

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİMDALI

SERVİKAL ÖRNEKLERDE
KARSİNOJENİK HPV (HUMAN PAPİLLOMA VİRÜS) TİPLERİNİN
HİBRİT CAPTURE YÖNTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI VE
DİĞER PARAMETRELERLE KİYASLANMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

118440

Fatma KAYNAK

DANIŞMAN

Prof. Dr. Sevgi TÜRET

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM ENSTİTÜSÜ
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

ANKARA

2002

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın gerçekleşmesindeki büyük katkılarından dolayı Gazi Üniversitesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilimdalı'ndaki tüm değerli öğretim üyelerine ve danışman hocam Prof. Dr. Sevgi Türet'e; çalışmalarım sırasında bana büyük destek olan Dr. Ayla Aydın'a ve Gazi Üniversitesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilimdalı'ndaki diğer tüm asistanlara; yardımlarından dolayı, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum ABD ve Patoloji ABD'na; çalışmalarım süresince maddi ve manevi desteklerinden dolayı annem Aynur Kaynak, babam Salim Kaynak, kardeşim Gözde Kaynak'a ve sevgili Fatih Onurdağ'a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

1. Giriş ve Amaç.....	1
2. Genel Bilgiler.....	2
2.1. Tarihçe.....	2
2.2. Sınıflandırma.....	5
2.3. Virüsün Yapısı.....	7
2.4. Patogenez.....	13
2.5. Onkogeneze.....	14
2.6. Tanı Yöntemleri.....	19
2.6.1. Gözle Muayene.....	19
2.6.2. Kolposkopi.....	19
2.6.3. Pap-smear.....	20
2.6.4. Mikrobiyolojik Tanı Yöntemleri.....	20
2.6.4.1. HPV DNA Tahlili.....	20
2.6.4.1.1. Southern Blot Hibridizasyonu.....	21
2.6.4.1.2. Dot Blot Hibridizasyonu.....	21
2.6.4.1.3. Hibrit Capture DNA tahlili.....	22
2.6.4.1.4. In situ Hibridizasyon.....	23
2.6.4.1.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	23
2.7. Epidemiyoloji.....	24
3. Materyal-Metod.....	28
3.1. Materyal.....	28
3.1.1. Çalışma Grupları.....	28
3.2. Metod.....	29
3.2.1. Digene Hibrit Capture Sistemi ile HPV DNA Analizi.....	29
3.2.1.1. Ayıraç ve Materyaller.....	29
3.2.1.2. Ayıraç Hazırlama ve Saklama Koşulları.....	31
3.2.1.3. Örneklerin Toplanması ve Kullanımı.....	32
3.2.1.4. Testin Uygulanışı.....	33

4.	Bulgular.....	36
5.	Tartışma.....	41
6.	Özet.....	52
7.	Yabancı Dilde Özet	54
8.	Özgeçmiş.....	56
9.	Kaynaklar.....	57



TABLÖLER

Tablo.1. HPV erken ve geç genlerinin fonksiyonları	11
Tablo.2. İnsan Papilloma Virüslerinin ilişkili olduğu klinik tablolar	15
Tablo.3. HPV DNA'sı pozitif ve negatif olan kadınlarda yaş ortalaması	37
Tablo.4. HPV DNA'sı pozitif ve negatif olan kadınlarda ilk cinsel ilişki yaşı ortalaması	38
Tablo.5. HPV DNA'sı pozitif ve negatif olan kadınlarda gebelik sayısı ortalaması	39
Tablo.6. HPV DNA'sı pozitif ve negatif olan kadınlarda canlı doğum sayısı ortalaması	40
Tablo.7. HPV DNA'sı pozitif ve negatif olan kadınlarda abortus sayısı ortalaması	40

ŞEKİLLER

Şekil.1. İnsan papilloma virüsünün elektron mikroskobik görüntüsü.	8
Şekil.2. İnsan Papilloma Virüsü tip-16'nın genomik organizasyonu	9
Şekil.3. Klinik örnekler, içindeki DNA 'nın korunacağı şekilde STM içinde laboratuvara ulaşır.....	32
Şekil.4. DNA'nın, kendine özgü RNA probu ile birleşip RNA:DNA hibriti meydana getirmesi	34
Şekil.5. RNA:DNA hibritlerinin yakalama tüplerinin dibindeki RNA:DNA hibritine-spesifik antikora tutunması	35
Şekil.6. Yakalama tüplerine tutunan RNA:DNA hibritlerine alkalin fosfatazın bağlanması	35
Şekil.7. Kemilümenesan substratın, alkalin fosfataza bağlanması	36

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Servikal kanser tüm dünyada, yılda 420.000 vaka ile kanser nedenleri ve kanser ölümleri bakımından ikinci sırada yer almakta ve bu vakaların %80'i gelişmekte olan ülkelerde meydana gelmektedir ¹⁻⁵. Genç kadınlarda servikal kanser riski artmaktadır ve son zamanlarda 40 yaş altı kadınlarda ölüme neden olan en büyük nedendir ⁶. Son yıllarda, İnsan Papilloma Virüsü (HPV) ile servikal displazi ve karsinomlar arasında, özellikle HPV 16, 18, 31 vb. gibi 20'den fazla özel tipin ilişkilendirildiğine ait bulgulara rastlanmaktadır ^{1, 3, 7-13}. Onkojenik HPV tipleri ile enfekte kişilerde, servikal kanser riski nedeniyle, servikal HPV tanısı ve tedavisi kanserden korunmada çok önemli bir hedef olmuştur ^{8, 14, 15}.

HPV'nin neden olduğu lezyonlar, viral proteinler ve ko-faktörlerin varlığında ve ancak immün sistem mekanizmaları bu etkiyi karşılayamayacak durumda ise kansere dönüşürler ¹⁶.

Servikal intraepitelyal neoplazi (CIN) ve kanserin sitolojik yöntemlerle tespiti birçok ülke tarafından yararlı bulunmuştur ². Son 50 yıl içinde pap-smear testlerinin kullanılmasıyla birlikte gelişmiş ülkelerde servikal kanser vakalarında %70 ve üzerinde azalma görülmüştür ¹ ancak pap-smear testinin özgüllüğü yüksek olmasına rağmen özellikle Yüksek dereceli servikointraepitelyal lezyon (HGSIL) ve karsinomlarda yanlış negatif oranı hala çok yüksektir (%20-40) ^{1, 2}. Sitolojik yöntemdeki hatalar; yetersiz örnek, kötü

preperasyon, mikroskopik incelemedeki hatalar ya da teşhis hatalarından kaynaklanmaktadır ². Bugüne kadar, HPV'nin in-vitro kültürü yapılamamıştır ve immünolojik testler de yetersizdir. Anogenital HPV enfeksiyonu ile ilgili indirekt kanıtlar, fiziksel muayene sonucu ve pap-smear ve biyopsi örneklerinde viral replikasyona bağlı olarak meydana gelmiş hücresel değişikliklerle elde edilmiştir ¹⁷. Fenotipik olarak da transformasyonun gözlenmesi için hücrelerin birçok jenerasyon geçirmesi gerekir. Serolojik analizler de kullanışlı olmadığından, HPV'nin varlığının gösterildiği testler kullanılır ya da sitoloji bu testlerle desteklenirse birçok avantaj elde edilir ⁷. Bunun için, HPV DNA'sının direkt varlığını göstermek için örnekler nükleik asit hibridizasyonu ile incelenebilir ¹⁷.

Bu çalışma, Gazi Üniversitesi Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarında rutin olarak kullanılan "Digene Hibrit Capture Sistemi-I HPV DNA analizi yöntemi" ile "pap-smear" sonuçlarını ve servikal örneklerde karsinojenik tip (16,18,31,33,35,45,51,52,56) HPV DNA'sı pozitif olarak bulunmuş kadınlarla negatif olanları, bazı özellikleri bakımından karşılaştırmak amacıyla planlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. TARİHÇE

İnsan Papilloma Virüsleri, omurgalı hayvanlarla birlikte evrim geçirmiştir ve tüm

omurgalılarda siğil görülür ¹⁸. Cinsel yolla bulaşan, sifiliz ve gonore gibi başka hastalıklarla karıştırılmasına rağmen genital siğillerin klinik bir sorun olarak görülmesi ve tarihsel kaynaklarda yazılması M.S. 500'lere dayanır ¹⁹. Siğillerin varlığı ise daha önceleri antik Yunan ve Roma dönemlerinde bilinmektedir. "Kondiloma" terimi yunanca "incir benzeri" anlamına gelip bugün hala HPV ile ilgili genital siğilleri tanımlarken ve sifilizde kullanılmaktadır (kondiloma lata). Eski Yunanlılar ve Romalılar, homoseksüeller arasında "kondiloma" prevelansının yüksek olduğunu not etmiş ve bunu sekse açık olmaları ile ilişkilendirmişlerdir. Sifiliz ile "kondiloma lata" arasındaki ilişki 16.yy'da saptanmış ve 18.yy'ın sonlarına kadar genital siğiller de sifiliz ya da gonore ile ilişkili sanılmıştır. 20.yy'ın ilk yıllarında deri siğilleri ile genital siğillerin çok benzer oldukları saptanmış ve bu benzerlikten dolayı genital siğillerin zührevi özellikleri sorgulanmaya başlanmıştır ²⁰. 1907 yılında Ciuffo; siğil dokusundan alınan ve hücre içermeyen ekstraktı kullanarak insandan insana aktarımı göstermiş ve bir viral ajanın varlığından söz etmiştir ^{18, 19, 21}. 1930'da Shope "pamuk-kuyruk tavşan papilloma virüsü = CRPV" ile yaptığı çalışmada virüsü tümör oluşumu ile ilgili bulmuştur. Böylece ilk papilloma virüsü bir tavşan türünde saptanmıştır. Papilloma virüsü ile insan arasındaki ilişki ise ancak 10 yıl sonra bulunabilmiştir ^{16, 18, 20, 22, 23}. 1940'ların sonlarında hapisshanedeki mahkumlarla yapılan bir çalışmada, gönüllülere genital siğil ekstraktı enjekte edilmiş ve

enjeksiyon bölgesi etrafında bulaşmayı doğrular şekilde siğiller oluşmuştur ²⁰. HPV'nin seksüel rotası 1954'de kaydedilmiştir. Barrett ve arkadaşları, kocaları uzak doğudan döndükten 4-6 hafta sonra genital siğil şikayetiyle gelen 24 kadını bildirmişlerdir. Tüm kocalar uzakta iken başka kadınlarla cinsel ilişkide bulunduklarını kabul etmiş ve onların da penil siğilleri olduğu saptanmıştır ^{24, 25}. Bernald, 1974'de gezgin satıcıların ve denizcilerin eşlerinde servikal kanser gelişme oranının daha yüksek olduğunu ve bunun kocaların evden uzakta olduklarında aldıkları HPV enfeksiyonu sonucu meydana gelme ihtimali olduğunu belirtmiştir ²⁶. 1956'da Koss ve Durfee displazi varyantı olduğunu düşündükleri histolojik ve sitolojik değişikliklerden bahsetmiş, yaklaşık 20 yıl sonra Meisels ve Fortin tarafından bu değişiklikler HPV ile ilişkilendirilmiştir¹⁹. 1960'larda elektron mikroskobu ile genital siğillerde viral partiküller tespit edilmiş ve bu partiküllerin deridekilere çok benzediği saptanmıştır. Bundan sonra HPV'nin deri ve genital bölgedeki siğillerden sorumlu bir ajan olduğu kabul edilmiştir ^{18, 20}. Çok uzun bir süre araştırmacılar, 1 viral tipin değişik viral genomların ekspresyonu ile değişik klinik görüntüler oluşturduğunu düşünmüşlerdir. Moleküler tekniklerin gelişmesiyle bu fikir çok sıkı bir incelemeye alınmıştır. Bugün, çok fazla çeşit gösteren klinik görünümelerde birçok HPV tipinin var olduğu bilinmektedir ¹⁹. HPV'nin kültürünün yapılamaması nedeniyle 1970'lerin ortalarında moleküler tekniklerin kullanılmaya başlanmasına kadar pek aşama

kaydedilememiştir. 1970'lerde modern biyolojinin gelişmesiyle birlikte papilloma virüs ailesinin moleküler yapısı ortaya çıkmaya başlamış ve birçok patolojik işlemde, lezyonla HPV'nin ilişkisini saptayabilmek için HPV genomunun klonları prob olarak kullanılmaya başlanmıştır. Böylece HPV'nin varlığının klinik örneklerde gösterilmesi mümkün olmuş ve virüsün zarar verme mekanizması ve patogenezi hakkında daha çok bilgi ortaya çıkmaya başlamıştır ^{16, 18, 25}. 1976 yılında ilk olarak Meisels, CIN ile HPV arasında bir ilişki olduğunu göstermiş, aynı yıl zur Hausen HPV'nin seksüel yolla bulaşan bir karsinojen olduğunu belirtmiştir ve o tarihten bu yana kadın genital sisteminin HPV ile ilişkili lezyonlarının CIN, karsinoma in-situ (CIS) ve invazif skuamöz hücre karsinomları ile ilişkili olduğu bilinmektedir ^{27, 28}. Bugün Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'nın bir ajansı olan Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (IARC) HPV enfeksiyonlarını, insanlar için, "karsinojenik (tip 16,18) ", "büyük olasılıkla karsinojenik (tip 31,33)" ve "muhtemelen karsinojenik (tip 6 ve 11 dışındaki diğer tipler)" olarak sınıflandırmaktadır ⁵.

2.2. SINIFLANDIRMA

İnsan Papilloma Virüsü, Papovaviridae ailesi içinde Papilloma Virüs genusunda yer alır ^{18, 24, 29, 30}. HPV'ler serotiplerine göre değil genotiplerine göre sınıflandırılmışlardır. Bugün yeni bir HPV tipi tanımlamak için bilinen HPV tipleri ile

karşılaştırıldığında seçilen genom bölgesindeki sekanslarda %10 farklılık bulunması gereklidir ¹⁸. Tüm tipler, epitelyotrofiktir ve hepsi kendine özgü, spesifik bir epitel tipini enfekte eder. Değişik tipler değişik tipte lezyonlarla ilişkilidir ve hepsinin onkojenik potansiyeli farklıdır ³⁰. Genel olarak kutanöz ve mukozatrofik gruplar vardır. Kutanöz grupta, genel olarak popülasyonda yaygın olan HPV'ler, örneğin plantar siğillerden sorumlu olan HPV-1, common-siğil yapan HPV-2 / HPV-4 ve 20'den fazla HPV tipi ile ilişkili olan "epidermoplasia verruciformis (EV)" yer alır. EV siğillerinin kansere dönüşenlerinin çoğu HPV-5 ve HPV-8 ile ilişkilidir. Mukozatrofik virüslerden 4'ü; HPV-6, HPV-11, HPV-16 ve HPV-18 düşük ve yüksek risk grupları için prototip oluşturur ve birlikte anogenital neoplazmaların 2/3'ünü oluştururlar. Değişik mukozal bölgelerde morfolojik olarak benzer lezyonlar meydana getiren virüsler genellikle aynı mukozal virüslerdir. Patolojik ve biyolojik olarak birbirine denk larengeal ve konjunktival papillomlar sıklıkla HPV-11 ve HPV-6 tarafından meydana gelir ¹⁸.

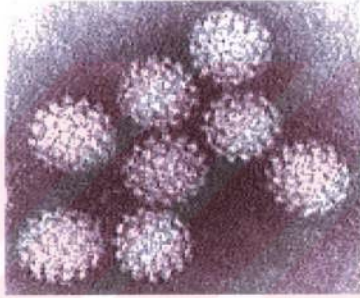
Bugün yaklaşık 100 HPV tipi sınıflandırılmış ve bunların 40-45'inin genital sistemi enfekte ettiği gösterilmiştir ^{4,31-33}. DNA sekans homolojisi HPV genotiplerinin sınıflandırılması açısından ana unsurdur³⁴. HPV tiplerinin çok azının DNA'sının konak hücre DNA'sına entegre olduğu bilinmektedir. Bu, entegrasyon özelliğine göre HPV'ler invazif kanser geliştirmeleri açısından düşük risk, orta dereceli risk ve yüksek risk tipler olarak 3 gruba

ayrılmışlardır^{27,29,34}. Bu gruplar, asemptomatik seyir, latent enfeksiyon, tipik karnabahar görünümlü lezyonlar (condylomata acuminata), displazi ve invazif kanser oluşumuna kadar geniş bir aralıkta enfeksiyon oluşturlar³⁵. Tip 6, 11, 42, 43 ve 44, benign genital lezyonlarda, düşük-dereceli servikal intraepitelyal lezyon (SIL)'de ve CIN I'de görülürler ve invazif karsinomda hemen hemen hiç rastlanmazlar^{1, 4, 7, 18, 29, 30, 32, 34, 36, 37}. Condyloma acuminata da HPV-6 ve HPV-11'in neden olduğu benign bir lezyondur. Ayrıca giant-condylomata ve larengeal papillomların da HPV-6 ve HPV-11 gibi düşük-risk grubu HPV'ler ile ilgili olduğu düşünülmektedir. Bu tip lezyonlarda HPV-6 ve HPV-11 görülme oranı %90'dır ve HPV-6 tespit edilme oranı HPV-11'e göre 3 kat daha fazladır^{18, 35, 36}. Orta dereceli risk tipleri; tip 18, 31, 33, 35, 51 ve 52'dir ancak yeterli problemler bugün bulunmadığı için bu tiplerin moleküler epidemiyolojisi gelişmemiştir^{18, 34}. Yüksek-risk grubu HPV tipleri, HPV tip 16, 18, 31, 33, 45 ve 56'dır ve servikal intraepitelyal lezyonlar; CIN II ve CIN III ile servikal kanserlerde görülürler^{1, 4, 7, 29, 30, 32, 34, 36-38}.

2.3. VİRÜSÜN YAPISI

Tüm Papilloma Virüsler, 8000 baz çiftinden oluşan, çift iplikli çembersel DNA molekülüne sahiptirler^{20, 24, 30, 34, 39, 40}. Virüs partikülü, 52-55nm büyüklüğünde ve ısıya dayanıklı olup DNA içeriği 5.2 milyon daltondur^{26, 29, 34}. DNA, 72 kapsomerden oluşan ikozahedral bir kapsidle çevrelenmiştir^{19, 26, 29, 34, 40}.

Viral partikülün ağırlığının %80-90'ını bu kapsid proteinleri oluşturur. Kapsid proteinleri, majör ve minör olarak ikiye ayrılırlar. Majör kapsid proteinleri virüse antiijenik özellik kazandırır ve papilloma virüs antikorları hazırlanması bakımından ticari hedef teşkil ederler ^{24,19}. Papilloma virüsler zarfsız virüslerdir ve nükleusta replike olurlar ^{18, 20, 24, 29}.

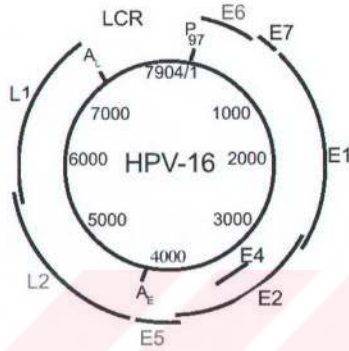


Şekil 1. İnsan papilloma virüsünün elektron mikroskopik görüntüsü.

Genomları, proteinlerin kodlanmasında görev alan Open reading frame (ORF) ve virüsün yaşamında düzenleyici fonksiyonları yürüten upstream regulatory region (URR) bölgelerinden oluşur ^{24, 25, 26, 40}.

URR, DNA replikasyonu için bir orijindir. mRNA sentezi için promotorlar ve transkripsiyonel enhancer sekanslar içerir ²⁴. ORF'ler ise enfeksiyonun geç ya da erken safhasında ifade edildiğine bağlı olarak erken (early) =E ve geç (late)= L ORF'ler olarak kısımlardan oluşur. Geç ORF'ler enfeksiyöz viral partiküllerin montajında kullanılan yapısal proteinlerin

sentezi ile ilgilidir. L₁ ve L₂ olarak bilinir ve minör ve majör kapsid proteinlerini kodlarlar ^{24, 26}.



Şekil 2. İnsan Papilloma Virüsü tip-16'nın genomik organizasyonu.

Erken ORF'ler E₁'den E₇'ye kadar numaralandırılır ve her numara farklı fonksiyonları kodlar. İnsanda E₃ ORF bulunmaz. Erken ORF'ler genel olarak viral replikasyon ve onkogenlerle ilgili proteinleri kodlarlar ^{24, 26}.

HPV, epitelin üst tabakalarına doğru farklılaşan hücre çekirdekleri içinde replike olmaktadır. Replikasyon sırasında önce erken sonra geç proteinler sentez edilir. Papilloma virüsler farklılaşan deri veya mukoza membran hücrelerinde replike olduklarından ve böyle bir sistem henüz in-vitro şartlarda kurulamadığından hücre kültürlerinde üretilemezler. Ancak replikasyon, deri organ kültür sistemlerinde gerçekleştirilebilmiştir ²¹.

Papilloma virüsler tarafından sentezlenen E₁ ve E₂ proteinleri viral replikasyon için gereklidir ⁴¹ .

HPV'ler konağa özgüdürler ve skuamöz epitel hücrelere kesin bir tropizm gösterirler. HPV enfeksiyonu sonucu çekirdeğe ulaşan yalnızca bir kısım virüs replikasyona gidebilir, bu da HPV enfeksiyonunun az sayıda hücre sayısı ile sınırlandırıldığını gösterir. HPV'ler genomlarını çoğaltmak için hücrel replikasyon modeline gereksinim gösterirler. Viral replikasyon, normalde büyümesi durmakta olan farklılaşmış keratinositlerle sınırlıdır. Bu yüzden HPV'ler normal hücre gelişmesini bozacak stratejiler geliştirmişlerdir⁴².

HPV replikasyonu 3 aşamada gerçekleşir. Başlangıç aşamasında viral genom plazmid şeklindedir ve kopya sayısı azdır. Bu aşamada skuamöz epitelin bazal hücrelerinde bulunur. Vejetatif aşamada, daha alt epitelin proliferen olan hücrelerinde hücre bölünmesinin her seferinde viral genom kopya sayısı biraz daha artar. Enfekte keratinosit terminal olarak farklılaşmaya giderken viral DNA vejetatif replikasyona girer ve enfekte hücre başına binlerce genom kopyası oluşur. Daha sonraki aşamada, viral kapsid proteinlerini kodlayan L genleri kodlanır ve virionlar oluşur ^{43, 44}.

Virüslerin bir araya toplanmasının bir parçası olarak virüs en azından kısmi bir farklılaşmaya gereksinim duyar. Bu nedenle farklılaşma meydana geldiği sırada enfekte hücrenin çekirdeği, S genomlarının replikasyonu için G1'den S fazına geçişi uyarmak zorundadırlar. Replikasyonun başarılı olarak sona ermesi

ve enfeksiyöz virüs partiküllerinin bir araya toplanma fazındadır ⁴⁵.

Tablo 1. HPV erken ve geç genlerinin fonksiyonları.

	FONKSİYON
E ₁	1. Ekstrakromozomal DNA replikasyonu ve viral siklusun tamamlanmasında görevli proteinleri kodlar. 2. Bu proteinler E₂ ürünleri ile birlikte çalışırlar ^{18,30}.
E ₂	1. URR ile ilişkili olan ve transkripsiyon üzerinde pozitif veya negatif etkisi olabilen majör transregülatör 2 proteini kodlar. Bu proteinler ekstrakromozomal DNA replikasyonu için gereklidir ve E₁ ürünleri ile birlikte çalışırlar. Tam protein (full-length), erken bölgenin transkripsiyonunu artırmak için DNA'ya URR'den bağlanır. Daha küçük olan protein erken bölgenin transkripsiyonunu inhibe eder ^{18, 19, 26, 30}. 2. E₂ proteini transkripsiyonel aktivasyon domaini olan bir amino domaini ve karboksi terminal DNA bağlayan domain olmak üzere 2 domain içerir. E₂'nin amino domaini viral siklusta 2 göreve sahiptir; hem viral gen ekspresyonunda transkripsiyonel bir regülatör olarak iş görür hem de E₁ ile etkileşerek E₁'in orijine bağlanmasını sağlar. E₂ bağlanma bölgeleri orijini çevrelemiştir. E₂ bu bölgelere bağlanıp E₁ ile etkileşerek E₁'i replikasyon orijinine doğru yönlendirir ⁴⁶.
E ₄	1. Virüsün matürasyonu ve replikasyonu açısından önemli bir proteindir 2. Yapısal proteinlerin sentezinden sorumlu olduğu düşünülmektedir ^{19,26,30}.

Tablo 1. HPV erken ve geç genlerinin fonksiyonları
(devam)

E ₅	1. EFR ve PDGF gibi büyüme faktörü reseptörlerinin de içinde bulunduğu değişik konak hücre membran proteinlerine bağlanan küçük bir proteini kodlar. 2. Enfekte hücrede hücre proliferasyonunu stimüle edebilir. 3. Viral entegrasyon sırasında E₅ ekspresyonu sıklıkla kaybedildiğinden karsinogenezdeki rolü halen tartışmalıdır ^{18,30,39}.
E ₆	1. Viral replikasyon, konak hücrenin ölümsüzleşmesi ve transformasyon için kritik bir proteindir. 2. HPV enfeksiyonunda en erken eksprese edilen genlerden biridir. 3. Servikal kanserlerdeki rolü, p53'e bağlanarak p53 seviyesini düşürmesi ile ilgilidir ^{18, 19, 24, 30, 39, 47}.
E ₇	1. Viral replikasyon, konak hücrenin ölümsüzleşmesi ve transformasyon için kritik bir proteindir. 2. Servikal kanserler açısından önemi RB'ye olan etkisi ve bununla ilişkili olan p107 ve p130 proteinleri ile ilgilidir ^{19, 24, 30, 39, 47}.
L ₁	1. Majör kapsid proteinlerini kodlar. 2. Majör kapsid proteinleri tüm HPV tiplerinde bulunur. Anti-HPV kapsid antikorları bu proteine karşı hazırlanmıştır ^{18, 19, 24, 26, 30, 40}.
L ₂	1. Minör kapsid proteinlerini kodlar. 2. Minör kapsid proteinleri tipe spesifiktir. Bu nedenle tipe spesifik antikorlar için antijen olarak kullanılır ^{18, 19, 24, 26, 30, 40}.

2.4. PATOGENEZ

Papilloma virüsler, deri ve mukoz membranların skuamöz epitel hücrelerini enfekte ederek ve replike olarak epitelyal proliferasyona yol açarlar. Sınırlı ve bütünlüğü bozulmamış bazal membrana sahip olan bu lokalize hiperplaziye "verruka" veya "papillom" adı verilir. Papillomların genellikle enfekte bir bazal hücrenin monoklonal çoğalması sonucu meydana geldiği düşünülmektedir ²¹. Bir papillomun oluşumu ise virüsün inokulasyonundan 6 hafta ile 2 yıl bir zaman süreci içinde gerçekleşmektedir ^{13, 40}. Enfeksiyon, bazal hücrelerin, örneğin bir travma sonrası enfeksiyöz virüs partikülleri ile karşılaşması ile ortaya çıkar ⁴⁰. Genital HPV enfeksiyonunun aşamaları başlıca 3 döneme ayrılır: Latent dönem, subklinik dönem ve klinik dönem. Latent dönemde hastalığın hiçbir bulgusu yoktur, yalnızca HPV DNA'sı gösterilebilir. Subklinik dönemde HPV'ye bağlı sitolojik mikroskobik değişiklikler veya kolposkopi gibi büyütme yöntemleri uygulanarak görülebilen lezyonlar mevcuttur. CIN'ler genelde bu döneme örnek teşkil eder. Genital kondilom ya da invazif kanser gibi gözle görülen lezyonların ya da semptomların bulunduğu dönem de klinik dönemdir. Enfeksiyon 3 hafta ila 8 ay arasında latent kalabilmektedir. Tüm bu dönemler aynı anda beraber bulunabileceği gibi birbirine geçiş de gösterebilir ²⁶.

Normal deride bulunan bütün lezyonlarda, bütün hücreler viral genomu içerir ancak, viral genlerin ekspresyonu hücrelerin farklılaşmasına bağlıdır. DNA replikasyonu ve erken genlerin ekspresyonu bazal hücrede olurken, geç gen ekspresyonu ve viral partikül sentezi keratinize tabakada gerçekleşir. Papillomun en yüzeysel tabakası olgun viral partikülleri içerdiğinden bu lezyonlar bulaşıcıdır. Hücrelerde sitoplazmik vakuolizasyon ile birlikte anormal nükleus varlığı (koilositoz) papillomavirüs enfeksiyonları bakımından tanımlayıcıdır ^{21, 26, 48, 49}. Viral enfeksiyon genellikle lokal kalır veya spontan olarak kaybolur, nadiren immün sistemi baskılanmış hastalarda yayılabilir. Papilloma virüsler epitelin bazal tabakasında kalıp daha sonra tekrarlayan enfeksiyonlara neden olabilirler ²¹.

2.5. ONKOGENEZ

Genetik zedelenmenin hedefini normalde hücre bölünmesini regüle eden regülatör genler oluşturur. Bunlar büyümeyi destekleyen-indükleyen protoonkogenler ve büyümeyi engelleyen-inhibe eden kanser baskılayıcı (tümör süpressör) genlerdir. Bunların dışında programlı hücre ölümünde rol oynayan genler de vardır ^{26, 50}.

Tablo 2. İnsan Papilloma Virüslerinin ilişkili olduğu klinik tablolar ²¹.

Klinik tablo	İnsan papilloma virüs tipi
DERİ	
Plantar verruka	1,49,60
Common verruka	2,4
Flat verruka	3,10,26-29,41
	5,8,9,12,14,15,17,19-
	25,36,46,47,50
Butcher's verruka	7
Kutanöz skuamöz hücreli kanser	41,48
Oral kavite ve baş-boyun tümörleri	
Larengeal papillom	6,11
Larengeal karsinom	30
Oral papillom	6,7,11,32,34,55,69,72,73
Konjunktival papillom	11
Oral, fokal epitelyal hiperplazi	13,32
Dudakta verruka	2,57
Osefagial papillom	45
Osefagial skuamöz hücreli kanser	73
Anogenital	
Condyloma accuminatum	
Eksofitik condiloma	6,11
Flat condyloma	6,11,16,18,31,54,70
Bovenoid papillozis	16,34,55
Giant condylom	6,11
<u>Servikal kanser</u>	
Kuvvetli ilişkili	16,18
Orta derece ilişkili	31,33,35,45,51,52,56,58,59,65,66
Zayıf ilişkili	6,11,30,40,42,43,44,54,62,66,67,
	68,74,75
<u>Vulvar kanser</u>	
Kuvvetli ilişkili	16
Zayıf ilişki	6,11,61,62,64,67,68,70
Vaginal kanser	16,18,74
Anogenital keratotik lezyon	4,60,63,65,67

Protoonkogenlerin, onkogenlere dönüşümü mutasyonlar, translokasyonlar ve overekspresyon ile açıklanabilir. Kanser oluşumu ile ilgili ikinci tip genler olan tümör süpressör genlerde ise kanser oluşumu sırasında fonksiyon yitirmeye neden olan mutasyonlar görülür ⁵¹.

İn-vitro hücre transformasyonu deneyleri HPV'lerin karsinogeneizde aktif bir rolü olduğuna dikkat çekmektedir. Viral RNA'nın ve protein sentezinin varlığı, virüsün lezyonun patogenezinde rol oynaması için bir iskelet hazırlar ¹⁸. İnsan dokusunda, enfektif virüs tanecikleri bazal hücreler yerine son farklılaşmaya uğramış skuamöz hücrelerde bulunur. Malign hücrelerde, viral DNA, hücresel protoonkogenler civarında konak hücre DNA'sına tümleşir ve E6 ve E7 genleri aşırı ifade edilmeye uğrar. Öte yandan latent olarak enfekte, benign hücrelerde viral DNA epizomal olup E6 ve E7 aşırı ifade edilmez. Bu farkın nedeni başka bir erken gen olan E2'nin E6 ve E7'nin ifadesini denetlemesidir. E2 geni, viral DNA epizomal iken işlev görmekte olup tümleşme gerçekleşmişse etkinsizleşmektedir ⁴⁸.

Düşük-dereceli lezyonlarda, vejetatif viral replikasyonun bir belirtisi olarak tüm viral genler eksprese edilir. Bunun aksine, HSIL ve invazif kanserlerde, viral gen ekspresyonunda E₆ ve E₇ nin dominant olduğu kısıtlı bir kısım vardır. Yapılan çalışmalar göstermiştir ki, viral genomun bundan sorumlu esas kısmı E₆ ve E₇ bölgeleridir . HPV'nin hücredeki

fiziksel fazıyla epitel hücrelerinin malignant potansiyeli arasında da bir ilişki vardır ¹⁸.

HPV ile enfekte benign lezyonlarda, viral DNA'lar ekstrakromozomal plazmidler olarak bulunur ve çoğunlukla monomerik çembersel moleküllerdir ancak kanserlerin çoğunda HPV DNA'lar konak kromozomuna entegre olur ^{18, 24}. Çalışmaların çoğu, serviksin invazif karsinomunda konak hücre genomuna entegre olmuş HPV-16 ve HPV-18 DNA'larını gösterirken bu konuda gözlenen ekstrakromozomal entegrasyon minimumdur. Viral entegrasyon çok sıklıkla transkripsiyonu düzenleyen proteinleri kodlayan E₁ ve E₂ ORF'den olur. Virüs konak hücre genomuna entegre olduğunda çembersel DNA E1-E2 gen bölgesinden açılır. Bu entegrasyon, konak kromozomu için non-spesifik olmasına rağmen virüs genomu açısından spesifiktir. Bu entegrasyonun, E₁ ve E₂ genlerinin deregülasyonu ile sonuçlandığı ve bunun da hücre onkogenlerin aktivasyonuna neden olduğu sanılmaktadır ²⁴. E₁ ve E₂ proteinlerinin yokluğunun E₆ ve E₇ ORF'lerin ekspresyonundaki düzensizliğin temelini oluşturduğu düşünülmektedir ^{18, 20}.

Onkogenlerin etkileri ile patogeneze arasında direkt bir ilgi kurmak zordur ancak tersine HPV'lerin tümör süpressör genlerle etkileşimi oldukça açıktır ¹⁸. HPV ORF E₇'nin servikal kanserler açısından önemi Rb üzerine olan etkisi ile ilgilidir. Aktif formunda, fosforile olmuş Rb hücre siklusunun G₁ fazında olan hücreleri bloke eder çünkü E₂F ailesinden transkripsiyon faktörlerine sıkıca bağlıdır. Hücre fosforile olunca, transkripsiyon faktörleri serbest kalır ve S fazının

progresyonundan sorumlu genleri aktive eder ³⁰. E₇ proteini, "Rb paketi" ne kompetitif olarak bağlanarak Rb anti-onkoprotein kompleksini inaktive eder. Bu inaktivasyon, konak hücrenin, DNA sentezi ve hücre siklusunda görev alan birçok geninin transkripsiyonunu aktive eden ve E₂F olarak adlandırılan bir konak transkripsiyon faktörünün serbest kalmasına neden olur^{18,30}.

p53 geninde, delesyon, insersiyon ve nokta mutasyonun neden olduğu değişiklikler birçok karsinomda en sık görülen genetik olaylardır. p53 geni, hücre siklusunu negatif olarak regüle eder ve tümör formasyonu için fonksiyon yitirmeye neden olan mutasyonlara neden olur. p53'ün normal fonksiyonu, DNA hasarı oluştuktan sonra hücre siklusunu G₁ evresinde dinlenmeye alarak ekspresyonu artırmaktır. Bu, dinlenme evresi DNA'nın tamiri içindir ya da tamir olanaksızsa hücreler bu evrede apoptozise gider ³⁰. HPV-16 gibi yüksek risk grubu virüslerin E6 proteinlerinin, p53 süpressör genini inaktive ettiği gösterilmiştir ^{18, 30}. p53'ün E₆ ilişkili düşüşü hücre siklusu regülasyonunu baskılayabilir . HPV-16 ve HPV-18 gibi yüksek risk HPV tiplerinin E₆ proteini, düşük risklerinkine kıyasla p53'e daha büyük afinite gösterirler. İlginç olarak düşük-risk HPV'lerdeki E₆ proteini bu degradasyona neden olma yeteneğinde değildir. Bu nedenle E₆, kuşkusuz, konak hücreye entegrasyonda, transkripsiyon faktörü gibi iş görmek gibi, p53 inaktivasyonundan daha başka görevlere sahiptir ^{18, 30}.

Normal servikste kolumnar epitelden skuamoz epitele geçişin olduğu bir transformasyon zonu vardır ve HPV'ler çoğunlukla bu bölgeye yakın hücreleri enfekte ederler. HPV virüsü serviksin bazal epitel hücrelerine vajinadan geçiş bulur, burada çekirdekte replike olur ve E1, E2, E4, E5, E6 ve E7 viral genlerini eksprese ederler. Enfekte olan bazal hücrelerde hasar meydana gelir ve farklılaşmaya ve epitel yüzeyine göç etmeye devam ederler. Epitel yüzeyinde skuamöz hücreler geç HPV genlerini (L1 ve L2) eksprese ederler. Enfeksiyöz virüs partikülleri oluşur ve vajina lümenine geçer. Özellikle yüksek-risk tiplerle oluşan HPV enfeksiyonu HPV ilişkili hafif displazi, CIN3 ve en sonunda da servikal kansere neden olurlar. Transforme olmuş epitel hücrelerde HPV genleri konak hücre kromozomuna entegre olur ve p53 ve RB'ye bağlanan E6 ve E7 onkojenik proteinleri eksprese edilir ⁵².

2.6. TANI YÖNTEMLERİ

2.6.1. GÖZLE MUAYENE: En basit tanı yöntemidir. İyi bir ışıklandırma ve hastanın rahat olması çok önemlidir. Labial ve perianal bölge, vajina ve anal kanal siğil varlığı açısından muayene edilir ¹⁶.

2.6.2. KOLPOSKOPİ: Genellikle smear sonucu anormal olan hastalar için kullanılır. Çok güçlü bir ışık kaynağı ve büyüteç yardımı ile 30 kez büyütme sağlar. Kolposkopi yapılmadan önce %5'lik asetik asit ile epitelde aseto-beyazı oluşup oluşmadığını gözlenir

ancak bu, HPV için spesifik değildir çünkü bu tip bölgelerin 1/3'ü HPV ile ilişkili değildir ¹⁶.

2.6.3. PAP-SMEAR: HPV enfeksiyonunun SIL gelişiminde temel bir olay olduğu açıktır. Bu, SIL'lerin genellikle HPV DNA içermesine dayanan gözlemler ve HPV ile enfekte normal servikal epitelin in-vivo ve in-vitro koşullarda SIL'in karakteristik özelliklerini taşıyan histolojik değişimler göstermesi esasına dayanır ⁵³. Pap-smear ile teşhisin birincil özelliği, yüksek dereceli lezyonları tanımlayarak servikal kanserden korunmayı sağlayabilmesidir ancak Pap testin hassasiyeti ve özgüllüğünün geliştirilmesi için yeni yöntemlerin gerekliliği açıktır ³.

Yanlış negatif pap smear: Pap-smearın yanlış negatif oranı oldukça yüksektir (%20). Yetersiz örnek oranı ise %5-10 arasında değişmektedir. Bu oranlar altın standart kabul edilen testlere göre elde edilmiştir ³.

Pap-smear sınıflandırmaları: Bu sınıflandırmalar pap-smear kullanılmaya başlandığında bu yana oldukça gelişme göstermiştir. Şu anda kullanılan standart, Bethesda sistemidir. Bu nomenklatür geniş kabul görmesine rağmen hala tartışılan yönleri de vardır³.

2.6.4.MİKROBİYOLOJİK TANI YÖNTEMLERİ

2.6.4.1.HPV DNA TAHLİLİ: HPV ile ilişkili alt genital sistem hastalıklarının viral tanısı son yıllarda bilimsel olarak oldukça ilgi uyandırmıştır ³.

Bununla birlikte servikal karsinomun tespitinde klasik sitolojik yöntemle ek olarak ya da yalnız başına HPV DNA testinin kullanılması yaygınlaşmaktadır. HPV DNA testi; servikal swablarla çalışılması bakımından sitolojik yöntemdeki örnekleme problemine kıyasla rahat ayrıca da ucuz bir yöntemdir ¹¹. Tüm bunlara rağmen bugüne kadar jinekologlar ve diğer hekimler arasında HPV DNA testi çok fazla kabul görmemiştir. Bunun 2 ana sebebi vardır: 1. Var olan ticari HPV testlerinin önemli lezyonları tespitindeki düşük hassasiyeti, 2. Servikal kanser öncülü olan lezyonların teşhisi ve tespiti için gerekli viral değerlendirme için katkıda bulunabilecek büyük ve uzun süreli denemelerin olmayışıdır ³.

2.6.4.1.1.Southern Blot Hibridizasyon:

Southern blot hibridizasyon testi HPV DNA tahlilinde altın standart olarak dikkate alınmıştır ve birçok laboratuvarında kullanılmaktadır. Southern Blot yüksek bir hassasiyete sahiptir ve teorik olarak hücre başına yalnızca 1 virüs kopyasını bile analiz edebilir. Ancak taze doku örneği ile çalışılması gerektiğinden günlük kullanım için oldukça zaman kaybettirici bir yöntemdir ayrıca radioaktif işaretli problemler ile çalışıldığından klinik kullanım için pratik değildir³.

2.6.4.1.2.Dot Blot Hibridizasyonu:

Dot Blot Hibridizasyonu, kullanımı kolay, ucuz, yüksek hassasiyetli, basitleştirilmiş bir Southern Blot yöntemidir. Daha önceleri 7 problemler için bir kit iken 7 yeni HPV tipinin eklenmesiyle yenilenmiştir (Digene

diagnostics-Silver spring, MD). 6 ve 11 düşük dereceli tiplere eklenen yeni düşük dereceli tipler ; 42, 43, 44 ile 16, 18, 31, 33 ve 35, yüksek dereceli tiplere eklenen intermediate/yüksek risk HPV'ler 51, 52, 45 ve 56'dır. Ancak bu testte de radyoaktif problar kullanılmaktadır ³.

2.6.4.1.3.Hibrit Capture DNA tahlili: Gıda ve İlaç Yönetimi (FDA)tarafından onaylanan bir testtir ^{54, 55}. Digene'in hibrit capture DNA tahlili de Dot Blot hibridizasyonundaki 14 HPV tipini identifiye etme yeteneğindedir. Fakat farklı olarak non-radyoaktif RNA probları kullanıldığından çok daha ekonomiktir ³. Bu yöntem, örneklerin HPV probları kullanılarak hibridize olması ve luminesan bir işaret vermesi esasına dayanır ⁹. Hibrit capture yöntemi, HPV-DNA var ya da yok şeklinde sonuç verir. Ancak düşük risk grubu ve yüksek risk grubu HPV'leri ayrı ayrı tanımlayabilir ⁵⁶. Hibrit capture'ın hassasiyeti çok yüksektir ancak bu hassasiyetle birlikte özgüllük azalmaktadır ³. İkinci jenerasyon hibrit capture olan Hibrit capture-II (HCII) tahlili ticari olarak 1998 yılında piyasaya çıkmıştır. HCII, non-radyoaktif, hızlı (5 saat), likit bir hibridizasyon yöntemidir. Yüksek-risk tipler (tip 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 ve 68) ve düşük-risk tipler (tip 6, 11, 42, 43, ve 44) olmak üzere 18 HPV tipini tespit edebilir ^{1, 14}. HCII'nin avantajı, tüp yerine mikrolateler kullanılması ve 96 kuyucuklu mikrolate okuyucuda kemilüminosan işareti okuyabilmesidir ^{1, 3}. Yapılan ilk çalışmalar, HCII'nin 0.2- 1pg HPV-DNA/ml tayin limiti ile orijinal

hibrit capture'dan daha güvenilir olduğunu göstermiştir³. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile de uyumlu olması bakımından gelecek vaadedicidir. Bu test, sitolojik tanının hassasiyetini artırmak ve yanlış değerlendirmeyi azaltmak amacıyla önerilmektedir¹⁴.

2.6.4.1.4.In-situ hibridizasyon: Parafine yerleştirilmiş dokularda non-radyoaktif HPV problemleri ile çalışan (Omniprobe - Digene Diagnostic) ve HPV-DNA tahlilinde kullanılan bir yöntemdir³. In-situ hibridizasyon, entegre viral DNA'yı gösteren nükleer koyuluk ile epizomal replike olmuş virüsü gösteren homojen koyuluğu belirleyerek, HPV enfeksiyonu için alınan örneği çalışır⁹. Diğer tekniklere oranla hassasiyetinin daha düşük olması klinik kullanımını güçleştirmektedir. In-situ hibridizasyon hücre başına 20-50 virüsü saptayabilir. Bu nedenle yalnızca pozitif sonuçların klinik değeri vardır, yanlış negatif oranı yüksektir³.

2.6.4.1.5.PCR (Polimeraz zincir reaksiyonu): Hassasiyet ve özgüllük göz önüne alındığında en uygun teknik L1 bölgesinden seçilen primerler ile çalışılan PCR'dır. L1-PCR bugüne kadar gösterilmiş en hassas yöntemdir ve HPV'nin geniş bir spektrumu için kullanılabilir. Virüs tayininin alt sınırı yaklaşık 100 viriondur. PCR, kullanımı kolay, otomatize ve HPV tipleri arasında ayırt etmeyi de sağlayabilen bir testtir. PCR'ın dezavantajı, örnekler arasında çapraz

kontaminasyon dolayısıyla yüksek oranda yanlış pozitif oranların bulunmasıdır ^{3, 57}.

2.7. EPİDEMİYOLOJİ

HPV ile genital enfeksiyon, en sık rastlanan seksüel yolla bulaşan viral enfeksiyonlardan biridir ⁵⁸. Son zamanlarda yapılan klinikoepidemiolojik çalışmaların çoğunda, HPV 16,18,31 vb. gibi 20'den fazla özel tipinin servikal displaziler ve karsinomlar ile yakından ilişkili olduğu saptanmıştır ^{1, 3, 7, 8, 9, 10, 11, 13}. Serviks kanserinin ülkelerdeki dağılımı incelendiğinde, bu kanserin dünyada en çok Kolombiyalı kadınlarda görüldüğü buna karşılık ise İsrailli kadınlarda çok seyrek olduğu bilinmektedir ^{26, 59}.

Genital HPV enfeksiyonu prevelansının çok kapsamlı bir şekilde saptanması zor olsa da son zamanlarda yapılan çalışmalar ABD'de seksüel olarak aktif kadınlarda görülen genital siğil oranı %1, HPV DNA ile tespit edilmiş verilere göre subklinik enfeksiyon oranı ise %15'tir ²⁸. Hastalıkları Kontrol Merkezi (CDC)'nin bildirdiğine göre ABD'de her yıl 750.000 yeni HPV vakası tespit edilmektedir. Genital siğil insidansının son 40 yılda artış gösterdiğini belirten çalışmalar vardır. ABD ve Birleşik Krallık'ta genital HPV riskinin yaklaşık olarak %10 olduğu bildirilmiştir¹³.

HPV ile ilgili risk faktörleri seksüel yolla bulaşan tüm ajanların içerdiği risk faktörlerini kapsar; birden fazla sayıda seksüel partner, kondom

kullanılmaması, oral kontraseptif kullanımı, önceden seksüel yolla bulaşan hastalık hikayesi, virüsle tekrar tekrar karşılaşma, bütünlüğü bozulmamış matür servikse kıyasla immatür adolesan servikse sahip olma , gebelik ve enfekte kişiyle seks gibi. Son zamanlarda birden fazla seksüel partnerin servikal HPV enfeksiyonlarında primer faktör olduğu bildirilmiştir. Tutarlı olarak HPV enfeksiyonu ile ilgili tek seksüel özellik seksüel partner sayısıdır (tüm hayatı boyunca ya da yakın geçmişte olan) ¹³. Diğer faktörler bağımsız olarak HPV enfeksiyonu ile ilgili değildir ^{18, 19, 26}. Yetersiz sayıda bazı sonuçlar, ilk cinsel ilişki yaşı, ilk cinsel ilişkiden sonra geçen yıl sayısı, seksüel ilişki sıklığı, menstrüasyon sırasında cinsel ilişki ve anal seks ilişkisi gibi diğer seksüel faktörlerle HPV arasında bir ilişki olduğunu bildirmektedir ¹³.

Seksüel partner, sayısı servikal kanser için en önemli risk faktörüdür. Ancak HPV(+) olan kadınlarda seksüel partner sayısının artması servikal kanser oluşumu açısından riski artırmaz çünkü anahtar risk zaten oluşmuştur ⁶⁰. Daha önce seksüel yolla bulaşan bir hastalığı olan erkekler ile penil kanseri olan erkeklerin partnerlerinde de HPV için yüksek risk görülür ²⁶.

HPV enfeksiyonu, seksüel partner sayısı ile doğru orantılı yaş ile ters orantılı olarak ilişkilidir. Dünya çapında artan yaşla birlikte HPV enfeksiyonunda azalma görülmektedir. En yüksek oranda HPV enfeksiyonu 15-25 yaş arasında görülmektedir ^{13, 28}. Kondiloma ve displazi insidansı ise tipik olarak 20'li yaşlarda artış

gösterir. Karsinoma in situ insidansı 30'lu yaşlarda ve yayılan servikal karsinoma insidansı 40'lı yaşlardan sonra artış gösterir ^{16, 18}. Servikste epitelin tipinin de HPV için bir risk faktörü olabileceği düşünülmektedir. Bu hipotezi doğrular şekilde birçok çalışmada yaşı önemli bir risk faktörü olduğu tespit edilmiştir ¹⁹.

Oral kontraseptif kullanımı ve hormonlar, reproduktif özellikler, sigara, diyet faktörleri gibi demografik risk faktörleri ile HPV arasındaki ilişki ise tutarlı değildir ¹³. Sigara içmek kanser riskini en az 2 kat artırır. Bu artışın nikotinin içerdiği metabolitlerin servikal sekresyonlarla karışması ve DNA onarım mekanizmasında bulunan enzimlerle etkileşmesi sonucu olduğu düşünülmektedir ¹⁶. Birçok epidemiyolojik çalışmada da sigara risk faktörü olarak belirtilmiştir ¹⁸. Vitamin A ya da folat eksikliği gibi beslenme yetersizliğinin de onkogeneizde önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir ¹⁶. Irk, etnik grup gibi sosyodemografik özellikler henüz saptanmamıştır. Birçok çalışmada birçok ırk ve etnik grup kullanılarak insidans ve prevelans belirlenmiş ve diğer risk faktörleri de göz önüne alınarak düzenlenmiştir. Tüm bu çalışmalarda Afrikalı-Amerikan kadınların beyaz kadınlara oranla HPV insidansı ve prevelansının yüksek olduğu saptanmıştır ¹³.

HSV-2 ve *Chlamydia trachomatis* gibi diğer genital enfeksiyonlar enflamasyona ve hücre sayısının artmasına neden olarak viral genlerin ekspresyonunu artırabilirler ^{16, 61}.

HIV'in yada ilaç kullanımının neden olduğu immün baskılanmanın da HPV'nin neden olduğu lezyonların gelişimini artırdığı gösterilmiştir ¹⁶. Servikal neoplazi, HIV-1 ile enfekte kadınlarda enfekte olmayan kadınlara oranla 5 kat daha fazla görülür ⁶².

HPV'nin bulaşı, virüsle direkt temas sonucu olmaktadır. Bu nedenle seksüel yolla bulaşı en yaygın olanıdır. Bazı kaynaklarda anogenital bölgeden diğer bölgelere ya da diğer bölgelerden anogenital bölgeye geçişin olduğu durumlardan bahsedilse de bu duruma genellikle rastlanmaz. Bazı kaynaklarda belirtildiği gibi, genital bölgeye hastanın ya da partnerinin elinden bulaşmış olması ise mümkün değildir çünkü genital bölgeyi enfekte eden HPV tipleri ile vücudun diğer bölgelerini enfekte eden HPV tipleri farklıdır ¹⁶. Ancak bazı durumlarda; oral ve anal seks ile ağız, boğaz ve anüse de bulaşabilmektedir. Anneden fetüse, plasenta ile geçip geçmediği kesin olarak bilinmemektedir ancak birçok çocuğun orofarinksinin normal doğum sırasında enfekte olduğu bildirilmiştir ^{20, 24, 25, 63}. Yapılan bazı çalışmalarda 12 yaş ve altı okul çağı çocuklarda HPV tespit edilmiş ve bu nedenle eşyalar aracılığıyla bulaş üzerinde durulmuş ancak bu konu bu güne kadar çalışılmadığı için araştırmacılar bu çocukların cinsel tacize maruz kaldıklarını düşünmüşlerdir ¹⁶.

3. MATERYAL-METOD

3.1. MATERYAL

3.1.1. Çalışma Grupları

Çalışmamızda Gazi Üniversitesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Polikliniğine vajinal kaşıntı, kasık ağrısı, adet düzensizliği, disüri, disparoni, vajinal akıntı, gaita yapamama, memede kitle, çocuk istemi şikayetleriyle ve rutin kontrol, menopoz kontrol ve check-up gibi HPV ile direkt ilişkili olmayan nedenlerle gelen rasgele seçilmiş 149 kadından servikal swablarla alınan 1'er örnek Gazi Üniversitesi Hastanesi Mikrobiyoloji Araştırma Laboratuvarına, smear fırçası ile alınan 1'er örnek ise eş zamanlı olarak Gazi Üniversitesi Hastanesi Patoloji Laboratuvarına gönderilmiştir. Çalışmaya alınan kadınlardan 1 tanesi virgin olduğu için vajinal sürüntü örneği alınmış, diğer hastalardan ise servikal örnekler alınmıştır. Tüm hastalara uygulanan ankette; yaş, evlenme yaşı, partner sayısı, korunma yöntemi, partnerde HPV öyküsü, gebelik sayısı, doğum sayısı ve abortus sayısı sorulmuştur.

3.2. METOD

3.2.1. Digene Hibrit Capture Sistemi ile HPV DNA analizi

3.2.1.1 Ayraç ve materyaller

- ❖ 60 tüp
- ❖ 1X2 ml negatif kontrol: Sodyum-azidli özel taşıma besiyerinde (STM) taşıyıcı DNA
- ❖ 1X1ml pozitif kontrol B: 10 pg/ml olarak hazırlanmış HPV16 DNA ve taşıyıcı DNA (STM içinde)
- ❖ 1X30 ml denatürasyon ayracı (DR) : Dilüe edilmiş NaOH solüsyonu
- ❖ 1X0.35 ml indikatör boya: Sodyum-azid içeriyor
- ❖ 2X2.5 ml probe sulandırıcı: Sodyum-azidli tampon solüsyon
- ❖ 1X55µl HPV prob B: HPV 16/18/31/33/35/45/51/52/56 RNA prob kokteyli (tampon solüsyon içinde)
- ❖ 1X18ml keşif (detection) ayracı 1: Sodyum-azidli tampon solüsyonu içinde RNA:DNA hibritlerine göre hazırlanmış alkale fosfataz konjuge antikorlar (murine monoclonal)
- ❖ 1X19ml keşif ayracı2: LumiPhos® 530
- ❖ 1X159 gr yıkama tamponu: Sodyum-azid içeriyor
- ❖ 1X60 vidalı kapaklı örnek tüpleri: 1ml örnek alacak şekilde

- ❖ 1X60 hibridizasyon tüpleri
- ❖ 2X30 hibridizasyon tüp kapağı
- ❖ 1X60 yakalama tüpleri: RNA:DNA hibritine özgül olarak Ab'la kaplanmış
- ❖ $65 \pm 2^{\circ}\text{C}$ su banyosu
- ❖ Vorteks
- ❖ İstenilen hıza göre ayarlanabilen çalkalayıcı
- ❖ Yıkama aygıtı
- ❖ DCR-1™ luminometre
- ❖ Hibridizasyon bulaşık sporu
- ❖ 20-200µl taşıyabilen mikropipet, RNAaz-free pipet ucu (steril)
- ❖ 50-250 ve 500µl taşıyabilen repeater pipet ve disposable pipet ucu
- ❖ 1ml 'lik disposable pipet
- ❖ Disposable banko örtüsü, havlu, eldiven ve %5'lik sodyum hipoklorit
- ❖ Parafilm
- ❖ 12X75 polystiren tüp (DR2 için)
- ❖ Saat
- ❖ Mikrosantrifüj (13000g)
- ❖ 2ml'lik mikrosantrifüj tüpü (konik tabanlı)
- ❖ Mikrosantrifüj tüpleri için vidalı kapak
- ❖ 5ml disposable transfer pipet ucu
- ❖ Örnek taşıma besiyeri

3.2.1.2. Ayraç hazırlama ve saklama koşulları

1.Kit 2-8°C'de muhafaza edildi. Vidalı kapaklı örnek tüpleri, hibridizasyon tüpleri, hibridizasyon tüp kapakları ve yıkama tamponu 15-25°C'de muhafaza edilebilir.

2.DR, prob sulandırıcı, prob B ve yıkama tamponu haricindeki tüm ayraçlar kullanıma hazırды.

Denatürasyon ayracı: Öncelikle denatürasyon ayracı şişesine 3 damla indikatör boya eklendi ve karıştırıldı. Bir kez hazırlandıktan sonra 2-8°C'de 3 ay korunabilen DR ayracının rengi koyu mora döndükten sonra kullanıldı. Hazırlanan tarihe göre mutlaka etiketlendi. Eğer renk solmuşsa kullanmadan önce 3 damla daha indikatör boya eklendi.

HPV prob-B kokteyli: HPV prob B şişesi, sıvı kısım şişenin dibine inene kadar santrifüj edildi. 50µl HPV prob B, pipet ucu şişenin iç duvarına yerleştirilerek çekildi ve prob sulandırıcı içine aktarıldı. Pipet ucu prob sulandırıcının içine değdirilmedi. 30 saniye maksimum hızla vortekslelendikten sonra "HPV prob B kokteyli" olarak etiketlendi. HPV problemleri -20°C'de 2 ay korunabilir. Kullanmadan önce tekrar karıştırıldı. RNAaz-pipet ve pipet ucu kullanıldı. Oldukça viskoz olan HPV problemleri hazırlanırken tam karışma olmazsa yanlış sonuca neden olabileceğinden prob pipetle çekilirken çok dikkatli davranıldı.

Yıkama tamponu: Hazırlandığında 2-25°C'de 3 ay korunabilen ve gerekirse kullanmadan önce 20-25°C'ye

çıkarılabilen yıkama tamponu yakalama işlemi sırasında hazırlandı. Yıkama tamponu paketinin tüm içeriği 3 lt distile ya da deiyonize suda çözününceye kadar karıştırıldı. Kontaminasyon ve buharlaşmayı önlemek için karışımın hazırlandığı kabın kapağı kapatıldı. Yıkama aygıtının bakteri ve küflerde bulunan alkalen fosfataz ile kontaminasyonunu önlemek için her 3 ayda bir %5'lik sodyum hipoklorit ve distile suyla yıkanması önerilir.

3.2.1.3. Örneklerin toplanması ve kullanımı

Servikal swablar: HPV DNA analizi, Digene specimen collection kit- cat.no.5100-0020'e göre örnek taşıma için tasarlanmıştır. Örnekler alındıktan sonra 2 haftaya kadar oda ısısında saklanabilir ve soğutma uygulanmadan laboratuvara ulaştırılabilir. Eğer analiz 1 hafta içinde yapılacaksa 2-8°C'de, 1 haftadan sonra yapılacaksa -20°C'de korunur. Yaptığımız çalışmada laboratuvara getirilen örnekler -20°C'de korundu.



Şekil.3. Klinik örnekler, içindeki DNA 'nın korunacağı şekilde STM içinde laboratuvara ulaşır.

1. Çalışma ortamı uygun koşullarda hazırlandı: Çalışılacak olan banka %5'lik sodyum hipoklorit ile silindikten sonra bankoyu örtecek olan atilabilir bir örtüyle örtüldü.

2. Tüm örnekler ve gerekli tüm ayaclar 15-30 dak. 20-25°C'de bekletildi ve vorteks ile örneklerin karışması sağlandı.

3. Kontroler ve örnekler test edilecekleri sıra ile spora dizildi ve numaralandırıldı.

4. HPV prob B kokteyli için, PKB (pozitif kontrol B) ve NK (negatif kontrol) kullanıldı.

5. Denatürasyon ve hibridizasyon: İndikatör

boyası DR'a ekendikten sonra DR tüplere aktarıldı (NK: 1ml, PK: 500µL, STM: 500µL). Tüm tüpler vortekslendi. Vortekslendikten sonra mor renk alan bütün tüpler 65±2°C'de 45±5 dak. inkübe edildi. Örnekler kullanmadan önce tekrar iyice karıştırıldı. Bu aşamada su banyosundaki su seviyesinin tüpteki örneği kapsadığından emin olunmalıdır. Örnekler bu aşamadan sonra 2-8°C'de overnighit ya da -20°C'de 3 ay saklanabilir. Yapılmıştı çalışmada örnekler overnighit saklanmadan test prosedürünün tüm aşamaları bir kerede uygulandı.

Bu inkübasyon süresince hibridizasyon tüpleri ve HPV prob B kokteyli hazırlandı. Bunun için prob sulandırıcı (2 şişe) birbiri içine eklenerek karıştırıldı. Prob sulandırıcı içine 50µl prob B eklendi. Ekleme işlemi sonrasında 30sn vortekslenerek iyice karışması sağlandı. Hazırlanan prob karışımından

50µl alınıp hazırlanmış olan hibridizasyon tüplerine ve kontrol tüplerine eklendi.



Şekil.4. DNA'nın, kendine özgü RNA probu ile birleşip RNA:DNA hibriti meydana getirmesi.

İnkübasyon sonrası örnekler ve kontroller su banyosundan çıkarıldı. Çalkalayıcıda 1100 ± 100 rpm'de 30 sn çalkalandı ve soğumaları için en az 5 dak beklendi.

Tüpün kenarlarına bastırarak mümkün olan en az miktarda sıvı emmesi sağlanacak şekilde swablar örnek tüplerinden çıkarıldı.

Hibridizasyon tüplerine 150µl örnek alındı.

Tüplerin ağzı kapatılıp çalkalayıcıda 1100 ± 100 rpm'de 3 ± 2 dak çalkalandı. Çalkalama sonrası kontrollerin ve örneklerin rengi sarıya dönmelidir. Hala mor olan örneklerle prob eklendi.

Tekrar $65 \pm 2^\circ\text{C}$ 'de su banyosunda 60 ± 5 dak inkübe edildi. Bu sürede yakalama tüpleri hazırlanıp ve etiketlendi. Kullanılana kadar ağızları parafilmle kapatıldı.

6.Hibrit capture: Hibridizasyon tüpleri su banyosundan çıkarıldı ve en az 5 dak soğumaları beklendi.

1ml'lik transfer pipetle kontrol ve örnek tüplerinin bütün içeriği yakalama tüplerine aktarıldı. Her transfer için ayrı pipet ucu kullanıldı.

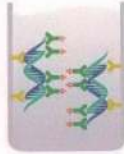
Yakalama tüplerinin ağzı parafilmle kapalı olarak shakerda 20-25°C'de 60±5 dak çalkalandı. Bu esnada yıkama solüsyonu hazırlandı.

Yakalama işlemi sonrasında tüplerin içeriği boşaltıldı.



Şekil.5. RNA:DNA hibritlerinin yakalama tüplerinin dibindeki RNA:DNA hibritine-spesifik antikora tutunması.

7.Hibriti denetleme: DRI'den 250µl yakalama tüplerine aktarıldı. 20-25°C'de 30±3 dak inkübe edildi.



Şekil.6. Yakalama tüplerine tutunan RNA:DNA hibritlerine alkalin fosfatazın bağlanması.

8.Yıkama: İnkübasyon sonrası tüpler sporuyla birlikte baş aşağı çevrilerek içerikleri lavaboya

boşaltıldı. Bu işlem 5 kez tekrarlandı. Tüpler en az 5 dak kurutma kağıdı üzerinde süzüldü.

9. Son (signal amplifikasyon): 250'şer µl DR2 tüm yakalama tüplerine aktarıldı. Tüpler parafilmle kapatılıp ışıktan uzak bir yerde 20-25°C'de 30±5 dak inkübe edildi.

10. Okuma: Nemli bir bezle yakalama tüplerinin tabanları dikkatlice silinip luminometrede okundu.



Şekil.7. Kemilümenesan substratın, alkalen fosfataza bağlanması.

4. BULGULAR

Çalışmaya aldığımız 149 hastanın 10'unda (%6.7) Digene Hibrit Capture-I yöntemi ile HPV DNA pozitif olarak bulunmuştur. HPV DNA'sı pozitif olan kadınlarla negatif olan kadınlar arasında; yaş, ilk cinsel ilişki yaşı, partner sayısı, korunma yöntemi olarak kondom kullanılıp kullanılmaması, partnerde HPV öyküsü, gebelik sayısı, canlı doğum sayısı ve abortus sayısı bakımından farklılık olup olmadığı araştırılmış ve istatiksel olarak değerlendirilmiş, ayrıca patoloji laboratuvarından alınan sitolojik değerlendirme

sonuçları ile hibridizasyon sonuçları karşılaştırılıp istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

Çalışmaya alınan 149 kadından; HPV DNA'sı pozitif olan 10 tanesinin yaş ortalaması 42.3, diğer 139 kadının yaş ortalaması 37.75 olarak bulunmuştur. Daha sonra tüm değerler Mann-Whitney Testi ve T-testi ile değerlendirilmiş ancak bu testlerde sırasıyla $p=0.212$ ve $p=0.175$ olarak yani $p>0.05$ olarak bulunduğu için pozitif ve negatif hasta grupları arasında yaş bakımından anlamlı bir farklılık bulunmamıştır.

Tablo.3.HPV DNA'sı pozitif ve negatif olan kadınlarda yaş ortalaması.

	Toplam sayı	Yaş ortalaması
HPV DNA (+)	10	42.30
HPV DNA (-)	139	37.75

HPV DNA'sı pozitif ve negatif olan kadınların ilk cinsel ilişki yaşlarına bakıldığında; pozitif olanların ilk cinsel ilişki yaşı ortalamasının 19.4, negatif olanların ilk cinsel ilişki yaşı ortalamasının 21.68 olduğu bulunmuş ancak sonuçlar Mann-Whitney ve T testleri ile değerlendirildiğinde sırasıyla $p=0.628$ ve $p=0.142$ olarak yani $p>0.05$ olarak bulunduğu için HPV DNA pozitif ve negatif kadınlar arasında ilk cinsel ilişki yaşı bakımından bir fark bulunmamıştır.

Tablo.4. HPV DNA'sı pozitif ve negatif olan kadınlarda ilk cinsel ilişki yaşı ortalaması.

	Toplam sayı	İlk cinsel ilişki yaşı ortalaması
HPV DNA (+)	10	19.40
HPV DNA (-)	139	21.68

Çalışmaya alınan kadınlar partner sayısı bakımından da sorgulanmış ancak tüm hastaların yalnızca 2 tanesinin(%1.34) partner sayısı 1'den büyük olduğu ve bu kadınların HPV DNA'sı da negatif olduğu için istatistiksel değerlendirme sonucunda $p=1$ olarak bulunmuş yani anlamlı bir fark bulunamamıştır.

HPV DNA pozitif ve negatif kadınlar arasında korunma yöntemi olarak kondom kullanılıp kullanılmaması araştırıldığında; tüm kadınların 29'unun (%19.4) kondom ile korunduğu, bu 29 kadının yalnızca 1'inin (%3.44) HPV DNA'sının pozitif olduğu diğerlerinin HPV DNA'sının negatif olduğu saptanmış ancak Ki-kare testiyle yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda $p=0.682$ yani $p>0.05$ olarak bulunmuştur. Bu durumda HPV DNA'sı pozitif olan ve negatif olan kadınların arasında kondom kullanması bakımından anlamlı bir fark bulunamamıştır.

Kadınlar partnerlerinde daha önceden belirlenmiş HPV öyküsü olup olmamasına göre değerlendirildiğinde 5 kadının partnerinde HPV öyküsü olduğu belirlenmiş ancak bu 5 kadının hiçbirinde HPV DNA pozitif olarak bulunmamıştır. Bu nedenle Ki-kare testiyle $p=1$ olarak bulunmuş yani anlamlı bir farklılık saptanamamıştır.

Kadınların gebelik sayıları değerlendirildiğinde HPV DNA sonucu pozitif olan kadınların gebelik sayısı ortalamasının 2.90, HPV DNA sonucu negatif olan kadınların gebelik sayısı ortalamasının 2.97 olduğu bulunmuş. Bu değerler istatistiksel olarak Mann-Whitney ve T testleri ile değerlendirildiğinde p değeri sırasıyla 0.761 ve 0.911 olarak yani $p>0.05$ olarak bulunduğundan iki grup arasında gebelik sayısı bakımından anlamlı bir farklılık saptanmamıştır.

Tablo.5. HPV DNA'sı pozitif ve negatif olan kadınlarda gebelik sayısı ortalaması.

	Toplam sayı	Gebelik sayısı ortalaması
HPV DNA (+)	10	2.90
HPV DNA (-)	139	2.97

Kadınlarda canlı doğum sayısı incelendiğinde; canlı doğum sayısı ortalaması, HPV DNA'sı pozitif olan hastalarda 2.30, HPV DNA'sı negatif olan kadınlarda 1.83 olarak bulunmuştur ancak Mann-Whitney ve T testleri ile bulunan p değerleri sırasıyla 0.349 ve 0.238 olduğu yani $p>0.05$ olduğu için iki grup arasında canlı doğum sayısı bakımından da bir farklılık bulunamamıştır.

Tablo.6. HPV DNA'sı pozitif ve negatif olan kadınlarda canlı doğum sayısı ortalaması.

	Toplam sayı	Canlı doğum sayısı ortalaması
HPV DNA (+)	10	1.34
HPV DNA (-)	139	1.19

Kadınlarda abortus sayısı incelendiğinde abortus sayısı ortalamasının HPV DNA'sı pozitif olan hastalarda 0.1, HPV DNA'sı negatif olan kadınlarda ise 0.43 olduğu tespit edilmiştir. T testi ile istatistiksel incelemesi yapıldığında $p=0.019$ yani $p<0.05$ olarak bulunmuş ve pozitif hastalar ile negatif kadınlar arasında abortus sayısı bakımından diğer parametrelere oranla, anlamlı bir farklılık bulunmuştur.

Tablo.7. HPV DNA'sı pozitif ve negatif olan kadınlarda abortus sayısı ortalaması.

	Toplam sayı	Abortus sayısı ortalaması
HPV DNA (+)	10	0.1
HPV DNA (-)	139	0.43

Patoloji laboratuvarından alınan sonuçlar incelendiğinde patolojik inceleme sonucu HPV ile uyumlu bulgular ya da CINI, CINII ve CINIII olarak çıkan yani

pozitif olan 6 hastanın yalnızca 1 tanesinde HPV DNA pozitif olarak bulunmuş, HPV DNA'sı pozitif olan ancak patoloji sonucu negatif olan 9 hasta bulunmuştur. Ki-kare testiyle bu 2 testin bulguları karşılaştırılmış ancak $p>0.05$ olduğundan aralarında anlamlı bir fark bulunmamıştır.

5. TARTIŞMA

Epidemiyolojik ve virolojik bilgiler, skuamöz serviks kanserlerinin %95'inde HPV DNA olduğunu bildirmektedir ^{64, 20}. Geri kalan %5'lik kısmının ise muhtemelen tanımlanmamış HPV tipleri ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Yapılan uluslararası bir çalışmada 1000 hastada servikal kanser varlığı araştırılmıştır. Elde edilen bilgiler HPV tiplerini ve diğer risk faktörlerini içermektedir. Bu bilgiler HPV tip 16,18 ve 31 ile kanser arasındaki ilişkiyi doğrulamaktadır. Ülkelerarası prevalans oranları 10/100.000'den 40/100.000'e kadar değişmektedir. En yüksek oranlar gelişmekte olan ülkelere elde edilmiştir ²⁰. Gelişmekte olan ülkelere oldukça yüksek serviks kanseri insidansının nedeni, servikal lezyonların invazif kansere ilerlemeden önce, preinvazifken saptanarak tedavi etmeyi amaçlayan etkili tarama programlarının olmayışdır ⁶⁵. Tüm dünyada, HPV enfeksiyonu çoğunlukla sitolojik olarak tanımlanmaktadır. Ancak tüm HPV enfeksiyonlarında sitolojik değişiklik saptanamamaktadır. Bu nedenle prekanseröz servikal lezyonların erken tanısı için pap-smear testinin yanı sıra HPV' yi tanımlayarak

tiplendiren uygun tarama testlerinin gerekliliği açıktır^{16, 19, 62}. Bunun için en sıklıkla kullanılan yöntemler Hibrit Capture Testi (Digene, Silver Spring, MD) ve birçok farklı primer ile çalışılabilen PCR yöntemleridir⁶⁶. Öte yandan, moleküler teknikler oldukça gelişmesine rağmen, Papilloma Virüs enfeksiyonunun tespiti için sitoloji, kolposkopi ve el büyütecinin kullanılması; örneğin nereden alınacağını belirlenmesi ve HPV ile ilişkili neoplazinin derecesinin belirmesi için kullanılmaya devam edilmelidir²⁵. A. R. Morse ve arkadaşları, yaptıkları çalışmada DNA hibridizasyonu ile pozitif buldukları hastaların %10'unda sitolojik bir değişikliğe rastlayamamış, HPV DNA'sı pozitif olan hastaların %75'inde sitoloji ile de pozitif sonuç bulmuşlardır. Bu, sitolojik yöntemin duyarlılığının düşük olması ya da hibridizasyonun özgüllüğünün düşük olmasından kaynaklanabilir ancak DNA hibridizasyonu hücre başına 10 kopyadan daha az viral DNA saptayabilen bir yöntemdir ve servikal swablarla çalışıldığı için sitolojide olduğu gibi örnekleme hataları söz konusu değildir⁶⁷. Çok geniş kullanımına ve faydalarına rağmen pap-smear testinin servikal kanser öncüllerini tanımlamadaki duyarlılığı hala tartışılmaktadır. Preinvazif ve invazif kanser lezyonlarında yanlış negatif sonuçlar oldukça yaygındır⁶⁸. Ayrıca sitolojinin özgüllükle ilgili sorunları da vardır. PCR ve hibrit capture sonuçlarının CIN II ve CIN III'de sitolojiye kıyasla daha duyarlı oldukları bilinmektedir⁶⁴. Almanya'da yapılan bir çalışmada, servikal sitolojileri negatif olan 65 yaş üstü kadınların %3.5'inde HPV DNA

pozitif olarak bulunmuştur ⁶⁹. Bizim çalışmamızda sitoloji sonucu pozitif olan toplam 6 hastanın yalnızca 1 tanesinde HPV DNA pozitif olarak bulunmuş, HPV DNA'si pozitif olan ancak sitoloji sonucu negatif olan 9 hasta bulunmuştur. Bu çalışmada yalnızca karsinojenik HPV tiplerini içeren prob B kullanıldığı ve karsinojenik olmayan HPV tipleri saptanmadığı için sitolojisi pozitif ancak hibridizasyonla negatif olan sonuçlar buna bağlı olarak açıklanabilir. Hibridizasyonla pozitif ancak sitolojisi negatif olan sonuçlar ise henüz patoloji oluşturmamış erken safhada bir HPV enfeksiyonunu gösteriyor olabilir. Sitolojik ve mikrobiyolojik sonuçlar istatistiksel olarak birbiri ile karşılaştırıldığında ise 2 sonuç arasında anlamlı bir farklılık saptanmamıştır.

Hibrit capture yöntemi (Digene Diagnostics, Silver Spring, Maryland, USA) radyoaktif olmayan duyarlı bir yöntem olarak geliştirilmiştir. Southern hibridizasyon ile ⁹⁰örtüşmektedir ⁷. Southern blottan farklı olarak radyoizotoplar kullanılmadığı için geniş kabul görmüştür. Ayrıca southern blotta hücre başına 0.1-0.5 DNA kopyası yakalanabilirken Hibrit capture hücre başına 0.05 HPV DNA kopyasını yakalayabilir. D. R. Brown ve arkadaşları yaptıkları çalışmada hem hibrit capture yöntemini hem de southern blot hibridizasyonu kullanarak HPV DNA tayini yapmış ve tüm vakalarda iki testin sonuçlarını uyumlu bulmuşlardır ³⁵.

Hibrit capture yöntemi; tanı laboratuvarlarında geniş bir kullanım alanına sahip yeni bir tekniktir. Bu yöntem 6 saat sürer ve bunun yaklaşık 4 saati inkübasyon

ve hibridizasyon esnasında geçmektedir. Bu nedenle fazla hasta sayısı ile çalışılabilmektedir. Amplifikasyon aşaması olmadığı için kontaminasyon riski dolayısıyla da yanlış pozitif olasılığı çok düşüktür ⁷. Hibrit capture'ın bir dezavantajı, prob gruplarıyla çalışıldığı için çoklu virüs gruplarını tayin edebilmesi, spesifik tiplendirme yapamamasıdır ³⁵. Digene tarafından yeni geliştirilmiş olan Hibrit Capture II sistemi ise mikropelateler ile çalışıldığı için daha kolay bir yöntemdir ¹. C.Clavel ve arkadaşları, yaptıkları çalışmada HCII yöntemi ile HPV tayini yapmışlar ve sitolojisi normal olan kadınlarda HPV DNA pozitif sonuçlar bulmuşlar ve bu kadınların 6 ayda bir pap-smear testi ile birlikte HPV DNA testini de tekrarlatmalarının uygun olduğunu bildirmişlerdir ¹⁴. Tayvan'da yapılan bir çalışmada HCII yönteminin duyarlılığının, yüksek dereceli CIN ya da kanser teşhisi açısından çok uygun olduğu belirtilmiştir ².

Birçok çalışmada HCII yönteminin, Hibrit capture I'e göre daha duyarlı olduğu belirtilmekte hatta HC II'nin duyarlılığının 30 yaş altı kadınlarda %100, 30 yaş üstü kadınlarda %81 olduğu belirtilmektedir. Bu sonuçları, J. C. Shlay ve arkadaşları da yaptıkları çalışma ile doğrulamıştır ³⁶. M. M. Brennan ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada HPV tespiti açısından PCR ve Hibrit capture-I yöntemlerini karşılaştırmışlardır. Çalışmanın sonucunda Hibrit capture-I yönteminin kolaylıkla tanı koymak için kullanılabileceğini ancak Hibrit capture-I ile negatif çıkan örneklerin PCR ile tekrar çalışılmasının Hibrit

capture-I yönteminin duyarlılığını artıracaklarını belirtmişlerdir ¹. Bir başka çalışmada ise J.Konya ve arkadaşları, PCR ile çalışılan ve pozitif bulunan örneklerin Hibrit capture ile tekrar çalışılmasının böylece de yanlış pozitif sonuçların ortadan kaldırılabileceğini önermişlerdir ⁵⁶. J.Cope yaptıkları çalışmada, "PCR ve Hibrit capture testleri, klinik sonuçlar açısından birbirini tamamlayan testlerdir" sonucuna varmışlardır ⁷⁰. Bir başka çalışmada P. Schneede ve arkadaşları, servikal smear örneklerinde HPV DNA tespitini hem HCII yöntemi ile hem de PCR (MY09/11primerleri) ile çalışmışlar ayrıca sonuçları sitoloji ve kolposkopi sonuçlarıyla da karşılaştırmışlardır. Çalışmanın sonucunda HC II ve PCR'ı %73 uyumlu bulmuşlardır ⁶⁷. C. Bergeron ve arkadaşlarının yayınladığı çalışmada Hibrit capture II yöntemi Hibrit capture I'den daha duyarlı olarak bulunmuş ve Hibrit capture II ile PCR sonuçlarının çok uyumlu olduğu belirtilmiştir. Bu bilgiler birçok başka çalışmada da belirtilmiş ve HC II sisteminin HC I'den daha duyarlı olduğu bildirilmiştir ^{15, 71}. Yaptığımız çalışmada, hibrit capture-I yöntemi ile, 149 hastanın 10'u HPV DNA pozitif olarak tespit edilmiştir. Benzer bir çalışma 2000 yılında Tübitak-Zekai Tahir Burak Kadın Hastanesi ve Düzen Laboratuvarları işbirliği ile yapılmış ve Başkent'teki 100 kadına PCR testi uygulanmıştır. Bu kadınlardan 10'unda HPV DNA tespit edilmiştir ⁷². Bu oranlar literatüre kıyasla daha düşük olmasına rağmen, tüm Türk toplumunu yansıtmadığı ve

yalnızca belirli bir bölgeyle sınırlı olduğu için bu farklılık oluşmuş olabilir.

HPV ile yaş arasındaki ilişkiyi açıklayan 2 hipotez vardır. Bir hipoteze göre immunité ya da hormonal değişiklikler yaşlı kadınlarda HPV enfeksiyonunu önüyor ya da temizliyor olabilir denmektedir. Bu immünolojik ve hormonal faktörlerin yanı sıra yaşlı kadınlarda seksüel partner sayısının daha az olması da HPV-yaş ilişkisini açıklamaya yardım eder. İkinci hipotez; HPV-yaş ilişkisinden sorumlu dolaylı bir etkiyi önermektedir. Bu hipotez, 1960'lar ve 1980'ler arasında klinik HPV enfeksiyonunun artması ile desteklenmektedir. Yaşlı kadınların HPV ile HPV'nin prevelansının yüksek olduğu bir dönemde yaşayan genç kadınlara oranla daha az karşılaştığını önerir ¹³. Ayrıca latent enfeksiyon da genç kadınlarda daha yaşlı olanlara oranla daha fazla görülür ². Meisels, geniş bir örnek grubunda (pap smear örnekleri) premenopozal kadınlarda (≤25 yaş) daha yaşlı kadınlara göre daha yüksek bir HPV prevelansı saptamıştır ¹³.

J. W. Sellers ve arkadaşları HCII ile yaptıkları çalışmada 20-24 yaş arasındaki kadınlarda HPV prevelansını (%24), 45-49 yaş grubuna göre (%3,4) daha fazla bulmuşlardır ⁷³. L. Koutsky'nin yayınladığı çalışma da bu sonuç ile uyumludur ²⁸. De Villiers ve arkadaşları HPV DNA tespiti ile yaş arasında ters orantılı bir ilişki olduğunu bulmuşlardır ²⁵. Bugünlerde, yaş grupları arasındaki ilişkinin bu kadar kesin olmadığı ve seksüel alışkanlıkların, HPV prevelansı ile yaş arasındaki ilişkiyi etkileyebildiği düşünülmektedir ^{13, 60}. Bunun

dışında çalışmaya alınan kadınların ortalama yaşının 46 civarında olduğu çalışmalarda ortalama yaşın 24 civarında olduğu çalışmalara oranla HPV oranı daha düşük olarak bulunmuştur ²⁵. Bizim çalışmamızda HPV DNA'sı pozitif ve negatif olan kadınların yaş ortalamaları birbirine yakın olduğu ve toplam ortalama yaş 38 olduğu için HPV DNA pozitif ve negatif kadınlar arasında yaş bakımından bir farklılık saptanmamıştır.

Seksüel alışkanlıklar bakımından en önemlisi HPV ile primer olarak ilişkili olan partner sayısıdır ^{13, 60}. J.R.Daling ve arkadaşları 5 ya da daha fazla partner sayısının ve ilk cinsel ilişki yaşının küçük olmasının skuamöz kanserlerin gelişiminde önemli risk faktörlerini olduğunu belirtmişlerdir. Ancak ilk cinsel ilişki yaşı ile HPV arasındaki ilişki açık değildir ^{28, 74}. İlk cinsel ilişki yaşı düştükçe HPV ile enfekte olma riskinin arttığını bildiren yayınlar vardır ancak bu ilişki partner sayısına bağlanmakta ve ilk cinsel ilişki yaşı düşük olan kadınların hayatları boyunca sahip oldukları partner sayısının daha fazla olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir ²⁸. Bizim çalışmamızda partner sayısı ile HPV enfeksiyonu arasındaki ilişki anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). Ancak bunun sebebi ülkemizde partner sayısının ABD gibi partner sayısının yüksek olduğu ülkelere kıyasla düşük olması hatta hastaların çoğunun yalnızca 1 partnerinin olmasıdır.

Buchanan J; Moscicki ve arkadaşlarının "HIV ile enfekte kişilerde olmayanlara göre daha fazla HPV enfeksiyonu oranı" bulunduğunu bildirmiştir⁷⁵. P. Ammanuta ve arkadaşları yaptığı çalışmada; PCR ve hibrit capture

yöntemleri ile, HIV(+) olan kadınların serviksinde HIV(-) olanlara oranla HPV varlığının daha fazla olduğunu göstermiştir⁵⁸.

Birçok çalışmada, menarşdan ilk cinsel ilişkiye, enfeksiyon tespit edildiğinde menstrüel siklusun hangi aşamasında olunduğundan virüsün alındığı yaşa, abortus hikayesi, gebelik sayısı ve o andaki gebeliğe kadar birçok durum ile HPV arasındaki ilişki saptanmış fakat kesin sonuçlar bildirilmemiştir. Gebelerde riskin arttığı düşünülse de henüz kesin bir şey söylemek mümkün değildir¹³.

Canlı doğum sayısı (parite) da bugün birçok çalışmada risk faktörü olarak gösterilmektedir ancak parite ile HPV ilişkisi uyumsuz sonuçlar içermektedir. Shlay J ve Bosch F yayınlarında "İspanya ve Kolombiya'da yapılan çalışmalarda parite ile HPV enfeksiyonu arasında herhangi bir ilişki tespit edilemezken, Brezilya'da yapılan bir çalışmada artan parite ile HPV enfeksiyonu riskinin arttığına dair sonuçlar elde edildiğini" bildirmiştir^{38, 60}. Bizim çalışmamızda canlı doğum sayısı ortalamasının pozitif olan hastalarda negatif olanlara göre daha fazla olduğu saptanmış ancak ikisi arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır. Bu bulgu İspanya ve Kolombiya'da yapılan çalışmalar ile uyumludur. Kuzey ve Güney Amerika'da yapılan farklı çalışmalarda da parite ile HPV enfeksiyonu riski arasında lineer bir ilişki olduğunu saptayarak, Brezilya'da yapılan çalışmaya uyumlu sonuçlar elde etmişlerdir⁵.

Korunma yöntemi de HPV enfeksiyonu açısından birçok çalışmada risk faktörü olarak bildirilmiştir. 12

yıl ve daha fazla süreli oral kontraseptif kullanımının riski artırdığı birçok epidemiyolojik çalışmada belirtilmekte ancak bu farkın oral kontraseptif kullanan kadınların daha düzenli olarak kontrole gitmeleri ve kullanmayanlara oranla daha fazla jinekolojik muayene olmaları dolayısıyla da daha fazla HPV tespit ediliyor olabileceği de düşünülmelidir ⁵. Kondom kullanımının virüsün bulaşmasında koruyucu bir rolü olup olmadığı henüz kesin değildir. Ancak kondomun tüm lezyonları kapatabilmesi durumunda koruyucu bir rolü olduğu düşünülmektedir ^{13, 76}. Bizim çalışmamızda tüm kadınların 29'unun (%19.4) kondom ile korunduğu, bu 29 kadının yalnızca 1'inin (%3.44) HPV DNA'sının pozitif olduğu diğerlerinin HPV DNA'sının negatif olduğu saptanmış ancak kondom kullananlar ve kullanmayanlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır.

Vitamin A ya da folat eksikliği gibi beslenme faktörlerinin de risk faktörü olabileceği belirtilmiştir. Seksüel özelliklerle birlikte bu özelliğin de değerlendirilmesi servikal kanser oranlarındaki ülkeler arası farkın açıklanmasına da yardımcı olabilir ⁵.

İrk ve etnik grup gibi özelliklerin bir risk faktörü olup olmaması henüz bir kesinlik kazanmamakla birlikte; Tortolero-Luna G ve arkadaşları "Ley ve arkadaşlarının Kaliforniya'daki Üniversite öğrencileri ile yaptıkları bir çalışmada HPV prevelansını, Afrikalı-Amerikan kadınlarda %61, Beyaz kadınlarda %47 ve Hispanik kadınlarda %41 olarak bulduğunu bildirmiştir.

Aynı yayında Hildesheim ve arkadaşlarının Washington'da yaptığı benzer bir çalışmadan da bahsedilmiş ve HPV prevelansının, "Afrikalı-Amerikan kadınlarda %44, Beyaz kadınlarda %32 ve Hispanik kadınlarda %24 olarak" bulunduğunu bildirilmiştir ¹³.

Sonuç olarak; yapılan çalışma doğrultusunda Hibrit capture-I testinin, pap-smear testine oranla daha fazla pozitif değer saptadığı görülmüştür. Bu bulgu, birçok çalışmada da belirtildiği gibi pap-smear testinin moleküler biyolojik bir testle desteklenmesi fikrini doğrulamaktadır ^{16, 61, 66}. HPV enfeksiyonunun başlangıç aşamasında iken tespit edilebilmesi, ileride oluşabilecek kanser riskine karşı erken önlem alınmasını sağlayacaktır.

Değerlendirmeye aldığımız diğer risk faktörleri ile HPV ilişkisi henüz kesinlik kazanmamıştır ¹³. Bizim çalışmamızda da abortus sayısı dışında; yaş, ilk cinsel ilişki yaşı, korunma yöntemi, partner sayısı, gebelik sayısı, canlı doğum sayısı ile HPV arasında anlamlı bir ilişki saptanamamıştır.

6. ÖZET

Skvamöz serviks kanserlerinin yaklaşık %95'inden HPV'nin (Human Papilloma Virüs) sorumlu olduğu ve erken tanının hastalığın takibi ve prognozu açısından önem taşıdığı bilinmektedir.

Bu çalışmada Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Polikliniği'ne çeşitli yakınmalar ile başvuran hastaların servikal sürüntü örnekleri kullanılarak, Hibrit Capture-I sistemi ile karsinojenik HPV tiplerinden; 16, 18, 31, 33, 35, 45, 51, 52, 56 varlığı araştırılmıştır. Sürüntü örnekleri alınan hastalara; yaş, ilk cinsel ilişki yaşı, partner sayısı, korunma yöntemi olarak kondom kullanılıp kullanılmaması, partnerde HPV öyküsü, gebelik sayısı, canlı doğum sayısı ve abortus sayısı soruldu. Aynı hastalardan ayrıca eş zamanlı olarak patoloji laboratuvarına gönderilen smear sonuçları değerlendirmeye alındı. Hibrit Capture testi sonucunda;149 hastadan 10'u HPV DNA (+), 139'u HPV DNA (-)olarak tespit edildi. HPV DNA'sı pozitif ve negatif olan hastalar yukarıdaki parametreler bakımından birbiri ile karşılaştırıldığında, istatistiksel çalışmaların sonucunda yalnızca abortus sayısı bakımından 2 grup arasında anlamlı fark tespit edildi. Diğer parametreler ve patoloji laboratuvarından alınan smear sonuçları bakımından pozitif ve negatif olan hastalar arasında anlamlı bir farklılık bulunmadı.

Hastaların sitoloji sonuçları, karsinojenik HPV tiplerini saptamadığı için; sitoloji sonucu pozitif olan

6 hastadan sadece 1 tanesi HPV DNA pozitif olarak bulunmuş ancak HPV DNA'sı pozitif bulunan 9 hasta sitolojik incelemede negatif bulunmuştur.

Sonuç olarak; yüksek risk gruplarını saptayan HPV DNA analizlerinin, serviks kanserlerinin erken tanısında tarama testi olarak kullanılabilir nitelikte olduğu görülmektedir.

7. YABANCI DİLDE ÖZET

It has been well established that HPV can be recovered from 95% of the cervical cancers and it has been known that earlier diagnosis is important in following and prognosis of the illness.

In this study, cervical samples of the patients that applied to Gazi University Obstetrics and Gynecology Out Patient Clinics with different symptoms were researched for carcinogenic HPV types; 16, 18, 31, 33, 35, 45, 51, 52, 56 by Hybrid Capture I Assay.

The patients were interviewed about; age, first sexual intercourse, number of partners, condom using, HPV story in the partner, number of pregnancy, number of live birth and number of abortus. Also smear samples were taken from the patients and sent to Gazi University Pathology Laboratory.

With Hybrid Capture Assay, 10 of the 149 patients were positive and 139 were negative. The above parameters of the positive and negative patients were compared with each other by statistical analyses and except the number of abortus no meaningful differences were determined.

Because the cytological investigations cannot establish whether HPV is carcinogenic or not; only 1 of the 6 patients that is cytologically positive was positive with hybrid capture assay. But there were 9 patients that were positive by hybrid capture assay but negative by cytological investigations. Also there was

no meaningful difference between the cytological and microbiological results.

As a result; it has been considered that the HPV DNA assays which can investigate high-risk HPV groups can be useful in the early diagnosis of cervical cancers.



8. ÖZGEÇMİŞ

1978 yılında Ankara'da doğdu. İlkokulu Kahramanmaraş'ın Afşin ilçesinde Afşin Bey İlkokulunda okudu. 1989 yılında Ankara Özel Arı Lisesi Orta kısmına başladı. 1996 yılında Ankara Özel Arı Lisesi'ni bitirdi. Aynı sene Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nü kazandı. 2000 yılında biyolog unvanı alarak mezun oldu ve Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilimdalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı. 2002 yılında Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilimdalı'nda araştırma görevlisi olarak göreve başladı. Halen bu anabilimdalında araştırma görevlisi olarak çalışmaktadır.

9. KAYNAKLAR

1. Riethmuller D., Genital Human Papillomavirus Infection Among Women Recruited for Routine Cervical Cancer Screening or for Colposcopy Determined by Hybrid Capture II and Polymerase Chain Reaction, Diagn Mol Pathol, 8(3):157-164. (1999)
2. Lin C., High-Risk HPV DNA Detection by Hybrid Capture II, J Reprod Med, 45:345-350. (2000)
3. Bovicelli A., HPV Testing: Where are we now?, Anticancer Research, 20:4673-4680. (2000)
4. Nindl I., Human Papillomavirus Distribution in Cervical Tissues of Different Morphology as Determined by Hybrid Capture Assay and PCR, Int J Gynecol Pathol, 16:197-204. (1997)
5. Franco L. E., Cervical Cancer: epidemiology, prevention and the role of human papillomavirus infection, CMAJ, 164(7):1017-25. (2001)
6. Spitzer M., Human Papillomavirus Related Diseases In The Female Patient, Urol Clin North America, 19(1):71-82. (1992)

7. Farthing A., Human Papillomavirus Detection by Hybrid Capture and Its Possible Clinical Use, *J Clin Pathol*, 47:649-652. (1994)
8. Gomousa-Michael M., Human Papillomavirus Identification and Typing of Both Sexual Partners, *Acta Cytol*, 41(2):244-250. (1997)
9. Brennan M. M., Detection of high-risk subtypes of human papillomavirus in cervical swabs: routine use of the Digene Hybrid Capture™ assay and polymerase chain reaction analysis, *Bri J Biomed Sci*, 58:24-29. (2001)
10. Jain S., Negative Predictive Value of Human Papillomavirus Test Following Conization of the Cervix Uteri, 82:177-180. (2001)
11. Polat H., Servikal Kanserli Kadınlarda HPV Enfeksiyonları ve Diğer Risk Faktörlerinin Tespiti, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji Anabilimdalı, Adana (1996).
12. Cheah P. L., Telomerase activation and human papillomavirus infectin in invasive uterine cervical carcinoma in a set of Malaysian patients, *J Clin Pathol*, 55:22-26. (2002)

13. Tortolero-Luna G., Epidemiology of genital human papillomavirus, Curr Therap Iss Gynecol Cancer, 13(1):245-257. (1999)
14. Clavel C., Human Papillomavirus Detection by the Hybrid Capture II Assay: A Reliable Test to Select Women With Normal Cervical Smears at Risk for Developing Cervical Lesions, Diagn Mol Pathol, 9(3):145-150. (2000)
15. Poljak M., Comparative Evaluation of First and Second Generation Digene Hybrid Capture Assays for Detection of Human Papillomaviruses associated with or High or Intermediate Risk for Cervical Cancer, J Clin Microbiol, 37(3):796-797. (1999)
16. Sellors J. W., Anogenital Human Papillomavirus Infection, Canadian Family Physician, 40:93-101. (1994)
17. Digene Corp., Digene Hybrid Capture System HPV DNA Assay for in-vitro Diagnostic Use, L1171 12/99, Digene Corp., USA, 1999.
18. Stoler M. H., Human Papillomviruses and cervical neoplasia : A model for carcinogenesis, Int J Clin Pathol, 19:16-28. (2000)

19. Moscicki A. B., Human Papilloma Virus Infections, Advances in Pediatrics, 39:257-281. (1992)
20. Sedlacek T. V., Advances in the Diagnosis of Human Papillomavirus Infections, Clin Obstet Gynecol, 42(2):206-220. (1999)
21. Ustaçelebi Ş., Temel ve Klinik Mikrobiyoloji, Birinci Baskı, Güneş Kitapevi, Ankara, 1999.
22. Bulay O. M., Tümör Bilimi Ders Kitabı, Birinci Baskı, Antip A.Ş., Ankara, 1995.
23. Canda Ş., Canda T., Temel Patoloji, Birinci Baskı, Ege Üniversitesi Basımevi, Bornova, 1982.
24. Garlan S. M., Cervical Cancer-What role for human papillomavirus?, Medical J Aust, 156:204-212. (1992)
25. Koutsky L. A., Genital Papillomavirus Infections, Obstet Gynecol Clin North America, 16(3):541-564. (1989)
26. Kışnişçi H. A., Gökşin E., Durukan T., Üstay K., Ayhan A., Gürkan T., Önderoğlu L. S.,

Temel Kadın Hastalıkları ve Doğum Bilgisi,
Birinci Baskı, Güneş Kitapevi, Ankara, 1996.

27. Syrjänen K., Epidemiology of Human Papillom Virus Infections and Genital Neoplasia, Scand J Infect Dis Suppl., 69:7-17. (1990)
28. Koutsky L., Epidemiology of Genital Human Papillomavirus Infection, Am J Med, 102:3-8. (1997)
29. Silva M. D., Cervical cancer vaccines: Emerging Concepts and Developments, J Cell Physiol, 186:169-182. (2001)
30. Wolf J. K., The Molecular Biology of Cervical Cancer, Cancer Investigation, 19(6):621-629. (2001)
31. Vernon D. S., Comparison of Human Papillomavirus Detection and Typing by Cycle Sequencing, Line Blotting and Hybrid Capture, J Clin Microbiol, 38(2):651-655. (2000)
32. Marrazzo J. M., Genital Human Papillomavirus Infection in Women Who Have Sex With Women, Am J Obstet Gynecol, 183(3):770-774. (2000)

33. Chan P. K. S., Determinants of Cervical Human Papillomavirus Infection:Differences Between High and Low Oncogenic Risk Types, *J Infect Dis*, 185:28-35. (2002)
34. Ustaçelebi Ş., İnsan Papilloma Virüsleri, *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti*, 35:329-334. (1999)
35. Brown D. R., Analysis of Human Papillomavirus Types in Exophytic Condylomata Acuminata by Hybrid Capture and Southern Blot Techniques, *J Clin Microbiol*, 31(10):2667-2673. (1993)
36. Liang X. M., In Situ Hybridization with Human Papillomavirus Using Biotinylated DNA Probes on Archival Smears, *J Histochem Cytochem*, 39(6):771-775. (1991)
37. Troncone G., Detection of Papillomavirus in Matched Cervical Smears and Biopsy Specimens by Non-isotopic In Situ Hybridization, *J Clin Pathol*, 45:308-313. (1992)
38. Shlay J. C., Prediction of Cervical Intraepithelial Neoplasia Grade 2-3 Using Risk Assessment and Human Papillomavirus Testing in Women With Atypia on Papanicolaou Smears, *Obstet Gynecol*, 96(3):410-416. (2000)

39. McMurray H. R., Biology of Human Papillomaviruses, Int. J. Exp. Path., 82:15-33. (2001)
40. Moscicki A. B., Pediat Clin North America, 46(4):783-807. (1999)
41. Enemark E. J., Crystal structure of the DNA binding domain of the replication initiation protein E1 from papillomavirus, Mol Cell., 6(1):149-58. (2000)
42. Syrjanen S. M., New Concepts on the Role of Human Papillomavirus in Cell Cycle Regulation, Ann Med, 31(3):175-87. (1999)
43. Delvecchio A. M., Transient Replication of Human Papillomavirus DNA's, J Virol, 66(10):5949-5958. (1992)
44. Kadaja M., The Differential Effect of Tumor Suppressor Protein p53 on Amplificational Replication and Stable Maintenance of BPV-1 URR Containing Replicon, J Sh Scien Commun, 1:1-6. (2001)

45. McMurray H.R., Biology of Human Papillomaviruses, Int J Exp Pathol, 82(1): 15-33. (2001)
46. Kasukawa H., A fifteen-amino-acid peptide inhibits human papillomavirus E1-E2 interaction and human papillomavirus DNA replication in vitro, J Virol, 72(10):8166-8173. (1998)
47. Dong S. M., Detection and Quantitation of Human Papillomavirus DNA in the Plasma of Patients with Cervical Carcinoma, Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention, 11: 3-6. (2002)
48. Levinson W., Jawetz E., Tıbbi Mikrobiyoloji ve İmmünoloji, Altıncı Baskı (Çeviri 1. baskı), Güneş Kitabevi, Ankara, 2001.
49. Büyükören A., Koilositoz ve HPV Enfeksiyonu ile İlişkisi, Teşhis ve Tedavi Yöntemleri, Tıp Fakültesi Mecmuası, 57(4):100-103. (1994)
50. Demirtaş H., Tıbbi Biyoloji ve Genetik Ders Notları, Birinci Baskı, Erciyes Üniversitesi Yayınları, Kayseri, 1996.

51. Kumar V., Cotran R., Robbins S., Basic Pathology, Fifth Edition, W.B.Sounders Company, 1992.
52. Expert Reviews in Molecular Medicine ISSN 1462-3994, www.ermm.cbcu.cam.ac.uk 3 July 1998.
53. Nuovo G.J., Predictive Value of Human Papillomavirus DNA Detection by Filter Hybridization and Polymerase Chain Reaction in Women with Negative Results of Colposcopic Examination, A.J.C.P, 98(5):489-492. (1992)
54. Swan D. C., Human Papillomavirus (HPV) DNA Copy Number Is Dependent on Grade of Cervical Disease and HPV Type, J Clin Microbiol, 37(4):1030-1034. (1999)
55. Vernon S. D., Comparison of Human Papillomavirus Detection and Typing by Cycle Sequencing, Line Blotting and Hybrid Capture, J Clin Microbiol, 38(2):651-655. (2000)
56. Konya J., Additional Human Papillomavirus Types Detected by The Hybrid Capture Tube Test Among Samples from Women with Cytological and Colposcopic Atypia, J Clin Microbiol, 38(1):408-411. (2000)

57. Tuncer S., Servikal Biyopsi Örneklerinde İnsan Papillomavirüsleri Tip 16 ve 18'in Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Saptanması, Flora, 1:40-44. (1996)
58. Ammanuta P., Presence of Human Papillomavirus and Epstein-Barr Virus in the Cervix of Women Infected With the Human Immunodeficiency Virus, J Med Virol, 62:410-415. (2000)
59. Rock L. C., Prevention of Cervix Cancer, Clin Rev Oncol/Hematol, 33:169-185. (2000)
60. Bosch F. X., Human Papillomavirus and Other Risk Factors for Cervical Cancer, Biomed and Pharmacother, 51:268-275. (1997)
61. Smith J. S., Evidence for *Chlamidia trachomatis* as a Human Papillomavirus Cofactor in the Etiology of Invasive Cervical Cancer in Brazil and the Philippines, J Infect Dis, 185:324-331. (2002)
62. Uberti-Foppa C., Evaluation of the Detection of Human Papillomavirus Genotypes in Cervical Specimens by Hybrid Capture as Screening for Precancerous Lesions in HIV-Positive Women, J Med Virol, 56:133-137. (1998)

63. Kelley K. F., Genital Human Papillomavirus Infection in Women, JOGNN, 21(6):503-515. (1992)
64. Cuzick J., A Systematic Review of the Role of Human Papillomavirus(HPV) Testing within a Cervical Screening Programme: Summary and Conclusions, Brit J Cancer, 83(5):561-565. (2000)
65. Birner P., Signal-Amplified Colorimetric In Situ Hybridization for Assessment of Human Papillomavirus Infection in Cervical Lesions, Mod Pathol, 14(7):702-709. (2001)
66. Morse A. R., DNA Hybridization of Cervical Scrapes: Comparison with Cytological Findings in Papanicolaou Smears, J Clin Pathol, 41: 296-299. (1988)
67. Schneede P., Evaluation of HPV Testing by Hybrid Capture II for Routine Gynecologic Screening, Acta Obstet Gynecol Scand, 80:750-752. (2001)
68. Costa S., Combin Pap Smear, Cervicography and HPV DNA Testing in the Detection of Cervical Intraepithelial Neoplasia and Cancer, Acta Cytologica, 44:310-318. (2000)

69. Ferenczy A., Human Papillomavirus Infection in Postmenopausal Women With and Without Hormone Therapy, *Obstet Gynecol*, 90:7-11. (1997)
70. Cope J., Comparison of the Hybrid Capture Tube Test and PCR for Detection of Human Papillomavirus DNA in Cervical Specimens, *J Clin Microbiol*, 35(9):2262-2265. (1997)
71. Bergeron C., Human Papillomavirus Testing in Women with Mild Cytologic Atypia, *Obstet Gynecol*, 95:821-827. (2000)
72. Düzen Laboratuvarlar Grubu Bülteni, www.duzen.com.tr/files/teshis.htm, Aralık 2000.
73. Sellors J. W., Prevalence and Predictors of Human Papillomavirus Infection in Women in Ontario, Canada, *CMAJ*, 163(5):503-508. (2000)
74. Daling J. R., A Population Based Study of Squamous Cell Vaginal Cancer: HPV and Cofactors, *Gynecol Oncol*, 84:263-270. (2002)
75. Buchanan J., Role of Immune Function in Human Papillomavirus Infection, *JAMA*, 286(10):1173-1178. (2001)

76. Ferenczy A., Epidemiology and Clinical Pathophysiology of Condylomata Acuminata, Am J Obstet Gynecol, 172(4 pt 2):1331-1339. (1995)

LC 10151200-10151200
BIOBIOLOGICAL RESEARCH