosystems) device. The prevalence of HPV was found to be 92.5% in cervical cancer, 81.2% in CIN2/3, %66,6 in CIN1 and 6.5% in the control group. In cervical cancer cases, HPV16 was the most common type with a rate of 66.6%, followed by HPV18 (11.1%) and HPV31, 58, 59 ve 68 (3.7%, each). The most prevalent type was also HPV16 (%56.2) among CIN 2/3 lesions and the next common types were HPV18 (12.5%), HPV11 (12.5%), HPV45, 51, 52, 58 ve 6 (6.2%, each). In CIN1 cases, the most frequently observed type was HPV59 (22%) and the other types were HPV16 (16.6%), HPV11 (11.1%), HPV18, HPV31 ve HPV 35 (5.5%, each). HPV16 and/or HPV18 infection was identified in 74% (20/27) of cervical cancer cases and in 62.5% (10/16) of CIN2/3 cases. In conclusion, the two most predominant types found in women with cervical cancer and CIN2/3 were HPV16 and HPV18 which are the types targeted by current prophylactic HPV vaccines. The investigation of the distribution of HPV genotypes in women with cervical cancer and precancerous lesions in our region is important for evaluating the impact of HPV vaccines.

Key words; HPV, genotype, cervical cancer, precancerous lesions, prevalence.