

T.C.
İstanbul Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Onkoloji Bilimleri Enstitüsü
Genel Onkoloji Ana Bilim Dalı
Kanser Etiyolojisi Bilim Dalı

Servikal Kanserli Hastaların Sitolojik
Materyallerinde İnsan Papilloma Virüs Enfeksiyonunun
Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Yöntemiyle Araştırılması

Doktora Tezi

T44786

H. Derya Karaloğlu
İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Haluk Onat

İstanbul 1995

TEŞEKKÜR

Enstitümüzde uygun çalışma ortamını sağlayan Enstitü Müdürü Sn. Prof. Dr. Erkan Topuz'a,

Temel Bilimlere verdiği önemle, bizlere öncülük eden Sn. Prof. Dr. Nijad Bilge'ye,

Tez çalışmamın gerçekleşmesinde beni yönlendiren ve destekleyen danışman hocam Sn. Prof. Dr. Haluk Onat'a,

Çalışmalarım süresince değerli fikirleri, eleştiri ve katkılarıyla her konuda yardımını gördüğüm Anabilim Dalı başkanımız Sn. Prof. Dr. Nejat Dalay'a,

Olguların sitopatolojik incelemesi ve değerlendirilmelerinde yardımcı olan Sn. Doç. Dr. Canan Alatlı'ya,

Örneklerin sağlanmasında yardımlarını esirgemeyen Sn. Prof. Dr. Gökhan Töre, Sn. Doç. Dr. Işık Aslay, Sn. Doç. Dr. Maktav Dinçer ve Sn. Dr. Fulya Yaman'a,

Çalışmamın her aşamasında yardım ve desteği ile yanımda olan arkadaşım Araş. Gör. Sn. Hülya Yazıcı'ya,

Tez çalışmalarım süresince büyük bir özveri ile her konuda yardımcı olan bütün arkadaşlarıma teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

1 * Giriş ve Amaç	1
2 * Genel Bilgi	4
2.1. Papillomavirüsler	5
2.2. Serviksin tümöral lezyonları ve HPV ilişkisi	9
2.3. Papillomavirüs hücre etkileşimi	14
2.4. HPV saptanmasında kullanılan metodlar	17
3 * Materyal Metod	21
3.1. Materyal	21
3.2. DNA izolasyonu	24
3.3. Elektroforez işlemi	26
4 * Bulgular	32
5 * Tartışma	40
6 * Özet	46
7 * İngilizce Özet	47
8 * Kaynaklar	48
* Özgeçmiş	57

1. GİRİŞ

Serviks karsinomu kadınlarda görülen kanserler arasında meme kanserinden sonra ikinci sırada yer almaktadır. Kadın genital sistem kanserleri içinde üzerinde en çok araştırma yapılmış olan bu kanserin görülme sıklığının 40 yaş üzerindeki kadınlarda % 2 olduğu bildirilmektedir (2,14,43). Preinvaziv ve invaziv lezyonların sitolojik olarak erken tanı ve tedavisi mortalite oranında düşüş sağlamıştır (3,56). Bugün serviks karsinomu % 95 oranında tedavi edilebilen kanserler arasında kabul edilmektedir (43). İlk kez 1928'de Papanicolaou'nun serviks ve vagina kanserlerinin tanısı için geliştirdiği "Pap test" (Papanicolaou) günümüzde hala serviks karsinomu taramasında kullanılan en başarılı testtir (31,58).

Son kırk yıl içinde Pap smear testi sayesinde serviks karsinomundan ölümlerde % 70 lik bir azalma sağlanmıştır (2).

Hastalık Panama, Brezilya ve Çin gibi gelişmekte olan ülkelerde yaygındır (1,15,43,66). Buna karşılık son 30 yıllık dönemde Amerika ve Batı Avrupa'daki birçok gelişmiş ülkede serviks karsinomunun görülme sıklığında düşüş gözlenmektedir (1,53). Uterus-serviks karsinomu Hindistan'da kadınlarda en sık görülen kanserdir. Yılda 90.000 den fazla kadının bu kansere yakalandığı bildirilmektedir (12,13,43). Görülme sıklığındaki bu farkların toplumun gelişmişlik derecesi, sağlık hizmetlerindeki farklılıklar, korku ve bilgisizlik gibi çeşitli faktörlerden kaynaklandığı ileri sürülmüştür. (1). A.B.D.de invaziv serviks karsinomunun ırklara (siyah ve beyaz) ve topluluklara göre farklılıklar

gösterdiği belirtilmiştir (1,14). A.B.D.' de her yıl bu hastalıktan 14.000 kadının öldüğü, ayrıca 50.000'den fazla kadında da intraepithelial neoplazi saptandığı bildirilmektedir (35). İngiltere'de her yıl beş milyondan fazla servikal smear incelemesi sonucunda olguların % 5'inde anormallik saptanmış, bunların % 10 nunda da displazi geliştiği bildirilmiştir (9). 1980-1984 yılları arasında Avrupa Topluluğu ülkelerinde serviks karsinomundan ölüm sayısının yılda 13.000 den fazla olduğu ve ölüm oranının da % 4 olduğu açıklanmıştır. Bu ülkelerde yaygınlaşan tarama programları sonucunda 30 ila 60 yaş arası kadınlarda ölüm oranları %40-63 arasında düşüş göstermiştir (53).

Ülkemizde 1985-1990 yılları arasında 16 merkezin katılımıyla yapılan incelemede, serviks karsinomunun kadınlardaki tüm kanser olguları içindeki oranı % 3.7 olarak verilmiştir (4). 1992 yılında yayınlanan bir başka istatistiksel çalışmada ise aynı oran % 4.6 olarak bildirilmiştir (26).

Tüm kanserlerde olduğu gibi serviks karsinomu etyolojisinde de neden tam olarak bilinmemekle birlikte, günümüzde devam etmekte olan çeşitli klinik, histopatolojik ve epidemiyolojik araştırmalara göre serviksin pre-malign lezyonlarının varlığı ile seksüel yolla geçen etkenlerin bu konuda önem taşıdıkları belirtilmiştir (41,42). Hastalığın etyolojisine yönelik olarak yapılan çalışmalarda özellikle insan papillomavirüslerinin (HPV) bazı tiplerinin önemi vurgulanmıştır. Selim, prekanseröz ve kanserli serviks doku ve sitolojik örneklerinde çeşitli HPV tiplerinin saptanmış olması, bu konuda viral karsinogenez mekanizmasının önemine işaret edilmektedir. Kanserli hastalardan alınan biyopsi ya da sitolojik materyallerde sıklıkla HPV 16, HPV 18, HPV 31 ve HPV 33

tiplerine ait virüs genomları saptanmıştır. Bu çalışmalar HPV'lerin bazı gruplarının onkogenik kabul edilmesini, epidemiyolojik ve etyolojik araştırmaların yönlendirilmesini sağlamıştır (44,52).

Türkiye'de serviks karsinomlarının viral etyolojisine yönelik hemen hiçbir çalışma bulunmamaktadır.

Bu çalışma serviks karsinomlu hastalarda HPV enfeksiyonunun saptanması ve karsinom ile HPV 16 ve 18 tiplerinin ilişkisini araştırmak amacıyla planlanmıştır. Çalışmada servikal fırça ile elde edilen materyalde, en duyarlı saptama yöntemi olarak bildirilen PCR seçilmiştir.

2.GENEL BİLGİ

Serviks karsinomu etyolojisi üzerinde pek çok varsayımlarileri sürülen bir kanser türüdür (27,70,73). Yaklaşık yüz yıldan bu yana seksüel aktivitenin serviks karsinomu gelişmesinde önemli rol oynadığı belirtilmektedir.

Epidemiyolojik ve klinik araştırmalarda erken yaşta evlilikya da erken yaşta cinsel ilişkiye başlama, seksüel partner sayısı, düşük sosyo-ekonomik koşullar, kötü hijyen, smegma, sigara kullanımı gibi çeşitli faktörlerin yanısıra, seksüelyolla geçen infeksiyöz etkenlerin ve servikal intraepithelial neoplazi lezyonlarının bu kanserin gelişmesinde etkili olduğu bildirilmektedir (19,44,48,69).

Virüslerin insan genital sistemi kanserlerindeki rolü ilk kez 1968'de Rawls ve ark. tarafından serviks karsinomlu hastalarda HSV-2 infeksiyonuna karşı yüksek antikor düzeylerinin bulunmasıyla gösterilmiştir (73). Daha sonraki geniş kapsamlı epidemiyolojik incelemeler bu virüsün serviks karsinomu gelişmesinde çok önemli bir etken olmadığı görüşünü ortaya koymuştur (14,27,44,70). Pekçok incelemede Cylamidia, Cytomegalovirus ve İnsan Papilloma Virüslerin (HPV) serviks karsinomunda etyolojik açıdan önemli etkenler olduğu vurgulanmıştır (1,11,43,68).

Son 10 yıldır geliştirilmiş olan moleküler ve virolojik araştırma yöntemleri ile, onkogenik potansiyele sahip ve serviks karsinomu olgularında etkili olduğu ileri sürülen buvirüslerin varlığı ve özellikleri belirlenebilmektedir

(57, 59,60,61,62,63). 1976'da genital bölgede infeksiyöz etken olan HPV'lerin bazı tiplerinin serviks karsinomu gelişmesinde etkili olduğu zur Hausen ve ark. tarafından ilk kez bildirilmiştir (50,73,). Bu virüsler insanlarda genital bölgede kondiloma olarak adlandırılan genital siğillerde, deride epidermodisplazi verruciformiste (EV), penis, vulva ve serviks tümörlerinde, mesane ve oral karsinomlarda saptanmıştır (5,11,54,69,71).

2.1. PAPILOMAVİRÜSLER

Papillomavirüsler papovaviridae ailesinden, fare Polyoma- virüs, Simian Virüs 40 (SV 40) ve İnsan Virüsleri BK ve JC'yi de kapsayan küçük DNA virüsleridir (56). Genellikle türe spesifiktirler ve enfekte ettikleri doğal konaklarında siğiller, papillomlar veya fibroepitelial tümörler ile yassı epitel hücreli tümörler oluştururlar (45,69,70). İnsanlardaki HPV tipleri özellikle epidermal veya mukozal lezyonlarla ilişkilidir (34,73,74).

Papillomavirüsler üzerindeki çalışmalar moleküler biyoloji yöntemlerindeki gelişmelere bağlı olarak son yirmi yıl içinde hızlanmıştır. Moleküler düzeyde yapılan incelemeler HPV'lerin yapısı ve etki mekanizması hakkında ayrıntılı bilgi edinmemizi sağlamıştır (51,75).

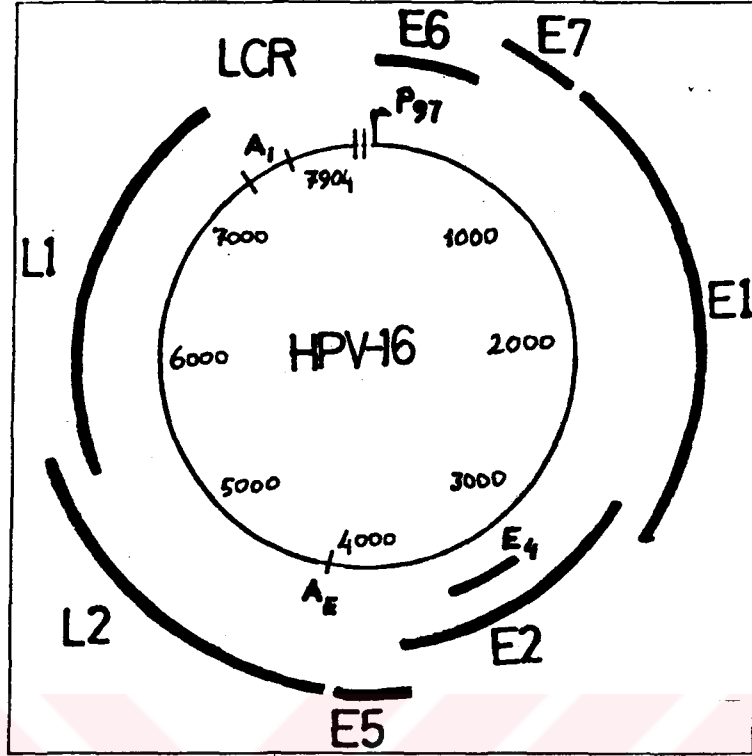
Diğer virüslerden farklı olarak serolojik testler ile HPV'leri tiplendirmek mümkün olamamıştır. Papillomavirüsler ancak nükleotid dizilerindeki farklılıklara ve buldukları konağa göre sınıflandırılmaktadır. Bu tip sınıflama ile şimdiye kadar 60 ın üzerinde HPV tipi tanımlanmış ve

bunların çoğunun da genital bölgeyi enfekte ettiği bildirilmiştir (7,11,68,69,74).

Papillomavirüsleri in vitro olarak üretmek de mümkün olma mıştır. Bunun nedeni virüs-konak etkileşiminin çok karmaşık olması ve sonuç olarak doku kültüründeki hücrelerin HPV ile enfekte edilmesinin güçlüğüdür (56,70). İzole edilen bir papillomavirus diğer tipler ile %50 den daha az çaprazhibridizasyon gösterdiğinde farklı bir tip olarak sınıflandırılmaktadır (35,64).

HPV'ler 55 nm çapında, 20 yüzlü (ikosahedral) kapsid ile, çift zincirli halkasal DNA molekülü içeren DNA virüsleridir. Virüsün içerdiği DNA molekülü 7900 baz çifti (5200 kD) uzunluğundadır (Şekil 2.1). HPV'ler diğer bazı virüs sınıfları ile karşılaştırıldığında oldukça küçüktür. Örneğin, Herpes Virüs grubunun genomu yaklaşık 100 kD büyüklüğündedir (16,52,56,70).

Papillomavirüsler benzer DNA organizasyonu gösterirler. HPV genomu üzerinde protein kodlayan bölgeler ORF (Open Reading Frame) olarak adlandırılır. Bunların DNA'nın tek zinciri üzerinde bulunduğu saptanmıştır. Bütün haberci RNA'lar (m RNA) tek DNA zincirinden sentezlenir (45,56). HPV genomu iki farklı bölgeden yapılmıştır. Bu bölgeler "Erken" (E) ve "Geç" (L) bölgeler olarak adlandırılır. Erken bölgelerin 7 gen (E1-E7), geç bölgelerin ise 2 gen (L1-L2) kodladığı bilinmektedir (56). Erken bölge, HPV enfeksiyonunun ilk aşamasında rol alan ve viral replikasyonu başlatan bölgedir. Bu bölge DNA replikasyonu, transkripsiyon ve hücrel transformasyonla ilgili viral proteinleri kodlar,



Şekil 2.1. Human Papillomavirus Genom Yapısı

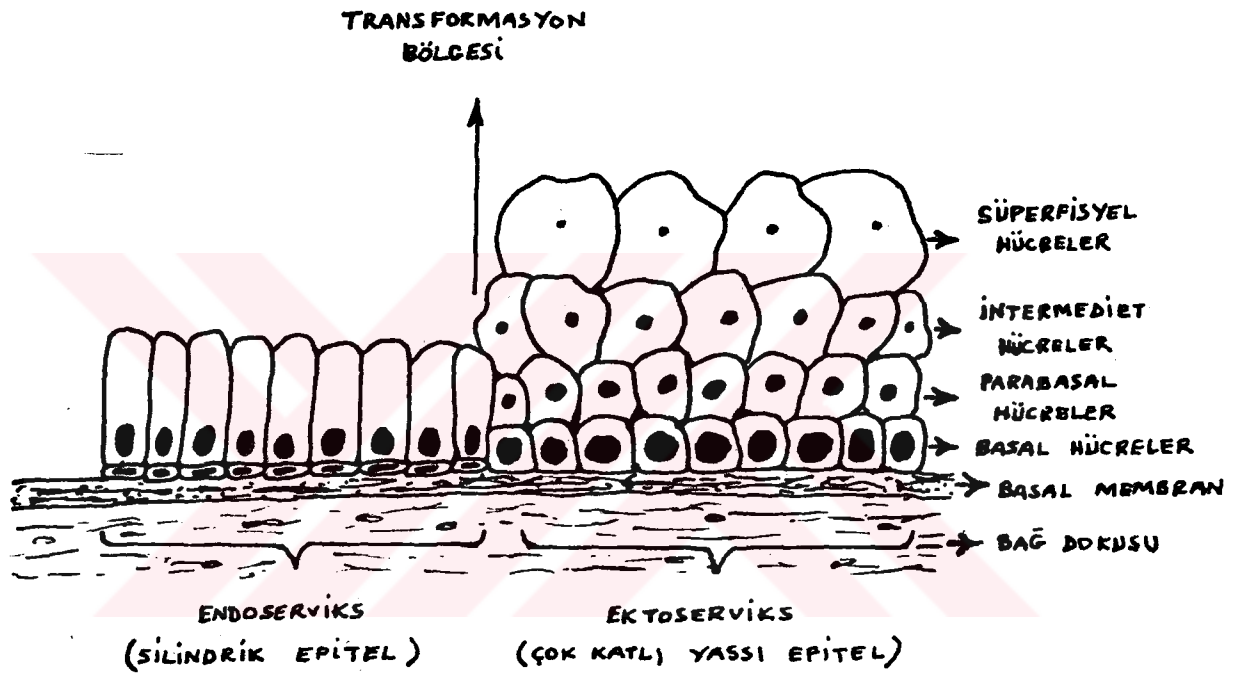
geç bölge ise viral kapsid proteinlerini kodladığı düşünülen iki uzun ORF içerir (24,30,45). Bütün HPV genomları protein kodlayıcı bölge taşımayan 600-900 baz çifti uzunluğunda URR (upstream regulatory region) olarak adlandırılan bir bölgeye sahiptir. L bölgesinin sonu ile E bölgesinin başı arasında yer alan bu bölgenin düzenleyici sinyaller taşıdığı, bunun da DNA replikasyonu ve viral genlerin ekspresyonunda rolü olduğu belirtilmiştir (56,74). E bölgesinin bazı kısımları virüsün etki mekanizması açısından önemlidir. E1 en uzun ORF bölgesidir ve viral genomun epizomal replikasyonunda önemli olduğu gösterilmiştir (66). E2 ORF bölgesinin düzenleyici proteinler kodlayan genler taşıdığı, özellikle E6 ve E7 bölgelerinin gen ekspresyonunu düzenleyici role sahip olduğu belirtilmiş, dolayısıyla viral veya hücrel gen

ekspresyonunu değiştirerek transformasyon ya da onkogeneizde rol oynadığı kabul edilmiştir (24,74) .

E2 nin kodladığı proteinlerin viral URR de spesifik DNA dizilerine bağlandığı gösterilmiştir. E2 proteinlerinin amino ucunun düzenleyici işlevinin bulunduğu belirtilmiştir (66). E6 ve E7 ORF ler en çok incelenmiş bölgelerdir. HPV ile enfekte hücrelerin nükleusunda gösterilmiş olan bu bölgelerin transformasyonda etkili olduğu ileri sürülmektedir (62,67). Serviks karsinomlarından elde edilen hücre soylarında E6 ve E7 proteinlerini kodlayan m RNA lar saptanmıştır (7,50). Özellikle HPV 16 ve 18'in bulunduğu tümör dokuları ve hücre soylarıyla yapılan çalışmalarda E6 ve E7 nin transformasyona neden olan asıl genler olduğu bildirilmiştir (10,23,35,57, 59,60). E6 ve E7 bölgelerinin önemli bir özelliği de bu bölgelerin ürünleri olan proteinlerin tümör baskılayıcı genler ile etkileşimde bulunabilmeleridir. Onkogenik HPV tipleri taşıyan hücre soylarıyla yapılan çalışmalarda E6 proteininin konak hücre proteini p53, E7 nin ise retinoblastom gen ürününe (Rb) bağlandığı gösterilmiştir (37,42,). HPV 16 ya da 18 in E6 ve E7 bölgelerine ait genler Adenovirus E1A ve SV 40 büyük T antijenine ait genler ile homoloji gösterir (70,75). L1 ve L2 ORF bölgelerinin büyük ve küçük virüs kapsid proteinlerini kodladığı bilinmektedir. Bu proteinlere karşı oluşturulan antikörler ile HPV enfeksiyonunun saptanması mümkün olmaktadır (18,56).

2.2. SERVİKSİN TÜMÖRAL LEZYONLARI VE HPV İLİŞKİSİ

Serviks mukozası iki değişik tip epitelden yapıldır. Ektoserviks adını alan dış bölüm çok katlı yassı epitel ile, endoserviks adını alan iç bölüm ise tek katlı silindirik epitel ile döşelidir (46). Bu iki epitelin birleştiği bölge transformasyon bölgesi olarak adlandırılır (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Serviks epiteli şematik görünüm

Serviks mukozasında değişik tümöral lezyonlar görülür. Servikste en sık rastlanan selim tümörler kondilomlardır. Bir tür virütik papillom olan kondilomlar saplı ya da geniş tabanlı kitleler biçiminde olabildiği gibi düz lezyonlar olarak da görülebilmektedir (Resim 2.1).



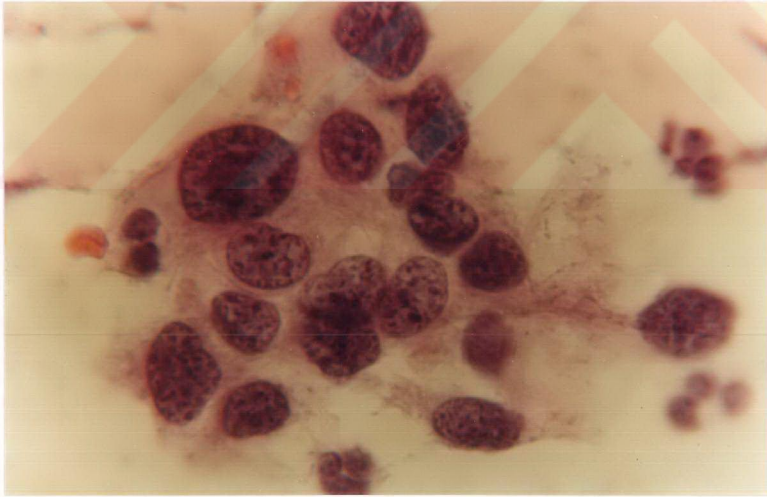
Resim 2.1. Kondilom

Serviksteki neoplazik değişiklikler; servikal intraepithelial neoplaziler (CIN), karsinoma in situ (CIS) ve invaziv karsinomlar olarak değerlendirilmektedir.

Servikal displazi olarak da adlandırılan CIN'ler serviksteki çok katlı yassı epitel hücrelerinin atipi bulguları göstermesi ile karakterizedir. Hücre atipisinin derecesine göre hafif, orta ve ağır servikal displazi olarak değerlendirilirler. Bu terimler CIN I, CIN II ve CIN III tanımlamalarıyla eşanlamlı olarak kullanılmaktadır. İntra-epithelial neoplazilerde değişik derecelerde hücre atipisi olmasına karşın hücre farklılaşması bozulmamıştır. Serviks karsinomu gelişmesinde "servikal intraepithelial neoplazi (CIN)" olarak tanımlanan yassı epitel değişikliklerinin rol oynadığı, yassı epitel hücreli tümörlerin, displazi olarak da adlandırılan

bu lezyonlardan kaynaklandığı düşünölmektedir (15,41,46,48).

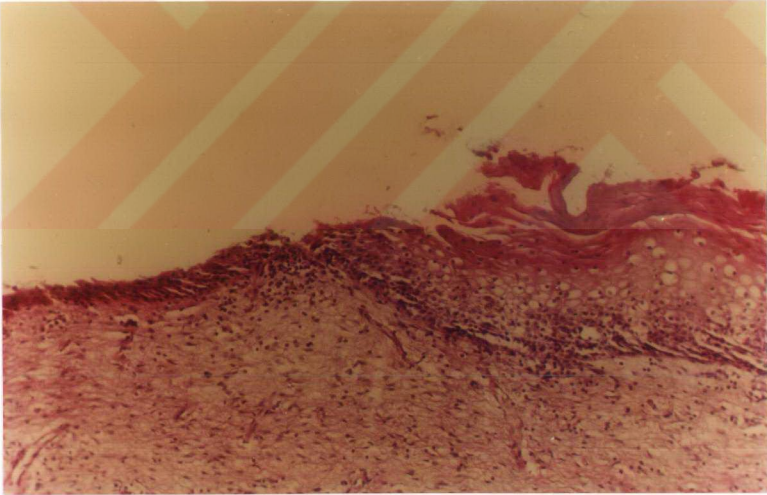
Karsinoma in situ (CIS) olarak adlandırılan değışiklik ise atipik epitel hücrelerinin herhangi bir düzeyde farklılaşma göstermeksizin, bütün epitel tabakası içinde dağılım göstermesidir. Bazal tabakada düzensizlik vardır, ancak atipik hücre çoğalması bazal membranı aşarak bağ dokusuna geçmemiştir. Bazı araştırmacılar CIN III ile CIS'i tek grup olarak kabul etmekte ve buna göre tedavi uygulamaktadırlar. İnvaziv karsinomlar sürekli çoğalan atipik epitel hücrelerinin bazal membranı aşarak bağ dokusu içinde düzensiz kitleler oluşturması ile karakterizedir. Bunlar; yassı epitel hücreli karsinom (epidermoid karsinom), adenokarsinom ve bu iki tipin birlikte görüldüğü adenoskuamöz karsinomlardır (Resim 2.2). Serviks karsinomlarının yaklaşık %90'ı çok katlı yassı epitel tabakasından gelişen yassı epitel hücreli karsinomlardır (63).



Resim 2.2. Serviks karsinomu (sitolojik Materyal)

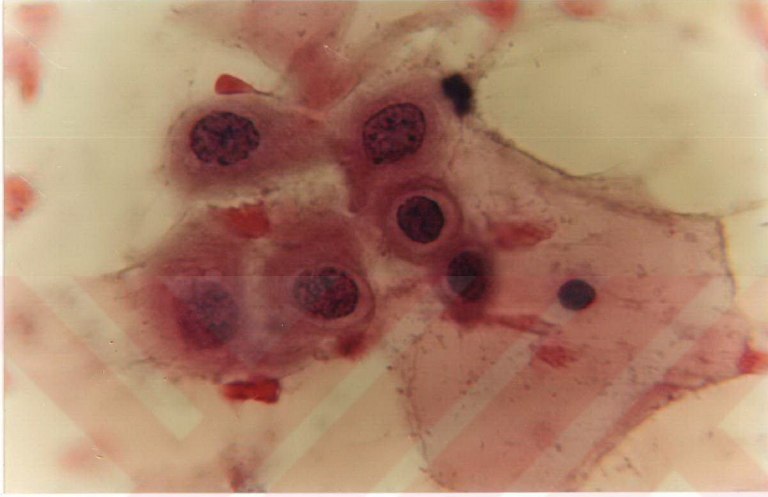
Endoserviksi döşeyen silindirik epitelden gelişen adenokarsinomlar ile hem yassı epitel, hem de silindirik epitel yönünde farklılaşma gösteren adenoskuamöz karsinomlar daha az oranda görülürler.

Serviks neoplazilerinin serviksteki yassı epitel ile silindirik epitel arasındaki transformasyon bölgesinden çıktığı kabul edilmektedir (Resim 2.3) (53,39). Bu bölgenin enfeksiyon, kötü hijyen, travma gibi çeşitli iritan faktörlerin etkisiyle erozyona uğradığı ve bunun iyileşmesi sırasında endoserviks epitelinin metaplaziye uğradığı bilinmektedir. Metaplazi sonucu ortaya çıkan hücreler hızlı proliferasyon gösteren olgunlaşmamış yassı epitel hücreleridir. Bunların kanserojen ajanlardan, özellikle de HPV den en kolay etkilenen hücre grubu olduğu belirtilmektedir (43).



Resim 2.3. Serviks epiteli transformasyon bölgesi

Servikste görülen HPV enfeksiyonu selim, premalign ve malign lezyonlar şeklinde kendini gösterir. Bu lezyonların mikroskopik olarak en önemli ortak özelliği koilositozdur (Resim 2.4).



Resim 2.4. Koilosit

HPV enfeksiyonunun mikroskopik göstergesi olarak kabul edilen koilositoz, olgun süperfisyel yada intermediet hücrelerin perinükleer vakuolüstasyon, yoğun ve düzensiz boyanan periferik sitoplazma ve nükleer dejeneratif değişiklikler göstermesi olarak tanımlanır (46). Koilositotik atipi bu değişikliklerin yanısıra çekirdek büyümesi ve hiperkromazi gösteren hücreler için kullanılan bir tanımlamadır (46). Atipik olmayan koilositoz daha çok kondilom gibi selim lezyonlarda görülmektedir. Atipik koilositoz ise displaziler, in situ ve invaziv karsinomlarda saptanan bulgudur. Serviksin selim, premalign ve malign

lezyonlarında değişik HPV tipleri ayırt edilmiştir. HPV 6 ve 11 genellikle kondilomlar ve CIN I de, görülmektedir. HPV 16 ve 18, CIN II ve CIN III ile invaziv karsinomlarda yüksek oranda saptanmaktadır (22, 40,41,46,58). HPV 31,33,35 ve daha sonra tanımlanan HPV 39,45,51, 52,56 gibi tipler yine yüksek gradlı CIN'lerle, karsinomlarda ancak daha az oranda gözlenmiştir. HPV 16'nın daha çok serviksin yassı epitel hücreli karsinomlarında, HPV 18'in ise adenokarsinomlarda daha yaygın olduğu bildirilmektedir (39). HPV 6 ve 11 hücrelerde epizom halde, 16 ve 18 ise DNA'ya integre şekilde bulunmuştur (55,72).

2.3. PAPILOMAVİRÜS HÜCRE ETKİLEŞİMİ

Papillomavirüslerin hücre ile etkileşimi şu şekilde olmaktadır:

Viral partiküller mukoza epitelinin aşınmış küçük bir kısmından bazal tabakadaki hücrelere geçer. Virüsün hücreye girişi endositoz ya da pinositozla olmaktadır. Burada virüs kılıfını atar ve bu şekilde viral mRNA transkripsiyonu ya da viral genom replikasyonu için uygun ortam sağlanmış olur.

Enfeksiyondan sonraki ilk aşama viral DNA replikasyonu için gerekli düzenleyici proteinlerin ve enzim proteinlerinin sentezlendiği, hücrenin uyarıldığı evredir (8,54). Erken viral proteinlerin sentezi düşük miktarlardadır, bu aşamada geç proteinlerin sentezi yoktur. İkinci aşamada ise virüs çoğalmaya başlar. Bu evre genellikle replikasyon yapan viral genomla ilgili nükleoproteinlerin, viral membran glikolipidlerinin sentezlendiği evredir. Farklılaşma başladıkça HPV

DNA'sının replikasyonu belirgin derecede uyarılır. Epizomal DNA nukleusta birikmeye başlar. Daha yüzeyel hücre tabakalarında L1 ve L2 kapsid proteinleri sentezlenir. Hücre keratinosit şeklinde dökülünce virüs başka bölge ya da başka insanları enfekte eder (8,57).

HPV enfeksiyonunun maligniteye ne şekilde yol açtığı kesin olarak bilinmemekle birlikte, HPV ile enfekte premalign lezyonların karsinoma dönüşümündeki muhtemel aşamalar şunlardır (35):

1. HPV DNA' sının konak hücre genomuna integrasyonu sonucunda HPV genlerinin ekspresyonunun değişmesi: İntegrasyon genellikle viral genomun bir parçasının delesyonu ile birlikte görülür. Örneğin, HPV 16 ve 18 DNA'sının integrasyonunun viral molekülün E2 ORF bölgesindeki açılma ile olduğu belirtilmiştir. E2 proteininin E6 ve E7 gen ekspresyonunu düzenleyici fonksiyona sahip olduğu, dolayısıyla bu bölge delesyonunun viral gen ekspresyonunu değiştirerek transformasyon ya da onkogeneizde rol oynadığı ileri sürülmektedir (74,75).

2. Onkogen ya da normal hücresel genlerin aktivasyonu: Bazı protoonkogenlerin aktivasyonunun HPV'nin komşu integrasyonu ile gerçekleştiği belirtilmektedir. İntegrasyon bölgesinin önemli olduğu, selim ve premalign lezyonlarda epizomal DNA'ların, malign lezyonlarda ise integre viral DNA'ların gösterilmesiyle açıklanmaktadır (8,72). İntegrasyon sonucunda viral genomun büyük bir kısmının özellikle geç (L1 ve L2) ve erken bölgelerin bazı bölümlerinin kaybolduğu, E6 ve E7 gibi karsinomlarla ilişkili bölgelerin kaldığı belirtilmiştir (7,75).

3. Tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu: Özellikle HPV lerin E6 ve E7 bölgelerinin ürünü olan proteinlerin tümör baskılayıcı gen ürünleriyle etkileştikleri gösterilmiştir. Bu proteinlerin p53 ve Rb gen ürünleriyle bağlanarak hücre proliferasyonunun kontrolü ile ilgili olan bu genlerin inaktivasyonunu sağladığı ve hücre büyümesi kontrolünün kaybına yol açtıkları belirtilmektedir (24,38,75).

4. İmmün denetim sistemindeki değişiklikler: HPV ile meydana gelen lezyonlarda konak immünitesi önemli rol oynar. Vakaların çoğunda selim lezyonlar oluştuğu, bunların bazen kalıcı olabildiği gibi, sonuçta gerilediği bilinmektedir. Viral yolla oluşan lezyonların immün sistemin etkisiyle gerileyebilmelerine rağmen, HPV DNA' sının normal hücrelerde muhtemelen latent formda kalarak immün gözetimden kaçtığı belirtilmiştir (66).

Normal konağın günümüzde HPV enfeksiyonuna karşı immün cevabı hakkındaki bilgiler yeterli değildir. HPV'ye bağlı servikal lezyonların proliferasyonlarını sınırlayan normal immün denetimden kaçmaları, bunların karsinoma ilerlemesini sağlamaktadır. HPV 16 ve 18 içeren premalin servikal lezyonların epitelinde antijen içeren en önemli hücre tipi olan Langerhans hücrelerinin sayısında azalma gözlenmesi, HPV'lerin lokal immün supresyon oluşturduğunu düşündürmektedir (70). HPV ile ilişkili CIN'li hastalarda lokal T hücre azalması ve supressör/sitotoksik T hücre oranında azalma gösterilmiştir.

İmmün denetimin baskılanması HPV ile enfekte lezyonların neoplastik transformasyonuna neden olabilmektedir. Ayrıca onkogenik ve selim

HPV tipleri arasındaki önemli bir fark da bunların normal immün denetimden kaçabilmeleridir (70).

2.4. HPV SAPTANMASINDA KULLANILAN METODLAR

Servikal örneklerde HPV enfeksiyonunu saptamak ve tiplerini belirlemek için çeşitli moleküler biyoloji yöntemleri kullanılmaktadır. Bu yöntemleri duyarlılıkları ve özellikleri yönünden şu şekilde karşılaştırmak mümkündür (49) .

Southern Blot:

Hücre ya da doku preparatlarında HPV DNA'sını saptamada kullanılan bir yöntemdir. Çalışılacak örnekten izole edilen DNA molekülü, restriksiyon enzimleri ile kesilir ve parçalar agaroz gel elektroforezi ile ayrılır. DNA daha sonra blotting işlemi ile hibridizasyon membranına aktarılır ve işaretli HPV DNA'sı ile hibridizasyona bırakılır. Yöntemde her bir hücrede hücre DNA'sının % 1'i ila % 0.1'i oranındaki HPV dizileri saptanabilmektedir. HPV tiplerinin her biri bu yöntemle belirlenebilmektedir. Yöntemin uygulaması zaman alıcıdır ve kullanılacak DNA miktarı fazladır (yaklaşık 10 µg) (36,49).

Dot-Blot hibridizasyon:

Bu yöntemde izole edilen genom DNA'sı restriksiyon enzimleri ile kesilmez. Direkt olarak membrana emdirilir ve ilgili HPV problemleriyle hibridizasyona sokulur. Duyarlılık her hücrede HPV genomundan tek kopyayı saptayabilecek düzeydedir. Ancak yöntem sınırlı sayıda HPV

tipini saptayabildiği ve uygulama sırasındaki koşullara bağlı olarak yanlış pozitif reaksiyonlar görülebildiğinden güvenilirliği değişebilmektedir. 0.3-1.0 µg DNA gerektirir (36,49).

Filter in-situ hibridizasyon:

DNA izolasyonuna gerek olmayan bu yöntemde hücreler direkt olarak membrana emdirilir. Yöntemin hassasiyeti dot-blot ve Southern blot yöntemlerine göre daha düşüktür. Örnekteki HPV DNA'sı ancak bir hücre ya da hücre kümesinde yoğunlaşmış ise (yaklaşık 10^4 - 10^5 mol. düzeyinde) saptanabilmektedir (49).

Northern Blot :

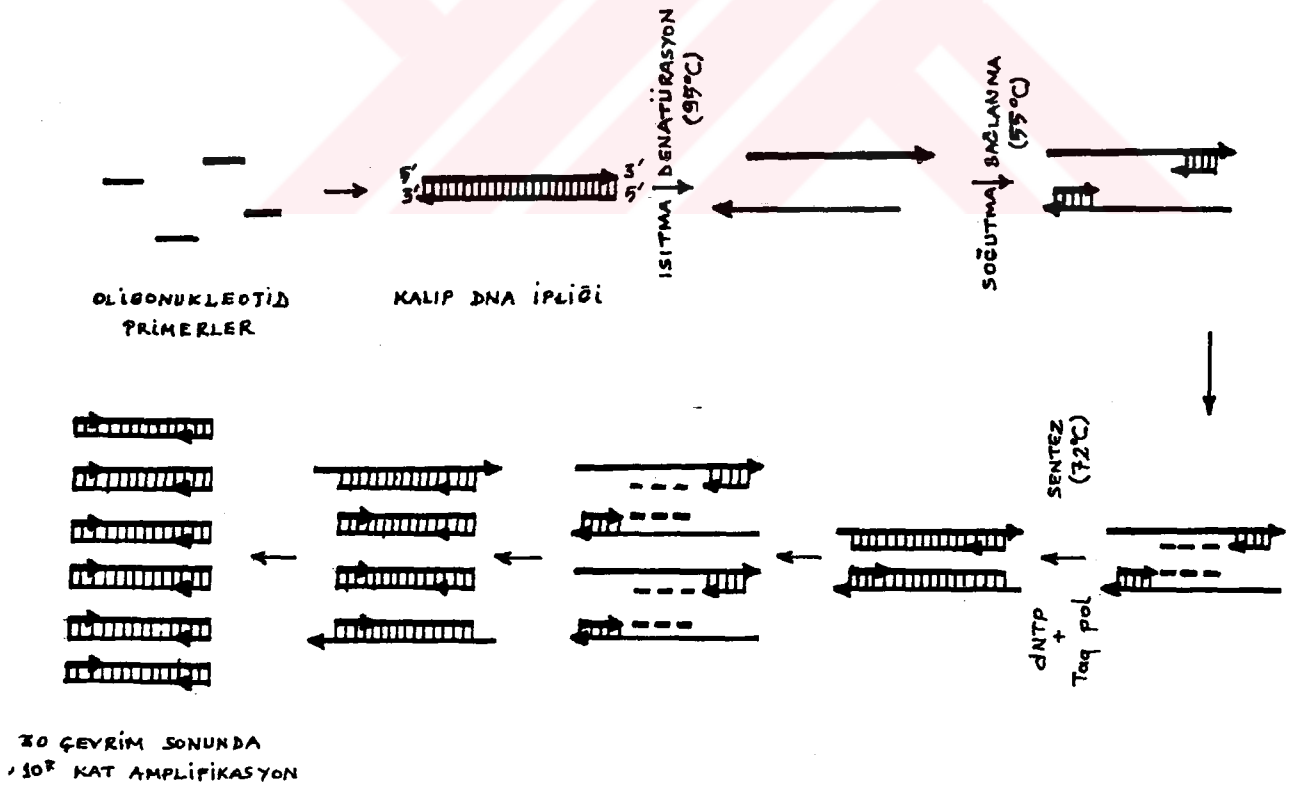
Southern blot yöntemine benzeyen bu yöntemde HPV RNA'sını tanımlamak mümkündür. Teknik güçlükler ve deney süresinin uzunluğu nedeniyle, yöntem klinik uygulamaya elverişli değildir (49).

In situ hibridizasyon:

Bu yöntemde sitolojik preparatlar ile doku kesitlerindeki DNA ya da RNA saptanabilmektedir. Doku, hücreler veya kromozomlar lam üzerinde fikse edilir ve radyoaktif ya da kimyasal olarak işaretlenmiş proplar kullanılarak hibridizasyon testleri yapılır (17). Yöntem ile her hücrede HPV genomunun yaklaşık 20-800 kopyası saptanabilmektedir ancak rutin çalışmalarda kullanılmaya uygun değildir. Seçilecek tekniğe ve deneyime bağlı olarak farklı sonuçlar elde edilebilmektedir. HPV negatif hücrelerin çok olduğu ortamda testin hassasiyeti düşüktür (66,49).

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR):

Yukarıda belirtilen tüm yöntemlere karşın en duyarlısıdır. PCR ile diğer yöntemlerle saptanamayacak seviyedeki HPV genomuna özgü fragmentlerin çoğaltılarak belirlenebilecek düzeye getirilmesi sağlanır. PCR yönteminde, kalıp DNA ipliği, sentetik oligonükleotid primerler, dört tip nükleosid trifosfat ve DNA polimeraz enzimi gereklidir (65). Kullanılan DNA polimeraz yüksek ısıya dayanıklı Taq Polimeraz enzimidir. Reaksiyonda ilk aşama DNA çift sarmalının yüksek sıcaklıkta birbirinden ayrılmasıdır. Sıcaklık daha sonra azaltılarak primerler yardımıyla yeni DNA zincirlerinin sentezi gerçekleşir. Daha sonra sentezlenen zincirler yeniden ısıtılarak ayrılır. Reaksiyon ısıtma-soğutma ve sentez aşamaları ile yaklaşık 30-35 çevrim tekrarlanır (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. PCR şematik görünümü

Amplifikasyon ürünleri gel elektroforezinde boyutları bilinen DNA fragmetleri ile karşılaştırılarak, çoğaltılan fragmentlerin büyüklüğü saptanır (13). Membrana aktarılan DNA molekülleri daha sonra hibridizasyona bırakılır. Radyoaktif ya da radyoaktif olmayan madde ile işaretli problarla, HPV tiplerinin belirlenmesi için genellikle Southern Blot hibridizasyon yöntemi uygulanır.

Çalışmalarda kullanılan primerlerin PCR'in başarılı olması açısından önem taşıdığı belirtilmiştir. İnsan ve hayvanlarda yapılan incelemelerde HPV virus genomunun daha çok E6, E7ve L1 bölgeleri saptanmıştır. Seçilecek primerlerin bu bölgelere özgü olması çalışılacak örneklerde viral dizilerin tanımlanmasında avantaj sağlamaktadır (21). PCR değişik klinik materyallerde HPV saptanmasında da kullanılabilir. Parafin doku kesitlerinden HPV DNA'sı izole etmek ve tiplendirmek mümkün olmakla birlikte, aynı işlemin servikal smearde yapılması daha hızlı ve kolaydır. Özellikle premalign lezyonların HPV ile ilişki yönünden değerlendirilmesi üstünlük sağlamaktadır (6,17).

Hassasiyet örnekte virüs genomuna ait tek bir DNA molekülünün varlığını bile saptayabilecek düzeydedir (29,33,35). Tekniğin tekrarlanabilirlik ve spesifikliğı çalışmada kolaylık ve üstünlük getirmektedir. Ancak testin duyarlılığı açısından klinik örneklerin kontaminasyonundan kaçınmak çok önemlidir (25,64).

3. MATERYAL - METOD

3.1. Materyal

Çalışmamızda, İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü jinekoloji ve meme polikliniğine başvuran, histopatolojik olarak serviks kar sinomu tanısı konmuş ancak hiç tedavi görmemiş hastaların serviks epitelinden fırça ile alınan sitolojik serviks materyalleri kullanıldı. Yaş ortalaması 51.4 olan toplam 33 hastanın 28'i epidermoid, 4'ü adeno, 1 tanesi adenoskuamöz karsinom tipindedir.

Kontrol grubu olarak toplam 36 bireyin sitolojik serviks materyali ile çalışıldı. Sitopatolojik olarak incelenen smear materyaline göre 14 kişi normal (sağlıklı), 22 kişi kanser dışı hastalıklı grup (20 servikal displazi ve 2 koilositoz) olarak değerlendirildi. Kontrol grubu yaş ortalaması sağlıklı (normal) ve kanser dışı hastalıklı grup için sırasıyla 46.6 ve 51.2 idi. Çalışmamızda kullanılan HPV 16 ve HPV 18 problemleri pBR322 plazmidinde klonlanmış olarak (Alman Kanser Araştırma Vakfı, Almanya) Prof.Dr. Harald zur Hausen'den temin edilmiştir.

Kimyasal maddeler ve malzeme:

Tris (hidroksimetil) metilamin, sodyum dodesil sülfat (SDS), hidroklorik asit (HCl), sodyum hidroksit (NaOH), amonyum klorür (NH₄Cl), fenol, kloroform, isopropanol, sodyum asetat (CH₃COONa), tri-sodyum sitrat (C₆H₅Na₃O₇.5,5H₂O) magnezyum klorür (MgCl₂), trikloroasetik asit

(TCA), gliserol, glasiyal asetik asit (CH_3COOH). [Merck]

Etilen-diamin-tetraasetik asit (EDTA) disodyum tuzu , agaroz, etidyum bromür (EtBr), proteinaz K, ribonükleaz A (RNase), Bromfenol mavisi (BFB), siğır serum albumini (BSA), polietilenglikol (PEG), low melting agaroz (LMP), maleik asit, lauroylsarcosine, lityum klorür.

[Sigma]

Digoksinin (DIG) işaretleme ve belirleme kiti (Boehringer- Mannheim, Germany)

Polaroid film (Polaroid 667)

Naylon membran (Sureblot S4056, Oncor, A.B.D.)

Tampon ve çözeltiler:

Agaroz gel elektroforezi tamponları :

10X yükleme tamponu (2 ml)

%1 SDS, 5 mg BFB, 2 ml gliserol

5X TBE (Tris-borat tamponu) (1 l)

27.5 g borik asit, 54 g Tris bazı, 20 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0)

Etidyum bromür 10 mg/ml

DNA izolasyonunda kullanılan tamponlar :

Parçalama tamponu : 155 mM NH_4Cl

10 mM KH CO

0.1 mM EDTA

SE Tamponu : 75 mM NaCl

25 mM EDTA

30 mM Tris-HCl (pH 8.0)
TE Tamponu : 20 mM Tris-HCl (pH 8.0)
1 mM EDTA (pH 8.0)
Proteinaz K : 20 mg/ml

Southern -Blot Tamponları :

Nötralizasyon Tamponu (1 l) : 0.875 g NaCl
0.44 g Trisodyum Sitrat
Blot Tamponu (1 l) : 0.5 N NaOH + 0.6 N NaCl
20X SSC (pH 7.0) : 175.3 g NaCl
88.2 g Trisodyum Sitrat

Prehibridizasyon Tamponu 5X SSC :

% 1 Blocking stok solusyonu
% 1 N-Lauroylsarcosine
% 0.02 SDS

Yıkama Tamponları:

Tampon 1 : 2X SSC + % 0.1 SDS
Tampon 2 : 0.1X SSC + % 0.1 SDS

Renk reaksiyonu tamponları:

Tampon 1 (pH 7.5): 0.1 M Maleik asit
0.15 M NaCl
Tampon 2 : % 1 Blocking solüsyonu
Tampon 3 : 100 mM Tris-HCl (pH 8.0)
100 mM NaCl
50 mM MgCl₂
Tampon 4 : 10 mM Tris HCl (pH 8.0)

1 mM EDTA (pH 8.0)

Anti-Digoksinin-AP konjugatı: 150 µg/ml

Renk reaksiyon çözeltisi: 75 mg/ml NBT (nitro blue tetrazolium sat.)

50mg/ml XPhosphate(5-bromo-4 kloro-3 indolyl phosphate)

Renk uzaklaştırma çözeltisi: % 100 ACS grade Dimetil formamit

Prob uzaklaştırma çözeltisi: 0.2 NaOH

% 0.1 SDS

Restriksiyon enzimleri reaksiyon tamponları:

Bam HI reaksiyon tamponu: 6 mM Tris-HCl,(pH 7.5), 100 mM NaCl, 6 mM MgCl₂ , 1 mM DDT (37°C de).

Eco RI reaksiyon tamponu: 50 mM NaCl ,6 mM tris-HCl (pH 7.9) 6 mM MgCl₂ , 1 mM DDT

3.2. DNA izolasyonu:

Hasta ve kontrol grubundan servikal fırça ile alınan sitolojik serviks materyali 10 ml izotonik sodyum klorür solüsyonu bulunan tüp içine koyularak vortekslendi. 10 ml izotonik sodyum klorür içindeki materyal üzerine 10 ml parçalama tamponu eklenerek 4°C de 15 dk inkübasyona bırakıldı.

3000 g de 10 dk santrifüj edildikten sonra ayrı bir tüpe alınarak tekrar

10 ml parçalama tamponu eklendi. İşlem 2 kez tekrarlandıktan sonra üst faz alınarak üzerine 4.5 ml SE tamponu, 100 µg/ml proteinaz K ve son konsantrasyonu % 1 olacak şekilde SDS eklendi. Gece boyunca 37°C de bırakıldı. Karışıma 5 ml SE tamponu ve 10 ml fenol/kloroform (1:1) eklendikten sonra 3000 g de 5 dk santrifüj edildi ve üst faza işlem bir kez daha tekrarlandı. Üst faza 0.3 M Na-asetat +10 ml isopropanol eklenerek DNA iplikleri elde edildi. DNA 1 ml TE tamponu içinde çözüldükten sonra +4°C de saklandı.

DNA örneklerinin konsantrasyonu spektrofotometrik yöntem ile belirlenerek minigel ile izlendi.

Spektrofotometrik ölçümler:

DNA örneklerinin konsantrasyonu, 260 nm dalga boyunda (Shimadzu UV 2201 UV-VIS Recording Spektrofotometre) optik yoğunlukları okunarak hesaplandı. DNA'nın saflığı 260 nm ile 280 nm dalga boylarındaki değerlerinin oranıyla belirlendi (Tablo 3.1).

Tablo 3.1. DNA ların spektrofotometrik ölçümü

örnek	O.D.280 nm	O.D.260 nm	260/280 nm	Konsantrasyon µg/ml
1	0.019	0.028	1.487	0.069
2	0.055	0.087	1.568	0.217
3	0.027	0.042	1.565	0.105
4	0.025	0.038	1.508	0.095
5	0.071	0.123	1.730	0.306
6	0.059	0.093	1.566	0.232
7	0.038	0.059	1.557	0.147
8	0.036	0.053	1.467	0.132
9	0.098	0.147	1.497	0.368
10	0.038	0.060	1.566	0.149
11	0.330	0.518	1.570	0.294
12	0.068	0.096	1.408	0.238
13	0.025	0.033	1.291	0.081
14	0.118	0.165	1.401	0.411
15	0.057	0.086	1.508	0.216
16	0.045	0.068	1.515	0.170
17	0.030	0.046	1.521	0.114
18	0.032	0.051	1.621	0.127
19	0.037	0.048	1.311	0.120
20	0.061	0.082	1.360	0.206
21	0.233	0.326	1.399	0.815
22	0.064	0.096	1.494	0.239
23	0.081	0.127	1.572	0.316

3.3. Elektroforez islemi :

DNA'larda parçalanma olup olmadığının anlaşılması, PCR sonuçlarının incelenmesi ve Southern blotting amacıyla 11 x 15 cm boyutundaki geller kullanıldı.

DNA örneklerinin kontrolü için % 0.8 lik, PCR sonuçlarının incelenmesi ve Southern Blotting işlemi için % 1.5 luk olmak üzere iki ayrı konsantrasyonda agaroz 0.5X TEB tamponu içinde kaynatılarak hazırlandı. Çözeltiye 50°C'ye kadar soğutulduktan sonra DNA'yı izleyebilmek amacı ile son konsantrasyonu 0.5 mg/ml olacak şekilde etidyum bromür eklendi. Agaroz çözeltisi donmadan önce üzerine 1 mm kalınlığında 14 yuvalı tarak yerleştirilmiş bulunan 14x11.5 cm boyutlarındaki gel tabağına döküldü. Gel donduktan sonra içinde 0.5 TBE tamponu bulunan yatay elektroforez tankına (BRL model 11X15) yerleştirildi. Taraklar çıkartılarak yükleme tamponu içindeki DNA örnekleri geldeki ceplere yüklendi. Elektroforez işlemleri DNA örneklerinin kontrolü için 100 V 'ta (35 mAmp), PCR ürünlerinin ve Southern Blotting için 160 V 'ta (60 mAmp) yapıldı.

HPV genomunun polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılması:

Hasta ve kontrol gruplarından fırça ile alınan sitolojik serviks materyalinden izole edilen DNA'larda HPV genomuna ait parçalar bulunup bulunmadığını belirlemek amacıyla, DNA örnekleri virüs HPV tipine özgü consensus primerler

MY 09 5'-CGT CCM ARR GGA WAC TGA TC-3' M=(A, C) R=(A, G) W=(A, T)
MY 11 5'-GCM CAG GGW CAT AAY AAT GG-3' Y=(C, T)

kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltıldı. Reaksiyon karışımı 50 µl hacimde, 200 µM deoksinükleotid trifosfat (dNTP) karışımı, her biri 25 pmol olacak şekilde primer, 3 mM MgCl₂, 2.5 U Taq polimeraz ve 1X reaksiyon tamponu (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl pH 9.0 25 C'de % 1 Triton X-100) ile hazırlandı. Karışımın üzerine buharlaşmayı önlemek için mineral oil eklendi. Amplifikasyon işlemine 95°C'de 5 dk lık bir inkübasyon ile başlandı, reaksiyon 55°C'de 30 sn, 72°C'da 1 dk, 95°C de 30 sn den oluşan 35 çevrim sonunda 72°C'de 10 dk lık inkübasyonla tamamlandı (Tablo 3.2).

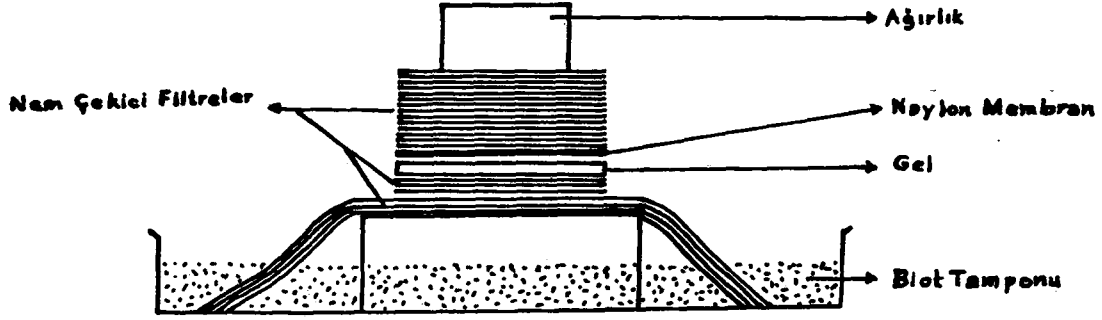
Tablo 3.2. PCR reaksiyonları

Denatürasyon	95°C	30"
Yapışma	55°C	30"
Uzama	72°C	1'
Çevrim sayısı	35	

Çoğaltılan reaksiyon ürününden 10 µl alınarak % 1.5 luk agaroz gele yüklendi. Elektroforez işleminden sonra UV ışık altında incelenerek fotoğrafı çekildi ve blotting işlemine geçildi (Şekil 3.1).

Blotting işlemi:

Şekil 3.1'de gösterilen düzeneğe yerleştirilen gelin üzerine gel boyutunda naylon membran, membran üzerine de nem çekici filtre kağıdı tabakaları konularak blot tamponunun (0.5 N NaOH + 0.6 N NaCl) gelden geçmesi sağlandı. 8-18 saat sonunda DNA'lar gelden



Şekil 3.1. Southern blot düzeneği şematik görünüm

filtreye transfer edildi. İşlemden sonra filtreler nötralizasyon tamponu ile nötralize edildi, havada kurutuldu ve kurutma kağıdı içinde +4°C'de saklandı.

Probların hazırlanması :

1) Probların vektörden (plazmiden) ayrıştırılması: Plazmidlerin üzerindeki probların ayrıştırılması için 10 µl plazmid DNA'sı, HPV 16 probu için Bam HI ile, HPV 18 probu için EcoR I enzimi ile kesildi.

Reaksiyon ortamı (50 µl) : 10 µl plazmid DNA 5 µl 10X enzim tamponu

2 µl enzim (20 u)

32 µl d H₂O

Kesim işlemi her restriksiyon enzimi için 37°C de gece boyu inkübasyon ile gerçekleştirildi. İşlem tamamlandığında reaksiyon karışımı % 0.7 lik LMP (Low Melting Point) agaroz gele yüklenerek elektroforez ile

ayrıştırıldı. Probu taşıyan gel bölgesi kesilmek suretiyle çıkarıldı. HPV 16 ve 18 DNA'larını taşıyan gel bölgeleri 65°C'de kaynatılmak suretiyle eritildi ve eriyen karışım 10 µl lik hacimlerde tüplere bölünerek -20°C'de saklandı.

2) Probların İşaretlenmesi; 25-50 ng prob DNA'sı Random Primer işaretleme yöntemi ile Digoksinin kullanılarak non radyoaktif olarak işaretlendi. Reaksiyon ortamı (50 µl) : 10 µl probe (25-30 ng)

2 µl dNTP

5 µl işaretleme tamponu

1 µ Klenow

32 µl d H₂O

Hibridizasyon işlemi:

Hibridizasyon işlemi Tablo 3.3 de gösterildiği gibi yapılmıştır.

Tablo 3.3. Prehibridizasyon, hibridizasyon, yıkama tamponları ve koşulları.

	Tamponlar		Koşullar
Pre-hibridizasyon	5X SSC %1 Bloking stok sol. %0.1 N- Lauroylsarcosine %0.02 SDS		68°C 2 saat
Hibridizasyon	Prehibridizasyon tamponu + DIG ile işaretlenmiş prob		68°C 18 saat
Yıkama	Tamp.1	2X SSC + %0.1 SDS	20°C-2 x 5'
	Tamp.2	0.1X SSC + %0.1 SDS	68°C-2x 15'

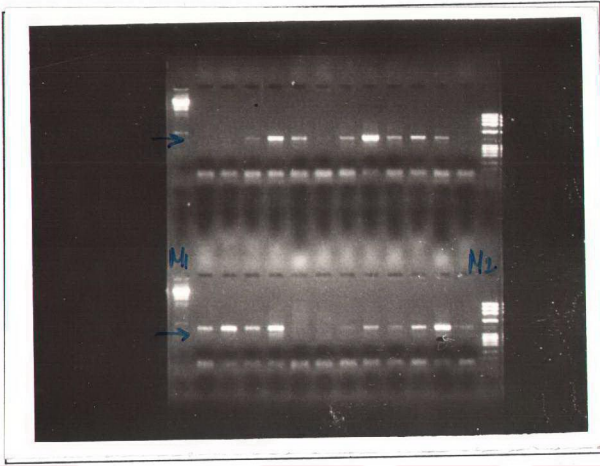
4. BULGULAR

Çalışmamızda histopatolojik olarak serviks karsinomu tanısı konmuş, evreleri ve tipi bilinen 33 hastanın, kontrol grubu olarak ise hiç bir jinekolojik şikayeti bulunmayan 14 ve kanser dışı jinekolojik şikayetleri bulunan 22 kadının sitolojik serviks materyalleri kullanıldı.

Deney grubuna ait çalışmalara başlamadan önce PCR reaksiyonu laboratuvarımızda HPV (-) ve HPV (+) kontrol örnekleri (HPV negatif kontrol olarak erkek lenfosit DNA'sı, HPV pozitif hasta DNA'sı) kullanılarak optimize edildi. Bu amaçla reaksiyon karışımında öncelikle 1-6 mM arasındaki $MgCl_2$ konsantrasyonları denendi ve 3 mM $MgCl_2$ konsantrasyonunda enzimin en iyi PCR ürününü verdiği saptandı. Daha sonra primer konsantrasyonları ayarlandı, seri deneyler yapılarak primer miktarı 12.5 pmol'e kadar düşürüldü. Taq polimeraz enziminin optimal konsantrasyonu araştırıldı ve 2.5 U enzim, reaksiyon için yeter miktarda bulundu. Kimyasal içeriği optimize edilen reaksiyon literatürde (13) verilen çevrim sayısı esas alınarak, yapılmış olup her çevrim içindeki denatürasyon, yapışma ve uzama sıcaklıkları ve süreleri literatürde sırasıyla 94°C'de 30 sn, 55°C'de 1 dk, 72°C'de 1 dk iken, çalışmamızda yapışma süresi 55°C'de 30 sn, olacak şekilde denenerek belirlendi.

Koşullar optimize edildikten sonra standart DNA oluşabilecek herhangi bir hatayı önlemek amacıyla beş farklı tüpte amplifikasyona sokuldu ve reaksiyonun istenildiği şekilde gerçekleştiği görülerek polimeraz zincir reaksiyonunun optimize edildiğine karar verildi. Hasta grubuna ait DNA'lara ilişkin deneylere DNA konsantrasyonlarının ayarlanması ile başlandı. İlk olarak hasta grubuna ait materyallerden izole edilen DNA'lar, daha sonra da kontrol grubuna ait DNA'lar PCR ile çoğaltıldı. PCR sonucu elde edilen reaksiyon ürününden örnekler alınarak elektroforez ile incelendi. UV ışık altında 450 baz çifti uzunluğundaki fragmentin varlığı tespit edildi (Resim 4.1,4.2).

Geldeki 450 baz çifti uzunluğundaki amplifikasyon ürününün gerçekten HPV genomuna ait olup olmadığının anlaşılması, olabilecek yalancı pozitif sonuçların ortadan kaldırılması için HPV 16 ve HPV 18 genomlarına özgü proplar ile hibridizasyona geçildi. Kontrol ve hasta grubuna ait PCR ürünleri Southern Blot analizi için hazırlanmış olan % 1.5 luk agaroz gele yüklendi. Elektroforez yapıldıktan sonra PCR ürünleri blotting işlemi ile naylon membrana aktarıldı. Amplifiye olan DNA'ların hangi HPV tipine ait olduğunun anlaşılabilmesi için Digoksigenin ile işaretlenmiş HPV 16 ve 18 propları ile ayrı ayrı

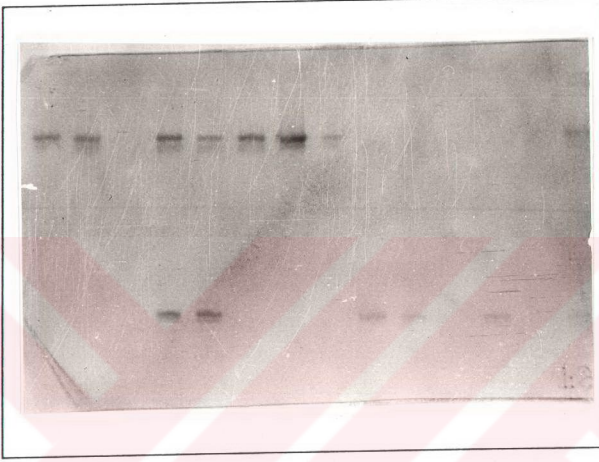


Resim 4.1 . Hasta grubuna ait PCR ürünlerinin gelde görünümü
M1 : λ / Hind III marker DNA
M2 : Marker DNA (1.353,1.078,872,603,310,281)
-> : Amplifiye olan 450 baz çifti uzunluğundaki PCR ürünü



Resim 4.2 . Kontrol grubuna ait PCR ürünlerinin gelde görünümü
M :Marker DNA (1.353,1.078,872,603,310,281)

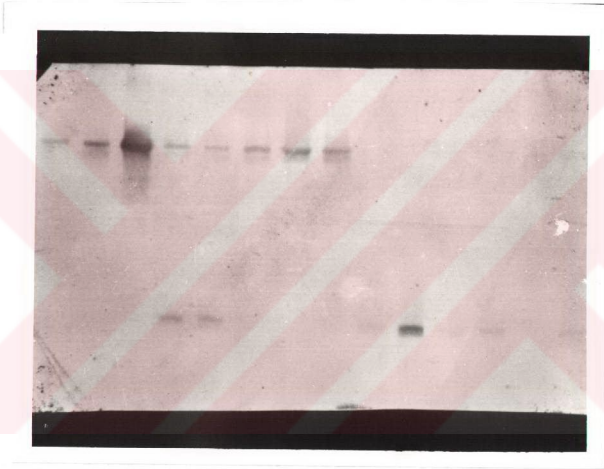
hibridizasyon işlemi yapıldı. Membran önce HPV 16 probu ile hibridizasyona bırakıldı. 33 hastanın 18'inin HPV 16 genomuna ait fragment taşıdığı belirlendi (Resim 4.3) .



Resim 4.3 . Hibridizasyon sonucu HPV 16 ile enfekte hasta DNA'larının membranda görünümü

Daha sonra aynı membran HPV 18 probu ile hibritleştirilmek üzere HPV 16 probu uzaklaştırılma (stripping) işlemine tabi tutuldu. Membranın HPV 18 probu ile hibridizasyonu sonucu HPV 18 genomuna ait fragment taşıyan hasta sayısının oldukça yüksek (17/33) olduğu ve HPV 16 ile hibritleşme gösteren hastaların HPV 18 ile de pozitif sonuç verdikleri görüldü. Bunun HPV 16 probunun uzaklaştırma işleminin iyi

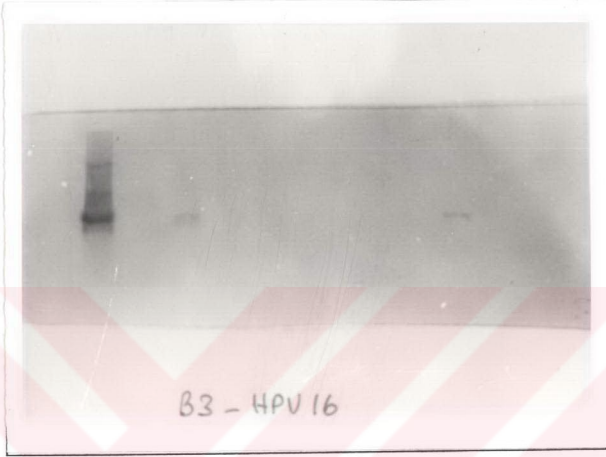
yapılmamasından kaynaklanabileceği göz önünde bulundurularak aynı örnekler yeniden PCR reaksiyonu ile çoğaltıldı, blotting işlemi ile naylon membrana aktarıldı ve sadece HPV 18 probe ile doğrudan hibridizasyon yapıldı. Böylelikle HPV 16 ile hibritleştirilmiş membrandan uzaklaştırılmamış probe HPV 18 probe ile hibridizasyondan sonraki renk reaksiyonunda pozitif sonuç vermesi önlenmiştir. 33 hastanın 15'inin HPV 18 genomuna ait fragment taşıdığı belirlendi (Resim 4.4).



Resim 4.4 . Hibridizasyon sonucu HPV 18 ile enfekte hasta DNA larının membranda görünümü

Buna göre hasta grubuna ait DNA'lardan ikisinin membranda HPV 16 probe ile uzaklaştırma işleminin iyi yapılamamasından dolayı bu probe ile hibritleştiği düşünüldü. Kontrol grubuna da hasta grubu DNA'larına

yapılan tüm işlemler uygulandı. Toplam 36 kişilik kontrol grubunda sadece 2 kişide HPV 16 tipi belirlendi (Resim 4.5).



Resim 4.5 . Hibridizasyon sonucu HPV 16 ile enfekte kontrol grubuna ait DNA'ların membranda görünümü

Bunlardan biri sağlıklı kontrol grubunda, diğeri kanser dışı hastalıklı kontrol grubunda yer almakta idi. HPV 18 tipine her iki kontrol grubunda da rastlanmadı.

Sonuç olarak Southern blot hibridizasyon ile hasta grubunda HPV 16 oranı % 54.5 (18/33), HPV 18 oranı % 45.4 (15/33), her iki tip virüsle enfekte hasta oranı ise % 33.3 (11/33) olarak bulundu. HPV 16 oranı

kanser dışı hastalıklı kontrol grubunda % 4.5 (1/22), sağlıklı kontrol grubunda ise % 7.1 (1/14) olarak bulundu. HPV 18 tipi kontrol gruplarında saptanamadı (Tablo 4.1).

HPV 16 tipi YEH karsinom vakalarında % 61 (17/28), HPV 18 tipi % 46.4 (13/28) oranında saptandı. Bu grupta HPV 16 ve 18'in her ikisi ile enfekte hasta oranı % 39 (10/28) idi. Adenokarsinomlu hastalarda HPV 16, 1 hastada (1/4), HPV 18, 2 hastada (2/4) ve 1 hastada da (1/4) her iki tip birden gözlemlendi. Adenoskuamöz tipteki vakada bu iki tip HPV ile enfeksiyon gözlenmedi (Tablo 4.2).

Normal ve karsinom dışı jinekolojik şikayeti olan kontrol gruplarında HPV 16 ve 18 tiplerinin oranları incelendiğinde, yalnızca HPV 16 tipine sağlıklı kontrol grubunda 1 kişide (1/14), kanser dışı hastalıklı grupta da 1 kişide (1/22) rastlandı. Her iki grupta HPV 18 tipi ile enfekte kişiye rastlanmadı.

Tablo 4.1 . HPV 16 ve HPV 18 tiplerinin hasta ve kontrol gruplarındaki dağılımı

	n	HPV 16	%	HPV 18	%	HPV 16+18	%
Hasta	33	18	54.5	15	45.4	11	33.3
Kanser dışı	22	1	4.5	-		-	
Sağlıklı	14	1	7.1	-		-	

Tablo 4.2 . HPV 16 ve HPV 18 tiplerinin karsinom tipleri ile ilişkisi

Karsinom tipi \ HPV tipi	n	HPV 16	HPV 18	HPV 16+18
YEH Ca	28	17 (%61)	13 (%46)	10 (%36)
Adeno Ca	4	1	2	1
Adenoskuamöz Ca	1	-	-	-

5. TARTIŞMA

Serviks karsinomu günümüzde kadınları etkileyen kanserler arasında önemini korumaktadır. Meme kanserinden sonra ikinci sıklıkta yer alan bu kanser öncelikle sitolojik yayma ya da "Pap smear" testleriyle erken safhada saptanabilmektedir (70). Literatürde serviks karsinomunun en sık görüldüğü yaş 45-55 yaş olarak bildirilmiştir. Hastalarımızın yaş ortalaması 51.4 ile bu yaş sınırları içindedir. Kontrol grubu olarak alınan ve sitopatolojik değerlendirme sonucu normal smear görülen kişilerin yaş ortalaması 46.6, servisit ve koilositoz saptanan kişilerin yaş ortalaması ise 51.2 dir.

Yine literatürde YEH karsinomun serviks karsinomlarının % 90-95 ini oluşturduğu belirtilmiştir. Adenokarsinoma ise daha seyrek rastlanmaktadır. Çalışmamızdaki bulgular bu konuda da literatür ile uygunluk göstermektedir. Hastalarımızın % 85'i YEH karsinom, geri kalanı adeno ve adeno skuamöz karsinom olarak bulunmuştur. Hastalığın etyolojisine yönelik çalışmalar aynı zamanda erken teşhis ve tedaviyi yönlendirmede önemlidir. Son yıllarda moleküler düzeyde yapılan çalışmalar insan papilloma virüslerin bu karsinomun gelişmesinde etkili olabileceğini göstermiş, serviksin premalign ve malign lezyonlarında bazı HPV tiplerinin yüksek oranlarda saptanmış olması, HPV'lerin bu konuda viral etyolojik bir faktör olarak kabul edilmelerine neden olmuştur (20,59).

Yapılan çeşitli araştırmalarda HPV 16 ve HPV 18'in prekanseröz lezyonlarda ve serviks karsinomlarında rastlanan en yaygın HPV tipleri

olduğu, HPV 16'ya HPV 18'e oranla daha sık rastlandığı belirtilmiştir (10,42,47,63,72). HPV tiplerinin ve viral genomun saptanması yüksek risk gruplarını belirlemede, prekanseröz lezyonların takibinde önemlidir (31,32). Lezyonların takibinde HPV tiplerinin duyarlı yöntemlerle saptanması önemlidir. PCR HPV tiplemesinde kullanılan en duyarlı yöntem olarak bildirilmiştir. Hücre DNA'sında HPV genomuna ait fragmentleri saptayabilecek kadar hassas olması, diğer metodlara tercih edilmesini sağlamıştır. Yapılan çalışmalarda bu yöntemle daha yüksek oranlarda HPV pozitifliği saptandığı görülmektedir (6,23). Çalışmamız ülkemizde serviks karsinomlu hastaların sitolojik materyallerinde onkogenik olarak kabul edilen HPV 16 ve 18 tiplerinin saptanması ve duyarlı bir yöntem olarak kullanılan PCR'ın sitolojik materyale uygulanmasının getireceği avantajları belirlemek amacıyla yapılmıştır.

Servikal yaymalarda saptanan HPV tiplerinin servikal displazi biyopsilerindeki HPV'lerin dağılımını yansıtması açısından klinik önemi olduğu vurgulanmıştır. Servikal fırça ile materyal alınması, HPV enfeksiyonu saptamasında en kolay ve elverişli yöntemdir. Bu şekilde alınan materyal daha geniş bir alanın durumunu yansıtıldığı için tercih edilmektedir. PCR ise bu tip materyalde HPV enfeksiyonu saptamasında kullanılacak en duyarlı ve hızlı bir yöntem olarak önerilmektedir. Bu nedenle çalışmamızda HPV taraması için serviks kanserli hastalardan servikal fırça ile alınan sitolojik materyal ve PCR ile birlikte Southern Blot yöntemi tercih edilmiştir. Böylece en kısa sürede en doğru sonuca ulaşılabileceği kanısına varılmıştır.

Literatürdeki çalışmalarda değişik özellikteki materyaller (biyopsi, frozen kesit ve sitolojik materyal) değişik yöntemlerle değerlendirilmiştir (19,39,42). Skuamöz hücreli invaziv serviks karsinomuna ait biyopsi örneklerinde HPV 16/18 oranı Southern Blot yöntemi ile % 56 (32), yine invaziv serviks karsinomlu hastalardan alınan sitolojik örneklerde in situ hibridizasyon ile % 20 (19) olarak bildirilmiştir. Serviks adenokarsinomlarında HPV 16 oranı in situ hibridizasyon ile % 33.3 bulunmuştur (12). PCR uygulamalarında aynı oran serviks karsinomu biyopsi örneklerinde % 48 (10), frozen biyopsi örneklerinde % 64 (13), skuamöz hücreli karsinomlardan alınan sitolojik materyalde ise % 35 (44) olarak bildirilmiştir.

Bu araştırmaların bir bölümünde HPV 16 ve HPV 18 tiplerinin her ikisini birlikte saptayabilen bir prob kullanılırken (28), diğer bir bölümünde ise HPV 16 ve 18'i ayrı ayrı saptayabilen proplar kullanılmıştır (13). HPV tiplerinin ayrı ayrı incelendiği çalışmalarda HPV 16 oranı HPV 18'e oranla genellikle daha yüksek bulunmaktadır.

Yukarıdaki çalışmalarla karşılaştırıldığında çalışmamızda % 54.5 olarak bulduğumuz HPV 16 oranı bildirilen değerler arasında yer almaktadır. Sözü edilen çalışmalar farklı coğrafik bölgelerde ve değişik özellikteki serviks materyallerinde yapılmıştır. Bulgularımız da, hastalarda HPV 16 ve 18 tiplerine rastlanma sıklığı bakımından her iki tip virüs oranı arasındaki fark az olmakla birlikte, literatür ile uygunluk göstermektedir. Ülkemizde HPV 16 ve 18 tiplerinin karsinom vakalarında hangi sıklıkta görüldüğü konusunda herhangi bir araştırma bulunmadığından çalışmamızın bu konuda yol gösterebileceğini düşünmekteyiz. Yabancı

literatürde rastlanan çalışmaların bir bölümünde gözlediğimiz bir eksiklik de PCR yapıldıktan sonra reaksiyon sonucunda oluşan ürünün doğrudan UV ışık altında incelenmesiyle yapılan değerlendirmelerdir. Bu tip değerlendirmeler enfekte kişilerdeki HPV tipleri ayırd edilemediği ve geldeki bantların nitelikleri hibridizasyon ile doğrulanmadığından yanıltıcı olmaktadır. Bu şekilde bildirilen sonuçlarda HPV pozitiflik oranı yüksek görülmektedir. Nitekim, Gopalkrisha ve ark. (20) çalışmalarında servikal sitolojik materyalde HPV 16 oranını, yalnızca PCR ürününü gel üzerinde değerlendirerek % 86 olarak bulmuşlardır.

Çalışmamız da saptadığımız HPV 18 oranı ile literatürdeki farklılıklar ise daha belirgindir. Kurman ve ark.nın (28) çalışmasında invaziv serviks karsinomlarındaki biyopsi örneklerinde Southern Blot yöntemiyle bu oran % 22 olarak bulunmuştur. Das ve ark.nın (12) serviks adenokarsinomlarındaki biyopsi örneklerinde Southern Blot ile buldukları oran % 16.6 dır. Bulgularımızdaki % 45.4 olarak saptadığımız HPV 18 oranı bu çalışmalara kıyasla oldukça yüksektir. Bunun nedeninin daha geniş hasta kitlelerinin taranmasıyla aydınlatılabileceğini düşünmekteyiz. Bu konuda toplumumuzda kapsamlı çalışmalar olmadığından kesin yorum yapmak mümkün olmamaktadır. Diğer yandan normal sitoloji gösteren vakalarda Lorincz ve ark. HPV 16,18'e rastlamazken, sitolojik olarak normal olmayan vakalarda bu oranı % 23 bulmuşlardır. Peng ve ark.(44) PCR ile karsinom dışı servikal sitolojik örneklerde HPV 16 oranını % 1.2 olarak bildirmişlerdir. HPV 16 ve 18 tamamen normal görünümdeki serviks epitelindeki sitolojik materyalde % 20 (19), HPV 16 CIN lezyonları saptanan biyopsi örneklerinde % 37 oranında bulunmuştur (28). Bu lezyonların ileride gelişebilecek serviks karsinomları

yönünden izlenmesi gerektiği önerilmektedir. Das ve ark. (13) kontrol grubu olarak normal serviks biyopsilerini kullanmışlar ve yalnızca PCR ile HPV 16 oranını % 18 olarak bulurken, aynı vakalarda Southern blot ile hiç pozitiflik saptayamamışlardır. Bu da yukarıda işaret edildiği gibi sonuçların yalnızca PCR ile değerlendirilmesinin yanlışlığını göstermektedir. Çalışmamızda bu yanlışlığı önlemek için PCR ve Southern Blot birlikte kullanılmıştır. Çalışmamızda kontrol grubu olarak aldığımız normal sitoloji, servisit ve koilositoz gösteren vakalarda saptadığımız HPV 16 oranı % 5.5 dur. Bu grup içinde normal smear gösteren 1 olgu ile servisit olarak değerlendirilen 1 kişide HPV varlığı (HPV 16) gözlenmiştir. Buna karşılık kontrol grubu içinde koilositoz gösteren 2 vakada HPV'nin her iki tipi de saptanamamıştır. Bu vakaların literatürde de belirtildiği gibi ileride gelişebilecek serviks lezyonları açısından izlenmesi gerektiğini düşünmekteyiz. PCR yöntemi serviks karsinomlarında erken tanı ve riskli grupları belirlemede kullanılan " Pap smear" taraması ile birlikte uygulanabilmektedir. Böylelikle, sitolojik materyalde CIN lezyonları ya da koilositoz saptanan kişilerde, viral etyolojik faktör olarak gösterilen ve onkogenik marker olarak gözönüne alınan HPV tiplerinin saptanması mümkün olacaktır.

PCR ürünlerini saptamak amacıyla kullanılan probun radyoaktif ya da non-radyoaktif yöntemlerle işaretlenmesi mümkündür. Ancak radyoaktif madde ile çalışma daha uzun süre gerektirmekte ve riski yüzünden rutin çalışmalarda tercih edilmemektedir. Bu amaçla çalışmamızda yeni ve non-radyoaktif bir işaretleme yöntemi kullanarak daha hızlı ve güvenli bir çalışma sistemi geliştirilmiştir.

PCR ile birlikte radyoaktif olmayan bir işaretleme sistemi ile kombine edilerek uygulanan Southern Blot yonteminin, riskli grupların tanı ve takibinde olduğu gibi, serviks karsinomlarındaki HPV tiplerinin belirlenmesinde rutin olarak kullanılabilceği görüşündeyiz.

Bulgularımız serviks karsinomu tarama programları içinde, 40 yaşın üzerindeki sağlıklı kadınlarda belirli aralıklarla 'Pap smear' testinin yanısıra serviks karsinomunda en yaygın HPV tipleri olarak gösterilen HPV 16 ve 18 tiplerinin belirlenmesinin uygun olacağına işaret etmektedir. Yılda en az bir kez yapılacak bu şekildeki taramalar riskli grupların izlenerek kanserin erken evrede belirlenmesi açısından olumlu sonuç verecektir. Aynı yontem bunun yanısıra serviks karsinomlu hastaların tedaviden sonraki döneminde HPV enfeksiyonunun kalıcılığı ve yeni enfeksiyon gelişmesi yönünden izleme amacıyla da kullanılabilir.

ÖZET

İnsan papilloma virüslerinin (HPV) bazı grupları serviks karsinomu etyolojisinde risk faktörü olarak gösterilmektedir. Onkogenik HPV tiplerinin saptanması prekanseröz lezyonların belirlenmesi ve izlenmesi açısından önem taşır. HPV tiplerinin araştırılmasında kolaylık ve çabukluk sağladığından bu tetkiklerde sitolojik servikal materyal tercih edilmektedir. Bu virüslerin saptanmasında, çeşitli doku ve sitolojik materyallere uygulanabilen en duyarlı yöntem polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) dur.

Çalışmamızda serviks karsinomlu hastaların sitolojik serviks materyallerinde HPV 16 ve HPV 18 enfeksiyonu araştırıldı. Alınan örneklerden izole edilen DNA'lar PCR ile çoğaltıldı. HPV 16 ve 18 tiplerini belirlemek amacıyla Southern Blot hibridizasyon yöntemi uygulandı. 33 serviks karsinomlu hastada HPV 16 oranı % 54.5, HPV 18 oranı % 45.4 olarak saptanırken, kontrol grubunda bu oran % 5.5 olarak bulundu.

Southern blot ile birlikte uygulandığı takdirde PCR, servikal smear tarama programları içinde HPV enfeksiyonunu belirleyerek, bu kanserlerdeki risk gruplarının tanınması ve izlenmesinde kullanılacak en duyarlı saptama yöntemi olarak önerilmektedir.

SUMMARY

Definite types of human papillomaviruses (HPV) are considered an etiological factor in the occurrence of cervical carcinoma. Determining the persistence of some HPV types associated with cervical carcinoma (HPV 16,18,31,33) are important in defining and following precancerous lesions. Because of the convenience and the fastness it provides, cytological cervical material is preferred for the analysis. The most sensitive method in the determination of these viruses is polymerase chain reaction (PCR). In our study HPV 16 and HPV 18 infections were investigated in the cervical scrapes of 33 subjects with cervical carcinoma. The DNAs isolated from the samples were amplified by PCR. The HPV 16 and HPV 18 types were identified by Southern Blot hybridization. The positivity rates for HPV 16 and HPV 18 in 33 subjects with cervical carcinoma were % 54.5 and % 45.4, respectively. The corresponding value in the control group was only 5.5 %.

PCR combined with Southern Blot is considered as the most sensitive method for scanning programmes and in defining and monitoring the risk groups for developing cervical neoplasia.

KAYNAKLAR

1.Acs J., Hildesheim A.,Reeves W.C.,Brenes M.,Brinton L.,Lavery C.,Gardia M.E.,Godoy J.,Rawls W.E.:Regional Distribution of Human Papillomavirus DNA and Other Risk Factors for Invasive Cervical Cancer in Panama, Cancer Res. 49, 5725-5729 (1989)

2.Averette H.E.,Stern A.,Nguyen H.N.: Screening in Gynecologic Cancer, Cancer Suppl. 72, 1043-1049 (1993)

3.Bergström R.,Adami H.O.,Gustafsson L.,Pontén J.,Sparen P.:Detection of Preinvasive Cancer of the Cervix and the Subsequent Reduction in Invasive Cancer, J. Cancer Inst. 85, 1050-1057 (1993)

4.Burgut R.,Tuncer İ.,Bozdemir N.Türkiye'de 16 Merkezin Kanseri Verilerinin Değerlendirilmesi. "Türkiye'de Kanseri Sıklığı" eds. İ.Tuncer, R.Burgut, N.Bozdemir, E.F.Coşar 22-66Tübitak / ÇÜTF, Adana, 1994

5.Chacho M.S.,Eppich E.,Wersto R.,Koss L.G.:Influence of Human Papillomavirus on DNA Ploidy Determination in Genital Condylomas, Cancer 65,2291-2294 (1990)

6.Class E., Melchers W., Quint W. : The Polymerase Chain Reaction for the Detection of Genital Human Papillomavirus Infections. "Papillomaviruses",eds. P. M. Howley, T. R. Broker,pp. 45-53, Wiley-Liss, New York (1990)

7.Cole S.T., Danos O.:Nucleotide Sequence and Comparative Analysis of the Human Papillomavirus Type 18 Genome Phylogeny of Papillomaviruses and Repeated Structure of the E6 and E7 Gene Product. J. Mol.Biol.,193, 599-608 (1987)

8.Crawford L.Prospects for Cervical Cancer Vaccines "The Molecular Pathology of Cancer" ed. N.R. Lemoine, N.A.Wright, pp.215-227 Cold Spring Harbor Lab. Pres. New York, 1993.

9.Cuzick J.,Terry G.,Ho L.,Hollingworth T.,Anderson M.: Human Papillomavirus Type 16 DNA in Cervical Smears as Predictor of High-Grade Cervical Cancer, *Lancet* 339, 959- 960 (1993)

10.Czegledy J.,Poka R.,Veress G.,Gergely L.: Amplification of Human Papillomavirus Type 16 Transforming Genes from Cervical Cancer Biopsies and Lymph Nodes of Hungarian Patients, *J. Clin. Microbiol.* 30,1, 233-236 (1992)

11.Daling J.R., Sharma K.J.: Relationship Between Human Papillomavirus Infection and Tumours of Anogenital Sites Other Than the Cervix."The Epidemiology of Cervical Cancer and Human Papillomavirus",eds.N.Munoz,F.X.Bosch,K.V.Shah and A.Meheus, 222-241,IARC, Lyon (1992).

12.Das B.C.,Gopalkrishna V.,Das D.K.,Sharma J.K.,Singh V., Luthra U.K.: Human Papillomavirus DNA Sequences in Adenocarcinoma of the Uterine Cervix in Indian Women, *Cancer* 72,147-153 (1993)

13.Das B.C.,Sharma J.K.,Gopalkrishna V.,Das D.K.,Singh V., Gissman L.,zur Hausen H., Luthra U.K.: A High Frequency of Human Papillomavirus DNA Sequences in Cervical Carcinomas of Indian Women as Revealed by Southern Blot Hybridization and Polymerase Chain Reaction, *J. Med. Virol.* 36, 239-245 (1992)

14.Day N.E.:The Epidemiology of Gynaecological Cancer. "Gynaecology", eds. R. W. Show, W. P. Soutter, S. L. Stanton, 451-460, Churchill Livingstone (1992)

15.Dillner L.,Bekassy Z.,Jonsson N.,Moreno-Lopez J.,Blomberg J.,Detection of IgA Antibodies Against Human Papillomavirus in Cervical Secretions from Patients with Cervical Intraepithelial Neoplasia, *Int.J.Cancer* 43, 36- 40 (1989)

16. Evander M., Edlung K., Boden E., Gustafsson A., Jonsson M., Karlsson R., Rylander E., Wadell G.: Comparison of a One- Step and a Two-Step Polymerase Chain Reaction with Degenerate General Primers in a Population-Based Study of Human Papillomavirus Infection in Young Swedish Women, *J. Clin. Microbiol.* 30, 987-992 (1992)

17. Felix J.C., Wright T.C.: Analysis of Lower Genital Tract Lesions Clinically Suspicious for Condylomata Using In Situ Hybridization and the Polymerase Chain Reaction for the Detection of Human Papillomavirus, *Arch. Pathol Lab Med.* 118,39-43 (1994)

18. Galloway D.A.: Papillomavirus Capsids: a New Approach to Identify Serological Markers of HPV Infection, *J. the Natl.Cancer Inst.* 86, 474-477 (1994)

19. Ghirardini C., Ghinosi P., Raisi O., Portolani M.: Human Papillomavirus DNA Detection in Papanicolaou-Stained Cervical Smears with a Nonradioactive In Situ Hybridization Assay, *Acta Cytol.* 36, 183-188 (1992)

20. Gopalkrishna V., Francis A., Sharma J.K., and Das B.C.: A Simple and Rapid Method of High Quantity DNA Isolation from Cervical Scrapes for Detection of Human Papillomavirus Infection, *J. Virol.Meth.* 36, 63-72 (1992)

21. Gregoire L., Arella M., Campione-Piccardo J., Lancaster W.D.: Amplification of Human Papillomavirus DNA Sequences by Using Conserved Primers, *J. Clin.Microbiol.* 27, 2660- 2665 (1989)

22. Higgins G.D., Phillips G.E., Smith L.A., Uzelin D.M., Burrell C.J.: High Prevalance of Human Papillomavirus Transcripts in All Grades of Cervical Intraepithelial Glandular Neoplasia, *Cancer* 70, 136-146 (1992)

23. Ho L., Chan S.Y., Chow V., Chong T., Tay S.K., Villa L.L., Bernard H.U.: Sequence Variants of Human Papillomavirus Type 16 in Clinical Samples Permit Verification and Extension of Epidemiological Studies and Construction of a Phylogenetic Tree, *J. Clin. Microbiol.* 29,1765- 1772 (1991)

24.Howley P.M.:Principles of Carcinogenesis: Viral."Cancer:Principles and Practice of Oncology"4.ed.V.T.de Vita Jr.,S Hellmann ,S.A.Rosenberg, pp. 188-194 J.B.Lippincott, Philedelphia, 1993.

25.Inoue M.,Duggan M.A.,Robertson D.I.,Chang-Poon V.: Non- isotopic Detection of HPV DNA in Cervical Smears Using dot-blot Hybridization, J. Virol. Meth. 26,159-170 (1989)

26.Kanser Bildirimlerinin Değerlendirilmesi 1991-1992, T.C.Sağlık Bakanlığı Kanser Savaş Daire Başkanlığı Yayın No 552,61, Ankara, 1994.

27.Kjaer S.K.,de Villiers E.M.,Çağlayan H.,Svare E.,Haugaard B.J.,Engholm G.,Christensen R.B.,Moller K.A.,Poll P., Jensen H.,Vestergaard B.F.,Lynge E.,Jensen O.M.: Human Papillomavirus, Herpes Simplex Virus and Other Potential Risk Factors for Cervical Cancer in a High-Risk Area (Greenland) and a Low-Risk Area (Denmark)- a Second Look. Br.J.Cancer 67,830-837 (1993)

28.Kurman R.J.,Shiffman M.H.,Lancaster W.D.,Reid R.,Jenson A.B.,Temple G.F., Lorinez A.T.: Analysis of Individual Human Papillomavirus Types in Cervical Neoplasia: A Possible Role for Type 18 in Rapid Progression, Am J. Obstet. Gynecol. 159, 293-297 (1988)

29.Kwok S., Higushi R.: Avoiding False Positives with PCR. Nature 339, 237-238 (1989)

30.Lancaster W.D.: Viral Role in Cervical and Liver Cancer, Cancer Supp. 70, 1794-1798 (1992)

31.Leung Y.,DePetrillo A.D.: Etiology, Epidemiology, Risk and Prognostic Factors, Screening and Imaging of Gynecologic Cancers, Curr. Opin. Oncol. 5,869-876 (1993)

32.Lorincz A.T.,Lancaster W.D.,Kurman R.J.,Jenson A.B., Temple G.F.:Characterization of Human Papillomaviruses in Cervical Neoplasias and Their Detection in Routine Clinical Screening."Viral Etiology of Cervical Cancer", eds.R.Peto,H.zur Hausen,225-237, Cold Spring Harbor Laboratory, New-York (1986).

33.Lyons John: The Polymerase Chain Reaction and Cancer Diagnostics, Cancer Supp. 69, 1527-1531 (1992)

34.Maden C.,Beckman A.M.,Thomas D.B.,McKnight B.,Sherman K.J., Ashley R.L., Corey L.,Daling J.R.: Human Papillomaviruses, Herpes Simplex Viruses and the Risk of Oral Cancer in Men, Am. J. Epidemiol. 135,10,1093-1102 (1992)

35.Maniatis T.,Fritsch E.F.,Sambrook J.:Molecular Cloning: A Laboratory Manual.Cold Spring Harbor Laboratory, 1990.

36.Melchers W.J.G.,Class H.C.J.,Quint W.G.V.: Use of the Polymerase Chain Reaction to Study the Relationship between Human Papillomavirus Infections and Cervical Cancer, Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis. 10,9, 714-727 (1991)

37.Monsonogo J.,Magdelenat H.,Catalan F.,Coscas Y.,Zerat L., Sastre X.: Estrogen and Progesterone Receptors in Cervical Human Papillomavirus Related Lesions, Int.J.Cancer 48,533- 538 (1991)

38.Morrison E.A.B.,Ho G.Y.F.,Vermund S.H., Goldberg G.L., Kadish A.S.,Kelley K.F.: Human Papillomavirus Infection and Other Risk Factors for Cervical Neoplasia: A Case- Control Study, Int.J.Cancer 49,6-13 (1991)

38.Moscicki.A.B.,Palefsky.J.,Smith G.,Siboshski S.,and Schoolnik G.: Variability of Human Papillomavirus DNA Testing in a Longitudinal Cohort of Young Women, Obstet. and Gynecol. 82,578-585 (1993)

39.Nielsen A.L.: Human Papillomavirus Type 16/18 in Uterine Cervical Adenocarcinoma In Situ and Adenocarcinoma, Cancer 65, 2588-2593 (1990)

40.Paquette R.L.,Lee Y.Y.,Wilczynski S.P.,Karmakar A.,Kizaki M.,Miller C.W.,Koeffler H.P.: Mutation of p53 and Human Papillomavirus Infection in Cervical Carcinoma, Cancer 72,1272-1280 (1993)

41.Park J.S.,Jones R.W.,McLean M.R.,Currie J.L.,Woodruff J.D.Shah K.V.,Kurman R.J.: Possible Etiologic Heterogeneity of Vulvar Intraepithelial Neoplasia, *Cancer* 67,1599-1607 (1991)

42.Parry G.,Byrne M.,Morse A.,Coleman D.V.,Taylor-Robinson D., Malcolm A.D.B.: Human Papillomavirus Infection of the Cervix-the Result of a Prospective Study. "Papillomaviruses", eds P. M. Howley,T. R. Broker 13-20, Wiley-Liss, New York (1990)

43.Peel K.R.:Premalignant and Malignant Disease of the Cervix."Dewhurt's Textbook of Obstetrics and Gynaecologyfor Postgraduates", ed. C.R. Whitfield 4.ed.766-785,ELBS Blackwell Scientific Publ.Oxford (1988).

44.Peng H.,Liu S.,Mann V.,Rohan T., Rawls W.: Human Papillomavirus Types 16 and 33, Herpes Simplex Virus Type 2 and Other Risk Factors for Cervical Cancer in Sichuan Province, China, *Int.J.Cancer* 47,711-716 (1990)

45.Reid R.,Greenberg M.,Jenson B.,Husain M.,Willett J.,Daoud Y.,Temple G.,Stanhope C.R.,Sherman A.I.,Phibbs G.D., Lorinez A.T.: Sexually Transmitted Papillomaviral Infections, *Am J. Obstet. Gynecol* 156,212-222 (1987)

46.Rosai J.: Ackerman's Surgical Pathology, 7.ed.pp.1022- 1049, C.V. Mosby Company, Washington D.C.(1989).

47.Schiffman M.H.: Recent Progress in Defining the Epidemiology of Human Papillomavirus Infection and Cervical Neoplasia, *J. Natl. Cancer Inst.* 84, 394-398 (1992)

48.Schiffman M.H,Bauer H.M.,Hoover R.N.,Glass A.G.,Cadell D.M., Rush B.B.,Scott D.R.,Sherman M.E.,Kurman R.J., Wacholder S.,Stanton C.K.,Manos M.M.: Epidemiologic Evidence Showing That Human Papillomavirus Infection Causes Most Cervical Intraepithelial Neoplasia, *J.Natl. Cancer Inst.* 85, 958-964 (1993)

49. Schneider A.: Methods of Identification of Human Papillomavirus. "Papillomaviruses and Human Disease", eds. K. Syrjanen, L. Gissmann, L.G. Koss, 27-29 Springer-Verlag Berlin, Heidelberg Germany (1987).
50. Schwarz E., Freese U.K., Gissman L., Mayer W., Roggenbuck B., Stremlau A., zur Hausen H.: Structure and Transcription of Human Papillomavirus Sequences in Cervical Carcinoma Cells, *Nature* 314, 111-114 (1985)
51. Schwarz E., Schneider-Gadicke A., Roggenbuck B., Mayer W., Gissmann L. and zur Hausen H.: Expression of Human Papillomavirus DNA in Cervical Carcinoma Cell Lines. "Viral Etiology of Cervical Cancer", eds. R. Peto, H. zur Hausen, pp. 281-289, Cold Spring Harbor, New-York U.S.A. (1986).
52. Seedorf K., Krammer G., Dürst M., Suhai S., Röwekamp W.G.: Human Papillomavirus Type 16 DNA Sequence, *Virology* 145, 181-185 (1985)
53. Segnan N.: Cervical Cancer Screening Human Benefits and Human Costs in the Evaluation of Screening Programmes *Eur. J. Cancer* 30,6 873-875 (1994).
54. Sheinin R., Mak T.W. Clark S.P., Viruses and Cancer. "The Basic Science of Oncology", eds. I.F. Tannock, R.P. Hill pp. 52-72, Pergamon Books, Inc. (1987).
55. Shibutani Y.F., Schoenberg M.P., Carpinello V.L., Malloy T.R.: Human Papillomavirus Associated with Bladder Cancer, *Urology* 40, 15-17 (1992)
56. Smotkin D.: Virology of Human Papillomavirus, *Clin. Obstet. Gynecol.* 52, 117-126 (1989)
57. Smotkin D., Wettstein F.O.: Transcription of Human Papillomavirus Type 16 Early Genes in a Cervical Cancer and a Cancer-Derived Cell Line and Identification of the E7 Protein, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 4680-4684 (1986)

- 58.Solomon D.: Screening for Cervical Cancer:Prospects for the Future, J. Natl. Cancer Inst. 85,1018-1019 (1993)
- 59.Spence R.P.,Murrey A.,Banks L.,Kelland L.R.,Crawford L.: Analysis of Human Papillomavirus Sequences in Cell Lines Recently Derived from Cervical Cancers, Cancer Res. 48,324-328 (1988)
- 60.Stoler M.H.,Rhodes C.R.,Whitbeck A.,Chow L.T., Broker T.R.: Gene Expression of HPV Types 16 and 18 in Cervical Neoplasia. "Papillomaviruses", eds. P. M. Howley,T. R. Broker,pp. 1-11, Wiley-Liss, New York (1990)
- 61.Storey A.,Osborn K.,Crawford L.: Co-transformation by Human Papillomavirus Types 6 and 11, J. Gen. Virol. 71, 165-171 (1990)
- 62.Takami Y.,Kondoh G.,Saito J.,Noda K.,Sudiro T.M.,Sjan- rurahman A.,Warsa U.C.,Yutsudo M., Hakura A.: Cloning and Characterization of Human Papillomavirus Type 52 from Cervical Carcinoma in Indonesia, Int.J. Cancer 48, 516- 522 (1991)
- 63.Tase T.,Okagaki T.,Clark B.A.,Manias D.A.,Ostrow R.S., Twiggs L.B., Faras A.J.: Human Papillomavirus Types and Localization in Adenocarcinoma and Adenosquamous Carcinoma, Cancer Res. 48, 993-998 (1988)
- 64.Tase T.,Okagaki T.,Clark B.A.,Twiggs L.B.,Ostrow R.S., Faras A.J.: Human Papillomavirus DNA in Glandular Dysplasia and Microglandular Hyperplasia:Presumed Precursors of Adenocarcinoma of the Uterine Cervix, Obstet. Gynecol. 73, 1005-1008 (1989)
- 65.Ting Y.,and Manos M.: Detection and Typing of Genital Human Papillomaviruses."PCR Protocols", eds.M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, T. J. White,pp. 356-367, Academic Press, San Diego (1990)
- 66.Unger E.:In Situ and Northern Hybridizations, Cancer Supp. 69,1532-1535 (1992).

67. Van Den Brule A.J.C., Meijer C.J.L.M., Bakels V., Kenemans P., Walboomers J.M.M.: Rapid Detection of Human Papillomavirus in Cervical Scrapes by Combined General Primer Mediated and Type-Specific Polymerase Chain Reaction, *J. Clin. Microbiol.* 28, 2739-2743 (1990)

68. Van Den Brule A.J.C., Snijders P.J.F., Raaphorst P.M.J., Schrijnemakers H.F.J., Delius H., Gissmann L., Meijer C.J.L., Walboomers J.M.M.: General Primer Polymerase Chain Reaction in Combination with Sequence Analysis for Identification of Potentially Novel Human Papillomavirus Genotypes in Cervical Lesions, *J. Clin. Microbiol.* 30, 1716-1721 (1992)

69. Villa L.L., Brentani R.R.: Human Papillomavirus Up-Date, *Int. J. Cancer* 48, 163-166 (1991)

70. Vousden K.H.: Human Papillomavirus and Cervical Carcinoma, *Cancer Cells* 1, 43-50 (1989)

71. Walker J., Bloss J.D., Liano S.Y., Berman M., Bergen S., Wilczynski S.P.: Human Papillomavirus Genotype as a Prognostic Indicator in Carcinoma of the Uterine Cervix, *Obstet. Gynecol.* 74, 781-785 (1989)

72. Woodworth C.D., Bowden P.E., Doniger J., Pirisi L., Barnes W., Lancaster W.D., DiPaolo J.A.: Characterization of Normal Human Exocervical Cells Immortalized in Vitro by Papillomavirus Types 16 and 18 DNA, *Cancer Res.* 48, 4620- 4628 (1988)

73. zur Hausen H.: Genital Papillomavirus Infections, *Prog. med. Virol.* 72, 15-21 (1985)

74. zur Hausen H.: Papillomavirus in Anogenital Cancer as a Model to Understand the Role of Viruses in Human Cancers, *Cancer Res.* 49, 4677-4681 (1989)

75. zur Hausen H.: Papillomavirus-Host Interactions in Cervical Carcinogenesis. "New Frontiers in Cancer Causation", ed. O. H. Iversen, 271-281, Washington DC, (1992)

ÖZGEÇMİŞ

1962 yılında İstanbul'da doğdum. Orta öğrenimimi Atatürk Kız Lisesinde tamamladım. 1986 yılında İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji bölümünden mezun oldum. Aynı yıl, İ.Ü. Onkoloji Enstitüsünde Kanser Etyolojisi Bilim Dalında Yüksek Lisans programına başladım. 1989 yılında bu programı tamamladıktan sonra, aynı bilim dalında doktora programına başladım. 1986 yılından beri İ.Ü. Onkoloji Enstitüsünde araştırma görevlisi olarak çalışmaktayım.