

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

**BAŞ-BOYUN VE SERVİKS KANSERLİ HASTALARDA POLİMERAZ
ZİNCİR REAKSİYONU (PCR) İLE HUMAN PAPİLLOMAVİRUS
POZİTİFLİĞİ TESPİT EDİLEN SONUÇLARIN DNA DİZİ ANALİZİ İLE
DOĞRULANMASI, PREVALANSININ BELİRLENMESİ VE
FİLOGENETİK ANALİZLERİNİN YAPILMASI**

DOKTORA TEZİ

Gülçin ALP AVCI

Tez Danışmanı
Doç. Dr. Gülendaml BOZDAYI

ANKARA
ŞUBAT 2011

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

**BAŞ-BOYUN VE SERVİKS KANSERLİ HASTALARDA POLİMERAZ
ZİNCİR REAKSİYONU (PCR) İLE HUMAN PAPİLLOMAVİRUS
POZİTİFLİĞİ TESPİT EDİLEN SONUÇLARIN DNA DİZİ ANALİZİ İLE
DOĞRULANMASI, PREVALANSININ BELİRLENMESİ VE
FİLOGENETİK ANALİZLERİNİN YAPILMASI**

DOKTORA TEZİ

Gülçin ALP AVCI

Tez Danışmanı
Doç. Dr. Gülendaml BOZDAYI

Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 01/2009-65 proje numarası ile desteklenmiştir.

ANKARA
ŞUBAT 2011

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tıbbi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı Doktora Programı
çerçevesinde yürütölmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından
Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 23 /02 /2011

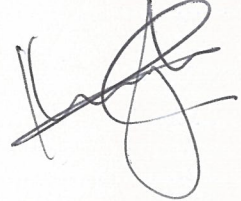
Prof. Dr. Turgut İMİR
Gazi Üniversitesi
Jüri Başkanı



Doç. Dr. Gülendarn BOZDAYI
Gazi Üniversitesi



Doç. Dr. Kayhan ÇAĞLAR
Gazi Üniversitesi



Doç. Dr. Ahmet PINAR
Hacettepe Üniversitesi



Doç. Dr. Işıl FİDAN
Gazi Üniversitesi



İÇİNDEKİLER

Kabul ve onay.....	i
İçindekiler.....	ii
Şekiller.....	iv
Resimler	v
Grafikler.....	vi
Tablolar.....	vii
Semboller, Kısaltmalar	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Tarihçe.....	3
2.2. HPV'nin Sınıflandırılması	6
2.3. HPV'nin Genel Özellikleri.....	10
2.3.1. HPV'nin yapısı ve proteinleri.....	11
2.3.2 HPV'nin replikasyonu.....	18
2.4. HPV'nin Klinik Bulguları	22
2.4.1. Epidermodisplazia verrusiformis	24
2.4.2. Anogenital siğiller.....	24
2.4.3. Genital olmayan diğer deri siğilleri	26

2.5. HPV'nin Kanser ile İlişkisi	26
2.5.1. Serviks kanseri ve HPV	27
2.5.2. Baş-boyun kanserleri ve HPV	39
2.5.3. Vulva kanseri ve HPV	43
2.5.4. Anal kanserler ve HPV.....	43
2.6. HPV'nin Bulaşma Yolları.....	44
2.6.1. Seksüel bulaşma	45
2.6.2. Ekstragenital bulaşma	46
2.6.3. Vertikal bulaşma	46
2.7. HPV Enfeksiyonunda İmmün Yanıt.....	47
2.8. HPV Enfeksiyonlarının Epidemiyolojisi	49
2.9. HPV Enfeksiyonu Tanısında Kullanılan Moleküler Yöntemler	53
2.10. HPV Enfeksiyonundan Korunma	60
2.11. HPV Enfeksiyonundan Korunmada Aşıların Yeri	61
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	65
3.1. Çalışma Grupları.....	65
3.2. Servikal Örneklerin Toplanması.....	65
3.3. Araç ve Gereçler.....	66
3.3.1. Laboratuvar araç ve gereçleri	66
3.3.2. Kullanılan kimyasal maddeler	67
3.3.3. Hazırlanılarak kullanılan solüsyonlar	68

3.4. Yöntem	68
3.4.1. Deparafinizasyon yöntemi.....	68
3.4.2. DNA ekstraksiyon yöntemi.....	69
3.4.3. Ekstraksiyon örneklerinin çoğaltılması.....	70
3.4.4. Real Time PCR uygulaması.....	71
3.4.5. HPV pozitif örneklerin elektroforezde gösterilmesi.....	77
3.4.6. Pozitif bulunan HPV DNA örneklerinin tiplendirilmesi	79
3.4.7. Dizisi belirlenen HPV tiplerinin filogenetik analizi.....	81
3.5. İstatistiksel Analiz	82
4. BULGULAR.....	83
5. TARTIŞMA	104
6. SONUÇ.....	117
7. ÖZET	119
8. SUMMARY	121
9. KAYNAKLAR	123
10. EKLER	151
ETİK KURUL BELGESİ	152
TEŞEKKÜR.....	153
ÖZGEÇMİŞ	154

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil 1. Papillomaviridae ailesinde yer alan cinsler	7
Şekil 2. HPV'nin genel görünümü.....	10
Şekil 3. Viral DNA'nın organizasyonu.....	12
Şekil 4. HPV'nin genomik yapısı	12
Şekil 5. Karsinogenezde E2 gen bölgesinin kırılması.....	19
Şekil 6. Rb ve p53'e bağlanan HPV'nin E6 ve E7 proteinleri	20
Şekil 7. HPV'nin yaşam döngüsü	22
Şekil 8. Servikal kanser gelişimi	29
Şekil 9. CIN'de kullanılan sınıflamaların karşılaştırılması.....	31
Şekil 10. CIN'de regresyon ve progresyon.....	32
Şekil 11a. Servikal kanserin doğal seyri.....	36
Şekil 11b. Servikal kanserin doğal seyri.....	37

RESİMLER

Resim 1. Koilosit görünümü 36

Resim 2. Agaroj jel görüntüsü 85

GRAFİKLER

Grafik 1. HPV ile ilişkili kanserlerde HPV görülme sıklığı.....	27
Grafik 2. Pozitif ve negatif kontroller	75
Grafik 3. HPV tip 16, pozitif ve negatif kontroller.....	76
Grafik 4. HPV 16, HPV 16 dışındaki tipler, pozitif ve negatif kontroller ..	76
Grafik 5. HPV tip 16 olan servikal örneklerin belirlenmesi.....	84
Grafik 6. HPV tip 16 ve HPV 16 dışındaki tiplerin belirlenmesi	84
Grafik 7. HPV tip 11 dizisinin genetik analiz cihazında elde edilen kromotogramı.....	87
Grafik 8. Servikal örneklerde Real Time PCR sonuçları	87
Grafik 9. Baş-boyun örneklerinde Real Time PCR sonuçları	88
Grafik 10. HPV'nin filogenetik ağacı.....	88
Grafik 11. Serviks örneği alınan hastaların yaş gruplarına göre HPV pozitifliği.....	91
Grafik 12. Serviks örneği alınan hastaların eğitim durumlarına göre HPV pozitifliği.....	93
Grafik 13. Serviks örneği alınan hastaların patoloji verilerine göre HPV pozitifliği.....	96
Grafik 14. Serviks örneği alınan hastaların patoloji verilerine göre HPV tiplerinin pozitifliği	97

Grafik 15. Baş-boyun kanseri hastalarının yaş dağılımına

göre HPV pozitifliği..... 100

TABLÖLAR

Tablo 1. Servikal kansere neden olan alfa papillomaviruslar	8
Tablo 2. Bölgelere göre HPV prevalansı	52
Tablo 3. Dizi analizi sonucundan elde edilen diziler	86
Tablo 4. Serviks örneği alınan hastaların demografik bilgileri	89
Tablo 5. Serviks örneği alınan hastaların sigara, OKS ve RIA kullanımı ile HPV pozitifliği	90
Tablo 6. Serviks örneği alınan hastaların yaş gruplarına göre HPV pozitifliği	92
Tablo 7. Serviks örneği alınan hastaların eğitim durumlarına göre HPV pozitifliği	94
Tablo 8. Serviks örneği alınan hastalarda çocuk ve gebelik sayılarına göre HPV pozitifliği	95
Tablo 9. Serviks örneği alınan hastaların patoloji verilerine göre HPV pozitifliği	97
Tablo 10. Baş-boyun kanseri hastalarının demografik bilgileri	98
Tablo 11. Baş-boyun kanseri hastalarının cinsiyetine göre HPV pozitifliği	99

Tablo 12. Baş-boyun kanseri hastalarının sigara kullanımına göre HPV pozitifliği	99
Tablo 13. Baş-boyun kanseri hastalarının yaş dağılımına göre HPV pozitifliği	101
Tablo 14. Baş-boyun kanseri hastalarının tümör lokalizasyonu, T derecesi ve lenf nodu metastazına göre HPV pozitifliği	103

SEMBOLLER, KISALTMALAR

ABD: Amerika Birleşik Devletleri

APC : Antigen presenting cell

ASC-H : Atypical squamous cells- HSIL dışlanmayan

ASC-US : Atypical squamous cells of undetermined significance

CIN : Cervical intraepithelial neoplasia

DNA : Deoxyribonucleic acid

EM : Elektron mikroskobu

FDA : Food and Drug Administration

HCII : Hybrid Capture II

HPV: Human Papilloma Virus

HR HPV: High risk Human papilloma virus

HSIL : High grade cervical intraepithelial lesion

HSV 2: Herpes Simplex Virus 2

LCR: Long control region

LR HPV : Low risk Human papilloma virus

LSIL : Low grade cervical intraepithelial lesion

mRNA: messenger Ribonucleic acid

ORF : Open reading frame

pA: polyadenylation

PCR : Polymerase chain reaction

RFLP : Restriction fragment length polymorphism

RLU : Relative light unit

RNA : Ribonucleic acid

URR: Upstream regulatory region

1. GİRİŞ

Human papillomavirus (HPV) bütün dünyada serviks kanserinin primer etiyolojik ajanı olarak kabul edilmektedir. HPV genital bölge dışında da prekanseröz lezyonlara sebep olmaktadır.¹

Human papillomavirus küçük, çift sarmallı bir DNA virüsüdür. Deriyi ve mukozal epitelyal yüzeyleri enfekte etmektedir.² Günümüzde yaklaşık olarak 200'den fazla HPV tipi tanımlanmıştır.³ HPV'lerin sınıflandırılması; tür orijini ve DNA hibridizasyonu ile tespit edilen viral genomlar arasındaki homolojinin derecesine bağlıdır.⁴ HPV sadece serviks kanserinde değil aynı zamanda deri ve faringeal kanserler gibi diğer malignansilerle ilişkili olan vulvar, vaginal, penil ve anal kanserlerden de sorumludur.⁵ Yaklaşık 40 HPV tipinin, genital mukoza enfeksiyonuna sebep olduğu bilinmektedir ve kanserojen potansiyeline göre sınıflandırılmaktadır.⁶

Serviks kanseri, meme kanserinden sonra dünyada en sık görülen ikinci kanser türüdür. Her yıl tanı konan 500 binin üzerinde yeni olguya karşın 275 bin hasta hayatını kaybetmektedir. Olguların %80'i ise gelişmekte olan ülkelerde izlenmektedir. Ayrıca, siyahlarda beyazlara göre iki kat daha fazla görülmektedir.⁷ Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı verilerine göre; 1996'da 623 tane serviks kanseri saptanmış olup, tüm kadın kanserleri arasında 7. sırada iken, 2002 yılında bu sayı 708'e çıkmış, ancak tüm kadın kanserleri arasında 10. sıraya gerilemiştir. 2003 yılı verilerinde ise serviks kanseri sayısı 763'e çıkarken tüm kadın kanserleri arasında da 9. sıraya yükselmiştir.⁸ Genelde yüksek dereceli

lezyonlar düşük dereceli lezyonlardan gelişse de, bir kısım olguda direkt olarak yüksek dereceli lezyon şeklinde görülmektedir. Genital sistemin HPV enfeksiyonu düşük dereceli lezyon olarak başlayıp kansere kadar devam edebilmektedir.⁹

Baş ve boyun tümörleri ise tüm kanserlerin %10-15'ini oluşturmaktadır.¹⁰ Son yıllarda yapılan baş ve boyun tümörleri ile ilgili yapılan çalışmalarda diğer faktörlere ek olarak HPV enfeksiyonları üzerinde de durulmaya başlanmıştır. HPV enfeksiyonu, insan genital keratinositlerini, oral ve tonsiller epitel hücrelerini ölümsüzleştirmektedir. Bu durum maligniteye dönüşümde başlatıcı olarak önemli rol oynamaktadır.¹¹ Baş ve boyun kanserleri arasında gözlenen larinks kanserleri, tüm kanserlerin %2'sini, baş ve boyun kanserlerinin ise yaklaşık %25'ini oluşturmaktadırlar. Ayrıca, üst solunum yolu kanserleri içinde de en sık rastlanan kanser şeklidir.¹²

Çalışmamızın amacı, serviks ve baş-boyun kanser olgularında polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve DNA dizi analizi ile kesin tanısı konan human papillomavirusun, bölgemizdeki prevalansının belirlenip, filogenetik analizlerinin yapılarak saptanan tiplerin filogenetik ağaçtaki yerinin belirlenmesidir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe

Millattan önce genital siğillerin viral kökenli olduğuna dair bir görüş bulunmamakta idi. Bu siğillerin enfeksiyon kökenli olduğu antik Yunan ve Roma'dan itibaren bilinmekteydi.¹³ İlk belirlenen DNA tümör virüsü, 1930 yılında Richard Shope tarafından keşfedilen pamuk kuyruklu tavşan papilloma virüsüdür (CRPV).¹ Bazı önemli gelişmeler ise, 1950 ve 1960'larda keşfedilmiştir. Bu dönemde viral replikasyonun, virus ile enfekte epitelyal hücrelerin farklılaşması süreci ile bağlantılı olduğu belirlenmiştir. Ayrıca bu süreçte papillomavirus virionlarının bazı fizikokimyasal analizleri de gerçekleştirilmiştir.¹⁴ Bu bilimsel gelişmenin ardından papillomavirusun biyokimyasal ve biyolojik çalışmaları da oldukça ilerlemiştir. Genom sekanslama sürecinin tamamlanması ile birlikte genomda açık okuma bölgeleri (ORF, Open Reading Frame) tanımlanmış ve araştırmacılar viral genlerin fonksiyonları hakkında da bilgi sahibi olmaya başlamıştır. Bu gelişmelerle birlikte, papillomavirus araştırmaları artarak devam etmiştir.^{15,16} Bovine papillomavirus tip-1'in (BPV-1) sıçan hücrelerinde değişimi indüklediğinin belirlenmesi ile birlikte bu tip viruslar birçok araştırmada standart olarak kullanılmaya başlanmıştır.^{17,18} Human papillomavirus (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. HPV tiplerinin varlığının belirlenmesi ile servikal kanser arasında oldukça sıkı bir ilişkinin bulunduğu da tespit edilmiştir. Bu durum HPV'nin tıp alanındaki önemini oldukça arttırmıştır.^{19,20}

İnsanlarda HPV enfeksiyonuna bağlı siğillerin tanımlanması ilk olarak İtalya'da Ciuffo tarafından 1907'de kanıtlanmıştır. Kansere ve papillomatöz lezyon arasındaki ilk ilişki ise, epidermodisplazi verrusiformis (EV) ile ilk kez 1922'de rapor edilmiştir. Epidermodisplazi verrusiformisli hastalarda bazı deri kanserlerinin görülmesi, bazı HPV tiplerinin malign potansiyeli olduğunu düşündürmüştür.²⁰ Ancak papillomavirusun bu lezyonlara neden olduğunun kanıtlanması bundan çok daha sonraki zamanlara denk gelmektedir.²¹

Serviks kanserinin cinsel yolla ortaya çıkan bir hastalık olduğu uzun yıllardan beri bilinmektedir. Meisels ve Fortin 1970'lerin ortalarında servikte HPV enfeksiyonu ve servikal intraepitelyal neoplazi (CIN) histolojisinin beraberliğine dikkat çekmişlerdir.²² Servikal kanserlerde HPV'nin varlığı deneysel olarak 1972 yılında araştırılmaya başlanmıştır.²³ Bazı çalışmalarda genital lezyonların nadir olarak malign tümörlere dönüştüğü bildirilmiş olup, bunun üzerine genital lezyonlarda belirlenen virusun kansere yol açan bir aday olduğu görüşü kesinlik kazanmaya başlamıştır. İki çalışma grubunun 1970'lerde aynı anda HPV ailesinden bahsetmiş ve HPV ailesine ait yaklaşık 100 tipin bulunduğunu iddia etmişlerdir.^{23,24}

Human papillomavirus ve servikal kanser arasındaki ilişki ilk kez 1976 yılında Harald zur Hausen tarafından ortaya konmuştur. Gissmann ve zur Hausen 1980–1982 yılları arasında genital lezyonlardan ve laringeal papilloma örneklerinden iki HPV DNA'sı karakterize etmiştir.²³ Moleküler yöntemlerin 1970'li yıllarda geliştirilmesi, papillomavirus araştırmalarında Rönesans devrinin yaşanmasına neden olmuştur. Bilim adamları bu teknik gelişim sayesinde papillomavirusun genomik yapısını tanımlamayı başarmışlardır.¹⁵ zur Hausen tarafından yapılan diğer serviks

kanseri çalışmalarında ise HPV tip 16 ile 18 belirlenmiş ve gelişen teknoloji sonucunda birçok olguda HPV DNA'sı saptanmıştır.²⁴ Harald zur Hausen bu buluşuyla 2008 yılında Nobel tıp ödölüne layık görölmüşür. Daha sonra devam eden çalışmalarda elde edilen biyopsilerin %70'inde yine bu iki tip HPV DNA'sına rastlanmıştır. Ayrıca yapılan çalışmalarda biyopsi örneklerinde, diğerk keşfedilen bazı HPV tiplerinin DNA'larının da var olduğu belirlenmiştir.^{24,25}

Serviks karsinomlarının yanında anal, perianal, vulvar, penil ve orofaringeal kanserlerin de büyük bir kısmının HPV ile ilişkili olduğu bilinmektedir.²⁵ Özellikle yapılan çalışmalar göstermiştir ki, baş ve boyun kanserlerinin risk faktörleri arasında HPV'ler yer almaktadır. Bu nedenle, son yıllarda baş ve boyun kanserleri ile ilgili yapılan çalışmalarda diğerk faktörlere ek olarak, HPV enfeksiyonları üzerinde de durulmuştur.²⁶ Oral ve orofaringeal karsinogenezde, HPV ile ilgili ilk çalışma 1983 yılında Syrjanen ve arkadaşları tarafından yapılmış ve karsinogenezde HPV'nin rol oynadığını tespit etmişlerdir.²⁷ Daha sonra tüm baş ve boyun kanserlerinde de HPV'nin varlığı Hodge ve ark. (1985), Niedobitek ve ark. (1990), Blot ve ark. (1994), Mineta ve ark. (1998), Gillison ve ark. (2000), Mork ve ark. (2001) gibi birçok araştırmacı tarafından da gösterilmiştir.²⁸⁻³³ Bu çalışmalarda, özellikle baş ve boyun kanserlerinin yaklaşık %20-25'inde HPV tip 16 gibi onkojenik HPV tiplerinin gözleendiği belirtilmiştir.

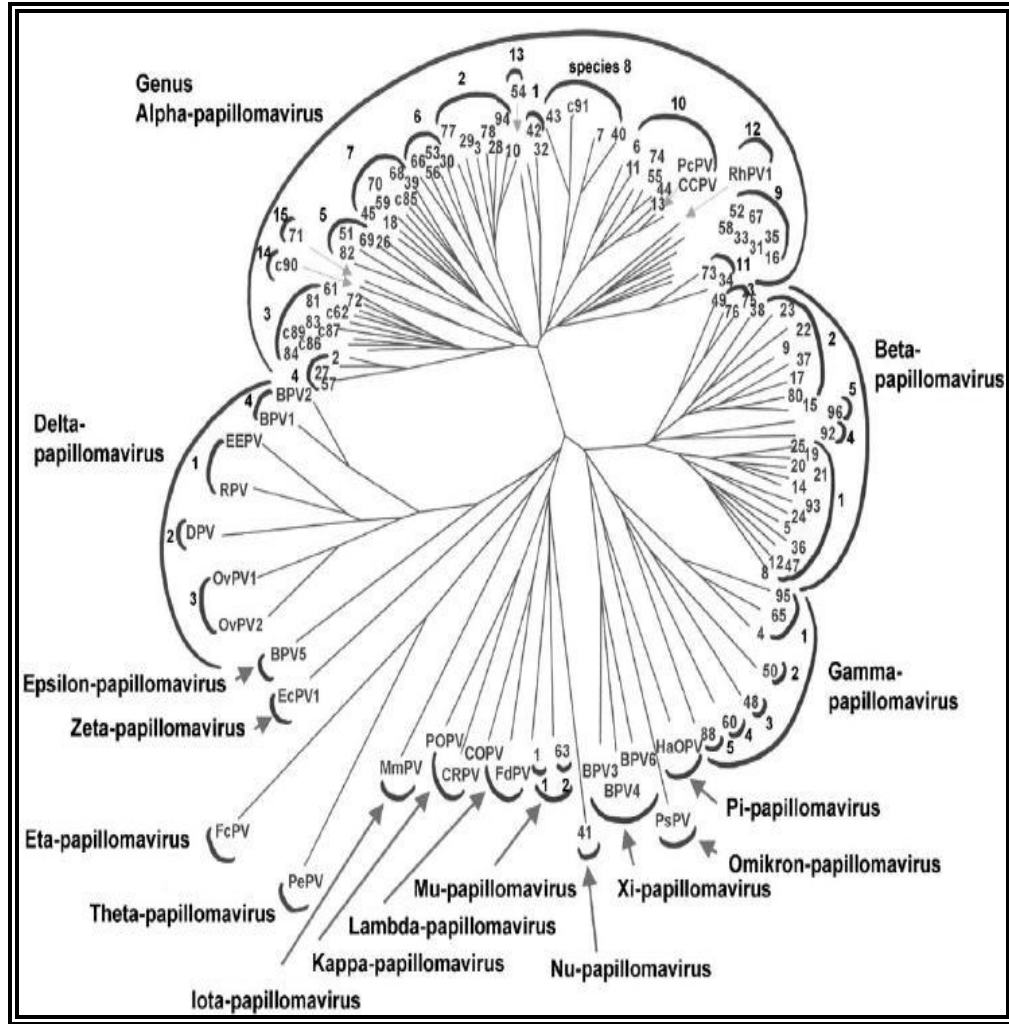
2.2. HPV'nin Sınıflandırılması

Papillomaviruslar deri ve mukoza epitelini enfekte eden DNA virusları olup, papillomaviridae ailesinde yer alır. Papillomavirusların sınırlı konak ve doku spesifiteleri vardır. Tür spesifite mekanizması tayin edilmemiştir, fakat muhtemelen virusun bağlanma ve penetrasyonundan ziyade, konak düzenleyici proteinlerine bağlı olabilir.³⁴

Elektron mikroskobu ile yapılan birçok çalışmada papillomaviruslar ve polyomaviruslar arasındaki ilişki araştırılmış ve her iki grup da Papovaviridae ailesi içinde birleştirilmiştir. Bu ilişki, çift sarmallı sirküler DNA genomuna sahip olmaları ve zarf taşımamaları gibi ortak karakteristik özelliklere dayanılarak yapılmıştır.²³ Ancak yapılan birçok çalışma bu iki grubun doğasının daha iyi anlaşılması için yol göstermiştir. Polyomavirusların T antijeni ve papillomavirusların E1 gen bölgesinde küçük bir segment dışında nükleotid veya aminoasit homolojisi göstermediği ortaya konmuştur. Bu virusların Farklı genom büyüklükleri, organizasyonları ve farklı replikasyon stratejileri mevcuttur. Bu sebeple 2004 yılında 'Uluslararası Virus Taksonomi Komitesi' tarafından polyomaviruslar ve papillomaviruslar iki ayrı aile olarak; polyomaviruslar Polyomaviridae ve papillomaviruslar ise Papillomaviridae ailesi içinde sınıflandırılmıştır.³⁵

Papillomaviridae ailesinde 12 cins yer almaktadır. Bunlar alfa, beta, gamma, mu ve nu cinsleri ile bunların dışında kalan ve hayvan papilloma viruslarını oluşturan 7 cinsi içermektedir (Şekil 1).³⁶ HPV'ler genital ve mukozal kanserler ile yakından ilişkili olan etiyolojik ajanlardır.

Bu HPV'ler tıbbi açıdan da oldukça önemli olup, özellikle en büyük grup olan alfa cinsi içerisinde yer almaktadırlar (Tablo 1).³⁵



Şekil 1. Papillomaviridae ailesinde yer alan cinsler.³⁶

Tablo 1. Servikal kansere neden olan alfa papillomaviruslar.³⁵

Cins+ Türler	Tip türü	Kategori	Cins+ Türler	Tip türü	Kategori
Alfa 1	HPV 32	Düşük risk	Alfa 7	HPV 18	Yüksek risk
	HPV 42	Düşük risk		HPV 45	Yüksek risk
Alfa 2	HPV 3	Kutanöz		HPV 59	Yüksek risk
	HPV 10	Kutanöz		HPV 39	Yüksek risk
	HPV 28	Kutanöz		HPV 68	Yüksek risk
	HPV 29	Kutanöz		HPV 70	
	HPV 77	Kutanöz		C85	
	HPV 78	Kutanöz	Alfa 8	HPV 7	Kutanöz(mukozal)
	HPV 94	Kutanöz		HPV 40	Kutanöz(mukozal)
Alfa 3	HPV 61	Düşük risk		HPV 43	Kutanöz(mukozal)
	C62		Alfa 9*	C91	
	HPV 72	Düşük risk		HPV 16	Yüksek risk
	HPV 81	Düşük risk		HPV 31	Yüksek risk
	HPV 83	Düşük risk		HPV 33	Yüksek risk
	HPV 84	Düşük risk		HPV 35	Yüksek risk
	C86			HPV 52	Yüksek risk
	C87			HPV 58	Yüksek risk
	C89		Alfa 10	HPV 67	
Alfa 4	HPV 2	Kutanöz		HPV 6	Düşük risk
	HPV 27	Kutanöz		HPV 11	Düşük risk
	HPV 57	Kutanöz		HPV 13	Düşük risk
Alfa 5*	HPV 26	Yüksek risk		HPV 44	Düşük risk
	HPV 51	Yüksek risk		HPV 55	Düşük risk
	HPV 69			HPV 74	
Alfa 6*	HPV 82	Yüksek risk	Alfa 11*	HPV 34	Yüksek risk
	HPV 30			HPV 73	Yüksek risk
	HPV 53	Yüksek risk	Alfa 12		
	HPV 56	Yüksek risk			
	HPV 66	Yüksek risk	Alfa 13	HPV 54	Düşük risk
			Alfa 14	C90	Düşük risk
			Alfa 15	HPV 71	Düşük risk

* Yüksek riskli HPV tipleri (Servikal kanserlerde sıklıkla gözlenenler).

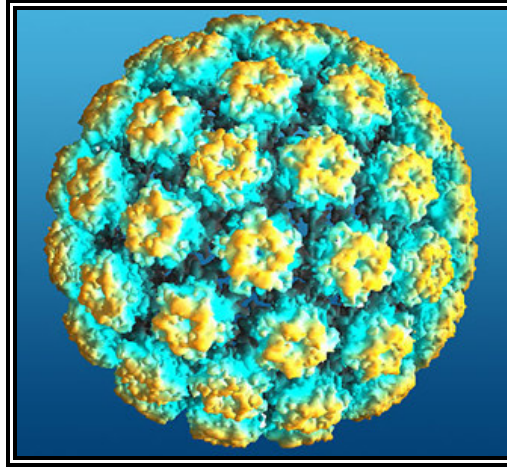
Papillomavirusa ait dizilerin analizi, majör kapsid proteinini kodlayan L1 geninin, diğer bölgelere göre daha iyi korunmuş olduğunu ve özellikle virusun tiplendirilmesi için bu bölgenin uygun olduğunu göstermiştir. Bu sebeple papillomavirusların şimdiki kabul görmüş taksonomisi, sadece L1 geninin nükleotid dizi benzerliğine dayanarak yapılmıştır.³⁷ Herhangi bir HPV tipinin genomundaki L1 gen dizisi, diğer bir tipten en az %10 farklıdır. Yeni bir HPV tipinin tanımlanması için bilinen tüm tiplere göre L1 dizisinde %10'dan fazla nükleotid farkı gerekir ve her bir HPV tipi keşif sırasına göre numaralandırılır.^{35,38} Günümüzde 200'den fazla HPV tipi tanımlanmıştır. HPV'lerin sınıflandırılması; tür orijini ve DNA hibridizasyonu ile tespit edilen viral genomlar arasındaki homolojinin derecesine bağlıdır. DNA sekanslarına göre papillomavirusların filogenetik sınıflandırması yapılmıştır. Papillomavirus tiplerinin, alt tiplerinin ve varyantlarının taksonomik sınıflandırılmasında major viral protein olan L1 gen bölgesinin homolojisi göz önünde bulundurulmuştur. Birbirinden en uzak tiplerde dahi %40 benzerlik görülmektedir.^{38,39}

HPV tipleri klinik olarak da üç kategoriye ayrılmaktadır.

- Düşük riskli HPV tipleri; 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 55 ve 62
- Olası yüksek riskli HPV tipleri; 26, 53 ve 66
- Yüksek riskli HPV tipleri; 16 başta olmak üzere 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 56, 58, 59, 68, 73 ve 82 olarak gruplandırılmaktadır.^{40,41}

2.3. HPV'nin Genel Özellikleri

Papillomaviruslar çift sarmallı, ikozahedral simetrikli yaklaşık 55 nm çapında, zarfsız DNA virüsleridir (Şekil 2). Elektron mikroskopundaki incelemelerde kapsidinin 60 hekzon ve 12 penton olmak üzere toplam 72 kapsomerden oluştuğu bilinmektedir. Virusun dış protein kılıfı, bir majör ve bir minör olmak üzere 2 kapsid proteini içermektedir. HPV'nin genetik bilgisi yaklaşık 8.000 baz çifti içeren halkasal, çift zincirli bir DNA molekülünde kodlanmaktadır.^{35,39}



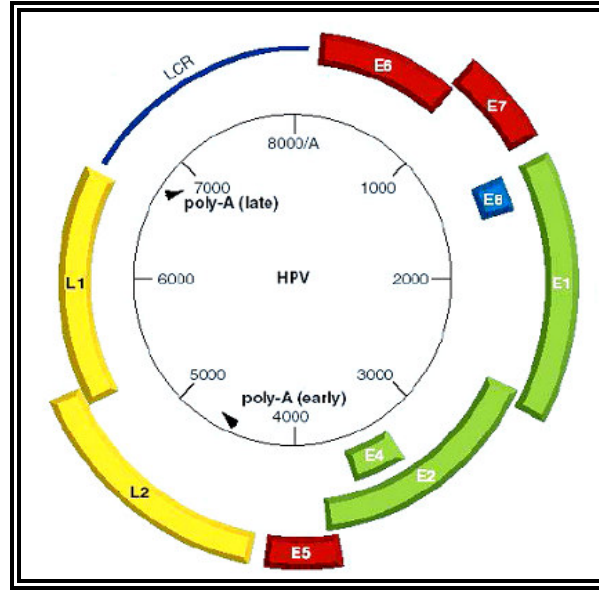
Şekil 2. HPV'nin genel görünümü.⁴²

Human papillomaviruslar, epitelyotropik viruslardır ve skuamöz hücrelerin nükleusunda çoğalırlar. El, ayak, anogenital bölge gibi kutanöz ve mukozal epitelyal dokularda enfeksiyon oluştururlar. Papillomaviruslar zarfları olmadığından kuruluğa nispeten dirençli ve stabildir, en az bir hafta ekstraselüler olarak canlılığını koruyabilirler. Organik çözücülere dirençlidirler ve 56°C'de enfektivitesinde minör bir kayıp meydana gelir.⁴³

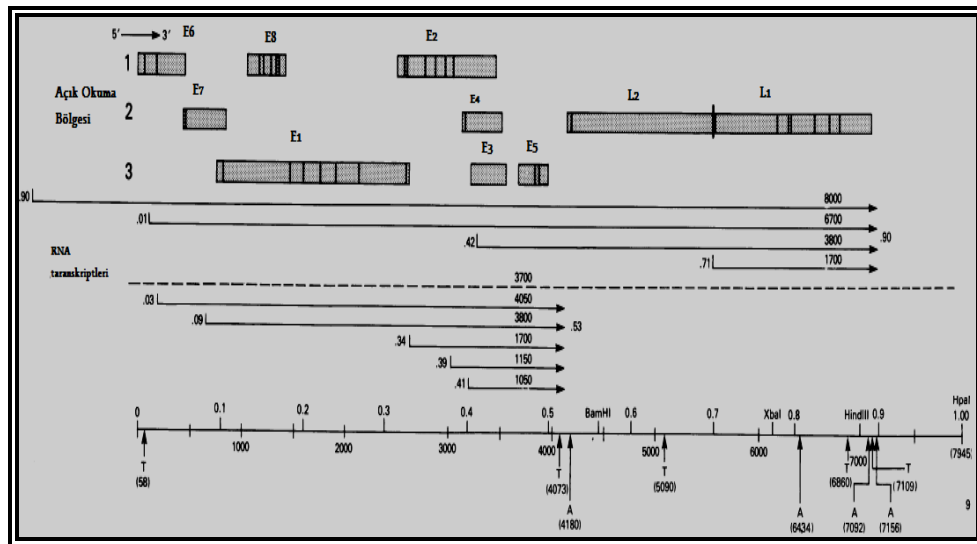
2.3.1. HPV'nin yapısı ve proteinleri

HPV'nin yapısı:

Papillomaviruslar, küçük boyutlarına rağmen moleküler biyolojileri oldukça kompleks olan viruslardır. Viral proteinleri kodlayan diziler tek bir DNA sarmalı üzerindedir ve genetik yapı tüm papillomaviruslarda aynıdır. Fonksiyonel olarak erken bölge (early: E), geç bölge (late: L) ve uzun kontrol bölgesi (long control region: LCR) olmak üzere üç bölgeye ayrılır. Tüm papillomaviruslarda bu üç bölge iki poliadenilasyon (pA) bölgesi tarafından ayrılmaktadır; erken pA ve geç pA. Erken bölgede 8 ORF (Open reading frame-açık okuma bölgesi) ve geç bölgede 2 ORF bulunur. Bütün HPV ORF'leri virusun sadece bir sarmalı üzerinde yer almaktadır ve 10 ORF viral hayat döngüsündeki gen ekspresyon sırasına göre erken ve geç olarak isimlendirilir. Erken proteinler E1, E2, E4, E5, E6 ve E7 viral replikasyon ve hücre transformasyonunda rol alır.³⁸ Son yıllarda keşfedilen E3 ve E8 de aynı bölgede bulunmakta olup, E8'in E2 bölgesinin delesyonu sırasında ortaya çıktığı düşünülmektedir.^{41,44} Geç gen bölgesinde ise L1 ve L2 proteinleri kodlanmaktadır (Şekil 3 ve 4).^{35,45} Bu genlerden, L1 geni major kapsid proteini ve L2 geni minör kapsid proteinini kodlar. Tüm bu proteinler, transmembranın uyarılması, hücre döngüsünün düzenlenmesi ve transformasyon aktivitesinin denetlenmesi gibi pleotropik fonksiyonlara sahiptir.⁴⁵



Şekil 3. Viral DNA'nın organizasyonu.⁴⁶



Şekil 4. HPV'nin genomik yapısı.⁴⁵

Human papillomavirus proteinleri;

E1 ve E2 proteinleri

E1 ve E2 genleri HPV'nin önemli düzenleyici proteinlerini kodlamaktadır. Bu genler parabazal keratinositlerde bulunur; viral epizomun stabilize edilmesinde, viral replikasyonun başlatılmasında ve replikasyonda rol oynarlar. E2 tarafından kodlanan protein LCR'deki E2 bağlanma yerine bağlanarak transkripsiyonu baskılar. E1 tarafından kodlanan protein ise promoter bölgesine E2'nin bağlanmasını kolaylaştırır.⁴⁷

E2 proteini, prodüktif enfeksiyon sırasında çeşitli roller üstlenmektedir. Bu protein, bazal hücrelerde viral DNA replikasyonunun başlaması ve genomun açılması için gerekmektedir.⁴⁶ Farklılaşmamış hücrelerde E2 proteini, düşük dozlarda transkripsiyonu arttırmak için, bir viral transkripsiyonel trans-aktivatör gibi davranır, oysa yüksek konsantrasyonlar da Sp1 ve TFIID gibi transkripsiyonel faktörlerin, onları tanıyan dizilere bağlanmasını engelleyerek baskılayıcı hale gelebilir. Farklılaşmış hücrelerde ise E2 proteini, geç promoter bölgesindeki değişimden dolayı transkripsiyonda baskılayıcı fonksiyonunu kaybeder. Bu durum, E1 ve E2 protein seviyelerinin ve bu sebeple viral DNA amplifikasyonunun hızlı artışı ile sonuçlanır. Servikal kanser hücrelerinin çoğunda, viral genomun integrasyonuna bağlı olarak meydana gelen E2 ekspresyondaki kaybın, HPV'nin indüklediği karsinomların gelişimine katkıda bulunduğu kabul edilmiştir.^{46,47}

E2 aynı zamanda viral genom replikasyonu için de gereklidir. E2 spesifik olarak E1'i tanır ve viral replikasyon orjiniinde (Ori) E1'i toplar, burada E1-E2 kompleksi oluşur.⁴⁸

E1 proteini, 68 kDa'luk ATPase, DNA helikaz ve DNA sarmalının açılması için aktiviteye sahip olan nükleer bir proteindir. Düşük kuvvetle viral Ori'ye bağlanır ve bağlanma affinitesi E2 proteini ile arttırılabilir. E1 DNA replikasyonunu aktive etmek için DNA polimeraz- α 'nın subünitleri ile etkileşir. E1 proteini, hem viral DNA replikasyonunun başlamasında hem de replikasyon çatalında helikaz aktivitesine bağlı olarak elongasyonda rol oynamaktadır.⁴⁸

E4 proteini

E4 proteinleri enfeksiyonun geç döneminde bol miktarda salınmaktadır. Tam uzunlukta bir E4 proteini, uç uca eklenmiş E1-E4 transkriptlerinden oluşur. E1-E4 proteini fazla salınır ve E4 ORF ile E1'in ilk 5 aminoasidi 17 kDa'luk E1-E4 füzyon proteinini oluşturur. E1-E4 transkriptleri HPV'nin hayat döngüsü süresince salınır. Tam uzunluktaki E1-E4 proteini, üst farklılaşmış hücre tabakalarında proteolitik olarak parçalanmış polipeptid ürünlerine bağlıdır ve en yüksek düzeyde salınım, farklılaşmış suprabazal tabakada meydana gelir.⁴⁷

Viral hayat döngüsünde E1-E4'ün fonksiyonu hala açık değildir. E1-E4 proteini özellikle sitoplâzmada yer almaktadır. Yüksek riskli HPV tiplerinin E4 proteini, enfekte hücrelerin sitoplâzmasında yaygın

olarak dağılır ve keratin intermediate filamentleri (IF) ile organize filamentöz bir ağ formu oluşturur. Ayrıca, in vitro sitoskeleton kollapsına yol açıp virus salınımında rol aldığı ileri sürülmektedir.⁴⁷⁻⁴⁹

E5 proteini

E5 proteini yaklaşık 5 kDa uzunluğunda, 83 aminoasitlik, küçük bir hidrofobik membran proteinidir. Başlıca endoplazmik retikulumda, golgi cisimciklerinde ve plazma membranlarında bulunmaktadır. E5 proteini, enfeksiyonun başlangıcında oldukça önemlidir. Epidermal büyüme faktörü reseptörü, trombositleri aktive edici büyüme faktörü reseptörü ve koloni uyarıcı faktör-1 reseptörü ile bir kompleks oluşturarak hücre büyümesini uyarır. Son yıllarda E5 proteini, apoptozisi izleyen DNA hasarında da görülmektedir. Bundan başka, HPV enfeksiyonu ile gelişen servikal kanser lezyonlarında sıklıkla epizomal viral DNA, konak DNA' sına entegre olmakta ve E5 proteinini kodlayan diziye de içeren genomun azımsanmayacak bir parçası delesyona uğramaktadır. Bu nedenle, HPV ile ilişkili karsinogenezin geç dönemlerinde E5 zorunlu değildir.³⁵

Son zamanlarda yapılan çalışmalar, E5 proteininin, viral çoğalma ve farklılaşmış hücrelerde viral gen ekspresyonunu modüle etmede E7 ile ortak bir rol oynadığını göstermiştir.⁴⁷

E6 ve E7 proteinleri

Human papillomavirusun onkojenik fonksiyonları, özellikle E6 ve E7 proteinlerinin salınımına bağlıdır. E6 ve E7 proteinleri iki ana HPV onkoproteinleridir. E6 onkoproteini, yaklaşık 17 kDa büyüklüğünde olup, HPV enfeksiyonunun kansere dönüşmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Yüksek riskli HPV'lerde E6 proteinleri, konak hücrenin hem nükleus hem de sitoplâzmada bulunmaktadır.⁴⁷

Yüksek riskli E6 proteinlerinin iyi bilinen fonksiyonlarından biri p53 geninin yıkılması yolu ile insan hücrelerini değişime uğratma kabiliyetidir. p53 geni, hücre döngüsünü durduran veya apoptosizi uyaran bir tümör baskılayıcısıdır. Düşük riskli (Low risk; LR) HPV E6 proteinlerinin de p53 genine düşük kuvvetle bağlandığı gösterilmiştir.⁴⁷

E7 onkoproteini ise, yaklaşık 12 kDa moleköl ağırlığındadır ve öncelikle nükleusta bulunur. Yüksek riskli HPV'nin E7 proteinlerinin temel aktivitesi, retinoblastom (Rb) ailesi üyeleri ile ilişkisi yoluyla, hücrelerin farklılaşmasında rol alır. Rb proteini hücre siklusunun G1 fazından S fazına geçişini inhibe eder ve aktivitesi fosforilasyon ile düzenlenir. HPV ile enfekte hücrelerde, E7 proteinlerinin hipofosforile Rb proteinlere bağlanması, Rb proteininin inaktivasyonu ile sonuçlanır ve hücre döngüsünün S fazına ilerlemesine izin verir. Düşük riskli HPV'nin E7 proteinlerinin aynı zamanda Rb'ye düşük kuvvet ile bağlandığı da gösterilmiştir.⁴⁹

E8 Proteini

E8 proteininin açık okuma bölgesi, bovine papillomavirus tip 1 (BPV-1) ve human papillomavirus tip 31 (HPV-31) dışında birçok tavşan papilloma virüslerinde de bir onkogen olarak tespit edilmiştir. Ayrıca, BPV-1 ve HPV-31'de viral transkripsiyon ve replikasyonun bir negatif düzenleyici olarak E8^E2 füzyon proteini belirlenmiştir.³⁶ E8 geninin bir parçası olan E8^E2 füzyon proteini, E2 geninin C terminaline bağlanmış olup, viral transkripsiyonun alternatif bir yolunu oluşturmaktadır. E8^E2C, viral yaşam döngüsünün erken evresi boyunca HPV DNA replikasyonunun negatif bir düzenleyici olduğunu göstermektedir.⁴⁹

L1 ve L2 proteinleri

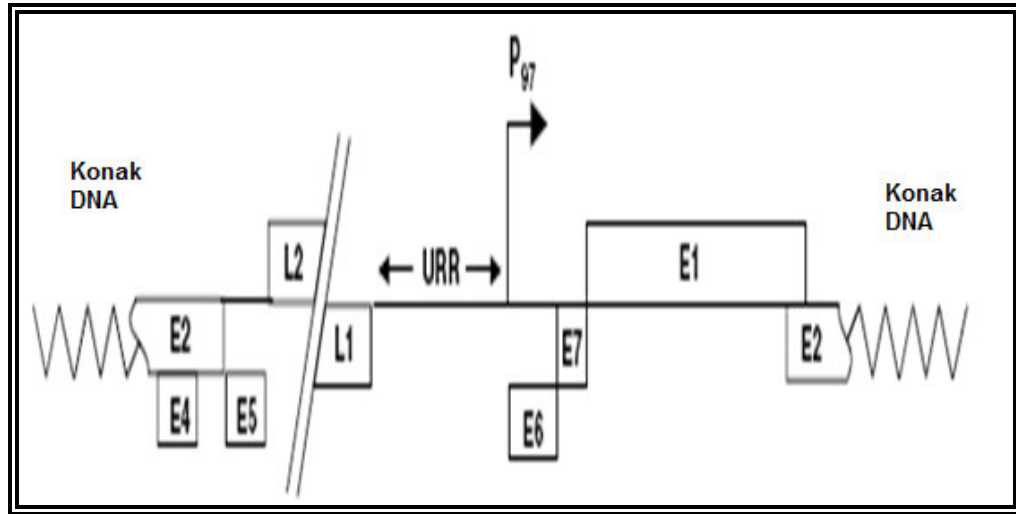
Geç bölge yaklaşık 3 kb uzunluğundadır ve sırasıyla majör ve minör proteinlerini kodlayan L1 ve L2 genlerini içermektedir. Kapsid proteinleri olan L1 proteini yaklaşık 55 kDa, L2 proteini ise yaklaşık 74 kDa ağırlığındadır. L1 proteini hücreye giriş için $\alpha\beta_4$ integrin, heparan sülfat ve glikozaminoglikan dâhil üç farklı yüzey reseptörüne bağlanır. L2'nin hücre yüzey proteinine bağlanması da, etkili HPV enfeksiyonu için gereklidir.⁴⁹ Enfekte hücrenin sitoplazmasında L2 proteini sitoplazmadan nükleusa virusun etkili transportu için β -aktin ile etkileşir. L1 ve L2 proteinlerinin reseptör aracılı bir yolla nükleus içine taşınması önemlidir. L2 proteininin DNA'ya bağlanmasından ve enkapsidasyon olaylarından sorumlu olduğu ileri sürülür. Son zamanlarda HPV-16 L2'nin varlığının E2'nin transkripsiyonel transaktivasyonunu inhibe ettiği, fakat DNA

replikasyonunu etkilemediği bildirilmiştir. Viral hayat döngüsünün düzenlenmesinde L2-E2 birleşmesinin etkisi hala araştırılmaktadır.⁴⁷⁻⁴⁹

2.3.2. HPV'nin replikasyonu

Human papillomavirus replikasyon döngüsünün epitelyumun stratum germinativumundaki (bazal tabaka) hücrelere girişi ile başladığı bilinmektedir. HPV enfeksiyonunda, bazal tabaka epidermisinin hafif veya mikrotravması gerekmektedir. Diğer pek çok virus gibi HPV'de, konak hücreye, hücre yüzeyindeki heparan sülfat aracılığıyla tutunur. HPV tutunmasında ikincil bir reseptör veya stabilize edici proteoglikanlar da rol oynayabilir.⁵⁰

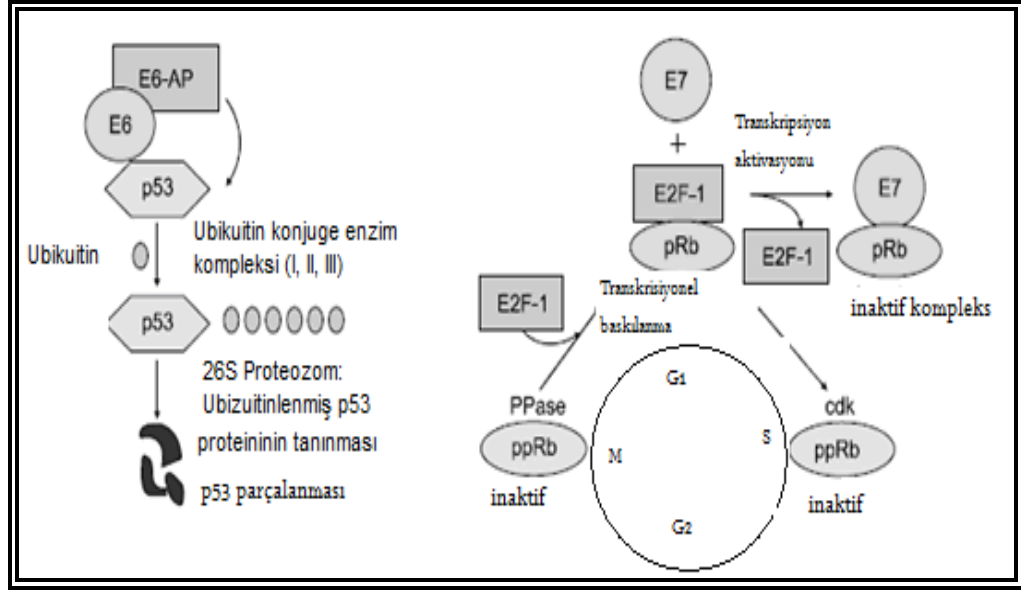
Viral entegrasyon tipik olarak viral E1 ve E2 bölgelerinde meydana gelmektedir. Bu genler viral gen ekspresyonu ve replikasyonunu düzenleyen proteinleri kodlamaktadır.⁴⁶ E1 proteini viral DNA replikasyonu için önemli olan helikaz aktivitesine sahiptir. Ayrıca, viral replikasyonun başlamasında anahtar rol oynamaktadır ve potansiyel bir adaydır. E2 proteini ise aynı zamanda iki protein kodlar; bunlardan biri erken bölgenin transkripsiyonunu inhibe eder, diğeri ise artırır.⁴¹ Kanserin gelişiminde E2 bölgesinde sıklıkla kırılma meydana geldiğinden HPV DNA entegrasyonu önemlidir (Şekil 5). Entegrasyon esnasında E2'de meydana gelen kırılma, E2'nin E6 ve E7 üzerindeki inhibitör etkisini ortadan kaldırır ve E8 bölgesinin oluşumuna yol açar. Sonuçta, E6 ve E7 viral proteinlerinin kontrolsüz olarak ifade edildiği görülür.⁵¹ Bu nedenle, E6 ve E7 onkoproteinleri kanser gelişimi için önemlidir.



Şekil 5. Karsinogenezde E2 gen bölgesinde kırılma.⁴⁹

Human papillomavirus tiplerinin E6 ve E7 proteinlerine sahip olması ve bu bölgelerin tümör baskılayıcı proteini olan p53 ve Rb ile ilişkili olması bu HPV tiplerinin, kanser gelişimi açısından yüksek risk taşıdığını göstermektedir. E6 proteini, p53 ve hücrel ubikuitinasyon enzim E6-AP'yi (protein yıkımında kullanılan bir enzim) kapsayan üçlü bir kompleksin oluşumuyla tümör baskılayıcı p53 proteininin parçalanmasını uyarak hücre proliferasyonunu teşvik eder (Şekil 6). E6 ile aktive edilen parçalanma sonucunda hücre döngüsünün ilerlemesi bozularak tümör hücre gelişiminde artma gerçekleşir.⁵² E6 ve E7 genlerinin transformasyon aktivitesi onların hücre döngüsünde görevli hücrel proteinler ile olan etkileşimlerinden kaynaklanmaktadır. E7 proteininin, HPV 16 ve HPV 18 gibi yüksek riskli HPV'ler tarafından kodlandığı ve Rb'ye yüksek kuvvetle bağlanığı tespit edilmiştir. E7 proteini Rb'ye 'cep domaini' adı verilen bir bölgeden bağlanır. Rb'nin cep domain dizisi tümör baskılayıcı fonksiyonu için önemlidir. Rb'nin önemli biyokimyasal fonksiyonlarından biri, E2F transkripsiyon faktörlerine bağlanmak ve replikasyonda görevli olan enzim genlerinin salınımını baskılamaktır. Replikasyonda görevli enzim

genlerinin baskılanma yeteneği, Rb'nın tümör baskılayıcı fonksiyonu ile ilişkilidir.⁵³



Şekil 6. Rb ile p53'e bağlanan HPV E6 ve E7 proteinleri.⁵²

Enfeksiyon ve vejetatif viral büyümenin tamamlanması keratinosit farklılaşmasına bağlıdır. Virüsler ilk olarak öncül bazal keratinositleri enfekte eder, fakat viral proteinlerin yüksek seviyede sentezi ve viral ürünlerin bir araya toplanması sadece skuamöz epitelin stratum spinosum ve granulosum tabakalarında meydana gelir.⁵⁴ Viral genlerin sentezi keratinositlerde meydana gelir ve keratinositlerden başka herhangi bir hücrede viral gen sentezinin meydana geldiği kanıtlanmamıştır. Bazal hücrelerde virüs enfeksiyonu ile başlangıçta düşük kopya sayısı görülür. Daha sonra viral DNA replikasyonda hücre siklusuna bağlı olarak, viral yük yaklaşık 50–100 kopya/hücre sayısına ulaşır. Enfekte hücre öncül kök hücreden ayrılarak epitelin diğer tabakalarına girer.⁵⁵ Daha sonra viral gen

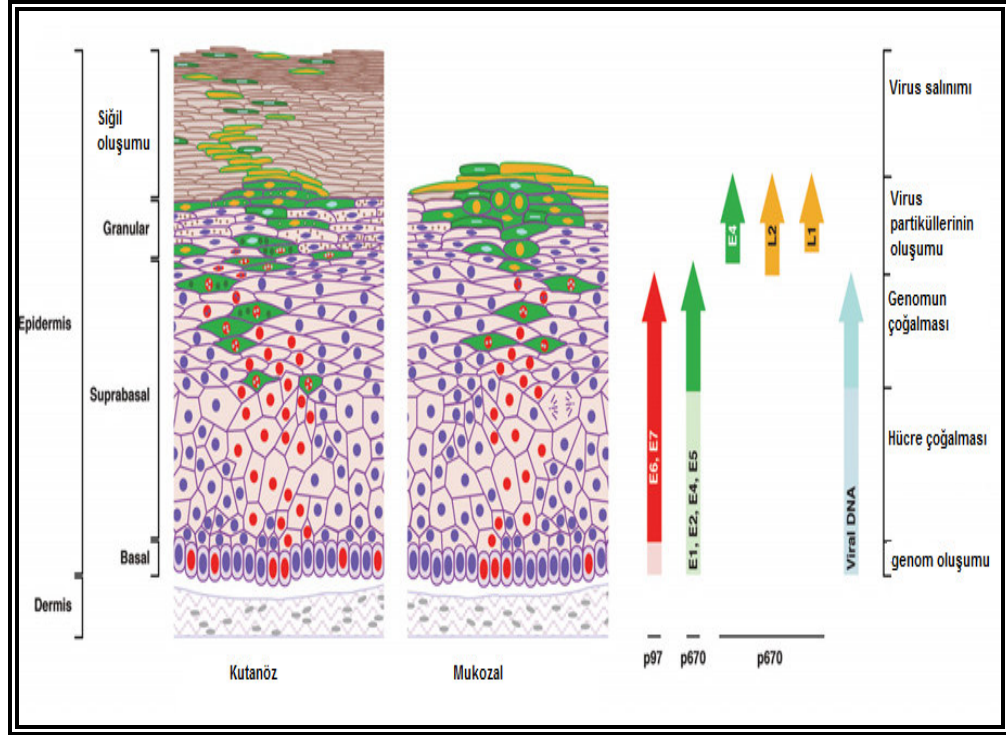
ifadesi minimal düzeydedir ve özellikle E6 ve E7 onkogenlerinin ifadesi açıkça saptanabilen E6/E7 transkriptleri ile sıkı bir kontrol altındadır. Enfekte keratinosit farklılaşan tabakalara girdiğinde, hücre döngüsünden ayrılır. Burada viral gen ifadesinin etkili bir regülasyonu vardır ve viral DNA replikasyonu gerçekleşir. Viral kopya sayısı en azından 1000 kopya/hücre ulaşır. Erken genler E6 ve E7'nin çok sayıda ifadesi ve geç promoterdan geç genlerin ifadesi görülür.⁵⁵ Hücre döngüsüyle farklılaşan hücrede meydana gelen bu olayların gerçekleşmesi önemlidir.

Papillomaviruslar, bir DNA replikasyon enzimi içermektedir, bu da E1 ve E2 proteinini kodlar. Replikasyon tamamen hücresel DNA sentez mekanizmasına bağlıdır. Bu virus için problem, hücresel DNA polimerazın ve replikasyon faktörlerinin sadece mitotik olarak aktif hücrelerde üretilmesidir. Bu problemi çözmek için viruslar viral yaşam döngüsü kapsamında proteinler kodlar. Döngüsüz hücrelerde hücresel DNA sentezini reaktif eder, apoptozisi inhibe eder ve enfekte keratinositlerin farklılaşma programını geciktirir. Viral DNA replikasyonuna izin veren bir çevre oluşturur. Gerçekleştirilen kusursuz detaylar tam olarak anlaşılamamıştır, ancak bu fonksiyonlar için viral genlerin merkezi E6 ve E7'dir.⁵⁶

HPV'nin yaşam döngüsü:

Enfeksiyonun olabilmesi için bazal tabaka hücrelerinin uygunluğu yani deri veya mukozada mikrolezyonlar gereklidir. Enfekte hücreler bölünürler ve popülasyon lateral olarak yayılır. Yavru hücrelerin bir kısmı ise farklılaşan suprabazal tabakaya göç eder. Burada viral genler aktive olur, viral DNA replikasyonu ve kapsid proteinlerin oluşumu

sonrasında viral partiküller oluşur. Bu partiküller yüzeyde salınır ve başka dokuları enfekte ederler (Şekil 7).⁴⁶



Şekil 7. HPV'nin yaşam döngüsü.⁴⁶

2.4. HPV'nin Klinik Bulguları

Papillomaviruslar her yerde bulunabilir, insanlar dışında hayvanlarda da papillomavirusların varlığı gösterilmiştir. Human papillomavirus insanlarda primer olarak skuamöz epiteli enfekte ederek, deri ve mukozada çeşitli lezyonlar oluşturmaktadır. HPV genital bölge dışında oral kavitede, sinonazal bölgede, nazofarinkste ve larinks

mukozasında da papüler tarzda prekanseröz lezyonlara sebep olmaktadır.⁵⁷

Human papillomavirus enfeksiyonlarının çoğu asemptomatik olmakla birlikte değişik klinik tablolar ortaya çıkabilir.³⁸ Klinik tablolardaki bu değişiklikler virusun tipine (HPV 16 ve HPV 18 invaziv karsinom ile ilişkilidir), lezyonun lokalizasyonuna (respiratuvar papillomatozis gibi), bireyin bağışıklık durumuna (gebeler ve immün yetmezliği olanlarda daha ağır tablo) ve epitelin doğasına (serviksin transformasyon bölgesindeki metaplazik skuamöz epitel, HPV veya diğer kofaktörlerin onkojenik etkilerine daha yatkındır) bağlıdır.⁵⁸

Klinik olarak belirgin HPV lezyonları olan genital siğiller, ilk enfeksiyondan ortalama 8 ay sonra ortaya çıkar. HPV enfeksiyonu sonrası servikal kanser gelişmesi için uzun bir süre gereklidir. Genellikle 10–15 yıl gibi bir zaman dilimi görülür. Bu dönemde, skuamöz intraepitelyal lezyon (SIL) veya servikal intraepitelyal neoplazi (CIN) olarak bilinen prekanseröz lezyonların erken tespiti ve tedavisi ile servikal kanser büyük oranda önlenir.³⁸

Human papillomavirus, sadece serviks kanserlerinde değil aynı zamanda deri ve faringeal kanserler gibi diğer malignansilerle ilişkili olan vulvar, vaginal, penil ve anal kanserlerden de sorumludur.⁵ Yaklaşık 40 HPV tipinin genital mukoza enfeksiyonuna sebep olduğu bilinmektedir ve kanserojen potansiyeline göre sınıflandırılmaktadır. Düşük riskli tipler, genital siğiller ve düşük dereceli genital lezyonları içeren benign lezyonlara sebep olur, ancak genital kanserlerde bulunmazlar. Bu nedenle '**düşük**

riskli' olarak adlandırılırlar. Yüksek riskli tipler ise, hem düşük hem de yüksek dereceli prekanseröz lezyonlara sebep olurlar. Bununla beraber, invaziv kanserlerde görülen tipler için '**yüksek riskli**' tanımlaması yapılmaktadır.⁵⁹

2.4.1. Epidermodisplazia verrusiformis

Epidermodisplazia verrusiformis (EV), nadir görülen bir hastalık olup, kutanöz HPV enfeksiyonlarına duyarlı olan bireylerde çok sık rastlanılmaktadır. Bütün yüzde, ekstremitelerin dış yüzeylerinde siğil benzeri lezyonlarla karakterize olan nadir görülen bir hastalıktır.⁶⁰ Çocukluk çağında, genellikle siğiller gelişir, yaygınlaşmaya başlar ve bazı durumlarda skuamöz hücre kanserlerine doğru gelişme mümkündür.⁶¹ Normalde görülen predominant karakterli iki tip lezyon vardır; her ikisinin de aynı hastada gelişmesi mümkündür. Bazı lezyonlar basit siğiller olarak görülebilmektedir, diğer lezyonlar ise kırmızı-kahverengi maküller veya pullu biçimdedir. Basit siğillere sebep olan HPV tipleri 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 bazılarıdır.^{62,63}

2.4.2. Anogenital siğiller

Genital siğiller dünyadaki yaygınlığı açısından oldukça önemli bir sağlık problemidir ve cinsel yolla en sık bulaşan enfeksiyondur.⁶⁴ Dünya verilerine göre, genital siğiller klinik olarak cinsel

yönden aktif popülâsyonun en az %1'inde görülmektedir. Genital siğillerin yaklaşık üçte ikisi enfekte eş ile cinsel ilişki sonucu gelişmektedir.⁶⁵

Anogenital siğiller genellikle eksternal lezyonlar olup çeşitli şekilde görülebilirler. Bu tip siğiller eksternal genital bölgede veya çeşitli bölgelerde gelişebilmektedir. Kadınlarda, çoğunlukla perine ve anüs, erkeklerde de penis ve anüsde görülebilmektedir. Çoklu lezyonlar anüs etrafında gelişebilmekte ve anal kanalı çevreleyebilmektedir. Çoğu kondiloma kendiliğinden sona erer veya lokal müdahale ile sonlandırılabilir. Ayrıca bazı kondilomalar yıllarca kalıcı olabilir. Bu tip siğillerin daha büyük hale gelmesi, hamilelik boyunca genişlemeleri veya dağılma sonucu kendiliğinden sona ermeleri mümkündür.⁶⁶

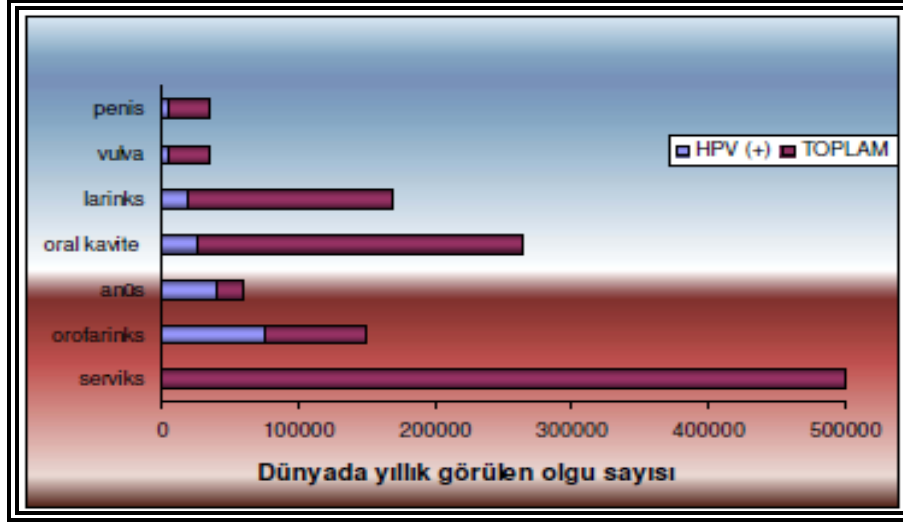
Genital siğillerin etkin bir tedavi yöntemi yoktur. Bu nedenle değişik tedavi yöntemleri uygulanmaktadır ve bu yöntemlerin başarı oranları değişiklik göstermektedir. Tedaviyi etkileyen faktörler arasında en önemlisi hastalığın gidişi ve konak direnci ile ilişkisidir. Bu siğiller tedavi edilmeseler de bazen kendiliğinden iyileşebilir. Ancak çoğunlukla boyutları ya aynı ölçüde kalır ya da ilerler. Bugün yapılan tedavinin amacı ise, gözle görülen ve yakınmalara neden olan siğillerin ortadan kaldırılmasıdır.⁶⁷

2.4.3. Genital olmayan diğer deri siğilleri

Deri siğilleri vücudun herhangi bir tarafında olabilir, sıklıkla görüldükleri yerler, ayak ve ellerdir. Bu siğiller benign papillomalar olup, genellikle yaşı büyük çocuklarda veya genç yetişkinlerde görülürler. Genital olmayan siğillerde geçiş genellikle eşyalar vasıtasıyla olur.⁶⁸ Çevresel şartlarda papillomaviruslar uzun süreler canlılığını koruyabilirler. 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.^{68,69}

2.5. HPV'nin Kanser ile ilişkisi

Human papillomavirusların, mukozal ve epitelyal kanserlere yol açtıkları artık kanıtlanmıştır. En sık görülen kanserler arasında yer alan serviks kanserinin de başlıca sorumlu ajanı HPV'lerdir. Serviks kanseri dışında özellikle anal, vulvar, penil, oral ve laringeal kanserlerin de bir bölümünden HPV'ler sorumludur (Grafik 1). Human papillomavirus ile meme, özefagus, akciğer, kolon, rektum ve prostat gibi diğer kanserlerle de nedensel ilişki kurulmaktadır.⁷⁰



Grafik 1. HPV ile ilişkili kanserlerde HPV görülme sıklığı⁷¹

Human papillomavirus enfeksiyonlarının invaziv kansere dönüşmesi için uzun bir süreç gerekmektedir. Ayrıca, kalıcı enfeksiyonun yanında, HPV'nin tipi, çevreye ve konakçıya ait faktörlerin de önemli bir rol oynadığı bilinmektedir.⁷⁰

2.5.1. Serviks kanseri ve HPV

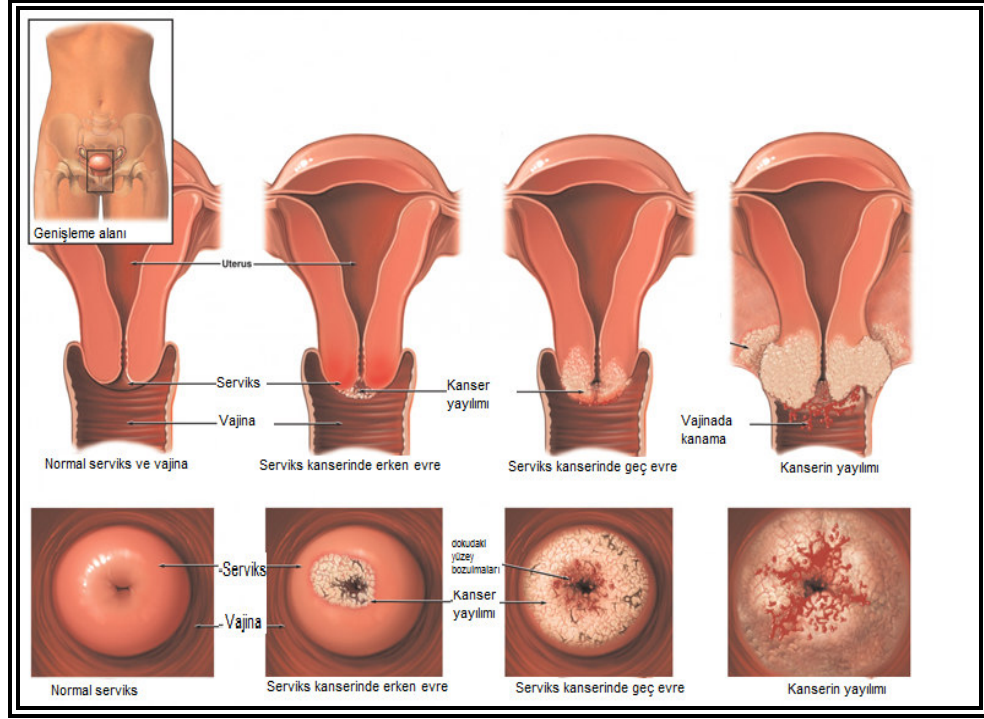
Serviks kanseri, meme kanserinden sonra dünyada en sık görülen ikinci kadın kanseridir. Her yıl tanı konan 500 binin üzerinde yeni olguya karşın 275 bin hasta hayatını kaybetmektedir. Vakaların %80'i gelişmekte olan ülkelerde görülmektedir. Olguların çoğu transformasyon zonundan köken almaktadır ve yassı hücreli sitolojiye sahiptir.^{7,72}

Servikal kanserlerin %85'i skuamöz hücre kanserleridir. Lezyonların malignensi sürecine yıllar süren displastik değişimler eklenir ve skuamöz hücre karsinomu (squamous cell carcinoma-SCC) gelişimi ile son bulur. Enfeksiyona ilk skuamöz epitelin bazal tabakasının maruz kaldığı tespit edilmiştir. Servikal kanserlerin %99,9'unda HPV DNA'sının bulunduğu kesinlik kazanmıştır.⁷³

Human papillomavirus tip 16 ve 18 servikal kanserlerin %70'inden sorumlu tutulmaktadır. En yaygın onkojenik HPV tipi, HPV tip 16'dır ve bunu HPV tip 18 takip eder. Asemptomatik HPV enfeksiyonu kadınlarda 10 yıllık bir süreci kapsamaktadır. HPV 16/18 tiplerinin her ikisi de, CIN III veya invaziv kansere neden olmakta ve diğer HPV tiplerine nazaran daha hızlı serviks kanseri geliştirebilmektedir.⁷⁴

Serviksin premalign lezyonları;

Serviksin invaziv skuamöz kanserleri ile birlikte izlenen hücresel atipi uzun zamandan beri tanınmasına rağmen, serviksin in situ karsinomunun tanınması ve preinvaziv potansiyelinin varlığı 1950'li yıllara kadar kabul edilmemiştir. Galvin, Jones ve TeLinde tarafından 1952 yılında yayınlanan çalışmalarında, karsinoma in situ'nun doğal seyrine dair gözlemlerini tarif etmişlerdir (Şekil 8).^{75,76}



Şekil 8. Servikal kanser gelişimi.⁷⁵

Servikal epitelde açık bir şekilde tanınabilen preinvaziv neoplastik bir değişiklik olması kavramı, servikal kanser gelişiminin ve doğal seyrinin anlaşılmasında önemli bir adım olmuştur. Pratik sitolojinin Papanicolaou ve Trout tarafından 1940'lı yıllarda ortaya atılması ve sonradan klinik kullanıma adapte edilmesi, yakınması olmayan kadınlara invaziv ve preinvaziv servikal neoplazi açısından tarama yapılmasını sağlayan ikinci önemli gelişmedir. Gelişmiş ülkelerde, geçmiş 50 yıl içinde servikal kanser ölümlerinde %70 gibi dramatik bir azalma sağlamıştır. Ek olarak, bu iki gelişme klinik olarak servikal kanserin klinik gelişimini anlamamızı sağlayan araçlar olmuşlardır.⁷⁶

Terminoloji;

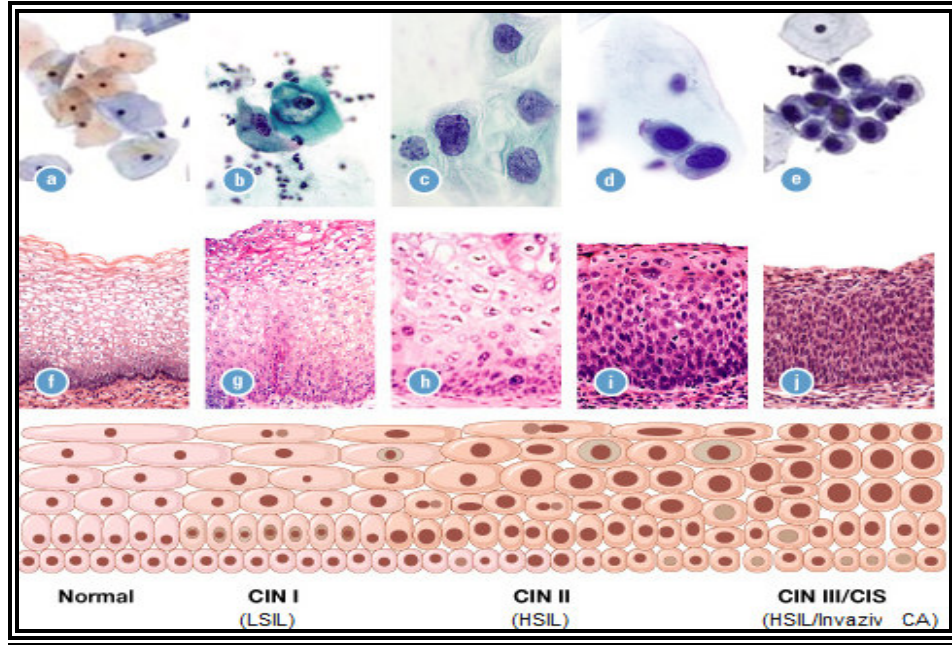
İlk olarak 1949 yılında Papanicolaou tarafından invaziv kansere progresyon gösterecek lezyonları belirlemek için “displazi” terimi tanımlanmıştır. İnvaziv kansere dönüşme potansiyeli olmayan lezyonlar; bazal hücre hiperplazisi, rezerv hücre hiperplazisi, immatür skuamöz metaplazi ve matür skuamöz metaplazi gibi benign fizyolojik durumlardan oluşur. Malign potansiyel taşıyan grupta displazi ve karsinoma in situ yer alır. Displazi hafif, orta ve ağır derecelere ayrılır.⁷⁶ Daha sonra, 1968 yılında Richart ve Barron tarafından displazi sınıflaması modifiye edilerek, invaziv karsinom ile ilişkili lezyonların hepsi “Servikal İntraepitelyal Neoplazi” (CIN) olarak tek ortak kategoriye alınmıştır.⁷⁷

CIN I: (Hafif Derecede Displazi, Hafif Derecede Atipi, Düşük Dereceli SIL): Hafif nükleer atipi olabilmesine rağmen çok katlı yassı epitelin üst 2/3'lük kısmının hücreleri normal matürasyon gösterir.⁷⁷

CIN II (Orta Displazi, Orta Derecede Atipi, Yüksek Dereceli SIL): Nükleer atipi yüzeye kadar izlenebilmesine rağmen epitelin üst yarısı matürdür.⁷⁷

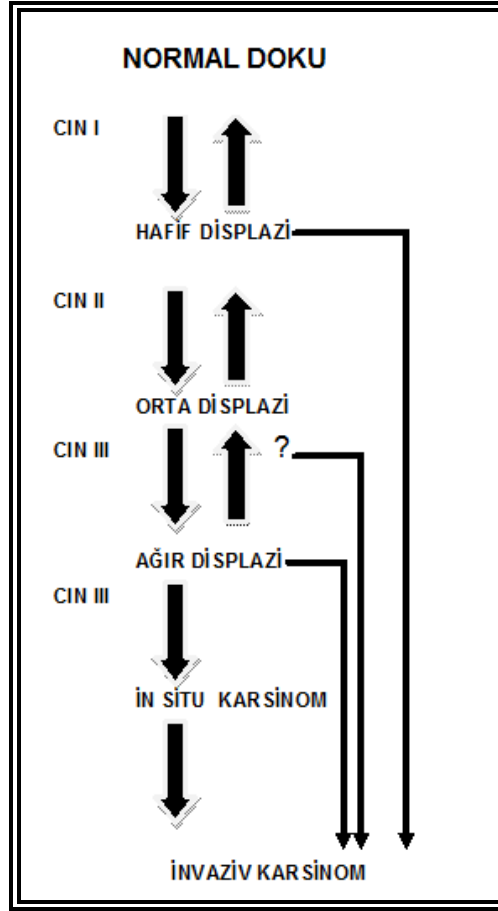
CIN III (Ağır Displazi, Karsinoma in Situ, Yüksek Dereceli SIL): Matürasyon yoktur veya sadece üst 1/3'te sınırlıdır.⁷⁷

CIN lezyonlarında dereceleme Şekil 9'da görülmektedir.



Şekil 9. CIN'de kullanılan sınıflamaların karşılaştırılması.⁷⁷

Serviksin preinvaziv lezyonlarının (CIN I, II, III) tümünün gerileme, persiste etme ve daha ağır bir şekle dönüşme kapasiteleri vardır. Ancak hangi lezyonun regresyon ve progresyon göstereceğini veya persiste edeceğini önceden saptamak pek mümkün değildir. CIN I olgularının %80–90 oranında geriledikleri bildirilmektedir. Ağır displazi ve in situ karsinom olguları ise çok az bir oranda regresyona uğramaktadır. Şekil 10'da servikal intraepitelyal neoplazilerde regresyon ve progresyon görülmektedir.^{78,79}



Şekil 10. CIN'de regresyon ve progresyon.⁷⁹

1988'de Ulusal Sağlık Enstitüleri servikal sitoloji için ortak bir konsensusa varmışlar ve Bethesda sistemini oluşturmuşlardır. Bu sistem yeni bilgiler ışığında 1991 yılında yayınlanmış ve 2001 yılında geliştirilerek güncellenmiştir. Potansiyel premalign skuamöz lezyonların Bethesda sistemine göre adlandırılması;

ASC-H: Önemli bir sitolojik bulgudur. Bu bulgu saptanan hastalarda fazla miktarda orta/ağır displazi ve daha ağır lezyon olasılığı vardır. ASC-US'a göre daha ciddidir.⁸⁰

ASC-US: Düşük veya yüksek dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon kriterlerine yanıt veremeyen anormal hücrelere ASC-US denir.^{81,82}

LSIL: CIN I (hafif displazi) ve koilositotik atipi olarak adlandırılan HPV değişiklikleri, düşük dereceli skuamöz intraepitelyal lezyonları kapsar.⁸⁰

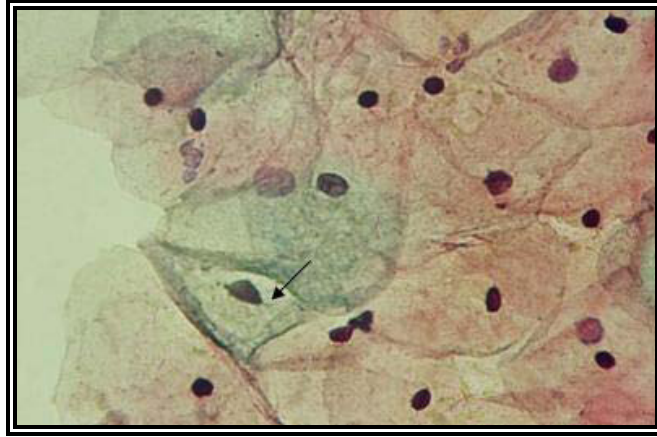
HSIL: CIN II ve CIN III (orta displazi, ağır displazi ve karsinoma in situ) yüksek dereceli skuamöz intraepitelyal lezyonlar arasında yer almaktadır. Kansere progresyon ASC-US'ta %0,25, LSIL'de %0,15 ve HSIL'de %1,44 oranında görülmektedir. Normale gerileme ASC-US'ta %68, LSIL 'de %47 ve HSIL'de %35 oranında görülmektedir.⁸¹

AGUS: Nadir görülen bir sitolojik anormalliktir. Nedeni bilinmeyen atipik hücreler olarak tanımlanır. Aslında hatalı bir adlandırmadır.⁸¹

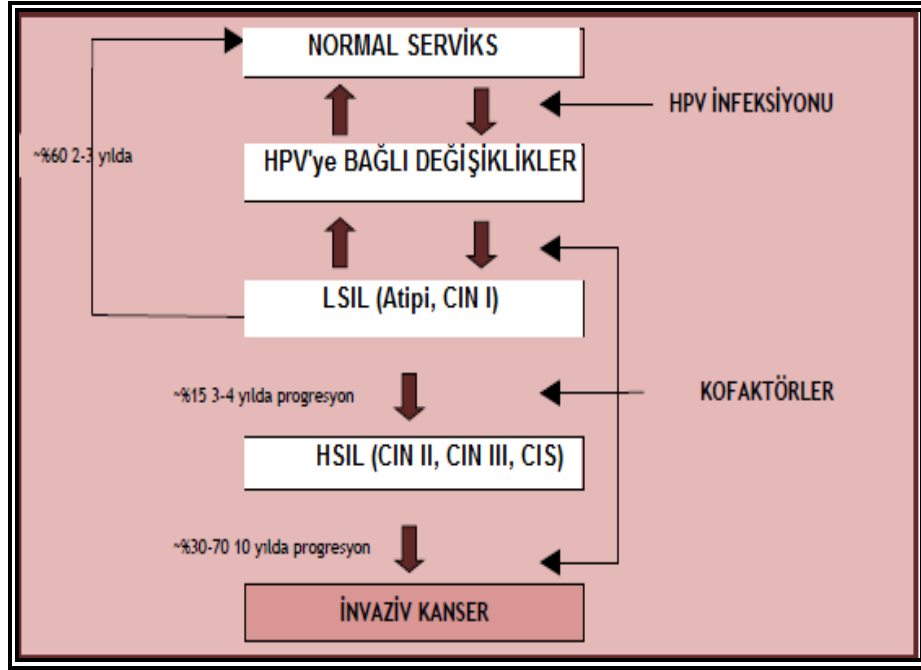
Servikal karsinogenezi HPV'nin rolü

Human papillomavirus enfeksiyonunun gelişmesi için, epitelin bütünlüğünü yitirmesi ve oluşan mikroçatlaklar aracılığıyla virüsün bazal hücre tabakasına ulaşması gereklidir.⁸³ Viral persistans ve lezyon gelişimi, virüsün epitelyal kök hücreleri enfekte etmesine bağlıdır.^{84, 85} HPV ile enfekte keratinositlerde viral onkogenler E6 ve E7'nin salınımindaki artış, hücre döngüsünü durduran kısıtlamaları ortadan

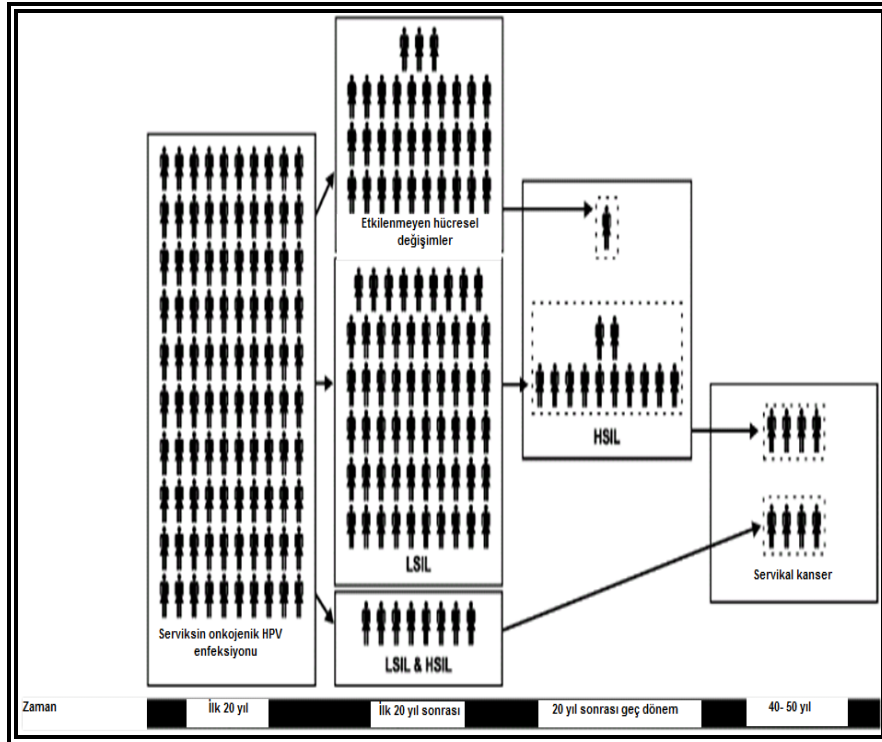
kaldırır, apoptozu durdurur ve hücre terminal farklılaşma sürecine girmez.⁸⁶ Rb proteini, E2F ailesinden transkripsiyon faktörleri ile birleşerek S-fazına girişi engelleyen bir negatif hücre döngüsü düzenleyicisidir. E7 proteini-Rb ile birleşerek E2F'nin yerini alır ve serbest kalan E2F siklin A ve E gibi viral DNA replikasyonu için gerekli hücre proteinleri transaktive eder. E6 proteini ise genel olarak Bak ve Bax ile birleşen anti-apoptotik bir proteindir ve yüksek riskli HPV enfeksiyonlarında neoplazi gelişimini indükler.⁸⁷ Bu sırada E4 proteini, sitokeratin ağını bozarak HPV ile enfekte hücrelerde koilositik görünüme yol açar (Resim 1). Ayrıca hücre döngüsünü G2 fazında durdurmayı ve E7 aracılı hücre proliferasyonunu antogonize etmeyi sağlar.^{46, 88} Yüksek riskli HPV tiplerinde E6 ve E7'nin p53 ve Rb üzerindeki etkileri sayesinde, enfekte hücrelerde büyüme kontrol edilemez, apoptozis inhibe olur ve kanser gelişir (Şekil 11a ve 11b).⁵⁶



Resim 1. Koilosit görünümü. Çok katlı yassı epitel hücreleri arasında bir adet koilosit bulunmaktadır (Papanicolaou x 600).⁸⁹



Şekil 11a. Servikal kanserin doğal seyri.⁸³



Şekil 11b. Servikal kanserin doğal seyri.⁴⁴

Serviks kanserinde risk faktörleri:

Human papillomavirus enfeksiyonu, ilk cinsel ilişkinin erken yaşta olması, birden fazla cinsel eş varlığı, sigara, bağışıklık sisteminin baskılanması, human immündeficiency virus (HIV) enfeksiyonu, bağışıklık sistemini baskılayıcı ilaç kullanımı, Herpes simpleks virusu (HSV) ve *Chlamidia* enfeksiyonları gibi cinsel yolla bulaşan hastalıklar, diyet, yüksek parite, düşük sosyoekonomik düzey, oral kontraseptif kullanımı ve genetik predispozisyon gibi konak faktörleri olarak sıralanmaktadır.⁹⁰

2.5.2. Baş - boyun kanserleri ve HPV

Baş ve boyun kanserleri tüm kanserlerin %10-15'ini oluşturmaktadır ve bunların da %90-95'i epidermoid karsinomlardır. Baş ve boyun kanserlerinde alkol ve sigara başlıca predizpozan faktörlerdir. Duman, buhar ve iritan maddelere maruziyet de etiyolojide rol oynamaktadır.⁹⁹ Sigara başta olmak üzere pek çok etkenin baş ve boyun kanserlerindeki yeri, uzun zamandır kulak-burun-boğaz hekimlerinin yaptığı sayısız araştırmalara konu olmuştur. Baş ve boyun tümörlerinde son yıllarda yapılan araştırmalarda sayılan bu faktörlerin yanı sıra, serviks kanseri ile ilişkisi uzun süredir bilinen human papillomavirüs enfeksiyonlarının üzerinde durulmaya başlanmıştır.¹⁰⁰

Amerika Birleşik Devletleri'nde her yıl 50,000 yeni baş ve boyun kanseri gelişmektedir. Bunun 1/4'ü ise larinksi etkilemektedir.

Kemoterapi ve radyoterapi morbiditeyi azaltmaktadır, ancak toplamda sağ kalım (yaklaşık 6 ay) büyük oranda değişmemektedir. Açıkçası, baş ve boyun kanserlerinin özellikle moleküler temelini daha fazla anlamak, tanı ve tedavide ilerleyebilme açısından yardımcı olacak, böylece daha iyi klinik sonuç alınacaktır.¹⁰¹

Human papillomavirus tipleri ile ilgili yapılan araştırmalar sonucunda, özellikle HPV tip 16'nın baş ve boyun tümörlerinin etiyolojisinde önemli bir role sahip olduğu gösterilmiştir.¹⁰²

Nazofarinks kanserleri; Nazofarinks kanserleri nadir görülen tümörlerdir. Bu kanserlerin görülme sıklığı 20'li yaşlardan sonra artar, 15-25 yaş arasında ve 50-59 yaşlarında pik yapar. Nazofarinks karsinomlarının %38,8'inde HPV pozitif olarak tespit edilmiştir.⁹⁹

Paranasal sinüs karsinomları; Paranasal sinüs ve burun neoplazmları oldukça nadir olup, solunum ve sindirim yolları tümörlerinin %3'ünü, tüm malignansilerin de %1'ini oluştururlar. HPV tip 6 ve 11'inde ilave faktör olarak rol oynayabileceği belirtilmiştir. Sinonasal karsinomların %2-22'sinde HPV pozitifliği tespit edilmiştir.¹⁰³

Larinks kanserleri; Larinks kanserleri, tüm kanserlerin %2'sini, baş ve boyun kanserlerinin ise yaklaşık olarak %25'ini oluşturmaktadır. Ayrıca üst solunum yolu kanserleri içinde en sık görülenidir.¹⁰⁴ Ultrastrüktürel çalışmalarda laringeal papillomatozisin viral etiyolojiye dayandığı gösterilmiştir. İmmünohistokimyasal çalışmalarda ve in situ

hibridizasyonda, HPV antijeni ortaya konulmuştur. Hastalarda aktif hastalığın olduğu durumlarda; lezyonu içermeyen bölgelerde ve remisyondaki hastalarda da viral DNA bulunmuştur. Laringeal papilloma eşlik eden HPV tipleri HPV 6 ve HPV 11'dir.¹⁰⁵

Lokalizasyonlarına göre 4 majör tümör tipi vardır;

1. Glottik: Tüm vakaların %60-65'ini oluşturur. En sık lokalizasyon glottisin ön 1/3'üdür. Etrafını çevreleyen kıkırdak duvar ve lenfatik damarların azlığı nedeniyle bu lokalizasyondaki tümörler uzun süre lokalize kalırlar.^{107,108}
2. Supraglottik: Tüm vakaların %30-35'ini oluşturur. Supraglottik tümörler, yalancı kord, ventrikül ve/veya epiglottisin laringeal veya lingual yüzeyini içine alır. Lenf nodu metastazı ortalama %40'dır. Tedavi radyasyon ve larenjektomidir.^{107,108}
3. Transglottik: Vakaların %5'inden daha azını oluşturur. Laringeal ventrikülü tutan tümörlerdir. Lenf nodu metastazı insidansının en yüksek olduğu gruptur.^{107,108}
4. Infraglottik: %5'den azdır, tümör korddadır. Servikal lenf nodu metastazı %15-20, paratrakeal lenf nodu metastazı %50'dir. Bu nedenle radikal lenf nodu diseksiyonu uygulanmalıdır.^{107,108}

Larinks karsinomlarında 5 yıllık yaşam oranı; glottik tümörlerde % 80-85, supraglottik tümörlerde % 65-75, subglottik tümörlerde % 40 ve transglottik tümörlerde % 50'dir.⁹⁹

2.5.3. Vulva kanseri ve HPV

Vulva kanseri, kadın genital kanserleri içerisinde oldukça nadir görülen bir gruptur. Vulva kanserlerinin %40'ından HPV sorumlu tutulmaktadır. HPV ile ilişkili vulva kanserlerinde kanser öncesi süreç net değildir.⁹⁷ Serviksin skuamöz hücreli karsinomlarında olduğu gibi vulvar karsinomlar da, vulvar intraepitelyal neoplazi (VIN: Vulvar Intraepithelial Neoplasia) sonucu gelişir. Vulva-vaginal hastalıklar VIN 1, VIN 2 ve VIN 3 olarak derecelendirilmiştir. VIN 3 şiddetli displazi veya karsinoma in situ olarak kabul edilir. VIN lezyonları vulvadaki lokalizasyonları, boyut, pigmentasyonu ve düzenliliğine göre çeşitlilik göstermektedir. VIN'lı hastalar genellikle asemptomatiktir ve lezyonlar rutin pelvik muayene sırasında saptanır. Bununla birlikte bazı hastalarda kaşıntı ve yanma olabilir.⁷⁷ Özellikle düşük riskli HPV tipleri ile oluşan siğiller ile sık olarak karşılaşılan bu bölgede, onkojenik virusların kanser oluşturabilmesi için bir takım yardımcı faktörlerin de bulunması gerekmektedir. Vulvar intraepitelyal neoplazi, sigara kullanımı, immün sistemin durumu, sosyoekonomik faktörler ve önceden mevcut olan bu virüsün neden olduğu başka bir anogenital kanser öyküsü gibi etiyolojik faktörler, HPV ile ilişkili vulva kanserlerinde önemli rol oynamaktadır.⁹⁷

2.5.4. Anal kanserler ve HPV

Anal kanserler, kolumnar ve skuamöz epitel arasında var olan transizyon zonunda meydana gelmektedir. Anüsün skuamöz hücreli kanseri oldukça nadirdir ve genelde gastrointestinal sistem (GIS) kanserlerinin %1,5'ini oluşturur.¹⁰⁹ Anal kanserlerin hemoroidler, fissür ve/veya inflamatuvar barsak hastalıklarından dolayı kronik irritasyon sonucu geliştiğine inanılmaktadır. Güncel çalışmalar, HPV enfeksiyonunun, birden fazla HPV genotipi ile olan enfeksiyonun, servikal displazi veya kanserin, human immunodeficiency virus (HIV) pozitifliğinin, düşük CD4 düzeyinin, sigara içiminin, anal ilişkinin ve solid organ transplantasyonu sonrası immüsupresyonun risk faktörleri arasında olduğunu göstermektedir.¹¹⁰ HIV pozitif vakalarda anal kanser görülme riski genel popülasyona nazaran daha fazladır ve bu risk özellikle HIV pozitif homoseksüel erkeklerde kadınlara oranla daha fazladır. AIDS –Kanser kayıt çalışması çerçevesinde Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde yapılan bir araştırmada HIV enfeksiyonu invaziv anal kanser riskini erkeklerde %37,9, kadınlarda ise %6,8 oranında artırmaktadır. Bu oran farklılığı ise HIV-pozitif homoseksüel erkekler grubu ile ilişkilidir.¹¹¹

2.6. HPV'nin Bulaşma Yolları

Human papillomavirus, birçok şekilde bulaşmaktadır; kontamine yüzeylerden, ciltteki lezyonlardan ve doğum kanalından olmak üzere direkt veya indirekt olarak bulaş görülmektedir.⁴¹ Ciltte görülen HPV tipleri kontamine yüzeyler ve eşyalar aracılığı ile bulaşabilirken, servikal

enfeksiyonlara yol açan özellikle yüksek riskli HPV tipleri cinsel temas aracılığıyla bulaşmaktadır.¹¹²

2.6.1. Seksüel bulaşma

Human papillomavirusun, seksüel aktif kadınların %75'inde var olduğu öne sürülmektedir. Ayrıca genital HPV enfeksiyonu geçiren bireylerin eşlerinde de %60–66 oranında, ortalama 3 ay gibi bir süre sonrasında genital HPV lezyonları görülmektedir.¹¹² Şiddetli enfeksiyonlar için, cinsel aktivite esnasında skuamöz ya da mukozal epiteldeki aşınmalar veya hasarlarla bazal hücrelere doğru HPV'nin ulaşması gerekmektedir.¹¹¹ Cinsel yolla bir kez HPV enfeksiyonu alınırsa, bundan sonraki aşamada konağın bağışıklık durumuna bağlı olarak HPV enfeksiyonu çok değişik şekillerde seyretmektedir. Bağışıklık yanıtı bozuk konaklarda aynı tip HPV ile nüksler görülürken, bağışıklığı sağlam konaklarda ise başka HPV tiplerine veya birden çok eşle ilişkiye bağlı olarak enfeksiyon ve lezyonlar görülmektedir.¹¹³

Cinsel ilişki ile bulaşmada en önemli faktörler cinsel eş sayısı ve enfeksiyonun alındığı yaştır. Maksimum prevalans 15–30 yaşları arasındır (21 ± 4 yaş), yaş ilerledikçe bu oran düşmektedir. Bu nedenle, ilk cinsel ilişki yaşının erken olması, HPV enfeksiyonu alınmasında ve daha sonra gelişecek malign lezyonlar açısından oldukça önemlidir. Tüm bu bilgilerin yanı sıra, serviks enfeksiyonunda genellikle cinsel ilişkinin gerekli olduğu düşünülür, ancak cinsel ilişki olmaksızın sadece deri teması yoluyla da HPV anogenital bölgeleri de enfekte edebilmektedir.^{113,114}

2.6.2. Ekstragenital bulaşma

Bazı genital HPV tipleri, genital bölge dışına da yerleşip hastalık yapabilmektedir. Örneğın HPV 16, periungual bölge siğilleri ve skuamöz kanserlerinde bulunmaktadır. “Bowenoid papüllozis” sebebi HPV tip 35, periungular verrülerde görölmektedir. Bu nedenle bu tiplerin tırnak aralarında yaşadığı ve non-seksüel geçişte rol oynayabilecekleri düşünölmektedir.¹¹⁵ Ekstragenital HPV’nin bulaşmasında ise bulaşma şekli gösterilememiştir, ancak çevresel yüzeyler, giysiler, havlu ve tuvaletlerden bulaşma olabileceğı öne sürölmüştür. Ancak henüz tam anlamıyla ispatlanamamıştır.¹¹⁶

2.6.3. Vertikal bulaşma

Nadir görölen bir durum olarak, anneden bebeğı doğum kanalıyla fetal olabilen rekkürent solunum papillomatozis (RRP)’in bulaşabileceğı rapor edilmiştir.¹¹¹ Doğum sırasında eğer annede HPV 6 veya HPV 11 varsa, bunların doğum sırasında bebeğı geçip, vokal kordlarla laringeal papillomatozis hastalığına sebep olduğı gösterilmiştir. Çalışmalarda servikal HPV taşıyan kadınlardan doğan çocukların nazofarinks sekresyonlarında %4–87 oranında HPV DNA pozitifliğı belirlenmiştir.¹¹⁷

2.7. HPV Enfeksiyonunda İmmün Yanıt

Bütün virus enfeksiyonlarında olduğu gibi HPV enfeksiyonunda da immün sistemin hücresel ve hümoral cevabı virusa karşı savunmada oldukça önemlidir.¹¹⁸ Genellikle virus ve virus ile infekte olan hücreler doğal immün sistem tarafından yok edilirler. Doğal bağışıklık, herhangi bir patojene karşı deri ve mukozal hücreler tarafından sağlanan ve interferon- , sitokinler, nötrofiller ve makrofajları içeren cevap ile karakterize nonspesifik dirençtir. Doğal immünite APC'leri (antigen-presenting cell - antijen sunan hücre) aktive ederek adaptif immün sistemi uyarır.¹¹⁹ Diğer patojenlere nazaran HPV, bazı yapısal ve fizyolojik karakterlerinden dolayı zayıf imm nojenidir ve başarılı bir şekilde immün sistemden kaçabilir. Bu kaçış esnasında bazı immün sistem fonksiyonlarını da baskılayabilir. Bu sebeple HPV enfeksiyonlarının iyileşmesi uzun zaman almaktadır. Yüksek riskli HPV tiplerinin temizlenmesi için gerekli olan süre yaklaşık 16-18 ay iken, düşük riskli HPV tiplerinin temizlenmesi için 10 ay gibi kısa bir süre yeterlidir.³⁷

Virüs immün sistemden kaçabilmek için birçok mekanizma geliştirmiştir. Bunlardan en önemlisi replikasyon döngüsüdür; viremi fazı içermez. Enfeksiyonun epitelyum hücrelerinde lizisine yol a maması ve farklılaşmaya bağımlı viral protein salınımlarının immün sistem hücrelerinden uzakta epitelin üst tabakalarında olması doğal immün cevabın uyarılmasını azaltmaktadır.¹¹⁸ İmmün cevaptan ka ıştaki diğer önemli faktör keratinositlerin iyi antijen sunamamasıdır. Böylece adaptif immün sistemin aktivasyonu da geciktirilmektedir. Bunların dışında HPV doğal immüniteyi de engelleyen bazı mekanizmaları da içermektedir. Yüksek riskli HPV'lerde bulunan E6 ve E7 proteinleri hücre yüzeyinde MHC sınıf I ekspresyonunu azaltır, Tip-1 interferon ekspresyonunu ve sinyal

iletimini de bozmaktadır.¹²⁰ E5 proteini de hücrelerde endozomların asidifikasyonunu azaltarak MHC sınıf II ile antijen sunumunu azaltır. Böylece HPV doğal immün cevaptan kaçarak adaptif immün cevabın aktivasyonunu geciktirir.⁵⁶ Ayrıca, epidermiste langerhans hücreleri ve keratinositler, birbirlerine e-cadherin adezyon molekülü ile tutunur. HPV 16 ile enfekte olan keratinositlerde ise E6 proteini e-cadherin ekspresyonunu azaltarak langerhans hücrelerine adezyonu engeller. Böylece langerhans hücrelerinin epiteldeki sayıları azalır. Bu durumda langerhans hücreleri tarafından viral antijenler yakalanamaz, antijen sunumu da azalmış olur ve hücrel immün cevabın başlaması gecikir. Bununla birlikte, E5 proteininin, endozomal olgunlaşmada ve konakta antijen sunan hücrelerde değişikliğe sebep olduğu gösterilmiştir. E5'in varlığı hücrelerde yüzey HLA-A ve HLA-B seviyelerinin azalmasına yol açar. MHC sınıf II tarafından antijen sunumunu, sabit zincirin yıkılmasındaki eksiklikten dolayı interferon gama stimülasyonu yaparak E5 eksprese eden hücrelerde MHC sınıf II yüzey seviyelerini azaltır. HPV 16 E5'in HLA sınıf I hücre yüzeyine transportu azaltarak MHC sınıf I'i engellediği bildirilmiştir.⁴⁶ HPV tip 16'nın E6 ve E7 proteinlerinin IL-8 ve makrofaj kemotaktik proteini MCP-1'in ekspresyonunu baskılayarak nötrofil ile makrofajların enfeksiyon yerine gelişini engellemesi de doğal immün cevaptan kaçışta rol oynadıklarıdır.¹²¹

Human papillomavirus çeşitli yollarla konak savunmasına engel olsa da ilk önce nonspesifik doğal immünite ve ardından spesifik adaptif immünitenin etkisiyle genital HPV enfeksiyonlarının %95'ten fazlasında virüsün temizlenmesi immün cevabın başarısını göstermektedir.¹²¹ Doğal enfeksiyon süreci sonrasında kısıtlı bir antikor yanıtı gelişir, bu antikorların büyük bir oranı süre gelen 3 yıl gibi bir zaman süreci içerisinde kaybolur. Bir HPV tipiyle daha önce enfekte olanlar sınırlı

bir zaman boyunca koruyucu antikora sahip olurlar. Fakat diğer tiplere karşı duyarlılıkları devam eder.¹²²

2.8. HPV Enfeksiyonunun Epidemiyolojisi

Human papillomavirus ve servikal kanser arasındaki ilişki ilk kez 1977 yılında zur Hausen tarafından bildirilmiştir. HPV bütün dünyada servikal kanser vakalarının %94–99,9'sinde tespit edilmiştir. Kanser epidemiyolojisinde bu ilişki eşsizdir, şimdiye kadar tanınan akciğer kanseri-sigara ilişkisinden sonra en büyük birlikteliktir.³⁸

Serviks kanseri insidansı 100.000 kadında 1–50 arasında değişmekte olup, en yüksek oranlara Latin Amerika ve Karaib adalarında, sahra altı Afrika, Malezya, güney-santral ve güneydoğu Asya'da rastlanmaktadır.¹²³ HPV prevalanslarındaki bu farklılıklar çalışılan popülasyonlar ve kullanılan çeşitli HPV DNA testlerinin moleküler sensitivitesindeki farklılıklar ile açıklanabilmektedir. En yüksek prevalans oranları, en sensitif test olan moleküler testlerin gelişimi sayesinde elde edilmektedir.¹²⁴ Prekanseroz lezyonları ve serviks kanserinin erken safhalarını tespit etmeye yönelik iyi organize edilmiş programları olan ülkelerde bu kanserler %80 oranında önlenabilmektedir. Ancak düşük ve orta derecede sosyo-ekonomik seviyelerde efektif tarama programları ve anormal tarama testi saptanan kadınların takibi çok güçtür. Bu nedenle gelişmekte olan ülkelerde servikal kanserin mortalite oranı daha yüksektir.¹²⁵

Geçici genital HPV enfeksiyonları sıklıkla, genç cinsel bakımdan aktif olan kadınlarda görülmektedir. Bauer tarafından 467 sağlıklı üniversite öğrencisi ile yapılan çalışmada, %46 oranında HPV pozitifliği tespit edilmiştir.¹²⁶ Villiers tarafından Almanya'da yapılan bir çalışmada ise 20.161 kadında %8,8 oranında bir sıklık belirlenmiştir.¹²⁷ Kümülatif insidans değerleri dikkate alındığında 12. ayda %14–41, 24. ayda %34–39, 36. ayda %43–44 ve 5. yıl sonunda %55 oranında pozitiflik saptanmaktadır.¹²⁶ Yapılan çalışmalarda insidans oranlarının daha genç olanlarda, eş sayısı fazla olanlarda, zencilerde, sigara içenlerde ve anal ilişkide bulunanlarda daha sık olduğu saptanmıştır. Bu da serviks kanseri için risk faktörü olan tüm bu değişkenlerin asıl etkisini HPV enfeksiyonu üzerinden gerçekleştirdiğini düşündürmektedir.^{126,128}

Tüm HPV tipleri çeşitli klinik belirtilere sebep olur. Genital tipler onkojenik potansiyellerine göre düşük veya yüksek riskli olarak sınıflandırılırlar. Örneğin HPV 6 ve 11 genital siğillerde en sık rastlanan tipler iken HPV 16, 18, 31 ve 45 invaziv anogenital kanserlerin gelişiminde en sık rastlanan tiplerdir.¹²⁹ Servikal kanserde en çok tespit edilen yüksek riskli HPV tip 16 ve 18 tipleridir. HPV tip 16 en yaygın yüksek riskli HPV tipidir ve servikal skuamöz hücreli kanserin yaklaşık %55'inde tespit edilmiştir. İkinci en yaygın yüksek riskli HPV ise tip 18 olup serviks kanserinin yaklaşık %16'sında bulunur. HPV 16 ve 18 birlikte, bütün servikal kanserlerin yaklaşık olarak %70'inde bulunur.¹³⁰ Düşük risk tipleri HPV 6 veya 11 'condylomata acuminata' olarak bilinen genital siğillere sebep olur ve anogenital siğillerin %90'dan fazlasında görülmektedir. Düşük riskli HPV tipleri LSIL (%4,3–8,1)'da az bir oranda, HSIL ve invaziv skuamöz karsinomada ise çok nadir bulunur.¹³¹

Human papillomavirus erkeklerde de genital siğil ve anal kanser yapmakla beraber görülme oranları oldukça düşüktür. Bu nedenle genel olarak erkeklerde klinik tablo asemptomatik olarak seyretmektedir ve dolayısıyla genelde erkeklerle ilgili veriler, HPV enfeksiyonu olan kadınların eşlerinde veya başka bir nedenle doktora başvuran erkeklerde yapılan çalışmalardan oluşmaktadır. Genel olarak rapor edilen oranlar %16 ile %45 arasında HPV varlığını göstermektedir.¹³²

Human papillomavirus, baş ve boyun skuamöz hücre kanserlerinde de önemli bir karsinojendir.⁹⁹ Baş ve boyun kanserlerinde HPV'nin varlığı ile ilgili ilk veri 1960'larda laringeal papillomatoz bulgusunda gözlenmiştir. Araştırmacılar HPV DNA'sını baş ve boyun karsinomlarında southern blot hibridizasyon ve polimeraz zincir reaksiyon yöntemleri ile göstermişlerdir. Larinks kanserlerinde HPV pozitifliği %3 ile %85 arasında değişirken, orofarenks kanserlerindeki gibi normal larinks mukozasında da %4 ile %64 arasında pozitiflik olduğunu bildiren çalışmalar mevcuttur.¹³³ Yapılan bir çalışmada PCR testinin kullanıldığı 60 çalışmadan 5046 baş ve boyun skuamöz hücre kanserlerine ait örnekler analiz edilmiştir. HPV prevalansı orofaringeal skuamöz hücreli kanserde oldukça yüksek %35,6, oral kanserde %23,5 ve larinks kanserinde %24 olup, toplam HPV prevalansı %25,9 olarak bildirilmiştir.¹⁰⁴ Larinksin papillom ve kanserlerinde farklı HPV tiplerine rastlanır. Papillomlardan gelişen larinks karsinomunda da virusun bu tiplerine rastlanır. Larinks karsinomlarında en sık saptanan tipler ise yüksek risk grubundan olan HPV 16, 18 ve 33'tür.¹³⁴ HPV 16 orafaringeal kanserlerin çoğunda %86,7, oral kanserin %68,2 ve larinks kanserinin %69,2'sinde tespit edilmiştir. HPV 18 ise tespit edilen en sık görülen ikinci tip olup, orafaringeal kanserde %2,8, oral kanserde %34,1 ve larinks kanserinde %17 oranında bulunmuştur. Diğer onkogenik HPV'ler baş ve boyun skuamöz hücre kanserlerinde nadiren tespit edilmiştir.¹³⁵

Tablo 2. Bölgelere göre HPV prevalansı.¹³⁶

Bölge	Yaş grupları						Toplam	Multiple HPV			Toplam HPV (%)
	15-24	25-34	35-44	45-54	55-64	65-74		Tek HPV (%)	2 tip (%)	3 ve daha fazla tip (%)	
Afrika	113	174	125	172	151	91	826	16,5	5	3,3	24,8
Asya	796	1578	1331	1037	881	477	6100	6,3	3,2	0,6	10,1
Güney Amerika	669	1088	871	442	322	154	3546	9,4	2,8	1,6	13,8
Avrupa	176	795	1379	1505	1064	222	5141	3,7	0,7	0,2	4,6
Kuzey Amerika	73	70	70	41	21	9	284	12,5	5,3	3,5	21,3
Tüm bölgeler	1827	3705	3776	3197	2439	953	15897	48,4	17,0	9,2	74,6

2.9. HPV Tanısında Kullanılan Mikrobiyolojik Yöntemler

Laboratuvar ortamında HPV kültürü güvenilir bir şekilde yapılamamaktadır. Bu nedenle HPV tanısı, tüm klinik örneklerde moleküler teknolojiler ile HPV DNA'sının saptanmasına dayanmaktadır.¹³⁷

Human papillomavirus, enfeksiyonlarının tanısı, hücresel örneklerde HPV'nin tespiti ile mümkündür. Tüm HPV taramaları için klinik geçerlilik gereklidir. Amerika ulusal gıda ve ilaç kurumu (Food and Drug Administration-FDA) tarafından, iki HPV tarama metodu onaylamıştır. Birçok HPV taraması, kolposkopik biyopsi veya FDA onaylı ilk test olan HC-II (Hybrid capture-II, Digene, Gaithersburg) testi ile yapılır. İkinci onay

alan test 2009 yılında HPV Invader testtir. HPV tanısı için üç ana metod vardır. Bunlar direk hibridizasyon yöntemleri (Southern blot, dot blot, in situ hybridisation), sinyal amplifikasyon testi (HC-II) ve nükleik asit amplifikasyon (PCR) testleridir.¹³⁸

Direk hibridizasyon yöntemleri

İn situ hibridizasyon hem parafine gömülü doku örnekleri hem de servikal yaymalarda HPV antijenlerinin veya nükleik asitinin (DNA veya mRNA) spesifik proplar ile birleşmesi temeline dayanmaktadır. Biyotinle işaretli propların belirlenmesinde kromojenik substratlar kullanılmaktadır. Yöntem klinik kullanımlar için otomatize edilmiştir. Sensitivitenin güçlendirilmesi sinyal amplifikasyonu ile sağlanır ve özellikle floresan işaretli prob kullanılması veya DNA ya da RNA hedeflerinin gözlemlenmesi için daha verimli protokollerin kullanılması, nanopropların kullanılması veya kombine tekniklerin pratiğe geçirilmesi mümkündür. Ayrıca, toplanan örneklerde aranan hedefin kaybolması, koruma ve saklama koşullarında var olan sınırlamalar, test tekniklerini de sınırlayabilmektedir.¹³⁹

Yöntemin avantajları, spesifik hücrelerde (normal hücreler veya koilositlere karşı tümör hücreleri) HPV enfeksiyonunu tanımlayabiliyor olması ve aynı zamanda fiziksel durumunun belirlenebiliyor (epizomal HPV veya hücre genomu içerisine integrasyon) olmasıdır. Eğer tanı metodunun sensitivitesi fazla ise, aynı zamanda entegre olmuş HPV kopyalarının sayısı da belirlenebilir.¹⁴⁰

Yöntemin dezavantajı, fiyatıdır. Ayrıca, multiple in situ hibridizasyon deneyleri her HPV tipi ve her örnek için yapılmalıdır.¹⁴⁰

Sinyal amplifikasyon testi

Human papillomavirus tanısı için ilk FDA onayı alan test Hybrid Capture II (HC-II) testidir (Digene, Gaithersburg). Günümüzde klinik onayı bulunan ve en çok kullanılan yöntemdir. Bu yöntem, solüsyon bazlı hibridizasyona dayanan sinyal amplifikasyon metodudur. Yöntemde 13 yüksek riskli (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 ve 68) ve 5 düşük riskli HPV tipinde (6, 11, 42, 43, 44) HPV-DNA hedefleriyle reaksiyona giren RNA probları kullanılmaktadır. Düşük riskli HPV tiplerinin saptanmasında ise herhangi bir klinik öneme sahip olmamasından dolayı test sadece yüksek riskli prob setleriyle yapılmaktadır.¹⁴¹ Yapılan çalışmalarda her ikisi de bu yöntem için kullanılabilmesine rağmen Specimen Transport Medium® (Digene, Gaithersburg) ile toplanan örneklerin PreservCyt® (Digene, Gaithersburg) ile toplanan örneklerle göre daha spesifik sonuçlar verdiği belirlenmiştir. HC-II testi, viral yükün semikantitatif ölçümünü sağlamaktadır. Sistemde yayılan ışık miktarı, örneklerin sinyal güçlerinin oranı olan relative light unit (RLU) olarak ifade edilir. Pozitif olarak belirlenen sonuçlar için, FDA'nın kabul ettiği kontrol değeri 1pg/ml HPV DNA'dır. Bu değer yaklaşık 5000 kopya sayısına karşılık gelmektedir. Buna karşın, yöntem örnekte hücresel DNA miktarının kontrolünü yapamamaktadır.¹⁴²

Hybrid Capture II (HC-II) yöntemi sadece yüksek riskli ve düşük riskli HPV tiplerinin tanınması için dizayn edilmiştir ve spesifik tipleri belirleyememektedir.¹⁴² Ancak yüksek riskli veya düşük riskli tiplerden en az birinin var olduğunu gösterebilir. Bu durum yöntem için önemli bir sınırlayıcıdır, buna karşın genotiplendirme dirençli yüksek riskli tiplerin varlığını belirleyebilmektedir. Bu durum da servikal kanser oluşumu için risk faktörüdür.¹⁴³ Yöntemin en önemli avantajı, kullanım kolaylığına sahip olmasıdır.¹⁴²

Nükleik asit amplifikasyon testi

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) nükleik asitlerin in vitro koşullarda replikasyonu için geliştirilmiş çok yaygın olarak kullanılan bir test tüp sistemidir.¹⁴² Hedef DNA'nın selektif olarak amplifikasyonuna izin verir. Böylece daha az doku ve hücre örnekleri veya daha az viral kopya ile test yapılmasını sağlar. Hedef DNA dizisi yaklaşık 1 saat içerisinde 1 milyon kez çoğaltılabilir. Tüm PCR yöntemleri örnek hazırlama ve PCR reaksiyonları için farklı laboratuvarlara ihtiyaç duymasına rağmen geniş çaplı klinik çalışmalar için uygundur. PCR yönteminin, tip spesifik PCR ve konsensus PCR olmak üzere 2 tipi mevcuttur. Spesifik PCR, tek bir HPV genotipinin amplifikasyonu için tasarlanmıştır. Bu PCR çoklu tiplerin amplifikasyonu için ayrı ayrı uygulanmaktadır. Bu sistemin en önemli dezavantajları ise, her örnek için ayrı zaman gerekmesi ve fiyatın artıyor olmasıdır.¹⁴⁴ Konsensus PCR da ise, HPV tiplerinin büyük bir kısmının tanınmasına olanak sağlar. Bu sistemde primerler farklı genotiplerdeki korunan dizileri hedef almaktadır.¹⁴² L1 bölgesi yüksek derecede korunan bölge özelliği taşımasının yanı sıra HPV tiplerinin sınıflandırılmasında da kullanılmaktadır.¹⁴³ Dolayısı ile kullanılan primerlerin büyük çoğunluğu L1

bölgesini hedef alır. Başlangıç olarak, dejenere primerler (MY09/11) kullanılır. Dejenere biçimde sentezlenmiş oligonükleotid primerlerin kullanılması, PCR çalışmalarında yüksek varyasyon meydana getirir. Bu sebeple artık oligonükleotid havuz setleri geliştirilerek MY09/11 ile aynı primer bağlanma bölgelerini kullanan sensitivitesi ve çoğalabilirliği geliştirilmiş PGMY09/11 primerleri geliştirilmiştir. PGMY11 primer havuzu için 5 tane ters yönlü oligonükleotid, PGMY09 primer havuzu için 13 tane düz yönlü oligonükleotid oluşturulmuştur.¹⁴⁵ PGMY09/11 primer seti L1 bölgesinin 450bp'lik parçasını çoğaltır. GP5+/6+ primer seti L1 bölgesinin 150bp'lik parçasını çoğaltır. SPF10 primerleri ise 10 farklı PCR primerleri (6 forward ve 4 reverse) ile sadece 65bp'lik fragmanı amplifiye eder. Bu primerler farklı genotiplerin herhangi bir bölgesini çoğaltmak için inozin nükleotidini kullanır, bu inozin herhangi bir baz ile bağlanabilir.¹⁴⁶ Her ne kadar bu primer setlerinin güçlenmiş sensitiviteye sahip olması beklense de, farklı çalışmalarda primer setlerinin uyumsuz olduğuna dair sonuçlar gözlenmektedir.¹⁴²

Bazı çalışmalarda viral integrasyon sırasında L1 bölgesinin kaybolabildiği veya parçalanabildiğini ve böylece yanlış negatif sonuçların ortaya çıkabileceği gösterilmiştir.¹⁴⁵ Bazı araştırmacılar ise integrasyonun E2 ORF'yi parçaladığını bunun sonucunda transkripsiyonel düzenleyici proteinlerin kaybedildiğini ancak E6 ve E7 onkoproteinlerinin salınımının devam ettiğini bildirmişlerdir.¹²⁴ Hedef DNA bölgesinin PCR aracılığı ile amplifikasyonu sonrası, spesifik HPV tipinin belirlenmesi, nükleik asit hibridizasyonu, restriksiyon endonükleaz ve sekanslama ile gerçekleştirilebilir. Nükleik asit hibridizasyonu, HPV tiplendirilmesi açısından en çok kullanılan testtir. Line probe assay tekniğinde ise poly(dT) kuyruk DNA problemlerinin 3' ucuna enzimatik yolla bağlanır ve problemler sonrasında nitroselüloz üzerinde immobilize hale getirilir, ardından hibridizasyon meydana gelir ve spesifik HPV tipleri bu yolla belirlenebilir.

Bu test de ayrıca kolorimetrik reaksiyona bağlıdır ve belirli spesifik HPV genotipleri de belirlenebilir.¹⁴⁵ Roche Diagnostic firmasına ait olan Amplicor HPV testinde L1 konsensus biyotinli primerleri (165 bp ürün) kullanmaktadır ve Linear Array line blot hibridizasyonun immobilize problemler ile birlikte tasarlanabilir. Amplicor HPV test 13 HR HPV DNA genotipinin belirlenmesini sağlayabilmektedir.¹⁴⁷

Genotiplerin belirlenmesi

Restriction fragment length polymorphism (RFLP) çeşitli endonükleazlar kullanarak, PCR ürünü DNA'yı spesifik baz çiftlerinden fragmentlere ayırır. Her bir endonükleaz farklı uzunluklarda fragmanların oluşmasına neden olur ve spesifik HPV tiplerine ait farklı bant modelleri agaroz jel elektroforezi ile belirlenebilir.¹⁴⁸

DNA dizi analizi rutin kullanımda pahalı olmasına rağmen, örneklerin rutin analizi için uygun ve hızlı bir yöntemdir. Sistemin en önemli dezavantajı, multiple HPV tiplerinde sensitivitesi oldukça düşüktür. Yöntem klinikte HPV genotiplendirmesi için rutin olarak uygulanan bir yöntem değildir.¹⁴⁹

Yeni teknikler

Sitoloji ve HPV tiplendirme testleri arasındaki uyumu arttırmak ve yüksek dereceli displazi ile kansere dönüşebilecek hastaların

daha iyi saptanabilmesi için de bir takım yeni metodlar gündeme gelmektedir.¹³⁷

Human papillomavirüslerde mRNA' nın belirlenmesi

Yüksek riskli HPV tiplerinde E6/E7 mRNA tespitinin HPV DNA testinden daha duyarlı olduğu bilinmektedir. Bu teknik kullanılarak öncül bir belirleyici olarak HPV'nin onkojenik aktivitesinin tespiti, taramanın etkinliğinin artmasında ve servikal lezyonun prognozunun belirlenmesinde E6/E7 mRNA'nın kullanılmasının yararlı olabileceği sonucunu ortaya koymuştur.¹⁵⁰

p16(INK4a)

p16, pRb gen ürünleri arttıkça sentezi baskılanan bir kinaz inhibitörüdür. Normal hücrelerde çok az salgınmaktadır. HPV E7 proteini, pRb proteinini baskırsa p16 artar. p16 salgınının çok olması anormal çoğalma olasılığını artırır. Serviks kanseri hücrelerinde de p16 çok artmıştır. Amaç hücrenin çoğalmasını kontrol altına almaktır. HPV'ye bağımlı displastik skuamöz hücrelerin tespitinde p16(INK4a) değerli bir belirleyicidir. Servikal lezyonun derecesi, pozitif p16(INK4a) ve yüksek riskli HPV ile anlamlı derecede korelasyon göstermektedir. p16(INK4a) servikal sitoloji taramasının sensitivitesini ve HPV testinin spesifisitesini yükseltmek için kullanılabilir.¹³⁷

2.10. HPV Enfeksiyonundan Korunma

Human papillomavirus, enfeksiyonunda korunma henüz açıklığa kavuşmamış bir konudur. En sık cinsel ilişki ile bulaştığı için en iyi korunma yöntemi hiç cinsel ilişkiye girmemektir. Böyle bir durum mümkün olamayacağından cinsel ilişki yaşının mümkün olduğu kadar geciktirilmesi, sigara içilmemesi, eş sayısının az olması uygun önerilerdir.¹⁵¹

Cinsel ilişki sırasında prezervatif (kondom) kullanılmasının HPV enfeksiyonlarından %100 koruduğuna dair kanıt bulunmamaktadır. Amerikan Ulusal Allerji ve Enfeksiyon Hastalıkları Enstitüsü çalışmasında, kondomların HPV enfeksiyonunu azalttığına dair bir bulgu elde edememiştir. Kondom, HPV partikülleri için bir bariyer oluşturur, fakat fiziksel olarak kaplanamayan bölgeler için yeterli koruma sağlamaz. HPV vulva derisi, pubik deri, penis shaftında da yaşamaktadır. Üstelik HPV bulaşması için mutlaka cinsel penetrasyon gerekmektedir. En son yapılan bir meta analizde, kondom kullanımının HPV enfeksiyonlarını azaltmadığı, fakat siğil oluşma riskini azalttığı belirlenmiştir.¹⁵¹

Günümüzde uygulanan etkin korunma, DNA testleri, smear, kolposkopi vs. ile HPV'yi erken belirleyip, sebep olduğu lezyonları erken tedavi ederek, invaziv kanser gelişimini önleme şeklinde uygulanan sekonder korunmadır. Bunun yerine profilaktik aşı uygulaması ile primer korunma daha mantıklıdır.¹⁵¹

2.11. HPV Enfeksiyonundan Korunmada Aşıların Yeri

Human papillomavirus aşılarının primer amacı, sadece mukoza yoluyla enfeksiyona sebep olup, enfeksiyon bölgesinde kalan bu virüslara karşı sistemik immün cevap oluşturup uzun dönem koruyucu etkinlik göstermektir.¹⁵² Aşılama ile yüksek riskli HPV genotiplerine karşı immünitenin uyarılması sağlanabilir. Böylece, yüksek riskli HPV tipleri ile enfeksiyonun önlenmesi sağlanmış olur. Bir diğer hedefi ise immünizasyon ile HPV ilişkili anogenital siğillerin önlenbilmesidir.¹⁵³

Aşı çalışmaları 1993 yılından günümüze kadar yapılmaktadır. HPV'nin kanser gelişimindeki etiyolojik faktörlerle ilişkilendirilmesi yönünde araştırmalar yapılmıştır. Lancet dergisinde 1996 yılında yayınlanan bir meta analizinde de HPV enfeksiyonuna karşı aşılanmanın servikal displazi ve karsinom insidansını, özellikle de gelişmekte olan ülkelerde azaltmada önemli olabileceği belirtilmiştir. İlk kez 1996 yılında ileri evre servikal karsinoma olan 8 hastada HPV aşısının faz I/II çalışması yapılmıştır. Tek doz aşılama yapılmış olup, üç hastada oluşan antikorlar aşılarmaya bağlanmıştır. Bu üç hastadan sadece birinde tedaviye yardımcı olan HPV'ye özgü sitotoksik T lenfosit bulunmuştur. Bu çalışmanın sonucunda servikal kanserin immünoterapisi için ileri çalışma yapılmasının gerekliliği bildirilmiştir.¹⁵⁴

Human papillomavirus aşılarının oluşturulmasında HPV'lerin sadece L1 proteininden faydalanılmaktadır. Aşılardaki en önemli özellik, virüs benzeri partiküllerin (VLP-virus like particles) içerisinde HPV

DNA'sının bulunmaması, dolayısıyla enfeksiyona neden olmadan immünojenik uyarım yapabilmektedir. İlk geliştirilen aşı HPV 16 VLP aşısı olup, popülasyon bazlı klinik çalışmalarda uzun süre kullanılmamıştır.⁹

Human papillomavirus aşıları profilaktik ve terapötik aşılar olmak üzere iki gruba ayrılmıştır.⁹ Profilaktik aşılar da amaç, HPV'ye karşı etkin bir immün cevap oluşturmak ve bu sayede oluşabilecek enfeksiyonu önlemektir.¹⁵⁵ Bu amaçla 2 aşı kullanıma girmiştir. Merk firmasının ürettiği kuadrivalan aşı olan Gardasil® (Merck & Co. Inc.; Whitehouse Station, NJ), HPV 6/11/16/18'in VLP'lerini içermektedir. VLP'ler maya hücrelerinde üretilir ve adjuvan olarak alüminyum hidrosifosfat sülfat içerir.¹⁵⁶ Bu aşı, 9–26 yaş arası 25.000'nin üzerinde genç kadında test edilmiş, Haziran 2006'da FDA tarafından onaylanmış ve kullanıma girmiştir.¹⁵⁷ Etkinliği HPV enfeksiyonlarını önlemede %95, servikal kansere sebep olan persistan enfeksiyonları önlemede %98,5'tir. İlk cinsel ilişkiden önce uygulanırsa etkinliği yüksektir ve genç yaşta aşılananlarda immün cevap daha belirgindir.¹⁵⁶ Diğer aşı, GlaxoSmithKline firması tarafından üretilen bivalan aşı olan Cervarix® (GlaxoSmithKline Biologicals; Rixensart, Belgium)'in, HPV 16/18'e karşı koruyuculuğu vardır. Bu aşı ise, 15–25 yaş arası 30.000'nin üzerinde kadında test edilmiş ve FDA onayı almıştır. Bivalan aşılar da ASO4 (3-deaşıllendirilmiş monofosforil lipid A) adjuvan sistemi kullanılması ile antikor titreleri arttırılmıştır. Bu mekanizma antijen sunan hücreleri etkileyerek ve B hücrelerin hafıza yanıtının süresini uzatarak gerçekleşmektedir.¹⁵⁷ Bu aşı HPV 16 ve 18 tipleri için koruyucudur. İlk HPV enfeksiyonunu önlemede %95, persistan enfeksiyonları önlemede %100 etkilidir. Koruyuculuğu en az 5 yıl devam eder.¹⁵⁶ Her iki aşı da; rekombinant aşı teknolojisi uygulanarak majör kapsül (L1) proteinlerinin saflaştırılması ile elde edilen tipe özgü virüs benzeri partikülleri (VPL) içerir. Aşıların ikisi de biyolojik ürünleri veya viral DNA'yı içermediklerinden enfeksiyöz değildirler.¹⁵⁸

Terapötik aşı ise daha önceden meydana gelmiş bir enfeksiyonun ortadan kaldırılması ve malign hastalığın gelişmesi yönünden koruyucu etki yaratmaktadır. Profilaktik aşılar nötralizan antikorlarla HPV enfeksiyonunu önlerken, terapötik aşılar virüs antijenlerine karşı güçlü sitotoksik T lenfosit ve T helper hücre yanıtı geliştirir. Terapötik aşıların yanıtı L1 ve L2 gibi kapsid antijenlerine karşı değil, E6 ve E7 gibi onkoproteinlere karşıdır. E6 ve E7 onkoproteinleri HLA-A2 MHC sınıf I molekülü ile ilişkili olarak işlenen ve sunulan epitoplara içermektedir.¹⁵⁹ Peptid-protein bazlı aşılar, dendritik hücre aşılama ları, DNA aşıları, viral vektörlerden HPV antijenleri elde ederek hazırlanan aşılar terapötik grupta üzerinde çalışmalar yapılan konulardır.¹⁶⁰

Gelecekte kullanıma girecek ve alternatif olacak birçok aşı günümüzde mevcuttur. Önemli olan bu aşılarda dünyanın tüm bölgelerinde kullanılması için fiyat olarak uygun olup olmadığıdır. Bunun için geliştirilen yeni aşılarda bakterilerde üretilmesi temel yaklaşımlardan biri olarak görülmektedir. Bu yeni geliştirilen yöntem, virüs-benzeri partikül üretimine değil sadece kapsomerin üretilmesine yöneliktir. Kapsomerler yüksek protein içeriğinden dolayı güçlü immünojenik cevap oluştururlar. Bundan dolayı virus-benzeri partikül üretimine dayalı aşılarda yerini alabileceği bildirilmektedir.¹⁶¹

Günümüzde piyasada bulunan her iki aşı da (bivalent ve quadrivalent) içerdiği HPV tipleri ile ilişkili premalign servikal lezyonların engellenmesinde başarılıdır. Ancak bu etkinin ne kadar sürdüğü ve üç doz aşı sonrası ek doza ihtiyaç olup olmadığı, ileriki yıllarda sonuçları açıklanacak olan çalışmalar ile aydınlanacaktır.¹⁶² Persistan HPV enfeksiyonunu takiben, invaziv serviks kanserinin ortaya çıkışı arasındaki sürenin uzun (>10 yıl)²⁸ bir dönemi kapsaması nedeniyle HPV aşılarda

serviks kanserini önlemedeki gerçek etkinliğini değerlendirmek, ancak aşının piyasaya çıkmasını takip eden ve dekatlarla ifade edilebilecek bir dönem sonra elde edilen kanser verilerinin ışığında mümkün olacaktır.¹⁶³

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Çalışma Grupları

Çalışmamıza, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum polikliniğine Ocak-Ekim 2010 tarihleri arasında başvuran ve kolposkopi önerilen 77 hastanın servikal sürüntü örnekleri ve Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı'ndan baş ve boyun kanseri tanısı alan 45 hastanın parafine gömülü doku örnekleri dâhil edilmiştir.

3.2. Servikal Örneklerin Toplanması

Kolposkopi sırasında hastalardan servikal hücre sürüntüsü alınıp, daha önce hazırlanıp steril edilen fosfat tamponlu tuzlu su (Phosphate Buffered Saline; PBS) içerisine konulmuştur. İçinde PBS bulunan steril kaplara alınan örnekler, bekletilmeden laboratuvarımıza getirilerek ependorf tüplere aktarılıp, çalışmalar yapılınca kadar -86°C' de saklanmıştır.

Her hastanın Pap smear testi sonuçları ve kolposkopi ile alınan biyopsi sonuçları kaydedilmiştir. Ayrıca her hastaya için yaş, eğitim, oral kontraseptif, rahim içi araç (RIA) ve sigara kullanımı gibi demografik ve epidemiyolojik faktörlerin yer aldığı bilgi formları doldurulmuştur.

3.3. Araç ve Gereçler

3.3.1. Laboratuvar araç ve gereçleri

- Derin dondurucu, -86 °C (Sanyo, Japonya)
- Derin dondurucu, -20 °C (Bosch, Almanya)
- Buzdolabı (Philco, Türkiye)
- Otoklav (Hirayama, Japonya)
- Laminar hava akımlı kabin (MetiSafe, Metis Biyoteknoloji, Türkiye)
- Real Time PCR cihazı (LightCycler (LC) 2.0, Roche, Almanya)
- Thermal cycler cihazı (MJ Reseach, ABD)
- Vorteks cihazı (VELP, Scientifica, Almanya)
- Mikrosantrifüj (Heraeus, Almanya)
- Hassas terazi (Shimadzu, Japonya)
- 10, 100, 1000 ml'lik mikropipetler (Gilson, Fransa)
- Mikropipet uçları (CLP, ABD)
- 0,2–0,5-1,5 µL'lik ependorf tüpler (Greiner Bio-One, Almanya)
- Kuru blok (Thermolyne, ABD)
- pH metre (Fisher Scientific, ABD)
- Çalkalayıcı (Elektro-mag, Türkiye)

3.3.2. Kullanılan kimyasal maddeler

- Distile su (Millipore, Fransa)
- % 99 Etanol (Kimetsan, Türkiye)
- Sodyum klorür (NaCl) (AppliChem, Almanya)
- Potasyum klorür (KCl) (Merck, Almanya)
- Disodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4) (Merck, Almanya)
- Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4) (Merck, Almanya)
- Sodyum asetat (Merck, Almanya)
- Taq DNA polimeraz (Heliosis[®], Metis Biyoteknoloji, Türkiye)
- Magnezyum klorür (MgCl_2)

·Primer dizileri: MY09/MY11 primer seti

MY 09: 5' - CGT CCA AGG GGA TAC TGA TC - 3'

MY 11: 5' - GCA CAG GGA CAT AAT AAT GG - 3'

- PCR dereceli H_2O (Roche, Almanya)
- SYBR Green I (Roche, Almanya)
- HPV 16 LC prob karışımı (Cy5.0 işaretli prob -0.2 μM), (Metis Biyoteknoloji, Türkiye)

Prob: 5'Cy5-GTT TCT GAA GTA GAT ATG GCA GCA CA-biotin 3'

- Real Time PCR primer karışımı (0,5 μM)

GP 5+ : 5' – TTT GTT ACT GTG GTA GAT ACT AC - 3'

GP 6+ : 5' – GAA AAA TAA ACT GTA AAT CAT AT – 3'

3.3.3. Hazırlanılarak kullanılan solüsyonlar

Fosfat tamponlu tuzlu su (Phosphate Buffered Saline; PBS)

Hastalardan alınan örnekleri saklamak için kullanıldı. Bir litre distile su içerisinde 8 gr NaCl; 0,2 gr KCl; 1,15 gr Na₂HPO₄; 0,2 gr KH₂PO₄ karıştırılarak çözüldükten sonra pH 7,4 olacak şekilde pH metre ile ayarlanıp, otoklavlanarak +4 °C'de dolapta saklandı.

3.4. Yöntem

3.4.1. Deparafinizasyon yöntemi

Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı'ndan alınan örnekler için öncelikle parafin bloklarda deparafinizasyon işlemi yapılmıştır.

Deparafinizasyon işlem basamakları;

1. Parafinli dokular üzerine 1 ml ksilen eklendi.
2. 30 dakika çalkalayıcıda karıştırıldı.
3. 2 dakika santrifüj yapıldı (7000–10000 rpm)
4. Santrifüj sonrası üste kalan kısım atıldı ve ilk üç basamak iki kere tekrarlandı.

5. Çökelti üzerine 1000 µl etanol eklenerek 3 dakika 10000 rpm'de santrifüj edildi.
6. Daha sonra etanol uzaklaştırıldı.
7. 50 µl aseton eklenerek 50°C'de ısıtıcıda kurutuldu.

3.4.2. DNA ekstraksiyon yöntemi

HPV DNA ekstraksiyonu için Heliosis® (Metis Biyoteknoloji, Türkiye) viral DNA ekstraksiyon modülü çalışma protokolü uygulanmıştır.

1. Örnekler kapakları açılmadan önce spin santrifüj edildi.
2. 400 µl DNA Lysis binding solution üzerine 100 µl serum/plazma eklenip, vortekslendi.
3. Karışım sırasıyla 65°C'de 10 dakika 95°C'de 10 dakika ve +4°C'de 3 dakika inkübe edildi.
4. Örnekler spin santrifüj edildikten sonra üzerine 500 µl DNA presipitasyon solüsyonu eklenip, vortekslendi.
5. 15 dakika 13.000 x rpm'de santrifüj edildi.
6. Üstte kalan kısım çökeltiye dokunulmadan pipetle tamamen alındı.
7. Örneklerin üzerine 500 µl DNA yıkama solüsyonu eklenip, vortekslendi.
8. 5 dakika 13.000 x rpm'de santrifüj edildi.
9. Üstte kalan kısım tamamen alınıp, 10 dakika oda sıcaklığında kurutuldu.
10. Örneklerin üzerine son olarak DNA sample diluter eklendi. Vortekslenip spin santrifüj edildi.

Ekstraksiyon örnekleri çalışma yapılncaya kadar -20°C'de saklandı.

3.4.3. Ekstraksiyon örneklerinin çoğaltılması

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) protokolü

Human papillomavirus tip 16'nın belirlenmesinde Real Time PCR protokolünden yararlanıldı.

	<u>1 örnek için</u>
Amplifikasyon karışımı	45 µl
Taq DNA polimeraz enzimi	0,2 µl

- ❖ Amplifikasyon karışımı tablodaki miktarlara göre hazırlandı, 20 sn vortekslendi ve spin santrifüj edildi.
- ❖ Amplifikasyon karışımı tüplere 45 µl dağıtıldı.
- ❖ Her PCR tüpünün üzerine çalışılacak DNA örneğinden 5 µl eklendi ve Termal cycler'a yerleştirildi.

Termal cycler programı:

<u>Derece</u>	<u>Süre</u>	<u>Siklus sayısı</u>
94°C	5 dk.	1
94°C	20 sn.	35
55°C	45 sn.	
72°C	60 sn.	
72°C	5 dk.	1

Ürünler hemen çalışılmadığı zamanlarda +4°C'de saklandı.

3.4.4. Real Time PCR uygulaması

Light Cycler (LC) cihazı reaksiyon protokolü

	<u>1 Örnek için</u>
dH ₂ O	4,6 µl
MgCl ₂	1,4 µl
HPV 16 LC primer karışımı	0,5 µl
HPV 16 LC probe karışımı	0,5 µl
<u>LC SYBR Green Master 10x kons.</u>	<u>1,0 µl</u>
	<u>Toplam miktar 8,0 µl</u>
<u>HPV 1. Tur ürünü</u>	<u>2,0 µl</u>
	Toplam miktar 10,0 µl

- ❖ Reaksiyon karışımı hazırlanırken, amplifikasyon karışımı, primer ve probe karışımları pipetajla karıştırılıp alındı.
- ❖ $MgCl_2$ eridikten sonra vortekslendi.
- ❖ Karışım hazırlandıktan sonra 8 μ l karışımdan kapiller tüplere dağıtıldı.
- ❖ En son 2 μ l PCR ürünü eklendi.
- ❖ 3000-5000 xrpm'de 10 saniye santrifüj edildi.

Light Cycler (LC) Cihazı Çalışma Protokolü

Deney protokolü 4 programdan oluşmaktadır.

Program 1. Denetürasyon

Program 2. Amplifikasyon

Program 3. Melting Curve analizi

Program 4. Cooling

Program 1. Denatürasyon

Siklus Program Verileri	Değer
Siklus	1
Analiz modu	Yok
Sıcaklık hedefleri	Segment 1
Hedeflenen sıcaklık (°C)	95
İnkübasyon süresi (Saat: dakika: saniye)	30
Sıcaklık geçiş oranı (°C/saniye)	20.0
İkinci hedeflenen sıcaklık (°C)	0
Adım boyutu (°C)	0.0
Adım gecikmesi (siklus)	0
Acquisition Mode	Yok

Program 2. Amplifikasyon

Siklus Program Verileri	Değer		
Siklus	45		
Analiz modu	Ölçüm		
Sıcaklık hedefleri	Segment 1	Segment 2	Segment 3
Hedeflenen sıcaklık (°C)	95	55	72
İnkübasyon süresi (Saat: dakika: saniye)	0	6	10
Sıcaklık geçiş oranı (°C/saniye)	20.0	20.0	20.0
İkinci hedeflenen sıcaklık (°C)	0	0	0
Adım boyutu (°C)	0.0	0.0	0.0
Adım gecikmesi (siklus)	0	0	0
Acquisition Mode	Yok	Yok	Tek

Program 3. Melting Curve Analiz

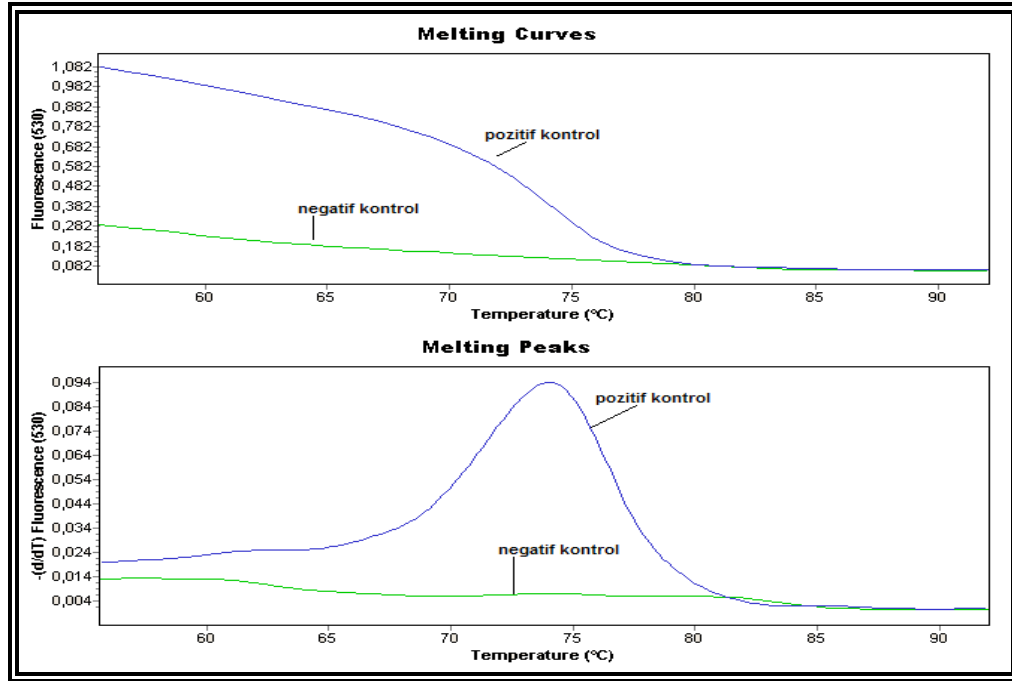
Siklus Program Verileri	Değer		
Siklus	1		
Analiz modu	Ölçüm		
Sıcaklık hedefleri	Segment 1	Segment 2	Segment 3
Hedeflenen sıcaklık (°C)	95	55	92
İnkübasyon süresi (Saat: dakika: saniye)	0	10	0
Sıcaklık geçiş oranı (°C/saniye)	20.0	20.0	0.2
İkinci hedeflenen sıcaklık (°C)	0	0	0
Adım boyutu (°C)	0.0	0.0	0.0
Adım gecikmesi (siklus)	0	0	0
Acquisition Mode	Yok	Yok	Kont.

Program 4. Cooling

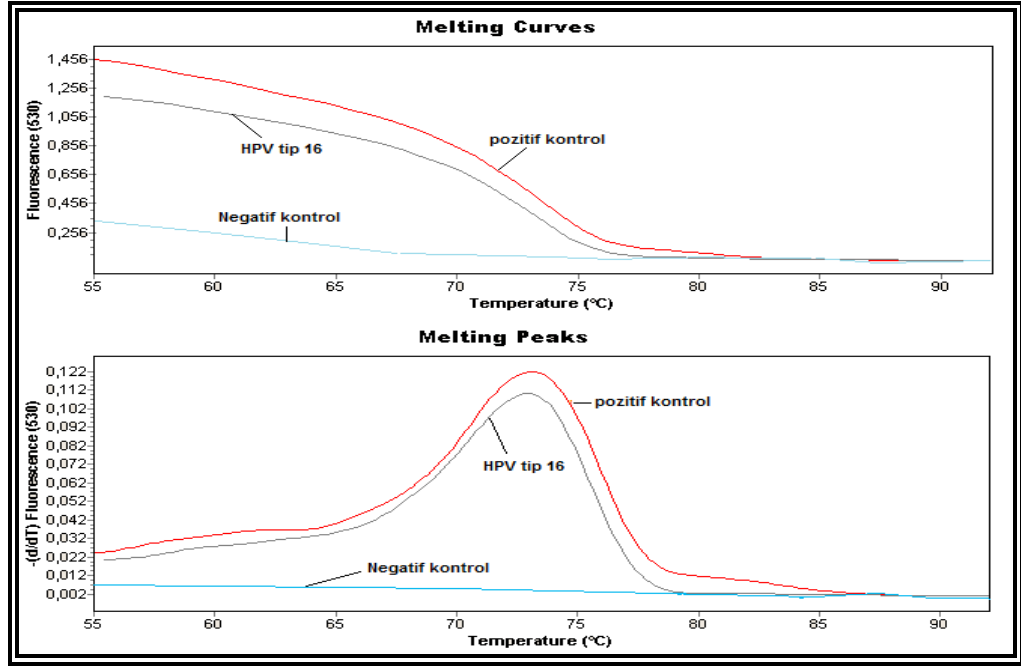
Siklus Program Verileri	Değer
Siklus	1
Analiz modu	Yok
Sıcaklık hedefleri	Segment 1
Hedeflenen sıcaklık (°C)	40
İnkübasyon süresi (Saat: dakika: saniye)	30
Sıcaklık geçiş oranı (°C/saniye)	20.0
İkinci hedeflenen sıcaklık (°C)	0
Adım boyutu (°C)	0.0
Adım gecikmesi (siklus)	0
Acquisition Mode	Yok

Sonuçların Değerlendirilmesi;

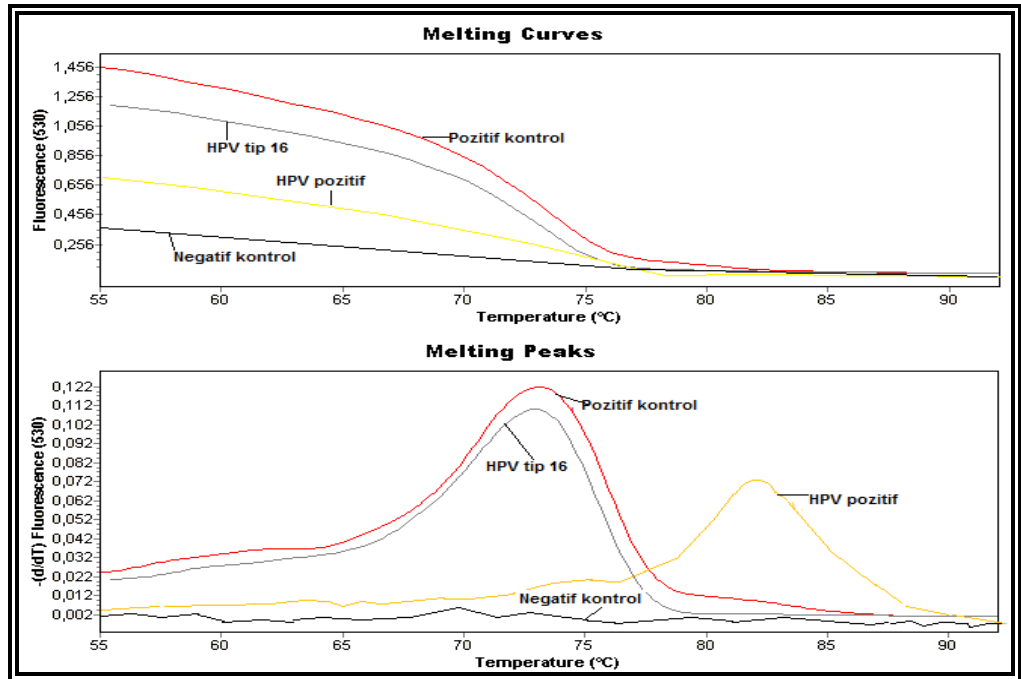
Human papillomavirus tip 16 için 69,5°C ve 78,5°C arası pikler, diğer HPV tipleri için de; $80 \pm 2^\circ\text{C}$ 'deki pikler değerlendirildi (Grafik 2, 3 ve 4).



Grafik 2. Pozitif ve negatif kontrolleri.



Grafik 3. HPV tip 16, pozitif ve negatif kontroller.



Grafik 4. HPV tip 16, HPV 16 dışındaki tipler, pozitif ve negatif kontroller.

3.4.5. HPV pozitif örneklerin elektroforezde gösterilmesi

Yapılan PCR işlemi sonucunda, oluşan amplifikasyon ürünleri %1'lik agaroz jelde yürütülerek, dizi analizi için en iyi bant oluşturan örneklerin seçimi yapıldı.

- Agaroz jelinin hazırlanması

5X depo TBE (Tris Borat EDTA) solüsyonunun hazırlanması:

54 g Tris -Base (Ambresco, ABD)

27,5 g Borik Asit (Merck, Almanya)

20 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0) (Sigma, Almanya)

Tüm maddeler erlenmayer içinde eritilerek distile su ile tüm hacim 1000 ml'ye tamamlandı. 5X TBE depo solüsyonu agaroz jelin hazırlanmasında ve yürütme tamponu olarak 1X'e çevrilerek kullanıldı.

Uygulama:

- 1- Jel ve yürütme tamponu hazırlamak için 100 ml 5X TBE depo solüsyonu 400 ml distile su içinde dilüe edilerek 1X TBE'ye çevrildi.

- 2- Hassas terazide (Schimadzu, Japonya) 1 g agaroz (AppliChem, Almanya) tartılarak erlenmayer içerisine konuldu.
- 3- Agaroz zerine 100 ml 1X TBE ilave edildi ve mikrodalga fırında en düşük sıcaklıkta agaroz tamamen çözülünceye kadar ısıtıldı.
- 4- Agaroz tamamen çözündükten sonra biraz soğuması beklendi, yaklaşık 50 C'de katılaşan agarozun katılaşmamasına dikkat edildi.
- 5- Agaroz jele, elektroforez tankının içindeki kalıba dökülmeden hemen önce renklendirici olarak 0,2 l DNA boyası etidyum bromid (5l/10ml AppliChem, Almanya) eklendi.
- 6- Kalıp içine taraklar yerleştirildikten sonra hazırlanan jel döküldü. Bu esnada oldukça yavaş ve dikkatli davranılarak jelde akım geçişini engelleyecek baloncuk oluşması nlendi.
- 7- Oda sıcaklığında 30 dakika bekletilerek jelin katılaşması sağlandı.
- 8- Donduktan sonra taraklar çıkartıldı ve jel elektroforez tankı (CS Cleaver Scientific Inc. Warwickshire, England) içine yerleştirildi.
- 9- Tankın içi jel yüzeyi kaplanana kadar 1X TBE tamponu ile dolduruldu.
- 10- Kuyucuklara rnek yüklemesi için yükleme tamponu Orange G (Metis, Canada) kullanıldı.
- 11- Düz bir zemin üzerine her örnek için 3 l yükleme tamponu dağıtıldı. Örneklerden 9 l alınarak yükleme tamponu ile pipetaj yapılarak karıştırıldı.
- 12- Her agaroz jel kuyucuğuna 9 l (yükleme tamponu+DNA) dağıtıldı.
- 13- İlk kuyucuğaa DNA parçalarının moleküler yüklerini tanımlamada yol gösterici olan marker (GeneRuler™100bp DNA Ladder Plus, LabAid™, Fermantas Inc, Ontario, Canada) yüklendi.
- 14- Güç kaynağı (LABNET International Power Station 300, Edison, England) alıştırılarak 20 mA, 90 V'de pozitifliğin araştırılmasında 20 dakika yürütüldü.

Agaroz jel tanktan çıkarılarak jel görüntüleme sisteminde (UVITEC Cambridge, England) UV ışığı altında bantların değerlendirilmesi yapıldı.

3.4.6. Pozitif bulunan HPV DNA örneklerinin dizi analizi

Real Time PCR ile HPV pozitif olarak belirlenen iki örnek ile HPV tip 16 ve tip 16 dışında HPV tipi taşıyan multiple HPV olarak belirlenen üç örneğin tip tayini yapıldı. HPV tiplerinin belirlenmesi, Big Dye Terminator Cycle Sequencing (Applied Biosystem, ABD) kiti ve GP5+/GP6+ primerleri kullanılarak, ABI Prism® 3130XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, ABD) cihazında yapıldı.

Dizi analizi yapılmadan önce PCR tüplerinde örneğe ait DNA ile birlikte bulunan diğer PCR elemanları uzaklaştırıldı.

1. Öncelikle örnekler, yüksek tuz konsantrasyonuna sahip silika içeren PCR temizleme solüsyonu ile yıkandı. Solüsyondan örnekler üzerine 90 µl eklenip, hafifçe karıştırıldıktan sonra 3000 rpm'de spin santrifüj edildi.

2. Santrifüj sonrası üstte kalan kısım tamamen uzaklaştırıldı. (Bu aşamada silika DNA ile bağlanıp pellet oluşturur).

3. Daha sonra %70'lik etanol ile karıştırılıp, 3000 rpm'de spin santrifüj edildi. Bu aşamada yüksek tuz konsantrasyonuna sahip solüsyon uzaklaştırıldı.

4. Santrifüj sonrası üstte kalan kısım tamamen uzaklaştırıldı.

5. Çökelti üzerine başlangıç hacmi kadar su eklenerek 3000 rpm'de spin santrifüj edildi. Böylece silikanın DNA'dan uzaklaştırılması sağlandı.

PCR protokolü;

	<u>Miktar</u>
Distile su;	24,8 µl
10X Buffer;	5,0 µl
Mg;	6,0 µl
dNTP;	5,0 µl
GP5+ Primer;	2,0 µl
GP6+ Primer;	2,0 µl
<u>Enzim;</u>	<u>0,2 µl</u>
Toplam hacim;	45,0 µl

Tüm PCR tüplerine eklenen DNAmiktarı; 5,0 µl

Daha sonra 94°C de 5 dakika süren ön denatürasyonu takiben aşağıda belirtilen döngülerden oluşan PCR işlemi uygulandı.

95°C de (denatürasyon)	20 saniye	} 40 siklus
54°C de (bağlanma)	45 saniye	
72°C de (uzama)	60 saniye	
Son elongasyon için 72°C de 5 dakika bekletildi.		

PCR ürünleri üzerine 10 µl su, 26 µl sodyum asetat- etanol (40 µl+1ml) eklenip karıştırıldıktan sonra 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Daha sonra 30 dakika 3000 rpm'de santrifüj edildi. Üstte kalan kısım atılıp, çökelti üzerine etanol eklenip 15 dakika 3000 rpm'de santrifüj edildi. Daha sonra üstte kalan kısım atılıp yerine formamid eklenerek çift iplikli DNA'nın tek ipliğe dönüşmesi sağlandı. Daha sonra ABI Prism® 3130XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, ABD) cihazına yerleştirilerek dizi analizi yapıldı.

Elde edilen diziler, GenBank (BLAST) veri tabanında yer alan diziler ile karşılaştırılarak HPV tipleri belirlendi.

3.4.7. Dizisi belirlenen HPV tiplerinin filogenetik analizi

Elde edilen diziler arasındaki genetik farklılık, Kimura'nın iki parametre yöntemi (K2P) ile hesaplanmıştır.¹⁶⁴ K2P yöntemi ile birbirine yakın olan diziler aynı grupta sınıflandırılmaktadır. Dizilerin birbiri ile yakınlıkları hesaplandıktan sonra MEGA 4.0.2 programı ile dizilere ait filogenetik ağaç oluşturulmuştur.

3.5. İstatistiksel Analiz

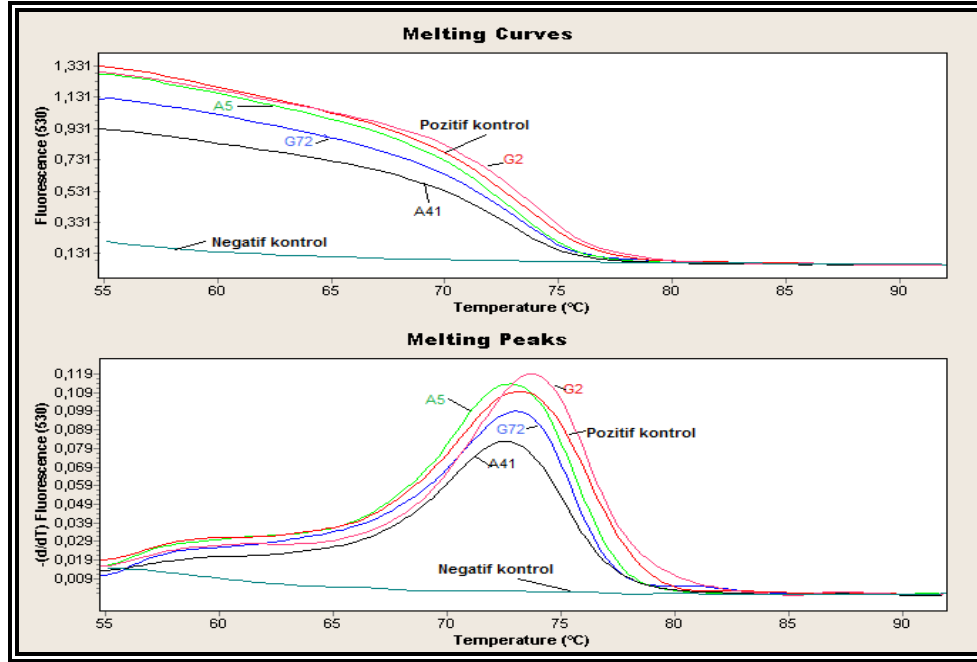
Veriler sayı ve yüzdelerle sunulmuştur. Gruplar arası HPV pozitifliği ve HPV tip 16 pozitifliği yönünden karşılaştırmalarda ki-kare testi kullanılmıştır. Ayrıca bazı tablolarda OR (%95 güven aralığı) hesaplanmıştır. İstatistiksel anlamlılık $p=0,05$ düzeyinde yorumlanmıştır.

4. BULGULAR

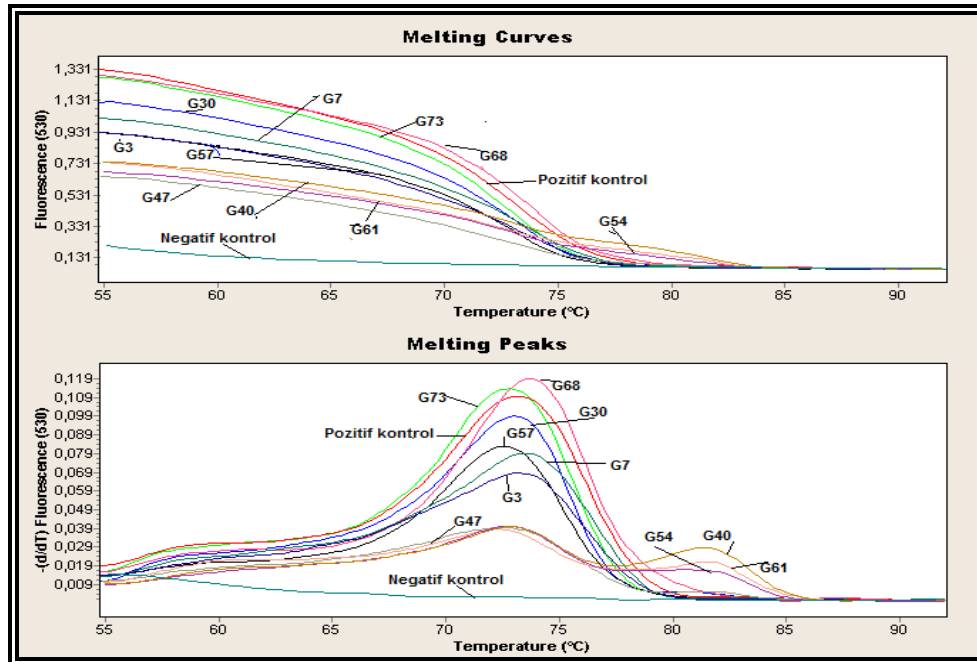
Bu çalışma, ülkemizdeki epidemiyolojik çalışmalara kaynak oluşturabilmek amacıyla, baş-boyun kanseri ve serviks hastalarında, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve DNA dizi analizi ile kesin tanı alan human papillomavirusun, bölgemizdeki prevalansının belirlenip, filogenetik analizlerinin yapılarak ülkemizdeki HPV tiplerinin filogenetik ağacının belirlenmesi şeklinde tasarlanmıştır.

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum polikliniğine başvuran ve kolposkopi önerilen 77 hastanın servikal sürüntü örnekleri ile Kulak Burun ve Boğaz polikliniğinde baş ve boyun kanseri tanısı alan 45 hastanın parafine gömülü doku örnekleri ile birlikte toplam 122 örnek çalışmaya dâhil edildi.

SYBR Green I, Cy5.0 işaretli HPV 16 LC prob karışımı ve GP5+/GP6+ primerleri kullanılarak Real time PCR yöntemi uygulandı. HPV tip 16'nın tespiti için Light Cycler (LC) cihazında 69,5°C ve 78,5°C arasında elde edilen pikler, diğer HPV tipler için ise 80±2°C pikler değerlendirildi (Grafik 5 ve 6).

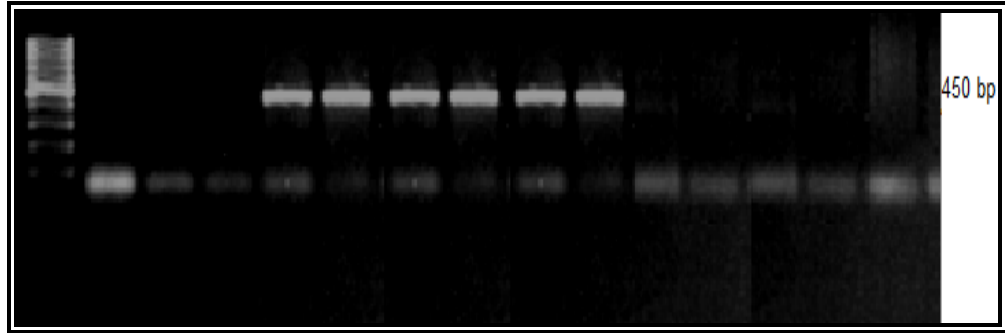


Grafik 5. HPV tip 16 olan örneklerin belirlenmesi.



Grafik 6. HPV tip 16 ve HPV 16 dışındaki diğer tiplerin belirlenmesi.

Real time PCR sonucunda, 77 serviks örneğinin 40 (%52)'i HPV tip 16 ve 7 (%9)'si HPV tip 16 ile birlikte diğer tipler de tespit edilmiştir. Böylece toplam 47 (%61) adet HPV DNA pozitifliği elde edilmiştir. 45 baş-boyun örneğinin ise 21 (%47)'i HPV tip 16 ve 4 (%9)'ü ise HPV tip 16 ile birlikte diğer tipler de belirlenmiştir. Baş- boyun hastalarında toplamda 25 (%56) adet HPV DNA pozitifliği saptanmıştır. PCR işlemi sonrasında multiple HPV ve HPV tip 16 dışındaki tipleri taşıyan bazı örnekler %1'lik agaroz jel elektroforezine yüklenerek görüntülendi ve en iyi parlaklığı sahip HPV örnekleri DNA dizi analizinde kullanılmak üzere ayrıldı (Resim 2).

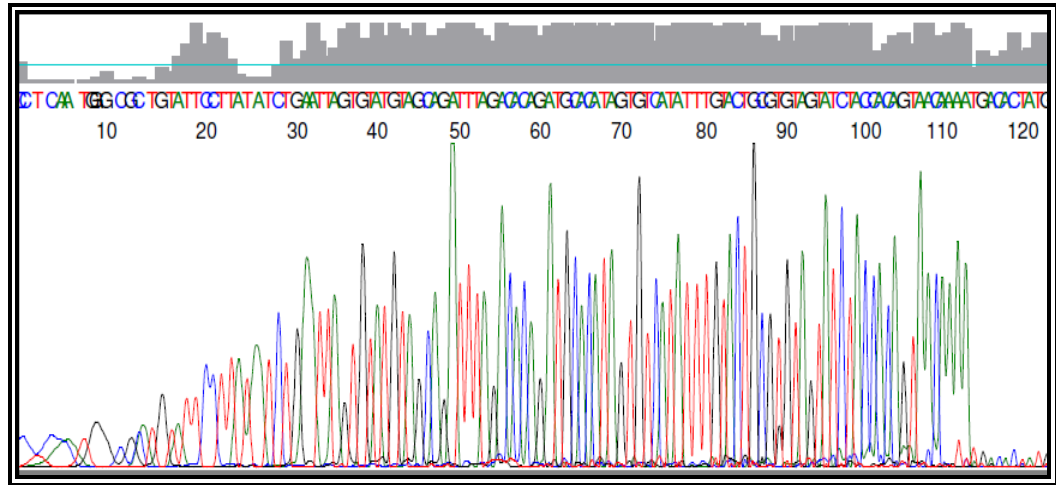


Resim 2. Agaroz jel görüntüsü.

Real time PCR'da HPV tip 16 dışında diğer tiplerin de varolduğu tespit edilen 5 serviks ve 1 baş-boyun kanseri örneğine DNA dizi analizi uygulandı. Bu örneklerden serviks örneği olan GA-22, GA-25, GA-69 ve GA-77'de tipler gözlenirken 1 serviks örneği ile 1 baş-boyun kanseri örneğinin tipi belirlenememiştir. DNA dizi analizi sonucunda bu örneklerden GA-22, GA-25, GA-77'de HPV tip 16 dışında HPV tip 11 de var olduğu belirlendi. GA-69 olarak adlandırılan örnekte ise HPV tip 16 dışında HPV tip 6 da gözlemlendi (Tablo 3). Grafik 7'de HPV tip 11'i içeren örneklerden birinin dizisi görülmektedir.

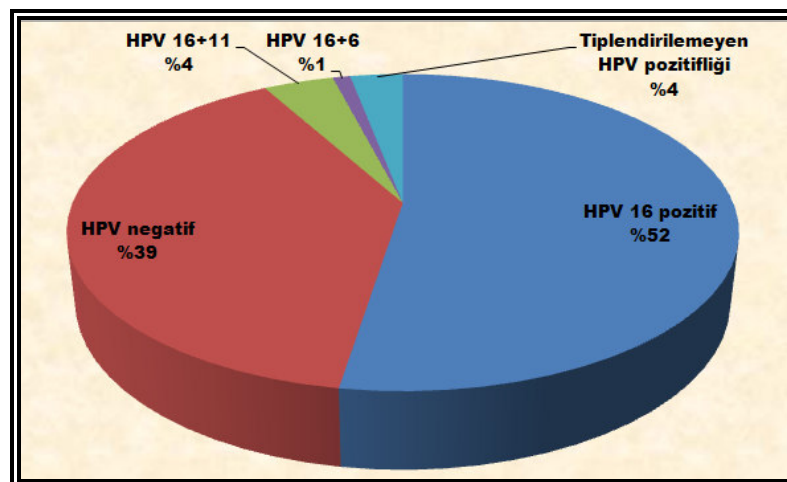
Tablo 3. Dizi analizi sonucunda elde edilen diziler.

Ornek	GA-22
Dizisi	AAA AAA AAA TTT TAT CTG CAT AAT ATG ACA CTA TGT GCA TCT GTG TCT AAT CTG CTA CAT ACA CTA ATT CAG ATT ATA AGG AAT ACA TGC GCC ATG TGG AGG AAT ATG ATT TAC AGT TTA TTT TTC A
HPV tipi	HPV tip 11
Ornek	GA-25
Dizisi	GAA AAA CAA CTC TGA TTG CGT CAA TAT GAC ACT ATG TGC ATC TGT GTC TAA TCT GCT ACA TAC ACT AAT TCA GAT TAT AAG GAA TAC ATG CGC CAT GTG GAG GAA TAT GAT TTA CAG TTT ATT TTT CA
HPV tipi	HPV tip 11
Ornek	GA-69
Dizisi	CGG GAT GCG ATC ACA GGA CTG ATG GGG ATC CGT GTG CGC ACT CTG CTA CAT ACT CTT ATT CTG ATT ATT TTG AAT ACA TGC TCC AAG ATG GAG AGG ATG ATT ATT TAT TTA TTT TTC ATC AGC CGT GTC TTG ATA CTC TTT AAA TTC CCT TTT AGG TTG GTG GTG GTT GCC AAA AAT TTT TGT ACG GG
HPV tipi	HPV tip 6
Ornek	GA-77
Dizisi	AAA AAA ACC TAA TGC GAT CAA TAT GAC ACT ATG TGC ATC TGT GTC TAA ATC TGC TAC ATA CAC TAA TTC AGA TTA TAA GGA ATA CAT GCG CCA TGT GGA GGA ATA TGA TTT ACA GTT TAT TTT TCA
HPV tipi	HPV tip 11

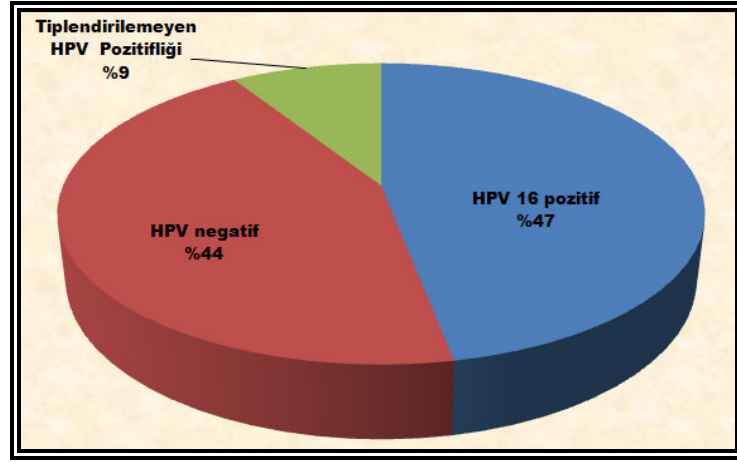


Grafik 7. HPV tip 11 dizisinin genetik analiz cihazında elde edilen kromotogramı.

Sonuçta, serviks örneği alınan bireylerin %52'sinde HPV tip 16, %4'ünde HPV tip 16+11, %1'inde HPV tip 16+6 ve %4'ünde tiplendirilemeyen HPV DNA tespit edildi (Grafik 8). Baş-boyun kanseri hastalarında ise %47 oranında HPV tip 16 ve %9 oranında tiplendirilemeyen HPV DNA'sı belirlenmiştir (Grafik 9).

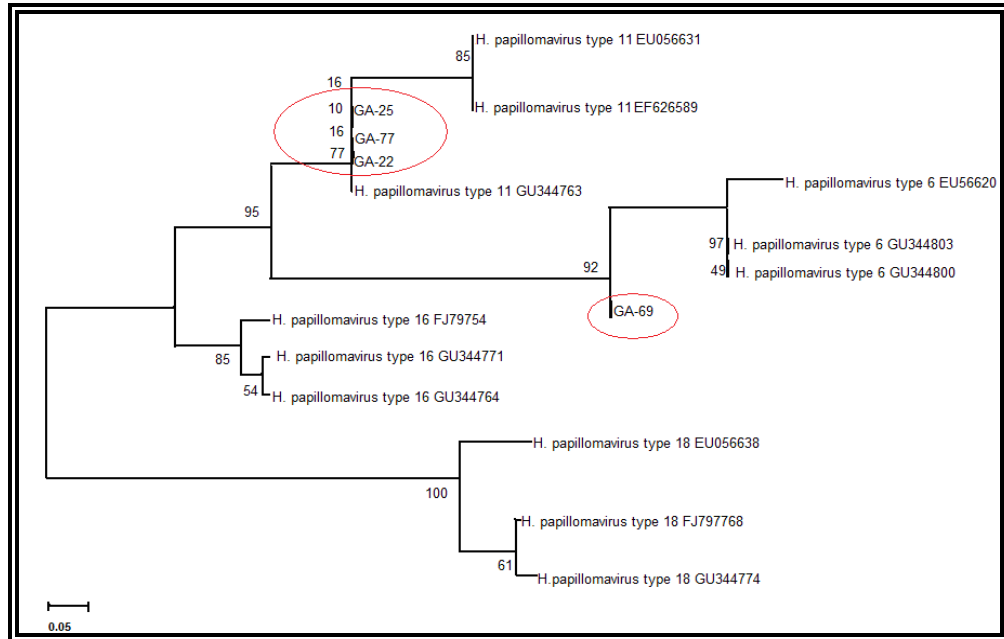


Grafik 8. Servikal örneklerde Real Time PCR sonuçları.



Grafik 9. Baş-boyun örneklerinde Real Time PCR sonuçları.

Elde edilen dizilerin Kimura (K2P)'nin yöntemi ile filogenetik analizi yapılmıştır.¹⁶⁴ Analiz sonucunda MEGA 4.0.2 programı ile filogenetik ağaç oluşturulmuştur (Grafik 10).



Grafik 10. HPV'nin filogenetik ağacı.

Kolposkopi sırasında servikal sürüntü örneği alınan hastalara ait yaş, eğitim durumu, çocuk sayısı, gebelik sayısı, sigara, oral kontraseptif ve rahim içi araç (RIA) kullanımı gibi demografik bilgiler Tablo 4’de yer almaktadır.

Tablo 4. Serviks örneği alınan hastaların demografik bilgileri.

	Sayı (n:77)	Yüzde (%)		Sayı (n:77)	Yüzde (%)
Yaş Grupları			Çocuk sayısı		
21-30	6	%7,8	0	11	%14,4
31-40	25	%32,5	2	14	%18,2
41-50	23	%29,8	2-4	28	%36,2
51-60	18	%23,4	4 ve üzeri	24	%31,2
61 ve üzeri	5	%6,5			
Eğitim durumu			Gebelik sayısı		
İlköğretim mezunu	21	%27,0	0	5	%6,5
olmayan			2	16	%21,0
İlköğretim	34	%44,0	2-4	25	%32,5
Lise	12	%16,0	4 ve üzeri	31	%40,0
Üniversite	10	%13,0			
Sigara kullanımı			RIA kullanımı		
Evet	25	%32,5	Evet	13	%17,0
Hayır	52	%67,5	Hayır	64	%83,0
OKS kullanımı					
Evet	5	%6,5			
Hayır	72	%93,5			

Hastaların sigara ve OKS kullanımına göre, HPV pozitifliği yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0,05$). Ancak RIA kullanımına göre HPV pozitifliğine bakıldığında RIA kullananlarda 1,60 kat daha fazla HPV pozitifliği görülmektedir. Fakat bu durum istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0,05$) (Tablo 5).

Tablo 5. Serviks örneği alınan hastaların sigara, OKS ve RIA kullanımı ile HPV pozitifliği.

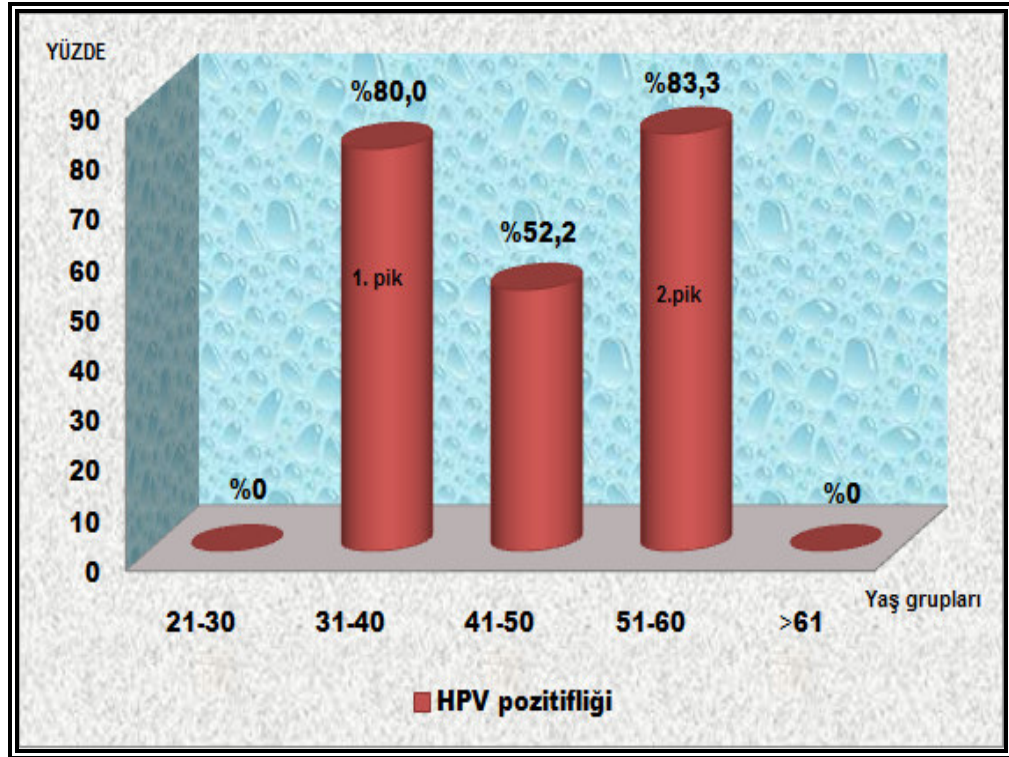
	HPV pozitif (n:47)	Yüzde (%)	HPV negatif (n:30)	Yüzde (%)
Sigara kullanımı				
Evet (n:25)	15	%60,0	10	%40,0
Hayır (n:52)	32	%61,5	20	%38,5
ki-kare:0,23 ^a	p= 0,6306		OR:0,79 (0,27-2,28) ^p	
OKS kullanımı				
Evet (n:5)	2	%40,0	3	%60,0
Hayır (72)	45	%62,5	27	%37,5
ki-kare:0,31 ^a	p= 0,5882		OR:0,60 (0,06-4,78) ^p	
RIA kullanımı				
Evet (n:13)	8	%61,5	5	%38,5
Hayır (n:64)	39	%61,0	25	%39,0
ki-kare:0,58 ^a	p= 0,4477		OR:1,60 (0,41-6,41) ^p	

a: Hastaların sigara, OKS ve RIA kullanımı ile HPV pozitifliği arasındaki ilişki ki-kare yöntemi ile belirlenmiştir.

b: Sigara, OKS ve RIA kullanımının HPV pozitifliğine etkisi OR ile analiz edilmiştir.

Değerlendirilmeye alınan hastaların 6 (%7,8)'ı 21–30 yaşları arası, 25 (%32,5)'i 31-40 yaşları arası, 23 (%29,8)'ü 41–50 yaşları arası, 18 (%23,4)'i 51–60 yaşları arası ve 5 (%6,5)'i 61 yaş ve üzeri olan yaş grubunda yer almaktadır. Çalışmaya katılan popülasyonun yaşları

ortalama 45 ± 24 olup, HPV pozitif bulunan bireylerin yaşları 34–56 arasındadır. HPV DNA pozitifliği tespit edilen kadınların hepsi 30 yaşın üstündedir. En fazla HPV DNA pozitifliği %80,0 oranı ile 31–40 yaşları arasında belirlenmiştir. HPV pozitifliğinin 41–50 yaşları arasında %52,2'e düştüğü, ancak 51–60 yaşları arasında tekrar %83,3'e yükselerek ikinci bir pik yaptığı tespit edilmiştir (Grafik 11).



Grafik 11. Serviks örneği alınan hastaların yaş gruplarına göre HPV pozitifliği.

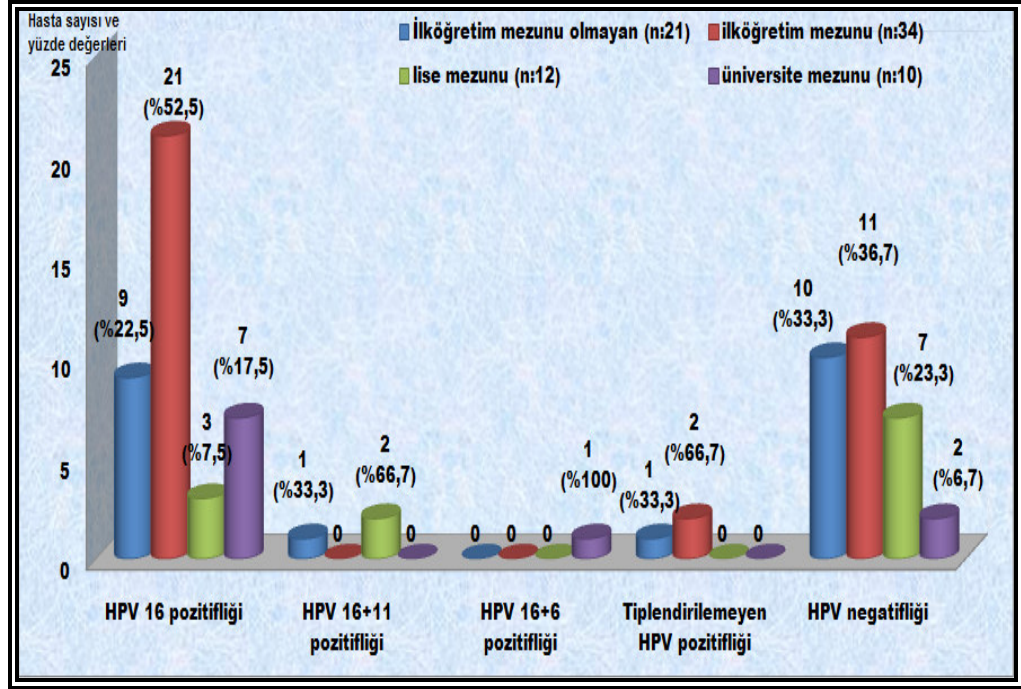
Yaş gruplarına göre HPV pozitifliği yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır ($p < 0,05$). Oluşan fark, 21–30 ile 61 ve üzeri yaş gruplarda HPV pozitif hasta bulunmamasından kaynaklanmaktadır (Tablo 6).

Tablo 6. Serviks örneği alınan hastaların yaş gruplarına göre HPV pozitifliği.

Yaş Grupları	HPV pozitif (n:47)	Yüzde (%)	HPV negatif (n:30)	Yüzde (%)
21-30 (n:6)	0	%0,0	6	%100
31-40 (n:25)	20	%80,0	5	%20,0
41-50 (n:23)	12	%52,2	11	%47,8
51-60 (n:18)	15	%83,3	3	%16,7
61 ve üzeri (n:5)	0	%0,0	5	%100
		ki-kare:18,14 ^a	p= 0,0011	

a: Hastaların yaş grupları ile HPV pozitifliği arasındaki ilişki ki-kare yöntemi ile belirlenmiştir.

Hastaların eğitim durumları incelendiğinde, 77 serviks örneği alınan hastanın 21 (%27,3)'inin ilköğretim mezunu olmadığı, 34 (%44,2)'ünün ilköğretim, 12 (%15,5)'sinin lise ve 10 (%13,0)'unun da üniversite mezunu olduğu gözlenmiştir. Bu hastaların eğitim durumları ile HPV pozitifliği arasındaki ilişkiyi değerlendirdiğimizde, ilköğretim mezunu olmayanların 9 (%22,5)'u, ilköğretim mezunu olanların 21 (%52,5)'i, lise mezunu olanların 3 (%7,5)'ü ve üniversite mezunu olanların 7 (%17,5)'sinin HPV tip 16 taşıdığı belirlenmiştir. Ayrıca ilköğretim mezunu olmayan 1 kişide HPV tip 11, ilköğretim mezunu olan 2 kişide tiplendirilemeyen HPV DNA'sı, lise mezunu olan 2 kişide HPV tip 11 ve üniversite mezunu olan 1 kişide HPV tip 6 varlığı gösterilmiştir (Grafik 12).



Grafik 12. Serviks örneği alınan hastaların eğitim durumlarına göre HPV tiplerinin sayısal ve yüzde dağılımı.

Eğitim durumlarına göre HPV pozitifliği yönünden istatistiksel olarak fark saptanmıştır ($p>0,05$). Bu fark ilköğretim mezunlarının yer aldığı gruptaki birey sayısının diğer gruplara oranla daha fazla olmasından kaynaklanmaktadır (Tablo 7).

Tablo 7. Serviks örneği alınan hastaların eğitim durumlarına göre HPV pozitifliği.

Eğitim durumu	HPV pozitifliği (n:47)	Yüzde (%)	HPV negatifliği (n:30)	Yüzde (%)
İlköğretim mezunu olmayan (n:21)	11	%52,4	10	%47,6
İlköğretim mezunu olan (n:34)	23	%67,6	11	%32,4
Lise mezunu olan (n:12)	5	%41,6	7	%58,4
Üniversite mezunu olan (n:10)	8	%80,0	2	%20,0
ki-kare:6,80 ^a		p= 0,784		

a: Hastaların eğitim durumu ile HPV pozitifliği arasındaki ilişki ki-kare yöntemi ile belirlenmiştir.

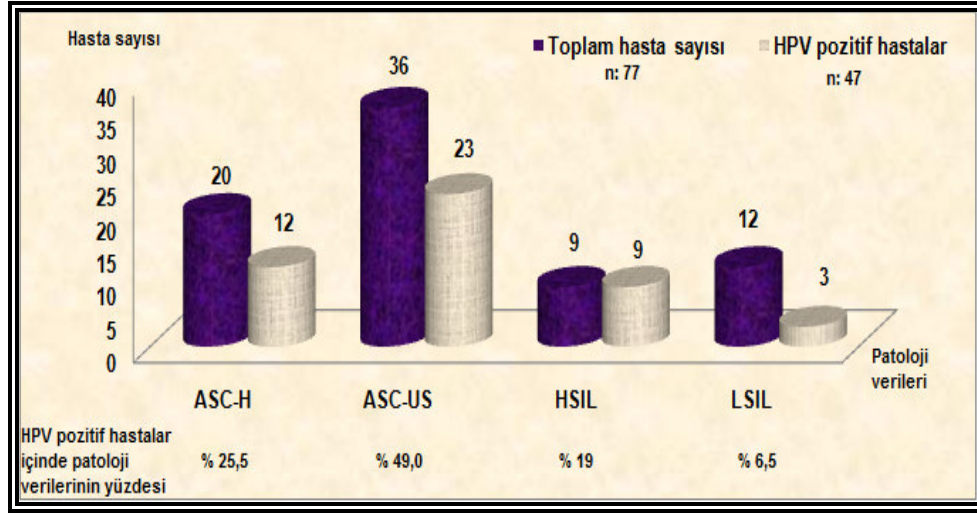
Serviks örneği alınan hastalarda çocuk ve gebelik sayılarına göre HPV pozitifliği incelendiğinde; hem çocuk sayısı hem de gebelik sayısında artışla birlikte HPV pozitiflik oranında bir yükselme tespit edilmiştir. Özellikle çocuk sayısı (canlı doğum sayısı) 2–4 arasında olanlarda %71,4 oranında; gebelik sayısında da yine 2–4 arasında olanlarda %68,0; 4’den fazla gebelik durumu olanlarda %64,5 oranında bir pozitiflik elde edilmiştir. Çocuk ve gebelik sayısına göre HPV pozitifliği yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0,05$) (Tablo 8).

Tablo 8. Serviks örneği alınan hastalarda çocuk ve gebelik sayılarına göre HPV pozitifliği.

	HPV pozitifliği (n:47)	Yüzde (%)	HPV negatifliği (n:30)	Yüzde (%)
Çocuk sayısı				
0 (n:11)	4	%36,4	7	%63,6
2 (n:14)	7	%50,0	7	%50,0
2-4 (n:28)	20	%71,4	8	%28,6
4 ve üzeri (n:24)	16	%66,7	8	%33,7
ki-kare:4,30 ^a		p= 0,2305		
Gebelik sayısı				
0 (n:5)	1	%20,0	4	%80,0
2 (n:16)	9	%56,2	7	%43,8
2-4 (n:25)	17	%68,0	8	%32,0
4 ve üzeri (n:31)	20	%64,5	11	%35,5
ki-kare:3,23 ^a		p= 0,3577		

a: Hastaların sigara, çocuk sayısı ve gebelik durumu ile HPV pozitifliği arasındaki ilişki ki-kare yöntemi ile belirlenmiştir.

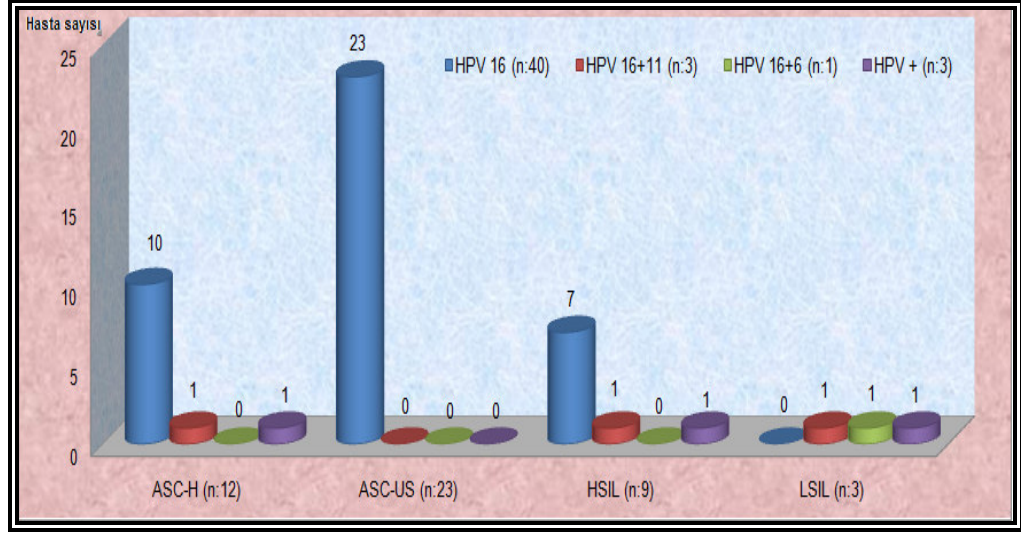
Çalışmamızda, kolposkopi uygulanan hastaların patoloji değerleri de incelenmiştir. 20 ASC-H olgusunun 12 (%60,0)'sinde; 36 ASC-US olgusunun 23 (%63,8)'ünde; 9 HSIL olgusunun 9 (%100)'unda ve 12 LSIL olgusunun 3 (%25,0)'ünde HPV DNA pozitif olarak belirlenmiştir. Tüm HPV pozitif olan hastalar üzerinden değerlendirildiğinde 47(%100) hastanın 12 (%25,5)'si ASC-H; 23 (%49,0)'ü ASC-US; 9 (%19,0)'u HSIL; 3 (6,5)'i LSIL tanısı almıştır (Grafik 13).



Grafik 13. Serviks örneği alınan hastaların patoloji verilerine göre HPV pozitifliği.

Hastaların patoloji verileri ile HPV tipleri birlikte değerlendirildiğinde;

- 12 ASC-H olgusunun 10'u HPV tip 16, 1'i HPV tip 16/tip 11 ve 1'i HPV pozitif;
- 23 ASC-US olgusunun 23'ü HPV tip 16 pozitif;
- 9 HSIL olgusunun 7'si HPV tip 16, 1'i HPV tip 16/tip 11 ve 1'i HPV pozitif;
- 3 LSIL olgusunun 1'i HPV tip 16/tip 11, 1'i HPV tip 16/tip 6 ve 1'i HPV pozitif olarak tespit edilmiştir (Grafik 14).



Grafik 14. Serviks örneği alınan hastaların patoloji verilerine göre HPV tiplerinin pozitifliği.

Patolojik verilerine göre HPV pozitifliği yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark vardır ($p < 0,05$). Bu fark HSIL olgularını içeren grubun tamamının HPV pozitif olmasından kaynaklanmaktadır (Tablo 9).

Tablo 9. Serviks örneği alınan hastaların patoloji verilerine HPV pozitifliği.

Patoloji verileri	HPV pozitifliği (n:47)	Yüzde (%)	HPV negatifliği (n:30)	Yüzde (%)
ASC-H (n:20)	12	%60,0	8	%40,0
ASC-US (n:36)	23	%63,8	13	%36,2
HSIL (n:9)	9	%100	0	%0
LSIL (n:12)	3	%25,0	9	%75,0
ki-kare=12,43 ^a		p=0,0060		

a: Hastaların patoloji verileri ile HPV pozitifliği arasındaki ilişki ki-kare yöntemi ile belirlenmiştir.

Çalışmaya dâhil edilen Kulak Burun Boğaz polikliniği hastalarının ise yaş, medeni hal, eğitim durumu ve sigara kullanımı gibi demografik bilgileri kaydedilmiştir (Tablo 10).

Tablo 10. Baş- boyun kanseri hastalarının demografik bilgileri.

	Sayı (n:45)	Yüzde (%)		Sayı (n:45)	Yüzde (%)
Yaş Grupları			Tümör lokalizasyonu		
21-30	2	%4,5	Glottik	24	%53,4
31-40	9	%11,2	Supraglottik	16	%35,5
41-50	16	%35,5	Transglottik	5	%11,1
51-60	14	%33,3	İnfraglottik	0	-
61 ve üzeri	4	%15,5			
T derecesi			Lenf Nodu Metastazı		
T1	4	%8,8	No	29	%64,5
T2	21	%46,6	N1	12	%26,6
T3	14	%31,3	N2	4	%8,9
T4	6	%13,3			
Sigara kullanımı					
Evet	39	%95,5			
Hayır	6	%4,5			

Değerlendirmeye alınan hastaların 38 (%85)'i erkek, 7 (%15)'si kadındır. Erkek hastaların 25/38 (%65,8)'inde HPV pozitifliği saptanmıştır (Tablo 11).

Tablo 11. Baş-boyun kanseri hastalarının cinsiyetine göre HPV pozitifliği.

Cinsiyet	HPV pozitifliği (n:25)	Yüzde (%)	HPV negatifliği (n:20)	Yüzde (%)
Kadın (n:7)	0	%0	7	%100
Erkek (n:38)	25	%65,8	13	%34,2

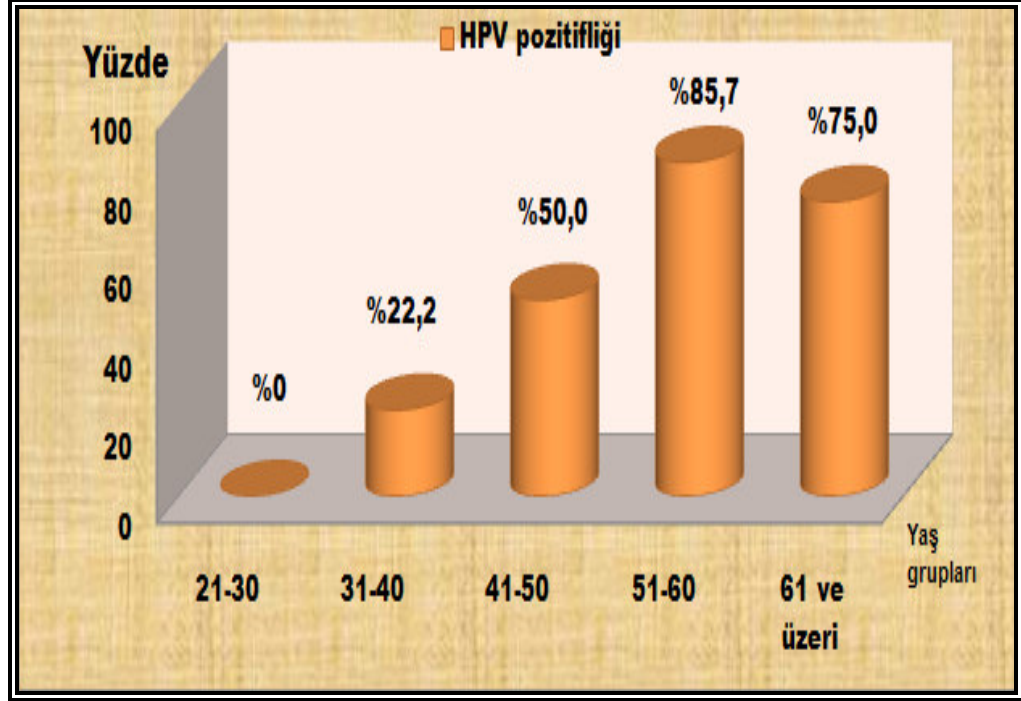
Baş-boyun kanseri tespit edilen hastaların 39 (%86,7)'u sigara kullanmakta olup, bunlarında 22 (%56,4)'sinde HPV pozitifliği saptanmıştır. Sigara kullanmayan 6 (%13,3) hastanın ise 3 (%50,0)'ünde HPV pozitifliği belirlenmiştir (Tablo 12).

Tablo 12. Baş-boyun kanseri hastalarının sigara kullanımına göre HPV pozitifliği.

Sigara kullanımı	HPV pozitifliği (n:25)	Yüzde (%)	HPV negatifliği (n:20)	Yüzde (%)
Sigara kullanan (n:39)	22	%56,4	17	%43,6
Sigara kullanmayan (n:6)	3	%50,0	3	%50,0

Çalışmaya dâhil edilen hastaların, 2 (%4,5)'si 21–30 yaş arası, 9 (%20,0)'u 31- 40 yaş arası, 16 (%35,5)'si 41–50 yaş arası, 14 (%31,2)'ü 51–60 yaş arası ve 4 (%8,8)'ü 61 yaş ve üzerindedir. Çalışmaya katılan popülasyonun yaşları ortalama 46±24 arasında olup, HPV pozitif bulunan bireylerin yaşları ise 36–58 yaş arasında yer almaktadır. HPV pozitif olan hastaların hepsi 30 yaşın üstündedir. En fazla HPV DNA pozitiflik %85,7 oranı ile 51–60 yaşları arasında tespit edilmiştir. HPV pozitifliğinin 31–40 yaşları arasında %22,2 olup, 41–50 yaşları arasında

yükselerek %50,0'ye, 61 yaş ve üzerinde ise %75,0'e ulaştığı belirlenmiştir (Grafik 16).



Grafik 16. Baş- boyun kanseri hastalarının yaş dağılımına göre HPV pozitifliği.

Yaş gruplarına göre HPV pozitifliği yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır ($p<0,05$). Bu fark 21–30 ve 31–40 yaş gruplarından kaynaklanmaktadır. Bu yaş gruplarında HPV pozitiflik yüzdeleri düşüktür (Tablo 13).

Tablo 13. Baş- boyun kanseri hastalarının yaş dağılımına göre HPV pozitifliği.

Yaş Grupları	HPV pozitif (n:25)	Yüzde (%)	HPV negatif (n:20)	Yüzde (%)
21-30 (n:2)	0	%0	2	%100
31-40 (n:9)	2	%22,2	7	%77,8
41-50 (n:16)	8	%50,0	8	%50,0
51-60 (n:14)	12	%85,7	2	%14,3
61 ve üzeri (n:4)	3	%75,0	1	%25,0
		ki-kare: 12,52 ^a	p=0,0138	

a: Hastaların yaş grupları ile HPV pozitifliği arasındaki ilişki ki-kare yöntemi ile belirlenmiştir.

Baş-boyun kanseri hastalarında tümörlerin 24 (%53,4)'ü glottik, 16 (%35,5)'sı supraglottik 5 (%11,1)'i transglottik yerleşimli olarak bulunmaktaydı. T1; 4 (%8,8), olgu T2; 21(%46,6) olgu, T3; 14 (%31,2) olgu, T4; 6 (%13,4) olguda tespit edilmiştir. Lenf nodu metastazı olan 16 (%35,5) hastada saptandı, bunların da 12 (%75,0) tanesi N1 ve 4 (%25,0) tanesi N2'dir. Toplam 29 (%64,5) hastada ise lenf noduna rastlanmamıştır (N0=29) (Tablo 14).

Tümör lokalizasyonlarına göre HPV pozitifliği yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark vardır ($p<0,05$). Tüm lokalizasyon tiplerinde HPV pozitifliği yüzdesi birbirinden farklıdır (Tablo 16). Glottik yerleşimlilerin %75,0'inde; supraglottik yerleşimlilerin ise %43,0'ünde HPV pozitifliği belirlenmiştir.

HPV pozitifliği açısından değerlendirildiğinde, T4 olgularının % 16,7'sinde; T3 olgularının %57,2'sinde ve T2 olgularının ise

%76,2'sinde pozitiflik saptanmıştır. T derecesine göre HPV pozitifliği yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark vardır ($p<0,05$). Fark bu gruplardaki T1 ve T4 gruplarında HPV pozitifliği düşük olmasından kaynaklanmaktadır (Tablo 14).

Hastalarda belirlenen lenf nodu metastazı incelendiğinde HPV pozitifliği N1'de %50,0; N2'de %25,0 iken N0'da %62,0 olarak belirlenmiştir. Lenf nodu metastazına göre HPV pozitifliği yönünden istatistiksel olarak fark saptanmamıştır ($p>0,05$) (Tablo 14).

Tablo 14. Baş-boyun kanseri hastalarında tümör lokalizasyonu, T derecesi ve lenf nodu metastazına göre HPV pozitifliği.

	HPV pozitifliği (n:25)	Yüzde (%)	HPV negatifliği (n:20)	Yüzde (%)
Tümör lokalizasyonu				
Glottik (n:24)	18	%75,0	6	%25,0
Supraglottik (n:16)	7	%43,7	9	%56,3
Transglottik (n:5)	0	0	5	%100
İnfraglottik (n:0)	0	0	0	0
ki-kare: 10,83 ^a			p=0,0044	
T fazı				
T1 (n:4)	0	0	4	%100
T2 (n:21)	16	%76,2	5	%23,8
T3 (n:14)	8	%57,2	6	%42,8
T4 (n:6)	1	%16,7	5	%83,3
ki-kare: 12,31 ^a			p=0,0063	
Lenf Nodu Metastazı				
No (n:29)	18	%62,0	11	%38,0
N1 (n:12)	6	%50,0	6	%50,0
N2 (n:4)	1	%25,0	3	%75,0
ki-kare: 2,16 ^a			p=0,3394	

a: Hastaların tümör lokalizasyonu, T derecesi ve lenf nodu metastazı ile HPV pozitifliği arasındaki ilişki ki-kare yöntemi ile belirlenmiştir.

5. TARTIşMA

Human papillomavirus (HPV), cinsel yolla bulaşan, seksüel olarak aktif yetişkinlerde ve adölesanlarda görölen en yaygın enfeksiyonlardan biridir.^{130,165} HPV'ler, insanlarda primer olarak skuamöz epiteli enfekte eder, deri ve mukozada çeşitli lezyonlar oluşturur. Başta genital bölge olmak üzere, anal bölge, vulva, penil, oral ve laringeal bölgelerde de görölmektedir.⁹⁵

Human papillomaviruslar, bulunduğu mukozal ve epitelyal bölgelerde kansere yol açma potansiyeli taşırlar. En sık görölen kanserler arasında yer alan serviks kanserinin de başlıca sorumlu ajanı olarak HPV'ler gösterilmektedir. Serviks kanseri dışında laringeal kanserlerin de bir bölümünden yine HPV'ler sorumlu tutulmaktadır.⁷⁰

Özellikle gelişmiş ölkelerde, cinsel yönden aktif kadın ve erkeklerin %50'sinden fazlasının, yaşamlarının bir döneminde HPV ile enfekte olduğu tahmin edilmektedir. HPV ile enfekte olan kadınların %90'ında, enfeksiyon sıklıkla kendini sınırlar. Buna karşın geriye kalan %10'luk dilimde yer alan enfekte kadınların skuamöz epitelinde yıllar içinde devam eden değışimler sonucunda prekanseröz veya kanseröz lezyonlar geliştirir.¹⁶⁵

Human papillomavirus ile ilgili ülkemizde yapılan çalışmalarda, farklı HPV pozitiflikleri görülmektedir.¹⁶⁶ Bu durum araştırmacılar tarafından oluşturulan çalışma gruplarının ve sayılarının farklı olmasından kaynaklanmaktadır. Altuğoğlu ve arkadaşlarının (2002) Hybrid capture yöntemi ile yaptıkları çalışmada, endoservisit tanısı almış 148 serviks örneğinin %5,4 oranında HPV DNA pozitifliği tespit etmişlerdir.¹⁶⁷ Özçelik ve arkadaşlarının (2003) serviks kanseri açısından düşük riskli kadınlarda Hybrid capture-I yöntemi ile yaptığı bir çalışmada HPV sıklığını %6,1 olarak bildirilmiştir.¹⁶⁸ İnal ve arkadaşlarının (2007) çalışmasında ise, Hybrid capture -II yöntemi ile 1344 olgunun %20'sinde HPV DNA saptanmıştır. Bunların %0,7'sinde HPV'nin neden olduğu preinvaziv lezyonlar tespit edilmiştir.¹⁶⁶ Kaynak ve arkadaşlarının (2004) çalışmasında ise, Hybrid capture-I yöntemi ile HPV DNA pozitifliğinin %12 oranında olduğu belirlenmiştir.¹⁶⁹ Dünyada yapılan çalışmalar incelendiğinde, verilerin daha farklı olduğu görülmektedir. Dunne ve arkadaşları (2007), Amerika'da 2003-2004 yılında 14-59 yaş grupları arası olan 1921 kadında HPV sıklığını Real time PCR yöntemi ile araştırmış ve HPV sıklığı PGMY09/11 primerleri ile %26,8 olarak belirlenmiştir.¹⁷⁰ Schiff ve arkadaşları (2000) tarafından Hindistan'da, yapılan çalışmada Hybrid capture yöntemi ile %34,3 oranında HPV DNA varlığı gösterilmiştir.¹⁷¹ Gerce ve arkadaşlarının (2001) Zagreb'deki çalışmasında, CIN II/III tanısı alan kadınların %64,4'ünde Real time PCR yöntemi ile HPV DNA pozitifliğini bildirilmiştir.¹⁷² Amrani ve arkadaşlarının (2003) CIS/CINIII tanısı alan Faslı kadınlar ile yaptıkları bir çalışmada, PCR ile %62 oranında HPV DNA varlığı tespit edilmiştir.¹⁷³ Bizim çalışmamızda ise, şüpheli kolposkopi hastalarının serviks örneklerde HPV DNA pozitifliği Real time PCR ile araştırılmış ve %61 oranında HPV DNA pozitifliği tespit edilmiştir.

Genital mukozayı 40'tan fazla HPV tipi enfekte etmektedir. Mukozal HPV tipleri servikal kanserle ilişkilerine göre düşük (LR) ve

yüksek (HR) riskli HPV tipleri olarak sınıflandırılmaktadır.⁵⁹ Düşük riskli HPV tiplerinden özellikle HPV tip 6 ve 11 genital siğillerin en az %90'ından sorumludur. Yüksek riskli HPV grubunda ise servikal mukozayı enfekte eden en az 15 onkojenik tip bilinmektedir. Yüksek riskli HPV DNA'sının 12 aydan daha uzun süre tespit edilmesi persistan enfeksiyonun göstergesidir ve persistan HR HPV enfeksiyonu prekanseröz lezyon ve servikal kanser gelişmesi için majör risk faktörüdür. Ancak displaziye ilerleyen enfeksiyonların bile çoğu iyileşmektedir.⁶¹ Düşük dereceli lezyon CIN I'in %50-60'ı, yüksek dereceli lezyon CIN II'nin %30-40'ı geriler. Bu durum HPV enfeksiyonlarının kontrolünde immün cevabın oldukça etkin olduğunu gösterir. HPV enfeksiyonu olan kişilerin sadece %1'inden azında servikal kanser gelişmektedir. Servikal kanserden en çok izole edilen HPV tipi %53,5 oranla HPV tip 16'dır, bunu ikinci sırada %16,5'lik oranla HPV tip 18 izler. HPV tip 16 ve 18 bütün servikal kanserlerin %70,0'inden sorumludur.¹⁶¹

Human papillomavirus tespitinde serolojik tanı yöntemleri etkili olmadığından ve halen kültürü yapılamadığından moleküler esaslı tanı yöntemlerinden biri olan PCR yöntemi günümüzde altın standart olarak değerlendirilmektedir.¹⁷⁴ Bizim çalışmamızda, aynı anda HPV tip 16 ve diğer HPV tiplerinin tayinine olanak sağlayan ve klasik PCR yöntemine göre maliyeti de oldukça düşüren Real time PCR yöntemi kullanılmıştır. Real time PCR yöntemi yüksek sensivite ve spesivitesi ile doğru miktarı belirleme imkânını sağlayabilen bir yöntemdir. Real time PCR aynı zamanda, klasik PCR'a göre kontaminasyon riskini en aza düşüren, güvenilirliği yükselten bir yöntemdir.¹⁵⁴ Human papillomavirusların tiplendirilmesinde oluşturdukları lezyonlar önemlidir. HPV tiplerinin özellikle onkojenik risk taşıması onların düşük ve yüksek riskli olarak tiplendirilmelerini sağlamaktadır.¹⁷⁵ Dünyada servikal kanser ve prekanseröz lezyonlarda HPV tiplerinin prevalansını ve dağılımını

araştıran uluslararası birçok meta-analiz çalışması yapılmıştır.^{34,176} Servikal kanserde en çok bulunan HR HPV tipi %50-55 oran ile HPV16 olup ikinci sıradaki HPV18'in oranı %10- 15'dir.^{174,175} Çalışmamızda, tedavi açısından oldukça önemli olan ileri lezyonlardan ve kanserden birincil olarak sorumlu olduğunu düşündüğümüz yüksek riskli HPV tipi olarak bilinen HPV tip 16'nın ayrımı esas alınmıştır. Ülkemizde tip tayinin de yapılan benzer çalışmalara baktığımızda, Onan ve arkadaşları (2005) Real time PCR ile CIN lezyonlarında HPV tip 16 ve HPV tip 18 varlığını tespit etmişler ve örneklerdeki viral yükün etkenin tespitindeki rolünü araştırmışlardır. 94 kadını içeren bu çalışmada örnekler %50,0 CIN I, %28,8 CIN II ve %21,2 CIN III şeklinde üç gruba ayrılmış ve Real time PCR ile üç grupta sırasıyla % 4,2; % 14,8 ve % 45 oranında HPV tip 16 ve HPV tip 18 varlığını tespit etmişlerdir. Viral yükler açısından ise gruplar arasında istatistiksel bir fark bulamamışlardır, ancak CIN III'de daha yüksek oranda HPV varlığını gözlemlemişlerdir (p= 0.73). Bu çalışmada, HPV varlığını tespit etmede, tip ayrımında ve viral yükün miktarını belirlemede Real time PCR yönteminin, diğer yöntemlere göre daha üstün olduğu bildirilmiştir.⁹⁵ Servikal kanserli olgularla Real time PCR ile yapılan diğer çalışmalara baktığımızda, Erkmen ve arkadaşları (2002) HPV tip 16'nın prevalansını % 54,5 olarak belirlerken, Polat ve arkadaşları (2000) ise prevalansı %18,2 olarak tespit etmişlerdir.^{177,178} Tuncer ve arkadaşları (1996) ise Real time PCR ile HPV tip 16'yı, normal sitolojili olan kadınlarda %12,5; CIN I'e sahip olanlarda %19,4, CIN II-III'e sahip olanlarda %46,3 ve invaziv kanserlerde %83,3 olarak belirlemişlerdir.¹⁷⁹ Dünyada ise, Ter Harmsel ve arkadaşları (1999), 1988-1989 yılları arasında HPV tip 16 varlığı ile CIN gelişim riski arasındaki ilişkiyi Real time PCR ile araştırmışlar ve bu çalışmada hastaları, geçici enfeksiyonlu ve persistan enfeksiyonlu olarak iki alt gruba ayırmışlardır. Persistan HPV 16 enfeksiyonlu çalışma grubunda (%44), geçici enfeksiyonlulara (%20) göre önemli ölçüde CIN gelişimi görülmüştür. Bu çalışmada, HPV tip 16 etkenli persistan enfeksiyonlu kişilerin, CIN gelişimi ve daha ileri lezyonları

açısından yüksek risk altında oldukları bildirilmiştir.¹⁸⁰ Martin ve arkadaşlarının (2002) yaptığı Real time PCR çalışmasında, servikal hücrelerdeki HPV tip 16'nın yüksek titredeki varlığının servikal karsinoma in situ'nun gelişimi için önemli bir risk faktörü olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca bu çalışmada, HPV tip 16'nın seviyesindeki değişime bakılarak, enfeksiyonun gelişimi hakkında bilgi sahibi olunabileceğini vurgulanmıştır.¹⁸¹ Grece ve arkadaşları (2001), HPV tiplerinin dağılımını CIN II/III'ü içeren gruplarda incelediklerinde; Real time PCR ile HPV 6 ve 11'in %5, HPV 16'nın %12, HPV 18'in %2, HPV 31'in %5 ve HPV 33'ün %3 oranında olduğunu belirtmişlerdir.¹⁷² Bizim çalışmamızda ise, Real time PCR ile şüpheli kolposkopi hastalarının %52'sinde HPV tip 16, %4'ünde HPV tip 16+11; % 1'inde HPV tip 16+6 ve %4'ünde tiplendirilemeyen HPV DNA'ları tespit edilmiştir. Servikal örneklerde HPV tip 16 dışında HPV tip 11 ve HPV tip 6'nın varlığı, malign olmayan HPV tiplerinin de servikal bölgede bulunabileceğini göstermiştir. Fransa'da Briolat ve arkadaşlarının tip spesifik HR HPV prevalansını, özellikle HPV 16 ile tek veya multiple HPV enfeksiyonların varlığını araştırmak amacıyla yaptıkları çalışmada 24 lezyonu olmayan olgu, 96 CIN I, 92 CIN II, 144 CIN III ve 7 kanser vakasına ait toplam 363 servikal örnek HC II ve linear array HPV genotiplleme testi (Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, NJ) ile analiz edildiğinde HPV-16 prevalansının baskın olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, çoklu enfeksiyonlar ile karşılaştırıldığında tekli enfeksiyonların prevalansının lezyon ciddiyeti ile arttığı tespit edilmiştir. Bu çalışmada multiple HPV tiplerinde HPV 16 ile birlikte HPV 18, 31, 35 ve 11 tipleri de tespit edilmiştir. Sonuç olarak, bu çalışma çoklu enfeksiyonlara göre tekli enfeksiyonların CIN ciddiyeti ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur.¹⁸²

Servikal kanserli hastaların ortalama tanı alma yaşı 51'dir. HPV ile birliktelikte yaşam boyu iki pik bulunmakta olup, birincisi 30-40, ikincisi ise 50-60 yaş civarındır. Çalışılan birçok popülasyonda HPV enfeksiyonlarının yaş ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. En yüksek prevalans 15-25 yaşları arasındaki kadınlarda görülmektedir ki tüm enfeksiyonların %25-40'ı bu yaş aralığına aittir.¹⁸³ Yaşın artması ile azalan enfeksiyonun nedeni HPV'ye maruz kalmanın azlığı, enfeksiyonun sınırlı doğası veya enfeksiyonun tekrarı neticesinde oluşan direnç ile açıklanmaktadır. Çalışmamız literatürler ile uyumlu olup ilk pik 31-40 yaşları arasında ortaya çıkarken, ikinci pik 51-60 yaşları arasında görülmektedir, ancak yaş gruplarına göre HPV pozitifliği yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır ($p<0,05$). Elde edilen bu fark 21-30 yaş grubu ile 61 yaş ve üzeri gruplarda HPV pozitif hasta bulunmamasından kaynaklanmaktadır. Benzer çalışmalar incelendiğinde, Amrani ve arkadaşları (2003) HPV varlığı ile yaş grupları arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. 30-39 yaş grubunda HPV sıklığı artmaya başlarken, 40-49 yaş grubu kadınlarda ise sıklık %39,5 ile en yüksek seviyeye ulaşmıştır. 60-69 yaş ve sonrası kadınlarda ise HPV sıklığında belirgin bir düşüş gözlemlenmiştir. Geniş çaplı popülasyon çalışmalarında 20-25 yaş grubunda normal sitolojik sürüntüye sahip kadınların %20'sinde HPV DNA'sı tespit edilmiştir.¹⁷³ Sellors ve arkadaşlarının (1994) Kanadalı kadınlarda HPV prevalansı ile yaş grupları arasındaki ilişkiyi değerlendirdikleri çalışmada; 15-19 yaş grubunda %15,7 olan HPV sıklığı, 20-24 yaş grubunda %24 ile en yüksek orana ulaşmıştır. Yaşın ilerlemesi ile HPV sıklığı düşmektedir. Bu çalışmada, sırasıyla 25-29 yaş grubunda %16,4; 30-34 yaş grubunda %12,3; 35-39 yaş grubunda %9,6; 40-44 yaş grubunda %8,3 ve 45-49 yaş grubunda ise %3,4 oranında HPV DNA pozitifliği bildirilmiştir.¹⁸⁴ Çalışmamızda ise, en fazla HPV DNA pozitifliği %80,0 oranı ile 31-40 yaşları arasında tespit edilmiştir. HPV pozitifliğinin 41-50 yaşları arasında %52,2'e düştüğü, ancak 51-60 yaşları arasında tekrar %83,3'e yükselerek ikinci bir pik yaptığı belirlenmiştir. HPV

enfeksiyonlarının yaş parametresine göre oldukça değişken olduğu görülmektedir. Bunun en temel nedeni, seksüel alışkanlıkların toplumun sosyokültürel, ekonomik ve değer yargılarına bağlı olarak yaş gruplarında farklılık göstermesidir. Toplumun yapısı, eğitim durumu ve aile yapısına bağlı olarak kişilerin farklı cinsel eğilimleri ortaya çıkmaktadır.¹⁶¹ Ülkemizdeki HPV sıklık değerlerinin Avrupa ülkelerine göre farklı oluşunu konservatif bir kültüre sahip olmamız ile açıklayabiliriz.

Uluslararası servikal kanserin epidemiyolojik çalışmalarını yürüten grup (ICESCC) tarafından yapılan çalışmada, gebelik sayıları arttıkça serviks kanseri riskinin de doğru orantılı olarak arttığı bildirilmiştir.¹⁸⁵ Schneider ve arkadaşlarının (1992), 92 gebe kadından elde ettiği sürüntüleri 96 gebe olmayan kadınla karşılaştırdıkları çalışmada, gebe kadınların %28,0'inde, gebe olmayanların ise %12,5'inde HPV pozitifliği saptamışlardır. Bu çalışmada, HPV pozitif gebelerin %42'sinde mevcut HPV alt tipinin oranı sadece %25 olarak bildirilmiştir. HPV pozitif gebelerin %21'inde örneklem gebeliğin ilk 20 haftasında yapılırken, %32'sinde HPV pozitifliği 20. gebelik haftasından sonra saptanmıştır.¹⁸⁶ Smith ve arkadaşlarının (1991), 69 gebe kadını 54 gebe olmayan kadınla karşılaştırdıkları bir çalışmada, gebelikte HPV prevalansının gebelik yaşı arttıkça artış gösterdiğini bildirmişlerdir. Ayrıca çalışmada, HPV pozitifliği ilk trimesterde %8 iken, bu oran ikinci trimesterde %16,7'e, üçüncü trimesterde %23,1'e yükselmektedir. Bu oranlardaki artış, gebeliğin başında başlayan bağışıklık sisteminin baskılanması olayının doğum evresine kadar geçen süreçte artarak devam etmesi ile açıklanabilir. Ayrıca bu çalışmada, gebe ve gebe olmayan kadınlardaki onkojenik HPV alt tiplerinin pozitiflik oranı eşit bulunmuştur.¹⁸⁷ Bizim çalışmamızda ise, hem çocuk sayısı hem de gebelik sayısında artışla birlikte HPV pozitiflik oranında bir yükselme tespit

edilmiştir. Özellikle çocuk sayısı 2-4 arasında olanlarda %71,4 oranında; gebelik sayısında da yine 2-4 arasında olanlarda %68,0; 4'den fazla gebelik durumu olanlarda %64,5 oranında bir pozitiflik elde edilmiştir. Çocuk ve gebelik sayısına göre HPV pozitifliği yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0,05$). Çalışmamızda elde edilen veriler literatürler ile uyumlu olup, gebelik sayısı ile HPV enfeksiyonunun görülme sıklığı arasında doğru orantılı bir ilişkinin varlığı tespit edilmiştir. Ülkemizde olduğu gibi periyodik kontrol alışkanlığı olmayan toplumlarda, gebelik kontrolleri hekime serviks kanseri taraması için bir fırsat yaratmaktadır. Gebelikte anormal servikal sitoloji görülme sıklığı, cinsel olarak aktif bir kadında görülme sıklığına paralellik göstermektedir.

Genital sistemin HPV enfeksiyonu; düşük dereceli lezyon olarak başlayıp, kansere kadar devam edebilmektedir. Bu süreç ile ilgili yoğun çalışmalar mevcuttur, ancak elde edilen bilgi, süreci net olarak açıklamaya yetmemektedir.¹⁸⁸ Ülkemizde yapılan çalışmalara baktığımızda, Ergünay ve arkadaşlarının (2007) çalışmasında sıvı bazlı sitoloji ile 14'ünde ASC-US, 3'ünde ASC-H, 7'sinde LSIL, 5' inde HSIL, 4'ünde LSIL+ şüpheli HSIL, 1'inde AGUS, 1'inde de atipik hücrelere tam tanı almamış toplam 35 hasta ile yaptıkları çalışmada %80 oranında (28 hasta) HPV DNA tespit etmişlerdir. Bunların 22'sinde ise yüksek riskli HPV tipleri (16, 18, 31, 33, 45, 56 ve 59) saptanmıştır.¹⁸⁹ Yurt dışı çalışmaları incelendiğinde, Castle ve arkadaşları HPV tip 16'nın etken olduğu, ASC-US veya LSIL lezyonlarının 2 yıl içinde CIN III veya kansere dönüşme riski olduğunu ve bu riskin, HPV tip 16 dışındaki diğer tiplerle kıyaslandığında 5 kat fazla olduğunu bildirmişlerdir.¹⁹⁰ Gerce ve arkadaşları (2001) ise çalışmalarında, Hybrid capture yöntemi ile HSIL'da HPV DNA tip 16'nın sıklığını % 17,1 olarak bulunurken, LSIL'da HPV DNA tip 16'nın sıklığını % 8,5 olarak bulunmuştur. Hırvat kadınlar için

HPV enfeksiyon etkenlerinden özellikle HPV tip 16'nın sağığı tehdit eden önemli bir etken olduğunu vurgulamışlar. Ayrıca sitolojik bulgular ile HPV tipleri arasındaki ilişkiyi incelediklerinde, yüksek riskli HPV tiplerinin sıklığı artıkça intraepitelyal lezyonların (LSIL ve HSIL) ciddiyetinin de artığı sonucuna varmışlar.¹⁷² Çalışmamızda, kolposkopi uygulanan hastaların patoloji değerleri de incelenmiştir. 20 ASC-H olgusunun 12 (%60,0)'inde; 36 ASC-US olgusunun 23 (%63,8)'ünde; 9 HSIL olgusunun 9 (%100)'unda ve 12 LSIL olgusunun 3 (%25,0)'ünde HPV DNA pozitif olarak belirlenmiştir. Tüm HPV pozitif olan hastalar üzerinden değerlendirildiğinde 47 (%100) hastanın 12 (%25,5)'si ASC-H; 23 (%49,0)'ü ASC-US; 9 (%19,0)'u HSIL; 3 (6,5)'i LSIL tanısı almıştır. Bu verileri göre HPV pozitifliği yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark vardır ($p<0,05$). Bu fark HSIL olgularını içeren grubun tamamının HPV pozitif olmasından kaynaklanmaktadır.

Baş ve boyun kanserlerinin tüm kanserler arasında %10-15 oranında görüldüğü belirlenmiştir. Baş-boyun bölgesinde en sık görülen malign tümörler ise larinks tümörleri olup, baş ve boyun kanserleri arasında yaklaşık % 25 oranındadır ve % 95'den fazlasında yassı hücreli (skuamöz) karsinomlar görülmektedir.¹⁶⁵

Baş ve boyun kanserleri ile ilgili son yıllarda yapılan çalışmalarda, DNA virüsleri ve özellikle HPV tiplerinin tümör oluşumu ve gelişiminde rol oynadığı bildirilmektedir.¹⁶⁵ Human papillomavirusun karsinogenezi düşük ve yüksek riskli tipleri vardır. Düşük riskli tipler laringeal papillomatozis ve genital siğiller gibi benign lezyonlarda rol alırken, yüksek riskli tipler malign lezyonlarda karşımıza çıkar.¹⁹¹ Baş ve boyun kanserlerinde de sıklıkla HPV tip 16, HPV tip 6 ve HPV tip 11 izole

edilmektedir.¹⁹² Laringeal papillomatozisli olgularda özellikle yüksek riskli HPV varlığında zaman içinde malign transformasyon görülebilir.¹⁹³

Ülkemizde de HPV enfeksiyonu ve larinks kanserleri arasında ilişkiyi inceleyen çalışmalar yapılmıştır. Konu ile ilgili yapılan ilk çalışma 1993 yılında Akyol ve arkadaşlarının yaptığı çalışmadır. Bu çalışmada özellikle çocuk hastalarda önemli mortalite ve morbidite nedeni olan rekürrent laringeal papillomatozisli 25 olgunun 21'inde HPV enfeksiyonunun histopatolojik değişiklikleri saptanmıştır.¹⁹⁴ Güvenç ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, total ya da parsiyel larenjektomi uygulanmış 40 adet laringeal skuamöz hücreli karsinom olgusunun 5'inde (%12,5) ve verrüköz karsinomlu 2 olgunun 2 (%100)'sinde de PCR yöntemiyle HPV pozitifliği belirlenmiştir.¹⁹⁵ Yıldırım ve arkadaşlarının (2009) çalışmalarında ise Real time PCR ile HPV pozitifliği 9/149 (%6) olarak tespit edilmiştir.¹⁹⁶ Tutkun ve arkadaşlarının (1999) yaptıkları çalışmada in situ hibridizasyon tekniği kullanılarak 20 larinks karsinomlu hastada %50 oranında HPV pozitifliği saptanmıştır.¹⁹⁷ Yurt dışı çalışmalarında ise, Deilson ve arkadaşları (2006) laringeal papillomatozisli olgularda malign transformasyon görülme oranı %3-7 olarak bildirilmiştir. Bu grubun yaptığı bir başka çalışmada ise, 110 adet skuamöz hücreli larinks karsinomu incelenmiş ve bunların %37,3'ünde yüksek riskli HPV saptanmıştır. %37 oranında HPV 16, %44 oranında HPV 18 görülmüştür.¹⁹⁸ Brandwein ve arkadaşları (1994), formalinle fikse edilmiş parafin içindeki 40 laringeal kanserli tümör bloğunda, nonspesifik primerlerin birleşmesini önleyerek amplifikasyonun sensitivitesini daha da arttıran hot-start PCR tekniği ile incelemiş ve sadece 3 (%8) hastada pozitiflik saptamışlardır.¹⁹⁹ Clayman ve arkadaşları (1990) ise, larinks ve hipofarinks tümörlü 65 hastayı içeren çalışmalarında Real time PCR ile 30 (%46) olguda HPV DNA pozitifliği saptamışlardır.²⁰⁰ Bizim çalışmamızda

da, baş-boyun kanseri tanısı alan hastalarda %47 oranında HPV tip 16 ve % 9 oranında tiplendirilemeyen HPV DNA olmak üzere toplam %56 oranında HPV pozitifliği belirlenmiştir.

Baş ve boyun tümörleri özellikle 50-60 yaşları arasında ve erkeklerde kadınlara oranla daha fazla karşılaşılmaktadır.¹⁶⁵ Ülkemizde yapılan çalışmalarda da laringeal karsinomların erkeklerde daha fazla görüldüğü belirtilmektedir.¹⁶⁶ Çalışmamızda yer alan 45 hastanın 38 (%85)'i erkek, 7 (%15)'si kadındır. 38 erkek hastanın 25 (%65,8)'i HPV pozitif olarak belirlenirken, kadınlarda HPV pozitifliği saptanmamıştır. Cruz ve arkadaşlarının (1996) çalışmalarında da, 35 oral epidermoid kanserli hastada yapılan inceleme ile HPV sıklığının yaşla belirgin bir ilişkisi olduğunu göstermiştir. Çalışmaya göre, 60 yaş ve üstü kişilerde HPV sıklığı 8 kat artmaktadır. Bu çalışmada erkeklerde HPV pozitifliğinin daha sık olduğu da belirtilmektedir (% 66,7).²⁰¹ Bizim çalışmamızda elde edilen verilerin literatürlerle uyumlu sonuçlar içerdiği gözlenmiştir. Çalışmamıza dâhil edilen hastaların, 2 (%4,5)'si 21-30 yaş arası, 9 (%20,0)'u 31- 40 yaş arası, 16 (%35,5)'si 41-50 yaş arası, 14 (%31,2)'ü 51-60 yaş arası ve 4 (%8,8)'ü 61 yaş ve üzerindedir. En fazla HPV DNA pozitiflik %85,7 oranı ile 51-60 yaşları arasında tespit edilmiştir. HPV pozitifliğinin 31-40 yaşları arasında %22,2 olup, 41-50 yaşları arasında yükselerek %50,0'ye, 61 yaş ve üzerinde ise %75,0'e ulaştığı belirlenmiştir.

Araştırmalarda glottik tümörlerin düşük dereceli, supraglottik tümörlerin ise yüksek dereceli olduğu bildirilmiş ve supraglottik tümörlerde lenf nodu metastazına (LN) daha sık rastlandığı bildirilmiştir.²⁰¹ Lenfatik damar ağının en yoğun olarak supraglottik bölgede olması bu metastazların asıl sebebidir. Lenf nodu metastaz varlığının baş ve boyun bölgesi tümörleri için en önemli bağımsız prognostik faktör olduğu bilinmektedir.^{201,202} Baş ve boyun kanserli hastalarda LN metastazının preoperatif saptanması etkili tedavinin yapılabilmesi için kritik bir öneme

sahiptir. Yıldırım ve arkadaşlarının (2009) Real time PCR çalışmalarında 9(%6) olguda HPV varlığı saptanmıştır. Bu olgulardan 6'sında (%66,6) HPV 16, 1'inde (%11,1) HPV 18 pozitif sonuç vermiştir.¹⁹⁶ Bizim çalışmamızda da, tümörlerin 24/45'ü (%53,4) glottik, 16/45'si (%35,5) supraglottik, 5/45'i (%11,1) transglottik yerleşimli olarak bulunmaktaydı. Tümör lokalizasyonlarına göre HPV pozitifliği yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark vardır ($p<0,05$). Glottik yerleşimlilerin %75,0'inde; supraglottik yerleşimlilerin ise %43,0'ünde HPV pozitifliği belirlenmiştir. T1; 4/45 (%8,8) olguda, T2; 21/45 (%46,6) olguda, T3; 14/45 (%31,3) olguda, T4; 6/45 (%13,3) olguda izlendi. HPV pozitifliği açısından değerlendirildiğinde, T4 olgularının %16,7'sinde; T3 olgularının %57,2'sinde ve T2 olgularının ise %76,2'sinde pozitiflik saptanmıştır. T derecesine göre HPV pozitifliği yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark vardır ($p<0,05$). Lenf nodu metastazı olan 16 hastada saptandı, bunların da 12 tanesi N1 ve 4 tanesi N2'dir. Toplam 29 hastada ise lenf noduna rastlanmamıştır (N0=29). Lenf nodu metastazı incelendiğinde HPV pozitifliği N1'de %50,0; N2'de %25,0 iken N0'da %62,0 olarak belirlenmiştir. Lenf nodu metastazına göre HPV pozitifliği yönünden istatistiksel olarak fark saptanmamıştır ($p>0,05$).

Larinks kanseri açısından risk faktörleri arasında başta sigara kullanımı gelmektedir.¹⁶⁵ Fouret ve arkadaşlarının (1995) yaptığı bir çalışmada sigara ve alkol bağımlılığı olan hastalarda, lezyonların daha kısa sürede meydana geldiği ve daha kötü seyirli olduğu görülmüştür.¹⁹³ Yıldırım ve arkadaşlarının (2009) çalışmasında olgularının %93,2 gibi çok yüksek bir oranı sigara içicisi olduğu belirtilmiş ve bunlarında %6 HPV pozitifliği saptanmıştır.¹⁹⁶ Bizim çalışmamızda da, sigara kullanan hasta sayısı 39/45 (%95,5) olup, sigara kullananlarda HPV 16 pozitifliği 22/39 (%56,4); kullanmayan hasta sayısı 6/45(%4,5) olup, HPV 16 pozitifliği 3/6 (%50,0) olarak belirlenmiştir.

6.SONUÇ

Serviks kanseri etiyolojisinde majör etken olarak kabul edilen human papillomavirus tanısı günümüzde oldukça önem taşımaktadır. Serviks kanseri, diğer kanser türlerinden “önlenebilir” bir kanser çeşidi olması ile ayrılmaktadır. Bu nedenle HPV ile ilişkili enfeksiyonlarda tarama, erken teşhis ve erken tedavi önem kazanmaktadır. Çalışmamızda elde edilen tüm bu veriler dâhilinde, Real time PCR yöntemi ile kolposkopi pozitif bulunan hastaların, belli bir algoritma dâhilinde takiplerinin yapılması ve sonuçlar doğrultusunda hastaların yönlendirilmesi önemlidir.

Günümüzde, human papillomavirusun özellikle de yüksek riskli HPV tip 16’nın baş ve boyun tümörlerinin etiyolojisinde önemli bir yeri olduğu bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda oral kavite ve orofarinks kanserlerinde HPV pozitifliği saptanan hastalarda, HPV DNA izole edilemeyenlere göre yaşam süresinin daha iyi olduğu gözlenmiştir. Baş ve boyun kanserlerinde HPV DNA varlığı hastalığın prognozunun şekillenmesine de katkı sağlamaktadır.

Sonuç olarak, human papillomavirusun serviks kanserlerinde varlığı önemlidir. Gelişen teknoloji kullanılarak HPV’nin erken teşhisi, prekanseröz lezyonların invaz hale dönmesini engellemede anahtar rol oynamaktadır. Baş ve boyun kanserlerin de ise HPV pozitifliği, hastalığın prognozunu şekillenmesine katkı sağlamaktadır. Bu yüzden larinksle ilgili lezyonlarda da HPV varlığının belirlenmesi önemlidir. Bu nedenle larinks

lezyonlarının rutin inceleme şemasına HPV pozitifliğinin araştırılması da eklenmelidir. Bu çalışmada elde edilen veriler, HPV ile ilgili gelecekte yapılması planlanan çalışmalara önemli katkılar sağlayacaktır.

7.ÖZET

Human papillomavirus enfeksiyonu cinsel yolla geçen enfeksiyonlardan en sık rastlanılandır. Serviks kanseri ile HPV enfeksiyonu arasındaki kesin ilişki ortaya konmuştur. Öte yandan HPV enfeksiyonları ile deri, oral kanserler, nazofarinks, larinks, baş ve boyun kanserleri arasında da bir ilişki olabileceği gösterilmiştir. Bu çalışmada serviks ve baş-boyun kanseri hastalarında polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve DNA dizi analizi ile human papillomavirus tiplerinin bölgemizdeki prevalansının belirlenmesi ve filogenetik analizinin yapılması amaçlanmıştır.

Çalışmamıza, Gazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum polikliniğine Ocak-Ekim 2010 tarihleri arasında başvuran ve kolposkopi önerilen 77 hastanın servikal sürüntü örnekleri ve Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı'nda baş-boyun kanseri tanısı alan 45 hastanın parafine gömülü doku örnekleri dâhil edilmiştir. HPV DNA tespiti için MY09/11 ve GP5+/GP6+ (Cy5.0 işaretli) primerleri ile yapılan Real Time PCR testi kullanılmıştır. Sonuçta, serviks örneği alınan bireylerin %52'sinde HPV tip 16, %4'ünde HPV tip 16+11, %1'inde HPV tip 16+6 ve %4'ünde tiplendirilemeyen HPV DNA tespit edildi. Baş-boyun kanseri hastalarında ise %47 oranında HPV tip 16 ve %9 oranında tiplendirilemeyen HPV DNA'sı belirlenmiştir.

Bölgemizde servikal kanser ve prekanseröz lezyonu olan kadınlarda HPV genotiplerinin dağılımının araştırılması önemlidir. Gelişen teknolojik yöntemler kullanılarak HPV'nin erken teşhisi,

prekanseröz lezyonların invaziv kanser dönmesini engellemede anahtar rol oynamaktadır. Baş ve boyun kanserlerin de ise HPV pozitifliği, hastalığın prognozunun şekillenmesine katkı sağlamaktadır. Bu yüzden larinksle ilgili lezyonlarda da HPV varlığının belirlenmesi önemlidir ve larinks lezyonlarının rutin inceleme şemasına HPV pozitifliğinin araştırılması da eklenmelidir.

Anahtar Sözcükler: Human papillomavirus, serviks kanseri, baş ve boyun kanserleri

8. SUMMARY

Human papillomavirus infection is one of the most common sexually transmitted diseases. The relation between HPV infection and cervical cancer is demonstrated. A possible relation between HPV infection and cancer of skin, oral cavity, nasopharynx, larynx, head and neck was shown. To determinate the prevalence of HPV types in patients with cervical and head-neck cancers in our legion by PCR and DNA sequence analysis and to make phylogenetic analysis was aimed in this study.

This study is conducted with paraffin blocs of 45 patients identified as head-neck cancer in department of Otorhinolaryngology and cervical swap samples of 77 patients who suggested colposcopy and attended department of Obstetrics and Gynecology of our hospital from January to October 2010. MY09/11 and GP5+/6+ (with Cy5.0) primers were used for detection of HPV in Real Time PCR test using. In conclusion, HPV 16- 52%; HPV 16+11- 4%; HPV 16+6- 1% and non-typing HPV 4% were found in cervix samples. HPV 16- 47%, and non-typing HPV 9.0% were found in patients with head-neck cancer.

The investigation of the distribution of HPV genotypes in women with cervical cancer and precancerous lesions in our region is important. Early diagnosis of HPV by using improved technological assays, play a key role to prevent the turn precancerous lesions into invasive cancers. HPV positivity in head

and neck cancers, contribute the prognosis of disease. Consequently researching the presence of HPV in larynx lesions is important and researching the positivity of HPV must be added in routine analysis of larynx lesions.

Anahtar Sözcükler: Human papillomavirus, cervix cancer, head and neck cancers.

9. KAYNAKLAR

1. Shope RE, Hurst EW. Infectious papillomatosis of rabbits; with a note on the histopathology. J Exp Med 1933; 58: 607-624.
2. Singer A, Ho L, Terry G, Kwie TS. Association of human papillomavirus with cervical cancer and precancer. In: A Mindel (ed), Genital Warts Human Papillomavirus Infection. Edward Arnold, London; 1995: 105-129.
3. Münger K, Baldwin A, Edwards KM et al. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. J Virol 2004; 78 (21): 11451-11460.
4. Howley PM. The molecular biology of papillomavirus transformation. Am J Pathol 1983; 113 (3): 414-421.
5. Bosch FX, Lorincz A, Munoz N, et al. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. J Clin Pathol 2002; 55: 244–265.
6. Anna-Barbara Moscicki. Impact of HPV infection in adolescent populations. J Adoles Healt 37; 2005: 3–9.
7. Hamont DW, Bekkers RLM, Massuger LFAG, Melchers WJG. Detection of management and follow-up of pre- malignen lesions and the role for human papillomavirus. Rev Med Virol 2008; 18: 117-132.

8. Özgöl N. Türkiye’de serviks kanserinin durumu ve servikal kanser tarama çalışmaları. <http://ukdk.org/pdf/kitap/30.pdf> [Erişim Tarihi: 01.02.2010].
9. Lowy DR, Schiller JT. Prophylactic human papillomavirus vaccines. *J. Clin Invest* 2006; 116: 1167-1173.
10. Engin K, Erişen L. Baş-boyun kanserleri.1. baskı. Bursa: Nobel tıp kitapevleri, 2003: 141-183.
11. Stoppler H, Stoppler Mc, Schlegel R. Transforming proteins of the papillomaviruses. *Intervirology* 1994; 37: 168-179.
12. Sessions RB, Harrison LB, Forastiere AA. Tumors of the larynx and hypopharynx. In: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA, eds, *Cancer: Principles and Practice of Oncology*. 6th ed. Philadelphia, Pa: Lippincott Williams& Wilkins, 2001, 861-885.
13. Sundberg JP. Papillomavirus infections in animals. In: Syrjanen K, Gissmann LL, Koss LG, eds. *Papillomaviruses and Human Disease*. Berlin: Springer-Verlag, 1987.
14. Lowy DR. History of papillomavirus research. *The Papillomaviruses*. New York: Springer, 2007; 13-28.
15. Danos O, Katinka M, Yaniv M. Human papillomavirus complete DNA sequence: a novel type of genome organization among papovaviridae. *EMBO J* 1982; 1: 231-236.

16. Chen EY, Howley PM, Levinson AD, et al. The primary structure and genetic organization of the bovine papillomavirus type 1 genome. *Nature* 1982; 299: 529-534.
17. Black PH, Hartley JW, Rowe WP, et al. Transformation of bovine tissue culture cells by bovine papillomavirus. *Nature* 1963; 199: 1016-1018.
18. Dvoretzky I, Shober R, Chattopadhyay SK, et al. A quantitative in vitro focus assay for bovine papilloma virus. *J Virol* 1980; 103: 369-375.
19. Gissmann ML, 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: 3812-3815.
20. 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: 1151-1157.
21. Lancaster WD, Olson C. Animal papillomaviruses. *Microbiol Rev* 1982; 46: 191-207.
22. Meisels A, Fortin R. Condylomatous lesions of the cervix and vagina. I. Cytologic patterns. *Acta Cytol* 1976; 20: 505-509.
23. Zur Hausen H. Condylomata acuminata and human genital cancer. *Cancer Res* 1976; 36: 530.

24. Bosch FX, Manos MM, Munoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, et al. Prevalance of human papillomavirus in cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. J Natl Cancer Inst 1995; 87(11): 796-802.
25. Hausen H. Papillomaviruses causing cancer: Evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. Journal of the National Cancer Institute 2000; 92: 690-698.
26. Öktem F, Aydın S, Öz F, Toprak M, Ada M. Baş-boyun kanserlerinde human papillomavirüs enfeksiyonunun rolü. KBB ve Baş Boyun Cerrahisi Dergisi 2000; 8(1): 51-57.
27. Syrjanen S. HPV infections and tonsillar carcinoma. J Clin Pathol 2004; 57: 449–455.
28. Hodge KM, Flynn MB, Drury T. Squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract in nonusers of tobacco. Cancer 1985; 55: 1232-1235.
29. Niedobitek G, Pitteroff S, Herbst S, et al. Detection of type 16 DNA in carcinomas of the palatine tonsil. J Clin Pathol 1990; 43: 918–921.
30. Blot WJ, Devesa SS, McLaughlin JK, Fraumeni JF. Oral and pharyngeal cancers. Cancer Surv 1994; 20 (19): 23-42.
31. Mineta H, Ogino T, Amano HM ve ark. Human papillomavirus (HPV) type 16 and 18 detected in head and neck squamous cell carcinoma. Anticancer Res 1998; 18(6B): 4765-4768.

32. Gillison ML, Koch WM, Capone RB. Evidence for a casual association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 709–720.
33. Mork L, Lie AK, Glatte E ve ark. Human papillomavirus infection as a risk factor for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 2001; 344: 1125–1131.
34. Clifford GM, Smith JS, Franceschi S. Comparison of HPV type distribution in high-grade cervical lesions and cervical cancer: a metaanalysis. *Br J Cancer* 2003; 89: 101–105.
35. De Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *J Virol* 2004; 324 (1): 17-27.
36. 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 (6): 518-527.
37. Ramael M, Gudleviciene Z, Didziapetriene J. Natural history and biological behaviour of human papillomavirus: implications for cervical cancer screening. *ACTA Medica Lituanica* 2004; 11(3): 1-7.
38. Harald zur H. Papillomaviruses and cancer: From basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 342-350.
39. Münger K, Baldwin A, Edwards KM et al. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J Virol* 2004; 78 (21): 11451-11460.

40. Donna D, Kathleen CT, Kenneth RS. Human papillomavirus testing and molecular markers of cervical dysplasia and carcinoma. *Cancer (cancer cytopathology)* 2007; 111(1): 1-12.
41. Motoyama S, Cecilia AL, Villanueva SL, Maruo T. The role of Human papillomavirus in the molecular biology of cervical carcinogenesis. *Kobe J Med Sci* 2004; 50 (1): 9-19.
42. <http://www.istanbulgenetik.com/hpv-dna-testi/>
43. Heilmann V, Kreienberg R. Molecular biology of cervical cancer and its precursors. *Current Science Inc* 2002; 2: 27-33.
44. Zhi-Ming Z, Carl CB. Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. *Front Biosci* 2006; 11: 2286–2302.
45. Howley PM. The molecular biology of papillomavirus transformation. *Am J Pathol* 1983; 113 (3): 414-421.
46. Doorbar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci(Lond)* 2006; 110 (5): 525-541.
47. Christy M, Laimonis A. Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. *Rev Med Virol* 2006; 16: 83–97.
48. John T, Laurie K, Thomas BS, Kenneth R. Shroyer MD. Human papillomavirus: molecular and cytologic/histologic aspects related to cervical intraepithelial neoplasia and carcinoma. *Human Pathology* 2008; 39: 154–166.

49. Burd EM. Human papillomavirus and cervical cancer. Clin Microbiol Rev 2003;16: 1-17.
50. Syrjanen SM, Syrjanen KJ. New concepts on the role of human papillomavirus in cell cycle regulation. Ann Med 1999; 31: 175–187.
51. Frauke F, Laimonis AL. Human papillomaviruses: Targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation. Oncogene 2003; 22: 5201–5207.
52. Yim EK, Park JS. The role of HPV E6 and E7 oncoproteins in HPV-associated cervical carcinogenesis. Cancer Res Treat 2005; 37(6): 319-324.
53. Kubbutat MH, Vousden KH. Role of E6 and E7 oncoproteins in HPV-induced anogenital malignancies. Sem Virol 1996; 7: 295-304.
54. Doorbar J. The papillomavirus life cycle. J Clin Virol 2005; 32 (1): 7–15.
55. Milde-Langosch K, Riethdorf S, Löning T, et al. Association of human papillomavirus infection with carcinoma of the cervix uteri and its precursor lesions: theoretical and practical implications. Virchows Arch 2000; 437: 227-233.
56. Stanley M.A, Pett MR, Coleman N. HPV: from infection to cancer Biochemical Society Transactions 2007; 35 (6): 1456-1460.
57. Termine N, Panzarella V, Falaschini S, Russo A, Matranga D, Lo Muzio L, et al. HPV in oral squamous cell carcinoma vs head and

neck squamous cell carcinoma biopsies: a meta-analysis (1988-2007). *Ann Oncol* 2008; 19 (10): 1681-1690.

58. Zarakolu IP. Cinsel yolla bulaşan enfeksiyonlar. *Hacettepe Tıp Dergisi* 2006; 37: 24-28.
59. Anna-Barbara M. Impact of HPV infection in adolescent populations. *J Adolesc Health* 2005; 37: 3–9.
60. Lutzner MA. The human papillomaviruses. *Arch Dermatol* 1983; 119: 631-635.
61. McDougall JK, Beckmann AM, Kiviat NB. Methods for diagnosing papillomavirus infection. *Ciba Found Symp* 1986; 120: 86-103.
62. Ramoz N, Rueda LA, Bouadjar B, et al. Mutations in two adjacent novel genes are associated with epidermodysplasia verruciformis. *Nat Genet* 2002; 32: 579-581.
63. Durso BC, Pinto JM, Jorge JJ, de Almeida OP. Extensive focal ephitelial hyperplasia: case report. *J Can Dent Assoc* 2005; 71 (10): 769-771.
64. Koutsky L. Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Am J Med* 1997; 102: 5-8.
65. Gunter J. Genital and perianal warts: new treatment opportunities for human papillomavirus infection. *Am J Obstet Gynecol* 2003; 189: 3-11.

66. 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- 2063.
67. Wiley DJ. Genital warts. *Clin Evid* 2003; 9: 1741-1753.
68. Roden RB, Lowy DR, Schiller JT. Papillomavirus is resistant to desiccation. *J Infect Dis* 1997;176: 1076-1079.
69. Trottier H, Burchell AN. Epidemiology of mucosal Human papillomavirus infection and associated disease. *Public Health Genomics* 2009; 12: 291-307.
70. Grassmann K, Kratzer F, Petry KU, Iftner T. Functional characterization of naturally occurring mutants of human papillomavirus type 16 with Large deletions in the non-coding region. *Int J Cancer* 1996; 68 (2): 265-269.
71. <http://anacondapharma.com/index.php?page=markets-for-hpv-treatments>. Erisim tarihi: 06.12.2009.
72. Freeman H, Wigrove B. Excess Cervical cancer mortality: A marker for low Access to health care in poor communities. NIH Pub. No. 05-5282. Rockville, MD: National Cancer Institute, Centre to Reduce Cancer Health Disparties, 2005.
73. 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.

74. Bohmer G, van den Brule AJ, Brummer O, et al. No confirmed case of human papillomavirus DNA negative cervical intraepithelial neoplasia dereceli 3 or invasive primary cancer of the uterine cervix among 511 patients. Am J Obstet Gynecol 2003; 189: 118-120.
75. <http://e-cervicalcancer.com/cervical-cancer-stage-iii/>
76. Te Linde's Operative Gynecology. Dokuzuncu Basım (Türkçe Basım) ed. Rock J, Jones HW. Bölüm 45-46: 1231-1235, 1252, 1254.
77. Monk BJ, Tewari KS. The spectrum and clinical sequelae of human papillomavirus infection. Gynecol Oncolog 2007; 107: 6-13.
78. Atasü T, Aydın K. Jinekolojik Onkoloji. 2nd. baskı, 1999, 178-259.
79. Buckley CH, Butler EB, Fox H. Cervical intra epithelial neoplasia. J Clin Pathol 1982; 35(1): 1-13.
80. Diane S, Diane D, Robert K et al. Bethesda System Terminology for Reporting Results of Cervical Cytology 2002; 287: 2114-2119.
81. Atasü T, Şahmay Ş. Jinekolojide eksfoliyatif sitoloji. Jinekoloji. 2nd baskı, İstanbul: Logos, 2001: 91-102.
82. Atasü T, Aydın K. Serviks embriyolojisi ve histolojisi. Jinekolojik Onkoloji. 2nd baskı, İstanbul: Logos, 1999:178-225.
83. Koyuncu E. Taksim eğitim ve araştırma hastanesi kadın hastalıkları ve doğum polikliniğine başvuran hastaların servikal sitolojilerinin servikal kanser risk faktörlerine göre analizi – normal ve anormal

sitolojik sonuçlarda yüksek onkojenik riskli HPV prevalansı. Uzmanlık tezi. İstanbul: Sağlık Bakanlığı Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniği; 2006.

84. Burger RA, Creasman WT, Disaia PJ, Monk BJ, Mutch DG. invazif serviks kanser. In DiSaia PJ, Creasman WT, editors. Klinik Jinekolojik Onkoloji 6nd baskı, Ankara: Güneş Kitabevi, 2003: 53-111.
85. Culp TD, Cristensen ND. Kinetics of in vitro adsorption and entry of papillomavirus virions. J Virol 2004; 319 (1): 152-161.
86. Day PM, Baker CC, Lowy DR, Schiller JT. Establishment of papillomavirus infection is enhanced by promyelocytic leukemia protein (PML) expression. Proc Natl Acad Sci USA 2004; 101 (39): 14252-14257.
87. Munger K, Basile JR, Duensing S, Eichten A, Gonzalez SL, Grace M, et al. Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein. Oncogene 2001; 20(54): 7888-7898.
88. Steger G, Corbach S. Dose-dependent regulation of the early promoter of human papillomavirus type 18 by the viral E2 protein. J Virol 1997; 71 (1): 50-58.
89. Safi Öz Z. Koilosit oluşumuna insan papilloma virüs proteinleri ile yaklaşım. J Med Marmara 2010; 23(1); 60-66.
90. Finnen RL, Erickson KD, Chen XS, Garcea RL. Interactions between papillomavirus L1 and L2 capsid proteins. J Virol 2003; 77 (8): 4818-4826.

91. Shingleton HM, Thompson JD. Cancer of the cervix. In John AR, Thompson JD, editors. The Linde's Operative Gynecology. 8th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven 1997; 1413-1500.
92. Schapiro F, Sparkowski J, Adduci A, et al. Golgi alkalization by the papillomavirus E5 oncoprotein. J Cell Biol, 2000; 148: 305-315.
93. Hatch KD. Handbook of colposcopy. Diagnosis and treatment of Lower Genital Tract Neoplasia and HPV Infections. Boston: Little, Brown and Co 1989; 7-19.
94. Madeleine MM, Dailing JR, Carter JJ et al. Cofactors with human papillomavirus in a population-based study of vulvar cancer. J Natl Cancer Inst 1997; 89: 1516-1523.
95. Onan MA, Taskiran C, Bozdayi G ve ark. 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): 632-635.
96. International Agency for Research on Cancer. Human Papillomaviruses, Vol. 64. Geneva: World Health Organization, 1995.
97. Özçelik B. Vulva kanseri ve human papilloma virüs ilişkisi. Türkiye Klinikleri J Gynecol Obst-Special Topics 2009; 2 (1): 19-23.
98. Benard VB, Johnson CJ, Thompson TD, et al. Examining the association between socioeconomic status and potential human papillomavirus-associated cancers. Cancer 2008; 113: 2910-2918.

99. Altun M. Nazofarinks kanserleri, Baş-boyun kanserleri. 1. Baskı. Bursa: Nobel Tıp Kitabevleri 2003. 141-183.
100. Öktem F, Aydın S, Öz F, Toprak M, Ada M. Baş - boyun kanserlerinde human papilloma virüs enfeksiyonunun rolü. K.B.B. ve Baş Boyun Cerrahisi Dergisi 2000; 8 (1): 51 -57.
101. Smigiel R, Sasiadek M, Krecick T. Inactivation of cyclin dependent kinase inhibitor 2A (CDKN2A) gene in squamous cell carcinoma of the larynx. Mol Carcinog 2004; 39: 147-154.
102. Gillison ML, D' Souza G, Westra W, Sugae E, Xiao W, Begum S, et al. Distinc risk factor profiles for human papillomavirus type 16- positive and human papillomavirus type- negativehead and neck cancers. J Natl Cancer Inst 2008; 100 (6): 407-420.
103. Syrjanen S. Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. J Clin Virol 2005; 32 (1): 59-66.
104. Sessions RB, Harrison LB, Forastiere AA. Tumors of the larynx and hypopharynx. In: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA, eds: Cancer: Principles and Practice of Oncology. 6th ed. Philadelphia, Pa: Lippincott Williams& Wilkins 2001, 861-885.
105. Syrjönen KJ. HPV infections in benign and malignant sinonasal lesions. J Clin Pathol 2003; 56: 174-181.

106. Fregonesi PAG, Teresa DB, Duarte RA. P16INK4A immunohistochemical overexpression in premalignant and malignant oral lesions infected with human papillomavirus. *J Histochem Cytochem* 2003; 51(10): 1291-1297.
107. Larynx and trachea. In: Rosai J, editor. *Surgical Pathology*. 9th ed. Edinburg London Newyork 2004, 305-358.
108. Kirchner JA, Carter D, Pathology of the Larynx, Chapter 22: In *Diagnostic Surgical Pathology*. 3rd ed. Editor Sternberg S S. Lippincot Williams & Wilkins. Philadelphia, Baltimore, Newyork 1999, 925-948.
109. Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2006. *CA Cancer J Clin* 2006; 56: 106-130.
110. Uronis HE, Bendell JC. Anal cancer: an overview. *Oncologist* 2007; 12: 524-534.
111. 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: 1500-1510.
112. Bosch FX, de Sanjose S, Castellsague X. Understanding the origin of cervical cancer. In: preville W, Davies P, eds. *The Health professional's HPV Handbook*. UK; Taylor and Francis Group: 2004, 41-54.

113. Carmichael JA, Maskens PD. Cervical dysplasia and HPV. *Am J Obstet Gynecol* 1989; 169: 916-918.
114. Cruickshank ME. The role of human papillomavirus in risk management. *Reviews in Gynecol Pract* 2003; 3: 229-233
115. Yüce K. HPV enfeksiyonu geçiş yolları ve korunma. *Türkiye Klinikleri J Gynecol Obst-Special Topics* 2009; 2 (1): 82-85.
116. Krebs HB. Management strategies in HPV. *Clin Obstet Gynecol* 1989; 32: 200-212.
117. Moscicki AB, Hills N, Shiboski S et al. Risks for incident human papillomavirus infection and low-dereceli squamous intraepithelial lesion development in young females. *J Am Med Assoc* 2001; 285: 2995–3002.
118. Garcea RL, DiMaio D. *The Papillomaviruses*. Springer Science Business Media, LLC. 2007.
119. Frazer IH. Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination. *Nat Rev Immunol* 2004; 4: 46-54.
120. Bradley J, Barone TM, Mahe C, Lewis R, Luciani S. Delivering cervical cancer prevention services in low-resource setting. *International Journal of Gynecology and Obstetrics* 2005; 89: 21-29.
121. Silins I, Avall-Lundqvist E, Tadesse A, et al. Evulation of antibodies to human papillomavirus as prognostic markers in cervical cancer patients. *Gynecol Oncol* 2002; 85(2): 333-338.

122. Cox JT. The development of cervical cancer and its precursors: what is the role of human papillomavirus infection? *Curr Opin Obstet Gynecol* 2006; 18(1): 5-13.
123. Cates WJ. Estimates of the incidence and prevalence of sexually transmitted diseases in the United States American SocialHealth Association Panel. *Sex Transm Dis* 1999; 26 (4): 2-7.
124. Scheurer ME, Tortolero G, Adler K. Human papillomavirus infection: biology, epidemiology, and prevention. *Int J Gynecol Cancer* 2005; 15: 727-746.
125. Smith JS, Melendy A, Rana RK, Pimenta JM. Age-specific prevalence of infection with human papillomavirus in females: a global review. *J Adolesc Health* 2008; 43(4): 5-25.
126. Bauer HM, Hildesheim A, Schiffman MH, Glass AG, Rush BB, Scott DR, Cadell DM, Kurman RJ, Manos MM. Determinants of genital human papillomavirus infection in low-risk women in Portland, Oregon. *Sex Trasm Dis* 1993; 20 (5): 274-278.
127. Villiers EM. Papillomavirus and HPV typing. *Clin Dermatol* 1997; 15: 199–206.
128. Burk RD, Kelly P, Feldman J, et al. Declining prevalence of cervicovaginal human papillomavirus infection with age isindependent of other risk factors. *Sex Transm Dis* 1996; 23: 333-341.

129. Kevin A. Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections in the female genital tract. *Infect Dis Obstet Gynecol* 2006; 40470:1-5.
130. Yarkın F, Vardar MA. Hpv immunolojisi ve natürel enfeksiyonlar. *Türkiye Klinikleri J Gynecol Obst-Special Topics* 2009; 2 (1): 43-47.
131. Andersson S, Hansson B, Norman I, et al. Expression of E6/E7 mRNA from high risk human papillomavirus in relation to CIN dereceli, viral load and p16INK4a. *Int J Oncol* 2006; 29: 705-711.
132. Gerberding J. Report to Congress: Prevention of genital human papillomavirus infection. Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention, Department of Health and Human Services; 2004.
133. Durst M, Kleinheinz A, Hotz M, et al. The physical state of human papillomavirus type 16 DNA in benign and malignen genital tumours. *J Gen Virol* 1985; 66 (7): 1515-1522.
134. Gillison ML, Shah KV. Human papillomavirusassociated head and neck squamous cell carcinoma: mounting evidence for an etiologic role for human papillomavirus in a subset of head and neck cancers. *Curr Opin Oncol* 2001; 13: 183–188.
135. Reed A, Califano J, Cairns P, et al. High frequency of p16 (CDKN2/MTS1/INK4A) inactivation in head and neck squamous celi carcinorna. *Cancer Res* 1996; 56: 3630-3633.
136. Giuliano AR, Harris R, Sedjo RL et al. Incidence, prevalence, and clearance of type-specific human papillomavirus infections: the Young Women's Health Study. *J Infect Dis* 2002; 186: 462-469.

137. İyibozkurt C, Berkman S. HPV testleri ve HPV tespitinde yeni yöntemler. Türkiye Klinikleri J Gynecol Obst-Special Topics 2009; 2 (1): 38-42.
138. Van Hamont D, Bekkers RLM, Massuger LFAG, Melchers WJG. Detection, management, and follow-up of pre-malignant cervical lesions and the role for human papillomavirus. Rev Med Virol 2008; 18: 117-132.
139. 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.
140. Ronco G, Segnan N, Giorgi-Rossi P, et al. Human papillomavirus testing and liquid-based cytology: results at recruitment from the new technologies for cervical cancer randomized controlled trial. J Natl Cancer Inst 2006; 98: 765-774.
141. 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: 4717-4723.
142. Davies P, Kornegay J, Iftner T. Current methods of testing for human papillomavirus. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol 2001; 15: 677-700.
143. 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.

144. van Doorn LJ, Kleter B, Quint WG. Molecular detection and genotyping of human papillomavirus. *Expert Rev Mol Diagn* 2001; 94: 402-407.
145. van Doorn LJ, Quint W, Kleter B, et al. Genotyping of human papillomavirus in liquid cytology cervical specimens by the PGMV line blot assay and the SPF(10) line probe assay. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 979-983.
146. 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.
147. 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.
148. Jiang HL, Zhu HH, Zhou LF, Chen F, Chen Z. Genotyping of human papillomavirus in cervical lesions by L1 consensus PCR and the Luminex xMAP system. *J Med Microbiol* 2006; 55 (6): 715- 720.
149. Arens M. Clinically relevant sequence-based genotyping of HBV, HCV, CMV, and HIV. *J Clin Virol* 2001; 22: 11-29.

150. Varnai AD, Bollmann B, Bankfalvi A, et al. Predictive testing of early cervical pre-cancer by detecting human papillomavirus E6/E7 mRNA in cervical cytologies up to high-dereceli squamoua intraepithelial lesions: diagnostic and prognostic implications. *Oncol Rep* 2008; 19(2): 457-465.
151. Yüce K. HPV enfeksiyonu geçiş yolları ve korunma. *Türkiye Klinikleri J Gynecol Obst-Special Topics* 2009; 2 (1): 82-85.
152. Güngör T, Altinkaya SÖ. Aşılama öncesi ve sonrası nötralizan antikorların etkisi ve uzun dönemde korunma. *Türkiye Klinikleri J Gynecol Obst-Special Topics* 2009; 2 (1): 48-52
153. Schiller JT, Davies P. Science and society: Delivering on the promise: HPV vaccines and cervical cancer. *Nat Rev Microbiol* 2004; 2: 343-347.
154. Borysiewicz LK, Fiander A, Nimako M, Man S, Wilkinson GW, Westmoreland D, et al. A recombinatinant vaccinia virus encoding human papillomavirus types 16 and 18, E6 and E7 proteins as immunotherapy for cervical cancer. *Lancet* 1996; 347: 1523-1527.
155. Douglas RL, John TS. Prophylactic human papillomavirus vaccines. *J Clin Invest* 2006; 116: 1167-1173.
156. Garland SM, Hernandez-Avila M, Wheeler CM, et al. Quadrivalent vaccine against human papillomavirus to prevent anogenital diseases. *N Engl J Med* 2007; 356 (19): 1928-1943.

157. Giannini SL, Hanon E, Moris P, et al. Enhanced humoral and memory B cellular immunity using HPV 16/18 L1 VLP vaccine formulated with the MPL/aluminium salt combination (ASO4) compared to aluminium salt only. *Vaccine* 2006; 24: 5937-5949.
158. Ault KA, Future II Study Group. Effect of prophylactic human papillomavirus L1 virus-like-particle vaccine on risk of cervical intraepithelial neoplasia dereceli 2, dereceli 3, and adenocarcinoma in situ: a combined analysis of four randomized clinical trials. *Lancet* 2007; 369: 1861-1868.
159. Lowy DR, Schiller JT. Papillomaviruses and cervical cancer: pathogenesis and vaccine development. *J Nat Canc Inst Monog* 1998; 23: 27-30.
160. Scholten KB, Schreurs MW, Ruizendaal JJ, et al. Preservation and redirection of HPV 16 E7-specific T cell receptors for immunotherapy of cervical cancer. *Clin Immunol* 2005; 114: 119-129.
161. Altun Z. Çukurova bölgesindeki kadınlarda Genital human papillomavirus enfeksiyon prevalansı. Doktora tezi. Adana: Çukurova Üniversitesi; 2009.
162. Pratt D, Goldenthal K, Gerber A. Discussion of possible endpoints for licensure of human papillomavirus (HPV) vaccines. FDA briefing document. Vaccines and Related Biological Products Advisory Committee Meeting, Jan 18, 2006.
163. Dünder İ, Kahraman K. Serviks kanserinde maliyet unsuru ve HPV aşılarının beklenen sonuçları. *Türkiye Klinikleri J Gynecol Obst-Special Topics* 2009; 2 (1): 69-77.

164. Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 1980; 16: 111-120.
165. Yazıcı F, Çelik Ç. HPV ve ekstrasjenital organ karsinomları. *Türkiye Klinikleri J Gynecol Obst-Special Topics* 2009; 2 (1): 29-33.
166. İnal MM, Köşe S, Yıldırım Y ve ark. The relationship between human papillomavirus infection and cervical intraepitelyal neoplasia in Turkish women. *Int J Gynecol Cancer* 2007; 17: 1266–1270.
167. Altuğoğlu I, Terek MC, Ozacar T, Ozsaran AA, Bilgiç A. The prevalence of human papillomavirus DNA in woman with mucopurulent endocervicitis. *Eur J Gynaecol Oncol* 2002; 23 (2): 166-168.
168. Özçelik B, Serin IS, Gökahmetoğlu S, Başbuğ M, Erez R. Human papillomavirus frequency of woman at low risk of developing cervical cancer: a preliminary study from Turkish university hospital. *Eur J Gynaecol Oncol* 2003; 24(2): 157-159.
169. Kaynak F, Türet S, Kadioğlu İ, Taner Z, Memiş L. Servikal örneklerde karsinogenik human papillomavirus tiplerinin hibrit capture yöntemi ile araştırılması ve diğer parametrelerle kıyaslanması. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2004; 34: 107-113.

170. Dunne EF, Unger ER; Sternberg M, et al. Prevalence of HPV infection among females in the United States. *JAMA* 2007; 297: 813-819.
171. Schiff M, Becker TM, Masuk M, et al. Risk factors for cervical intraepithelial neoplasia in Southwestern American Indian women. *Am J Epid* 2000; 152: 716-726.
172. Gerce M, Husnjak K, Bozikov J ve ark. Evaluation of genital human papillomavirus infections by polymerase chain reaction among Croatian women. *Anticancer Res* 2001; 21: 579-584.
173. Amrani M, Lalaoui K, El Mzibri M, Lazo P, Belabbas MA. Molecular detection of human papillomavirus in 594 uterine cervix samples from Moroccan women (147 biopsies and 447 swabs). *J Clin Virol* 2003; 27: 286-295.
174. Maria TS, Paola L, Elvira B et al. Comparison of the digene hc2 assay and the roche amplicor Human papillomavirus (HPV) test for detection of high-risk hpv genotypes in cervical samples. *J Clin Micro* 2006; 44: 2141–2146.
175. Lorincz AT. Screening for cervical cancer: new alternatives and research. *Salud Publica Mex* 2003; 45 (3): 376- 387.

176. Bosch FX, Burchell AN, Schiffman M ve ark. Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections and type-specific implications in cervical neoplasia. *Vaccine* 2008; 26 (10): 1-16.
177. Erkmen E, Simsek M, Sapmaz E et al. Bölgemizdeki serviks kanseri vakalarında HPV 16 ve 18 genomlarının PCR yöntemi ile araştırılması. *Jinekolojik Onkoloji Dergisi* 2002; 5: 75-79.
178. Polat A, Aydın Ö, Düsmez D, et al. Mersin ilinde 1989-1999 yılları arasında görülen kadın genital sistem tümörlerinin dağılımının değerlendirilmesi. *Türk Patoloji Dergisi* 2000; 16: 34-38.
179. Tuncer S, Ustaçelebi S, et al. Servikal biyopsi örneklerinde insan papillomavirüsleri tip 16 ve 18'in polimeraz zincir reaksiyonu ile saptanması. *Flora* 1996; 1: 40-44.
180. Ter Harmsel B, Smedts F, Kuijpers J, Van Muyden R, Oosterhuis W, Quint, W. Relationship between Human papillomavirus type 16 in the cervix and intraepithelial neoplasia. *Obstet Gynecol* 1999; 93: 46-50.
181. Williams OM, Hart KW, Wang ECY, Gelder CM. Analysis of CD4⁺ T-Cell Responses to Human Papillomavirus (HPV) Type 11 L1 in Healthy Adults Reveals a High Degree of Responsiveness and Cross-Reactivity with Other HPV Types. *J Virol* 2002; 74:18–7429.

182. Briolat J, Dalstein V, Saunier M et al. 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): 2198-2204.
183. Baseman JG, Koutsky LA. The epidemiology of human papillomavirus infections. *J Clin Virol* 2005; 32: 16-24.
184. Sellors JW. Anogenital Human Papillomavirus infection. *Canadian Family Physician* 1994; 40: 93-101.
185. International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer. Cervical carcinoma and reproductive factors: collaborative reanalysis of individual data on 16,563 women with cervical carcinoma and 33,542 women without cervical carcinoma from 25 epidemiological studies. *Int J Cancer* 2006; 119 (5): 1108-1124.
186. Schneider A, Kirchhoff T, Meinhardt G, Gissmann L. Repeated evaluation of human papillomavirus 16 status in cervical swabs of young women with a history of normal papanicolaou smears. *Obstet Gynecol* 1992; 79 (5): 683-688.
187. Smith EM, Johnson SR, Jiang D, et al. The association between pregnancy and Human papillomavirus prevalence. *Cancer Detect Prev* 1991;15 (5): 397-402.
188. Köse F, Turan T. Servikal kanser tümörögenezi ve HPV. *Türkiye Klinikleri J Gynecol Obst-Special Topics* 2009; 2 (1): 13-18.

189. Ergünay K, Mısırlıoğlu M, Pınar F, Tuncer ZS, Tuncer S, Ustaçelebi S. Human papillomavirus DNA in cervical samples with cytological abnormalities and typing of the virus. *Mikrobiyol Bul* 2007; 41 (2): 219-226.
190. Philip E. Castle, Mark Sadorra, Francisco Garcia, E. Blair Holladay, Janet Kornegay. Pilot Study of a Commercialized Human Papillomavirus (HPV) Genotyping Assay: Comparison of HPV Risk Group to Cytology and Histology. *J Clin Micro* 2006; 3915–3917.
191. Manjarrez ME, Ocadiz R, Valle L, et al. Detection of human papillomavirus and relevant tumor suppressors and oncoproteins in laryngeal tumors. *Clin Cancer Re* 2006; 12 (23): 6946-6951.
192. 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.
193. Fouret P, Martin F, Flahault A, Saint-Guily JL. Human papillomavirus infection in the malignant and premalignant head and neck epithelium. *Diagn Mol Pathol* 1995; 4: 122-127.
194. Akyol MU, Sungur AA, Turan E, Ruacan S, Hosal N. Rekurrent respiratuar papillomatoziste human papillomavirus enfeksiyonu. *Kulak Burun Boğaz ve Baş Boyun Cerrahisi Dergisi* 1993; 1 (3): 120-124.

195. Güvenç MG, Midilli K, İnci E, ve ark. Larenksin primer karsinomlarında human papillomavirüs (HPV) varlığının ve larenks karsinomu ile HPV ilişkisinin araştırılması. XXVII. Türk Ulusal Otolarengoloji ve Baş Boyun Cerrahisi Kongresi, Antalya. 1997; 506.
196. Yıldırım F. Skuamöz hücreli larinks kanserlerinde; human papillomavirüs varlığı, tp53 ve e-kaderin ekspresyonları ve bulguların klinikopatolojik değişkenlerle ilişkisinin araştırılması. Uzmanlık tezi. Adana: Çukurova Üniversitesi; 2009.
197. Tutkun A, İnanlı S, Dadaşzade N, Öztürk Ö, Batman Ç, Şehitoğlu MA. Larinks skuamöz hücreli karsinomlarında in situ hibridizasyon yöntemi ile HPV araştırılması 25. Ulusal Türk Otorinolarengoloji ve Baş-Boyun Cerrahisi Kongresi, İzmir. 18-22 Eylül, 1999.
198. Deilson EO, Maura M. Bacchi, Ricardo SS. Macarenco, José VT, Ricardo CC, Carlos EB. Human Papillomavirus and Epstein-Barr Virus Infection, p53 Expression, and Cellular Proliferation in Laryngeal Carcinoma. Am J Clin Pathol 2006; 126: 284-293.
199. Brandvvein MS, Zeitlin J, Nuovo GJ, et al. HPV detection using hot start polymerase chain reaction in patients with oral cancer: a clinicopathologicalstud of 64 patients. Mod pathol 1994; 1: 120-121.
200. Clayman GL, Stewart MG, Weber RS, Naggar AK, Grimm EA. Human papillomaviruses in laryngeal squamos celi carcinomas. Intl J Cancer 1990; 46: 8-11.

201. Cruz IBF, Snuders PJF, Steenbergen RDM, et al. Age dependence of human papillomavirus. DNA peresence in oral squamous cell carcinomas. Oral Oncol Eur J Cancer 1996; 32: 55-62.

EKLER



T.C
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ YEREL ETİK KURULU
RESEARCH ETHICS COMMITTEE OF MEDICAL FACULTY, GAZİ UNIVERSTY
ANKARA-TÜRKİYE
ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAYI
İLAÇ DIŞI KLİNİK ÇALIŞMALAR

BAŞVURU BİLGİLERİ	PROTOKOL ADI	"Baş-boyun ve serviks kanserli hastalarda polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile Human Papilloma Virüs pozitifliği tesbit edilen sonuçların DNA dizi analizi ile doğrulanması, prevalansının belirlenmesi ve filogenetik analizlerinin yapılması"	
	SORUMLU ARAŞTIRICI UNVANI, / ADI	Doç.Dr.Gülendam Bozdayı	
DEĞERLENDİRİLEN İLGİLİ BELGELER	Belge Adı	Tarihi / değişiklik No.su	Dili Türkçe
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ		
KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 108	Tarih : 23 Şubat 2009	
	Üniversitemiz Tıp Fakültesinde yapılması tasarlanan ve yukarıdaki künyede kayıtlı araştırma projesine ait dosya; araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım, yöntemler ve aydınlatılmış onamın yeterliliği yönünden incelenmiş, bütçe dışında uygun olduğuna karar verilmiştir. Etik Kurul kararı; projenin bütçesi BAP tarafından kabul edildiği takdirde yürürlüğe girecek olup, BAP kararının Etik Kurula bildirilmesi gerekmektedir.		

ETİK KURUL BİLGİLERİ

ÇALIŞMA ESASI İYİ KLİNİK UYGULAMALAR KILAVUZU, HELSİNKİ BELGESİ, BİYOTİK SÖZLEŞMESİ

UYELER

Unvanı / Adı / Soyadı Üyeliği	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki (*)	Katılım (**)	İmza
Prof.Dr.Necla BUYAN BAŞKAN	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları - Nefroloji	G.Ü.T.F Çocuk Sağ.ve Hast.A.D.	K	x	E xx	H E
Prof. Dr.Firdevs Aktaş ÜYE	Enfeksiyon	G.Ü.T.F Enfeksiyon Hast. A.D.	K	x	E xx	H E
Prof. Dr.Aysel ARICIOĞLU ÜYE	Tıbbi Biyokimya	G.Ü.T.F Tıbbi Biyokimya A.D.	K	x	E xx	H E
Prof.Dr.Fatma ATALAY ÜYE	Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon	G.Ü.T.F Fiziksel Tıp ve Reha.A.D.	K	x	E xx	H E
Prof.Dr.Çağatay ÇİFTER ÜYE	Genel Cerrahi	G.Ü.T.F Genel Cerrahi A.D.	E	x	E xx	H E
Prof.Dr.Seyhan ERSAN ÜYE	Farmasötik Kimya Ecz. Fak.	G.Ü.E.F (Ecz.Fak.) Farmasötik Kimya	K	x	E xx	H E
Prof.Dr.Reha KURUOĞLU ÜYE	Nöroloji	G.Ü.T.F Nöroloji A.D.	E	x	E xx	H E
Doç.Dr.Nesrin ÇOBANOĞLU ÜYE	Tıp Etiği ve Tıp Tarihi	G.Ü.T.F Tıp Etiği ve Tıp tarihi A.D.	K	x	E xx	H E
Doç.Dr.Mehmet Ali Ergün ÜYE	Tıbbi Genetik	G.Ü.T.F Tıbbi Genetik A.D.	E	x	E xx	H E
Doç.Dr.Aylar POYRAZ ÜYE	Tıbbi Patoloji	G.Ü.T.F Tıbbi Patoloji A.D.	K	x	E xx	H E
Doç.Dr.Canan ULUOĞLU ÜYE	Tıbbi Farmakoloji	G.Ü.T.F Tıbbi Farmakoloji A.D.	K	x	E xx	H E
Doç.Dr.Münci YAĞCI ÜYE	İç Hastalıkları - Hematoloji	G.Ü.T.F İç Hastalıkları A.D.	E	x	E xx	H E
Doç.Dr.Birol DEMİREL ÜYE	Adli Tıp	G.Ü.T.F Adli Tıp A.D.	E	x	E xx	H E
Hukuk Müşaviri Adem GELİR ÜYE	Hukuk Müşavirliği	Rektörlük Hukuk Müşavirliği	E	x	E X	H H

* Araştırma ile İlişki
** Katılımda Bulunma

TEŞEKKÜR

Tez konumun seçilmesinde ve hazırlanmasında, tüm pratik çalışmalarında bana yol gösteren, yardımlarını ve desteğini esirgemeyen danışman hocam Sayın Doç. Dr. Gülendaml BOZDAYI' ya, ayrıca Tıbbi Mikrobiyoloji AD. Başkanı'mız Sayın Prof. Dr. Semra KUŞTİMUR'a, Kulak Burun Boğaz AD. öğretim üyesi Prof. Dr. Yusuf KEMALOĞLU'na, Kadın Hastalıkları ve Doğum AD. öğretim üyesi Doç. Dr. Çağatay TAŞKIRAN'a, Patoloji AD. öğretim üyesi Sayın Doç. Dr. Özlem ERDEM'e ve istatistik çalışmalarının yapılmasında yardımlarından dolayı Doç. Dr. Seçil ÖZKAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Doktora eğitimim boyunca bilgileri ile bana yol gösteren Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nın değerli öğretim üyeleri Prof.Dr. Turgut İMİR'e, Prof.Dr. Nedim SULTAN'a, Prof.Dr. Seyyal ROTA'ya, Prof.Dr. Meltem YALINAY ÇIRAK'a, Doç.Dr. Kayhan ÇAĞLAR'a, Doç.Dr. Ayşe KALKANCI'ya, Doç.Dr. Işıl FİDAN'a, Doç.Dr. Funda DOĞRUMAN AL'a teşekkür ederim.

Çalışmada kullanılan örneklerin toplanmasında bana yardımcı olan Bio. Melda MERAL'e ve tüm Tıbbi Mikrobiyoloji laboratuvarında çalışan arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Bana her zaman güvenen ve hiçbir zaman desteğini esirgemeyen en değerli varlığım canım aileme ve daima yanımda olan sevgili eşime binlerce kez teşekkür ederim.

Gülçin ALP AVCI

ÖZGEÇMİŞ

Adı: Gülçin

Soyadı: ALP AVCI

Doğum Yeri ve Tarihi: Ankara 06.10.1983

Eğitimi:

- 2008-2011 Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Doktora, Ankara,
- 2005-2008 Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Yüksek Lisansı, Ankara,
- 2001-2005 Gazi Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Lisans Eğitimi, Ankara,

Yabancı Dili: İngilizce

Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar:

- Ankara Mikrobiyoloji Derneği
- Biyoteknoloji Derneği
- ECMID
- Türk Biyokimya Derneği
- Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti