

T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**NORMAL SERVİKAL SİTOLOJİ BULGULARINA SAHİP
KADINLARDA GENİTAL HUMAN PAPİLLOMA
VİRUSUNUN ARAŞTIRILMASI VE GENOTİPLERİNİN
BELİRLENMESİ**

Didem ÖZGÜR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. Seda TEZCAN

MERSİN - 2013

T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**NORMAL SERVİKAL SİTOLOJİ BULGULARINA SAHİP
KADINLARDA GENİTAL HUMAN PAPİLLOMA
VİRUSUNUN ARAŞTIRILMASI VE GENOTİPLERİNİN
BELİRLENMESİ**

Didem ÖZGÜR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. Seda TEZCAN

Bu tez, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
“BAP SBE TM (DÖ) 2011- 7 YL” nolu proje olarak desteklenmiştir.

Tez No: 242

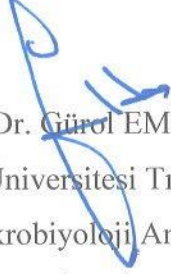
MERSİN – 2013


Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü


Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı Çerçevesinde yürütülmüş olan “**Normal Servikal Sitoloji Bulgularına Sahip Kadınlarda Genital Human Papilloma Virusun Araştırılması ve Genotiplerinin Belirlenmesi**” başlıklı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi

18.07.2013


Prof. Dr. Gürül EMEKDAŞ
Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Jüri Başkanı


Yrd. Doç. Dr. Seda TEZCAN
Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Jüri Üyesi/Danışman


Yrd. Doç. Dr. Mahmut ÜLGER
Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Jüri Üyesi

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunun 30.07.2013 tarih ve 2013/138 sayılı kararı ile kabul edilmiştir.


Enstitü Müdürü
Prof. Dr. Necat YILMAZ



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam süresince, her konuda yardım ve desteğini gördüğüm, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Gürol EMEKDAŞ'a, danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Seda TEZCAN başta olmak üzere lisansüstü eğitimim süresinde destek ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Gönül ASLAN, Sayın Prof. Dr. Candan ÖZTÜRK, Sayın Prof. Dr. Nuran DELİALİOĞLU, Sayın Doç. Dr. Feza OTAĞ ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Mahmut ÜLGER'e teşekkür ederim.

Çalışmamızın hasta örneklerinin toplanmasında yardımcı olan Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı emekli Öğretim Üyesi Prof. Dr. Saffet DİLEK'e teşekkür ederim.

Çalışmamıza dahil ettiğimiz hasta örneklerinin patolojik bulgularının değerlendirilmesinde yardımcı olan Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. İclal GÜRSES'e teşekkür ederim.

Tezimin bulgularının değerlendirilmesi ve istatistiksel analizlerinin yapılması konusundaki yardımlarından dolayı Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik Anabilim Dalı Arş. Gör. Didem Ovla'ya teşekkür ederim.

Tez çalışmam sırasında laboratuvar ortamında sonsuz desteklerini gördüğüm Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'mızda görev yapan tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Hayatımın her aşamasında olduğu gibi bu tez çalışmam sırasında da beni manevi olarak destekleyen ve bana her zaman yol gösteren babama, sonsuz sevgisiyle ve sabrıyla beni kucaklayan anneme ve beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan yol arkadaşım ablama sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

KABUL VE ONAY	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ÖZET	xii
ABSTRACT	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİ	2
2.1. Tarihçe	2
2.2. Sınıflandırma	3
2.3. HPV Genomik Yapısı	4
2.4. HPV Proteinleri.....	6
2.4.1. Erken Bölge Proteinleri	6
2.4.1.1. E1 Proteini	6
2.4.1.2. E2 Proteini	6
2.4.1.3. E4 Proteini	7
2.4.1.4. E5 Proteini	8
2.4.1.5. E6 Proteini	8
2.4.1.6. E7 Proteini	9
2.4.2. Geç Bölge L1 ve L2 Proteinleri	10
2.5. Patogenez	10
2.6. Klinik Sendromlar.....	12
2.6.1. Kutanöz İnfeksiyonlar.....	14
2.6.1.1. Deri ile İlişkili İnfeksiyonlar.....	14

2.6.2. Mukozal İnfeksiyonlar	15
2.6.2.1. Oral Kavite İnfeksiyonları ve Respiratuvar Papillomlar	15
2.6.3. Anogenital İnfeksiyonlar	16
2.6.3.1. Anogenital Siğiller	16
2.6.3.2. HPV ve Kanser	17
2.6.3.2.1. Servikal Kanser	17
2.6.3.2.2. Anal Kanser	18
2.6.3.2.3. Vulvar, Vajinal ve Penis Kanserleri	18
2.6.3.2.4. Baş ve Boyun Kanserleri	19
2.7. Epidemiyoloji.....	19
2.8. Tanı	20
2.8.1. Morfolojik Tanı.....	20
2.8.2. Viral Proteinlerin Saptanması	21
2.8.3. Viral Nükleik Asit Saptanması	21
2.8.3.1. Nükleik Asit Hibridizasyon Yöntemi	22
2.8.3.1.1. Southern Blot Hibridizasyon	23
2.8.3.1.2. In-Situ Hibridizasyon.....	23
2.8.3.1.3. Dot-Blot Hibridizasyon.....	23
2.8.3.2. Sinyal Amplifikasyon Testleri	24
2.8.3.3. Nükleik Asit Amplifikasyon Teknikleri	25
2.9. HPV Aşıları.....	26
2.9.1. Terapötik Aşılar	26
2.9.2. Profilaktik Aşılar.....	26
2.9.2.1. Bivalan Aşı	27
2.9.2.2. Kuadrivalan Aşı	27
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	28
3.1. Örneklerin Alınması	28
3.1.1. Pap Smear İçin Örnek Alınması	28
3.1.2. HPV DNA Saptanması İçin Örneklerin Alınması	29
3.2. Anket Uygulaması	29
3.3. Kullanılan Araç ve Gereçler	29
3.3.1. Kullanılan Cihazlar	29

3.3.2. Kullanılan Sarf Malzemeler.....	30
3.3.3. Kullanılan Hazır Ticari Kitler.....	31
3.3.4. Kullanılan Bilgisayar Yazılımları.....	31
3.3.5. Kullanılan Kimyasallar.....	31
3.3.6. Kullanılan Tampon Çözeltiler.....	32
3.3.6.1. Elektroforez İçin Kullanılan Solüsyonlar.....	32
3.4. Servikal Sürüntü Örneklerinden HPV DNA'nın Tespit Edilmesi.....	33
3.4.1. DNA Ekstraksiyonu.....	33
3.4.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Uygulaması.....	35
3.4.3. Agaroz Jel Elektroforez İşlemi.....	37
3.5. HPV Genotiplendirilmesi.....	38
3.5.1. HPV DNA Dizi Analizi.....	38
3.5.2. Dizi Analizi Verilerinin Değerlendirilmesi.....	39
3.6. İstatistiksel Analiz.....	40
4. BULGULAR.....	41
5. TARTIŞMA.....	48
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	56
7. KAYNAKLAR.....	58
EKLER.....	71
EK-1.....	71
EK-2.....	72
ÖZGEÇMİŞ.....	75

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. HPV'nin filogenetik şeması	4
Şekil 2.2. HPV genom yapısı	5
Şekil 4.1. İnsan hücresel GAPD-H geninin PZR yöntemi ile amplifikasyonu sonrası oluşan 136 bç'lik bölgenin %1'lik agaroz jel elektroforez görüntüsü	41
Şekil 4.2. HPV DNA'sının L1 kapsid geninin MY09/MY11 primerleri ile amplifikasyonu sonrası oluşan 450 bç'lik bölgenin %1'lik agaroz jel elektroforez görüntüsü	42
Şekil 4.3. HPV DNA'sının L1 kapsid geninin GP5+/6+ primerleri ile amplifikasyonu sonrası oluşan 142 bç'lik bölgenin %1'lik agaroz jel elektroforez görüntüsü	42
Şekil4.4. HPV pozitif bulunan hastaların yaş gruplarına göre dağılımı	43
Şekil4.5. HPV pozitif bulunan hastalarda en sık tespit edilen HPV tiplerinin prevalansı	44
Şekil4.6. HPV pozitif bulunan hastalarda diğer tespit edilen HPV tiplerinin prevalansı	45

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. HPV ile ilişkili önemli klinik tablolar	13
Çizelge 2.2. Viral nükleik asit saptanmasında kullanılan yöntemler	22
Çizelge 3.1. PZR amplikasyonlarında kullanılan primer dizi çiftleri	36
Çizelge 3.2. L1 gen bölgesinin amplifikasyonunda her bir örnek için hazırlanan reaksiyon karışımı.....	36
Çizelge 3.3. Uygulanan amplifikasyon sıcaklık ve süreleri	37
Çizelge 4.1. Çalışmaya dahil edilen kadınların yaş gruplarına göre dağılımı	43
Çizelge 4.2. HPV DNA pozitif bulunan hastalardaki HPV tiplerinin prevalansı.....	44
Çizelge 4.3. HPV tiplerinin yaşa göre dağılımı.....	46
Çizelge 4.4. Çalışma grubundaki kadınların demografik özellikleri.....	47
Çizelge 5.1. Dünya genelinde normal servikal sitolojiye sahip kadınlarda HPV DNA çalışmaları.....	49
Çizelge 5.2. Türkiye’de normal servikal sitolojiye sahip kadınlarda HPV DNA çalışmaları.....	52

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ACIP	Bağışıklama Uygulamalarına İlişkin Danışma Komitesi (Advisory Committee on Immunization Practices)
AGUS	Önemi Belirgin Olmayan Atipik Glandüler Hücreler (Atypical Glandular Cells of Undetermined Significance)
ASC-H	Yüksek Dereceli Skuamöz İntraepitelyal Lezyonun Dışlanamadığı Atipik Skuamöz Hücreler (Atypical Squamous Cells, Cannot Exclude a High-Grade Squamous Intraepithelial Lesion)
ASCUS	Önemi Belirgin Olmayan Atipik Skuamöz Hücreler (Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance)
BBSHK	Baş ve Boyun Skuamöz Hücreli Karsinom
BÇ	Baz Çifti
BVP	Bovine Papilloma Virus
CD	Cluster Designation
CDC	Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri (Centers for Disease Control and Prevention)
CDKI	Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörü (Cyclin Dependent Kinase Inhibitor)
CIN	Servikal İntraepitelyal Neoplazi (Cervical Intraepithelial Neoplasia)
CRPV	Cottontail Rabbit Papilloma Virus
DNA	Deoksiribonükleik Asit
E2BS	E2 Bağlanma Bölgesi (E2 Binding Site)
E6AP	E6 İlişkili Protein (E6 Associated Protein)
EGFR	Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü (Epidermal Growth Factor Receptor)
EIA	Enzim İmmunoassay
ER	Endoplazmik Retikulum

EV	Epidermodisplazia verrusiformis
FDA	Gıda ve İlaç Yönetimi (Food and Drug Administration)
GAPD-H	Gliseraldehid-3-Fosfat Dehidrojenaz
GIS	Gastrointestinal Sistem
HCII	Hybrid Capture II
HLA	İnsan Lökosit Antijeni (Human Leukocyte Antigen)
HPV	Human Papilloma Virus
HR	Yüksek Riskli (High Risk)
HSIL	Yüksek Dereceli Skuamöz İntraepitelyal Lezyon (High-Grade Squamous Intraepithelial Lesion)
ICTV	Uluslararası Virus Sınıflandırma Konseyi (International Council on Taxonomy of Viruses)
kDa	Kilodalton
LA	Linear Array
LCR	Uzun Kontrol Bölgesi (Long Control Region)
LR	Düşük Riskli (Low Risk)
LSIL	Düşük Dereceli Skuamöz İntraepitelyal Lezyon (Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesion)
MHC	Major Histocompatibility Complex
OKS	Oral Kontraseptif
ORF	Açık Okuma Çerçevesin (Open Reading Frame)
pA	Poliadenilasyon
PAP	Papanicolaou
pRb	Retinoblastom Proteini
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RIA	Rahim İçi Araç
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	Ribonükleik Asit
Rb	Retinoblastom
SHAK	Skuamöz Hücreli Anal Kanser
SIL	Skuamöz İntraepitelyal Lezyon (Squamous Intraepithelial Lesions)

URR

Üst Regulator Bölge (Upper Regulatory Region)

VLP

Virus Benzeri Partikül (Virus Like Particle)

ÖZET

Normal Servikal Sitoloji Bulgularına Sahip Kadınlarda Genital Human Papilloma Virusun Araştırılması ve Genotiplerinin Belirlenmesi

Human papilloma virus (HPV), cinsel yolla bulaşan hastalıkların en sık nedenlerinden biridir ve tüm dünyada kadınlar arasında en yaygın görülen ikinci kanser türü olan servikal kanserin major etiyolojik ajanıdır. Belirli tiplerinin servikal kanser gelişiminde HPV'nin etkili olduğu bilinmektedir. Servikal kanserin erken teşhisi ve önlenmesinde, kişideki HPV infeksiyonunun ve etken olan tipin saptanması önem taşımaktadır. Bu çalışmada Mersin ilinde normal servikal sitoloji bulgularına sahip kadınlarda HPV infeksiyon prevalansının araştırılması, genotip dağılımı ve olası risk faktörlerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmaya 17-72 yaş aralığında olan normal servikal sitolojili bulgularına sahip 322 kadından elde edilen servikal sürüntü örnekleri dahil edilmiştir. HPV DNA tespiti için MY09/11 ve GP5+/6+ primerleri ile yapılan nested PZR (polimeraz zincir reaksiyonu) yöntemi kullanılmıştır. HPV DNA pozitif örnekler doğrudan dizi analizi ile genotiplendirilmiştir. Toplam 322 örnekten 64 (%19,9)'ü HPV DNA pozitif bulunmuştur. En sık görülen HPV tipi %25 oran ile tip 66 olup, bunu sırasıyla tip 16 (%21,9), tip 6 (%10,9), tip 53 (%9,7) ve tip 83 (%7,8) izlemiştir. En fazla HPV DNA pozitifliği %34,4 oranla 35-45 yaş arasında tespit edilmiştir. Risk faktörleri açısından HPV DNA pozitif ve negatif bulunan kadınlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir ($p>0,05$). Sonuç olarak Mersin ilinde normal servikal sitolojiye sahip kadınlarda genital HPV infeksiyonu prevalansı oldukça yüksek bulunmuştur. HPV tiplerinin çeşitliliği ve infeksiyon prevalansının yüksekliği epidemiyolojik araştırmalarda, servikal kanser tarama ve HPV aşı stratejilerinin oluşturulmasına değerli katkılar sağlamaktadır.

Anahtar sözcükler: Human papillomavirus; Prevalans; Genotip; Normal servikal sitoloji; Polimeraz Zincir Reaksiyonu

ABSTRACT

Investigation and Identification of Genotypes of Genital Human Papilloma Virus among Women with Normal Cervical Cytology Findings

HPV is one of the most common causes of sexually transmitted diseases and the major etiological agent of cervical cancer which is the second most common type of cancer in women all over the world. As it is known, some specific types of HPV play active role in the development of cervical cancer. Determination of HPV infection and effective type in the people is important for an early diagnosis and prevention of cervical cancer. In this study we aimed to investigate the prevalence of HPV infection, determinate the distribution of genotypes and possible risk factors, among women with normal cervical cytology findings in Mersin. Totally 322 cervical cytological samples obtained from women with normal cytology aged between 17 and 72 years were included in this study. HPV DNA was detected by nested PCR (polymerase chain reaction) method using MY09/11 and GP5+/6+ primers. HPV DNA positive samples were genotyped by direct sequence analysis. Out of the 322 cervical specimens, 64 (19,9%) specimens were found to be positive for HPV DNA. The most frequent HPV type was HPV type 66 with a rate of 25%, followed by HPV type 16 (21,9%), HPV type 6 (10,9%), HPV type 53 (9,7%) and HPV type 83 (7,8%) respectively. The highest number of HPV DNA positive women was found between the age of 35-45 with a rate of 34,4%. We couldn't determine statistically significant difference between HPV DNA positive and negative women for risk factors ($p>0,05$). In conclusion, the prevalence of genital HPV infection is found quite high in women with normal cervical cytology in Mersin and the results were showed a wide variety of genotypes. The epidemiological research of HPV infection and its genotypization should be considered for cervical cancer screening and development of the HPV vaccine.

Keywords: Human papillomavirus; Prevalence; Genotype; Normal cervical cytology; Polymerase Chain Reaction

1. GİRİŞ

Human papilloma virus (HPV), *Papillomaviridae* ailesine ait ikozahedral simetrik, çembersel çift zincirli küçük DNA virusudur (1). HPV cinsel yolla bulaşan hastalıkların en sık nedenlerinden biridir (2). HPV infeksiyonları genellikle asemptomatiktir ve infekte bireylerin %90'ında 1-2 yıl içinde virus temizlenmektedir. Geriye kalan %10'unda ise persistan infeksiyon görülmekte ve bunların %1,5'inde 30 yıl içinde malignite gelişmektedir (3).

HPV, tüm dünyadaki kadınlarda kansere bağlı ölümler içinde ikinci sırada yer alan servikal kanserin primer etiyolojik ajanıdır (2). HPV genotipleri prekanseröz lezyon ve servikal kanserle ilişkilerine göre yüksek riskli (High Risk; HR) ve düşük riskli (Low Risk; LR) HPV tipleri olarak sınıflandırılmaktadırlar (4). HR-HPV tipleri: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 ve 82'tir. LR-HPV tipleri: 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72 ve 81'dir (5).

Servikal kanserlerden en çok izole edilen HPV tipi %53.5 oranla HPV tip 16'dır, bunu ikinci sırada %17'lik oranla HPV tip 18 izlemektedir. HPV tip 16 ve 18 bütün servikal kanserlerin %70'inden sorumludur. Diğer HPV tiplerinden ise HPV tip 45 üçüncü sırada, HPV tip 31 dördüncü sırada yer almaktadır ve bu dört HPV tipi bütün servikal kanserlerin %80'inde tespit edilmektedir (6).

Servikal kanser olgularının neredeyse tümünde (%99,7) HPV DNA'sı izole edilmesine rağmen, HPV varlığı servikal kanser için gerekli fakat tek başına yeterli değildir. Sigara, cinsel aktivitenin erken yaşta başlaması, uzun süreli oral kontraseptif (OKS) kullanımı, immün yetmezlik, çok sayıda cinsel eşe sahip olma, diğer cinsel yolla geçen infeksiyonların varlığı gibi faktörler karsinogenezde rol oynamaktadır (7). Servikal kanser sıklığında azalma HPV infeksiyonlarının tanısı, önlenmesi ve tedavi edilmesi yoluyla mümkün olabilir.

Mersin ilinde normal sitolojiye sahip kadınlardaki HPV prevalansının ve genotiplerinin dağılımının belirlenmesi, HPV'nin karsinogenezde rol oynayan faktörler ile arasında ilişki olup olmadığının araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİ

2.1. Tarihçe

HPV'nin neden olduğu siğillerin varlığı Antik Yunan ve Roma'dan bu yana bilinmektedir (8,9). 1760-1839 tarihleri arasında Rigoni-Stern bekarlar ve rahibelerde, evli ve dul kadınlara oranla uterus kanserinin çok nadir bulunduğunu tespit etmiştir ve bunun HPV ile olan ilişkisini 1842 yılında kanıtlamıştır (8,10,11). 19. yüzyılın sonlarında Payne (1891) genel siğillerin insidansında artış olduğunu rapor etmiştir (8).

Yirminci yüzyılın başlarına ise ilk kez Ciuffo tarafından insanlardaki siğillerin viral etyolojisi ileri sürülmüştür ve 1907 yılında hücresiz siğil ekstraktlarını kendi eline intradermal olarak inoküle ederek yeniden siğil oluşumu ile siğillerin bulaşıcılığını açıklamıştır (10,12,13). Shope 1933 yılında papillomavirusların retroviruslardan sonra maligniteye sebep olan ikinci virus olduğunu bildirmiştir (11-14). Strauss ve arkadaşları ise 1949 yılında elektron mikroskopunda ilk kez insan siğillerinde viral partikülleri tespit etmişlerdir (8,14). İto ve Evans 1961 yılında karsinomanın infeksiyöz papillomavirus DNA'sı içerdiğini göstermiştir. 1963 yılında Crawford tarafından viral DNA'nın fiziksel özellikleri karakterize edilmiştir. 1976 yılında Epidermodysplasia verruciformis (EV) ile ilişkili lezyonlara papillomavirusun sebep olduğu kanıtlanmıştır (10). Ayrıca yine 1976 yılında, zur Hausen servikal kanser ile HPV arasındaki ilişkiyi göstermiştir (14).

1980'li yıllarda moleküler tekniklerin gelişmesiyle birlikte papillomavirus araştırmaları yaygınlaşmıştır. 1980-1982 yılları arasında Gissmann ve zur Hausen genital lezyonlardan ve laringeal papilloma örneklerinden HPV'nin iki tipini izole etmişlerdir (11).

21. yüzyılın başlarında ise 2006 yılında kadınlar için, 2009 yılında ise erkekler için HPV aşısı geliştirmiştir. Ayrıca 2008 yılında zur Hausen, servikal kanser ile HPV arasındaki ilişkiyi gösteren çalışması ile tıp alanında Nobel barış ödülü almıştır (14).

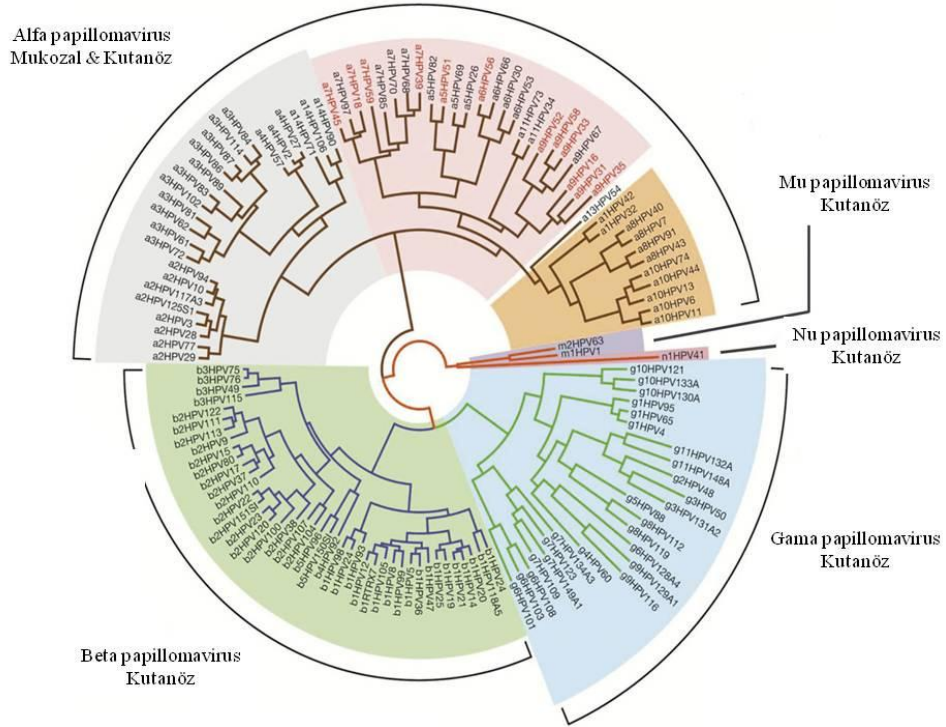
2.2. Sınıflandırma

Doğada yaygın olarak bulunan papillomaviruslar, polyomaviruslar ile benzer morfoloji, nükleik asit kompozisyonu ve transformasyon yeteneğine sahip olmalarından dolayı *Papovaviridae* ailesinde sınıflandırılmışlardır (15,16). Ancak yakın zamanda genom organizasyonları ve farklı replikasyon stratejileri göz önüne alınarak Uluslararası Virus Sınıflandırma Konseyi (International Council on Taxonomy of Viruses; ICTV) tarafından polyomaviruslar *Polyomaviridae*, papillomaviruslar ise *Papillomaviridae* ailesi içinde sınıflandırılmıştır (15). Papillomaviruslarda L1 açık okuma çerçevesi (Open Reading Frame; ORF) genomdaki en iyi korunmuş gen bölgesi olduğundan dolayı 15 seneyi aşkın bir süredir yeni tiplerinin izole edilmesinde kullanılmaktadır. Yeni bir HPV suşu tanımlanırken, tam genomu kopyalanmış ve bilinen HPV tiplerinin L1 ORF'sinin DNA dizilerinden %10'dan daha fazla farklılık içeriyorsa yeni bir tip, farklılık %2-10 arasında ise subtip, %2'den az ise varyant olarak adlandırılmaktadır (15,17). Her bir papillomavirus L1'in nükleotid dizi benzerliği ve infekte ettiği türe özgü olarak değerlendirilmesi ile birlikte 150'den fazla HPV ve 60 hayvan papillomavirusu tespit edilmiştir (18).

Uluslararası Virus Sınıflandırma Konseyi'nin 2012 verilerine göre *Papillomaviridae* ailesi insan ve hayvanları infekte eden 258 tipi içeren ve 30 cinse ayrılmış büyük bir ailedir (19). İnsanları infekte eden papillomaviruslar ise DNA dizi analizine dayanarak **alfa**, **beta**, **gama**, **mu** ve **nu** olmak üzere beş cinse ayrılmıştır. Alfa genusu mukozal ve kutanöz HPV tiplerini içermekte olup bu genusda bulunan düşük riskli mukozal tipler genital siğillere, yüksek riskli mukozal tipler servikal neoplazilere ve kansere neden olurken düşük riskli kutanöz HPV tipleri yaygın siğillere neden olmaktadır (18). Beta cinsi EV ile ilişkili tüm HPV tiplerini kapsar ve latent infeksiyonlara neden olmaktadır (18,20). Ancak immunsuprese hastalar veya bağışıklık sistemi baskılanmış bireylerde HPV, infeksiyon bölgesinde cilt kanserlerinin gelişmesine de neden olabilmektedir (18). **Gama** ve **mu** cinsleri kutanöz lezyonlara, **nu** cinsi de selim ve habis kutanöz lezyonlara neden olmaktadır (15).

Ayrıca genital HPV'ler serviks kanserine yol açma riskine göre de üç gruba ayrılmaktadır. Bunlar; **yüksek riskli** [HPV tip 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 59,

68, 73, 82], **olası yüksek riskli** [HPV tip 26, 53, 66] ve **düşük riskli** [HPV tip 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 ve CP6108] HPV tipleridir (21).



Şekil 2.1. HPV'nin filogenetik şeması (18).

2.3. HPV'nin Genomik Yapısı

Papillomaviruslar, küçük, zarfsız, ikozahedral simetrik, yaklaşık 50-55 nm çapında, 7900 baz çifti (bç) uzunluğunda sirküler çift sarmallı DNA viruslarıdır (22-24). Viral genom, protein yapıdaki 12 penton ve 60 hekzon olmak üzere toplam 72 adet kapsomerden oluşan ikozahedral simetriye sahip bir kapsid ile çevrilidir (24,25). Kapsid, majör ve minör olmak üzere iki yapısal proteinden oluşur. Majör kapsid proteini HPV cinsine özgü (bütün HPV tipleri için ortak) antijeniteye sahip olmakla birlikte virion ağırlığının %80'ini oluşturmaktadır (26).

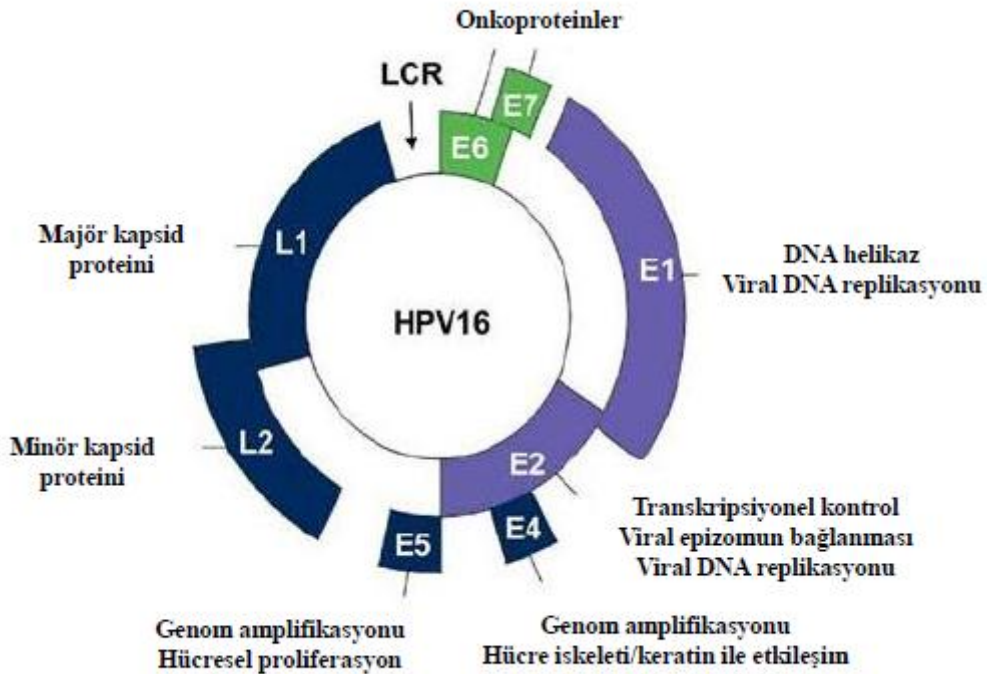
Viral genom ise virion ağırlığının %12'sini oluşturur ve viral proteinleri kodlayan bütün dizinler (ORF) tek bir DNA sarmalı üzerinde bulunur (24,27). Viral

genom iki poliadenilasyon (pA) bölgesi tarafından ayrılan üç büyük bölgeye bölünür (28,29).

Erken bölge (early; E): Viral replikasyon ve hücre transformasyonu için gerekli yapısal olmayan proteinleri (E1-E8) kodlayan bölgedir (24). HPV’de E3 ve E8 ORF’nin bilinen bir fonksiyonu olmadığı için toplam erken ORF sayısı altı olarak kabul edilmektedir (30) .

Geç bölge (late; L): L1 (majör kapsid proteini) ve L2 (minör kapsid proteini) proteinlerini kodlayan ve iki ORF bulunduran bölgedir (30).

Uzun kontrol bölgesi (long control region; LCR): Erken ve geç bölgenin arasında yer alan bu bölge, kodlama yapmayan bölge (noncoding region) veya üst regülatör bölge upper regulatory region; URR) olarak da adlandırılmaktadır. Viral genomun transkripsiyonu ve replikasyonunu için gerekli olan pek çok kontrol elemanlarını içerir (31). DNA replikasyon orijini, başlatıcı (promotör) ve hızlandırıcı (enhancer)’lar bu bölgede yer alır (27,30,32).



Şekil 2.2. HPV tip 16'nın genom yapısı (33).

2.4. HPV Proteinleri

2.4.1. Erken Bölge Proteinleri

2.4.1.1. E1 Proteini

E1 proteini viral DNA replikasyonundan sorumlu 70 kilodalton (kDa)'luk nükleer bir proteindir. E1 yapısal olarak karboksi (C) ucu helikaz/ATPase domaini, amino (N) ucu regülatör domaini ve merkezi orijin bağlanma domaini olmak üzere üç fonksiyonel bölgeye ayrılabilir (27,34). E1 proteini viral epizomun stabil durumda kalmasını sağlamaktadır. Düşük dizi spesifitesi ve düşük affiniteye sahip olan E1 proteininin viral replikasyon orijini (Ori)'ne bağlanma affinitesi E2 proteini ile artırılabilir (35). Böylece yüksek affinite ile deoksiribonükleik asit (DNA)'e bağlanan E1-E2 çift heksamer kompleksi şaperon proteinlerin yardımı ile DNA'yı etkili bir şekilde açmaktadır. Ayrıca E1, DNA polimeraz α -primaz topoizomeras ve DNA bağlayan protein RPA gibi hücrel replikasyon faktörleri ile etkileşime girerek viral DNA replikasyonunun başlamasında ve replikasyon çatalında helikaz aktivitesine bağlı olarak elongasyonda rol almaktadır (33).

E1, enzimatik aktiviteye sahip tek viral protein olduğundan dolayı yeni terapötik ajanların geliştirilmesinde ilgi çekici bir hedef haline gelmektedir (33,35).

2.4.1.2. E2 Proteini

E2 gen ürünü olan E2 proteini yaklaşık 45 kDa'luk bir nükleer proteindir (27). LR-HPV'lerde protein nükleusda bulunurken HR-HPV'lerde sitoplazmada da bulunmaktadır (23). HPV E2 proteini 200 aminoasit içeren transkripsiyonel aktivasyondan sorumlu bir amino domaini ve 100 aminoasit içeren DNA bağlayıcı bir karboksi termal domaini olmak üzere iki korunmuş domain içermektedir. Amino domaini LCR bölgesindeki spesifik palindromik DNA dizileri [AACCg(N4)cGGTT]

içeren E2 bağlanma bölgelerine (E2 Binding Site; E2BS) bağlanarak viral replikasyon ve transkripsiyonunun regülasyonunda önemli bir rol oynamaktadır. E1 tarafından kodlanan protein promotor bölgesine E2'nin bağlanmasını kolaylaştırmaktadır. Ayrıca viral genom replikasyonunda da etkin olan E2, spesifik olarak E1'i tanımakta ve Ori'ye E1'i çekerek E1-E2 kompleksinin oluşmasında da görev almaktadır (36,37).

E2'nin transkripsiyonda pozitif ve negatif etkileri bulunmaktadır. Erken promotor transkripsiyonunun regülasyonu, E2BS'nin LCR'deki konumuna bağlıdır. Genital HPV tiplerinde LCR'de E2BS dizileri çakışmaktadır. Bu gibi lokalizasyonlarda E2 bu bölgelere bağlanmakta ve hücrel transkripsiyon faktörleri TBF ve SP1'in bağlanmasını engelleyerek represör görevi görmektedir. Bunun aksine kutanöz HPV tiplerinde ise E2BS erken transkripsiyon başlangıç bölgesinden uzakta bulunduğundan dolayı E2, transkripsiyonel aktivatör olarak davranmaktadır (23). Farklılaşmış hücrelerde ise E2'nin transkripsiyonda baskılayıcı fonksiyonunu kaybetmesi sonucunda, E1-E2 protein seviyelerinde ve DNA amplifikasyonunda hızlı bir artış meydana gelmektedir (37).

Ayrıca E2'nin aşırı ekspresyonu sonucunda E6 ve E7'nin transkripsiyonunun baskılandığı ve apoptoza neden olduğu bildirilmiştir (23,35). E2 ekspresyonu erken dönemde keratinositlerde oldukça düşük miktarda bulunmakta ve apoptoza neden olmamaktadır. İlerleyen dönemlerde E2 ekspresyonunun artmasıyla E4'ün üretimi, E2'nin pro-apoptotik etkisini azaltabilmekte veya E2'nin pro-apoptotik etkisi keratinositlerin farklılaşmasına neden olan apoptozis ile çakışabilmektedir (35).

2.4.1.3. E4 Proteini

HPV E4 geni, E2 geni ile aynı bölgede lokalize olup infeksiyonun geç döneminde eksprese edilmektedir (38). E4 proteininin uç uca eklenmiş E1^{E4} transkriptlerinden eksprese edildiği düşünülmektedir (39). E4 ORF ile E1'in ilk beş aminoasidini kodlayan sekansların RNA tarafından biçimlendirilmesi ile oluşan E1^{E4} proteini bütün HPV proteinleri içinde en fazla eksprese edilen proteindir. E1^{E4} transkriptleri HPV'nin yaşam siklusu boyunca eksprese edilmesine rağmen en yüksek seviyede ekspresyonu differansiye suprabazal tabakada gerçekleşmektedir (37).

E1^{E4}'ün fonksiyonu hala açık olmamasına rağmen bazı çalışmalarda; viral amplifikasyon, suprabazal hücre differansiyonunun baskılanması ve bazal hücrelerdeki epizomal yapının korunması gibi çeşitli fonksiyonlara sahip olduğu belirtilmektedir.

Pamuk kuyruklu tavşan papillomavirus (Cottontail Rabbit Papillomavirus; CRPV) E1^{E4} proteini üzerine yapılan *in vivo* bir çalışmada E1^{E4}'ün viral genomik amplifikasyon ve L1 üretimi gibi etkin geç dönem viral fonksiyonlar için gerekli olduğu gösterilmiştir (39).

Ayrıca E4 proteini hücrel sitokeratinler ile etkileşime girerek HPV ile ilişkili morfolojik değişikliklerden sorumlu tutulmaktadır (40).

2.4.1.4. E5 Proteini

E5, HPV proteinleri içinde 83 aminoasit içeren en küçük onkoproteindir ve sadece alfa, beta, gamma ve delta cinsinde E5 ORF'si bulunmaktadır (31). Hidrofobik membran lokalizasyonu ve düşük seviyedeki ekspresyonu nedeniyle tespit edilmesi zordur. E5 proteini öncelikle endoplazmik retikulum (ER) lokalize olsa da golgi cisimciğinde ve nükleer membranda da tespit edilebilmektedir (23,31). E5'in epidermal büyüme faktör reseptörü (EGFR) ile kompleks oluşturması, "major histocompatibility complex" (MHC)/ İnsan Lökosit Antijeni (Human Leukocyte Antigen; HLA) sınıf I ekspresyonunu ve siklin bağımlı kinaz inhibitörleri (CDKIs) olan tümör supresör p21/p27'yi baskılaması çeşitli mekanizmaları, malign transformasyonun gelişmesine katkıda bulunmaktadır (31,38).

Ayrıca E5 proteini, apoptozis ile ilişkili öldürücü reseptörlerin ve apoptozisi indükleyen ER stresi inhibisyonu yoluyla apoptozisi engelleyerek HPV enfeksiyonunun erken döneminde rol almaktadır (23,31).

2.4.1.5. E6 Proteini

HPV tip 16 E6 proteini; 151 aminoasit içeren yaklaşık 18 kDa ağırlığında olan maligniteyi indüklemeye yeteneğine sahip bir onkoproteindir (41,42). Enzimatik

aktiviteye sahip olmayan E6 proteininin birçok aktivitesini, protein-protein etkileşimlerini tetiklediği düşünülmektedir (23). En sık E6 ile etkileşime giren protein E6 ilişkili Protein (E6-Associated Protein; E6AP) olarak bilinen E3 hücresel ubikuitin ligazdır (41,43). Ubikuitin kaskadının fonksiyonu, yok edilmesi planlanan proteine birden fazla ubikuitin monomerinin bağlanmasıyla proteozomal yıkım için proteinin hedeflenmesidir. Yani; E6, E6AP ve hedef protein bir kompleks oluşturmakta ve oluşan bu kompleks hedef proteinin önce ubikuitinasyonuna sonra da proteazom aracılı degradasyonuna neden olmaktadır. E6 proteinin temel hedeflerinden biri de tümör supresör protein olan p53'tür. p53, DNA'ya spesifik transkripsiyon faktörüdür ve genotoksik ve sitotoksik stres altında hücrede anahtar sinyal koordinatörlerinden biri olarak görev yapmaktadır (23).

E6 proteini, p53 inaktivasyonu ve apoptozisin bloke edilmesi olmak üzere iki yol ile apoptozisi engellemektedir. Apoptozisin bloke edilmesinde E6 proteini, intrinsik ve ekstrinsik olmak üzere iki adet temel apoptoz yolunu bozarak, stres altında hücrenin ölümünü engellemektedir (23). E6 kaynaklı apoptozisin engellenmesinde p53 inaktivasyonu ise, E6 proteini ile E6AP'nin oluşturduğu kompleksin p53'ün merkezine bağlanmasıyla gerçekleşmektedir ve hücrenin G1'den S fazına geçmesi sağlanmaktadır (44).

2.4.1.6. E7 Proteini

E7 proteini, yaklaşık 100 aminoasit içeren küçük asidik polipeptidlerdir ve N-ucunda CR1-CR2 olmak üzere 2 korunmuş bölgesi bulunmaktadır (23,45). E7 proteini, HPV'nin temel onkoproteinidir ve proteinin ekspresyonu düşük sıklıktaki primer epitel hücrelerin ölümsüzleştirilmesinde önemlidir (23). E7'nin temel hedefi Retinoblastom proteini (pRb) ve pRb'nin ilişkili olduğu p107 ve p130 proteinleridir (23,45). E7 proteini, HR HPV'lerde hem viral patogeneze hem de hücresel transformasyon için gereklidir (23).

E7 proteini, hücre ve viral tipe bağlı olarak sitokin bağımlı hücre ölümünü ve apoptozisi inhibe edebilmektedir. E7 proteininin apoptozisi inhibe etmesinin yanısıra çeşitli yollar ile apoptozisi indükleme yeteneği de vardır. Bu yollar ;

- E7 proteininin CD2 bölgesinde bulunan Leu-X-Cys-X-Glu (LXCXE) motifinin pRb'ye bağlanmasıyla, NIH3T3 hücrelerinde apoptozisin aktive edilmesi (HR-HPV E7 proteinin bağlanma yeteneği LR HPV E7 proteinine göre 10 kat daha fazladır).
- p21 ile kompleks oluşturarak U2OS hücrelerinde bulunan apoptotik mediatör olan katepsin B'nin aktive edilmesi.
- Primer insan keratinositlerinde apoptozise neden olan TRAIL ve TNF- α 'nın aktive edilmesi.
- E2F1 ile kompleks oluşturarak, E2F1'nin transkripsiyonuna bağlı olarak apoptozisi indüklemesi (23).

2.4.2. Geç Bölge L1 ve L2 Proteinleri

Viral DNA'nın geç bölgesi sırasıyla majör ve minör kapsid proteinleri kodlayan L1 ve L2 genlerini içermektedir (46). İkozahedral simetrik kapsid L1 major proteininin 360 kopyasını ve L2 minör proteinini içermektedir (47,48). L2, kapsid oluşumu için gerekli değilken, viral enfeksiyon giriş yolunda önemli roller üstlenmektedir (47). L2 proteini hücrel yüzey proteinine bağlanarak virusun infekte hücrenin sitoplazmasından nükleusa geçişini sağlar (49). Virusa antijenik özellik sağlayan L1 major kapsid proteini ise virus yüzeyindeki proteinlerin %90'ını oluşturmaktadır ve hafif-orta displazilerde, nadiren de şiddetli displazilerde tespit edilebilmektedir (48). L1 proteini $\alpha 6\beta 4$ integrin, heparan sülfat ve glikozaminoglikan dahil olmak üzere üç farklı yüzey reseptörüne bağlanarak hücreye girişte etkin rol oynamaktadır (49).

2.5. Patogenez

Papillomaviruslar deri ve mukoz membranların skuamöz hücrelerini infekte ederek proliferasyona yol açarlar (17,50). Papillomaviruslar tarafından enfeksiyon oluşması için virus partiküllerinin derideki epitel hücrelerinin bazal tabakasına ulaşması ve bölünen bazal hücrelere girişi gerekmektedir (51). Yapılan deneysel çalışmalarda

virusun bazal tabakaya bağlanmasında heparin sülfat proteoglikanlarının etkili olduğu gösterilmiştir. İlk bağlanmadan sonra virusun stabilize edilmesi ve daha sonra nükleusa viral genomun transfer edilmesi amacıyla bazal keratinositlerde ikincil bir reseptöre bağlanmak için virion kapsitinde yapısal değişiklikler meydana gelmektedir. Bu süreçten $\alpha\beta4$ integrin ve büyüme reseptörlerinin sorumlu tutulmasına karşın giriş reseptörleri kesin değildir (18). L2 proteini-DNA kompleksi viral genomun nükleusa doğru girişini sağlarken L1 proteini endozomda korunmakta ve sonunda lizozomal degradasyona maruz kalmaktadır. Konak hücreye girişi takiben genom amplifikasyonu meydana gelmektedir. O zamana kadar viral epizom düşük kopya sayısında tutulmaktadır (52). Servikal lezyonlardan elde edilen epizomal hücre dizi çalışmaları baz alındığında, malign lezyonların bazal tabakalardaki kopya sayısının hücre başına $200 \geq$ olduğu tespit edilmiştir. Benign lezyonlarda ise kopya sayısının hücre başına 50-100 kopya arasında olduğu tespit edilmiştir (18).

İnfeksiyon viral genomun bazal tabakadaki hücrelerde stabil epizom olarak yerleşmesine sebep olmaktadır ve bunun için E1 ve E2 viral genom proteinlerinin ekspresyonuna ihtiyaç duyulmaktadır. E1 proteini viral DNA replikasyonunda, E2 proteini ise replikasyonun yanı sıra transkripsiyon kontrolünde de görev almaktadır. E2 proteini viral genomun LCR bölgesindeki palindromik motif (AACCg(N4)CGGTT) içeren E2BS'ye bağlanarak, E1 helikazın viral orijine çekilmesini sağlamaktadır. Böylece E1 ve E2 kompleks oluşturarak LCR'deki replikasyon orijinine bağlanmakta ve DNA replikasyonunu başlatmaktadır (17,36). E1 proteininin helikaz aktivitesi bulunmaktadır. E1'in helikaz aktivitesinin hücresel replikasyon helikazlarından farklı olduğu ileri sürülmüştür. Genom replikasyonu sırasında, hücresel DNA replikasyonundan bağlantısını keserek viral DNA replikasyonuna izin verdiği öne sürülmüştür. Genomdaki viral ve hücresel helikazların rolü açıklık kazanmamasına rağmen yapılan bazı çalışmalarda bazal hücre bölünmesi sırasında genom bölünmesinin düzgün bir şekilde düzenlenmesinde E2'nin rol aldığı öne sürülmüştür (18).

E2 proteininin aşırı ekspresyonu E6 ve E7 proteinlerinin transkripsiyonunu baskılamaktadır. E6 ve E7 proteinleri hücrenin transformasyonundan sorumlu olan proteinlerdir (23,51). Hücrelerin transforme olabilmeleri için viral DNA'nın konak hücre genomuna integre olması gerekmektedir. HR-HPV tiplerinin DNA'sı konak hücre genomuna integre olurken, LR-HPV tiplerinin DNA'sı konak hücre nükleusunda

ekstrakromozomal epizom olarak bulunmaktadır (16). E2 proteininin konak hücre genomuna integrasyonu sırasında yapısında meydana gelen değişiklikler E6 ve E7 proteinlerinin aktive olmasına neden olmaktadır (23).

E6 ve E7, tümör supresör protein olan p53 ve retinoblastom (Rb)'un fonksiyonlarının inaktivasyonundan sorumlu proteinlerdir. E6 proteini, genomda herhangi bir zedelenme durumunda hücre siklusunu durdurma ve apoptozisi indüklemeye görevi olan tümör supressör protein p53'ün fonksiyonunu inhibe etmektedir. E6 proteini, hücresel protein ubikuitin ligaz E6AP ile birleşerek oluşturduğu kompleks, p53 proteininin ubikuitin yoluyla 26S proteazom içinde yıkımını gerçekleştirmektedir. E7 proteini ise diğer tümör supresör protein Rb'nin fonksiyonunu inaktive etmektedir. Normal hücrelerde aktif formda bulunan Rb'nin hücre siklusunda G1'den S'ye geçişte baskılayıcı görevi bulunmaktadır. Bunu, E2F'in hücrenin S fazına girmesinden sorumlu genlerin promotorlarına bağlanmasını engelleyerek gerçekleştirmektedir. Fakat E7 proteini, pRb'e bağlanınca serbest kalan E2F transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu ile hücrenin S fazına girmesine neden olmaktadır (17,52). LR-E7 proteinleri, pRb ailesi üyelerinden p105 ve p107'ye HR-E7 proteinlerine oranla daha düşük affinite göstermektedir (18).

Viral genom, epitel hücrelerin bazal tabakasında, hücre başına 10-200 kopya civarında olacak şekilde replikasyonunu ve düşük düzeyde erken proteinlerin (E1, E2, E6 ve E7) ekspresyonunu devam ettirerek varlığını sürdürmektedir. Bazal tabakadan ayrılan hücreler, epitelin yüzeyine doğru ilerledikçe farklılaşmaktadır (18). Suprabazal bölgede E1, E2, E4 ve E5 proteinlerinin yüksek seviyede sentez edilmesi ile viral genom sayısında artış meydana gelmektedir (17,18). Daha sonra epitelin üst katmanlarında viral kapsid proteinlerinden L1 genomun paketlenmesi için, minör kapsid proteini olan L2 ise hücre döngüsünden hücrenin çıkması için eksprese edilmektedir. Daha sonra nükleusta paketlenme işleminin ardından epidermisin yüzeyinden virus yüklü keratinositlerin dökülmesiyle virus salınımı gerçekleşmektedir (18).

2.6. Klinik Sendromlar

HPV, farklı vücut bölgelerindeki epitel hücrelere tropizm gösteren küçük DNA virusudur. Moleküler farklılıklar baz alınarak tanımlanmış 150'den fazla HPV tipinin

özelliklerinden biri de patojenitedeki çarpıcı farklılıklarıdır. Vücudun farklı kutanöz ve mukozal yüzeylerinde farklı klinik tablolar meydana getirebilmektedirler (53) (Çizelge 2.1). LR-HPV tipleri genellikle benign siğillere neden olurken HR-HPV tipleri malign hastalıklar ile ilişkilidir. LR mukozal HPV tiplerinden HPV tip 6 ve 11 genital siğillerin %90'ına ve genellikle tekrarlayan solunum papillomlarına neden olmaktadır. HR mukozal HPV tipinden en önemlileri olan HPV tip 16 ve 18 ise servikal kanser vakalarının %70'inden fazlasında tespit edilmektedir (54).

Çizelge 2.1. HPV ile ilişkili önemli klinik tablolar (55-57).

Kutanöz infeksiyonlar	HPV tipi
Verruka plantaris	1, 4, 49, 60, 63
Verruka vulgaris	1, 4, 26, 28, 57
Verruka plana	3, 10, 20, 21, 27
Epidermodisplazia verrusiformis (benign)	19, 22, 23, 24, 25, 46, 47
Skuamöz hücreli kanser	41, 48
Mukozal infeksiyonlar	
Laringeal papilloma	6, 11
Laringeal karsinoma	30
Oral papilloma	6, 7, 11, 32, 34, 55, 59, 69, 72, 73
Konjunktival papilloma	11
Oral fokal epitelial hiperplazi	13, 32
Dudakta verruka	2, 57
Özofagiyal papilloma	45
Özofagiyal skuamöz hücreli karsinom	73
Anogenital infeksiyonlar	
Kondiloma aküminata	6, 11, 70
Ekzofitik kondiloma	6, 11
Flat kondiloma	6, 11, 16, 18, 31, 54, 70
Bowenoid papülozis	16, 34, 55
Giant kondilom	6, 11
Düşük dereceli intraepitelyal neoplazi	6, 11, 30, 40, 42, 43, 44, 54, 62, 66, 67, 68, 74, 75
Orta dereceli intraepitelyal neoplazi	31, 33, 35, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 65, 66
Yüksek dereceli intraepitelyal neoplazi	16, 18
Servikal karsinoma	16, 18, 31
Vulval karsinoma	6, 11, 16, 61, 62, 64, 67, 68, 70
Vajinal karsinoma	16, 18, 74
Anogenital keratotik lezyon	4, 60, 63, 65, 67

2.6.1. Kutanöz İnfeksiyonlar

2.6.1.1. Deri ile İlişkili İnfeksiyonlar

Deri siğilleri vücudun herhangi bir yerinde olabileceği gibi en sık olarak ellerde ve ayaklarda görülmektedir (58). Deri infeksiyonlarına genellikle alfa genusunda bulunan HPV tip 2, 7, 27, 57; gama genusunda bulunan HPV tip 4, 65 ve mu genusunda bulunan HPV tip 1 neden olmaktadır (59). Deri siğillerine herhangi bir yaşta yakalanma oranı %10 iken, okul çağındaki çocuklarda bu oran %3-20 arasında artmakta ve ergenlik döneminde ise en yüksek seviyeye ulaşmaktadır (60).

Deri abrazyonu (çizilmesi) gibi epitelin küçük travmaya maruz kalması bazal hücrelerin virus ile karşılaşmasını kolaylaştıracağından dolayı infeksiyon riskini artırmaktadır (57). İnfeksiyonun başlaması ile birlikte görülmeye başlayan lezyonlar otoinokulasyon ile bulaşmaktadır. İnfeksiyon birkaç ay içinde gelişme gösterebilir ve kişinin immün durumuna bağlı olarak kendiliğinden sona ermesi birkaç yıl içerisinde gerçekleşebilmektedir (61).

Yaygın siğillere (*Verruca vulgaris*) genellikle HPV tip 1, 2 ve 4 neden olurken immün sistemi baskılanmış bireylerde HPV tip 75 ve 77 de tespit edilebilmektedir. Klinik lezyonlar karakteristik olarak elde, özellikle parmaklarda, küçük kubbe biçimli papüller şeklinde görülmektedir. Bazen lezyonlar dirsek, diz ve yüz gibi farklı bölgelerde de yerleşim gösterebilmektedir (58). Ayrıca kasaplar ve et ile ilgili işlerle uğraşan kişiler el siğilleri açısından daha yüksek riske sahiptir ve bu infeksiyon genellikle HPV tip 7 ile ilişkilidir (61).

Plantar siğiller (*Verruca plantaris*) sadece ayak tabanında meydana gelmekte ve genellikle çocuklarda görülmektedir. Bunun gibi siğiller genellikle HPV tip 1 ve 4, daha az olarak da HPV tip 57, 60, 63, 65 ve 66 ile ilişkilidir. Lezyonlar deri yüzeyinden tabanın içine doğru ilerlediklerinden dolayı ağrılıdır (58).

Düz siğiller (*Verruca planta*) çoğunlukla yüzde, elin sırtında ve bacakta düzgün yüzeyli papüller içeren gruplar halinde görülmektedir. Papüller genellikle deri ile aynı renktedir, fakat nadiren açık kahverengi görülebilmektedir. Genellikle çocuklarda

görülen bu siğillere en çok HPV tip 3 ve 10, bazen de HPV tip 26, 29 ve 41 neden olmaktadır (58).

Epidermodisplazia verrusiformis, 1922 yılında Lewandosky ve Lutz tarafından tanımlanan bir genodermatozudur (8,62,63). Vakaların çoğunda kalıtım, otozomal resesiftir fakat bazı vakalarda otozomal dominant kalıtım ve sporadik mutasyonlar rapor edilmiştir (58,63). Vakaların %75'inde, homozigot çerçeve kayması veya kromozom 17'nin uzun koluna lokalize olmuş EVER1 ve EVER2 genlerinin bir tanesinin splice bölgesinde meydana gelen bir mutasyon görülmektedir (58,62,63). Son zamanlarda EV sendromu hücrel immün sistem bozukluğuna sahip hastalarda gözlemlenmiştir. Ayrıca HIV ile infeksiyon, organ nakli, Hodgkin hastalığı, sistemik lupus eritematosus, immünglobulin M eksikliği gibi nedenler ile bağışıklık sisteminin baskılandığı hastalarda da görülmektedir. EV'nin neden olduğu polimorfik kutanöz lezyonlar genellikle kırmızı-kahverengi pitriyazis versikolor benzeri maküller ve düz siğil benzeri papüller şeklinde çocukluk çağında gövdede, boyunda, kollarda ve yüzde görülmektedir (63). EV ile ilişkili HPV tipleri β genusunda bulunan HPV tip 3, 5, 8, 9, 10, 12, 14, 15, 17, 19, 25, 36, 38, 47 ve 50'dir. Bazı durumlarda EV ile ilişkili olarak hastaların %30-70'inde non-melanom cilt kanserleri gelişebilmektedir. Kansere en çok sebep olan HPV tipleri 5 ve 8'dir (62, 65).

2.6.2. Mukozal İnfeksiyonlar

2.6.2.1. Oral Kavite İnfeksiyonları ve Respiratuvar Papillomlar

Oral papillomalar her yaş grubunda görülebilen benign tümörlerdir (65). Yüzeyleri düzensiz papiller şeklindeki bu solid tümörler cerrahi müdahale sonrası nadiren tekrar oluşabilmektedir (56). Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, oral kavitede görülen benign lezyonlara HPV tip 1, 2, 3, 4, 6, 7, 10, 11, 13, 16, 18, 30, 31, 32, 33, 35, 45, 52, 55, 57, 59, 69, 72 ve 73'ün neden olduğu gösterilmiştir (66).

Tekrarlayıcı respiratuvar papillomlar, solunum yolundaki tekli ve çoklu benign tümörler ile karakterize iyi huylu bir hastalık olmasına rağmen solunum yolu

tıkanmasına neden olduğu için tehlikelidir. Çocuklarda (özellikle 10 yaş) ilerleyici ses kısıklığı ve üst solunum yolu obstrüksiyonunun genel nedenidir. İnfeksiyon laringeal boşluğun tüm bölgelerine yayılma eğiliminde olup HPV tip 6 ve 11'in neden olduğu tespit edilmiştir (67,68).

2.6.3. Anogenital İnfeksiyonlar

2.6.3.1. Anogenital Siğiller

Dünyada cinsel yolla bulaşan viral infeksiyonlar arasında en sık görülen anogenital HPV'ler malign kanserlere veya anogenital siğilleri de içeren benign deri ve mukoza tümörlerine neden olabilmektedir. Anogenital siğiller; vulva, perianal bölge, vajina, serviks, penis, anus, skrotum ve üretrada tekli veya çoklu papüller şeklinde görülmektedir. Klinik belirtileri kaşıntı, yanma, kanama ve vajinal akıntıdır. Anogenital siğillerin kondiloma aküminata (sivri siğil), düz/maküler lezyonlar, papüler ve keratotik lezyonlar olmak üzere dört ayrı şekilde tarif yapılmıştır (69). Genital siğil vakalarının %90'ından HPV tip 6 ve 11 sorumludur (70,71). Anogenital siğiller oldukça bulaşıcıdır ve infekte bir partner ile birlikte olan bireylerin yaklaşık %65'inde kuluçka süresi 3 hafta ile 8 ay arasında değişmektedir. Son zamanlarda yapılan çalışmalara göre HPV tip 6 ve 11'in neden olduğu anogenital siğiller erkeklerde 11-12 ay, genç bayanlarda ise 5-6 ay içinde gelişmektedir. Nadir durumlarda Buschke-Lowenstein tümörü olarak adlandırılan malign lezyonlarla da ilişkili olabilmektedir (69).

Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri (The Centers for Disease Control and Prevention; CDC) anogenital siğiller ile infeksiyon riskinin azaltılmasına yönelik kondom kullanılmasını, seksüel davranışta cinsel partner sayısının sınırlandırılmasını ve hem kadınlarda hem de erkeklerde HPV tip 6 ve 11'e karşı yüksek profilaktik etki gösteren lisanslı profilaktik aşının kullanımını önermektedir (69).

2.6.3.2. HPV ve Kanser

2.6.3.2.1. Servikal Kanser

Servikal kanser cinsel yolla bulaşan bir hastalıktır. Dünyada invaziv servikal kanser vakalarının %99'una HPV neden olmaktadır ve vakaların %70'inde HPV tip 16 ve 18 tespit edilmektedir (72-74). Fakat servikal kanserin gelişmesinde kanserojenik HPV tiplerinin (HPV tip 16 veya 18) yanısıra çeşitli kofaktörler de etkilidir (75).

Servikal kanser ektoserviksin skuamöz epiteli ile endoserviksin kolumnar epiteli arasında bulunan servikal transformasyon zonunda oluşur ve HPV infeksiyonu transformasyon zonunda benign ve malign lezyonlara neden olur (76,77).

İnvaziv servikal kanser gelişmeden önce hücrel maturasyonda, tabakalaşmada ve nükleer atipide meydana gelen bozukluklar ile karakterize prekürsör lezyonlar oluşmaktadır. Bu lezyonlar histolojik olarak servikal intraepitelyal neoplazi (CIN) ve sitolojik olarak Bethesda terminolojisine göre skuamöz intraepitelyal lezyonlar (SIL) olarak sınıflandırılmaktadır (78). **CIN sınıflandırmasında** lezyonların histolojik tanısı; hafif, orta dereceli, şiddetli displazi olmak üzere sırasıyla birden üçe kadar derecelendirilmiştir (79).

Servikal ve vajinal sitolojinin tanısında kullanılan **Bethesda** terminolojisi ise 1988 yılında tanıtılmış ve 1991 yılında revize edilmiştir. 2001 yılına kadar yaygın bir şekilde kullanılan bu sınıflama, 2001 yılında en son şeklini almıştır (80). Bethesda sisteminde, premalign skuamöz lezyonlar üç kategoriye ayrılmıştır (79).

a. Atipik skuamöz intraepitelyal lezyonlar (ASC)

- Önemi belirgin olmayan atipik skuamöz hücreler (ASCUS)
- Gözardı edilemeyen-yüksek dereceli skuamöz intraepitelyal lezyonlar (HSIL) (ASC-H)

b. Düşük dereceli skuamöz intraepitelyal lezyonlar (LSIL)

- Kapsamı: HPV, hafif displazi ve CIN I

c. Yüksek dereceli skuamöz intraepitelyal lezyonlar

- Kapsamı: Orta ve şiddetli displazi, in-situ karsinoma, CIN II ve CIN III (79,80)

Prekürsör lezyonların servikal kansere ilerlemesi 10 ile 20 yıl arasında değişen uzun bir sürede gerçekleştiği için PAP test, asetik asit, Lugol'un iyodini ve HPV DNA testleri gibi çeşitli tarama yöntemleri ile önlenmektedir (81).

2.6.3.2.2. Anal Kanser

Gastrointestinal sistem (GIS) tümörlerinin yaklaşık %1'ini ve anorektal tümörlerin %5'inden daha az bir oranını oluşturan skuamöz hücreli anal kanser (SHAK) nadir olarak görülmektedir. Geçmişte SHAK'ın sıklıkla ileri yaşlardaki kadınlarda tespit edilen ve kronik iritasyonda yavaş seyirli bir hastalık olduğuna inanılmaktaydı. Son yıllarda yapılan çalışmalarda ise onkojenik HPV tipleri invaziv SHAK'ların %90'nından fazlasında tespit edilmiş ve düşük/yüksek dereceli premalign anal intraepitelyal neoplazmların gelişimiyle ilişkili olduğu bulunmuştur (82). Ayrıca yapılan çalışmalarda, SHAK insidansının giderek arttığını ve HPV tip 16/18'in anal ve servikal kanseri içeren maligniteler ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (82-84).

Güncel çalışmalar HIV enfeksiyonunun, anal ilişkinin, servikal displazi veya kanserin, immünyüpresyonun, inflamatuvar bağırsak hastalıklarının ve sigaranın risk faktörleri arasında olduğunu göstermektedir (82,85). Şu anda, SHAK vakalarının en az yarısını erkekler ile ilişkiye giren 40-60 yaş aralığındaki HIV pozitif erkek bireyler oluşturmaktadır (82).

2.6.3.2.3. Vulvar, Vajinal ve Penis Kanseri

Vulva ve penisteki verrüköz karsinomlar, persistan genital siğillerden nadir de olsa gelişebilmektedir. Bunlar HPV tip 6 veya 11'i içermektedir. Geçmiş yıllarda yapılan çalışmalarda dış genital bölgede kanserin prekürsör lezyonu olan Bowenoid papülozunda HPV tip 16 tespit edilmiştir (8). Günümüzde de vulvar skuamöz hücreli karsinomlar 50 yaş ve altı kadınlarda sıklıkla görülmekte olup HPV DNA saptanan vakaların %85'inde meydana gelen lezyonlardan ilk sırada HPV tip 16, ikinci sırada ise HPV tip 33'ün ve penil karsinomlarının %30-50'sinde HPV tip 16'nın sorumlu olduğu

bilinmektedir (8,75). Genelde HPV pozitif vulva ve penil karsinomların prognozu HPV DNA içermeyenlerden daha iyi olmaktadır (8). Penil ve vulva kanserlerinin %60-90'ında, vajinal kanserlerin %64-91'inde HPV DNA saptanmaktadır. Vulvar, vajinal ve penis kanserlerinde en yaygın olarak HPV tip 16 tespit edilirken bunu HPV tip 18, 31 ve 33 takip etmektedir (75).

2.6.3.2.4. Baş ve Boyun Kanseri

Baş ve boyun skuamöz hücreli karsinom (BBSHK) oral kavite, nazofarenks, orofarenks, larenks ve hipofarenkste görülmektedir. Dünyada BBSHK biyopsilerinin %23-35'inin HPV ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Vakaların %45-90'ında dilde veya dil tabanında HPV tespit edilirken oral kavitede ve larenkste bu oranın daha düşük olduğu bulunmuştur. HPV pozitif olan hastalarda BBSHK'nın %68-87'si HPV tip 16 ile ilişkili olmakla birlikte HPV tip 18, 31, 33, 35, 45, 51, 52, 56, 58, 59 ve 68 daha düşük oranlarda bulunabilmektedir. Dünyada malign hastalıklar arasında altıncı sırada yer alan BBSHK'da başlıca risk faktörleri alkol tüketimi ve sigara kullanımıdır (3).

2.7. Epidemiyoloji

Günümüzde HPV dünya çapında cinsel yolla bulaşan infeksiyonlardan biridir (3). Seksüel olarak aktif yetişkinlerin yaklaşık %70'nin yaşamları boyunca HPV ile infekte olduğu tahmin edilmektedir. Cinsel aktivitenin başlangıcından kısa bir süre sonra 25 yaşın altındaki kadınlarda HPV infeksiyonu en yüksek oranda görülmektedir ve yaklaşık 45'li yaşlarda ise ikinci bir pik meydana gelmektedir (75). HPV sentinel sürveyans projesinde 14-19 yaş aralığındaki kadınların %35'nin, 20-29 yaş aralığındaki kadınların %29'unun HR-HPV ile infekte olduğu tespit edilmiştir (86).

HPV infeksiyonları genellikle asemptomatiktir ve bunların %90'ında virus bir iki yıl içinde temizlenmektedir. Geriye kalan %10'unda ise infeksiyon persistan hale gelmekte ve kanser gelişme riski artmaktadır (3). HPV tipleri onkojenik potansiyellerine ve servikal kanser ile ilişkilerine göre HR ve LR olarak gruplandırılmışlardır (3,75). LR-

HPV tipleri benign epitel hiperproliferasiyondan sorumlu iken HR-HPV tipleri premalign lezyonlar ve invaziv skuamöz hücreli karsinom ile ilişkilidir (66). Örneğin; anogenital siğillerin %90'nına LR-HPV tiplerinden HPV tip 6 ve 11 neden olurken, anal kanserlerin %90'nına, vulvar, vajinal veya penil kanserlerinin %40'ına, oral ve farenks kanserinin %12'sine HR-HPV tipleri neden olmaktadır (87).

Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (Agency for Research on Cancer; IARC)'nın 10.058 servikal kanserli kadının dahil edildiği 85 çalışmanın verilerine göre yaptığı meta analiz çalışmasında servikal kansere en sık neden olan HPV tiplerinin sırasıyla HPV tip 16, 18, 45, 31, 33, 58, 52, 35, 59, 56, 6, 51, 68, 39, 82, 73, 66 ve 70 olduğu tespit edilmiştir. Vakaların üçte ikisinin HPV tip 16 (%51) ve 18 (%16,2) ile infekte olduğunu bildirilmiştir (88).

Yakın zamanda normal sitolojiye sahip 150.000'den fazla kadında yapılan bir meta analiz çalışmasında global HPV infeksiyon prevalansı %10,4 bulunmuştur (Amerika'da %13, Afrika'da %22, Avrupa ve Asya'da %8) (75).

Viral DNA; prekürsör veya CIN II, CIN III lezyonların %70-90'nında, CIN I lezyonların %20-50'sinde, ASCUS ve önemi belirgin olmayan atipik glandüler hücrelerin (AGUS) neden olduğu lezyonların %50'sinde tespit edilmektedir. (89).

2.8. Tanı

2.8.1. Morfolojik Tanı

HPV infeksiyonlarının muhtemel tanısı mikroskobik olarak koikilositozun gösterilmesi ile konabilmektedir. Servikovajinal hücrelerde tarama amacıyla karakteristik sitolojik değişiklikleri gösteren Papanicolaou boyası kullanılmaktadır (56). Pap smear olarak adlandırılan bu yöntemin duyarlılığı %53-55,4, özgüllüğü %96,3-96,8'dir ve kesin tanı için immünolojik yöntemler veya nükleik asit tanı yöntemleri kullanılmalıdır (56,90).

2.8.2. Viral Proteinlerin Saptanması

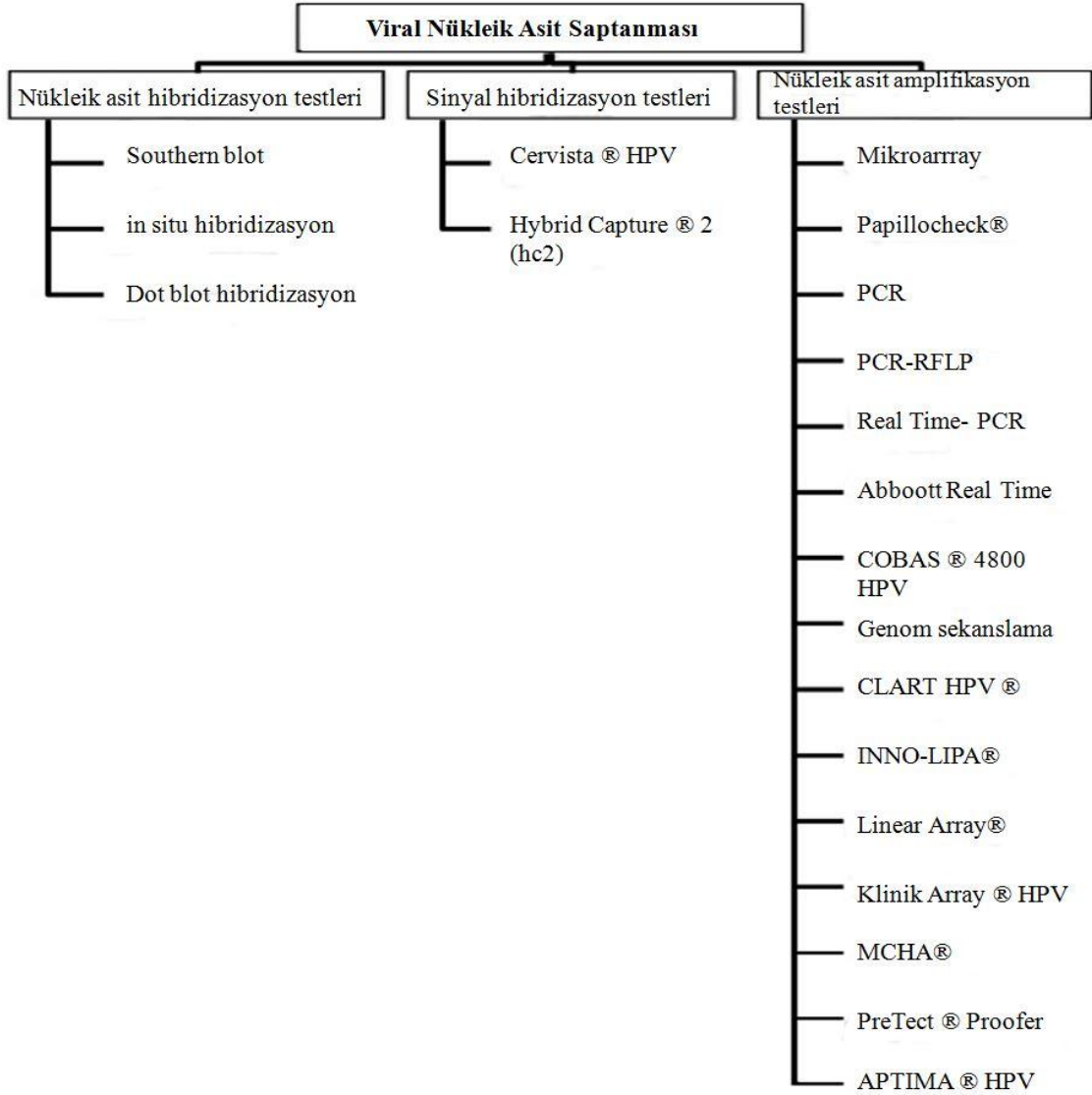
Papillomavirus kapsid antijenleri, doku kesitleri ve sürüntü örneklerinde HPV geç proteinleri ile çapraz reaksiyon veren Bovine papillomavirus (BPV)'unun geç proteinlerine karşı oluşturulan antikorların kullanılmasıyla tespit edilebilmektedir (56,91). Bu testler, prodüktif infeksiyonu saptamada viral partiküllerin elektron mikroskopik incelenmesinden daha duyarlıdır (56). Fakat HPV tiplerinin ayrımının yapılamamasından dolayı HPV infeksiyon riskinin belirlenmesinde düşük duyarlılığa sahiptir (91). Antiserum bütün HPV tipleri ile çapraz reaksiyon verdiği için pozitif sonuçlar HPV tipini göstermezken negatif sonuçlar da HPV infeksiyonunu ekarte ettirmemektedir. Çünkü histolojik olarak verruka tanısı almış örneklerde kapsid antijeni aynı oranda eksprese edilmemektedir (56).

HPV erken proteinlerinin tespit edilmesi ise HPV pozitif lezyonlardan elde edilen doku veya hücredeki düşük ekspresyon seviyesinden dolayı zordur. HPV proteinlerinin saptanmasında E6 veya E7 proteinlerine karşı oluşturulan antikorlar kullanılabilir. Ancak immunohistokimya yöntemi ile hücre veya dokularda, western blot yöntemi ile protein ekstratlarında antikorların doğrudan görüntülenmesini içeren testlerin kullanımı in-vitro deneyler ile sınırlıdır (91).

2.8.3. Viral Nükleik Asit Saptanması

Geçirilmiş veya geçirilmekte olan HPV infeksiyonunun ayırıcı tanısında güvenilir bir serolojik test olmaması ve virus izolasyonunun yapılamaması nedeni ile kesin tanı HPV DNA'sının örnekte gösterilmesine dayanmaktadır. HPV infeksiyonun tanısında kullanılan moleküler tanı testleri üç grupta incelenebilir (92).

Çizelge 2.2. Viral nükleik asit saptanmasında kullanılan yöntemler (92).



2.8.3.1. Nükleik Asit Hibridizasyon Yöntemi

Servikal örneklerden HPV enfeksiyonunun tespitinde ilk olarak Southern blot, in situ ve dot-blot hibridizasyon gibi radyoaktif hibridizasyon yöntemleri kullanılmıştır. Bu direkt- prob yaklaşımlarının yüksek kalitede bilgi sağlanmasına rağmen bir takım dezavantajları vardır. Bunlar (93);

- Düşük duyarlılığa sahip olması
- Fazla miktarda şaflştırılmış DNA'ya ihtiyaç duyulması
- Zaman alıcı prosedürlere sahip olması

2.8.3.1.1. Southern blot Hibridizasyon

Bu yöntemde öncelikle çalışılan genomik DNA'nın izolasyonu ve restriksiyon enzimleri tarafından kesimi gerçekleştirilmektedir. Elde edilen DNA parçaları, agaroz jelde DNA uzunluklarına göre ayrılmaktadır. Daha sonra jeldeki DNA'lar nitrosellüloz veya naylon membrana aktarılmakta ve özgül DNA dizilimlerinin yeri izotopik (P^{23}) veya nonizotopik tekniklerle işaretlenmiş genomik HPV problemleri kullanılarak belirlenmektedir. Uzun yıllar altın standart bir test olan bu yöntem, epizomal ve integre DNA'nın ayrımını sağlayabilmekte ve hücre başına bir virus kopyasını bile tespit edebilmektedir (94,95). Fakat klinik kullanım için pratik değildir. Teorik olarak bu yöntem yüksek bir özgüllüğe sahip olmasına karşın polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)'ndan daha düşük duyarlılığa sahiptir (94).

2.8.3.1.2. In-situ Hibridizasyon

HPV ile ilişkili hastalıkların biyolojisini aydınlatmak için kullanılan bu yöntem oldukça zaman alıcı prosedüre sahiptir. Fakat bu hassas yöntemin kullanılmasıyla lezyonlardaki infekte hücrelerde HPV'nin lokalizasyonunu göstermek mümkündür. The Ventana INFORM HPV test (Ventana, Tucson, A.B.D) mevcut olan tek ticari testtir. Bu test hedeflenen HPV DNA'nın direkt görüntülenmesine olanak sağlamaktadır. Biyopsilerde tespit edilen HR lezyonlar için doğrulama prosedürüne ihtiyaç olabilmektedir ve bu yöntem histolojik kullanım için doğrulayıcı bir test olarak özgüllük göstermektedir (92).

2.8.3.1.3. Dot-blot Hibridizasyon

Bu yöntemde, Southern blot yöntemine göre daha kolay bir laboratuvar yöntemi olarak kabul edilmektedir, ancak düşük duyarlılığa sahiptir. Çalışma prensibi Southern blot yöntemine benzer, fakat elde edilen HPV DNA'nın elektroforezi yapılmadan destek membrana damlatılması ve bu membranda sabitlendikten sonra özgül dizilerin

belirlenmesi sağlanır. Fazla miktarda DNA ile çalışılması gerekmektedir. Günümüzde Virarap® ve Viratype® olmak üzere iki ticari test mevcuttur (65).

2.8.3.2. Sinyal Amplifikasyon Testleri

Günümüzde HPV tanısı için Hybrid Capture II (HCII) (Digene, Gaithersburg, Md.) ve Cervista® HPV HR Test (Hologic, Inc., Marlborough, MA, A.B.D) olmak üzere Gıda ve İlaç Yönetimi (Food and Drug Administration; FDA) tarafından onay almış iki test mevcuttur (96).

2003 yılından FDA'dan Qiagen Standard Transport Media (STM) ve ThinPrep Pap Test PreservCyt Solution (Hologic, Marlborough, A.B.DS) ile birlikte kullanılmak üzere onay almış HCII testi solüsyon bazlı hibridizasyona dayanan sinyal amplifikasyon yöntemidir (97). Bu yöntemde 13 HR (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 ve 68) ve beş LR (6, 11, 42-44) HPV tipi tespit edilebilmektedir (96-99). Son yıllarda en çok PZR ve solüsyon hibridizasyon yöntemleri tercih edilmektedir. Solüsyon hibridizasyon yöntemi olan HC sistemi ikinci kuşak HPV tespit tekniklerindedir. Bu yöntemle 0,1 pgr kadar düşük HPV DNA'sı saptanabilmektedir. Yöntemde öncelikle HPV DNA'sının multipl oligonükleotid RNA prob karışımları ile spesifik HPV genomu solüsyon içinde hibridize edilmektedir. Daha sonra oluşan spesifik DNA-RNA hibridleri alkalın fosfataz ile işaretli antikorlar tarafından tanınmaktadır. Hibridler luminometre tarafından ölçülmek üzere bir dizi reaksiyondan geçirilmekte ve ölçümler sonucu viral yükün semi-kantitatif tayini yapılmaktadır (65). Bu yöntemin en büyük dezavantajı prob miksinin içermediği HPV tip 53, 66, 67 ve 73 gibi HPV tipleri ile çapraz reaksiyona girmesidir (100).

Cervista® HPV HR Test, ASCUS'lu hastaların kolposkopiye ihtiyacı olup olmadığının belirlenmesinde, 30 yaş ve altı kadınlarda servikal sitoloji ile birlikte değerlendirilmek üzere bu iki endikasyonda kullanılması için 2009 yılında FDA'dan onay almıştır. Bu test ile 14 HR (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 ve 68) HPV tipi tanımlanmaktadır (99). HCII testi ile kıyaslandığında Cervista® HPV HR Testi'nin CIN III'lerin tespitinde %100, CIN II'nin tespitinde %98 duyarlılığa sahip olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca bu sistemin HPV tip 16 ve 18'in tiplendirilmesinde

yüksek özgülüğe ve duyarlılığa sahip olduğu ve yanlış pozitif sonuçların oldukça düşük olduğu gözlenmiştir (101).

2.8.3.3. Nükleik Asit Amplifikasyon Teknikleri

HPV çalışmalarında en yaygın kullanılan yöntemlerden biri olan PZR yöntemi taze doku ve hücrelerden elde edilen DNA'lar ile formalinle fikse edilmiş, parafine gömülü dokulardan çalışılmasına olanak sağlamaktadır. PZR'ye dayalı testler yüksek analitik duyarlılığa sahiptir. Viral yükün çok az olduğu veya az miktarda örneklerle çalışıldığı durumlarda bile sonuç vermektedir. Yöntem, viral genomda hedeflenen gen bölgelerinin çoğaltılması esasına dayanmaktadır (92,100).

İlk başta hedef DNA denatüre edilerek tek sarmalı kalıp olarak kullanılmaktadır. Çoğaltılmak istenen gen bölgesine spesifik oligonükleotid primerleri, *Taq* DNA polimeraz enzimi yardımıyla hedef bölgeye bağlanmakta ve çift sarmallı DNA moleküllerini oluşturmaktadır. Sentezlenen her yeni çift sarmallı DNA molekülü bir sonraki döngüde kalıp görevi üstlenmektedir (92,100). PZR yöntemi ile 30 amplifikasyonun sonunda tek bir çift zincirli DNA molekülünden bir milyon kopya üretilabilmektedir (91). Bu basamakların tekrarlanması sonucunda çoğaltılan ürünler jel elektroforezi, RFLP veya sekanslama gibi işlemlere tabi tutulabilmektedir (100).

PZR'ye dayalı yöntemlerin duyarlılığını ve özgülüğünü; primer setleri, PZR ürününün büyüklüğü, reaksiyon koşulları, çoğaltılan HPV DNA tipi veya reaksiyonda kullanılan DNA polimerazın performansı gibi faktörler etkileyebilmektedir. Ayrıca kontaminasyon sonucu da hatalı pozitif sonuçlar elde edilebilmektedir (100). HPV DNA tespitinde en yaygın olarak L1 genini hedef alan MY09/11, PGMY09/11, GP5+/6+ ve SPF 1/2 primerleri kullanılmaktadır (95,100). MY09/11 primerleri kullanılarak L1 bölgesinin 450 bç'lik, GP5+/6+ primerleri ile 150 bç'lik ve SPF1/2 primerleriyle de 65 bç'lik bölgesi çoğaltılabilmektedir (91).

2.9. HPV Aşıları

Günümüzde HPV infeksiyonlarına karşı, farklı etki mekanizmasını hedefleyen profilaktik ve terapötik aşılar geliştirilmiştir. HPV hücre kültüründe üretilmediğinden dolayı diğer aşılar gibi attenüe aşılar söz konusu değildir.

2.9.1. Terapötik Aşılar

HPV ile ilişkili servikal lezyonların yok edilmesi ve serviks kanseri gelişmiş olgularda tedavi amacıyla kullanılması planlanan terapötik aşılar, HPV'nin L1, L2, BVP E2, E6 ve E7 gen proteinlerine karşı geliştirilmiş aşılarıdır (102). Terapötik aşılamada amaç, "Cluster Designation" (CD)4+ ve CD8+ hücrelerinin uyarılması sonucu viral DNA'yı integre etmiş E6 ve E7 proteinlerini aşırı üreten infekte hücrelerin yıkılmasıdır ve bu aşılar henüz araştırma aşamasındadır (103,104).

2.9.2. Profilaktik Aşılar

Profilaktik aşılar HPV infeksiyonunun olduğu bölgede etkin bir immün cevap oluşturarak HPV infeksiyonu ve buna bağlı lezyonların gelişimini önlemek için geliştirilmektedir (103).

Günümüzde Cervarix® ve Gardasil® olmak üzere iki aşı profilaktik amaçlı kullanılmaktadır (104). Bu aşılar L1 kapsid proteininin 360 kopyasının bir araya gelmesiyle elde edilen virus benzeri partikülleri (Virus like particule; VLP) içeren rekombinant aşılarıdır (105,106). VLP'ler, HPV DNA içermediğinden dolayı infeksiyöz değildir (105). Yüksek titrede antikor sentezi sağlarlar. Ayrıca VLP'ler nötralizan antikor oluşturmanın yanı sıra hücresel yanıtı da uyarmaktadır. Mevcut olan bu iki aşı arasındaki fark ise içerdikleri HPV tipleri ve adjuvan çeşitleridir (103,107). HPV aşısının cinsel aktivitenin başlangıcından önceki dönemde uygulanması önerilirken gebelerde kullanılması önerilmemektedir (108,109).

2.9.2.1. Bivalan Aşı

GlaxoSmith Kline tarafından geliştirilen bivalan HPV aşısı Cervarix[®], VLP L1 HPV tip 16 ve 18 içermektedir (102,107). Bacilovirus'da geliştirilen bu aşıda adjuvan olarak alüminyum hidroksit ve 3-deasilmonofosforil lipit A kullanılmaktadır (103). FDA tarafından 2009 yılında 10-25 yaş aralığındaki kızlarda servikal kanser ve prekürsör lezyonların önlenmesi amacıyla kullanımına lisans verilmiştir (106). Bu aşı 0., 1. ve 6. aylarda toplam üç doz olmak üzere intramüsküler uygulanmaktadır (108). CDC'nin “ Bağışıklama Uygulamalarına İlişkin Danışma Komitesi (Advisory Committee on Immunization Practices; ACIP)” kuruluşu tarafından ilk doz için kadınlarda 11-12 yaş uygun bulunmuştur (106). Ayrıca yapılan çalışmalara göre bivalan aşının yaklaşık yedi yıl koruyucu etki süresi olduğu bildirilmiştir (110).

2.9.2.2. Kuadrivalan Aşı

Merck firması tarafından geliştirilen Kuadrivalan HPV aşısı Gardasil[®], onkojenik HPV tip 16/18 ve non-onkojenik HPV tip 6/11 olmak üzere dört tip HPV VLP L1 içermektedir (107,111). Bu aşı mayalarda eksprese edilmiş olup, adjuvan olarak alüminyum hidroksifosfat sülfat kullanılmaktadır (103,111).

FDA tarafından 2006 yılında kuadrivalan HPV aşısının (Gardasil[®]) 9-26 yaş aralığındaki kadınlarda servikal kanser, anogenital siğiller ve servikal-vajinal-vulval kanser prekürsörlerinin önlenmesi için kullanımına, 2009 yılında da anogenital siğillerin önlenmesi amacıyla erkeklerde de kullanılmasına lisans verilmiştir. 2010 yılında ise FDA tarafından hem kadınlarda hem de erkeklerde anal kanserlerin önlenmesinde kuadrivalan aşılardan kullanılmasına lisans verilmiştir (106,111).

Kuadrivalan aşı üç doz intramüsküler olarak 0., 2. ve 6. ayda uygulanmaktadır (109). CDC'nin ACIP kuruluşu tarafından kızlar için ilk doz 9, erkeklerde ise 11-12 yaş uygun bulunmuş ve yaklaşık dokuz yıl koruyucu etki süresi olduğu bildirilmiştir (106,110). Ayrıca aşının önemli bir özelliği de, içermediği diğer HPV tiplerine (örnek: HPV tip 31, 45) karşı bir derece çarpaz koruyuculuk sağlamasıdır (107).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Örneklerin Alınması

Mersin Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Polikliniği'ne jinekolojik şikayetlerle başvuran, PAP smear örneklemesinde ASCUS, ASC-H, LSIL ve HSIL sitolojisine sahip olmayan, normal sitolojili 17-76 yaş aralığındaki toplam 325 hastadan HPV DNA ve PAP smear test uygulaması için 2 ayrı örnek alındı.

Çalışma Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul Başkanlığı'nın 02/08/2012 tarihli ve 2012/270 sayılı kararı ile "Etik Kurul Onayı"nı almıştır. Çalışmaya dahil edilen hastaların hepsi, yapılacak çalışma ile ilgili olarak bilgilendirildi ve 301 hastaya anket uygulaması yapıldı (Ek1-2).

3.1.1. PAP Smear İçin Örnek Alınması

Hasta, jinekolojik masada litotomi pozisyonunda iken kuru spekulum vajene yerleştirildi. Işık kaynağı altında serviksin portio vajinalis kısmından smear fırçası ile endoservikal kanala girildi ve kendi etrafında 360° döndürülerek örnek alındı. Alınan materyal temiz lam üzerine yayıldı. Sırasıyla önce fırçanın bir yüzü lamın yüzeyine sürüldü. Sonra diğer yüzü materyal sürülen alanın üstünden geçecek şekilde lam üzerine yayıldı. Alkol ile fikse edilerek incelenmek üzere Mersin Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Patoloji Laboratuvarı'na gönderildi. Patoloji laboratuvarında Hematoksilen+Eozin boyası ile boyanıp Bethesda 2001 ve Pap class sistemi ile değerlendirildi.

3.1.2. HPV DNA Saptanması İçin Örneklerin Alınması

Hastalardan kolposkopik muayene sırasında servikal HPV DNA'nın saptanması için FDA onaylı, ticari sıvı bazlı bir sitolojik yöntemde kullanılan "Thin Prep™ Pap Test" solüsyonu kullanılarak sürüntü örnekleri alındı. Hasta Pap smear uygulamasında olduğu gibi litotomi pozisyonunda yatırıldı. Muayane spekulumu yardımıyla endoservikal kanala girildikten sonra skuamokolumnar bileşke ve ektoserviksin transformasyon bölgesinde fırça 10 saniye 360° döndürülerek örnek alındı. Fırçanın uç kısmı çıkarılarak solüsyonun içine atıldıktan sonra kapağı kapatılıp Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Moleküler Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gönderildi. Örneklerden daha fazla servikal hücre elde edebilmek amacıyla laboratuvara ulaşan 20 ml'lik Thin Prep™ Pap Test solüsyonları 50 ml'lik falkonlara aktarılarak 4000 rpm'de santrifüj edildi. Bu işlemden sonra süpernatant kısmı atıldı ve pellet kısmı 1 ml'lik hacimlere bölünerek 2 ependorf tüpe alındı. Çalışma süresine kadar örnekler -20°C'de saklandı.

3.2. Anket Uygulaması

Çalışmaya dahil edilen 325 hastanın 301 tanesine yaş, meslek, eğitim durumu, ekonomik durum, koit yaşı, partner sayısı, kondom-OKS-rahim içi araç (RIA) kullanımı, menopoz durumu, düzenli jinekolojik kontrol, smear takibi, smear hakkında bilgi durumu ve sigara kullanım öyküsü hakkında sorular içeren anket uygulandı. Anket sonuçlarına göre HPV DNA pozitif olgulardaki risk faktörleri belirlendi. Anket örneği Ek-1'de verilmiştir.

3.3. Kullanılan Araç ve Gereçler

3.3.1. Kullanılan Cihazlar

- Isı döngü cihazı (Thermal Cycler, Eppendorf Mastercycler Gradient)

- Güvenlik Kabini (Heraeus, HERA safe)
- Elektroforez Güç Kaynağı (Biometra, P30)
- Elektroforez Tankı (Thermo Scientific, Owl E. Sycast™ B2)
- Jel Görüntüleme Sistemi (Vilber Lourmat Marne La Vallée, Fransa)
- “ABI PRISM 3130XL Genetic Analyzer” (Applied Biosystems, Foster City, CA, ABD)
- UV-Transilluminatör (UVP, 81.0110.01)
- Mikrodalga Fırın (Beko, MD 1500)
- Derin Dondurucu (Uğur, R134a)
- Hassas Terazı (Scaltec)
- Vortex (Heidolph, REAX top)
- Santrifüj (Sigma, 1-15)
- Otoklav (Hirayama, HVE-50)
- Bulaşık Makinası (Arçelik, 6020E)
- +4°C’lik soğutucu (Indesit)
- -20°C’lik Derin Dondurucu (Indesit)
- Su Banyosu (Memmert)
- Distile su cihazı (Thermo Scientific, micropure)
- Mikropipet Seti (Thermo Scientific, 0,2-2 µl, 2-20 µl, 20-200 µl)

3.3.2. Kullanılan Sarf Malzemeler

- Ependorf Tüpleri (500 µl-1ml-1.5ml)
- PZR Tüpleri (0,2 µl)
- Falkon Tüpleri (50ml)
- Sarı Pipet Ucu
- Mavi Pipet Ucu
- Aerosol Bariyerli Pipet Ucu
- Dnase Free Pipet Ucu
- Rnase Free Pipet Ucu
- Pudrasız Eldiven

3.3.3. Kullanılan Hazır Ticari Kitler

- High Pure Viral Nukleic Acid Kit (Roche Diagnostics GmbH Mannheim, Almanya)
- Thin Prep™ Pap Test

3.3.4. Kullanılan Bilgisayar Yazılımları

- Chromas DNA Dizi Analizi
- PubMed-BLAST (the Basic Local Alignment Search Tool)
- SPSS (Statistical Package for Social Sciences) for Windows 11.5.0

3.3.5. Kullanılan Kimyasallar

- Etilen diamin tetra asetik asit (EDTA), sodium salt (Lachema, 302430300, cat no: 30354)
- Tris-base (Amresco, 1639B291)
- Borik asit (Merck, K29935665 204)
- Brom fenol mavisi (SCP Science, B7722)
- Sükroz (Merck, 1.07651)
- Etanol absolut (Riedel- deHaän, 32221)
- Agaroz (Prona, 0945002PR)
- Etidyum Bromid (Sigma-Aldrich, E8751)
- Taq DNA Polimeraz (Fermentas, #EP0402)
- 10X *Taq* Buffer (with KCl) (Fermentas, #EP0402)
- 25 mM MgCl₂ (Fermentas, #EP0402)
- 100 mM dNTP (Fermentas, Deoxynucleotide set-dNTP set, 4x25 µmol, #R0181)
- Distile Su
- Nuclease Free Su (Fermentas, #R0582)
- Primerler:

HPV L1 kapsid geni (450 bç uzunluğundaki bölge için):

MY09: 5'-CGTCCMARRGGAWACTGATC-3'

MY11: 5'-GCMCAGGGWCATAAYAATGG-3'

(M: A+C, R: A+G, W: A+T, Y: C+T)

HPV L1 kapsid geni (150 bç uzunluğundaki bölge için):

GP5+ : 5'-TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC-3'

GP6+ : 5'-GAAAAATAAACTGTAAATCATATT-3'

İnsan hücresel GAPD-H geni (136 bç uzunluğundaki bölge için):

GAPDHF: 5'-CGGCAGCAGCAAGCATTCCCT-3'

GAPDHR: 5'-GCCCAACACCCCCAGTCA-3'

- Moleküler ağırlık standartı

3.3.6. Kullanılan Tampon Çözeltiler

3.3.6.1. Elektroforez İçin Kullanılan Solüsyonlar

- **10X TBE (Tris-Borik asit-EDTA) Stok Solüsyonu pH 8.8**

- Tris Base.....108 gr
- Borik Asit.....55 gr
- EDTA.....8,3 gr

Bu malzemeler bir miktar distile su ile eritildi ve pH'sı 8,8'e ayarlandı. Daha sonra son hacim 1 litre olacak şekilde distile su eklendi. Oda ısısında muhafaza edildi.

- **Elektroforez Yürütme Tamponu (1X TBE)**

10X TBE Buffer stok solüsyonundan distile su ile seyreltilerek hazırlanmış olan 1X TBE tamponu elektroforez yürütme tamponu olarak elektroforez tankına konularak kullanıldı. Tanka konulan tampon haftalık olarak değiştirildi.

- **Yükleme Tamponu (20 ml için)**

- Sükroz.....4 gr.
- Brom fenol mavisi.....0,05 gr.

Tartılan kimyasallar 20 ml 1X TBE tamponunda eritildi. Oda ısısında saklandı.

- **% 1'lik Agaroz Jel**

100 ml 1X TBE Buffer içerisinde 1 gr agaroz mikrodalga fırında eritildikten sonra 10 µl etidyum bromid ilave edildi.

3.4. Servikal Sürüntü Örneklerinden HPV DNA'nın Tespit Edilmesi

3.4.1. DNA Ekstraksiyonu

DNA ekstraksiyonu için High Pure Viral Nucleic Acid (lot:13554700 Roche Diagnostics GmbH Mannheim, Almanya) kiti kullanıldı. Ekstraksiyon aşamaları ve kullanılan çözeltilerin hazırlanması üretici firmanın talimatları doğrultusunda yapıldı.

- **Çözeltilerin Hazırlanması**

- **Proteinaz K (20 mg/ml)**

- Liyofilize halde bulunan 100 mg proteinaz K, 5 ml elution buffer içinde karıştırılarak çözüldü.
- Bu karışım, 250 µl'lik hacimlere bölünerek -20°C'de saklandı.

- **Poly (A) (4 mg/ml)**

- Liyofilize halde bulunan 2 mg poly (A) taşıyıcı RNA 0,5 ml elution buffer ile çözüldü.
- 40 µl'lik hacimlere bölünerek -20°C'de saklandı.

- Çalışma sırasında bu 40 µl'lik karışıma, 2 ml binding buffer [6M guanidine-HCl, 10mM Tris-HCl, %20 Triton X-100 (w/v), pH 4,4 (25°C)] eklendi.
- Binding buffer ve poly (A) karışımı her çalışma sırasında taze hazırlandı.

Inhibitor Removal Buffer

- 33 ml inhibitor removal buffer'a [5M guanidine-HCl, 20mM Tris-HCl pH 6,6 (25°C) etanol eklendikten sonraki konsantrasyonu], 20 ml saf etanol eklendi ve iyice karıştırıldı.

Wash Buffer

- Wash buffer'a [2X 10 ml, 20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl, pH 7,5 (25°C) etanol eklendikten sonraki konsantrasyonu] 40 ml saf etanol eklendi ve iyice karıştırıldı.

• **Ekstraksiyonun Aşamaları**

1. Saklanan 200 µl'lik sürüntü örneğine 2 ml binding buffer ve 40 µl poly (A) karışımından 200 µl alınıp örneklerin bulunduğu ependorf tüplerine eklendi. Ayrıca her bir örneğin üzerine 50 µl proteinaz K (20 mg/ml) eklenip vortekslenildi ve 72°C'de 10 dakika inkübe edildi.
2. İnkübasyondan sonra kapakta sıvı kalmaması için kısa süreli santrifüj edildi. Üzerine 100 µl binding buffer eklendi ve vortekslenildi.
3. Kit içerisindeki toplama kapları ve filtreli tüpler iç içe geçirildi.
4. Örneklerin bulunduğu ependorf tüpündeki karışım, hazırlanan toplama kapları içerisine aktarıldı ve 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
5. Santrifüj sonrası, toplama kabı atıldı. Filtre tüpleri yeni toplama kaplarına yerleştirildi.
6. Üzerine 500 µl inhibitor removal buffer eklenip 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
7. Santrifüj sonrası toplama kabı atıldı. Filtre tüpleri yeni toplama kapları üzerine yerleştirildi.

8. Üzerine 450 µl wash buffer eklendi ve 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası toplama kabı atıldı. Filtre tüpleri yeni toplama kapları üzerine yerleştirildi. Bu basamak toplam iki kez yapıldı.
9. Bu işlemden sonra 13000 rpm'de 10 saniye santrifüj edildi. Santrifüj sonrası toplama kabı atıldı. Filtre tüpleri 1,5 ml'lik ependorf tüplere yerleştirildi.
10. Üzerine 50 µl elution buffer eklendi ve 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
11. Ependorf tüp içindeki filtre tüpü atıldı ve daha sonra bu tüpler -20°C'de saklandı.

3.4.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Uygulaması

Çalışmada;

- PZR, tek bir molekül DNA'yı bile çoğaltabileceği için, reaksiyon karışımlarının DNA molekülleri ile kontamine olmasının engellenmesi için; DNA ekstraksiyonu, PZR ana karışımının hazırlanması ("master mix") ve örneklerin ana karışıma eklenmesi izole edilmiş 3 ayrı odada yapıldı.
- PZR reaksiyonunda ısı iletiminden kaynaklanabilecek sorunların en az düzeye indirilmesi için, ince duvarlı DNase ve RNase enzimlerinden arındırılmış steril 0.2 µl'lik PZR tüpleri (Axygen Thin-Walled PCR Tubes) kullanıldı. Solüsyonlar küçük hacimlerde tüplere bölündü.
- Aerosol bariyerli pipet uçları ve pudrasız eldivenler kullanıldı.
- Yüzeylerin dekontaminasyonu için UV ışık ve sodyum hipoklorid kullanıldı.

HPV DNA analizinden önce ekstraksiyon yapılan bütün örneklerde insan hücresel DNA'sının varlığının kontrolü amacıyla, iyi korunmuş bir bölge olan GADP-H'ye özgül primerler ile PZR amplifikasyonu gerçekleştirildi. HPV DNA'nın tespiti için ise L1 gen bölgesi, MY09/11 ve sonrasında GP5+/6+ konsensus primer dizileri kullanılarak nested-PZR tekniği ile amplifiye edildi. PZR amplifikasyonlarında kullanılan primer dizi çiftleri Çizelge 3.1'de verilmiştir (112).

Çizelge 3.1. PZR amplifikasyonlarında kullanılan primer dizi çiftleri.

Primerler	Hedef bölge uzunluğu (bç)	Anneling derecesi (T)	5'-3' dizi
HPV L1 gen bölgesi			
MY09 MY11	450	55°C	CGT CCM ARR GGA WAC TGA TC GCMC AGGGWC AT AAYAATGG
GP5+ GP6+	142		TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC GAAAAAT AACTG AAATC AT ATTC
İnsan GAPD-H gen bölgesi			
GAPDHF GAPDHR	136	60°C	GGC AGC AGC AAGC ATTCCT GCCCAACACCCCCAGTCA
(M: A+C, R: A+G, W: A+T, Y: C+T)			

İki tur halinde gerçekleştirilen nested-PZR tekniğinde, birinci turda L1 kapsid gen bölgesi içinden 450 bç uzunluğundaki bölge MY09/11 primerleri kullanılarak amplifiye edildi. İkinci turda ise birinci turda amplifiye edilen gen bölgesi içinden 142 bç uzunluğundaki daha korunmuş bölge GP5+/6+ primerleri kullanılarak amplifiye edildi. Her bir örnek için PZR karışımları Çizelge 3.2'deki gibidir.

Çizelge 3.2. L1 gen bölgesinin amplifikasyonunda her bir örnek için hazırlanan reaksiyon karışımı.

Birinci tur		İkinci tur	
Reaksiyon bileşenleri	Kullanılacak miktar (µL)	Reaksiyon bileşenleri	Kullanılacak miktar (µL)
Distile Su	35,25	Distile Su	37,25
10X <i>Taq</i> Tampon	5	10X <i>Taq</i> Tampon	5
MgCl ₂ (25 mM)	3	MgCl ₂ (25 mM)	3
dNTP Mix (10 mM)	1	dNTP Mix (10 mM)	1
Primer 1 (MY09) (100 pmol/µL)	0,25	Primer 3 (GP 5+) (100 pmol/µL)	0,25
Primer 2 (MY 11) (100 pmol/µL)	0,25	Primer 4 (GP 6+) (100 pmol/µL)	0,25
<i>Taq</i> DNA Polimeraz	0,25	<i>Taq</i> DNA Polimeraz	0,25
DNA örneği	5	1.Tur PZR ürünü	3

Oluşturulan ilk tur PZR karışımı vortekslendikten sonra, her bir örneğe ait ve üzerlerinde numaraları yazılı steril 0,2 µl'lik PZR tüplerine 45'er µl konuldu. Daha sonra üzerine 5 µl DNA örneği konulup cihaza yerleştirildi. İkinci turda HPV GP5+/6+ nested-PZR için PZR karışımından 47'şer µl, MY09/11 PZR ürününün 3 µl'si

kullanılarak nested-PZR tekniği ile amplifikasyon gerçekleştirildi. HPV DNA tespiti için ısı döngü cihazında PZR koşulları Çizelge 3.3'deki gibi uygulanmıştır.

Çizelge 3.3. Uygulanan amplifikasyon sıcaklık ve süreleri.

Reaksiyon aşaması	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü sayısı
Ön ısıtma (Başlangıç denatürasyonu)	94	5 dk	1
Denatürasyon	94	5 sn	35
Primer bağlanması (Annealing)	55	5 sn	
Zincir uzaması (Elongasyon)	72	60 sn	
Son uzama (Post elongasyon)	72	7 dk	1
Muhafaza	4	∞	∞

İşlem bittikten sonra, örnekler elektroforez uygulanmak üzere +4°C'deki buzdolabına kaldırıldı.

3.4.3. Agaroz Jel Elektroforez İşlemi

PZR'de amplifiye edilen HPV DNA'sının L1 gen bölgesini tespit etmek için agaroz jel elektroforez tekniği kullanıldı. Hazırlanan jelde yürütülen DNA'ların uzunlukları, büyüklükleri belli (100-1000 bp) DNA bantları ihtiva eden moleküler ağırlık standardı ile kıyaslanarak saptandı. GAPD-H primerleri ile çoğaltılan insan genomik DNA varlığı, 136 bp uzunluğunda ürün bantlarının görülmesi ile belirlendi. Aynı şekilde MY09/11 primerleri ile çoğaltılan 1. tur PZR ürünlerinde 450 bp, GP5+/6+ primerleri ile çoğaltılan 2. tur PZR ürünlerinde ise 142 bp uzunluğunda ürün bantlarının görülmesi ile HPV DNA varlığı anlaşıldı.

Elektroforez tamponu olarak TBE (Tris-Borik asit-EDTA), 10X konsantre stok solüsyon şeklinde hazırlandı. Daha sonra 1X olacak şekilde distile su ile sulandırıldı ve hem tankta hem de agaroz jelin hazırlanması sırasında kullanıldı.

• Agaroz jelin hazırlanması

Bir erlenmayerde %1'lik agaroz jel hazırlama için, 1 gr agaroz 100 ml 1X TBE solüsyonu içerisinde mikrodalga fırında homojen şeffaf hale gelinceye kadar ısıtıldı. Buhar çıkması durduktan sonra 10 µl etidyum-bromid eklendi. Erimiş haldeki etidyum-

bromid ile karıştırılmış jel, tarakların yerleştirildiği jel tepsisine yavaşça döküldü. Dökme işlemi esnasında jel içinde hava kabarcıklarının kalmamasına dikkat edildi. Yaklaşık 30 dakika boyunca jel katılaşana kadar oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra elektroforez tankına yerleştirilerek PZR örneklerinin yüklenmesine hazır hale getirildi. Daha önceden PZR işlemi yapılmış olan buzdolabındaki örneklerden 7 µl alınarak parafilm üzerinde 2 µl 1X TBE ile hazırlanmış yükleme tamponu (%20 sükröz veya gliserol, %0,25 brom fenol mavisini) ile iyice karıştırıldı. Daha sonra da elektroforez tankına yerleştirilen jelin kuyucuklarına sırasıyla yüklendi. Yükleme işleminde bir hasta için yan yana bulunan iki kuyu kullanıldı. Birinci kuyuya MY09/11 primerleri ile çoğaltılan 1. tur PZR ürünü, ikinci kuyuya da GP5+/6+ primerleri ile çoğaltılan 2. tur PZR ürünü yüklendi. Tankın kapağı kapatıldıktan sonra güç kaynağı çalıştırıldı. Kullanılan tanka 130 mA elektrik akımı verilerek örnekler 40-50 dakika boyunca yürütüldü. Yükleme tamponunda bulunan brom fenol mavisinin göçü takip ederek jelin 2/3'lük kısmına ulaştığında elektroforez işlemi durduruldu. Jeli tanktan çıkararak 312 nm dalga boyunda ışık veren UV-transilluminatöründe incelendi ve jel görüntüleme sisteminde (Vilber Lourmat Marne La Vallée, Fransa) kayıtları yapıldı.

3.5. HPV Genotiplendirilmesi

3.5.1. HPV DNA Dizi Analizi

L1 gen bölgesinin MY09/11 ve GP5+/6+ primerleri ile nested-PZR tekniği ile amplifiye olan PZR ürünleri, işaretli dideoksinükleotidleri içeren “Bigdye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit” (Applied Biosystems, Foster City, CA, ABD) kullanarak, sense zincirleri MY09 ve GP5+ primerleri ile “Cycle Sequence” PZR'ı yapıldı.

“Cycle Sequencing” sonrası reaksiyon ürünlerine Etanol/EDTA/Sodyum Asetat (NaOAc-EtOH) presipitasyon yöntemi ile saflaştırma uygulanmıştır.

Etanol/EDTA/Sodyum Asetat (NaOAc-EtOH) presipitasyon yöntemi:

- 20 µL'lik reaksiyon ürünlerinin üzerine 2 µL 125 mM EDTA eklendi.

- Daha sonra üstüne 2 µL 3 M sodyum asetat eklendi.
- Bunun üzerine 50 µL %100'lik etanol eklendi.
- Ters-düz ederek karıştırıldı.
- Oda ısısında 15 dk inkübe edildi.
- +4 °C'de 13.000 rpm'de 15 dk santrifüj edildi.
- Pelletlerin üstündeki süpernatant ters çevrilerek döküldü.
- Üzerine %70'lik etanol eklendi.
- +4 °C'de 13.000 rpm'de 15 dk santrifüj edildi.
- Pellet kurutuldu.

Saflaştırma işlemi sonrasında, “ABI PRISM 3130XL Genetic Analyzer” (Applied Biosystems, Foster City, CA, ABD) otomatize DNA dizi analizi cihazında, reaksiyon ürünlerinin elektroforez işlemi gerçekleştirilerek, kromatografi şeklinde DNA dizi analizi verileri elde edildi.

3.5.2. Dizi Analizi Verilerinin Değerlendirilmesi

Dizi analizi verileri, kromatografi şeklinde elde edildi. Kromatografi, her bir reaksiyon için renk/baz ilişkisinin dalgalı analizini sağlayan bir düzendir. Dizi verileri bu şekilde kayıt edilebilmekte ve güvenli ortamlarda saklanabilmektedir. HPV DNA tespit ettiğimiz her bir PZR ürününün tek zinciri MY09 ve GP5+ primer dizileri kullanılarak DNA dizi analizi uygulandı.

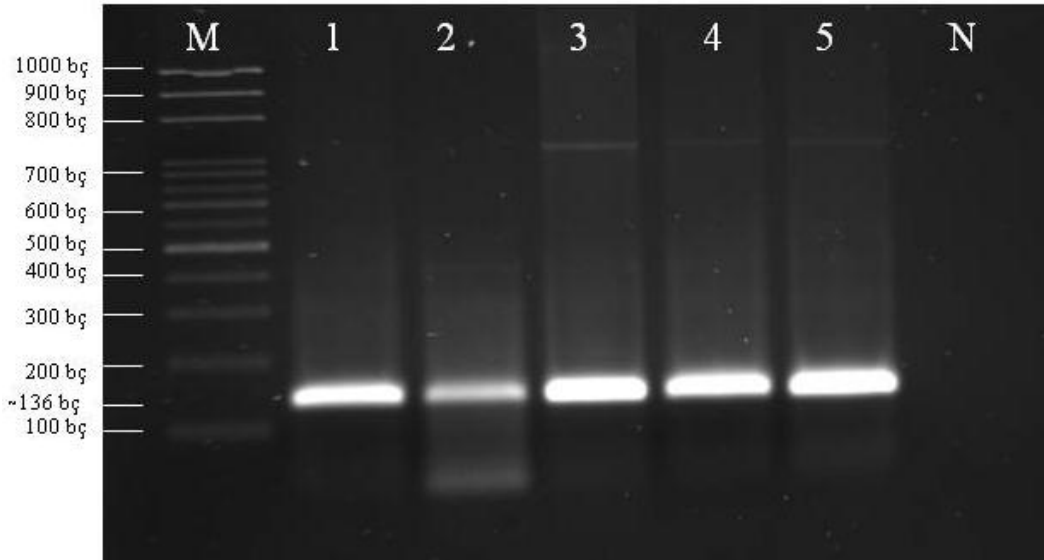
Dizi analizi sonrası Chromas DNA dizi analizi programında kromatogram dalgalarının pik uzunlukları kontrol edildi ve düzeltmeler yapıldı. Ayrıca uç kısımlardaki okunamayan diziler kırpıldıktan sonra, son konsensus dizi şeklinde kayıt edildi. Her bir hastaya ait dizisi çıkarılan bu gen bölgeleri, PubMed-BLAST (the Basic Local Alignment Search Tool) programına yüklenerek, Gen-Bankası veri tabanında yayınlanmış referans HPV dizi verileri ile karşılaştırılarak olası HPV genotiplendirilmesi yapıldı. Değerlendirmede, bit-score, maksimum identity (karşılaştırmada identik dizilerin sayısı) ve E-değeri (karşılaştırmanın istatistiksel anlamı) çıktıları göz önünde bulunduruldu. HPV genotip belirlenmesinde, en benzer ve anlamlı sonuç veren dizi eşleşmeleri temel alındı.

3.6. İstatistiksel Analiz

Çalışmada elde edilen bulgular değerlendirilirken, istatistiksel analizler için “SPSS (Statistical Package for Social Sciences) for Windows 11.5.0” paket programı kullanıldı. Çalışma verilerinin istatistiksel değerlendirilmesinde kategorik veriler frekans ve yüzde cinsinden, sürekli veriler ise ortalama \pm standart sapma cinsinden özetlendi. İstatistiksel değerlendirme için çapraz tablo istatistiklerinden Ki-kare veya Likelihood Ratio test istatistiği kullanıldı. Anlamlılık derecesi (p) $< 0,05$ olarak alındı

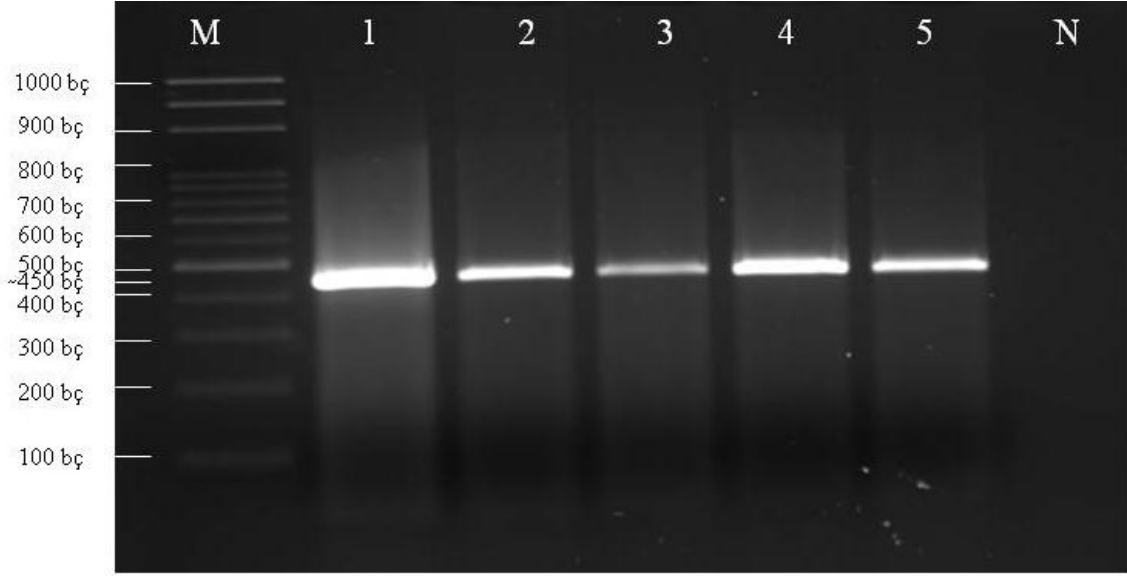
4. BULGULAR

Mersin ilinde normal sitolojiye sahip kadınlarda HPV prevalansını belirlemek amacıyla Mersin Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Polikliniği'ne başvuran hastalardan alınan servikal sitoloji örnekleri nested-PZR yöntemiyle değerlendirildi. Toplanan 325 örnekten insan hücresel DNA varlığı yönünden pozitif bulunan toplam 322 örnek çalışmaya dahil edildi (Şekil 4.1).

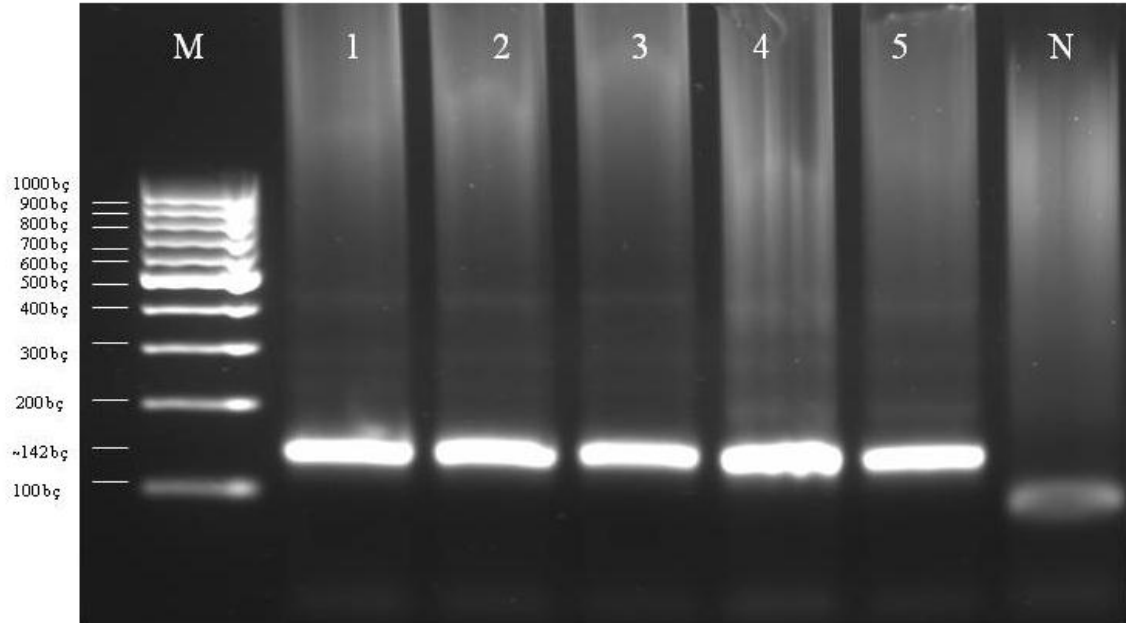


Şekil 4.1. İnsan hücresel GAPD-H geninin PZR yöntemi ile amplifikasyonu sonrası oluşan 136 bç'lik bölgenin %1'lik agaroz jel elektroforez görüntüsü [Kolon M: 100 bç'lik DNA moleküler ağırlık standardı, Kolon 1, 2, 3, 4 ve 5: 136 bç'lik amplifikasyon ürünleri, Kolon N: Negatif kontrol].

Çalışmaya dahil edilen 322 örnekten 64 (%19,9)'ü HPV DNA yönünden pozitif bulundu. HPV pozitif 64 örnekten 5'i MY09/11 primerleri ile pozitif bulunurken, 48'i GP5+/6+ nested PZR ile pozitif bulundu. Kalan 11 örnek ise hem MY09/11 hem de GP5+/6+ primerleri ile HPV DNA tespit edildi (Şekil 4.2 ve Şekil 4.3).



Şekil 4.2. HPV DNA'sının L1 kapsid geninin MY09/11 primerleri ile amplifikasyonu sonrası oluşan 450 bç'lik bölgenin %1'lik agaroz jel elektroforez görüntüsü [Kolon M: 100 bç'lik DNA moleküler ağırlık standardı, Kolon 1, 2, 3, 4 ve 5: 450 bç'lik amplifikasyon ürünleri, Kolon N: Negatif kontrol].



Şekil 4.3. HPV DNA'sının L1 kapsid geninin GP5+/6+ primerleri ile amplifikasyonu sonrası oluşan 142 bç'lik bölgenin %1'lik agaroz jel elektroforez görüntüsü [Kolon M: 100 bç'lik DNA moleküler ağırlık standardı, Kolon 1, 2, 3, 4 ve 5: 142 bç'lik amplifikasyon ürünleri, Kolon N: Negatif kontrol].

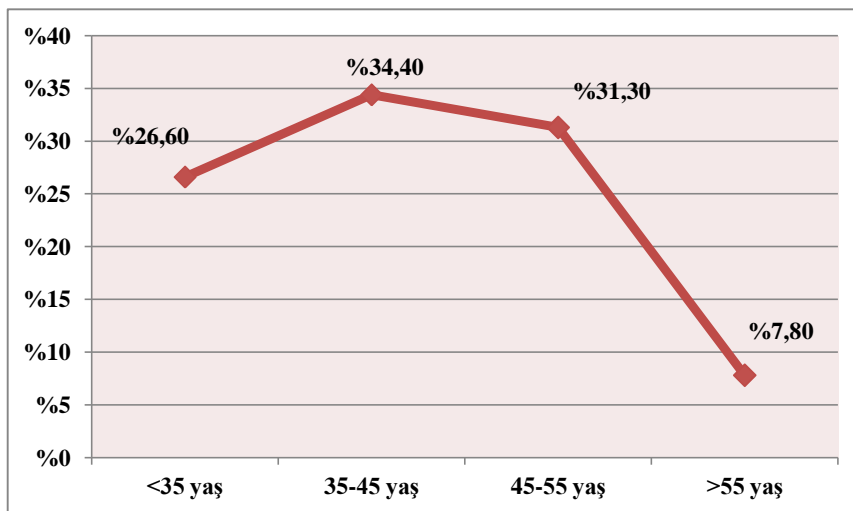
Çalışmaya alınan 322 hastanın yaş ortalaması $42,27 \pm 10,95$ (yaş aralığı 17-76) olarak saptandı. Hastaların 86 (%26,7)'si 35 yaş altı, 104 (%32,3)'ü 35-45 yaş arası, 94 (%29,2)'ü 45-55 yaş arası ve 38 (%11,8)'i 55 yaş üzeri yaş grubunda yer almaktadır (Çizelge 4.1).

HPV DNA pozitif bulunan kadınların ortalamaları $41,95 \pm 10,09$ (yaş aralığı 20-67) olarak saptanmıştır. HPV DNA pozitifliği %34,4 oranla en fazla 35-45 yaş arasında tespit edildi. HPV DNA pozitifliğinin 45-55 yaş arasında %31,3'e, 55 yaş üzerinde %7,8'e düştüğü görüldü. 35 yaş altı kadınlarda ise HPV DNA pozitifliğinin %26,6 olduğu saptandı (Çizelge 4.1, Şekil 4.4).

Çizelge 4.1. Çalışmaya dahil edilen kadınların yaş gruplarına göre dağılımı

Yaş	Çalışma grubu		HPV DNA pozitif	
	Sayı	%	Sayı	%
<35	86	26,7	17	26,6
35-45	104	32,3	22	34,4
45-55	94	29,2	20	31,3
>55	38	11,8	5	7,8
Toplam	322	100	64	100

Şekil4.4. HPV pozitif bulunan hastaların yaş gruplarına göre dağılımı



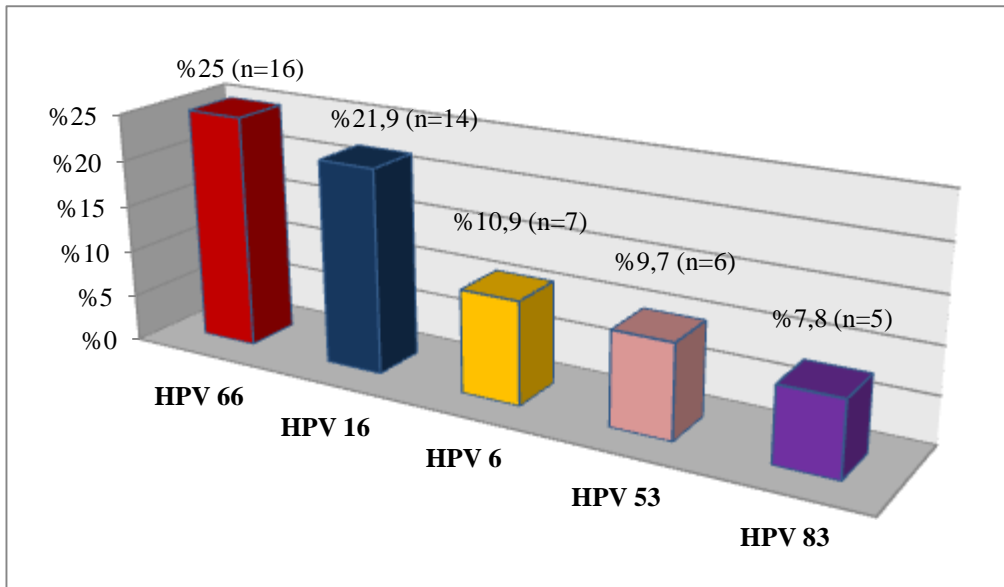
Çalışmada HPV DNA pozitif bulunan 64 örneğin 61'inin tiplendirilmesi yapılabildi ve kalan 3 örneğin dizi analizi verileri okunamadı. Dizi analizi sonuçlarına göre 14 farklı HPV tipi tespit edildi (Çizelge 4.2) . HPV tip 66 (%25,0), HPV tip 16 (%21,9), HPV tip 6 (%10,9), HPV tip 53 (%9,7), HPV tip 83 (%7,8) en fazla bulunan ilk beş tip olarak tespit edildi (Şekil 4.5) . HPV tip 18 (%1,6), 31 (%4,7), 40 (%1,6), 45 (%3,1), 54 (%1,6), 56 (%1,6), 61 (%1,6), 62 (%1,6) ve 81 (%3,1) azalan oranda saptandı (Şekil 4.6).

Çizelge 4.2. HPV pozitif bulunan hastalardaki HPV tiplerinin prevalansı.

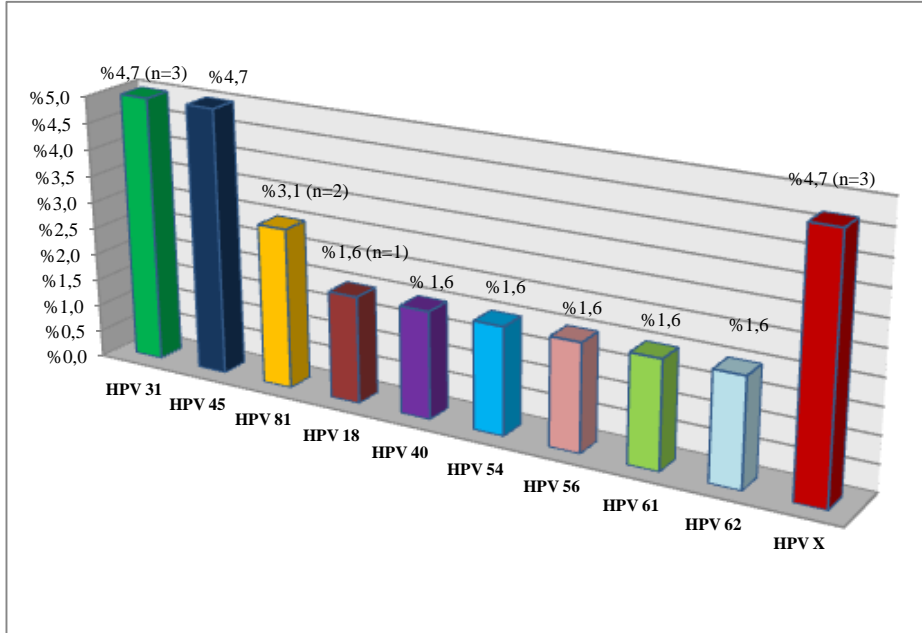
	HPV tipleri														
	HPV 6	HPV 16	HPV 18	HPV 31	HPV 40	HPV 45	HPV 53	HPV 54	HPV 56	HPV 61	HPV 62	HPV 66	HPV 81	HPV 83	HPV X
n	7	14	1	3	1	2	6	1	1	1	1	16	2	5	3
%	10,9	21,9	1,6	4,7	1,6	3,1	9,7	1,6	1,6	1,6	1,6	25,0	3,1	7,8	4,7

X: Tipi belirlenemeyen örnekler

Şekil4.5. HPV pozitif bulunan hastalarda en sık tespit edilen HPV tiplerinin prevalansı



Şekil4.6. HPV pozitif bulunan hastalarda diğer tespit edilen HPV tiplerinin prevalansı



En fazla tespit edilen HPV tipleri yaş aralıklarına göre bakıldığında HPV tip 66 ve 53 en fazla 35-45 yaş aralığında, HPV tip 6 ve 16 en fazla 45-55 yaş aralığında tespit edildi. HPV tip 83 ise 35-45 ve 45-55 yaş aralığında aynı oranda tespit edildi (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. HPV tiplerinin yaş aralıklarına göre dağılımı

HPV Tip	<35	35-45	45-55	>55	Toplam n (%)
6	1	2	3	1	7 (%10,9)
16	3	4	7	-	14 (%21,9)
18	-	-	1	-	1 (%1,6)
31	2	-	-	1	3 (%4,7)
40	-	-	-	1	1 (%1,6)
45	-	1	1	-	2 (%3,1)
53	2	3	-	1	6 (%9,7)
54	1	-	-	-	1 (%1,6)
56	-	1	-	-	1 (%1,6)
61	-	-	1	-	1 (%1,6)
62	1	-	-	-	1 (%1,6)
66	4	8	3	1	16 (%25,0)
81	1	1	-	-	2 (%3,1)
83	1	2	2	-	5 (%7,8)
X	1	-	2	-	3 (%4,7)
Toplam n (%)	17 (%26,6)	22 (%34,4)	20 (%31,3)	5 (%7,8)	64 (%100)

Çalışmaya dahil edilen 322 hastanın 301'ine demografik bilgileri içeren anket uygulaması yapıldı. HPV pozitif ile HPV negatif hastalar; meslek, ekonomik ve eğitim durumu, ilk koit yaşı, partner sayısı, menopoz durumu, kondom ve OKS kullanımı, RİA, jinekolojik kontrol sıklığı, smear hakkında bilgi ve takip, sigara kullanım süresi açısından değerlendirildi ve istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmedi ($p>0.05$) (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4. Çalışma grubundaki kadınların demografik özellikleri

Demografik özellikler	Çalışma grubu		HPV DNA pozitif		p değeri
	Sayı	%	Sayı	%	
Yaş					
<35	86	26,7	17	26,6	0,729
35-45	104	32,3	22	34,4	
45-55	94	29,2	20	31,3	
>55	38	11,8	5	7,8	
Meslek					
Ev hanımı	202	67,1	40	64,5	0,626
Çalışan	99	32,9	22	35,5	
Eğitim durumu					
Okuma yazma yok	29	9,6	6	9,7	0,464
İlköğretim	114	37,9	25	40,3	
Lise	81	26,9	12	19,4	
Üniversite ve üzeri	77	25,6	19	30,6	
Ekonomik durumu (TL)					
<1000	141	46,8	29	46,8	0,847
1000-2000	75	24,9	14	22,6	
≥2000	85	28,2	19	30,6	
Koît yaşı					
<20	117	38,7	23	37,1	0,626
20-29	163	54,0	32	51,6	
>30	22	7,3	7	11,3	
Partner sayısı					
Tek	273	90,4	53	85,5	0,141
Multipartner	29	9,6	9	14,5	
Menopoz durumu					
Menopozda	80	26,5	13	21	0,269
Menopozda değil	222	83,5	49	79	
Kondom kullanımı					
Evet	131	43,4	34	54,8	0,058
Hayır	171	56,6	28	45,2	
OKS kullanımı					
Kısa süreli	19	6,3	5	8,1	0,513
Uzun süreli	43	14,2	11	17,7	
Yok	240	79,5	46	74,2	
RIA kullanımı					
Var	59	19,5	7	11,3	0,066
Yok	243	80,5	55	88,7	
Jinekolojik kontrol					
Yılda bir	138	45,7	30	48,4	0,889
İki yılda bir	35	11,6	7	11,3	
Yok	129	42,7	25	40,3	
Smear hakkında bilgisi					
Var	168	55,6	32	51,6	0,475
Yok	134	44,4	30	48,4	
Smear takibi					
Yılda bir	95	31,5	19	30,6	0,801
İki yılda bir	27	8,9	4	6,5	
>2 yıl	33	10,9	6	9,7	
Yok	147	48,7	33	53,2	
Sigara kullanımı [Yoğun: >10 tane/gün; Az: ≤10 tane/gün; Uzun süre: ≥2 yıl; Kısa süre: <2 yıl]					
Yoğun-uzun süre	51	16,9	7	11,3	0,389
Yoğun-kısa süre	0	0	0	0	
Az-uzun süre	34	11,3	5	8,1	
Az-kısa süre	14	4,6	3	4,8	
Yok	203	67,2	47	75,8	

5. TARTIŞMA

HPV, tüm dünyadaki kadınlarda kansere bağılı ölümler içinde ikinci sırada yer alan servikal kanserin primer etiyolojik ajanıdır ve cinsel yolla bulaşan en yaygın infeksiyonlardan biridir (113). Her yıl yaklaşık 530.000 yeni servikal kanser vakası tanımlanmakta ve vakaların yaklaşık 270.000'i kaybedilmektedir (114). Servikal kanser olgularının neredeyse tümünde (%99,7) HPV DNA izole edilmesine rağmen, HPV varlığının servikal kanserin gelişmesinde önemli bir risk faktörü olduğu belirtilmiş, ancak bunun tek başına yeterli olmadığı vurgulanmıştır (75,116).

Yaptığımız bu çalışmada Mersin ilinde normal servikal sitolojiye sahip kadınlarda HPV infeksiyonunun prevalansının belirlenmesi amaçlanmıştır. HPV pozitifliği tespit edilen hastalarda ise HPV tiplerinin dağılımı ve infeksiyonun olası risk faktörleri ile ilişkisi incelenmiştir. Çalışmaya normal servikal sitolojiye sahip 17-76 yaş aralığında toplam 322 kadına ait servikal sürüntü örneği dahil edilmiştir. HPV DNA varlığı, HPV genomunun L1 gen bölgesini hedefleyen MY09/11 ve GP5+/6+ primerlerinin kullanıldığı nested PZR yöntemi ile tespit edilmiştir. Çalışmaya dahil edilen 322 kadının servikal sürüntü örneğinin 64'ünde HPV DNA tespit edilmiştir ve HPV DNA prevalansı %19,9 (64/322) olarak saptanmıştır.

Çalışmamızda HPV DNA tespit edilen 64 örneğin 61 tanesinin genotiplenmesi yapılabilmektedir ve 14 farklı HPV genotipi tespit edilmiştir. HPV tipleri içinde HPV tip 66 %25 oran ile ilk sırada saptanırken, HPV tip 16 (%21,9), 6 (%10,9), 53 (%9,7) ve 83 (%7,8) sırasıyla en fazla tespit edilen ilk beş tip olarak belirlenmiştir. HPV tip 18 (%1,6), 31 (%4,7), 40 (%1,6), 45 (%3,1), 54 (%1,6), 56 (%1,6), 61 (%1,6), 62 (%1,6) ve 81 (%3,1) azalan oranda tespit edilmiştir.

Guan ve ark. (116)'nın 2012 yılında yayınladıkları meta analiz çalışmasında, 147 çalışmanın verilerine göre, normal sitolojiye sahip kadınlarda (n=33.154) global HPV prevalansı %12,4 bulunmuştur ve Batı/Orta Asya ve Avrupa'da %8-9'dan fazla, Afrika, Kuzey Amerika, Güney/Orta Amerika ve Okyanusya'da %20'den fazla olduğu tespit edilmiştir.

Dünya genelinde yapılan çalışmalarda, normal sitolojiye sahip kadınlarda HPV DNA prevalansının Amerika'da %6,7-20,8, Avrupa'da %11,3-56,4, Afrika'da %10,5-

47,9 ve Asya'da %7,6-57,1 arasında değiştiği bildirilmiştir. Genel olarak HPV tip 16, 18, 31, 52, 53 ve 66 en yaygın HPV tipleri olarak saptanmıştır. Çizelge 5.1'de dünya genelinde normal sitolojiye sahip kadınlarda tespit edilen HPV tipleri özetlenmiştir (117-132).

Çizelge 5.1. Dünyada genelinde normal servikal sitolojiye sahip kadınlarda HPV DNA çalışmaları.

Ülke	Kaynak no	Yıl	Toplam kişi	Normal sitoloji	HPV DNA prevalansı (%)	Tiplendirme yöntemi	En sık rastlanan HPV tipleri
Avrupa							
İtalya	117	2004-2006	9947	9148	1037 (11,3)	PZR	16, 31,18, 56, 39
İspanya	118	2006-2010	2461	1656	334 (31)	PZR-Dot Blot Hibridizasyon	16, 53, 31, 6, 52
Fransa	119	2008-2010	785	302	146 (48,3)	DNA Mikroarray Testi	16, 53, 51, 31, 18
Romanya	120	2006-2008	460	285	161 (56,4)	Line Blot Assay	16, 51, 18, 66, 53
Kuzey İrlanda	121	2009-2011	5712	5068	670 (13,2)	Real-Time PZR	16, 31, 51, 59, 52
Afrika							
Gine	122	2006	831	752	360 (47,9)	EIA Line Blot Assay	16, 45, 52, 66
Kenya	123	2002-2004	496	454	183 (40,3)	Line Blot Assay	16, 58, 53, 18, 52
Nijerya	124	-	1282	962	113 (10,5)	Dot Blot Hibridizasyon	31, 52, 58, 16, 35
Tanzanya	125	2008-2009	3603	3235	478 (14,8)	Line Blot Assay	16, 51, 35, 66, 18
Amerika							
Meksika	126	1996-1999	1340	1248	178 (14,2)	Line Blot Assay	16, 53, 31, 18
Belize	127	2007	463	426	43 (10,1)	PZR-Luminex xMAP	18, 66, 16, 45, 52
Brezilya	128	2009	440	418	28 (6,7)	PZR-RFLP	16, 66, 31, 70
Asya							
Japonya	129	2006	1039	908	237 (26,1)	Line Blot Assay DNA-EIA HPV 16/18 Spesifik PZR	52, 16, 51, 53, 18
Tayland	130	2008-2009	1662	1495	127 (7,6)	DNA Dizi Analizi	16, 90, 71, 6, 52
Kore	131	2008-2010	7014	6681	1153 (17,3)	HPV DNA Chip	16, 58, 52, 18, 35
Çin	132	2010-2011	384	84	48 (57,1)	PZR-Mikroarray	16, 6, 52, 58
EIA: Enzim İmmunoassay							
RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism							

Servikal kanserin gelişiminde HR-HPV tipleri ile infeksiyon rol oynamaktadır. Özellikle tüm dünyada HR-HPV tiplerinden HPV tip 16 hem normal sitolojiye sahip kadınlarda hem de servikal kanser vakalarında en yaygın tespit edilen tiptir (116-123,125,126,128,130-137).

Bruni ve ark. (133)'nin 2010 yılında yayınladıkları meta analiz çalışmasında, dünya genelinde normal sitolojili 215.568 kadında %3,2 ile HPV tip 16 ilk sırada bulunurken, %1,4 ile HPV tip 18 ikinci sırada ve azalan sıklıklarla HPV tip 52 (%0,9), 31 (%0,8) ve 58 (%0,7) en yaygın bulunan tipler olarak saptanmıştır.

Miranda ve ark. (134)'nin Birezilya'da 18-65 yaş aralığındaki 399 normal sitolojili kadında RFLP yöntemini kullanarak yaptıkları çalışmada %46 oranı ile HPV tip 16 ilk sırada tespit edilirken, HPV tip 6 (%16), 61 (%12), 83 (%7) ve 66 (%5) en yaygın görülen HPV tipleri olarak saptanmıştır.

Martin ve ark. (135)'nin İspanya'da 2006-2010 tarihleri arasında 15-75 yaş aralığında olan normal sitolojili 1656 kadında, HPV PZR (PGMY09/PGMY11 primer seti) ve reverse dot-blot hibridizasyon yöntemini kullanarak yaptıkları çalışmada %21 oranı ile HPV tip 16 (%21) ilk sırada tespit edilirken, HPV tip 53 (%16), 6 (%10), 31 (%10) ve 52 (%8) en yaygın görülen HPV tipleri olarak tespit edilmiştir. Çalışmamızda en yüksek oranda (%25) bulduğumuz HPV tip 66 ise bu çalışma %6 oranında tespit edilmiştir.

Colin ve ark. (136)'nin Meksika'nın farklı bölgelerinde 18-81 yaş aralığındaki normal sitolojiye sahip toplam 671 kadında, dizi analizi yöntemini ile ilk sırada HPV tip 16 (%27,9) saptanırken, bunu HPV tip 18 (%9,7), 58 (%9,3), 11 (%6,9) ve 53 (%6,5) izlemiştir. Bu çalışmada, bizim çalışmamızda olduğu gibi HPV tiplerinin belirlenmesinde dizi analizi yöntemi kullanılmasına rağmen HPV tip 66 %0,8'lik düşük bir oranda tespit edilmiştir.

Dobec ve ark. (137)'nin İsviçre'de 16-88 yaş aralığında olan normal sitolojiye sahip 680 kadında, linear array (LA) HPV genotyping test yöntemi kullandıkları çalışmada HPV tip 16 (%12) ilk sırada tespit edilirken, HPV tip 31 (%9,4), 52 (%6), 51 (%5,1) ve 66 (%5) en yaygın görülen HPV tipleri olarak saptanmıştır.

Normal sitolojiye sahip kadınlarda özellikle HPV tip 16 ve 18 gibi onkogenik HPV tiplerinin tespit edilmesi, prekürsör lezyonların yanı sıra ileride meydana gelebilecek servikal kanser vakalarının bir işareti olabilir.

Castle ve ark. (138)'nin 1989 ve 2006 tarihleri arasında HPV DNA testinin, kadınlarda servikal kanser riskinin belirlenmesindeki rolünü tespit etmek amacıyla 18.450'si normal sitolojili ve 1062'si (630 ASCUS'lu, 381 LSIL'li, 51 HSIL'li) anormal sitolojili toplam 19.512 kadını dahil ettikleri çalışmada HCII yöntemi

kullanılmıştır. Normal sitolojiye sahip kadınlarda %12,1 oranında HPV DNA pozitifliği tespit edilmiştir. Bu kadınların %13,8'nin HPV tip 16, %4,9'unun HPV tip 18 ve %81,3'ünün diğer HR-HPV tipleri ile infekte olduğu belirlenmiştir. Yapılan 18 yıllık takip sonucunda normal sitolojiye sahip HPV tip 16 tespit edilen kadınların %20,53'ünün sitolojisinin CIN II'ye, %13,70'inin CIN III'e ilerlediği tespit edilmiştir. HPV tip 18 tespit edilen kadınların ise %10,74'ünün sitolojisinin CIN II'ye, %6,44'ünün CIN III'e ve diğer HR-HPV tipleri tespit edilen kadınların ise %4,68'inin sitolojisinin CIN II'ye, %2,30'unun CIN III'e ilerlediği tespit edilmiştir. Sonuç olarak normal sitolojiye sahip HPV tip 16 ve 18 ile infekte kadınların diğer HPV tipleri ile infekte kadınlara oranla daha yüksek oranda servikal kanser riski taşıdıkları belirlenmiştir. Anormal sitolojiye sahip kadınlarla karşılaştırılma yapıldığında ise aynı oranda servikal kanser riski oluşturduğu anlaşılmıştır.

Çalışmamızda, Munoz ve ark. (21)'nin yaptıkları sınıflandırmaya göre %33 (21/64) oranında HR-HPV tipi tespit edilmiştir. HR-HPV tiplerinin %67'sini (14/21) HPV tip 16 oluştururken, bunu sırasıyla HPV tip 31 (%14), 45 (%9), 18 (%5) ve 56 (%5) izlemiştir. Çalışmamızda en yüksek oranda tespit ettiğimiz HPV tip 66, HPV tip 53 ile birlikte olası HR-HPV tipleri içinde gruplandırılmış ve bu grup %34 (22/64) oranında tespit edilmiştir. LR-HPV grubunda yer alan HPV tip 6, 40, 54 ve 61 ise %16 (10/64) oranında saptanmıştır. Ayrıca tespit ettiğimiz HPV tip 62 ve 83 ise bu sınıflamada herhangi bir grupta yer almamaktadır.

Ülkemizde normal sitolojiye sahip kadınlardaki HPV prevalansı ile ilgili epidemiyolojik veriler sınırlıdır. Yapılan çalışmalardaki hasta popülasyonunu, genellikle hastaneye gelen hastalardan seçildiğinden dolayı elde edilen veriler toplum taraması niteliğinde değildir. Ülkemizde yapılan çalışmalara göre, normal servikal sitolojiye sahip kadınlarda HPV DNA pozitiflik oranı %5 ile %63 arasında değişmektedir. Çizelge 5.2'de ülkemizde yapılan çalışmalar ve sonuçları özetlenmiştir (139-147).

Çizelge 5.2. Türkiye’de normal servikal sitolojiye sahip kadınlarda HPV DNA çalışmaları

Araştırmacılar	Şehir	Yıl	Toplam kişi	Normal sitoloji	HPV DNA prevalansı (%)	Tiplendirme yöntemi	En sık rastlanan HPV tipleri
Dursun ve ark.	Ankara	2004-2008	403	310	62 (20)	DNA Dizi Analizi	16, 6, 18, 11, 45
Altun ve ark.	Adana	2006-2008	460	457	23 (5)	PZR	16, 45, 18, 31
Akyar ve ark.	İstanbul	2007-2010	1014	459	289 (63)	DNA Dizi Analizi	6, 16, 18, 31, 56
Eren ve ark.	İstanbul	2008	492	405	64 (15,8)	Line Blot Assay	%73,4 HR HPV
Kasap ve ark.	İzmir	2006-2009	642	546	175 (32,1)	Line Blot Assay	%74,3 HR HPV %25,7 LR HPV
Bayram ve ark.	Gaziantep	2009-2010	520	234	30 (12,8)	Dot Blot Hibridizasyon	18, 16, 6, 59, 54
Yüce ve ark.	Ankara	2008-2010	890	640	137 (21,4)	Dizi Analizi	16, 31, 51, 42, 33
Demir ve ark.	Ankara Adana Elazığ İstanbul Niğde	2010-2011	582	530	95 (17,9)	Line Blot Assay	16, 6, 45, 62, 31
Aybike ve ark.	İstanbul(1) Ankara (2)	2008-2010	2161	2040	167 (8,2)	PZR	6, 18,16, 11, 52, 45, 51, 59

Akyar ve ark. (141)’nın 2007-2010 tarihleri arasında İstanbul’da yaptıkları bir çalışmada, ailesinde servikal kanser öyküsüne sahip olan 15-68 yaş aralığındaki 1014 kadında HPV tiplerinin dağılımı ile moleküler ve sitolojik sonuçlar arasında bir ilişkinin olup olmadığını araştırmışlardır. HPV DNA varlığını tespit etmek için MY09/11 ve GP5+/6+ primerleri ile yapılan nested-PZR yöntemi kullanılmış ve HPV DNA saptanan örneklerin tiplendirilmesi dizi analiziyle yapılmıştır. Çalışmaya dahil edilen normal sitolojili 459 (%45,3) ve anormal sitolojili 555 (%54,7) kadında %69,6 oranında HPV pozitifliği tespit edilmiştir. Normal servikal sitolojiye sahip 459 kadının %63’ünde HPV pozitifliği saptanmış ve HPV tip 6 (%16,6), 16 (%16,3), 18 (%9,7), 31 (%5,5) ve 56 (%5,5) en yaygın görülen HPV tipleri olarak tespit edilmiştir. Anormal sitolojiye sahip kadınlarda HPV prevalansı %75,1 oranında bulunmuş ve bu kadınların 369’u ASCUS’lu, 3’ü ASC-H’li, 170’i LSIL’li ve 13’ü HSIL’li olup sırasıyla %65,6, %33,3, %94,7, %100 oranında HPV DNA tespit edilmiştir. En yaygın tespit edilen tipler ise HPV tip 16 (%23,3), 6 (%9,6), 31 (%7,2), 18 (%6,7) ve 53 (%4,8)’dür. HPV DNA tespitinde ve tiplendirilmesinde bizim çalışmamızda kullandığımız yöntem kullanılmasına rağmen yaptığımız literatür taramaları sonucunda Türkiye’de normal

sitolojiye sahip kadınlarda en yüksek HPV pozitifliği bu çalışmada tespit edilmiştir. Bunun nedeninin bu çalışmada hasta grubu olarak ailesinde servikal kanser öyküsüne sahip olan bireylerin tercih edilmesinden kaynaklandığı düşünülebilir.

Altun ve ark. (140)'nın Adana'da 2006 ve 2008 tarihleri arasında HPV prevalansını araştırdıkları çalışmada; 20-68 yaş aralığında bulunan 457'si normal sitolojili (%99,4) ve 3'ü (2 ASCUS'lu, 1 LSIL'li) anormal sitolojili toplam 460 kadında, MY09/11 ve GP5+/6+ primerleri ile yaptıkları konsensus PZR yöntemi ile %5,2 oranında HPV pozitifliği tespit etmişlerdir. HPV DNA pozitif bulunan örnekler HPVpU-1M/pU-2R ve HPVpU-31B/pU-2R primerleri ile sırasıyla yüksek riskli (HPV tip 16, 18, 31, 33, 52 ve 58) ve düşük riskli (HPV tip 6 ve 11) tipler olarak tanımlanmıştır. Ayrıca tespit edilen HR HPV tipleri, HPV 16, 18, 31 ve 45 için tip spesifik PZR ile genotiplendirilmiştir. HPV DNA pozitif bulunan 24 örneğin 14 (%58,3)'ünde tek veya multipl infeksiyon şeklinde yüksek riskli HPV tipi ve 10 (%41,7)'unda düşük riskli HPV tipi bulunmuştur. HR HPV pozitif bulunan toplam 16 örneğin %50'si HPV tip 16, %31,3'ü HPV tip 45, %6,3'ü HPV tip 18, %6,3'ü HPV tip 31 olarak tespit edilirken bir örnek tiplendirilememiştir. En yüksek HPV pozitifliği %9,9 oranla 30-39 yaşları arasında saptanırken, 40-49 yaş arasında bu oranının %4,3'e düştüğü ve 50-59 yaş arasında %6,8 ile ikinci bir pik yaptığı tespit edilmiştir. Ayrıca çalışmaya dahil edilen kadınların demografik özellikleri incelendiğinde medeni hal ve sigara kullanımı ile HPV prevalansı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanırken yaş, eğitim düzeyi ve OKS kullanımı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanamadığı belirtilmiştir.

Çalışmamızda tespit ettiğimiz HPV prevalansı, ülkemizde Demir ve ark., Eren ve ark., Yüce ve ark., Dursun ve ark.'nın bulduğu oranlarla uyumlu bulunurken, Bayram ve ark., Altun ve ark, Abike ve ark.'nın bulduğu oranlardan yüksek, Kasap ve ark., Akyar ve ark.'nın bulduğu oranlardan ise düşük olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 5.2). Bunun nedeninin kullanılan yöntem, hasta populasyonu ve bölgesel farklılıktan kaynaklandığı düşünülebilir.

Ülkemizde HPV genotiplerinin araştırıldığı çalışmalarda normal sitolojiye sahip kadınlarda ilk sırada genellikle HPV tip 16 tespit edilirken, daha düşük oran ile HPV tip 6, 18 ve 31 en yaygın bulunan HPV tipleri olarak bulunmuştur (139-147). Bizim çalışmamızda ise HPV tip 16 %21,9 oran ile ikinci sırada tespit edilirken, %25 oranda

en fazla tespit ettiğimiz HPV tip 66 ise bazı çalışmalarda ya hiç saptanamamıştır ya da çok düşük oranlarda saptanmıştır. Bunun nedeninin çalışmalarda kullanılan yöntemlerin sınırlı sayıda HPV tiplerini tespit edebilmesinden ve HPV tiplerinin dağılımının coğrafi olarak farklılık göstermesinden kaynaklandığı düşünülebilir.

Çalışmamızda HPV pozitif bulunan kadınların yaşları 22 ile 67 arasında olup, en fazla HPV DNA pozitifliği %34,4 oranla 35-45 yaş arasında tespit edilmiştir. HPV DNA pozitifliğinin 45-55 yaş arasında %31,3'e, 55 yaş üzerinde %7,8'e düştüğü görülmüştür. 35 yaş altı kadınlarda ise HPV DNA pozitifliğinin %26,6 olduğu tespit edilmiştir. Yurt dışında yapılan çalışmalarda HPV DNA pozitifliği en yüksek oranda 30 yaş altı kadınlarda tespit edilirken, ülkemizde yapılan çalışmalarda en yüksek oran 30-40 yaş arası kadınlarda tespit edilmiştir (133,134).

Sigara, cinsel aktivitenin erken yaşta başlaması, uzun süreli OKS kullanımı, immun yetmezlik, çok sayıda cinsel eşe sahip olma, diğer cinsel yolla geçen infeksiyonların varlığı gibi faktörler servikal karsinogeneizde rol oynamaktadır (75).

Çalışmamızda sigara kullanım süreleri ile HPV DNA pozitifliği arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p=0,389$). Sigaranın servikal kanser için risk faktörü olduğu hipotezi 1977 yılında Winkelsteina tarafından ortaya atılmıştır ve daha sonra yapılan epidemiyolojik çalışmalarla da desteklemiştir. Sigara içmek, servikte langerhans hücrelerinin ve bağışıklık fonksiyonlarının bazı etkilerinin azalması ile lokal immun sistemi etkileyebilmektedir. Sigara içen kadınların serviksinde nikotin türevlerinin ve dökülen servikal hücrelerde genotoksik hasarların saptanması mümkündür (148). Rotell-Martins ve ark. (149)'nın Brezilya'da yaptıkları çalışmada HR HPV tiplerinin prevalansının, sigara kullananlarda kullanmayanlara göre anlamlı derecede yüksek olduğunu saptanmıştır. Nielsen ve ark. (150)'nin Danimarkalı kadınlarda HR HPV infeksiyonlarını araştırdıkları kohort çalışmasında, sigara kullanımı ile HR HPV infeksiyonu arasında anlamlı bir ilişki bulunmadığı bildirilmiştir. Ülkemizde Kasap ve ark. (143), Altun ve ark. (140) HPV pozitifliği ile sigara kullanımı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunduğunu tespit etmişlerdir.

HPV cinsel yolla bulaşan infeksiyonların en yaygın nedenlerinden biri olmasına rağmen çalışmamızda HPV DNA pozitif ve HPV DNA negatif kadınların partner sayıları incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir ($p=0,141$). Giambi ve ark. (151)'nin İtalya'da 1102 kadında yaptıkları çalışmada, yaşam

boyunca birden fazla partnerle birliktelik ile HR HPV infeksiyonu arasında anlamlı bir ilişki tespit edilmiştir. Roura ve ark. (152)'nin İspanya'da yaptıkları çalışmada, partner sayısı ile HPV pozitifliği arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğunu tespit etmişlerdir ve dört ya da daha fazla partnerle birlikte olmanın tek partner ile birlikte olmaya göre HPV infeksiyonuna yakalanma riskini dört kat artacağını bildirmişlerdir.

Çalışmamızda HPV DNA pozitif ve HPV DNA negatif kadınların ilk koit yaşları incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p=0,626$). Çalışmamızda %51,6 oran ile HPV DNA pozitifliği koit yaşı 20-29 arasında olanlarda ilk sırada tespit edilmiştir. Clarke ve ark. (153) yaptıkları çalışmada 15-24 yaş arasında cinsel aktivitenin başlanması ile HPV infeksiyonu arasında güçlü bir ilişki olmamasına rağmen risk faktörü olabileceğini bildirmişlerdir.

Çalışmamızda HPV DNA pozitif ve HPV DNA negatif kadınların OKS kullanıp- kullanmamaları ve kullanım süreleri incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır ($p=0,513$). Li ve ark. (154)'nin yaptıkları çalışmada, OKS kullanımının HPV infeksiyonunun yerleşmesinde bir risk faktörü olmadığını bildirmişlerdir. Schmeink ve ark. (155)'nin yaptıkları çalışmada, OKS kullanan ve kullanmayanlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmediği bildirilmiştir. Ayrıca OKS kullanımının; HPV prevalansına, insidansına ve persistansına hiçbir etkisinin olmadığını belirtilmiştir. Ülkemizde Altun ve ark. (140)'nin yaptığı çalışmada HPV DNA pozitifliği ile OKS kullanımı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmediği bildirilmiştir.

Çalışmamızda HPV DNA pozitif ve HPV DNA negatif kadınların eğitim seviyeleri, ekonomik durumları, jinekolojik muayene sıklıkları, smear hakkında bilgileri ve takipleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Bu faktörler piramidin basamakları gibi birbirleriyle bağlantılıdır ve piramidin temelinde eğitim bulunmaktadır. Pista ve ark. (156)'nin yaptığı çalışmada düşük eğitim seviyesinin HPV infeksiyonunda risk faktörü olduğu bildirilmiştir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Servikal kanser, tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de kadın genital kanserleri içinde önemli bir yer tutmaktadır. Günümüzde, HPV tiplerinin, servikal kanserler ve prekürsör lezyonları ile olan ilişkisi bilinmektedir. Servikal kansere neden olan HPV tiplerinin dünyadaki coğrafi dağılımı bölgelere göre farklılıklar göstermektedir ve çeşitli ülkelerde HPV tiplerinin prevalans çalışmaları yapılmış olmasına rağmen ülkemizde bu konuyla ilgili fazla çalışma yoktur.

Çalışmamızda normal sitolojiye sahip kadınlarda %19,9 (64/322) oranında HPV pozitifliği saptanmıştır. Yaş gruplarına göre, en fazla HPV DNA pozitifliği %34,4 oranla 35-45 yaş arasında tespit edilmiştir. HPV DNA pozitifliğinin 45-55 yaş arasında %31,3'e, 55 yaş üzerinde %7,8'e düştüğü görülmüştür. 35 yaş altı kadınlarda ise HPV DNA pozitifliğinin %26,6 olduğu tespit edilmiştir. HPV DNA pozitif bulunan olgularda ise 14 farklı HPV genotipi tanımlanmıştır ve HPV tip 66 %25 oran ile ilk sırada tespit edilirken HPV tip 16 (%21,9), 6 (%10,9), 53 (%9,7) ve 83 (%7,8) sırasıyla en fazla tespit edilen tipler olarak saptanmıştır. HPV tip 66 ve 53 en fazla 35-45 yaş aralığında, HPV tip 6 ve 16 en fazla 45-55 yaş aralığında, HPV tip 83 ise 35-45 ve 45-55 yaş aralığında aynı oranda tespit edilmiştir.

Normal sitolojiye sahip kadınlarda özellikle HPV tip 16 ve 18 gibi onkojenik HPV tiplerinin tespit edilmesi, prekürsör lezyonların yanı sıra ilerde meydana gelebilecek servikal kanser vakalarının bir işareti olabilir. Bu hastaların düzenli aralıklarla takibinin yapılması ilerde oluşabilecek servikal kanser olgularının önlenmesini sağlayabilir.

Ayrıca çalışmaya dahil edilen kadınların yaş, eğitim düzeyi, medeni hal, aylık gelir, partner sayısı, smear takip, RİA, OKS ve sigara kullanımı gibi demografik özellikleri incelendiği zaman bu vriler ile HPV prevalansı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır.

HPV ile infekte olmuş hastaların tespiti, servikal kanser ilişkili HPV tipleri ile infekte hastaların belirlenmesi, gerekli tedavilerinin yapılması, muhtemel servikal kanser vakalarının engellenmesi ve aşı çalışmaları açısından önem taşımaktadır. Çalışma sonucu elde edilen bulguların konu ile ilgili ülkemizde ve dünyada yapılacak

alışmalar için kaynak olacağı ve bu sonuçların lkemizde HPV prevalansının ve HPV tiplerinin belirlenmesi için önemli katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. **Mammas IN, Sourvinos G, Spandidos DA.** Human papilloma virus (HPV) infection in children and adolescents. *Eur J Pediatr*, **2009**; 168(3):267-273.
2. **Fernandes JV, Araújo JMG, Fernandes TAAM.** Biology and natural history of human papillomavirus infection. *Open Access J Clin Trials*, **2013**; 5:1-12.
3. **Zandberg DP, Bhargava R, Badin S, Cullen KJ.** The role of human papillomavirus in nongenital cancers. *Ca Cancer J Clin*, **2013**; 63(1):57-81.
4. **Salih MM, El Safi M, Hart K, Tobi K, Adam I.** Genotypes of human papilloma virus in Sudanese women with cervical pathology. *Infect Agent Cancer*, **2010**; 5(1):26.
5. **Tjalma WA, Arbyn M, Paavonen J, van Waes TR, Bogers JJ.** Prophylactic human papillomavirus vaccines: the beginning of the end of cervical cancer. *Int J Gynecol Cancer*, **2004**; 14(5):751-761.
6. **Yarkın F, Vardar MA.** HPV immunolojisi ve natürel enfeksiyonlar. *Türkiye Klinikleri J Gynecol Obst-Special Topics*, **2009**; 2(1):43-47.
7. **Moscicki AB.** HPV vaccines: today and in the future. *J Adolesc Health*, **2008**; 43(4):26-40.
8. **zur Hausen H.** Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account. *Virology*, **2009**; 384(2):260-265.
9. **Onon TS.** History of human papillomavirus, warts and cancer: what do we know today?. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, **2011**; 25(5):565-574.
10. **Syrjänen S, Syrjänen K.** The history of papillomavirus research. *Cent Eur J Public Health*, **2008**; 16:7-41.
11. **Frazer IH.** Human Papillomaviruses. *Vaccines: A Biography*, **2010**; 361-373.
12. **zur Hausen H.** Q&A: On the case. Interview by Michelle Grayson. *Nature*, **2012**; 488(7413):16.
13. **Kalland KH, Ke XS, Øyan AM.** Tumour virology – history, status and future challenges. *APMIS*, **2009**; 117(5-6):382-399.
14. **Echenique I, Phillips BR.** Anal warts and anal intradermal neoplasia. *Clin Colon and Rectal Surg*, **2011**; 24(1):31-38.

15. **Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H.** Classification of papillomaviruses. *Virology*, **2004**; 324(1):17- 27.
16. **Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA.** Papillomavirus'lar. Çeviri Editörü: Yenen OŞ, *Lange*,1.baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri, **2009**: 597-600.
17. **Castillo A.** HPV infection and carcinogenesis in the upper aero-digestive tract. *Colomb Med*, **2011**; 42(2):233-242.
18. **Doorbar J, Quint W, Banks L, Bravo IG, Stoler M, Broker TR, Stanley MA.** The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine*, **2012**; 30(5):F55-F70.
19. International Committee on Taxonomy of Viruses. Erişim: <http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2012>. Erişim Tarihi: 20/03/2013.
20. **White EA, Howley PM.** Proteomic approaches to the study of papillomavirus-host interactions. *Virology*, **2013**; 435(1):57-69.
21. **Munoz N, Bosch FH, Sanjose SD,Herrero R, Castellsague X, Shah KV, Snijders PJF, Meijer KJLM.** Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*, **2003**; 348(6):518-527.
22. **Jastreboff AM, Cymet T.** Role of the human papilloma virus in the development of cervical intraepithelial neoplasia and malignancy. *Postgrad Med J*, **2002**;78(918):225-228.
23. **Cai Q, Lv L, Shao Q, Li X, Dian A.** Human papillomavirus early proteins and apoptosis. *Arch Gynecol Obstet*, **2013**; 287(3):541-548.
24. **Howley PM, Lowy DR.** Papillomaviruses and their replication. In: Fields BN, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE, Knipe DM, Howley PM. Eds. *Field's Virology*. Vol. 2, 4th Ed., Philadelphia: Lippincott Williams &Wilkins, **2001**:2197–2230.
25. **Yue Y, Yang H, Wu K, Yang L, Chen J, Huang X, Pan Y, Ruan Y, Zhao Y, Shi X, Sun Q, Li X.** Genetic Variability in L1 and L2 Genes of HPV-16 and HPV-58 in Southwest China. *PloS One*, **2013**; 8(1):e55204.
26. **Pfischer H.** Virology and pathogenesis. In: Pfischer H. Eds. *Prophylaxis and Early Detection of HPV-RelatedNeoplasia*, 1st Ed., Germany: Karger, **2012**: 1-11.
27. **McCance D.** Papillomaviruses. In: Zuckerman AJ, Banatvala JE, Schoub BD, Griffiths PD, Mortimer P. Eds. *Principles and Practice of Clinical Virology*, 6th Ed., Chichester UK: John Wiley & Sons, **2009**: 807-823.
28. **Klymenko T and Graham SV.** Human papillomavirus gene expression is controlled by host cell splicing factors. *Biochem. Soc. Trans*, **2012**; 40(4):773-777.

29. **Montoya-Durango DE, Ramos KS.** HPV E7 viral oncoprotein disrupts transcriptional regulation of L1Md retrotransposon. *FEBS Lett*, **2012**; 586(1):102-106.
30. **Moody CA, Laimins LA.** The Life Cycle of Human Papillomaviruses. In: Damaniyas B, Pipas JM. Eds. *DNA Tumor Viruses*, 1st Ed., Newyork: Springer Science&Business Media, **2009**: 75-98.
31. **Venuti A, Paolini F, Nasir L, Corteggio A, Roperto S, Campo MS and Borzacchiello G.** Papillomavirus E5: the smallest oncoprotein with many functions. *Mol Cancer*, **2011**; 10:140.
32. **Brown C, Kowalczyk AM, Taylor ER, Morgan IM and Gaston K.** p53 represses human papillomavirus type 16 DNA replication via the viral E2 protein. *Viol J*, **2008**; 5:5.
33. **Abramo D, Archambault J.** Small molecule inhibitors of human papillomavirus protein – protein interactions. *Open Virol J*, **2011**; 5:80-95.
34. **Lehoux M, Fradet-Turcotte A, Lussier-Price M, Omichinski JG, Archambault J.** Inhibition of human papillomavirus DNA Replication by an E1-derived p80/UAF1-binding peptide. *J Virol*, **2012**; 86(7):3486-3500.
35. **Egawa N, Nakahara T, Ohno S, Narisawa-Saito M, Yugawa T, Fujita M, Yamato K, Natori Y, Kiyono T.** The E1 protein of human papillomavirus type 16 is dispensable for maintenance replication of the viral genome. *J Virology*, **2012**; 86(6):3276-3283.
36. **Muller M, Demeret C.** The HPV E2-host protein-protein interactions: A complex hijacking of the cellular network. *Open Virol J*, **2012**; 6(2):173-189.
37. **Hebner CM, Laiminis LA.** Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. *Rev Med Virol*, **2006**; 16(2):83-97.
38. **Longworth MS, Laiminis LA.** Pathogenesis of human papillomavirus in differentiating epithelia. *Microbiol Mol Biol Rev*, **2004**; 68(2):362-372.
39. **Ding Q, Li L, Whyte P.** Human papillomavirus 18 E1^{E4} protein interacts with cyclin A/CDK 2 through an RXL motif. *Mol Cell Biochem*, **2013**; 373(1-2):29-40.
40. **Thomison J 3rd, Thomas LK, Shroyer KR.** Human papillomavirus: molecular and cytologic/histologic aspects related to cervical intraepithelial neoplasia and carcinoma. *Hum Pathol*, **2008**; 39(2):154-166.
41. **Pang CL, Thierry F.** Human papillomavirus proteins as prospective therapeutic targets. *Microb Pathog*, **2013**; 30(58):55-65.

42. **Pim D, Bergant M, Boon SS, Ganti K, Kranjec C, Massimi P, Subbaiah VK, Thomas M, Tomaić V, Banks L.** Human papillomaviruses and the specificity of PDZ domain targeting. *FEBS J*, **2012**; 279(19):3530-3537.
43. **Howie HL, Katzenellenbogen RA, Galloway DA.** Papillomavirus E6 proteins. *Virology*, **2009**; 384(2):324-334.
44. **Ghittoni R, Accardi R, Hasan U, Gheit T, Sylla B, Tommasino M.** The biological properties of E6 and E7 oncoproteins from human papillomaviruses. *Virus Genes*, **2010**; 40(1):1-13.
45. **McLaughlin-Drubin ME, Münger K.** The human papillomavirus E7 oncoprotein. *Virology*, **2009**; 384(2):335-344.
46. **Yue Y, Yang H, Wu K, Yang L, Chen J, Huang X, Pan Y, Ruan Y, Zhao Y, Shi X, Sun Q, Li Q.** Genetic variability in L1 and L2 genes of HPV-16 and HPV-58 in Southwest China. *PLoS One*, **2013**; 8(1):e55204.
47. **Marigliani B, Kavati EA, Sakauchi D, Oliveira HB, Canali RA, Sasaki AA, Ferreira Jr JMC, Armbruster E, Moraes E, Müller M, Cianciarullo AM.** Intracellular distribution of recombinant Human Papillomavirus capsid proteins. *Current Microscopy Contributions to Advances in Science and Technology* (Electronic Journal), 2012; 5(1):678-684.
Erişim: <http://www.formatex.org/microscopy5/index.html>
48. **Nakao S, Mori S, Kondo K, Matsumoto K, Yoshikawa H, Kanda T.** Monoclonal antibodies recognizing cross-neutralization epitopes in human papillomavirus 16 minor capsid protein L2. *Virology*, **2012**; 434(1):110-117.
49. **Marusic MB, Ozbun MA, Campos SK, Myers MP, Banks L.** Human Papillomavirus L2 Facilitates Viral Escape from Late Endosomes via Sorting Nexin 17. *Traffic*, **2012**; 13(3):455-467.
50. **Muller M, Demeret C.** The HPV E2-Host Protein-Protein Interactions: A Complex Hijacking of the Cellular Network. *Open Virol J*, **2012**; 6(2):173-189.
51. **Miller DL, Puricelli MD, Stack MS.** Virology and molecular pathogenesis of HPV (human papillomavirus) associated oropharyngealsquamous cell carcinoma. *Biochem J*, **2012**; 443(2):339-353.
52. **Klingelhutz AJ, Roman A.** Cellular transformation by human papillomaviruses: lessons learned by comparing high- and low-risk viruses. *Virology*, **2012**; 424(2):77-98.
53. **Nathanson N, Robertson ES.** Viral Oncogenesis: DNA Viruses Viral. In: Nathanson N. Eds. *Viral Pathogenesis and Immunity* 2nd Ed., California: Academic Press&Elsevier, **2007**:158-174.

54. **Stanley M.** Genital human papillomavirus infections: current and prospective therapies. *J Gen Virol*, **2012**; 93(Pt 4):681-691.
55. **Strauss JH, Strauss EG.** *Viruses and Human Disease*. 1st. Ed., Canada: Academic Press, **2002**: 265-270.
56. **Tuncer S.** İnsan Papillomavirusları. In: Çelebi Ş. Eds. *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*, Ankara: Güneş Kitabevi, **1999**:797-803.
57. **Ustaçelebi Ş.** Papilloma virusları ve insan siğilleri. In: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. Eds. *İnfeksiyon Hastalıkları*, İzmir: Nobel Tıp Kitabevleri, **1996**:759-761.
58. **Cardoso JC, Calonje E.** Cutaneous manifestations of human papillomaviruses:A review. *Acta Dermatoven APA*, **2011**; 20(3):145-154.
59. **Bruggink SC, Koning MNC, Gussekloo J, Egberts PF, Schegget JT, Feltkamp MCW, Bavinck JNB, Quint WGV, Assendelft WJJ, Eekhof JAH.** Cutaneous wart-associated HPV types: prevalence and relation with patient characteristics. *J Clin Virol*, **2012**; 55(3):250-255.
60. **Proietti I, Skroza N, Bernardini N, Nicolucci F, Tolino E, Viola GL, Orsini D, Zuber S, Potenza C.** Acitretin in management of diffuse common warts: A case report. *Dermatol Ther*, **2011**; 24(6):581-583.
61. **Howley PM.** Warts, cancer and ubiquitylation: Lessons from the papillomaviruses. *Trans Am Clin Climatol Assoc*, **2006**: 17:113-127.
62. **Kaushal A, Silver S, Kasper K, Severini A, Hamza S, Keynan Y.** Epidermodysplasia verruciformis in an HIV-infected man: A case report and review of the literature. *Top Antivir Med*, **2012**; 20(5):173-179.
63. **Zampetti A, Giurdanella F, Manco S, Linder D, Gnarra M, Guerriero G, Feliciani C.** Acquired epidermodysplasia verruciformis: A comprehensive review and a proposal for treatment. *Dermatol Surg*, **2013**; DOI: 10.1111/dsu.121351 (**Baskıda**).
64. **Schmitt M, Koning MNC, Eekhof JAH, Quint WGV, Pawlita M.** Evaluation of a novel multiplex human papillomavirus (HPV) genotyping assay for HPV types in skin warts. *J Clin Microbiol*, **2011**; 49(9):3262.
65. **Kumaraswamy KL, Vidhya M.** Human papilloma virus and oral infections: An update. *J Cancer Res Ther*, **2011**; 7(2):120-127.
66. **Durzyńska J, Pacholska Bogalska J, Kaczmarek M, Hanć T, Durda M, Skrzypczak M, Goździčka-Józefiak A.** HPV genotypes in the oral cavity/oropharynx of children and adolescents: cross-sectional survey in Poland. *Eur J Pediatr*, **2011**; 170(6):757-76.

67. **Orji FT, Okorafor IA, Akpeh JO.** Experience with recurrent respiratory papillomatosis in a developing country: Impact of tracheostomy. *World J Surg*, **2013**; 37(2):339-343.
68. **de Matos RP, Sichero L, Mansur IM, do Bonfim CM, Bittar C, Nogueira RL, Küpper DS, Valera FC, Nogueira ML, Villa LL, Calmon MF, Rahal P.** Nucleotide and phylogenetic analysis of human papillomavirus types 6 and 11 isolated from recurrent respiratory papillomatosis in Brazil. *Infect Genet Evol*, **2013**; 16:282-289.
69. **Patel H, Wagner M, Singhal P, Kothari S.** Systematic review of the incidence and prevalence of genital warts. *BMC Infect Dis*, **2013**; 13:39.
70. **Gao L, Zhou F, Li X, Yang Y, Ruan Y, Jin Q.** Anal HPV Infection in HIV-positive men who have sex with men from china. *PloS One*, **2010**; 5(12): e15256.
71. **Yanofsky VR, Patel RV, Goldenberg G.** Genital warts a comprehensive review. *J Clin Aesthet Dermatol*, **2012**; 5(6): 26-37.
72. **Ibeanu OA.** Molecular pathogenesis of cervical cancer. *Cancer Biol Ther*, **2011**; 11(3):295-306.
73. **Khorasanizadeh F, Hassanloo J, Khaksar N, Mohammad Taheri S, Marzaban M, Rashidi B, Akbari Sari A, Zendejdel K.** Epidemiology of cervical cancer and human papilloma virus infection among Iranian women analyses of national data and systematic review of the literature. *Gynecol Oncol*, **2013**; 128(2):277-281.
74. **Arbyn M, de Sanjosé S, Saraiya M, Sideri M, Palefsky J, Lacey C, Gillison M, Bruni L, Ronco G, Wentzensen N, Brotherton J, Qiao YL, Denny L, Bornstein J, Abramowitz L, Giuliano A, Tommasino M, Monsonogo J.** EUROGIN 2011 roadmap on prevention and treatment of HPV-related disease. *Int J Cancer*, **2012**; 131(9):1969-1982.
75. **Ramet J, Ezzo D, Meszner Z.** Position paper-HPV and the primary prevention of cancer; improving vaccine uptake by paediatricians. *Eur J Pediatr*, **2011**; 170(3):309-321.
76. **Bodily J, Laimins LA.** Persistence of human papillomavirus infection: keys to malignant progression. *Trends Microbiol*, **2011**; 19(1):33-39.
77. **Herfs M, Yamamoto Y, Laury A, Wang X, Nucci MR, McLaughlin-Drubin ME, Münger K, Feldman S, McKeon FD, Xian W, Crum CP.** A discrete population of squamocolumnar junction cells implicated in the pathogenesis of cervical cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*, **2012**; 109(26):10516-10521.
78. **Boulet GA, Horvath CA, Berghmans S, Bogers J.** Human papillomavirus in cervical cancer screening: important role as biomarker. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **2008**; 17(4):810-817.
79. **Dim CC.** Towards improving cervical cancer screening in Nigeria: a review of the basics of cervical neoplasm and cytology. *Niger J Clin Pract*, **2012**; 15(3):247-252.

80. **Apgar BS, Zoschnick L, Wright TC Jr.** The 2001 Bethesda System terminology. *Am Fam Physician*, 2003; 68(10):1992-1998.
81. **Saxena U, Sauvaget C, Sankaranarayanan R.** Evidence based screening, early diagnosis and treatment strategy of cervical cancer for national policy in low-resource countries: example of India. *Asian Pac J Cancer Prev*, **2012**; 13(4):1699-1703.
82. **Tonolini M, Bianco R.** MRI and CT of anal carcinoma: a pictorial review. *Insights Imaging*, **2013**; 4(1):53-62.
83. **Zou H, Fairley CK, Hocking JS, Garland SM, Grulich AE, Chen MY.** The prevalence of anal human papillomavirus among young HIV negative men who have sex with men. *BMC Infect Dis*, **2012**; 12:341.
84. **Amirian ES, Fickey PA, Scheurer ME, Chiao EY.** Anal cancer incidence and survival: Comparing the greater San-Francisco bay area to other seer cancer registries. *PloS One*, **2013**; 8(3):e58919.
85. **Donà MG, Benevolo M, Vocaturo A, Palamara G, Latini A, Giglio A, Moretto D, Rollo F, Impara G, Ensoli F, Pimpinelli F, Carlo AD, Giuliani M.** Anal cytological abnormalities and epidemiological correlates among men who have sex with men at risk for HIV-1 infection. *BMC Cancer*, **2012**; 12:476.
86. **Schwaiger C, Aruda M, LaCoursiere S, Rubin R.** Current guidelines for cervical cancer screening. *J Am Acad Nurse Pract*, **2012**; 24(7):417-424.
87. Human Papillomavirus (HPV). Erişim: <http://www.cdc.gov/std/hpv/default.htm>. Erişim tarihi:11.03.2013.
88. **Franceschi S.** The IARC commitment to cancer prevention: the example of papillomavirus and cervical cancer. *Recent Results Cancer Res*, **2005**;166:277-297.
89. **Castellsagué X.** Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer. *Gynecol Oncol*, **2008**; 110(3 Suppl 2):4-7.
90. **Brown AJ, Trimble CL.** New technologies for cervical cancer screening. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, **2012**; 26(2):233–242.
91. **Villa LL, Denny L.** Methods for detection of HPV infection and its clinical utility. *Int J Gynecol Obstet*, **2006**; 94(1):71-80.
92. **Nishino HT, Tambouret RH, Wilbur DC.** Testing for human papillomavirus in cervical cancer screening. *Cancer Cytopathol*, **2011**; 119(4):219-227.

93. **Zaravinos A, Mammas IN, Sournivos G, Spandidos DA.** Molecular detection methods of human papillomavirus (HPV). *Int J Biol Markers*, **2009**; 24(4):215-222.
94. **Venuti A, Paolini F.** HPV detection methods in head and neck cancer. *Head Neck Pathol*, **2012**; 6(1):63-74.
95. **Snow AN, Laudadio J.** Human papillomavirus detection in head and neck squamous cell carcinomas. *Adv Anat Pathol*, **2010**; 17(6):394-403.
96. **Abreu LPA, Souza RP, Gimenes F, Consolaro MEL.** A review of methods for detect human Papillomavirus infection. *Virologia*, **2012**; 9:262.
97. **Poljak M, Cuzick J, Kocjan BJ, Iftner T, Dillner J, Arbyn M.** Nucleic acid tests for the detection of alpha human papillomaviruses. *Vaccine*, 2012; 30(5):100-106.
98. **Bory JP, Cucherousset J, Lorenzato M, Gabriel R, Quereux C, Birembaut P, Clavel C.** Recurrent human papillomavirus infection detected with the hybrid capture II assay selects women with normal cervical smears at risk for developing high grade cervical lesions: a longitudinal study of 3,091 women. *Int. J. Cancer*, **2002**; 102(5):519-525.
99. **Jarboe EA, Hunt JP, Layfield LJ.** Cytomorphologic diagnosis and HPV testing of metastatic and primary oropharyngeal squamous cell carcinomas: A review and summary of the literature. *Diagn Cytopathol*, **2012**; 4(6):491-497.
100. **Denny LA, Wright TC Jr.** Human papillomavirus testing and screening. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, **2005**; 19(4):501-515.s
101. **Hogarth S, Hopkins MM, Rodriguez V.** A molecular monopoly? HPV testing, the Pap smear and the molecularisation of cervical cancer screening in the USA. *Sociol Health Illn*, **2012**; 34(2):234-250.
102. **Kawana K, Adachi K, Kojima S, Kozuma S, Fujii T.** Therapeutic Human Papillomavirus (HPV) Vaccines: A Novel Approach. *Open Virol J*, **2012**; 6(2):264-269.
103. **Chen J, Ni G, Liu XS.** Papillomavirus virus like particle-based therapeutic vaccine against human papillomavirus infection related diseases: Immunological problems and future directions. *Cell Immunol*, **2011**; 269(1):5-9.
104. **Pang CL, Thierry F.** Human papillomavirus proteins as prospective therapeutic targets. *Microb Pathog*, **2012**; 30:1-11.
105. **Schiller JT, Castelsague X, Garland SM.** A Review of Clinical Trials of Human Papillomavirus Prophylactic Vaccines. *Vaccine*, **2012**; 30(5):123-138.

106. **Jin XV, Lipold L, Sikon A, Rome E.** Human papillomavirus vaccine: Safe, effective, underused. *Cleve Clin J Med*, **2013**; 80(1):49-60.
107. **Kwak K, Yemelyanova A, Roden RBS.** Prevention of cancer by prophylactic human papillomavirus vaccines. *Curr Opin Immunol*, **2011**; 23(2):244-251.
108. Human Papillomavirus (HPV) Vaccination. Erişim: www.cdc.gov/vaccines/vpd-vac/hpv/default.htm. Erişim tarihi:12.03.2013.
109. Gardasil. Erişim: www.cdc.gov/vaccines/vpd-vac/hpv/vac-faqs.htm. Erişim tarihi:12.03.2013.
110. IPV Conference 2009. Erişim: <http://www.hpv2009.org/>. Erişim tarihi:01.02.2013.
111. **Garnock-Jones KP, Giuliano AR.** Quadrivalent human papillomavirus (HPV) types 6, 11, 16, 18 vaccine: for the prevention of genital warts in males. *Drugs*, **2011**; 71(5):591-602.
112. **Lin CY, Lin RW, You SL, You CM, Chuang LC, Pan MH, Lee MH, Chou YC, Chen CJ.** Quality assurance of genotyping array for detection and typing of human papillomavirus. *J Virol Methods*, **2007**; 140(1-2):1-9.
113. **Tiggelaar SM, Lin MJ, Viscidi RP, Ji J, Smith JS.** Age-specific human papillomavirus antibody and DNA prevalence: A global review. *J Adolesc Health*, **2012**; 50(2):110-131.
114. **Álvarez-Argüelles ME, Melón S, Junquera ML, Boga JA, Villa L, Pérez-Castro S, de Oña M.** Human papillomavirus infection in a male population attending a sexually transmitted infection service. *PLoS One*, **2013**; 8(1):e54375.
115. **Pandey S, Mishra M, Chandrawati.** Human papillomavirus screening in north Indian women. *Asian Pac J Cancer Prev*, **2012**; 13(6):2643-2646.
116. **Guan P, Howell-Jones R, Lil N, Bruni L, Sanjos S, Franceschil S, Clifford GM.** Human papillomavirus types in 115,789 HPV-positive women: A meta-analysis from cervical infection to cancer. *Int J Cancer*, **2012**; 131(10):2349-2359.
117. **Agarossi A, Ferrazzi E, Parazzini F, Perno CF, Ghisoni L.** Prevalence and type distribution of high-risk human papillomavirus infection in women undergoing voluntary cervical cancer screening in Italy. *J Med Virol*, **2009**; 81(3):529-535.
118. **Martín P, Kilany L, García D, López-García AM, Martín-Azaña MJ, Abraira V, Bellas C.** Human papillomavirus genotype distribution in Madrid and correlation with cytological data. *BMC Infect Dis*, **2011**; 11:316.
119. **Casalegno JS, Benchaib M, Le Bail Carval K, Piaton E, Mathevet P, Mekki Y.** Human papillomavirus genotype distribution among French women with and without cervical abnormalities. *Int J Gynaecol Obstet*, **2011**; 114(2):116-119.

120. **Anton G, Peltecu G, Socolov D, Cornitescu F, Bleotu C, Sgarbura Z, Teleman S, Ilescu D, Botezatu A, Goia CD, Huica I, Anton AC.** Type specific human papillomavirus detection in cervical smears in Romania. *APMIS*, **2011**; 119(1):1-9.
121. **Anderson L, O'Rourke R, Jamison J, Wilson R, Gavin A.** Prevalence of human papillomavirus in women attending cervical screening in the UK and Ireland: New data from Northern Ireland and a systematic review and meta-analysis. *J Med Virol*, **2013**; 85(2):295-308.
122. **Keita N, Clifford GM, Koulibaly M, Douno K, Kabba I, Haba M, Sylla BS, van Kemenade FJ, Snijders PJF, Meijer CJLM, Franceschi.** HPV infection in women with and without cervical cancer in Conakry, Guinea. *Br J Cancer*, **2009**; 101(1):202-208.
123. **De Vuyst H, Parisi MR, Karani A, Mandaliya K, Muchiri L, Vaccarella S, Temmerman M, Franceschi S, Lillo F.** The prevalence of human papillomavirus infection in Mombasa, Kenya. *Cancer Causes Control*, **2010**; 21:2309-2313.
124. **Gage JC, Ajenifuja KO, Wentzensen NA, Adepiti AC, Eklund C, Reilly M, Hutchinson M, Wacholder S, Harford J, Soliman AS, Burk RD, Schiffman M.** The age-specific prevalence of human papillomavirus and risk of cytologic abnormalities in rural Nigeria: Implications for screen-and-treat strategies. *Int. J. Cancer*, **2012**; 130(9):2111-2117.
125. **Dartell M, Rasch V, Kahesa C, Mwaiselage J, Ngoma T, Junge J, Gernow A, Ejlersen SF, Munk C, Iftner T, Kjaer SK.** Human papillomavirus prevalence and type distribution in 3603 HIV-positive and HIV-negative women in the general population of Tanzania: The PROTECT Study. *Sex Transm Dis*, **2012**; 39(3):201-208.
126. **Lazcano-Ponce E, Herrero R, Muñoz N, Cruz A, Shah KV, Alonso P, Hernández P, Salmerón J, Hernández M.** Epidemiology of HPV infection among Mexican women with normal cervical cytology. *Int. J. Cancer*, **2001**; 91(3): 412-420.
127. **Cathro HP, Loya T, Dominguez F, Howe SL, Howell R, Orndorff K, Moreno J, Mendez E, Fung PC, Beer NL, Allen P, Sosa AM, Gurka KK, Stoler MH, Frierson Jr HF.** Human papillomavirus profile of women in Belize City, Belize: correlation with cervical cytopathologic findings. *Hum Pathol*, **2009**; 40(7):942-949.
128. **da Silva MC, Martins HPR, de Souza JL, Tognim MCB, Svidzinski TIE, Teixeira JJV, Consolaro MEL.** Prevalence of HPV infection and genotypes in women with normal cervical cytology in the state of Parana, Brazil. *Arch Gynecol Obstet*, **2012**; 286:1015-1022.
129. **Konno R, Tamura S, Dobbelaere K, Yoshikawa H.** Prevalence and type distribution of human papillomavirus in healthy Japanese women aged 20 to 25 years old enrolled in a clinical study. *Cancer Sci*, **2011**; 102(4):877-882.
130. **Chansaenroj J, Lurchachaiwong W, Termrungruanglert W, Tresukosol D, Niruthisard S, Trivijitsilp P, Sampatanukul S, Poovorawan Y.** Prevalence and genotypes of human papillomavirus among Thai women. *Asian Pac J Cancer Prev*, **2010**; 11:117-122.

131. **Kim MJ, Kim JJ, Kim S.** Type-specific prevalence of high-risk human papillomavirus by cervical cytology and age: Data from the health check-ups of 7,014 Korean women. *Obstet Gynecol Sci*, **2013**; 56(2):110-120.
132. **Shen Y, Gong JM, Li YQ, Gong YM, Lei DM, Cheng GM, Li XF.** Epidemiology and genotype distribution of human papillomavirus (HPV) in women of Henan Province, China. *Clin Chim Acta*, **2013**; 415:297-301.
133. **Bruni L, Diaz M, Castellsague X, Ferrer E, Bosch FX, Sanjose S.** Cervical human papillomavirus prevalence in 5 continents: meta-analysis of 1 million women with normal cytological findings. *J Infect Dis*, **2010**; 202(12):1789-1799.
134. **Miranda PM, Pitol BCV, Moran MS, Silva NNT, Felix PM, Lima-Filho JL, Carneiro CM, Silva IDC, Carvalho RF, Lima AA, Beçak W, Stocol RC.** Human papillomavirus infection in Brazilian women with normal cervical cytology. *Genet Mol Res*, **2012**; 11 (2):1752-1761.
135. **Martín P, Kilany L, García D, López-García AM, Martín-Azaña MJ, Abaira V, Bellas C.** Human papillomavirus genotype distribution in Madrid and correlation with cytological data. *BMC Infectious Diseases*, **2011**; 11:316.
136. **Orozco-Colín A, Carrillo-García A, Méndez-Tenorio A, Ponce-de-León S, Mohar A, do-Rodríguez RM, Guerra-Arias R, Flores-Gil O, Sotelo-Regil R, Lizano M.** Geographical variation in human papillomavirus prevalence in Mexican women with normal cytology. *Int J Infect Dis*, **2012**; 14(2):1082-1087.
137. **Dobec M, Bannwart F, Kaeppli F, Cassinotti P.** Automation of the linear array HPV genotyping test and its application for routine typing of human papillomaviruses in cervical specimens of women without cytological abnormalities in Switzerland. *J Clin Virol*, **2009**; 45:23-27.
138. **Castle PE, Glass AG, Rush BB, Scott DR, Wentzensen N, Gage JC, Buckland J, Rydzak G, Lorincz AT, Wacholder S.** Clinical human papillomavirus detection forecasts cervical cancer risk in women over 18 years of follow-up. *J Clin Oncol*, **2012**; 30(25):3044-3050.
139. **Dursun P, Senger SS, Arslan H, Kuscu E, Ayhan A.** Human papillomavirus (HPV) prevalence and types among Turkish women at a gynecology outpatient unit. *BMC Infectious Diseases*, **2009**; 9:191.
140. **Altun Z, Yarkın F, Vardar MA, Uğuz AH.** Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesine Başvuran Kadınlarda Genital Human Papilomavirus Enfeksiyon Prevalansı. *Turkiye Klinikleri J Med Sci*, **2011**; 31(2):307-314.
141. **Human Papillomavirus prevalence and type in liquid-based cervical samples from Turkish women in a selected risk group.** Erişim: <http://www.textcheck.com/certificate/9DsFVL>. Erişim tarihi: 08.03.2013.

142. **Eren F, Erenus M, Bas E, Ahiskali R, Yoldemir T.** Prevalence of HPV infection by cytologic diagnosis and HPV DNA extraction and prevalence of the HPV genotypes detected in urban Turkish women. *Int J Gynaecol Obstet*, **2010**; 109:235-238.
143. **Kasap B, Yetimlar H, Keklik A, Yıldız A, Çukurova K, Soylu F.** Prevalence and risk factors for human papillomavirus DNA in cervical cytology. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, **2011**; 159:168-171.
144. **Bayram A, Erkiş S, Balat Ö, Ekşi F, Uğur MG, Öztürk E, Kaya G.** Prevalence and genotype distribution of human papillomavirus in non-neoplastic cervical tissue lesion: Cervical erosion. *J Med Virol*, **2011**; 83:1997-2003.
145. **Yüce K, Pınar A, Salman MC, Alp A, Sayal B, Doğan S, Haşcelik G.** Detection and genotyping of cervical HPV with simultaneous cervical cytology in Turkish women: a hospital-based study. *Arch Gynecol Obstet*, **2012**; 286:203-208.
146. **Tamburacı Demir A, Ceyhan M, Simsek M, Gündüz T, Arlier S, Aytaç R, Aycan AE, Gürbüz V.** The prevalence of different HPV types in Turkish women with a normal pap smear. *J Med Virol*, **2012**; 84:1242-1247.
147. **Abike F, Bingöl B, Yılmaz A, Temizkan O, Tapısız ÖL, Dunder İ.** HPV infection and HPV subtypes in normal and abnormal cervical cytology in Turkish women. *Journal of Virology & Microbiology*, **2013**; DOI:10.5171/2013.640873.
148. **Plummer M, Herrero R, Franceschi S, Meijer CJLM, Snijders P, Bosch FX, de Sanjose S, Munoz N.** Smoking and cervical cancer: pooled analysis of the IARC multi-centric case-control study. *Cancer Causes Control*, **2003**; 14:805-814.
149. **Rotell-Martins CM, Panetta K, Alves VA, Siqueira SA, Syjanen KJ, Derchain SF.** Cigarette smoking and high risk HPV DNA as predisposing factors for high grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN) in young Brazilian women. *Acta Obstet Gynecol Scand*, **1998**; 77(6):678-682.
150. **Nielsen A, Kjaer SK, Munk C, Osler M, Iftner T.** Persistence of high-risk human papillomavirus infection in a population-based cohort of Danish women. *J Med Virol*, **2010**; 82:616-623.
151. **Giambi C, Donati S, Carozzi F, Salmaso S, Declich S, Atti ML, Ronco G, Alibrandi MP, Brezzi S, Collina N, Franchi D, Lattanzi A, Minna MC, Nannini R, Barretta E, Burroni E, Gillio-Tos A, Macallini V, Pierotti P, Bella A.** A cross-sectional study to estimate high risk human papillomavirus prevalence and type distribution in Italian women aged 18-26 years. *BMC Infect Dis*, **2013**; 13:74.
152. **Roura E, Iftner T, Vidart JA, Kjaer SK, Bosch FX, Muñoz N, Palacios S, Rodriguez MS, Morillo C, Serradell L, Torcel-Pagnon L, Cortes J, Castellsagué X.** Predictors of human papillomavirus infection in women undergoing routine cervical cancers screening in Spain: the CLEOPATRE study. *BMC Infect Dis*, **2012**; 12:145.

153. **Clarke MA, Gage JC, Ajenifuja KO, Wentzensen NA, Adepiti AC, Wacholder S, Burk RD, Schiffman M.** A population-based cross-sectional study of age specific risk factors for high risk human papillomavirus prevalence in rural Nigeria. *Infect Agent Cancer*, **2011**; 6:12.
154. **Li C, Wu M, Wang J, Zhang S, Zhu L, Pan J, Zhang W.** A population-based study on the risks of cervical lesion and human papillomavirus infection among women in Beijing, People's Republic of China. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **2010**;19(10):2655-2664.
155. **Schmeink CE, Massuger LF, Lenselink CH, Quint WG, Melchers WJ, Bekkers RL.** Effect of the menstrual cycle and hormonal contraceptives on human papillomavirus detection in young, unscreened women. *Obstet Gynecol*, **2010**; 116(1):67-75.
156. **Pista A, de Oliveira CF, Cunha MJ, Paixao MT, Real O.** Risk factors for human papillomavirus infection among women in Portugal: the CLEOPATRE Portugal Study. *Int J Gynaecol Obstet*, **2012**;118(2):112-116.

EKLER

EK-1

GÖNÜLLÜ BİLGİ FORMU

Adı/Soyadı:.....				
Telefon:				
Adres:				
Normal Servikal Sitoloji Bulgularına Sahip Kadınlarda Genital Human Papilloma Virus (HPV)'un Araştırılması ve Genotiplerinin Belirlenmesi				
Yaşı	A. 35-45	B. 45-55	C. >55	
Meslek durumu	A. Ev hanımı	B. Çalışan		
Eğitim Durumu	A. Okuma-yazma yok	B. İlkokul	C. Ortaokul	D. Üniversite ve üzeri
Ekonomik durumu	A. İyi (≥ 2000 TL)	B. Orta (1000-2000 TL)	C. Kötü (≤ 1000 TL)	
Koît yaşı (Evlilik belirlenerek)	A. <20yaş	B. 20-29	C. >30yaş	
Partner sayısı (Evlilik sayıları da göz önüne alınarak)	A. Tek	B. Multipartner		
Menopoz durumu	A. Menopozda	B. Menopozda değil		
Menopoz yaşı	A. <42yaş	B. 42-50 yaş	C. >50yaş	
Kondom kullanımı	A. Evet	B. Hayır		
OKS kullanım öyküsü	A. Kısa süreli (≤ 1 yıl)	B. Uzun süreli (> 1 yıl)	C. Yok	
Düzenli jinekolojik kontrol	A. Yılda bir	B. İki yılda bir	C. Yok	
Smear hakkında bilgi durumu	A. Var	B. Yok		
Smear takibi	A. Yılda bir	B. İki yılda bir	C. >2yıl	D. Yok
Sigara Kullanımı	A. Yoğun (>10 tane/gün)-uzun süre (≥ 2 yıl)	B. Yoğun (>10 tane/gün)-kısa süre (< 2 yıl)	C. Az (≤ 10 tane/gün)-uzun süre (≥ 2 yıl)	D. Az (≤ 10 tane/gün)-kısa süre (< 2 yıl)
				E. Yok

EK-2

BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Araştırmanın Adı: Normal Servikal Sitoloji Bulgularına Sahip Kadınlarda Genital Human Papilloma Virus (HPV)'un Araştırılması ve Genotiplerinin Belirlenmesi

LÜTFEN DİKKATLİCE OKUYUNUZ!!!

Bu çalışmaya katılmak üzere davet edilmiş bulunmaktasınız. Bu çalışmada yer almayı kabul etmeden önce çalışmanın ne amaçla yapılmak istendiğini anlamanız ve kararınızı bu bilgilendirme sonrası özgürce vermeniz gerekmektedir. Size özel hazırlanmış bu bilgilendirmeyi lütfen dikkatlice okuyunuz, sorularınıza açık yanıtlar isteyiniz.

Araştırmanın konusu rahim ağzı kanserine sebep olan *Human Papilloma Virus* (HPV) adında bir virusun jinekolojik şikayetleri bulunan ancak normal rutin testlerde bir anormallik belirlenmeyen kadın hastalarda varlığını araştırılması ve bu virusun kansere sebep olan tiplerinin belirlenmesi ile ilgilidir.

Sizin de bu araştırmaya katılmanızı diliyoruz. Ancak bu araştırmaya katılıp katılmamakta serbestsiniz. Araştırmaya katılım gönüllülük esasına dayalıdır. Kararınızdan önce araştırma hakkında sizi bilgilendirmek istiyoruz. Bu bilgileri okuyup anladıktan sonra araştırmaya katılmak isterseniz formu imzalayınız.

Bu araştırmayı yapmak istememizin nedeni, hastaneye jinekolojik şikayetlerle başvuran, rutin Pap smear örnekleme yapılan ancak rahim ağzından yapılan sürüntü örneklerinde herhangi bir anormalliği olmayan 35-65 yaş aralığındaki hastalarda rahim ağzı kanserin önemli nedeni olan HPV'nin varlığının araştırılması ve kansere neden olan tiplerinin belirlenmesidir. Ayrıca HPV ile infekte olmuş hastaların tespit edilmesi, rahim ağzı kanser ilişkili HPV tipleri ile infekte hastaların belirlenmesi, gerekli tedavilerinin yapılması, muhtemel rahim ağzı kanser vakalarının engellenmesi açısından önem taşımaktadır.

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji A.D. ile Kadın Hastalıkları ve Doğum A.D.'nin ortak katılımı ile gerçekleştirilecek bu araştırmaya katılımınız araştırmanın başarısı için önemlidir.

Eğer araştırmaya katılmayı kabul ederseniz Prof. Dr. Saffet DİLEK veya onun görevlendireceği bir hekim tarafından muayene edileceksiniz ve bulgular kaydedilecektir. Muayene sonucunda doktorunuz uygun görürse bu araştırmaya alınacaksınız. Yine izniniz doğrultusunda bu araştırmayı yapabilmek için rahim ağzından sürüntü almamız gerekmektedir. Alınan rahim ağzı sürüntüsünde HPV araştırılacak ve genotiplendirilmesi yapılacaktır.

Bu araştırmaya katılmanız için sizden herhangi bir ücret istenmeyecektir. Araştırmaya katıldığınız için size ek bir ödeme de yapılmayacaktır.

Bu araştırmaya katılmayı reddedebilirsiniz. Bu araştırmaya katılmak tamamen isteğe bağlıdır ve reddettiğiniz takdirde size uygulanan tedavide herhangi bir değişiklik olmayacaktır. Yine araştırmanın herhangi bir aşamasında onayınızı çekmek hakkına da sahiptir.

Gönüllü Denek Beyanı

Sayın Yrd. Doç. Dr. Seda TECAN tarafından Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji ve/veya Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dallarında tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya katılımcı (denek) olarak davet edildim.

Eğer bu araştırmaya katılırsam, hekim ile aramda kalması gereken bana ait bilgilerin gizliliğine, bu araştırma sırasında da büyük özen ve saygı ile yaklaşılabileceğine inanıyorum. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgilerimin özenle korunacağı konusunda bana yeterli güven verildi.

Araştırmanın yürütülmesi sırasında herhangi bir sebep göstermeden araştırmadan çekilebilirim. Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemin uygun olacağını bilincindeyim. Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı tutulabilirim.

Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır.

İster doğrudan, ister dolaylı olsun araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorununun ortaya çıkması halinde,

her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi. (Bu tıbbi müdahalelerle ilgili olarak da parasal bir yük altına girmeyeceğim).

Araştırma ile ilgili bir sağlık sorunu ile karşılaştığımda, herhangi bir saatte, Yüksek Lisans öğrencisi Didem ÖZGÜR'ü 0324 337 4300 numaralı iş telefonundan veya Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı adresinden arayabileceğimi biliyorum.

Bu araştırmaya katılmak zorunda değilim ve katılmayabilirim. Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakımına ve hekim ile olan ilişkiye herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum.

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Kendi başıma belli bir düşünme süresi sonunda adı geçen bu araştırmada katılımcı (denek) olarak yer alma kararını aldım. Bu konuda yapılan daveti büyük bir memnuniyet ve gönüllülük içerisinde kabul ediyorum.

İmzalı bu form kağıdının bir kopyası bana verilecektir.

Sağlıklı/hasta gönüllü denek		İmza
Adı-Soyadı		
Adres		
Telefon numarası		
Tarih		

Görüşme tanığı		İmza
Adı-Soyadı		
Adres		
Telefon numarası		
Tarih		

Sağlıklı/hasta gönüllü denek ile görüşen hekim		İmza
Unvan-Adı-Soyadı		
Adres	ME. Ü. Tıp Fakültesi, Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi, Kadın Hastalıkları ve Doğum A.D., Zeytinlibahçe Cad./ MERSİN	
Telefon numarası	0324 337 4300	
Tarih		

ÖZGEÇMİŞ

01.11.1987 tarihinde İstanbul ilinde doğdu. Liseyi İzmit'te tamamladı. 2005 yılında Mersin Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünde lisans eğitimine başladı ve 2010 yılında mezun oldu. 2010 yılında Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı. 2010 yılında araştırma görevlisi kadrosuna atandı.

Halen Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda araştırma görevlisi olarak görev yapmaktadır.