

T.C.
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

MENOPOZ ÖNCESİ VE SONRASI KADINLARDA İNSAN
PAPİLLOMA VİRÜS (HPV) DNA'SININ ARAŞTIRILMASI

TEZ YÖNETİCİSİ
DOÇ. DR. MUSTAFA GÜL

DR.SÜMEYRA ALKIŞ KOÇTÜRK

UZMANLIK TEZİ
KAHRAMANMARAŞ 2010

TEŞEKKÜR

Eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım, ilgi ve hoşgörüsünü esirgemeyen değerli hocam Sayın Doç. Dr. Mustafa Gül'e,

Daima yakın ilgi ve desteklerini gördüğüm değerli hocalarım Sayın Doç. Dr. Murat Aral'a ve Sayın Doç. Dr. Pınar Çıragil'e,

Tez konumun belirlenmesinde desteğini gördüğüm değerli hocam Sayın Doç. Dr. Gürkan Kıran'a,

İstatistiksel analiz aşamasında yardımcı olan Sayın Yrd. Doç.Dr. Ali Özer'e,

Birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum asistan arkadaşlarıma ve laboratuvar personeline,

Çalışmam süresince bana yardımcı olan ve emeği geçen herkese,

Teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

| | |
|--------------------------------------|-----------|
| TEŞEKKÜR..... | II |
| İÇİNDEKİLER..... | III |
| TABLO LİSTESİ..... | IV |
| ŞEKİL LİSTESİ | V |
| SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ..... | VI |
| ÖZET | VIII |
| ABSTRACT | IX |
| 1. GİRİŞ VE AMAÇ | 1 |
| 2. GENEL BİLGİLER | 3 |
| 2.1. Tarihçe | 3 |
| 2.2. Viral Özellikler | 5 |
| 2.3. Sınıflandırma | 6 |
| 2.4. Patogenez ve immünite..... | 10 |
| 2.5. Klinik Görünümler | 13 |
| 2.6. Tanı..... | 19 |
| 2.7. Korunma | 24 |
| 2.8. Tedavi..... | 25 |
| 3. MATERYAL VE METOD | 27 |
| 3.1. Örneklerin Toplanması | 27 |
| 3.2. Gereçler | 28 |
| 3.3. Çalışma protokolü | 29 |
| 3.4. PCR..... | 30 |
| 3.5. HPV Tip Analizi | 32 |
| 3.6. İstatistiksel Analiz | 32 |
| 4. BULGULAR | 33 |
| 5. TARTIŞMA VE SONUÇ | 39 |
| 6. KAYNAKLAR..... | 49 |

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1. HPV tipleri ve oluşturduğu lezyonlar

Tablo 3.1. Real-Time PCR aşamasında tek örnek için karışım miktarları

Tablo 4.1. Gruba göre HPV pozitifliği

Tablo 4.2. Yaş dağılımı ve buna uygun HPV pozitifliği

Tablo 4.3. 49 yaş sınırına göre hasta dağılımı

Tablo 4.4. Eğitim süresi ve HPV pozitifliği ilişkisi

Tablo 4.5. Gelir düzeyi ve HPV pozitifliği ilişkisi

Tablo 4.6. Evlenme yaşı ve HPV pozitifliği ilişkisi

Tablo 4.7. İlk hamilelik yaşı ve HPV pozitifliği ilişkisi

Tablo 4.8. Hamilelik sayısı ve HPV pozitifliği ilişkisi

Tablo 4.9. Genital enfeksiyon öyküsü ve HPV pozitifliği ilişkisi

Tablo 4.10. OC kullanımı ve HPV pozitifliği ilişkisi

Tablo 4.11. Sigara kullanımı HPV pozitifliği ilişkisi

Tablo 4.12. Diyet ve HPV pozitifliği ilişkisi

Tablo 5.1. Ülkemizde yapılan HPV çalışmaları

Tablo 5.2. Amerika Birleşik Devletleri'nde yaş dağılımına göre HPV prevalansı

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1. İnsan papillomavirusü

Şekil 2.2. Kanseri oluşumu

Şekil 5.1. Dünyada 5 bölgede normal sitolojili kadınlarda yaşa bağı HPV prevalansı

SEMBOLLER/KISALTMALAR LİSTESİ

Özl. - Özellikle

HPV - İnsan papillomavirüsü

PV - Papillomavirüs

CIN – Servikal intraepitelial neoplazi

EV - Epidermodysplasia verruciformis

ICTV - International council on taxonomy of viruses

PCR - Polimeraz zincir reaksiyonu

Cand – candidate = aday

DNA - Deoksiribo nükleik asit

RNA - Ribo nükleik asit

kDa - Kilodalton

ORF - Open reading frame = Açık okuma parçası

URR - Upstream regulatory region

mRNA - messenger RNA

HIV - Human immunodeficiency virus = İnsan immünyetmezlik virüsü

HSV – Herpes simpleks virüs

HSV-TK - Herpes simpleks virüs-Timidin kinaz

E - Erken protein

L - Geç protein

Rb - Retinoblastoma proteini

RFLP - Restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi

SIL - Sküamöz intraepitelial lezyon

RRP - Recurrent Respiratory Papilloma = Tekrarlayıcı respiratuvar papillom

NMSC - Nonmelonoma Skin Cancer = Melanom olmayan cilt kanseri

BCC – Bazal hücreli karsinom

SCC – Skuamöz (yassı) hücreli karsinom

AIDS - Acquired Immunodeficiency syndrome = Kazanılmış immünyetmezlik sendromu

CDC - Center for Disease Control and Prevention =Hastalık kontrol ve engelleme merkezi

EBV - Epstein-Barr virüsü

HC2 - Hybrid capture 2

OKS - Oral kontraseptif

HRT - Hormon replasman tedavisi

nm - nanometre

vb – ve benzeri

örn - örneğin

pgr - pikogram

PAPS – Pap smear

HGSIL – Yüksek dereceli servikal intraepitelyal lezyon

LGSIL – Düşük dereceli servikal intraepitelyal lezyon

SIL – Servikal intraepitelyal lezyon

ASCUS - Önemi belirlenemeyen atipik skuamöz hücreler

VLP – Virüs benzeri parçacıklar

SBH – Southern Blot Hibridizasyon

DBH – Dot Blot Hibridizasyon

ÖZET

İnsan papilloma virüsü (HPV) Papillomaviridae ailesi içinde zarfsız, çift sarmallı bir DNA virüsüdür. Bugüne kadar 100 farklı tip belirlenmiş, bunların 40'tan fazlası anogenital sistem ve diğer alanların epiteliyal ve mukozal yüzeylerini enfekte etmiştir. HPV tipleri pratik olarak servikal kansere sebep olup olmamasına göre düşük (tip 6 ve 11) ve yüksek (tip 16 ve 18) riskli olarak gruplandırılmaktadır.

HPV enfeksiyonları ve servikal kanser arasında güçlü bir bağ bulunmaktadır. Günümüzde, kadınlarda en sık görülen ikinci kanser türünün servikal kanser olması dolayısıyla, servikal kanser ve prekürsör enfeksiyonlarında, HPV DNA araştırılması bir zorunluluk haline gelmiştir.

Çalışmamızda Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Jinekoloji ve Menopoz polikliniklerine başvuran ve muayeneleri yapılan 50'si menopoz öncesi ve 50'si menopoz sonrası hastada HPV sıklığı araştırıldı. Alınan endoservikal örnekler Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilimdalı laboratuvarına ulaştırıldıktan sonra HPV DNA ekstraksiyonu yapıldı. İzole edilen DNA, amplifiye edildi ve ardından Real Time PCR yöntemi ile HPV DNA pozitif hastalar ile HPV tipleri araştırıldı. 100 hastanın 6'sı (%6) HPV DNA pozitif saptandı. HPV DNA pozitif hastaların 4'ü (%4) postmenopozal grupta, 2'si (%2) ise premenopozal gruptaydı. HPV DNA pozitif olan örnekler HPV genotipleri yönünden araştırıldı ve 6 örneğin 2'si(%33.3) tip 6, 2'si (%33.3) tip 45, 1 örnek (%16.6) tip 16 ve 1 örnek (%16.6) tip 67 bulundu. Bu çalışmada pozitif sonuçlar ile premenopozal veya postmenopozal dönemde olma arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ($p>0.05$).

Çalışmamızda hayatın iki periyodunda HPV prevalansı ve tip dağılımını değerlendirdik ve dünya genelindeki oranlara benzer sonuçlar bulduk. Ülkemizde farklı gruplarda ve hastane kaynaklı olmayan popülasyonlarda sıklığın belirlenmesi için daha ileri araştırmaların yapılması yararlı olacaktır.

Anahtar Kelimeler: HPV, menopoz, Real-Time PCR

Bu çalışma, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 2009/3-6

ABSTRACT

The human papillomavirus (HPV) is a non-enveloped double-stranded DNA virus that belongs to the Papillomaviridae family. Over 100 different HPV types have been isolated to date, and more than 40 of these types infect the epithelial and mucosal lining of other areas and the anogenital tract. HPV strains can be practically classified by their risk of causing cervical cancer into low-risk (type 6 and 11) and high-risk (HPV 16 and 18) types.

There is a strong correlation between HPV infection and cervical cancer. Recently the second most common cancer case in women is cervical cancer. Therefore, it is necessary to investigate HPV DNA in cervical cancer and its precursor infections.

In our study, we determine the frequency of the HPV in 50 premenopausal and 50 postmenopausal patients who were admitted to Kahramanmaras Sutcu Imam University School of Medicine, Gynecology and Menopause outpatient clinics for examination. After endocervical swab specimens reached to Medical Microbiology laboratory, HPV DNA extraction was performed. Isolated DNA was amplified and then studied with Real Time PCR method to find out HPV DNA positive patients and types of HPV. 6 patients out of 100 (6%) were determined to be HPV positive. 4 (4%) of these HPV DNA positive patients were at postmenopausal group and 2 (2%) of them were at premenopausal group. The HPV DNA positive samples were investigated in terms of HPV genotypes. 2 out of these 6 positive patients were type 6 (33.3%), 2 of them were type 45 (33.3%), 1 sample was type 16 (16.6%) and 1 sample was type 67 (16.6%). In this study, we couldn't determine statistically significant difference between positive results and being in premenopausal or postmenopausal period ($p>0.05$).

In our study, we evaluated HPV prevalence and type distribution in two periods of life and prevalence was similar to that reported worldwide. Further studies would be beneficial in different groups and to determine nonhospital based HPV prevalence in our country.

Key Words: HPV, menopause, Real-time PCR.

The present work was supported by the Research Fund of Kahramanmaras Sutcu Imam University Project No:2009/3-6

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Papillomavirüsleri (PV) konakçı türüne özgül virüslerdir. İnsanlar da dahil, pek çok hayvan türü ve kuşlarda papillom veya siğillere neden olurlar (1-3). Küçük boyutlu (yaklaşık 8000 baz çiftinden oluşan) çift sarmallı DNA virüsleri olup genetik yapılarında minimal değişiklikler oluşarak yüzyıllardır insanlarda yaşamaktadırlar. Zarfsız ikosahedral simetrik, replikasyonlarını skuamöz epiteliyal hücrelerde gerçekleştiren viruslerdir (4, 5).

Papillomaviridae ailesi içinde yaklaşık 40 tanesi genital mukozayı infekte edebilen 100'den fazla virüs tipi bulunmaktadır (6). Karakteristik tropizm gösteren neredeyse 100 değişik HPV tipi saptanmıştır. Bazı tipleri kutaneotropik olup (HPV tip 1, 4, 5, 8, 41, 48, 60, 63 ve 65) sıklıkla kutanöz ve plantar siğillerden izole edilmiştir. Diğer bir HPV grubu (HPV tip 6, 11, 13, 44, 55, 16, 31, 33, 35, 52, 58, 67, 18, 39, 45, 59, 68, 70, 26, 51, 69, 30, 53, 56, 66, 32, 42, 34, 64, 73, 54) ise mukozotropikdir ve her iki cinsiyette anogenital bölgede benign ve malign lezyonlardan izole edilmiştir (2). Düşük risk HPV tipleri (özl. HPV tip 6, 11) tipik olarak benign siğillerle, laringeal papillomatöz ile çok nadir olarak malignitelerle ilişkilidir. Buna karşın yüksek risk HPV tipleri, (özl. HPV tip 16, 18, 31, 33, 45) baş ve boyun kanserleri, servikal kanser ve diğer genital malignitelerin gelişimi ile bağlantılıdır (5).

HPV'nin yüksek risk genotiplerinden HPV 16 ve HPV 18'in vajina, vulva, anüs, penis ve serviksin skuamöz kaynaklı karsinomu oluşumunda önemli rol oynadığı yapılan moleküler ve epidemiyolojik çalışmalarla gösterilmiştir (7). Servikal HPV enfeksiyonu sık rastlanılan bir enfeksiyon olup, birçok kadın ilk ilişkisinden kısa bir süre sonra HPV ile enfekte olur (8).

Dünya üzerindeki kadınlar arasında HPV enfeksiyonu populasyon prevalansı tahminen %2 ile %44 arasında değişmektedir (9). Bulaş; cinsel ilişki ile olmakta (deri teması) ve özellikle serviks geçiş zonu olmakla beraber diğer dış genital organlara da yerleşebilmektedir. Perinatal bulaşma olasılığı nadir de olsa bulunmaktadır. Bağışıklığı baskılanmış bireylerde bulaş çok daha kolay gerçekleşebilir (10, 11). Genç ve seksüel olarak aktif yaşlarda enfeksiyon sıklığı artmıştır, fakat %90'dan fazlası spontan düzeliyor az bir kısmı sebat eder (12). Orta yaş grubunda ise HPV DNA sıklığında spontan ve ani bir şekilde azalma olup, postmenopozal grupta yükseliş gözlemlenebilir. Bu ikinci yükseliş ise latent HPV enfeksiyonu ile açıklanmaktadır (13). Latent dönemde hastalığın sitolojik, kolposkopik ya da morfolojik hiçbir bulgusu yoktur, yalnızca ultrasensitif PCR teknikleri ile HPV DNA gösterilebilir. Yüksek prevalans grupları ise hayat kadınları ve HIV enfekte hastalardır. Uzun süreli oral

kontraseptif (OKS) kullanımı, yüksek parite, sigara, meyve-sebzeden fakir beslenme ve diğer seksüel geçişli hastalıklar da risk faktörleri arasında değerlendirilmiştir (14).

Servikal kanser, dünya çapında kadınlarda en sık görülen ikinci kanser türüdür (8). Vakaların büyük çoğunluğu gelişmekte olan ülkelerde görülür. Bu ülkelerde servikal kanser, mortalitesi en yüksek kanser çeşididir (15). Epidemiyolojik ve laboratuvar bazlı çalışmalar, servikal kanser patogenezinde 15 yüksek risk veya onkojenik HPV tiplerinin herhangi biriyle enfeksiyon gerekliliğini göstermiştir. Ancak servikal kanser oluşumu için yüksek risk HPV ile enfeksiyon tek başına yeterli değildir (16). HPV tip 18, serviks adenokarsinoması ile en çok ilişkili olan tiptir. HPV tip 16 ve daha sonra HPV tip 18 skuamöz hücre karsinomasında en sık rastlanılan tiplerdir (17).

Günümüzde, HPV tiplerinin, servikal kanserler ve prekürsör lezyonları ile olan ilişkisi bilinmektedir. HPV ile enfekte olmuş hastaların tespit edilmesi, yaş gruplarına dağılımının belirlenmesi, servikal kanser ilişkili HPV tipleri ile enfekte hastaların belirlenmesi, gerekli tedavilerinin yapılması, muhtemel servikal kanser vakalarının engellenmesi açısından önem taşımaktadır.

Bugün dünya çapında yapılan epidemiyolojik çalışmaların amacı, farklı HPV tiplerinin bölgesel dağılımını tanımlamak ve HPV enfeksiyonu ile sosyal gruplar arasındaki ilişkileri araştırarak bu viral enfeksiyonun epidemiyolojisi, kontrolü ve önlenmesi için anahtar bilgilere ulaşmaktır. Türkiye’de bu konuda yapılmış çalışmalar, sınırlı sayıda ve genel gruplarda yapıldığı için HPV enfeksiyonunun sıklığı, sağaltımı ve alınan önlemler konusunda ayrıntılı bilgi yeterli değildir. Cinsel yolla geçen diğer hastalıklarda olduğu gibi genital HPV enfeksiyonları da en sık 15-25 yaş arasındaki kadınlarda görülüp; yaş ilerledikçe değişiklikler göstermektedir (18, 19). Kadınlarda menopoz dönemine girme ile oluşan fizyolojik değişikliklerin, HPV enfeksiyonu sıklığına etkisini belirlemek amacıyla çalışmamızda HPV ile ilişkili başka bir hastalığı ve genital kanser öyküsü olmayan premenopozal ve postmenopozal dönemde bulunan kadınlar karşılaştırılmıştır. Bu amaçla Aralık 2008-Aralık 2009 tarihleri arasında Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakültesi Menopoz polikliniğine takip amaçlı başvuran 50 hasta ile, yine Jinekoloji polikliniğine herhangi bir şikayetle başvuran 50 hastadan servikal sürüntü örneği alınmıştır. Alınan örneklerde Real-time PCR yöntemi kullanılarak HPV varlığı araştırılmış ve genotiplendirmesi yapılmıştır ve HPV DNA belirlenmesinde risk faktörü olan unsurlar ile tespitinin klinik ve epidemiyolojik açıdan önemi vurgulanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. TARİHÇE:

HPV'lerin etken olduğu siğillerin varlığı ve bulaşıcı tıaiatta oldukları Antik Yunan ve Roma'dan beri bilinmekteydi. Ancak 19.yüzyılın başlarına kadar genital siğillerin, sifiliz veya gonorenin bir formu olduğu düşünölmekteydi (11).

1907'de Roma'da, Cuiffo tarafından yürütölen araştırmalarda insan siğillerinden alınan hücresiz ekstraktlar ile inokölasyon deneyleri yapılarak ekstraktların inokölasyon bölgesinde kutanöz siğilleri oluşturduğu gözlemlenmiştir. Steril ekstraktlar kullanarak gönüllölere siğilleri başarı ile geçirebilmişlerdir (20).

İlk kez 1922'de Basel'de Lewandowski ve Lutz tarafından rapor edilen bir sendromun tanımını bu düşünöcenin yavaş yavaş değişmesini sağlamıştır. Bu araştırmacılar geniş verrukozlar (büyük çoklu siğiller) ile karakterize Epidermodysplasia verruciformis (EV)'i kalıtsal bir durum olarak tanımlamışlardır. Bu hastalarda alın, yüz, eller gibi güneşe maruz kalan bölgelerde papillomatöz lezyonların bazıları skuamöz karsinomaya dönüşmektedir (21).

1933'te Richard E. Shope pamuk kuyruk tavşanı (cotton tail rabbit) papillomlarında keratinli dokuya inoköle edildiğinde siğil oluşumunu indükleyen ve filtreden geçebilen etkeni keşfetti (21).

1934'te Rous ve Bernard özellikle evcil tavşanların birçoğunda ilk papillomanın skuamöz hücreli karsinomaya dönüştüğünü, bu enfeksiyonun malignant potansiyele sahip olduğunu keşfetmişlerdir. Rous ve arkadaşları bu sistem üzerinde çalışmaya devam etmişler ve özellikle kimyasal karsinojenler ile bu virüs enfeksiyonunun etkileşimini incelemişlerdir. Hatta bu virüsün sistemik uygulamalarından sonra enfeksiyon ve hasarlı deri veya belirli kimyasal karsinojenlerle muamele edilen deri ile karsinoma gelişimi arasında olağanüstü derecede bir sinerjizm görmüşlerdir (21).

Köksal çalışmasında HPV'nin tarihçesinde, Lutz'un 1946'da ve Jablonska ve Millewski'nin de 1957'de inokölasyon deneyleriyle bu siğillerdeki viral etiyoölojiyi ispatladığını ve bu siğillerde görölen partiköllerin deride skuamöz hücreli kanserin gelişimine neden olma potansiyeline sahip olduğunu esasen Jablonska'nın gösterdiğini belirtmiştir (22).

Köksal ayrıca Orth ile arkadaşlarının başarılı bir şekilde skuamöz hücre karsinoma biyopsilerinde ve EV lezyonlarında çoğu HPV tip 5 olan yeni birçok HPV varlığını gösterdiklerini belirtmiştir. EV görülen hastalarda, kutanöz skuamöz hücre kanserlerinden izole edilen ilk HPV enfeksiyonu HPV tip 5 olarak saptanmıştır (22).

1950-1960'lı yıllarda yapılan çalışmalar çok yoğun olmamakla beraber, bu dönemde HPV replikasyonu ile enfekte epiteliumun farklılaşma işlemi arasındaki ilişkinin ispatlanması, HPV virionunun fizikokimyasal analizini de içeren bazı önemli ilerlemeler gerçekleşmiştir (11).

1961'de İto ve Evans karsinomanın enfeksiyöz HPV DNA'sı içerdiğini göstermişlerdir. İnsan papillomatöz lezyonlarının virüs enfeksiyonları ve karsinogenez ile ilişkisinin anlaşılması çok yavaş olmuştur. İnsan siğillerinin bulaşıcı etiolojisinin hücreye bulaşmaya dayandığı açıkça kanıtlanırsa da, onlara esasen kozmetik bir kusur gözüyle bakılıyordu ve herhangi önemli bir sağlık sorununa yol açmadığı düşünülmekteydi (21).

Papillomavirüs araştırmaları, orofaringeal kanser alt kümeleri diğer anogenital kanserler ve serviks kanserine neden olan spesifik HPV tiplerinin izolasyonu ile sonuçlanmıştır. Genital siğillerden HPV tip 6 DNA'sının izolasyonu 1980 yılında, laringeal siğillerden HPV tip 11 izolasyonu 1982 yılında başarılmıştır (21).

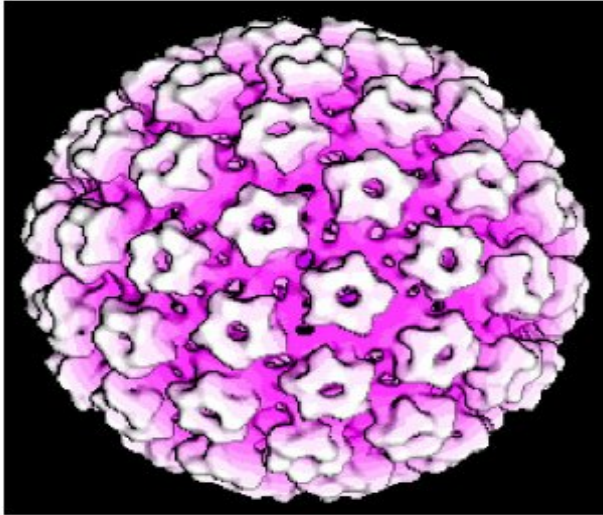
Zur Hausen HPV tarihçesine değindiği çalışmasında; 1982 yılında insanda HPV'yi Gissmann ve ark. 3 invaziv kondiloma aküminata biyopsisinden izole ettiklerini belirtmiştir. Aynı çalışmada gelişim süreci sırayla belirtildiği gibidir: 1983'de ise Dürst ve ark. servikal kanser biyopsilerinde HPV16 varlığını saptamış, aynı grup anogenital kanserlerin prekürsör lezyonlarından da HPV 16'yı izole etmişlerdir. 1985'te Schwarz ve ark.'nın servikal kanserde E6 ve E7'nin selektif transkripsiyonunu tanımlamasının ardından, 1990'da Werness ve ark. E6 proteini ile p53 etkileşimini bildirmiştir. 1993'te Lambert ve ark.'nın transjenik hayvanlarda tümör oluşumunu göstermesi ile HPV'nin onkojenik potansiyeli üzerinde durulmuştur. 2000 yılında Soto ve ark. HPV ile malign konversiyonu tanımlamışlardır. En son gelişmelerden HPV aşılı ise 1996'da Zur Hausen ve 2006'da Lowy tarafından bildirilmiştir (23).

HPV ile servikal kanser arasında %99.9 oranında nedensel bir ilişki saptayan Zur Hausen 2008 Nobel Tıp Ödülünü almıştır (24).

2.2.VİRAL ÖZELLİKLER

HPV'ler 50-55 nm büyüklüğünde zarfsız virüslerdir (25). Viral genom çift sarmallı, sirkülerdir ve ortalama 8000 baz çiftinden oluşmuştur. Guanin+Sitozin oranı hemen hemen bütün HPV tiplerinde %42'dir. Çift iplikli çembersel DNA'sı, 72 kapsomerli ikozahedral simetriye sahip bir kapsid ile çevrilidir (25). Virion iki kapsit proteini içerir (26). Majör kapsid proteini 55 kDa molekül ağırlığında olup virion ağırlığının % 80'nini oluşturur ve minör kapsid proteini ise 70 kDa'dur. Majör kapsid proteini HPV cinsine özgü (bütün HPV tipleri için ortak) antijeniteye sahiptir. Viral genom 7.900-8.000 baz çifti uzunluğundadır ve viral DNA virion ağırlığının yaklaşık olarak % 12'sini oluşturur. Birçok PV'ün genomu klonlanmış ve yaklaşık %20'sinin tam nükleik asit dizisi çıkartılmıştır (25).

Viral DNA hücresel histonlarıyla birlikte kromatin benzeri yapılar oluşturmaktadır. Viral proteinleri kodlayan bütün dizinler (ORF: open reading frame) tek bir DNA sarmalı üzerindedir ve bütün PV'lerde genetik organizasyon aynıdır. Viral genomun üç farklı bölgeye sahip olduğu gösterilmiştir. Bunlar; URR (upstream regulatory region), transkripsiyonu ve replikasyonu düzenleyici bölge, DNA replikasyonu ve hücre transformasyonu için gerekli proteinleri kodlayan erken genlerin (E1-E7) bulunduğu bölge ve majör/minör kapsit proteinlerini kodlayan iki geç genin (L1-L2) bulunduğu bölgedir (26).



Şekil 2.1. İnsan papillomavirüsü (1)

PV'ler standart hücre kültürlerinde üretilememelerine rağmen genomları iyi bilinmektedir. Küçük sirküler dsDNA genom klonlamaya çok yatkındır ve dizilim analizi,

tanı problemlerinin hazırlanması ve PV'lerin karsinojen olarak muhtemel rollerinin araştırılması için yeterli miktarda genetik materyal mevcuttur (26).

2.3. SINIFLANDIRMA

Doğada yaygın olarak bulunan PV'ler, papovaviridae ailesinin papillomavirüs genusunda yer almaktadır. Papovaviridae ailesinde polyomavirüs genusunda bulunmaktadır. Papovavirüs terimi bu ailedeki virüs gruplarının ilk iki harflerinin birleşmesi ile oluşmaktadır. PV'ler, polyomavirüsler ile fiziksel ve kimyasal olarak ortak özellikleri paylaşmasına karşılık temel biyolojik özellikleri ve genomik organizasyonu farklıdır (3, 7).

1950 ortalarından 1960'lı yıllara kadar, PV'ler ve Polyomavirüslerin temel nükleik asit analizleri ve elektron mikroskopisi incelemelerine başlanmasıyla sadece bu iki grubun çift iplikli sirküler DNA genomuna sahip ve ikosahedral simetrik zarfsız partiküller olduğu gözlemlenmiştir. Sonuç olarak çok benzer oldukları düşünülerek bu virüsler, Papovaviridae ailesi adı altında tek bir aile içerisinde dahil edilmişlerdir. Danos 1982'de yaptığı sekans analizi ve fonksiyonel çalışmalarla bu benzerliklerin çok yüzeysel olduğunu göstermiştir (27).

Bilinen PV tiplerinden yaklaşık 20 kadarı genital mukozayı etkilemektedir. HPV genotip sınıflandırmasında esas DNA dizi homolojisidir. Yeni tanımlanan HPV eğer bilinen diğer tiplerle %90'dan daha fazla homoloji gösterirse yeni tip olarak sınıflandırılır. Ayrıca HPV tipleri kanser gelişimi ile ilgili olarak üç sınıfta gruplandırılmaktadır. Bunlardan tip 16, 18, 45 ve 56 yüksek derecede displazi ve servikal kanser oluşumu ile ilişkili olmaları nedeniyle yüksek risk tipleri olarak bilinirler. Bunlardan başka tip 31, 33, 35, 51, 52 ve 58 orta ve tip 6, 11, 42, 43 ve 44 düşük risk tipleri olarak sınıflandırılır (28-30).

Yüksek derecede tür ve doku tropizm özelliği gösteren ve farklı mukozal ve dermal bölgelere eğilimi olan HPV'ler bu özelliklerine dayanarak; genital HPV'ler, EV ile ilişkili olan HPV'ler, ungula ile ilişkili olan HPV'ler ve kutanöz HPV'ler olmak üzere 4 gruba toplanmıştır. Ancak, klinik tablolar ile HPV tiplerinin DNA homolojileri arasında ilişki yoktur (25).

Papillomavirüsler'in sınıflandırılması, genomundaki farklılıklar üzerine temellendirilmiştir. Bu nedenle tipler serotip yerine "genotip" olarak adlandırılmakta ve tip sayısı hızla artmaktadır (7, 25). Tüm polyomavirüslerin genom büyüklükleri 5 kb civarında iken, PV'lerin 8 kb civarındadır. PV'lerde transkripsiyon sadece bir yönde meydana gelirken,

polyomavirüsler iki transkripsiyon alt birimi içerirler ve bunlar birbirini izleyerek okuma gerçekleştirir. En önemlisi Polyomavirüsler ve PV'ler; T-antijenleri ve E1 genindeki çok küçük homolog segment dışında herhangi önemli bir nükleotid veya aminoasit dizi benzerliği içermemektedir. Doğal ilişkilerin yansıtıldığı taksonomik sınıflandırmadan sonra bu virüslerin farklı ailelerden olduğu sonucuna varılmıştır. Yakın bir süre önce bu aile International Council on Taxonomy of Viruses (ICTV) tarafından resmen papillomaviridae ailesi olarak tanımlanmaya başlamıştır (7).

L1 ORF (Open reading frame)'si genomdaki en iyi korunmuş gen bölgesidir ve bu yüzden 15 seneyi aşkın bir süredir yeni PV tiplerinin izole edilmesinde bu bölge kullanılmaktadır. Yeni HPV örneği tam genomu kopyalanmış ve bilinen HPV tiplerinin L1 ORF'sinin DNA dizilerinden %10'dan daha fazla farklılık içeriyorsa yeni bir tip, farklılık %2-10 arasında ise subtip, %2'den az ise varyant olarak isimlendirilir. Genomu, geleneksel klonlama tekniklerinden ziyade PCR tarafından üretilen HPV tipleri, numaralarının önüne "cand" (candidate=aday) kısaltmasının eklenmesiyle tanımlanırlar (örn; candHPV 86) (7).

Sadece kısmi PCR amplikonları ile tanımlanan olası HPV tipleri numaralandırılmış tip olamazlar, ancak orijinlendikleri laboratuvarı gösteren bir kısaltmayla tanımlanırlar (örn; Luisa Villa X 100 için LVX100 olarak). Bu tanımlama 1995'te Quebec'de Uluslararası PV kongresinde taksonomisi ve tanısında çalışan tüm bilim adamları tarafından kabul edilmiştir. Bu sınıflandırmada başlıca 3 hedef vardır;

- 1) PV tipleri arasında ilişkiler kurabilmek,
- 2) Virolojide sık sık uygulanan ve tüm biyolojik organizmaların sistematikleri için kullanılan cins ve tür taksonomik terimlerine karşı PV tip terimini benzetmek,
- 3) Virüsün patolojik ve biyolojik özellikleri, taksonomik sınıflandırma ile arasındaki ilişkiyi araştırabilmektir (7).

Sınıflandırmada esasen L1 geninin 291 bp'lik küçük bir parçası kullanılır. Genomu tamamlanmış 118 PV'ün arasında dizi karşılaştırmaları, virüslerin arasında yüksek derecede çeşitliliği göstermektedir. L1 ORF dizileri karşılaştırıldığında buna benzer bir dağılım bulunmuştur. Filogenetik ağaç, 96 HPV tipi ve 22 hayvansal PV tipinin tam L1 ORF'leri temel alınarak oluşturulmuştur (7).

Şu anda bilinen insan ve hayvan PV'leri, Yunan harfleri ile betimlenen 16 cinsi oluşturur (29). Klinik yönden en önemli cins, alfa PV'tür. Bu cins, mukozal ve genital lezyonlarla ilişkili tüm HPV tiplerini içerir. Genomik dizileri temel alınarak, bütün HPV tipleri alfapapillomavirüs cinsi içinde 15 türü oluşturur. 15 HPV tipinin 12'si son yıllarda yapılan epidemiyolojik çalışmalarla yüksek risk olarak sınıflandırılmıştır. Servikal kanser oluşumu ile ilişkili iki türün HPV-tür 7 (HPV tip 18, HPV tip 39, HPV tip 45, HPV tip 59 ve HPV tip 68) ve HPV-tür 9 (HPV tip 16, HPV tip 31, HP tip 33, HPV tip 35, HPV tip 52, HPV tip 58 ve HPV tip 67) oldukları gösterilmiştir (17) (Tablo 2.1).

Betapapillomavirüsler, EV ile ilişkili tüm HPV tiplerini kapsar. EV, kutanöz neoplastik bir hastalıktır (31). Genetik yönden yatkın olmayan taşıyıcılarda beta-papillomavirüs ve gammapapillomavirüsler ile ilgili enfeksiyonlar genellikle asemptomatik seyirlidir ve henüz resmen tanımlanmış olmayan birçok HPV tipini içerir. Bu iki cinste bulunan virüslerin bir kısmının bağışıklığı bastırılan bireylerde deri kanseriyle ilişkili oldukları saptanmıştır (32).

Tablo 2.1. HPV tipleri ve oluşturduğu lezyonlar: 1 ile 67 arası HPV tipleri ve oluşturduğu lezyonlar gösterilmektedir (1).

| HPV tipleri | Oluşturduğu lezyonlar |
|-------------------------|---------------------------------|
| 1, 4 | Plantar ve basit el siğilleri |
| 2 | Basit el siğilleri |
| 3 | Düz ve juvenil siğiller |
| 6, 11, 54 | Condylomata acuminata |
| 7 | Kasap siğilleri |
| 5, 8, 9, 12, 17, 20, 21 | Maküler lezyonlar |
| 10, 14, 15, 27 | Düz siğiller |
| 13, 32 | Ağız boşluğunda Heck lezyonları |
| 16, 18 | Malign genital karsinoma |
| 26, 28, 29, 41 | Deri siğilleri |
| 30 | Larinks karsinoması |
| 31, 35, 39, 40, 43, 58 | CIN |
| 34 | Bowen hastalığı |
| 36 | Aktinik keratoz |
| 37 | Keratoakantoma |
| 38 | Malign melanoma |
| 35, 45, 51, 52, 56 | CIN, malign servikal karsinoma |
| 42, 44 | CIN, kondiloma aküminata |
| 57 | CIN, oral lezyonlar |
| 60 | Epidermoid kist |
| 67 | Vajinal intraepitelial neoplazi |

2.4. PATOGENEZ VE İMMÜNİTE

PV'leri doku tropizmine bakılarak iki grup içinde değerlendirilebilirler: kutanöz tip (deriyi tutanlar) ve mukozal tip (genital kanalı, bazen solunum kanalını, oral boşluğu veya konjonktivayı tutanlar). PV'ler deri ve mukoz membranların skuamöz epitel hücrelerini enfekte eder ve replike olarak epitelyal proliferasyona yol açarlar. Sınırlı ve intakt bazal membrana sahip olan bu lokalize hiperplaziye “verruka veya papillom” adı verilir. Papillomların genellikle enfekte bir bazal hücrenin monoklonal çoğalması sonucu meydana geldiği düşünülmektedir (25).

Virüs deriyi bir sıyrık aracılığıyla geçer ve bazal hücre katmanını enfekte eder. İki yıla varan bir inkübasyon sonucu siğiller oluşur (32). Nispeten farklılaşmamış, üreme safhasında olan bu hücrelerde, sadece erken genler transkribe olur ve sınırlı bir DNA replikasyonu sonucunda genom bir nükleer plazmid olarak korunur. Erken proteinler bazal hücrelerin proliferasyonunu stimüle eder ve birkaç aylık inkübasyon periyodundan sonra ortaya çıkan hiperplazi, kalınlaşma ve genellikle kabarık papillomlara yol açar. Kapsit proteinleri ve virionlar sadece epitelin dış katmanlarındaki terminal olarak farklılaşmış keratinositlerde üretilir. Bu hücreler normal olarak keratin üretmekte ancak bölünmemektedir (33).

Hiperkeratozis deri siğillerinin dikkat çekici bir özelliğidir. Siğiller genellikle senkronize bir şekilde ve bir kaç yıl içinde kaybolma eğilimindedir. Bu ani gerileme antikor titresi tarafından gerçekleştirilmez ve genellikle T hücreleri tarafından yürütülen immün yanıtla atfedilmektedir (34).

HPV enfeksiyonlarında iyileşmede hücrel immünite önemlidir. Bu nedenle immün sistemi normal olan kişilerde HPV enfeksiyonları zaman içinde kendiliğinden iyileşebilmektedir. Diğer taraftan, immün sistemi primer veya sekonder nedenlerle bozulmuş hastalarda siğil, vulva ve serviks karsinomları gibi HPV enfeksiyonları daha sık görülmesinin yanısıra klinik olarak daha ağır gidişli olmaktadır (35).

HPV enfeksiyonunda inflamasyon olmadığından virüsün varlığı ile ilgili immün sistemi uyuracak bir sinyal oluşmaz. Ancak HPV'nin oluşturduğu immün yanıt; güçlü lokal hücrel immünite ile karakterizedir. Hücrel immün yanıt, lezyonların gerilemesini serum nötralizan antikor gelişimini sağlar. Serum nötralizan antikorlar, L1 kapsid proteinine karşı oluşur. Çalışmalar, HPV ile enfekte olan olguların ancak yarısında serolojik yanıtın oluştuğunu göstermektedir. Antikor titresi, doğal HPV enfeksiyonunu izleyerek artar ancak

tepe noktasında bile oldukça düşük düzeydedir. Bu durum HPV'nin intrasellüler bir enfeksiyon olmasına bağlıdır (viremi yoktur). Yüzeysel epitelyum içerisindeki virüs partiküllerinin oluşumu antijen sunan hücrelerden etkilenmez. Antijen uyarımı düşük olduğundan B ve T hücrelerinin yüksek oranda aktive olması engellenir ancak, düşük seropozitivite ile de koruyuculuk sağlanabilir (36).

Genital organların dış yüzeyinde HPV tarafından indüklenen papillomlar temelde yukarıda tanımlananlara benzemesine rağmen servikal lezyonlar bazı önemli farklılıklara sahiptir. Burada virüs, cinsel birleşme sırasında skuamokolumnar sınırın yakınında üremekte olan hücrelerin bulunduğu bölgeye minör bir sıyrıktan girer. Ortalama 3 aylık bir inkübasyon periyodundan sonra düzgün yüzeysel bir kondilom gelişir. Bazı HPV tiplerinin enfeksiyonu yıllar süren bir süreçte gelişir ve bu sırada değişik aşamalı bir servikal intraepitelyal neoplazi (CİN) ve invaziv skuamöz karsinom görülür. HPV genomu yıllar boyu entegre olmamış nükleer epizom şeklinde persistan kalabilir. Bu durum sadece lezyon içindeki hücrelerde değil aynı zamanda histolojik olarak normal mukoz membranlarda ve periferdeki hücrelerde de söz konusudur. Buna karşın, servikal karsinomlarda HPV genomunun küçük parçalar halinde saçılması söz konusudur. En yaygın olarak da HPV tip 16, 18, 31, 33, ve 35 viral genomu, konakçı hücre kromozomuna rastgele bölgelerde entegre olmuş tam uzunlukta olmayan kopyalar şeklinde bulunmaktadır (34).

Genital HPV enfeksiyonunun başlıca klinik aşamaları; 1) Latent, 2)Subklinik, 3)Klinik dönemlerdir. Virüs ilk olarak stratum germinatumdaki bazal hücreleri enfekte eder, bu da en çok cinsel ilişkiye bağlı mikrotravmaların olduğu bölgede oluşur. Virüs genomu, protein kılıfından ayrılıp hücrenin çekirdeğine girer ve burada epizomal (konak DNA'sı dışında) yerleşim gösterir. Yara iyileşmesi sırasındaki bazal hücre bölünmesiyle vasküler ve bazal hücre proliferasyonu başlar ve bazal intermediyer hücre hiperplazisi ortaya çıkar. Başlangıçta HPV DNA'sı yalnızca bazal epitelyum tabakasındadır, yani latent dönemde kalır. Genellikle temastan sonra en az altı hafta içerisinde belirgin hale gelebilir, bazen tespit edilmeden yıllarca kalabilir. Bu durum hem yüksek riskli hem de düşük riskli tipler için geçerlidir (37).

Latent dönemin ne kadar süreceği, ileri aşamalara geçip geçemeyeceği çeşitli faktörlere bağlıdır. Tüm bu dönemler aynı anda beraber bulunabileceği gibi birbirine geçiş de gösterebilir. Hatta klinik belirti veren epitele komşu normal epitelde de latent HPV enfeksiyonu bulunabilir ki, buna bağlı olarak genital kondilom ya da intraepitelyal neoplazi

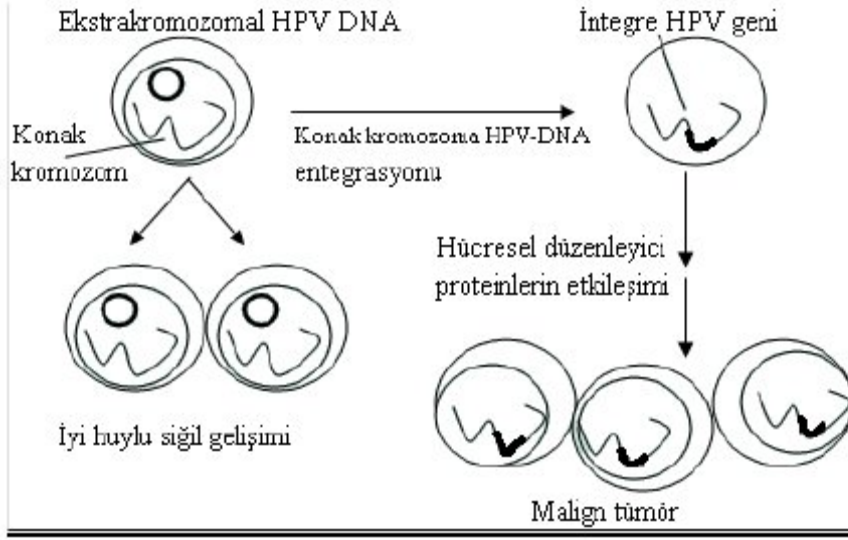
alanlarına komşu alanlarda tedavi sonrası nüksler sıkça görülmektedir. Buna “Koebner fenomeni” adı verilmektedir (38)

Onkojenik yönleriyle de geniş çapta incelenmiş olan HPV'ler özellikle mukozal PV'ler başta olmak üzere hem benign hem de malign tümörlerde gösterilmiştir. Epidemiyolojik olarak HPV tip 16 ve 18'in servikal displazi ve kanserle yakın ilişkisinin saptanmasının yanı sıra in vitro olarak hücre kültürlerinde transformasyon kapasiteleri gösterilmiştir (39). Özellikle tip 16 ve 18'in E6 ve E7 gen ürünleri bugün HPV onkoproteinleri olarak adlandırılmaktadır. Bu proteinlerin hücre replikasyonunu baskılayan proteinlere (tumor suppressor protein) bağlandığı gösterilmiştir ve bu yolla hücre üreme ve proliferasyonunu stimüle ederek kanser patogenezinde rol oynadıkları ortaya atılmıştır. HPV onkoproteinlerinden E6, P53'e E7 ise Rb' ye (retinoblastoma protein) bağlanır (40). Bu hücrel tümör süpresor proteinlerinin inaktif hale gelmesi kanser patogenezinde HPV nin muhtemel rolü üzerinde öne sürülen bir hipotezdir (25).

HPV standart hücre kültürlerinde üretilmediği için karsinogenezin mekanizması konusundaki bilgiler temel olarak moleküler klonlama ile elde edilmiş HPV DNA' sıyla transfekte hücrelerin in vitro transformasyonundan veya timusu olmayan transjenik farelerden edinilmiştir (34). Yüksek riskli HPV tip 16 ve 18'in onkojenitesi E6 ve E7 onkogenlerine atfedilmektedir. Bu genlerin bütün servikal karsinomların %90'ından fazlasında bulunan integre ve defektif HPV DNA'sında varlığı bildirilmekte ve normal hücrel tümör baskılayıcı gen ürünlerine bağlanan proteinleri şifrelemektedirler. Malignansın tam olarak ortaya çıkması konakçı DNA'sının istikrarsızlığının ortaya çıkardığı hücrel onkogen aktivasyonunun da sonucu olabilir (25, 34).

2.5. KLİNİK GÖRÜNÜMLER

PV'leri insanlarda çok çeşitli siğillere neden olmaktadır (34). Bunlardan genital siğiller cinsel ilişki ile bulaşan hastalıklar arasında önemli bir yer almaktadır (25). HPV-kanser ilişkisi HPV kliniğinin çok önemli bir boyutudur (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Kanser oluşumu (41). HPV DNA'nın konak kromozomuna integrasyonu ile malign tümör oluşumu gösterilmektedir.

HPV enfeksiyonları ile vulva, serviks, penis ve anüsün premalign ve malign hastalıkları arasında kuvvetli bir ilişki bulunmaktadır (35). HPV enfeksiyonlarının klinik belirtileri geniş bir spektruma sahiptir; enfeksiyonlar bazen semptomsuz ve benign seyrederken, zaman zaman da tekrarlayıcı ve tedaviye direnç gösteren, sürekli proliferasyon ile giden bir tablo göstermektedir. Bunlardan bazıları kansere dönüşebilir. Değişken klinik tablo, virüs tipine (Örneğin; HPV 16 ve 18 invaziv karsinom ile ilişkilidir), lezyon lokalizasyonuna (respiratuvar papillomatozis gibi), bireyin immünolojik durumuna (gebelere ve immün yetmezliği olanlarda daha ağır tablo) ve epitelin doğasına bağlıdır (25).

2.5.1 Anogenital Siğiller

Genital bölge enfeksiyonlarından 5 ana HPV tipi (HPV tip 6, 11, 16, 18 ve 31) sorumludur. Genital bölge enfeksiyonlarında genellikle birden fazla bölge tutulur ve bu hastaların %50'sinde farklı HPV tiplerine rastlanabilmektedir. İnfekte kadın hastaların partnerlerinin %65'inde aynı HPV tipi izole edilmiştir. Genital siğiller hemen daima eksternal genitalyaya ile

anal ve perianal bölgelerde ortaya çıkar ve yaklaşık % 90'ı HPV tip 6 ve 11 ile oluşur (35). Bu tiplerle oluşan lezyonlar malign kalabilir. Servikste ise tip 6 ve 11 tarafından oluşturulan düz siğiller (flat wart) ise condyloma planum olarak isimlendirilmektedir (25).

Genital organların HPV enfeksiyonları cinsel yolla bulaşan hastalıklar arasında önemli bir yer almaktadır. Kadın genital sisteminde; genellikle HPV tip 16 ve 18'in, serviks kanserinin etyolojisinde rol aldığı epidemiyolojik ve moleküler biyolojik çalışmalarla kanıtlanmıştır. Serviksin bütün kanserlerinin %90' dan fazlası HPV DNA'sına sahiptir ve bu DNA genellikle tip 16 veya 18'e aittir. Aynı tipler vulva, vajina, penis veya anüs karsinomlarıyla da ilişkili bulunmuştur. Servikal kanser lezyonuna öncülük eden, displazi veya CIN ve primer kondiloma lezyonlarının çoğuna bu tipler neden olmaktadır (25, 39).

Servikal HPV enfeksiyonlarında olduğu gibi kondilomlar gençlerde ve seksüel olarak aktif yetişkinlerde görülür, kondilomların oluşma sıklığı ise diğer seksüel yolla bulaşan hastalıklara paraleldir (42). Genellikle peniste oluşan lezyonlar ve CIN (+) kadınlarla seksüel temas ile bulaşır fakat klinik belirti göstermeyebilir (43). Kondilomlar genellikle çok sayıda ekzofitik lezyonlar halinde bulunurlar ve dış genital bölgelere rastgele dağılmış şekilde gözlemlenirler. Erkeklerde genellikle penis ve anüs çevresinde görülürken, kadınlarda perineum ve anüste görülür. Anüsteki lezyonlar anüs kanalını çevreleyecek şekilde birleşebilirler. Genellikle kondilomlar kendiliğinden ya da tedavi sonucunda gerileme gösterebilirler. Diğer HPV enfeksiyonlarında olduğu gibi hücrel immünite yönünden zayıflamış olan hastalarda tedavi oldukça güçtür. Bu olaylar hamilelikten doğan immünzayıflık ile de bağlantılıdır. HPV tip 6 ve HPV tip 11 birbirleriyle ilişkili olup genital siğillerin %90'ına sebep olurlar. Lezyonlar içerisinde HPV tip 16'da dahil olmak üzere diğer HPV tiplerine de rastlamak mümkündür (44).

Bowenoid siğillerde lezyonlar genellikle Bowen'in hastalığına benzer ya da in situ şartlarda skuamöz hücreli karsinomaya benzer lezyonlar oluştururlar. Çocuklarda görülen genital siğiller seksüel tacize bağlı, doğum esnasında bulaş ile veya kutanöz siğillerden oluşabilmektedir. Yetişkinlerdeki anogenital lezyonlara zıt olarak çocuklarda görülen genital siğiller HPV'nin genital olmayan tiplerinden kaynaklanmaktadır. Bu sonuç muhtemelen çocuklardaki genital bölgenin, yetişkinlere oranla farklı olmasından kaynaklanmaktadır (33).

Her iki cinsin anogenital yol HPV enfeksiyonları genellikle 3 gruba ayrılır. Klinik veya patolojik olarak tayin edilemeyen latent enfeksiyonlar seksüel olarak aktif kişilerin yaklaşık % 10'unda ortaya çıkar. Prodüktif enfeksiyonlar ise ekzofitik, düz veya her iki tip lezyonla sonuçlanabilir ve seksüel olarak aktif kadınların yaklaşık % 2 ile 4'ünde ortaya çıkar. İntraepitelyal neoplaziler veya invaziv karsinomlar ise sıklıkla düz, nadiren ekzofitik lezyonlardan gelişir. HPV ilişkili düz lezyonlar subklinik HPV enfeksiyonu olarak değerlendirilir. Çünkü klinik olarak sadece asetik asit uygulamasından sonra oluşan beyaz alanların kolposkopik olarak görülmesi ile tanınırlar (26).

2.5.2.Respiratuar Papillomatöz

Genellikle çocuklarda bazan genç yetişkinlerde, çok nadir olarak genital HPV tipleri solunum kanalını da enfekte edebilmekte ve larinkste lezyonlar oluşturmaktadır. Bu genital tiplerce neden olunan papillomlar bazen konjonktivada da gözlenmektedir. Larengeal papillomalar larinksin en iyi huylu epitelyal tümörüdür. Ancak solunum yolu tıkanmasına neden oldukları için çocukluk çağıının en tehlikeli tümörlerindedir (25)

Morrison ve ark. çalışmalarında, Setlacek ve ark.'nın yaptığı gebe kadınların servikal hücrelerinde ve doğumdan sonra bebeklerden elde edilen nazofaringeal aspiratlarda Southern blot hibridizasyon (SBH) ile HPV araştırmasına değinmişlerdir; ve bu çalışmada HPV pozitif anneden doğan 23 bebeğin 11'inin nazofaringeal aspiratlarında HPV pozitif bulunmuştur. Bu bebeklerin herhangi birinde aktif HPV enfeksiyonu gelişip gelişmediği bilinmemesine rağmen bebekler açık bir şekilde virüse maruzdurlar ve doğum sırasında vertikal geçiş kuvvetle muhtemeldir. Rekürrent respiratuar papillomatozisli çocukların çoğu vaginal yolla doğan bebeklerdir (45). Papillomaların ilk ortaya çıktığı ortalama yaş 3 olmasına karşın doğumda, hatta sezaryenden sonra bile vakalar kaydedilmiştir (20). Bu gözlem hastalığın muhtemelen annenin genital yolunda enfeksiyonun yukarı yayılması ile uterusu iken kazanıldığını gösterir. HPV enfeksiyonunun yeni doğana geçişini önlemede sezeryanın rolü açık değildir ve sezeryan bu amaç için tavsiye edilmemektedir. Erişkinlerde rekürren respiratuar papillomatozisin geçişi bilinmemektedir (20). Hastalık perinatal enfeksiyonun geç bir komplikasyonu olabilir veya sonradan oral-genital yolla bulaşabilir. Anogenital siğilleri olan hastalarla seksüel teması olanların yaklaşık % 64-70'inde sonradan hastalık geliştiği gözlenmiştir. Ayrıca, anogenital siğili olan hastalar çoğu kez seksüel yolla geçen diğer hastalıkların anamnezini verirler. Laringeal papillomatoza sebep olan HPV 6 veya 11'i yeni

dođanların, genital siđil veya servikal kondilom'u olan annelerin dođum kanalından geerirken aldıkları dűřünűlűr (20, 26).

2.5.3.Mukoza Lezyonları

Oral kavitedeki lezyonlar HPV tip 13 ve 32 ile iliřkili olan beyaz veya mukoza renginde, dűz veya hafifçe yűksek lezyonlardır. Bu lezyonların genelde Kuzey ve Gűney Amerika'nın yerlilerinde ortaya çıktığı bildirilmiřtir. Lezyonlar genelde birden fazladır ve spontan olarak kaybolur. Tek oral papillomlar oral kavitenin en yaygın benign epitelyal tűműrleridir. Yűzeyleri kaba papiller gűrűnűme sahip olup fibrovaskűler bir sapı vardır. Herhangi bir yařta ortaya çıkarlar ve cerrahi eksizyondan sonra nadiren tekrarlarlar. Oral kavitede birden çok papillom (HPV tip 6, 11 ile iliřkili) nadiren gűrűlűr (26).

Laringeal papillomlar en çok HPV tip 11, az bir oranda da HPV 6 ile iliřkili olup larinksin en yaygın benign epitelyal tűműrleridir. Laringeal papillomatozise eriřkinlerden çok çocuklarda rastlanır ve sıklıkla puberteden sonra kaybolur. Tipik olarak birden fazla sayıda, kűűk ekzofitik papillomlar olup cerrahi giriřimden sonra sıklıkla tekrarlarlar. Çocuklarda lezyonların hızla bűyűmesi solunum yolu obstrűksiyonuna yol açabildiđinden hayatı tehdit eden bir durum olarak kabul edilir ve asfiksiyi ۆnlemek için sıklıkla cerrahi giriřim gerekebilir. Eriřkinlerde hastalıđın seyri genellikle daha az agresiftir. Buna karřılık lezyonlar ۆzellikle radyasyon terapisi gűren hastalarda malign transformasyona uđrayabilir. Papillomalar nadiren trakea ve bronřlara ilerler (46).

2.5.4.Servikal Kanser:

HPV ile enfekte olan kiřilerin %90'ında yaklařık viral klerensin olduđu bilinmektedir. Bunun için belirli bir sűre verilememektedir. Ancak 4-6 ay ile 1-2yıl arasında gerilemenin olduđu bildirilmektedir. Ancak bu olguların %10'u progrese olarak intraepitelyal lezyon haline geçmekte; bunların da %1'i invaziv kansere dűnűřebilmektedir. Tűm CIN lezyonlarının regrese olabileceđi dűřűnűlmeli takipteki hastalar buna gűre deđerlendirilmelidir (33).

2.5.5.Epidermodysplasia verruciformis(EV):

Bu hastalık otozomal resesif bir gene bađlı olan nadir bir hastalıktır. Hűcre sel imműnitenin azalması ve HPV enfeksiyonuna duyarlılıkta artıř ile karakterizedir (47). Çocuklukta kazanılan ve ۆműr boyu devam eden enfeksiyon, deri űzerinde geniř biçimde

yayılan çok sayıda siğillerle karakterizedir (34, 48). Lezyonlar, çoğunlukla tip 3 ve 10 tarafından oluşturulan düz siğiller ve kırmızı-kahverengi maküler soyulan lekeler olmak üzere iki türdür. Bu hastalarda 20 HPV (HPV tip 5, 8, 9, 12, 14, 15, 17, 19, 20 ve 25 gibi) tipinden herhangi biri izole edilebilir (34, 49).

Bütün EV hastalarının yaklaşık 1/3'ünde, yıllar içinde skuamöz hücre karsinomu (SCC) ortaya çıkmaktadır. Bu durumda, derinin güneş ışığına maruz kalan bölgelerinde, bir veya daha fazla maküler lezyonlar gözlenmektedir. Dolayısıyla, güneş ışığının malignitenin ortaya çıkışında kritik bir kolaylaştırıcı faktör olarak görev yaptığı ifade edilmektedir. Tümörler genellikle HPV tip 5, 8 ve 14 genomunu taşımaktadır ve genellikle yavaş büyüyen in situ karsinom özelliğindedir. Bunlar, metastaz yapan invaziv SCC de olabilirler (25). Böbrek transplantasyonu yapılan kronik olarak immün sistemi baskılanmış hastaların bir kısmında ve immün sistemi yetkin bireylerin derilerinin güneşe maruz kalan bölgelerindeki SCC'lerde HPV 5 ve 8 DNA'sı bulunmuştur. Ancak, etiyolojik bir ilişki henüz kurulamamıştır (35, 49).

2.5.6. Onkogenez

HPV'lerin onkojenik potansiyelini gösteren ilk çalışmalar hayvan PV'leri ile ilgilidir. Papillomalara tümör uyarıcıları olan kimyasal kanserojenler uygulandığında malign değişim çok daha hızlı olmuştur (47). HPV'nün transforme edici özelliği hakkındaki bilgilerimizin çoğu in vitro çalışmalardan gelir. HPV tarafından oluşturulan benign lezyonlarda viral DNA, enfekte hücrelerin nukleusunda epizomal halde yani ektrakromozomal olarak lokalizedir. Saptanabilen HPV dizilimine sahip malignitelerde HPV genomu sıklıkla konak hücre genomuna integre olmuş haldedir (46). İntegrasyonun hemen daima E1 ve E2 bölgesini tuttuğu gözlenmektedir (20, 26). İntegrasyon sırasında viral DNA'nın özgül olarak E2 ORF'u bozular ve bu durum malignensinin patogenezinde rol oynar. Bilindiği gibi E ORF'u transkripsiyonu hem aktive hem de inaktive eden fonksiyonları kodlar. Bu transkripsiyonel fonksiyonlar E2'den derive proteinlerin genomun kontrol bölgesinde bulunan özgül DNA sırasına bağlanması ile düzenlenir ve böylece E6 ve E7'nin transkripsiyonu inhibe olur. Ancak integrasyon sırasında E2 bölgelerinin delesyonu ile bu repressör bölgenin inaktivasyonu, hücre transformasyonunda rol oynayan E6 proteinlerinin yapımına sebep olur. E6 ve E7 gen ürünlerinin ekspresyonunun artması diğer sellüler veya viral modifikasyonlar yoluyla da başarılabilir (33).

HPV'nun uzun kontrol bölgesindeki mutasyonların E2'den derive proteinler için bağlanma yerlerinin kaybına yol açacağı da ileri sürülmüştür. E6 ve E7 genleri tümörlerde sürekli vardır ve transkripsiyonel olarak aktiftir. Bu gen ürünleri kültürü yapılan keratinositleri transforme edebilir. Çalışmalar, HPV 16'nın E7 proteininin sellüler Rb antionkogen ürününe, E6 proteininin de P53 tümör supressör proteinine bağlandığını ve böylece P53 ve Rb proteinini inaktive ederek virüsün sellüler üremeyi ve differensiyasyonu değiştirme özellikleri kazandığını göstermiştir (45). HPV'nun konak hücre genomuna integresyonu ve hücrelerin transformasyonuna yardım eden diğer faktörler tam olarak anlaşılamamıştır. Çalışmalar kanserin uzun süren HPV enfeksiyonunun bir sonucu olduğunu göstermiştir. Servikal kanser gelişiminin 20 yıl kadar sürebileceği bildirilmiştir (46).

2.5.7.Non-melanoma Cilt Kanseri:

Melanoma olmayan (Nonmelanoma) kanserleri (NMSC: Nonmelanoma Skin Cancer) çok yaygın olarak görülür ve bazal hücre karsinomaları (BCC: basal cell carcinomas) ve skuamöz hücre karsinomaları (SCC: Squamous cell carcinomas) olmak üzere iki kısma ayrılırlar. Non-melanoma kanserleri güneş ışınlarına maruz kalmaktan kaynaklanırlar ve genellikle bölgesel olarak yayılma göstermekle birlikte diğer alanlara sıçramazlar. İmmün sistemi baskılanmış olan hastalar, güneşe maruz kalan bölgelerde siğillerin, premalignant lezyon ve NMSC (özellikle SCC) oluşması bakımından yüksek risk altındadırlar (11). HPV özellikle SCC'da potansiyel kanserojendir. Efektif tekniklerle (nested PCR) NMSC'e sahip olan ve normal immün sistemi olan hastaların %30- 40'ı HPV pozitif olabilmektedir bu oran immün sistemi baskılanmış hastalarda 2 katına kadar çıkmaktadır. Genellikle HPV pozitif olan durumlarda EV tiplerine de rastlanır fakat bu tümörlerde HPV'ye patojenik rol yüklenip yüklenemeyeceği kesin değildir. EV ile ilgili kanserlerin ve mukozal kanserlerin HPV ile ilişkisi kesin olmasına rağmen, NMSC'e sahip olan hastalarda dominant olan HPV tiplerinin kesin olarak tanısı yapılmamıştır. Çok az da olsa bazı NMSC'ler yüksek HPV DNA viral yükü taşırlar (11).

2.5.8.HPV ve HIV ilişkisi:

HIV ile enfekte hastalarda immün sistemin baskılanmış olması dolayısıyla immün sistem bütün mikroorganizmalara açık bir hale gelir. Genital HPV enfeksiyon riski HIV ile enfekte olmuş kişilerde daha yüksektir, çünkü cinsel ilişki ile bulaşan hastalıklar diğer cinsel yolla bulaşan hastalık riskinin artmasına yol açar. Buna bağlı olarak HIV'e seksüel olarak

maruz kalma riskine sahip olan kişilerde HPV'ye maruz kalma riski de artar. Servikal HPV enfeksiyonu, HIV pozitif kadınlarda HIV negatif kadınlara oranla daha fazladır. HIV pozitif kadınlarda, ısrarcı HPV enfeksiyonu, sitolojik anormallikler ve yüksek riskli displaziye sık rastlanır (11).

2.6.TANI

HPV enfeksiyonlarının tanısında; siğillerin klinik görünümü, lezyonların kolposkopi ile incelenmesi, %3-5'lik asetik asit uygulaması ile beyaz alanların görülmesi, sitolojik muayene, histopatolojik değişiklikler, viral partiküllerin elektron mikroskobu ile görülmesi, HPV antijenlerinin immunofloresan veya immünoperoksidaz teknikleri ile gösterilmesi, dokuda HPV DNA'sının tespiti gibi metodlar kullanılır (50). HPV enfeksiyonlarının tanısı önceleri sadece morfolojik kriterlere dayanılarak yapılırdı. Aynı zamanda, 1956'larda yuvarlak, vakuollü ve hiperkromatik nükleusun açık bir hale ile çevrili olduğu hücreleri, "koilositotik hücreler" olarak adlandırıldı. Displastik servikal lezyonlar, karsinoma insitu ve nadiren invaziv kanserlerde bu hücrelerin varlığını göstermiştir. Zur Hausen çalışmasında; Meisels ve Fortin'in servikste ki koilositotik hücrelerin vulvar ve vajinal kondilomatada görülen hücrelerle morfolojik olarak benzer olduğunu, bu hücrelerin düz servikal siğillerden kaynaklandığını ve bir virüsle enfekte olduğunu belirttiğini ileri sürmüştür. Bu sitolojik değişiklikler Condyloma virüsüne bağlanmış ve bu virüsün servikal kanser etiyojisi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (23).

Daha sonra PV'nin kapsid antijenine karşı hazırlanmış antiserum kullanılarak yapılan immünohistokimyasal çalışmalar, servikal displazi ve malign dokulardaki koilositotik hücrelerde HPV antijenlerinin varlığı gösterilmiştir (50). Koilositotik değişikliklerin HPV'lerin sitopatik etkisini yansıttığı kabul edilir. Koilositotik hücreler veya HPV kapsid antijenini ekspres eden hücreler özellikle düşük dereceli displazilerde bulunur. Bunların yüksek dereceli displazilerde veya kanserlerde bulunmaması viral entegrasyonu veya kapsid oluşumunu geliştirecektir. Örneğin, biotinle işaretlenmiş problemlerin duyarlılığı digoksigenin ile işaretlenmiş problemlere göre 10 kat daha düşüktür. Diğer bir avantaj ise HPV genomundaki her bir ORF'un RNA transkriptlerinin gerçek lokalizasyonlarının tespit edilmesi ile lezyonun hangi derecede olduğunu belirlemesidir. Bu metodun bir dezavantajı dokularda viral nükleik asidin az sayıda bulunduğu durumlarda veya problemin özgül olmayan şekilde bağlanması halinde yanlış sonuçlar alınabilmesidir (51).

2.6.1. İmmunolojik yöntemler:

HPV'nin kapsid proteinleri veya E6-E7 proteinlerine karşı geliştirilmiş antikorları saptamaya yönelik testlerdir, duyarlılıkları azdır. HPV 16'ya bağlı olduğu bilinen serviks kanserli hastaların %50'sinden azında antikor saptanabilmektedir. HPV 16 E7 proteini kullanılarak yapılan bir çalışmada invaziv kanserlerde önemli oranda pozitif sonuç alınırken intraepitelyal neoplazilerde hep negatif sonuç elde edilmiştir. Dolayısıyla çok güvenilir testler değildir (52).

2.6.2. Elektron Mikroskopisi ve İmmunohistokimyasal Yöntemler

Bu yöntemlerle tanı ancak HPV protein kılıfı oluşturduğunda konulur. Bu da virüsün tam bir virion oluşturduğu dönemdir. Dolayısıyla non-produktif enfeksiyonlarda tanı pek yerleri yoktur. HPV enfeksiyonlarının ancak %50'sinin tanısında yardımcıdırlar (53).

2.6.3. Moleküler Hibridizasyon

Radyoizotoplarla işaretlenmiş HPV problemlerinin elde edilmesiyle viral nükleik asit ileri teknikler kullanılarak saptanabilmiş, bu da histopatolojik olarak HPV enfeksiyonu tanısı konulmuş dokulardan PV'nün genomik dizisini elde etmeye olanak sağlamıştır. Ayrıca HPV bulgusu olmayan normal görünümlü dokularda ve çoğu servikal kanserlerde de bu yöntem sayesinde HPV DNA'sı saptanabilmektedir. Nükleik asidin (DNA veya RNA) hibridizasyon analizi HPV enfeksiyonunun rutin tanısında en iyi yöntemdir. Oldukça yüksek duyarlılığı vardır ve HPV'nin subgruplarının da ayrılmasına olanak tanır. Aslında HPV tipleri standart hibridizasyon durumunda gösterdikleri homolojiye göre tanımlanırlar; %50'den az homoloji gösteren virüsler farklı tip olarak kabul edilir. Birçok nükleik asid hibridizasyon prosedürleri geliştirilmiştir ve hepsinin birbirine göre avantajları ve dezavantajları vardır. Ancak tüm hibridizasyon testleri benzer temel prensiplere dayanarak çalışırlar (54).

DNA ve RNA molekülleri ya tek iplikçikli ya da çift iplikçikli (çift sarmal) durumda olurlar. Uygun pH, ısı ve tuz konsantrasyonunda birbirlerini tamamlayan DNA ve RNA'nın tek iplikçik molekülleri birbirleriyle çift sarmal oluşturabilirler. İki birbirini tamamlayan iplikçiğin bir araya gelişi 'anahtar-kilit' mekanizmasına benzer, doğru anahtar doğru kilidi açar. Hibridizasyon tekniğinde de bundan faydalanılarak klonlanmış prob ile tamamlayıcı viral DNA iplikçiği eşleştirilir. Ama öncesinde disosiasyon denilen yöntemle hücresel DNA dokudan çıkarılıp, iki kolu birbirinden ayrılır. Problemler işaretli olduğu için değişik metodlarla

bu birleşmeler tespit edilir. Başlıca kullanılan teknikleri; SBH, reverse SBH, northern blot, dot blot (DBH), filter in-situ ve insitu hibridizasyondur. SBH en duyarlı ve özgül tekniktir. DBH hızlı ve göreceli olarak daha ucuzdur, yanlış pozitif olasılığı yüksektir, klinik biyopsilerde ve eksfoliyate hücrelerde kullanılabilir. Filter in-situ tekniğinin de yalancı pozitif oranı yüksektir. İnsitu hibridizasyonun duyarlılığı ve özgüllüğü SBH'ya yakındır (55).

2.6.4. Hybrid Capture Yöntemi

Son yıllarda en çok polimeraz zincir reaksiyonu ve solüsyon hibridizasyon metodları tercih edilmektedir. Solüsyon hibridizasyon yöntemi olan 'hybrid capture sistemi' (HC) ikinci jenerasyon HPV tespit tekniklerindedir. Bu yöntemle 0.2 pgr kadar dahi HPV DNA'sı saptanabilmektedir (56). Bugüne kadar yapılan randomize kontrollü çalışmalar iki temel sonucu göstermektedir: SIL durumunda yüksek riskli HPV DNA negatif ise bu olgularda regresyon oranı ileri dereceye yüksek olur. Yüksek riskli HPV DNA negatif ve ASCUS saptanan hastalarda HGSIL veya LGSIL ekarte edilemez ve kolposkopik inceleme yapılması gerekir (57). Bu temel gerçeklere klinik uygulamalarla birlikte baktığımızda gerçekten HC HPV tarama testinin PAPS'den daha duyarlı olduğu; PAPS ve HPV tespiti birlikte değerlendirildiğinde %96.9'lara çıktığını görmekteyiz (58). 30 yaş üzerindeki hastalarda Amerikan kanser derneği, konvansiyonel smear ile likid bazlı sitoloji kombine edilerek 3 yıllık aralarla tarama yapılabileceğini önermektedir. Çünkü tarama intervalleri açılarak pahalı olan bu testlerin maliyetinin düşmesine de katkıda bulunabilir (59-61). 9747 hasta üzerinde yapılan bir çalışmada HGSIL'in histolojik olarak saptanmasında HC HPV testinin duyarlılığı %100 olarak gösterilmiş; bu kadınlarda başlangıçta konvansiyonel smear kullanıldığında %63.6'lık bir duyarlılık bulunmuştur. Likit bazlı sitoloji kullanıldığında %85.9 duyarlılık bulunan kadınlarda HC HPV testinin duyarlılığı %98.5 olarak tanımlanmıştır (62).

2.6.5. PCR

En önemlisi PCR olan hedef nükleik asit amplifikasyonları HPV tanısının tüm yönleri için ümit vaat etmektedir (63). Son zamanlarda geliştirilen PCR metodu, her HPV tipi için özgül primerler ve Taq polimeraz denilen ısıya dirençli polimeraz kullanılarak özgül hedef DNA sıralarının enzimatik amplifikasyonunu sağlar. Bu teknik hibridizasyon metodlarından çok daha (en az 100 kat) hassastır ve bu testle teorik olarak bir milyon hücrede tek HPV DNA molekülünü tespit etmek mümkündür. Reaksiyonun özelliği amplifiye edilecek HPV DNA dizisine uygun 2 oligonükleotid primerine bağlıdır. En yaygın kullanılan primerler HPV

genomunun L1 ORF'ü içinden seçilmektedir. Bu primerler birçok HPV tipini tanır, consensus veya genel primerler olarak adlandırılırlar (64). PCR metodunda, çift sarmallı genomun denaturasyonu, primerlerin komplementer sıralara bağlanması (annealing) ve Taq polimeraz kullanılarak yapılan ekstensiyondan oluşan sikluslar sırası ile tekrarlanır. Her siklus hedef DNA'nın miktarını 2'ye katlar. Klasik PCR'da amplifiye edilen DNA jel elektroforezde yürütülür (65).

Son ürünlerde yanlış değerlendirmeden kaçınmak için amplifiye DNA rn SBH ve DBH tekniği ile identifiye edilebilir. Jel elektroforezinde tip zgl HPV problemleri ile hibridize edilir veya amplifikasyon ürünleri tip özgül fragmanlar için kullanılan restriksiyon enzimleri ile kesilerek karakterize edilebilir. Eğer L1 ORF' HPV DNA'sının integre olduğu bir tümör hücresinde delesyona uğramışsa problem olabilir. Bu olay karsinom vakalarında sıklıkla oluşur. Bu sebeple tayin edilebilen HPV tip sayısı sınırlı olmasına rağmen E6 ve E7 ORF'leri için primer kullanımı tavsiye edilebilir. Bu metodun yüksek duyarlılığı ile ilişkili en önemli problem, sonuçları etkileyecek olan kontaminasyon riskidir. Çünkü kontaminantlar test DNA'sı gibi amplifiye olabilir. Bu kontaminasyon herhangi bir aşamada, hatta hastadan örneğin alınması sırasında da olabilmektedir. Farklı biyopsiler için aynı aletler kullanılırsa biyopsi örneklerinin çapraz kontaminasyonu olabilir. DNA'nın bir tüpten diğerine aktarılması da kontaminasyon için muhtemel kaynaktır (66). Yalancı pozitif reaksiyonların eliminasyonu için çapraz kontaminasyon olmamasına aşırı dikkat gösterilmelidir. Histolojik kesitlerde sağlam hücrelerdeki DNA'nın amplifikasyonuna yönelik metodlar geliştirilmektedir. Bu amplifiye edilen DNA'nın yerleşiminin belirlenmesi sellüler morfoloji hakkında değerli bilgiler verecektir (26).

PCR teknolojisi tüm genotipleme metodlarının ana kapısıdır. Consensus primerlerinin kullanılmaya başlanmasıyla birlikte, bireysel genotiplerin saptanması RFLP, revers hibridizasyon gibi yöntemlerle mümkün olmuştur. Alternatif olarak, E6 ve E7 polimorfizmine bağlı olarak bireysel HPV tiplerinin identifiye edilmesinde kullanılan genotip spesifik PCR primerleri kullanılabilir. Klinik rneklerdeki HPV tiplerini etkili bir biçimde gösteren genel veya consensus primerlerine bağımlı PCR yöntemleri geliştirilmiştir. Bu testler, çoğu anogenital HPV tiplerinde bulunan primer çiftlerini kullanılırlar. Farklı HPV consensus primerlerinin dizileri de bildirilmiştir. GP5+/GP6+, SPF10, MY09/11 gibi primerler HPV tiplerinin büyük bir kısmını saptayabilir ve genotipleyebilir (67).

PCR reaksiyonlarında sıcaklık döngüleri sağlamak için kullanılan cihazların (thermocyclers) hassas ölçüm aletleriyle birleştirilmesi, real-time PCR sisteminin özüdür. Real-time PCR, geleneksel PCR'in uygulama alanlarını arttırırken PCR'la ilişkili pek çok laboratuvar sorununa da çözüm getirmiştir. Bu yöntem sayesinde DNA ve RNA örnekleri kalitatif ve kantitatif olarak kısa sürede analiz edilebilmekte, çok sayıda örnek son derece az kontaminasyon riskiyle güvenle çalışılabilmektedir. Real-time PCR'da ürünlerin analizi reaksiyon sırasında yapılmaktadır. Bu nedenle, agaroz jel elektroforezi, DNA bantlarının mor ötesi ışık altında görüntülenmesi gibi işlemlerin uygulanmasına gerek kalmamaktadır. Real-time PCR ürünlerinin kalitatif ve kantitatif analizlerinde, diziye özgün olmayan floresan boyalardan ya da diziye özgün problardan yararlanılmaktadır. Böylece sonuçlar anında alınmakta, kontaminasyon riski azalarak tüm işlemler sıcaklık döngüleri başlayınca otomatik olarak devam etmektedir (68).

Real time PCR, nükleik asit amplifikasyonu ile eş zamanlı olarak artış gösteren floresan sinyalin ölçülmesiyle template miktarını kısa sürede, kantitatif olarak saptayan spesifik, duyarlı bir PCR yöntemidir. PCR'in her döngüsünde, reaksiyon sırasındaki ampikon üretimini, floresan yayılımını indikatör olarak kullanarak görüntüler. Real time PCR kantitasyonu, klasik PCR'da ürünü görüntülemek için uygulanan PCR sonrası işlemleri ortadan kaldırır. Bu da daha duyarlı sonuçların elde edilmesine olanak sağlarken, aynı zamanda kontaminasyon riskini azaltır ve potansiyel hata kaynağı olan PCR sonrası işlemleri elimine eder. Diğer yandan real-time PCR, çok daha geniş bir dinamik aralığı saptamaktadır. Dinamik aralığın genişlemesi, kantitasyonun doğruluğunu daha da arttırmıştır (69).

“Real-time PCR”ın tipik kullanım alanları patojen saptanması, gen anlatımının analizi, kromozomlardaki sayısal-yapısal bozuklukların analizi ve son zamanlarda “real-time” immüno PCR ile protein belirlenmesidir. Ticari olarak satılan birçok “real-time” cihazı vardır. Birbirleri arasındaki temel farklılıklar “eksitasyon” ve “emisyon” dalga boyları, hızı ve aynı anda paralel gidebilen reaksiyon kapasiteleridir. “Real-time PCR” teknolojisinin, kullanıcılar tarafında tercih edilen çeşitli alanlardaki önemi gittikçe artmaktadır. Gen ekspresyonunda daha hassas, verimli ve hızlı olması tercih edilmesinin sebebidir (70).

2.7. KORUNMA

2.7.1. Aşı

HPV aşıları; viral nötralizan antikor oluşturulması hedef alınarak hazırlanan ve yeni enfeksiyonlara karşı bireyi koruyucu profilaktik aşılar ve HPV ile enfekte epitelyal hücrelerde, hücrel immüneyi arttıran terapötik aşılar şeklinde ikiye ayrılabilir (71). Terapötik aşıların keşfedilmesinde erken bir evredeyiz ve çalışmalar sınırlı olarak başarı göstermiştir. Profilaktik aşılar ise, rekombinant DNA teknolojisinin ürünleridir.

1- Profilaktik aşılar nötralizan antikor oluşturmak için L1 viral kapsid proteininden oluşan virüs benzeri parçacıkları (VLP) içerirler.

2- Terapötik aşılar viral E6 ve/veya E7 onkogenlerini hedef alan spesifik T hücrelerini üretmeyi amaçlar.

2.7.1.1. Profilaktik HPV Aşıları

Profilaktik aşılar, sonradan ortaya çıkabilecek bulaşlardan bireyi koruyan ve virüsün L1 ve daha az oranda da L2 proteinlerine karşı nötralizan antikor gelişimini hedef alan aşılardır. Hücre kültürleri yapılamadığı için canlı HPV aşısı geliştirilememektedir, aşının yapımında rekombinant DNA teknolojisi kullanılmaktadır (71).

Denatüre monomerik L1, nötralizan antikor oluşturmamaktadır, ancak L1 proteini rekombinant bakulovirüs veya mantar gibi vektörlerle sunulunca, kendiliğinden VLP'ye dönüşmektedir. VLP gerçek virion yapısına benzer, immunojeniktir, ancak viral genom içermediği için zararlı değildir (71). Yüksek titrede antikor sentezi sağlar. Koruyucu aşıların özelliği tip spesifik olmasıdır. VLP'ler sadece nötralizan antikor oluşturmamakta aynı zamanda hücrel yanıtı da uyarmaktadır (72). VLP aşıları yüksek titrede nötralizan serum antikoruna ortaya çıkartır ve koruma seviyesi ile serum antikor titresi arasında korelasyon olduğundan bahsedilmektedir (72).

2.7.1.2. Terapötik HPV aşıları:

HPV enfeksiyonuna karşı koruyucu olmak üzere geliştirilmekte olan aşılar oldukça heyecan verici olsa da uzun yıllardan beri HPV ile enfekte olmuş ve benign ve malign HPV ile ilişkili hastalıklara maruz kalan kişilerin sayısı giderek artmaktadır. Varolan HPV

enfeksiyonlarına çözüm olmazsa gelecek 20 yılda şimdiki enfekte olan 5 milyon servikal kanser adayı hastanın kaybedileceği bilinmektedir. Bu nedenle etkin immünoterapiler araştırılmaktadır (73).

HPV enfeksiyonlarında karsinojenik etkiye yol açtığı düşünülen proteinler E6 ve E7'dir. Terapötik aşuların direkt olarak iki olası antijenik hedefi de bu proteinlerdir. Terapötik aşulamada amaç hücrel immünitinin uyarılmasıdır. CD4+ ve CD8+ T hücreleri uyarılarak sitotoksikite ve sitokinler aracılığı ile viral DNA'ya integre olmuş ve E6 ve E7 proteinlerini üreten enfekte hücreler yıkılır. İlerlemiş servikal hastalığın kontrolünde HPV tip 16 spesifik T-hücre cevabıyla ilgili TNF- α 'nın önemli rolü olduğuna dair kanıtlar vardır (74).

2.8. TEDAVİ

Günümüzde enfeksiyöz lezyonlarla temas etmeme dışında etkili bir korunma yöntemi bulunmamaktadır. Kondom gibi araçların korunmada bir miktar olumlu katkısı vardır. Eşlerin birlikte muayene ve sağaltımları, düşünüldüğü kadar etkin değildir. Ancak HPV'nin bulaştırıcılığı o kadar yüksektir ki, kondom kullanımı bile yetersiz kalabilmektedir. Kadınların her yıl pap smear aldırılmaları, iltihabi reaksiyon ile birlikte hücrel değişiklikler görülmesi halinde 3 ay sonra tekrarı ve yine sitopatolojik bozukluklar devam ediyorsa daha ileri tetkikler yapılmalıdır (30).

HPV enfeksiyonunun tedavisinde temel prensip, nüksleri en aza indirmek için kitlelerin mümkün olduğunca temizlenmesidir. Bu amaçla virüslere etkili ilaçlar kullanılarak lokal tedavi ve büyük lezyonların koterizasyon yoluyla yakılması şeklinde tedavi uygulanır (35).

Deri siğilleri kendiliğinden iyileşmekte, geleneksel tedavi yöntemleri olarak krioterapi, yakıcı ajanların uygulanması (podofilin, triklorasetik asit v.s.), DNA inhibitörlerinin kullanımı (5-florourasil gibi) ve cerrahi müdahaleler yer almaktadır. Bu yöntemlerin uygulanması ile kür oranı %90'ı geçmesine rağmen HPV'ler latent olarak kalabilir ve tekrarlayabilirler (29,34).

Refrakter genital siğillerin tedavisinde parenteral veya lezyon içine interferon uygulanması başarılı bulunmuştur. Solunum yolu papillomlarında interferonun sınırlı faydası görülmüştür, bunların tek tedavisi cerrahidir (25, 30). Laringeal papillomlarda lazer, dış genital yüzeyindeki siğillerde kriyoterapi ve podofilin (Etki mekanizması tam bilinmeyen

podofilinin %10'luk solüsyonu) uygulanmaktadır. Podomotoksin, podofilinden daha etkilidir. Laringeal papillomlar, dış siğiller genellikle spontan olarak kaybolduğunda aşırı skar veya kalıcı bir hasarla sonuçlanmaz. Ancak siğillerin kaybolması sıklıkla aylar veya yıllar sonra olabilir. Bu sebeple özellikle ağrılı ve büyük lezyonlar için girişim gerekebilir. Siğillerin topikal tedavisinde triklorasetik asit, salisilik asit, formalin, glutraldehit ve podophyllin gibi ajanlar yıllardır kullanılmaktadır (25,75). Topikal idoksiüridine uygulanması yaygın genital siğili olan hastalarda kısmen başarılı olmuştur. Cerrahi kriyoterapi ve elektrokoter, siğiller için en çok seçilen tedavi yöntemleridir (75). Laringeal papillomlar için cerrahi girişim gerekebilir. Lazer tedavisi inatçı genital veya solunum yolu lezyonları için kullanılır ve plantar siğiller için de son zamanlarda popüler tedavi haline gelmiştir (26). Yakın zamanlarda hem sistemik hem de lokal olarak alfa interferon ile tedavi ümit verici gözükmektedir Fakat şimdilik deneme aşamasındadır. Ayrıca psikolojik telkin ve hipnoz ile tedavi de el siğilleri için son derece etkilidir. Lezyonların tamamen eradike edilmemesi rekurrensin başlıca sebebi olduğundan tedavi için başlıca kriter, siğillerin kaybolmasından sonra normal derinin gözükmesidir. İnvaziv kanser tedavisi, hastalığın safhası ve anogenital yoldaki lokalizasyona bağlıdır (75).

Yeni laboratuvar çalışmaları; HSV timidin kinaz (HSV-TK), HSV vektörleri, HPV-16 E2 çeşitlerini ve anti-HPV hairpin ribozimlerini içeren değişik gen tedavi uygulamalarını içermektedir. Ayrıca, büyüme faktörü inhibisyonu ve endotelin reseptör antagonistleri kullanılmaktadır. Bu çalışmaların sonuçları gelişmelere olanak sağlayabilecektir ve amaç klinikte uygulanabilir hale gelmesidir (70). Hayvan çalışmalarında; prelinik çalışmalar için Ağır Kombine İmmün Yetmezlikli fare modelinde HPV tip 6 veya HPV tip 11 uyarımlı insan ksenogreftleri kullanılmıştır. HPV-6'nın E1 mRNA'sının 5' ucunun tamamlayıcısı olan ORI-1001'in HPV tip 6'nın yaptığı kondiloma inhibitör etkili olduğu gösterildi. İnsan çalışmalarında ise turpgillerde bulunan indol-3-karbinol (I3C) bileşiğinin karsinojenleri detoksifiye ettiği ve östrojen metabolizmasını değiştirdiği bildirildi (76). I3C ve metaboliti DIM'in in vitro çalışmalarda servikal kanser hücrelerinde apoptoza yol açtığı gözlemlendi (77).

3.MATERYAL VE METOD

3.1.ÖRNEKLERİN TOPLANMASI

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi jinekoloji polikliniğine başvuran premenopozal ve postmenopozal dönemde olan 50'şer kadın hastadan endoservikal örnekler, alındı. Örnek alımında steril pamuklu eküvyonlar (dacron swab) kullanıldı. Örnekler muayene yapan uzman doktor tarafından alındı. Alınan örnekler soğuk zincir gerekmeksizin Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarına gönderildi. Bu örnekler çalışılincaya kadar fosfat tamponu içerisinde, steril ependorflarda -20°C'de muhafaza edildi. Örnekler soğuk zincire uyularak; izolasyon ve PCR aşamaları yapılmak üzere IONTEK Merkez laboratuvarına (İstanbul) ulaştırıldı.

Değerlendirilen 100 hastada, kendilerinde ve birinci derecede yakınlarında servikal kanser öyküsü olmaması ve genital bölge veya deride siğilinin olmaması esas olarak alındı. Yine cerrahi menopoza girmiş veya serviksi olmayan hastalar da çalışmaya dahil edildi çünkü; amaç sadece servikste değil genital sistemdeki HPV taşıyıcılığının tespitidir. Diğer özellikler göz ardı edildi. Hastalar örnek alımı öncesinde olur formları ile bilgilendirilerek onayları alındı.

Hastalara ait bilgiler (Menopoz/Jinekoloji hastası olması, yaş, menopoz yaşı , evlenme durumu, eğitim durumu, gelir durumu, evlenme yaşı, hamilelik yaşı, hamilelik sayısı, sexüel partner sayısı, OKS/HRT kullanma öyküsü, seksüel geçişli hastalık öyküsü, sigara/içki kullanımı, diyet) hasta bilgi formundan alınmıştır. Sürüntü HPV DNA'sı açısından sırasıyla izolasyon, PCR aşaması ve tip analizi işlemlerine tabi tutulmuştur. Çalışmada kullandığımız yöntem olan Real-Time PCR "kinetic PCR" ve "homogenous PCR" isimleriyle de tarif edilmektedir. "Real-time PCR"da oluşan ürün miktarı reaksiyon boyunca oluşan ürün miktarıyla orantılı olarak artan floresan boya ve probların verdiği sinyalin izlenmesiyle anlaşılır ve amplifikasyonun devir sayısı belirli miktardaki DNA moleküllerinin elde edilmesi açısından da gereklidir (67).

3.2. GEREÇLER

3.2.1. Cam ve plastik malzemeler:

- Steril tüpte pamuklu eküvyon çubuğu
- Tek kullanımlık eldivenler
- Değiştirilebilir uçlu filtreli pipetler
- Otoklavlanmış eppendorf tüpleri (1.5 mL)
- 1.5 mL'lik tüpler için tüp stantları
- 0.5 mL/0.2 mL'lik tüpler için tüp stantları

3.2.2. Ekipman

Malzemeler:

- Fosfat tamponu solüsyonu
- Eppendorf
- Steril jelsiz taşıma ortamı
- Etanol (96–100%)
- 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpleri
- Aerosol bariyerli pipet uçları
- Mikrosantrifüj (2 ml tüpler için rotoru bulunan)
- Vakum manifoldu (Örn: QIAvac 24 manifold)
- QIAamp Vac Accessory Set
- -800-900 mbar'lık vakum oluşturabilen bir vakum pompası
- Vakum regülatörü
- RNaz A (DNaz'dan arındırılmış)
- QIAamp DNA Mini HPV PCR kiti(Fluorion)

3.3. ÇALIŞMA PROTOKOLÜ

3.3.1. Örneğin hazırlanması

Jelsiz taşıma ortamına alınan örnekler Tıbbi Mikrobiyoloji laboratuvarına ulaştırıldıktan sonra, pamuklu çubukların uçları kesilerek, çalışılincaya kadar steril ependorflarda, fosfat tamponu içerisinde -20°C'de muhafaza edildi.

İzolasyon aşamasında ilk önce hücrelerin parçalanması ve proteinlerin ortamdan uzaklaştırılması için ependorflar çözdürülüp 15 dk boyunca beklendi. Bu süre sonunda pamuklu çubuk ependorf tüpünün çeperlerine değdirilerek çıkarıldı. Ependorf tüpleri 42 derecede 1 saat boyunca tutuldu. Bir saatin sonunda ependorf tüplerindeki karışım süt beyazı renk alana kadar vortekslendi ve 15000 rpm'de 10 dk santrifüjlendi. Bu aşama sonunda 3 faz göze çarpmaktaydı en alttaki kısım fenol onun üstündeki ince beyaz tabaka protein en üstteki fazda DNA yı içeren kısımdır. Pipet yardımı ile protein tabakasına dokunulmadan üst kısım ayrı bir ependorfa alındı. Alınan kısım üzerine 500 µl %100 lük alkol konuldu ve vortekslendi. Daha sonra 13000 rpm'de 10 dk santrifüjlendi. Üst tabaka döküldü bu aşamada materyal ependorf çeperine yapışmış olarak bulunmaktaydı. Daha sonra üzerine 250 µl %70'lik alkolden konularak ve 13000 rpm de 5 dk santrifüjleme yapıldı, alkol döküldü ve ependorf tüpleri 37 derecelik etüve kaldırıldı, 10 dk bekletildi. Daha sonra 250 µl distile su ile sulandırıldı. Spektrofotometrede protein kirliliği ve DNA konsantrasyonu bakımından 25 ngr/µl'ye göre standardize edildi.

3.3.2.İzolasyon aşaması

Çalışmamızda QIAamp HPV DNA QNS mini kit (Fluorion) kullanılmıştır.

1. 20 µl QIAGEN Protease (veya Proteinase K) 1.5 ml'lik bir mikrosantrifüj tüpünün dibine koyuldu.
2. Tüpe 200 µl örnek eklendi. Örneğin hacmi 200 µl'den azsa PBS ile 200 µl'ye tamamlandı.
3. Örneğin üzerine 200 µl Buffer AL ekleyip tüpün kapağını kapatarak 15 saniye vortex'le karıştırıldı.

4. 56 °C'de 10 dakika bekletildi. Elde edilen DNA miktarı 56°C'de 10 dk.lık parçalamanın (lysis) ardından maksimuma ulaşıldı.

5. 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpünün kapağındaki damlacıkları aşağıya indirmek için kısa süreli santrifüjlendi.

6. Örneğe 200 µl etanol (%96-100) eklendi. 15 saniye vortex'le karıştırılıp; damlacıkları aşağıya indirmek için kısaca santrifüjlendi.

7. Tüpün içindeki sıvı 2 ml'lik temiz bir toplama tüpüne yerleştirdiğimiz QIAamp Spin kolonuna tüpün çeperine değmeden dikkatle koyuldu. 6000 x g (8000 rpm.) hızda 1 dakika santrifüjlendi. Altteki 2 ml'lik tüpü içinde biriken sıvıyla birlikte atıldı ve kolon temiz bir 2 ml'lik toplama tüpünün içine yerleştirildi. Solüsyonun tamamı kolondan aşağı geçmemişse, daha yüksek bir hızda, kolonda hiç sıvı kalmayınca dek santrifüjlendi.

8. Kolon dikkatlice açılıp ve tüpün çeperine değmeden 500 µl Buffer AW1 eklendi. Kapağını kapatıp 8000 rpm hızda 1 dakika santrifüjlendi. Toplama tüpü içinde biriken sıvıyla birlikte atıldı ve kolon 2 ml'lik temiz bir toplama tüpünün içine yerleştirildi

9. Kolonu dikkatlice açıp ve tüpün çeperine değmeden 500 µl Buffer AW2 eklendi. Kapağını kapatıp maksimum hızda (14 000 rpm) 3 dakika santrifüjlendi.

10. İçinde sıvı biriken toplama tüpü atılıp; QIAamp Spin kolonu yeni bir 2 ml'lik toplama tüpünün içine yerleştirilip, 14 000 rpm'de 1 dk santrifüjlendi.

11. Toplama tüpünün içinde biriken sıvıyla birlikte atılıp, QIAamp Spin kolonu 1.5 ml'lik temiz bir toplama tüpünün içine yerleştirildi. QIAamp Spin kolonunun kapağı dikkatlice açılıp, tam ortasına 200 µl Buffer AE ya da distile su koyuldu. Kapağını kapatıp 1 dakika oda sıcaklığında (15-25°C) bekletildi ve 8000 rpm hızda 1 dakika santrifüjlendi

3.4. PCR

Pürifikasyon sonunda örnekler HPV tespiti için Real-Time PCR cihazına yüklendi. Çalışmamızda kullanılan Real time PCR cihazı, Flourion detection system (Slam) olarak isimlendirilmektedir.

Tablo 3.1. Real-Time PCR aşamasında tek örnek için karışım miktarları

| | |
|--------------------------------|---------|
| Detection Mix 1 | 1.0 µl |
| dH2O | 6.5 µl |
| Örnek DNA | |
| Negatif/Pozitif Kontrol | 5.0 µl |
| Toplam Hacim | 25.0 µl |
| Detection Mix 1 | 1.0 µl |

Tablo 3.1’de 1 test için yapılması gereken pipetlemeler vardır. Çalışmamızda bu rakamları toplam örnek sayısının 1 ya da 2 fazlası ile çarparak hazırlanması gereken master mix miktarı hesaplandı. Sonra sırasıyla su, PCR Mix ve deteksiyon mix pipetlendi. Hazırlanan master mixten 20’şer µl tüplere bölündü ve her tüpe en son 5 µl izole edilmiş DNA eklenerek real-time reaksiyonuna koyuldu.

Termal protokolde sıralamaya göre:

- 1- 95°C de ilk denatürasyon (50 döngü)
- 2- 95°C de amplifikasyon
- 3- 52°C de bağlanma
- 4- 72°C de uzama-veri toplama
- 5- 60°C de erime eğrisi (75 döngü)
- 6- 22°C de sonsuz inkübasyon aşamalarından oluşmaktadır.

Reaksiyon SYBR Green kullanılarak yapıldığından erime eğrisi analizi de yapıldı. Spesifik olmayan çift zincirli DNA’nın çoğaltımında “SYBR Green I” yöntemi kullanılır. Bu yöntemde kullanılan floresan boya sadece çift zincirli DNA’ya bağlandığından çoğalan DNA miktarındaki artışa paralel olarak “real-time” PCR cihazında okunan floresanın miktarı da eş

zamanlı olarak artar. “SYBR Green I” en fazla kullanılan boya çeşididir ve 497 nm dalga boyunda yükseltgenir ve 520 nm dalga boyunda indirgenir. Amplifikasyonun başında reaksiyon karışımında çift zincirli DNA molekülü, primerler ve “SYBR Gren I” boyası bulunmaktadır. Bağlı olmayan serbest DNA molekülü çok az bir floresan ışımaya yapar. Primerler bağlanıp uzama başladığında boya molekülü çift zincirli DNA’nın arasına girer ve floresan yayılımı başlar. Başlangıçtaki döngü boyunca sinyal zayıftır; ürün miktarı arttıkça floresan miktarı hızla artar ve bu artış “real-time PCR” cihazının monitöründen izlenebilir (67).

Erime eğrisi analizi spesifik ürünleri primer dimerlerinden ayırmak için kullanıldı. Spesifik ürün 74,5 derecede zirveye ulaştı. Bundan farklı bir derecede zirveye ulaşan ürünler nonspesifik ürün olarak değerlendirildi ve onlara pozitif sonuç verilmedi.

3.5.HPV TİP ANALİZİ:

Real-time PCR’da pozitif bulunan örnekler sekans analizi için ön işlemlere tabi tutuldu. Öncelikle her bir örneğe High Pure (Roche) kiti ile PCR sonrası saflaştırma işlemi uygulandı. Saflaştırma sonrası örnekler; % 1.5’luk agaroz jelde 170 V akımda 15 dakika yürütüldü. Gene Ruler DNA Ladder Mix (1000 bp) marker ile örnekler kıyaslandı. Marker baz alınarak; örneklerin ortalama DNA konsantrasyon değerleri belirlendi ve konsantrasyona bağlı olarak örnekten alınması gereken hacim (μ l) belirlendi. Her bir örnek PCR cihazında; GP6 primeri ve Sequence Reagent Mix varlığında dizileme reaksiyonuna alındı. Dizileme reaksiyonu sonrası örnekler Sodyum Asetat ve Etilenhidroksit varlığında çöktürme işlemi uygulandı. Sekans analizi için örnekler; AB Prism 310 Genetic Analyser cihazına yüklendi. Sekans sonuçlarına BLAST analizi uygulandı ve bu şekilde tip belirlenmesi yapıldı.

Pozitif saptanan hastalar düşük riskli (tip 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72 ve 81), orta riskli (26, 31, 33, 35, 39, 51, 52, 53, 55, 56, 57, 58, 59) ve yüksek riskli (16, 18, 45, 56 ve 67) olmak üzere gruplandırılmıştır.

3.6. İSTATİSTİKSEL ANALİZ:

Verilerin analizi SPSS 8.0 paket programı ile yapıldı. Tamamlayıcı istatistikler frekans (%) şeklinde ifade edildi. Kategorik karşılaştırmalar için Fisher’s exact X^2 testi kullanıldı. Tüm sonuçlar $p < 0.05$ için istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Çalışmamızda Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı polikliniğine başvuran, 50'si premenopozal, 50'si de postmenopozal dönemde olan 100 hastadan alınan servikal sürüntü örneklerinde, HPV varlığı incelenmiş ve tip profili araştırılmıştır.

Klinik bilgiler değerlendirildiğinde HPV-DNA pozitifliğini etkilediği bildirilen şu bulgular elde edilmiştir. Bunlar ilk cinsel ilişki yaşı, ilk hamilelik yaşı ve hamilelik sayısı, seksüel partner sayısı, OKS/HRT kullanımı, sigara kullanımı, sebzedden zengin/fakir diyet, seksüel geçişli hastalık öyküsü ve kondom kullanımınıdır. Bizim çalışmamızda da hastalarda sırasıyla; yaş, medeni hal, gelir düzeyi, eğitim seviyesi, evlenme yaşı/ilk cinsel ilişki yaşı, hamilelik sayısı (multiparitenin etkisi), partner sayısı, OKS/HRT kullanımı, seksüel geçişli hastalık öyküsü, sigara/içki kullanımı ve diyet sorgulandı.

Çalışmamızda menopoz öncesi ve sonrası grupta HPV tesbiti amaçlanmıştır. Çalışmamıza katılan 100 hastadan 50'si premenopozal 50'si de postmenopozal gruptandır. Hastaların 59'u 49 yaş altında, 41'i ise 49 yaş ve üzerindedir. Menopoza girmiş sadece 1 hasta 49 yaş altındadır; o da cerrahi menopozdur. 49 yaş klimakterium dönemi için ortalama yaş olarak kabul edildiği için yaş sınırı değerlendirilmesi buna göre yapılmıştır.

Çalışmaya katılan 100 kişiden 6'sı HPV-DNA pozitif, 94'ü negatif bulunmuştur. Premenopozal grupta 2 (grup içerisinde %4) hastada, postmenopozal grupta ise 4 (yine grup içerisinde % 8) hastada HPV pozitifliği saptanmıştır. Bu gruplama ile HPV pozitifliği arasındaki ilişkinin bağımsız olup olmadığını gösteren bağımsızlık testi sonucunda (p=0.678) istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. Gruba göre HPV pozitifliği tablo 4.1 'de görülmektedir.

Tablo 4.1 Gruba göre HPV pozitifliği: (n=hasta sayısı)

| GRUP | n(%) | HPV pozitif | | HPV negatif | |
|----------------------|------------------|-------------|------------|-------------|-------------|
| | | n | % | n | % |
| Premenopozal | 50(%50) | 2 | 4,0 | 48 | 96,0 |
| Postmenopozal | 50(%50) | 4 | 8,0 | 46 | 92,0 |
| TOPLAM | 100(%100) | 6 | 6,0 | 94 | 94,0 |

Hastaların yaş dağılımı ve buna uygun HPV pozitifliği tablo 4.2’de görülmektedir. Yaş dağılımına bakıldığında, 20-34 yaş aralığında olan 14 hastada HPV pozitifliği görülmezken, 35-48 yaş aralığında olan 37 katılımcının 2’sinde, 49-54 yaş aralığında olan 33 kişinin 3’ünde ve 55 yaş ve üzerinde olan 15 katılımcının 1’inde pozitiflik saptanmıştır

Tablo 4.2 Yaş dağılımı ve buna uygun HPV pozitifliği

| YAŞ ARALIĞI | | HPV pozitif | HPV negatif |
|---------------|------------------|--------------|----------------|
| | n(%) | n | n |
| 20-34 | 14(%14) | 0(%0) | 14(%14) |
| 35-48 | 37(%37) | 2(%2) | 35(%35) |
| 49-54 | 33(%33) | 3(%3) | 30(%30) |
| 55 ve üstü | 16(%16) | 1(%1) | 15(%15) |
| TOPLAM | 100(%100) | 6(%6) | 94(%94) |

Çalışmamızda toplam 100 hastanın 59 ‘u (%59) 49 yaş altında, 41’i 49 yaş ve üzeridir. 94 HPV-DNA negatif hastadan 39’u (%95.1) 49 yaşın altında, 55’i (%93.2) 49 yaş ve üzerindedir. Pozitif olan 6 hastanın 2’si (%4.8) 49 yaşın altında, 4 tanesi (%6.7) 49 yaşın üzerindedir. 49 yaş sınırına göre HPV pozitifliği tablo 4.3’de görülmektedir.

Tablo 4.3. 49 yaş sınırına göre HPV pozitifliği

| YAŞ | HPV pozitif | | HPV negatif | | |
|---------------|------------------|----------|-------------|-----------|-------------|
| | n(%) | n | % | n | % |
| 49 yaş üzeri | 59(%59) | 4 | 6.7 | 55 | 93.2 |
| 49 yaş altı | 41(%41) | 2 | 4.8 | 39 | 95.1 |
| TOPLAM | 100(%100) | 6 | 6,0 | 94 | 94,0 |

HPV pozitif olan örnekler tiplendirilmeye alınmıştır. Bu HPV-DNA pozitif 6 kişiden 2’si tip 6 (%33), 2’si tip 45 (%33), 1’i tip 16 (%16) ve 1’i de tip 67 (%16) olarak belirlendi

100 hastanın 98’i evli, 2’si dul olarak sorgulanmıştır. Pozitif bulunan hastalar evli grup içerisinde bulunmuştur. Önceki çalışmalarda partner sayısı fazla olanlar ile HPV ilişkili hastalık öyküsü olanlarda yüksek oranda saptanmıştır fakat çalışmamızda yöresel özelliklerin de etkisi ile çok partnerli 1 hasta hariç 99 kadın tek partnerlidir. Premenopozal grupta olan bu hastada HPV negatif saptanmıştır.

Yine hastaların 78'i (%78) ya hiç okula gitmemiş (okur-yazar değil) ya da ilkokul mezunudur. 22'si (%22) ise ortaokul ve sonrası eğitim mezunudur. 5 yıl ve altı eğitim süresine sahip 78 hastanın 4'ü (%5.1) HPV pozitif saptanmıştır. Eğitim süresi ile HPV pozitifliği ilişkisi ($p=0.610$) istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Veriler tablo 4.4'de gösterilmektedir.

Tablo 4.4. Eğitim süresi ve HPV pozitifliği ilişkisi.

| Eğitim süresi | n(%) | HPV pozitif | | HPV negatif | |
|---------------|------------------|-------------|-------------|-------------|------------|
| | | n | % | n | % |
| 5 yıl ve altı | 78(%78) | 4 | %5.1 | 74 | 94.9 |
| 5 yıl üzeri | 22(%22) | 2 | %9.1 | 20 | 90.9 |
| TOPLAM | 100(%100) | 6 | %6.0 | 94 | %94 |

Katılımcıların 66'sı (%66) 1000 TL ve altı gelir düzeyine, 34'ü (%34) 1000 TL üzeri gelir düzeyine sahiptir. HPV pozitif hastaların 5'i (%7.6) 1000 TL ve altı gelir düzeyine, 1'i (%2.9) ise 1000 TL üzeri gelir düzeyine sahiptir. Gelir düzeyi ile HPV pozitifliği ilişkisi ($p=0.661$) istatistiksel olarak anlamlı değildir. Veriler tablo 4.5'de gösterilmektedir.

Tablo 4.5. Gelir düzeyi ve HPV pozitifliği ilişkisi

| Gelir düzeyi | n(%) | HPV pozitif | | HPV negatif | |
|-----------------|------------------|-------------|-------------|-------------|------------|
| | | n | % | n | % |
| 1000 TL ve altı | 66(%66) | 5 | %7.6 | 61 | %92.4 |
| 1000 TL üzeri | 34(%34) | 1 | %2.9 | 33 | %97.1 |
| TOPLAM | 100(%100) | 6 | %6.0 | 94 | %94 |

Ülkemizde ilk cinsel ilişki yaşı ile genel itibariyle hastalarda sorgulanan evlenme yaşı arasındaki paralellikten dolayı değerlendirmeye ikisi beraber alınmıştır. İlk gebelik yaşı sorgulandı ama evlilik yaşı değerlendirilmeye alındığı için değerlendirilmedi. Çalışmamızdaki 100 hastanın 65'i (%65) 18 yaşın altında evlenmiştir (ilk cinsel ilişki yaşı olarak sorgulanmıştır). Bunların 4'ü pozitif (%6.2) çıkmıştır. İlk cinsel ilişki yaşı 18 yaşın üzerinde olan 35 hastadan 2'si pozitif (%5.7) bulunmuştur. İlk cinsel ilişki yaşı ve HPV pozitifliği ilişkisi tablo 4.6'da gösterilmektedir ve istatistiksel olarak ($p=1,0$) anlamlı bulunmamıştır.

Tablo 4.6. İlk cinsel ilişki (evlenme) yaşı ve HPV pozitifliği ilişkisi

| İlk cinsel ilişki (evlenme) yaşı | n(%) | HPV pozitif | | HPV negatif | |
|----------------------------------|------------------|-------------|-------------|-------------|------------|
| | | n | % | n | % |
| 18 yaş ve altı | 65(%65) | 4 | %6.2 | 61 | 93.8 |
| 18 yaş üzeri | 35(%35) | 2 | %5.7 | 33 | 94.3 |
| TOPLAM | 100(%100) | 6 | %6.0 | 94 | %94 |

100 hastadan 78'i 22 yaş ve öncesinde ilk hamileliğini yaşarken bunların 5'i (%6.4) HPV pozitif saptanmış; 21'i 22 yaş üzerinde ilk hamileliği yaşayıp, bunların da 1'i (%4.8) HPV pozitif saptanmıştır. 1 hasta hiç hamile kalmamıştır. İlk hamilelik yaşı ile HPV pozitifliği ilişkisi tablo 4.7'de gösterilmektedir ve istatistiksel olarak (p=1.0) anlamlı bulunmamıştır.

Tablo 4.7. İlk hamilelik yaşı ve HPV pozitifliği ilişkisi

| İlk hamilelik yaşı | n(%) | HPV pozitif | | HPV negatif | |
|--------------------|----------------|-------------|-------------|-------------|--------------|
| | | n | % | n | % |
| 22 yaş ve altı | 78(%78) | 5 | %6.4 | 73 | 93.6 |
| 22 yaş üzeri | 21(%21) | 1 | %4.8 | 20 | 95.2 |
| TOPLAM | 99(%99) | 6 | %6.1 | 93 | %93.9 |

Katılımcıların hamilelik sayısı ile HPV pozitifliği ilişkisine bakılacak olursa 39 hasta 2 veya daha az sayıda hamilelik yaşamış ve bunların da 2'si (%5.1) HPV DNA pozitif saptanmıştır; veriler tablo 4.8'de gösterilmektedir. Yine 3 ve üzeri hamilelik geçirmiş 55 hastanın ise 4'ü (%7.2) HPV pozitif saptanmıştır. Bu ilişki ise istatistiksel olarak anlamlı değildir(p= 1.0).

Tablo 4.8. Hamilelik sayısı ve HPV pozitifliği ilişkisi

| Hamilelik sayısı | n(%) | HPV pozitif | | HPV negatif | |
|------------------|----------------|-------------|-------------|-------------|--------------|
| | | n | % | n | % |
| 2 ve altı | 39(%39) | 2 | %5.1 | 37 | %94.9 |
| 3 ve üzeri | 55(%55) | 4 | %7.2 | 53 | %96.4 |
| TOPLAM | 94(%94) | 6 | %6.3 | 90 | %95.7 |

HPV ilişkili hastalık (siğil vs.) öyküsü olanları çalışmaya dahil etmediğimiz için ve alkol kullanımını sorgulamamıza rağmen hastaların tümünde negatif cevap aldığımız için değerlendirmeye alınmamıştır. Hastalarda genital kanser hikayesi sorgulanmıştır, 2 hastada kanser öyküsü vardır ve bu hastalar da HPV negatiftir. Katılımcıların 3'ünde (%3) genital

enfeksiyon öyküsü bulunup bunlardan premenopozal grupta olan bir hastada (%33.3) HPV pozitif saptanmıştır ve bu da HPV tip 16'dır. Bulgular tablo 4.9' da özetlenmiştir.

Tablo 4.9. Genital enfeksiyon öyküsü ve HPV pozitifliği ilişkisi.

| Genital enfeksiyon öyküsü | n(%) | HPV pozitif | | HPV negatif | |
|---------------------------|------------------|-------------|--------------|-------------|--------------|
| | | n | % | n | % |
| Pozitif | 3(%3) | 1 | %33.3 | 2 | %66.6 |
| Negatif | 97(%97) | 5 | %5.1 | 92 | %94.8 |
| TOPLAM | 100(%100) | 6 | %6 | 94 | %94.0 |

HRT veya OKS kullanımı öyküsü ise halen veya geçmişte (OKS için 0-5 yıl/HRT için 0-12 yıl) kullanımı pozitif veya negatif olarak değerlendirildi. 10 hastada OKS kullanımı, 1 hastada da HRT kullanımı öyküsü vardır. Çalışmamızda toplam 100 hastadan 90'ı (%90) hiç OKS kullanmamıştır. Bunların 4'ü (% 4.4) HPV pozitif bulunmuştur. Geçmişte veya halen OKS kullanan 10 hastanın ise 2'si (%20) HPV pozitif saptanmıştır. Bunlardan postmenopozal grupta olan hastada tip 45, premenopozal grupta olan hastada ise tip 16 saptanmıştır. Bulgular tablo 4.10.'da özetlenmiş olup istatistiksel olarak (p= 0.109) anlamlı değildir.

Tablo 4.10. OKS kullanımı ve HPV pozitifliği ilişkisi.

| OKS kullanımı | n(%) | HPV pozitif | | HPV negatif | |
|----------------------|------------------|-------------|-------------|-------------|--------------|
| | | n | % | n | % |
| Hiç | 90(%90) | 4 | %5.1 | 86 | %95.6 |
| 0-5 yıl arası | 10(%10) | 2 | %20 | 8 | %80 |
| TOPLAM | 100(%100) | 6 | %6 | 94 | %94.0 |

Çalışmamızda toplam 100 hastadan 6'sı (%6) sigara kullanmaktadır. Sigara kullananların 1'i HPV pozitif (% 16.7) bulunmuştur. Sigara içmeyen 94 kişiden (%94) 5'i HPV pozitif (%5.3) bulunmuştur. Sigara kullanımı ve HPV pozitifliği ilişkisi, Fisher's exact test'e göre istatistiksel olarak anlamlı (p=0.317) bulunmamıştır. Bulgular tablo 4.11'de görülmektedir.

Tablo 4.11. Sigara kullanımı ve HPV pozitifliği ilişkisi: Sigara hiç kullanmamış ve halen kullanıyor şeklinde belirtilmiştir.

| Sigara kullanımı | HPV pozitif | | HPV negatif | |
|-------------------|----------------------|--------------------------|---------------------------|---|
| | n | % | n | % |
| Hiç | 94 (%94) | 5 %5.3 | 89 %94.7 | |
| Kullanıyor | 6 (%6) | 1 %16.7 | 5 %83.3 | |
| TOPLAM | 100 (%100) | 6 %6.0 | 94 %94.0 | |

HPV enfeksiyonunu etkileyen faktörlerden birisi olarak görülen diyet sorgulandığında ise, pozitif saptanan hastaların hepsinin önceki verilerin aksine meyve-sebzeden zengin beslenen grupta olduğu gözlenmiştir. Diğer bir ifade ile 100 katılımcıdan 81'i (%81) meyve-sebzeden zengin diyetle beslenmektedir ve bunların 6'sı HPV pozitifdir (%7.4). Meyve-sebzeden fakir diyetle beslenen 19 katılımcının 19'u da (%100) HPV negatif bulunmuştur. Bulgular tablo 4.12'de özetlenip diyetle HPV pozitifliği ilişkisi Fisher's exact test ile değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0.592$).

Tablo 4.12. Diyet ve HPV pozitifliği ilişkisi: Meyve-sebzeden zengin veya fakir olarak belirtilmiştir.

| Diyet | HPV pozitif | | HPV negatif | |
|------------------------------|----------------------|-------------------------|---------------------------|---|
| | n | % | n | % |
| Meyve-sebzeden zengin | 81 (%81) | 6 %7.4 | 75 %92.6 | |
| Meyve-sebzeden fakir | 19 (%19) | 0 %0 | 19 %100 | |
| TOPLAM | 100 (%100) | 6 %6.0 | 94 %94.0 | |

5.TARTIŞMA

HPV enfeksiyonu temel olarak seksüel geçişli bir hastalık olup kadın ve erkek asemptomatik taşıyıcı olarak enfeksiyonu yayabilir (78). Buna bağlı olarak enfeksiyon için risk faktörleri seksüel alışkanlıklar ile yakından ilişkilidir. Mesela cinsel yaşama erken başlama, fazla sayıda sexüel partner riski artırırken, erkeklerde sünnet ve kondom kullanımı enfeksiyon riskini azaltabilmektedir (79,80).

Kadınlarda HPV tespiti yaş yükseldikçe azalmakla birlikte en yüksek oran 20-35 yaş arasında gözlenmektedir. Anogenital bölgeden 20'den fazla farklı HPV tipi izole edilmiştir. Onkojenitelerine göre düşük, orta ve yüksek risk gruplarında sınıflandırılmaktadırlar. Düşük riskli HPV'ler (tip 6, 11, 42, 43, 44)genital kondilomlar ve LGSIL'lerden izole edilirken, orta riskli olanlar (tip 31, 33, 35, 51, 52) HGSIL ile ilişkili bulunmuştur. Yüksek riskli tipler ise invaziv servikal kanser ile ilişkilidir. Tip faktörünün yanısıra, servikal epitelde persistan enfeksiyon varlığı da onkojenik farklılaşmada önem taşımaktadır.

Dünya genelinde kadınlarda HPV prevalansı %2 ile %44 arasında tahmin edilmektedir. Değişkenliğin bu kadar fazla olması çalışılan gruplardaki yaş farklılıkları ve çalışılan metodun duyarlılığı ile açıklanmaktadır (9). Bireylerin çoğunda HPV enfeksiyonu geçici ve asemptomatik olup, bireyin virüsle ilk enfeksiyonunun % 70'i 1 yıl içinde, %90'ı ise 2 yıl içinde geriler. Amerika'da kolej öğrencileri arasında yapılan bir çalışmada yeni bir HPV enfeksiyonunun ortalama süresi 8 ay olarak değerlendirilmiştir. 6 aydan uzun süre sebat eden enfeksiyon ise yüksek yaş, yüksek riskli HPV varlığı ve birçok HPV tipi ile enfeksiyonla ilişkili bulunmuştur (81).

Ülkemizde 132 hastada yapılan bir çalışmada HPV pozitif olanlardan 27'si (%58,7) 37 yaşın altında, 19'u (%41.3) 37 yaşın üzerindedir. 33-37 yaş aralığında 9 hasta (%19.6) ile en yüksek oranda HPV-DNA pozitifliği bulunmuştur. Keskin bu çalışmasında 18-37 yaş aralığında 6 hasta, 38-57 yaş aralığında ise 3 hasta yüksek riskli HPV-DNA pozitif saptamıştır (82). Bizim çalışmamızda ise 49 perimenopozal yaş sınırı olarak kabul edilip, genelde 49 yaş altı olanlar premenopozal, 49 yaş üzeri olanlar ise postmenopozal grupta değerlendirilmiştir. Pozitif hastalarımızın 4'ü 49 yaş ve üzeri grupta (%6.7), 2'si ise (%4.8) 49 yaşın altındadır. Çalışmamızda 20-34 yaş aralığında olan 14 hastada HPV pozitifliği görülmezken, 35-48 yaş aralığında olan 37 katılımcının 2'sinde, 49-54 yaş aralığında olan 33 kişinin 3'ünde ve 55 yaş ve üzerinde olan 15 katılımcının 1'inde pozitiflik saptanmıştır. Çalışmamızdaki bu sonuç

alışlagelmiş HPV pozitifliği yüzdesinin genç yaşta daha yüksek olması ile uyumlu değildir, fakat 49 yaş ve sonrasındaki 4 hastada saptanan pozitiflik önceki verilerle uyumludur. Tablo 5.1’de ülkemizde yapılan HPV çalışmaları, kullanılan metodlar ile gösterilmektedir.

Tablo 5.1. Ülkemizde yapılan HPV çalışmaları (83).

| | n | Method | % |
|--|------|--------|-----|
| Ege SSK Hastanesi, İzmir | 1353 | HC-II | 2.1 |
| Hacettepe Üniversitesi Hastanesi, Ankara | 1032 | HC-II | 4 |
| Erciyes Üniversitesi Hastanesi, Kayseri | 230 | HC-I | 6 |
| Numune Hastanesi, Ankara | 134 | PCR | 2.2 |
| Hacettepe Üniversitesi Hastanesi, Ankara | 60 | PCR | 3.3 |
| Başkent Üniversitesi Hastanesi, Ankara | 403 | PCR | 20 |
| KSÜ Tıp Fakültesi, Kahramanmaraş | 100 | PCR | 6 |

Dursun ve ark.’nın 403 normal sitolojili hastada yaptığı çalışmada %20 oranda HPV pozitifliği görülmüştür (83). Yine Eren’in yaşları 22 ile 68 arasında değişmekte olan 61 kadın olgu üzerinde yaptığı çalışmada, hastaların % 45.9’unda HPV (+) olarak bulunmuştur. HPV DNA pozitifliğinin yaş ile ilişkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmamasına rağmen HPV DNA (+) hastaların yaş ortalamaları, HPV DNA (-) hastalara göre daha düşük gözlenmiştir (84). Koyuncu 460 hastayı değerlendirdiği çalışmasında 24 hastada pozitiflik saptamış; en yüksek HPV DNA pozitifliğini %9.9 ile 30-39 yaş arası kadınlarda bulmuştur. Yine bu çalışmada kadınlarda 40-49 yaş arası grupta HPV DNA pozitifliğinin %4.3’e düştüğü ve 50-59 yaş arasında ise %6.8 ile ikinci bir pik yaptığı gözlenmiştir (85).

De Sanjose ve arkadaşlarının yaptığı geniş çaplı bir çalışmada 70 ülkeden 346.000 kadın değerlendirilmiş, yaşa bağlı HPV prevalansı bölge ve popülasyona göre farklılık göstermiştir. Bölgelerin çoğunda HPV sıklığı 25 yaş civarında artmakta, daha yaşlı gruplarda azalma gözlenmektedir. Bazı bölgelerde ise yeni edinilmiş enfeksiyona bağlı veya reaktif olmuş latent enfeksiyona bağlı ileri yaşlarda bir yükseliş gözlenmiştir. Smith ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise yaşa bağlı HPV pozitifitesi U şeklinde bir eğri olarak göze çarpmakta, genç yaşlarda bulunan yüksek oran daha ileri yaşlarda düşmekte ve yaşlı grupta tekrar bir yükseliş gözlenmektedir (86, 87). Bazı popülasyonlarda ise bu oranda 55 yaş

üzeri kadınlarda nispeten az fakat ikinci yükseliş olması azalan immünite ve latent enfeksiyonun reaktivasyonu ile açıklanabilir (18-19). Başka bir ifade ile yeni cinsel aktif olan bir kadın ilk olarak HPV'ye maruz kaldığında prevalans artar ve sonra azalmış maruziyet ya da koruyucu immünite edinimi ile yaşlı kadınlarda azalır (88). Kostarika'da yapılan ve yaş faktörünün değerlendirildiği iki ayrı araştırmada ise bizim çalışmamızdaki gibi PCR methodu kullanılmıştır ve 16 yaş altı HPV pozitifitesi % 4.2, 16 yaş üzeri ise % 4.9 bulunmuştur. 260 postmenopozal kadını kapsayan farklı bir çalışmada ise bu oran yine benzer methodlarla % 6 bulunmuştur (18, 19). Bizim çalışmamızda elde ettiğimiz yüzde oranları ile bu sonuçlar benzerdir.

Zietkowiak ve arkadaşlarının perimenopozal ve postmenopozal gruptaki hastaları kıyaslayan çalışmasında 45-49 yaş arasında HPV enfeksiyonu, 56 yaş ve üzerine göre yüksek oranda gözlenmiştir. Bu çalışmada HPV prevalansının yaşla azaldığı sonucuna varılmış fakat menopoza sonrası görülen bu nisbi artışın nedeni bu yaşta HGSIL oranının fazla görülmesi ile ilişkilendirilmiştir (89). Brown ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise HPV ilişkili hastalıklar immün sistem değişiklikleri ile ilişkili bulunmuş ve daha ileri yaş gruplarında sık görülmüştür (90). Sturgeon ve arkadaşlarının çalışmalarında belirttiği gibi; yaş ilerledikçe HPV pozitifitesinin artması, immün sistemin zayıflığı ile veya HRT kullanımı ile de açıklanabilir. Özellikle progesteron HPV gen ekspresyonunu artırabilmektedir fakat kanser insidansı ile ilişkisi henüz tanımlanmamıştır (91).

HPV enfeksiyonunda hasta yaşı yükseldikçe yüksek riskli enfeksiyonun tekrar etme olasılığı artmaktadır. Bu durum da viral özellikler ve immünitenin azalması ile açıklanmaktadır, fakat ileri araştırmalar gerekmektedir (22, 24). Brisson ve arkadaşları yaş ile tekrar eden enfeksiyon arasında ters ilişki gözlemleyip farklı bir veri olarak 35 yaş üzerinde %15 ve 25 yaş altında % 42 olarak bulmuşlardır (92). Genç hastalarda bu yükselmiş riskin nedeni ise squamöz metaplaziye giden alanın daha geniş olması ile HPV'nin bazal tabakayı enfekte etme imkanı elde etmesi şeklinde yorumlanmıştır (93).

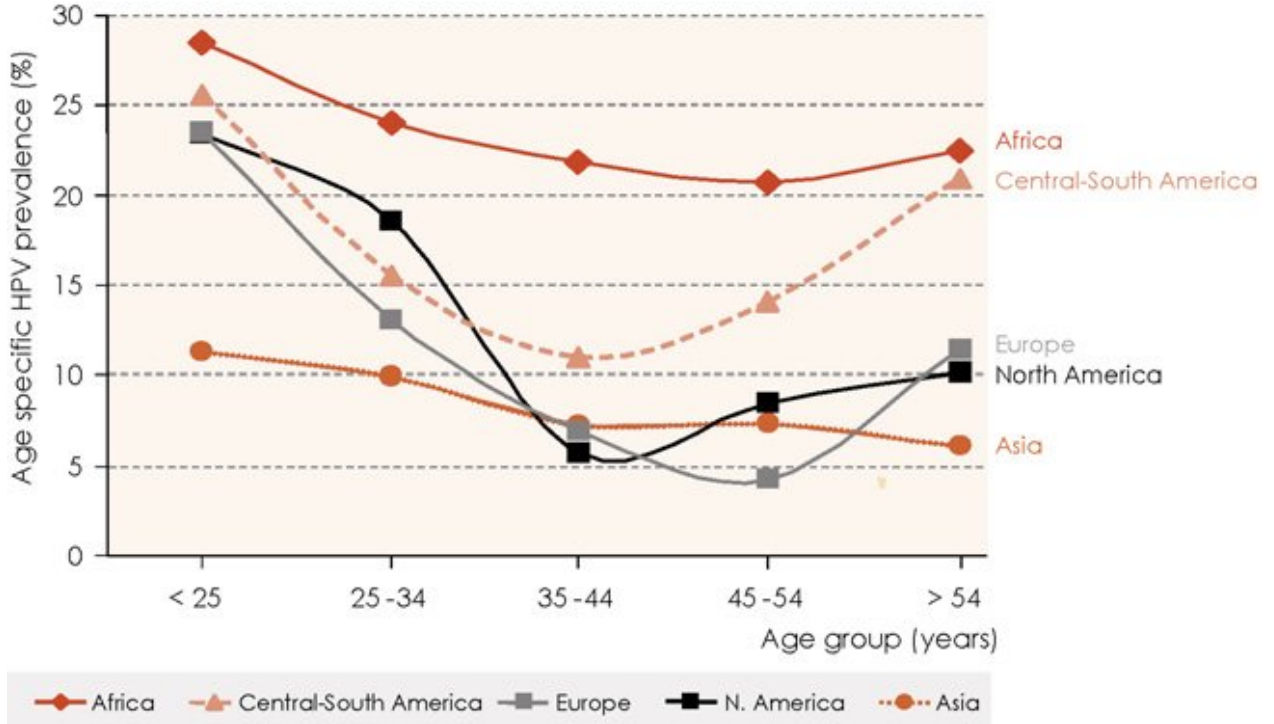
20 milyondan fazla insanın ve seksüel olarak aktif yetişkinlerin % 50'den fazlasının hayatının bir döneminde enfekte olmasıyla Amerika HPV enfeksiyonu açısından yoğun bir bölgedir. Tablo 5.2'de Amerika'da HPV enfeksiyonunun yaş aralıklarına göre dağılımı gösterilmektedir. Enfeksiyon kendiliğinden geçebilmekte veya klinik olarak belirgin şekilde geçirilmektedir (94). Seksüel aktivitenin başlamasıyla risk altında olan tüm bireylerin belirlenmesi ve hepsinin aşılması projesi halen değerlendirilmektedir(18).

Tablo 5.2.Amerika Birleşik Devletleri’nde yaş dağılımına göre HPV prevalansı(1).

| Yaş | HPV Prevalansı (%) | 95% CI |
|-------|--------------------|-------------|
| 14–19 | 24.5 | (19.6–30.5) |
| 20–24 | 44.8 | (36.3–55.3) |
| 25–29 | 27.4 | (21.9–34.2) |
| 30–39 | 27.5 | (20.8–36.4) |
| 40–49 | 25.2 | (19.7–32.2) |
| 50–59 | 19.6 | (14.3–26.8) |

CI=confidence interval

Şekil 5.1 HPV DNA prevalansını kıtalara ve yaş gruplarına bağlı olarak göstermektedir. Asya hariç diğer bölgelerde DNA tespiti genç grupta %30 oranları ile yüksek saptanmıştır (86). Dünyanın farklı bölgelerinde yapılmış çalışmalarda servikal sürüntü örneklerinden HPV DNA izolasyon oranları % 10 ile %66 arasında değişmektedir (95-97). Domfeh ve arkadaşlarının Gana’da 2002 yılında 19-57 yaş arası 75 kadında PCR testi ile yaptıkları çalışmada HPV DNA prevalansını %10.7 (8/75) olarak tespit etmişlerdir (98). En sık 17-22 yaş aralığında olup, yaşla azalmaktadır. Bu bulgu enfeksiyonun geçici olduğunun göstergesidir (99). Tutucu özellikleri olan dindar ülke toplumlarında; düzenli tek partnerle seksüel davranış ve kolaylaştırıcı faktörlerle etkileşimin az olması nedeniyle HPV cinsel yolla bulaşma yönünden düşük riske sahiptir. Fakat bu toplumlarda da artmış parite, tarama programlarının yetersiz olması riski artıran unsurlardır. Örneğin Endonezya’da 2686 hastada yapılan araştırmada %11.4 oranında HPV pozitifliği saptanmış; risk faktörleri değerlendirildiğinde ise birden fazla partnerle ilişki ve daha öncesinde servikal tarama yaptırmış olma HPV pozitifitesi ile ilişkili bulunmuştur. Aynı çalışmada 55 yaş üzeri hastalarda HPV prevalansı anlamlı derecede düşük saptanmıştır (100).



Şekil 5.1. Dünyada 5 bölgede normal sitolojili kadınlarda yaşa bağlı HPV prevalansı

Farklı kıtalarda yapılan geniş çaplı çalışmalarda ise tip dağılımı farklılıklar göstermektedir. Afrika’da yapılan bir çalışmada, sıklık sırasına göre en sık tip 16, 33, 58, 18, 31 ve tip 52 tespit edilmiştir. Yine aynı çalışmada Avrupa’da servikal kanserde HPV tip 16’nın diğer kıtalara oranla fazla görülmesi durumunu; HPV 16’nın azalmış hücrel immüniteden (malnütrisyon, HIV vs. nedeniyle) daha az etkilenmesine bağlamışlardır (101).

Önceki çalışmalarda tip 16 en sık rastlanan tip olarak görülmekte, sonra tip 18, tip 51 ve tip 31 gelmektedir. HPV 16 görülme sıklığı yaşla azalmakta, 46-55 yıl arasında tekrar yükselmekte fakat 30 yaş ve altına göre yine de daha az rastlanmaktadır. HPV tip 18 veya başka bir tip için böyle bir pattern mevcut değildir (99). HPV-16 %50-55 oranları ile CIN(+) serviksten en sık izole edilen tip olup, normal sitolojilerde %2-4 oranında görülmektedir.

HPV genotiplerini araştıran çalışmalardan bazı örnekleri incelersek; Beka ve ark.’nın yaptığı çalışmada, 418 hastadan alınan servikal sürüntü örneklerinde HPV DNA’sı araştırılmış, bu örneklerden 35 (%8,3)’inde HPV DNA düşük risk grubu, 57 (%13,6)’sinde HPV DNA yüksek risk grubu pozitif bulunmuştur. Hastaların 17 (%4)’sinde ise hem düşük hem de yüksek risk grubu pozitif bulunmuştur. Bu çalışmada Hybrid capture yöntemi kullanılmıştır (102). 34 yaş üzeri 2988 kadında yapılan geniş çaplı bir çalışmada ise PCR ile hybrid capture test sonuçları benzer bulunmuştur (2).

Koyuncu çalışmasında normal sitoloji gösteren pap smearli kadınlarda % 52.9 ile HPV 16'yı ilk sırada olarak bildirirken, % 29.1 ile HPV 18 ikinci sırada ve azalan sıklıklarla HPV 52, HPV 45'i belirlemiştir (85). Eren ise pap smear testinde hücresel değişiklik saptanmayan 23 hastadan 8'inde HPV DNA pozitifliği saptamış ve bunların 4'ünü düşük riskli HPV grubundan, 2'sini HPV tip 50, 1'ini HPV tip 30, ve 1'ini ise HPV tip 45 olarak bulmuştur (84).

Bizim çalışmamızda pozitif saptanan 6 hastadan 2'si tip 6 (%33.3), 2'si tip 45 (%33.3), 1'i tip 16 (%16.6) ve 1'i de tip 67 (%16.6) bulunmuştur. Bilindiği gibi HPV tespitinde tip 16, 18, 45 ve 56 yüksek derecede displazi ve servikal kanser oluşumu ile ilişkili olmaları nedeniyle yüksek risk tipleri olarak bilinirler. Bizim çalışmamızda da tespit edilen HPV'lerin 4'ü yüksek riskli olup (tip 16.45.67); tip 6 düşük risk grubuna dahildir. HPV tip 45'lerin her ikisi, HPV tip 67 ve HPV tip 6 tespit edilen hastalar postmenopozal grupta, HPV tip 16 ve HPV 6 tespit edilen hastalar ise premenopozal gruptadır. HPV tip 45 CIN oluşumu, tip 16 malign genital karsinoma ve CIN oluşumu, tip 67 ise vaginal intraepitelial neoplazi gelişimi ile ilişkili bulunmuştur. Tip 6 ise condyloma accuminata gelişimi ile ilişkilidir.

Çalışmamızda da görüldüğü gibi postmenopozal gruptaki hastaların yüksek risk grubundaki tipler ile enfekte olması bu hastalarda persistan enfeksiyonu akla getirmektedir. Bilindiği gibi yüksek riskli tiplerle enfeksiyon malign lezyon gelişimi için öncü olabilir (88). Sonuçlarımızın özellikle postmenopozal grupta pap smear sonuçları ile birlikte değerlendirilmesi, ısrarcı enfeksiyon hakkında daha bilgi verici olabilir ve bu hastaların ileri araştırması gerekebilir.

Çalışmamız bir başka açıdan değerlendirildiğinde hastaların çoğu en fazla ilkokul mezunudur. 100 hastanın 78'i (%78) en fazla 5 yıl eğitim süresine sahiptir ve pozitif saptanan 6 hastanın 4'ü bu gruba dahildir. Smith ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 12 yıl ve altı eğitim süresine sahip 48 hastanın %16.7'sinde HPV pozitifliği saptanmış, 12 yıl üzeri eğitim almış olan 57 hastanın ise %17.3'ünde pozitiflik görülmüştür (103). Yine Smith ve arkadaşlarının yaptığı farklı bir çalışmada HPV pozitivitesi, 12 yıldan az eğitim süresine sahip hastalarda %15.7, daha yüksek eğitimlilerde ise %11.5 oranında bulunmuştur (88).

Gelir durumuna bakılan çalışmalarda ise düşük gelir düzeyi olanlarda HPV pozitifliğinin daha fazla gözlenmiştir (88, 100). Yine geniş kapsamlı bir çalışmada kişi başı

yüksek gelir düzeyi olan ülkelerde HPV prevalansı düşük saptanmıştır (104). Bu konuda değişik bir veride ise gelir düzeyi yüksek olan ülkelerde yaşla HPV prevalansında düşüş gözlenirken, sosyoekonomik olarak daha geride olan ülkelerde yaş ve HPV pozitivitesi değerlendirildiğinde U şeklinde bir eğri elde edilmektedir (88). Bizim çalışmamızda da 100 hastanın 66'sı düşük gelir grubundan olup, 6 HPV pozitif hastanın 5'i bu gruba dahildir, fakat gelir düzeyi ile HPV pozitifliği arasında anlamlı bir ilişki saptanamamıştır.

Birçok HPV enfeksiyonu çalışmasında belirtilen risk faktörleri arasında erken evlenme veya ilk cinsel ilişki yaşının küçük olması yer almaktadır. Keskin çalışmasında ilk cinsel ilişki yaşı 20 yaşın altında olanların %51.5'ini HPV pozitif, 20'nin üzerinde olanların %10'unu HPV pozitif bulmuştur. Bu çalışmaya göre 20 yaşın altında ilk cinsel deneyim, HPV pozitifliğini 9.45 kat arttırmaktadır (82). Bizim çalışmamızda da HPV pozitif hastalarımızın 4'ü (%6.2) ilk cinsel deneyimini 18 yaş veya öncesinde yaşamıştır. Bireylerin ilk cinsel deneyimini evlenme ile yaşadığı ülkemize bu yönü ile benzeyen Endonezya'da yapılan çalışmada 18 yaş altında evlenen 505 kadından 449'u HPV negatif bulunmuş; ilk cinsel ilişki yaşı ile HPV pozitivitesi arasında anlamlı derecede ilişkili saptanamamıştır (100). Koyuncu çalışmasında erken cinsel ilişki yaşının HPV enfeksiyonu için risk faktörü olabileceğini bildirmiş ve HPV pozitif olguların % 75.6'sında ilk cinsel ilişki yaşının 20'nin altında, % 24.4'ünde ise 20 ve üzerinde olduğunu belirtmiştir (85). Eren ise çalışmasında evlilik yaşını esas alarak cinsel aktivite süresini hesaplamış ve HPV enfeksiyonu ile cinsel ilişki süresi arasında ters orantı bulmuştur. Erken ve korunmasız cinsel ilişkinin HPV gibi cinsel yolla bulaşan hastalıkların olasılığını artırdığı düşünülerek, gençler bu konuda eğitilmeli 18 yaş ve altında cinsel ilişkiye girmemeleri konusunda uyarılmalıdır.

Genç yaşlarda bu yüksek enfeksiyon oranlarına rağmen HPV ile enfekte kadınların çoğunda enfeksiyon spontan iyileşmektedir. Hastalığın ilerlemesinde viral tip, ısrarcı enfeksiyon ve hücre başına viral yük ile viral DNA'nın hücresel DNA'ya entegre olması önemli faktörler olarak kabul edilmiştir. Neoplastik farklılaşmada ise HIV ile birliktelik, uzun süreli OKS kullanımı, yüksek parite ve sigara suçlanmaktadır (1). Multiparite, önceki çalışmaların da desteklediği gibi HPV enfeksiyonu sıklığını arttıran faktörlerden birisidir (105). Franceschi ve ark.'nın yaptığı çalışmada ise yine yüksek parite, erken menopoza gibi faktörler HPV enfeksiyonu ve dolayısı ile servikal in situ karsinoma ile anlamlı derecede ilişkili bulunmuştur (104). Bizim çalışmamızda da sorgulanan 94 hastanın 55'i multipardır ve pozitif örneklerin 4'ü (%7.2) bu gruba dahildir. Çalışmamızda ilk hamilelik yaşı sorgulanmış

ve 100 hastanın 78'i 22 yaş ve altında ilk hamileliğini yaşamıştır. Bunlardan da 5'i (%6.4) HPV pozitif bulunmuştur.

HPV enfeksiyonuyla, birden fazla cinsel partnere sahip olma arasındaki güçlü ilişki çeşitli yayınlarda vurgulanmışsa da; çalışmamıza birden fazla cinsel partnere sahip olduğunu belirten sadece bir kadın dahildir ve bu hasta da HPV DNA negatif bulunmuştur. Toplam 2225 kadın ve 1140 erkek hastanın değerlendirildiği çalışmada genital HPV saptanma oranının, hayat boyu partner sayısı ve ilk ilişki yaşı ile korele olduğu belirtilmiştir. Monogamik kadınların eşlerinin partner sayısı arttıkça risk artmakta, ayrıca monogamik kadınların daha sonra partner sayısı artarsa risk yine artmaktadır (106).

OKS'ler servikal ektopiyi dolayısıyla hücrel ektopiyi ve hücrel proliferasyonu artırarak HPV'nin viral ekspresyonunu sağlamakta ve tespitini kolaylaştırmaktadır (107). Yine OKS'lerin uzun süreli HPV pozitifliği olan hastalarda servikal kanser gelişimini indükleyebileceği bildirilmiştir (108). Kostarika çalışmasında da hastalarda OKS kullanımının HPV pozitifliğini artıran bir faktör olduğu gözlenmiştir (19). Katılımcılarımızın 10'u 0-5 yıl arası OKS kullanma hikayesi vermiş, bunların 2'si (%20) HPV pozitif saptanmıştır. Bunlardan premenopozal grupta olan hastada HPV tip 16, postmenopozal grupta olan hastada ise HPV tip 45 bulunmuştur. OKS kullanımı ile HPV tespiti arasında istatistiksel olarak anlamlı bir bağlantı bulunamamıştır.

Önceki çalışmalar HRT kullanımının dolayısıyla progesteronun HPV ekspresyonu üzerinde pozitif etkili olduğunu göstermiştir. Ferenczy ve ark. postmenopozal HRT kullanan kadınlarda HPV tespit oranlarında artış gözlemiş fakat kullanım süresi dikkate alınmamıştır (109). Çalışmamızda 50 postmenopozal hastanın 1'i HRT kullanmaktadır ve bu hasta da HPV negatiftir.

Seksüel yolla bulaşan hastalıklarla koenfeksiyonun HPV progresyonunda etkili olduğu yapılan çalışmalarda bildirilmektedir (16). Castellsague ve Bosch yaptığı çalışmalarda Chlamydia trachomatis enfeksiyonunun HPV'nin oluşturduğu hücrel atipiyi ve kronik inflamatuvar süreci desteklediği sonucuna varmışlardır. Aynı zamanda bakteriyel vajinozis'in de HPV enfeksiyonuyla, dolayısı ile de hücrel atipi gelişimi ile ters orantılı olduğu bildirmişlerdir (2, 13). Çalışmamızda tanı konulmamış genital enfeksiyon öyküsü veren 3 hastadan 1'inde HPV pozitifliği bulunmuştur, bu da HPV tip 16'dır.

Castle ve Burk risk faktörlerini değerlendirdiği çalışmalarında sigara kullanımının HPV enfeksiyonu riskini artırdığı vurgulanmışlar ve mekanizmayı azalmış hücrel immüniteyle açıklamışlardır (18, 110). Chan ve arkadaşları ise sigara kullanıyor olmayı veya geçmişte kullanma hikayesini, HPV enfeksiyonu riski ile ilişkili bulurken, genç kadınlarda paket yılı ile enfeksiyon ilişkisi değerlendirilmemiştir (111). Nyari ve ark. 728 Macar kadınında HPV prevalansını araştırdıkları çalışmalarında sigara kullanmayı HPV için bir risk faktörü olarak nitelendirmişlerdir (112). Eren'in çalışmasında sigara kullanan hastaların HPV DNA pozitifliği, sigara kullanmayanlara göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (84). Bizim çalışmamızda da sigara kullanan 6 hastanın sadece 1'inde (%16.6) HPV pozitifliği bulunmuş, bu durum da istatistiksel olarak anlamlı değildir.

Çalışmamızda hastaların hiçbirisi birden fazla HPV tipi ile enfekte değildir. Hastalarda benzer özellikleri sorgulayan çalışmalarda birden fazla sayıda ve yüksek riskli tiplerle enfeksiyona değişik oranlarda rastlanmıştır. Tek veya birden çok tiple enfeksiyonda risk faktörleri aynı olup en belirgin olarak yaş ve seksüel partner sayısı gözlenmektedir (13).

Yüksek riskli HPV tiplerine (tip 16 ve 18) karşı profilaktik aşılardan kullanıma girmiştir. Aşıların etkinlik çalışmalarıyla hedeflenen servikte HPV ile ilişkili CIN gelişimine sebep olan tiplere karşı % 100 koruyucu olduğu belirlenmiştir. Bu alanda yüksek riskli tiplere örneğin; HPV tip 56 ve 90'a karşı aşılardan da uygulamaya geçmesi beklenen yeniliklerdendir (113). HPV araştırmalarında tiplendirmenin önemi gün geçtikçe artmaktadır.

1-Belirli tiplerin servikal ve diğer genital kanserlerle kuvvetli ilişkisi,

2- Bazı enfeksiyonların birçok tiple oluşması ve bu tiplerin belirlenmesi zorunluluğu,

3-HPV tiplerinin coğrafi dağılımı belirlenerek HPV aşılama programlarının oluşturulması, amaçlanan durumlardır (114). HPV enfeksiyonunda risk faktörleri seksüel davranış, HPV tipi ve madde kullanımı şeklinde kabaca özetlense de her kadın HPV enfeksiyonu ve servikal kanser riski ile karşı karşıyadır. Bu yüzden HPV taramaları ve aşılama programlarının genişletilmesi önem taşımaktadır (18). Yaş gruplarının değerlendirildiği çalışma sayısının artması ile ideal örneklem büyüklüğünün saptanmasına yardımcı olacaktır.

Sonuç olarak, menozp dönemine geçiş ile oluşan hormonal değişiklikler ve cinsel yaşam tarzı değişimlerinin kadınlarda başlıca cinsel yolla geçen HPV enfeksiyonu bulunuş sıklığına etkisini değerlendirmek amacıyla yaptığımız çalışmamızda; 100 katılımcıdan postmenozal grupta olan 4 ve premenozal grupta olan 2 hastada HPV pozitifliği saptadık.

HPV'nin servikal kanserin primer sebebi olması yanı sıra HPV enfeksiyonu cinsel yolla bulaşan en yaygın enfeksiyonlardan biridir. Kadınlarda yaşamları boyunca HPV enfeksiyonuna yakalanma riski %50'den fazladır. Özellikle yüksek riskli tiplerle HPV enfeksiyonunun servikal kanser patogeneziine etkisi bilinmektedir. Her yıl servikal kanser tanısı alan kadınlarda bir kısmının hayatları boyunca hiç Pap smear yaptırmadığı bilinmektedir.

Gelişmekte olan ülkemizde; risk faktörleri de ayrıntılı bir Şekilde sorgulanarak, korunmaya yönelik programların yaygınlaştırılması ve benzer çalışmaların özellikle risk gruplarında sayı artırılarak yapılması uygun bir yaklaşım olacaktır. HPV enfeksiyonlarının gerçek oranı ve risk tiplerinin dağılımı konusunda ayrıntılı bilgi elde edilmesi için kapsamlı araştırmalar önem taşımaktadır.

KAYNAKLAR

- 1- Steben M., Duarte-Franco E. Human papillomavirus infection: Epidemiology and pathophysiology. *Gynecologic Oncology* 107 (2007); 2-5.
- 2- Castellsague X. Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer. *Gynecologic Oncology* (2008); 100; 4–7.
- 3- Howley P.M. Papillomaviridae: The Viruses and their replication. in: Fields B.N., Knipe D.M., Howley P.M.(eds). *Fields Virology* (1996); 2045-2076.
- 4- Zur Hausen H. Human papillomaviruses. *Annu Rev Biochem* (1994); 48: 427–447.
- 5- Zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: From basic studies to clinical application. *Nature Rev. Cancer* 2. (2002); 342–350
- 6- de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, et al. Classification of papillomaviruses. *Virology* (2004);324:17–27.
- 7- Kiviatt NB., Koutsky LA. Human Papillomavirus. in: Murray PR. Baron EJ, Pfaller MA, et al. (eds.) *Manuel of Clinical Microbiology*. ASM, Washington DC.(1995), 1082-1089.
- 8- Parkin D. M., Bray F. Chapter 2: the burden of HPV related cancers. *Vaccine* (2006);24;11–25.
- 9- Bosch FX, de Sanjose S. Chapter 1: Human papillomavirus and cervical cancer burden and assessment of causality. *J Natl Cancer Inst Monogr.* (2003),(31): 3–13.
- 10- Edwards S, Carne C. Oral sex and the transmission of viral STIs. *Sex Transm Infect.* (1998);74:6-10.
- 11- Howley PM., Lowy DR. Papillomaviruses *Fields virology*, “Knipe DM, Howley PM (eds) *Papillomaviruses*”, Lippincot Williams & Wilkins, Philadelphia (2007):2231-2264.
- 12- Elfgren K, Kalantari M, Moberger B, et al. A populationbased five-year follow-up study of cervical human papillomavirus infection. *Am J Obstet Gynecol.*,(2000);183:561-567.

- 13 Bosch F X., Rohan T., Schneider A., et al. Papillomavirus research update: highlights of the Barcelona HPV 2000 international papillomavirus conference, *J. Clin. Pathol.* (2001);54;163-175.
- 14- Castellsague X, Munoz N. Cofactors in human papillomavirus carcinogenesis-role of parity, oral contraceptives, and tobacco smoking. *J Natl Cancer Inst Monogr.* (2003);3/20-28.
- 15- Bray F., Carstensen B., Moller H., et al. Incidence trends of adenocarcinoma of the cervix in 13 European countries. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* (2005); 14, 2191–2199.
- 16- Doorbar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Science* (2006);110, 525–541.
- 17- Munoz N, Bosch FX, de Sanjos'e S, et al. Epidemiological classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* (2003); 348: 518–27.
- 18- Castle PE, Schiffman M, Herrero R, et al. A prospective study of age trends in cervical human papillomavirus acquisition and persistence in Guanacaste, Costa Rica. *J Infect Dis.* (2005); 191: 1808-1816.
- 19- Herrero R, Hildesheim A, Bratti C, et al. Population-based study of human papillomavirus infection and cervical neoplasia in rural Costa Rica. *J Natl Cancer Inst.* (2000); 92: 464-474.
- 20- Mandell G.L., Bennett J.E., Dalin R. Principles and practice of infectious diseases. 4th edit. Churchill Livingstone. USA., (1995); 1379-1397.
- 21- Zur Hausen H. Infections Causing Human Cancer. Wiley-Vch. Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim (2006).
- 22- Köksal O. Jinekoloji kliniğine başvuran hastalarda HPV sıklığının araştırılması. Yüksek lisans tezi. İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi (2007).
- 23- Zur Hausen H. Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account. *Virology* (2009); 384: 260-265.
- 24- Onan A. Hpv Virolojisi, Epidemiyoloji ve Genital Kanser İlişkisi (2009); 2(1): 1-8.
- 25- Tuncer S. Ustaçelebi Ş. (ed). İnsan Papillomavirüsleri. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. 1.Baskı. Güneş Kitabevi, Ankara (1999), 797-802.

- 26- Belshe, R.B. "Textbook of human virology". Mosby year book, Inc. St.Louis, USA.(1991); 951-964.
- 27- Danos O, Katinka M, Yaniv M. Human papillomavirus complete DNA sequence: A novel type of genome organization among papovaviridae. EMBO J (1982); 1: 231-236.
- 28- De Villiers EM. Human pathogenic papillomavirus types: An update. Curr Topics in Microbiol and Immunol (1994); 186: 1-12.
- 29- Ustaçelebi Ş. İnsan papilloma virüsleri ve servikal intraepitelyal neoplazi. XXIX. Türk Mikrobiyoloji Kongresi (Antalya).bildiri kitabı, (2000), 140-141.
- 30- Eron U, Judson F, Tucker S, et al. Interferon therapy for condylomata acuminata. N Engl J Med. (1986); 315: 1059.
- 31- Ramoz N, Rueda LA, Bouadjar B, et al. Mutations in two adjacent novel genes are associated with epidermodysplasia verruciformis. Nat Genet (2002); 32: 579-581.
- 32- Antonsson A, Forslund O, Ekberg H, et al. The ubiquity and impressive genomic diversity of human skin papillomaviruses suggest a commensalic nature of these viruses. J Virol (2000); 74: 11636-11641.
- 33- Arvas M. İ.Ü.Cerrahpaşa Tıp Fakültesi sürekli tıp eğitimi etkinlikleri. Adolesan sağlığı II. Sempozyum dizisi No:63.(2008); 111-116.
- 34- Doymaz M. Z. Papovaviridae. Medikal viroloji. Nobel tıp kitapevleri, İstanbul (1994); 294-304.
- 35- Ustaçelebi Ş., Topçu W.A., Söyletir G., et al. Papillomavirusları ve İnsan siğilleri. Enfeksiyon Hastalıkları .Nobel Kitabevi. (1996); 759-761.
- 36- Stanley M. Immun responses to human papillomavirus. Vaccine (2006); 24: 16-22.
- 37- Münger K. The role of human papilomaviruses in human cancers. Front biosci.(2002);7:641-649.
- 38- Ferenczy A., Mitao M., Nagai N.,et al. Latent papillomavirus and recurring genital warts. N Eng J Med (1985); 313: 784-788.

- 39- Zur Hausen H. The role of papillomaviruses in anogenital cancer. *Scand J Infect Dis* (1990):(Suppl) 69: 107.
- 40- Wemes B.A., Levine AJ, Hovley PM. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science*(1990); 248: 76.
- 41- Beutner K.R., Tyring S. Human Papillomavirus and Human Disease. *Am J Med.*, (1997); 102 (5A): 9-15.
- 42- Baseman JG , Koutsky LA. The epidemiology of Human Papilloma Virus infection. *J Clin Virol* 2005;32 (Suppl 1) 16-24.
- 43- Boxman IL., Berkhout RJ, et al. Detection of human papillomavirus types 6 and 11 in pubic and perianal hair from patients with genital warts. *J Clin Microbiol* (1999); 37: 2270-2273.
- 44- Greer CE, Wheeler CM, et al. Human papillomavirus type distribution and serological response to HPV-6 virus like particle in patients with genital warts. *J Clin Microbiol* (1995); 33: 2058-2063.
- 45- Morrison E.A.B. Natural History of cervical infection with human papillomaviruses. *Clin.Infect Dis.*, (1994); 18: 172-180.
- 46- Murray P.R., Orew WL, Kobayashi G.S., et al. *Medical Microbiology*. Mosby company, USA., (1990); 539-546.
- 47- Balows A., Hausler WJ, Herman K.L. *Manuel of Clinical Microbiology*. 5th edit. Washington DC, (1991); 998-1004.
- 48- Jablonska J., Majewski S. Epidermodysplasia verruciformis: immunological and clinical aspects. In: zur Hausen H (eds). *Human pathogenic papillomaviruses*. Heidelberg: Springer Verlag, (1994); 157-175.
- 49- Schiffmann, MH. Epidemiology of cervical human papillomavirus infections. *Curr Topics in Microbiol Immunol.*, (1994); 186: 55-81.
- 50- Schneider, A. Gruberi, T. Diagnosis of HPV infection by recombinant DNA technology. *Clin. Obstet. Gynecol.* (1989); 127-140.

- 51- De villiers, E.M. Laboratory techniques in the investigation of human papillomavirus infection. *Genitourin Med.*, (1992); 68: 50-54.
- 52- Dunn, J., Weinstein, L., Droegemeller, et al. Immunologic detection of condyloma accuminata spesific antigens. *Obstet Gynecol.* (1981); 57: 351-356.
- 53- Uzun, Ö., Ünal, S. Güncel bilgiler ışığında enfeksiyon hastalıkları. *Bilimsel Tıp yayınevi.*, (2001); 425-443.
- 54- Lorincz, AT. Detection of human papillomavirus infection by nucleic acid hybridization. *Obstet Gynecol Clin North Am.*, (1987); 14: 451-469.
- 55- Peyton, CL., Schiffman, M., Lorincz, AT., et al. Comparison of PCR and hybrid capture-based human papillomavirus detection systems using multiple cervical specimen collection strategies. *J Clin Microbiol.*, (1998); 36: 3248-3254.
- 56- Petry, KU., Menton, S., Menton, M., et al. Inclusion of HPV testing in routine cervical cancer screening for women above 29 years in Germany: results for 8466 patients. *Br J Cancer.*,(2003); 88: 1570-1577.
- 57- Wright Jr TC, Interim guidance for the use of Human papillomavirus DNA testing as an adjunct to cervical cytology for screening. *Obstet Gynecol.*(2004); 103: 304-309.
- 58- Cuzick, J., Szarewski, A., Cubie, H., et al. Management of women who test positive for high-risk types of human papillomavirus: the HART study. *Lancet* (2003); 362: 1871-1876.
- 59- Wright, TC JR, Cox JT, Massad LS, et al. ASCCP Sponsored Consensus Conference. 2001 Consensus Guidelines for the management of women with cervical cytological abnormalities. *JAMA* (2002); 287: 2120-2129.
- 60- Bergeron, C., Jeannel, D., Poveda, J.,et al. Human papillomavirus testing in women with mild cytologic atypia. *Obstet Gynecol* (2000) ; 95: 821-827
- 61- Kim, JJ., Wright, TC., Goldie, SJ. Cost-effectiveness of alternative triage strategies for atypical squamous cells of undetermined significance. *JAMA* (2002); 28: 2382-2390.
- 62- Clavel, C., Jean-Paul, B., Nou, JM., et al. Human papilloma virus testing in primary screening for the detection of high grade cervical lesions: a study of 9747 women. *Global*

challenges and opportunities in cervical cancer prevention. International leader meeting. (2001). France.

63- Schiffman MH, Bauer HM, Lorincz AT, et al. Comparison of Southern blot hybridization and polymerase chain reaction methods for the detection of human papillomavirus DNA. J Clin Microbiol. (1991); 29: 573–57

64- Melchers, W., Ferrera, A., Willemse, D., et al. Human papillomavirus and cervical cancer in honduran women. Am J. Trop. Med. Hyg. (1994); 137-142.

65- Wright, T.C., Richard R.M. Role of Human papillomavirus in the pathogenesis of genital tract warts and cancer. Gynecol Oncol. (1990); 37: 151-164.

66- Durmaz R. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) teknolojisi ve mikrobiyolojide kullanımı. Mikrobiyol Bult., (1995); 29: 304-320

67- Günel T.: Gen anlatımının kantitatif analizi "real-time PCR", Türkiye Klinikleri J Med Sci (2007); 27: 763-767

68- Bilenoğlu O. Real Time-PCR. 12.06.2009 tarihli düzenlenen <http://www.iontek.com.tr> adresinden alınmıştır.

69- Akçalı S., Şanlıdağ T., Özbakkaloğlu B.: HBV DNA saptanmasında sıvı hibridizasyon ve Real-Time PCR yönteminin karşılaştırılması, Türk Mikrobiyol Cem Derg (2005); 35: 199-202.

70- Günel T. Gen anlatımının kantitatif analizi "real-time PCR", Türkiye Klinikleri J Med Sci (2007); 27: 763-767.

71- Tjalma WA, Arbyn M, Paavonen J, et al. Prophylactic human papillomavirus vaccines: the beginning of the end of cervical cancer, Int J Gynecol Cancer (2004); 14(5): 751-761.

72- Wang TS, Chou HF, Liu WM, et al. Semiautomated typing of human papillomaviruses by restriction fragment length polymorphism analysis of fluorescence- labeled PCR fragments. J Med Virol.(1999); 59: 536-540.

73- Smyth LJ, Van Poelgeest MI, Davidson EJ et al. Immunological responses in women with human papillomavirus type 16 (HPV-16) associated anogenital intraepithelial neoplasia

induced by heterologous primeboost HPV-16 oncogene vaccination, *Clin Cancer Res* (2004); 10(9): 2954-2961.

74- Welters MJ, de Jong A, van den Eeden SJ et al. Frequent display of human papillomavirus type-16 E6-specific memory T-helper cells in the healthy population as witness of previous viral encounter. *Cancer Res* (2003); 63(3): 636-641.

75- Joklik, W.K., Willet, H.P., Amos, D.P., et al. *Zinsser Microbiology*. 20th edit., Prentice-Hall International Inc. USA. (1992); 975-977.

76- Bell MC, Crowley-Nowick, P, Bradlow HL, et al., "Placebo-controlled trial of indole-3-carbinol in the treatment of CIN." *Gynecologic Oncology* (2000); 78: 123-129.

77- Qi M., Anderson A.E., et al. "Indole-3-Carbinol Prevents PTEN Loss in Cervical Cancer In Vivo" ,*Mol Med.*(2005) 11: 59–63.

78- Castellsague X, Bosch FX, Munoz N. The male role in cervical cancer. *Salud Publica Mex* (2003);45(Suppl 3): 345-353.

79- Castellsague X, Bosch FX, Munoz N, et al. Male circumcision, penile human papillomavirus infection, and cervical cancer in female partners. *N Engl J Med* (2002);346: 1105-1112.

80- Bleeker MC, Hogewoning CJ, Voorhorst FJ, et al. Condom use promotes regression of human papillomavirus-associated penile lesions in male sexual partners of women with cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Cancer* (2003); 107: 804-810.

81- Ho GY, Bierman R, Beardsley L. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med* (1998); 338(7): 423-428.

82- Keskin İ.S., Zekai Tahir Burak Doğumevi Cinsel Yolla Bulaşan Hastalıklar Polikliniği Hastalarında HPV DNA'sının araştırılması ve genotiplendirilmesi. Adli Biyoloji Doktora Tezi. Zekai Tahir Burak Kadın Hastalıkları ve Doğum Hastanesi,Cinsel Yolla Bulaşan Hastalıklar Kliniği,ANKARA (2006).

83- Dursun P.,Senger SS,Arslan H., et al. Human papillomavirus (HPV) prevalence and types among Turkish women at a gynecology outpatient unit. *BMC Infectious Diseases* (2009); 9:191

- 84- Eren H. Serviksin prekanseröz lezyonlarındaki HPV prevalansı. Uzmanlık tezi. Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, İSTANBUL (2007).
- 85- Koyuncu E. Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Polikliniği'ne Haşvuran Hastaların Servikal Sitolojilerin Servikal Kanser Risk Faktörlerine Göre analizi –Normal ve Anormal Sitolojik Sonuçlarda Yüksek Onkojenik HPV Prevalansı Uzmanlık Tezi. İSTANBUL (2006).
- 86- de Sanjose S, Diaz M, Castellsague X, et al. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *Lancet Infect Dis* (2007); 7: 453-459.
- 87-Smith J, Melendy A., Rashida K. R., et al. Age-Specific Prevalence of Infection with Human Papillomavirus in Females: A Global Review. *Journal of Adolescent Health* 43 (2008); 5-25.
- 88- Smith E.M., Ritchie J.M., Levy B.T., et al. Prevalence and persistence of human papillomavirus in postmenopausal age women, *Cancer Detection and Prevention* 27 (2003): 472-480.
- 89- Zietkowiak W., Zimna K., Sroka L., et al. Frequency of HPV infection of the uterine cervix among perimenopausal women in Wielkopolska Region. *Ginekol Pol.* (2002);73(11):939-944.
- 90- Brown MR, Noffsinger A, First MR, et al. HPV subtype analysis in lower genital neoplasms of female renal transplant recipients. *Gynecol Oncol* (2000); 79: 220-224
- 91- Sturgeon SR, Brinton LA, Devesa SS, Kurman RJ. In situ and invasive bulbar cancer incidence trends. *Am J Obstet Gynecol* (1992); 166:1482-1485.
- 92- Brisson J, Bairati I, Morin C, et al. Determinants of persistent detection of human papillomavirus DNA in the uterine cervix. *J Infect Dis* (1996);173:794-799.
- 93- Castellsague X, Bosch FX, Munoz N. Environmental co-factors in HPV carcinogenesis. *Virus Res* (2002); 89: 191-199.

- 94- Syrjanen K., et al. Epidemiological, clinical and viral determinants of the increased prevalence of high-risk human papillomavirus (HPV) infections in elderly women. *Eur J Gynaecol Oncol.* (2008); 29(2): 114-122.
- 95- Hopman EH, Rozendaal L, Voorhorst FJ, et al. High risk human papillomavirus in women with normal cervical cytology prior to the development of abnormal cytology and colposcopy. *Br J Obstet Gynecol* (2000); 107: 600-604.
- 96- Adam E, Berkova Z, Daxnerova Z, et al. Papillomavirus detection: demographic and behavioral characteristics influencing the identification of cervical disease. *Am J Obstet Gynecol* (2000);182:257-264.
- 97- Tachezy R, Hamsikova E, Hajek T, et al. Human papillomavirus genotype spectrum in Czech women: correlation of HPV DNA presence with antibodies against HPV-16, 18 and 33 virus-like particles. *J Med Virol* (1999); 58: 378-386.
- 98- Domfeh AB, Wiredu EK, Adjel AA, et al. Cervical human papillomavirus infection in Accra, Ghana. *Ghana Medical Journal*, (2008); 42: 71-78.
- 99- Evander M, Edlund K, Gustafsson A, et al. Human papillomavirus infection is transient in young women: a population-based cohort study. *J Infect Dis* (1995); 171: 1026-1030.
- 99- Xavier F., Ann B.N., Schiffman B., et al. Epidemiology and Natural History of Human Papillomavirus Infections and Type-Specific Implications in Cervical Neoplasia. *Cancer Epidemiology Research Program (CERP), Catalan Institute of Oncology (ICO), Barcelona/Spain. Salud publica de Mexico.* (2003); 45: 326-329.
- 100- JN Vet et al. Prevalence of human papillomavirus in Indonesia: a population-based study in three regions. *British Journal of Cancer* (2008); 99: 214-218.
- 101- Espinosa BG., et al. Genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with cervical lesions in Bioko, Equatorial Guinea. *Diagnostic Pathology* (2009); 4:31.
- 102- Beka H, Önel M, Önel D, et al. Jinekoloji kliniğine başvuran hastalarda HPV DNA'nın Nükleik asit Hibridizasyon yöntemi ile araştırılması. 1. Ulusal Viroloji kongresi Konferanslar ve Bildiriler kitabı. (2003); 343.

- 103- Smith E.M., Johnsona S.R., D., Feddersena D.,et al. Persistent HPV infection in postmenopausal age women. *International Journal of Gynecology and Obstetrics* (2004); 87, 131-137.
- 104- Franceschi S, Herrero R, Clifford GM, et al. Variations in the age-specific curves of human papillomavirus prevalence in women worldwide. *Int J Cancer* (2006); 119.
- 105- Sapy T., Poka R., Szarka K. Age-specific prevalence of high-risk human papillomavirus infection in a Hungarian female population with positive cytology. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 138 (2008); 194-198.
- 106- Bosch FX, Castellsague X, Munoz N., et al. Male sexual behavior and Human Papillomavirus DNA: key risk factors for cervical cancer in Spain. *J Natl Cancer Inst* (1996);88(15): 1060-1067.
- 107- de Villiers EM. Relationship between steroid hormone contraceptives and HPV, cervical intraepithelial neoplasia and cervical carcinoma. *Int J Cancer* (2003);103: 705-708.
- 108- Mandelblatt J, Richart R, Thomas L, et al. Is human papillomavirus associated with cervical neoplasia in the elderly? *Gynecol Oncol* (1992); 46: 6-12.
- 109- Ferenczy A, Gelfand MM, Franco E, et al. Human papillomavirus infection in postmenopausal women with and without hormone therapy. *Obstet Gynecol* (1997);90: 7-11.
- 110- Burk RD, Kelly P, Feldman J, et al. Declining prevalence of cervicovaginal human papillomavirus infection with age is independent of other risk factors. *Sex Transm Dis* (1996); 23: 333-341.
- 111- Chan WK, Klock G, Bernard HU. Progesterone and glucocorticoid response elements occur in the long control region of human papilloma virus-16. *J Virol* (1989); 63: 3261-3269.
- 112- Nyari T, Cseh I, Woodward M., et al. Screening for human papillomavirus infection in asymptomatic women in Hungary. *Human reproduction*.(2001); 16: 2235-2237.
- 113- Dempsey AF. Human Papillomavirus: The Usefulness of Risk Factors in Determining Who Should Get Vaccinated. *Rev Obstet Gynecol.* (2008); 1(3): 122-128.
- 114- Doeberitz MvK. Human Papillomaviruses and cervical cancer (e-book). Cilt.23-s273.