

T.C
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ÇUKUROVA BÖLGESİNDEKİ KADINLARDA
GENİTAL HUMAN PAPİLLOMAVİRUS İNFEKSİYON
PREVALANSI

Dr. Zafer ALTUN

DOKTORA TEZİ

TEZ YÖNETİCİSİ
Prof. Dr. Fügen YARKIN

Bu alışma Çukurova Üniversitesi Rektörlüğü Araştırma Fonu TF2007D6 numaralı proje olarak desteklenmiştir.

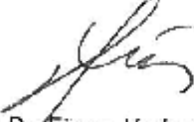
ADANA-2009

KABUL VE ONAY

Mikrobiyoloji Doktora Programı Çerçevesinde yürütülmüş olan
“Çukurova Bölgesindeki Kadınlarda Genital Human Papillomavirus Enfeksiyon Prevalansı”
adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tarihi: 16/10/2009

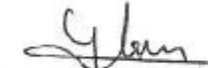
TEZ SINAV JÜRİSİ


Prof. Dr. Fügen Yarkın
Çukurova Üniversitesi
Başkan


Prof. Dr. Fatih Köksal
Çukurova Üniversitesi
Üye


Prof. Dr. M. Ali Yavuz
Çukurova Üniversitesi
Üye


Prof. Dr. Akgün Yaman
Çukurova Üniversitesi
Üye


Prof. Dr. Gönül Aslan
Mersin Üniversitesi
Raportör

Yukarıdaki Tez, Yönetim Kurulunun / / tarih ve sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Halil Kasap
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Tez konusunun seçilmesinde ve hazırlanmasında bana yol gösteren ve desteklerini esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Fügen YARKIN'a, ayrıca sayın hocam Prof. Dr. Fatih KÖKSAL, çalışmam boyunca yardımlarını esirgemeyen Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Jinekolojik Onkoloji Ünitesinde görevli Sayın Prof. Dr. Mehmet Ali VARDAR'a ve tüm personele ayrıca Patoloji Anabilim Dalında görevli Sayın Doç. Dr. Derya GÜMÜRDÜLÜ'ye yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

Asistanlığım süresince birçok şeyi paylaştığımız asistan arkadaşlarımıza ve personelimize, çok değerli anneme, her zaman yanımda olan sevgili eşime teşekkürlerimi sunarım. Son olarak, aramızdan ayrıldığından beri varlığını hep yanımda hissettiğim babama sevgi ve saygılarımı sunuyorum.

Dr. Zafer ALTUN

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
KABUL VE ONAY	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
TABLolar DİZİNİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	viii
ÖZET	ix
ABSTRACT	x
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Tarihçe	3
2.2. Sınıflandırma	5
2.3. Virusun Biyolojisi	7
2.3.1. Human papillomavirusun Yapısı ve Genel özellikleri	7
2.3.2. Human papillomavirusun Proteinleri	8
2.3.2.1. E1 ve E2 Proteinleri	8
2.3.2.2. E6 ve E7 Proteinleri	9
2.3.2.3. E4 Proteini	11
2.3.2.4. E5 Proteini	11
2.3.2.5. Geç Bölge L1 ve L2 Proteinleri	12
2.4. Patogenez	13
2.4.1. HPV ve Hastalık	13
2.4.2. HPV İnfeksiyonunun Doğal Seyri	14
2.4.3. Normal Prodüktif İnfeksiyon	14
2.4.4. HPV İnfeksiyonunun Oluşması	15
2.4.5. Hücre Proliferasyonunun Stimülasyonu	16
2.4.6. Genom Amplifikasyonu	18

2.4.7. Virus Montajı ve Salınımı	19
2.5. Klinik	20
2.5.1. Yetişkinlerde Anogenital Siğiller	21
2.5.1.1. Vulva-Vaginal Siğiller	21
2.5.1.2. Perianal Siğiller	22
2.5.1.3. Penil Siğiller	22
2.5.2. HPV'un İnsan Kanseri ile İlişkisi	23
2.5.2.1. Servikal Kanseri	23
2.5.2.2. Vulvar Kanseri	24
2.5.2.3. Anal Kanseri	25
2.6. Epidemiyoloji	25
2.7. Tanı	28
2.7.1. Giriş	28
2.7.2. Sitolojik Test	30
2.7.3. HPV Testi	30
2.7.3.1. Direkt Hibridizasyon Testi	31
2.7.3.2. Sinyal Amplifikasyon Testi	32
2.7.3.3. Nükleik Asit Amplifikasyon Testi	33
2.7.4. Tanıda Kullanılan Yeni Teknolojiler	35
2.7.5. HPV Taramalarında Değerlendirme	36
2.8. HPV İmmünolojisi	38
2.9. HPV Aşıları	40
3. GEREÇ VE YÖNTEM	44
3.1. HPV DNA Ekstraksiyonu	44
3.2. Konsensus PCR ile HPV Amplifikasyonu	46
3.3. Amplifiye Edilen Ürünlerin Agaroz Jel Elektroforezinde Gösterilmesi	47
3.4. Pozitif Bulunan HPV DNA Örneklerinin Tiplendirilmesi	49
4. BULGULAR	51
5. TARTIŞMA	56
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	66
7. KAYNAKLAR	68
8. ÖZGEÇMİŞ	81

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 3.1. PCR amplifikasyon ürünlerinin %2'lik agaroz jeldeki görüntüleri	48
Şekil 3.2. Tip spesifik PCR amplifikasyon ürünlerinin %2'lik agaroz jeldeki görüntüleri	50

TABLÖLAR DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 2.1. Bölgelere göre HPV prevalansı	27
Tablo 4.1. Çalışma grubundaki kadınların yaş gruplarına göre dağılımı	51
Tablo 4.2. Çalışmaya dahil edilen kadınların demografik özellikleri	52
Tablo 4.3. Servikal hücrelerde PCR ile tespit edilen HPV tiplerinin dağılımı	53
Tablo 4.4. Çalışmaya katılan kadınların sitoloji sonuçları ve HPV DNA oranları	54
Tablo 4.5. HPV (+) bulunan 24 spesifik HPV tiplerinin prevalansı	54
Tablo 4. 6. HR HPV (+) bulunan HPV tiplerinin yaşa göre dağılımı	55

SİMGELER VE KISALTMALAR

ABD :	Amerika Birleşik Devletleri
APC :	Antigen presenting cell
ASC-H :	Atypical squamous cells- HSIL dışlanmayan
ASCUS :	Atypical squamous cells of undetermined significance
BMD :	Borderline or mildly dyskaryosis
CIN :	Cervical intraepithelial neoplasia
DNA :	Deoxyribonucleic acid
EIA :	Enzyme-linked immunosorbent assays
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

ÖZET

ÇUKUROVA BÖLGESİNDEKİ KADINLARDA GENİTAL HUMAN PAPİLLOMAVİRUS İNFEKSİYON PREVALANSI

Human papillomavirus (HPV) servikal kanserin major etyolojik ajanıdır. Servikal kanser tüm dünyadaki kadınlar arasında en yaygın ikinci kanserdir. Bu çalışmada bölgemizdeki kadınlarda human papillomavirus infeksiyonunun prevalansının araştırılması amaçlanmıştır. Toplam 460 servikal sitoloji örneği 20-68 yaş arası kadınlardan toplanmıştır. HPV DNA tespiti için MY09/11 ve GP5+/6+ primerleri ile yapılan konsensus PCR (polimerase chain reaction) testi kullanılmıştır. HPV DNA pozitif örnekler HPVpU-1M/pU-2R ve HPVpU-31B/pU-2R primerleri ile sırasıyla yüksek riskli (HR; high risk) ve düşük riskli (LR; low risk) tipler olarak tanımlanmıştır. Ayrıca servikal kanserde en yaygın görülen HR HPV tipleri olan HPV 16, 18, 31 ve 45 için HPV DNA pozitif bulunan örnekler tip spesifik PCR ile genotiplendirilmiştir. Toplam 460 örnekten 24 (% 5,2)'ü HPV DNA için pozitif bulunmuştur. HPV DNA pozitif 24 kadından 14'ünde (% 3) tek veya multiple infeksiyon şeklinde HR HPV tipi ve 10'unda (% 2,2) ise tek başına LR HPV pozitifliği tespit edilmiştir. HPV DNA pozitif 30 yaş ve üstü olan 24 kadında %33,3 oranı ile en sık görülen HR HPV tipi HPV tip 16 olup bunu sırasıyla HPV 45 (%20,8), HPV 18 ve HPV 31 (%4,2) izlemiştir. Sonuç olarak Çukurova bölgesindeki kadınlarda genital HPV infeksiyon prevalansı %5,2 bulunmuştur ve HPV infeksiyonunun epidemiyolojik araştırmalarının servikal kanser tarama stratejilerinin geliştirilmesi ve HPV aşılarının uygunluğunun gösterilmesi için gelecekte de sürdürülmesi önerilmektedir.

Anahtar sözcükler: Human papillomavirus, tarama, PCR, servikal kanser, prevalans.

ABSTRACT

THE PREVALENCE OF GENITAL HUMAN PAPILLOMAVIRUS INFECTION AMONG WOMEN IN ÇUKUROVA REGION

Human papillomavirus (HPV) is the major etiologic agent of the cervical cancer. Cervical cancer is the second most common cancer among women worldwide. This study was aimed to investigate the prevalence of human papillomavirus infection among women in our region. Total 460 cervical cytology samples were obtained from women aged between 20-68 years. HPV DNA was detected by consensus PCR (polymerase chain reaction) test using MY09/11 and GP5+/6+ primers. HPV DNA positive samples were identified by HPVpU-1M/pU-2R and HPVpU-31B/pU-2R primers as high risk (HR) and low risk (LR) HPV types respectively. In addition, HPV DNA positive samples were genotyped by type specific PCR for HPV 16, 18, 31 and 45 which are the most common HR HPV types in cervical cancer. From a total of 460 cervical samples, 24 (5.2%) were found to be positive for HPV DNA. Of the 24 HPV DNA positive women, 14 (3%) were positive for HR HPV types as single or multiple infections and 10 (2.2%) had LR HPV types as single infection. The most frequent HPV type was HPV 16 with a rate of 33.3%, followed by HPV 45 (20.8%), HPV 18 and HPV 31 (4.2%) among 24 HPV DNA positive women aged 30 years and older. In conclusion, the prevalence of genital HPV infection was found 5.2% among women in Çukurova region and it is suggested that the epidemiological investigation of HPV infection should be also maintained in future for development strategies of cervical cancer screening and for evaluating appropriateness of HPV vaccines.

Key Words: Human papillomavirus, screening, PCR, cervical cancer, prevalence.

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Human papillomavirus (HPV) bütün dünyada servikal kanserin primer etyolojik ajanı olarak kabul edilmektedir. HPV servikal kanser dışında diğer anogenital kanserler; vulvar, vaginal, anal ve penil kanser ve ayrıca genital siğiller ve respiratuvar papillomamatozis lezyonları ile de ilişkilidir¹.

HPV papillomaviridae ailesinin bir üyesi olup genom dizi analizine göre şimdiye kadar 100'den fazla genotipi identifiye edilmiştir ve 40'dan fazla genotip genital bölgede infeksiyona sebep olur. Genital HPV tipleri servikal kanser ile epidemiyolojik ilişkilerine göre kategorize edilir. HPV genotipleri prekanseröz lezyon ve servikal kanserle ilişkilerine göre yüksek risk (High risk: HR HPV tipleri) ve düşük risk (Low risk: LR HPV tipleri) HPV tipleri olarak sınıflandırılır. Servikal kanserden en az 15 HPV genotipi sorumlu olup en çok izole edilen yüksek risk HPV 16 ve 18 tipleridir. Düşük risk HPV tiplerinden HPV 6 ve 11 ise genital siğillerin %90'ından fazlasında etkindir².

Servikal kanser, bütün dünyada, kadınlarda göğüs kanserinden sonra görülen ikinci en yaygın kanserdir. HPV infeksiyonu cinsel yolla bulaşan en yaygın viral infeksiyonlardan biri olup kadın ve erkeklerin en az %50'si yaşamları boyunca HPV infeksiyonu ile karşılaşır. Dünyada her yıl 470.000'den fazla yeni servikal kanser vakası tanınmakta ve servikal kansere bağlı yaklaşık 250.000 ölüm bildirilmektedir. Servikal kanser vakalarının %75-80'i servikal kanser tarama programlarının etkili bir şekilde yapılmadığı veya uygulanamadığı gelişmekte olan ülkelerde görülür. Servikal kanser, prekanseröz lezyonların tespiti ve tedavisi ile büyük oranda (>%90) önlenabilir bir hastalıktır. Erken tanı etkilidir, çünkü prekanseröz lezyonlar invaziv kansere çok yavaş, genellikle 10 yıldan uzun bir sürede ilerler³.

Servikal prekanseröz lezyonlar sitolojik tarama testi olan Papanicolau (Pap) testi kullanılarak servikal hücrelerin analizi ile tespit edilebilir. Gelişmiş ülkelerde Pap testinin yaklaşık 50 yıldır kullanılması ile servikal prekanseröz lezyonların erken tanısı ve tedavisi sonucu servikal kanserin insidans ve mortalitisinde önemli bir düşüş görülmüştür. Servikal kanser insidansının %70 oranında azalmasına karşılık bu sonuç

beklenenin çok altındadır. Servikal kanserin tam olarak eradike edilememesinin en önemli sebebi yüksek grade skuamöz intraepitelyal lezyonların (HSIL: high-grade squamous intraepithelial lesions) tanısı için Pap testinin sensitivitesinin oldukça düşük, %50-70 arasında olmasıdır. Oysa HSIL'i tespit etmede HPV-DNA testinin sensitivitesi %84-100 arasındadır. HPV-DNA testinin spesifitesi ise %64-95 olup Pap testinin spesifitesi %86-100 oranına benzer veya biraz düşüktür. Servikal kanser ve prekürsör lezyonların %99.7'sinde HPV DNA tespit edilmiştir. HPV infeksiyonu ve servikal kanser arasındaki kuvvetli etyolojik ilişki HPV testinin servikal kanser taramasında servikal kanser ve prekürsörlerinin tespiti için sitolojiye ilaveten yardımcı bir tarama testi olarak veya Pap testine alternatif tek başına bir tarama testi olarak değerlendirilmesine yol açmıştır²⁻⁴.

Servikal kanser taramasında, asemptomatik kadınlarda HPV-DNA testinin kullanımına son yıllarda artan bir ilgi vardır. Bu strateji servikal kanser için riskli populasyonların erken tanınmasını sağlamaktadır, üstelik normal Pap smear ve negatif HPV-DNA testinin negatif prediktif değeri %99-100'dür⁵.

Bu çalışmanın amacı Çukurova bölgesindeki asemptomatik kadınlarda genital HPV infeksiyon prevalansını tespit etmektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe

HPV enfeksiyonunun sebep olduğu siğillerin varlığı Antik Yunan ve Roma'dan bu yana bilinmektedir. İtalyan fizikçi Domenico Rigoni-Stern 1760-1839 tarihleri arasında Verona'da uterus kanserinden ölenleri incelemiştir. Bekarlar ve rahibelerde evli ve dul kadınlara oranla uterus kanserinin çok nadir bulunduğunu gözlemiş ve bunun HPV'ye bağılı olduğunu 1842 yılında kanıtlamıştır⁶. Genetik siğillerin enfeksiyöz özelliğı 20. yüzyılın başlarına kadar fark edilmemiştir.

Papillomavirus araştırmaları birkaç aşamada ilerlemiştir. İnsan ve hayvan siğillerinin deneysel olarak bulaşmasının gösterilmesi ile ilgili çalışmalar 1930'dan önce başlamıştır. İnsanlardaki siğillerin viral etyolojisi ilk kez Ciuffo tarafından ileri sürülmüştür. Ciuffo hücresiz siğil ekstraktlarını kendi eline intradermal olarak inokule etmiş ve yeniden siğil oluşumu ile siğillerin bulaşıcılığını 1907'de açıklamıştır. Papillomatöz lezyon ve kanser arasındaki ilk bağlantının kalıtsal bir hastalık olarak düşünülen Epidermodysplasia verruciformis'in olduğu ilk kez 1922'de rapor edilmiştir, oysaki bu lezyonlara papillomavirusun sebep olduğunun kanıtlanması bundan yıllar sonra 1976 yılında gerçekleşmiştir⁷.

Bu virüslara karşı en büyük ilgi 1930'larda başlamış ve ilk papillomavirus 1933 yılında tanımlanmıştır. Shope 1933'de papillomavirusların retroviruslardan sonra malignensiye sebep olan ikinci virüs olduğunu bildirmiştir. Shope ve Hurst vahşi kuzey Amerika pamuk kuyruklu tavşanlarda (cottontail) oluşan kutanöz papillomlarda papillomavirusu göstermiş ve hastalığın bulaşıcı olduğunu bulmuşlardır. Etken sonradan cottontail rabbit papillomavirus (CRPV) olarak adlandırılmıştır. Evcil cottontail tavşanlarda CRPV'un malign deri lezyonlarına sebep olduğu ilk kez Rous ve Beard tarafından 1935 yılında gösterilmiştir. Böylece papillomavirus enfeksiyonu ile kanser arasındaki ilişki ilk kez açıklanmıştır. Papilloma modeli olarak 1930'lu yılların ortalarından 1940'lı yılların ortalarına kadar cottontail tavşan kültürü yapılmıştır⁸.

Strauss ve arkadaşları 1949 yılında ilk kez insan siğillerinde viral partikülleri elektron mikroskopunda tespit etmişlerdir. İto ve Evans 1961 yılında karsinomanın infeksiyöz papillomavirus DNA'sı içerdiğini göstermişlerdir.

Papillomavirusların 1970'lerin sonuna kadar sadece bazı memeliler ve insanlarda siğil gibi benign kutanöz lezyonlara sebep olduğu biliniyordu ve çok ilgi çeken bir virus değildi. O zamanlar siğiller normal olarak sadece kozmetik bir problemdi, fakat halk sağlığını tehdit eden büyük bir etken değildi. Sadece insan viruslarını içeren neoplazilerin araştırılmasına ilgi vardı. Yeni moleküler biyolojik tekniklerin 1980'lerde geliştirilmesi servikal kanser ve öncül lezyonları, genital ve laringeal siğiller gibi benign ve malign mukozal lezyonların tanımlanmasında yol gösterici olmuştur ve papillomavirus araştırmalarının yaygınlaşmasını sağlamıştır.

Papillomavirus araştırmalarında diğer önemli bir gelişme, 1963 yılında Crawford tarafından viral DNA'nın fiziksel özelliklerinin karakterize edilmesi olmuştur. Servikal kanserin insan Herpes simplex virus tip 2 (HSV-2) ile bağlantılı olduğundan 1968'den beri şüphe edilmekteydi. HSV-2 DNA'sının servikal kanser biyopsilerinde araştırılması sonucu negatif bulunması diğer ajanların araştırılmasını beraberinde getirmiştir.

Servikal kanserlerde human papillomavirusların varlığı deneysel olarak 1972 yılında araştırılmaya başlanmıştır. Bazı çalışmalarda genital lezyonların nadir olarak malign tümörlere dönüştüğü bildirilmiş olup bunun üzerine genital lezyonlarda rastlanacak virusun kansere yol açan ilk aday olduğu görüşü kesinlik kazanmaya başlamıştır. Bu olgu birçok makalede hipotez olarak sunulmuştur. İki çalışma grubu 1970'de aynı anda HPV familyasından bahsetmiş olup bu aileye üye yaklaşık 100 tipin bulunduğunu iddia etmiştir.

HPV ve servikal kanser arasındaki ilişki ilk kez 1976 yılında H. 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. Her ne kadar bu karakterize edilen DNA'lara servikal kanser biyopsilerinde rastlamasa da aynı problemler kullanılarak servikal kanser biyopsilerinde ve anogenital kanser lezyonlarının prekürsörlerinde hibridizasyon tekniği ile HPV 16 ve 18'in belirlenmesini sağlamışlardır.

Sonrasında devam eden çalışmaların birçoğu, test edilen biyopsilerin %70'inde bu iki tipe ait DNA'ya rastladıklarını belirtmişler ve diğer bulunan bazı tiplerin

DNA'larının da biyopsi örneklerinde var olduğunu belirlemişlerdir. Daha sonra analiz edilen servikal kanser biyopsilerinin tümünde HPV DNA'sının varlığı netlik kazanmıştır. Temel olarak HPV 16 ve HPV 18, 31, 33 DNA'sı anogenital kanserlerde kesin infeksiyon ajanı olarak bulunmuş olup bununla birlikte orofaringeal kanserlerin de %25-30'unda bu tiplere ait DNA belirlenmiş ve infeksiyon ajanı olarak değerlendirilmeleri kesinleşmiştir⁷.

2.2. Sınıflandırma

Papillomaviruslar deri ve mukoza epitelini infekte eden DNA virusları olup papillomaviridae ailesinde yer alır. İnsanlarda ve diğer türlerde çeşitli benign ve malign tümörlere sebep olurlar. Papillomavirusların sınırlı konak ve doku spesifiteleri vardır, tür spesifite mekanizması tayin edilmemiştir, fakat muhtemelen virusun bağlanma ve penetrasyonundan ziyade konak regülatör proteinlerine bağlı olabilir⁹.

Papillomaviruslar her yerde olabilirler ve insanlara ilaveten hayvanlarda da saptanabilirler. Önceden elektron mikroskopisi ile yapılan birçok çalışmada papillomaviruslar ve polyomaviruslar arasındaki ilişki araştırılmıştır 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. 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. Farklı genom büyüklükleri, organizasyonları ve farklı replikasyon stratejilerine sahiptirler. Bu sebeple yakın geçmişte Uluslararası Virus Taksonomi Komitesi tarafından polyomaviruslar ve papillomaviruslar iki ayrı aile olarak; polyomaviruslar Polyomaviridae ve papillomaviruslar ise Papillomaviridae ailesi içinde sınıflandırılmıştır¹⁰.

Papillomaviridae ailesinde alfa, beta, gama, mu ve nu olmak üzere beş genus bulunur. En büyük grup olan alfa papilloma genusunda mukozayı infekte eden tipler ile deride yaygın siğillere sebep olan HPV2 gibi kütanoz tipler bulunur. Diğer genuslardaki HPV tipleri deriyi infekte eder. Klinik olarak önemi olan alfa-papillomavirus genusu mukozal ve genital lezyonlarla ilişkili tüm HPV tiplerini içerir. Genital veya mukozal

HPV tipleri olarak tanımlamada bazen çelişkiler olabilir ve alfa papillomavirus olarak isimlendirme bu iki terminolojiden üstündür. Örneğin HPV 6 ve 11 tipik olarak servikte genital siğil veya condylomata acuminata'da bulunur, bu yüzden genital HPV olarak isimlendirilir. Ancak larinks papillomaları gibi non-genital bölgelerde de bulunabilir¹⁰.

Papillomavirus dizi veritabanlarının analizi majör kapsid proteinini kodlayan L1 geninin çok iyi korunmuş olduğunu ve böylece özellikle ailenin sınıflandırılması için uygun olduğunu göstermiştir. Bu sebeple papillomavirusların şimdiki kabul görmüş taksonomisi benzer, fakat aynı olmayan taksonomik grupların klasifikasyonu için diğer genlerin kullanılabilmesine rağmen sadece L1'in nükleotid dizi benzerliğine dayanarak yapılmıştır. 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. Her bir HPV tipi keşif sırasına göre numaralandırılır. Şimdiki veriler 100'den fazla HPV tipinin varlığını desteklemektedir ve muhtemelen henüz tanınmamış yeni tipler vardır. HPV'ların E6, E7 ve L1 gibi bazı gen bölgelerinin open reading frames (ORF)'lerinde, diğer HPV tipleri ile %90'dan az sıra homolojisi varsa yeni bir HPV tipi olarak tanımlanır. Subtip tanımı ise ilk olarak 1980'de restriksiyon paternlerindeki farklılıklara dayanarak kullanılmıştır. HPV genomunun L1 genindeki %2-10 arası farklılık subtipleri belirler. Şimdilik sadece HPV 5, 8, 20, 34, 44, 54, 68 ve 82'nin subtipleri bilinmektedir. Aynı tip izolatların L1 gen nükleotid dizilerinde %2'den daha az farklılıklar ise "variant" olarak isimlendirilir. HPV varyantlarının kodlanmayan LCR (long control region)'sinde %5 ve daha fazla intratipik ayrılık vardır. Son zamanlarda açıkça gösterilmiştir ki erken-geç intergenik bölge, E4 ve E5'in çok değişken olmasına rağmen variantlar arasındaki ilişkide LCR dizileri çoğunlukla intratipik farklılıkların tarifinde kullanılır. Bazı çalışmalarda her viral tip için yaygın varyantların sadece sınırlı sayıda olduğu görülmüştür ve etnik grupların kendi aralarında gelişen varyantlarda büyük farklılıklar gösterir. Örneğin Amerika'daki Hintliler ve Afrikalılardaki bu varyantların kimyasal, biyolojik ve patojenik özellikleri değişir ve HPV varyantları L1, L2 ve LCR bölgelerindeki nükleotid farklılıklarına dayanarak European (E), Asiatic (AS), Asiatic American (AA), African AF1 ve AF2 olmak üzere beş büyük gruba ayrılmıştır. Bu varyant grupları arasında E2, E4, E5, E6, E7 genlerinde bazı dizi varyasyonları da bulunmuştur. Farklı

veriler farklı varyasyonlar arasındaki korelasyonu ve neoplazi için yüksek riski desteklemektedir¹¹.

2.3. Virusun Biyolojisi

2.3.1. Virusun yapısı ve genel özellikleri

Human papillomaviruslar (HPV) papillomaviridae ailesine ait, küçük, zarfsız, 55-60 nm'lik ikozahedral kapsidi olan yaklaşık 7900 bp uzunluğunda sirküler çift sarmallı DNA viruslarıdır. Kapsid protein yapıda olup yapısı elektron mikroskopik olarak 12 penton ve 60 hekzon olmak üzere toplam 72 adet kapsomerden oluşmuştur¹².

Papillomaviruslar yüksek omurgalılar arasında yaygındır, fakat primat olmayan canlılardan insanlara geçiş rapor edilmemiştir. Bu grup viruslar memelilerden kuşlara çeşitli hayvanları ve insanları infekte ederler. Papillomaviruslar sıklıkla lokal hücre proliferasyonuna sebep olarak siğil, kondilom ve servikal intraepitelyal neoplazi gibi bening tümörlere sebep olurlar. Bening tümörler çoğunlukla immünkompetan hastalarda kendiliğinden geriler⁸.

Epitelyotropik viruslardır ve skuamöz hücrelerin nukleusunda çoğalırlar¹³. El, ayak, anogenital bölge gibi kutanöz ve mukozal epitelyal dokularda enfeksiyon oluştururlar. Papillomaviruslar zarfları olmadığından dolayı kuruluğa nispeten dirençli ve stabildir, en az bir hafta ekstraselüler olarak canlılığını koruyabilirler. Organik çözücülere dirençlidirler ve 56°C'de infektivitesinde minör bir kayıp meydana gelir.

Viral proteinleri kodlayan dizinler tek bir DNA sarmalı üzerindedir ve genetik yapı tüm papillomaviruslarda aynıdır. Viral genom, 3 majör bölgeye bölünmüştür, erken ve geç bölge 8 “open reading frame” (ORF) taşır ve bu iki bölge arasında replikasyon orjini (origin of replication) içeren 1000bp'lik uzun kontrol bölgesi (long control region, LCR) bulunur. Bu bölge “non-coding” veya “upstream regulatory region” (URR) olarak da bilinir. Tüm papillomaviruslarda üç bölge iki polyadenylation (pA) bölge tarafından ayrılır. Erken bölge viral genomun %50'den fazlasını, geç bölge %40'ını ve LCR %5'ini oluşturur. ORF'ler tek bir DNA sarmalında mRNA transkripsiyonu ile ekspres edilirler. Transkripsiyonun regülasyonunda görev alırlar. DNA replikasyonu ve hücresel transformasyonu düzenlerler. Viral genomda erken (E1-E7) ve geç (L1-L2) proteinleri

kodlayan dizinler bulunur. Geç bölge DNA'yı saran kapsid proteinlerinin kodlandığı bölgedir. L1 kapsidde bulunan başlıca protein olup (majör), papillomaviruslarda korunmuş bölgedir ve HPV tiplerinde benzer olan proteindir. L2 minör kapsid proteindir ve HPV tipleri arasında farklılık gösterir. Tiplerin antijenitesindeki farklılıkları meydana getirir. Erken bölge yaklaşık 4000bp uzunluğundadır ve 6 adet erken bölge (E1, E2, E4, E5, E6 ve E7) vardır. Viral replikasyon, transkripsiyon işlevlerini kontrol eder ve hücresel transformasyondan sorumlu proteinleri kodlar⁸.

2.3.2. HPV proteinleri

2.3.2.1. E1 ve E2 proteinleri

E1 ve E2 genleri HPV'un önemli regülatör proteinlerini kodlar, parabazal keratinositlerde bulunur; viral epizomun stabilize edilmesi, viral replikasyonun başlatılması ve replikasyonda rol oynarlar. E2 tarafından kodlanan protein URR'deki E2 bağlanma yerine bağlanarak transkripsiyonu baskılar. E1 tarafından kodlanan protein promoter bölgesine E2'nin bağlanmasını kolaylaştırır¹⁴.

E2 gen ürünü olan E2 proteini yaklaşık 50 kda'luk bir nükleler proteindir. LCR bölgesindeki E2 bağlanma bölgelerine (E2BS) bağlanarak viral replikasyon ve transkripsiyonunun regülasyonunda önemli bir rol oynar. E2 proteini prodüktif infeksiyon sırasında çeşitli roller oynar ve bazal hücrelerde viral DNA replikasyonunun başlaması ve genomun açılması (segregasyon) için gereklidir. E2, viral genomun noncoding bölgesinde palindromik motif [AACCg(N4)cGGTT] kodlayan DNA bağlayan bir proteindir.² Transkripsiyonda hem pozitif hem negatif etkileri vardır. Differensiye olmamış hücrelerde E2 proteini düşük dozlarda transkripsiyonu arttırmak için bir viral transkripsiyonel trans-aktivatör gibi davranır, oysa yüksek konsantrasyonlarda Sp1 ve TFIID gibi transkripsiyonel faktörlerin, onları tanıyan dizilere bağlanmasını engelleyerek baskılayıcı hale gelebilir. Differensiye hücrelerde E2, geç promoter bölgedeki değişimden dolayı transkripsiyonda baskılayıcı fonksiyonunu kaybeder. Bu durum, E1 ve E2 protein seviyelerinin ve bu sebeple viral DNA amplifikasyonunun hızla artışı ile sonuçlanır. İnsan servikal kanser hücrelerinin

çoğunda, viral genomun integrasyonuna bağlı olarak E2 ekspresyon kaybının HPV'un indüklediği karsinomanın gelişimine katkıda bulunduğu kabul edilmiştir^{2,14}.

E2 aynı zamanda viral genom replikasyonu için de gereklidir. E2 spesifik olarak E1'i tanır ve viral replikasyon orjinine (Ori) E1'i toplar, burada E1-E2 kompleksi oluşur. E1'in toplanmasına ilaveten E2 aynı zamanda bütün pre-initiation kompleksinin yapımı ve konak hücresel DNA replikasyon mekanizmasının Ori'ye toplanması için gereklidir¹⁵.

E1 proteini 68 kDa'luk ATPase, DNA helikaz ve DNA sarmalının açılması için aktivitesi olan nükleer bir proteindir. Düşük dizi spesifitesi ve düşük affinite ile viral Ori'ye bağlanır. Bağlanma affinitesi E2 proteini ile artırılabilir. Yeni oluşan E1-E2 heksamer kompleksi DNA'ya yüksek affinite ile bağlanır ve şaperon proteinlerin yardımı ile DNA'yı etkili bir şekilde açar. E1 DNA replikasyonunu aktive etmek için DNA polimeraz- α 'nın subünitleri ile etkileşir. E1 hem viral DNA replikasyonunun başlamasında hem de replikasyon çatalında helikaz aktivitesine bağlı olarak elongasyonda bir rolü vardır¹⁵.

2.3.2.2. E6 ve E7 proteinleri

HPV tiplerinin onkojenik fonksiyonları özellikle iki erken genin; E6 ve E7 ekspresyonuna bağlıdır. E6 ve E7 iki major HPV onkoproteinleridir. E6 onkoproteini yaklaşık 17 kDa büyüklüğündedir. HPV enfeksiyonunun tümörojenitesinde önemli bir rol oynar. Yüksek risk (HR) HPV'lerde E6 proteinleri, konak hücrenin hem nükleus hem de stoplazmasına dağıtılır¹⁴.

HR E6 proteinlerin iyi bilinen fonksiyonlarından biri p53'ün yıkılması yolu ile insan hücrelerini transforme etme kabiliyetidir. p53 hücre siklusunu durduran veya apoptosizi uyaran bir tümör supresördür. Düşük risk (Low risk; LR) HPV E6 proteinlerinin de p53'e düşük affinite ile bağlandığı gösterilmiştir. E6 p53'e ubiquitin-ligaz olarak isimlendirilen E6 ilişkili protein ile bağlanır. (E6AP) E6-E6AP-p53 kompleksinin oluşumu, ubiquitin bağımlı proteolitik yol vasıtasıyla p53'ün hızlı yıkılımı ile sonuçlanır, böylece p53 aracılı hücre apoptozisini ve hücre siklusunun regülasyonunu ortadan kaldırır. E6 aynı zamanda bir p53 koaktivatörü olan p300/CBP'i hedefler ve indirek olarak p53 aktivitesini azaltır^{2,15}.

PDZ (PSD-95, Dlg, Zo-1) proteinlerine bağlanma ve insan telomeraz revers transkriptaz (hTERT) geninin ekspresyonunun aktivasyonu E6 proteinlerinin insan hücrelerini ölümsüzleştiren iki önemli p53 bağımlı yoldur. PDZ ailesinin proteinleri PSD 95, Dises Large ve ZO-1 proteinleri ile ilişkili korunmuş bir bölge içerir. Bazı PDZ proteinleri sinyal transdüksiyonda rol oynar. PDZ domain içeren proteinlerin HR (high risk) E6 tarafından proteozom-aracılı parçalanma için hedeflendikleri açıktır. LR E6 proteinleri PDZ domain içeren proteinleri hedeflemezler. İnsan telomeraz revers transkriptazın, ökaryotik kromozomların telomerlerini uzatma özelliği vardır. Telomeraz aktivitesi olmadan telomerler hücre bölünmesi sırasında kısalır ve hücreler kromozom replikasyonunu sonlandırır, yaşlanma oluşur. HR tiplerin E6 proteinleri transkripsiyonal düzeyde, hTERT ekspresyonunun upregülasyonu ile telomerazı aktive eder, insan hücrelerinin ölümsüzleşmesine yol açar¹⁴.

E7 onkoproteini yaklaşık 12 kDa molekül ağırlığındadır ve öncelikle nukleusta bulunur. HR E7 proteinlerinin temel aktivitesi, retinoblastom (Rb) ailesi üyeleri ile ilişkisi yoluyla hücrelerin transformasyonuna katılımıdır. Rb proteini hücre siklusunun G₁'den S fazına geçişini inhibe eder ve aktivitesi fosforilasyon ile düzenlenir. HPV ile infekte hücrelerde, E7 proteinlerinin hipofosforile Rb proteinlere bağlanması Rb proteininin inaktivasyonu ile sonuçlanır ve hücre siklusunun S fazına ilerlemesine izin verir. LR E7 proteinlerinin aynı zamanda Rb'ye düşük affinite ile bağlandığı gösterilmiştir. Rb ailesi içindeki diğer proteinler p107 ve p130'u içerir. Her ikisi de proteinlerin ekspresyonunu olumsuz yönde etkiler ve hücre siklusunun devamı için gereklidirler¹⁶.

Histon deasetilazlar (HDAC) hücre siklus regülasyonunda önemli rol oynar. Rb proteininin hipofosforile formu, transkripsiyon faktör E2F ile regüle edilen S fazına spesifik genleri inhibe etmek için HDAC'ları uyarır. HPV ile infekte hücrelerde Rb-HDAC kompleksi E7 proteinleri ile bozulur ve hücre siklusunun S fazına girişine yol açar. Ayrıca E7 proteinlerinin Rb'den bağımsız olarak HDAC'lere bağlandığı da gösterilmiştir. Differensiye epitelde E7 proteinleri tarafından E2F aktivasyonunun hem HR hem de LR HPV'ların viral replikasyonunda ortak mekanizma olduğu ileri sürülmüştür. E7 proteinleri p21 ve p27 gibi siklin bağımlı kinaz inhibitörlerin (CKI) inhibitör aktivitesini de inaktive etmesi ile hücre siklusunun G₁'den S fazına ilerlemesini uyarır^{14,15}.

2.3.2.3. E4 proteini

Diğer erken proteinlerin çoğunun aksine HPV E4 proteinleri infeksiyonun geç döneminde bol miktarda eksprese edilir. Tam uzunlukta bir E4 proteini uç uca eklenmiş E1-E4 transkriptlerinden oluşur. E1-E4 proteini tüm HPV proteinlerine göre çok fazla eksprese edilir ve E4 ORF ile E1'in ilk 5 aminoasidi 17 kDa'luk E1-E4 füzyon proteini oluşturur ve bu şifrelenmiş dizilerin uç uca gelmesi RNA tarafından biçimlendirilir. E1-E4 transkriptleri HPV'un hayat siklusu süresince eksprese edilir. Tam uzunluktaki E1-E4 proteini, üst differensiye hücre tabakalarında proteolitik olarak parçalanmış polipeptid ürünlerine bağlıdır ve en yüksek düzeyde ekspresyon diferensiye suprabazal tabakada meydana gelir. Viral hayat siklusunda E1-E4'ün fonksiyonu hala açık değildir. E1-E4 proteini özellikle stoplazmada lokalizedir. HR HPV'nin E4 proteini infekte hücrelerin stoplazmasında yaygın olarak dağılır ve keratin intermediate filamentleri (IF) ile organize filamentöz bir ağ formu oluşturur, in vitro sitoskeleton kollapsına yol açıp virus salınımında rol aldığı ileri sürülmektedir. E4 proteininin yüksek ekspresyon düzeyinin viral DNA replikasyonu ile korele olduğu ve differensiye epitel hücrelerinde L1 ekspresyonundan önce meydana geldiği rapor edilmiştir, bu da E4 proteininin, HPV DNA replikasyonunu uyardığı ve HPV hayat siklusunda geç viral fonksiyonları regüle ettiğini gösterir¹⁴⁻¹⁶.

2.3.2.4. E5 proteini

E5 gen ürünü olan E5 proteini yaklaşık 5 kDa uzunluğunda, 83 aminoasitlik, küçük bir hidrofobik membran proteinidir. E5 proteini başlıca endoplazmik retikulum ve golgi cisimciklerinde lokalizedir, fakat aynı zamanda plazma membranlarında da bulunur. Sığır papillomaviruslarının aksine hücre kültürlerinde, zayıf transforme yeteneğine sahiptirler yine de E6 ve E7'nin transforme özelliklerine katkısı olduğu gösterilmiştir. Sığır papillomaviruslarında E5 proteini platelet derived growth factor (PDGF) reseptörleri ile etkileşerek primer hücrelerin transformasyon aktivitesine aracı olur, buna karşılık viral hayat siklusunda HPV E5 proteininin kesin rolü hücrelerdeki zayıf ekspresyona bağlı olarak açık değildir. HPV E5 proteininin potansiyel bir hedefi

de epidermal growth factor reseptörleridir (EGFR). E5 proteininin EGFR ile etkileştiği ve HPV ile infekte hücrede nukleusa EGF aracılı sinyal aktarımını uyardığı gösterilmiştir. EGFR'nin pratik olarak tüm servikal intraepitelyal lezyonlarda eksprese olduğu bilinir. Fare fibroblastlarında HPV E5 ekspresyonu EGF stimülasyonu yaparak proliferasyonun artmasına yol açar. HPV E5 proteinleri başlıca geç viral hayat siklusu sırasında üretilir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, E5 proteininin, viral amplifikasyonu ve differensiye hücrelerde viral gen ekspresyonunu modüle etmede E7 ile kooperatif rol oynadığını göstermiştir. E5 aracılı etkinin, endozomal maturasyonda ve konak antijen sunan hücrelerde değişikliğe sebep olduğu gösterilmiştir. E5 varlığı hücrelerde yüzey HLA-A ve HLA-B seviyelerinin azalmasına yol açar. MHC class II tarafından antijen sunumunu, sabit zincirin yıkılmasındaki eksiklikten dolayı interferon gama stimülasyonu yaparak E5 eksprese eden hücrelerde class II yüzey seviyelerini azaltır. HPV 16 E5'in HLA class I hücre yüzeyine transportu azaltarak MHC class I'i engellediği bildirilmiştir¹⁴.

2.3.2.5. Geç bölge L1 ve L2 proteinleri

Geç bölge yaklaşık 3 kb uzunluğundadır ve sırasıyla majör ve minör proteinleri kodlayan L1 ve L2 genlerini içerir. Kapsid proteinleri olan L1 proteini yaklaşık 55 kDa, L2 proteini ise yaklaşık 74 kDa ağırlığındadır. Geç HPV genleri E7 geni içinde geç diferensiasyon bağımlı promoterden transkribe olur. L1 proteini hücreye giriş için $\alpha 6\beta 4$ integrin, heparan sülfat ve glikozaminoglikan dahil üç farklı yüzey reseptörüne bağlanır. L2'nin hücresel yüzey proteinine bağlanması da etkili HPV enfeksiyonu için gereklidir. İnfekte hücrenin stoplazmasında L2 proteini stoplazmadan nukleusa virusun etkili transportu için β -aktin ile etkileşir. Hem L1 hemde L2 proteinleri C-terminalde nükleer lokalizasyon sinyalleri içerir, bu stoplazmada sentezden sonra virionlara montaj olmak için onları nukleusa yönlendirir. L1 ve L2 proteinlerinin reseptör aracılı bir yolla nukleus içine taşınması önemlidir. Viral hayat siklusu sırasında L1 ve L2 proteinlerinin iki kez nükleer transportu olduğu açıktır. İlki undifferensiye prolifere olan hücrelerde enfeksiyonun erken safhasında replikasyon için HPV genomunun nukleusa salınması sırasında olur. İkincisi infekte hücrelerin terminal differensiye safhası sırasında olur veya stoplazmada sentez edilen L1 ve L2 proteinlerinin nukleusa transport olduğu ve

virionlara montaj olduğu sırada olur. L1 proteinlerinin tek başına kapsidlere montaj olma kapasiteleri vardır. 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 siklusunun regülasyonunda L2-E2 birleşmesinin etkisi hala araştırılmaktadır¹⁴⁻¹⁶.

HPV'lar başlıca serviksin epitel hücrelerini infekte eder ve epitel hücrelerinin farklılaşması replikasyonları için gereklidir. İnfeksiyon bazal tabakada başlar ve epitelyum hücresi nukleusuna girer ve epizomal viral DNA replikasyonu başlar².

2.4. Patogenez

2.4.1. HPV ve hastalık

HPV'lar çeşitli epitelyal lezyonlara sebep olur. HPV'un dizi analizine göre 100'den fazla HPV tipi identifiye edilmiştir. Her biri spesifik epitellerde infeksiyon ile ilişkidir. Evrimsel süreçte HPV'lar farklı grup veya genusta numaralandırılmış ve farklı karakterde infeksiyonlara sebep olmuşlardır. Alfa ve beta papillomaviruslar olmak üzere iki ana hpv genusu vardır ve yaklaşık hpv tiplerinin %90'ı halen bu genusların birinde bulunmaktadır. Beta papillomavirusler tipik olarak insanlarda görülmeyen kutanöz infeksiyonlarla ilişkilidir, fakat immunsuprese ve epidermodysplasia verruciformis (EV) hastalarında bu viruslar non-melanoma deri kanserlerinin gelişmesine sebep olurlar².

HPV çoğunlukla cinsel ilişki sırasında geçmektedir. Genital siğilleri içeren genital HPV infeksiyonu, bakireler, çocuklar ve yeni doğanlar gibi cinsel deneyimi olmayan bireylerde de oluşabilir. LR HPV'ların genital olmayan geçişlerine ilişkin bazı kanıtlar vardır. Ansebep çocuğa vertikal veya perinatal geçiş çok düşük ihtimalde olsa olabilir. HR HPV'lar ağız, orofarinks ve konjunktivada bulunup bu bölgelerdeki kanserler ile ilişkilidir.

HPV infeksiyonunda epidemiyolojik risk faktörleri için çalışmalar, hem erkek hemde kadınlar arasında cinsel davranış ilişkilerinin ana gösterge olduğunu açık bir

şekilde göstermiştir. En önemli risk faktörleri cinsel eşlerin sayısı, cinselliğe başlama yaşı ve cinsel eşlerinin en az birinde HPV taşıyıcılığı bulunmasıdır.

2.4.2. HPV enfeksiyonunun doğal seyri

HPV enfeksiyonlarının çoğu geçici ve asemptomatiktir ve klinik belirtilere sebep olmaz. Yeni HPV enfeksiyonlarının %70'i 1 yıl içinde ve %90'ı 2 yıl içinde temizlenir. Yeni enfeksiyonların ortalama süresi 12 aydır. HR HPV tipleriyle persistan enfeksiyon servikal kanser öncü lezyonları ve invaziv servikal kanser için en önemli risk faktörüdür. HPV tiplerinin prekanseröz lezyonlara progresyonu ve persistanlık için risk diğer HR HPV tiplerine göre HPV 16 ile daha fazladır. İlk HPV enfeksiyonu ve servikal kanser gelişimi arasındaki süre genellikle 10-15 yıldır. HPV enfeksiyonundan sonra doğal bağışıklığın süresi ve rolünü içeren HPV'nin doğal hikayesinin birçok yönü tam anlaşılmamıştır¹⁷.

2.4.3. Normal prodüktif enfeksiyon

Birçok HPV tipi enfeksiyondan sonra sadece prodüktif lezyonlar oluşturur ve insan kanserleriyle ilişkili değildir. Bu tip lezyonlarda viral gen ürünlerinin ekspresyonu, epitelium yüzeyine doğru enfekte hücreler göç ettikçe belirli zamanlarda üretilen viral proteinler ile dikkatli bir şekilde regüle edilir. Üst epitelial tabakalarda virus sentezine sebep olan olaylar, hem düşük hem de yüksek risk HPV tiplerinde yaygındır. Prodüktif enfeksiyon spesifik roller oynayan farklı viral proteinler ile oluşur. E6 ve E7 gen ürünleri hücrenin büyümeyi düzenleyici mekanizmalarını bozar ve böylece farklılaşmış hücrede viral replikasyonu kolaylaştırır. Epiteliumda viral replikasyon başlıca intermediate ve süperfisyal hücrelerde olur ve en fazla viral yük terminal diferansiye epitelde bulunur. Prodüktif enfeksiyonda skuamöz hücrelerde karakteristik sitolojik değişiklikler meydana gelir, bunlar hücrenin büyümesi, multinükleasyon, nükleer hiperkromazi, nükleer düzensizlik ve perinükleer hale oluşumudur².

2.4.4. HPV infeksiyonunun oluşması

Tüm papillomaviruslar birçok özelliği paylaşır ve ikozahedral kapsidi içinde çift sarmallı sirküler DNA içerirler. Farklı HPV tipleri arasında viral genomun büyüklükleri hafifçe değişmesine rağmen tipik olarak yaklaşık 8000 bp (HPV 16 için 7904 bp) içerir ve 8 veya 9 ORF (open reading frame) kodlar. Virus kapsidi iki proteinden oluşur. İnfeksiyöz virusların L1 proteini primer yapısal proteindir ve 360 protein kopyası 72 kapsomer içinde organize olur. L2 minör virion proteindir ve tek L2 molekülünün virionun köşelerinde pentavalan kapsomerlerin merkezinde olduğu düşünülür. Her iki protein virus infektivitesinde önemli rol oynar^{18,19}.

Papillomaviruslar tarafından infeksiyon oluşması, virus partiküllerinin epitel bazal tabakaya bağlanmasını ve bölünen bazal hücrelere girişini gerektirir. Virusun hücreye girişinde rol oynayan reseptörlerle ilgili çelişki vardır, fakat heparan sülfat proteoglikanlarının, ilk bağlanmada ve/veya virus alınımında rol oynadığı düşünülmektedir. Diğer viruslarda olduğu gibi HPV'un etkili infeksiyon oluşturmaları için sekonder reseptörlerin varlığının gerektiği görülür ve bu rolün $\alpha 6$ integrin tarafından oynadığı ileri sürülür^{2,20}. Papillomavirus partikülleri bağlanmadan sonra hücreye oldukça yavaş alınırlar ve HPV 16 için bu "clathrincoated" endositoz ile gerçekleşir. Bu giriş modu tüm HPV tiplerinde korunmayabilir, bununla birlikte HPV 31'in "caveolae" yolu ile giriş yaptığı ileri sürülmektedir. Papillomavirus partikülleri geç endozomlarda ve/veya lizozomlarda ayrışır ve viral DNA'nın nukleusa transferini minör kapsid proteini L2 kolaylaştırır. Deneysel sistemlerde, birkaç günden sonra mRNA seviyelerinin artması ile viral transkriptler infeksiyondan sonra 12 saat gibi erken sürede tespit edilebilir^{14,21,22}.

İnfeksiyon viral genomun bazal tabaka hücrelerinde konak genoma integrasyon olmaksızın stabil epizom olarak yerleşmesine sebep olur ve bunun için E1 ve E2 viral genom proteinlerinin ekspresyonuna ihtiyaç olduğu düşünülür. E2 proteini prodüktif infeksiyon sırasında çeşitli roller oynar ve bazal hücrelerde viral DNA replikasyonunun başlaması ve genom ayrılması için gereklidir. E2 viral genomun kodlanmayan bölgesindeki palindromic motifi (AACCg(N4)CGGTT) tanıyan, DNA bağlayan bir proteindir. HPV 16 bu tip 4 motif içerir, bunlardan biri viral replikasyon orjinine bitişiktir. E2 bağlanması E1 helikazın viral orjine çekilmesi için gereklidir. E2, DNA

polimeraz α ve RPA (replication protein A) içeren DNA replikasyonu için gerekli olan hücresel proteinlere bağlanır^{2,14}.

Bazal hücrelerde S fazında hücresel DNA ile viral genomun replike olduğu görülür. Replikasyon ve genom segregasyon rolüne ilaveten E2 aynı zamanda bir transkripsiyon faktörü olarak da davranabilir. Viral erken promotor, (HPV16 için p97; HPV31 için p99) regülasyonu ve E6/E7 viral onkogenlerinin ekspresyonunu kontrol edebilir. Düşük düzeylerde E2 transkripsiyonel aktivatör olarak davranır, oysa yüksek düzeylerde, hücresel transkripsiyon faktör SP1'in erken promotere yakın bir yerde yerini değiştirerek onkogen ekspresyonunu baskılar. E2 aracılı transkripsiyonel regülasyonun bazal epitel hücreleri için önemli olup olmadığı açık değildir, burada nukleozomal yapı ve/veya viral DNA'nın metilasyon durumu erken promoterin etkili aktivasyonu ile uyumlu olmayabilir. BPV (bovine papillomavirus) ile transforme keratinositlerde ve servikal lezyonlardan alınan hücre dizilerinde bakılan genom analizi viral epizomların bazal hücrelerde 10-200 kopya halinde korunabildiğini göstermiştir. Bazal tabakada viral genomun varlığı için hem E1 hem de E2'nin gerektiği ileri sürülmüştür^{2,16,20}.

2.4.5. Hücre proliferasyonunun stimülasyonu

Birkaç model sistem in vivo infeksiyon sırasında papillomavirus prodüktif döngüsünü incelemek için kullanılmıştır. ROPV (rabbit oral papillomavirus) veya COPV (canine oral papillomavirus) deneysel olarak mukozal epitelyal dokuya inokulasyonunu takiben bazal ve suprabazal hücre proliferasyonunda ki artış kolayca gösterilmiştir ve infeksiyondan 4 hafta sonra olgun siğiller görülür hale gelmiştir²³. İlk infeksiyon ile prodüktif papillomaların ortaya çıkışı arasındaki süre infekte eden virusun titresi ve muhtemelen papillomavirus tipinin yapısına göre değişir. İnoküle edilen titreleri düşük olduğunda papillom oluşumunda gecikme olduğu ileri sürülmüştür. HPV tarafından oluşan servikal lezyonlarda suprabazal epitel hücrelerinin artan proliferasyonu E6 ve E7'nin ekspresyonuna bağlanmıştır. Doğal infeksiyon sırasında bu genlerin aktivitesi az sayıda infekte hücrenin çoğalmasını sağlar ve bu çoğalan hücreler sonradan infeksiyöz virionları üretirler. Bazal tabakaların üstünde viral epizomların replikasyonu için E1 ve E2 ile birlikte E6 ve E7 proteinleri hücreleri S fazı içine

çekmek için gereklidir. Suprabazal hücreler çoğunlukla hücre siklusundan çıkar ve deri tarafından sağlanan koruyucu bariyeri oluşturmak için terminal differensiasyon süreci başlar. Buna karşılık HPV ile infekte keratinositlerde hücre siklusunun durdurulması gerçekleşmez ve normal terminal differensiasyon meydana gelmez^{2,15}.

Hücre siklusunun progresyonunu papillomavirusların hangi temel mekanizma ile uyardıkları iyi bilinir. E7, pRb [Rb (retinoblastoma) protein] ile ve diğer cep protein ailesinin üyeleri ile ilişkilidir, ayrıca pRb ve E2F transkripsiyon faktörleri arasındaki ilişkiyi bozar. E2F sonradan siklin A ve E gibi viral DNA replikasyonu için gerekli hücre proteinleri transaktive eder. E7 aynı zamanda histon deasetilaz, p21 ve p27 siklin bağımlı kinaz inhibitörleri ve E6/E7 transkripsiyonunu regüle eden hücre protein faktör AP1 transkripsiyon kompleksinin komponentleri dahil diğer proteinlerle de ilişkilidir^{2,24}. Buna karşılık doğal infeksiyon sırasında E7'nin hücre proliferasyonunu sürdürmesi p21 ve p27 siklin bağımlı kinaz inhibitörlerinin düzeylerine bağımlı olarak bazı hücrelerde inhibe edilir. Diferansiye keratinositlerde p21 ve p27'nin yüksek düzeyleri hücre içinde E7 ve siklin E ile inaktif kompleksin oluşumuna yol açabilir. E7, diferansiye epitelyumda mitoz yoluyla hücreleri çoğaltır. Hücre çoğalması, düşük düzeyde p21 ve p27 eksprese eden hücrelerde veya hücre siklus progresyonunun blokajının üstesinden gelecek yeterli E7 eksprese eden hücrelerde sınırlıdır²⁵. Viral onkogenlerin ekspresyonunda kısıtlamanın kalkması HPV ile ilişkili kanserlerin gelişmesinde predispozan faktör olduğu için önemlidir. Viral E6 proteininin fonksiyonu E7'yi komplemente eder ve yüksek risk HPV tiplerinde tek polisistronik mRNA'dan iki protein birlikte eksprese edilir²⁶. E6'nın primer rolü p53 ile ilişkilidir, p53 ubiquitin yolu ile degradasyona aracılık eder. Bu üst epitelyal tabakada E7 aracılı hücre siklusuna girişe karşılık apoptosizi veya büyümenin durmasını önler. Antiapoptotik protein olarak E6'nın rolü ayrıca Bak ve Bax ile de ilişkili olduğunun bulunması ile vurgulanmıştır². E6'nın bu rolü servikal kanser gelişmesinde çok önemlidir. Çünkü hücre DNA hasarına cevabın etkinliğini bozar ve sekonder mutasyonların birikmesine izin verir. HR HPV tiplerinin E6 proteini, C terminal PDZ ligand domain vasıtasıyla E7'den bağımsız olarak hücre proliferasyonuna aracılık etmede rol oynar. PDZ ismi bu domainlerin bulunduğu ilk 3 proteinden PSD-95 (sinyalizasyondan sorumlu 95 kDa'luk protein), Dlg (*Drosophila* discs large protein) ve ZO1 (epitelyal hücre polaritesinin sürdürülmesinden sorumlu zonula occludens 1 proteini)'den

oluşmaktadır²⁷. E6'nın PDZ'ye bağlanması suprabazal hücre proliferasyonuna aracılık eder ve normal hücre adezyonunu bozarak metastatik tümörlerin gelişmesine katkıda bulunur. Prodüktif lezyonlarda hücreler, sadece alt epitelyal tabakalarda siklusa girer ve lezyonun derecesine ve HPV tipinin yapısına göre epitelyal yüzeye doğru çoğalır. HPV 1'in sebep olduğu benign lezyonlarda proliferen olan hücreler epitelyal bazal tabakaya sınırlıdır, genom amplifikasyonu infekte hücreler suprabazal hücre tabakalarına girer girmez başlar. HPV16 ve HPV6 (Alpha papillomaviruslar) gibi HPV'lar tipik olarak bir çok hücre tabakasının kalın olduğu bir bölge içerebilir ki burada hücreler, vegetatif viral genom amplifikasyonunun başlamasından önce siklusa tutulur. Servikal kanser ile ilişkili HR HPV tiplerinde bu tabakaların kalınlığı kanserin grade ile ilişkilidir. Yüksek dereceli lezyonlarda kalınlık artar, oysa epitelyal diferansiasyon derecesi azalır²⁸.

2.4.6. Genom amplifikasyonu

Hücre proliferasyonu, lezyon formasyonu ve viral epizomun devamı için gerekli olmasına rağmen, tüm papillomaviruslar sonuçta amplifiye edilir ve genomlarını paketleyerek infeksiyöz virionlar oluşturur. Geç olayların başlamasının neyin sağladığı henüz tam olarak anlaşılamamıştır, fakat infekte hücre epitelyal yüzeye doğru hareket ettikçe kısmen hücresel çevredeki değişikliklere bağlı olduğu görülmektedir. Bunun için differensiasyona bağımlı olan promoterin aktive olması kritik bir öneme sahiptir ki bu promoter birçok papillomavirus tiplerinde E7 ORF (P670 HPV16'da, p742 HPV31'de) içinde bulunur. Diferensiasyona bağımlı promoterin aktivasyonu, genom amplifikasyonundan daha ziyade hücresel sinyallerdeki değişikliklere bağlıdır ve replikasyon için gerekli viral proteinlerin (E1, E2, E4 ve E5) artışına sebep olur. Prodüktif infeksiyonu destekleyen hücreler E4'e karşı oluşan antikorlar kullanılarak gözlenebilir, halbuki genom amplifikasyonunu destekleyenler aynı zamanda E7 de içerir^{29,30}.

Viral genom amplifikasyonunda E1 ve E2'nin rolü iyi kurulmuştur. E1, papillomaviruslar arasında son derece iyi korunmuş ve viral orijinde 6 kez tekrarlanan ortak motif (AACNAT) için zayıf affiniteye sahiptir. Doğal infeksiyon sırasında E1 çok düşük seviyede eksprese edilir ve hedef bölgeye etkili bir biçimde bağlanması için E2'nin varlığı gerekir. Primer olarak N terminus boyunca E1 ile E2 bağlantılıdır ve bir

dimer gibi C terminus boyunca DNA'ya bağlanır³¹. Replikasyon orjininde E1-E2 kompleksinin oluşması viral DNA'da lokalize kıvrılmayı uyarır ki bu E1 moleküllerinin toplanmasını kolaylaştırır ve E2 ortamdan ayrılır. E1 hücresel Hsp (Heat Shock Proteins: ısı şok proteinleri) özellikle Hsp40 ve Hsp70 ile ilişkiye girer ve E1 dihekzamerlerinin yapımına katılır. E1 ve E2 aynı zamanda viral erken promotor HPV16'da p97, HPN31'de p99 regülasyonunda rol oynar. E2'nin yüksek düzeyleri, deneysel olarak E6 ve E7 ekspresyonunu azaltır. E2'nin erken viral genlerin ekspresyonunu baskılaması veya aktive etmesi, E2'nin çeşitli bağlanma bölgelerine affinitesindeki farklılıkların sonucu olduğu düşünülür^{2,14}.

2.4.7. Virus montajı ve salınımı

Papillomaviruslarda prodüktif siklusun son aşaması, replike olan genomun infekte partiküller içine paketlenmesidir. Genom amplifikasyonu başladıktan sonra L1 ve L2 ekspresyonu ile kapsid proteinleri çoğalır. L2 ekspresyonu L1 ekspresyonundan önce olur. Kapsid proteinlerinin sentezi ile genom amplifikasyonu arasındaki bağlantı henüz tam olarak anlaşılamamıştır, fakat mRNA “splicing” [transkripsiyon sonrasında RNA'daki bazı bölümlerin (intron'ların) çıkartılıp kalan kısımlarının (eksonların) birleştirilmesi] değişikliklere ve geç poliadenilasyon bölgesinde (erkenden daha ziyade) sonlanan transkript oluşumlarına bağlıdır. Epitelyumda hücre differansiasyonu sırasında kapsid sentezinin zamanlaması, hem RNA yapımı hem de protein sentez düzeyinde kontrol edilir. RNA stabilitesini kontrol eden negatif düzenleyici faktörler, kodlama bölgelerinde ve HPV 16'nın geç translasyona uğramayan bölgesinde bulunur, halbuki HPV 16 L1 genindeki “splicing silencer” (L1 bölgesinde bulunur ve “enhancer” fonksiyonlarını gölgeler) proliferasyondaki hücrelerde öncelikle erken transkriptlerin sentezine öncülük eder. Buna ilaveten HPV 16 L1 ve L2 genleri içinde kullanılan kodon paterni genellikle memeli hücrelerinde bulunan paternden farklıdır ki bu alt epitelyal tabakalarda devam eden kapsid ekspresyonunun inhibisyonuna katılır. Benzer düzenleyici mekanizmalar HPV 1, HPV 31 ve BPV'de bulunduğu düşünülür².

Üst epitelyal tabakalarda infeksiyöz virusların montajında kapsid proteinleri L1 ve L2'ye ilaveten E2'ye ihtiyaç olduğu düşünülmektedir. E2'nin doğal infeksiyon

sırasında genomun protein bir kılıf içinde çevrelenmesinin (enkapsidasyon) etkinliğini arttırabildiği ileri sürülmüştür. L1 nukleusa lokalize olur bu PML (promyelocytic leukaemia) cisimcikleri ile ilişkilidir. Bazı papillomavirusların L2 proteinleri direk olarak DNA ile ilişkili olmasına rağmen PML ile ilişkili olanlarda E2 proteinine ihtiyaç vardır. L1 önce stoplazmada kapsomerlere montaj edilir ve L2 bağlandıktan sonra PML cisimcikleri içinde toplanır. Deneysel sistemlerde virus benzeri partiküllerin montajı hücresel protein Hsp70 varlığını gerektirir, bu aynı zamanda replikasyon sırasında viral E1 proteininin yeniden kullanımını sağlar¹⁴.

Papillomavirus partikülleri L2 yokluğunda montaj olmasına rağmen, L2 varlığında etkili paketleme sağlanır ve virusun infektifitesi artar. HPV 31’de L2’nin kaybı, paketleme etkinliğinde 10 kat, virus infektifitesinde 100 kat azalmaya sebep olur. Papillomaviruslar kuruluğa dirençli olmalarına rağmen, epitelyal yüzeyden kornifiye Skuamözün dökülmesi ile yaşam süreleri arttırılabilir. İnfekte hücre, epitelyal yüzeye erişinceye kadar papillomavirus antijenlerinin birikmesi, infeksiyonu tespit edecek immün sistem gücünü sınırlar. Sonuç olarak virus salınımı hücre yüzeyinde kornifiye membrandan etkili kaçmayı gerektirir, bu E4 proteini ile kolaylaştırılır. E4 keratin ağı bozar ve kornifiye mebranın bütünlüğünü etkiler^{2,14,16}.

2.5. Klinik belirtiler

Human papillomavirus (HPV) deri, anogenital bölge larinks ve özefagusu infekte edebilen epitelotropik, çift zincirli DNA virusudur.

Zur Hausen 1970’li yıllarda HPV’un genital bölge kanserlerinin gelişmesi için gerekli olduğunu ileri sürmüştür. Ayrıca 1980’lerde moleküler tekniklerin kullanılmasıyla HPV DNA dizileri genital siğillerde tanımlanmıştır. HPV genotipleri servikal kanserle ilişkilerine dayanarak yüksek riskli ve düşük riskli olarak ayrılmışlardır. Yaklaşık olarak 30 farklı HPV tipi anogenital bölgeyi infekte edebilir. Genital kondilomalardan %90’nın üzerinde HPV6 veya HPV 11 sorumludur. Oysa 15 kadar HPV tipi ise servikal kanserlerde bulunur³².

2.5.1. Yetişkinlerde anogenital siğiller

HPV cinsel yolla bulaşan yaygın virüslerden biridir. Genital siğiller klinik olarak cinsel aktif popülasyonun en az %1'inde görülmektedir. Genital siğillerin yaklaşık üçte ikisi infekte partner ile cinsel ilişki sonucu gelişir. Tam kuluçka süresi bilinmemektedir, fakat çoğu araştırmacı kuluçka süresinin yaklaşık olarak 3 ay olduğunu varsayar. HPV tip 6 ve 11'in sebep olduğu infeksiyonlarda kondilomatöz lezyonlar görülür ve lokal infeksiyon oluşur. Anogenital siğillere ilaveten HPV infeksiyonu deri siğilleri, laringeal papilloma ve oral papilloma ile sonuçlanabilir³³.

2.5.1.1. Vulva-Vaginal siğiller

Genital siğiller genellikle klasik olarak kondiloma akuminata olarak tanımlanır. Sivri uçlu ve cauliform (saplı) olanlar keratinotik siğiller, kalın, boynuza benzeyenler papüler düz siğillerdir ve bunlar yaygın deri lezyonlarından sorumludurlar, flat (düz) siğiller sıklıkla servikste görülürler. Tipik olarak ekzotifik kondilomalar keratinize epitelyumda oluşur ve multiple lezyonlar birleşerek dev kondilomalar oluşturabilir³³.

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

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

2.5.1.2. Perianal siğiller

Kadınlarda vulva siğillerin en sık görüldüğü lokalizasyon olmasına rağmen perianal bölgenin tamamının muayene edilmesi önemlidir. Çünkü vulva-vaginal kondilomalı hastaların yaklaşık %25'inde aynı zamanda perianal kondilomada mevcuttur³⁴. Anal kondilomaların perianal lokalizasyona uzanım riski yüksek iken perianal kondilomalı hastaların çoğunda anal siğiller mevcut değildir. Enfeksiyonun anal bölgedeki sekresyonların birikimine bağlı olduğu düşünülmektedir.

Tipik olarak pembe-kahverengi papüller ve nodüller anüsü seçer. Vulva-vaginal kondilomalar ve penil siğiller gibi perianal siğillerin cinsel partnere bulaşmasını önlemek için hemen tedavi edilmelidir. En popüler tedavi %5'lik podofilindir. Siğiller tedavi edilmezse birleşerek daha büyük kitle şeklinde rektuma uzanma eğilimindedirler ve bu vakalarda cerrahi tedavi gerekir. Eğer bir partnerde perianal siğil varsa aynı zamanda vulva-vaginal siğil ve penil siğil açısından da kontrol edilmelidir. Perianal siğiller homoseksüel erkeklerde de yaygındır ve HIV gibi hastalıklar açısından da risk altındadırlar³².

2.5.1.3. Penil siğiller

Penil siğiller özellikle glans penis, penil shaft ve prepişyumu tutar. Meatus ve üretra çok nadir tutulur ve tedavi için büyük bir problem oluşturur. Peniste bu lezyonlar gelişirse HPV enfeksiyonu ile ilişkili olduğu düşünülmelidir³². O'Brien ve arkadaşları penil kondilomalı 26 hasta çalışmışlar ve lezyonların HPV-6, 11, 31 ve karakterize edilemeyen tiplerden oluştuğunu bulmuşlardır³⁵.

Nielson ve arkadaşları yaşları 18–40 arasında değişen, son 1 yıl içerisinde gelişen genital siğil ve penil-vaginal girişim öyküsü olmayan 463 erkek hastanın glans/corona, penil shaft, skrotum, üretra, perianal bölge, anal kanal ve semenden HPV için örnekler almış ve bu hastaların 237'sinde (%51.2) en az bir onkojenik veya nononkojenik HPV tipi, 66 hastada (%14.3) sınıflandırılmayan HPV tipi pozitif bulmuştur. Prevalansı en yüksek tip HPV 16 bulunmuş, onkojenik HPV tipleri genital örneklerde (glans/corona, shaft ve skrotum) anal örneklerle göre daha yüksek (%25.1'e %5) bulunmuştur. HPV pozitif penil shaft ve glans/corona örneklerinde diğer lokalizasyondaki örneklerle göre birden fazla HPV subtipleri tarafından infekte olma

ihtimalinin daha fazla olduğu gösterilmiştir. Erkeklerde HPV infeksiyonunun tanısı için penil ve üretral bölgeden fırça ile örnek alma en uygun metod olarak görölmektedir³⁶.

2.5.2. HPV'nin insan kanserleriyle olan ilişkisi

2.5.2.1. Servikal kanser

Sitolojik test olan Pap testi yönteminin kullanılmasıyla servikal kanser görölme sıklığı ve mortalite oranı dramatik bir şekilde azalmıştır. Amerikan Kanser Derneği 2007 yılı için invaziv servikal kanserli 11.150 yeni vakanın tespit edildiğini ve bunlardan 3670'inin 2007 yılı içerisinde öldüğünü belirtmiştir. Ne yazık ki kadınların çoğunda servikal kanser tanısında eksiklikler mevcuttur, özellikle gelişmekte olan ölkelerde servikal kanser sebebiyle yılda en az 250 bin kişi ölür³⁷.

Servikal karsinomların büyük bir çoğunluğu skuamöz hücreli kanserlerdir (%85) ve endoservikal kanalın kolumnar epitelinin ektoserviksin stratifiye skuamöz epitel ile yer değiştirdiği serviksin transformasyon zonunda gelişir. Adenokarsinom daha az görölür (%15) ve glandüler epitelden köken alır. Servikal sitoloji sonucunda displazi şüphesi varsa asetik asit ile serviksin kolposkopik muayenesi ve biyopsi tanıyı doğrulamak için gereklidir. Servikal intraepitelyal neoplazi (CIN) 1'den 3'e derecelendirilir. CIN 1 ve/veya CIN 2'nin büyük bir çoğunluğunun spontan gerileme göstermesine rağmen CIN 3'lerin büyük bir çoğunluğu krioterapi, CO2 ile lazer buharlaştırma veya eksizyonel biyopsi gibi yöntemlerle tedavi edilen ablatif tedavi yöntemlerine ihtiyaç duyar. Servikal displazi için ortalama tanı yaşı 29 iken invaziv kanserde 47'dir³².

Servikal kanserin mikroinvaziv ve displastik safhasında hastalar tipik olarak asemptomatiktir. Bununla birlikte servikte kanser klinik olarak görölebilir hale geldiğinde vaginal akıntı ve/veya vaginal kanama mevcuttur ki bu şikayetler genellikle cinsel ilişki sonrasında ortaya çıkar. Bu belirtileri menstrüel kanama ve postmenapozal diğer kanama sebeplerinden ayırt etmek gerekir. Lokal olarak ilerlemiş hastalıkta alt ekstremitelerde ağrı ve/veya şişkinlik, yan ağrısı, rektal kanama, hematüri ve fistöl gelişebilir. Metastazlar sonucu kemik fraktürleri, mide çıkış obstrüksiyonu ve/veya hemoptizi geliřebilir³².

2.5.2.2. Vulvar Kanserler

Jinekolojik kanserlerin yaklaşık %4'ünü oluşturlar ve tipik olarak 70 ve 80 yaşları arasında görülürler. Risk faktörü bulunan (HPV enfeksiyonu, immünsupresyon) genç kadınlar da risk altındadırlar. Serviksin skuamöz hücreli karsinomlarında olduğu gibi vulvar karsinomlarda 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 insitu olarak kabul edilir. VIN lezyonları vulvadaki lokalizasyonları, boyut, pigmentasyonu ve düzenliliğine göre çeşitlilik göstermektedir. VIN'li hastalar genellikle asemptomatiktir ve lezyonlar rutin pelvik muayene sırasında saptanır. Bununla birlikte bazı hastalarda kaşıntı ve yanma olabilir. Yeni gelişen bir vulvar lezyon için biyopsi her zaman önerilmektedir. İnvaziv vulvar karsinomanın en sık görülen histolojik tipi skuamöz hücreli karsinomdur. Verriköz karsinoma skuamöz hücreli karsinomanın bir subtipidir ve yavaş büyüyen bir siğil gibi oluşur. Lezyon tipik olarak öbekli veya ülseredir. Genellikle kaşıntı, irritasyon bazen de lokal kanama ve akıntı ile kendini gösterir. Aynı zamanda dizüri, dispareni ve ağrı oluşabilir. Vulvar neoplazili hastalar genellikle utanmalarından dolayı semptomları önemsemezler ve geç başvururlar³².

Skuamöz hücreli kanserlerin çoğunluğu unifokaldır ve primer olarak labia majörden köken alır. Diğer bölgeler klitoris, lokal glandlar ve labia majörün arka birleşke yeridir. Labiaların lenfatik drenajı inguinal ve femoral lenf nodlarından çok mons ve vulvar lenf nodlarına olur. Tümör aynı zamanda vagina, üretra ve rektum gibi komşu organları da invaze edebilir ve bu organların lenfatikleri ile de yayılım gösterebilir^{32,38}.

CIN ve servikal kanserde olduğu gibi VIN ve vulvar kanserde de HPV enfeksiyonunun etkisi güçlüdür. HPV enfeksiyonu artışı ile VIN artışı arasında güçlü bir ilişki vardır. Hilleman ve arkadaşları 30 VIN lezyonunun 24'ünde (%80) HPV 16 ve HPV 18 DNA'sı olduğunu tespit etmişlerdir. VIN 3 bulunan HPV 16/18 pozitif 21 hastanın 8'inde (%38.1) HPV 16 ve 18 genomlarının entegre olduğu görülmüştür³⁹.

Monk ve arkadaşları 55 vulvar kanserli hastada HPV DNA'sının histopatolojik, epidemiyolojik ve prognostik etkilerini araştırmışlardır. Vulvar kanserli

hastaların 33'ünde (%60) HPV DNA bulunmuştur. Yaşlı sigara içmeyenlere göre genç sigara içen vulvar kanserlilerde HPV DNA görülme olasılığı daha fazladır. HPV-DNA'nın varlığı ve bölgesel nodal metastaz mevcudiyeti vulvar kanserden ölüm ve rekürrens üzerine etkilidir^{38,39}.

2.5.2.3. Anal Kanser

Anüsün Skuamöz hücreli kanseri oldukça nadirdir ve genelde gastrointestinal sistem (GIS) kanserlerinin %1.5'ini oluşturur. Yapılan araştırmalar insidansın arttığını göstermektedir. Amerika'da 2007 için anüs anal kanal ve anorektal kanserlerin sayısı 4650 olup bunların 1900'ü erkek 2750'si kadındır³⁷. Rektal kanama, anal kaşıntı, hemoroidde ağrı ile hastalar başvurur. Eğer kanama yanlılıkla hemoroidlere bağlanır ise tanı atlanmış olur. Erken evre kanserler asemptomatik olabilir. Ancak rektal tuşe ile saptanabilen lezyonlardır.

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, HIV pozitifliğinin, düşük CD4 düzeyinin, sigara içiminin, anal ilişkinin ve solid organ transplantasyonu sonrası immünsupresyonunun risk faktörleri arasında olduğunu göstermektedir⁴⁰. Tachezy ve arkadaşları anal Skuamöz hücreli kanser olan 22 hastanın 18'inde (%81.8) HPV 16'yı tespit etmiştir⁴¹. Palefsky ve arkadaşları 24 hastanın örneklerinde yaptığı çalışmada HPV 16'nın özellikle yüksek dereceli anal intraepitelyal lezyon (AIN) ve invaziv kanserle ilişkili olduğunu bulmuştur⁴². HPV tip 6 ve 11 ise kondiloma ve düşük dereceli AIN ile ilişkilidir.

Öncül lezyon olan anal intraepitelyal lezyon genellikle anal siğillerin eksizyonları veya hemoreidektomi sırasında saptanmaktadır. Anal sitolojinin tanı için değeri tartışmalıdır⁴⁰.

2.6. Epidemiyoloji

Genital HPV en yaygın cinsel yolla bulaşan enfeksiyondur ve tahminen cinsel olarak aktif kadınların en azından %50'sinin bir veya daha fazla tiple enfekte olduğu

ileri sürülmektedir. HPV genotiplerinin en az 40'ı genital epitelyumu infekte eder. Her HPV tipi çeşitli klinik belirtilere sebep olur ve 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. Servikal kanser örneklerinin %99.7'sinde HPV bulunması, HPV enfeksiyonu ve servikal neoplazi gelişmesi arasındaki etyolojik ilişkiyi kuvvetle destekler. HPV enfeksiyonlarının çoğunun subklinik seyretmesi ve enfeksiyonların geçici olmasından dolayı epidemiyoloji ile ilgili veriler sınırlıdır^{43,44}.

Genital HPV enfeksiyonu en sık klinik, moleküler ve serolojik metodlar ile tanınır. Klinik belirtilerin büyük çoğunluğu genital siğillerin varlığı ile karakterizedir, ayrıca mikroskopik olarak görülebilen sitolojik ve histolojik özellikler ve kolposkopik olarak tespit edilen SIL'lerin varlığı ile karakterize edilir. HPV DNA'nın moleküler tespiti ya PCR'a dayalı amplifikasyon metodları veya hibridizasyon metodları ile yapılmaktadır. Serolojik metodlar, spesifik HPV tipleri tarafından üretilen bazı viral proteinlere karşı serum antikorlarının tespiti için kullanılır⁴⁵.

HPV prevalansı belli bir nüfusta, belli bir zaman dilimi içerisinde, çalışma kapsamında yer alan, enfeksiyona sahip kişilerin oranıdır. HPV tanı metodlarına göre değişiklik gösterir. Klinik olarak siğillere dayanan çalışmaların tipik olarak prevalansları düşüktür, oysa HPV DNA tespiti için PCR'a dayalı metodları kullanan çalışmalarda en yüksek prevalans bildirilmiştir. En yüksek prevalans cinsel olarak aktif kadınlarda, en düşük prevalans ise cinsel ilişkiye girmemiş olduğunu söyleyen kadınlar arasında bildirilmiştir^{45,46}.

Genital HPV enfeksiyonu, gelişmiş ülkelerde, genç cinsel aktif popülasyonlarda cinsel yolla bulaşan enfeksiyonlar içinde en yaygın olanıdır ve en fazla 15-24 yaş arası kadınlarda görülür. Tahminen dünyada her yıl 30 milyon yeni genital HPV vakası tanınmaktadır. Doğurgan yaştaki popülasyonun tahminen %75'i genital HPV ile enfekteldir ve cinsel aktif kadınların çoğu yaşamları sürecinde HPV enfeksiyonuna yakalanırlar^{47,48,49}. Onkojenik HPV tipleri ile oluşan enfeksiyonlar bütün HPV enfeksiyonlarının %50-75'ini oluşturur^{45,50}.

HPV enfeksiyonunun, cinsel yolla bulaşan hastalıklardan sorumlu olmasına ve servikal neoplazi ile etyolojik bağına rağmen, HPV genital enfeksiyonunun

epidemiolojisi ve doğal gelişimi hala tam olarak anlaşılmış değildir. HPV enfeksiyonunun prevalansı ve insidansı için doğru tahminler mevcut değildir. Çoğu enfeksiyonun subklinik veya kısa süreli olması, kesin tanının HPV DNA ve serum antikorlarının tespitine dayalı olmasından dolayı veriler kısıtlıdır. Şimdilik HPV tespiti için rutin tarama ve izleme sistemleri yoktur. Bu sebeple tespit edilen enfeksiyonların yeni mi kazanılmış yoksa uzun süreli enfeksiyonlar mı olduğu açık değildir. HPV enfeksiyonlarının insidans ve prevalansı, HPV DNA ve serum antikorları tespit metodlarını kullanan epidemiyolojik çalışmalara dayanır. Genital HPV enfeksiyonunun insidans ve prevalans tahminleri; çalışılan popülasyonun özellikleri, çalışma dizaynı, örnek toplama ve kullanılan HPV tespit metodlarına göre değişir. Aşağıda çeşitli bölgelerdeki HPV enfeksiyon prevalansı görülmektedir⁵¹.

Tablo 2.1. Bölgelere göre HPV prevalansı

Bölge	Yaş grupları						Toplam (no)	Tek HPV (%)	Multiple HPV		Toplam HPV(%)
	15-24 (no)	25-34 (no)	35-44 (no)	45-54 (no)	55-64 (no)	65-74 (no)			2(%)	≥3(%)	
Afrika	113	174	125	172	151	91	826	16.5	5	3.3	24.7
Asya	796	1578	1331	1037	881	477	6100	6.3	3.2	0.6	8.2
Güney Amerika	669	1088	871	442	322	154	3546	9.4	2.8	1.6	13.9
Avrupa	176	795	1379	1505	1064	222	5141	3.7	0.7	0.2	4.5
Kuzey Amerika	73	70	70	41	21	9	284	12.5	5.3	3.5	21.1
Tüm bölgeler	1827	3805	3776	3197	2439	953	15897	6.8	2.4	0.9	9.4

Kohort çalışmalarındaki verilere göre HPV enfeksiyonunun kümülatif insidans oranları, 12 ayda %13.6-41, 24 ayda %34-39, 36 ayda %43-44 ve 5 yıl takipte %55 olarak bildirilmiştir. Yüksek sayıda cinsel partneri olan, oral kontraseptif ve sigara kullanan, HSV ve vulvar siğilleri olan kadınlarda HPV enfeksiyon riski yüksektir⁵²⁻⁵⁵.

PCR'a dayalı metodlarla bulunan prevalans oranları, cinsel olarak aktif genç kadınlarda, kolej öğrencilerinde, HIV pozitif kadınlarda ve cinsel yolla bulaşan hastalığı olanlarda yapılan çalışmalarda yüksektir. Halbuki popülasyona dayalı çalışmalarda, jinekoloji kliniklerinde ayakta tedavi edilenlerde, yaşlılarda ve tek eşli kadınlarda düşük prevalans oranları bildirilmiştir⁴⁵.

Hanoi şehrinde 15-69 yaşında Vietnamlı kadınlarda HPV DNA prevalans oranları sitolojisi normal kadınlarda %2'den adolesan kliniğine (STD kliniği) başvuran

11-20 yaş kadınlarda %90'a kadar değiştiği görülmektedir⁵⁶. Kuzey Yunanistan'da jinekoloji kliniğine başvuran kadınlarda %2.5, İspanya Barselona'da popülasyona dayalı yapılan çalışmalarda %3, Tayland, Songla'da %3.9 gibi düşük prevalans oranları bildirilmiştir. Oysaki Atlanta'da adolesan kliniğine başvuran 12-19 yaş kadınlar arasında %64, USA'da 13-18 yaş arası HIV pozitif kadınlarda %77 gibi yüksek prevalans oranları bildirilmiştir. Bununla birlikte birçok prevalans çalışmasında %30'dan daha büyük prevalans oranları bildirilmiştir. Örneğin, Bauer, 16-24 yaş arası genç kadınlar arasında HPV DNA prevalans oranını %32 olarak tespit etmiştir. Peyton Amerika'da rutin jinekolojiye başvuran kadınlar arasında HPV prevalans oranını %39 olarak bildirmiştir. Wheeler ve Ley USA'de sitolojisi normal kolej öğrencileri arasında yaptıkları çalışmada prevalans oranlarını sırasıyla %43 ve %46 buldular. HPV DNA prevalans oranları Toronto üniversitesi öğrencilerinde %13'ten, San Fransisko'da genç kadın ve adolesanlar arasında %46'ya kadar değişik oranlarda bulunmuştur. Oysa geniş vaka-kontrol çalışmaları arasında servikal neoplazi prevalans oranları İspanya'da %5'ten New Mexico'da %42'ye kadar değişmektedir. En yaygın enfeksiyonlar HR-HPV tipleri ile meydana gelir ve infekte kadınlarda multiple HPV tipleri ile enfeksiyon oranı %5-30 arasındadır⁴⁵.

2.7. Tanı

2.7.1. Giriş

Servikal kanser kadın genital sisteminin en sık görülen 3. malignitesi ve tüm dünyada kadınlarda görülen kanserlerin 2. en yaygın sebebidir⁵⁷. Servikal mukoza epitelinin premalign ve malign lezyonlarının büyük çoğunluğunda etiyolojik ajanın HPV olduğu epidemiyolojik ve laboratuvar verileri ile desteklenmiştir. Tüm vakaların %95-100'ünde HPV saptanabilmektedir. HPV enfeksiyonunun 25 yaşın altındaki kadınlarda %28-46 arasında olduğu bildirilmiştir. Vakaların büyük bir kısmında HPV enfeksiyonu geçicidir ve servikal mukozada klinik önemi olan lezyonlara sebep olmazlar. Yüksek HPV insidansına rağmen düşük servikal kanser prevalansının olması, servikal mukozanın malign transformasyonunda diğer faktörlerinde etkili olduğunu

göstermiştir. Bu kofaktörler sigara, oral kontraseptif, çocuk sayısı, HSV 2 gibi diğer cinsel yolla bulaşan infeksiyonlar ve konağa ait faktörlerdir⁵⁸.

HPV-DNA çalışmaları servikal kanser taramaları için önemlidir, fakat klinik olarak etkili sonuç alınması çeşitli moleküler, biyolojik ve klinik faktörlere bağlıdır. HPV testi ASCUS'lu hastaların yönetiminde kabul edilmiştir ve servikal kanser taramasında 30 yaş üstü hastalarda servikal sitoloji ile birlikte artarak kullanılmaktadır. Ancak HPV testinin daha genç kadınların servikal kanser taramaları için veya düşük dereceli sitolojik anormalliklerin yönetiminde kullanımı sınırlıdır⁵⁹.

HPV çift zincirli sirküler genoma sahiptir. Genom, içinde erken (E1-E7) ve geç (L1, L2) open reading frames (ORF)'lere ayrılmıştır. Geç ORF'ler L1 ve L2 iki viral kapsid proteinini kodlar, oysaki erken ORF'ler hücre proliferasyonu ve DNA replikasyonunun regülasyonunda rol oynayan proteinleri kodlar. L1 ORF'nin nükleotid dizi farklarına dayanarak 100'den fazla farklı HPV tipi tanımlanmıştır ve 40'tan fazla tipin servikal mukozayı infekte ettiği bilinmektedir. Epidemiyolojik çalışmalar ile servikal kanser için düşük riskli tipler (tip 6, 11, 40, 42, 54 ve 57) ve yüksek riskli tipler (tip 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66 ve 68) olarak ayrılmışlardır. Düşük riskli tipler, genital siğil veya condyloma acuminata gibi benign lezyonlarla ilişkili iken yüksek riskli tipler (servikal infeksiyonların %90'ı) invaziv kanseri içeren displastik lezyonlardan sorumludur⁵⁸.

Squamöz maturasyon, CIN 1'de HPV'un epizomal replikasyonunun yüksek olduğunu gösterir. Tersine yüksek dereceli lezyonlar sıklıkla nonprodüktif infeksiyonu gösterir ve HPV'un viral integrasyonu ile sürdürülebilir. Bu faktörleri yüksek dereceli lezyonların tespiti için, moleküler stratejilerin geliştirilmesinde göz önünde bulundurmak önemlidir. Prodüktif HPV infeksiyonlarında, HPV DNA epizomal kromozomda kalır ve E1/E2 ORF'ler önemli onkoproteinler olan E6, E7 salınımını baskılar. Yüksek dereceli lezyonlar ve karsinomlarda viral DNA'nın konak genomu içine integrasyonu ile E1/E2 bozulur, bu E6 ve E7 proteinlerinin yüksek derecede salınımı ile sonuçlanır^{17,58,60}. E6 promoterin aşırı salınımı sonucu ubiquitin aracılı yol ile, hücre siklus düzenleyici protein olan p53 azalır, bu kontrolsüz hücre bölünmesi ile sonuçlanır. E7 onkoproteini retinoblastom genini (Rb) azaltarak, Rb cyclin D/p16^{INK4a} hücre siklus düzenleyici yolu bozar. Rb geninin azalması sırasıyla p16^{INK4a} promoterin hipometilasyonu ve aşırı p16^{INK4a} salınımıyla sonuçlanır⁶¹.

2.7.2. Sitolojik test

Servikal sitoloji testi kanser taramasında çok etkilidir, fakat klinik olarak önemi olan lezyonlarda sensitivitesi sınırlıdır ve yüksek yanlış negatif sonuç verebilir. Kolposkopik biyopsi önceleri altın standart olmasına rağmen son çalışmalarda servikal biyopsinin tanı veya örneklemeye hatalarından dolayı yüksek dereceli lezyonların %33-50'sinin gözden kaçırılabilceğı belirtilmiştir. Bundan dolayı yanlış pozitif servikal sitoloji sonuçlarına karşı, yanlış negatif biyopsi sonuçları arasında ayırım yapmak zor olabilir^{58,59}. Sitolojik olarak ASCUS tanısı konmuş hastaların servikal biyopsilerinde %5-17 CIN2-3 bulunmaktadır. Sitolojik olarak ASC-H (atypical squamous cells, cannot exclude high-grade squamous intraepithelial lesion) tanısı konmuş olanların biyopsilerinde %24-94 CIN 2-3 lezyon bulunur. Sitolojik olarak LSIL tanısı konmuş olanların kolposkopik muayenesinde %25'inde CIN 2-3, %45'inde CIN 1 bulunmuştur, fakat %25'in üstünde vakada displazi tespit edilmemiştir. Benzer olarak AGC (atypic glandular cells) tanısı almış hastalarda CIN 2-3 veya adenokarsinoma insitu bulunma olasılığı %9-41'dir⁶². Servikal sitolojide yanlış negatif sonuçların oranı %1.6'dan %28'e kadar değişebilmektedir. Ayrıca invaziv servikal karsinomalı hastalar servikal yaymalarında ki az sayıda anormal hücrenin nekrotik debritle, inflamasyon veya kanama ile gizlenmesinden dolayı sitolojik olarak yanlış negatif tanı açısından yüksek bir riske sahiptirler. Benzer şekilde AIS (adenocarcinoma insitu) için servikal sitoloji, invaziv endoservikal adenokarsinoma için %50'nin üzerinde yanlış negatif sonuç verebilir⁶³. Bu sebeple yüksek dereceli lezyonlar ve karsinomanın tespit edilmesi için servikal sitolojinin sensitivitesini arttıran ve yanlış negatif sonuçları azaltan moleküler tanı yöntemlerinde uygulanmasına ihtiyaç vardır.

2.7.3. HPV Testi

American Society for Colposcopy and Cervical Pathology consensus-based guidelines (<http://www.asccp.org/edu/practice/cervix.shtml>) ASCUS'lu hastaların yönetiminde ek olarak HPV testinin kullanımını desteklemektedir, fakat diğer anormal servikal sitoloji sonucu olanlarda HPV testinin kullanımını desteklememektedir. Stoller anormal servikal sitolojili örneklerin çoğunluğunda yüksek riskli HPV tiplerinin bulunmasına rağmen ASCUS'lu birçok hastada geçici HPV enfeksiyonu ile ilişkili hafif

sitolojik göstergelerin bulunduğunu, bu yüzden bu grup hastalarda HPV testinin spesifitesinin sınırlı olduğunu bildirmiştir. Ayrıca geçici HPV infeksiyonlarının yüksek, yüksek dereceli lezyonların düşük oranda gözlenmesi 30 yaş altındaki kadınlarda HPV tarama testinin etkinliğini sınırlar⁶⁴.

HPV infeksiyonlarının tanısı, hücresel örneklerde HPV'un tespiti ile mümkündür. Tüm HPV taramaları için klinik geçerlilik gereklidir. FDA iki HPV tarama metodunu onaylamıştır. Birçok HPV taraması kolposkopik biyopsi veya FDA onaylı ilk test olan HCII (Hybrid capture 2) test ile yapılır. İkinci onay alan test 2009 yılında HPV Invader testidir. HPV tanısı için 3 ana metod vardır. Bunlar direk hibridizasyon yöntemleri (Southern blot, dot blot, in situ hybridization), sinyal amplifikasyon testi (HCII) ve nükleik asit amplifikasyon (PCR) testleridir^{58,59,64}.

2.7.3.1. Direk Hibridizasyon

In situ hibridizasyon hem parafine gömülü doku örnekleri hem de servikal yaymalarda HPV antijenlerinin veya nükleik asitin (DNA veya mRNA) spesifik problemler ile birleşmesi temeline dayanmaktadır. Biotinlenmiş problemler, rutin olarak kromojenik substratlar ile saptanabilir ve yöntem klinik kullanımlar için otomatize edilmiştir (Ventana Benchmark Staining System, Ventana Medical Systems, Tucson, Ariz). Sinyal amplifikasyonu (catalyzed reporter deposition or CARD), floresan problemlerin kullanımı, küçük nanoprobe kullanımı (Nanoprobes, Yaphank, NY) ve bu tekniklerin kombinasyonu ile sensitivitede gelişmeler sağlanmıştır. Bununla birlikte örnek toplama, saklama veya işlem sırasında hedef nükleik asit kaybı teknik için önemli bir sınırlayıcı etkindir. Çoğu ticari olarak kullanılan DNA problemlerinde HPV tiplendirilmesi için gruplandırılmış problemler bulunmaktadır. Örneğin Enzo Life Sciences, Inc.(Farmingdale, NY) ve DakoCytomation (Copenhagen, Denmark) in situ tiplendirme ve görüntüleme tarama testleri HPV 16 ve 18'i tanıyabilir, ancak birbirinden ayırt edemez. Bazı testler (Bio Genex, San Ramon, Calif), hem oligonükleotid prob kokteyllerini hem de tip spesifik problemleri içerir. Ventana yüksek riskli HPV'ler için 13 genotip içeren kromojenik tarama testidir⁵⁸.

In situ hibridizasyonun avantajı, spesifik hücrelerde (normal hücreler veya koilositlere karşı tümör hücreleri) HPV infeksiyonunu tanımlayabilmesi ve

aynı zamanda fiziksel durumunun belirlenebiliyor (episomal HPV veya hücre genomu içerisine integrasyon) olmasıdır. Eğer tanı metodunun sensitivitesi fazla ise, aynı zamanda entegre olmuş HPV kopyalarının sayısı da belirlenebilir. Fiyat en önemli dezavantajdır multiple in situ hibridizasyon deneyleri her HPV tipi ve her örnek için yapılmalıdır⁶⁵.

2.7.3.2. Sinyal amplifikasyon testi

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

kuyucuklu mikropalak formatında kullanılmaktadır ve klinik laboratuvarlarında oldukça sık uygulanmaktadır^{58,67}.

2.7.3.3. Nükleik asit amplifikasyon testi

PCR HPV tanısı için en çok kullanılan ve en sensitif testtir. HPV-DNA'nın küçük parçalarını amplifiye eder, 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 ve konsensus testler olmak üzere 2 ana tipi vardır. Tip spesifik test tek bir HPV genotipinin amplifikasyonu için dizayn edilmiştir. Multiple PCR reaksiyonları böylelikle ayrı ayrı uygulanabilir, ancak her örnek için zaman ve fiyat artar^{68,69}. Konsensus testler ise HPV tiplerinin büyük bir kısmının tanınmasına olanak sağlar. Primerler farklı tiplerdeki belirli bölgeleri hedeflemek için dizayn edilmiştir. L1 iyi korunan bir bölgedir ve HPV tiplerinin klasifikasyonu için kullanılır. Kullanılan primerlerin büyük çoğunluğu L1 bölgesini hedef alır. MY09/11 gibi dejenere primer çiftlerinin kullanılması çoğalabilirlik kaybına ve PCR hızları arasında yüksek değişikliğe sebep olmaktadır. Bu sebeple artık oligonükleotid havuz setleri geliştirilerek MY09/11 ile aynı primer bağlanma bölgelerini kullanan sensitivitesi ve çoğalabilirliği geliştirilmiş PGMY09/11 primerleri geliştirilmiştir. Bunun sonucunda PGMY11 primer havuzu için 5 tane ters yönlü oligonükleotid, PGMY09 primer havuzu için 13 tane düz yönlü oligonükleotid oluşturulmuştur⁷⁰. PGMY09/11 primer seti L1 bölgesinin 450bp'lik fragmanı amplifiye eder. GP5+/6+ primer seti L1 bölgesinin 150bp'lik fragmanını amplifiye eder. 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 bağlanabilir⁷¹. PCR'ın etkinliği amplifiye edilen bölgenin boyutuyla ters orantılı olduğu için bu primer setinin sensitiviteyi artırması beklenirken çeşitli araştırmalarda ki primer setleriyle yapılan karşılaştırmalı sonuçlar uyumsuzluk göstermektedir⁶⁷.

Bazı araştırmacılar viral integrasyon sırasında L1 bölgesinin kaybolabildiği veya parçalanabildiğini ve böylece yanlış negatif sonuçların ortaya çıkabileceğini bildirmişlerdir⁷². Bazı araştırmacılar ise integrasyonun E2 ORF'yi parçaladığını bunun sonucunda transkripsiyonel düzenleyici proteinlerin kaybedildiğini ancak E6 ve E7 onkoproteinlerinin salınımının devam ettiğini bildirmişlerdir⁴⁵. E6 ve E7 bölgelerini hedefleyen primer setleri de günümüzde kullanılmaktadır. Son zamanlarda yapılan bir çalışmada yüksek riskli HPV tiplerinin (19 tip) geniş bir kısmını tanımak için 31 primer içeren E7 primer havuzu oluşturulmuştur. E7 bölgesindeki homolojiden dolayı bazı primerler 12'den fazla HPV tipini belirleyebilirler. Bu 31 primeri içeren yeni primer havuzu ile. GP5+/6+ primer seti arasında yapılan bir çalışmada E7 PCR ve APEX (array primer extension) yönteminin GP5+/6+'ya göre daha fazla HPV tipini tanımlayabildiği bildirilmiştir. Ancak E7 PCR HPV16 için daha az sensitiftir. Eğer L1 ve E6/E7 yöntemleri birlikte kullanılırsa sensitivite artar, yanlış negatif sonuç bulma oranı azalır⁷³.

HPV DNA'nın PCR ile amplifikasyonundan sonra HPV'un tipi, nükleik asit hibridizasyon, restriksiyon endonükleaz veya dizi analizi ile tanımlanabilir. Nükleik asit hibridizasyonu HPV tiplendirilmesinde en çok kullanılan yöntemdir. Çeşitli çalışmalar reverse hibridizasyon yöntemlerini değerlendirmiş ve bu yöntemler arasında tek enfeksiyon için yüksek korelasyonu göstermiştir. INNO-LiPA testi (Innogenetics, Temse, Belgium), kullanılan SPF10 primerlerinin kısa PCR ürünleri oluşturmamasından dolayı multiple enfeksiyonlar için yüksek sensitiviteye sahiptir. Roche Diagnostics Amplicor HPV testi biyotin ile işaretli L1 primerlerini kullanan Line blot hibridizasyon yöntemidir. Bu Amplicor HPV testi yüksek riskli HPV tiplerinin 13'ünü, daha ileri versiyonları yüksek ve düşük riskli tiplerin 37'sini tanıyabilir. Aynı zamanda insan β globin genini belirleyebilir. Digene HCII yöntemi ile Roche Amplicor HPV testi karşılaştırılmış, her iki testinde güvenilir sonuçlar verdiği, ancak HPV amplicor testinin sensitivitesinin daha yüksek olduğu bulunmuştur. HPV amplicor testi pahalıdır ve sadece gelişmiş laboratuvarlarda kullanılmaktadır^{58,59,74}.

Klassen ve ark. biotin işaretli HPV problemleri kullanarak 53 HPV tipini tespit eden yüksek dansiteli DNA microarray sistemini geliştirmiştir. Diğer araştırmacılar ve firmalar (GenomicTree, South Korea; MyGene, South Korea; Daiichi Pure

Chemicals/Toshiba, Japan) microarray (DNA ipleri) geliştirmişler ve HPV genotiplerini tespit etmişlerdir⁵⁸.

Restriction fragment length polymorphism (RFLP) çeşitli endonükleazlar kullanarak, DNA'yı spesifik baz çiftlerinden keser ve agaroz jel elektroforezi ile tespit edilebilen her biri farklı boyutlarda bantlar oluşturur. RFLP pahalı olmamasına rağmen uğraştırıcı bir yöntemdir, aynı zamanda manuel teknik olmasından dolayı her deneyde farklı sonuçlar alınabilir⁷⁵.

Dizi analizi pahalı olmasına rağmen, örneklerin rutin analizi için hızlı bir yöntemdir. Dezavantajı ise multiple HPV tiplerinde sensitivitesinin düşük olmasıdır. Klinikte HPV genotiplendirmesi için rutin olarak uygulanan bir yöntem değildir.

2.7.4. Tanıda kullanılan yeni teknolojiler

HPV tanısı ve genotip tespiti için hızlı, spesifik, sensitif ve düşük maliyetli yeni teknolojik yöntemler klinikte aktif olarak kullanılmaktadır. Luminex xMAP süspansiyon yöntemi tip spesifik oligonükleotid problemleri kullanarak 100 farklı HPV genotipini tespit edebilmektedir. Bu oligonükleotid problemleri polystyrene mikroparacıklarına bağlanır ve Luminex 100 cihazında okunur. Daha sonra biotin işaretli PCR ürünleri mikroparacık ile bağlanmış problemlere hibridize edilir. Her bir mikroparacık Luminex tarafından yüksek akımlı sıvı akışkan içerisinde iki ayrı lazer ile okunur ve yüzeydeki hibridizasyon miktarı belirlenir⁷⁵.

İnvader HPV testi FDA tarafından Mart 2009'da onaylanmış bir test olup, bu teknik iki izotermal reaksiyondan oluşur. İlk reaksiyon hedef DNA sırası üzerinde gerçekleşir ve ikinci reaksiyon floresan sinyal oluşturur. İlk reaksiyonda hedef DNA sırasına biri prob nükleotid diğeri invader oligonükleotid olan iki tip spesifik oligonükleotid hedef DNA sırasına bağlanır. Bu oligonükleotidler hedef sıra ile en az bir baz çakışacak şekilde dizayn edilmiştir ve Cleavase enziminin substrat olarak kullanılacağı bir invaziv yapı oluşur. Enzimin etkisiyle probun 5' ucundan "flap" denen parça ayrışır. Ayrışan flap sonra üniversal floresan rezonans enerji transferi (FRET) yapan proba bağlanarak yine Cleavase enziminin substrat olarak tanıyacağı ikinci bir invaziv yapı oluşturur ve enzimin etkisiyle quencher molekülünden florofor ayrışarak

floresan sinyal oluşur. Bu metodun bir avantajıda örneklerde yeterli DNA varlığını gösteren internal kontrol bulunmasıdır⁷⁶.

Viral yük yüksek dereceli servikal lezyonlar ile pozitif korelasyon gösterir ve hastalık takibinde önemlidir. Viral yükün yüksek olması persisten infeksiyon ve hastalığın ilerlediğini, düşük viral yük ise viral temizlenmeyi gösterir. Real time PCR tip spesifik HPV DNA'yı hedefleyen ve servikal örneklerde viral yükün belirlenmesinde kullanılan en iyi yöntemdir. HCII yöntemi de viral yükün semikantitatif olarak tahmin edilmesini sağlar, ancak düşük kopya sayılarının tespitinde başarısız olabilir⁵⁷.

E6 ve E7 onkogenlerinin ekspresyonu ile p53 ve Rb sürekli salınır, bu durum hücrenin malign transformasyonu ile sonuçlanır. PreTect HPVProofer assay (NorChip AS, Klokkestua Norway) real-time multiplex nükleik asit dizi amplifikasyonu ile E6/E7 mRNA'larını tespit eder. Pozitif sonuçlar E6/E7 integrasyonunu ve hastanın persisten infeksiyon için yüksek risk altında olduğunu gösterir. Yapılan bir çalışmada PreTect HPVProofer assay pozitif sonuç bulunan kadınlarda negatif sonuç bulunanlara göre 70 kat daha fazla CIN2 tanısı konduğu gösterilmiştir. PCR ile karşılaştırıldığında ise sadece 6 kat fazla CIN2 tanısı konduğu bulunmuştur⁷⁷.

Gen-Probe (San Diego, Calif) APTIMA HPV testini geliştirmiştir ve bu test HPV infeksiyonunun tanısı için yüksek sensitivite ve spesifiteye sahiptir. APTIMA yöntemi manyetik kaplı parçacıklara hedef rRNA'yı bağlayarak, örneklerdeki rRNA'nın parsiyel saflaştırılmasını sağlar. Saflaştırılan rRNA'nın amplifikasyonu için izotermal transkripsiyon aracılı amplifikasyon ile RNA-DNA hibridleri oluşturan DNA problemleri kullanarak RNA amplifiye ürünlerini tespit eder. Bu yöntem E6/E7 onkogenlerini hedef alır. Bundan dolayı persisten infeksiyon için yüksek riskteki kadınların tespit edilmesinde faydalıdır⁵⁷.

2.7.5. HPV taramalarında değerlendirme

Yüksek dereceli lezyonların tespiti için HR HPV testinin duyarlılığı yaklaşık olarak %95-100'dür. Yüksek dereceli CIN lezyonların tespiti için HR HPV testinin negatif prediktif değeri yaklaşık %100 gibi yüksek bir değerdir. Bu değer konvansiyonel sitolojik test ve LBA (Line Blot Assay)'de sırasıyla %68 ve %88'dir.

Servikal kanser için tarama testleri, anormal servikal sitolojinin tespitinde, şüpheli sitoloji sonuçlarının yönetiminde ve yüksek dereceli CIN lezyonlarının tedavisinin takibinde önemli bir rol oynar^{58,59}.

Sitolojinin pozitif prediktif değeri (PPV) HR HPV testinden fazladır. En yüksek HPV prevalansına sahip olan cinsel aktif genç kadınlarda klinik önemi olmayan pozitif HPV sonuçları önemli değildir. Çünkü immun sistemi normal kişilerde bunların büyük bir kısmı 12-24 ay içinde temizlenir. Bununla birlikte HPV'ye bağlı düşük dereceli lezyonların %70'i spontan olarak geriler. Halbuki HR HPV negatif kadınlarda gerileme oranı %100'dür. Viral temizlenme sıklıkla sitolojinin normale dönmesinden önce olur. Her ülkenin tarama programlarına bağlı olarak konvensiyonel sitolojik tarama güvenli bir şekilde 2-5 yıla uzatılabilir. Sitolojisi normal olan ve HR HPV negatif olan iki testin negatif prediktif değeri (NPV) %100'e yakındır. HPV DNA test sonucunun negatif (-) olması CIN2/CIN3 olasılığını %99 olasılıkla dışlamakta, prekanseröz lezyon mevcudiyetinin değerlendirilmesinde ve kolposkopi endikasyonunun belirlenmesinde hekime çok önemli bilgiler sağlamaktadır. Sonucun negatif bulunması gereksiz pek çok işlem yapılmasını ortadan kaldırmaktadır^{59,63}.

Yapılan birkaç çalışmada sınırda veya orta displazili, (borderline or mildly dyskaryosis: BMD) HR HPV negatif kadınlarda yüksek dereceli CIN lezyonlarına ilerleme tespit edilememiştir. HR HPV negatif BMD'li kadınların (BMD'lilerin %65'i) tümünün 5 yıl sonra ve HR HPV pozitiflerin ise 6 ay sonra sitolojik testleri tekrar edilir. Böylece bu grup hastaların kolposkopiye başvurusu yaklaşık %50 oranında azalır. Bu yaklaşımın maliyeti düşürdüğü de gösterilmiştir^{59,68,71}.

FDA (American Food and Drug Administration) 2003 yılında 30 yaş ve üstündeki kadınlarda yapılan kanser taramalarında HPV-DNA testinin Pap smear ile birlikte eş zamanlı kullanımını onaylamıştır. Ancak serviks kanseri araştırmalarında primer tarama testi olarak kullanılmasının daha doğru olduğu ve zaman içerisinde tek tarama testi olarak kullanılacağı yönünde makaleler yayınlanmaya başlamıştır. Servikal kanser tarama testlerinde anormal sitoloji tespit edilen hastaların mutlaka HPV DNA testi ile birlikte değerlendirilmesi hastalığın kesin tanısı, prognozu ve tedavisi hakkında yol göstermektedir. Bu yaklaşımla hastalara gereksiz invazif girişimler önlenmekte ve ülke ekonomisine önemli bir katkı sağlanmış olmaktadır. Gelecekte servikal kanser önleme programları, yalnızca HPV-DNA PCR testinin kullanılacağı ve servikal sitoloji

tekniklerinin ise HR HPV pozitif bulunan hastalarda kanserleşme sürecini takip etmek için kullanılacağı ileri sürülmektedir^{58,59,68,71}.

2.8. HPV İmmunolojisi

Bütün virus infeksiyonlarında olduğu gibi HPV infeksiyonunda da immun sistemin hücresel ve humoral cevabı virusa karşı savunmada oldukça önemlidir. Genellikle virus ve virus ile infekte olan hücreler doğal immun sistem tarafından yok edilirler. Doğal bağışıklık, herhangi bir patojene karşı deri ve mukozal hücreler tarafından sağlanan ve interferon- α , sitokinler, nötrofiller ve makrofajları içeren cevap ile karakterize nonspesifik dirençtir. Edinilmiş bağışıklık ise her bir patojen için spesifiktir ve humoral immunité ile hücresel immunitéyi kapsar. Doğal immunité APC'leri (antigen-presenting cell = antijen sunan hücre) aktive ederek adaptif immun sistemi uyarır. Diğer patojenlere nazaran HPV, bazı yapısal ve fizyolojik karakterlerinden dolayı zayıf immunojendir ve başarılı bir şekilde immun sistemden kaçabilir. Bunlar^{8,78}.

- 1- HPV doğal immun cevabı çağıran aracı RNA'sı olmayan çift zincirli DNA virusudur.
- 2- İnfeksiyonun erken fazında nonsekretuar nükleoproteinler üretir, bu yüzden infekte hücreler tarafından sunulamazlar.
- 3- Birçok HPV proteini, bazal epitelyumda çok düşük seviyede eksprese edilir. Böylece dentritik hücreler, infekte olmuş hücredeki virusa ulaşır onları yok etmeyi başaramazlar.
- 4- HPV sadece epitelyumu infekte eder ve epidermisin yüzeyinden salınır, doğal ve kazanılmış immunitenin majör aktivatör hücrelerini indükleyemez.
- 5- Sistemik HPV antijen sunumu sınırlıdır. Bu karakteristik özelliklerinden dolayı konak immun cevabı yavaş ve zayıftır. İmmunolojik cevaptan etkili bir şekilde kaçır.
- 6- HPV erken genleri, (E6 ve E7) interferon (IFN) ve nükleer faktör kappa B (NF- κ B) seviyelerini düşürür ve bu şekilde immun sisteme karşı savaşıır.

Genital HPV infeksiyonunun doğal seyri çoğunlukla (>%95), direk erken HPV proteinlerine karşı oluşan başarılı hücresel aracılı immun cevap ile lezyonlardan temizlenmesidir. İmmunohistolojik çalışmalar ile HPV infeksiyonuna karşı gelişen hücresel immun cevap mekanizmaları açıklanmıştır. Bu cevap ile genital siğillerin

kendiliğinden gerilediği gösterilmiştir. Gerilemeyen genital siğiller, infeksiyon bölgesinde ki çoğunluğu stromada bulunan mononükleer hücreler ve az bir kısımda intraepitelyal lenfositlerde ki CD8 hücrelerinin eksikliği sonucu gelişir. Gerileyen genital siğiller histolojik olarak incelendiğinde siğilin stroma ve epitelinde çoğunluğu T lenfositler (hem CD4+ hemde CD8+) ve makrofajların oluşturduğu infiltrat görülür. Lenfosit infiltrasyonu sonucu IL-12, TNF- α , ve IFN- γ gibi proinflatuar sitokin salınımı hızlanır ve siğil kapiller endotelinde lenfosit geçişi için gerekli adezyon moleküllerinin ekspresyonu artar. Bu mekanizma Th1 lenfosit immun cevap için karakteristiktir. İnsanlarda uzun süreli çalışmalar kısıtlı olduğundan dolayı köpek oral papillomavirus gibi hayvan modellerinde yapılan çalışmalarda, siğillerde meydana gelen immunolojik olaylar, infeksiyonun başlamasından gerilemesine kadar izlenmiştir. Hayvan infeksiyonlarında sistemik T hücre cevabı direk olarak HPV'un erken proteinleri olan E2 ve E6'ya karşı oluşur. Bu cevap kısa bir sürede gelişir ve viral DNA amplifikasyonu ile eş zamanlı oluşur. Siğilin gerilemesinde en büyük etkiye sahiptir, daha sonra hızlı bir şekilde azalır. Ayrıca nötralizan antikor serum seviyeleri siğilin gerilediği dönemde en üst seviyededir^{78,79}. HPV etkili bir şekilde konak defansını engellemesine rağmen, genital HPV infeksiyonuna karşı birçok kişide başarılı bir immun cevap gelişir. Güçlü, lokal hücresel immun cevap ile karakterizedir, serum nötralizan antikorların üretimi ve lezyonun gerilemesi ile sonuçlanır. Bu antikorlar infekte bireylerin çoğunda üretilir. HPV 6, 16, 18 ile infekte kadınların %54-69'unda tip spesifik L1 proteinine karşı antikor oluşumu bildirilmiştir⁸⁰. Antikor virus partikülünün dış membranındaki L1 kapsid proteinlerine karşı oluşur. Virionun en fazla immun sistemi uyaran epitopu L1 nötralizan epitopudur ve tip spesifiktir⁸¹.

Serum nötralizan antikor seviyeleri doğal infeksiyon süresince artar, ancak HPV'nun hücre içi patojen olması ve viremi yapmamasından dolayı pik yaptığı dönemde bile çok düşük seviyelerdedir. Yüzeyel epitel içerisinde virus partiküllerinin üretimi APC ve makrofajlardan etkilenmez. Düşük antikor titrelere rağmen koruyuculuk sağlanabilir. IgG kadın genital yolun majör immunglobulinidir. Serumda oluşan antikorlar servikal mukus içerisine transüda olur ve virüsü nötralize eder⁸².

Kadınların çok yüksek bir oranında HPV pozitif olmasına rağmen, çoğunda HPV infeksiyonu immun sistemi normal hastalarda subklinik olarak seyrederek veya lezyonlar sınırlı kalır. Genital HPV infeksiyonu cinsel aktif genç kadınlarda çok sıktır,

çoğu hastada serokonversiyon meydana gelir ve HPV DNA kaybolur. Yüksek riskli HPV için bu temizlenme zamanı örneğin HPV 16'da ortalama 8-16 aydır ve düşük riskli HPV infeksiyonlarına göre 4-8 ay daha uzundur. Fakat immun sistemi baskılanmış, renal transplantasyon veya HIV ile infekte hastalarda lezyon hızlı bir şekilde ilerler. Bundan dolayı HPV infeksiyonunun kontrolü ve kansere ilerleyişinde immun cevap önemli bir rol oynar. HPV infeksiyonunun uyardığı sistemik ve lokal humoral immun cevap bazı HPV antijenlerine, IgG ve IgA antikorlarının oluşması ile gösterilir. Örneğin servikal HPV 16 infeksiyonu bulunan kadınların büyük bir kısmında HPV 16 L1 kapsid proteinine sistemik IgG antikor cevabı oluşur ve virus benzeri partiküller (VLP) antijen gibi kullanılarak ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) ile tespit edilir. HPV DNA pozitif kadınlarda, HPV 16 VLP'ye karşı oluşan sistemik IgG ve IgA cevabı, kontrol grubundan daha fazladır ve persisten viral infeksiyon ile ilişkilidir. Tersine HPV 16 E7 proteinine sistemik IgG cevabı servikal intraepitelyal neoplazide viral temizlenme ile ilişkilidir. HPV 16 infeksiyonu olan kadınlarda HPV 16 VLP spesifik sekretuvar IgA'nın virus nötralizan aktivitesinin gözlemlenmesine rağmen HPV spesifik antijenlere karşı oluşan lokal IgA sağlıklı kadınlarda viral temizlenme ile ilişkili değildir. Benzer olarak lokal HPV 16 VLP spesifik IgA ve IgG cevabı CIN'li hastalarda viral temizlenme ile ilişkili değildir. HPV 16 kapsid antijenlerine karşı oluşan lokal antikorlar, HPV infeksiyonunun başlamasından birkaç ay sonra artar ve antikor seviyeleri HPV varlığına bağımlıdır. Servikal lezyonlar tedavi edildiğinde serum ve servikal mukus antikor seviyelerinin azaldığı izlenir^{8,78,79}.

2.9. HPV Aşıları

HPV infeksiyonuna karşı immunizasyonun esas amacı genital kanser insidansını düşürmektir. Bu aşılama ile HR HPV genotiplerine karşı immunitiyi uyarmak ile gerçekleştirilebilir, dolayısıyla bu HPV tipleri ile infeksiyonun önlenmesi sağlanmış olur⁷. Bir diğer hedef immunizasyon ile HPV ilişkili anogenital siğillerin önlenmesidir. HPV aşıları profilaktik ve terapötik aşılar olmak üzere iki gruba ayrılmıştır. Aşı çalışmaları 1993 yılından günümüze kadar yapılmaktadır. Bu zamana kadar yapılan çalışmaların çoğu profilaktik aşılarla ilgilidir⁸².

HPV gibi hastalık etkeni viral ajanların tanımlanması hastalığın önlenmesi için koruyucu ve tedavi edici yöntemlere yönelik yeni olanaklar sağlamıştır. HIV ve İnfluenza gibi bazı viral etkenlerin tedavisi için başarılı antiviraller geliştirilmiştir fakat HPV gibi viruslara karşı antiviral yoktur. HPV enfeksiyonuna karşı tedavi edici aşı, kanserle ilişkili HPV komplikasyonlarının önlenmesi için son derece iyi olacaktır. Ancak devam eden çalışmalara rağmen HPV ve diğer viruslara karşı etkili yeterli immun cevap oluşturan bir tedavi edici aşı geliştirilememiştir.

HPV'un servikal kanser ve diğer hastalıklara sebep olduğunun anlaşılmasından sonra benign ve malign HPV lezyonlarının önlenmesi için etkili bir HPV aşısı gerekmektedir. Profilaktik aşılar da amaç, HPV'ye karşı etkin bir immun cevap oluşturmak ve bu sayede oluşabilecek enfeksiyonu önlemektir⁸³. Bu amaçla 2 aşı kullanıma girmiştir. Merk firmasının ürettiği kuadriyalan aşı olan Gardasil, 9-26 yaş arası 25.000'nin üzerinde genç kadında test edilmiş, Haziran 2006'da FDA tarafından onaylanmış ve kullanıma girmiştir. Bu aşı HPV 6, 11, 16, 18 tipleri için koruyucudur. Etkinliği HPV enfeksiyonlarını önlemede %95, servikal kansere sebep olan persisten enfeksiyonları önlemede %98.5'tir. İlk cinsel ilişkiden önce uygulanırsa etkinliği yüksektir ve genç yaşta aşılananlarda immun cevap daha belirgindir⁸⁴. GlaxoSmithKline firması tarafından üretilen bivalan aşı olan Cervarix, 15-25 yaş arası 30.000'nin üzerinde kadında test edilmiş ve FDA onayı almıştır. Bu aşı HPV 16, 18 tipleri için koruyucudur. İlk HPV enfeksiyonunu önlemede %95, persisten enfeksiyonları önlemede %100 etkilidir. Koruyuculuğu en az 5 yıl devam eder. Yapılan çalışmalarda diğer HPV tipleri ile çapraz reaksiyon gösterdiği bildirilmiştir^{85,86}.

Persisten enfeksiyon oluşturan yüksek riskli HPV enfeksiyonlarında immunolojik çalışmaların çokluğu servikal kanserden aşı ile korunmaya yönelik umutları arttırmıştır. İlaç endüstrisinde HPV aşılarının üretimine yönelik ilk adım epidemiyolojik çalışmaların ortaya koyduğu deneysel kanıtlar ile atılmıştır.

Günümüzde klinik olarak kullanılan aşılar genelde virus benzeri partiküller formatındadır⁸⁷. İlk olarak HPV 16'ya ait L1 ve L2 bölgelerinin vaccinia virus'a integre edilmesi ile üretilmesi başarılmış ve daha sonra aynı bölgelerin maya hücrelerine integrasyonu ile aşı elde edilmiştir. Major kapsid proteini olan L1 bölgesinin bu yöntemler ile eksprese edilmesi ile virus-benzeri partikül oluşması sağlanmıştır⁷. Aşının saflaştırılması ve uygun adjuvanın eklenmesi ile virus benzeri partikül kullanıma

girmiştir. HPV 16'nın bütün servikal kanserlerde oranı % 50 iken bu oran HPV 18'de %20'dir. Bu aşılardan tüm servikal kanserlerde ve öncül lezyonlarda koruyucu olma oranı %70 olarak belirlenmiştir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda aşılardan HPV 16'ya yakın suş olan HPV 31 ve HPV 18'e yakın suş olan HPV 45'in meydana getirdiği infeksiyonlarda da koruyuculuğu gösterilmiştir. Bu suşların oluşturduğu infeksiyonlarda aşılardan koruyuculuğu %80'dir⁷.

HPV üzerine yapılan çalışmalar ile çok önemli bilgilere ulaşılmıştır. Her iki aşıda yukarıda belirtilen HPV suşlarının sebep olduğu infeksiyonlarda virüsle karşılaşmamış kadınlarda oldukça yüksek koruyuculuğa sahiptir. Aşıların 9-25 yaş arası kadınlara uygulanması önerilmektedir. Aşılanmanın ilk cinsel ilişkiden önce yapılması gerekir ve aşılardan intramüsküler olarak 0, 1 veya 2 ve 6. aylarda uygulanması uygun görülmektedir. Aşılanmış kişilerin yaklaşık %100'ünde antikor oluşur Bu antikorlar 6 yıl gibi uzun bir süre kanda tespit edilebilir⁸⁶.

Servikal kanser vakalarının % 83'ü Sahra-altı Afrika, Merkez ve Kuzey Amerika ile Doğu Asya'da görülmektedir. Avrupa'da fiyatı 500 Euro, Amerika'da ise 360 dolar olan bu aşılar yüksek maliyetlerinden dolayı bu bölgelerde ihtiyaç olmasına karşın uygulama şansı bulamaması söz konusudur⁷.

Geliştirilen aşılardan uygulanması ve servikal kanser taramaları birlikte yapılmalıdır, çünkü aşılardan kanser sebebi olan diğer yüksek risk HPV tiplerine karşı (%25-30) koruma sağlamamaktadır. Dolayısıyla erken dönem servikal lezyonların belirlenmesi ve prognozu hala ciddi bir problemdir.

Günümüzde en büyük problem aşılanmanın küresel olarak nasıl uygulamaya geçirileceğidir. Bu sorun aşının fiyatının düşürülmesi ile bağlantılıdır. Bununla birlikte yeni aşı politikaları geliştirilmeli ve yeterli finansal destek sağlanmalıdır. Servikal kansere karşı tüm dünyada duyarlılığın gelişmesi için lokal bölgelerde sağlık çalışanları, politikacılar, okul öğretmenleri, şirket çalışanlarının bilgilendirilmesi gereklidir. Bu yönde adımlar atılması için Dünya Sağlık Örgütü (WHO), Birleşmiş Milletler ve diğer Ulusal kurumların harekete geçmesi gerekmektedir. Servikal kanser insidansı dünyada hala ikinci sıradadır, her yıl yaklaşık 500,000 kadın bu hastalığa yakalanmaktadır.

Gelecekte kullanıma girecek ve alternatif olacak birçok aşı günümüzde mevcuttur. Önemli olan bu aşılardan dünyanın tüm bölgelerinde kullanılması için fiyat olarak uygun olup olmadığıdır. Bunun için geliştirilen yeni aşılardan 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 immunojenik cevap oluştururlar. Bundan dolayı virüs-benzeri partikül üretimine dayalı aşılarda yerini alabileceği bildirilmektedir.

Günümüzde birçok alternatif yöntem değerlendirilmektedir. L2 proteinin N-terminal kısmı çok iyi seviyede gruba özgü immun cevap oluşturmaktadır ve birçok HPV tipinde nötralize edici antikorların varlığı belirlenmiştir. Bu gelişme gelecekte papillomavirus enfeksiyonlarına karşı geniş spektrumlu aşılarda geliştirilmesi açısından ümit verici olarak değerlendirilmektedir. Çıplak viral DNA veya viral RNA vektörlerinin kullanılması veya HPV L1 proteinini eksprese eden genetik olarak modifiye edilmiş, zayıflatılmış Salmonella suşlarının intranasal olarak uygulanmasını içeren yöntem, profilaktik ve tedavi edici aşılarda çalışmalarında değerlendirilmektedir. Önemli yaklaşımlardan birisi adeno-associated virus (AAV)'un HPV L1 proteinini taşıması şeklinde modifiye edilmesidir. Ayrıca AAV virusunun 60°C'ye kadar dirençli olması soğuk zincir uygulamasını ortadan kaldırmaktadır. Bu aşılarda intranasal olarak uygulanabilir olmaları enjeksiyon gereksinimi ortadan kaldırır. Spesifik yüksek riskli HPV tiplerine karşı immunizasyon çalışmalarında deneysel olarak çok olumlu sonuçların elde edilmesine karşın bu konu ile ilgili birçok problem hala çözülmeyi beklemektedir.

Önemli bir problem, persisten enfeksiyonlarla birlikte erken ve geç servikal/intraepitelyal neoplazilerin, in-situ karsinomanın ve invaziv servikal kanserin kemoterapötik veya immunoterapötik açıdan çözüm bulunabilmesi konusudur. İmmunoterapinin, persisten virus enfeksiyonu ile seyreden erken lezyonlarda etkili olabileceği düşünülmektedir. Birçok viral onkoprotein 3 boyutlu yapısı günümüzde bilinmektedir. Bu gelişme gelecekteki çalışmalar açısından olumlu bir durumdur. RNA interferens çalışmaları deney aşamasındadır ve doku kültürü çalışmalarında RNA interferens çalışmalarına uygun olarak E7 fonksiyonunun inhibe edilmesi hücreleri apoptoza götürebilmektedir. Gelecek yıllarda bu yeni yöntemlerin uygulamaya girmesiyle umut verici sonuçlar elde edilebilecektir^{7,88,89}.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Balcalı Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum polikliniğine 2006 Mart ve 2008 Mart tarihleri arasında başvuran hastalarda, rutin olarak yapılan Pap testi için servikal hücre sürüntüsü alındıktan sonra aynı fırça, içinde fosfat tamponlu tuzlu su (Phosphate buffered saline; PBS) bulunan steril kaplar içerisine konuldu. Klinik olarak asemptomatik kadınlar çalışmaya dahil edildi.

İçinde PBS bulunan steril kaplar içine alınan örnekler, bekletilmeden tüplere aktararak 6000 X g'de 5 dakika santrifüj edildi ve çökelti ependorf tüplerine alınarak 200µl TE (Tris EDTA) buffer eklendi. Örnekler çalışılana kadar -70 °C'de saklandı. Örnekler çözdürüldükten sonra servikal hücrelerden DNA ekstraksiyonu yapıp -70°C'de saklandı. Daha sonra örneklerde HPV konsensus PCR ile HPV-DNA varlığı araştırıldı. Pozitif bulunan örnekler servikal kanserden en çok sorumlu olan HPV 16, 18, 31 ve 45 gibi genotiplerin tanısı için tip spesifik PCR ile analiz edildi.

Her hastanın Pap testi sonuçları ve kolposkopi ile alınan biopsi sonuçları kaydedildi. Ayrıca her hastaya ait yaş, eğitim, medeni durumu, kontraseptif metodlar ve sigara kullanımı gibi demografik ve epidemiyolojik faktörler için bilgi formu dolduruldu.

3.1. HPV DNA ekstraksiyonu

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

3.1.1 Çözeltilerin Hazırlanması

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

Liyofilize halde bulunan 2 mg poly (A) taşıyıcı DNA 0.5 ml elution buffer ile çözüldü. İyice karıştırıldı ve bu karışım 50 µl'lik hacimlere bölünerek ependorf tüplerinde -20°C'de saklandı. Çalışma sırasında bu 50 µl'lik karışıma, 2.5 ml binding buffer [6M guanidine-HCl, 10mM Tris-HCl, %20 Triton X-100 (w/v), pH 4.4 (25°C)] eklendi. Binding buffer ve poly(A) karışımı her çalışma sırasında yeniden hazırlandı.

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

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

3.1.2.Ekstraksiyon aşamaları

1. Saklanan 200µl'lik smear örneğine 2.5 ml binding buffer ve 50µl Poli A karışımından 200 µl alınıp örneklerin bulunduğu ependorf tüplerine eklendi. Ayrıca her bir örneğin üzerine 50 µl proteinaz K (20 mg/ml) eklenip vortekslendi ve 72°C'de 10 dakika inkübe edildi.
2. İnkübasyondan sonra kapakta sıvı kalmaması için kısa süreli santrifüj edildi. Üzerine 100µl binding buffer eklendi.
3. Kit içerisindeki toplama kapları ve filtreli tüpler iç içe geçirilerek birleştirildi.
4. Örneklerin bulunduğu eppendorf tüpündeki karışım, hazırlanan toplama kapları içerisine aktarıldı ve 15 saniye vortekslendi ve 8000 X g'de 1 dakika santrifüj edildi.
5. Santrifüj sonrası, toplama kabı atıldı. Filtre tüpleri yeni toplama kaplarına yerleştirildi.
6. Üzerine 500 µl inhibitor removal buffer eklenip 8000 X g'de 1 dakika santrifüj edildi.
7. Santrifüj sonrası toplama kabı atıldı. Filtre tüpleri yeni toplama kapları üzerine yerleştirildi.
8. Üzerine 450 µl Wash Buffer eklendi ve 8000 X g'de 1 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası toplama kabı atıldı. Filtre tüpleri yeni toplama kapları üzerine yerleştirildi. Bu basamak toplam iki kez yapıldı.

9. Bu işlemten sonra 13000 X g'de 10 saniye santrifüj edildi. Santrifüj sonrası toplama kabı atıldı. Filtre tüpleri 1.5 ml'lik ependorf tüplerine yerleştirildi.
10. Üzerine 50 µl Elution Buffer eklendi ve 8000 X g'de 1 dakika santrifüj edildi.
11. Ependorf tüp içindeki filtre tüpü atıldı ve daha sonra bu tüpler -70°C'de saklandı.

3.2. Konsensus PCR ile HPV amplifikasyonu

Bütün örnekler HPV DNA analizinden önce ekstrakte edilen DNA'nın yeterliliğini kontrol etmek amacıyla PC04 (CAACTTCATCCACGTTCCACC) ve GH20 (GAAGAGCCAAGGACAGGTAC) primerleri ile hücresel beta-globin varlığı yönünden araştırıldı ve 268 bp'lik beta-globin geni pozitif bulunan örnekler HPV-DNA yönünden test edildi^{90,91}.

Primerler: Örnekler önce MY09 ve MY11 primerleri^{92,93} kullanılarak HPV-DNA'nın L1 geni içinden 450 baz çifti (bp) uzunluğundaki bölge amplifiye edildi. HPV DNA negatif bulunan örnekler, GP5+/6+ primerleri⁹² ile HPV DNA'nın 450bp'lik bölgesinden 150 bp uzunluğundaki bölge tekrar amplifiye edildi.

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

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

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

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

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

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

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

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

HPV GP5+/GP6+ nested PCR, 95°C de 5 dakika süren ön denatürasyonu takiben aşağıda belirtilen siklulardan oluşmuştur.

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

Son elongasyon için 72°C de 7 dakika bekletildi.

DNA ekstraksiyonu, PCR ana karışımının hazırlanması (“master mix”), ve örneklerin ana karışıma eklenmesi izole edilmiş 3 ayrı odada yapıldı. PCR kontaminasyonunu engellemek için reagenler, küçük hacimlerde tüplere bölündü. Aeresol bariyerli pipet uçların kullanımı, eldivenlerin sık sık değiştirilmesi ve yüzeylerin dekontaminasyonu için UV ışık ve sodyum hipokloritle silinmesi gibi kontaminasyona karşı genel önlemler alındı.

3.3. Amplifiye edilen PCR ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezinde gösterilmesi

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

40xTAE tamponunun hazırlanması;

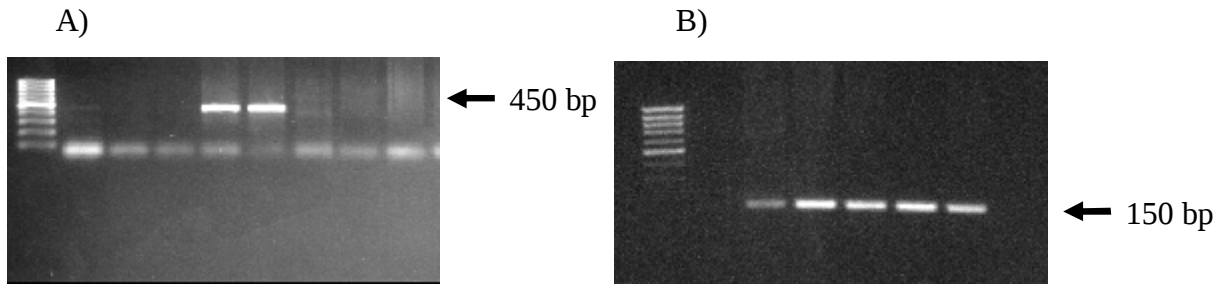
38.72 gr	Tris-Base (1.6 M) (Sigma)
21.78 gr	Na Asetat x3 H ₂ O (0.8 M)
3.04 gr	EDTA (40 M) (Sigma)

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

1. Elektroforez için kullanılan tampon 1xTAE solüsyonu elde etmek için 40x TAE solüsyonu distile su ile dilüe edildi.
2. Eridiğinde % 2’lik jel oluşturacak şekilde agaroz tartılıp bir balon içerisine konuldu.
3. Üzerine 1xTAE tamponu ilave edilerek mikrodalga fırında eritildi.
4. Bir süre 60°C’nin altına düşmeyecek şekilde soğutuldu.

5. İçerisine 100ml'lik jel için 5 µl etidyum bromid (10 mg/ml'lik stok) eklenerek karıştırıldı.
6. Jel, önceden hazırlanmış ve tarakları uygun olarak yerleştirilmiş kalıp tepsisinin üzerine yavaşça döküldü.
7. Oda sıcaklığında 20-30 dakika bekletilerek katılaşması sağlandı.
8. Jel kalıbı tanka (OWL Separation Systems Model B2 Mini Gel Electrophoresis System) yerleştirilerek taraklar yavaşça çıkarıldı.
9. Örneklerden 10'ar µl alınarak 1µl yükleme tamponu (%20 sükroz, %0.25 brom fenol mavisini (1xTAE ile hazırlanmış)) ile karıştırılarak, açılan her kuyuya bir örnek olacak şekilde konuldu. İlk kuyuya 100 bp'lik (Fermentas) DNA markeri yüklendi.
10. Tankın güç kaynağı (LABNET International Power Station 300) alıştırılarak 100 V akım verildi.
11. Brom fenol mavisinin migrasyonu takip edilerek jelin 2/3'lik kısmına ulaştığında elektroforez durduruldu.

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



Şekil.3.1. PCR amplifikasyon ürünlerinin %2'lik agaroz jeldeki görüntüleri. A) HPV-DNA'nın L1 geni içinden 450 baz çifti uzunluğundaki diziler (MY09/MY11); B) HPV-DNA'nın L1 geni içindeki 150 baz çifti uzunluğundaki diziler (GP5+/GP6+) görülmektedir.

3.4. Pozitif Bulunan HPV-DNA Örneklerinin Tiplendirilmesi

Pozitif bulunan örnekler tip tayini için ilk olarak ORF bölgesi içindeki E6 ve E7 konsensus primerleri kullanılarak DNA fragmanları amplifiye edildi. Düşük riskli tipler (HPV 6 ve 11), pU-31B ve pU-2R⁹⁴, yüksek ve orta riskli tipler (HPV 16, 18, 31, 33, 52 ve 58) ise pU-1M ve pU-2R primerleri⁹⁵ kullanılarak amplifiye edildi ve %2'lik agaroz jelde yürütülerek görüntülendi. HPVpU-1M ve pU-2R primerleri⁹⁵ ile yaklaşık 230-270 bp ve HPV pU-31B ve pU-2R primer çifti ile yaklaşık 230 bp uzunluğunda PCR ürünleri tespit edildi. Aşağıda, kullanılan primerlerin baz dizisi gösterilmiştir.

HPV pU-31B ve pU-2R primerleri kullanılarak yapılan PCR, 95°C de 5 dakika süren ön denatürasyonu takiben aşağıda belirtilen siklulardan oluşmuştur.

95°C	de	(denatürasyon)	1 dakika	} 40 siklus
54°C	de	(bağlanma)	1 dakika	
72°C	de	(uzama)	1 dakika	

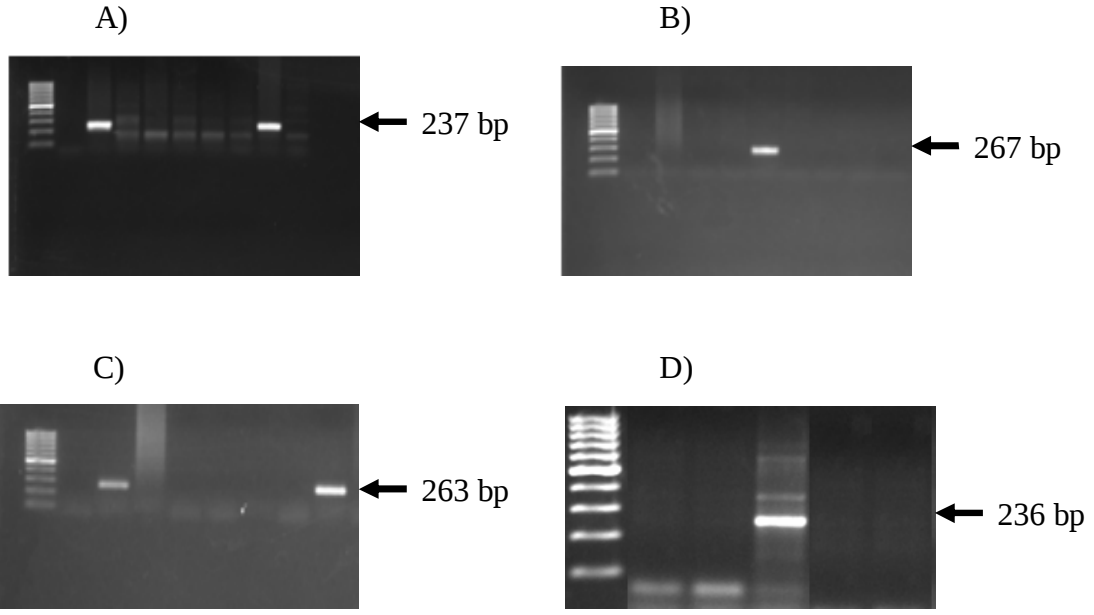
Son elongasyon için 72°C de 7 dakika bekletildi.

HPV pU-1M ve pU-2R primerleri kullanılarak yapılan PCR, 95°C de 5 dakika süren ön denatürasyonu takiben aşağıda belirtilen siklulardan oluşmuştur.

95°C	de	(denatürasyon)	1 dakika	} 40 siklus
54°C	de	(bağlanma)	1 dakika	
72°C	de	(uzama)	1 dakika	

Son elongasyon için 72°C de 7 dakika bekletildi.

Yüksek riskli tipler için pU-1M ve pU-2R primerleri kullanılarak pozitif bulunan örnekler daha sonra HPV 16, 18, 31, 45 primerleri kullanılarak amplifiye edildi. PCR ürünleri %2'lik agaroz jelde görüntülendi. HPV 16 primerleri⁹⁶ ile 237 bp, HPV 18 primerleri⁹⁶ ile 267 bp, HPV 31 primerleri⁹⁷ ile 263 bp ve HPV 45 primerleri⁹⁸ ile 236 bp uzunluğunda PCR ürünleri tespit edildi.



Şekil.3.2. Tip spesifik PCR amplifikasyon ürünlerinin %2'lik agaroz jeldeki görüntüleri
A) HPV 16 primerleri ile 237 bp; B) HPV 18 primerleri ile 267 bp; C) HPV 31 primerleri ile 263 bp; D) HPV 45 primerleri ile 236 bp uzunluğunda PCR ürünleri görülmektedir.

4. BULGULAR

Bölgemizde asemptomatik kadınlarda HPV prevalansını belirlemek amacıyla Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum polikliniklerine başvuran hastalardan alınan servikal sitoloji örnekleri PCR yöntemiyle değerlendirildi. Toplam 472 örnek alındı ve hücrel beta globin varlığı yönünden pozitif bulunan 460 örnek çalışmaya dahil edildi. Bu 460 örnekten 24'ü HPV DNA yönünden pozitif bulundu. HPV pozitif 24 örnekten 18'i MY09/MY11 primerleri ile pozitif bulunurken, 6'sı GP5+/6+ nested PCR ile pozitif bulundu.

Değerlendirilmeye alınan hastaların 37 (%8)'si 20-29 yaş arası, 91 (%19.8)'i 30-39 yaş arası, 162 (%35.2)'si 40-49 yaş arası, 116 (%25.2)'si 50-59 yaş arası ve 54 (%11.8)'ü 60 yaş ve üzeri yaş grubunda yer almakta idi (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. Çalışma grubundaki kadınların yaş gruplarına göre dağılımı

Yaş grupları									
20-29		30-39		40-49		50-59		≥60	
Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
37	8	91	19,8	162	35,2	116	25,2	54	11,8

Çalışmaya katılan popülasyonun yaşları 20 - 68 yaş, HPV pozitif bulunan kadınların yaşları ise 32 - 52 yaş arasında idi. HPV DNA pozitif bulunan kadınların hepsi 30 yaşın üstünde idi. En fazla HPV DNA pozitiflik %9.9 oranla 30-39 yaşları arasındaydı. HPV pozitifliğinin 40-49 yaş arasında %4.3'e düştüğü, ancak 50-59 yaş arasında tekrar %6.8 ile ikinci bir pik yaptığı tespit edildi. HPV DNA evlilerde %4.5 boşanmış kadınlarda ise %20 oranında saptandı. Çalışmaya katılan kadınların %24.4'ü sigara kullanmaktaydı. Sigara kullananların %8.9'u kullanmayanların ise %4'ünde HPV

DNA tespit edildi. Üniversite mezunlarında HPV DNA oranı %10.5, eğitimi olmayanlarda %4.6, ilköğretim mezunlarında %4.3 ve lise mezunlarında %4.1 idi. Çalışmaya katılan kadınların %5.9'u OKS kullanmaktaydı, OKS kullananlarda HPV DNA pozitifliği %7.4 kullanmayanlarda %5 bulundu (Tablo 4.2).

Tablo 4.2. Çalışmaya dahil edilen kadınların demografik özellikleri

	Çalışma grubu		HPV DNA pozitif	
	No	%	No	%
Yaş				
≤29	37	8	-	-
30-39	91	19.8	9	9.9
40-49	162	35.2	7	4.3
50-59	116	25.2	8	6.8
≥60	54	11.8	-	-
Medeni Hal				
Evli	440	95.6	20	4.5
Boşanmış	20	4.4	4	20
Eğitim Durumu				
Yok	131	28.4	6	4.6
İlköğretim	164	35.6	7	4.3
Lise	98	21.3	4	4.1
Üniversite	67	14.7	7	10.5
Sigara				
Evet	112	24.4	10	8.9
Hayır	348	75.6	14	4
OKS Kullanımı				
Evet	27	5.9	2	7.4
Hayır	433	94.1	22	5

Toplam 460 önekten 436'sı (%94.8) HPV DNA negatif bulunurken, 24'ü (%5.2) HPV DNA pozitif bulundu. Pozitif bulunan 19 (%4.1) örnekte infeksiyona sebep olan tek bir HPV tipi, 5 (%1.1) örnekte ise multiple tipler saptandı. HPV DNA pozitif bulunan 24 örneğin 11'inde (%45.8) yüksek riskli tip, 10'unda (%41.7) düşük riskli tip ve 3'ünde (%12.5) hem yüksek hem de düşük riskli tip birlikte bulundu. Tek ve multiple infeksiyon şeklinde HR HPV infeksiyon prevalansı %3 (14/460)'dür. HPV

DNA tespit edilen örneklerin 7'si HPV 16 (%29.2), 1'i HPV 31 (%4.2), 1'i HPV 45 (%4.2), 1'i HPV16 + 45 (%4.2), 1'i HPV 18 + 45 (%4.2), 2'si HPV 45 + LR (%8.4), 1'i HR + LR (%4.2), ve 10'u (%41.7) LR HPV olarak tiplendirildi (Tablo 4.3).

Tablo 4.3. Servikal hücrelerde PCR ile tespit edilen HPV tiplerinin dağılımı

Tespit edilen HPV	No (%)
Tüm kadınlar	460 (100)
Negatif	436 (94.8)
Pozitif	24 (5.2)
Tek infeksiyon	19 (4.1)
Multiple infeksiyon	5 (1.1)
HR-HPV	11 (2.4)
LR-HPV	10 (2.2)
LR-HPV + HR-HPV	3 (0.6)
Tip dağılımı	No (Pozitifler içindeki oranı)
LR-HPV (HPV 6 veya 11)	10 (41.6)
HPV 16	7 (29.2)
HPV 31	1 (4.2)
HPV 45	1 (4.2)
HPV 16 + 45	1 (4.2)
HPV 18 + 45	1 (4.2)
HPV 45 + LR-HPV	2 (8.4)
HR-HPV + LR-HPV	1 (4.2)

PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu (polymerase chain reaction)

HPV: Human papillomavirus

LR-HPV: Düşük riskli Human papillomavirus (Low risk Human papillomavirus)

HR-HPV: Yüksek riskli Human papillomavirus (High risk Human papillomavirus)

Kadınlardan alınan servikal hücrelerin yapılan patolojik incelemesinde, 457 (%99.4) kadında normal servikal sitoloji, 2 (%0.44) kadında ASCUS, 1 (%0.22) kadında LSIL tespit edildi. Servikal sitolojisi normal bulunan kadınların 23'ünde (%5) HPV DNA pozitif bulunurken, servikal sitoloji tanısı ASCUS olan 2 olgu HPV DNA negatif, LSIL olan 1 olguda HPV 18 ve HPV 45'in sebep olduğu multiple infeksiyon bulundu (Tablo 4.4). HPV DNA pozitif bulunan 23 örnekten 13 örnekte HR HPV DNA, 10 örnekte LR HPV DNA tespit edildi.

Tablo 4.4. Çalışmaya katılan kadınların sitoloji sonuçları ve HPV DNA oranları

Sitoloji sonucu	No	%	HPV	%
Normal Sitoloji	457	99.4	23	5
ASCUS	2	0.4	-	-
LSIL	1	0.2	1 (HPV 18+45)	100
HSIL	-	-	-	-
TOTAL	460	100	24	5.2

ASCUS: Önemi bilinmeyen atipik skuamöz hücreler (atypical squamous cells of undetermined significance)

LSIL: Düşük dereceli skuamöz epitel lezyonu (Low Grade Squamous Intraepithelial Lesion)

HSIL: Yüksek dereceli skuamöz epitel lezyonu (High Grade Squamous Intraepithelial Lesion)

HPV DNA pozitif bulunan 24 örnekte tek ve/veya multiple enfeksiyon sebebi olarak sekiz (%33.3) HPV 16, bir HPV 18 (%4.2), bir HPV 31 (%4.2), beş HPV 45 ve toplamda (%20.8), on altı (%66.7) HR HPV ve on üç (%54.2) LR HPV tipi tanımlanmıştır (Tablo 4.5).

Tablo 4.5. HPV (+) bulunan 24 spesifik HPV tiplerinin prevalansı

	HPV16	HPV18	HPV31	HPV45	HPV X	HR HPV	LR HPV
HPV (+) (24)	8/24	1/24	1/24	5/24	1/24	16/24	13/24
%	33.3	4.2	4.2	20.8	4.2	66.7	54.2

Pozitif bulunan HR HPV tipleri yaş aralıklarına göre dağıtıldığında 30-39 yaş arası pozitif bulunan 7 HR HPV tipinin 3'ü (%42.9) HPV 16, 1'i (%14.3) HPV 18, 2'si (%28.6) HPV 45 idi ve pozitif bulunan 1 (%14.3) örnek tanımlanamadı. HR HPV pozitif olan 3 örnek 40-49 yaş arasında idi, bunların 2'si (%66.7) HPV 16, 1'i (%33.3) HPV 45 olarak tanımlandı. HR HPV pozitif olan 6 örnek 50-59 yaş arasında bulundu ve bunların 3'ü (%50) HPV 16, 1'i (%16.7) HPV 31, 2'si (%33.3) HPV 45 olarak tanımlandı. Toplam HR HPV bulunan 16 örneğin 8'i (%50) HPV 16, 1'i (%6.3) HPV 18, 1'i (%6.3) HPV 31, 5'i (%31.3) HPV 45 ve 1'i (%6.3) ise belirlenemeyen (X) tip olarak bulundu (Tablo 4.6).

Tablo 4.6. HR HPV (+) bulunan HPV tiplerinin yaşıa göre dağılımı

	No HPV %	HPV 16 %	HPV18 %	HPV 31 %	HPV 45 %	X %
20-29 (37)	-	-	-	-	-	-
30-39 (91)	7 %7.7	3 %42.9	1 %14.3	-	2 %28.6	1 %14.3
40-49 (162)	3 %1.9	2 %66.7	-	-	1 %33.3	-
50-59 (116)	6 %5.2	3 %50	-	1 %16.7	2 %33.3	-
≥60 (54)	-	-	-	-	-	-
Total (460)	16 %3.5	8 %50	1 %6.3	1 %6.3	5 %31.3	1 %6.3

5. TARTIŞMA

HPV servikal kanserin primer sebebi olması yanı sıra HPV infeksiyonu cinsel yolla bulaşan en yaygın infeksiyonlardan biridir. Kadınların yaşamları boyunca HPV infeksiyonuna yakalanma riski %50'den fazladır. Genç kadınlarda görülen HPV infeksiyonlarının çoğu, %80'den fazlası geçicidir. Genellikle klinik belirtiler görülmeden %70-90'ı 1-2 yılda iyileşir. HPV infeksiyonlarının %10'undan azında ise persisten infeksiyon gelişir. Yüksek risk (HR) HPV DNA'nın 12 aydan daha uzun süre tespit edilmesi persisten infeksiyonun göstergesidir ve persisten HR HPV infeksiyonu prekanseröz lezyon ve servikal kanser gelişmesi için majör risk faktörüdür. Ancak displaziye ilerleyen infeksiyonların bile çoğu iyileşir. Düşük grade lezyon CIN 1'in %50-60'ı, yüksek grade lezyon CIN 2'nin %30-40'ı geriler. Bu durum HPV infeksiyonlarının kontrolünde immun cevabın oldukça etkin olduğunu gösterir. HPV infeksiyonu olan kişilerin sadece %1'inden azında servikal kanser gelişir. Genital mukozayı 40'tan fazla HPV tipi infekte eder. Mukozal HPV tipleri servikal kanserle ilişkilerine göre düşük (LR) ve yüksek (HR) riskli HPV tipleri olarak sınıflandırılır. LR HPV tiplerinden özellikle HPV tip 6 ve 11 genital siğillerin %90'dan fazlasından sorumludur. HR HPV grubunda ise servikal mukozayı infekte eden en az 15 onkojenik tip bilinmektedir. Servikal kanserden en çok izole edilen HPV tipi %53.5 oranla HPV tip 16'dır, bunu ikinci sırada %17'lik oranla HPV tip 18 izler. HPV tip 16 ve 18 bütün servikal kanserlerin %70'inden sorumludur. Diğer HPV tiplerinden ise HPV tip 45 üçüncü sırada, HPV tip 31 dördüncü sırada yer alır ve bu dört HPV tipi bütün servikal kanserlerin %80'inde tespit edilir⁹⁹.

Genel popülasyondaki kadınlarda HPV prevalans oranları farklı coğrafik bölgelerde büyük farklılıklar göstermektedir. Dünyada kadınlarda HPV infeksiyon prevalansının %2-44 arasında değiştiği bulunmuştur. HPV prevalanslarındaki bu farklılıklar çalışılan popülasyonlar ve kullanılan çeşitli HPV DNA testlerinin moleküler sensitivitesindeki farklılıklar ile açıklanabilir. En yüksek prevalans oranları en sensitif test olan PCR testinin kullanımından gelir. HPV infeksiyonu için en çok riskte olan

grup cinsel olarak aktif genç erişkinlerdir, çünkü epidemiyolojik çalışmalar HPV infeksiyon prevalansının 18-25 arası genç kadınlarda en yüksek olduğunu göstermiştir¹⁰⁰. Yeni yapılan bir meta analizde 78 çalışmanın verileri kullanılarak normal sitolojisi olan kadınlar arasında global HPV prevalansı %10.4 bulunmuştur ve bölgeye göre önemli varyasyon göstermiştir. En yüksek prevalans Afrika'da %22.1 iken Orta Amerika ve Meksika'da %20.4, Kuzey Amerika'da %11.3, Avrupa'da %8.1 ve Asya'da %8'dir. Afrika, Amerika ve Avrupa'da 45 yaş sonrası veya daha ileri yaşlarda belirgin şekilde ikinci pik gözlenmiştir. Sitolojik olarak normal kadınlarda tip spesifik prevalans verileri olan 48 çalışmaya göre en yaygın beş HPV tipi HPV 16 (%2.5), HPV 18 (%0.9), HPV 31 (%0.7), HPV 58 (%0.6) ve HPV 52 (%0.6)'dir¹⁰¹.

Avrupa ülkelerinde 18 çalışmanın meta analizinin yapıldığı çalışmada 30-64 yaş arası kadınlarda HR HPV prevalansı İspanya'da %2'den Belçika ve Fransa'da yaklaşık %12'ye kadar değişmektedir. Bütün HR HPV pozitifler arasında HPV 16'nın ortalama oranının yaklaşık %30 ve HPV 18'in ise %12 oranında bulunduğu bildirilmiştir¹⁰².

Verteramo ve arkadaşları İtalya'da 2000-2004 yılları arası rutin olarak jinekoloji polikliniğine başvuran 17-57 yaş arası 753 kadında L1 bölgesini hedefleyen MY09/11 primerleri, ayrıca E6/E7 genlerine yönelik primerlerin kullanıldığı PCR testi ile yaptıkları bir çalışmada HPV DNA prevalansını %18.3 (138/753) bulmuş ve en yüksek prevalansa sahip olan tipin %14.18 ile HPV 16 olduğunu tespit etmiştir. Bunu sırasıyla HPV 53 (%9.21), HPV 58 (%7.80), HPV 66 ile HPV 6 (her ikisi %5.67) takip etmiş ve diğer tiplerin oranı %5'in altında bulunmuştur. HPV pozitif bulunan toplam 138 örnekten 41'inde (%29.08) LR HPV, 83'ünde (%58.86) HR HPV ve 17'sinde (%12.06) bilinmeyen HPV tipi tespit edilmiştir. 3 örnekte (%2.17) multiple infeksiyon bulunmuştur. HPV DNA pozitif bulunan örneklerin büyük bir kısmı 34 yaşın altındaki kadınlarda tespit edilmiştir¹⁰³.

Klup ve arkadaşlarının Almanya'da 8101 kadında tip spesifik HPV dağılımını araştırdıkları, HC II testi ve genotiplendirme için PGMY09/11 PCR line blot assay (LBA) testi kullanarak yaptıkları epidemiyolojik çalışmada HR HPV infeksiyon prevalansı HC II testi ile %6.4 (521/8101), PGMY09/11 PCR LBA testi ile ise %4.3 (344/8101) bulunmuştur. PGMY09/11 PCR LBA testi ile 3678 kadının bulunduğu 30-39 yaş grubunda 228 kadın (%6.2) en az 1 karsinojenik HPV tipi için pozitif

bulunmuştur. Diğer yaş gruplarında 40-49 yaş arası %3.1, 50-59 yaş arası %2, 60 ve üzeri yaş grubunda %1.6 karsinogenik HPV oranları tespit edilmiştir¹⁰⁴.

Leinonen ve arkadaşlarının Finlandiya’da 2003-2004 yılları arasında 25-65 yaş arası 16.895 kadında HC II testi ile yaptıkları çalışmada HR HPV prevalansı %7.5 (1.274/16.895) bulunmuştur. Prevalansın pik yaptığı 25-29 yaş grubunda HR HPV %24.1 olup ileriki yaşlarda giderek azalarak 65 yaşlarında yaklaşık %2.9’a düşmüştür¹⁰⁵.

Sanjose ve arkadaşlarının İspanya Barselona’da 1998-2000 yılları arasında 20-65 yaş arası 973 kadında GP5+/6+ PCR testi ile yaptıkları çalışmada HPV infeksiyon prevalansı %2.98 (24/973) olarak tespit edilmiştir. En yaygın tip %20.7 (6/24) ile HPV 16 olarak belirlenirken, bunu HPV 31 ve HPV 35’in birlikte bulunduğu multiple infeksiyon %13.6 (4/24) ve HPV 51 %10.3 (3/24) ile izlemektedir. Multiple infeksiyon prevalansı %1 (10/973) bulunmuştur. Yaş gruplarında en yüksek prevalans %5.9 (18/287) ile 18 ve altı yaş grubunda tespit edilmiştir¹⁰⁶.

Agorastos ve arkadaşları Yunanistan’da 2000-2001 yıllarında jinekoloji kliniklerine başvuran 17-67 yaş arası 1296 kadında PGMY09/11 primerlerinin kullanıldığı reverse line blot PCR testi ile HPV prevalansını %2.5 olarak tespit etmişlerdir. HPV 16, %18.7 oranla tek tip veya multiple infeksiyonda tespit edilen en yaygın tip olarak bulunmuştur. Multiple infeksiyon prevalansı %0.4 oranla nadir olarak tespit edilmiştir¹⁰⁷.

Nyari ve arkadaşları Macaristan’da 2000 yılında yaş ortalaması 35.5 olan 397 asemptomatik kadında HC II testini kullanarak yaptıkları bir çalışmada HPV DNA prevalansını %23 (91/397) bulmuş ve pozitif bulunan hastaların büyük kısmının %37 (23/62) ile 24 yaş ve altında olduğunu tespit etmiştir. HR HPV prevalansı %16 (15/91) bulunmuştur ve bunların %69’unda (11/16) patolojik servikal sitoloji sonucu tespit edilmiştir³.

Clavel ve arkadaşları Fransa’da 1997-2001 yıllarında 15-76 yaş arası 7.932 kadında HR HPV tipleri için yaptıkları HC II testi ile HR HPV prevalansını %15.3 (1.214/7.932) bulmuşlardır¹⁰⁸.

Kjaer ve arkadaşlarının Danimarka’da 2004-2005 yıllarında 15-93 yaş arası normal servikal sitolojili 10.918 (%94), ASCUS veya LSIL sitolojili 494 (%4.3), HSIL sitolojili 188 (%1.6), toplam 11.617 (17 örnek analiz için yeterli değildi) kadında HC II

testi ile yaptıkları çalışmada normal servikal sitolojili 10.918 kadında HPV prevalansı %22.9, HR HPV prevalansı %19.2 ve LR HPV prevalansı %7.4 bulunmuştur (%3.8'i sadece LR HPV, %15.5'i sadece HR HPV ve %3.7'si hem LR hem HR HPV tiplerine sahipti). HPV 16 %4.8 ile en yaygın tip bulunurken, bunu sırasıyla HPV 31 (%3.8), HPV 52 (%3.7), HPV 51 (%3.6), HPV 68 (%2.4), HPV 18 (%2.2), HPV 39 (%2.2), HPV 66 (%1.9), HPV 53 (%1.9), HPV 45 (%1.8) ve diğer tipler izlemiştir¹⁰⁹.

Cuschieri ve arkadaşları İngiltere'de 2000 yılında 16-78 yaş arası 3444 kadında real time GP5+/6+ PCR testi ile yaptıkları çalışmada HPV DNA pozitifliğini %20 (705/3444) bulmuşlardır. HPV pozitif bulunan 705 örnekten 187'sinde (%26.5) LR HPV, 540'ında (%76.6) HR HPV ve 114'ünde (%16) sınıflandırılmayan HPV tipleri tespit edilmiştir. Toplam popülasyonda (3444 kadın) ise LR HPV %5.5, HR HPV %15.7 oranında bulunmuştur. HPV 16 %6.4 ile en yaygın tip iken, bunu sırasıyla HPV 18 (%2.2), HPV 51 (%2.2), HPV 31 (%2.1), HPV 52 (%1.8), HPV 45 (%1.4), HPV 73 (%1.4), HPV 59 (%1.3), ve diğer tipler izlemiştir¹¹⁰.

Amerika kıtasında yapılan çalışmalarda; Dunne ve arkadaşları Amerika'da 2003-2004 yılında 14-59 yaş arası 1921 kadında PGMY09/11 primerlerinin kullanıldığı PCR testi ile yaptıkları çalışmada HPV infeksiyon prevalansını %26.8 olarak tespit etmişlerdir. HR HPV prevalansını %15.2, LR HPV prevalansını ise %17.8 bulmuşlardır. En yaygın HPV tipleri HPV 62 (%3.3), HPV 84 (%3.3), HPV 53 (%2.8), HPV 89 (%2.4) ve HPV 61 (%2.4) olarak bulunmuştur. Aşı tipleri olan HPV 16 kadınların sadece %1.5'inde, HPV 16 ve 18 ise %0.8'inde oldukça düşük oranda pozitif bulunmuştur. En yüksek prevalans 20-24 yaş arası grupta %44.8, en düşük prevalans ise 50-59 yaş grubunda %19.6 olarak tespit edilmiştir¹¹¹.

Perez ve arkadaşlarının Arjantin'de 15-67 yaş arası servikal sitolojisi normal olan 79 kadında MY09/11 ve GP5+/6+ primer setlerinin kullanıldığı PCR testi ile yaptıkları çalışmada HPV infeksiyon prevalansı %30 (24/79) bulunmuştur. Pozitif bulunan hastalarda HR HPV prevalansı %33.4 (8/24) olarak tespit edilmiştir. En yaygın tip %29.2 (7/24) ile HPV 16 iken, HPV 18 %4.2 (1/24) ve multiple infeksiyon oranı %8.3 (2/24) olarak belirlenmiştir¹¹². Sellors ve arkadaşları Kanada'da 1998-1999 yıllarında 15-49 yaş arası 955 kadında HC II testi kullanılarak yaptıkları çalışmada HR HPV prevalansını %12.7 (121/955) bulmuşlardır. En yüksek HR HPV prevalansı %24

(30/125) ile 20-24 yaş arası grupta, en düşük HR HPV prevalansı ise %3.4 (4/118) ile 45-49 yaş arası grupta belirlenmiştir⁵⁴.

Anguiano ve arkadaşları Meksika’da 2003 yılında 20-72 yaş arası 498 kadında MY09/11 primerlerinin kullanıldığı PCR testi ile yaptıkları çalışmada HPV DNA prevalansını %4.8 (24/498) bulmuşlardır. En yaygın görülen tip pozitif bulunan 24 örneğin 18’inde tespit edilen HPV 16 (%75) iken, 2 örnekte HPV 16’ya ek olarak HPV 18 koinfeksiyonu belirlenmiş ve pozitif bulunan 6 örnekte çalışmada bakılan HPV tipleri olan HPV 16, 18 ve 33 negatif bulunmuştur¹¹³.

Rama ve arkadaşlarının Brezilya’da 2002-2003 yıllarında 15-65 yaş arası 2300 kadında HC II testi ile yaptıkları çalışmada genital HR HPV infeksiyon prevalansı %17.8 bulunmuştur. En yüksek HR HPV prevalansı 25 yaş altı kadınlarda %27.1 olarak tespit edilmiştir¹¹⁴.

Ferreccio ve arkadaşları Şili’de 2000-2001 yılında 15-69 yaş arası 955 kadında GP5+/6+ primerlerinin kullanıldığı PCR testi ile yaptıkları çalışmada HPV DNA prevalansını %12.8 (122/955) bulmuşlardır. HR HPV prevalansı %9.1 (87/955), LR HPV prevalansı %3.7 (35/955) olarak tespit edilmiştir. HR HPV tiplerinden HPV 16, 56, 31, 58, 59, 18 ve 52’nin infeksiyonların %75.4’ünden sorumlu olduğu belirlenmiştir. En yaygın tip %2.6 (25/955) ile HPV 16 bulunmuştur¹¹⁵.

Asya ülkelerinde yapılan çalışmalar incelendiğinde; Sowjanya ve arkadaşlarının Hindistan’da 2002-2003 yıllarında 30-65 yaş arası 185 kadında HC II testi ile yaptıkları çalışmada HR HPV prevalansı %10.3 (19/185) bulunmuştur¹¹⁶. Dai ve arkadaşlarının Çin’de 2004 yılında 15-59 yaş arası servikal sitolojisi normal olan 594 kadında GP5+/GP6+ PCR yöntemi ile yaptıkları bir çalışmada HPV prevalansı %9.6 (57/594), HR HPV prevalansı %7.4 (44/594) bulunmuştur ve en yüksek prevalansa sahip olan tipin %3 oranla (18/594) HPV 16 olduğu tespit edilmiştir¹¹⁷.

Kulmala ve arkadaşları Rusya, Belarus ve Litvanya’da 2007 yılında 15-85 yaş arası kadınlarda HPV tespiti için HC II, genotiplendirme için real time PCR testini kullanarak yaptıkları ortak çalışmada tarama grubunda bulunan 1601 kadında HPV prevalansını % 27.2, normal jinekoloji polikliniğine başvuran 695 kadında ise HPV prevalansı %30.9 olarak bildirilmiştir. Tüm gruplarda HR HPV prevalansı %31.2 bulunmuştur. Tüm gruplarda bulunan en yaygın tip %34.3 ile HPV 16, ikinci yaygın tip ise %14.3 ile HPV 31 olarak bildirilmiştir¹¹⁸.

Shin ve arkadaşları 1999-2000 yılında Kore’de 20-74 yaş arası servikal sitolojisi normal olan 821 kadında PCR testi ile yaptıkları çalışmada HPV infeksiyon prevalansını %8.5 (70/821), HR HPV prevalansı, %4.38 (36/821) bulmuşlardır. Multiple infeksiyon prevalansı %1.59 ve en yaygın tip %1.34 ile HPV 70 olarak belirlenmiştir¹¹⁹.

Maehama ve arkadaşları Japonya’da 20-89 yaş arası normal servikal sitolojisi olan 4078 kadında PCR testi ile yaptıkları çalışmada HPV DNA pozitifliğini %10.6 bulmuşlardır. HPV infeksiyonu en fazla 20-29 yaş arası kadınlarda %20.4 iken, 30-89 yaş arası kadınlarda yaklaşık %10 olarak tespit edilmiştir. En sık bulunan HPV tipi %5.8 oranla HPV 35, en az bulunan ise %0.5 oranla HPV 18 olmuştur¹²⁰.

Afrika ülkelerinde yapılan çalışmalarda; Thomas ve arkadaşlarının Nijerya’da 1999 yılında 15 yaş ve üstü rutin jinekoloji polikliniğine başvuran 932 kadında PCR testi ile yaptıkları çalışmada HPV prevalansı %26.3, HR HPV prevalansı %19.7 bulunmuştur. Servikal sitolojisi normal olan 844 kadında HPV prevalansı %24.8, HR HPV prevalansı %18.3 olarak tespit edilmiştir¹²¹.

Baay ve arkadaşlarının 2004 yılında Zimbabwe’de servikal sitolojisi normal olan 15-49 yaş arası 174 kadında PCR testi ile yaptıkları çalışmada HPV DNA prevalansı %27 gibi yüksek oranda bulunmuştur¹²². Domfeh ve arkadaşları Gana’da 2002 yılında 19-57 yaş arası 75 kadında GP5+/6+ primerlerinin kullanıldığı PCR testi ile yaptıkları çalışmada HPV DNA prevalansını %10.7 (8/75) olarak tespit etmişlerdir¹²³.

Ülkemizde yapılan çalışmalarda; Rota ve arkadaşları Ankara’da 2004 yılında çeşitli şikayetlerle rutin jinekoloji polikliniğine başvuran 313 kadında MY09/11 primerlerini kullanarak PCR testi ile yaptıkları çalışmada HPV prevalansını %11 (34/313) bulmuşlardır. HPV pozitif bulunan örneklerin HPV 16 ve 18 tip spesifik primerleri kullanılarak yapılan PCR testinde 13’ü (%4) HPV 16, 9’u (%3) HPV 18 ve 12’si (%3.5) HPV 16 ve 18 dışındaki tipler olarak tespit edilmiştir¹²⁴. İnal ve arkadaşları Türkiye’de 2002-2005 yıllarında, servikal intraepitelyal lezyon ile HPV ilişkisinin araştırıldığı, 1353 kadında HC II testi kullanılarak yaptıkları çalışmada HPV DNA pozitifliğini % 2.14 (29/1353) oranında saptamışlardır. Pozitif bulunan örneklerin %24.1’inde (7/29) HPV 6, %27.5’inde (8/29) HPV 11, %27.5’inde (8/29) HPV 16, %10.3’ünde (3/29) HPV 18 ve %10.3’ünde (3/29) HPV 31 tespit etmişlerdir¹²⁵. Ağaçfidan ve arkadaşları İstanbul’da 2001 yılında 18-67 yaş arası 179 asemptomatik

kadında HC II testi ile yaptıkları çalışmada HR HPV prevalansını %6.1, LR HPV prevalansını ise %5 bulmuşlardır¹²⁶. Öztürk ve arkadaşları Denizli’de 2004 yılında jinekoloji polikliniğine başvuran 18-62 yaş arası 206 kadında HC II testi ile yaptıkları çalışmada HPV DNA prevalansını %4.9, normal servikal sitolojisi olanlarda %2.1 bulmuşlardır. HPV prevalansı en yaygın %7.3 ile 30-39 arası yaş grubunda, daha sonra %6.3 ile 15-19 yaş grubunda tespit edilmiştir. Epitelyal hücre anomalisi olan kadınlarda HPV DNA pozitifliği %42.9 bulunmuştur¹²⁷. Gökahmetoğlu ve arkadaşlarının Kayseri’de 2003 yılında 20-68 yaş arası 100 kadında HC II testi ile yaptıkları çalışmada normal servikal sitolojisi olan 93 kadının 7’sinde (%7.5) HPV DNA bulmuşlardır¹²⁸. Midilli ve arkadaşlarının İstanbul’da 2003 yılında 144 sağlıklı kadında HC II testi ile yaptıkları çalışmada HPV DNA pozitifliği %6.25 bulunmuştur¹²⁹.

Çalışmamızda bölgemizdeki kadınlarda HPV DNA prevalansı %5.2 (24/460) bulunmuştur. Tek ve/veya multiple infeksiyon şeklinde HR HPV infeksiyon prevalansı ise %3 (14/460)’dür. Birçok ülkede yapılan çalışmalarda genel popülasyondaki kadınlarda HPV prevalansı İtalya’da %18.3, Macaristan’da %23, İngiltere’de %20, Danimarka’da %22.9, Amerika’da %26.8, Arjantin’de %30, Zimbabwe’de %27, Rusya’da %30.9 ve Nijerya’da %26.3 olup bizim çalışma popülasyonunda bulduğumuz %5.2’lik orandan oldukça yüksek, Kanada’dan bildirilen %12.7, Şili’den %12.8, Çin’den %9.6, Japonya’dan %10.6, Gana’dan %10.7 ve Kore’den %8.5’lik oranlar ise biraz yüksektir. Meksika’daki çalışmada tespit edilen %4.8’lik oran bizim bulgumuza benzer olup, İspanya’da %2.98, Yunanistan’da %2.5 bulunan HPV prevalans oranları daha düşüktür. Çalışmada kadınlarda HR HPV prevalansı %3 olup İtalya’daki %11, Macaristan’daki %16, Fransa’daki %15.3, İngiltere’deki %15.7, Danimarka’daki %19.2, Amerika’daki %15.2, Arjantin’deki %10.1, Brezilya’daki %17.8, Şili’deki %9.1, Hindistan’daki %10.3 ve Nijerya’daki %19.7’lik oranlar bizim bulgumuzdan oldukça yüksek iken, Finlandiya’da %7.5, Çin’de %7.4 oranı biraz yüksek ve Kore’de %4.8’lik oran ise bizim bulgumuza benzerdir. Çalışmamızda HR HPV pozitif bulunan örnekler arasında HPV 16 %50 (8/16), HPV 18 %6.3 (1/16) ve iki tip toplam %56.3 (9/16) olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar aşı tipleri olan HPV 16 ve 18’e yönelik aşılamanın popülasyonumuzda etkili olabileceğini göstermektedir. HR HPV pozitif 16 HPV tipinin %50’si HPV 16, %31.3’ü HPV 45 ve %6.3 oranlarında HPV 16, 31 ve bilinmeyen HPV tipidir. Ayrıca HPV pozitif bulunan 24 kadının 5’inde (%20.8)

multiple infeksiyon bulunmuştur. Birçok ülkede multiple HPV infeksiyonu oranı ise %8.3 ile %43 arasında değişmektedir. HPV pozitif bulunan toplam 24 kadında HR HPV tiplerinin dağılımına bakıldığında ise %33.3 HPV 16, %20.8 HPV 45 ve %4.2 oranında HPV 18 ve 31 tespit edilmiştir. HPV 16 prevalans oranı İngiltere’de %31.5, Arjantin’de %29.2 ve Çin’de %31.6 olup bizim %33.3’lük bulgumuza benzer, İtalya’daki çalışmada bildirilen %14.1 ve İspanya’da çalışma popülasyonundaki %20.7’lik oranlar ise düşüktür. Yine çalışmamızda %4.2 bulunan HPV 18 oranı İtalya’dan bildirilen %3.54 ve Arjantin’deki %4.2’lik orana benzerdir. Spesifik HR HPV tiplerinin prevalansı da ülkeler arasında farklılık göstermektedir. İspanya, Danimarka ve Rusya’da en yaygın HPV tipi HPV 16 olup bunu HPV 31 izlemektedir. Oysa İngiltere ve Arjantin’de en yaygın tipler sırasıyla HPV 16 ve 18, Amerika’da ise HPV 62 (%3.3), 84 (%3.3) ve 53 (%2.8) bulunmuştur.

Ülkemizde kadınlarda HPV prevalansının araştırıldığı çalışmalarda bulunan oranlar Ankara’da %11, Kayseri’de %7.5 ve İstanbul’da %6.25 olup bizim %5.2’lik orandan yüksek iken, Denizli’de bildirilen %4.9’luk oran bizim bulduğumuz orana benzerdir ve İzmir’de tespit edilen HPV prevalansı %2.1 olup bölgemizdeki orandan düşüktür.

Çalışma popülasyonumuzda 460 kadının 457’sinde (%99.3) normal sitoloji, 2’si ASCUS biri LSIL olmak üzere 3’ünde (%0.7) anormal sitoloji tespit edilmiştir. LSIL pozitif olan örnekte aynı zamanda HPV 18 ve 45 tipleri ile multiple infeksiyon bulunmuştur. Sitolojisi normal olan 457 kadından 444’ü (%97.2) HR HPV negatiftir. Bu popülasyonda 30 yaş üstü servikal sitolojisi normal HR HPV negatif kadınlarda HPV DNA testinin negatif prediktif değeri %100’e yakın olup servikal kanser tarama aralıklarının 1 yıl yerine 3-5 yıla kadar uzatılması öngörülmektedir. Böylece çalışma popülasyonumuzun %97.2’sinin en az 3 yıl sonra izlenebilir. Bu tip stratejinin sitolojik test sayısı azalacağından maliyet etkin olduğu da bildirilmiştir. Çalışma grubunda sitoloji normal olup tek veya multiple HR HPV infeksiyonu olan hepsi 30 yaş üstündeki 13 kadında ise 12 ay sonra HPV testi ve sitolojik test tekrarlanmalıdır. Tekrarlanan her iki test sonucu negatif ise 3 yıl aralarla rutin taramaya dönülür. Sitoloji negatif HPV pozitif ise kolposkopi yapılır. Sitoloji anormal HPV test sonucu ne olursa olsun hasta ASSCP (American Society for Colposcopy and Cervical Pathology) önerilerine göre izlenir¹³⁰. Sitolojik olarak normal kadınlarda HPV bulunma olasılığı yaşla çok güçlü

ilişkilidir. Yaş ilerledikçe HPV prevalansı azalmaktadır. HPV infeksiyonu birçok coğrafi bölgede yapılan çalışmaların çoğunda 25 yaşın altındaki kadınlarda en fazla görülür. Yapılan çalışmalara göre HPV prevalansı en yüksek 20-24 yaş grubunda görülmektedir. Çalışmamızda ise 30 yaşın altındaki kadınların hiç birinde HPV DNA tespit edilmedi. Bunun sebebi muhtemelen çalışma grubundaki 30 yaş altı kadınların sayısının düşük, 37 olması ve genç yaş grubundaki HPV infeksiyonlarının çoğunun geçici olmasından dolayı test sırasında tespit edilememesi olabilir. Oysa 30 yaş üstü kadınlardaki HPV infeksiyonları ise genellikle persisten infeksiyon göstergesidir. Çalışmamızda en yüksek HPV DNA pozitifliği %9.9 ile 30-39 yaş arası kadınlarda tespit edildi. Kadınlarda 40-49 yaş arası grupta HPV DNA pozitifliğinin %4.3'e düştüğü ve 50-59 yaş arasında ise %6.8 ile ikinci bir pik yaptığı gözlemlendi. HPV prevalansı yaşın ilerlemesiyle birlikte azalır ve bu bulgu muhtemelen HPV'ye karşı gelişen adaptif immun cevabın sonraki infeksiyonu önlemesine bağlıdır. Buna karşılık birçok çalışmada 25 yaşından küçük kadınlar arasında HPV prevalansında ilk pik sonrası prevalansta beklenen düşüş olmuştur, ancak sonra ≥ 45 yaş ve üzeri yıllarda ikinci pik takip etmiştir. Bu ikinci pik bir veya fazla HPV tip spesifik immunitenin giderek kaybına bağlı hayatın erken döneminde kazanılan latent infeksiyonların reaktivasyonu veya hayatın geç döneminde yeni partnerler ile cinsel temasa bağlı yeni infeksiyonların kazanılmasından kaynaklanabilir^{131,132}.

Çalışmadaki kadınların bazı demografik özellikleri ile HPV DNA pozitiflik oranların ilişkisine bakıldığında HPV infeksiyon prevalansı boşanmış kadınlarda (%20) evli kadınlara (%4.5) göre, üniversite mezunlarında (%10.5) eğitimi olmayan (%4.6) veya düşük eğitim düzeyine (%4.1) sahip olanlara göre, sigara içenlerde (%8.9) içmeyenlere göre (%4) ve oral kontraseptif kullananlarda (%7.4) kullanmayanlara (%5) göre daha yüksek bulunmuştur.

Çeşitli ülkelerde ve ülkemizin birçok bölgesinde HPV DNA pozitiflik oranları farklılıklar göstermektedir. Avrupa'daki birçok ülkede %18.3 ile %23 oranlarda bildirilen HPV DNA pozitifliği ile kıyaslandığında çalışmamızda %5.2'lik daha düşük prevalans saptanmıştır. Bu bulgular Avrupa'daki 9/100.000 ile 14.5/100.000 arasında olan ve ülkemizdeki 4.5/100.000 olan servikal kanser oranlarıyla da uyumludur^{133,134}. Bölgemizdeki düşük HPV prevalansı sosyokültürel özellikler ve kadınlarda tek eşliliğin yaygın olmasından kaynaklanabilir.

Bölgemizdeki kadınlarda HPV prevalansı (%5.2), HR HPV prevalansı (%3) ve HR HPV tiplerinin prevalansı ile ilgili bulgular servikal kanser taraması için yeni algoritmalar geliştirilmesi ve baskın olan HPV genotipinin mevcut HPV aşılılarıyla uyumlu olduğunu göstermesi yönünden önemli bilgiler sağlamaktadır.

6. SONUÇLAR

Çukurova bölgesinde 460 kadında genital human papillomavirus enfeksiyonunun prevalansını araştırmak amacıyla yapılan çalışma sonunda;

1. Human papillomavirus enfeksiyonunun prevalansı, 20-68 yaş arası kadınlarda %5.2 ve HR HPV prevalansı ise %3 bulundu.
2. Çalışmaya dahil edilen toplam 460 kadının ayrılan yaş grupları içinde HPV DNA pozitifliği en çok 30-39 yaş arasında %9.9 oranında tespit edildi. Kadınlarda 40-49 yaş arası grupta HPV DNA pozitifliğinin %4.3'e düştüğü ve 50-59 yaş arası kadınlarda %6.8 ile ikinci bir pik yaptığı bulundu.
3. HPV DNA pozitif bulunan kadınların hepsi 30 yaşın üstünde olup 30 yaşın altındaki hiçbir kadında HPV-DNA pozitif bulunmadı.
4. Kadınlardan alınan smear örneklerinin yapılan patolojik incelenmesinde, 457 (%99.4) kadında normal servikal sitoloji ve 3 (%0.6) kadında anormal servikal sitoloji tespit edildi. Anormal servikal sitoloji bulunan 2 (%0.4) kadında ASCUS, 1 (%0.2) kadında LSIL saptandı. LSIL tespit edilen örnekte HPV 18 ve 45 multiple enfeksiyonu belirlendi.
5. Çalışmamızda HR HPV pozitif 16 HPV tipinin %50'si HPV 16, %31.3'ü HPV 45 ve %6.3 oranlarında HPV 18, 31 ve bilinmeyen HPV tipi bulundu. Bu sonuçlar HPV aşısındaki HPV genotipleri ile uyumludur.
6. Çalışmadaki kadınların bazı demografik özellikleri ile HPV DNA pozitiflik oranların ilişkisine bakıldığında HPV enfeksiyon prevalansı boşanmış kadınlarda (%20) evli kadınlara (%4.5) göre, üniversite mezunlarında (%10.5) eğitimi olmayan (%4.6) veya düşük eğitim düzeyine (%4.1) sahip olanlara göre, sigara içenlerde (%8.9) içmeyenlere göre (%4) ve oral kontraseptif kullananlarda (%7.4) kullanmayanlara (%5) göre daha yüksek bulunmuştur.

Ülkemizde genital human papillomavirus enfeksiyonunun prevalansı ve epidemiyolojik özellikleri ile ilgili sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Bu proje bölgemizde human papillomavirus prevalansının belirlendiği ilk kapsamlı çalışma olup kadınlarda

genital human papillomavirus infeksiyonunun epidemiyolojisi açısından veri sağlayacak ve gelecekte servikal kanser tarama programlarında HPV DNA testinin kullanılmasının belirlenmesine ve HPV aşılarının uygunluğunun gösterilmesine katkıda bulunacaktır.

KAYNAKLAR

1. **Yarkin F, Chauvin S, Konomi N, Wang W, Mo R, Bauchman G, Diaz A, Burstein D, Szporn A, Hauptman E, Zhang DY.** Detection of HPV DNA in cervical specimens collected in cytologic solution by ligation-dependent PCR. *Acta Cytol*, **2003**; 47(3):450-6.
2. **Doorbar J.** Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci (Lond)*, **2006**; 110(5):525-41.
3. **Nyári TA, Kamlár L, Deák J, Szöllösi J, Farkas I, Kovács L.** Prevalence and risk factors of human papillomavirus infection in asymptomatic women in southeastern Hungary. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, **2004**; 115: 99–100.
4. **Petry KU, Menton S, Menton M, van Loenen-Frosch F, de Carvalho Gomes H, Holz B, Schopp B, Garbrecht-Buettner S, Davies P, Boehmer G, van den Akker E, Iftner T.** Inclusion of HPV testing in routine cervical cancer screening for women above 29 years in Germany: results for 8466 patients. *Br J Cancer*, **2003**; 88:1570-1577.
5. **Wright TC, Schiffman M.** Adding a test for human papillomavirus DNA to cervical-cancer screening. *N Engl J Med*, **2003**; 348(6):489-490.
6. **Löning M, Gissmann L, Diedrich K, et al.** Human papillomavirus and cervical cancer. *Dtsch Arztebl*, **2007**; 104(41):2806–10.
7. **zur Hausen H.** Papillomaviruses to vaccination and beyond. *Biochemistry (Moscow)*, **2008**; 73(5):498-503.
8. **Garcea RL, DiMaio D.** The Papillomaviruses. **2007**; Springer Science Business Media, LLC.
9. **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.
10. **Villiers EM, Claude F, Thomas R. Broker, et al.** Classification of papillomaviruses. *Virology*, **2004**; 324:17– 27.

11. **Hans-Ulrich B, Itzel E, Calleja-Macias S, Terence D.** Genome variation of human papillomavirus types: Phylogenetic and medical implications. *Int. J. Cancer*, **2006**; 118:1071–1076.
12. **Sanclemente G, Gill DK.** Human papillomavirus molecular biology and pathogenesis. *Jeadv*, **2002**; 16:231–240.
13. **Heilmann V, Kreienberg R.** Molecular biology of cervical cancer and its precursors. *Current Science Inc*, **2002**; 2:27-33.
14. **Christy M, Laimonis A.** Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. *Rev. Med. Virology*, **2006**; 16:83–97.
15. **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.
16. **Burd EM.** Human Papillomavirus and Cervical Cancer. *Clinical microbiology reviews*, **2003**; 16:1-17.
17. **Doorbar J.** The papillomavirus life cycle. *Journal of Clinical Virology*, **2005**; 32:7–15.
18. **Modis Y, Trus BL, Harrison SC.** Atomic model of the papillomavirus capsid. *EMBO J*, **2002**; 21:4754-4762.
19. **Trus BL, Roden RB, Greenstone HL, Vrhel M, Schiller JT, Booy FP.** Novel structural features of bovine papillomavirus capsid revealed by a three dimensional reconstruction to 9A resolution. *Nat. Struct. Biol.*, **1997**; 4, 413–420.
20. **zur Hausen H.** Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nature Reviews Cancer*, **2002**; 2:342-350.
21. **Day PM, Lowy DR, Schiller JT.** Papillomaviruses infect cells via a clathrin-dependent pathway. *Virology*, **2003**; 307:1-11.
22. **Day PM, Baker CC, Lowy DR, Schiller JT.** Establishment of papillomavirus infection is enhanced by promyelocytic leukemia protein (PML) expression. *Proc. Natl. Acad. Sci*, **2004**; 101:14252-14257.

23. **Christensen ND, Cladel NM, Reed CA, Han R.** Rabbit oral papillomavirus complete genome sequence and immunity following genital infection. *Virology*, **2000**; 269:451-461
24. **Funk JO, Waga S, Harry JB, Espling E, Stillman B, Galloway DA.** Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with the HPV16 E7 oncoprotein. *Genes Dev*, **1997**; 11: 2090-2100.
25. **Noya F, Chien WM, Broker TR, Chow LT.** p21cip1 degradation in differentiated keratinocytes is abrogated by costabilization with cyclin E induced by human papillomavirus E7. *J. Virology*, **2001**;75:6121-6134.
26. **Stacey SN, Jordan D, Williamson AJ, Brown M, Coote JH, Arrand JR.** Leaky scanning is the predominant mechanism for translation of human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein from E6/E7 bicistronic mRNA. *J Virology*, **2000**; 74:7284-7297.
27. **Thomas M, Laura R, Hepner K et al.** Oncogenic human papillomavirus E6 proteins target the MAGI-2 and MAGI-3 proteins for degradation. *Oncogene*, **2002**; 21:5088-5096.
28. **Peh WL, Middleton K, Christensen N et al.** Life cycle heterogeneity in animal models of human papillomavirus-associated disease. *J. Virology*, **2002**; 76:10401-10416.
29. **Bodily JM, Meyers C.** Genetic analysis of the human papillomavirus type 31 differentiation-dependent late promoter. *J. Virology*, **2005**; 79:3309-3321.
30. **Middleton K, Peh W, Southern SA et al.** Organisation of the human papillomavirus productive cycle during neoplastic progression provides a basis for the selection of diagnostic markers. *J. Virology*, **2003**; 77:10186-10201.
31. **Moscufo N, Sverdrup F, Breiding DE, Androphy EJ.** Two distinct regions of the BPV1 E1 replication protein interact with the activation domain of E2. *Virus Res*, **1999**; 65:141-154.
32. **Monk BJ, Tewari KS.** The spectrum and clinical sequelae of human papillomavirus infection. *Gynecologic Oncolog*, **2007**; 107:6-13.
33. **Gunter J.** Genital and perianal warts: new treatment opportunities for human papillomavirus infection. *Am J Obstet Gynecol*, **2003**; 189:3-11.

34. **Handley JM, Maw RD, Lawther H, et al.** Human papillomavirus DNA detection in primary anogenital warts and cervical low-grade intraepithelial neoplasias in adults by in situ hybridization. *Sex TransmDis*, **1992**; 19:225-9.
35. **O'Brien WM, Jensen AB, Lancaster WD, Maxted WC.** Human papillomavirus typing of penile condyloma. *J Urol*, **1989**; 141:863-5.
36. **Nielson CM, Flores R, Harris RB, et al.** Human papillomavirus prevalence and type distribution in male anogenital sites and semen. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **2007**; 16:1107-14.
37. **Jemal A, Siegel R, Ward E, et al.** Cancer statistics. *CA Cancer J Clin*, **2007**; 57:43-66.
38. **Jamieson DJ, Paramsothy P, et al.** Vulvar, vaginal, and perianal intraepithelial neoplasia in women with or at risk for human immunodeficiency virus. *Obstet Gynecol*, **2006**; 107(5):1023-8.
39. **Sakaliene J, Cigriejiene VM, Zilinskas K.** Vulvar intraepithelial neoplasia. *Medicina*, **2003**; 39(4):342-51.
40. **Uronis HE, Bendell JC.** Anal cancer: an overview. *Oncologist*, **2007**; 12:524-34.
41. **Tachezy R, Jirasek T, Salakova M, et al.** Human papillomavirus infection and tumours of the anal canal: correlation of histology, PCR detection in paraffin sections and serology. *Apmis*, **2007**; 115:195-203.
42. **Palefsky JM, Holly EA, Gonzales J, et al.** Detection of human papillomavirus DNA in anal intraepithelial neoplasia and anal cancer. *Cancer Res*, **1991**;51:1014-9.
43. **Kevin A. Ault.** Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections in the female genital tract. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*, **2006**; 40470:1-5.
44. **Schiffman M, Castle PE.** Human papillomavirus: Epidemiology and public health. *Arch Pathol Lab Med*, **2003**; 127:930-934.
45. **Scheurer ME, Tortolero G, Adler K.** Human papillomavirus infection: biology, epidemiology, and prevention. *Int J Gynecol Cancer*, **2005**; 15:727-746.
46. **zur Hausen H.** Infections causing human cancer, Wiley-VCH, Weinheim-New York, **2006**; S1-517.

47. **Weinstock H, Berman S, Cates W Jr.** Sexually transmitted diseases among American youth: incidence and prevalence estimates, 2000. *Perspect Sex Reprod Health*, **2004**; 36:6-10.
48. **Gerberding JL.** Report to Congress: prevention of genital human papillomavirus infection. Atlanta, GA: *Centers for Disease Control and Prevention*, **2004**.
49. **Chesson HW, Blandford JM, Gift TL, Tao G, Irwin KL.** The estimated direct medical cost of sexually transmitted diseases among American youth, 2000. *Perspect Sex Reprod Health*, **2004**; 36:11-9.
50. **Clifford GM, Gallus S, Herrero R, Munoz N, Snijders PJ, Vaccarella S, et al.** Worldwide distribution of human papillomavirus types in cytologically normal women in the International Agency for Research on Cancer HPV prevalence surveys: a pooled analysis. *Lancet*, **2005**; 366:991-8.
51. **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**; 186:462-9.
52. **Winer RL, Lee SK, Hughes JP, Adam DE, Kiviat NB, Koutsky LA.** Genital human papillomavirus infection: incidence and risk factors in a cohort of female university students. *Am J Epidemiol*, **2003**; 157:218-26.
53. **Woodman CB, Collins S, Winter H et al.** Natural history of cervical human papillomavirus infection in young women: a longitudinal cohort study. *Lancet*, **2001**; 357:1831-6.
54. **Sellers JW, Karwalajtys TL, Kaczorowski J et al.** Incidence, clearance and predictors of human papillomavirus infection in women. *CMAJ*, **2003**; 168:421-5.
55. **Pham TH, Nguyen TH, Herrero R et al.** Human papillomavirus infection among women in South and North Vietnam. *Int J Cancer*, **2003**; 104:213-20.
56. **World Health Organization.** Comprehensive cervical cancer control: a guide to essential practice. Geneva, Switzerland: WHO; **2006**.
57. **Dehn D, Torkko KC, Shroyer KR.** Human papillomavirus testing and molecular markers of cervical dysplasia and carcinoma. *American Cancer Society*, **2007**; 111:1-14.
58. **Thomas CJ.** Human papillomavirus testing in primary cervical screening and abnormal papanicolaou management. *Obstetrical and Gynecological Survey*, **2006**; 61:15-25.

59. **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. Virology*, **2008**; 18:117-132.
60. **Zhang HS, Postigo AA, Dean DC.** Active transcriptional repression by the Rb-E2F complex mediates G1 arrest triggered by p16INK4a, TGFbeta, and contact inhibition. *Cell* **1999**; 97:53-61.
61. **ASCUS-LSIL Triage Study (ALTS) Group.** A randomized trial on the management of low-grade squamous intraepithelial lesion cytology interpretations [published comment appears in *Am J Obstet Gynecol*. 2003;188:1381–1382]. *Am J Obstet Gynecol*, **2003**; 188:1393-1400.
62. **Krane JF, Granter SR, Trask CE, Hogan CL, Lee KR.** Papanicolaou smear sensitivity for the detection of adenocarcinoma of the cervix: a study of 49 cases. *Cancer*, **2001**; 93:8-15.
63. **Stoler MH.** Testing for human papillomavirus: data driven implications for cervical neoplasia management. *Clin Lab Med*, **2003**; 23:569-583.
64. **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.
65. **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.
66. **Davies P, Kornegay J, Iftner T.** Current methods of testing for human papillomavirus. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, **2001**; 15:677-700.
67. **Malloy C, Sherris J, Herdman C.** HPV DNA testing: technical and programmatic issues for cervical cancer prevention in low-resource settings. Seattle: *PATH*; **2000**.
68. **van Doorn LJ, Kleter B, Quint WG.** Molecular detection and genotyping of human papillomavirus. *Expert Rev Mol Diagn*, **2001**; 94-402.
69. **Gravitt PE, Peyton CL, Alessi TQ, et al.** Improved amplification of genital human papillomaviruses. *J Clin Microbiol*, **2000**; 38:357-361.

70. **van Doorn LJ, Quint W, Kleter B, et al.** Genotyping of human papillomavirus in liquid cytology cervical specimens by the PGMY line blot assay and the SPF(10) line probe assay. *J Clin Microbiol*, **2002**; 40:979-983.
71. **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.
72. **Gheit T, Landi S, Gemignani F, et al.** Development of a sensitive and specific assay combining multiplex PCR and DNA microarray primer extension to detect high-risk mucosal human papillomavirus types. *J ClinMicrobiol*, **2006**; 44:2025-2031.
73. **Sandri MT, Lentati P, Benini E, 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 Microbiol*, **2006**; 44:2141-2146.
74. **Lungu O, Wright TC Jr, Silverstein S.** Typing of human papillomaviruses by polymerase chain reaction amplification with L1 consensus primers and RFLP analysis. *Mol Cell Probes*, **1992**; 6:145-152.
75. **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.
76. **Stillman MJ, Day SP, Schutzbank TE.** A comparative review of laboratory-developed tests utilizing Invader HPV analyte-specific reagents for the detection of high-risk human papillomavirus. *J Clin Virol*, **2009**; 45:73-7.
77. **Molden T, Nygard JF, Kraus I, et al.** Predicting CIN2 when detecting HPV mRNA and DNA by PreTect HPV-proofer and consensus PCR: a 2-year follow-up of women with ASCUS or LSIL Pap smear. *Int J Cancer*, **2005**; 114:973-976.
78. **Frazer IH.** Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination. *Nat Rev Immunol*, **2004**; 4:46-54.
79. **Sheu BC, Chang WC, Lin HH, et al.** Immune concept of human papillomaviruses and related antigens in local cancer milieu of human cervical neoplasia. *J. Obstet. Gynaecol*, **2007**; 33(2):103-113.

80. **Carter JJ, Koutsky LA, Hughes JP, et al.** Comparison of human papillomavirus types 16, 18, and 6 capsid antibody responses following incident infection. *J Infect Dis*, **2000**; 181:1911-9.
81. **Roden RB, Yutzy W, Fallon R, et al.** Minor capsid protein of human genital papillomaviruses contains subdominant, cross-neutralizing epitopes. *Virology*, **2000**; 270:254-7.
82. **Schiller JT, Davies P.** Science and society: Delivering on the promise: HPV vaccines and cervical cancer. *Nat Rev Microbiol*, **2004**; 2:343-7.
83. **Douglas R. Lowy and John T. Schiller.** Prophylactic human papillomavirus vaccines. *J. Clin. Invest*, **2006**; 116:1167-1173.
84. **Garland SM, Hernandez-Avila M, Wheeler CM, Perez G, Harper DM, Leodolter S, et al.** Quadrivalent vaccine against human papillomaviruses to prevent anogenital diseases. *N Engl J Med*, **2007**; 356:1928-43.
85. **The FUTURE II Study Group.** Quadrivalent Vaccine against Human Papillomavirus to Prevent High-Grade Cervical Lesions. *N Engl J Med*, **2007**; 356:1915-1927.
86. **Harper DM, Franco EL, Wheeler CM, et al.** Efficacy of a bivalent L1 virus-like particle vaccine in prevention of infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: a randomized controlled trial. *Lancet*, **2004**; 364:1757-65.
87. **Zhou J, Sun XY, Stenzel DJ and Frazer IH.** Expression of vaccinia recombinant HPV-16 L1 and L2ORF proteins in epithelial cells is sufficient for assembly of HPV virion-like particles. *Virology*, **1991**; 185, 251-257.
88. **Koutsky L.** The epidemiology behind the HPV vaccine discovery. *Ann Epidemiol*, **2009**; 19:239-244.
89. **Kuck D, Lau T, Leuchs B, Kern A, Muller M, Gissmann L and Kleinschmidt JA.** Intranasal vaccination with recombinant adeno-associated virus type 5 against human papillomavirus type 16 L1. *J. Virology*, **2006**; 80:2621-2630.
90. **Medeiros R, Soares R, Vasconcelos A, Schmitt F and Lopes C.** Glutathione S-transferase genotype GSTM1 as a predictor of elevated angiogenic phenotype in patients with early onset breast cancer. *Angiogenesis*, **2004**; 7:53-58.

91. **Franco EL, Villa LL, Sobrinho JP and et al.** Epidemiology of acquisition and clearance of cervical human papillomavirus infection in women from a high-risk area for cervical cancer. *Journal of Infectious Diseases*, **1999**; 180:1415-23.
92. **Siriaunkgul S, Suwiat S, Settakorn J and et al.** HPV genotyping in cervical cancer in Northern Thailand Adapting the linear array HPV assay for use on paraffin-embedded tissue. *Gynecologic Oncology*, **2008**; 108:555-560.
93. **Coutlee F, Voyer H.** Effect of nonionic detergents on amplification of human papillomavirus DNA with consensus primers MY09 and MY11. *Journal of Clinical Microbiology*, **1998**; 36(4):1164.
94. **Chang KC, Su IJ, Tsai ST, et al.** Pathological features of betel quid-related oral epithelial lesions in Taiwan with special emphasis on the tumor progression and human papillomavirus association. *Oncology*, **2002**; 63:362-369
95. **Neves D, Camara GNL and et al.** Prevalence of human papillomavirus in penile carcinoma. *Clinical Urology*, **2002**; 28(3):221-226.
96. **Hwang T.** Detection and typing of human papillomavirus DNA by PCR using consensus primers in various cervical lesions of Korean women. *J. Korean Med. Sci*, **1999**; 14:593-9.
97. **Sotlar K, Diemer D, Dethleffs A, Hack Y and et al.** Detection and typing of human papillomavirus by E6 nested multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, **2004**; 42:3176-3184.
98. **Gheit T, Landi S, Gemignani F, Snijders PJF and et al.** Development of a sensitive and specific assay combining multiplex PCR and DNA microarray primer extension to detect high-risk mucosal human papillomavirus types. *Journal of Clinical Microbiology*, **2006**; 44:2025-2031.
98. **Van Doorn LJ, Figueiredo C, Rossau R, Jannes G et al.** Typing of *Helicobacter pylori vacA* gene detection and *cagA* gene by PCR and reverse hybridization. *J Clin Microbiol*, **1998**; 36:1271-1276.
99. **Yarkın F, Vardar MA.** Hpv immunolojisi ve natürel enfeksiyonlar. *Türkiye Klinikleri J Gynecol Obst-Special Topics*, **2009**; 2(1):43-7.
100. **Yarkın F.** Human papillomavirus enfeksiyonlarının virolojisi ve epidemiyolojisi. *Klinik aktüel tıp*, **2007**; 12(8):1-6.

101. **de Sanjosé S, Diaz M, Castellsagué X. et al.** Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology:a meta-analysis. *Lancet Infect Dis*, **2007**; 7(7):453-9.
102. **De Vuyst H, Clifford G, Li N, Franceschi S.** HPV infection in Europe. *European Journal of Cancer*, **2009**; 45:2632-2639.
103. **Verteramo R, Pierangeli A, Calzolari E, et al.** Direct sequencing of HPV DNA detected in gynaecologic outpatients in Rome, Italy. *Microbes and Infection*, **2006**; 8:2517-2521.
104. **Klug SJ, Hukelmann M, Hollwitz B, Düzenli N, Schopp B, et al.** Prevalence of human papillomavirus types in women screened by cytology in Germany. *Journal of Medical Virology*, **2007**; 79:616-625.
105. **Leinonen M, Talonen LK, Anttila A, Dyba T, Tarkkanen J, Nieminen P.** Prevalence of oncogenic human papillomavirus infection in an organised screening population in Finland. *Int. J. Cancer*, **2008**; 123: 1344-1349.
106. **Sanjose SD, Almirall R, Lloveras B, et al.** Cervical human papillomavirus infection in the female population in Barcelona, Spain. *Astda*, **2003**; 30:788-793.
107. **Agorastos T, Dinas K, Lloveras B, Bosch FX, Kornegay JR, Bontis JN, de Sanjose S.** Cervical human papillomavirus infection in women attending gynaecological outpatient clinics in northern Greece. *European Journal of Cancer Prevention*, **2004**; 13:145-147.
108. **Clavel C, Masure M, Bory JP, et al.** Human papillomavirus testing in primary screening for the detection of high-grade cervical lesions: a study of 7932 women. *British Journal of Cancer*, **2001**; 89:1616–1623.
109. **Kjær SK, Breugelmans G, Munk C, et al.** Population-based prevalence, type- and age-specific distribution of HPV in women before introduction of an HPV-vaccination program in Denmark. *Int. J. Cancer*, **2008**; 123:1864-1870.
110. **Cuschieri KS, Cubie HA, Whitley MW, et al.** Multiple high risk HPV infections are common in cervical neoplasia and young women in a cervical screening population. *J Clin Pathol*, **2004**; 57:68-72.

111. **Dunne EF, Unger ER; Sternberg M, et al.** Prevalence of HPV infection among females in the United States. *JAMA*, **2007**; 297:813-819.
112. **Pe´rez MO, Barbisan G, Abba MC, et al.** Herpes simplex virus and human papillomavirus infection in cervical disease in Argentine women. *International Journal of Gynecological Pathology*, **2005**; 25:42-47.
113. **Anguiano LFS, Esquivel CA, Romero MAR, Rodriguez MC.** Human papillomavirus infections in women seeking cervical Papanicolaou cytology of Durango, Mexico: prevalence and genotypes. *BMC Infectious Diseases*, **2006**; 6:27.
114. **Rama CH, Martins CMR, Derchain SFM, Filho AL, et al.** Prevalence of genital HPV infection among women screened for cervical cancer. *Rev Sa´ude P´blica*, **2008**; 42(1):1-7.
115. **Ferreccio C, Prado RB, Luzoro AV, et al.** Population-based prevalence and age distribution of human papillomavirus among women in Santiago, Chile. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **2004**; 13(12):2271-6.
116. **Sowjanya AP, Jain M, Poli UR, et al.** Prevalence and distribution of high-risk human papilloma virus (HPV) types in invasive squamous cell carcinoma of the cervix and in normal women in Andhra Pradesh, India. *BMC Infectious Diseases*, **2005**; 5:116.
117. **Dai M, Bao YP, Li N, Clifford GM, Vaccarella S, Snijders PJF, et al.** Human papillomavirus infection in Shanxi Province, People’s Republic of China: a population-based study. *British Journal of Cancer*, **2006**; 95:96-101.
118. **Kulmala SM, Shabalova IP, Petrovitchev N, Syrjnen KJ, Gyllensten UB, Syrjnen SM, NIS Study Group.** Prevalence of the most common high-risk HPV genotypes among women in three new independent states of the former Soviet Union. *J Med Virology*, **2007**; 79(6):771-81.
119. **Shin HR, Lee DH, Herrero R, Smith JS, et al.** Prevalence of human papillomavirus infection in women in Busan, South Korea. *Int J Cancer*, **2003**; 103:413-421.
120. **Occhialini A, Marais A, Alm R, Garcia F, Sierra R and Megraud F.** Distribution of Open Reading Frames of Plasticity Region of Strain J99 in *Helicobacter pylori* Strains Isolated from Gastric Carcinoma and Gastritis Patients in Costa Rica. *Infection and Immunity*, **2000**; 68(11):6240–6249.

121. **Thomas JO, Herrero R, Omigbodun AA, Ojemakinde K, et al.** Prevalence of papillomavirus infection in women in Ibadan, Nigeria: a population-based study. *British Journal of Cancer*, **2004**; 90:638-645.
122. **Baay MF, Kjetland EF, Ndhlovu PD, et al.** Human papillomavirus in a rural community in Zimbabwe: the impact of HIV co-infection on HPV genotype distribution. *J Med Virology*, **2004**; 73(3):481-5.
123. **Domfeh AB, Wiredu EK, Adjei AA, et al.** Cervical human papillomavirus infection in Accra, Ghana. *Ghana Medical Journal*, **2008**; 42:71-78.
124. **Rota S, Biri A, Bozdayi G, Dinç B, Güner H.** Farklı hasta gruplarında servikal biopsi ve sürüntü örneklerinde PCR ile genital human papillomavirus araştırması ve tip tayini. *Türk Mikrobiol Cem Derg*, **2004**; 34:185-189.
125. **İnal M, Yıldırım Y, Özelmas I.** The relationship between human papillomavirus infection and cervical intraepithelial neoplasia in Turkish women. *IJ.Gynecol Cancer*, **2007**.
126. **Ağaçfidan A, ve ark.** Kadınlarda insan papillomavirus (HPV) ve Chlamydia trachomatis araştırılması. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti 70. Yıl Bilimsel Toplantısı Özet Kitabı*, **2001**; 325-326.
127. **Öztürk ve ark.** Servikal örneklerde insan papilloma virus DNA varlığının hibrid yakalama yöntemi ile araştırılması. *Mikrobiyoloji Bült*, **2004**; 38:223-232.
128. **Gökahmetoğlu S ve ark.** Servikal örneklerde human papillomavirus DNA'sının Hibrid yakalama yöntemi ile araştırılması. *1 Ulusal Viroloji Kongresi Özet Kitabı*, **2003**; s.339.
129. **Midilli K ve ark.** Sağlıklı Türk kadınlarında human papillomavirus (HPV) ve human herpes virus 8 (HHV-8) araştırılması. *1. Ulusal Viroloji Kongresi Özet Kitabı* **2003**; s.338.
130. **Wright TC, Massad LS, Dunton CJ, Spitzer M, Wilkinson EJ, Solomon D.** 2006 consensus guidelines for the management of women with abnormal cervical cancer screening tests. *J Low Genit Tract Dis*, **2007**; 11:201-22.
131. **Trottier H, Franco EL.** The epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Vaccine*, **2006**; 24:1-15.
132. **Burchell AN, Winer RL, de Sanjose S. et al.** Chapter 6: Epidemiology and transmission dynamics of genital HPV infection. *Vaccine*, **2006**; 24:52-61.

133. **Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P.** Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*, **2005**; 55:74-108.
134. **Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM.** Globocan 2002 cancer incidence. Mortality and prevalence worldwide, IARC Cancer Base No.5 version 2.0, IARC Press, Lyon **2004**.

ÖZGEÇMİŞ

Kayseri’de 1977 yılında doğdu. İlkokul eğitimini Reyhanlı, ortaokul eğitimini Silifke daha sonra lise eğitimini Adana Baraj Lisesinde 1994 yılında tamamladı. Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesinden 2001 yılında mezun oldu. Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Anabilim Dalında 2002 yılında doktora eğitimine başladı.

Evli ve bir kız çocuk babasıdır.

Dr. Zafer ALTUN