



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

ASC-US SİTOLOJİSİ SAPTANAN  
KADINLARDA MİKRONUKLEUS SKORUNUN ASC-US  
SİTOLOJİSİNİN REGRESYON, STABİLİTE VE  
PROGRESYONU ÜZERİNE OLAN ETKİSİ

Dr. Pınar AVCI BULUT  
UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN  
Prof. Dr. C.Ekrem TOK  
MERSİN- 2015



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

ASC-US SİTOLOJİSİ SAPTANAN  
KADINLARDA MİKRONUKLEUS SKORUNUN ASC-US  
SİTOLOJİSİNİN REGRESYON, STABİLİTE VE  
PROGRESYONU ÜZERİNE OLAN ETKİSİ

Dr. Pınar AVCI BULUT  
UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN  
Prof. Dr. C.Ekrem TOK  
MERSİN- 2015

Bu tez, BAP-TF CTB (PAB) 2014-2 TU kodlu proje olarak  
Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından  
desteklenmiştir

MERSİN- 2015

## TEŐEKKÜR

İhtisasa başladığım günden beri her zaman yanımda olup desteğini hissettiren, bana benden çok inanıp yetişmemde emeği sonsuz olan, hoca olmanın ötesinde her tür zor anımda "abla" gibi derdimi paylaşıp mutlaka bir çözüm üreten, asistanı olmaktan her zaman onur duyduğum değerli hocam saygıdeğer anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. Devrim TOK'a; bu mesleği bırakacakken yaptığı onkoloji ameliyatlarını tek nefeste izleyip hayran kaldığım ve onkolog olmak istememde en büyük katkısı olan, tezimin her aşamasında desteklerini esirgemeyen ve asistanı olmaktan onur duyduğum değerli tez hocam Prof. Dr. Ekrem TOK'a; her zaman olduğu gibi tez çalışmamda da desteklerini esirgemeyen değerli abim Yrd. Doç. Dr. Hüseyin DURUKAN'a; her ameliyatında olmaktan mutluluk ve onur duyduğum Doç. Dr. Hakan AYTAN'a ve eğitimime katkısı bulunan tüm değerli hocalarıma teőkükürü bir borç bilirim.

Tez çalışmamda katkısı bulunan değerli tez danışman hocalarım olan Prof. Dr. Gönül ASLAN'a, Prof. Dr. Ayla ÇELİK'e, Prof. Dr. İclal Gürses'e teőkükür ederim. Tez çalışmamdaki yardımlarından dolayı Yrd. Doç. Dr. Seda TEZCAN'a, istatistiğime büyük katkılarından dolayı Yrd. Doç. Dr. Semra ERDOĞAN'a ve mikronukleus çalışmasının her aşamasında desteklerini ve yardımlarını esirgemeyen Gizem GÜLER'e teőkükür ederim.

Başta her tür yardımını esirgemeyen Dr. İlknur AM olmak üzere tüm değerli asistan arkadaşlarıma, hemşirelere ve personellere teőkükür ederim.

Bugün bunları yazabilmemde en büyük emek sahibi olan biricik annem ve babama ve her tür konuda desteklerini hep hissettiren canım ablalarıma ve canım yeğerim Nehir'ime teőkükür ederim.

Bu zorlu asistanlık sürecinin her aşamasında sabırla yanımda olup her an desteğini hissettiğim ve her zaman cerrahi misyonunu örnek aldığım değerli eşim ERSAN BULUT'a teőkükür ederim.

Son olarak hayatıma girdiği andan itibaren bana "sabır"ı öğreten, minicik kalbiyle her sabah kalp atışlarımı hızlandıran, daha şimdiden annesiyle tez yazmayı, nöbet tutmayı ve hasta muayenesini öğrenen canım bebeğime çok teőkükür ederim...

Dr.Pınar Avcı Bulut

Mersin-2015

# İÇİNDEKİLER

ÖZET	5
İNGİLİZCE ÖZET	6
GİRİŞ VE AMAÇ	7
GENEL BİLGİLER	10
SERVİKSİN ANATOMİSİ VE HİSTOLOJİSİ	10
SERVİKS PREMALIGN VE MALIGN LEZYONLARI	11
SERVİKS KANSERİ TARAMASI VE TANI YÖNTEMLERİ	17
ASC-US VE YÖNETİMİ	24
HPV GENEL ÖZELLİKLERİ	27
HPV PATOGENEZİ	31
HPV VE KARSİNOGENEZ	36
MİKRONÜKLEUS	37
MATERYAL VE METOD	43
BULGULAR	51
TARTIŞMA	58
SONUÇ VE ÖNERİLER	66
KAYNAKLAR	67
KISALTMALAR DİZİNİ	77
ŞEKİLLER DİZİNİ	79
TABLolar DİZİNİ	80

## ÖZET

Servikal kanser tarama yöntemlerinin ana hedefi servikal kanserin öncül lezyonlarını erken dönemde teşhis etmektir. ASC-US, %4,5 oranında izlenmektedir.

Çalışmamızın amacı Pap-smear testi ASC-US olarak belirlenen hastalarda mikronukleus (MN) değerleri ve HPV-DNA tipleri ile ASC-US lezyonunun regresyon, stabilite ve progresyonu arasındaki ilişkinin belirlenmesidir.

Çalışmamızda Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın hastalıkları ve Doğum Polikliniği'ne Ocak 2014-Haziran 2014 tarihleri arasında başvuran, ASC-US sitolojik tanısı konulmuş 30 hastada MN skoru ve PCR tekniği ile HPV-DNA tip ve tayini yapılmıştır. Tüm hastalara 4-6 ay sonra tekrar sitolojik değerlendirme yapılarak MN skoru bakılmıştır.

Çalışma grubunda 6/30 (%20) oranında HPV-DNA pozitifliği saptandı. İlk sitoloji sonucu ile bakılan mikronukleus skoru ortalaması  $10,47 \pm 1,89$  olarak bulundu. Dört- altı ay sonra alınan ikinci smear sonuçları ASC-US ve sitoloji negatif olarak raporlandı; progresyon izlenmedi. Bunların %16,6'sının (5/30) smear sonucu ASC-US olarak; %83,3'ünün (25/30) sitoloji negatif olarak raporlandı. İkinci sitoloji ile eş zamanlı MN bakıldı. Sitoloji negatifliği saptanan hastalarda MN skorunda genel olarak düşüş izlenirken; smear sonucu ASC-US olarak belirlenen hastaların MN skorlarının ilkinde yakın olduğu bulundu. Dört- altı ay sonra bakılan MN skoru ortalama  $9,00 \pm 2,29$  olarak bulundu.

Sonuç olarak ASC-US'un regresyon gösterdiği hastalarda MN skoru düşerken; stabil seyrettiği hastalarda MN skoru ilkinde yakın bulunmuştur. HPV-DNA(+) liği, YR-HPV DNA ve DR-HPV DNA tiplerinin pozitifliği ile ASC-US'un regresyon ve stabilitesi arasında anlamlı bir farklılık bulunamamıştır. Bu sonuçlar, ASC-US'un regresyon, stabilite ve progresyonunun öngörülmesinde MN skorunun umut vaat edici bir yöntem olabileceğini düşündürmektedir.

**Anahtar kelimeler:** ASC-US, HPV-DNA, Mikronukleus, Pap-smear, Serviks kanser

## ABSTRACT

### The Effect of Micronucleus Score on Regression, Stability and Progression of ASC-US Cytology in Women with Detected ASC-US Cytology

The main goal of the cervical cancer screening methods is to diagnose the precursor lesions of the cervical cancer in an early stage. Among abnormal cytology results, ASC-US corresponds to 4.5%.

The goal of our study is to determine the relation between micronucleus (MN) values and HPV-DNA types and regression, stability and progression of ASC-US lesions among the patients whose Pap-Smear tests came back as ASC-US.

In our study, HPV-DNA and type designation of 30 patients who applied to Gynecology and Obstetrics, Mersin University Medical Faculty between January 2014 and June 2014, diagnosed with ASC-US cytology, was applied using MN score and PCR technique. All the patients were cytologically reevaluated 4-6 months later and their MN scores were obtained.

HPV-DNA positivity was detected in 6 out of 30 (20%) patients. The mean micronucleus score for first cytology results was  $10.47 \pm 1.89$ . The second smear tests that were applied 4-6 months later were recorded to be ASC-US and cytology negative, and no progression was reported. 16.6% (5 out of 30) of the smear results were ASC-US; 83.3% (25 out of 30) were cytology negative. MN results were assessed at the same time with second cytology results. MN scores were observed to be decreasing for cytology negative patients, while they were close to the original values for patients with ASC-US smear results. The mean MN score that was obtained 4-6 months later was found to be  $9.00 \pm 2.29$ .

In conclusion, MN scores were decreasing in patients with regressing ASC-US, while MN scores were close to the original values in patients with stable ASC-US. No significant difference between HPV-DNA positivity, YR-HPV DNA and DR-HPV DNA types positivity, and regression and stability of ASC-US was found. These results suggest that MN score is a promising method to predict regression, stability and progression of ASC-US

**Key words:** ASC-US, HPV-DNA, Micronucleus, Pap-smear, Cervical cancer

## GİRİŞ VE AMAÇ

Serviks kanseri, gelişmekte olan ülkelerde, meme kanserinden sonra en sık görülen ikinci kanserdir. Tüm dünyada yılda 530.000 yeni serviks kanseri olgusunun tanı aldığı ve 275.000 olgunun da serviks kanserinden öldüğü bildirilmektedir.<sup>1</sup> Dünyada, serviks kanserinden ölüm oranı %52'dir.<sup>2</sup> Gelişmiş ülkelerde yürütülen kanser tarama programları sayesinde, bu kansere bağlı ölüm oranı önemli ölçüde azalmıştır.

Servikal kanser tarama yöntemlerinin amacı; tedavi edilebilir öncül lezyonların tespitidir. Bu amaçla en yaygın kullanılan yöntem servikal sitolojik taramadır. Pap-smear, serviks kanseri taramasında bir model haline gelmesine rağmen sensitivitesi düşüktür ve etkinliği randomize bir çalışmada gösterilememiştir. Bu düşük sensitivite ve sık tekrarlama gerekliliği nedeni ile yeni tarama yöntemleri araştırılmaya başlanmıştır. Serviks kanseri taraması Pap-smear tarama uygulamaları, HPV testinin rolü ve yeni teknolojilerin gelişimi ve sürekli yeniden değerlendirilmesi ile gelişen bir alan olmayı sürdürmektedir.

Son 30 yılda yapılan çalışmalarda HPV onkojenik tipleri ile bu kanser ve öncül lezyonlarının ilişkisi net olarak saptanmıştır. Onkojenik insan papilloma virüs türleri (HPV), özellikle HPV 16 ve HPV 18, serviks kanseri ve öncül lezyonları ile ilişkili başlıca risk faktörüdür. Bu virüs, servikal epitelde, malign sürecin başlatılması ile ilişkili yapısal kromozomal değişiklikler ve anöploidiyi indükler. HPV testi, hem primer tarama yöntemi olarak (servikal smear testine yardımcı veya onun yerine) hem de belirsiz smear sonuçlarının ayrılması veya düşük dereceli lezyonları gösterme metodu olarak kullanılabilir. HPV testinin yüksek maliyetli olması, servikal kanser taramasında kullanılabilirliğini kısıtlamakta ve yeni tarama yöntemleri araştırılmasına yönlendirmektedir.

Yapısal kromozomal anomaliler ve artmış anöploidi ile kendini gösteren kromozomal instabilite, serviks malign öncül lezyonlarının orta safhadan geç safhaya ilerlemesinde kritik rol oynamaktadır.<sup>3</sup> Hücre bölünmesi esnasında çekirdeğe eklenmesinde hata olan kromozomlar veya kromozom parçaları mikronukleusu oluşturur. Mikronukleus, başka bir deyişle; küçük bir "ek çekirdek"tir ve bu ek çekirdek, mitotik disfonksiyona bağlı onarılmamış veya yanlış onarılmış DNA (Deoksiribonükleik asit) lezyonları veya kromozomal parçalardan meydana gelir. Bu nedenle mikronukleus, genetik hasarın hassas

bir göstergesi olarak hem kromozom kaybını ve hem de kromozomal kırılmaları yansıtır.<sup>4</sup> Mikronukleus, kanser başlangıcına sebep olan apoptozis ve bunun uç noktaları olan karyorekzis, piknozis ve yoğunlaşmış kromatinler hakkında da bilgi verebilir. Hücrelerdeki mikronukleus sıklığı, hücre siklusundaki kontrol mekanizmalarının veya DNA tamir genlerinin bozulmasına yol açan sigara kullanımı, pestisitler, radyoterapi, oksidatif stres gibi bir çok durumda artış gösterebilir.<sup>5</sup>

Yüksek mikronukleus frekansları, oral lezyonu olan hastalarda, üst gastrointestinal traktın prekanseröz lezyonlarında bukkal mukozada ve erken meme kanserinde gösterilmiştir.<sup>6,7,8</sup> Çeşitli çalışmalar mikronukleusun, servikal kanser riski olan kadınlarda biyolojik izlem amaçlı kullanılabileceğini göstermiştir.<sup>9,10</sup>

ASC-US, Bethesda klasifikasyonuna göre skuamöz intraepitelyal lezyona (SIL) yol açabilen, önemi belirsiz atipik skuamöz hücreler olarak tanımlanır ve sitolojik taramanın yaklaşık %4'ünde tespit edilir. Bu sitolojik anormalliğin yönetimi; kadının yaşı, gebelik ve adölesan çağda olma gibi durumlarına göre değişmekle birlikte halen tartışmalıdır. 2013 yılına kadar ASC-US takibinde üç yol izlenmekteydi. Kolposkopi, sitolojinin 6 ay sonra tekrarı ve HPV-DNA bakılması yollarından birinin seçilmesi ve sonuçlara göre yönetim önerilmekteydi.

2013 yılında ASCCP tarafından yayınlanan kılavuzda takip ve yönetim stratejisi değişmiştir. Kolposkopi takip modalitesi olmaktan çıkarılmış, hastalara bir yıl sonra sitoloji tekrarı veya HPV-DNA bakılması önerilmiştir. Bir yıl sonraki sitoloji tekrarında  $\geq$  ASC olan olgularda veya HPV-DNA (+) olan olgularda kolposkopi önerilmektedir. HPV testinin takip stratejisine eklenmesi ile birlikte gereksiz kolposkopi sıklığı azalmış ve ileride gelişebilecek olası bir servikal kanser için yüksek riskli HPV pozitifliği saptanan bireyler tespit edilebilmiştir.

Ancak HPV testi, yüksek maliyeti nedeni ile gelişmekte olan ülkelerde tarama programına dahil edilememiştir. Bu yüksek maliyet nedeni ile HPV testi, araştırmacıları, bu teste alternatif olabilecek daha uygun maliyetli tarama testlerinin araştırılmasına yöneltmiştir.

Mikronukleus ile serviks kanseri ve serviksin preinvaziv lezyonları arasındaki ilişkiyi gösteren çok sayıda çalışma mevcuttur. Smear sonucu ASC-US olarak belirlenen hastalarda mikronukleus ile ASC-US'un histolojik sonuçları



arasındaki ilişkiyi gösteren bir çalışma mevcuttur.<sup>11</sup> Smear sonucu ASC-US olarak belirlenen hastalarda HPV-DNA tipi ve mikronukleus arasındaki ilişkiyi gösteren literatürde herhangi bir çalışmaya rastlamadık.

Bu çalışmada; smear sonucu ASC-US olarak belirlenen hastalarda, mikronukleus ve HPV-DNA tipi ile hastalığın regresyon, stabilite ve progresyonu arasındaki ilişkinin belirlenmesi amaçlanmaktadır.

Çalışmadan beklentimiz, mikronukleusun, sitolojisi ASC-US olarak saptanan hastalarda takip stratejisine eklenebilecek düşük maliyetli bir yöntem olup olmayacağının belirlenmesidir.

## GENEL BİLGİLER

### Serviksın anatomisi ve histolojisi

Serviks, Latince'de 'boyun' anlamına gelir. Uterus isthmusu ile vajina arasında yer alan, fiçı şeklinde fibromüsküler bir yapıdır. Serviksın, vajen içerisinde kalan alt yarısına "portio vaginalis", bu bölümün yukarısında kalan bölümüne ise "portio supravaginalis" denir. External osun dışına uzanan kısmı ektoserviks, yukarı uzanan kısmı ise endoserviks olarak adlandırılır. Serviksın kanlanması, hipogastrik arterden köken alan uterin arterin inen dallarından ve kısmen de vajinal arterin servikal dallarından olur. Venler, arterlere paralel olarak seyreder ve v. iliaka internaya drene olurlar. Serviksın lenfatik drenajı ise common, eksternal ve internal iliak, obturator ve parametrial nodlara olur. Endoservikte yaygın sinir ağı bulunmasına rağmen ektoserviks sinirlenme açısından fakirdir ve biyopsi, koterizasyon gibi işlemler lokal anestezi uygulamasından yapılabilir.

### **Skuamokolumnar junction: SCJ (Skuamo-kolumnar bileşke):**

Endoservikse ait silindirik epitelin sonlandığı, ektoserviksın çok katlı yassı epitelinin başladığı yerdir. İki farklı hücre tipi karşılatığı için histolojik olarak keskin bir sınırdır. İntrauterin 6-7. haftada müllerian kanalın birleşmesi ile alt genital kanal meydana gelir. Daha sonra ürogenital sinüs ile invajinasyon yaparak birleşir. Serviks ve vajeni oluşturan müllerian kanal, kolumnar epitle döşelidir. İntrauterin 4. ayda vajen ve serviksın kolumnar epiteli skuamöz metaplazi ile skuamöz epitele dönüşmeye başlar.<sup>12</sup> Bu dönemde, ektoserviksın 15-20 katlı skuamöz epiteli ile endoserviksın kolumnar epitelinin karşılaştığı sınıra 'orijinal skuamokolumnar junction (OSCJ)' adı verilmektedir. Serviks iki tip epitel ile kaplıdır; skuamokolumnar bileşkede birleşen çok katlı yassı epitel ve kolumnar epitel. Yerleşimi %66 ektoservikal, %30 endoservikal ve %4 vajinal fornikstir. Yenidoğanlarda SCJ, ektoservikte yerleşimlidir. OSCJ'nin yeri, skuamöz metaplazinin genişliğini belirler. Gebelik, puberte ve menopoz gibi hormonal uyarılma olaylarına, doğum travmalarına yanıt veren dinamik bir alandır ve yeri, eksternal osa göre değerlendirilir. Doğumdan sonra (özellikle menarştan sonra) uyarılara (travma, hormonal faktörler, pH değişiklikleri, enfeksiyonlar v.s.) yanıt olarak 4,0'a kadar düşen pH, kolumar epitelde zedelenmeye ve immatür skuamöz metaplastik epitele dönüşmesine yol açar.

İmmatür skuamöz metaplazi olgunlaşıp orijinal skuamöz epitelden zor ayırt edilen skuamöz epitele dönüşür. Buna "yeni skuamo-kolumnar bileşke (NSCJ)" denir. OSCJ ile NSCJ arasındaki bölge "transformasyon zonu (T/Z)" olarak adlandırılır. Servikal neoplaziler, bu bölgeden köken alırlar. Reprodüktif dönemde östrojen üretimine bağlı olarak laktobasiller, pH'ı değiştirmek suretiyle, skuamo-kolumnar rezerv hücrelerinin metaplaziye geçmesini uyarır. Metaplazi, OSCJ'nin iç kısmından eksternal osa doğru ve kolumnar villusların üzerinden ilerleyerek transformasyon sınırının oluşmasına neden olur. Bir kadın reproduktif yaşamında perimenopozal yaş grubuna doğru ilerlerken, skuamokolumnar bileşkenin yeri giderek ektoserviksten eksternal osa doğru gerilemeye başlar. Postmenopozal kadında skuamokolumnar bileşke endoservikal kanal içinde yerleşmiştir ve gözle muayenede görülemez.

#### **Transformasyon zonu (T/Z):**

Orijinal yassı-silindirik epitel sınırı ile metaplazi tamamlandıktan sonra ortaya çıkan yeni yassı-silindirik epitel sınırı arasında kalan alandır. Bu bölge mitotik aktivite çok fazla olduğu için mutajenik ve karsinojenik etkilere çok hassastır.<sup>13</sup>

T/Z yeri yaş, hormonal durum, gebelik ve doğum travmalarına bağlı olarak değişir.<sup>14</sup> Çocuklukta ve perimenarşta OSCJ eksternal osta veya çok yakınındadır. Hemen hemen tüm servikal neoplaziler yüksek mitotik aktiviteye sahip bu bölgeden geliştiği için kolposkopide T/Z'yi görüntülemek önemlidir.

#### **Serviksin Premalign ve Malign Lezyonları**

##### **Servikal intraepitelyal neoplazi (CIN) :**

##### **Terminoloji ve tanımlar:**

1949 yılında, ilk olarak Papanicolaou tarafından tanımlanan 'displazi' terimi, kansere progresyon gösterecek lezyonları ifade eder. Bu lezyonlar daha önceleri 'displazi' ve "karsinoma in situ (CIS)" olmak üzere iki başlık altında incelenirdi. Displazi hafif, orta ve şiddetli olarak derecelendirilirdi. 1968 yılında, Richart ve Barron tarafından, displazi sınıflaması modifiye edilerek, invaziv karsinom ile ilişkili lezyonların hepsi "Servikal Intraepitelyal Neoplazi" (CIN) olarak tek ortak kategoriye alınmıştır.<sup>15</sup>

CIN, serviksin premalign bir lezyonudur.<sup>16</sup> İyi differansiye intraepitelyal neoplazm olarak başlayıp, invaziv karsinomda sonlanan intraepitelyal

değişiklikleri ifade eder. Ektoserviks; skuamöz epitel, endoserviks (endoservikal kanalı da içerir) glandüler epitel ile döşelidir.

CIN, skuamöz anormallikler anlamına gelir. Glandüler servikal neoplaziler ise adenokarsinoma in situ ve adenokarsinomayı kapsar.

1988 yılında, Bethesda sistemi tanıtıldı ve 1991 ve 2001 yıllarında revize edildi. Bu sisteme göre sitoloji (Pap-test) için farklı bir terminoloji ve histoloji (biyopsi) için farklı bir terminoloji kullanıldı. Sitolojik anormallikler Servikal İntraepitelyal Lezyon (SIL) terimi ile ve histolojik anormallikler CIN terimi ile tarif edildi.

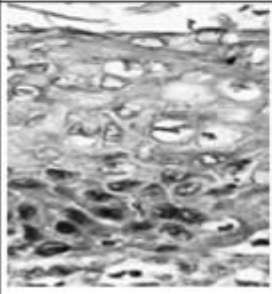
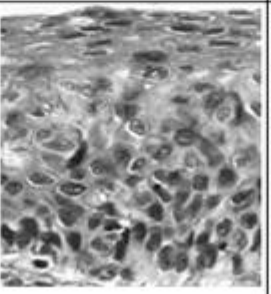
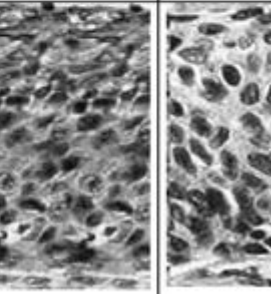

CIN teriminin şiddeti üç derecede ifade edilebilir. CIN sınıflamasında diferansiasyon, nükleer anormallikler ve mitotik aktivite gibi histolojik özellikler önem arz eder.

**CIN I:** Epitelyumun alt üçte birinde meydana gelen hafif atipik hücrel değişiklikler demektir. HPV'nin sitopatik etkisi (koilositik atipi) sıklıkla mevcuttur. Düşük dereceli (low-grade) lezyondur. (Önceki terminolojide "hafif displazi" olarak adlandırılırdı.)

**CIN II:** Epitelyumun alt üçte ikisinde meydana gelen orta dereceli hücrel değişimleri ifade eder. Yüksek dereceli (high-grade) lezyon olarak kabul edilir. (Önceki terminolojide "orta displazi" olarak adlandırılırdı.)

**CIN III:** Epitelyal kalınlığın üçte ikisinden fazlasını kaplayan ve bazen tam kalınlıkta olan hücrel atipik değişiklikleri ifade eder. Yüksek dereceli (high-grade) lezyondur. (Önceki terminolojide "şiddetli displazi" veya "karsinoma in situ" olarak adlandırılırdı.)

2012 yılında ASCCP (American Society for Colposcopy and Cervical Pathology ) tarafından anogenital traktın, HPV ile ilişkili skuamöz lezyonlarını tanımlamak için kullanılan terminoloji değişiklikleri LAST (Lower Anogenital Squamous Terminology) sistemi olarak yayınlandı.<sup>17</sup> Bu sistemde, histolojik servikal bulgular, sitolojik bulgularla aynı terminoloji kullanılarak tanımlandı. Şekil 1' de CIN terminolojisi ve histolojisi gösterilmiştir.

LAKT	sitoloji	LSIL	HSIL		
	histoloji	LSIL	P16 boyama yapılmalıdır	HSIL	
METREDA	sitoloji	LSIL	HSIL		
	histoloji	CIN I	CIN II	CIN III	
ÖNCEKİ TERİMOLOJİ		HAFİF DİSPLAZİ	ORTA DİSPLAZİ	ŞİDDETLİ DİSPLAZİ	KARSİNOMA İN SİTU
HİSTOLOJİK GÖRÜNÜMLER					

\*P16 pozitif olan CIN 2 HSIL olarak sınıflandırılır. P16 negatif CIN 2 LSIL olarak sınıflandırılır.

### Şekil 1. CIN Terminolojisi ve histolojisi <sup>18</sup>

Dünya'da CIN I insidansı %4 iken CIN II ve III insidansı %5'tir.<sup>19</sup> CIN'in servikal invazif kansere dönüşebilme riski vardır. CIN, servikal invazif kansere dönüşüm potansiyeli derecesi ile artar, ancak progresyon ve regresyonunu önceden tahmin etmek imkansızdır.

Tablo1'de CIN'lerde regresyon ve progresyon oranları gösterilmiştir.<sup>20</sup>

**Tablo 1.** CIN'lerde regresyon ve progresyon oranları

	Gerileme %	Kalıcılık %	İn situ kansere dönüşüm (%)	İnvazif kansere dönüşüm (%)
<b>CIN I</b>	57	32	11	1
<b>CIN II</b>	43	35	22	5
<b>CIN III</b>	32	< 56	-	> 12

### **Serviksin Malign Lezyonları:**

Serviks kanseri, Amerika'da jinekolojik kanserler içerisinde, corpus ve over kanserlerinden sonra üçüncü sırada yer alırken, gelişmekte olan ülkelerde tüm kanserler arasında ikinci sırada yer almaktadır.<sup>21</sup> Dünya genelinde, servikal kanserden ölüm oranı %52'dir.<sup>2</sup> Servikal kanser insidansı ve mortalitesi, gelişmiş ülkelerde erişimi daha kolay olan servikal kanser tarama programlarının kullanımına ve HPV aşısının kullanımına bağlı olarak değişmektedir.

Servikal kanser, tarama testleri ile erken dönemde tanı ve tedavisinin mümkün olması, preinvazif döneminin uzun olması nedeni ile önlenebilir bir durumdur.

### **Risk faktörleri:**

Servikal kanserin iki ana histolojik tipinin de benzer risk faktörleri bulunmaktadır. Erken yaşta cinsel ilişki, servikal kanser için önemli bir risk faktörüdür. Kadının çok sayıda seksüel partnerinin olmasının yanında partnerinin yüksek riskli olması (çok sayıda seksüel partnere sahip partner veya HPV enfeksiyonunun olması) da servikal kanser için risk faktörüdür.<sup>22</sup> Partneri sünnetli olanlarda servikal kanser sıklığı daha azdır.<sup>23</sup> Klamidya veya genital herpes gibi seksüel geçişli hastalıkların olması da riski arttırabilir. Cinsel ilişki yoluyla HPV maruziyetinin daha çok olduğu durumlar; erken yaşta ilk doğumunu yapmak ve artan parite ( $\geq 3$ ) durumları da artmış risk ile ilişkilidir.

Özellikle uzun süreli oral kontraseptif kullanımının servikal kanser riskini arttırdığı ve bırakılması ile riskin, hiç kullanmayanlar seviyesine geldiği bilinmektedir.<sup>24</sup> Düşük sosyoekonomik düzey ve siyah ırk her iki tip servikal kanser için de risk faktörü olmasına rağmen; sigara içiciliği adenokanser için önemli bir risk faktörü olarak kabul edilmemektedir.<sup>25</sup> Servikal kanser için genetik yatkınlık belirtilememesine rağmen; kadınlarda persistan HPV enfeksiyonunun genetik yatkınlığı üzerine çalışmalar devam etmektedir.<sup>26</sup> Günümüzde en bilinen servikal kanser risk faktörü ise HPV maruziyetidir.

### **Histolojik tipleri ve yayılım yolları:**

Servikal kanser; doğrudan, lenfatik veya hematojen yolla yayılabilir. Direk yayılım ile uterin korpus, vajina, parametrium, peritoneal kavite, mesane veya rektuma yayılabilir. Hematojen yayılım yerleri en sık akciğer, karaciğer ve kemiktir; barsak, adrenal bezler, dalak ve beyin daha nadir yayılım yerleridir.

Eskiden, obturator lenf nodlarının en sık nodal metastaz yeri olduğuna inanılırdı.<sup>27</sup> Ayrıca bu yayılımın düzenli bir şekilde, öncelikle pelvik duvar ve ardından ana iliak ve paraaortik nodlara doğru ilerlediği düşünülürdü. Sonraki çalışmalar göstermiştir ki pelvik lenf nodu gruplarından herhangi birisi veya paraaortik lenf nodu grubu ile nodal yayılım yeri olabilmektedir.<sup>28</sup>

### **Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO: World Health Organisation) Serviks kanseri histopatolojik sınıflaması:**

#### **A. Skuamöz Kanserler:**

- Büyük hücreli, keratinize skuamöz kanser
- Büyük hücreli, non-keratinize skuamöz kanser
- Verruköz kanser
- Papiller skuamöz ve tranzisyonel hücreli karsinom
- Lenfo-epitelyoma benzeri karsinom

#### **B. Adenokanser:**

- Müsinöz, endoservikal varyant
- Müsinöz, intestinal tip, taşlı yüzük hücreli varyant
- Müsinöz, adenoma malignum
- Müsinöz, villoglandüler adenokarsinom
- Endometrioid tip adenokanser
- Clear cell kanser
- Papiller seröz adenokanser
- Mesonefrik kanser

#### **C. Diğer Kanserler:**

- Adenoskuamoz kanser
- Adenoid kistik kanser
- Nöroendokrin kanser (karsinoid, küçük hücreli, büyük hücreli)
- Andiferansiye karsinom
- Mikst epitelyal ve mezenkimal tümör

Bu kanser tiplerinden Amerika'da en sık görülen skuamöz hücreli karsinom (%69)'dur. Adenokarsinom %25 oranında izlenirken; diğer tiplerin görülme sıklığı %6'dır.<sup>29</sup>

#### **Evreleme:**

Servikal kanser, klinik olarak evrelenir. Çeşitli evreleme sistemleri

tanımlansa da en yaygın kullanılan 2009 yılında Uluslararası Jinekoloji ve Obstetri Federasyonunun (FIGO: The International Federation of Gynecology and Obstetrics) yaptığı evreleme sistemidir.

Serviks Kanserinin 2009 FIGO Evrelemesi:

**Evre I:** Tümör servikste sınırlıdır. Uterus korpusuna uzanım dikkate alınmamalıdır.

**Evre IA:** Tümör sadece mikroskopik olarak görülebilir. Stromal invazyon derinliği 5 mm'den az ve tümör 7 mm'den geniş değildir. Lenfovasküler alan tutulumu sınıflamayı etkilemez.

**Evre IA1:** Stromal invazyon 3 mm'den küçük ve tümör 7 mm'den geniş değildir.

**Evre IA2:** Stromal invazyon 3 - 5 mm arasında ve tümör 7 mm'den geniş değildir.

**Evre IB:** Servikse sınırlı klinik lezyonlar veya Evre IA'dan büyük preklinik lezyonlar.(Bütün gros lezyonlar yüzeysel invazyon olsa dahi Evre IB kanserlerdir.)

**Evre IB1:** 4 cm'den küçük klinik lezyonlar

**Evre IB2:** 4 cm'den büyük klinik lezyonlar

**Evre II:** Tümör serviksi aşmış; fakat pelvis duvarına ulaşmamıştır. Vajen tutulumu olabilir ancak alt 1/3'e ulaşmamıştır

**Evre IIA:** Belirgin parametrial infiltrasyon yoktur. Vajenin üst 2/3'üne kadar tutulum vardır

**Evre IIA1:** 4cm'den küçük; vajen üst 2/3'ten daha az tutulum ile olan klinik lezyonlar

**Evre IIA2:** 4cm'den büyük; vajen üst 2/3'ten daha az tutulum ile olan klinik lezyonlar.

**Evre IIB:** Belirgin parametrial infiltrasyon vardır, ancak pelvis yan duvarına ulaşmamıştır.

**Evre III:** Tümör pelvik duvara kadar ulaşmıştır. Rektal muayenede tümörle pelvis duvarı arasında serbest aralık yoktur. Tümör vajen alt 1/3'ünü infiltre etmiştir. Hastalarda hidronefroz ve/veya nonfonksiyone böbrek bulguları vardır.

**Evre IIIA:** Tümör pelvis duvarına ulaşmamıştır; fakat vajen alt 1/3'ü infiltredir.



**Evre IIIB:** Tümör pelvis duvarına ulaşmış veya hidronefroz veya nonfonksiyone böbrek vardır.

**Evre IV:** Tümör gerçek pelvisi aşmış veya klinik olarak mesane ve/veya rektum mukozası tutulumu vardır.

**Evre IVA:** Komşu pelvik organlara yayılım vardır.

**Evre IVB:** Uzak organlara yayılım vardır.

#### **Tarama Ve Tanı Yöntemleri:**

##### **Sitolojik Yöntemler:**

- PAP-smear
- Sıvı bazlı teknikler
- Kompüterize teknikler

##### **Visüel Yöntemler:**

- Asetik asit testi
- Spektroskopi
- Servikografi
- Kolposkopi

##### **Diğer:**

- HPV testleri
- Polar probe

##### **Sitolojik Yöntemler:**

##### **Pap-Smear:**

İlk kez 1928 yılında Yunan bilim adamı George Papanicolaou tarafından tanımlandığı için onun ismine ithafen PAP-smear veya PAP test olarak adlandırılan bu tarama yöntemi, normal ve anormal servikal hücrelerin toplanıp incelenmesine dayanmaktadır.

Test, servikal displazi ve kanserlerin en sık kaynaklandığı yer olan T/Z'den, bir fırça ve spatula yardımı ile dökülen hücrelerden örnek alıp ince bir tabaka halinde mikroskop lamına yayılması ve saç spreyi veya alkol ile fiksasyonu takiben Papanicolaou boyası ile boyanma sonrası mikroskopik olarak bu hücrelerin incelenmesi esasına dayanmaktadır.<sup>30</sup>

Pap-smear jinekolojide genital kanser taramasında, hormonal durumun değerlendirilmesinde, vajinal ve servikal iltihapların değerlendirilmesinde, genital kanserlerin tedavisi sırasında ve sonrasında tedavi sonuçlarının

değerlendirilmesinde kullanılır.<sup>31</sup> Bir tanı testi değil, tarama testidir ve serviks premalign ve malign lezyonları için risk belirler. Bu testin kullanımında önemli bir sorun ise yanlış pozitif ve yanlış negatif değerlendirmelerdir. Yanlış negatiflik oranı, testin ilk tanımlandığı yıllarda %40' larda iken Dr. Ayre tarafından bulunan spatulanın kullanımı ile %20'lere; hatta alınan önlemlerle %5'e indirgenebilir.<sup>32</sup> En sık nedenleri; yetersiz ve yanlış yerden alınan materyal, yanlış yayma tekniği, yetersiz boyama ve sitoloğun deneyimsizliğidir. Yanlış pozitifliğe yol açan en önemli etken ise genital sistem iltihapları; özellikle trikomonas vajinitidir. PAP-smearin sensitivitesi %51 ve spesifitesi %90'dır.<sup>33</sup>

PAP-smear taraması için örnek alınırken dikkat edilmesi gereken noktalar şunlardır<sup>34</sup>:

- Hastanın vajinal kanaması olmamalıdır.
- Mümkünse menstruasyonun proliferatif fazında alınmalıdır.
- Vajinal spekulum kuru ve steril olmalıdır; lumbrikan kullanılmamalıdır.
- Postmenopozal hastalarda endoservikal fırça kullanılmalıdır.
- Fiksasyonda alkol (%95'lik), spreye tercih edilmelidir. Hücreler havada kurumadan, hemen fiksasyon sağlanmalıdır.
- Smear alınmadan 48 saat öncesinde vajinal duş ve coit yapılmamalı; 7 gün öncesinden vajinal ovüller bırakılmamalıdır.
- Serviks kanseri tanısı için sitolojik örnekler vaginal forniks, ektoserviks ve endoserviksten alınırken, hormonal değerlendirme için örnek vagen yan duvarlarından alınmalıdır.

Pap-test, 1950'den beri servikal kanser insidansını %79, mortaliteyi %70 azaltmıştır.<sup>35</sup> Tüm bu olumlu bulgulara rağmen tarama hataları, yanlış takip, yanlış negatiflik nedeniyle ölümler devam etmektedir. Bu yüzden sitolojinin sensitivitesini arttırmak için yeni yöntemler bulunmaya çalışılmıştır. Tablo 2' de servikal kanser taraması ile ilgili çeşitli organizasyonların önerileri gösterilmiştir.

**Tablo 2. Servikal Kanser Tarama ile İlgili Çeşitli Organizasyonların Önerileri**

	<b>ACS ve ASCCP 2012</b>	<b>USPSTF 2012</b>	<b>ACOG 2012</b>
<b>TARAMAYA NE ZAMAN BAŞLAMALI</b>	21 yaş 21 yaşın altındaki kadınlar cinsel ilişki yaşı veya diğer risk faktörleri gözlemlenmesiz taranamamalı	21 yaş	21 yaş
<b>YILLIK TARAMA DURUMU</b>	Herhangi bir tarama yöntemiyle yıllık taranmaya gerek yoktur(yaş kaçılırsa olsun)	Klinisyenler, sağlık problemleri ve önleyici metodları tartışmak için yıllık Pap test taramasını kullanabilir. Klinisyenlerin ve sağlık hizmetleri, hastaya belirli aralıklarla önerilen yararlı koruyucu hizmetlerin alınmasını kolaylaştırmak için etkin yollar aramalıdır.	30-65 yaş arası kadınlara yıllık tarama önerilmez.
<b>TARAMA METODLARI VE ARALIKLARI</b>			
<b>Sitoloji</b> <b>21-29 yaş</b> <b>(konvansiyonel veya sıvı bazlı)</b>	3 yılda bir	3 yılda bir	3 yılda bir
<b>30-65 yaş</b>	3 yılda bir	3 yılda bir	3 yılda bir
<b>HPV ko-test</b> <b>21-29 yaş</b> <b>(sitoloji+HPV test)</b>	<30 yaş HPV ko-test önerilmez	<30 yaş önerilir	<30 yaş HPV ko-test önerilmez
<b>30-65 yaş</b>	5 yılda bir	Tarama aralıklarını genişletmek isteyen kadınlar için 5 yılda bir önerilir	5 yılda bir
<b>Primer HPV test</b>	30-65 yaş arası kadınlarda birçok klinikte tek başına HPV testi önerilmemektedir.	<30 yaş; tek başına veya kombine edilerek önerilir	Belirtilmemiş
<b>TARAMA NE ZAMAN BIRAKILMALI</b>	>65 yaş; yeterli tarama hikayesi varsa	>65 yaş; yeterli tarama hikayesi varsa	>65 yaş; yeterli tarama hikayesi varsa
<b>HİSTEREKTOMİ SONRASI TARAMA</b>	Total histerektomi sonrası tarama önerilmez; subtotal histerektomi sonrası tarama, önerilen şekilde devam etmeli	Histerektomi olan kadınlara da önerilir	Önerilmez

**ACS:** American Cancer Society

**ASCCP:** American Society for Colposcopy and Cervical Pathology

**USPSTF:** United States Preventive Services Task Force

### **Tarama Önerileri:**

Amerikan Jinekoloji ve Obstetri Derneği (ACOG: American College of Obstetricians and Gynecologists) 2012 yılı tarama önerileri <sup>36</sup>:

- Taramaya 21 yaşında başlanmalıdır.
- 21-29 yaş arası her 3 yılda bir Pap-test ile tarama önerilir.
- 30-65 yaş arası tercihen her 5 yılda bir ko-test (Pap test+ HPV test) yapılmalı; ancak tek başına 3 yılda bir Pap-test de kabul edilebilir. Tek başına HPV testi önerilmez
- 65 yaş üzeri kadınlarda; CIN II/III veya kanser öyküsü yoksa veya son 10 yıl içerisinde arka arkaya 3 negatif Pap-test veya 2 negatif ko-test varsa tarama önerilmez. CIN II/III veya adenokarsinomu olanlarda ise taramaya devam edilmelidir.
- Servikal kanser öyküsü, HIV ile infekte, immün süpresif veya inutero DES (Diethylstilbestrol) maruziyeti olanlar bu önerilerin dışında değerlendirilmelidir.

### **Sıvı bazlı teknikler:**

Klasik Pap-smear alınmasından farklı olarak, sıvı bazlı tekniklerde; örnekler, skuamo-kolumnar bileşke ve ektoserviksin T/Z'den spatül ve fırça ile alındıktan sonra, fiksatif solüsyonu ile dolu şişeye daldırılır ve hücreler şişe içindeki fiksatife toplanır. Sitoloji laboratuvarına fiksatif ile dolu şişe etiketlenerek gönderilir. Laboratuvarda, 40.000 epitelyal hücre lama yayılarak hazırlanır. Hazırlanan preparat klasik Papanicolaou boyası ile boyanır ve sitolog ya da sitopatologlar tarafında değerlendirilir. Bu yeni teknolojinin maliyeti klasik Pap-smear testinden daha yüksektir; ancak daha duyarlı bir test olduğundan daha az tarama aralığı gereksinimi yüksek maliyeti dengelemektedir.

Sıvı bazlı sitoloji; hem tarama, hem de sitolojik yorumlama hatalarından kaynaklanan yalancı negatif sonuçların oranını azaltmaktadır.<sup>37</sup> Bu teknik sayesinde tanı için daha çok servikal hücre toplanabilir ve örnekten hazırlanan preparatlarda hücre kümeleşmesi, kan ve enflamatuvar değişikliklere bağlı artefaktlara daha az rastlanır. Bu yöntemlerin Thin-prep, Autocyteprep gibi çeşitleri vardır. Yüksek oranda alkol içermesi ve buna bağlı daha az hücre artığı içermesi; tüm spesmeni elde etmeye olanak vermesi; daha fazla oranda tanısıl

anomalilerin saptanabilmesi ve daha az oranda yetersiz smear elde edilmesi; yanlış negatiflik oranını azaltması avantajları arasında sayılabilir.

Dezavantajları ise; konvansiyonel sitolojiye göre spesifitesinin düşüklüğü; değerlendirilmesinde ek eğitim gerekmesi; laboratuvar aşamasının daha uzun olması ve daha yüksek maliyeti olarak sayılabilir. Yapılan bir çalışmada konvansiyonel smear ve Thin prep'in yalancı negatiflik sonuçları karşılaştırılmış ve konvansiyonel pap smear için yalancı negatiflik %15, Thin prep için %4 olarak bulunmuştur.<sup>38</sup>

#### **Sitolojik Sınıflama:**

##### **Papanicolaou Sınıflaması:**

Yaklaşık 50 yıl boyunca en sık kullanılan bu sisteme göre sitolojik tablolar 5 sınıfta incelenir.

**Class I (Negatif I):** Tamamen normal yayma görünümü.

**Class II (Negatif II):** Kesinlikle benign tipte hücreler ve tam iltihabi yayma görünümü.

**Class III (Şüpheli):** Anormal hücrelerin bulunuşu. Bunlar normalden sapmış oldukları ve kuşku uyandırdıkları halde malign tanımına uyacak kadar da anormal değildirler.

**Class IV (Zayıf pozitif):** Birkaç malign hücre.

**Class V (Kuvvetli pozitif):** Çok sayıda malign hücre.

Papanicolaou sistemi çok uzun bir süredir kullanıldığı için, zaman içinde değişen klinik ve histolojik terminoloji yüzünden kliniğe uygulamada zorluklarla karşılaşmış ve Pap-sınıflaması, çeşitli modifikasyonlara uğramıştır.

##### **Bethesda Sınıflaması:**

İlk defa 1988 yılında ortaya atılan ve 1991 yılında revize edilen Bethesda sisteminin son hali 2001 yılında yayınlanmıştır. Bu sistemde, smear örneğinin değerlendirmeye uygunluğu hakkında da sınıflama yer almaktadır. Tablo 3' te Bethesda sınıflaması gösterilmiştir.

**Tablo.3** Bethesda Sınıflaması

<p>➤ <b>SPESİMEN TİPİ</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Konvansiyonel, likit bazlı v.s.</li></ul>
<p>➤ <b>SPESİMEN YETERLİLİĞİ</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Değerlendirmek için yeterli (endoservikal transformasyon zonunun komponentlerinin varlığı/yokluğu ve/veya diğer kalite indikatörleri; kan, inflamasyon, v.s.)</li><li>• Değerlendirmek için yetersiz</li><li>• Örnek işleme konulmadı / reddedildi (sebebi)</li><li>• Örnek işleme konuldu-incelendi ancak epitel anormalliklerini değerlendirmek için yetersiz (sebebi)</li></ul>
<p>➤ <b>GENEL KATEGORİZASYON (Opsiyonel)</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>• İntraepitelyal lezyon veya malignansi açısından negatif</li><li>• Epitelyal hücre anormallikleri (skuamöz/glandüler) (sonuç/yoruma bak)</li><li>• Diğer (≥ 40 yaş kadında endometrial hücreler görülmesi, v.s.) (sonuç/yoruma bak)</li></ul>
<p>➤ <b>OTOMATİK GÖZDEN GEÇİRME</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Otomatik cihazla inceleme yapıldıysa cihazı ve sonucunu belirt</li></ul>
<p>➤ <b>YARDIMCI TESTLER</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Test metodunun kısa bir tanımı</li></ul>
<p>➤ <b>YORUM / SONUÇ</b></p> <p>❖ <b>Intraepitelyal Lezyon/Malignansi Açısından Negatif</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Organizmalar</li><li>• Trichomonas vaginalis</li><li>• Morfoljik olarak kandidayı andıran fungal organizmalar</li><li>• Bakteriyel vajinozis lehine değişen vajinal flora</li><li>• Actinomycesle uyumlu bakteriyel morfoloji</li><li>• Herpes simplex ile uyumlu hücresel değişiklikler</li></ul> <ul style="list-style-type: none"><li>• Diğer non-neoplastik bulgular</li><li>• Reaktif hücresel değişiklikler<ul style="list-style-type: none"><li>• İnflamasyon</li><li>• Radyasyon</li><li>• RIA</li></ul></li><li>• Histerektomi sonrası glandüler hücre durumu</li><li>• Atrofi</li></ul> <p>❖ <b>Epitelyal Hücre Anomalileri</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Skuamöz hücre anomalileri<ul style="list-style-type: none"><li>• Atipik skuamöz hücreler ( ASC ) ASC – US ASC – H</li><li>• Low-grade skuamöz intraepitelyal lezyon ( LSIL ) HPV / Hafifi displazi / CIN I</li><li>• High-grade skuamöz intraepitelyal lezyon ( HSIL ) CIN II / CIN III / CIS</li><li>• Skuamöz hücreli karsinom</li></ul></li><li>• Glandüler hücre anomalileri</li><li>• Atipik glandüler hücreler ( AGC )<ul style="list-style-type: none"><li>• Endoservikal hücreler ( NOS veya açıklayıcı bilgi )</li><li>• Endometriyal hücreler ( NOS veya açıklayıcı bilgi )</li><li>• Glandüler hücreler ( NOS veya açıklayıcı bilgi )</li></ul></li><li>• Atipik glandüler hücreler ( AGC ) - Favor neoplazi<ul style="list-style-type: none"><li>• Endoservikal hücreler ( Favor neoplazi )</li><li>• Glandüler hücreler ( Favor neoplazi )</li></ul></li><li>• Endoservikal adenokarsinoma in situ</li><li>• Adenokarsinoma<ul style="list-style-type: none"><li>• Endoservikal</li><li>• Endometriyal</li><li>• Ekstrauterin</li><li>• Başka şekilde belirtilmeyenler</li></ul></li></ul>

### **HPV Testleri:**

Önceleri sadece morfolojik kriterlere dayanılarak yapılan HPV tanısı için günümüzde çeşitli immünolojik metodlar ve moleküler tespit yöntemleri kullanılmaktadır.

### **In-situ Hibridizasyon:**

Radyoizotoplarla işaretlenmiş HPV problemlerinin elde edilmesiyle viral nükleik asitin saptanmasına olanak sağlar. Normal görünümlü dokularda da bu yöntemle HPV-DNA saptanabilmektedir. Yüksek duyarlılığı vardır ve HPV subgruplarına da bakılabilir.<sup>39</sup>

### **Hybrid-Capture (HC) Yöntemi:**

Bir solüsyon hibridizasyon yöntemi olan bu test; ikinci nesil HPV test yöntemlerindedir. FDA onayı almıştır. İki yaklaşım içermektedir. Birincisi 1995 yılında FDA'den onay alan ve YR-HPV tiplerini belirleyen Hibrid yakalama tüp (HCT)'tür. Diğeri ise 1999 yılında FDA onayı alan ve HCT'den birkaç tip daha fazla belirleyebilen Hibrid Yakalama II (HC II)'dir. Hybrid-capture yöntemi ile 0,2 pgr kadar HPV-DNA bile saptanabilmektedir.<sup>40</sup> Bu yöntem, sinyal amplifikasyonu kullanarak nükleik asitleri doğrudan belirler.

Spesimen, Digene servikal örnekleyici ya da süpürge tipi servikal örnekleyici ile ve Cyty Preserv Syt solüsyonu ile toplanır. Bu çözelti ile DNA denatüre edilir ve açığa çıkan DNA, DNA-RNA hibridleri oluşturmak üzere spesifik RNA (ribonükleik asit) problemleri ile birleştirilir. Oluşan hibridler, spesifik antikorlarla kaplı yüzey üzerinde yakalanır ve bu yakalanan hibridlerin bağlandığı antikorlara alkali fosfataz ile bağlı antikor parçaları ile karıştırılır. Bu reaksiyonlarda oluşan ışık ürünü; relatif ışık birimlerinde (RLU) ölçülür. RLU, HPV-DNA ürünüyle karşılaştırılır ve sonuç 1,0 ya da daha fazla ise pozitif olarak kabul edilir. Basit ve hızlı sonuç veren bir tekniktir. En önemli dezavantajı ise düşük riskli veya yüksek riskli gruplar içerisindeki spesifik HPV tiplerini ayırt edememesidir. Tahmini yanlış negatiflik oranı %1,1-7,5 arasındadır.<sup>41</sup>

### **Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR: Polymerase Chain Reaction):**

Nükleik asit amplifikasyon yöntemlerinin en önemlisidir. Her HPV tipi için özgül primerler ve ısıya dirençli polimeraz (Taq polimeraz) kullanılarak özgül hedef DNA sıralarının enzimatik amplifikasyonunu sağlar. En sık L1 geni amplifiye edilir. Hibridizasyon metodlarından çok daha hassas bir tekniktir ve teorik olarak bu testle, bir milyon hücrede tek HPV-DNA molekülünü tespit

etmek mümkündür. Üç adımlı bir yöntemdir. Yapılan bir çalışmada PCR için sensitivite %87,4 ve spesifite %55 iken; HCII için bu oranlar sırasıyla %92,5 ve %51'dir.<sup>42</sup> Bütün mukozal HPV-DNA tiplerini belirleyebilir.

### **ASC-US ve Yönetimi**

2001 Bethesda sınıflamasında yeniden düzenlenen Atipik Skuamöz Hücre (ASC) kavramı, yıllardır çeşitli fikir ayrılıklarına neden olmuştur.

Bu başlık altında, atipik skuamöz hücre-önemi bilinmeyen (ASC-US) ve atipik skuamöz hücre-yüksek dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon (HSIL) dışlanamıyor (ASC-H) olmak üzere iki tip tanımlamaya yer verilmiştir.

ASC tanımında, nicel veya nitel olarak tanımlayıcı bir değerlendirmeye olanak sağlamayan; fakat SIL düşündürülen sitolojik değişiklikler ifade edilmektedir.<sup>43</sup> ASC, servikal tarama programlarında saptanan en sık sitolojik anormalliktir ve %5 olarak raporlanmaktadır.<sup>44</sup> ASC adı altında, HPV'ye bağlı gözlenen değişimler, inflamasyon, dejenerasyon gösteren atipi, havada kurutulmuş smear ve diğer artefaktlar yer alır. Bu nedenle, benign reaktif değişiklikleri düşündürülen bulgular dikkatlice değerlendirilerek "intraepitelyal lezyon veya malignite açısından negatif" olarak sınıflandırılmalıdır.

1988'de ilk Bethesda sisteminde ortaya konuluşundan itibaren ASC-US tanımı, patologlar ve klinisyenler tarafından tartışmalı bir konu olmuştur. 1991 yılında bu kavram revize edilmiş ve 'ASC-US; reaktifi destekleyen' ve 'ASC-US; neoplaziyi destekleyen' olmak üzere sınıflaması önerilmiştir. 1994 yılında yayınlanan atlarda ise ASC-US "nitelik veya nicelik olarak skuamöz intraepitelyal lezyon (SIL) tanısı konulmasına yeterli olmayan; fakat reaktif değişikliklere ait olanlara göre daha belirgin olan hücresel anormallikler" olarak tanımlanmıştır.<sup>45</sup> Amerika Birleşik Devletleri'nde her yıl 2 milyondan fazla kadına ASC-US tanısı konulmaktadır.<sup>46</sup>

Bethesda 2001 sınıflamasına göre ASC-US kriterleri aşağıdaki gibi sıralanmaktadır;

I. Çekirdeklerin kapladığı alan, normal intermediate skuamöz hücre çekirdeğine göre 2,5-3 kat daha fazla,

II. Çekirdek/sitoplazma oranı hafifçe artmış,

III. Minimal nükleer hiperkromazi ve kromatin dağılımında veya çekirdek şeklinde düzensizlik,



#### IV. Dens oranjofilik sitoplazma ile ilişkili nükleer anormallikler.

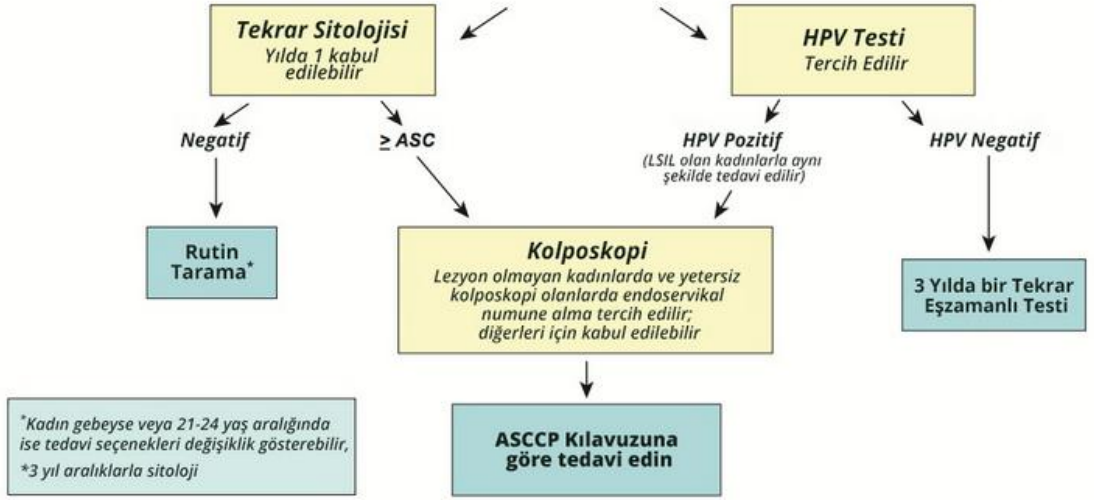
ASC-US olgularının 1/3- 2/3' ü HPV ile ilişkisizdir. HPV (-) olan ASC-US çoğunlukla maturasyondaki bir anormallik veya atrofi, inflamasyon gibi hücresel değişikliklerle ilişkilidir. Standart tanısal yöntemler kullanıldığında ASC-US insidansı %3-5 arasında değişmektedir. Bir sitoloji kliniğinde ASC-US tanısı alan olgular, toplam smearlerin %5'ini geçmemeli; LSIL'den 2, en fazla 3 kat fazla görülmelidir. Bu, patoloji laboratuvarının değer kalite kontrolü için kullanılmaktadır.<sup>47</sup> ASC-US tanısı konulan hastalardan elde edilen servikal biyopsi materyallerinde CIN 1 oranı %10-20, CIN 2 veya 3 oranıysa %3-5 olarak bildirilmiştir. Bu vakaların % 0,1- 0,2 kadarında ise altta yatan nedenin invaziv kanser olduğu bildirilmiştir.<sup>48</sup>

ASC-US yönetiminde adolesanlar, gebeler, immün süprese hastalar ve menopozal hastalar gibi bazı özel gruplar önem arz etmektedir. Örneğin adolesanlarda HPV enfeksiyonunun en geç 24 ayda geçmesi beklenir ve buna bağlı sitoloji çoğunlukla negatifleşir. Bu nedenle bu popülasyonda triaj amaçlı HPV testinin yeri yoktur.

2007 yılında ASCCP tarafından ASC-US yönetim seçenekleri üç grupta toplanıyordu. Birincisi; PAP-testin 6 ayda bir tekrarlanması ve anormal bulgu saptandığı takdirde kolposkopi uygulanmasıydı. İkincisi; hemen kolposkopi uygulanması; üçüncü ise HPV testi uygulanması idi. Bu rehberde göre ASC-US sonucu likit-baz sitoloji ile elde edilmişse YR-HPV DNA için likit-baz spesmeninde kalan rezidü hücrelerde YR-HPV DNA aranabilirdi. Bu hastanın HPV testi istenmesi için tekrar çağırılmasını da gerektirmezdi. Reflex HPV testi denilen bu değerlendirme kost-efektiftir, kolaydır ve %44-69 hastayı kolposkopiden kurtarır.

2013 yılında ASC-US yönetiminde ASCCP tarafından yeni değişiklikler yapılmıştır. Buna göre direkt kolposkopi artık bir seçenek olmaktan çıkmış; smear tekrarı 6 ayda değil; yılda bir önerilmiştir. 21-24 yaş arası yönetim değişirken; postmenopozal hastalarda yönetim aynı kalmıştır. Şekil 2'de ASCCP 2013 kılavuzuna göre ASC-US yönetimi özetlenmektedir.

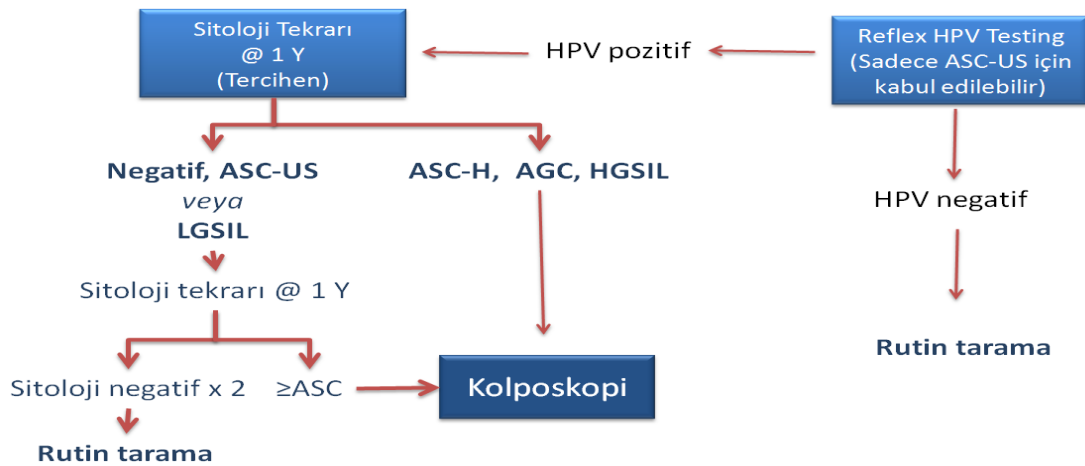
### Sitolojide Önemi Belirsiz Atipik Skuamöz Hücreli (ASC-US) Kadınların Tedavisi\*



Şekil 2. ASCCP 2013 Kılavuzuna Göre ASC-US Yönetimi

ASC-US ve HPV(+) grupta kolposkopide CIN tespit edilmezse 1 yıl sonra ko-test yapılır. Herhangi biri pozitif gelirse kolposkopi tekrarlanır. İkiside negatif ise 3 yıl sonra ko-test ve sonrasında rutin tarama önerilir.

21-24 yaş arası yönetim ise diğer yaş gruplarından farklılık göstermektedir. Şekil 3' te ASCCP kılavuzuna göre bu yönetim özetlenmektedir.



Şekil 3. ASCCP 2013 Kılavuzuna Göre 21-24 Yaş Arası ASC-US ve LSIL Yönetimi

Persistan HPV (-) ASC-US durumu genellikle inflamasyon ve atrofiyle ilişkilidir. Hastanın pelvik muayenesi normal, postkoital kanama, anormal uterin kanama gibi semptomları yoksa yıllık smear takibi önerilmektedir.

### **Human papilloma virüs(HPV)**

#### **HPV'nin viral özellikleri:**

HPV, papova viridae ailesinden, küçük, zarfsız, 55-60 nm büyüklüğünde, ikozahedral kapside sahip, yaklaşık 7900 bç uzunluğunda çembersel çift sarmallı DNA içerir. Günümüzde, 200'den fazla subtipinin olduğu ve yaklaşık 40 tipinin genital enfeksiyonlara neden olduğu bildirilmektedir.<sup>49</sup> HPV zarfsız olduğundan nispeten stabil bir virüstür, pek çok ortamda aylarca kalabilir. Ayrıca virüs ısıya dayanıklıdır.

Yakın zamana kadar HPV'nin yeni bir alt tipinin ortaya konulması için daha önce tanımlanmış HPV tiplerinden %50'den az DNA homolojisi içermesi gerekmekte iken, günümüzde yeni bir tip tanımlayabilmek için tüm genomun kodlanması ve E6, E7 ve L1 bölgelerindeki nükleotid zincirinin önceki tiplerle %90'dan daha az oranda benzerlik göstermesi gerekmektedir. Kapsid 72 kapsomerden oluşan her biri L1 ve L2 adında en az iki kapsid proteini içeren ikozahedral bir yapıdadır.<sup>50</sup> Her bir kapsomer major kapsid proteini L1'in bir pentameridir. Her bir virion kapsidi minör kapsid proteinin çoklu kopyalarından oluşmuştur. Elektron mikroskopunda bakıldığında virüs, bir golf topunu andırmaktadır.

HPV'nin tüm açık okuma çerçevesi (ORF: open reading frame) protein kodlayan sekansları bir zincire bağlanmıştır.

Viral genom, transformasyon ve replikasyondan sorumlu erken bölge (E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, E8 okuma proteinleri), kapsid proteinlerini sentezleyen geç bölge (L1-L2) ve replikasyonun orijin aldığı ve replikasyonun kontrol edildiği kodlama yapmayan bölge (noncoding region: NCR veya longcoding region=LCR) olmak üzere üç farklı bölgeden oluşmaktadır.<sup>51</sup> HPV gen bölgeleri ve fonksiyonları Tablo 4'te verilmektedir.

**Tablo 4.** HPV gen bölgeleri ve fonksiyonları<sup>51</sup>

<b>KODLAMA BÖLGESİ</b>	<b>FONKSİYON</b>
<b>E1</b>	Viral DNA replikasyonu
<b>E2</b>	Viral transkripsiyon aktivasyonu ve düzenlenmesi
<b>E3</b>	Bilinmiyor
<b>E4</b>	Virionların salınımı
<b>E5</b>	E7 ile birlikte transformasyon(hücre iskeletinin bozulması)
<b>E6</b>	Transformasyon, p53'e bağlanma ve parçalanması
<b>E7</b>	Transformasyon, pRB'ye bağlanması Viral replikasyonun düzenlenmesi
<b>L1</b>	Majör kapsid proteini oluşumu
<b>L2</b>	Minör kapsid proteini oluşumu

Birinci bölge, HPV viral genomundaki yüksek derecede çeşitlilikten sorumludur ve 400-1000 bp arasında kodlanmayan düzenleyici bir bölgeyi içermektedir. Bu bölge ORF'lerin transkripsiyonunu kontrol ederek DNA replikasyonunu düzenleyen bir P97 çekirdek düzenleyici içermektedir.

İkinci bölge "erken bölge" olarak adlandırılır ve E1, E2, E4, E5, E6 ve E7 ORF'lerinden oluşur. Bu ORF'ler viral replikasyon ve onkogenezele ilişkilidirler.

Üçüncü bölge "geç bölge" olarak adlandırılır ve viral kapsid için L1 ve L2 yapısal proteinlerini kodlar. L1; ökaryotik hücrelerde eksprese olma özelliği gösteren majör kapsid proteindir. L1 tarafından kodlanan protein, kapsidde bulunan başlıca proteindir ve papillomavirusler arasında oldukça korunmuş ve her HPV tipinde benzer olan proteindir. L1 ve L2, major ve minör kapsid proteinlerini içeren ayrı iki yapısal proteini kodlar. L2 tarafından kodlanan protein değişik HPV tipleri arasında çok farklıdır ve HPV tipleri arasındaki antijenite farklılığını ortaya çıkarır. Geç bölgede transkribe olan tüm proteinler hücre kökenli transkripsiyonel proteinler tarafından düzenlenir ve sadece terminal matürasyon gösteren skuamöz epitelyal hücrelerde üretilir. L1 ve L2 tarafından kodlanan kapsid proteinlerinin miktarı epitelyum terminal matürasyonu ile yüksek oranda korelasyon gösterir. Kondilom gibi iyi diferansiye HPV tarafından oluşturulan lezyonlar L1 ve L2 tarafından kodlanan

proteinlerden zengindir; buna karşın, yüksek dereceli CIN lezyonları gibi az diferansiye lezyonlarda çok az miktarda kapsid proteinleri bulunur. Erken bölge ORF'leri viral DNA replikasyonundan önce eksprese edilen proteinleri kodlar. Üç erken ORF (E5, E6 ve E7) onkogendir ve değişimi ayarlarlar. İki düzenleyici protein, E1 ve E2, replikasyon ve transkripsiyonu düzenler. Ayrıca E2, E6 ve E7'nin ekspresyonuna negatif etki yapar.<sup>52</sup>

### **Sınıflandırma:**

1995 yılında papillomaviruslar, 4'ü karsinojenik (HPV tip 16 ve 18) ve 2'si ise olası karsinojenik (HPV tip 31 ve 33) tip olarak olarak sınıflandırılıp iki temel gruba ayrılmıştır.<sup>53</sup> Papillomaviruslarda yeni bir tip tanımlayabilmek için; HPV genomunda, bilinen en yakın HPV tiplerinin L1, E6 ve E7 ORF'leri arasında %10'dan daha fazla bir farklılığın olması gerektiği bildirilmektedir. Bu farklılık %2-10 arası ise yeni bir subtipi, %2'den az ise tip içi çeşitliliği göstermektedir.<sup>54</sup>

Papillomaviruslar karakteristik tropizm gösterir. Bazı tipler kutaneotropik bazıları ise mukozotropiktir. Başka bir grup HPV ise farklı olarak kutanöz ve müköz dokulardan ve lezyonlardan izole edilebilirler. HPV duyarlı olan dokuya göre kutanöz ve mukozal olarak 2 grupta incelenebilir. Kutanöz HPV'ler derinin skuamoz epitelini infekte eder ve burada replike olur. Mukozal HPV'ler ise müköz membranları infekte edip replike olurlar ve epitelyum proliferasyonunu indüklerler.

Servikal kanser ve prekürsörleriyle ilişkisine göre HPV'ler yüksek riskli ve düşük riskli olmak üzere iki gruba ayrılarak incelenebilir. Düşük riskli tipler; 6, 11, 42, 43, 44, 54, 55, 61, 62, 64, 71, 72, 74, 81, 83, 84, 87, 89, 91; yüksek riskli tipler; 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 67, 68, 69, 70, 73, 82,85 olarak sayılabilir. Yüksek riskli gruptaki bazı HPV tipleri nadiren kanserlerle ilişkilendirilebilirken, skuamoz intraepitelyal lezyonlarda sıkça bulunmaktadırlar. Bu nedenle bazı bilim adamları bu tipleri orta riskli tipler arasında sınıflandırmaktadırlar. Bunun yanında düşük riskli HPV tiplerinin de bazen servikal karsinomlara yol açabileceği bildirilmektedir. Düşük riskli gruplar benign anogenital kondiloma ve düşük grade skuamoz intraepitelyal lezyonlara yol açarken, yüksek riskli gruplar anogenital kanserleri oluşturmakta ve servikal kanserlerin %99,7'sinde saptanmaktadır. Tablo 5'te HPV tipleri ve ilişkili oldukları hastalıklar gösterilmektedir.

**Tablo 5.** Hastalıklarla İlişkilerine Göre HPV Tipleri

HASTALIK		HPV TİPİ
<b>KUTANÖZ HASTALIK</b>		
<b>Plantar siğiller</b>		1, 2, 4, 63
<b>Genel siğiller</b>		2, 1, 7, 4, 26, 27, 29, 41, 57, 65, 77, 1, 3, 4, 10, 28
<b>Düz siğiller</b>		3, 10, 26, 27, 28, 38, 41, 49, 75, 76
<b>Diğer kutanöz lezyonlar (epidermoid,laringeal karsinom)</b>		6, 11, 16, 30, 33, 36, 37, 38, 41, 48, 60, 72, 73
<b>Epidermodisplazi verrusiformis</b>		2, 3, 10, 5, 8, 9, 12, 14, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 36, 37, 38, 47, 50
<b>Kondiloma akuminata (Genital siğiller)</b>		6, 11, 30, 42, 43, 45, 51, 54, 55, 70
<b>MUKOZAL HASTALIK</b>		
Rekürren respiratuar papillomatozis		6, 11
Lokal epitelyal hiperplazi (Heck hastalığı)		13, 32
Konjunktival papillomlar/karsinomlar		6, 11, 16
<b>CIN</b>	Belirlenmemiş	30, 34, 39, 40, 53, 57, 59, 61, 62, 64, 66, 67, 68, 69
	Yüksek risk	6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 74
	Düşük risk	16, 18, 6, 11, 31, 34, 33, 35, 39, 42, 44, 45, 51, 52, 56, 58, 66
Servikal karsinom		16, 18, 31, 45, 33, 35, 39, 51, 52, 56, 58, 66, 68, 70

Onkojenik HPV tipleri içinde 16 ve 18 servikal intraepitelyal neoplazilerin (CIN) %52'sinden ve servikal kanserlerin ise %77'sinden sorumlu iken, HPV 6 ve 11 ise anogenital kondilomların %90'ından sorumludur.<sup>55</sup> HPV tip 6 ve 11 düşük risk grubundadır, nadiren malignensiye sebep olan, genital siğillerin çoğunun etkeni olan, en sık rastlanılan iki tiptir. HPV tip 16 ve 18 ise invaziv anogenital kanserlerde öne çıkan, major yüksek risk grubunda yer alan tiplerdir.<sup>56</sup> Tanımlanan HPV tiplerinin 40'tan fazlasının anogenital yolun epitelinin ve vücudun diğer mukozal bölgelerini infekte ettiği bildirilmektedir. Bu tiplerin 18 kadarının onkojeniteye sebep olduğu gösterilmiştir. Tablo 6'da HPV genotiplerinin risk gruplarına göre dağılımı verilmiştir.

**Tablo.6** HPV Genotiplerinin Risk Gruplarına Göre Dağılımı

<b>Yüksek Riskli Tipler</b>	16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 67, 68, 69, 70, 73, 82,85
<b>Düşük Riskli Tipler</b>	6, 11, 32, 40, 42, 44, 54, 55, 61, 62, 64, 71, 72, 74, 81, 83, 84, 87, 89,91

### **Patogenez:**

HPV oldukça spesifiktir ve türler arası bulaş bildirilmemiştir. HPV'nin bilinen tek konağı insandır. Servikal T/Z'de bulunan immatür skuamöz metaplazi, HPV'nin hedef bölgesidir ve malign dönüşüm için en yüksek risk taşıyan bölgedir. Bu bölgedeki matürasyonun az olduğu fetal dönem, puberte ve gebeliğin erken dönemi T/Z metaplazisinin en aktif olduğu dönemlerdir.

HPV replikasyonunun epitel stratum germinativumundaki (basal tabaka) hücelere girişi ile başladığı düşünülmektedir. Epitel dokunun travması sonucunda epitel yüzeyi bozulur ve enfeksiyon L1 ve L2 kapsid proteinlerin konak hücre reseptörlerine bağlanmasıyla başlar.<sup>57</sup> Diğer birçok virusta olduğu gibi HPV'nin bazı tipleri konak hücreye, hücre yüzeyinde bulunan heparan sülfat ile bağlanmaktadır.<sup>58</sup> HPV'nin konak hücreye bağlanmasında proteoglikanların da rol oynadığı bilinmektedir.

HPV, viral transkripsiyon ve replikasyonu için ihtiyaç duyulan proteinleri konak hücreden faydalanarak kodlar. Konak hücrenin HPV genomunun LCR bölgesinin etkileşimi ile HPV replikasyonu başlar ve HPV "rolling circle" (yuvarlanan çember) replikasyon modeli ile nükleusta çoğalır. E1 proteini viral DNA replikasyonu, E2 proteini ise hem viral replikasyon hem de transkripsiyonun kontrolü için gereklidir. Bu proteinler HPV genomunun bazal hücrelerin nükleusunda epizomal halde kalmasını ve replikasyonunun devamını sağlar. E1 ve E2 kompleks oluşturarak LCR2 'deki replikasyon orijinine bağlanır ve DNA replikasyonunu başlatır. E1 proteininin helikaz aktivitesi vardır. E2 proteini ayrıca E6 ve E7 genlerinin ekspresyonunu baskılar. E4 proteini hücreye şeklini veren sitoskeletona bağlanarak yapısını bozar. E5 proteini hücre membranındaki üreme faktör reseptörlerine bağlanarak hücre proliferasyonunu stimüle eder. E6 ve E7 proteinleri hücreleri transforme edici proteinlerdir. Hücrelerin transformasyonu viral DNA konak hücre genomuna integre

olduğunda gerçekleşir. Sadece HR-HPV tiplerinin genomları konak hücre DNA'sına integre olur. LR-HPV tiplerinin genomu benign ve düşük grade lezyonlarda yani selim lezyonlarda her zaman ekstrakromozomal epizom olarak bulunur. HPV DNA'nın entegrasyonu sırasında normalde viral onkogenleri baskılayan E2 proteininin geninde bozulma meydana gelir ve viral onkoproteinler olan E6 ve E7 aktive olur ve daha stabil olarak eksprese edilirler. Bu etkileşim sonucunda E6 ve E7 genlerinin transkripsiyonu indüklenir.<sup>59</sup> Ardından E6 ve E7 proteinleri p53 ve pRb proteinlerine bağlanıp bunları inaktive ederek konak hücrenin mitotik aktivitesini azaltırlar. E6 ve E7 proteinlerinin fonksiyonu, konak hücreye HPV invazyonu sırasında viral replikasyonu kolaylaştırmaktır. E6 proteini p53 proteinini hedefler ve p53 bir hücresel ubiquitin ligaz tarafından degrade edilir. Bu yıkım inaktive edici bir mutasyon ile aynı etkiye sahiptir.

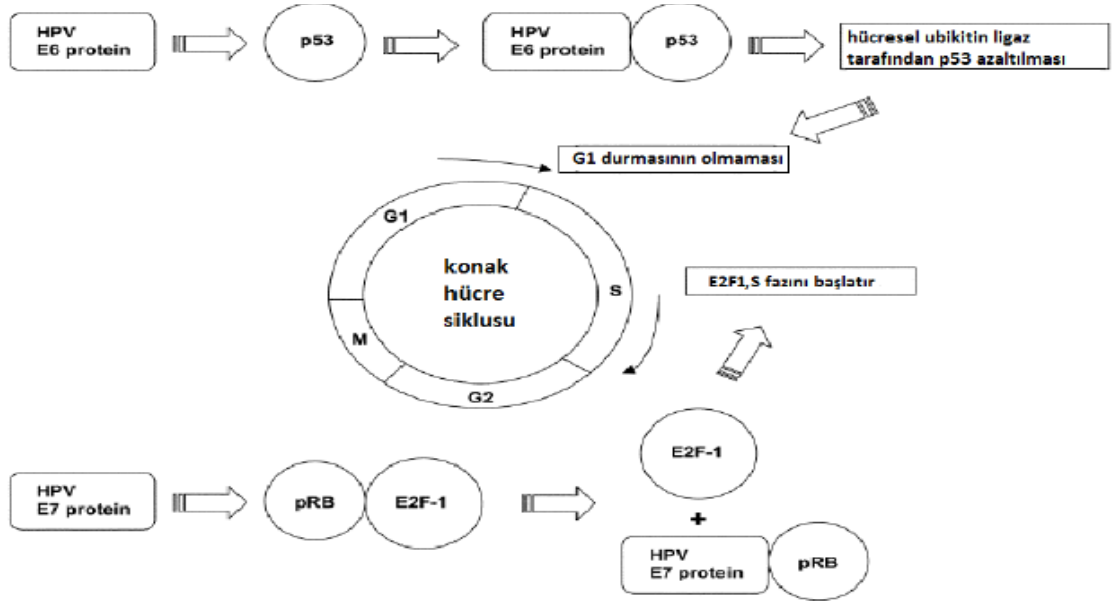
Sonuç olarak G1 durur, apoptozis ve DNA onarımı iptal olur. Düşük riskli HPV E6 proteinleri p53'e ölçülebilir seviyelerde bağlanmaz ve in vitro olarak p53 stabilitesi üzerinde bir etkisi yoktur. Ayrıca E6'nın telomerazı aktive etmesi de hücrelerin sürekli proliferasyonuna neden olur. HPV E7 gen ürünü proteinlerin R13 ailesinin hipofosforile formuna bağlanır. Bu bağlanma pRB ve hücresel transkripsiyon faktörü E2F-1 in arasındaki kompleksi bozar ve bu da E2F-1'in serbestleşmesi ile sonuçlanır, bu da hücrenin S fazına girmesi için gereken ürünlerin gen transkripsiyonuna izin verir. E7 gen ürünü siklin E gibi diğer mitotik olarak inaktif hücresel proteinlerle de ilişki kurabilir. Sonuç hücresel DNA sentezinin stimülasyonu ve hücre proliferasyonudur. Ardından E5 gen ürünü mitojen-aktive protein kinaz aktivitesini indükler ve artırır. Böylece büyüme ve farklılaşma faktörlerine hücresel cevapları güçlendirir. Bu durum ardışık proliferasyon ve konak hücrenin gecikmiş farklılaşması ile sonuçlanır. Ardından E1 ve E2 gen ürünleri sentezlenir. E2 gen ürünü, E6 ve E7 genlerinin transkripsiyonunu bloke eden bir DNA bağlayıcı proteindir ve LCR'de yer alan replikasyonun viral orijinine E1 gen ürününün bağlanmasına izin verir. Bu bağlanma, hücre siklusunun S fazındaki ekstra kromozomal elementler olarak viral genomun replikasyonunu başlatır. Genomun kopya sayısı, bu hücrelerde sabit bir seviyede tutulur ve transkriptler düşük bir seviyede eksprese edilir. E6 ve E7 transkripsiyonunun E2 aracılı down-regülasyonu; p53, pRB proteinlerinin salınmasıyla ve konak hücrenin normal farklılaşmasına devam etmesine izin



verilmesiyle sonlanır. Sonrasında geç promotor, kapsid genleri L1 ve L2 yi aktive eder. Viral partiküller çekirdekte birleşir ve tamamen kornifiye epitelyal tabakaları halinde salınır ve ayrılır. E4 gen ürünü, papilloma virus gen partiküllerinin olgunlaşması ve salınımında rol oynar. Süreç, sitolitik gibi görünmektedir. Replikasyon sürecinde viral DNA epitelin tüm kalınlığı boyunca yer alırken, intakt virionlar dokunun sadece üst tabakalarında bulunur. Siğil veya kondilomada viral replikasyon, basal tabaka hariç tüm epidermal tabakaların proliferasyonu ile ilişkilidir. Bu durum akantozis, parakeratozis, hiperkeratozis ve histolojik olarak görülen tipik papüllomatöz hücre yapısını oluşturan rete yarıklarının derinleşmesine yol açar. Bazı infekte hücreler geniş, genellikle poligonal sitoplazmik bir vakuol içerisinde küçülmüş bir çekirdeği olan, skuamöz hücreler olan koilositlere dönüşür. Basal tabakadaki hücrelerin aşırı çoğalması, bazıları anormal olan yüksek mitoz oranı, malign veya premalign hastalığın bir özelliğidir. Viral genom nükleusta persiste olur ve hücrelerin mitozu ile diğer yeni hücrelere aktarılır. Replikasyonun erken dönemlerinde E6 ve E7 parabazal hücrelerce eksprese edilir. İki geç protein olan virionların toplanması ve DNA paketlemesinden sorumlu L1 ve L2'nin ekspresyonu ise oldukça geç ve matür skuamöz epitelde olur. Üretimin son basamağı olan enfekte virion oluşumu için enfekte epitelyal hücrelerin terminal farklılaşması gereklidir. Enfekte virüslerin salınımı ise epitelyal hücrelerin döngüsü içindeki son basamak olan deskuamasyon sırasında oluşur.

Sonuçta HPV enfeksiyonunun devamı epitelyal hücrelerin farklılaşma sürecine bağlıdır. Virüs ilk olarak bazal keratinositleri enfekte eder, fakat yüksek orandaki viral proteinlerin ekspresyonu farklılaşmış epitelyal hücrelerde olur. Enfeksiyonun ilk aşamasında hücre başına 50- 100 kopya replikasyonu olurken, enfekte hücrelerin farklılaşmaya başlaması ile hücre başına en az 1000 ile birlikte aşırı E6, E7 ve geç proteinler üretilmeye başlanır. E6 ve E7 proteinlerinin ekspresyonu yüksek "grade"li lezyonlara dönüşümde artış gösterdiğinden, terapötik aşılar için çok iyi bir hedeftir. Bu süreçler non-litik olduğundan bu sırada inflamatuvar süreçlerde çok az bir etkilenme olur. Sonuçta HPV konakçı immün sistemden pratik olarak gözükmez bir şekilde çok uzun bir süre kalır. HPV' nin prodüktif enfeksiyonu yüzeyel tabakalarda sitoplazmik vakuolizasyon, perinükleer halo ve genellikle büyük, hiperkromatik nükleus ile karakterize "koilositoz" denilen sitopatik etki oluşturur. Koilositoz, boşluk anlamına gelen

koilos kelimesinden gelir. HPV replikasyonu bazal tabaka hariç epiderminin diğer tabakalarında aşırı proliferasyona yol açar ve hücrelerde hiperplazi (akantoz) ve hiperkeratoz oluşur. HPV patogenezi Şekil 4'te özetlenmiştir.



**Şekil 4.** HPV Patogenezi

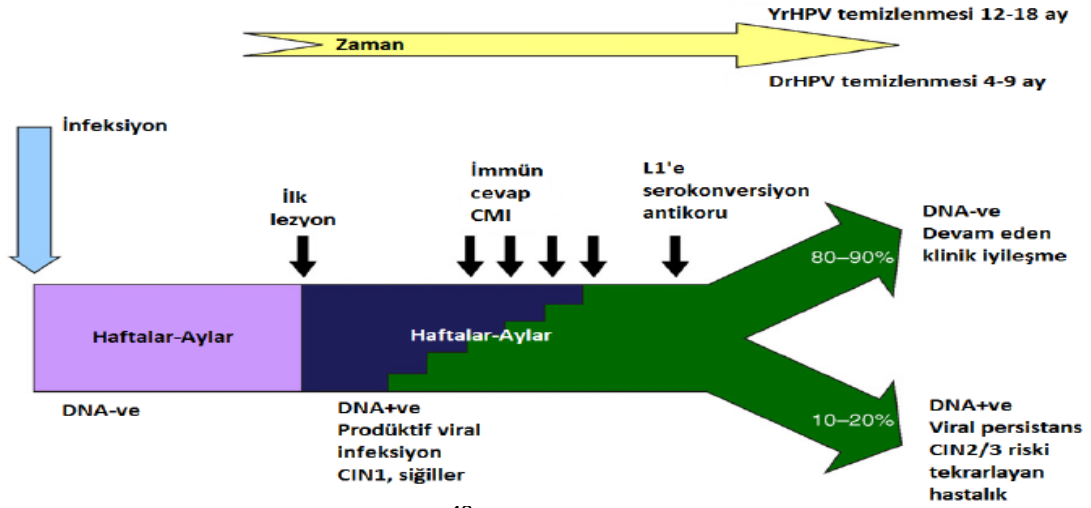
### HPV Doğal Seyri:

Serviksin hemen hemen tüm preinvazif lezyonlarında ve servikal kanserde HPV saptanmıştır. HPV-DNA sırasıyla ASC-US'ta %30,8, LSIL'de %63,2 ve HSIL'de % 83 oranında pozitif olarak saptanmıştır.<sup>60</sup> HPV enfeksiyonu genellikle asemptomatik, lokal, çoğu geçici ve klinik belirtilere sebep olmaz. Yeni HPV enfeksiyonlarının ortalama süresi 12 aydır ve %70'i 1 yıl içinde ve % 90'ı 2 yıl içinde temizlenir. İlk HPV enfeksiyonu ve servikal kanser gelişimi arasındaki süre genellikle 10-15 yıldır.

HPV enfeksiyonundan sonra doğal bağışıklık süresi ve HPV'nin doğal hikayesinin birçok yönü tam anlaşılmamıştır. Moleküler biyoloji sayesinde HPV enfeksiyonlarının doğal seyri daha iyi anlaşılabilir. Papillomavirüsler epiteli enfekte etmek için bazal ya da parabazal hücrelere ulaşmalıdır. Servikte bu olay skuamokolumnar bileşkede olur. Aynı zamanda bu olay transformasyon bölgesinde metaplazik skuamöz epitelin immatür bazal ya da parabazal

hücrelerden oluştuğu ince, immatür kısımlarında ortaya çıkar. Mitotik olarak aktif olan hücre enfekte olduğunda virüs hücre içinde latent formda kalır ve DNA nükleusta yer alırken replikasyon sadece normal hücre siklusu ile eşzamanlı olarak oluşur. Bu duruma "latent enfeksiyon" adı verilir. Latent enfekte hücreler morfolojik olarak normaldir. Tam virion üretilmediğinden latent enfeksiyonu olan hastalar enfeksiyonu başkalarına bulaştırmazlar. Latent enfeksiyonlar sadece HPV-DNA hibridizasyonu gibi moleküler tekniklerle saptanabilir. Latent enfeksiyonu olan hastalar klinik olarak tanınamazlar. Latent enfeksiyonu olan bireyler virüsü belli ve önceden tahmin edilemeyen aralıklarla salgılarından belirli bir zaman sürecinde tarama yapılan kadınlarda HPV DNA saptanması değişkenlik gösterir.

Çoğu kadında ilk ortaya çıkan HPV enfeksiyonu hiçbir tedaviye gerek kalmadan normal konakçı immünolojik savunma mekanizmaları sayesinde kendiliğinden iyileşmektedir. Ancak bilinmeyen nedenlerle bazı bireylerde latent papillomavirüsler konak hücre siklusundan bağımsız olarak replikasyona başlamakta ve çok miktarda virion ortaya çıkmaktadır. Bu döneme 'prodüktif viral enfeksiyon dönemi' adı verilmektedir. Prodüktif enfekte epitelde viral replikasyon intermediate ve süperfisyal hücrelerde ortaya çıkmakta ve en fazla viral yük terminal diferansiye epitelde bulunmaktadır. Viral replikasyonun erken genler tarafından kontrol edilmesine rağmen, epitelyal hücreler diferansiye oldukça konak epitel hücreleri tarafından diferansiyasyona spesifik transkripsiyonel faktörler üretilmekte ve viral DNA'yı çevreleyecek kapsid proteinleri sentez edilmektedir. YR-HPV'ler kendi DNA'larını konakçı DNA'larına entegre ettiklerinden vücuttan eradikasyonları uzun sürmektedir. HPV-DNA'nın 8 aydan uzun süre vücutta tespiti persistan enfeksiyonu göstermektedir. Hastaların %10'unda persistan enfeksiyon görülür ve bu olguların invazif kansere ilerlemesi 15-20 yıllık bir süreci kapsamaktadır. HPV'nin doğal seyri, Şekil 5'te özetlenmektedir.



**Şekil 5.** HPV'nin doğal seyri <sup>49</sup>

YR-HPV ile persiste infeksiyonu olan hastalar HSIL ve servikal kanser gelişmesi bakımından büyük risk altındadır. Buna karşılık servikal kanser gelişmesi için HPV infeksiyonu gerekli fakat tek başına yetersiz bir sebeptir. Persistan YR-HPV infeksiyonu olan hastalarda uygun kofaktörler varsa prekanseröz lezyonların ileri formları gelişir. Sigara, cinsel aktivitenin erken yaşta başlaması, uzun süreli oral kontraseptif kullanımı, immün yetmezlik, multiparite, çok sayıda cinsel partner olması ve diğer cinsel yolla geçen infeksiyonların varlığı gibi kofaktörler karsinogeneziste rol alır. Erken tanınmadığı ve tedavi edilmediği takdirde ortalama 15 yıl sonra servikal kansere dönüşür.<sup>61</sup>

HPV'ye karşı immün cevap geç oluşur. HPV latent, non-litik infeksiyon oluşturduğundan ve viremi fazı olmadığından dolayı HPV'ye karşı antikorlar HPV-DNA tespitinden 8 -18 ay kadar uzun süre sonra ve düşük düzeyde gelişir. Üstelik HPV ile enfekte keratinositlerin yüzeylerinde az miktarda HPV antijeni sunmaları da virusun immün cevaptan kaçmasında rol alır. HPV'nun kapsid proteini L1'e karşı gelişen tip spesifik IgG (Immunoglobulin G) veya IgA (Immunoglobulin A) antikorları serum veya servikal sekresyonda tespit edilir ve koruyucudur. Ancak HPV ile enfekte olan kişilerin hepsinde tespit edilebilir düzeyde antikor cevabı yoktur. Servikal kanseri olan HPV 16 DNA pozitif kişilerin yaklaşık % 50'sinde IgG antikor cevabı oluşur. HPV tip spesifik IgG antikor pozitifliği yıllarca persiste edebilir. HPV lezyonlarının gerilemesinde hücrel immünite rol oynar. Hücrel immünitenin baskılandığı HIV (Human

Immunodeficiency Virus) enfeksiyonu veya organ transplantasyonu yapılan kişilerde HPV lezyonları daha yüksek oranlarda görülür.<sup>62</sup>

### **HPV ve servikal karsinogenez:**

Serviks kanseri tüm dünyada kadınlardaki kansere bağlı ölümler içerisinde meme kanserinden sonra ikinci sıklıktadır.<sup>63</sup> Neredeyse tamamında (%99,7) HPV-DNA izole edilmektedir.<sup>64</sup> Servikal malign transformasyon için en yüksek risk taşıyan bölge, dolayısı ile HPV'nin hedef bölgesi T/Z'de bulunan skuamöz metaplazi bölgesidir.

Serviks kanseri-HPV ilişkisi ilk olarak 1980'lerin başında alman virologist Herold Zun Hausen tarafından belirlenmiş, zamanla daha iyi anlaşılmıştır. Servikal kanser gelişimi için YR-HPV enfeksiyonu mutlaka gereklidir. Latent evre, subklinik evre ve klinik evre olmak üzere servikal HPV enfeksiyonun 3 evresi vardır.

**Latent Evre:** Ortalama 3 hafta ile 8 ay arasında sürer. Virüs, stratum germinatumdaki bazal hücreleri enfekte eder. Virüs genomu kılıfından ayrılır ve hücre çekirdeğine girerek konak DNA'sına girmeden latent olarak kalır. Hastalığın bu dönemde morfolojik, sitolojik ve kolposkopik hiçbir bulgusu yoktur; yalnızca ultrasensitif PCR teknikleri ile saptanabilir.<sup>65</sup>

**Subklinik Evre:** Virüs genomu replike olur ve büyüme faktörlerinin etkisi ile bu evreye geçilir. Intraepitelyal neoplaziler bu evreye girer. Epitelde proliferasyon, akantozis ve hiperkromazi olur. HPV'nin karakteristik bulgusu olan ve malign transformasyon göstermeyen koilositler de bu dönemde görülebilir. Bu dönemde sitoloji ve kolposkopi pozitif olabilir. HPV bu dönemde konak genomuna entegre olabilir veya olmayabilir. Konak genomuna yalnız YR-HPV'ler entegre olabilir. Entegre olsun veya olmasın anormal smear ve kolposkopi sonuçlarına neden olabilir. Kesinlikle tedavi edilmelidir.

**Klinik Evre:** Klinik olarak bulgularla yani kondilom, servikal lezyon veya kanser gelişimi ile karakterizedir. İnfeksiyonu meydana getirebilmek için HPV'nin bazal ve parabazal hücrelere ulaşması gerekmektedir. Viral genler, epitelyal hücrelerin çoğalmasını ve farklılaşmasını düzenleyen mekanizmalarla etkileşirler ve bu yolla kromozal dengesizliklerin ve malign differansiasyonun ortaya çıkmasına neden olurlar. Tümör gelişebilmesi için çoğunlukla virüs genomunun konak DNA'sına entegre olması gerekmektedir. Bu birleşme E1 ve E2 bölgelerinden olur. E2 bu şekilde inaktifleşerek, E6 ve E7 nin aktifleşmesine

neden olur. Bu da tümör baskılayıcı genler olan P53 ve pRB 'nin baskılanmasına ve kontrolsüz çoğalma ve malign dönüşüme neden olur. Viral E6 ve E7 onkogenlerinin bazal ve parabazal hücrelerde dengesiz bir şekilde ekspresyonu ile servikal karsinogenez indüklenir. Bu durumda epitelde differansiyon aşamaları bloke olur ve yüksek dereceli displazilerde E6 ve E7 miktarı çok yüksektir.

### **Mikronukleus:**

Hücrede mitozun metafaz-anafaz geçişi esnasında oluşan, hücre sitoplazması içinde, ana nukleusun dışında fakat nukleus ile şekil, yapı ve boyanma özellikleri bakımından aynı olan küçük küresel yapılara "mikronukleus" (MN) denir.<sup>66</sup> Başka bir deyişle mikronukleus, hücre bölünmesi sırasında serbest kalan kromozomal parçaların ya da kromozomların ortamda varlığını devam ettirmesidir. Temel olarak çeşitli karsinojenik, mutajenik ve klastojenik ajanlara organizmanın maruz kalması sonucu oluşan DNA hasarıdır. Mikronukleusun çeşitli oluşum mekanizmaları Tablo 7'de özetlenmiştir.

**Tablo 7.** Mikronükleus Oluşum Mekanizmaları<sup>68</sup>

- DNA kırıkları sonucu oluşan asentrik kromozom/ kromatid fragmanları
- Tüm kromozomun/kromatidin kinetokorları üzerindeki tübülün fiberlerinin tutunmasındaki hatalar sonucu nukleus dışında kalması
- Sentromerik DNA'da oluşan hatalar sonucu kromozom/kromatidlerin nukleus dışında kalması
- Kinetokor proteinlerinde hataların oluşması sonucu kromozom / kromatidlerin nukleus dışında kalması
- Nükleoplazmik köprü oluşumu ve kırılması
- Histon modifikasyonları ve geç replikasyon
- Kırık-füzyon-kırık (BFB: bridge-fusion-break) sonucu oluşan gen amplifikasyonu nedeniyle nukleer tomurcuklanma

MN, fiziksel ve kimyasal mutajene maruz kalan hücrelerde, kromozomların hasar görmesi veya onların asentrik parçaları ya da mitotik

iğdeki hatalar nedeniyle kutuplara çekilemeyen kromozomların sitoplazmada yoğunlaşması sonucu oluşur yani kromozomal fragment veya tüm bir kromozomu içerebilir.<sup>67</sup> MN, esas olarak hücre siklusunu kontrol eden genlerdeki kusurlar, mitotik içcikte bozukluk, kinetokor ve diğer mitotik aparatüs parçalarındaki bozukluk, sentromerik DNA hipometilasyonu gibi mekanizmalardaki kusurlardan oluşur. Mikronukleüs oluşumu ilk olarak eritrositlerde saptanmıştır. Zamanla genetik hasar ölçümü için toksikolojide, diyetle, ilaç sanayinde, kanser riski oluşum şüphesinde ve radyoterapide önemi anlaşılmıştır.<sup>66</sup> DNA hasarının in vivo ve in vitro olarak belirlenmesinde, en ekonomik ve en pratik tekniklerden biri haline gelmiştir.

Mikronukleüsler mitozdan sonra farklı yollar izleyebilir;<sup>69</sup>

1. Apoptozis ile hücreden uzaklaştırılabilir,
2. Hücreden dışarı atılabilir,
3. Ana nükleüs içine tekrar girebilir,
4. Nükleüs dışı bir yapı olarak, hücre sitoplazması içinde kalabilir.

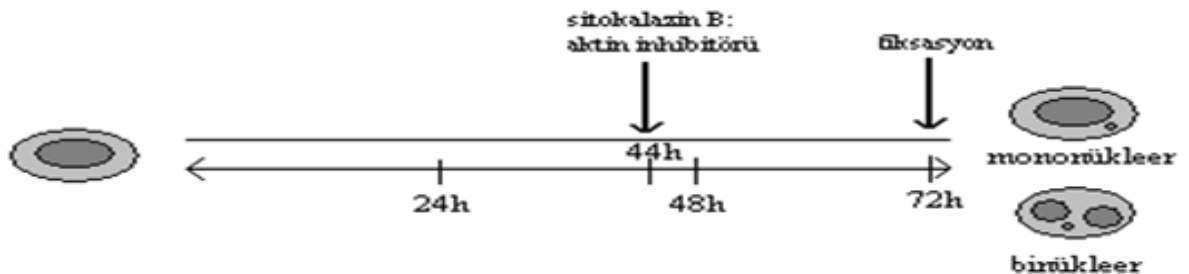
MN çalışması lenfositler, fibroblastlar ve dökülmüş epitelyal hücrelerle yapılabilmektedir. MN yöntemi, fiziksel ve kimyasal genotoksik ajanların etkilerinin belirlenmesine olanak sağlayan bir yöntemdir ve in vivo genotoksin maruziyetinin değerlendirilmesi, in vitro genotoksisite testleri, nütrigenomiks çalışmaları, farmakogenomik ve kanser riskinin değerlendirilmesinde yerini almıştır. Basit, kısa zamanda sonuç veren ve DNA hasarı konusunda güvenilir bir tekniktir. Günümüzde birçok kanser tipi ile kromozomal kırıklar arasında bağlantı olduğu bilinmektedir. Bu nedenle, kanserli olgularda MN testi yapılmakta ve anlamlı sonuçlar elde edilmektedir.<sup>70</sup>

Sitokinez Baskılanmış Mikronukleüs (Cytokinesis Block MicroNucleus :CBMN) sitalazin-B (Cyt-B)'nin hücre bölünmesini sitokinez evresinde durdurma özelliği temel alınarak tanımlanmıştır. Cyt-B, sitokinez evresinde aktin filamentlerin ucuna bağlanarak aktinin polimerize olmasını önler ve böylece hücre bölünmesini durdurur.<sup>71</sup> Bu analiz, MN ile beraber apoptotik ve nekrotik hücreleri de tanımlar. Skorumla özellikle mikronukleüs gösterme potansiyeline sahip bir kez bölünen binükleer hücrelerle sınırlıdır. Son yıllarda CBMN; kromozom kırıkları, DNA hatalı onarımı (misrepair), kromozom kaybı, non-disjunction, nekroz, apoptozis ve sitostazis incelemelerinde kullanılabildiği için kapsamlı bir yöntem haline gelmiştir. Kromozom kırıkları kendiliğinden,

mutajenler, iyonize radyasyon veya DNA hasarına neden olan kimyasallar nedeni ile oluşabilmektedir. Genellikle kırılan uçlar tekrar birleşir ve kırık onarılır; ancak bazen kırıklar kromozomal delesyonlara ve hatta birden fazla kırığın olması durumunda kromozomların yeniden düzenlenmesine yol açabilir.

Kromozom kırıkları hücre siklusunun G1, S ve G2 aşamalarına meydana gelebilir.<sup>72</sup>

İki tip kromozomal kırık vardır. Kromozom tipi kırıklar ve kromatid tipi kırıklar. Hangisinin olacağı, hücre siklusunun hangi fazında ajana maruz kaldığına bağlıdır. Eğer ajan mitoz bölünmenin G0 veya G1 fazında etkili ise kromozom tipi kırıklara, S veya G2 fazında etkili ise kromatid tipi kırıklara yol açar. Kromozom kırılması sonucu oluşan asentrik parçalar ya metafazda kaybolur ya da anafazda mikronukleusları oluşturur. Bu metod aynı zamanda nükleoplazmik köprü oluşumu, telomer end-fusion veya DNA misrepair sonucu oluşan disentrik kromozomların da bir göstergesidir. Gen amplifikasyonunun bir göstergesi olan nükleer tomurcuklanmalar da bu yöntemle ölçülebilir. Bu yöntemde, inkübasyondan 44 saat sonra sitokalazin-B eklenmesi ile sitokinez durdurulur. Böylece mononükleer (bölünmeyen) ve binükleer (in vitro bir kez bölünebilen) hücreler ayırt edilebilir. Cyt-B, sitokinezin tamamlanması için gerekli mikrofılaman halkasının birleşmesini engeller. Bu koşullarda mononükleer hücreler, in vivo biriken kromozomal/genomik mutasyonların seviyesini gösterirken, binükleer hücreler in vitro mitoz sırasında ve daha öncesinde biriken hasarın derecesini gösterir. Şekil 6'da sitokinez baskılanmış mikronukleus yöntemi özetlenmiştir.



**Şekil 6.** Sitokinez baskılanmış mikronukleus yöntemi (cytokinesis block micronucleus: CBMN assay) sitokalazin B eklenme zamanı<sup>68</sup>



Fenech, 2007 yılında MN sıklığını değerlendirmek için hücre seçim kriterlerini ve MN değerlendirme kriterlerini belirlemiştir. Tablo 8'de MN sıklığını değerlendirmek için hücre seçim kriterleri ve Tablo 9'da MN değerlendirme kriterleri özetlenmiştir.

**Tablo 8.** MN Sıklığını Değerlendirmek İçin Hücre Seçim Kriterleri(Fenech; 2007)

- Hücreler binükleer (BN) olmalı,
- BN hücrelerdeki 2 nükleusun sağlam nükleer membranları olmalı ve aynı sitoplazmik sınırdaki yerleşmeli,
- BN hücre içindeki 2 nükleus yaklaşık aynı boyutta, aynı boyanma paterni ve aynı boyanma yoğunluğunda olmalı,
- BN hücredeki iki nükleus bir nükleoplazmik köprü ile birleşebilir, ancak bu köprü nükleus çapının  $\frac{1}{4}$  'ünden fazla olmamalı,
- BN hücrede 2 hücre birbirine temas edebilir ancak birbiri üzerine binmemelidir.
- 2 nükleus birbiri üzerine biniyorsa sadece nükleuslar birbirinden ayrılabilirse skorlanmalı
- BN hücrelerin stoplazmik sınırı veya membranı sağlam olmalı ve komşu hücrelerin stoplazmik sınırından ayırdedilebilmeli
- MN(mononükleer), BN, TriN(trinükleer) ve multiN(multinükleer) hücreler ve nekrotik, apoptotik hücreler MN frekansı yönünden skorlanmamalı

**Tablo 9.** MN Değerlendirme Kriterleri; Fenech 2007

- MN, nükleusa morfolojik olarak benzer, ancak küçük, çapı ortalama asıl nükleus çapının  $\frac{1}{16}$ -  $\frac{1}{3}$ 'ü arasında olmalı, BN hücrede bir asıl nükleusun kapladığı alanın  $\frac{1}{256}$ - $\frac{1}{9}$ 'una karşılık gelmelidir.
- MN'nin asıl nükleus ile ilişkisi olmamalı
- MN asıl nükleus ile benzer boyanma yoğunluğunda olmalı
- Hücreler sağlam nükleer membranlı, binükleer olmalı ve aynı sitoplazma sınırı içine yerleşmeli
- Her lam için 1000 binükleer MN sayılmalı (lamın %10'u değerlendirilmeli)

MN ve floresan in situ hibridizasyon (FISH) yöntemlerinin birleştirilmesinden oluşan MN-FISH (Mikronükleus-FISH) yöntemi, mikronükleus içindeki kromozomun ve/veya kromozom fragmanının kökenini belirlemede kullanılmaktadır. Başka bir deyişle MN'un orijinin tüm kromozomdan mı (sentromer (+) MN) yoksa asentrik kromozom parçasından mı kaynaklandığını anlamamıza yarar.<sup>73</sup> Sentromerik problemler kullanılarak yapılan MN-FISH yöntemi ile MN oluşum mekanizması ve anöploidiyi değerlendirmek mümkündür. Bu yöntem ile asentrik kromozom fragmanı içeren MN, tüm kromozomu içeren MN ve kardeş hücrenin anöploid olmasına yol açan özgün kromozomal nondisjunction değerlendirilebilir. Nükleustaki tüm sentromerleri değerlendirmek güç olacağından, pansentromerik problemler nondisjunction değerlendirmesinde kullanılmaz. MN-FISH bulguları değerlendirilirken MN testinde olduğu gibi değerlendirme kriterleri belirlenmemiştir.

MN zaman alıcı (1000 hücre sayımı ortalama 15 dakika sürmektedir); ancak, son derece basit ve ucuz bir tekniktir. Yapılan birçok çalışma kanser oluşumuna yol açan nükleer oluşumlarının güçlü gen amplifikasyon ölçümleri olduğunu göstermiştir ve bu oluşumlar MN artışıyla beraber görülmektedir.<sup>74</sup> MN, DNA hasarını gösterir ve MN indeksi, kanser riski ile paralellik gösterir. Yapılan ve sürmekte olan birçok çalışma sonucunda kromozom kırığı, MN oluşumu, apoptotik hücre oluşumu ve kanser ilişkisinin ortaya konulabilmesi olasıdır. Bununla birlikte bu ilişkinin tam olarak açıklanabilmesi için daha çok çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

## MATERYAL VE METOD

Bu çalışmada Pap-smear sonucunda önemi belirlenemeyen atipik skuamöz hücreler (ASC-US) tespit edilen hastalarda, mikronuklues sayısı ile hastalığın regresyon, stabilite ve progresyonu arasındaki ilişkinin belirlenmesi ve HPV-DNA pozitifliği ve yüksek risk ve düşük risk HPV genotiplerinin dağılımının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Bu amaçla Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan 22.05.2013 tarihli ve 2013/190 sayılı kararı ile çalışma için onay alındı. Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Polikliniği'ne Ocak 2014- Haziran 2014 tarihleri arasında başvuran, servikal smear' inde ASC-US sitolojik tanısı konulmuş 31 hastanın bilgilendirilmiş gönüllü onam formları alındıktan sonra mikronukleus skoru bakıldı ve PCR tekniği ile HPV-DNA tip ve tayini yapıldı. Dört ila altı ay sonra hastalar tekrar çağırılarak tekrar sitoloji alındı ve eş zamanlı olarak mikronukleus skorlarına bakıldı. Hastalardan birisi bu dönemde histerektomi olduğu için çalışma dışı bırakıldı. Çalışmaya 30 hasta ile devam edildi.

Çalışmaya, histerektomi olmamış ve gebe olmayan hastalar dâhil edildi. Hastaların tümüne yaş, parite, koit yaşı, partner sayısı, menopoz durumu, sigara kullanım öyküsü, kronik hastalık varlığı, partnerinin cinsel partner sayısı hakkında sorular içeren anket uygulandı. Boy ve kilo ölçümleri yapıldı. Yaş: ortalaması; parite: nullipar, primipar ve multipar; koit yaşı: <20 ve >20; partner sayısı: tek ve multipartner; menopoz durumu: postmenopozal dönemde, perimenopozal dönemde ve reproduktif dönemde; sigara kullanımı: kullanıyor ve kullanmıyor; kronik hastalık varlığı: var ve yok; partnerinin cinsel partner sayısı: tek ve multipartner olarak değerlendirildi.

Hastaların boy ve kilo ölçümleri alınarak vücut kitle indeksleri hesaplandı ve bu indekslere göre 0-18,4: şişman, 18,5-24,9: normal, 25-29,9: fazla kilolu ve >30: obez olarak değerlendirildi.

### **Smear ve patolojik İnceleme:**

Tüm hastalardan sitobrush yardımı ile smear alındı ve lam üzerine yayılarak 25-30 cm uzaklıktan sprey püskürtülerek fiske edildi. Hastanemiz patoloji laboratuvarına konvansiyonel incelenme için gönderildi. Patoloji uzmanları, hastaların klinik özellikleri hakkında bilgiye sahip değildi. Smearler,

patologlar tarafından Bethesda 2001 derecelenme sistemiyle değerlendirildi. HPV enfeksiyonu saptanmayan ve düşük veya yüksek riskli HPV enfeksiyonu saptanan tüm hastalara 4-6 ay sonra kontrol smear yapıldı. Bethesda 2001 sistemine göre ilk alınan smear ile kontrol smear örnekleri değerlendirildi.

### **HPV-DNA İncelemesi:**

#### **Servikal sürüntü örneklerinden HPV tespiti:**

Hastalardan muayene esnasında servikal HPV-DNA'nın saptanması için "Female Swab Specimen Cell Collection Media Kiti" kullanılarak sürüntü örnekleri alındı.

1) Transport kitinin içinden çıkan ilk eküvyon (swab) ile servikste mukus ve/veya kan silindi.

2) İkinci eküvyon endoservikal kanal içinde (1/2-1 cm) 10-30 saniye 360 derece döndürülerek örnek alındı ve vagen mukozasına değdirilmeden çekilip taşıyıcı besiyerini içeren tüpe yerleştirildi. Tüpün bittiği yerden eküvyon kırılarak kapağı kapatıldı. Örnekler alındıktan 15-30 dakika içinde Tıbbi Mikrobiyoloji A.D. laboratuvarına gönderildi.

Servikal sürüntü örnekleri 50 ml'lik falkon tüplerine alındı. Santrifüj edilerek dipteki pelletten DNA izolasyonu yapıldı. İzole edilen DNA örneklerinden de HPV tespiti yapıldı.

DNA izolasyonu için: AMPLICOR, AmpliLute Liquid Media Extraction Kit kullanıldı.

HPV tespiti için: LİNEAR ARRAY HPV Genotyping Test kullanıldı.

#### **DNA izolasyonu:**

##### **Örnek ve Kontrol Ekstraksiyonu**

- Kuru ısı bloğunun sıcaklığı 56°C ye ayarlandı.
- Diğer bir kuru ısı bloğunun sıcaklığı 7°Cye ayarlandı.
- Reaktiflerin, örneklerin ve kontrollerin oda sıcaklığına gelmesi beklendi.
- Kit ilk açıldığında Liyofilize haldeki CAR'ı, 310 uL AVE ekleyerek çözüldü. 10 saniye vortekslendi.
- Kit ilk açıldığında AW2ye, 30 mL saf etanol eklendi, çalkalanarak karıştırıldı.
- Çalışma AL karışımını Tablo 10' da gösterildiği şekilde uygun miktarda CAR'ı AL'ye ekleyerek hazırlandı.

**Tablo 10:** Çalışma AL'sinin Hazırlanması

İşlenecek Örnek/Kontrol Sayısı							
(Reaktif)	12	24	36	48	60	72	96
CAR (mL)	0.04	0.07	0.10	0.13	0.16	0.20	0.25
AL (mL)	4.0	7.0	10.0	13.0	16.0	20.0	25.0

- İşlenecek her örnek ve kontrol için bir 2ml'lik ependorf tüpü etiketlendi.
- Her tüpe 80uL ATL eklendi.
- Örneklerin her biri ve kontrolü 10 saniye vortekslendi ve ilgili ependorf tüpe 250uL eklendi.
- Her tüpe 20uL Proteinase K eklendi ve 10 saniye vortekslendi. Tüpler kuru ısı bloğunda 56°C'de 30 dakika boyunca inkübe edildi.
- 56°C ± 2°C'de inkubasyon tamamlandıktan sonra her tüpe 250uL Çalışma AL'sinden eklendi ve 10 saniye son hızda vortekslendi.
- Tüpler daha sonra 70°C de 15 dakika boyunca kuru ısı bloğunun içinde inkübe edildi.
- İnkubasyon tamamlandıktan sonra her tüpe 300uL saf etanol eklendi ve 15 saniye son hızda vortekslendi.
- Tüpler oda sıcaklığında 5 dakika inkubasyona bırakıldı.
- Her tüpteki karışımı ilgili Kolonlara aktarıldı. En az bir dakika inkubasyona bırakıldı.
- Sonrasında 12.000g'de 1 dakika santrifüj edildi ve kolonun altındaki atık toplama tüpleri boşaltıldı.
- Her Kolona 750 uL AW2 eklendi. En az 1 dakika inkübe edildi.
- Sonrasında 12.000g'de 1 dakika santrifüj edildi ve kolonun altındaki atık toplama tüplerini boşaltıldı.
- Her Kolona 750uL saf etanol eklendi. En az 1 dakika inkübe edildi.
- En yüksek santrifüj ayarında 3 dakika boyunca santrifüj edildi.
- Her örnek ve kontrol için bir Elution tüpü (ependorf) etiketlendi.
- Kolonların altındaki atık toplama tüpleri atıldı ve her Kolonları ilgili Elution tüplerine yerleştirildi.

- Her Kolon'a 120uL AVE eklendi. Tüm kapakları kapatın.
- Karışımları oda sıcaklığında 5 dakika boyunca inkübe edildi ve ardından en yüksek santrifüj ayarında 1 dakika boyunca santrifüj edildi.
- Kolonları çıkartıldı ve elution tüplerinin kapakları kapatıldı.
- İşlenmiş örnekleri ve kontrolleri hemen amplifiye edildi veya amplifikasyona kadar 2-8°C arasında saklandı.

#### **PCR Amplifikasyonu:**

##### **MMX Hazırlığı**

- Örnek ve kontrol testi için gerekli sayıda 0.2 ml'lik PCR tüpü belirlendi.
- Bir şişe HPV MMX'e, 125uL HPV Mg<sup>2+</sup> ekleyerek Çalışma MMX Karışımı hazırlandı. Tüpün kapağı kapatıldı ve tüp 10-15 kez ters-düz ederek iyice karıştırıldı. (Her bir örnek için)
- Her PCR tüpüne 50'şer uL MMX Karışımı eklendi.
- Mastermiks içeren ilgili PCR tüplerine örnek ve kontrol ekstraktlarından 50şer uL eklendi. PCR tüplerinin ağzını kapatıldı.

##### **Amplifikasyon koşulları:**

HOLD Programı:	2	dakika	50°C
HOLD Programı:	9	dakika	95°C
CYCLE Programı:	30 saniye	95°C, 1 dakika 55°C, 1 dakika 72°C (Rampa oranı	= %50)
HOLD Programı:	5	dakika	72°C
HOLD Programı:	Sonuna kadar 72°C		

Sonrasında PCR tüplerinin kapakları açılarak, 100 uL Denatürasyon solusyonu (DN) eklendi.

##### **Linear Array HPV Strip ile Genotip Testi:**

- Çalışmaya başlamadan önce bütün reaktiflerin oda sıcaklığına gelmesi beklendi.
- Çalkalayıcı su banyosunun sıcaklığı 53°C ± 2°C' ye ayarlandı.
- Çalkalayıcı su banyosunun hızı 60 RPM'e ayarlandı.
- Üretici firmanın talimatlarına uygun olarak reaktifler hazırlandı.

##### **Hibridizasyon Buffer:**

SSPE ve SDS incelendi ve çökelti meydana gelmişse, 53°C ± 2°C'de su banyosunda yeniden çözdürüldü. 388 ml distile suya, 100 ml SSPE eklendi ve

iyice karıştırıldı. Daha sonra bu karışıma 12,5 ml SDS eklendi ve tekrardan karıştırıldı. Hazırlanan Hibridizasyon Buffer temiz bir kap içerisinde oda ısısında saklandı. Çalışmadan önce Hibridizasyon Buffer, su banyosunda  $53^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de minimum 15 dakika ısıtıldı ve kullanana kadar su banyosunda bekletildi.

**Ambient Wash Buffer:**

SSPE ve SDS incelendi ve çökelti meydana gelmişse,  $53^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de su banyosunda yeniden çözdürüldü. 2520 ml distile suya, 133 ml SSPE eklendi ve iyice karıştırıldı. Daha sonra bu karışıma 13,3 ml SDS eklendi ve tekrardan karıştırıldı. Hazırlanan Ambient Wash Buffer temiz bir kap içerisinde oda ısısında saklandı.

**Stringent Wash Buffer:**

Her strip (hasta) için daha önceki basmakta hazırlanmış olan Ambient Wash Buffer'ın 5 ml'si kullanıldı (Örn: 24 strip için 120 ml Ambient Wash Buffer). Stringent Wash Buffer, her çalışmadan önce taze olarak hazırlandı. Çalışmadan önce Stringent Wash Buffer, su banyosunda  $53^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de minimum 15 dakika ısıtıldı ve kullanana kadar su banyosunda bekletildi.

**Sitrat Buffer:**

CIT incelendi ve çökelti meydana gelmişse,  $53^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de su banyosunda yeniden çözdürüldü. 475 ml distile suya, 25 ml CIT eklendi ve iyice karıştırıldı. Hazırlanan Sitrat Buffer temiz bir kap içerisinde oda ısısında saklandı.

**Substrat:**

Her strip (hasta) için 1 ml SUB B'ye, 4 ml SUB A eklendi ve iyice karıştırıldı. Hazırlanan Substrat, ışık görmeden şekilde oda ısısında saklandı (3 saat stabil kalabilir).

**Konjugat:**

Her strip (hasta) için 5 ml Ambient Wash Buffer'a, 15  $\mu\text{l}$  SA-HRP eklendi ve iyice karıştırıldı. Hazırlanan Konjugat, oda ısısında saklandı (3 saat stabil kalabilir).

- Reaktifler hazırlandıktan sonra, prob hatları yukarı bakacak şekilde treyin kuyularına stripler yerleştirildi.
- Her bir strip için kuyulara, daha önce ısıtılmış Hibridizasyon Buffer'dan 4 ml eklendi.

- Strip ve Hibridizasyon Buffer bulunan kuyulara, aerosol bariyerli pipetör yardımıyla denatüre edilmiş amplikondan 75 µl pipete edildi.
- Hibridizasyon işlemi; ısı 53°C ± 2°C'de, çalkalama hızı 60 RPM'de, 30 dakikada gerçekleştirildi.
- Hibridizasyon işleminden sonra Hibridizasyon Buffer aspire edildi.
- Her bir stripin yıkanması için kuyulara, Ambient Wash Buffer'dan 4 ml eklendi ve 3-4 çalkalamadan sonra aspire edildi.
- Her bir strip için kuyulara, daha önceden ısıtılmış Stringent Wash Buffer'dan 4 ml eklendi. Çalkalama hızı 60 RPM 'de, 53°C ± 2°C'de, 15 dakika inkübe edildi.
- İnkübasyondan sonra Stringent Wash Buffer aspire edildi.
- Her bir strip için kuyulara, daha önceden ısıtılmış Konjugattan 4 ml eklendi. Oda ısısında, çalkalama hızı 60 RPM 'de, 30 dakika inkübe edildi.
- İnkübasyondan sonra Konjugat aspire edildi.
- Her bir stripin yıkanması için kuyulara, Ambient Wash Buffer'dan 4 ml eklendi ve 3-4 çalkalamadan sonra aspire edildi.
- Tekrardan her bir strip için kuyulara, Ambient Wash Buffer'dan 4 ml eklendi. Oda ısısında, 60 RPM 'de 10 dakika çalkalama işlemi gerçekleştirildi ve Ambient Wash Buffer aspire edildi.
- Her bir strip için kuyulara, Sitrat Buffer'dan 4 ml eklendi. Oda ısısında, 60 RPM 'de 5 dakika çalkalama işlemi gerçekleştirildi ve Sitrat Buffer aspire edildi.
- Her bir strip için kuyulara, Substrat Buffer'dan 4 ml eklendi. Oda ısısında, 60 RPM'de 5 dakika çalkalama işlemi gerçekleştirildi ve Substrat Buffer aspire edildi.
- Her bir strip için kuyulara, 4 ml distile su eklenerek yıkama işlemi gerçekleştirildi.
- Stripler, treydeki kuyulardan temiz bir forseps yardımıyla alındı ve kurumaları için minimum 1 saat, maksimum 72 saat oda ısısında bekletildi.
- Stripte oluşan bantlara göre HPV genotip tayini yapıldı.



### **Mikronukleus İncelemesi:**

Tüm hastalardan sitobrush yardımı ile uterin serviksten eksfoliyatif hücreler alındı ve örnek, fırça yardımı ile temiz bir lama yayıldı. Bu işlemden önce lamalar, hasta ismi, tarih ve kod numarası verilerek hazırlandı. Smear örnekleri 20 dakika boyunca metanol/asetik asit (3:1) karışımı içeren solüsyonda fikse edildi. Ardından örnekler kurumaya bırakıldı. Kuruma sonrası örnekler mikronukleus sayımının yapılması için Fen Edebiyat Fakültesi Tıbbi Biyoloji laboratuvarına gönderildi.

Tıbbi biyoloji laboratuvarında inceleme için Feulgen boya hazırlandı. Feulgen boya hazırlanırken kaynamakta olan 100 mL saf suya 0,5 gr bazik fuksin ilave edildi ve 50°C'ye kadar soğutuldu. Başka bir erlende filtre kâğıdından geçirildi. Buna 10 mL 1 mol HCl ilave edildi ve 0,5 gr sodyum metabisülfid eklendi. Rengi saman sarısına dönünceye kadar en az 18 saat bekletildi. Smear örnekleri HCl içeren şalelere yerleştirildikten sonra 10 dk oda sıcaklığında bekletildi. Ardından 10 dk 60°C'de pastör fırınında bekletildi ve distile su ile yıkandı. Hazırlanılan Feulgen boyada örnekler 1,5 saat bekletildi. Ardından duru su ile yıkandı ve kurumaya bırakıldı. Kuruyan örnekler, incelenmesi için ışık mikroskobuna alındı. Işık mikroskobunda 100'lik büyültmede her 1000 epitel hücresi başına düşen mikronukleus sayısına bakıldı ve bu değer "Mikronukleus Skoru" olarak tanımlandı. Sadece tek düşmüş, üst üste yerleşim göstermeyen, katlanmamış hücreler sayıldı. MN değerlendirilirken Fenech'in 2007'de tanımladığı değerlendirme kriterleri esas alındı.

Bu kriterlere göre mikronukleusun özellikleri şunlar olarak belirlendi:

- Nükleusa morfolojik olarak benzeyen, ancak küçük, çapı ortalama asıl nükleus çapının 1/16- 1/3'ü arasında olan
- Asıl nükleus ile temas halinde olmayan
- Asıl nükleus ile benzer boyanma yoğunluğunda olan fragmanlar

Aynı işlem 4-6 ay sonra hastalar tekrar çağırılıp örnekleri alınarak yinelendi ve sonuçları karşılaştırıldı.

### **İstatistiksel Analiz:**

İstatistiksel analiz, Sosyal Bilimler için İstatistik Paketi Versiyon 11,5 (demo, Illinois, Chicago, ABD) kullanılarak gerçekleştirildi. Sürekli ölçümlere ait

normallik kontrolleri Shapiro Wilk testi ile test edildi ve normal dağılım gösterdiği belirlendi. Kategorik değişkenler arasındaki farklılıklar için Pearson ki-kare ve Likelihood ratio ki-kare testleri kullanıldı. Tanımlayıcı istatistikler olarak sayı ve yüzde değerleri verildi. Mikromukleus ncesi ve sonrası arasındaki farklılıklar için eş yapma t testi (paired samples t test) kullanıldı. Ayrıca, mikronukleus öncesi ve mikronukleus sonrası ölçümlerin smear durumlarına göre farklılıkları için student t testine göre, HPV-DNA durumlarına göre ise varyans analizi (One Way ANOVA) kullanıldı. Varyansların homojenliği Levene testi ile test edildi. Tanımlayıcı istatistikler olarak ortalama ve standart sapma değerleri verildi. İstatistik anlamlılık olarak  $p < 0.05$  alındı.

## BULGULAR

Ocak 2014-Haziran 2014 tarihleri arasında, 6 aylık dönemde, servikal sitolojik tarama sonuçları ASC-US olarak belirlenen 31 kadın çalışma kapsamına alındı ve tüm çalışma grubunu oluşturdu. Gebe olan ve histerektomize olan hastalar çalışmaya dâhil edilmedi. İlk smear sonuçları ASC-US olan bu hastalara mikronukleus skoru bakıldı ve HPV-DNA tayini ve tiplendirmesi yapıldı. Hastalardan birisi bu dönemde histerektomi olduğu için çalışma dışı bırakıldı. Çalışmaya 30 hasta ile devam edildi. Dört ila altı ay sonra hastalar tekrar çağırılarak tekrar sitoloji alındı ve eş zamanlı olarak mikronukleus skorlarına bakıldı.

Tüm çalışma grubunun (n=30) yaş ortalaması  $43,8 \pm 10,2$  (23-68) olarak hesaplandı. İlk cinsel ilişki yaş ortalaması ise  $22,1 \pm 1,4$  olarak bulundu. Çalışmaya dahil edilen hastaların vücut kitle indeksleri (VKİ) ortalamalarının ise  $28,58 \pm 3,96$  olduğu tespit edildi. VKİ değerlerine bakıldığında hastalardan 4'ünün (%13,3) normal kiloda (VKİ 18,5-24,9 kg/m<sup>2</sup> arasında) olduğu, 19 hastanın (%63,3) fazla kilolu (VKİ 25-29,9 kg/m<sup>2</sup> arasında) olduğu, 7 tanesinin (%23,3) ise obez (VKİ:30-39,9 kg/m<sup>2</sup> arasında) olduğu izlendi. 24 hastanın (%80) çocuk sahibi olmadığı ve 6 hastanın (%20) çocuk sahibi olduğu görüldü.

Çalışmaya dâhil edilen hastalardan 10 tanesi (%33,3) postmenopozal dönemdeyken 4 tanesi (%13,3) perimenopozal dönemde ve 16 tanesi (%53,3) üreme çağındaydı. 11 hastanın (%36,7) eşlik eden hastalığı yokken 19 hastanın (%63,3) eşlik eden hastalık tablosu vardı. Hastaların 28 tanesi (%93,3) tek cinsel partnere sahipken 2 hastanın (%6,7) multipartneri olduğu görüldü. 24 hastanın (%80) sigara kullanmadığı, 6 hastanın (%20) sigara kullandığı izlendi. 10 hastanın (%33,3) geçirilmiş operasyon öyküsü varken 20 hastanın (%66,7) önceye ait operasyon öyküsü yoktu. 11 hastanın ilk koit yaşının 20 yaş ve altı (%36,7); 19 hastanın (%63,3) hastanın ilk koit yaşının 20 yaş üzerinde olduğu tespit edildi. Hastalardan 24 tanesinin (%80) partnerinin tek cinsel partnerinin olduğu ve 6 tanesinin (%20) partnerinin multipartnerinin olduğu tespit edildi.

Çalışma grubunun karakteristik özelliklerine ait sayı ve yüzde değerleri Tablo 11' de özetlenmiştir.

**Tablo 11.** Çalışma Grubunun Karakteristik Özellikleri

		<b>Sayı (n)</b>	<b>Yüzde (%)</b>
<b>Vücut Kitle İndeksi</b>	Normal	4	13.3
	Fazla kilolu	19	63.3
	Obez	7	23.3
<b>Parite</b>	Multipar	24	80.0
	Nullipar	6	20.0
<b>Menstrüel dönem</b>	Postmenopozal	10	33.3
	Perimenopozal	4	13.3
	Üreme Çağında	16	53.3
<b>Eşlik eden hastalık</b>	Var	11	36.7
	Yok	19	63.3
<b>Cinsel partner sayısı</b>	Tek	28	93.3
	Multipartner	2	6.7
<b>Operasyon öyküsü</b>	Var	10	33.3
	Yok	20	66.7
<b>Sigara kullanımı</b>	Kullanmıyor	24	80.0
	Kullanıyor	6	20.0
<b>Partnerinin cinsel partner sayısı</b>	Tek	24	80.0
	Multipartner	6	20.0
<b>İlk koit yaşı</b>	20 yaş ve altı	11	36.7
	20 yaş üstü	19	63.3

Tüm olgular (n=30) HPV-DNA pozitifliği yönünden değerlendirildiğinde hastalardan 6 tanesinde (%20) HPV-DNA pozitifliği saptandı. Bu hastalardan 5 tanesinde (%16,6) YR-HPV tiplerinin pozitif olduğu belirlendi. Bu tipler tip 16, tip 35, tip 45, tip 58 ve tip 82 idi. Tip 18 saptanmadı. Tüm çalışma grubunda DR-HPV bir hastada (%3,3) saptandı. Bu da DR-HPV tip 71 idi. Tablo 12’de tüm çalışma grubunda saptanan HPV tipleri verilmiştir.

**Tablo 12.** Tüm Çalışma Grubunda Saptanan HPV Tipleri

YR-HPV Tipleri	Tüm Olgular (n=30)	DR-HPV Tipleri	Tüm Olgular (n=30)
<b>Tip 16</b>	1 (%3,3)	<b>Tip71</b>	1 (%3,3)
<b>Tip 35</b>	1 (%3,3)		
<b>Tip 45</b>	1 (%3,3)		
<b>Tip 58</b>	1 (%3,3)		
<b>Tip 82</b>	1 (%3,3)		
<b>Toplam</b>	5/30 (%16,6)		1/30 (%3,3)

Hastaların 4-6 ay sonra alınan ikinci smear sonuçları ASC-US veya sitoloji negatif olarak raporlandı; progresyon izlenmedi. Tüm hastaların (n=30) 4-6 ay sonra, ikinci defa alınan smear sonuçlarına bakıldığında hastaların %16,6'sının (n=5) smear sonucu ASC-US olarak; %83,3'ünün (n=25) smear sonucu sitoloji negatif olarak raporlandı.

İkinci smear sonucu sitoloji negatif veya ASC-US olarak belirlenen hasta grupları arasında karakteristik özellikler karşılaştırıldı. Vücut kitle indeksi (p=0,420), paritesi (p=1,000) ve menstrüel dönem (p=0,231) açısından karşılaştırıldığında iki grup arasında anlamlı bir farklılık saptanmadı. Her iki grup eşlik eden hastalık (p=0,327), cinsel partner sayısı (p=1,000) ve operasyon öyküsü (p=1,000) açısından karşılaştırıldığında aralarında anlamlı bir farklılık saptanmadı. Sigara kullanımı (p=0,553), partnerinin cinsel partner sayısı (p=0,254) ve ilk koit yaşı (p=0,865) gibi karakteristik özellikleri karşılaştırıldığında her iki grup arasında anlamlı bir farklılık saptanmadı.

Bu karakteristik özelliklerin ASC-US ve sitoloji negatif olma durumlarına göre dağılımları Tablo 13'te verilmiştir.

**Tablo 13.** İkinci Smear Sonucu ASC-US ve Sitoloji Negatif Olarak Raporlanan Hastalarda Karakteristik Özelliklerin Karşılaştırılması

		ASCUS (n=5)		Sitoloji negatif (n=25)		P*
		Sayı	Yüzde	Sayı	Yüzde	
<b>VKİ</b>	Normal	0	0,0	4	16,0	0,420
	Fazla kilolu	4	80,0	15	60,0	
	Obez	1	20,0	6	24,0	
<b>Parite</b>	Multipar	4	80,0	20	80,0	1,000
	Nullipar	1	20,0	5	20,0	
<b>Menstrüel dönem</b>	Postmenopozal	1	20,0	9	36,0	0,231
	Perimenopozal	2	40,0	2	8,0	
	Reprodüktif	2	40,0	14	56,0	
<b>Eşlik eden hastalık</b>	Var	3	60	8	32	0,327
	Yok	2	40	17	68	
<b>Cinsel partner sayısı</b>	Tek	5	100	23	92	1,000
	Multipartner	0	0	2	8	
<b>Operasyon öyküsü</b>	Var	2	40	8	32	1,000
	Yok	3	60	17	68	
<b>Sigara kullanımı</b>	Kullanmıyor	5	100	19	76	0,553
	Kullanıyor	0	0	6	24	
<b>Partnerinin cinsel partner sayısı</b>	Tek	3	60	21	84	0,254
	Multipartner	2	40	4	16	
<b>İlk koit yaşı</b>	20 yaş ve altı	2	40	9	36	0,865
	20 yaş üstü	3	60	16	64	

\*: Likelihood ratio ki kare testine ait p değerleri

Tüm çalışma grubunda (n=30) HPV-DNA(-)'liğinin, DR-HPV(+)'liğinin ve YR-HPV(+)'liğinin çeşitli risk faktörleriyle olan ilişkisi incelendiğinde vücut kitle indeksi (p=0,200), parite (p=0,065), eşlik eden hastalık (p=0,624), operasyon öyküsü (p=0,288), sigara kullanımı (p=0,220), cinsel partner sayısı (p=0,629) ve ilk koit yaşı (p= 0,624) açısından gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir

farklılık saptanmadı. Menstrüel dönem ( $p=0,048$ ) ve partnerinin cinsel partner sayısı ( $p<0,001$ ) açısından gruplar karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı farklılık saptandı. Menstrüel dönem, HPV-DNA durumu ile bağımsız değildir ( $p=0.048$ ). Partnerinin cinsel partner sayısı ile HPV-DNA durumu arasında da anlamlı bir ilişki gözlemlendi ( $p<0.001$ ). Hastalardan 24 tanesinin (%80) partnerinin tek cinsel partneri varken 6 tanesinin (%20) çok sayıda cinsel partnerinin olduğu görüldü. HPV-DNA (-) olan hastalardan ( $n=24$ ) 1 tanesinin (%4,2), YR-HPV (+) olan hastalardan ( $n=5$ ) 4 tanesinin (% 80) ve DR-HPV(+) olan bir hastanın da (%100) partnerinin çok sayıda cinsel partnerinin olduğu saptandı.

Bu karakteristik özelliklerin HPV DNA negatif, DR-HPV (+) ve YR-HPV (+) olma durumlarına göre dağılımları Tablo14 'te verilmiştir.

Tüm çalışma grubuna ait ilk mikronukleus değerleri ile 4-6 ay sonra sitolojik tarama ile eş zamanlı bakılan mikronukleus değerleri karşılaştırıldığında; ilk bakılan mikronukleus değeri ortalaması  $10,47\pm1,89$ ; ikinci bakılan mikronukleus ortalaması  $9,00 \pm 2,29$  olarak bulundu. Bu iki mikronukleus değeri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlemlendi ( $p^*=0,001$ ), (\*: eş yapma t testine ait p değeri).

Dört–altı ay sonra yapılan smear testinin sonuçları ile ilk mikronukleus değerleri ve ikinci mikronukleus değerleri arasındaki farklılıklar incelendi. İkinci smear sonucu ASC-US olarak belirlenen hastaların mikronukleus değerlerinde stabilite veya artış saptanırken; sitoloji negatif olarak sonuçlanan hastaların mikronukleus değerlerinde belirgin düşüş izlendi. Bu bulgular ışığında iki durum arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu tespit edildi ( $p=0.001$ ).

Tablo 15'te ASC-US'un regresyon ve stabilitesi ile MN değerlerinin ilişkisi verilmiştir.

**Tablo 14.** HPV DNA (-) 'liğinin, DR-HPV (+)'liğinin ve YR-HPV (+) liğinin Çeşitli Risk Faktörleriyle Olan İlişkisi.

		HPV DNA Negatif (n=24)		HPV DNA Yüksek risk (n=5)		HPV DNA Düşük risk (n=1)		P*
		Sayı	Yüzde	Sayı	Yüzde	Sayı	Yüzde	
Vücut Kitle İndeksi	Normal	3	12,5	0	0,0	1	100,0	0,200
	Fazla kilolu	16	66,7	3	60,0	0	0,0	
	Obez	5	20,8	2	40,0	0	0,0	
Parite	Multipar	19	79,2	5	100,0	0	0,0	0,065
	Nullipar	5	20,8	0	0,0	1	100	
Menstrüel dönem	Postmenopozal	9	37,5	1	20,0	0	0,0	0,048
	Perimenopozal	1	4,2	3	60,0	0	0,0	
	Üreme Çağında	14	58,3	1	20,0	1	100,0	
Eşlik eden hastalık	Var	9	37,5	2	40,0	0	0,0	0,624
	Yok	15	62,5	3	60,0	1	100,0	
Cinsel partner sayısı	Tek	22	91,7	5	100,0	1	100,0	0,629
	Multipartner	2	8,3	0	0,0	0	0,0	
Operasyon öyküsü	Var	7	29,2	3	60,0	0	0,0	0,288
	Yok	17	70,8	8	40,0	1	100,0	
Sigara kullanımı	Kullanmıyor	18	75,0	5	100,0	1	100,0	0,220
	Kullanıyor	6	25,0	0	0,0	0	0,0	
Partnerinin cinsel partner sayısı	Tek	23	95,8	1	20,0	0	0,0	<0,001
	Multipartner	1	4,2	4	80,0	1	100,0	
Koit yaşı	20 yaş ve altı	3	37,5	2	40,0	0	0,0	0,624
	20 yaş üstü	15	62,5	3	60,0	1	100,0	

\*: Likelihood ratio ki kare testine ait p değerleri



**Tablo 15.** ASC-US'un Regresyon ve Stabilitesi İle MN Değerlerinin İlişkisi

		<b>1. Mikronukleus</b>	<b>2. Mikronukleus</b>
<b>Smear</b>	<b>ASC-US (n=5)</b>	9.80 ± 0.84	12.00 ± 1.23
	<b>Negatif (n=25)</b>	10.60 ± 2.02	8.40 ± 1.96
	<b>P</b>	0.397	0.001

HPV-DNA negatifliği, YR-HPV(+)liği ve DR-HPV(+)liği olan hastalar 1.MN değerleri ve 2.MN değerleri açısından karşılaştırıldığında istatistiksel olarak farklılık gözlenmedi. Bunlara ait tanımlayıcı istatistikler ve p değerleri Tablo 16'da verilmiştir.

**Tablo 16.** HPV-DNA Negatifliği, YR-HPV(+)liği ve DR-HPV(+)liği İle MN Değerlerinin İlişkisi

		<b>1. Mikronukleus</b>	<b>2. Mikronukleus</b>
<b>HPV-DNA</b>	<b>Negatif (n=24)</b>	10.29 ± 1.97	8.50 ± 2.21
	<b>Yüksek risk (n=5)</b>	11.00 ± 1.58	11.00 ± 1.58
	<b>Düşük risk (n=1)</b>	12.00 ± ..	11.00 ± ..
	<b>P</b>	0.548	0.051

## TARTIŞMA

Servikal kanser tüm dünyada kadınlar arasında en yaygın görülen ikinci kanserdir. Her yıl yaklaşık 530.000 yeni serviks kanseri olgusunun tanı aldığı ve 275.000 olgunun da serviks kanserinden öldüğü bildirilmektedir.<sup>1</sup> Gelişmiş ülkelerde tarama ve erken tanı sayesinde giderek sıklığı azalmaktadır. Son 60 yılda, servikal sitolojik tarama ile servikal kanser insidansı ve mortalitesi %70 oranında azalmıştır.<sup>75</sup> Serviks kanseri tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de kadın genital kanserleri içinde önemli bir yer tutmaktadır. Sağlık Bakanlığı Kansere Daire Başkanlığı 2009 verilerine göre serviks kanseri kadın kanserleri içerisinde 4,5/100.000 oranında görülmekte ve onuncu sırada yer almaktadır.

Serviks kanserinin birden ortaya çıkmayıp serviks premalign lezyonlarının yıllar içerisinde ilerlemesi sonucu oluştuğu bilinmektedir. Başka bir deyişle serviks kanseri, erken teşhisi mümkün ve önlenilebilir bir hastalıktır. Mevcut durum ise serviks kanseri ve premalign lezyonların teşhisinde tarama programlarının önemini ortaya koymaktadır. Tarama programlarının yaygın kullanılmadığı gelişmekte olan ülkelerdeki yüksek servikal kanser prevalansı da bu düşüncüyü desteklemektedir.

Pap-smear, serviks kanseri taramasında bir model haline gelmiştir. Birçok ülkede bu tarama yöntemiyle ilgili çok sayıda gözlemsel çalışma yapılmasına rağmen etkinliği randomize bir çalışmada gösterilememiştir.<sup>76</sup> Farklı çalışmalarda farklı sonuçlar elde edilse de Nanda ve arkadaşlarının 2000 yılında yaptıkları bir çalışmada Pap-smear testinin duyarlılığı %68 ve özgüllüğü %75 oranında bulunmuştur.<sup>33</sup> Bu düşük duyarlılık ve sık tekrarlama gerekliliği nedeni ile yeni tarama yöntemleri araştırılmaya başlanmıştır. Servikal kanser taramasında Pap-smear tarama uygulamaları, HPV testinin rolü ve yeni teknolojilerin gelişimi ve sürekli yeniden değerlendirilmesi ile gelişen bir alan olmayı sürdürmektedir.

Çalışmamızda, servikal sitoloji sonucu ASC-US olarak raporlanan hastalarda mikronukleus skorunun ASC-US'un regresyon, stabilite ve progresyonu ile olan ilişkisini belirlemek ve hastalarda HPV-DNA varlığını saptamayı amaçladık.

Anogenital bölgenin diğer kanserlerinde olduğu gibi serviks kanserinin de etiyopatogenezinde HPV'nin risk faktörü olduğu iyi bilinmektedir.<sup>77</sup> Serviksin premalign lezyonları ve HPV arasındaki ilişki net olarak ortaya konmuştur.<sup>78</sup> Bu durum göz önüne alındığında HPV-DNA testi ile tiplendirmenin klinik ve epidemiyolojik açıdan önemi aşıkardır. HPV-DNA tespiti, serviks kanserinin öngörülmesinde, serviksin premalign lezyonlarının gösterilmesi ile uygun tedavi ve takip protokolünün planlanmasında önem taşımaktadır.

HPV enfeksiyonu ilk cinsel ilişkiyi takiben, 30 yaş altında yüksek prevalansta izlenmektedir. Daha sonra % 3-10 oranında viral temizlenme ile sıklığı azalmaktadır. Başka bir deyişle bu enfeksiyonların birçoğu klinik semptomlara yol açmaz ve kendi kendini sınırlar. 30 yaşından sonra saptanan onkojenik HPV tipinin bilinmeyen nedenlerle persiste eden enfeksiyon olduğu kabul edilmektedir. Cinsel aktif kişilerin yarısının hayatlarında en az bir defa HPV ile karşılaştıkları tahmin edilmektedir. Bruni ve ark. 2010 yılında yaptıkları bir meta-analizde dünya genelinde servikal HPV prevalansını %11,7 olarak saptamışlardır.<sup>79</sup> De Sanjosé ve ark. 2007'de yaptığı bir meta-analizde smear sonucu normal kadınlarda ortalama HPV prevalansını %10,4 olarak bulmuşlardır.<sup>80</sup> Yine 2012 yılında dünya çapında yapılan geniş kapsamlı bir meta-analizde normal sitolojiye sahip hastalarda HPV prevalansı % 12 olarak bildirilmiştir.<sup>81</sup> 6388 hastayı kapsayan Türkiye genelinde 2013 yılında yapılan bir meta-analizde ülke genelinde HPV prevalansı %25 olarak saptanmıştır. En sık görülen tip ise % 32 oranında HPV tip 16'dır ve bu sonuç dünya genelindeki çalışmalar ile benzerlik göstermektedir.<sup>82</sup>

Serviks kanseri ile YR-HPV DNA arasındaki ilişki günümüzde net olarak ortaya konmuştur. Bu bilgi, herkese tarama amaçlı HPV-DNA bakılıp bakılmayacağı sorusunu da beraberinde getirmiştir. Kaufman ve ark. yaptıkları bir çalışmada HPV-DNA bakılması, yalnızca ASC-US'un takip, tedavi ve yönetimi için anlamlı olarak bulunmuştur.<sup>83</sup> ASC-US olan hastalarda skuamöz hücrelerin skuamöz intraepitelyal lezyona ilerleme riskinin % 10 olduğu bilinmektedir.<sup>84</sup> Bu bilgiler doğrultusunda ASC-US'lu hastalarda takip ve yönetim için HPV-DNA bakılması faydalı gibi görünmektedir.

Literatüre bakıldığında çoğu çalışmada ASC-US'lu hastalarda YR-HPV prevalansı yüksek olarak bulunmuştur. Samarawardana ve ark. 2010 yılında yaptıkları bir çalışmada ASC-US'lu hastalarda YR-HPV sıklığını %65 olarak

bulmuşlardır.<sup>85</sup> Schiffman ve ark. yaptıkları çalışmada ASC-US hastasında yüksek riskli HPV enfeksiyonu sıklığı %50,6 olarak saptanmıştır.<sup>86</sup> Stany ve ark. 40870 ASC-US' lu hastada yaptığı çalışmada yüksek onkojenik riskli HPV enfeksiyonu sıklığı %40,8 olarak bulunmuştur.<sup>87</sup> Arbyn ve ark. 2005 yılında yaptıkları meta-analizde ASC-US'lu hastalarda YR-HPV prevalansı %44,7 olarak bulunmuştur.<sup>88</sup>

Mona ve ark. yaptıkları çalışmada olduğu gibi bazı çalışmalarda yüksek prevalans bildiren çalışmaların aksine özellikle ileri yaştaki hastalarda düşük prevalans oranları bildirilmiştir.<sup>89</sup> Benzer şekilde Zao ve ark. yaptığı bir çalışmada 50 yaş üstü ASC-US'lu hastalarda YR-HPV prevalansı % 14,3 olarak saptanmıştır.<sup>90</sup>

Biz de çalışmamıza dâhil ettiğimiz toplam 30 ASC-US'lu hastada HPV-DNA (+)'liğini %20 oranında bulduk. Bu hastalarda YR-HPV DNA (+)'liğini %16,6 oranında; DR-HPV DNA (+)'liği %3,3 oranında saptadık. Bu sonuçlarımızı literatür ile karşılaştırdığımızda literatürdeki çoğu çalışmada belirtilenin aksine daha düşük oranlarda HPV-DNA, YR-HPV prevalansı tespit ettik. Bunun nedeninin HPV prevalansının etnik, bölgesel, mevsimsel ve yaş gruplarına göre değişim göstermesiyle ilişkili olabileceğini düşündük. HPV prevalansının bilindiği gibi yaşla azalması ve çalışma grubumuzdaki yaş ortalamasının  $43,8 \pm 10,2$  olması da bu oranın düşük çıkmasını açıklayabilmektedir.

Servikal kanserli hastalarda en sık izole edilen HPV tipleri tip 16 ve 18'dir.<sup>80</sup> De Sanjose ve ark. 2010 yılında yaptığı geniş kapsamlı bir retrospektif çalışmada serviks kanserli hastaların %50'sinde HPV-tip 16 pozitif olarak saptanmıştır.<sup>91</sup> ASC-US' lu olan hastalarda da YR-HPV tipleri, özellikle tip 16, sık görülmektedir. 2011'de yapılan, 1578 ASCUS'lu hastayı kapsayan bir çalışmada YR-HPV prevalansı % 32,6 olarak saptanmıştır. Aynı çalışmada, HPV tip 16 % 8,2, tip 18 %2,9, diğer yüksek riskli tipler %21,4 oranında pozitif saptanmıştır.<sup>92</sup> 2012 yılında yayınlanan bir meta-analizde sitolojisi normal vakalarda HPV tip 16 prevalansı % 20,4 saptanırken, ASC-US'lu vakalarda %22,9 olarak saptanmıştır.<sup>81</sup> Anna ve ark. ASC-US'lu hastaları kapsayan bir çalışmalarında YR-HPV prevalansını %51 olarak saptarken, HPV tip 16 % 27, tip 18 % 3 sıklıkta saptamışlardır.<sup>93</sup> Castle ve ark. 2015 yılında yeni yayınladıkları 912 ASC-US'lu hastayı kapsayan bir çalışmada YR-HPV

prevalansını %38,8 olarak bulmuşlardır. Bu hastalarda %37 oranla en sık saptanan HPV tipi ise tip 16'dır.<sup>94</sup>

Biz çalışmamızdaki ASC-US'lu hastalarda YR-HPV tiplerini tip 16 (%3,3), tip 45(%3,3) tip 58(%3,3), tip 82 (%3,3) olarak saptadık. Çalışmamızda hiç HPV tip 18 saptanmaması dikkati çekmektedir. DR-HPV (tip 71) prevalansını ise %3,3 olarak saptadık.

Düşük veya yüksek dereceli skuamoz intraepitelyal lezyon kriterlerine yanıt vermeyen anormal hücreler tanımlaması ASC-US olarak bilinmektedir. Standart tanısal kriterler kullanıldığında, oranının %3-5 olması beklenmektedir.<sup>95</sup> Tanısal kriterlerin eksikliği ve medikolegal hareket korkusu nedeniyle, genellikle tanı oldukça yaygın olup bazı merkezlerde %3-25 arasındadır. Yıllardır süregelen tartışma ise ASC-US'un takip ve tedavisi hakkında olmuştur. 2013 yılına kadar ASC-US takibinde üç yol izlenmekteydi. Kolposkopi, sitolojinin 6 ay sonra tekrarı ve HPV-DNA bakılması yollarından birinin seçilmesi ve sonuçlara göre yönetim önerilmekteydi. 2013 yılında ASCCP tarafından yayınlanan kılavuzda takip ve yönetim stratejisi değişmiştir. Kolposkopi takip modalitesi olmaktan çıkarılmış, hastaların bir yıl sonra sitoloji tekrarı veya HPV-DNA bakılması önerilmiştir. Bir yıl sonraki sitoloji tekrarında >ASC olan olgularda veya HPV-DNA (+) olan olgularda kolposkopi önerilmektedir. 30 yaş üzeri ASC-US'lu hastaların takiplerindeki 5 yılda CIN III gelişme riski %3 olarak bilinmektedir. Başka bir deyişle ASC-US, takip edilmediği sürece, altta yatan risk faktörlerinin de mevcudiyetinde serviksin premalign ve malign lezyonlarına dönüşme potansiyeli olan bir durumdur.

Erken yaşta cinsel ilişkinin serviks kanseri ve serviksin premalign lezyonları açısından bir risk faktörü olduğu bilinmektedir. 2001 yılında servikal kanserli kadınlarda yapılan bir çalışmaya göre ilk koit yaşının erken olması ile servikal kanser gelişimi arasında bağlantı bulunmuştur.<sup>96</sup> Biz çalışmamızda yer alan ASC-US'lu hastalarda ilk koit yaşı sınır değerini 20 yaş ve altı olarak değerlendirdik. Bu şekilde değerlendirdiğimizde HPV-DNA(-) olan hastaların % 37,5'inde ve HPV-DNA (+) hastaların % 40'ında 20 yaş ve öncesi ilk koit öyküsü vardı. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi (p=0,624). Altı ay sonra alınan ikinci sitolojileri negatif olan hastaların %36'sında 20 yaş ve öncesi ilk koit öyküsü varken, ikinci smear sonuçları ASC-US olan hastaların %40'ında 20

yaş ve öncesi ilk koit öyküsü vardı ve bu durum istatistiksel açıdan anlamlı değildi ( $p=0,865$ ).

Seksüel partner sayısının arttıkça serviksin premalign lezyonları ve servikal kanser riskinin arttığını gösteren çok sayıda çalışma mevcuttur. 2003 yılında Silverberg ve ark. yaptığı bir çalışmada, hayat boyu 3'ten fazla seksüel partnere sahip olmanın adenokarsinom ve skuamöz hücreli karsinom riskini arttırdığı tespit edilmiştir.<sup>97</sup> Yine partner sayısı ile ilgili yapılan başka bir çalışmada, 266 servikal kanserli hasta ve 408 kontrol grubu karşılaştırılmış ve sonucunda partner sayısı 10 yada daha fazla olanlarda servikal kanser riskinin belirgin olarak daha fazla olduğu görülmüştür.<sup>98</sup> Biz çalışmamızda ikinci sitolojisi normal olan grupta çok eşlilik %8 oranında saptarken, ASC-US grubunda çok eşlilik saptamadık ve aradaki fark anlamlı değildi ( $p=1,000$ ). YR-HPV ve DR-HPV saptanan hastalarda çok eşlilik izlenmezken, HPV (-) grupta % 8,3 oranında çok eşlilik mevcuttu ve istatistiksel açıdan anlamlı değildi. ( $p=0,629$ )

Çoğu kanserin risk faktörleri arasında yer alan sigara ve tütün kullanımı, uzun yıllardır servikal kanserin de iyi bilinen bir risk faktörüdür. Green ve ark. 2003 yılında yaptıkları bir çalışmada uzun süreli sigara içiminin servikal skuamöz kanser riskini 2 kat arttırdığını, ancak adenokarsinom riskini artırmadığını tespit etmişlerdir.<sup>99</sup> Biz yaptığımız çalışmamızda ikinci smear sonucu ASC-US olarak raporlanan hastalarda sigara kullanımı saptamazken, sitolojisi normal olarak raporlanan hastaların %24'ünde sigara kullanımı saptadık ve aradaki fark, istatistiksel açıdan anlamlı değildi ( $p=0,553$ ). Benzer şekilde olguları HPV (-), DR-HPV(+), YR-HPV(+) olarak gruplandırıp tütün kullanımı açısından değerlendirildiğimizde gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark saptamadık. ( $p=0,220$ )

Olguları parite durumuna, vücut kitle indekslerine, eşlik eden hastalık varlığına, operasyon öykülerine, menstrüel dönemlerine ve partnerinin cinsel partner sayılarına göre değerlendirildiğimizde ikinci defa alınan sitolojisi normal olan grupla, sitolojisi ASC-US olan grup arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark saptamadık.

Olguları HPV(-), DR-HPV(+), YR-HPV(+) olarak gruplandırıp parite durumuna, vücut kitle indekslerine, eşlik eden hastalık varlığına ve operasyon öykülerine göre değerlendirildiğinde göre değerlendirildiğimizde istatistiksel

açından anlamlı fark saptamadık. Partnerinin cinsel partner sayısına göre değerlendirildiğimizde HPV (-) olan grupta multipartner oranı %4,2 iken YR-HPV (+) olan grupta %80, DR-HPV(+) olan grupta ise %100'dü ve aradaki bu fark, istatistiksel açıdan anlamlı idi. ( $p<0,001$ )

Mikronükleus, hücrenin bölünmesinde, anafaz aşamasında geciken, küçük ve fazladan oluşan, kromozom parçaları veya tüm kromozom kaynaklı nükleer oluşumlardır. Başka bir deyişle mikronükleus, çeşitli ajanlar nedeni ile hücrenin mitoz aşamasında kromozomal kırıkların oluşumu ile ortaya çıkar ve hücrede saptanması, DNA'da oluşan hasarın bir göstergesi olarak kabul edilebilir. Mikronükleus oluşumunun temelini, DNA hasarı oluşturmaktadır. Bu nedenle mikronükleus genetik hasar ölçümünde, toksikolojide, diyetle, ilaç sanayide, kanser riski oluşumu şüphesinde, radyoterapide yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır.<sup>66</sup> Mikronükleus, ucuz ve basit bir tekniktir. Bu avantajları nedeni ile bugüne kadar pek çok kanser üzerine yapılan araştırmada bu teknikten faydalanılmıştır. Çoğu biyoizlem çalışmasında dökülen hücrelerde mikronükleus bakılmasının, genotoksik ajanlara maruziyetin hatta kanser riskinin muhtemel bir göstergesi olduğu gösterilmiştir.<sup>4,74</sup>

Gonsebatt ve ark. yaptıkları bir çalışmada bukkal mukozada mikronükleus saptanmasının, oral lökoplaki gibi premalign lezyonları veya üst gastrointestinal sistem kanserlerini öngörebileceğini saptamışlardır.<sup>7</sup> Yine Fareed ve ark. 2011 yılında yaptığı benzer bir çalışmada oral skuamöz hücreli karsinomu olan hastaların ağız mukoza hücrelerinde, kontrol grubuyla karşılaştırıldıklarında, üç veya dört kat daha fazla mikronükleus frekansları saptamışlardır.<sup>100</sup> Rajeswari ve ark. 2000 yılında yaptıkları bir çalışmada meme kanseri olan hastaların ve bunların birinci derece yakınlarının bukkal mukozalarında mikronükleus sayısını kontrol grubuyla karşılaştırdıklarında daha yüksek bulmuşlardır.<sup>8</sup>

Serviksin premalign lezyonları ve servikal kanserli hastalarda yapılan birçok çalışmada mikronükleus varlığının servikal kanser riskinin muhtemel bir göstergesi olduğu bildirilmiş ve desteklenmiştir. 2003 yılında Patricia ve ark. 35 normal smearli (13%), 64 ASC-US'lu (23%), 39 LSIL'li (14%), 36 HSIL'li (13%), 62 invazif karsinomlu (23%) ve 39 radyasyon öykülü (14%) olmak üzere toplam 275 hastayı kapsayan çalışmalarında, bu gruplarda mikronükleus sıklığına bakmışlar ve smear sonucu normal ve ASC-US olan hastalar ile

karşılaştırıldıklarında HSIL ve invazif karsinomu olan hastalarda MN frekansını daha yüksek bulmuşlardır.<sup>101</sup> 2007 yılında Nersesyan ve ark. yaptıkları bir mini-review'de dökülen servikal hücrelerde mikronükleus varlığının servikal kanser riski için ek bir kriter olarak düşünülebileceği ve Pap-smear testlerinde mikronükleus bakılmasının servikal sitolojinin sensitivite ve spesifitesini arttırarak servikal kanser teşhisi ve sekonder korunmada faydalı olabileceği sonucuna varmışlardır.<sup>102</sup> Campos ve ark. 2008'de yaptıkları, servikal kanser risk faktörleri olan 101 hastayı kapsayan çalışmalarında, bu hastalarda servikal sitoloji ve MN frekanslarına bakmışlar ve servikal lezyon derecesi ile MN frekansının arttığını saptamışlardır.<sup>103</sup> 2011 yılında Samant ve ark. yaptıkları çalışmada, smear sonucu normal (n=40), inflamatuvar (n=40), ASC-US (n=30), LSIL (n=38), HSIL (n=30) ve invazif karsinom (n=36) olmak üzere toplam 224 hastanın smear örneğinde MN skoru bakmışlar ve servikal lezyonun derecesi arttıkça MN skorunun da arttığını bulmuşlardır.<sup>104</sup> (p<0.000)

Bu çalışmaların pek çoğunda serviksin premalign ve malign lezyonları ile normal sitolojiye sahip smear sonucu olan hastalarda MN bakılmış ve lezyonun derecesi arttıkça MN sayısının da arttığı belirlenmiştir. Literatürde, smear sonucu ASC-US olan hastalarda MN bakılarak ASC-US'un sonuçları ile MN frekansının değişikliği arasındaki bağlantıyı inceleyen bir çalışma bulunmaktadır. Swapan ve ark. 2011 yılında yaptıkları bu retrospektif çalışmada, smear sonucu ASC-US olan toplam 53 hastanın histoloji sonuçlarını ve MN değerlerini karşılaştırmışlardır. Histoloji sonucu reaktif değişiklikler olarak raporlanan 30 hastanın MN skoru ortalamasını  $2,8667 \pm 2,20866$  ve CIN olarak raporlanan 23 hastanın MN skoru ortalamasını  $8,3478 \pm 6,44987$  olarak bulmuşlardır. Her iki grup MN skoru açısından karşılaştırıldığında anlamlı farklılık saptamışlardır.<sup>11</sup> (P<0.0001).

Biz çalışmamızda smear sonucu ASC-US olan 30 hastada MN skorunu değerlendirdik. Hastaları 4-6 ay sonra tekrar çağırdık ve sitoloji tekrarları ile birlikte MN değerlerine baktık. Dört ila altı ay sonraki sitoloji sonuçlarına bakıldığında hastaların %16,6'sında (n=5) ASC-US olduğu ve %83,3'ünde (n=25) sitoloji negatif olduğunu izledik. Hastaların ilk MN değeri ortalamalarını  $10,47 \pm 1,89$  olarak ve ikinci bakılan mikronükleus ortalamasını  $9,00 \pm 2,29$  olarak bulduk. Bu iki mikronükleus değeri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözledik (p=0,001). Dört ila altı ay sonra yapılan smear testinin



sonuçları ile ilk mikronukleus değerleri ve ikinci mikronukleus değerleri bakımından farklılıkları inceledik. İkinci smear sonucu ASC-US olarak belirlenen hastaların mikronukleus değerlerinde stabilite veya artış saptarken; sitoloji negatif olarak sonuçlanan hastaların mikronukleus değerlerinde belirgin düşüş izledik. İkinci smear sonucu ASC-US olan 5 hastanın ilk MN değerlerinin ortalamasını  $9,80 \pm 0,84$  ve ikinci MN değerlerinin ortalamasını  $12,00 \pm 1,23$  olarak bulduk. İkinci smear sonucu sitoloji negatif olan 25 hastanın ilk MN değerlerinin ortalamasını  $10,60 \pm 2,02$  ve ikinci MN değerlerinin ortalamasını  $8,40 \pm 1,96$  olarak bulduk. Bu bulgular ışığında iki durum arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğunu tespit ettik ( $p=0.001$ ).

Mikronukleus skorlamasının HPV-DNA varlığının öngörülmesinde yardımcı bir parametre olarak kullanılabileceğini gösteren çalışmalar mevcuttur. Duensing ve ark. 2001 yılında yaptıkları bir çalışmada yüksek risk HPV 16 E7 onkojenik proteininin, sentromer anormalliklere neden olduğu ve kromozomal dengesiz hücreler yaratarak MN oluşturduğu deneysel olarak gösterilmiştir.<sup>105</sup> Aires ve ark. 2011 yılında yaptıkları bir çalışmada, normal servikal sitolojilerde HPV-DNA varlığı ile MN skoruna bakmışlar ve MN skorunu HPV-DNA (+) olan hastalarda daha yüksek bulmuşlardır.<sup>106</sup> Benzer şekilde Ana Paulo ve ark. 2014 yılında 158 normal smeari olan hastayı kapsayan çalışmalarında HPV-DNA ve mikronukleus bakarak aralarındaki bağlantıyı ortaya koymayı amaçlamışlardır. HPV-DNA (+) olan hastalarda MN skorunu belirgin şekilde HPV-DNA (-) olan hastalardan daha yüksek bulmuşlardır.<sup>107</sup>

Biz de çalışmamızda HPV-DNA negatifliği, YR-HPV(+) liği ve DR-HPV(+)liği olan hastaları 1. MN değerleri ve 2. MN değerleri açısından karşılaştırdık. Üç grupta istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık izlemedik. ( $p=0,051$ )

## SONUÇ VE ÖNERİLER

Günümüzde HPV testinin servikal kanser taramasında sitolojiye nazaran daha sensitif ve spesifik olduğu bilinmektedir.<sup>108</sup> Gelişmiş ülkelerde kullanımı gittikçe yaygınlaşan bu test, servikal kanser taramasındaki önemine rağmen hala üst düzey teknoloji gerektirmekte ve yüksek maliyeti nedeniyle gelişmekte olan ülkelerde kullanımı sınırlanmaktadır. HPV testinin bu denli kısıtlamalarının olması nedeniyle daha ucuz ve daha kolay erişilebilir tarama testlerinin varlığı araştırılmaya başlanmıştır.

MN skorlaması, rutin smear tetkiklerinde bakılabilen, kromozomal hasarı gösteren ucuz ve kolay bir yöntemdir.<sup>109</sup> Hücrelerdeki DNA hasarının bir göstergesi olduğu bugüne kadar pek çok çalışmada gösterilmiş ve bu nedenle kansere dönüşümü öngörmeye bir parametre olarak kullanılabilirliği bildirilmiştir. Servikal smearlerde servikal lezyonun derecesi ile MN frekansı arasında korelasyon izlenmektedir. Biz çalışmamızda smear sonucu ASC-US olarak gelen hastalara MN skoruna baktık ve 4-6 ay sonra tekrar smear alarak MN skorlarını ve smear sonuçlarını karşılaştırdık. Hastalara eş zamanlı HPV-DNA da bakarak smear sonucu ASC-US olan hastalarda MN'un ASC-US'un regresyon, stabilite ve progresyonuna olan etkisini belirlemeyi ve hastalarda HPV-DNA varlığını belirlemeyi amaçladık. Yaptığımız literatür taramalarında böyle bir çalışmaya rastlamadık.

Sonuç olarak MN skoru bakılması, ASC-US'un izleminde sitolojiye ve HPV-DNA'ya yardımcı bir yöntem olabileceği düşünülmüştür; ancak primer tarama yöntemi olarak kullanılabilmesi için daha fazla hasta sayısını içeren geniş ölçekli çalışmaların varlığı gerekmektedir.

## KAYNAKLAR

1. Cervical Cancer Incidence, Mortality and prevalence worldwide in 2008: Summary. <http://globocan.iarc.fr/factsheet.asp> (Erişim tarihi:30.01.2013)
2. WHO/ICO Information Center of HPV and Cervical Cancer (HPV Information Center). Human Papillomavirus and Related Cancers in the World. Summary Report 2010. <http://www.who.int/hpvcentre/en/> (Erişim tarihi:19.09.2011) .
3. Olaharskil AJ, Sotelo R, Solorza-Luna G, et al. Tetraploidy and chromosomal instability are early events during cervical carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 2006;27(2):337-43.
4. Fenech M, Holland N, Chang WP, et al. The HUMAN MicroNucleus Project--An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. *Mutat Res*. 1999;428(1-2):271-83.
5. Pastor S, Creus A, Parron T, et al. A Biomonitoring of four European populations occupationally exposed to pesticides: Use of micronuclei as biomarkers. *Mutagenesis* 2003;18:249–258.
6. Desai SS, Ghaisas SD, Jakhi SD, et al. Cytogenetic damage in exfoliated oral mucosal cells and circulating lymphocytes of patients suffering from precancerous oral lesions. *Cancer Lett* 1996;109:9–14.
7. Gonsebatt ME, Guzma'n P, Blas J. Cytogenetic and cytotoxic damage in exfoliated cells as indicators of effects. In: Butterworth F, Gunatilaka A, Gonsebatt ME, editors. *Biomonitoring and biomarkers as indicators of environmental change*. New York: Kluwer; 2000. p 317–332
8. Rajeswari N, Ahuja YR, Malini U, et al. Risk assessment in first degree female relatives of breast cancer patients using the alkaline Comet assay. *Carcinogenesis* 2000;21:557–561
9. Leal-Garza CH, Cerda-Flores RM, Leal-Elizondo E, et al. Micronuclei in cervical smears and peripheral blood lymphocytes from women with and without cervical uterine cancer. *Mutat Res*. 2002;515:57–62
10. GUZMAN M. Cannabinoids: potential anticancer agents. *Nat. Rev. Cancer*. 2003;3:745–755.

11. Swapan S, Pranab D, Nalini G, et al. Micronucleus in Atypical Squamous Cell of Undetermined-Significance. *Diagnostic Cytopathology* 2011;(39)4:242-244
12. Patnick J. Cervical cancer control in Europe. *CME Journal of Gynecologic Oncology* 2000; 5:8-12
13. Atasü T., Aydınli K.; *Jinekolojik Onkoloji*; 1999; ikinci baskı sayfa:178-259
14. Berek&Novak' s *Gynecology*. Berek. J.S.2008(17), pg:561-588.
15. Atasü T, Aydınli K. Servikal metaplazi. Aydınli K Edt. *Jinekolojik Onkoloji* 1. Baskı. İstanbul: Logos Kitabevi;1996. s.178-259.
16. Montz FJ. Management of high-grade cervical intraepithelial neoplasia and low-grade squamous intraepithelial lesion and potential complications. *Clin Obstet Gynecol* 2000; 43:394.
17. Waxman AG, Chelmow D, Darragh TM, et al. Revised terminology for cervical histopathology and its implications for management of high-grade squamous intraepithelial lesions of the cervix. *Obstet Gynecol* 2012; 120:1465.
18. Darragh TM, Colgan TJ, Thomas Cox J, et al. The Lower Anogenital Squamous Terminology Standardization project for HPV-associated lesions: background and consensus recommendations from the College of American Pathologists and the American Society for Colposcopy and Cervical Pathology. *Int J Gynecol Pathol* 2013; 32:76.
19. Insinga RP, Glass AG, Rush BB. Diagnoses and outcomes in cervical cancer screening: a population-based study. *Am J Obstet Gynecol* 2004; 191:105
20. Ostor, A.G., Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review. *Int J Gynecol Pathol*, 1993. 12(2): p. 186-92.
21. Siegel R, Ma J, Zou Z, et al. Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin* 2014; 64:9.
22. International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer. Comparison of risk factors for invasive squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the cervix: collaborative reanalysis of individual data on 8,097 women with squamous cell carcinoma and

- 1,374 women with adenocarcinoma from 12 epidemiological studies. *Int J Cancer* 2007; 120:885
23. Castellsagué X, Bosch FX, Muñoz N, et al. Male circumcision, penile human papillomavirus infection, and cervical cancer in female partners. *N Engl J Med* 2002; 346:1105.
  24. International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer, Appleby P, Beral V, et al. Cervical cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data for 16,573 women with cervical cancer and 35,509 women without cervical cancer from 24 epidemiological studies. *Lancet* 2007; 370:1609.
  25. International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer, Appleby P, Beral V, et al. Carcinoma of the cervix and tobacco smoking: collaborative reanalysis of individual data on 13,541 women with carcinoma of the cervix and 23,017 women without carcinoma of the cervix from 23 epidemiological studies. *Int J Cancer* 2006; 118:1481.
  26. Grimm C, Watrowski R, Baumühlner K, et al. Genetic variations of interleukin-1 and -6 genes and risk of cervical intraepithelial neoplasia. *Gynecol Oncol* 2011; 121:537.
  27. Pilleron JP, Durand JC, Hamelin JP. Prognostic value of node metastasis in cancer of the uterine cervix. *Am J Obstet Gynecol* 1974; 119:458.
  28. Levenback C, Coleman RL, Burke TW, et al. Lymphatic mapping and sentinel node identification in patients with cervix cancer undergoing radical hysterectomy and pelvic lymphadenectomy. *J Clin Oncol* 2002; 20:688.
  29. Ries LAG, Melbert D, Krapcho M, et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2004. National Cancer Institute; Bethesda, MD 2007
  30. Screening for cervical cancer: Rationale and recommendations; Uptodate 2014
  31. Atas T., Şahmay S. Jinekolojide Eksfoliyatif Sitoloji (2.Baskı). In: Atas, T., Şahmay S. Edt Jinekoloji (Kadın Hastalıkları). Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2001
  32. Beksaç MS, Ayhan A, Demir N, et al. Jinekoloji; Üreme Endokrinolojisi & İnfertilite ve Jinekolojik Onkoloji. Ankara :Medical Network İnterapitelial serviks, vajen ve vulva hastalıkları 2006;1326-1359.

33. Nanda K, McCrory D C, Myers E R, et al. Accuracy of the Papanicolaou test in screening for and follow-up of cervical cytologic abnormalities: a systematic Ann Intern Med. 2000; 132: 810–819.
34. Cancer and Pregnancy. Creasman W.T., Ann NY Acad Sci; 2001 Sep; 943: 281-6
35. Novak Jinekoloji. Onüçüncü Baskı .(Türkçe Basım). 2004 bölüm 16, sf: 471-505
36. ACOG practice bulletin no. 131: screening for cervical cancer. Obstet Gynecol 2012; 120: 1222–38.
37. Shingleton HM, Thompson JD. Cancer of the cervix. In John AR Thompson JD, editörs. The Linde's Operative Gynecology. 8th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997: 1413-1500.
38. Klinik Jinekolojik Onkoloji, Dısaia P, Creasman W. Güneş kitabevi 2003; Bölüm 1; sf 1-35.
39. Lorincz, AT. Detection of human papillomavirus infection by nucleic acid hybridization. Obstet Gynecol Clin North Am., (1987); 14: 451-469
40. 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
41. Jung WW, Chun T, Sul D, et al. Strategies against human papillomavirus infection and cervical cancer. J Microbiol. 2004 Dec; 42(4): 255-66.
42. Schiffman M, Wheeler C, Dasgupta A, et al. Efor the AltsGroup: A comparison of a prototype PCR assay and Hybride Capture2 for Detection of carcinogenesis HPV DNA in women with equivocal or mildly abnormal pap smear. Am J Clin Pathol 2005; 124: 111
43. D. Solomon, D. Davey, R. Kurman, et al. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. JAMA : the journal of the American Medical Association. 2002; 287(16): 2114-2119.
44. Cox J T. Management of women with cervical cytology interpreted as ASC-US or as ASC-H. Clin Obstet Gynecol 2005; 48: 160.
45. C. M. McGrath. ASCUS in Papanicolaou smears. Problems, controversies, and potential future directions. Am J Clin Pathol. 2002 Jun; 117 Suppl: S62-75.

46. D. Solomon, M. Schiffman, R. Tarone, F. t. A. Group. Comparison of Three Management Strategies for Patients With Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance: Baseline Results From a Randomized Trial. *Journal of the National Cancer Institute*. 2001;93(4):293-299.
47. Williams M L, Rimm DL, Pedigo M A, Frable W J. Atipic squamous cell of undetermined significance: Correlative histologic and follow-up studies from an academic medical center. *Diagn Cytopathol* 1997;16,1-7
48. F. Garcia, K. Hatch, J. Berek. Intraepithelial Disease of the Cervix, Vagina and Vulva. In: J. S. Berek, editor. *Berek & Novak's Gynecology*. 15th ed. Philadelphia, USA: Lippincott Williams & Wilkins (LWW); 2012
49. Stanley M. Pathology and epidemiology of HPV infection in females. *Gynecol Oncol*. 2010 May;117(2):5-10.
50. Baker TS, Newcomb WW, Olson NH, Cowsert LM, Olson C, Brown JC. Structures of bovine and human papillomaviruses. Analysis by cryoelectron microscopy and threedimensional image reconstruction. *Biophys J*. 1991; 60:1445-56.
51. Bernard, H.U., Chan, S.Y., Delius, H., Evolution of papillomaviruses. *Current Topics in Microbiology and Immunolgy*. 1994;186, 33- 53
52. Münger K, Baldwin A, Edwards KM, et al. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J Virol*. 2004; 78(21):11451–60.
53. IARC. Epidemiology of infection: human papillomaviruses. *Carcinog Risk Chem Hum*. 1995; 64:60–5.
54. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology*. 2004; 324(1):17–27.
55. Smith J S, Lindsay L, Hoots B, et al. Human Papillomavirus type distrubution in invasive cervical cancer and highgrade cervical lesions: a meta–analysis update. *Int J Cancer* 2007; 3: 621-632.
56. Das BC, Gopalkrishna V, Hedau S, Katiyar S. Cancer of the uterine cervix and human papillomavirus infection. *Curr Sci*. 2000; 78:52-63.
57. Coppleson M, Reid B. The etiology of squamous carcinoma of the cervix. *Obstet Gynecol* 1968;32:432-6
58. Giroglu T, Florin L, Schäfer F, et al. Human papillomavirus infection requires cell surface heparin sulfate. *J. Virol*. 2001; 75:1565-70.

59. Syrjänen KJ, Natural history of genital human papillomavirus infections. C. Lacey ed. Leeds, United Kingdom. Papillomavirus reviews. Leeds University Press; 1996. p.189-206.
60. Allan BR, Marais DJ, Denny L. Et al. The agreement between cervical abnormalities identified by cytology and detection of high-risk types of human papillomavirus. S Afr Med J. 2006 ;96:1186-90.
61. Yarkin F. Human Papillomavirus: Patogenez ve İmmunite. XXXII.Türk Mikrobiyoloji Kongresi ( Kongre kitabı) S:234-236
62. Stanley M.İmmune respnses to human papillomavirus vaccine 2006, 24 Suppl. 1:16-22
63. World Health Organization: Comprehensive cervical cancer control: a guide to essentialpractice, WHO; Geneve-2006
64. AAPA Annual Conference 2006 San Francisco Syllabus Document HPV and the abnormal Pap smear Robert Gobbo M.D, Providence Medicine Residency Portland,Oregon
65. Munger K.The role of human papillomaviruses in human cancers.Front Biosci. 2002a;7:d641-9
66. Fenech M. The in vitro micronucleus technique. Mutat Res 2000;455:81–95.
67. Fenech M. Biomarkers of genetic damage for cancer epidemiology. Toxicology 2002;181-182:411-416.
68. Mateuca R, Lombaert N, Aka PV, Decordier I,Kirsch-Volders M. Chromosomal changes:induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. Biochimie2006;88(11):1515-1531.
69. Leach NT, Jackson-Cook C. Micronuclei with multiple copies of the X chromosome: dochromosomes replicate in micronuclei?. Mutat Res 2004;554(1-2):89-94.
70. Bonassi,S., Fenech,M., Lando, C., et al. Human Micronucleus Project: International Database Comparison for Results With the Cytokinesis-Block Micronucleus Assay in Human Lymphocytes: I. Effect of Laboratory Protocol, Scoring Criteria, and HostFactors on the Frequency of Micronuclei , Environmental and Molecular Mutagenesis 2001,37:31-45
71. Umegaki, K., Fenech, M, Cytokinesis-block micronucleus assay in WILZ-NS cells: a sensitive system to detect chromosomal damage induced by



- reactive oxygen species and activated human neutrophils, *Mutagenesis*, 2000,15: 261-269.
72. Başaran, N, *Tıbbi Genetik*, 7. Baskı, Güneş ve Nobel Tıp Kitabevi, (1999).
  73. Thomas, P., Umegaki, K., Fenech, M, Nucleoplasmic bridges are a sensitive measure of chromosome rearrangement in the cytokinesis-block micronucleus assay, *Mutagenesis*, 2003,18: 187-194 .stimulation protocols for in vitro fertilization, *Fertil Steril* 46: 1108, 1986.
  74. Tolbert PE, Shy CM and Allen JW. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. *Mutat. Res.* 1992;271: 69-77.
  75. American Cancer Society. *Cancer Facts and Figures 2004*.
  76. Vaccarella S, Franceschi S, Engholm G, et al. 50 years of screening in the Nordic countries: quantifying the effects on cervical cancer incidence. *Br J Cancer* 2014; 111:965.
  77. De Martel C, Ferlay J, Franceschi S, et al. Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis. *Lancet Oncol.* 2012;13(6):607–15.
  78. Castellsagué X, Iftner T, Roura E, et al. Prevalence and genotype distribution of human papillomavirus infection of the cervix in Spain: the CLEOPATRE study. *J Med Virol* 2012;84(6):947–56.
  79. Bruni L, Diaz M, Castellsagué X, et al. Cervical human papillomavirus prevalence in 5 continents: meta-analysis of 1 million women with normal cytological findings. *J Infect Dis* 202:1789-1799.
  80. De Sanjosé S, Diaz M, Castellsagué X, et.al. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical HPV DNA in women with normal cytology: A meta-analysis. *Lancet InfectDis* 2007;7:453-459
  81. Guan et al. Human papillomavirus types in 115,789 HPV-positive women:A meta-analysis from cervical infection to cancer *Int. J. Cancer:* (2012) VC2012 UICC
  82. Dursun P, Ayhan A, Mutlu L, et al. HPV types in Turkey: Multicenter hospital based evaluation of 6388 patients in Turkish Gynecologic Oncology Group Centers. *Turk Patoloji Derg* 2013;29:210-6

83. Kaufman RH, Adam E. Is human papilloma virus testing of value in clinical practice? *Am J Obstet Gynecol* 1999;180:1049-53
84. Solomon D, Nayar R. *The Bethesda System for Reporting Cervical Cytology: Definitions, Criteria, and Explanatory Notes*. 2nd ed. Rio de Janeiro: Revinter; 2005.
85. Samarawardana P, Dehn DL, Singh M, et al. P16 INK4a is superior to high risk HPV testing in cervical cytology for the prediction of underlying high grade dysplasia. *Cancer Cytopathol* 2010; 118:146-56
86. Schiffman M, Hildesheim A, Herrero R et al. Human papillomavirus testing as a screening tool for cervical cancer. *JAMA* 2000;283:2525-6.
87. Michael P. Stany, Michael A. Bidus, Elizabeth J. Reed, et al. The prevalence of HR-HPV DNA in ASCUS Pap smears: A military population study *Gynecologic Oncology* 2006; 101:82-5.
88. Arbyn M, Paraskevaidis E, Martin-Hirsch P, et al. Clinical utility of HPV-DNA detection: triage of minor cervical lesions, follow-up of women treated for high grade CIN: an update of pooled evidence. *Gynecol Oncol*. 2005;99.
89. Mona B, Zaibo L, Chengquan Z, et al. Correlation of Histopathologic /Cytologic Follow-up Findings With Vaginal ASC-US and ASC-H Papanicolaou Test and HPV Test Results Presented in abstract form at the 99th Annual Meeting of the United States and Canadian Academy of Pathology. Washington, DC.:2010(3)20-26
90. Zhao C, Zhao S, Heider A, et al. Significance of high-risk human papillomavirus DNA detection in women 50 years and older with squamous cell Papanicolaou test abnormalities. *Arch Pathol Lab Med*. 2010;134:1130– 1135.
91. De Sanjose S, Quint WG, Alemany L, et al. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. *Lancet Oncol* 2010; 11:1048.
92. Mark H. Stoler, Thomas C. Wright et al. and the ATHENA (Addressing THE Need for Advanced HPV Diagnostics) HPV Study Group. High-Risk Human Papillomavirus Testing in Women With ASC-US Cytology *Am J Clin Pathol* 2011;135:468-47

93. Anna K. W, Raymond C. Chan, W. Stephen N, et al. Invader Human Papillomavirus (HPV) Type 16 and 18 Assays as Adjuncts to HPV Screening of Cervical Papanicolaou Smears With Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance. *Cancer*. 2009;(115)4: 823-832
94. Castle PE, Cuzick J, Stoler MH, et al. Detection of Human Papillomavirus 16, 18, and 45 in Women With ASC-US Cytology and the Risk of Cervical Precancer: Results From the CLEAR HPV Study. *Am J Clin Pathol*. 2015;143(2):160-7.
95. Berek S.J., Adashi E.Y., Hillard A.P.; Novak Jinekoloji; 1998; birinci baskı. p: 435, 458-1111.
96. Thomas D B, Quin Q, Kuypers J, et al. Human papillomaviruses and cervical cancer in Bangkok. Risk factors in situ and invasive cell squamous carcinoma. *American Journal of Epidemiology* 2001; vol:153, No:8, 732-739.
97. Sean F, Lacey V, James V Jr, et al. Comparison of human genotypes, sexual, and reproductive risk factors of cervical adenocarcinoma and squamous cell carcinoma : Northeastern United States. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*. 2003; 188(3): 657- 663.
98. Slattery M, Overall J C, Abbott T M, et al. Sexual activity, contraception, genital infection and cervical cancer: Support for A sexually transmitted disease hypothesis. *American Journal of Epidemiology*. Vol:130, No:2, 248-258.
99. J Green, Berrington de Gonzalez, S Sweetland, et al. Risk factors for adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the cervix in women aged 20-44 years: the UK national case-control study of cervical cancer. *British journal of cancer* November 2003(89);2078-2086.
100. Fareed M, Afzal M, Siddique YH. Micronucleus investigation in buccal mucosal cells among pan masala/gutkha chewers and its relevance for oral cancer. *Biol Med* 2011;3:8-15
101. Patricia Guzmán, Rita C. Sotelo-Regil, et al. Positive Correlation Between the Frequency of Micronucleated Cells and Dysplasia in Papanicolaou Smears Instituto de Investigaciones Biome´dicas, UNAM, Me´xico City, Me´xico 2 Instituto Nacional de Cancerologı´a, SS, Me´xico City, Me´xico. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 41:339 –343

102. Nersesyan AK (2007). Possible role of the micronucleus assay in diagnostics and secondary prevention of cervix cancer: a minireview. *Cytol. Genet.* 41: 317-318
103. Campos LMFR, Dias FL, Antunes LMG et al. Prevalence of micronuclei in exfoliated uterine cervical cells from patients with risk factors for cervical cancer. *São Paulo Med. J.* 126: 323-328.
104. Samant S, Dey P, Nijhawan R. Micronucleus in cervical intraepithelial lesions and carcinoma. *Acta Cytol* 2011;55:42–47.
105. Duensing S, Duensing A, Crum CP, et al Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein-induced abnormal centrosome synthesis is an early event in the evolving malignant phenotype. *Cancer Res* 2001. 61:2356 – 2360.
106. Aires GM, Meireles JR, Oliveira PC, et al. Micronuclei as biomarkers for evaluating the risk of malignant transformation in the uterine cervix. *Genet Mol Res* 2011. 10:1558-1564.
107. Ana Paula Rebelo Cassel, Regina Bones Barcellos, Cláudia Maria Dornelles da Silva, et al. Association between human papillomavirus (HPV) DNA and micronuclei in normal cervical cytology. *Genetics and Molecular Biology*, 2014;37, 2, 360-363
108. Castle PE, de Sanjosé S, Qiao YL, et al. Introduction of human papillomavirus DNA screening in the world: 15 years of experience. *Vaccine Suppl* 30 suppl 2012; 5:F117-122
109. Gayathri B, Kalyani R, Hemalatha A, et al. Significance of micronucleus in cervical intraepithelial lesions and carcinoma. *J Cytol* 2012; 29:236-240.

## KISALTMALAR DİZİNİ

<b>ACS:</b>	American Cancer Society
<b>ACOG:</b>	American College of Obstetricians and Gynecologists
<b>ASCCP:</b>	American Society for Colposcopy and Cervical Pathology
<b>ASC:</b>	Atipik skuamöz hücreler
<b>ASC-H:</b>	Yüksek grade lezyonun dışlanamadığı atipik skuamöz hücreler (atypical squamous cells can not exclude HSIL).
<b>ASC-US:</b>	Önemi bilinmeyen atipik skuamöz hücreler
<b>BN:</b>	Binükleer
<b>CBMN:</b>	Cytokinesis Block Micronucleus
<b>CIN:</b>	Servikal intraepitelyal neoplazi
<b>CIS:</b>	Karsinoma in situ
<b>Cyt-B:</b>	Sitalazin-B
<b>DES:</b>	Dietilestilbestrol
<b>DNA:</b>	Deoksiribonükleik asit
<b>DR-HPV:</b>	Düşük riskli HPV
<b>FDA:</b>	Food and Drug Administration
<b>FIGO:</b>	The International Federation of Gynecology and Obstetrics, (Uluslararası Jinekoloji ve Obstetri Federasyonu)
<b>FISH:</b>	Floresan In Situ Hibridizasyon
<b>HC:</b>	Hibrid yakalama
<b>HCT:</b>	Hibrid yakalama tüp
<b>HIV:</b>	Human Immunodeficiency Virus
<b>HSIL:</b>	Yüksek dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon
<b>HPV:</b>	Human papillomavirus
<b>Ig:</b>	Immüoglobulin
<b>LAST:</b>	Lower Anogenital Squamous Terminology
<b>LCR:</b>	Long Coding Region
<b>LSIL:</b>	Düşük dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon
<b>MN:</b>	Mikronukleus
<b>MultiN:</b>	Multinükleer
<b>NCR :</b>	Non Coding Region

<b>NSCJ:</b>	New Squamo-Columnar Junction (Yeni Skuamo-Kolumnar Bileşke)
<b>ORF:</b>	Open Reading Frame (Açık Okuma Bölgesi)
<b>OSCJ:</b>	Original Squamo-Columnar Junction (Orijinal Skuamo-Kolumnar Bileşke )
<b>PCR:</b>	Polimerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
<b>RLU:</b>	Relatif Light Unit (Relatif Işık Birimi)
<b>RNA:</b>	Ribonükleik Asit
<b>SCJ:</b>	Squamo-Columnar Junction (Skuamo-Kolumnar Bileşke )
<b>SIL:</b>	Skvamöz intraepitelyal lezyon
<b>TriN:</b>	Trinükleer
<b>T/Z:</b>	Transformasyon zonu
<b>USPSTF:</b>	United States Preventive Services Task Force
<b>VKİ:</b>	Vücut kitle indeksi
<b>WHO:</b>	World Health Organisation (Dünya Sağlık Örgütü)
<b>YR-HPV:</b>	Yüksek riskli HPV

## ŞEKİLLER DİZİNİ

		<b>Sayfa</b>
<b>Şekil 1</b>	(Servikal Intraepitelyal Neoplazinin Terminolojisi ve Histolojisi)	13
<b>Şekil 2</b>	(ASCCP 2013 Kılavuzuna Göre ASC-US Yönetimi )	26
<b>Şekil 3</b>	(ASCCP 2013 Kılavuzuna Göre 21-24 Yaş Arası ASC-US ve LSIL Yönetimi)	26
<b>Şekil 4</b>	(HPV Patogenezi)	34
<b>Şekil 5</b>	(HPV' nin Doğal Seyri)	35
<b>Şekil 6</b>	(Sitokinez baskılanmış mikronukleus yöntemi (cytokinesis block micronucleus: CBMN assay) sitokalazin B eklenme zamanı)	40

## TABLolar DİZİNİ

		<b>Sayfa</b>
<b>Tablo 1</b>	(Servikal Intraepitelyal Neoplazilerde Regresyon ve Progresyon Oranları)	13
<b>Tablo 2</b>	(Servikal Kanser Tarama ile İlgili Çeşitli Organizasyonların Önerileri)	19
<b>Tablo 3</b>	(Bethesda Klasifikasyonu)	22
<b>Tablo 4</b>	(HPV Gen Bölgeleri ve Fonksiyonları)	28
<b>Tablo 5</b>	(Hastalıklarla İlişkilerine Göre HPV Tipleri)	30
<b>Tablo 6</b>	(HPV Genotiplerinin Risk Gruplarına Göre Dağılımı)	30
<b>Tablo 7</b>	(Mikronukleus Oluşum Mekanizmaları)	38
<b>Tablo 8</b>	(MN Sıklığını Değerlendirmek İçin Hücre Seçim Kriterleri)	41
<b>Tablo 9</b>	(MN Değerlendirme Kriterleri)	41
<b>Tablo 10</b>	(Çalışma AL' sinin Hazırlanması)	45
<b>Tablo 11</b>	(Çalışma Grubunun Karakteristik Özellikleri)	52
<b>Tablo 12</b>	(Tüm Çalışma Grubunda Saptanan HPV Tipleri)	53
<b>Tablo 13</b>	(İkinci Smear Sonucu ASC-US ve Sitoloji Negatif Olarak Raporlanan Hastalarda Karakteristik Özelliklerin Karşılaştırılması)	54
<b>Tablo 14</b>	(HPV DNA (-) ' liğinin, DR-HPV (+) ' liğinin ve YR-HPV (+) ' liğinin Çeşitli Risk Faktörleriyle Olan İlişkisi)	56
<b>Tablo 15</b>	(ASC-US'un Regresyon ve Stabilitesi ile MN Değerlerinin İlişkisi)	57
<b>Tablo 16</b>	(HPV-DNA negatifliği, YR-HPV(+) ' liği ve DR-HPV(+) ' liği ile MN Değerlerinin İlişkisi)	57