



**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM
ANABİLİM DALI**

**HSIL (YÜKSEK DERECE SKUAMUZ İNTRAEPİTELYAL LEZYON)
SEBEBİYLE LEEP (LOOP ELECTROSURGİCAL EXCİSİON
PROCEDURE) YAPILAN HASTALARDA LEEP SONRASI İMMÜN
CEVABIN İMMÜNOHİSTOKİMYASAL YÖNTEMLERLE
DEĞERLENDİRİLMESİ VE BU CEVABIN HPV DNA
ERADİKASYONUNDAKİ ETKİSİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Ali POTA

Antalya, 2017



**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM
ANABİLİM DALI**

**HSIL (YÜKSEK DERECE SKUAMUZ İNTRAEPİTELYAL LEZYON)
SEBEBİYLE LEEP (LOOP ELECTROSURGİCAL EXCİSİON
PROCEDURE) YAPILAN HASTALARDA LEEP SONRASI İMMÜN
CEVABIN İMMÜNOHİSTOKİMYASAL YÖNTEMLERLE
DEĞERLENDİRİLMESİ VE BU CEVABIN HPV DNA
ERADİKASYONUNDAKİ ETKİSİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Ali POTA

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Nasuh Utku DOĞAN

**“Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinasyon Birimi tarafından projelendirilmiştir. (Proje ID:1656)”**

“Kaynak gösterilerek tezimden yararlanılabilir”

Antalya, 2017

TEŞEKKÜR

Asistanlık eğitimim boyunca engin tecrübe ve bilgilerinden yararlanmamı sağlayan Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Selahattin KUMRU' ya, bu tezin fikrinin olgunlaşmasından en son haline gelmesine kadar olan tüm basamaklarında ilgi ve desteğini esirgemeyen, değerli Tez Danışmanım Doç. Dr. N. Utku DOĞAN başta olmak üzere tüm hocalarıma; Prof. Dr. Tayup ŞİMŞEK, Prof. Dr. İ. İnanc MENDİLCİOĞLU, Prof. Dr. Münire ERMAN, Prof. Dr. Mehmet ŞİMŞEK, Doç. Dr. Abdullah BOZTOSUN, Doç. Dr. Mehmet SAKINCI, Yrd. Doç. Dr. Murat ÖZEKİNCİ, Yrd. Doç. Dr. Şafak OLGAN ve Uz. Dr. Selen DOĞAN

Tezimin doku örneklerinin çalışılmasında bana yardımcı olan Prof. Dr. Gülgün ERDOĞAN başta olmak üzere Hülya AKGÜL ve Mualla ÖZCAN' a

Tezimin yazım aşamasındaki teknik ve manevi desteklerinden dolayı Uz. Dr. Hülya AYIK AYDIN ve Uz. Dr. Mehmet GÖKSU' ya

Uzmanlık eğitimim ve tez yazım dönemimdeki süreçte çalışma odasını benimle paylaşan, üstün anlayış ve manevi desteğini benden esirgemeyen Anabilim Dalı Sekreterimiz Gülizar YORULMAZ ELDURAN' a

Uzmanlık eğitimim süresince birlikte çalıştığım tüm asistan, hemşire, teknisyen, poliklinik sekreterleri ve tüm çalışanlarına

Tezimin oluşumuna destek verdikleri için Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Bölümüne teşekkür ederim.

Ayrıca beni bu seviyeye getiren bana mutluluk, huzur ve güven veren aileme, uzmanlık eğitimim boyunca bu zorlu süreci benimle paylaşan, yoğun çalışma şartlarına rağmen her türlü fedakarlığı gösterip desteğini esirgemeyen sevgili nişanım Dr. Çisil ERKAN' a teşekkürlerimi bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

Simgeler ve Kısaltmalar Dizini	vi
Çizelgeler Dizini	viii
Şekiller Dizini	ix
1. GİRİŞ	1
1.1 Gerekçe ve Hipotez	1
1.2 Amaçlar	1
1.3 Kapsam	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1 Giriş	2
2.2 Serviks Histolojisi	3
2.3 Skuamokolumnar Bileşke	5
2.4 Skuamoz Metaplazi	6
2.5 Transformasyon Zonu	7
2.6 HPV Tarihçesi	8
2.7 HPV Yapısı	9
2.8 HPV Bulaş Yolları	11
2.9 HPV Epidemiyoloji	11
2.10 HPV ve Hastalık	12
2.11 Smear	13
2.12 Kolposkopi	18
2.13 Servikal İntraepitelyal Neoplazi (CIN)	23
2.14 Toll Like Reseptörler	26

3. MATERYAL VE METOD	29
3.1 HPV DNA İzolasyonu	30
3.2 HPV DNA Tiplendirme Kit Çalışma Metodu	31
3.3 İmmünohistokimya	31
3.4 LEEP İşlemi	32
3.5 İstatistiksel Yöntem	34
4. SONUÇLAR	35
5. TARTIŞMA	49
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	57
7. ÖZET	58
8. ABSTRACT	59
9.KAYNAKLAR	60

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ACOG: American College of Obstetricians and Gynecologists

ASC: Atypical squamous cells

ASCCP: American Society for Colposcopy and Cervical Pathology

ASCUS: Atypical squamous cells of undetermined significance

ASC-H: Atypical squamous cells- cannot exclude high grade lesion

CDC: Centers For Disease Control and Prevention

CIN: Servikal Intraepiteliyal Neoplazi

DNA: Deoxyribo Nucleic Acid

FDA: Food and Drug Administration

HC2: Hybrid Capture 2

HIV: Human İmmunodeficiency Virus

HPV: Human Papilloma Virüs

HSIL: High grade squamous intraepithelial lesion

LEEP: Loop Electro-surgical Excision Procedure

LSIL: Low grade squamous intraepithelial lesion

OR: Odds Ratio

PAMP: Pathogen Associated Molecular Patterns

PAP: Papanicolau test

PCR: Polimerase chain reaction

PRR: Pathogen Recognition Receptor

RNA: Ribo Nucleic Acid

SIL: Squamous İntraepithelial lesion

SCJ: Squamo columnar junction

SKB: Skuamokolumnar bileşke

TLR: Toll Like Reseptör

WHO: World Health Organisation



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge	<u>Sayfa No</u>
2.1 Bethesda Sistemi 2001	17
4.1 Hastaların demografik verileri ve bunların hasta sayısına oranı	35
4.2 Sıvı bazlı sitoloji sonuçları ve bu sonuçların toplam hasta sayısına oranı	36
4.3 Kolposkopik biyopsi sonuçları ve bu sonuçların toplam hasta sayısına oranı	37
4.4 LEEP biyopsi sonuçları ve bu sonuçların toplam hasta sayısına oranı	38
4.5 6. Aydaki kontrol sıvı bazlı sitoloji sonuçları ve bunların toplam hasta sayısına oranı	39
4.6 6.aydaki kontrol kolposkopik biyopsi sonuçları ve bunların toplam hasta sayısına oranı	40
4.7 HPV negatif ve pozitif hastaların LEEP öncesi ve 6. Ay kontrolleri	41
4.8 HPV tipleri ve toplam hasta sayısı arasındaki oranlar	42
4.9 Hastaların demografik verileri ile HPV durumlarının Karşılaştırılması	43
4.10 TLR 4, 5, 9' un LEEP öncesi ve sonrası boyanma oranları	44
4.11 TLR 4, 5, 9' un LEEP öncesi ve sonrası boyanma sayılarının HPV ile ilişkisi	46
4.12 Hastalarda HPV durumu ve LEEP öncesi ve sonrası TLR boyanma yoğunlukları	47

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa No
2.1: Serviksin skuamoz ve kolumnar epiteli	4
2.2: Skuamokolumnar Bileşke	6
2.3: Transformasyon Bölgesi	8
2.4: HPV genomu	9
2.5: Smear alınması	14
2.6: İnce Asetowhite Epitel	20
2.7: İnce Asetowhite Epitel	20
2.8: Lökoplaki	21
2.9: İnce Puntuasyon	22
2.10: Kaba Puntuasyon	22
2.11: Mosaizm	23
2.12: CIN 1, 2, 3'ün epitelyum tabakalarına göre dağılımı	24
2.13: HPV Karsinogenezi	25
3.1: Kolposkopi Cihazı	33
3.2: LEEP Kesici Uçları	33
4.1: Sıvı bazlı sitoloji sonuçları ve bu sonuçların toplam hasta sayısına oranı	36
4.2: Kolposkopik biyopsi sonuçları ve bu sonuçların toplam hasta sayısına oranı	37
4.3: LEEP biyopsi sonuçları ve bu sonuçların toplam hasta sayısına oranı	38

4.4: 6. Aydaki kontrol sıvı bazlı sitoloji sonuçları ve bunların toplam hasta sayısına oranı	39
4.5: 6.aydaki kontrol kolposkopik biyopsi sonuçları ve bunların toplam hasta sayısına oranı	40
4.6: HPV negatif ve pozitif hastaların LEEP öncesi ve 6. Ay kontrolleri	41
4.7: HPV tipleri ve toplam hasta sayısı arasındaki oranlar	42



1.GİRİŞ

1.1 Gerekçe ve Hipotez

Servikal intraepitelyal neoplazilerin tedavisinde kullanılan LEEP işlemi HPV eradikasyonunu arttırmakta ve lokal immün cevabı güçlendirmektedir.

1.2 Amaçlar

- Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Jinekoloji Polikliniğine servikal sitolojik anormallik nedeniyle referans edilen olguların demografik verilerini, sitolojik anormallik özelliklerini ve bu anormalliklerde rol oynayan HPV tiplerini belirlemek.
- HSIL sebebiyle LEEP işlemi yapılan hastalarda LEEP işleminin HPV eradikasyonundaki etkisini ortaya koymak.
- HSIL sebebiyle LEEP yapılan hastalarda immün cevabın oluşmasında ve HPV eradikasyonunda Toll Like Reseptörlerin oynadığı rolü saptamak.
- Bu hastaların takiplerindeki (altıncı ay) sitolojik anormallikleri ve HPV DNA durumunu ve rekürrens oranını belirlemek.
- Sitolojik takipte HPV DNA testinin önemini değerlendirmek.
- İleriki dönemlerde yapılması planlanan bu konuyla ilgili araştırmalara kaynak sağlamak.

1.3 Kapsam

Şubat 2016 – Aralık 2016 tarihleri arasında, Akdeniz Üniversitesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Jinekoloji bölümüne sitolojik anormallik nedeniyle başvuran olgular araştırma kapsamına alınmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1 GİRİŞ

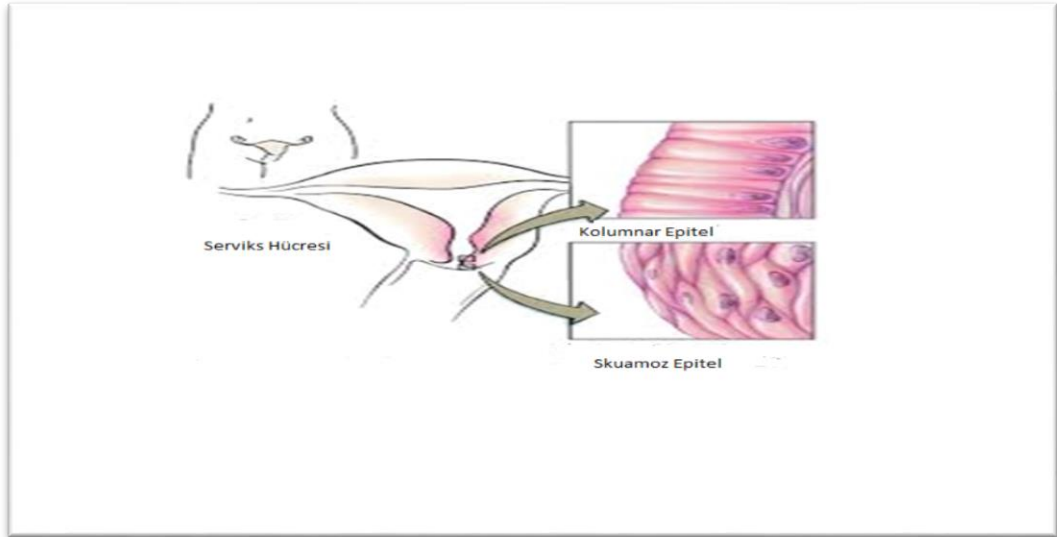
Kanser, çeşitli çevresel ve kalıtsal faktörlerin etkisiyle normal hücre DNA'sının mutasyona maruz kalması sonucu ortaya çıkan bir hastalıktır. Çevresel ve kalıtsal faktörlerin kanser oluşumuna etkisi kanserin türüne ve çevresel etmenlere göre değişmektedir. Kişinin genetik yapısı kanser gelişimine direkt olarak yatkınlık oluşturabileceği gibi, çevresel faktörlerin zararlı etkilerine karşı kişinin daha duyarlı ya da daha dirençli olmasında da belirleyici bir rol oynayabilir. Servikal kanser insidansı gelişmiş ülkelerde premalign ve malign lezyonların taranması ve HPV aşılama etkisiyle değişiklik göstermektedir. Genel olarak Dünya genelinde 2012 yılında yıllık 528000 yeni servikal kanser vakası ve servikal kanser sebebiyle 266000 ölüm gerçekleşmiştir (1). Tarama ve aşılama çalışmaları sonucunda gelişmiş ülkelerde son 50 yılda % 75 oranında bir azalma gerçekleşmiştir (2,3). Servikal kanserli vakaların % 80'i az gelişmiş ülkelerde meydana gelmektedir (4). WHO (Dünya Sağlık Örgütü) verilerine göre gelişmekte olan ülkelerdeki kadınlarda servikal kanser en sık görülen kanserler arasında 2.sırada yer almaktadır (15.7/100000 kadın) ve kansere bağlı ölümlerde 3. sırada yer almaktadır (8.3/100000 kadın) (5). Gelişmiş ülkelerde ise servikal kanser kadınlarda en sık görülen kanserler arasında 11.sırada yer almaktadır (9.9/100000) ve kansere bağlı ölümler sıralamasında 9.sırada yer almaktadır. (3.3/100000) Amerika Birleşik Devletlerinde her yıl 13000 yeni invaziv servikal kanser tanısı konmaktadır ve yaklaşık 4100 hastada servikal kansere bağlı ölüm vakaları bildirilmektedir (6). Amerika Birleşik Devletlerinde jinekolojik kanserler arasında servikal kanserler sıklık ve mortalite sıralamasında 3.sırada yer almaktadır ve sıralamada endometrium ve over kanserlerinden sonra yer almaktadır. Bu veriler diğer gelişmiş ülkelerdeki oranlara benzerdir (7). Bu sayılar serviks kanserinde tarama programlarının, bu kanserin görülme sıklığını ve bu kanserden ölüm oranlarını azaltmakta ne kadar önemli olduğunu göstermektedir, Türkiye' de ise Sağlık Bakanlığı Kanser Dairesi verilerine göre 2008 yılında Türkiye'de 1443 kadının serviks kanseri teşhisi aldığı ve 556 kadının serviks kanserinden öldüğü tahmin edilmektedir (8). Türkiye Halk Sağlığı Kurumu' nun 2009 yılında yayınladığı Türkiye Kanser İstatistikleri Raporu' na göre serviks

kanseri kadın kanserlerinde onuncu sıradadır (9). Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Kanser Dairesi Başkanlığının 2014 yılı Türkiye Kanser İstatistiklerine göre serviks kanseri tüm kanserler içinde % 2 oranında görülmektedir (10). Türkiye için Sağlık Bakanlığı Kanserle Savaş Dairesi Başkanlığı tarafından hazırlanan, 2009-2015 yılları arasını kapsayan Ulusal Kanser Programında meme, serviks ve kolon kanserleri ulusal tarama programına alınmıştır. Tarama programları ile hem mortalite ve morbidite hem de maliyet açısından preinvaziv lezyonların tespit ve tedavisi önemli avantajlar sağlamaktadır (11). Bu nedenle hastaların daha iyi seçilebilmesi, tanı ve tedavi girişimleri için etkin yöntemlerin geliştirilmesi birçok açıdan önem kazanmaktadır. Bu prospektif çalışmada halihazırda HSIL tanısı olan 30 hastada LEEP işlemi öncesi ve işlem sonrası altıncı ayda sitoloji ve HPV DNA testleri ile sitolojik anormallik ve HPV persistans oranları ile Toll Like Reseptörlerin immün cevap oluşumundaki rolü değerlendirildi.

2.2 Serviks Histolojisi

Serviks iki tip epitel ile döşelidir. Bu epitel tipleri çok katlı yassı epitel ve kolumnar epiteldir. Skuamoz epitelyum ve kolumnar epitelyum skuamokolumnar bileşkede bir araya gelirler. Skuamoz epitel, ektoserviksin geniş bir bölümünü kaplayan, nonkeratinize, glikojen içeren, çoklu hücre tabakasından meydana gelir. İnspeksiyonda soluk pembe renkli görünür. Bazal, parabazal, intermedier ve süperfisyal hücreler olmak üzere 4 tabaka hücre içerir. Bazal tabaka; çekirdekleri büyük ve az miktarda sitoplazmaya sahip olan immatür hücrelerden oluşur. Aktif mitozun gerçekleştiği kat budur. Buradaki hücreler bölünüp farklılaşarak parabazal, intermedier ve süperfisyal tabakadaki hücreleri oluştururlar. Bazal tabakadan süperfisyal tabakaya doğru gidildikçe hücrelerin sitoplazmik hacimlerinde artış ve çekirdeklerinin büyüklüğünde küçülme olur. Ayrıca protein içeriklerinde azalma gözlenir. Süperfisyal tabaka, glikojen içeren sitoplazma ve küçük çekirdekli 5-8 sıra yassı hücrelerden meydana gelir. Çekirdek piknotiktir. Pap smear testinin temeli süperfisyal tabakadan dökülen hücrelere dayanır. Süperfisyal hücre tabakasının kalınlığı östrojenin hormonal etkinliğinin derecesine bağlı olarak değişir. Östrojen uyarısı sonrası epitel kalınlığı ve glikojen içeriğinde artma olur. Bu sebeple atrofik vajinit tedavisinde östrojenin bu etkisinden yararlanılır. Postmenopozal dönemde skuamoz epitel hücreleri parabazal

tabakadan sonrasına farklılaşamaz, bu sebeple skuamoz epitelde incelmeye olur ve atrofik hale gelir. Asetik asit, geri dönüşlü olarak hücrel proteinlerle etkileşir. Süperfisyal hücreler düşük protein içeriğine sahip olduklarından dolayı asetik asit uygulanması süperfisyal hücrelerde renk değişimine sebep olmaz. Intermediate ve süperfisyal tabaka hücrelerin sitoplazmalarındaki glikojen içeriği fazladır. Glikojen içeren hücreler iyot ile kolayca etkileştiğinden, lugol solüsyonu uygulanan epitelde kahverengi veya siyah renge dönüşüm olur. Kolumnar epitel; endoservikal kanalı kaplayan, çekirdekleri koyu renkli tek tabaka hücrelerden oluşur. Kolumnar epitel serviksi ve vajinadaki kuruluşu önlemek için mukus salgılar. İnceksiyonda; tek katlı hücre tabakası, alttaki stromanın damarlı kırmızı renginin rahatça görünmesine olanak verir. Servikal stromaya fazla sayıda invajinasyon olur ve bunun sonucunda endoservikal kript oluşur. Kolumnar epitelde glikojenizasyon ve mitoz izlenmez. Bu sebepten dolayı lugol iyodin işleminden sonra kolumnar epitelde boyanma izlenmez ya da sadece ince bir film tabakası halinde boyanma izlenir. Skuamokolumnar bileşke endoservikse ait kolumnar epitelin sonlandığı, ektoserviksin skuamoz epitelinin başladığı alandır. Skuamokolumnar bileşke; puberte, gebelik ve menopo2 dönemlerinde hormonal uyarılarla stimüle olan aktif bir alandır.



Şekil 2. 1: Serviksin skuamoz ve kolumnar epiteli

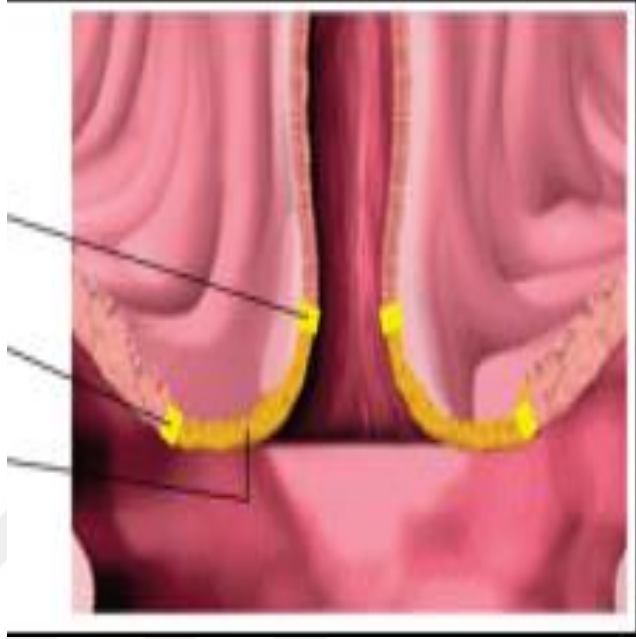
2.3 Skuamokolumnar Bileşke

Endoservikse ait kolumnar epitel ile ektoserviksin skuamoz epitelinin birleştiği yerdir. Hiç metaplastik değişikliğe uğramamış yani intrauterin dönem ve yenidoğanın serviksindeki orijinal skuamoz-kolumnar epitel bileşke noktasına orijinal skuamokolumnar bileşke denir. Metaplazi, orijinal skuamokolumnar bileşkenin iç kısımdan eksternal osa doğru yer değiştirmesidir ve bu sayede kolumnar villusların üzerinden ilerlemesine olanak sağlar. Bu yeni oluşan bileşke ise fizyolojik SCJ olarak adlandırılmıştır. Skuamokolumnar bileşke sınırı yaş, hormon seviyesi, doğum travması, oral kontraseptif kullanımı ve gebelik gibi farklı etkenlerle değişiklik gösterir. Orijinal SCJ ile fizyolojik SCJ arasındaki bu sürekli değişim alanı transformasyon zonu olarak adlandırılır. Bu bölge orijinal yassı-silindirik epitel sınırı ile metaplazi tamamlandıktan sonra oluşan fizyolojik yassı -silindirik epitel sınırı arasında kalan alan şeklinde tanımlanmaktadır. Bu alan yoğun mitotik aktivitesi sebebiyle mutajenik ve karsinojenik etkilere çok duyarlıdır. Metaplazinin en aktif olduğu dönemler olan reproduktif dönem ve gebelik süreci sonrası başta HPV olmak üzere çeşitli onkojenlere maruz kalınması CIN gelişmesinde önemlidir. Perimenopozal ve menopozal dönem sonrası östrojen hormonunun eksikliğine bağlı olarak serviks atrofiye uğrar ve bunun neticesinde skuamo-kolumnar bileşkenin eksternal osa ve endoservikal kanalın içine doğru yer değiştirmesi daha da hızlanır. Postmenopozal dönemde skuamokolumnar bileşke endoservikal kanal içine doğru yer değiştirmiştir ve gözle muayenede saptanamaz.

Fizyolojik Skuamokolumnar
Bileşke

Orijinal Skuamokolumnar
Bileşke

Transformasyon Zonu



Şekil 2. 2: Skuamokolumnar Bileşke

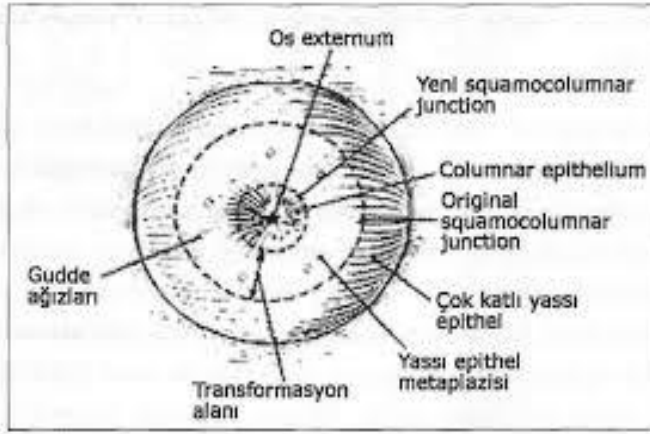
2.4 Skuamoz Metaplazi

Metaplazi kavramının karşılığı patoloji sözlüğünde matür bir dokunun yerini aynı oranda matür başka bir tip dokunun alması şeklinde geçer. Skuamoz metaplazide; kolumnar epitelin ekspozite alanlarında, rezerv hücre olarak adlandırılan küçük, yuvarlak, subkolumnar hücreler oluşur. Vajinal asidite etkisiyle bu rezerv hücrelerin sayısı artar ve çok hücreli immatür skuamoz epitel adı verilen bir epitel oluştururlar. Kolumnar epitel direkt olarak skuamoz epitele dönmeyip önce rezerv hücrelere dönüşür bu yüzden serviksteki metaplazi indirekt metaplazi olarak da adlandırılır. Skuamoz metaplazi geri dönüşümü olmayan bir süreçtir. Epitel tekrardan kolumnar epitele dönüşemez. Servikal neoplazi gelişmesine predispozan olan değişiklikler, servikal metaplazi sonucu oluşan transformasyon zonunda gelişirler. Skuamoz metaplazinin başlangıç aşamasında, genç metaplastik hücrelerin fagositoz yapabilme özelliği vardır. Yassı epitelyum metaplazisinin erken safhaları aktif silindirik hücrelerin transformasyonunun en yoğun olduğu dönemdir bu sebeple hücre değişimi ve servikal neoplazi gelişmesi açısından olayın kaderini belirleyecek en kritik dönemdir. Bu sırada vajina bir

mutajene (viral partiküller gibi) maruz kaldığı takdirde, epitelde premalign değişikliklere dönüşme meydana gelebilir. Bu, yeni viral DNA ile birleşmiş metaplastik olay; atipik metaplazi olarak da adlandırılmaktadır. Atipik metaplastik epitelyum ile normal metaplazi karşılaştırıldığında atipik metaplastik epitelyum hücreleri çekirdek, şekil, büyüklük ve kromozom içeriği ile normal metaplaziden farklıdır. Servikal metaplazi konusundaki en önemli nokta servikal metaplazi bütün genç kadınlarda görülebilen fizyolojik bir olaydır, benignidir. Klinik, kolposkopik, sitolojik veya histolojik olarak saptanmış olması, bir patolojiyi işaret etmez. Ancak bugün gelinen noktada servikal neoplaziye götüren tüm değişikliklerin servikal metaplazi sonucu oluşan transformasyon zonunda geliştiği bilinmektedir.

2.5 Transformasyon Zonu

Transformasyon zonu, kolumnar epitelin skuamoz metaplazi sonucunda skuamoz epitel tarafından değişikliğe uğradığı servikal bölümdür. Ektoservikte yerleşmiştir. Distalde orijinal skuamokolumnar bileşke ve proksimalde fizyolojik skuamokolumnar bileşkenin arasında kalan alan olarak tanımlanan bu bölgede skuamoz metaplazi en uç noktaya kadar uzanır. Menopozdan sonra, yaş ilerledikçe östrojenlerin azalan seviyeleri ile serviks atrofiye uğrar ve transformasyon zonu endoservikal kanalın içine doğru yer değiştirir. Transformasyon bölgesi servikal karsinogeneze ait bulguların saptanmadığı immatür veya ara sıra kolumnar hücre adacıklarının olduğu matür skuamoz metaplazi varlığında ise normal olarak kabul edilir. Anormal ya da atipik transformasyon zonu ise transformasyon bölgesinde servikal karsinogenezin belirtisi olan displastik lezyonların olması olarak tariflenebilir. Kolposkopi sırasında transformasyon bölgesinin tanınması ve iyi bilinmesi servikal karsinogenezin bulgularının hemen hemen hepsinin bu alanda yerleşmesi sebebiyle büyük önem taşımaktadır.



Şekil 2.3: Transformasyon Bölgesi

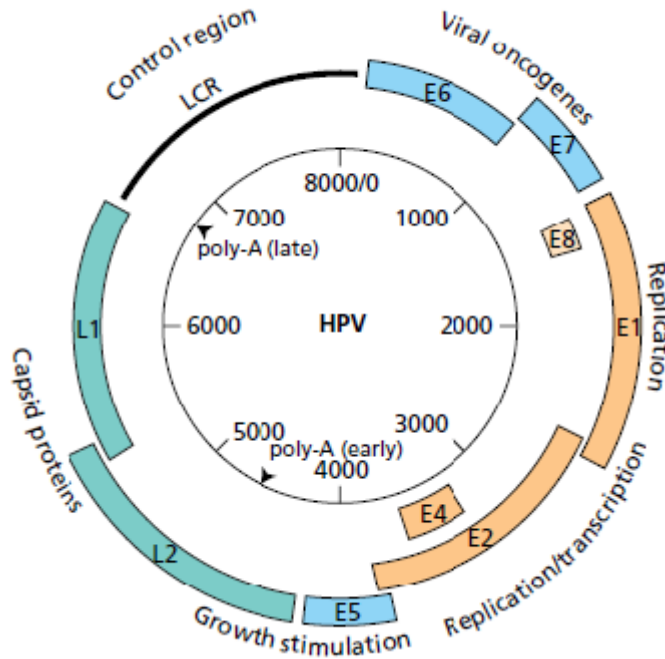
2.6 HPV Tarihçe

Antik Yunan Çağı ve Roma döneminden beri Human Papilloma Virüslerinin (HPV) neden olduğu siğillerin var olduğu ve bunların bulaşıcı oldukları bilinmekteydi (12). Roma döneminde Uzakdoğuda savaşan askerlerin ülkelerine döndüklerinde genital bölgelerinde siğiller izlendiği bilinmektedir. Özellikle genital siğiller çok fazla sayıda cinsel partneri olan kişilerde görülmekteydi ve bulaşıcıydı (13). İtalyan bir doktor olan Rigoni-Stern yapmış olduğu bir çalışmada 1760-1839 tarihleri arasında Verona’ da ölen kadınların ölüm raporlarını incelemiş; evli kadınlar, dul kadınlar ve genelev çalışanı olan kadınlarda serviks kanserinin daha sık olduğu, bakireler ve rahibelerde ise daha az görüldüğü sonucunu elde etmiştir (12). HPV araştırmaları yıllar geçtikçe ilerleyerek devam etmiştir. İnsan ve hayvanlarda siğillerin bulaştırıcılığı ile ilgili deneyler 1930’ lu yıllardan önce başlamış olup ilk HPV izolasyonu 1933’ te Shope ve Hurst tarafından tavşanlardan elde edilmiştir (14). 1932 yılında yapılan deneysel çalışmalarda servikal kanserlerde HPV’ nin varlığı sorgulanmaya başlanmıştır. Yapılan araştırmalar neticesinde genital lezyonların malign kanserlere dönüşebileceği saptanmış olup bu dönüşümdeki en önemli etkenin viral patojen olduğuna dair iddialar ilk defa net bir biçimde ortaya konulmuştur. 1976 yılında H. Zur Hausen’ in yaptığı çalışmalar neticesinde HPV ve servikal tümörler arasındaki ilişki ilk kez ortaya atılmıştır (15). HPV ile servikal tümörler arasında yüksek derecede sebep-sonuç ilişkisi saptayan Zur Hausen 2008 Nobel Tıp

Ödülüne layık görülmüştür (16). Yeni moleküler biyolojik tekniklerin 1980' lerde gelişmesiyle birlikte servikal premalign ve malign lezyonların saptanmasında yeni yöntemler kullanılmıştır. Günümüze kadar yayınlanan birçok epidemiyolojik ve laboratuvar çalışmaları ışığında serviksin premalign ve malign lezyonlarının oluşumunda HPV enfeksiyonunun en önemli etkenlerden biri olduğu saptanmıştır.

2.7 HPV Yapısı

HPV 55 nm büyüklüğünde viral genomu çift iplikli, dairesel, 8000 baz çiftine sahip, zarfsız bir DNA virüsüdür. Papillomavirus ailesine aittir. İkozahedral (20 yüzlü) bir kapsül içinde çift iplikli DNA' ya sahiptir (17). Kapsid yapısı 72 kapsomerden oluşup ikozahedral bir şekle sahiptir. Bugün için bilinen 200' den fazla çeşidi vardır.



Şekil 2. 4: HPV genomu

Viral genler üretim sıralarına göre erken (E) ve geç (L) olarak kategoriye ayrılmıştır.

Erken bölge (early region, ER) : Viral transkripsiyon, gen regülasyonu ve onkogenlerle ilgili proteinleri sentezler, viral genomun % 45' lik parçasını kaplar. Hücresel genomun konak genomuna yeni viral DNA meydana getirmek üzere ilişkisini sağlayan proteinlerin transkripsiyonunda görev alır. E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7 ve E8 olmak üzere 8 farklı protein tipi kategorize edilmiştir (14).

E1: Viral genomun devamı ve replikasyonunu sağlar. DNA' nın sirküler, normal durumda kalmasını sağlar (18).

E2: Transkripsiyonu düzenleyen proteinleri stimüle eder. E1' in işlevini tamamlar (18).

E3: İşlevi net olarak anlaşılamamıştır. Birçok HPV tipinde yer almaz.

E4: Viral siklusun geç dönemlerinde görev alır, virüsün maturasyonuna, virionların yapımına ve serbest kalmasına, enfekte hücrenin sitokeratin matriksini parçalamasına yardım eder.

E5: Epidermal büyüme faktörünü etkileştirerek hücrenin büyümesini sağlarken p21 tümör supresör geninin fonksiyonunu deprese ederek hücrenin kontrol sistemini bozar.

E6 ve E7: Major onkogenik genlerdir. E6 p53' ü, E7 ise aktif retinoblastoma genini inaktive eder. Viral replikasyon evresinde görev alan en önemli moleküllerdir ve hücresel proteinlerle etkileşimde rol oynarlar. Deneysel araştırmalarda ortaya çıkarılmıştır ki bu etkileşimler hücre proliferasyonunu, hücrenin immortalizasyonunu ve malign transformasyonunu uyarırlar (20).

E8: Sığır papillomavirüs tip 1 ve HPV 31' de bulunmakla birlikte tavşan papillomavirüslerinde de tespit edilmiştir. E8 geninin yapısında bulunan E8-E2 füzyon molekülü E2 geninin C terminaline bağlı olarak bulunur ve viral transkripsiyonda alternatif bir yolak olarak görev yapar. E8-E2 birleşik molekülü viral replikasyonu kontrol altında tutarak HPV epizomlarının stabilitesini sağlar ve HPV DNA replikasyonunu sınırlandırır (21).

Geç bölge (late region, LR): Tam virionu meydana getirmek üzere DNA' yı örten kapsid proteinlerinin kodlandığı alandır. Viral genomun % 40' ını kaplar.

L1 ve L2 olarak adlandırılan geç alan açık okuma alanları major ve minör kapsid proteinlerinin üretiminden sorumludur (22,23). L1 her HPV tipinde ortak olarak bulunan ve kapsidteki 25 proteinin üretiminden sorumlu alandır. Papillomavirüs ailesi içinde korunmuştur. Kapsid proteinlerine karşılık Anti-HPV kapsül antikoları üretilmiştir. L1' den farklı olarak L2 tarafından oluşturulan proteinler her HPV tipinde farklılık göstermektedir ve bu sayede her HPV tipinin farklı antijenik yapıda olmasını sağlar. Kondilom gibi iyi diferansiye HPV etkisiyle oluşan hastalıklarda L1 ve L2 tarafından üretilen proteinler sık görülmesine rağmen yüksek gradeli CIN lezyonları gibi farklılaşmanın az görüldüğü lezyonlarda kapsid proteinlerinin sıklığı daha az görülmektedir.

2.8 HPV Bulaş Yolları

HPV enfeksiyonu tüm dünyada en sık görülen cinsel yolla bulaşan hastalıktır (24). HPV bulaştırıcılığı çok yüksektir ve aktif cinsel hayatı olan erkek ve kadınlar hayatlarının herhangi bir döneminde bu virüsten etkilenmektedirler. Sık olmamakla birlikte yapılan araştırmalarda vertikal ve perinatal geçiş rapor edilmiş ve kanserle ilişkisi gösterilmiştir. Bu sebepten dolayı yenidoğanlarda, çocuklarda ve cinsel birliktelik yaşamamış adölesanlarda da genital siğiller görülebilmektedir (25). Bununla birlikte genital bölgede HPV lezyonu olan hastaların ellerinde ve tırnaklarında da HPV saptanmış ve bu hastalığı çocuklarına veya partnerlerine bulaştırabildikleri gösterilmiştir (26).

2.9 HPV Epidemiyolojisi

Cinsel yolla bulaşıcı hastalıklar arasında en sık rastlanılanı HPV enfeksiyonudur. HPV enfeksiyonları tüm dünyada en fazla tanı almış cinsel yolla bulaşıcı hastalıktır. Yapılan bir çalışmada normal servikal sitolojiye sahip 157879 kadın incelenmiş ve bu hastalarda HPV prevalansı yaklaşık % 10 olarak saptanmıştır (32). En fazla bölgesel prevalans % 22 ile Afrika' da saptanmıştır. Hastalık kontrol ve önleme merkezi (CDC) raporlarına göre her yıl 6.5 milyon kişi HPV ile enfekte olmaktadır. Buna bağlı olarak servikal kanserlerde artış beklenmektedir (33). HPV görülme sıklığı gelişmiş ve gelişmemiş ülkelerde değişiklik gösterse de genelde 20–24 yaş arası kadınlarda % 20–30 gibi bir orana ulaşır. Bu oran 30 yaşının üzerindeki kadınlarda azalarak % 3-10 seviyesine

ulaşır. HPV enfeksiyonu geçirmiş kadınların % 80' inde HPV enfeksiyonu immün sistem tarafından 12–18 ay gibi bir süreç sonrasında temizlenir. Neticede 30 yaş sonrası HPV prevalansında önemli derecede düşme görülür (34). HPV enfeksiyonunun ekonomiye etkisi incelendiğinde ABD' ye yıllık maliyeti 2.25 ila 4.6 milyar dolar arasında değişmektedir. Cinsel yolla bulaşan enfeksiyonların ekonomiye etkileri kıyaslandığında 15-24 yaş aralığındaki bireylerde HPV enfeksiyonunun ekonomik yükünün HIV enfeksiyonu ile benzer olduğu saptanmıştır.

HPV' nin günümüzde kullanılan sınıflaması DNA hibridizasyon yöntemi kullanılarak saptanan nükleotid zincirleri baz alınarak yapılmıştır. Yapılan araştırmalara göre, şuan itibariyle yaklaşık 200 kadar HPV tipi tanımlanmıştır (35). Bunların 40 kadarı anogenital epitelde tutulum yapmaktadır. Geri kalan HPV tipleri birçok dokuda farklı hastalıklara ve farklı tür kanserlere sebep olabilmektedir. Bunlar servikal kanserlerde görülme sıklığına göre serviks kanserine predispozan yüksek riskli ve düşük riskli ve orta riskli olmak üzere gruplara ayrılmıştır (36).

Yüksek Riskli Grup HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82

Orta Riskli Grup HPV 26, 34, 53, 57, 66, 83

Düşük Riskli Grup HPV 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81

Düşük riskli grupta yer alan HPV tipleri servikal tümörlerin oluşumunda etkisi olmayan, mukozal tutulumu sebep olarak kondilom benzeri lezyonlara sebep olurlar ve kozmetik sorunlar yaratırlar. HPV 6 ve HPV 11 genital bölgedeki kondilomların % 90' ında saptanan HPV tipleridir. Yüksek riskli grupta yer alan HPV 16 ve HPV 18 servikal kanser oluşumunun % 70' inde görülen HPV tipleridir ve servikal kanser oluşum riski diğer HPV tiplerine oranla 200 kat daha fazladır (37,38).

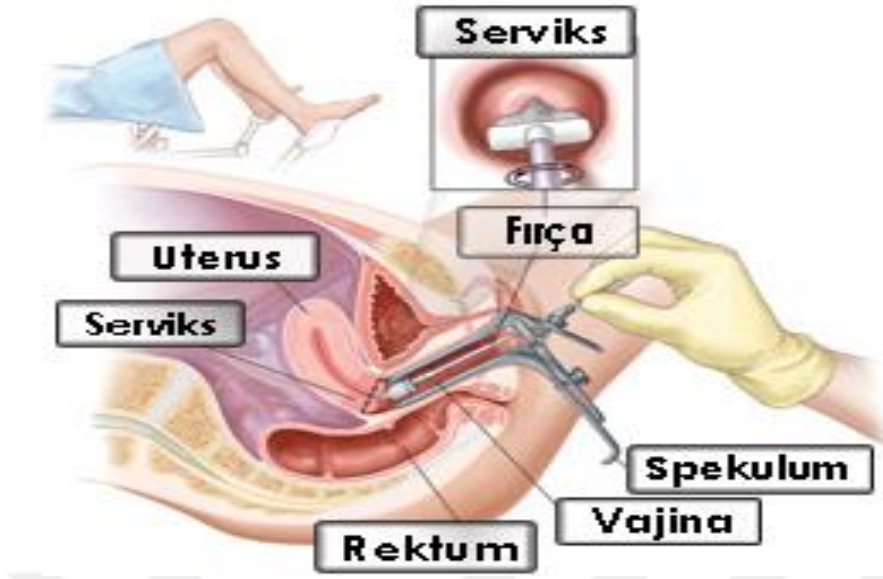
2.10 HPV ve Hastalık

Papillomavirüsler doku afinitesine bakılarak iki grup halinde kategorize edilebilirler: kutanöz tür (deriyi tutanlar) ve mukozal tür (genital kanalı, solunum yollarını, oral boşluğu veya konjunktivayı tutanlar) (27). Papillomavirüsler

skuamoz epitel hücrelerine etki ederek deri ve mukozal membranların tutulumunu sağlarlar. Buralarda replikasyon aşamasını gerçekleştirerek epitelyal hücre proliferasyonunu sağlarlar. Yüksek riskli tipler olan HPV 5 ve HPV 8 deride tutulumuna sebep olan kutanöz tiplerdir. Bu virüsler aynı zamanda epidermodisplazi verrüsiformis (EV) oluşumuna sebep olurlar (28). Genç bayanlardaki HPV enfeksiyonlarının çoğu geçicidir ve % 70' i birinci yılda, % 90' ı ikinci yılda immün sistem tarafından yok edilir. Ancak enfekte bayanların % 5-10' unda enfeksiyon dirençli seyir izleyip invaziv servikal kansere ilerleyebilir. Yapılan çalışmalarda koilositik hücrelerde intranükleer HPV izlenmiş olup bunların CIN gelişimi ile ilişkili oldukları ortaya konulmuştur. Sonrasında bu bilgiler ışığında HPV' nin kolposkopik muayene sonucunda servikte düz beyaz lezyonlara sebep olabildiği ve bu lezyonların serviks kanserinin başlangıç evrelerinde görülebildiği saptanmıştır. Araştırmalar sonucunda ortaya konulmuştur ki düşük gradeli CIN lezyonlarının (CIN I) % 85' ine, yüksek gradeli CIN lezyonlarının (CIN II ve III) ve invaziv servikal tümörlerin tamamına yakınına onkojenik HPV tipleri sebep olmaktadır (29,30,31). Düşük riskli HPV tipleri bu patolojilerin sadece % 15' ine sebep olmaktadır. HPV ilgili yapılan çalışmalar arttıkça HPV enfeksiyonunun önlenmesi ve tedavi edilebilmesi kolaylaşacak ve servikal kanserli hasta sayısında azalma meydana gelecektir.

2.11 Smear

Dökülen normal hücreler ve hastalık sebebiyle değişime uğramış endoservikal kanaldan elde edilen hücrelerin lam üzerine yayılıp mikroskopta incelenmesine dayanan bir testtir. Pap smear yöntemi dokuya zarar vermeyerek hızlı ve kolay tanıma fırsatı vermesi ve sık olarak hücre örneği elde etmek açısından avantajlıdır. Sitoloji yöntemi bir tanı yöntemi olmayıp tarama amaçlı olarak kullanılır ve sadece diğer yöntemlerle (kolposkopi ve histoloji) korele halde değerlendirilmesi gereken bir testtir. Serviks uterusunun tanısal sitolojisi bugün için dünya genelinde en yaygın kullanılan tarama testidir.



Şekil 2.5: Smear alınması

Serviks kanserinin preinvaziv evreye sahip olması ve bu sürecin uzun zaman alması, bu zaman diliminde hastaların yakalanabilmesi ve doğru bir şekilde tedavi edilebilmesi açısından önemli bir özellik olup; tarama, erken tanı ve tedaviye olanak sağlamaktadır. Sitolojik incelemedeki ana hedef dökülen normal hücreleri göstermesine ek olarak objektif kriterler kullanarak servikal lezyonların benign malign ayrımı yapılmasına olanak sağlar.

Günümüzde servikal kanser taramaları ile ilgili birçok kılavuz bulunmaktadır. HPV ile ilişkili hastalıklar genç bireyler ile yaşlı bireyler arasında farklılık göstermektedir. Bu farklılık yeni kılavuzlara da yansımıştır. Adölesanlarda sitolojik anormallik erişkinlerden daha fazla görülür. Adölesanlardaki sitolojik anormalliklerin servikal kansere ilerleme sıklığı daha azdır. Servikal kanser taraması ile ilgili en son kılavuz Amerikan Obstetri ve Jinekoloji Derneği (ACOG) tarafından 2016 yılında yayınlanmıştır (39).

ACOG KRİTERLERİ (2016)

1. Geçmişteki seksüel yaşamı önemsenmeksizin tüm taramalara 21 yaşında başlanmalı ve 21 yaşına gelmiş olan tüm kadınlar yıllık muayene ve Pap testi yaptırmalıdır.

2. Eğer hastanın HIV gibi sistemik bir hastalığı varsa, immüsupresif durumu varsa bu kişilerde tarama için 21 yaş beklenmemeli, seksüel aktif olur olmaz taramaya alınmalıdırlar. Bu hastalarda yıllık smear ve HPV taraması önerilir.
3. 21-29 yaş aralığındaki kişilere 3 yılda bir yalnızca smear testi kontrolü önerilmektedir.
4. 30 yaş üzerindeki kişilere 3 yılda bir smear kontrolü veya 5 yılda bir kotest (smear + HPV Tarama) kontrolü önerilmektedir.
5. 30 yaş üzerindeki kişilerde geçen 10 yıllık süreçte 2 kez negatif kotest veya 3 kez negatif smear sonucu varsa tarama 65 yaşında sonlandırılabilir. Bu dönemde kanser riski oldukça düşüktür.
6. Kişilerin yüksek dereceli displazi ve daha üstü bir lezyon öyküsü yoksa veya anormal tarama öyküsü, sigara kullanım öyküsü, önceki HPV sebepli bir hastalığı, immüsupresif bir hastalığı yoksa tarama 65 yaşında sonlandırılabilir.
7. Benign hastalık sebebiyle total histerektomi ameliyatı olmuş hastalarda tarama sonlandırılabilir. Fakat supraservikal histerektomi olan hastalarda serviks halen bulunduğu için taramaya devam edilmelidir.
8. Histerektomi geçirmiş, ancak CIN 2-3 anamnezi olan kişilerde taramaya CIN 2-3 tedavisinden sonra en az 20 yıl devam edilmelidir.

Smear yönteminin kullanılması serviks kanseri tarama, erken teşhis ve tedavisinde etkin rol oynamasına rağmen, yalancı negatif sonuçlar (%10-35) yüzünden yeni teknolojilerin gelişmesine ihtiyaç duyulmaktadır. FDA tarafından kabul edilmiş birçok sıvı bazlı teknik mevcuttur.

1.THİN PREP: Bu yöntem, alınan sitolojik örneğin, özel bir sıvı ortamda toplanmasına dayanmaktadır. Klasik smeardan farklı olarak, alınan örnek lam üzerine yayılmak yerine smear çubuğu özel bir solüsyona daldırılır. Bu tekniğin avantajı uniform dağılmış kan, mukus ve inflamatuvar hücrelerden arındırılmış bir hücre preperatı sağlamasıdır (40).

2.PAPNET(Bilgisayarlı yeniden tarama yöntemi): Bu teknik, daha önce mikroskopla taranmış negatif sitolojik smearların (konvansiyonel pap-smearlar) bilgisayarlı bir mikroskop ve renkli kamera ile yeniden taranmasına dayanır (40).

3.OTOPAP: Bu bilgisayarlı yeniden tarama yöntemi, yanlış negatif sitolojik örneklerin yakalanmasına yardımcı olmayı amaçlamaktadır. Normal sınırlarda ve yeterli kabul edilen tüm smearları yeniden tarayarak anormal hücreler içermeye olasılığı bulunan lamaları ayırır. Bunlar yeniden manuel olarak taranır (40).

Geçen zamanda histolojik terminolojinin Papanicolaou ve CIN sınıflaması ile uyuşmaması sebebiyle yeni bir sistem gerekliliği doğmuş ve bu sebeple Bethesda sistemi geliştirilmiştir. 1991 yılında Bethesda sistemi yeniden geliştirilmiş olup 2001 yılında en son şeklini almıştır (41,42). Bu sisteme göre, HPV ile CIN I düşük grade lezyonlar (LSIL), CIN II ve CIN III yüksek grade lezyonlar (HSIL) olarak kategorize edilmiştir.

Bethesda 2001 Sistemi

➤ SPESİMEN TİPİ
• Konvansiyonel, Likit bazlı, v.s.
➤ SPESİMEN YETERLİLİĞİ
• Değerlendirmek için yeterli (endoservikal transformasyon zonunun komponentlerin varlığı/yokluğu ve/veya diğer kalite indikatörleri; kan, inflamasyon, v.s.)
• Değerlendirmek için yetersiz
• Örnek işleme konulmadı / reddedildi (sebebi)
• Örnek işleme konuldu-incelendi ancak epitel anomalliklerini değerlendirmek için yetersiz (sebebi)
➤ GENEL KATEGORİZASYON (Opsiyonel)
• İntraepitelyal lezyon veya malignansi açısından negatif
• Epitelyal hücre anomallikleri (squamous/glandüler) (sonuç/yoruma bak)
• Diğer (≥ 40 yaş kadında endometrial hücreler görülmesi, v.s.) (sonuç/yoruma bak)
➤ OTOMATİK GOZDEN GEÇİRME
• Otomatik cihazla inceleme yapıldıysa cihazı ve sonucu belirt
➤ YARDIMCI TESTLER
• Test metodunun kısa bir tanımı
➤ YORUM / SONUÇ
• İntraepitelyal Lezyon/Malignansi Açısından Negatif
• Organizmalar
• Trichomonas vaginalis
• Morfoljik olarak kandidayı andıran fungal organizmalar
• Bakteriyel vajinozis lehine değişen vajinal flora
• Actinomycesle uyumlu bakteriyel morfoloji
• Herpes simplex ile uyumlu hücresel değişiklikler
• Diğer non-neoplastik bulgular
• Reaktif hücresel değişiklikler
• İnflamasyon
• Radyasyon
• RİA
• Histerektomi sonrası glandüler hücre durumu
• Atrofi
• Epitelyal Hücre Anomallileri
• Skuamöz hücre anomallileri
• Atipik skuamöz hücreler (ASC)
- ASC – US
- ASC – H
• Low-grade skuamöz intraepitelyal lezyon (LSIL)
- HPV / Hafif displazi / CIN I
• High-grade skuamöz intraepitelyal lezyon (HSIL)
- CIN II / CIN III / CIS
• Skuamöz hücreli karsinom
• Glandüler hücre anomallileri
• Atipik glandüler hücreler (AGC)
- Endoservikal hücreler (NOS veya açıklayıcı bilgi)
- Endometriyal hücreler (NOS veya açıklayıcı bilgi)
- Glandüler hücreler (NOS veya açıklayıcı bilgi)
• Atipik glandüler hücreler (AGC) – Favor neoplazi
-Endoservikal hücreler (Favor neoplazi)
-Glandüler hücreler (Favor neoplazi)
• Endoservikal adenokarsinoma in situ
• Adenokarsinoma
- Endoservikal
- Endometriyal
- Ekstrauterin
- Başka şekilde belirtilmeyenler

Çizelge2.1: 2001 Bethesda Sistemi

2.12 Kolposkopi

Kolposkopinin kelime anlamı vajina içine bakmaktır (colpo ve scope). Kolposkopinin icadı 1925 yılında Hans Hinselman tarafından yapılmıştır. Geçen yıllarda kolposkopi ile ilgili terminoloji geliştikçe kolposkopinin önemi artmıştır. Sitoloji ve kolposkopi birbirini tamamlayıcı yöntemlerdir. Servikal kolposkopinin primer odak noktası transformasyon zonuna, servikal osa ya da servikal kanala yerleşmiş lezyonların tanımlanması, prekanseröz serviks lezyonlarının varlığının araştırılması ve anormal pap-smear sonucunda biyopsi alınacak alanların işaretlenmesidir (43). Şüpheli noktalardan biyopsi alınır. Neticede sitolojik, kolposkopik ve histolojik verilerin birlikte değerlendirilmesiyle hastaya en doğru yaklaşım seçilmiş olur.

Kolposkopi Tekniği

Hasta rahat bir şekilde litotomi pozisyonuna alınarak dış genital organlar incelendikten sonra spekulum vajinaya yerleştirilir ve serviks tümüyle ortaya çıkarılır.

Klasik Kolposkopi: İlk ortaya çıkan ve en sık kullanılan yöntemdir. Spekulum yerleştirildikten sonra farklı derecedeki büyütmeler kullanılarak vajen ve serviks değerlendirilir. Yaklaşık 6-40 katlık bir büyütme sağlar. Mukus tabakası varsa temizlenir. Bu ilk değerlendirmeden sonra % 3-5' lik asetik asit solüsyonu servikse uygulanıp 60-90 saniye süreyle bekledikten sonra serviks ve üst vajina tekrar değerlendirilir. Normal epitelde asit glikojenin altına geçemez ve doku pembe görülür. Anormal epitel gri-beyaz bir görünüm alır ve bu durum aseto-beyaz etki olarak adlandırılır. Anormal epitel hücrelerinde artmış olan çekirdek içeriği ve protein asetik asit tarafından koagüle edilir ve bu durum da alttaki stromaya ışığın ulaşmasına engel olur. Bu aşamadan sonra serviks ve vajinaya Schiller solüsyonu (lugol solüsyonu; % 1 iyot, % 3 potasyum iyodür karışımı) damlatılır. Glikojenden zengin dokuları koyu renkte boyanırken anormal epitelyum hücreleri gibi glikojenden fakir dokular açık renk boyanır.

Tuzlu Su tekniği: Klasik teknikte kullanılan asetik asit ve schiller solüsyonu subepitelyal damar ağını kamufle ettiği için Koller ve Kolstad tarafından

geliştirilmiş bir yöntemdir. Burada servikse asetik asit yerine tuzlu su damlatılmakta ve yeşil ışık filtresi kullanılarak serviksin damar ağının kolposkopik olarak detaylı bir şekilde incelenmesine olanak sağlamaktadır.

ENDİKASYONLARI (43)

- İnvaziv kanser şüphesi olan smearlar
- İn utero dietilstilbestrol 'e fetal hayatta maruz kalma
- Anormal servikal sitoloji
- Anormal menstruel kanamalar veya postkoital kanamalar
- Vulvar veya vajinal neoplaziler
- Yetersiz sitoloji tekrarı
- Kriyoterapi, elektrocerrahi veya lazer cerrahisi gibi yöntemlere yardımcı olmak amaçlı
- HPV 16/ 18 pozitifliği

Normal kolposkopi bulguları;

Kolposkopik muayenede normal bir transformasyon zonu içerisinde silindirik epitel adacıkları, bez ağzları, nabothi kistleri ve bunun üzerindeki regüler damarlanma izlenmelidir. Normalde kolposkopi alt genital sistemi incelemek için büyütme, neoplazi olabilecek alanları belirlemek ve bu alanlardan biyopsi almak, serviksin skuamokolumnar bileşkesini tanımlamak için kullanılır.

Anormal kolposkopi bulguları;

- Asetik-asit beyazı
- Lökooplaki
- Puntuasyon
- Mosaizm
- Atipik damarlanma şeklinde sıralanabilir.

Asetik-asit Beyazı: Basit kolposkopik muayenede izlenmeyip servikse % 3' lük asetik asit uygulamasından 60 saniye sonra oluşan yüzeysel kabarıklık veya düz alanlar olarak izlenir. Patogenezi tamamen nükleer dansite ile alakalıdır.



Şekil 2.6: İnce Asetowhite Epitel



Şekil 2.7: İnce Asetowhite Epitel

Lökoplaki (hiperkeratoz): Sözlükteki karşılığı beyaz plak demektir. Kolposkopik terminolojiye göre ise, bu plak, asetik-asit uygulanmasından önce görülen beyaz epiteldir ve epitel yüzeyindeki keratin tabakasıyla etkileşim sonrası meydana gelir. İmmatür skuamoz epitelyal hücrelerin, keratin üreten veya

glikojen üreten hücrelere farklılaşma potansiyeli vardır. Vajina ve serviksteki normal dönüşüm glikojen lehinedir. Servikovajinal mukozadaki keratin üretimi anormal derecededir. HPV, CIN' in keratinizasyonu, karsinomanın keratinizasyonu, pesser veya tampon kullanımından doğan kronik travma ve radyoterapi gibi multifaktöryel etkenler lökoplakiye sebep olabilir. Lökoplaki oluşumunun en sık görülen sebebi HPV enfeksiyonudur. Kolposkopi esnasında kalın keratin tabakasının altındaki damar ağını görmek olanaksızdır bu sebeple keratinleşmiş alandan biyopsi alınmalıdır.



Şekil 2.8: Lökoplaki

Puntuasyon: Patolojik bulguları saptamak için dikkat edilmesi gereken en önemli nokta vasküler görünümüdür. Fizyolojik epitel düzgün kapiller damarsal yapılar içermektedir. Ancak displastik sürece girildiğinde anormal damarlanma ortaya çıkar. Epitelin yüzeyine doğru çıkıntı yapan bu anormal vasküler damarağı, kolposkopik olarak nokta nokta şeklinde görülür ki buna puntuasyon adı verilir.



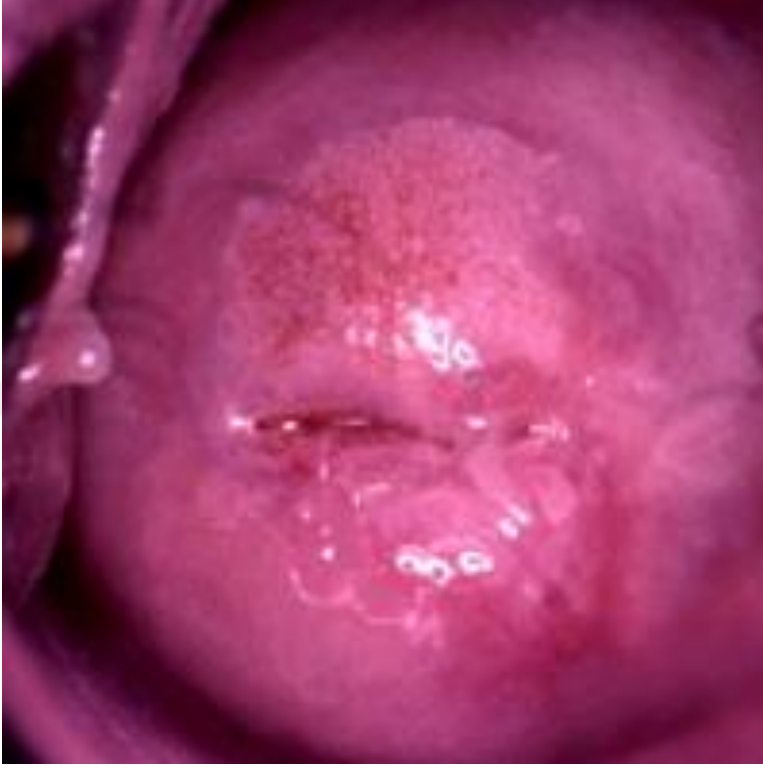
Şekil 2.9: İnce Puntuasyon



Şekil 2.10: Kaba Puntuasyon

Mosaizm: Bir arada toplanmış aseto-beyaz epitel alanlarını sirküler veya her yönden çevreleyen terminal kapillerler mozaik olarak tanımlanır; çünkü bunların şekilleri mozaiği andırmaktadır. Anormal epitel alanları çevresinde bir mozaik ağ

oluşturan bu damarlar, birçok punktuasyon gösteren terminal damarın birleşmesinden veya servikal salgı bezi ağızlarını çevreleyen damarlardan meydana gelebilir.



Şekil 2.11: Mosaizm

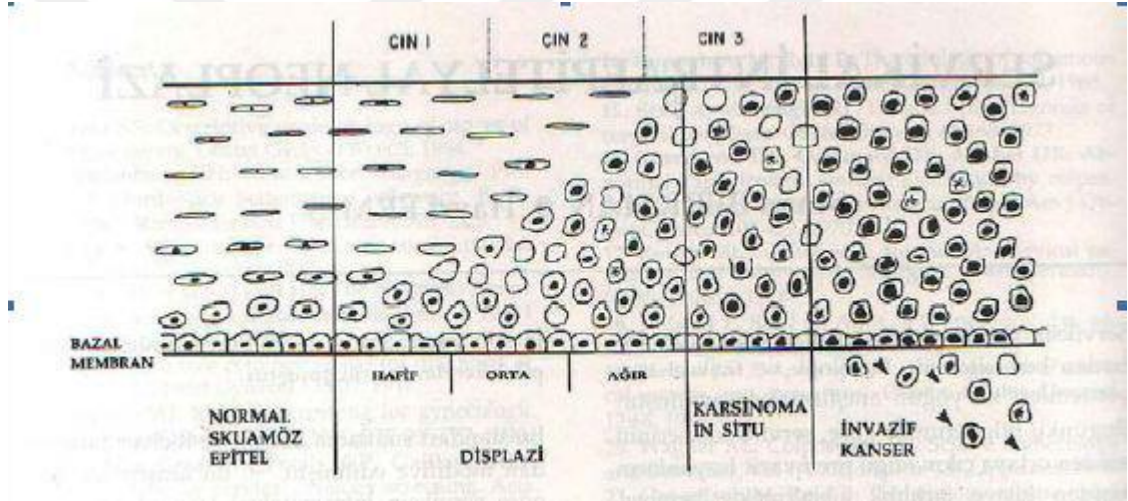
Atipik damarlanma: Damar yapıları düzensiz olup asimetric şekillenme gösterirler. Kapiller damarlar çoğunlukla bir ağ topluluğu meydana getirirler ve yumak benzeri görünüm oluştururlar. Atipik damarlanma diğer anormal kolposkopik bulgu olan punktuasyon ve mosaizm ile beraber görülebilir.

2.13 Servikal İntraepitelyal Neoplaziler

Servikal intraepitelyal neoplazi (cervical intraepithelial neoplasia, CIN) servikal invaziv kanserin iyi bilinen bir başlangıç lezyonudur. Servikal intraepitelyal neoplazi histolojisi iyi diferansiye neoplaziden başlayıp invaziv karsinomla sona eren intraepitelyal değişikliklerin bir bütünüdür. CIN lezyonlarında derecelendirme neoplastik değişiklik izlenen epitelin oranı ve sellüler atipi oranı baz alınarak yapılır (44).

1. Diferansiyasyon (Matürasyon, Stratifikasyon): Varlığı veya yokluğu, diferansiyasyon gösteren epitelin oranı
2. Nükleer anormallikler: Nükleus / sitoplazma oranı, hiperkromazi, nükleer pleomorfizm ve anizokaryozis
3. Artmış mitotik aktivite: Mitoz sayısı, epiteldeki düzeyi, anormal konfigürasyon

Mitoz ve immatür hücreler epitelin alt 1/3'ünde sınırlı ise CIN I, alt 2/3'ünde ise CIN II, epitelin tamamına yakını veya tamamını içeriyorsa CIN III olarak kabul edilmektedir. Bu lezyonların hepsinin ortak özelliği lezyonların hiçbirinde stromal invazyon görülmemesi ve hepsinde bazal membran bütünlüğünün korunmasıdır.



Şekil 2.12: CIN 1, 2, 3'ün epitelyum tabakalarına göre dağılımı

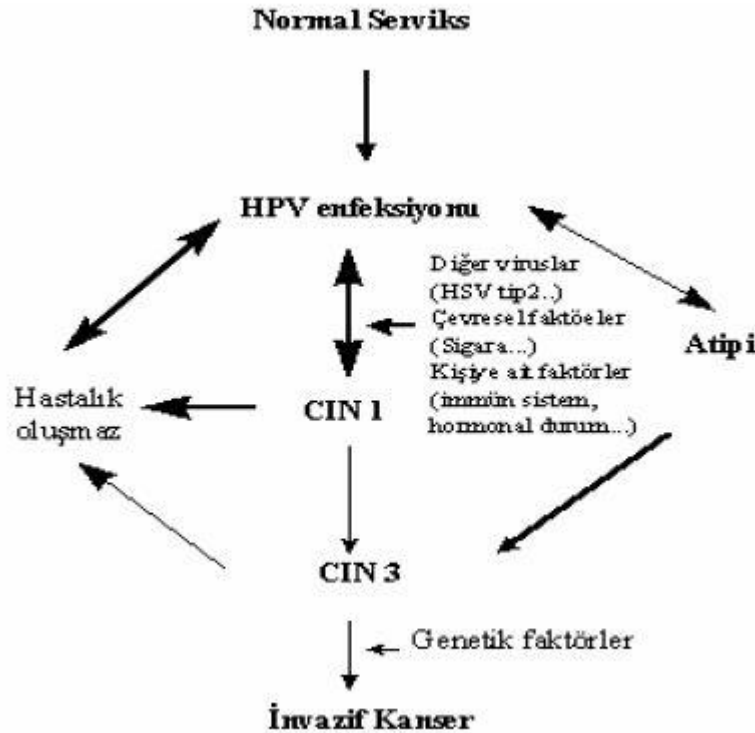
2012 yılında Amerikan Kolposkopi ve Servikal Patoloji Derneği (ASCCP) tarafından HPV sebepli genital skuamöz lezyonlarda yeni terminoloji tanımlanmıştır. Bu terminolojiye göre CIN I; LSIL ile, CIN II; p16 negatifliğine ve pozitifliğine göre LSIL ve HSIL ile, CIN III ise HSIL olarak kategorize edilmiştir (45,46).

CIN I: Çok katlı skuamöz epitelin üst 2/3' lük bölümünün hücrelerinde hafif nükleer atipi görülebilmesine rağmen normal matürasyon izlenir. Alt 1/3' lük tabakada ise nükleer anormallikler daha belirgin izlenmektedir. Mitoz görülmesine rağmen çok fazla sayıda değildir. Epitelin alt 1/3' lük kısmında

sınırlıdır ve anormal mitoz yapıları nadir izlenir (40). CIN I lezyonlarında % 50-60 oranında regresyon izlenir ve bu lezyonların % 30' u persistans gösterir. CIN 1 lezyonlarının % 20' sinde CIN III' e progresyon izlenir. Bunlardan sadece % 1-5' i invaziv kansere dönüşüm gösterir (47). Amerikan Kolposkopi ve Servikal Patoloji Derneğinin (American Society for Colposcopy and Cervical Pathology, ASCCP) 2012' de yayınlanan konsensus kılavuzuna göre yetersiz kolposkopiye sahip hastalarda, pozitif endoservikal küretaj varlığında, büyük lezyonlarda, 2 yıldır persistans süresi olan lezyonlarda, sitolojide ASC-H veya HSIL varsa CIN1 patolojisi varlığında eksizyonel tedavi biçimleri önerilmektedir (48).

CIN II: Nükleer atipi yüzeye kadar izlenebilmesine rağmen epitelin üst yarısında maturasyon izlenir. CIN 1 ile karşılaştırıldığında nükleer anormallikler daha fazladır. Mitozlar alt 2/3' lük kısımda izlenir ve anormal formları görülebilir (40).

CIN III: Maturasyon yoktur veya epitelin sadece üst 1/3 kısmına yerleşir. Nükleer anormallikler epitelin hemen hemen tamamında görülür. Mitozlar çok sayıdadır ve epitelin tüm tabakalarında izlenir (40).



Şekil 2.13: HPV Karsinogenezi

CIN 2 vakalarında % 40 oranında regresyon olmakla birlikte % 40 oranında da persistans izlenir. CIN 2 vakaları % 20 oranında CIN 3' e, % 5 oranında da invaziv karsinoma dönüşüm gösterir. CIN 3 vakalarında ise % 12–22 oranında invaziv karsinoma progresyon izlenir. CIN 3 vakalarının % 33 kadarı regrese olur (49). Bu nedenle CIN 2 ve 3 vakaları tedavi gerektirir. Servikal intraepitelyal neoplazi tanısı almış hastalarda tedavideki primer odak noktası servikste CIN lezyonlarının en sık izlendiği yer olan transformasyon alanındaki anormal epitelin tamamen eksize edilmesidir. CIN tedavisinde genellikle iki tip tedavi şekli mevcuttur. Tedavi biçimleri ablatif yöntemler (nitroz oksid ile ya da karbondioksit ile kriyoterapi, lazer ablasyon) ve eksizyonel metodlar (soğuk bıçak ya da lazer konizasyon, LEEP) olmak üzere ikiye ayrılır. Servikal intraepitelyal neoplazi tedavisinde kullanımı son zamanlarda sık kullanılan tedavi şekillerinin başında elektroeksizyon yöntemi olan LEEP gelmektedir. LEEP sonrası % 90 oranında regresyon izlenmesine rağmen hastaların önemli bir kısmında birkaç yıl içerisinde sınır tutulumundan bağımsız olmak üzere rekürrens gelişecektir (50,51). Bu sebepten dolayı LEEP sonrası takipte rekürrenslerin veya sonradan gelişebilecek CIN lezyonlarının saptanabilmesi çok önemlidir. Takip konusunda standart bir yöntem bulunmamaktadır. Bu tür hastalarda CIN tedavisi sonrası belli aralıklarla servikal sitoloji ve kolposkopik inceleme ile değerlendirme önerilmektedir.

2.14 Toll Like Reseptörler

Toll like reseptörler patojenlerle etkileşime geçerek doğal immün cevabın aktifleşmesini sağlayan transmembran proteinleridir (52). Patojenle etkileşime girdiklerinde konağın antijenik yapısını saptamaları en önemli özellikleridir. Doğal ve adaptif olarak iki tip immün sistem mevcuttur. Patojene maruz kaldıktan sonra ilk cevabın oluşmasını sağlayan ve patojenin antijenik yapısını tanıyan savunma sistemi doğal immünitinin bir parçasıdır. Adaptif immün sistem ise bellek görevi üstlenerek patojeni tanır ve daha sonraki karşılaşmalarda patojenin tanınmasını sağlar ve enfeksiyonun geç döneminde patojenlerin ortadan kaldırılmasında görev yapar. Patojenlerin üzerinde yerleşmiş moleküller “patojenlere eşlik eden moleküler yapılar-pathogen associated molecular patterns (PAMP) olarak adlandırılır (53,54,55). Doğal immün sistem hücreleri üzerinde

yerleşen ve PAMP moleküllerinin tanınmasını sağlayan reseptörlere de “Patojen tanıyıcı reseptör-Pathogen Recognition Receptor (PRR)” adı verilmektedir. Sentezi mikrobiyal ajanlar tarafından sağlanan TLR’ ler PAMP’ ları tanırlar. PAMP’ ları makrofajlar veya dendritik hücreler gibi antijen sunucu hücrelere sunarlar ve doğal immün sistemi aktive ederek konak savunmasını sağlarlar. TLR’ ler her patojene karşı aynı cevabı vermeyip sitokinlerin çeşitliliğine ve çevresel streslere bağlı olarak immün sistem cevabı değişir. TLR’ ler makrofajlar, monositler, dendritik hücreler (DC), natural killer (NK) hücreler, B hücreler, T hücrelerin spesifik tiplerinin yanında; miyofibroblastlarda, mide, ince bağırsak ve kalın bağırsakların matür ve immatür epitelial hücrelerinde, bağırsak submukozasının endotelial hücreleri ve adipositler gibi immün sistem hücresi olmayan hücrelerde bulunurlar. TLR 1, 2, 4, 5, 6 ve 10 aktive olduktan sonra fagozomlara doğru yer değiştirirler ve hücre yüzeyinde bulunurlar. TLR 3, 7, 8 ve 9 bütün hücrelerde özellikle endozomlar ve endoplazmik retikulum başta olmak üzere hücre içi kompartmanlarda bulunurlar (56). Northernblot analizi ve mRNA ekspresyonu baz alınarak, TLR 1’ in çoğunlukla monosit, nötrofil, B hücreleri ve NK hücrelerinde, TLR 2’ nin monosit, nötrofil ve dendritik hücrelerde, TLR 3’ ün dendritik hücrelerde, TLR 4’ ün endotelial hücreler, monosit, nötrofil ve dendritik hücrelerde, TLR 5’ in ise monosit ve dendritik hücrelerde yerleştiği kanıtlanmıştır (57,58). TLR gen polimorfizmleri ve kanser ilişkisini araştıran az sayıda araştırma yayınlanmıştır. Tahara ve ark. 2007 yılında Japon hastalarda yaptıkları bir çalışmada TLR-2 polimorfizminin mide kanserine yatkınlığa sebep olabileceğini kanıtlamışlardır (59). Lee ve ark. araştırmasında, servikal neoplazide TLR 9 ekspresyonu kanserin ilerlemesinde aktif görev almaktadır ve servikal skuamöz hücrelerdeki malign transformasyonu göstermek için kullanılabilecek bir belirteçtir (60). Buna benzer bir araştırma Kim ve ark. tarafından 2008 yılında gerçekleştirilmiş olup servikal neoplazide TLR 5 ekspresyonunun tümör ilerlemesinde aktif rol alabileceği ve servikal skuamöz hücrelerdeki malign transformasyonu göstermek için yararlı bir belirteç olabileceği ileri sürülmüştür (61). Ayrıca akciğer, mide ve meme kanserinde de TLR 9 ekspresyonunda artış olduğu belirtilmektedir (60).

TLR 4: Bakteri ve virüs DNA' larının tanınmasında etken rol oynar. 9q32-33 kromozomunda kodlanan, 90 kDa moleküler ağırlığında 839 aminoasit içeren bir toll like reseptördür. TLR 1 ve TLR 6 ile birlikte çalışır. TLR 4 mRNA 'sı tek kopya transkript halinde bulunur. Dalak ve PBL' lerde yüksek oranda bulunur. TLR 4 ekspresyonu B hücreler, DC'ler, monositler, makrofajlar, granülositler ve T hücreler tarafından yapılır (62).TLR 4 geninde polimorfizmler, artmış gram-negatif infeksiyon hassasiyeti ile orantılıdır. Yapılmış bazı araştırmalarda TLR 4'ün yalnızca myelomonositik hücrelerde sunulduğu ve mononükleer hücrelerde en yüksek seviyede olduğu görülmüştür. TLR 4'ün ekspresyonu NF- κ B sinyal yolağı vasıtasıyla gerçekleşir ve edinsel immün cevaplarda çok önemli olan çeşitli sitokinlerin ve kositimülatör moleküllerin ekspresyonunu sağlar. Bu bulgular ışığında TLR' lerin doğal immün sistemde reseptör görevi gören çok önemli moleküller olduğu bildirilmiştir (63).

TLR 5: TLR 5 ve TLR 9 diğer TLR' lerden farklı olarak tek bir yapıyı spesifik olarak tanırlar. TLR-2, TLR 4 ve TLR 6 birçok farklı mikrobiyal ajana reaksiyon oluşturabilmelerine rağmen TLR 5 bakteriyel flagellanın temel yapısal bir komponenti olan bakteriyel flagellini tanımaktadır (64). Flagellin tamamen protein yapıda olup karbonhidrat ve lipid içermez. Flagellin ile karşılaştıktan sonra TLR 5 ekspresyonu olur ve bunun neticesinde tümör nekroz faktörü (TNF)- α gibi inflamatuvar yanıt oluşur.

TLR 9:Her bir TLR mikroorganizmalardaki farklı yapılara farklı şekilde ekspresyon gösterirler. Mikrobiyal DNA' da memeli DNA' sından farklı olarak çok yüksek miktarda metile olmamış CpG yapıları içermektedir. TLR 9' un CpG DNA' yı tanınması endosom içinde gerçekleşir. Metilasyon, memeli DNA'sında gerçekleştiği bilinen tek kovalan olaydır ve yalnızca CG (CpG) dinükleotidlerinde bulunan sitozinlerde meydana gelir. Anmetile CpG dinükleotidlerinin B hücrelerinin proliferasyonunu stimüle ettiği ve makrofajlar ile dendritik hücrelerin aktivasyonunu sağladığı gösterilmiştir. CpG DNA dendritik hücreleri uyarak IL-12 salınmasına ve TH-1 immün yanıtın oluşmasına yol açarlar (65).Akira ve arkadaşları tarafından yapılan araştırmalarda bu yapılar için insandaki reseptörün TLR 9 olduğu bildirilmiştir (65).

3. MATERİYAL METOD

Bu prospektif kohort çalışmada Şubat 2016 – Aralık 2016 tarihleri arasında, Akdeniz Üniversitesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Jinekoloji bölümüne sitolojik anormallik nedeniyle başvuran olgular araştırma kapsamına alınmıştır. Çalışma için Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulundan onay alınmıştır ve çalışmamız Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) tarafından desteklenmiştir. (Proje kodu: TTU-2016-1656) Çalışmaya ilk başvuruda sitolojik anormalliği olup bu sebeple kolposkopik biyopsi sonrası veya LEEP işlemi sonrası HSIL olduğu saptanan 30 hasta dahil edildi. Çalışmaya servikal konizasyon öyküsü olan, herhangi bir immün yetmezliği olan ya da HIV pozitif hastalar ve gebe hastalar alınmadı.

İlk sitolojide Bethesda 2001 sistemi baz alınarak ASCUS ve daha üzeri sitolojik anormallik (ASC, ASC-H, LSIL, HSIL) saptanan hastalar kolposkopiye yönlendirildi. Hastaların takip ve tedavileri 2012 ASCCP önerileri dikkate alınarak planlandı. Hastaların ilk başvuruları sırasında ayrıntılı jinekolojik anamnez alındı. Hastaların dahili hastalıkları, cerrahi operasyon geçmişleri, servikal cerrahi girişim geçirip geçirmediği, sigara öyküsü, kontraseptif yöntem kullanımı, parite ve gravidası sorgulandı. Jinekolojik muayeneleri yapıldı.

Hastaların ilk başvurusunda jinekolojik muayene öncesi servikal sürüntü örneği alındı. Servikal sürüntüler Papette çubuğu (Wallach Surgical Devices, USA) yardımıyla alındı. Alınan örnekler Shandon Pap Spin (Thermo Fisher Scientific, USA) solüsyonuna daldırıldı. Örnekler incelenmek üzere Akdeniz Üniversitesi Patoloji Anabilim Dalı laboratuvarına ulaştırıldı.

Kolposkopi işlemi sonrası kolposkopide anormal bulguları olan hastalara ve sitoloji – kolposkopi uyumsuzluğu olan hastalara eksizyonel prosedür olan LEEP işlemi uygulandı. LEEP sonrası koterizasyon ile hemostaz sağlandı. Örnekler % 10 formalin uygulamasından sonra patolojik incelemeye yollandı.

LEEP işlemi sonrası 6. ayda hastalar kontrole çağırıldı. Hastalardan kontrol servikal sürüntü örneği alındı. Servikal sürüntüler Papette çubuğu (Wallach Surgical Devices, USA) yardımıyla alındı. Alınan örnekler Shandon Pap

Spin (Thermo Fisher Scientific, USA) solüsyonuna daldırıldı. Hastalardan Hybrid capture 2 yöntemiyle değerlendirilmek üzere HPV DNA sürüntü örnekleri alındı. HPV DNA tarama örnekleri Digene HC2 DNA toplama çubukları (Qiagen, USA) ile alındı. HPV DNA taraması yapıldı. Hastalardan kolposkopi eşliğinde şüpheli lezyonlardan biyopsi alındı. Tüm bu örnekler incelenmek üzere Akdeniz Üniversitesi Patoloji Anabilim Dalı laboratuvarına ulaştırıldı.

3.1 HPV DNA İzolasyonu

Doku örneklerinden 10 mikron kalınlığında 3-5 kesit alındı. DNA izolasyonu için; parafine gömülü dokudan DNA izolasyon kiti (Qiagen) kullanıldı. Dokular santrifüj tüpü içine alınıp dokulara 1 ml Ksilol eklenip ve vortekslendikten sonra 2 dakika 14000 rpm de santrifüj yapıp deparafinizasyon işlemi yapıldı. Aynı işlem bir kez daha tekrarlandı. Ksilol aşamasından sonra 1 ml absolü alkol eklendi ve vorteksleme işlemi yapıldı. Daha sonra 2 dakika 14000 rpm de santrifüj işlemi yapıldı. Süre sonunda süpernatant kısım alındı. 10 dakika kadar oda ısısında beklenildi. Santrifüj tüpündeki doku üzerine 180 µl ATL Buffer ve 20 µl Proteinaz K eklenerek 56 °C de gece boyu (16-18 saat) inkübasyona bırakıldı. Lizis olan dokunun bulunduğu santrifüj tüpleri; 95 °C ye ayarlı ısı bloğunda 15 dakika bekletildi. Lizis olan dokunun üzerine 200 µl AL buffer ve 200 µl absolü alkol eklendi, vortekslendi ve 14000 rpm kısa 1 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda üst kısım dikkatlice kolona aktarıldı ve 8000 rpm de 1 dakika santrifüj edildi. Kolona yıkama sıvıları eklenerek tekrardan 8000 rpm de santrifüj işlemleri yapıldı. Kolon temiz bir 2 ml. lik santrifüj tüpüne alınarak üzerine 50 µl elüsyon solüsyonundan eklendi. Oda ısısında 5 dakika bekletildi. Süre sonunda 8000 rpm de 2 dakika santrifüj edilerek kolondaki DNA' nın elüsyonu sağlandı. DNA; -20 °C' de saklama işlemleri gerçekleştirildi.

Hastaların LEEP materyalinden HPV DNA tiplendirme çalışıldı. Anyplextm II HPV 28, Seegene, KOREA kiti kullanılmıştır. Bu kit ile 19 yüksek riskli HPV tipi ve 9 düşük riskli HPV tipinin tiplendirmesi yapılmaktadır. Taranan yüksek riskli HPV tipleri; tip 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 69, 73, 82' dir. Düşük riskli HPV tipleri ise; tip 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61 ve 70' dir.

3.2HPV DNA Tiplendirme Kit Çalışma Metodu

Kitin çalışma metodu; multipleks gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyon (multipleks RT-PCR; real time PCR) ile erime eğrisi analizi temeline dayanmaktadır. Kit; kendine spesifik geliştirilmiş TOCE teknolojisini kullanmaktadır. TOCE teknolojisinde, RT-PCR cihazında tek bir floresans kanalında çok sayıda patojen belirlenebilmektedir. Erime eğrisi analizinde; yüksek düzeyde sekans varyasyonlarına sahip DNA' lar arasında sıcaklık farklılıkları sıklıkla görülmektedir. Ancak TOCE teknolojisinde, sekans varyasyonlarından etkilenmeyecek şekilde geliştirilmiştir.

Anyplex™ II HPV 28 kitinde; End-point CMTA (End point-Catcher Melting Temperature Analysis) ve Cyclic CMTA (Cyclic –Catcher Melting Temperature Analysis) multipleks reaksiyonları meydana gelmektedir. Cyclic-CMTA yöntemi, yeni geliştirilmiş bir metod olup ko-infekte olan örneklerde major patojenin ayrılmasını sağlamaktadır. Kit de aynı zamanda; insan house-keeping genlerinden birisi internal kontrol olarak kullanılmaktadır. Bu sayede; olası PCR inhibisyonlarının, nükleik asit izolasyonun başarısı, alınan örnekteki hücre miktarının yeterliliğinin kontrolü yapılmaktadır.

3.3 İmmünohistokimya

Leep işleminde çıkarılan servikal doku ve kontrol kolposkopisinde şüpheli lezyondan alınan biyopsi materyalleri mikrotom bıçağı ile 4 mikron kalınlığında kesildi. Kesilen preparatlar 10 dakika süreyle xylol içerisinde bekletilerek kısmi deparafinizasyon yapıldı. Deparafinizasyon işlemi yapıldıktan sonra Ventana XP kapalı sistem otomatik immünohistokimya cihazına preparat tepsilerine yerleştirildi. TLR 4, 5 ve 9 kitleri (Abcam, USA) uygun protokol ve antikorlar ile boyandı. Boyama işlemi yaklaşık 4-5 saat devam etti. Boyanmış preparatlar deterjanda yıkandıktan sonra dereceli alkol ve ksilol solüsyonlarıyla muamele edildikten sonra entellan damlatılıp lamelle kapatıldı. Lameller histopatologlar tarafından mikroskop altında değerlendirildi. Hücrelerin sitoplazmasındaki kırmızı ve mor boyanma pozitif olarak kabul edildi. Boyanmanın yoğunluğu ve hücrelerin tutulma oranına göre 0'dan 4'e kadar olan bir skala kullanıldı;

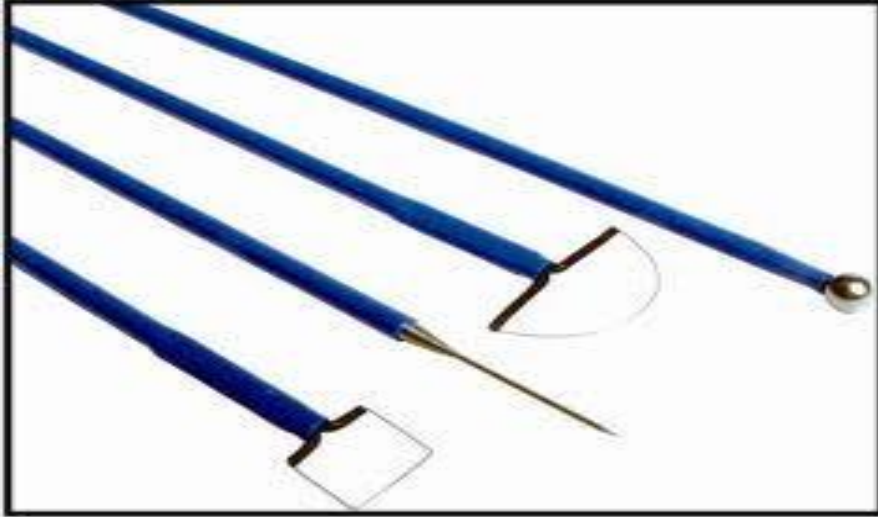
- 1: Zayıf derecede boyanma yoğunluğu ve % 50' den az hücre tutulumu
- 2: Orta derecede boyanma yoğunluğu ve % 50' den fazla hücre tutulumu
- 3: Yoğun derecede boyanma yoğunluğu ve % 50' den fazla hücre tutulumu
- 4: Çok yoğun derecede boyanma yoğunluğu ve % 80' den fazla hücre tutulumu

3.4 LEEP İşlemi

Hastalar maske anestezi altında litotomi pozisyonunda uyutuldu. Gerekli alan temizliği ve örtülme işlemleri gerçekleştirildi. Spekulum takılması ve serviks ekspozisyonu sonrasında serviksin üst polü tek dişli klemp ile tutuldu. Cerrahi kesme işlemi yüksek frekanslı elektrik jeneratörle yapıldı. Jeneratör diatermi ayarı kesme işlemi için 45-55 W, koagülasyon işlemi için 50 W ayarına getirildi. Lezyon genişliğine ve derinliğine uygun loop elektrodlar seçildi. İşlem sonrasında gerekli hemostazı sağlamak için kanamalı alanlara topuz uçlu elektrod yardımıyla koagülasyon uygulandı. Koterizasyon ve koagülasyon sırasında çıkan duman aspire edildi. Şekil 3.1' de kolposkopi aparatı, şekil 3.2' de ise LEEP için kesici uçlar görülmektedir. Örnekler % 10 formalin uygulamasından sonra patolojik incelemeye yollandı.



Şekil 3.1: Kolposkopi Cihazı



Şekil 3.2: LEEP Kesici Uçları

3.5 İstatistiksel Yöntem

Verilerin tanımlayıcı istatistiklerinde ortalama, standart sapma, medyan en düşük, en yüksek, frekans ve oran değerleri kullanılmıştır. Değişkenlerin dağılımı kolmogorov simirnov test ile ölçüldü. Değişkenlerin dağılımı homojendi. Nicel bağımsız verilerin analizinde Mann-Whitney U test kullanıldı. Bağımlı nicel verilerin analizinde, Wilcoxon testi, nitel verilerin analizinde McNemar test kullanıldı. Nitel bağımsız verilerin analizinde Ki-kare test, ki-kare test koşulları sağlanmadığında Fischer test kullanıldı. Analizlerde SPSS 22.0 programı kullanılmıştır.



4.SONUÇLAR

Çalışmaya ilk başvuruda sitolojik anormalliği olup bu sebeple kolposkopik biyopsi sonrası veya LEEP işlemi sonrası histopatolojik olarak HSIL olduğu saptanan 30 hasta dahil edildi.

Ortalama hasta yaşı 40.6 ± 8.4 , ortanca değeri 39.5 (min 26–max 56), ortanca gravida değeri 2 (min 0-max 8), ortanca parite değeri 2 (min 0-max 4) idi. Hastaların 13'ünde ek herhangi bir dahili problem mevcuttu (%43.3). Dokuz hastada sigara kullanım öyküsü mevcuttu (%30). Sekiz hastada hayatının herhangi bir döneminde oral kontraseptif kullanım hikayesi mevcuttu (%26.7). **(Çizelge 4.1)**

Çizelge 4.1: Hastaların demografik verileri ve bunların hasta sayısına oranı

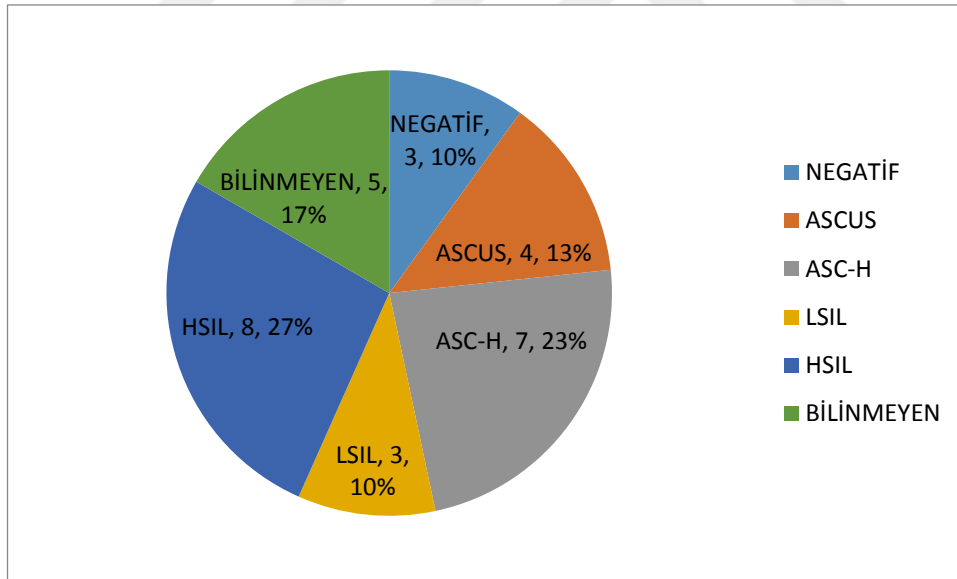
		Min-Mak		Medyan
Yaş		26	- 56	39,5
Gravida Sayısı		0,00	- 8,00	2,00
Parite Sayısı		0,00	- 4,00	2,00
Ek Hastalık	Yok			17 56,7%
	Var			13 43,3%
Sigara Kullanım	Yok			21 70,0%
	Var			9 30,0%
OKS Kullanımı	Yok			22 73,3%
	Var			8 26,7%

Hastaların başvuru anındaki sıvı bazlı sitoloji sonuçlarında dört ASCUS (% 13.3) , yedi ASC-H (%23.3), üç LSIL (% 10), sekiz HSIL (% 26.6) idi. Üç hastada sıvı bazlı sitoloji negatif (%10) gelmekle birlikte beş hastanın smear sonucuna hastalar dış merkezden başvurduğu için ulaşılammıştır (% 16.7). **(Çizelge 4.2)**

Çizelge 4.2: Sıvı bazlı sitoloji sonuçları ve bu sonuçların toplam hasta sayısına oranı.

İLK SMEAR	n	%
NEGATİF	3	10,0
ASCUS	4	13,3
ASC-H	7	23,3
LSIL	3	10,0
HSIL	8	26,6
BİLİNMEYEN	5	16,7
TOPLAM	30	100

Şekil 4.1: Sıvı bazlı sitoloji sonuçları ve bu sonuçların toplam hasta sayısına oranı.

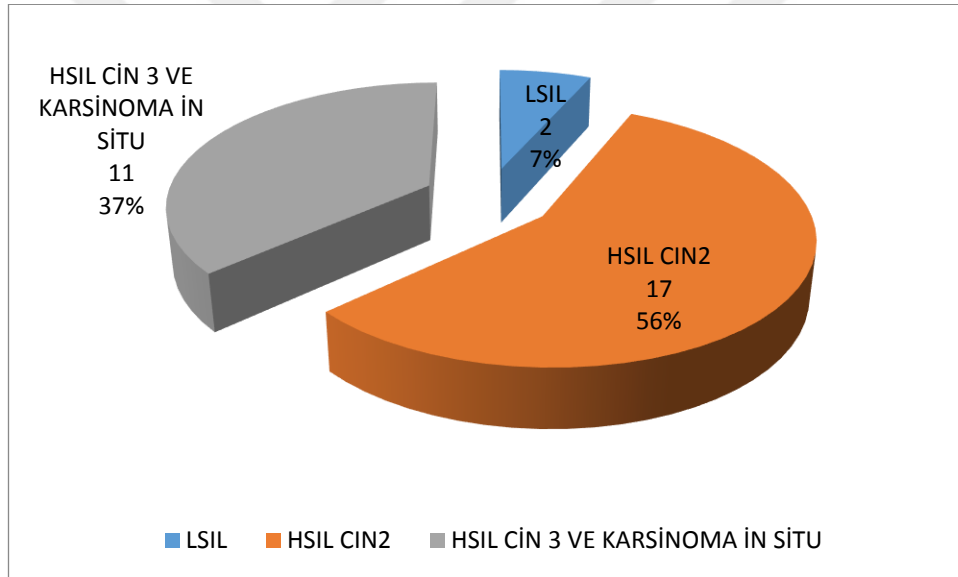


Kolposkopik biyopsi sonuçları; 2 LSIL (% 6.7), 17 HSIL CIN2 (% 56.7), 11 HSIL (CIN3 ve KARSİNOMA İN SİTU) (% 36.7) idi. (Çizelge 4.3)

Çizelge 4.3: Kolposkopik biyopsi sonuçları ve bu sonuçların toplam hasta sayısına oranı

KOLPOSKOPİ BİYOPSİ	n	%
LSIL	2	6,7
HSIL CIN2	17	56,7
HSIL CİN 3 VE KARSİNOMA İN SİTU	11	36,7
TOPLAM	30	100

Şekil 4.2: Kolposkopik biyopsi sonuçları ve bu sonuçların toplam hasta sayısına oranı

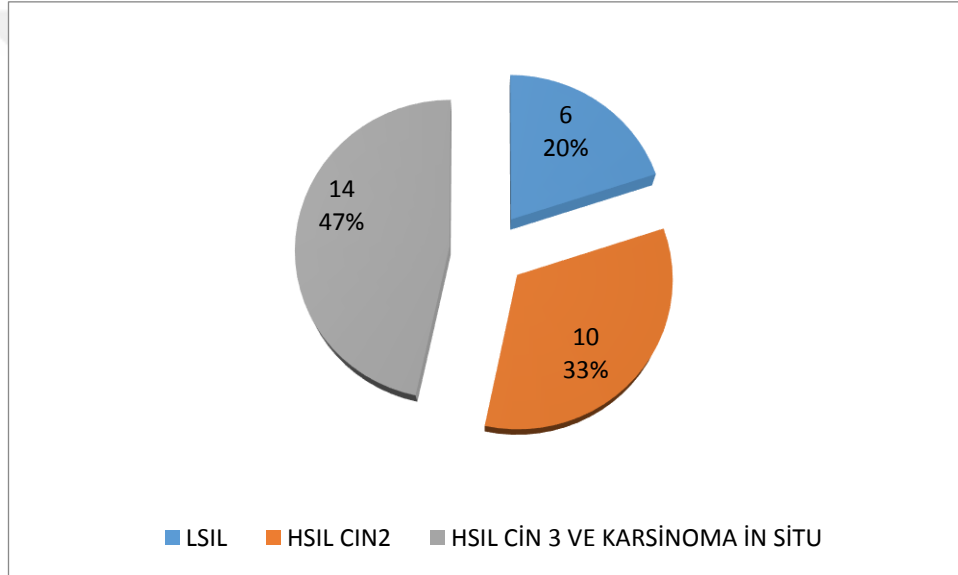


LEEP biyopsi sonuçları; altı LSIL (% 20),10 HSIL CIN2 (% 33.3), 14 HSIL CIN3 ve KARSİNOMA İN SİTU (%46.7)idi. (**Çizelge 4.4**)

Çizelge 4.4: LEEP biyopsi sonuçları ve bu sonuçların toplam hasta sayısına oranı

LEEP BİYOPSİ	n	%
LSİL	6	20
HSİL CIN2	10	33,3
HSİL CİN 3 VE KARSİNOMA İN SİTU	14	46,7
TOPLAM	30	100

Şekil 4.3: LEEP biyopsi sonuçları ve bu sonuçların toplam hasta sayısına oranı

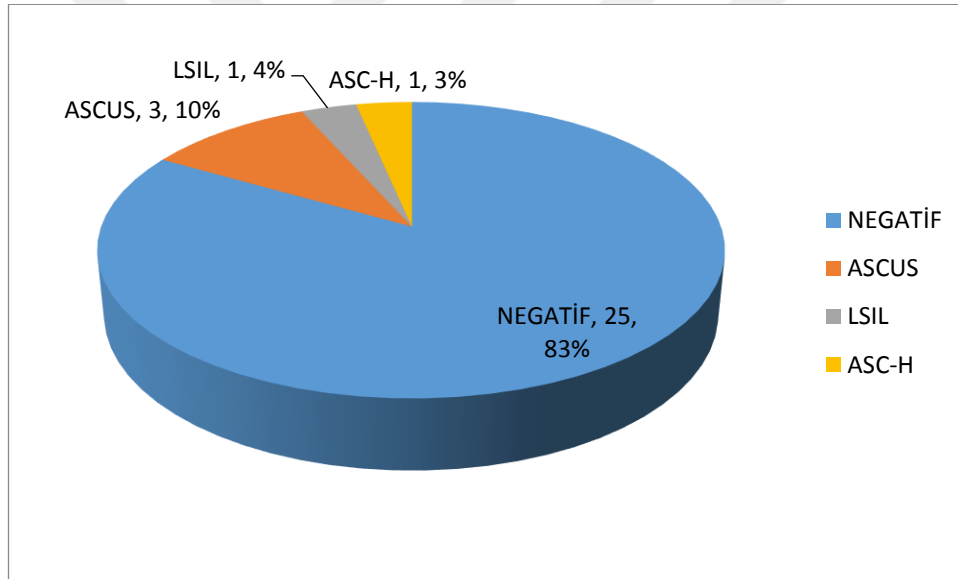


Hastaların 6 ay sonraki kontrol sıvı bazlı sitoloji sonuçları; 25 negatif (% 83.3), üç ASCUS (% 10), bir LSİL (% 3.3), bir ASC-H (% 3.3) idi. (**Çizelge 4.5**)

Çizelge 4.5: 6. Aydaki kontrol sıvı bazlı sitoloji sonuçları ve bunların toplam hasta sayısına oranı

LEEP SONRASI SMEAR	n	%
NEGATİF	25	83,3
ASCUS	3	10,0
LSIL	1	3,3
ASC-H	1	3,3
TOPLAM	30	100

Şekil 4.4: 6. Aydaki kontrol sıvı bazlı sitoloji sonuçları ve bunların toplam hasta sayısına oranı

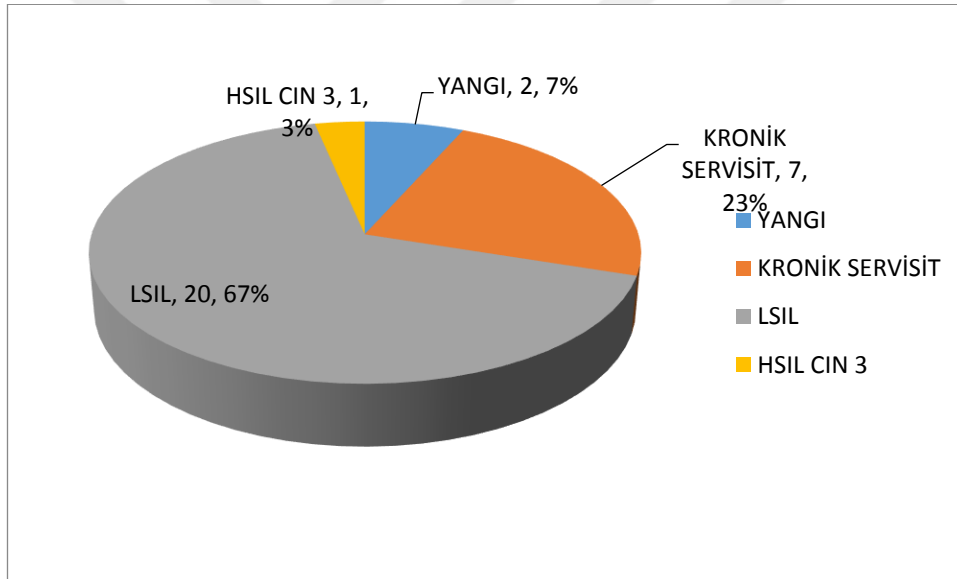


Hastaların 6.aydaki kontrol kolposkopik biyopsi sonuçları; iki yangı (% 6.7), yedi kronik servisit (% 23.3), 20 LSIL (% 66.7), bir HSIL CIN3 (% 3.3) idi. (Çizelge 4.6)

Çizelge 4.6: 6.aydaki kontrol kolposkopik biyopsi sonuçları ve bunların toplam hasta sayısına oranı

KONTROL BİYOPSİ	n	%
YANGI	2	6,7
KRONİK SERVİSİT	7	23,3
LSIL	20	66,7
HSIL CIN 3	1	3,3
TOPLAM	30	100

Şekil 4.5: 6.aydaki kontrol kolposkopik biyopsi sonuçları ve bunların toplam hasta sayısına oranı



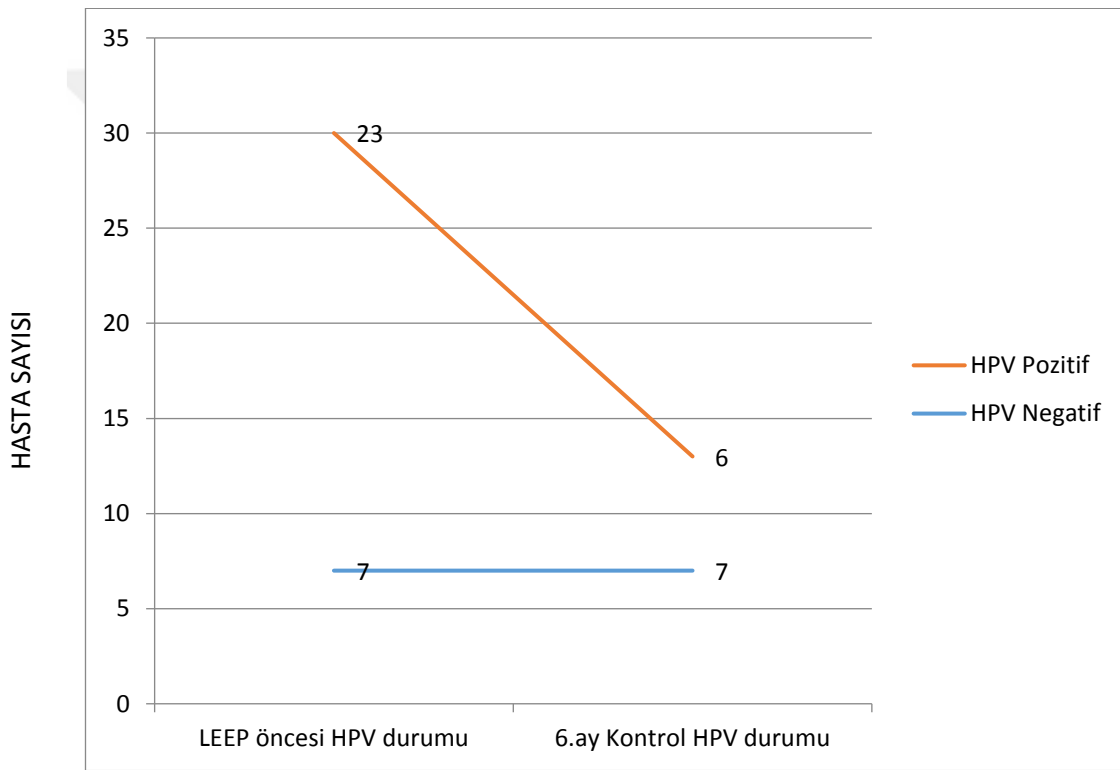
Hastaların LEEP materyalinden çalışılan HPV tiplendirmesi yedi HPV negatif veya düşük riskli HPV tipi (% 23.3), 23 yüksek riskli HPV tipi (% 76.7) idi. Hastaların 6. ay HPV Tarama sonuçları; 24 HPV tarama negatif (% 80), altı HPV tarama pozitif (% 20) idi. (**Çizelge 4.7**)

HPV pozitiflik oranı LEEP sonrası altıncı ay takipte % 76 dan % 20' ye geriledi. (p<0.05)

Çizelge 4.7: HPV negatif ve Pozitif hastaların LEEP öncesi ve 6. Ay kontrolleri

	LEEP Öncesi HPV Durumu		6.ay kontrol HPV	
	n	%	n	%
HPV NEGATİF	7	23.3	7	23.3
HPV POZİTİF	23	76.7	6	20

Şekil 4.6: HPV negatif ve pozitif hastaların LEEP öncesi ve 6. Ay kontrolleri

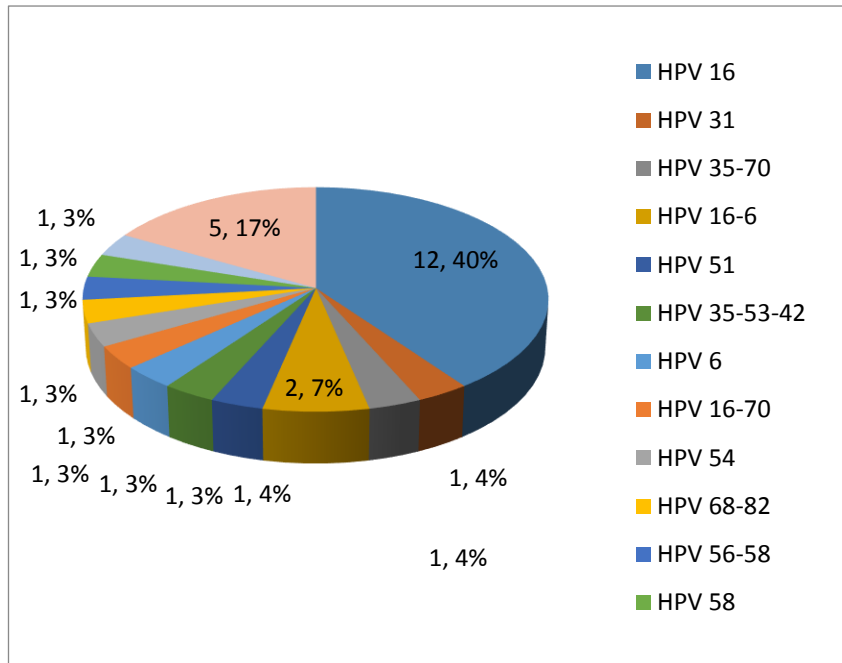


Alınan örneklerde HPV tipleri, 12 HPV 16 (% 40), beş HPV negatif (% 16.6), iki HPV 16-6 (% 6.7), bir HPV 31 (%3.3), bir HPV 51 (%3.3), bir HPV 6 (%3.3), bir HPV 54 (%3.3), bir HPV 58 (%3.3) idi. Bir hastada HPV 35-70 (%3.3), iki HPV 16-6 (%6.7), bir HPV 35-53-42 (%3.3), bir HPV 16-70 (%3.3), bir HPV 68-82 (%3.3), bir HPV 56-58 (%3.3), bir HPV 18-52-56-6 (%3.3) idi. (Çizelge 4.8)

Çizelge 4.8: HPV tipleri ve toplam hasta sayısı arasındaki oranlar

HPV TİPLERİ	n	%
HPV 16	12	40
HPV 31	1	3.3
HPV 35-70	1	3.3
HPV 16-6	2	6.7
HPV 51	1	3.3
HPV 35-53-42	1	3.3
HPV 6	1	3.3
HPV 16-70	1	3.3
HPV 54	1	3.3
HPV 68-82	1	3.3
HPV 56-58	1	3.3
HPV 58	1	3.3
HPV 18-52-56-6	1	3.3
HPV NEGATİF	5	16.6
TOPLAM HASTA SAYISI	30	100

Şekil 4.7: HPV tipleri ve toplam hasta sayısı arasındaki oranlar



HPV negatif-düşük ve HPV yüksek riskli olan grupta hastaların yaşları, gravida sayısı, ek hastalık oranı, sigara kullanım oranı, OKS kullanım oranı anlamlı ($p > 0.05$) farklılık göstermemiştir. HPV yüksek riskli olan grupta parite sayısı HPV negatif-düşük olan gruptan daha düşüktü. ($p < 0.05$) (**Çizelge 4.9**)

Çizelge 4.9: Hastaların demografik verileri ile HPV durumlarının Karşılaştırılması

		HPV(Negatif-Düşük Risk)		HPV(Yüksek Risk)		P
		Ort.±s.s.	Medyan	Ort.±s.s.	Medyan	
Yaş		46.0 ± 10.0	45	39.0 ± 10.0	39	0.090 ^m
Gravida Sayısı		2.57 ± 0.79	2.00	2.26 ± 1.74	2.00	0.212 ^m
Parite Sayısı		2.29 ± 0.76	2.00	1.57 ± 0.99	1.00	0.048^m
Ek Hastalık	Yok	3	42.9%	14	60.9%	0.400 ^{x²}
	Var	4	57.1%	9	39.1%	
Sigara Kullanım	Yok	5	71.4%	16	69.6%	0.925 ^{x²}
	Var	2	28.6%	7	30.4%	
OKS Kullanımı	Yok	4	57.1%	18	78.3%	0.345 ^{x²}
	Var	3	42.9%	5	21.7%	

^m Mann-whitney u test / ^{x²} Ki-kare test

Hastaların ilk ölçümde TLR 4 boyanma dereceleri; 19 (%63.3) boyanma olmadı, sekiz (%26.7) hafif derecede boyanma, üç (%10) yoğun derecede boyanma idi. Hastaların ilk ölçümde TLR 5 boyanma dereceleri; 17 (%56.7) boyanma olmadı, beş (%16.7) hafif derecede boyanma, sekiz (%26.7) yoğun derecede boyanma idi. Hastaların ilk ölçümde TLR 9 boyanma dereceleri; 30 (%100) boyanma olmadı idi. Hastaların son ölçümde TLR 4 boyanma dereceleri; 19 (%63.3) boyanma olmadı, 11 (%36.7) hafif derecede boyanma idi. Hastaların son ölçümde TLR 5 boyanma dereceleri; 13 (%43.4) boyanma olmadı, 14 (%46.7) hafif derece boyanma, üç (%10) orta derecede boyanma idi. Hastaların son ölçümde TLR 9 boyanma dereceleri; 25 (%83.3) boyanma olmadı, beş (%16.7) hafif derecede boyanma idi. (**Çizelge 4.10**).

Çizelge 4.10: TLR 4, 5, 9' un LEEP öncesi ve sonrası boyanma oranları

		Ort.±s.s.	
TLR 4			
İlk Ölçüm		0.57 ± 0.94	
	0	19	63.3%
İlk Ölçüm	I	8	26.7%
	II	0	0.0%
	III	3	10.0%
Son Ölçüm		0.37 ± 0.49	
	0	19	63.3%
Son Ölçüm	I	11	36.7%
	II	0	0.0%
	III	0	0.0%
TLR 5			
İlk Ölçüm		0.97 ± 1.30	
	0	17	56.7%
İlk Ölçüm TLR 5	I	5	16.7%
	II	0	0.0%
	III	8	26.7%
Son Ölçüm		0.67 ± 0.66	
	0	13	43.3%
Son Ölçüm TLR 5	I	14	46.7%
	II	3	10.0%
	III	0	0.0%
TLR 9			
İlk Ölçüm		0.00 ± 0.00	
	0	30	100.0%
İlk Ölçüm TLR 9	I	0	0.0%
	II	0	0.0%
	III	0	0.0%
Son Ölçüm		0.17 ± 0.38	
	0	25	83.3%
Son Ölçüm TLR 9	I	5	16.7%
	II	0	0.0%
	III	0	0.0%

HPV negatif-düşük ve HPV yüksek riskli olan grupta ilk ölçüm-son ölçüm TLR 4, 5,9 boyanma oranı anlamlı ($p > 0.05$) farklılık göstermemiştir. (**Çizelge 4.11**)

HPV yüksek riskli olan grupta istatistiksel olarak anlamlı olmasa da ilk ölçüm TLR 5 boyanma oranının HPV negatif-düşük riskli gruba göre daha fazla olduğu saptanmıştır.($p=0.078$)

Multiple HPV enfeksiyonu ile TLR arasındaki ilişkiyi incelediğimizde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da multiple HPV tipiyle enfekte hastalarda LEEP sonrası TLR 4 boyanması daha fazla izlenmiştir. ($p=0.087$)

TLR 9 ilk boyamada dokuda gösterilemese de LEEP sonrası alınan biyopsilerde yüksek riskli HPV pozitif grupta % 17.4 oranında TLR 9 boyanması mevcuttur.

Çizelge 4.11: TLR 4, 5, 9' un LEEP öncesi ve sonrası boyanma sayılarının HPV ile ilişkisi

		HPV(Negatif-Düşük Risk)		HPV(Yüksek Risk)		P	
		n	%	n	%		
TLR 4							
İlk Ölçüm	Boyama(-)	4	57,1%	15	65,2%	0,698	X ²
	Boyama(+)	3	42,9%	8	34,8%		
Son Ölçüm	Boyama(-)	4	57,1%	15	65,2%	0,698	X ²
	Boyama(+)	3	42,9%	8	34,8%		
<i>Değişim p</i>		1,000	N	1,000	N		
TLR 5							
İlk Ölçüm	Boyama(-)	6	85,7%	11	47,8%	0,078	X ²
	Boyama(+)	1	14,3%	12	52,2%		
Son Ölçüm	Boyama(-)	4	57,1%	9	39,1%	0,400	X ²
	Boyama(+)	3	42,9%	14	60,9%		
<i>Değişim p</i>		0,625	N	0,687	N		
TLR 9							
İlk Ölçüm	Boyama(-)	7	100,0%	23	100,0%	-	
	Boyama(+)	0	0,0%	0	0,0%		
Son Ölçüm	Boyama(-)	6	85,7%	19	82,6%	1,000	X ²
	Boyama(+)	1	14,3%	4	17,4%		
<i>Değişim p</i>		1,000	N	0,025	N		
X ² Ki-kare test / N Mc-Nemar							

Çizelge 4.12: Hastalarda HPV enfeksiyonu ve LEEP öncesi ve sonrası TLR boyanma yoğunlukları

Hasta Numarası	HPV Durumu	HPV Tip	TLR 4 *	TLR 4 **	TLR 5 *	TLR 5 **	TLR 9 *	TLR 9 **
1	+	16	+	+	+++	+	-	+
2	+	16-6	-	+	+++	+	-	+
3	+	68-82	+	+	-	-	-	+
4	+	54	+	+	-	-	-	+
5	+	56-58	-	+	-	-	-	+
6	+	16	-	-	+++	++	-	-
7	+	31	-	-	-	++	-	-
8	-	0	-	-	-	++	-	-
9	+	35-70	+++	+	+++	+	-	-
10	+	16	+	+	+	+	-	-
11	+	16	+	+	-	+	-	-
12	+	16-6	-	+	-	+	-	-
13	+	51	-	-	+++	+	-	-
14	+	16	-	-	+++	+	-	-
15	+	16	-	-	+++	+	-	-
16	+	16	+++	-	+	+	-	-
17	+	35-53-42	-	-	+	+	-	-
18	-	0	+	-	-	+	-	-
19	+	16-70	-	-	-	+	-	-
20	+	6	-	-	-	+	-	-
21	-	0	-	+	+++	-	-	-
22	-	0	+++	+	-	-	-	-
23	+	58	+	-	+	-	-	-
24	+	16	+	-	+	-	-	-
25	+	18-52-56-6	-	-	-	-	-	-

Çizelge 4.12 (devamı): Hastalarda HPV enfeksiyonu ve LEEP öncesi ve sonrası TLR boyanma yoğunlukları

Hasta Numarası	HPV Durumu	HPV Tip	TLR 4 *	TLR 4 **	TLR 5 *	TLR 5 **	TLR 9 *	TLR 9 **
26	+	16	-	-	-	-	-	-
27	+	16	-	-	-	-	-	-
28	+	16	-	-	-	-	-	-
29	+	16	-	-	-	-	-	-
30	-	0	-	-	-	-	-	-

*LEEP öncesi TLR boyanma yoğunluğu

**LEEP sonrası TLR boyanma yoğunluğu

5.TARTIŞMA

Preinvaziv servikal lezyonlar karsinogenezde öncül lezyonlardır ve bazen tedaviye rağmen bazı hastalarda kansere progresyon gözlenmiştir. Servikal kansere ilerlemede izlenen yavaş seyir, preinvaziv servikal lezyonların erken tanınmasında ve invaziv kansere progresyonun önlenmesinde tarama programlarının önemini göstermektedir. Serviks kanseri etiyolojisine yönelik çalışmalarda serviks kanseri için en önemli risk faktörünün HPV olduğu saptanmıştır (66). Her ne kadar karsinogenezde en önemli faktör HPV persistansı olsa da hangi hastalarda tedaviye rağmen persistans olacağı HPV virüs latensi dışında net değildir. Serviks kanseri ve karsinogenez ile ilgili yapılan çalışmalarda preinvaziv/invaziv sürecin TLR ekspresyonu ile ilişkili olduğu görülmüştür. Aynı zamanda HPV eradikasyonunda TLR'lerin rol oynadığına dair çalışmalar mevcuttur (67). Tüm bu veriler ışığında HPV eradikasyonunda TLR sisteminin etkin olabileceği düşünülmüştür. Fakat LEEP işleminin direkt olarak HPV eradikasyonuna etkisi ya da doğal immünite ile ilişkisi üzerine güncel literatürde az sayıda data mevcuttur. Bu çalışmada iki amaç hedeflenmiştir. Birincisi HSIL tanısı almış hastaların tedavisinde kullanılan eksizyonel bir yöntem olan LEEP işleminin HPV DNA eradikasyonunda ve yüksek dereceli servikal lezyonların tedavisindeki rolü, ikincisi ise HPV DNA eradikasyonunda immün sistemin bir parçası olan TLR ekspresyonunun oynadığı roldür. Hipotezimizde LEEP sonrası doğal immün sistem markerlarında immünite lehine bir artış olacağı ve HPV eradikasyonu lehine değişiklikler olacağı varsayılmıştır.

Sıvı bazlı sitoloji yönteminin duyarlılığının düşük olması ve servikal premalign ve malign lezyonların etiyolojisinde HPV' nin major etken olduğu bilindiğinden HPV DNA testleri takipte kullanılabilir (68). Mevcut çalışmada 7 hastada HPV negatif veya düşük riskli HPV tipi (%23.3), 23'ünde ise yüksek riskli HPV tipi (%76.7) saptanmıştır. Hasta grubunda HSIL tanılı olan kadınlarda HPV DNA pozitifliği yüksek olmasına karşın %100 değildir. HPV prevalansına yönelik ülkemizde yapılan çalışmalarda benzer şekilde HSIL ve serviks kanseri vakalarında HPV saptama oranı %100 den daha düşük olarak bildirilmiştir (69, 70). HPV saptanamayan olguların aslında mevcut kitlerle saptanamayan diğer yüksek riskli HPV genotipleri olabileceği düşünülebilir.

HSIL lezyonlarının tedavisinde ablatif ve eksizyonel yöntemler kullanılabilir. Konizasyon ve LEEP yöntemi en sık kullanılan eksizyonel tedavi biçimleridir. Bu eksizyonel tedavilerle histopatolojik inceleme için elde doku örneği olması bu işlemlerin en önemli avantajlarından biridir. LEEP ile tedavi edilen hastaların takibinde nasıl bir yol izleneceği belirgin değildir. Geleneksel izlem 4-6 aylık aralar ile sitolojik ve/veya kolposkopik izlem şeklindedir (68). HPV enfeksiyonlarının tanımlanması ve tiplendirilmesi, servikal kanser gelişiminin önlenmesi ve takibi için büyük önem taşımaktadır. Mevcut çalışmada LEEP öncesi 23 hastada yüksek riskli HPV tipi (%76.7) saptanmış olup LEEP sonrası takiplerde HPV pozitiflik oranı altıncı ayda % 20 oranına gerilemiştir. Mevcut çalışmada LEEP öncesi bakılan 30 hastada HPV pozitiflik oranının azalması dikkat çeken bir bulgudur. Mevcut çalışmada dikkat çeken diğer bir detay ise LEEP işlemi yapılan 30 hastanın sadece birinde cerrahi sınırda pozitiflik saptanması idi. Bu hastaya daha sonra konizasyon işlemi tekrarlandı. Hasta 42 yaşında HPV tip 16 ile infekte idi. Hastanın LEEP öncesi ve sonrası doku örnekleri incelendiğinde TLR 4, 5, 9 ile boyanma izlenmedi. HPV pozitifliği eradikasyonu açısından LEEP işlemi sonrası cerrahi sınır pozitifliğinin olması rekürrens ve persistans açısından prediktif bir değere sahip olabilir. Çalışmadaki cerrahi sınır pozitifliği veya rekürrens gösteren hasta sayısı sadece bir olduğu için bu konuda herhangi bir yargıya varılamamıştır. Ülkemizde yapılan bir tez çalışmasında LEEP işlemi yapılan 77 hastanın doku örnekleri incelenmiş olup bu hastaların 25' inde (%32.5) cerrahi sınır pozitifliği bulunmuştur. Literatürde ise bu oran % 1-5 civarındadır.(71,72)

Venturoli ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada sadece yüksek dereceli lezyonlar çalışmaya dahil edilmiş olup altı ay sonunda %51.4 oranda HPV pozitifliği saptanmıştır (73). Prato ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalarda ise takiplerde HPV DNA pozitifliği %56.5 olarak saptanmıştır (74). Literatürle karşılaştırıldığında mevcut çalışmada LEEP sonrası HPV pozitifliği % 20 olarak bulunmuştur. 6 aydaki bu gerileme LEEP' in lezyonlar üstündeki etkisi ve HPV eradikasyonuna bağlanabilir. Literatürde LEEP sonrası üçüncü ayda HPV pozitiflik oranı % 36 olarak bildirilmekle birlikte viral arınma zamanla artacaktır (75). Güncel literatür bilgisiyle mevcut çalışma karşılaştırıldığında LEEP

sonrasındaki HPV pozitiflik oranındaki düşüş HPV' nin doğal bağışıklıkla temizlenmesinin yanı sıra LEEP gibi eksizyonel yöntemlerin ilk tedavi ve sonraki rekürrenslerde kullanılmasının sonucu olabilmektedir. LEEP' in servikte lokal immüniteyi uyatarak HPV eradikasyonuna katkıda bulunduğu da düşünülebilir.

Sık görülen HPV tiplerinin belirlenmesi için farklı populasyonlarda farklı tanı yöntemleri kullanılarak araştırmalar yapılmıştır. Yapılan çalışmalarda Dünyada kadınlarda genital infeksiyonlardan sorumlu en yaygın HPV genotipinin tip 16 olduğu bildirilmiştir. Mevcut çalışmada saptanan HPV tipleri, 12 HPV 16 (% 40), bir HPV 31 (%3.3), bir HPV 51 (%3.3), bir HPV 6 (%3.3), bir HPV 54 (%3.3), bir HPV 58 (%3.3) idi. Bir hastada HPV 35-70 (%3.3), iki hastada HPV 16-6 (%6.7),bir hastada HPV 35-53-42 (%3.3), bir hastada HPV 16-70 (%3.3), bir hastada HPV 68-82 (%3.3), bir hastada HPV 56-58 (%3.3), bir hastada HPV 18-52-56-6 (%3.3) birlikteliği görülmüştür. 2012 yılında Guan ve arkadaşlarının yayınladığı bir metaanalizde sitolojisi normal vakalarda HPV tip 16 prevalansı % 20.4, ASC-US' lu vakalarda %22.9 olarak saptanmıştır. Servikal lezyonun derecesi ilerledikçe HPV tip 16 prevalansı da artmaktadır. Sırasıyla CIN1' de 27.6% , CIN2' de 39.8% , CIN3' de 58.2% , invaziv skuamöz karsinomda 62.6% HPV tip 16 saptanmıştır (76). Tayvan'da 1086 CIN2/3 lezyonlu hastalarda HPV DNA pozitifliğinin araştırıldığı bir çalışmada HPV DNA pozitifliği % 91.6 olarak saptanmıştır. Önde gelen HPV genotipleri, HPV16 (% 24), HPV52 (% 20), HPV58 (% 20), HPV33 (% 13), HPV31 (% 8) ve HPV18 (% 4.6) oranında (+) saptanmıştır (77).

HPV pozitif vakaların %10-20'sinde multiple genotiplerle HPV infeksiyonu gelişebildiği de bildirilmiştir. Mevcut çalışmada kadınların %26.4ünde (8/30)'sinde çoklu genotip ile infekte HPV infeksiyonu tespit edilmiştir. Bu multiple HPV genotipiyle infekte kadınların %20 (6/30)'inin iki HPV tipiyle, %3.3 (1/30)'inin üç HPV tipiyle ve %3.3 (1/30)'unun da dört HPV tipiyle infekte olduğu tespit edilmiştir. Türkiye'de yapılan 61 kadının değerlendirildiği bir çalışmada, sitoloji sonucu normal olarak raporlanan hastalarda %36, HSIL izlenen hastalarda %87,5, LSIL izlenen hastalarda %50 ve ASC-US izlenen hastalarda %11,1 oranında HPV DNA saptanmıştır. En sık rastlanan tipler HPV 16 ve 18'dir (78). Başka bir çalışmada, 20-68 yaş arası 460

kadın çalışmaya dahil edilmiş olup, 24'ünde (%5,2) HPV pozitif saptanmıştır. Hastaların 14'ünde (%3) yüksek riskli, 10'unda (%2,2) düşük riskli HPV tipleri izlenmiştir. Yüksek riskli HPV tiplerinden en sık HPV 16 (%33,3) tespit edilmiştir. Bunu sırasıyla HPV 45 (%20,8), HPV 18 (%4,2) ve HPV 31 (%4,2) izlemektedir (79). Türkiye' deki HPV prevalansını saptamak için yapılan çok merkezli 6388 hastanın dahil edildiği bir retrospektif analizde, HPV prevalansı %25 olarak bulunmuş ve bu oranın dünya geneli ile benzer olduğu görülmüştür. En sık saptanan HPV tipi HPV 16 (%32) olarak raporlanmıştır. Bu sonuçlar özellikle batı ülkelerinde görülen HPV tipleri ile benzerlik göstermektedir (80). Mevcut çalışmada en sık rastlanan HPV tipi HPV 16 olarak saptanmış olup veriler literatürle uyumlu olsa da diğer HPV tipleri literatürle uyuşmamaktadır. Bu farklılığa hem olgu sayısındaki azlık hem de HPV prevalansının etnik, bölgesel ve yaş ile değişiklik göstermesi sebep olabilir. Ayrıca HPV tipleri arasındaki çapraz reaksiyonda bu oranlarda etkili olabilir.

Mevcut çalışmada HPV yüksek riskli yedi hastada sigara kullanım öyküsü mevcutken, HPV negatif-düşük riskli hastalardan ikisinde sigara kullanım öyküsü mevcuttu. İki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0.05$) ve sigara kullanımı ile yüksek riskli HPV arasında önemli bir ilişki tespit edilememiştir. Trottier ve ark. yaptıkları çalışmalarda ise HPV DNA(+) hastalarda sigara kullanımının genetik yollarla oluşan hasarlanmaya yol açtığı ve bu hasarın da kansere progresyonu hızlandırdığı sonucuna varmışlardır (81). David ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada HPV 16(+) kadınlarda sigara içiminin servikal lezyon gelişme riskini 3 kat (95%CI:1.19-7.56) arttırdığı belirtilmiştir. Sigaranın servikal premalign lezyon oluşumunda kofaktör olduğu bilinmektedir (82). Mevcut çalışmada sigara ve HPV ilişkisini değerlendirmek açısından sigara içen hasta sayısı yeterli değildi. Mevcut çalışmada HPV yüksek riskli beş hastada OKS kullanım öyküsü mevcutken, HPV negatif-düşük riskli hastalardan üçünde OKS kullanım öyküsü mevcuttu. İki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0.05$) ve OKS kullanımı ile yüksek riskli HPV arasında önemli bir ilişki tespit edilememiştir. Bosch ve arkadaşlarına göre 5 yıldan az OKS kullanımı servikal kanserle ilişkili değildi (OR:0.77,95%CI=0.46-1.25). 5-9 yıl arasında OKS kullanımının (OR:2.72,95%CI=1.36-5.46) ve 10 yıl OKS

kullanımının (OR:4.48;95Cl:2.24-9.36) servikal kanser riskini arttırdığını bildirmişlerdir (83). Bu konuda yeni çalışmalar yapılması uygun olabilir.

Diğer bir sosyo-demografik verilere baktığımızda mevcut çalışmada HPV yüksek riskli hastaların parite median değeri bir iken HPV negatif-düşük riskli hastaların parite median değeri iki saptanmıştır. HPV yüksek riskli olan grupta parite sayısı HPV negatif-düşük olan gruptan anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha düşüktü. 2006'da Appleby ve ark tarafından yapılan bir çalışmada da HPV DNA (+)'liği ile parite arasında anlamlı ilişki tesbit edilmemiştir (84). Cai B. ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada ise HPV DNA(+) hastalarda parite sayısının artmasının atipik transformasyona yol açacağı tespit edilmiştir (85). Güncel literatür bilgisiyle mevcut çalışma karşılaştırıldığında HPV DNA pozitifliği ile parite ilişkisinin bulgularımızla uyumlu olmadığı gözlenmiştir. Bu farklılığın oluşması paritenin tek başına HPV pozitifliği persistansında etken olmayabileceğini ve ek faktörlerin rol oynayabileceğini düşündürmektedir.

İmmünoterapötik yaklaşımlar servikal kanserin kontrolünde önem teşkil etmektedir ve TLR araştırmaları bu konuda önemlidir. TLR' ler interlökin ailesinin önemli bir üyesidir ve virüs, bakteri ve diğer patojenlere karşı immün sistemin oluşumunda görev alan transmembran proteinleridir. TLR' ler tümörlü hücrelerde eksprese olurlar ve patojenlere karşı doğal immüniteyi aktifleştirerek tümörün gelişiminde etkin rol oynarlar (86).

Mevcut çalışmada TLR ekspresyonu serviks dokusunda gösterilmiştir. Çalışmada TLR 4 ve TLR 9 ekspresyonu ile HPV pozitiflik arasında fark saptanmamıştır. Her ne kadar istatistiksel olarak anlamlı olmasa da HPV pozitif olan hastalar negatif olanlara göre daha fazla TLR 5 boyanma eğilimi göstermiştir. TLR 9 ilk boyamada dokuda gösterilemese de LEEP sonrası alınan biyopsilerde yüksek riskli HPV pozitif grupta % 17.4 oranında TLR 9 boyanması mevcuttur. LEEP sonrası kontrolde de benzer şekilde HPV negatif ve pozitif gruplar arasında TLR boyanması açısından fark izlenmemiştir.

TLR serviks kanseri ilişkisi ile alakalı mevcut literatürde farklı bulgulara rastlanmaktadır. Yapılan çalışmalarda TLR 4 gen ekspresyonunun servikal karsinoması olan hastalarda normal sitolojideki hastalara göre belirgin olarak

baskılandığı görülmüştür (87). Yu ve ark. serviks kanserinin progresyonunda TLR 4 ekspresyonunun azaldığını görmüşlerdir (88). TLR 4 ekspresyonunun servikal kanserlerde azaldığı başka çalışmalarda da gösterilmiştir (88,89). Fakat Hasimu ve ark. yaptığı çalışmalarda ise TLR 4,TLR 7 ve TLR 9 seviyelerinin CIN ve servikal SCC ‘de normal serviks dokusuna göre daha fazla olduğunu göstermişlerdir (90). Lee ve ark. yaptığı bir çalışmada ise TLR 5 ve 9’ un düşük dereceli CIN ‘den yüksek dereceli CIN’ e, oradan da invaziv skuamoz hücreli karsinoma ilerlerken ekspresyonun kademeli olarak arttığı gösterilmiştir (60). Kim ve ark. TLR 5 ekspresyonunun normal servikal skuamoz epitelde immünohistokimyasal boyamayla belirlenemediğini (%80) veya zayıf boyandığını (% 20) göstermiştir. Buna rağmen %33.3 düşük dereceli CIN ,%41.7 yüksek dereceli CIN ve %45.8 invaziv skuamoz hücreli karsinomda ise orta düzeyde ekspresyon olduğu gösterilmiştir. %33.3 yüksek dereceli CIN ve %50 invaziv kanserde güçlü ekspresyon olduğu gösterilmiştir (61). TLR 4 ve TLR 5 genel olarak normal serviks dokusunda bulunmazken TLR 5 ekspresyonunun yüksek dereceli servikal displazi ve invaziv kanserlerde fazla miktarda olduğu görülmüştür. Sonuç olarak TLR’ ler tümör mikro çevresindeki inflamatuvar cevabı ve hücre sağ kalımını arttırmalar. Jinekolojik kanserlerde kritik immünomodülatör olarak görev alırlar.

TLR 9 intraselüler olarak görev alan bir immün sistem elemanıdır. TLR 9 endosomlarda yerleşmiştir ve viral nükleik asitlerin tanınmasında rol oynar. Yapılan bir çalışmada TLR 9 ekspresyonunun kondilomdan CIN 1-2-3 ve invaziv skuamoz hücreli kansere doğru gittikçe arttığı bulunmuştur. Meksikalı kadınlar üzerinde yapılan bir çalışmada CIN lezyonu olan hastalarda servikal kanserin başlangıcında TLR 9 ekspresyonunda azalma olması önemli bir basamaktır (91). Ayrıca başka çalışmalarda da HPV’ nin immün sistem tarafından eradikasyonunu takiben TLR 9 ekspresyonunda artış olduğu bulunmuştur (67).

Fehri ve ark. yaptığı bir çalışmada TLR 9 ekspresyonu normal doku örnekleriyle karşılaştırıldığında CIN 1 vakalarında anlamlı derecede artış yokken, CIN 2 vakaları ile karşılaştırıldığında TLR 9 ekspresyonunda artış izlenmiştir. CIN 3 vakaların çoğunda anlamlı derecede orta yoğunlukta boyama, skuamoz hücreli karsinomlu hastalarda ise yüksek yoğunlukta boyanma izlenmiştir (92). Agarwal ve ark. yaptıkları bir çalışmada ise skuamoz hücreli karsinomlu

hastalarda TLR 9 ekspresyonu hafif derece yüksek izlenmiştir fakat normal doku örnekleriyle karşılaştırıldığında anlamlı derecede bir farklılık izlenmemiştir (87).

Mark ve ark. yaptığı çalışmada ise yüksek seviyede TLR ekspresyonunun HPV 16'nın temizlenmesiyle ilişkili olduğu görülmüştür. TLR'lerin HPV'nin kontrolünde primer rol aldığı ortaya konulmuştur. Bu bağlantı temel olarak E6 spesifik efektör cevabına bağlıdır (93). Hasan ve ark. yaptığı bir çalışma HPV 16'nın E6 ve E7 proteinlerinin TLR 9 transkripsiyonunu azaltabildiğini göstermiştir. Yeni bulunan diğer bir bilgi de HPV 16 E7 inhibitör nükleer faktör kappa-B kompleksini östrojen reseptör alfa ile aktive ederek TLR 9 transkripsiyonunu baskılamakta ve interferon cevabını engellemektedir (94).

Daud ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada HPV ve TLR ekspresyonu arasındaki ilişki incelenmiş ve persistan HPV 16 enfeksiyonu olan hastalarda HPV eradikasyonu izlenen hastalara göre daha çok TLR ekspresyonu olduğu ortaya konulmuştur. TLR 4 hariç bütün TLR'ler (TLR 2, 3, 7, 8, 9) için TLR ekspresyonu persistan HPV 16'da HPV 16 eradikasyonu olan hastalara göre daha fazla izlenmiştir. Fakat bu fark HPV 51'de saptanmamıştır. Bu fark için kondom kullanımı, seksüel partner sayısı ve OKS kullanımı ve genital enfeksiyon yönünden hastalar sorgulanmış ve bunların prognozu etkilediğine dair bir veri bulunamamıştır (67). Mevcut çalışmada ise her ne kadar istatistiksel olarak anlamlı olmasa da HPV pozitif olan hastalar negatif olanlara göre daha fazla TLR 5 boyanma eğilimi göstermiştir.

Mevcut çalışmada multiple HPV enfeksiyonu ile TLR arasındaki ilişkiyi incelediğimizde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da multiple HPV tipiyle enfekte hastalarda LEEP sonrası TLR 4 boyanması daha fazla izlenmiştir. Daud ve ark. yaptığı bir çalışmada ise multiple HPV enfeksiyonu ile TLR ilişkisi saptanamamıştır (67).

Farklı tipteki TLR'ler ile farklı kanserler arasındaki ilişki klinik çalışmalara konu olmaktadır. Bazı yazarlar TLR'lerin tümör progresyonunda rol oynadığını göstermişlerdir. Ösefagus skuamöz hücreli karsinom (95), pankreatik karsinogenez (96), kolorektal kanserler (97), meme kanseri (98), gliom (99).

Buna karşılık olarak TLR 9 ve TLR 3' ün gliom (100) ve kronik lösemi (101) hastalarında koruyucu etkisi olabileceği bazı çalışmalarda gösterilmiştir. TLR oluşum mekanizmaları kullanılarak TLR ve inflamasyon oluşumu arasındaki ilişki ortaya konulabilir, bu sayede kanser tedavisinde immünoadjuvan olarak ve kombine immünoterapi tedavilerinde kullanılabilir (102,103,104).

Çalışmamızın kısıtlılıklarına baktığımızda en başta hasta sayısının az olması ile beraber takip süresinin sınırlı olması ve sonuçlara etki edebilecek nüks hasta sayısının az olmasıdır. Çalışmamızın gücünü arttıran faktörler ise prospektif bir çalışma olmasının yanında hasta populasyonunun homojen olması, prognoza etki edebilecek faktörlerin çalışmaya dahil edilmesi ve HPV takipleri için birden çok immünohistokimyasal markerların kullanılmasıdır.

Sonuç olarak LEEP işlemi sonrasında HPV eradikasyonu artmaktadır. Serviks dokusunda ve servikal intraepitelyal karsinogenez sürecinde TLR ekspresyonu izlenmektedir. LEEP sonrası TLR ekspresyonunda herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir. LEEP işleminin doğal immünite markerı olan TLR ile ilişkisi bulunmamaktadır. LEEP her ne kadar HPV eradikasyonunda rol alsada en azından bu etkisini TLR üzerinden göstermemektedir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

- Serviks dokusunda ve Servikal intraepitelyal süreçte TLR 4, 5, 9 reseptörü eksprese edilmektedir.
- LEEP sonrası HPV pozitiflik oranı takiplerde azalmaktadır.
- Her ne kadar istatistiksel olarak anlamlı olmasa da HPV pozitif olan hastalar negatif olanlara göre daha fazla TLR 5 boyanma eğilimi göstermiştir.
- Her ne kadar istatistiksel olarak anlamlı olmasa da multiple HPV varlığında LEEP işlemi sonrası serviks dokusunda TLR 4 boyanması daha fazla izlenmiştir.

7. ÖZET

HSIL sebebiyle LEEP işlemi yapılan hastalarda LEEP işleminin HPV eradikasyonundaki etkisi ve HSIL sebebiyle LEEP yapılan hastalarda immün cevabın oluşmasında ve HPV eradikasyonunda Toll Like Reseptörlerin oynadığı rol araştırıldı. Şubat 2016 – Aralık 2016 tarihleri arasında, Akdeniz Üniversitesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Jinekoloji bölümüne sitolojik anormallik nedeniyle başvuran 30 olgu araştırma kapsamına alındı. Hastaların LEEP materyalinden çalışılan HPV tiplendirmesi yedi HPV negatif veya düşük riskli HPV tipi (% 23.3), 23 yüksek riskli HPV tipi (% 76.7) idi. Hastaların 6. ay HPV Tarama sonuçları; 24 HPV tarama negatif (% 80), altı HPV tarama pozitif (% 20) idi. LEEP öncesi ve LEEP sonrası 6. Ayda serviks dokuları TLR 4, 5, 9 kitleri ile boyandı. Her ne kadar istatistiksel olarak anlamlı olmasa da HPV pozitif olan hastalar negatif olanlara göre daha fazla TLR 5 boyanma eğilimi göstermiştir. Sonuç olarak LEEP işlemi sonrasında HPV eradikasyonu artmaktadır. Serviks dokusunda ve servikal intraepitelyal karsinogenez sürecinde TLR ekspresyonu izlenmektedir.

Anahtar Kelimeler: LEEP, HSIL, Yüksek Riskli HPV, Toll Like Reseptörler

8. ABSTRACT

The effect of LEEP on HPV eradication in patients undergoing LEEP due to HSIL and the role of Toll Like Receptors in the development of immunological response and HPV eradication in patients with LEEP due to HSIL were investigated. Between February 2016 and December 2016, 30 patients who were admitted to Obstetrics and Gynecology Department of Akdeniz University for cytological abnormality were included in the study. On the LEEP material of the patients, seven of them were HPV negative or low-risk HPV type (23.3%) and 23 of them were high-risk HPV type (76.7%). HPV screening results of the patients at 6 months; 24 HPV screening was negative (80%) and six HPV screening was positive (20%). Cervical tissues were stained with TLR 4, 5, 9 kits before LEEP and at 6 months after the LEEP. Although not statistically significant, HPV positive patients showed more TLR 5 staining tendency than negative ones. As a result, HPV eradication increases after LEEP treatment. TLR expression is observed in cervical tissue and cervical intraepithelial carcinogenesis.

Keywords: LEEP, HSIL, High Risk HPV, Toll Like Receptors

9. KAYNAKLAR

1. Cervical cancer. Estimated incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012. http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx (Accessed on March 18, 2015).
2. Quinn M, Babb P, Jones J, Allen E. Effect of screening on incidence of and mortality from cancer of cervix in England: evaluation based on routinely collected statistics. *BMJ* 1999; 318:904.
3. Willoughby BJ, Faulkner K, Stamp EC, Whitaker CJ. A descriptive study of the decline in cervical screening coverage rates in the North East and Yorkshire and the Humber regions of the UK from 1995 to 2005. *J Public Health (Oxf)* 2006; 28: 355.
4. Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 2015; 65: 87.
5. WHO/ICO Information Center of HPV and Cervical Cancer (HPV Information Center). Human Papillomavirus and Related Cancers in the World. Summary Report 2010. <http://www.who.int/hpvcentre/en/> (Accessed on September 19, 2011).
6. Siegel R, Ward E, Brawley O, Jemal A. Cancer statistics, 2011: The impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths. *CA Cancer J Clin* 2011; 61: 212.
7. Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 2015; 65: 87.
8. Zemheri E, Koyuncuer A. Servikal kanserlerin erken tanısında pap testinin önemi. *Sürekli Tıp Eğitimi Dergisi*, 14(1), 2005.
9. Türkiye kanser istatistikleri. Ed. Gültekin M, Boztaş G. s. 19-42. T.C.Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, 2014.
10. <http://kanser.gov.tr/daire-faaliyetleri/kanser-istatistikleri/2106-2014-y%C4%B1l%C4%B1-t%C3%BCrkiye-kanser-istatistikleri.html>
11. Ferlay J, Autier P, Boniol M. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Ann Oncol* 2007;18:581–92.7
12. Löning M, Gissmann L, Diedrich K, et al. Human papillomavirus and cervicalcancer. *Dtsch Arztebl*, 2007; 104:2806-10.

13. Arvas M, Gezer A, Genital HPV, 1.Baskı, İstanbul Medical Yayıncılık, 2007, 1-128.
14. Garcea RL, Di Maio D. The Papillomaviruses. 2007; Springer Science Business Media, LLC.9.
15. Hausen ZH. Papillomaviruses in the causation of human cancers a brief historical account. *Virology*, 2009;384: 260–65.
16. Malisic E. Human Papillomaviruses: from discovery to vaccine. *International Journal of Cancer Research and Diagnosis*, 2013;1:1.
17. Asiaf A, Ahmad ST, Mohammad SO and Zargar MA: Review of the current knowledge on the epidemiology, pathogenesis and prevention of human papillomavirus infection. *Eur J Cancer Prev* 23: 206-224, 2014
18. Venuti A, Paolini F, Nasir L, et al: Papillomavirus E5: the smallest oncoprotein with many functions. *Mol Cancer* 10: 140, 2011.
19. Campo MS, Graham SV, Cortese MS, et al: HPV-16 E5 down-regulates expression of surface HLA class I and reduces recognition by CD8 T cells. *Virology* 407: 137-142, 2010
20. Faridi R, Zahra A, Khan K and Idrees M: Oncogenic potential of human papillomavirus (HPV) and its relation with cervical cancer. *Virol J* 8: 269, 2011
21. Munoz, N., vd. (2003), Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer, *N Engl J Med*, 348:518-27.
22. Yang R, Yutzy WH 4th, Viscidi RP, Roden RB, J. Biol Chem, Interaction of L2 with beta-actin directs intracellular transport of papillomavirüs and infection 2003;278(14):12546
23. Yang R, Day PM, Yutzy WH 4th, Lin KY, Hung CF, Roden RB, J. Virol, Cell surface-binding motifs of L2 that facilitate papillomavirüs infection, 2003;77(6):3531
24. Stoler, M. H. : Human papilloma viruses and cervical neoplasia: a model for carcinogenesis, *Int J Gynecol Pathol.*, 19, 16-28, 2000
25. [www.cdc.gov/std/hpv/HPV Information for Clinicians Papillomavirus:](http://www.cdc.gov/std/hpv/HPV%20Information%20for%20Clinicians%20Papillomavirus%20.pdf)
HPV information for Clinicians. Centers for Disease Control and Prevention. April 2007

26. Bosch, F. X., Iftner, T., Sheffield, U. K.: The etiology of cervical cancer. NHS Cervical Screening Programme, 2005.
27. Castellsagu X. An update on oral Human papillomavirus infection natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer. *Gynecologic Oncology*, 2008;110:4–7.
28. Doorbar J,. Molecular Biology Of Human Papillomavirus İnfection And Cervical Cancer, Clin Science, London, 2006; 110:5:525-41.
29. Bosch FX, Lorincz A, Munoz N, Meijer CJ, Shah KV. The cWiner RL, Hughes JP, Feng Q, O'Reilly S, Kiviat NB, Holmes KK, Koutsky LA. “Condom use and the risk of genital human papillomavirus infection in young women.” *N Engl J Med*. 2006 Jun 22;354(25):2645-54.
30. DeFrancesco M, Gargiolo F, Ciravolo G, Salinaro F, Manca N. Detection and genotyping of human papillomavirus in cervical samples from Italian patients. *J Med Virol* 2005;75:588-92.
31. F X Bosch¹, A Lorincz², N Muñoz³, C J L M Meijer⁴, K V Shah⁵.The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol* 2002;55:244-65.
32. SanjoséS, Diaz M, CastellsaguéX, Clifford G, Bruni L, Muñoz N, Bosch FX Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis.*Lancet Infect Dis*. 2007;7(7):453
33. Camcıoğlu Y. Adolesan çağında yeni bir aşı; human papillomavirus aşısı. İ.U. Cerrahpaşa Tıp Fakultesi Surekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri. Adolesan Sağlığı 2; 117- 124, Mart 2008.
34. Wright TC Jr, Schiffman M. Adding a test for human papillomavirus DNA to cervical-cancer screening. ,*N Engl J Med*. 2003;348(6):489
35. Bernard HU, Burk RD, Chen Z, et al: Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology* 401: 70-79, 2010
36. Munoz, N., Castellsague, X., DE Gonzalez, A.B., Gissmann, L.:Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer, Vaccine, 24, 1-10, 2006.

37. Stoler M. The Impact of Human Papillomavirus Biology on the Clinical Practise of Cervical Pathology. *Pathology Case Reviews* 2005;10(3):119-127.
38. Smith JS, Lindsay L, Hoots B, et al: Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: A meta-analysis update. *Int J Cancer* 121: 621-632, 2007
39. Screening for cancer: advice for high-value care from the American College of Physicians. Wilt TJ, Harris RP, Qaseem A, High Value Care Task Force of the American College of Physicians *Ann Intern Med.* 2015;162(10):718. Sarah Feldman, MD, MPHAnnekathryn Goodman, MDJeffrey F Peipert, MD, PhD
40. Atasü T, Aydın K. Jinekolojik Onkoloji; 2. baskı,1999 (sf 178-259).
41. Solomon D, Davey D, Kurman R, et al. The 2001 Bethesda system: terminology for reporting results of cervical cytology, *JAMA* 2002; 24;287:2114-9.
42. The 1988 Bethesda system for reporting cervical / vaginal cytological diagnoses. National Cancer Institute Workshop. *JAMA* 1989;262:931
43. Cantor SB,Cardenas-turan M,Cox DD,Atkinson EN,Nogueras-Gonzalez GM,Beck JR,Follen M, Benedet JL Accuracy of colposcopy in the diagnostic setting compared with the screening setting *Obstet;Gynecol.*2008;111(1);7
44. Buckley CH, Butler EB, Fox H: Cervical intraepithelial neoplasia. Review article, *J.clin Pathol* 1982 April; 35(4):478
45. Waxman AG, Chelmow D, Darragh TM, et al. Revised terminology for cervical histopathology and its implications for management of high grade squamous intraepithelial lesions of the cervix. *Obstet Gynecol* 2012;120:1465.
46. Darragh TM, Colgan TJ, Thomas Cox J, et al. The Lower anogenital squamous terminology standardization project for HPV-associated lesions: background and consensus recommendations from the college of American Pathologists and the American Society for Colposcopy and Cervical Pathology. *Int J Gynecol Pathol* 2013;32:76.
47. Robbins ve Cotran. Temel patoloji. Kadın genital sistemi ve meme. 6.baskı. Nobel Tıp Kitabevleri; 2000. 604-5.
48. L. Stewart Massad, MD, Mark H. Einstein, MD, Warner K. Huh, MD, Hormuzd A. Katki, PhD, Walter K. Kinney, MD, Mark Schiffman, MD, Diane

Solomon, MD, Nicolas Wentzensen, MD, and Herschel W. Lawson, MD, for the 2012 ASCCP Consensus Guidelines Conference 2012 Updated Consensus Guidelines for the Management of Abnormal Cervical Cancer Screening Tests and Cancer Precursors

49. ACOG Practice Bulletin number 66, September 2005. Management of abnormal cervical cytology and histology. *Obstet Gynecol* 2005; 106: 645–664,

50. Anderson ES, Thorup K, Larsen G. Results of cryosurgery for cervical intraepithelial neoplasia. *Gynecol Oncol* 1988;30:21–5.

51. Burke L. The use of the carbon dioxide laser in the therapy of cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Obstet Gynecol* 1982;144: 337–40.

52. Himanshu Kumar, Taro Kawai, Shizuo Akira Toll-like receptors and innate immunity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2009;388: 621–625.

53. C.A. Janeway Jr., R. Medzhitov, Innate immune recognition, *Annu. Rev. Immunol* 2002;20: 197–216

54. S. Akira, S. Uematsu, O. Takeuchi, Pathogen recognition and innate immunity, *Cell* 2006;124: 783–801

55. R. Medzhitov, Recognition of microorganisms and activation of the immune response, *Nature* 2007;449: 819–826

56. Cario E. Bacterial interactions with cells of the intestinal mucosa: Toll-like receptors and NOD2. *Gut* 2005;54: 1182–93

57. Muzio M, Bosisio D, Polentarutti N, et al. Differential expression and regulation of Toll-like receptors (TLR) in human leucocytes: selective expression of TLR-3 in dendritic cells. *J Immunol* 2000; 164:5998–6004

58. Tapping RI, Akashi S, Miyake K, et al. Toll-like receptor 4, but not Toll-like receptor 2 is a signalling receptor for Escherichia and Salmonella lipopolysaccharides. *J Immunol* 2000; 165:5780–7.

59. Tahara T, Arisawa T, Wang F, Shibata T, Nakamura M, Sakata M, et al. Toll-like receptor 2 –196 to 174del polymorphism influences the susceptibility of Japanese people to gastric cancer. *Cancer Sci* 2007;98: 1790–94.

60. Lee JW, Choi JJ, Seo ES, Kim MJ, Kim WY, Choi CH, et al. Increased

toll-like receptor 9 expression in cervical neoplasia. *Mol Carcinog* 2007; 46:941–47

61. Kim WY, Lee JW, Choi JJ, Choi CH, Kim TJ, Kim BG, et al. Increased expression of toll-like receptor 5 during progression of cervical neoplasia. *Int J Gynecol Cancer* 2008;18:300–5.

62. Rock FL, Hardiman G, Timans JC, Kastelein RA, Bazan JF. A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95: 588- 93.

63. Metzhitov R, Janeway C Jr. Innate Immunity. *N Engl J Med* 2000;343: 338-44.

64. Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, et al. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 2001; 410:1099-103.

65. Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, et al. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 2000; 408:740-5.

66. Wallboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Munoz N, J. Pathol Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide 1999;189(1) 12

67. Ibrahim I. Daud^{1,4,5}, Mark E. Scott², Yifei Ma², Stephen Shiboski³, Sepideh Farhat², and Anna-Barbara Moscicki² Association between Toll-like Receptors expression and Human Papillomavirus Type 16 Persistence *Int J Cancer*. 2011 February 15; 128(4): 879–886. doi:10.1002/ijc.25400.

68. Wright TC. Massad LS, Dunton CS, Spitzer M, Wilkinson E, Solomon D. Consensus guidelines for the management of woman with cervical intraepithelial neoplasia or adenocarcinoma in-situ. *J Low Tract Dis* 2007;114:223-239

69. Onan MA, Taskiran C, Bozdayi G, Biri A, Erdem O, Acar A, Gunaydin G, Rota S, Ataoglu O, Guner H. Assessment of human papilloma viral load of archival cervical intraepithelial neoplasia by real-time polymerase chain reaction in a Turkish population. *Eur J Gynaecol Oncol*. 2005;26(6):632-5

70. Ozsaran AA, Dikmen Y, Akercan F, Zekioglu O, Terek MC, Mgoyi L, Altuglu I. The triage of squamous cell abnormalities of cervical cytology by human papilloma virus screening. *Eur J Gynaecol Oncol.* 2003;24(6):535-8
71. Rodriguez –Manfredi A, Alonso I, del pitno M, Fuste P, Torne A. Predictors of absence of cervical intraepithelial neoplasia in the conization specimen *J. Gynecol Oncol.* 2013;128(2):271-6
72. Kang WD, Oh MJ, Kim SM, Nam JH, Park CS, Chot HS Significance of human papillomavirus genotyping with high grade cervical intraepithelial neoplasia treated by a loop electrosurgical procedure *J. Obstet Gynecol* 2010;203(1) 72
73. Venturoli S, Ambretti S, Cricca M, Leo E, Costa S, Musiani M, Zerbini M., Correlation of High-Risk Human Papillomavirus Genotypes Persistence and Risk of Residual or Recurrent Cervical Disease After Surgical Treatment, *J Med Virol.* 2008 Aug;80(8):1434-40
74. Prato B, Ghelardi A, Gadducci A, Marchetti I, Di Cristofano C, Di Coscio G, Bevilacqua G, Genazzani AR. Correlation of recurrence rates and times with posttreatment human papillomavirus status in patients treated with loop electrosurgical excision procedure conization for cervical squamous intraepithelial lesions *Int J Gynecol Cancer* 2008, 18, 90–94
75. Wud, Zheng Y, Chen W, Guo C, Yul, Chan G, et al. prediction of residual /recurrent disease by HPV Genotype after loop excision procedure for high grade cervical intraepithelial neoplasia. With negative margins *Aust New Zeland of Obstetrics and Gynecology* 2011;51:114-118
76. Guan et al. Human papillomavirus types in 115,789 HPV-positive women: A meta-analysis from cervical infection to cancer *Int. J. Cancer:* (2012) VC 2012 UICC
77. Angel C, Mei-Shan J, Chu-Chun H, Huei-Jean H et. al., Human papillomavirus genotype in cervical intraepithelial neoplasia grades 2 and 3 of Taiwanese women *Int. J. Cancer:* 128, 653–659 (2011) VC 2010 UICC.
78. Eren H, Özgüneş N, Bayram Y ve ark. Serviksin prekanseröz lezyonlarında Human Papilloma Virus (HPV) tiplerinin belirlenmesi. *Van Tıp Dergisi* 2013;20:70-5.

79. Altun Z, Yarkin F, Vardar MA, Uğuz AH. Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'ne başvuran kadınlarda genital human papillomavirus prevalansı. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 2011;31: 307-14
80. Dursun P, Ayhan A, Mutlu L, et al. HPV types in Turkey: Multicenter hospital based evaluation of 6388 patients in Turkish Gynecologic Oncology Group Centers. *Türk Patoloji Derg* 2013;29:210-6
81. Trottier H, Eduardo L. The Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Vaccine* 24 S1(2006) S1/4-S1/S5
82. David C S, RajeEwan M S, Nisenbaum R, et.all. Epidemiologic and viral factors associated with cervical neoplasia in HPV 16 pozitive women. *International journal of cancer* 2005; volume 115, Issue 1, pg:114-120
83. Bosch X, Qiao Y L, Castellsaque X. The epidemiology of human papillomavirus infection and its association with cervical cancer. *International journal of gynecology and obstetrics*.(2006); 94.Suplement(1),pg8-21.
84. P Appleby, V Beral, A Berrington de González, D Colin, S Franceschi, J Green, C La Vecchia, J Peto, M Plummer, G Randi, S Sweetland.Cervical carcinoma and reproductive factors: collaborative reanalysis of individual data on 16,563 women with cervical carcinoma and 33,542 women without cervical carcinoma from 25 epidemiological studies. *International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer. Int J Cancer.* 2006 Sep 1;119(5):1108-24
85. Cai HB, Ding XH, Zhou YF, Lie DM. Risk factors for cervical cancer in China: a case-control study. *Eur J Gynaecol Oncol.* 2008;29(1):72-5
86. Yu L, Wang L, Chen S. (2013). Dual character of Toll-like receptor signalling: pro-tumorigenic effects and anti-tumor functions. *Bio Bio Acta*, 1835, 144-54
87. Ritu Aggarwal a, Sunayana Misra a, Charu Guleria a, Vanita Suri b, Navdeep Mangat a, Madhulika Sharma a,Raje Nijhawan c, Ranjana Minz a, Characterization of Toll-like receptor transcriptome in squamous cell carcinoma of cervix: A case–control study *Gynecologic Oncology* 138 (2015) 358–362

88. Yu L, Wang L, Li M, Zhong J, Wang Z, Chen S. Expression of toll-like receptor 4 is downregulated during progression of cervical neoplasia. *Cancer Immunol Immunother* 2010;59:1201–8.
89. J. Werner, C.A. Decarlo, N. Escott, I. Zehbe, M. Ulanova, Expression of integrins and Toll-like receptors in cervical cancer: effect of infectious agents, *Innate Immun.* 18 (2012) 55–69.
90. A. Hasimu, L. Ge, Q.Z. Li, R.P. Zhang, X. Guo, Expressions of Toll-like receptors 3, 4, 7, and 9 in cervical lesions and their correlation with HPV16 infection in Uighur women, *Chin. J. Cancer* 30 (2011) 344–350.
91. Moreno-Eutimio MA, Altamirano GA, Vargas-Hernández VM (2013). Expression of toll-like receptor 9 in cervical intraepithelial neoplasia from Mexican women. *J Cytol Histol*, 4, 4.
92. Emna Fehri^{1,2}, Emna Ennaifer^{1,2}, Monia Ardhaoui^{1,2}, Kaouther Ouerhani^{1,2}, Thalja Laassili^{1,2}, Rahima Bel Haj Rhouma¹, Ikram Guizani¹, Samir Boubaker² Expression of Toll-like Receptor 9 Increases with Progression of Cervical Neoplasia in Tunisian Women - A Comparative Analysis of Condyloma, Cervical Intraepithelial Neoplasia and Invasive Carcinoma *Asian Pac J Cancer Prev*, 15 (15), 6145-6150
93. Mark E. Scott, Yifei Ma, Sepideh Farhat and Anna-Barbara Moscicki Expression of nucleic acid-sensing Toll-like receptors predicts HPV16 clearance associated with an E6-directed cell-mediated response Department of Pediatrics, Division of Adolescent Medicine, School of Medicine, University of California, San Francisco, CA Accepted 25 Sep 2014;
94. Hasan UA, Zannetti C, Parroche P, et al. The human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein induces a transcriptional repressor complex on the Toll-like receptor 9 promoter. *J Exp Med* 2013;210:1369–87
95. Sheyhidin I, Nabi G, Hasim A, et al (2011). Overexpression of TLR3, TLR4, TLR7 and TLR9 in oesophageal squamous cell carcinoma. *World J Gastroenterol*, 17, 3745-51
96. Ochi A, Graffeo CS, Zambrinis CP, et al (2012). Toll-like receptor 7 regulates pancreatic carcinogenesis in mice and humans. *J Clin Invest*, 122, 4118-29.

97. Doan HQ, Bowen KA, Jackson LA, Evers BM (2009). Toll-like receptor 4 activation increases Akt phosphorylation in colon cancer cells. *Anticancer Res*, 29, 2473-78
98. Yang H, Zhou H, Feng P, et al (2010). Reduced expression of Toll-like receptor 4 inhibits human breast cancer cells proliferation and inflammatory cytokines secretion. *J Exp Clin Cancer Res*, 29, 92.
99. Wang C, Cao S, Yang Y, et al (2010). TLR9 expression in glioma tissues correlated to glioma progression and the prognosis of GBM patients. *BMC Cancer*, 10, 415
100. El andaloussi A, Sonabend AM, Han Y, Lesniak MS (2006). Stimulation of TLR9 with CpG ODN enhances apoptosis of glioma and prolongs the survival of mice with experimental brain tumors. *Glia*, 54, 526-35.
101. Spaner DE, Masellis A (2007). Toll like receptor agonists in the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, 21, 53-60.
102. Schmidt C (2006). Immune system's Toll-like receptors have good opportunity for cancer treatment. *J Natl Cancer Inst*, 98, 574-5.
103. Weng Y, Wang Y, Shi Y, et al (2011). TLR9 expression and its role in chemosensitivity to DDP in human cervical cancer cells *in vitro*. *Med Sci*, 31, 550-4.
104. Mason KA, Hunter NR (2012). CpG plus radiotherapy: a review of preclinical works leading to clinical trial. *Front Oncol*, 2, 1-6.