



**T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
TAYFUR ATA SÖKMEN TIP FAKÜLTESİ**

**SERVİKAL LEZYONLU VE SERVİKAL LEZYONU OLMAYAN
KADINLARDAN ALINAN SMEAR ÖRNEKLERİNDE PCR YÖNTEMİ
İLE HPV SIKLIĞININ ARAŞTIRILMASI VE
GENOTİPLENDİRİLMESİ**

UZMANLIK TEZİ

**Dr. Eyüp SAPAN
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANA BİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Nizami DURAN**

HATAY-2012

**T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
TAYFUR ATA SÖKMEN TIP FAKÜLTESİ**

**SERVİKAL LEZYONLU VE SERVİKAL LEZYONU OLMAYAN
KADINLARDAN ALINAN SMEAR ÖRNEKLERİNDE PCR
YÖNTEMİ İLE HPV SIKLIĞININ ARAŞTIRILMASI VE
GENOTİPLENDİRİLMESİ**

UZMANLIK TEZİ

**Dr. Eyüp SAPAN
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANA BİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Nizami DURAN**

Bu tez, Mustafa Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 1003D0101 proje numarası ile desteklenmiştir.

TEZ ONAY SAYFASI

T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
TAYFUR ATA SÖKMEN TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

SERVİKAL LEZYONLU VE SERVİKAL LEZYONU OLMAYAN KADINLARDAN ALINAN SMEAR ÖRNEKLERİNDE PCR YÖNTEMİ İLE HPV SIKLIĞININ ARAŞTIRILMASI VE GENOTİPLENDİRİLMESİ

Dr. Eyüp SAPAN

Tıp Fakültesi Dekanlığı Onayı

.....
Doç. Dr. Ahmet NACAR
Tıp Fakültesi Dekan V.

Bu tez çalışmasının “Tıpta Uzmanlık” derecesine uygun ve yeterli bir çalışma olduğunu onaylıyorum.

.....
Doç. Dr. Nizami DURAN
Ana Bilim Dalı Başkanı

Bu tez tarafımdan okunmuş ve her yönü ile “Tıpta Uzmanlık” tezi olarak uygun ve yeterli bulunmuştur.

.....
Doç. Dr. Nizami DURAN
Tez Danışmanı

TEZ JÜRİSİ

1. Doç. Dr. Nizami DURAN
2. Doç. Dr. Meryem ÇETİN
3. Doç. Dr. Yusuf ÖNLEN
4. Yrd. Doç. Burçin ÖZER
5. Yrd. Doç. Dr. Melek İNCİ

İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK SAYFASI.....	i
ONAY SAYFASI.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ.....	iv
GRAFİK LİSTESİ.....	v
RESİM LİSTESİ.....	vi
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ.....	vii
İTHAF.....	viii
TEŞEKKÜR.....	ix
ÖZET.....	x
ABSTRACT.....	xi
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1.TARİHÇE.....	4
2.2.HPV’NİN VİRAL ÖZELLİKLERİ.....	6
2.3.SINIFLANDIRMA.....	10
2.4.PATOGENEZ VE İMMÜNİTE.....	11
2.4.1.Patogenez.....	11
2.4.2.İmmünite.....	18
2.5.KLİNİK GÖRÜNÜMLER.....	26
2.5.1.Onkogenez.....	26
2.5.2.Benign Kutanöz Lezyonlar.....	28
2.5.3.Epidermodisplazi Verrusiformis.....	31
2.5.4.Malign Kutanöz Lezyonlar.....	32
2.5.5.Benign Mukozal Lezyonlar.....	33
2.5.6.Malign Mukozal Lezyonlar.....	34
2.6.TANI.....	35
2.7.KORUNMA.....	40
2.7.1.Aşı.....	40
2.7.2.Aşı İçerikleri.....	42
2.7.3.Aşılama ve Koruyuculuk.....	44
2.7.4.Tip Spesifite ve Çapraz Koruma.....	44
2.7.5.Tarama.....	45
2.8.TEDAVİ.....	47
3.MATERYAL VE METOD.....	49
3.1.SERVİKAL ÖRNEKLERİN ALINMASI.....	49
3.1.1.Viral Transport Besiyeri.....	50
3.2.DNA EKSTRAKSİYONU.....	50
3.3.PCR YÖNTEMİYLE HPV DNA AMPLİFİKASYONU.....	54
3.4.PCR ÜRÜNLERİNİN AGARUZ JEL ELEKTROFOREZİ.....	55
3.5.FRAGMENT ANALİZİ.....	56
3.5.1.Sonuçların Yorumlanması.....	57
3.6.E6 VE E7 GEN EKSPRESYONU.....	61
3.7.İSTATİSTİKSEL ANALİZ.....	65
4.BULGULAR.....	66
5.TARTIŞMA.....	78
6.SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	87
7.KAYNAKLAR.....	90

TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ

Tablo 1: Hastalıklarla ilişkilerine göre HPV tipleri.

Tablo 2: Çalışmada kullanılan primer dizileri ve amplikon büyüklükleri.

Tablo 3: F-HPV tiplendirme kitinde renk ve boyutlara göre subtiplerin belirlenmesi.

Şekil 1: HPV genomunun Şematik olarak gösterilmesi.

Şekil 2: HPV E6 ve E7 onkojenik proteinlerin hedefleri ve etkileri.

Şekil 3: CIN ve servikal kanser gelişimindeki histolojik değişimlerin Şematik gösterimi.

Şekil 4: Yüksek riskli HPV'lerin infeksiyöz siklusu.

Şekil 5: Genital HPV infeksiyonunun doğal süreci.

Şekil 6: Ön işleme örneklerin ekstraksiyona hazırlanması.

Şekil 7: DNA ekstraksiyon prosedürü.

Şekil 8: Nuclisens EasyQ Genetic Analyzer cihazı çalışma rakının Şematik görünümü.

Şekil 9: E6/E7 onkoprotein çalışma prosedürü.

GRAFİK LİSTESİ

- Grafik 1:** Çalışmaya dahil edilen CIN tanılı kadınların yaşlara göre dağılımı.
- Grafik 2:** Çalışmaya alınan CIN tanılı kadınlarda HPV tip dağılımı.
- Grafik 3:** Tek tipte infekte CIN tanılı kadınların sayısal dağılımı.
- Grafik 4:** HPV ile infekte CIN tanılı kadınların yaş aralığına göre dağılımı.
- Grafik 5:** HPV tip 16 ile infekte 34 CIN tanılı kadında diğer HPV tipleriyle koenfeksiyon dağılımı.
- Grafik 6:** HPV tip 18 ile infekte CIN tanılı 11 kadında diğer HPV tipleriyle koenfeksiyon dağılımı.
- Grafik 7:** HPV tip 35 ile infekte CIN tanılı 14 kadında diğer HPV tipleriyle koenfeksiyon dağılımı.
- Grafik 8:** HPV tip 45 ile infekte CIN tanılı 35 kadında diğer HPV tipleriyle koenfeksiyon dağılımı.
- Grafik 9:** CIN tanılı kadınlarda E6/E7 gen ekspresyonunun (viral onkoproteinlerin) HPV tiplerine göre dağılımı.
- Grafik 10:** CIN evrelerine göre HPV genotiplerinin dağılımı.
- Grafik 11:** CIN evrelerine göre E6/E7 onkoprotein varlığının dağılımı.

RESİM LİSTESİ

- Resim 1:** HPV DNA izolasyonunda kullanılan ısıtmalı çalkalayıcı (thermo-shaker).
- Resim 2:** NucliSENS® Mini MAG manyetik DNA izolasyon cihazı.
- Resim 3:** PCR amplifikasyonu yapılan thermal cycler cihazı.
- Resim 4:** Tek tip pozitif sonuç.
- Resim 5:** Birden fazla HPV tipinin pozitif olduğu analiz sonucu.
- Resim 6:** Negatif analiz sonucu.
- Resim 7:** İnternal kontrolün çalışmadığı geçersiz analiz sonucu.
- Resim 8:** Applied Biosystems Genetic Analyzer 3130 cihazı ve bilgisayar donanımı.
- Resim 9:** Nuclisens EasyQ Genetic Analyzer cihazında onkoprotein analizinde kullanılan strip yapılı eppendorf tüpleri.
- Resim 10:** E6 ve E7 onkoprotein analizinde kullanılan cihazlar (inkübatör, Nuclisens EasyQ Genetic Analyzer, mini santrifüj ve bilgisayar donanımı).
- Resim 11:** MYO9/MY11 gen ürünlerinin %2'lik agaroz jelde görüntüsü.
- Resim 12:** GP5+/GP6+ gen ürünlerinin %2'lik agaroz jelde görüntüsü.
- Resim 13:** HPV tip 6 pozitif örnek.
- Resim 14:** HPV tip 16 pozitif olan örnekte DNA pik görüntüsü.
- Resim 15:** HPV tip 35 ve 45 pozitif olan örnekte DNA pik görüntüleri.

KISALTMALAR VE SİMGELER

AIS	: Adenocarcinoma in situ
ASC	: Atypical squamous cells
BCC	: Basal cell carcinom
BD	: Bowen's disease
Bp	: Base pair
BP	: Bowenoid papulosis
CIN	: Cervical intraepithelial neoplasia
DNA	: Deoxyribonucleic acid
EGBD	: Extragenital Bowen's disease
EMEA	: European Medicines Evaluation Agency
EQ	: Queyrat erythroplasia
EV	: Epidermodysplasia verruciformis
FDA	: The Food and Drug Administration
FEH	: Focal epithelial hyperplasia
GSK	: GlaxoSmithKline
HC	: Hibrid capture
HIV	: Human immunodeficiency virus
HLA	: Human Leucoyte Antigen
HPV	: Human papillomavirus
HR-HPV	: High risk Human papilloma virus
HSIL	: High-grade squamous intraepithelial lesion
IARC	: International Agency for Research on Cancer
ICC	: Invazive cervical carcinom
IL	: Interleukin
INF	: Interferon
LA	: Linear array
LBA	: Line blot assay
LCR	: Long control region
LİPA	: Line prob assay
LR-HPV	: Low risk Human papilloma virus
LSIL	: Low squamous intraepithelial lesion
MPL	: 3d monophoryl lipid A
mRNA	: Messenger Ribonucleic acid
nm	: Nanometre
NMSC	: Non-melanoma skin cancer
ORF	: Open reading frame
OSCC	: Oral squamous cell carcinoma
PAP	: Papanicolaou
PCR	: Polymerase chain reaction
SCC	: Squamous cell carcinoma
SIL	: Squamous intraepithelial lesion
SPSS	: Statistical package for social sciences
TAE	: Tris-Asetat- EDTA
TNF	: Tumor necrosis factor
URR	: Upstream regulatory region
VIN	: Vulvar intraepithelial neoplasia
VLP	: Virus-like particle
µl	: Mikrolitre

Sevgili eşim ve canım çocuklarıma...

TEŞEKKÜR

Gerek eğitimim sırasında gerekse de tez konumun belirlenmesi, tezimle ilgili pratik çalışmaların yapılması ve tezimin yazılması aşamalarında bana yol gösterici olan, yardım ve desteğini esirgemeyen danışmanım Sayın Doç. Dr. Nizami DURAN hocama, Ana Bilim Dalımız ğretim üyeleri Doç. Dr. Meryem ÇETİN, Yard. Doç. Dr. Burçin ÖZER, Yard. Doç. Dr. Melek İNCİ ve Yard. Doç. Dr. Erkan YULA'ya en içten teőekkürlerimi sunarım.

Ayrıca, tez çalışmam sırasında yardımlarından dolayı Kadın Hastalıkları ve Doğum Ana Bilim Dalı ğretim üyesi Yard. Doç. Dr. Kenan DOLAPIOğLU'na, beraber çalışmaktan mutluluk duyduğum tüm doktor ve teknisyen arkadaşlarıma, benden maddi-manevi desteklerini eksik etmeyen canım annem, babam ve sevgili eşime çok teşekkür ederim.

ÖZET

Giriş ve Amaç: Human papillomaviruslar (HPV) servikal kanserin en önemli etyolojik faktörleridir. Bu çalışmada servikal intraepitelyal neoplazi (CIN) tanılı kadınlarda HPV tiplerinin belirlenmesi ve yüksek riskli HPV genotiplerinde E6/E7 onkoprotein varlığının araştırılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Yöntem: Çalışmaya CIN1 tanılı 69, CIN2 tanılı 26 ve CIN3 tanılı 19 kadın olmak üzere toplam 114 kadın dâhil edilmiştir. Kadınlardan alınan servikal sürüntü örneklerinde HPV DNA varlığı MY09/MY11 ve GP5+/GP6+ primerleri kullanılarak tespit edilirken, fragment analiz yöntemiyle HPV genotiplendirilmesi yapılmış ve NASBA yöntemiyle de yüksek riskli HPV tiplerinde E6/E7 onkoprotein varlığı araştırılmıştır.

Bulgular: Çalışmada CIN evrelerine göre dağılım yapıldığında; CIN1 tanılı kadınlarda %23.2 HPV tip 16, %15.9 HPV tip 45 ve %11.6 oranında ise HPV tip 35 saptanırken, CIN2 tanılı kadınlarda bu oranlar HPV tip 45 için; %53.8, HPV tip 16 için; %26.9 ve HPV tip 18 için ise %19.2 olarak tespit edilmiştir. CIN3 tanılı kadınlarda HPV genotip dağılımı ise HPV tip 16 için; %57.9, HPV tip 45 için %52.6 ve HPV tip 18 için ise %15.8 olarak bulunmuştur. Ayrıca, çalışmada toplam 31 kadında birden fazla HPV genotipiyle koenfeksiyon tespit edilmiştir. Bunun yanında çalışmada yüksek riskli HPV tipleriyle infekte 57 kadının %42.1'inde E6/E7 onkoprotein varlığı tespit edilmiştir. E6/E7 onkoproteinleri; HPV tip 16 ile infekte toplam 34 kadının %38.2'sinde, HPV tip 45 ile infekte toplam 35 kadının %31.4'ünde ve HPV tip 18 ile infekte toplam 11 kadının %18.2'sinde tespit edilmiştir.

Sonuç: Sonuç olarak çalışmamızda elde edilen bulgular, servikal intraepitelyal neoplazik hastalarda gerek total HPV enfeksiyonu prevalansının ve gerekse de yüksek riskli HPV tipleriyle enfeksiyon oranının oldukça yüksek olduğunu göstermektedir. Ayrıca, yüksek riskli HPV tipleriyle infekte kadınlarda onkojenik aktivite oranı da oldukça yüksek bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: HPV, genotip, servikal kanser, E6, E7, onkoproteinler.

ABSTRACT

Background and Aim: Human papillomavirus (HPV) is the most important etiological agents for cervical cancer. In this study, it was aimed to investigate the determining HPV subtypes in women with cervical intraepithelial neoplasia (CIN) and the presence of E6/E7 oncoproteins in high risk HPV genotypes (hr-HPV).

Methods: A total of 114 women (diagnosed with CIN1; 69, CIN2; 26 and CIN 3; 19) were included to the study. MY09/MY11, GP5+/GP6+ primers were used for the determination of HPV-DNA. The fragment analysis and NASBA methods were selected for the genotyping of HPV subtypes and the E6/E7 gene expressions.

Results: The distributions of HPV genotypes according to CIN stages were as follows: 23.2% for HPV type 16, 15.9% for type 45 and 11.6% for type 35 in women with CIN1; 53.8% for HPV type 45, 26.9% for type 16 and 19.2% for type 18 in women with CIN2; 57.9% for HPV type 16, 52.6% for type 45 and 15.8% for type 18 in women with CIN3. Also, co-infections were found in 31 women. Otherwise, the occurrence of E6/E7 oncoproteins was detected in 24 of 57 women who infected with hr-HPV subtypes. The distributions of E6/E7 oncoproteins according to HPV subtypes in these women were as follows: 38.2% of the women (34) that infected with HPV type 16, 31.4% of the women (35) that infected with HPV type 45 and 18.2% of the women (11) that infected with HPV type 18.

Conclusion: The findings of our study showed that both the prevalence of HPV infection and the rate of hr-HPV subtypes in patients diagnosed with CIN were very high. In addition, the oncogenic activity rates in hr-HPV subtypes were quite high.

Key words: HPV, genotype, cervical cancer, E6, E7, oncoproteins.

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Papillomaviruslar skuamoz epitel hücrelerini infekte edebilen, cilt siğilleri ve proliferatif lezyonlara neden olabilen, çift zincirli DNA viruslarıdır. İnsanlar için patojen olan papillomaviruslar önemli ölçüde konak ve doku spesifitesi göstermekte olup tüm infeksiyöz döngü skuamoz epitelyum hücrelerinde gerçekleşmektedir (1).

Virusun majör kapsit proteinini kodlayan genin dizi analizi sonuçlarına dayanılarak yapılan sınıflandırmada, papillomavirusların 130'dan fazla subtipinin olduğu bildirilmiştir (2). Bu tiplerden bazılarının cilde, bazılarının ise mukozal yüzeylere affinitesi yüksek olup, cilt ve mukozal infeksiyonlara yol açan Human papillomaviruslar (HPV) kendi içinde, onkojenik potansiyellerine göre, düşük ve yüksek onkojenik riskli genotiplere ayrılır. Papillomavirusların 40'tan fazla tipi genital bölgede infeksiyonlara yol açmaktadır. Genital bölgede infeksiyon yapan tipler arasında; benign genital siğiller veya kondilomata ile ilişkili olan, düşük riskli olarak tanımlanan HPV tip 6, 11 gibi subtipler yer alırken, anogenital kanser ve intraepitelyal neoplazi ile ilişkilendirilen ve yüksek riskli olarak tanımlanan HPV tip 16, 18, 31, 33, 35 ve 45 gibi genotiplerin de yer aldığı bildirilmektedir (2).

Servikal kanserlerin tamamına yakınının yüksek riskli HPV tipleriyle ilişkili olduğu bildirilmektedir. Serviks kanseri tüm dünyada kadınlar arasında hayatı tehdit eden ikinci en önemli kanser tipi olup, HPV infeksiyonu insidansı ülkeden ülkeye hatta aynı ülkenin değişik bölgelerinde dahi farklılıklar gösterebilmektedir. Dünyada HPV infeksiyonu insidansının toplumlarda %2 ile %44 arasında değiştiği bildirilirken, ülkemizde yapılan çeşitli çalışmalarda asemptomatik kadınlar arasında HPV sıklığının %10-20, semptomatik kadınlar arasında ise %50-70 arasında değiştiği bildirilmiştir (3).

Serviks kanseriyle en sık ilişkilendirilen tipler HPV tip 16 (% 50-70) ve HPV tip 18'dir (% 7-20). HPV sadece servikste karsinojen değildir, aynı zamanda vulval, vajinal, penil, anal ve baş ve boyundaki kanserlerde HPV (başta HPV tip 16) ilişkisi gösterilmiştir. Servikal kanserin en sık görüldüğü yaşın 50'li yaşlar ve en yaygın tipin ise skuamoz hücre karsinomu olduğu bildirilmektedir. Son yıllarda tarama testlerinin yaygınlaşmasıyla serviks kanserinde erken tanı ve gerekli önlemlerin alınması ile hayatta kalma oranlarının da arttığı görülmektedir (4,5).

HPV infeksiyonu dünya genelinde oldukça yaygın bir infeksiyondur. Kadınların hayatlarının bir döneminde HPV ile karşılaşma ihtimallerinin çok yüksek

olduğu ve bir kadının hayatı boyunca bu virusla infekte olma riskinin % 50-80 arasında değiştiği bildirilmektedir. Normal servikal sitolojisi olan kadınların %10.2'sinin HPV DNA pozitif olduğu bildirilmekle beraber hastalığın prevalansında coğrafik farklılıklar olabilmektedir. Hastalığın daha çok genç kadınlar (<25 yaş) arasında yaygın olduğu (sıklıkla çoklu tiplerle infeksiyon) bildirilmektedir. Bununla birlikte 30'lu ve 40'lı yaşlarda insidansın hızlı bir düşüş yaptığı ve postmenapozal dönemde ise yine bir yükselme ile seyrettiği bildirilmektedir.

HPV infeksiyonu, primer bulaşma yolu cinsel temas olduğundan, cinsel yönden aktif genç kadınlar ve erkeklerde daha sıktır. Virusun bulaşması için vajinal ya da anal penetrasyon olmadan cilt teması yeterlidir. Kondom kullanımının koruma sağladığı ancak HPV vulva ve skrotum gibi korumasız olan genital cilt bölgelerinden de bulaşabildiği bildirilmektedir. İnfeksiyon çoğu zaman asemptomatik olarak seyreder. İnfeksiyonda eğer kolposkopik olarak saptanabilir bir lezyon varsa bu, düşük dereceli servikal intraepitelyal neoplazi (CIN) olarak tanımlanmaktadır. HPV DNA'sının tespit edildiği fakat saptanabilir herhangi bir lezyonun olmadığı çoğu HPV infeksiyonu ve düşük dereceli CIN, hücresel immüitenin gelişmesi sonucu iyileşmektedir. Kadınların yaklaşık %10-15 gibi az bir kısmında başarılı bir hücresel immünite oluşturulamamaktadır. Bu tip kadınlarda HPV DNA pozitif olup infeksiyon, persiste viral infeksiyon olarak tanımlanır ve bu hastalarda infeksiyöz virus üretimi mevcuttur. Bu tür kadınların tanısı son derece önemlidir çünkü bu tip kadınlarda yüksek dereceli intraepitelyal hastalık ve invaziv servikal kanser (ICC) geliştirme riski bulunmaktadır. Günümüzde, Human papillomavirusların servikal kanserler ve prekürsör lezyonlar (CIN1, CIN2 ve CIN3) ile yakın ilişkili olduğu bilinmektedir. Servikal kanserle ilişkilendirilen HPV tipleriyle infekte kadınların belirlenmesi, serviks kanseri vakalarının azaltılması açasından son derece önemlidir. Epidemiyolojik çalışmalar yüksek onkojenik riskli HPV infeksiyonunun CIN (tüm evreler; CIN1, CIN 2 ve CIN3) ve adenokarsinoma *in situ* (AIS)'ya sebep olduğunu göstermiştir. Yüksek riskli HPV tipleri hem skuamöz hücreli karsinom hem de serviks adenokarsinomu gelişimini tetikleyen önemli bir risk faktörüdür (6). Yüksek onkojenik riskli HPV tiplerinde E6 ve E7 genlerinin servikal karsinogenezde önemli rol oynadığı kesin bir şekilde gösterilmiştir (7). Hücre kültürü çalışmalarında daha çok yüksek riskli HPV tiplerinin primer genital keratinosit hücrelerinde onkojenik transformasyon meydana getirdiği tespit edilmiştir (8).

İnvaziv servikal kanser vakalarında en sık saptanan tipin HPV tip 16 (%55) olduğu ve bunu HPV tip 18 (%12.8)'in takip ettiği bildirilmektedir (6,7). HPV tip 16 ve 18'in ise tüm olguların yaklaşık %70'inden sorumlu olduğu bildirilmiştir. Avrupa ve Amerika'da çeşitli çalışmalarda bu tipler dışında servikal kanserlerle en sık ilişkilendirilen tiplerin HPV tip 33, 45 ve 31 olduğu bildirilmektedir. Asya'da yapılan çalışmalarda ise serviks kanseri vakalarında en sık saptanan tiplerin HPV tip 58, 33 ve 52 olduğu bildirilmiştir. Ancak yapılan çalışmalarda bu tiplerin servikal kanser etiolojisindeki rolünün %4 dolaylarında olduğu bildirilmektedir. HPV'nin sebep olduğu serviks adenokarsinomunda da en sık, HPV tip 16 (%48), tip 18 (% 36) ve tip 45 (% 6)'in ilişkisi bildirilmiştir (6,7).

Servikal displazi taramaları halk sağlığı açısından son derece önemlidir. Taramaların yapılmadığı toplumlarda yetişkin kadınlar arasında servikal kanser insidansının %2-4 arasında değiştiği, halbuki bu oranın taramaların yapıldığı toplumlardaki kadınlar arasında %0.1'lere kadar düştüğü bildirilmektedir (9). Skuamoz hücreli serviks kanseri ve öncü lezyonları taramalarda başarılı bir şekilde tespit edilebilmektedir. HPV enfeksiyonu ile ilişkili CIN2 ve CIN3 şeklindeki epitelyal değişimlerin tespiti ve tedavisi ile hastalarda invaziv servikal kanser gelişimi önlenmektedir (4). Son dönemlerde, HPV DNA saptama yöntemleriyle yapılan çalışmalarda, yüksek onkojenik riskli HPV tipleriyle invaziv servikal kanser arasındaki ilişkinin çok sıkı olduğu tespit edilmiştir.

Bu çalışma, Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Ana Bilim Dalı Polikliniklerine müracaat eden ve kolposkopi muayeneleri yapılarak servikal intraepitelyal neoplazi tanısı alan kadınlar ile herhangi bir semptomatik bulgusu olmayan kadınlarda, Human papillomavirus enfeksiyonunun insidansını ve genotip dağılımını belirlemek amacıyla yapılmıştır. Bunun yanında servikal intraepitelyal neoplazi tanılı kadınlardan izole edilen ve yüksek riskli grupta yer alan servikal kanser ile en sık ilişkilendirilen 5 HPV tipi (16, 18, 31, 33 ve 45)'inde E6/E7 mRNA sentezi ile onkoprotein varlığının belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla Kasım 2010-Eylül 2011 tarihleri arasında Kadın Hastalıkları ve Doğum Ana Bilim Dalı Polikliniklerine başvuran semptomatik herhangi bir bulgusu olmayan 89 kadın ile, CIN1 tanılı 69, CIN2 tanılı 26 ve CIN3 tanılı 19 olmak üzere toplam 114 servikal intraepitelyal neoplazi tanılı kadından servikal sürüntü örnekleri alınmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1.TARİHÇE

İnsan papillomavirusları çift zincirli, yaklaşık 8000 baz çiftinden oluşan DNA genomuna sahiptir (10). Genetik çalışmalar HPV biyolojisinin 200.000 yıldan fazla süredir değişmediğini göstermektedir (11).

Genital siğillerin 19. yüzyıldan önce HPV'ler tarafından oluşturulabileceğine dair bir görüş yoktu. Ancak siğillerin infeksiyon kökenli olduğu ve bulaşıcı oldukları çok uzun yıllar öncesinde de bilinmekteydi. HPV kökenli bu siğillerin 19. yüzyılın başlarına kadar gonore ve sifiliz gibi genital siğillerin bir formu olduğu sanılmakta ve cinsel temasla bulaşan hastalıklar ile birlikte aynı grupta değerlendirilmekteydi (12,13,14).

Uterin serviksın karsinoma *in situ*'su 1932'de servikal kanserin bir prekürsörü olarak kabul edildi. George N. Papanicolaou ve Herbert F. Traut 1941 yılında eksfoliatif sitolojinin uterin serviksın *in situ* ve invaziv karsinomlarının her ikisini de saptamada kullanılabileceğini göstermişlerdir (15). Bu test, servikal kanserle HPV ilişkilendirilmeden önce, bu yöntemi başlatan patolog Papanicolaou'ya ithafen 1949'dan sonra kendi ismiyle isimlendirilmiştir (16).

HPV 1940'lı yıllarda deri siğillerinde elektron mikroskobu ile virionlar olarak tanımlansa da (17) HPV'nin kondiloma aküminata ile ilişkili olduğu yıllar sonra ortaya konabilmiştir. Daha sonraki dönemlerde yapılan dizi analizleri sonucunda ise HPV'nin servikal kanserlerle ilişkili olduğu tespit edilmiştir (18,19).

HPV ile baş boyun kanserleri ilişkisi ise ilk kez 1960'lı yıllarda laringeal papillomaların radyasyon tedavisi sonrası malignensiye dönüşmesiyle fark edilebilmiştir (20,21). HPV'nin diğer kanserlerde ve baş boyun kanserlerindeki muhtemel etiyolojik rolü ilk kez 1985 yılında Luning ve arkadaşları tarafından ortaya atılmıştır (22).

HPV'nin OSCC (oral squamose cell carcinoma)'deki rolü servikal kanserdeki rolü kadar açık olmasa da tonsil, larinks, hipofarinks, oral kavite, dil ve nazofarinks tümörlerinde ve SCC (squamosa cell carcinoma)'ye dönüşmüş papillomalarda da

HPV DNA tespit edildiği bildirilmiştir. Olguların %76'sında, prekanseröz lezyonlarda ve metastatik lenf nodlarında, primer tümörle aynı HPV tipinin tespit edilmesinin, SCC gelişmesinde HPV ilişkisini desteklediği bildirilmiştir (23,24).

HPV enfeksiyonu ile servikal kanser arasındaki ilişki ilk defa 1980'li yılların ilk yarısında Alman virolog Harold zur Hausen tarafından gösterilmiştir (25). HPV enfeksiyonunun cinsel temasla bulaştığı ilk kez 1970'li yıllarda gösterilmiştir. Aynı yıllarda kondiloma aküminatada bulunan virusun servikal kanserlere yol açtığı da gösterilmiştir (26). İlk kez 1976 yılında, displastik lezyonları olan hastaların servikal smear örneklerinde bulunan koilositik hücrelerin HPV enfeksiyonunun patolojik değişikliği olduğu bildirilmiştir. Sonra 1990'lı yıllarda moleküler biyoloji teknolojisi ile yapılan epidemiyolojik çalışmalar, bazı HPV alt tiplerinin persistan enfeksiyonları ile servikal kanser arasındaki ilişkiyi kesinleştirmiştir (27-30).

Bir çalışmada; 1969 yılında, servikal intraepitelyal neoplazinin terminolojisinin tanımlanmasıyla servikal kanserin non-invaziv evrelerden geliştiği görüşü ortaya atılmış, premalign CIN lezyonları yalnızca histomorfolojik kritere göre sınıflandırılmıştır (31). Bu; nükleer atipi, mitotik figürlerin sıklığı ve yeri, anormal mitotik figürler (kromozomal dengesizliği yansıtan) ve nukleus polaritesinin kaybı olarak değerlendirilmiştir. Displastik değişimler olan epitelyum kalınlığına göre CIN alt kısımlara ayrılarak incelenmiştir. Bunlar; düşük evre lezyonlar CIN1 (epitelyum tabakasının üçte birinden az tutulum gösteren), yüksek evre lezyonlar CIN2 (üçte biri ile ikisi arası karışım gösteren) ve CIN3 (tüm kalınlığın fazlasının tutulması) (31). Bu tarihten 20 yıl sonra, 1988'de servikal sitolojinin sonuçlarını rapor etmek için Bethesda yöntemi geliştirilmiştir. Bethesda yöntemi 1999 yılında tekrar güncellenmiştir. Bu yöntem sık kullanılmasına rağmen servikal anormalitelerin sitolojik ve histolojik olarak tanımlanmasında başka yöntemler de kullanılmıştır (25,31).

Displazinin dokudaki derinliğine dayanan PAP smear raporlama sistemi olan CIN sistemi 1973'te tanımlanmıştır (32,33).

Minnesota, Rochester'da 1950-1978 yılları arasında genital siğillerin sıklığı üzerinde yapılan bir çalışmada, insidansın 29 yıllık zaman periyot içinde oldukça

yüksek oranda arttığı bildirilmiş, 1975 yılında ise her 100.000 kişide ortalama 107 yeni olgunun ortaya çıktığı tespit edilmiştir (34).

Uluslararası Kanseri Araştırma Ajansı (International Agency For Research On Cancer, IARC) 1995 yılında yaptığı sınıflamada HPV tip 16 ve 18'in karsinojenik, 31 ve 33'ün ise olası karsinojenik tipler olduğunu bildirmiştir (35). Bu sınıflandırma 1994 yılına kadar yayınlanmış bulgulara dayanılarak yapılmıştır. IARC, karsinojenik olarak tanımlanan mukozotropik anogenital 13 HPV tipinin yanında, 2005 yılında kuru cildi infekte eden 2 HPV tipini bu gruba dahil etmiştir. Daha sonra HPV tip 6 ve 11 de olası karsinojenik tipler olarak sınıflandırılmıştır (36,37).

The Food and Drug Administration (FDA) 2003 yılında birleşmiş milletler toplumu için 30 yaşından büyük kadınlarda sitoloji ilişkili HPV testinin yapılması gerekliliğini bildirmiştir (10). Günümüzde yüksek riskli HPV tiplerinin saptanmasında en yaygın kullanılan yöntem hala Papanicolaou (PAP) boyalı smear yöntemidir (38).

HPV aşısı çalışmaları 1980'li yılların ortalarında başlamış, 2006 yılında ilk olarak Merck Frosst Canada Limited tarafından kuadrivalan (HPV tip 6, 11, 16 ve 18'e karşı) aşısı üretimi yapılmıştır. Daha sonra 2007 yılında GlaxoSmithKline (GSK) Incorporated tarafından üretilen bivalan (HPV tip 16 ve 18'e karşı) aşısı kullanıma sunulmuştur (39).

2.2. HPV'NİN VİRAL ÖZELLİKLERİ

Human papillomavirus papovaviridae ailesinin bir üyesidir (40). HPV virusları erken hayatta kazanılan epitelotropik DNA tümör viruslarıdır (41,42). Günümüzde 130'dan fazla subtipinin olduğu bildirilmiştir (2). HPV'lerde influenza virus gibi bazı viruslardan farklı olarak viral genom segmentsiz olup, genomik yapı stabildir. Genetik çalışmalarda HPV genomunun 200.000 yıldan fazla süredir aynı kaldığı bildirilmektedir (11).

Virus 55 nm çapında, zarfsız bir yapıdadır. Her biri L1 ve L2 adında en az iki kapsid proteini içeren 72 kapsomerden oluşan ikozahedral bir yapıdadır (43). Her bir kapsomer major kapsid proteini L1'in bir pentameridir. Her bir virion kapsidi minör kapsid proteininin çoklu kopyalarından oluşmuştur. Bu nedenle virus elektron

mikroskobu ile bakıldığında bir golf topunu andırmaktadır. HPV genomu yaklaşık 7900 bp büyüklükte sirküler, çift zincirli DNA genomuna sahiptir (44). Bu nedenle tüm ORF (open reading frame) protein kodlayan sekansları bir zincire bağlanmıştır. Bu güne kadar genomun 3 bölgesi fonksiyonel olarak sınıflandırılmıştır (geç bölge, kodlanmayan uzun kontrol bölgesi ve erken bölge). Birinci bölge 400-1000 bp arasında kodlanmayan düzenleyici bir bölgeyi içermektedir. Bu bölge ORF'lerin transkripsiyonunu kontrol ederek DNA replikasyonunu düzenleyen bir P97 çekirdek düzenleyici içermektedir. Bu bölge HPV viral genomundaki yüksek derecede çeşitlilikten sorumludur. İkinci bölge erken bölge olarak adlandırılır ve E1, E2, E4, E5, E6 ve E7 ORF'lerinden oluşur. Bu ORF'ler viral replikasyon ve onkogeneze ilişkilidirler. Üçüncü bölge geç bölge olarak adlandırılır ve viral kapsid için L1 ve L2 yapısal proteinlerini kodlar. L1 ökaryotik hücrelerden ekspres olma özelliği gösteren major kapsid proteini (45). L1 ve L2, major ve minor kapsid proteinlerini içeren ayrı ayrı iki yapısal proteini kodlar. Kodlanmayan bölge düzenleyici elementleri içerir. Erken bölge ORF'leri viral DNA replikasyonundan önce ekspres edilen proteinleri kodlar. Üç erken ORF (E5, E6 ve E7) onkogendir ve değişimi ayarlarlar. İki düzenleyici protein, E1 ve E2, replikasyon ve transkripsiyonu düzenler. Ayrıca E2, E6 ve E7'nin ekspresyonuna negatif etki yapar (46).

Papillomavirusların DNA sentezi tamamen konak hücrenin replikasyon mekanizmasına bağlıdır. Viral proteinlerin sentezi çok sıkı bir şekilde düzenlenmektedir ve hücre farklılaşmasına bağlıdır (46).

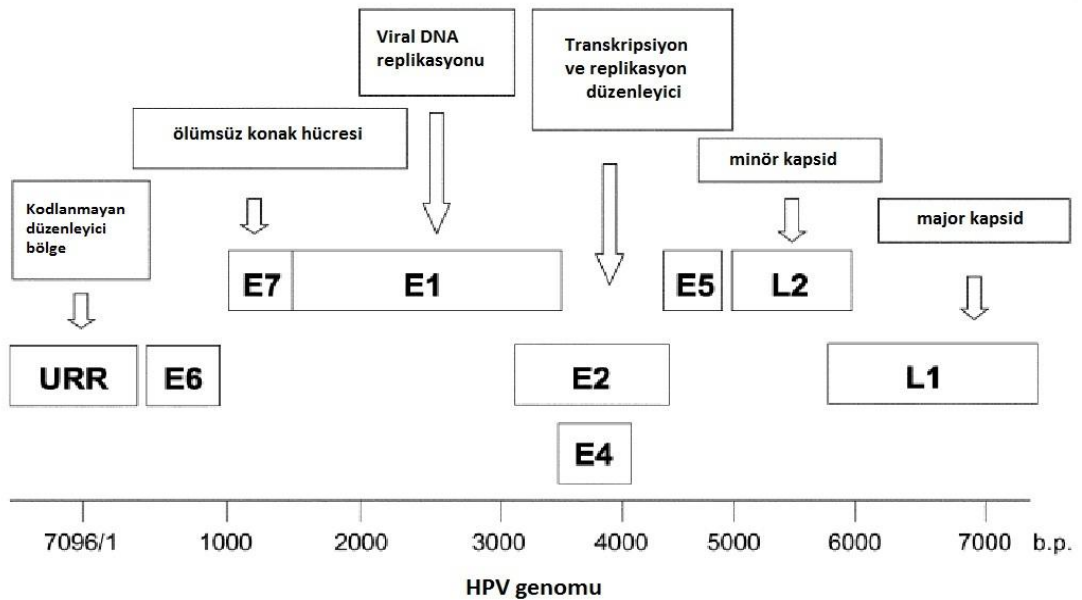
Papillomaviruslar karakteristik bir tropizm gösterir. Bazı tipler kutaneotropiktir. Diğer bir grup HPV ise mukozotropiktir. Son olarak başka bir grup HPV ise farklı olarak kutanöz ve müköz dokulardan ve lezyonlardan izole edilebilirler (Tablo 1) (10).

Tablo 1: Hastalıklarla ilişkilerine göre HPV tipleri (47,48,49).

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

HPV infeksiyonlarının çoğu asemptomatik olup klinik bulgu vermeyebilir. HPV DNA'sı, moleküler yöntemler kullanılarak, kadınlarda; serviks, vagina, vulva ve erkeklerde; prepisyum, penis ve skrotumda bulunabilirken, her iki cinsten de anal kanal ile perineal bölgede tespit edilebilmektedir (10).

Geç infeksiyon evresinde, bir DNA bağlayan protein olan E2, E6 ve E7 genlerinin transkripsiyonunu bloke eder, replikasyonun viral orjine bağlanması için LCR (Long control region) içinde lokalize olan E1 genine izin verir. Bu bağlanma S fazında olan konak hücrede viral genomun replikasyonunu başlatır. E2 aracılı E6 ve E7 transkripsiyonunun azalması, p53 ve pRB proteinlerinin salınımını sağlayarak konak hücrede normal hücre siklusunun yeniden başlamasına neden olmaktadır. L1 ve L2 transkripsiyona başlar ve sonra viral partiküllerin oluşumunu takiben virionlar serbest kalır. Bu evrede E4 proteini papillomavirusun olgunlaşmasını ve serbestleşmesini kontrol eder. Bu süreç sitolitik bir süreç gibi gözükmemektedir. Konak hücrede artan mitoz nedeniyle yüksek düzeyde hücre proliferasyonu gerçekleşmekte ve sonuç olarak hücre malignleşmesi meydana gelmektedir (Şekil 1) (25).



Şekil 1: HPV genomunun şematik olarak gösterilmesi.

L1: Major kapsit proteini, L2 minör kapsit proteini. E1'den E7'ye kadar olan proteinler viral replikasyon ve onkogenezi ile ilişkilidir. URR (upstream regulatory region) (50).

2.3.SINIFLANDIRMA

Human papillomavirus papovavirus (papovaviridae) ailesinin bir üyesidir (25). IARC 1995 yılında papillomavirusları, 4'ü karsinojenik (HPV tip 16 ve 18) ve 2'si ise olası karsinojenik (HPV tip 31 ve 33) tip olarak olarak sınıflandırıp iki temel gruba ayırmıştır (35). Daha sonraları ise tip 6, 11 ve 13 de bu sınıflandırmaya dahil edilmiştir (36,37).

Papillomaviruslarda yeni bir tip tanımlayabilmek için; HPV genomunda, bilinen en yakın HPV tiplerinin L1, E6 ve E7 ORF'leri arasında %10'dan daha fazla bir farklılığın olması gerektiği bildirilmektedir. Bu farklılık %2-10 arası ise yeni bir subtipi, %2'den az ise tip içi çeşitliliği göstermektedir (51). DNA dizi analiz yöntemine dayanarak yapılan sınıflandırmada HPV'nin 130'dan fazla tipi olduğu bildirilmektedir.

HPV duyarlı olan dokuya göre kutanöz ve mukozal olarak 2 grupta incelenebilir. Kutanöz HPV'ler derinin skuamoz epitelini infekte eder ve burada replike olur (siğiller gibi). Mukozal HPV'ler ise müköz membranları infekte edip replike olurlar ve epitelyum proliferasyonunu indüklerler (52).

Servikal kanser ve prekürsörleriyle alakasına göre HPV'ler yüksek riskli ve düşük riskli olmak üzere iki gruba ayrılarak incelenebilir. Düşük riskli tipler arasında 6, 11, 42, 43 ve 44; yüksek riskli tipler arasında ise tip 16, 18, 31, 33, 34, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 ve 70 sayılabilir. Yüksek riskli grupta olan bazı HPV tipleri nadiren kanserlerle ilişkilendirilebilirken, skuamoz intraepitelyal lezyonlarda sıkça bulunmaktadır. Bu nedenle bazı bilim adamları bu tipleri orta riskli tipler arasında sınıflandırmaktadırlar. Bunun yanında düşük riskli HPV tiplerinin de bazen servikal karsinomlara yol açabileceği bildirilmektedir (25).

HPV tip 6 ve 11 düşük risk grubunda yer alan, nadiren malignensiye sebep olan, genital siğillerin çoğunun etkeni olan, en sık rastlanılan iki tiptir. HPV tip 16 ve 18 ise invaziv anogenital kanserlerde öne çıkan, major yüksek risk grubunda yer alan tiplerdir (53,54).

HPV ailesinin 12'den fazla tipinin oral lezyonlarda bulunabileceği bildirilmiştir. Bu tipler; HPV tip 1, 2, 4, 6, 7, 11, 13, 16, 18, 30, 32 ve 57'dir (55).

HPV tip 13 ve 32 oral lezyonlarda nadiren tespit edilebilen tiplerdir. Çeşitli çalışmalarda oral lezyonlardan alınan örneklerde en sık rastlanılan iki HPV tipinin tip 16 ve 18 olduğu bildirilmiştir (56).

Kutanöz HPV tipleri genellikle ciltte bulunmakta olup siğillere neden olurken, mukozatropik HPV tipleri ise orofarinks ve anogenital yolun mukozasını tutmaktadırlar. Anogenital yolun mukozasına tropizm gösteren 40'tan fazla farklı HPV tipinin olduğu bildirilmiştir. Karsinojenitelerine göre bu tipler düşük riskli, olası yüksek riskli ve yüksek riskli olarak alt gruplara ayrılmışlardır (57,58).

Tanımlanan HPV tiplerinin 40'tan fazlasının anogenital yolun epitelini ve vücudun diğer mukozal bölgelerini infekte ettiği bildirilmektedir. Bu tiplerin 18 kadarının onkojeniteye sebep olduğu gösterilmiştir (59,60).

HPV tip 1, 4, 5, 8, 41, 48, 60 ve 65'in sıklıkla kutanöz ve plantar siğillerden, verrusiform epidermodisplazilerden, transplant sonrası immun depresif hastalardan ve bazı epitelyal tümörlerden izole edildiği bildirilmektedir. HPV tip 6, 11, 13, 44, 55, 16, 31, 33, 35, 52, 58, 67, 18, 39, 45, 59,68, 70, 26, 51, 69, 30, 53, 56, 66, 32, 42, 34, 64, 73 ve 54'ün ise hem kadınlarda hem de erkeklerde benign ve malign anogenital bölge lezyonlarında infeksiyon yaptığı bildirilmektedir. Bazen bu tiplerin oral kavite, orofarinks, larinks ve özefagus dokularında ve lezyonlarında da saptandığı gösterilmiştir. Son olarak başka bir grup HPV ise farklı olarak kutanöz ve müköz dokulardan ve lezyonlardan izole edilenlerdir. Bu tiplerin HPV tip 2, 3, 7, 10, 27, 28, 29, 40, 43, 57, 61, 62 ve 72 olduğu ve malign lezyonlarla ilişkisinin daha az olduğu gösterilmiştir (10).

2.4.PATOGENEZ VE İMMÜNİTE

2.4.1.Patogenez

Servikal karsinogenezin major evreleri; HPV infeksiyonunu takiben viral persistans ve prekanser döneme ilerleme ve invazyondur. HPV'nin bulaş yolları arasında en önemlisi cinsel temastır. İnfeksiyonun ilk yılı içerisinde tespit edilmesi moleküler yöntemlerle bile zordur. İnfeksiyon sıklığının en yüksek oranlara ulaştığı dönem genç yaşlar olup, bu oran tipe özgü kazanılmış immuniteye bağlı olarak ileriki yaşlarda azalmaktadır. HPV infeksiyonlarının çoğu makroskopik ve mikroskopik

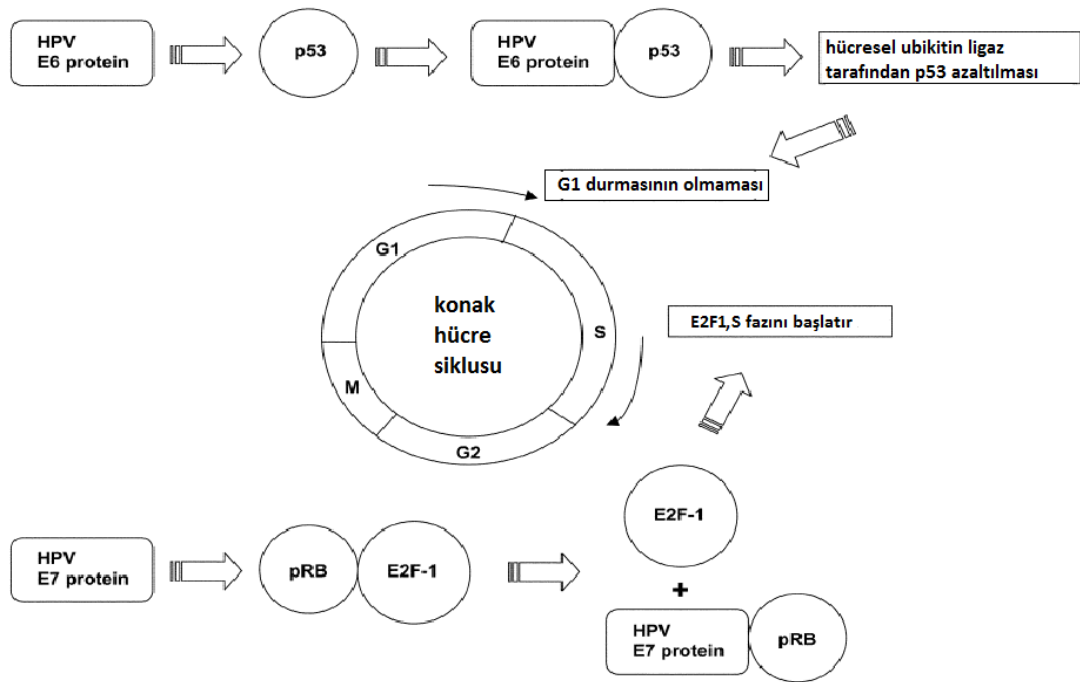
olarak tespit edilemeyecek düzeyde seyrettiğinden hastalığın tanısında HPV DNA saptama yöntemleri en güvenilir yöntemlerdir. Sigara kullanımının, çok doğum yapmanın ve oral kontraseptiflerin uzun süre kullanımının persistans ve progresyon riskini arttırdığı bildirilmiştir. Diğer seksüel geçişli hastalıkların (örn, Chlamydia trachomatis), kronik inflamasyon ve beslenme faktörlerinin de enfeksiyonda önemli rol oynayabileceği bildirilmektedir. Enfeksiyondan korunmada aşılamanın önemi büyük olup, aşı çalışmaları yoğun olarak devam etmektedir. Enfeksiyonun tanısında HPV DNA'nın tespitinin sitolojik yöntemlerden daha duyarlı ancak daha az spesifik olduğu bildirilmiştir. Halk sağlığı açısından klinisyenler, hafif anormal PAP smear testini, cinsel yolla bulaşabilen, servikal kanserlerle ilişkili HPV enfeksiyonu açısından ele alarak değerlendirmelidir (61).

Human papillomavirusun onkojenik tipleriyle meydana gelen enfeksiyonlar, tüm servikal kanser ve prekanseröz intraepitelyal lezyonların asıl sorumlusudur (57). Servikal transformasyon zonu, HPV karsinogenitesine çok duyarlı bir doku kısmını çevreler. Servikal kanserin ilerlemesi, görsel (kolposkopi ve ilgili teknikler), mikroskopik (sitoloji ve histoloji) ve moleküler olarak (HPV DNA test ve seroloji) değerlendirilebilir. Bu testler normal serviksten kansere kadar uzanan kritik basamakların göreceli olarak daha iyi anlaşılmasına imkan sağlamaktadır (61).

Normal olarak HPV enfeksiyonu epitelyum hücrelerinin bazal tabakasında bir kırık veya yırtıktan kaynaklanır. Diğer hücre tiplerinin HPV enfeksiyonuna karşı daha dirençli olduğu bildirilmiştir. HPV'nin üretilmesi ile ilgili yapılan hücre kültürü çalışmalarında HPV'nin diğer vücut hücrelerinde üretilmediği bildirilmiştir (62,63,64). Bunun sebebinin viral DNA replikasyonu sırasında keratinositlerin farklılaşması olduğu düşünülmektedir (64).

HPV replikasyon siklusu, virusun epitelyum bazal katman hücrelerine girmesiyle başlar. HPV enfeksiyonunun başlayabilmesinde orta derecede epidermal aşınmanın önemi büyüktür. İntegrin- $\alpha 6$, HPV tip 6 için epitelyal hücre reseptörü olarak bildirilmesine rağmen, diğer tiplerin adezyonu ve enfeksiyonunun başlaması için gerekli olmadığı bildirilmiştir (65,66,67). Diğer birçok virusta olduğu gibi HPV'nin bazı tipleri konak hücreye, hücre yüzeyinde bulunan heparin sülfat aracılığıyla bağlanmaktadır (67). Bunun yanında HPV'nin konak hücreye bağlanmasında proteoglikanların da rol aldığı bildirilmiştir (67). HPV'ler viral

transkripsiyon ve replikasyonu regüle etmek için ihtiyaç duyulan 8-10 proteini konak hücreden faydalanarak kodlar. HPV replikasyonu, konak hücre komponentleri ile HPV genomunun LCR bölgesinin etkileşimi ile başlar. Bu etkileşim E6 ve E7 genlerinin transkripsiyonunu indükler (1). E6 ve E7 proteinleri sonra p53 ve pRb proteinlerine bağlanıp inaktive ederek konak hücrenin mitotik aktivitesini azaltırlar. E6 ve E7 proteinlerinin, konak hücreye HPV invazyonu sırasındaki, fonksiyonu hücrenin büyüme düzenleyici yollarını kesmek ve konak hücre çevresini modifiye etmek, dolayısıyla viral replikasyonu kolaylaştırmaktır (1). E6 proteini p53 proteinini hedefledikten sonra p53 bir hücrel ubikitin ligaz tarafından hızlıca degrade edilir. Sonuç olarak G1 durur, apoptozis ve DNA onarımı iptal olur. HPV E7 proteini fosforile olmuş pRb'ye bağlanır. Bu bağlantı pRb ile hücrel transkripsiyon faktörü, E2F-1, arasındaki kompleksi bozar. Serbest E2F-1 sonra konak hücre için gerekli olan genleri S fazına girmek için kopyalamaya başlar. E7 proteini aynı zamanda siklin E ile bağlanabilir (1). Konak hücrede E6 ve E7 proteinlerinin fonksiyonları sonucu DNA sentezi stimüle edilir ve hücre proliferasyonu gerçekleşir (Şekil 2) (25).



Şekil 2: HPV E6 ve E7 onkojenik proteinlerin hedefleri ve etkileri. HPV E6 ve E7 onkojenik proteinleri hücrel p53 ve pRB proteinlerini bağlamakta ve konak hücre siklusunu değiştirerek tümörojenik hücre transformasyonuna sebep olmaktadır (49,68).

HPV infeksiyonları zararsız basit lezyonlardan kansere kadar değişebilen çeşitli klinik formlarda kendini belli edebilir. HPV infeksiyonu ile oluşan benign

lezyonlar ellerde ve ayaklardaki kutanöz siğillerle (plantar siğiller, yaygın siğiller, düz siğiller) sınırlıdır. Siğiller 1-5 yıl içinde iyileşebilen içi keratin dolu hipertrofiye olmuş cilt bölgeleridir. Bazı HPV tiplerinin ise yüz bölgesini infekte etmesi sıklıkla cilt kanseriyle sonuçlanabilir. Genel olarak ağız kenarında yerleşen diğer HPV tipleri, fatal skuamoz hücre kanserine dönüşebilen, küçük kalkık nodüllere sebep olur. Oral kavitedeki epitelyal hiperplazi odakları (Heck hastalığı) genellikle HPV tip 13 infeksiyonu ile ilgilidir. Epidermodysplasia verruciformis gövde ve üst ekstremitelerde HPV ilişkili siğillere neden olan, sonraki evrelerde ise invaziv skuamoz hücre karsinomuna dönüşen nadir bir genetik hastalıktır. Konjunktival papillomlar ve karsinomlar birçok çalışmada HPV infeksiyonuyla ilişkilendirilmektedir. Rekürren respiratuar papillomatozis genç çocuklarda larinksin major bir hastalığı olarak bildirilmiş olmasına rağmen, yetişkinlerde de rastlanabilmektedir. Genç çocuklarda görülen HPV infeksiyonunun sebebinin HPV infeksiyonlu annelerden kaynaklanabileceği düşünülmektedir (25).

HPV infeksiyonu temel olarak cinsel yolla bulaşan bir hastalıktır. Bu yüzden kadın ve erkeklerin her ikisi de epidemiyolojik zincire dâhildir ve her iki cins de aynı zamanda asemptomatik taşıyıcı ve bulaştırıcıdırlar ve HPV infeksiyonu riski altındadırlar (69). Bu sebeple, HPV infeksiyonunda en önemli risk faktörü cinsel tutumla ilgilidir. Erken yaşta cinsel ilişkiye başlama, çok eşlilik, yüksek riskli kişilerle cinsel ilişki bulaşta önemlidir. Erkeklerin sünnetli olması ve cinsel ilişkide kondom kullanımının geçiş riskini düşürdüğü bildirilmiş olsa da cinsel partnerler arasında HPV bulaşında yüksek düzeyde koruyucu olmadığı bildirilmektedir (70,71).

HPV infeksiyonunun yüksek düzeyde tespit edildiği gruplar arasında hayat kadınları ve HIV (Human Immunodeficiency Virus) pozitif kişiler sayılabilir. HPV'nin en önemli bulaş yolu cinsel temas olup, neoplastik transformasyon başlama potansiyeli en yüksek olan organlar serviks (transformasyon zonu) ve anal kanaldaki pektineal çizgidir (10).

Cinsel aktivitenin en yüksek olduğu yaşlarda subklinik HPV infeksiyonlarının (dokunun normal morfolojide olması veya minimal değişikliklerin söz konusu olduğu durumlarda HPV DNA tespit edilebilir) prevalansının bayanlar arasında %40'lara kadar çıkabildiği bildirilmiştir. Prevalansın 30 yaş üstü gruplarda ise %5-10'lara kadar düşüş gösterdiği bildirilmiştir. İnfeksiyonların yarılanma ömrünün

yüksek riskli tipler için 8-10 ay, düşük riskli tipler için ise bu sürenin yarısı kadar olduğu düşünülmektedir. Bazı çalışmalarda, HPV tip 16 enfeksiyonunun ortalama 16 ay kadar persiste olarak kalabildiği gösterilmiştir (72).

Cinsel aktivitenin yoğun olduğu genç yaşlarda HPV enfeksiyonuna sıkça rastlanılsa da bu dönemde enfekte kadınların çoğunda (%90'dan fazlasında) enfeksiyonun kendiliğinden iyileştiği de bilinmektedir. Ancak bu enfeksiyonların çok az bir kısmında enfeksiyon persiste olarak kalmaktadır (73). Kronik HPV taşıyıcıları ve anogenital bölgede neoplastik lezyonlar geliştirme riski yüksek olan kadınların bu küçük grupta yer aldığı bildirilmektedir (74).

Hastalığın progresyonunda önemli olan faktörler arasında; viral tip, enfeksiyon tipi (persiste enfeksiyon vb.), hücre başına düşen viral yük ve viral DNA'nın hücre DNA'sına integre olması sayılabilir. Hastanın HIV ile enfekte olması, özellikle immünsüpresyon dönemlerinde, HPV enfeksiyonu ve neoplastik lezyon geliştirme için önemli risk faktörüdür. Bunların dışında oral kontraseptiflerin uzun süre kullanılması, çok doğum yapma ve sigara kullanımı da önemli risk faktörleri arasında yer alır (75,76). Ayrıca diyet yapma (meyve ve sebzelerden fakir diyet), Chlamydia trachomatis ve Herpes simplex gibi diğer cinsel temasla bulaşan hastalıklarla koenfeksiyon olası diğer risk faktörlerindedir (77,78).

HPV'nin anogenital kanserlerdeki rolü ile ilgili çok çeşitli çalışmalar mevcuttur. Yaklaşık olarak 50 farklı HPV tipinin anogenital bölge yüzeyini enfekte edebildiği bildirilmiştir (79). Bu tiplerin çoğunun prekanseröz lezyonlar, oral kavite mukozal lezyonları ve lenf nodu metastazlarından izole edildiği bildirilmiştir (56).

HPV'ler onkojenik potansiyeline göre iki major grupta sınıflandırılabilirler. HPV 6 ve Hpv 11 nadiren malignensiye ilerleyen, genital siğillerin çoğunun sebebi olan, düşük risk grubunun en sık iki tipidir. HPV 16 ve 18 invaziv anogenital kanserlerde öne çıkan, major yüksek risk grubu tipleridir (53,54). Genital lezyonlarda olduğu gibi HPV 16 benignden premaligne ve maligne kadar çoğu oral lezyonla da en sık ilişkili virustur (80).

HPV'lerin morfolojik olarak skuamoz hücre karsinomuyla ilişkileri ve oral keratinositleri ölümsüzleştirebilmeleri ve epitelyal hücrelerde transformasyon meydana getirmelerinden dolayı OSCC'den primer olarak sorumlu olabileceği

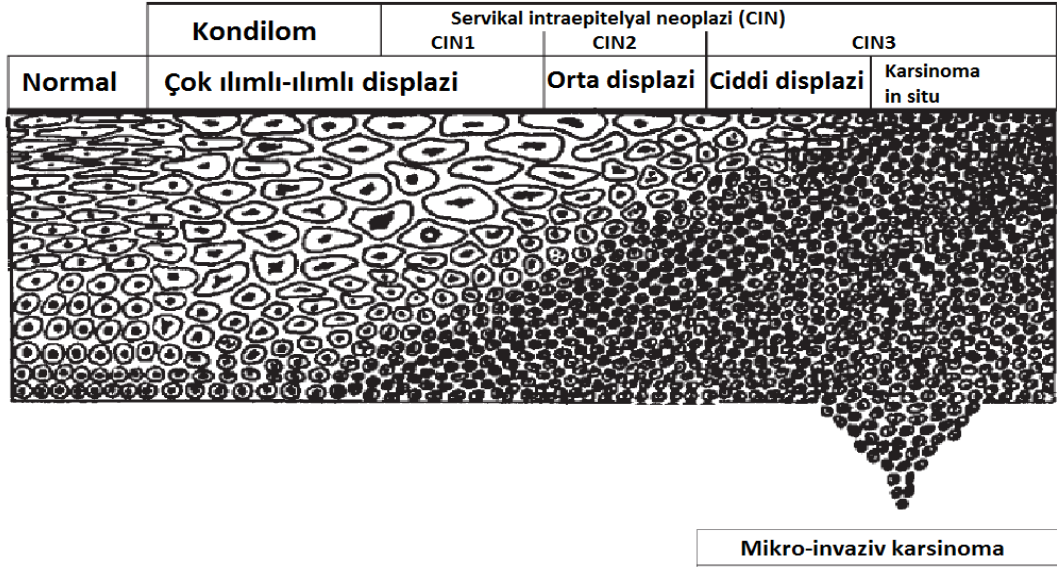
düşünülmektedir (55). Kimyasal karsinojenlere, infeksiyonlara ve travmaya en açık bölge olan bukkal mukoza karsinogenezde en korumasız olan bölgelerdendir. Bu etkilere sürekli maruz kalınmasıyla oluşan mukoza abrazyonların HPV'lerin bazal hücrelere ulaşmasını kolaylaştırdığı kabul edilmektedir (64,81).

HPV'nin tümörögenezdeki etki mekanizmasının aşağıdaki gibi olduğu düşünülmektedir.

- HPV'nin E1/E2 gen bölgesi konak genomla birleşmeyi sağlar. Erken ORF'de kodlanan E6 ve E7'nin artışı tümörojiteyi artırır.
- E6 ve E7'nin etkisi virusun erken ORF'sinde kodlanan E2 proteinin azalmasına neden olur.
- Konak genomunun fonksiyonlarının değiştirilmesiyle p53 ve pRB tümör süpresör genlerinin ve karsinogenezle alakalı birçok hücresel proteininin bozulması başlar.
- Daha sonradan bu infekte hücreler apoptoz kontrolü yapan genlerde, DNA onarımında, hücre siklusunda hasar meydana getirir. Bunlar hücre transformasyonuna yol açar (56).

Bir ya da daha fazla yüksek riskli subtip persistan infeksiyonun olması CIN hastalığının gelişmesine ve ilerlemesine öncülük eder. İlerleyici bir şekilde gelişen hücresel değişiklikler epitelin bazal hücre katmanındaki infeksiyon ile başlar. Tüm işleyiş genel olarak 10-40 yıllık bir zaman periyodunu kapsar ancak bazı olgularda bu süre sadece 1-2 yıl da olabilir. Genellikle CIN1 değişiklikleri 3 ay içinde, CIN2 değişiklikleri 6 ayda ve CIN3 değişiklikleri 1-2 yılda ortaya çıkar. Onkojenik sürecin açığa çıkmasında, patojen virulans faktörlerinin olup olmaması ve konağın doğuştan gelen immun faktörleri belirleyici rol oynar. Anormal infekte hücreler ve CIN1, düşük dereceli skuamoz intraepitelyal lezyonlar (LSIL) olarak da isimlendirilir. CIN2 ve CIN3 de aynı zamanda yüksek dereceli intraepitelyal lezyonlar (HSIL) olarak isimlendirilir (Şekil 3). CIN1 gelişmesi ileride kanser oluşması anlamına gelmez. Çünkü nononkojenik HPV tipleriyle infeksiyonda da oluşabilir. CIN2 değişiklikleri bile doğal olarak geri dönebilir. Yüksek riskli HPV DNA'sı olan ve sito-morfolojik olarak normal olan kadınların önemli bir kısmı 4 yıl içinde CIN2 veya CIN3 geliştirecektir. Ters bir durumda; yüksek riskli HPV DNA negatif olan

ayrıca sitolojik olarak anormal olan (önemi belli olmayan atipik skuamoz hücreler, sınırdı veya hafif displazi) kadınların 2 yıla kadar CIN 2 veya 3 geliştirmeleri ihtimali yoktur ve sitolojilerinin normale dönmesi ihtimal dâhilindedir (82).



Şekil 3: CIN ve servikal kanser gelişimindeki histolojik değişimlerin şematik gösterimi (83).

Onkojenik HPV tiplerinin E6 ve E7 proteinleri genel olarak dominant onkoproteinler olarak tanımlanır (84).

Karsinogenezisi destekleyen HPV'lerdeki major mekanizma, kritik hücre döngüsü proteinlerini engelleyen bu proteinlerin (p53'ü E6 ve pRB'yi E7) aktivitesini de içine alır. E6 ve E7'nin hücre proteinleriyle ve DNA metilasyon değişiklikleriyle etkileşimi; genomik bütünlüğü, hücre adezyonunu, immun cevabı, apoptoz ve hücre siklusunu kontrol eden ana hücre yolaklarında değişikliklerle alakalıdır (85).

Anormal sitolojili ve yüksek riskli HPV tipleriyle persistan infeksiyonu olan kadınların yüksek dereceli lezyonlar geliştirme ihtimalinin en az 300 kat arttığı bildirilmiştir (86). Yüksek onkojenik riskli tiplerle genital HPV infeksiyonu, servikal kanser gelişimi için önemli bir risk faktörüdür (87).

HPV infeksiyonunda bazal tabakanın bütünlüğünün mikrotravma veya çevresel faktörlerle bozulması ile HPV epitelyumu infekte eder. Viral DNA'nın bir epizom olarak bulunması büyük ihtimalle E1 ve E2 ekspresyonu ile olur (88). Papillomavirusları, DNA sentezi için tamamen konak hücresi replikasyon

mekanizmasına bağlıdır. Viral proteinlerin sentezi çok sıkı bir şekilde düzenlenmektedir ve hücre farklılaşmasına bağlıdır (46).

Genellikle yüksek onkojenik riskli HPV DNA'sı konak genomunun kırılğan bölgelerine girer (89) ve CIN lezyonunun aşama aşama ilerlediği yerin burası olduğuna inanılmaktadır. Konak genomuna viral integrasyondan sonra viral E2 bölgesinin bozulması başlar ve E2 transkripsiyonu azalır. Bunun sonucu olarak da E6 ve E7 onkoproteinlerinin sentezinde artış meydana gelir (90,91). Düşük dereceli CIN'de E6 ve E7 ekspresyonu bazal katmanda düşük derecededir. Ekspresyon yüksek dereceli CIN lezyonlarında ve servikal kanserde tüm epitelyal katmanlarda artar. Daha sonra onkoproteinler konak hücrenin iki kritik mitoz önleyici yolağını (p53 ve retinoblastoma yolakları) engeller. E6 proteini apoptozisi ve büyümenin durmasını indükleyen p53 proteinini hedef alır. E7'nin pRB'ye bağlanması pRB'nin inaktivasyonuna ve konak transkripsiyonel faktör E2f'nin serbestleşmesine neden olur. Bu faktör sonunda hücre siklusu düzenlemesini bozar. E6 ve E7'nin bu yolakları inaktive etmesi nedeniyle hiperproliferasyon (E7 bağımlı), genetik dengesizlik, sayısal ve yapısal kromozom sapmaları ve ölümsüzleşme (hepsi E6 bağımlı) meydana gelir (92). E6 ve E7 aktivitelerinin indirekt olarak ölçülmesinin potansiyel olarak CIN lezyonlarının biyolojik davranışlarını önceden belirlemek için kullanılabilceği bildirilmektedir (31).

Yukarıda açıklandığı gibi viral DNA'nın integrasyonu ile oluşan karsinogenezde %40'dan fazla servikal kanser epizomal formda HPV 16 içerir. E1 ve E2 genlerinin integrasyonu ve bozulmasının dışında diğer mekanizmalar da E6 ve E7 ekspresyonunu aktive etmek için olmalıdır (93,94).

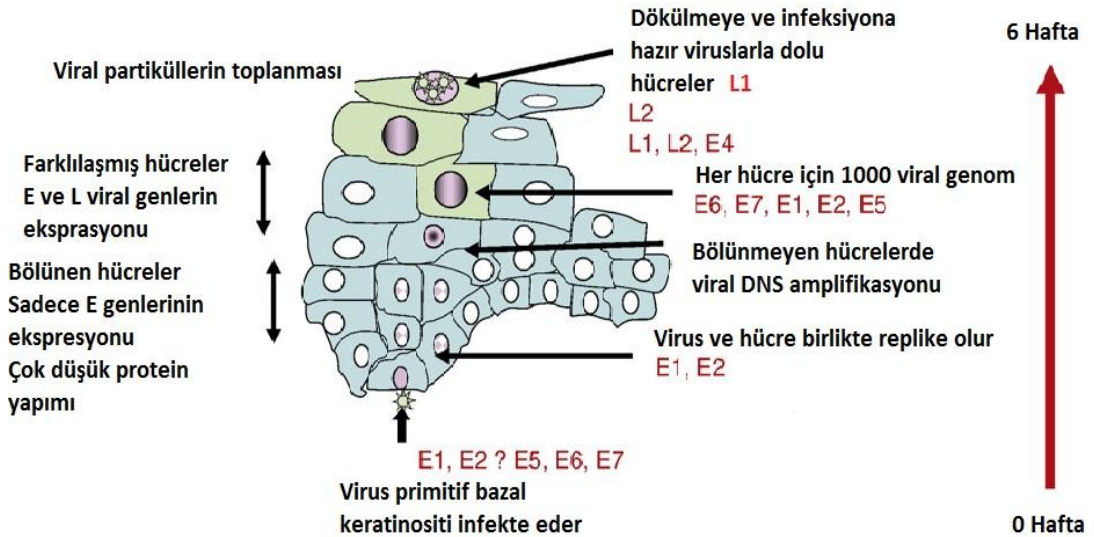
2.4.2.İmmünite

İmmun sistemin en temel görevi yabancı ajanları tanımak ve onlarla savaşmak için doğuştan ve kazanılan immunitiyi kullanmaktır. Fakat mekanizma HPV enfeksiyonunda olduğu gibi bazen etkisiz kalabilmektedir. HPV, immün sistemden korunmak için çeşitli mekanizmalar kullanır. Korunmak ve çoğalmak için immün merkezlerden uzakta olan keratinositleri infekte eder. Keratinositlerin doğası gereği ömürleri kısadır. Bu kısa ömürden dolayı, virusun salınımı sırasında hücrenin parçalanmasıyla tetiklenebilecek immün cevap ve inflamasyon engellenmiş olur. Ek

olarak HPV, interferon genlerinin ürünlerini azaltır. Virusun immün sistemden kaçmasına rağmen immün sistem çoğu zaman HPV infeksiyonunu etkin bir şekilde engellemektedir. Güçlü bir şekilde lokalize olmuş hücresel immün cevabın bunda rolü büyüktür (95).

2.4.2.1.İnfeksiyöz döngü

Papillomaviruslar her yerde bulunan ve doku tropizmi olan viruslardır. Bu virusların infeksiyöz siklusu hedef hücrenin farklılaşmasını içerir. Viral gelişmenin farklı evreleri epitelde farklılaşan keratinositin olgunlaşma evrelerine eşlik eder. İnfeksiyon ve viral gelişme kesinlikle keratinosit farklılaşmasına dayanır. Virus ilk olarak bazal keratinositleri infekte eder. Muhtemelen kök hücreleri hedef alır. Fakat genellikle viral proteinler ve viral yapılar sadece skuamoz epitelin stratum spinosum ve granulozumunun üst katmanlarında ortaya çıkar (Şekil 4) (96,97). Klinik bulgular, viral gen ekspresyonunun keratinositler veya skuamoz maturasyon potansiyeli olan hücrelerle sınırlı olduğunu göstermektedir. İnfeksiyondan virusun temizlenmesine kadar geçen süre yaklaşık olarak 3 haftadır. Bu süre bazal keratinositin tamamen farklılaşma ve deskuamasyonu için gereken süredir. İnfeksiyondan lezyonların görülmesine kadar geçen periyot, virusun immün sistemden etkili bir şekilde kaçtığını gösterir bir şekilde, haftalardan aylara kadar çok değişkenlik gösterir (98).



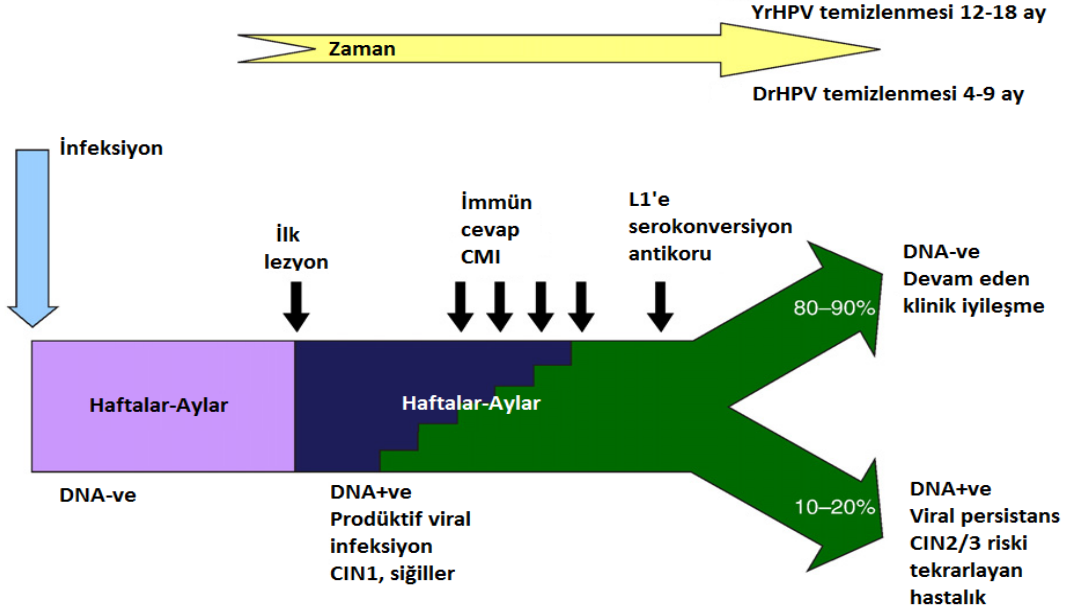
Yalnızca intraepitelyal infeksiyöz siklus; sitoliz veya ölüm yok, viremi yok, uzun infeksiyöz siklus

Şekil 4: Yüksek riskli HPV'lerin infeksiyöz siklusu (99).

Viral replikasyonda viral proteinler, koilosite dönüşmek için farklılaşan keratinositlerde nükleer yoğunlaşmayı geciktirirler. Sonra virus yüklü keratinosit doğal sebeplerle ölür. Bundan dolayı HPV infeksiyonunda inflamasyon görülmez ve immün sistemde virus varlığından dolayı uyarılmak için önemli bir tehlike sinyali oluşmaz. Bu durum, konak uzun dönem boyunca patojeni yok saydığı için, persistan ve kronik infeksiyonla sonuçlanabilir (95).

2.4.2.2.Hücreyel immünite

HPV infeksiyonuna karşı hücreyel immün cevabın doğası hakkındaki ipuçları, kendiliğinden gerileyen genital siğiller üzerinde yapılan immunohistokimyasal çalışmalardan elde edilmiştir. İyileşmenin olmadığı genital siğillerde infeksiyon bölgesinde immün sistem hücreleri bulunmamaktadır. Genel olarak stromada az sayıda intraepitelyal lenfosit, CD8 hücresi ve mononükleer hücre bulunurlar. İyileşmenin görüldüğü genital siğillerin histolojik incelenmesi, T hücrelerin (CD4 ve CD8'in her ikisi) ve makrofajların siğil stroması ve epitelyum içerisine büyük bir infiltrasyon yaptığını gösterir. İnfiltrasyon yapan lenfositler aktivasyon markırları açığa çıkarır. Sitokinler; interlökin-2 (IL-2), tümör nekrozis faktör- α (TNF- α) ve interferon- γ (INF- γ) gibi proinflamatuvar sitokinlerce zengindir. Lenfositlerin siğil kapillerlerinin endotelindeki değiş tokuşu için gerekli olan adezyon moleküllerinde bir artma vardır (100). Bu Th-1'e dayanan immün cevabın karakteristiğidir fakat kesitsel çalışmaların işleyişin sadece bir anına ait olduğunu unutmamak gerekir. Etik sebeplerden dolayı insanlarda sınırlı sayıda çalışma yapılabilmektedir. Oral papillomavirus infeksiyonu olan köpekler gibi mukozal papillomavirus infeksiyonu olan hayvan modellerinde infeksiyondan iyileşmeye kadar olan tüm siğil döngüsündeki immunolojik olaylar takip edilebilir. Bu hayvan infeksiyonlarında siğil iyileşmesi, genital siğillerde görülene benzer şekilde hücreyel infiltrasyonla birlikte dir. HPV E2 ve E6 proteinlerine karşı yönlendirilen sistemik T hücre cevapları, infeksiyon siklusu sırasında farklı zamanlarda düşük sıklıkta saptanabilir. Bu tür cevaplar viral DNA amplifikasyonu periyotlarına denk gelecek şekilde kısıtlı zaman pencerelerinde oluşmakta ve siğil iyileşmesinde en sık olup akabinde hızlıca düşmektedir. Ayrıca nötralize edici antikorların serum düzeyleri siğil regresyonunda pik yapmaktadır (Şekil 5) (101).



Şekil 5: Genital HPV infeksiyonunun doğal süreci (99).

Epidemiyolojik ve doğal seyirli çalışmalar, insanlardaki HPV infeksiyonunda immün cevabın benzer bir yol izlediğini göstermektedir (102,103). Çalışmalar genital HPV infeksiyonunun prevalansının cinsel olarak aktif genç kadınlar arasında %80'lere kadar çıktığını göstermektedir (104). Bu infeksiyonların çoğu iyileşmektedir. Yüksek onkojenik riskli HPV infeksiyonlarının iyileşmesi için gereken sürenin özellikle HPV 16 için 8-14 ay kadar, düşük onkojenik riskli HPV infeksiyonları için ise bu sürenin 5-6 ay kadar olduğu bildirilmiştir (104,105). Eğer immün cevap, infeksiyonu iyileştirmede veya kontrol etmede başarısız olursa, özellikle yüksek onkojenik riskli HPV DNA replikasyonunun yüksek düzeyde olduğu yerlerde persistan infeksiyon oluşur. Persistan infeksiyonu olan bireylerin yüksek dereceli servikal intraepitelyal neoplaziye ve invaziv karsinoma ilerleme ihtimalleri yüksektir (74,102,106).

İmmünsüprese kişilerde HPV infeksiyonunun insidansının yükselmesi ve progresyonu HPV infeksiyonlarının kontrolü ve iyileşmesinde hücre aracılı immün cevabın kritik önemini göstermektedir. HIV ile infekte hastalarda servikal intraepitelyal neoplazide rekürrenslere sık rastlanılmaktadır (107). Bu hastalar arasında genital siğillerin insidansında (108) ve subklinik HPV infeksiyonunun klinik HPV infeksiyonuna dönüşme riskinde artış olur (109). Yaşlar 13-18 arasında değişen HIV ile infekte kız çocukları arasında yapılan prospektif çalışmalarda HPV DNA

persistanslığının uzadığı (110) ve yüksek dereceli skuamoz intraepitelyal lezyonların insidansında artış olduğu bildirilmiştir (111). Bu çocuklarda yüksek dereceli intraepitelyal lezyonların, saptanabilir lezyonu olmayan yüksek onkojenik riskli HPV DNA persistansından çok, primer olarak düşük dereceli lezyonların persistansına bağlı olarak olduğu saptanmıştır (111). Bu olay; persistan, aktif infeksiyonda sağlıklı viral gen ekspresyonunun hastalık progresyonunda önemli olduğu anlamına gelmektedir (95).

2.4.2.3. İmmun sistemden kaçış mekanizmaları

HPV infeksiyonu özellikle intraepitelyal bir infeksiyon olup skuamoz epitelin antijen sunan hücreleri olan langerhans hücreleri tarafından saptanması gerekmektedir. Aktive olmuş langerhans hücresi HPV antijenini işleyerek lenf noduna göç etmeli ve lenf nodunda T hücelere antijeni sunmalıdır. T hücreleri sonra uyarılmış efektör hücelere farklılaşmalı ve sonra tekrar infekte bölgeye göç edip infekte olmuş keratinositleri yok etmelidir (95).

Bunların olmaması için birkaç neden vardır. HPV'nin infeksiyöz döngüsünün kendisi, konağın virusu saptamasını inhibe eden bir immün sistemden kaçma mekanizmasıdır. Hücre zaten doğal nedenlerle öldüğü için HPV replikasyonu ve salınması hücre ölümüne neden olmaz. Bu "doğal nedenlerle ölme" immün sisteme bir tehlike sinyali olarak sunulmaz. Aslında tehlike sinyali geliştirebilen hücre ölümü inflamasyon için gereken bir olaydır. Bu nedenle çoğu HPV infeksiyöz siklusunda dentritik hücrelerin aktivasyonu ve göçü için önemli olan proinflamatuvar sitokinler ya hiç salgılanmaz ya da az salgılanır. Yani skuamoz epitelde immün cevap için gerekli olan sinyaller yoktur (112).

Ancak viral kaynaklı sitoliz ve hücre ölümü olmamasına karşın HPV ile infekte keratinositler güçlü antiviral savunma sistemi aktivasyonu, tip 1 interferon sekresyonu, yapmalıdır. Tip 1 interferonlar (INF- α ve INF- β) antiviral, antiproliferatif, antianjiojenik ve immünsitümölan özelliklere sahip olup doğuştan ve kazanılmış immünite arasında köprü gibi rol oynamakta ve olgunlaşmamış dentritik hücreleri aktive etmektedirler (113,114). Papillomaviruslar gibi çoğu DNA virusu interferon sentez ve salgılanmasını inhibe edecek mekanizmalara sahiptirler. Yüksek onkojenik riskli HPV viruslarının INF- α gen ekspresyonunu baskıladığı bildirilmiştir

(115,116) HPV tip 16 E6 ve E7 onkoproteinlerinin interferon sinyal yollarının komponentleriyle doğrudan etkileşim halinde olduğu (117,118) ve bu yolları inhibe ettiği bildirilmektedir. Viral kapsid girişi genellikle dentritik hücreler için aktive edici önemli bir sinyal olsa da stromal dentritik hücelere benzemeyen langerhans hücreleri HPV kapsidlerinin alınmasıyla aktive olmamaktadır (119,120).

HPV etkili bir şekilde doğal immun cevaptan kaçır ve kazanılmış immun cevabın aktivasyonunu geciktirir. Konak dentritik hücreler uzun bir süre, inflamatuvar olmayan, düşük düzeyde viral proteine maruz kalır. Bunun sonucu infekte mukozada bölgesel immun cevapsızlık oluşur (121). Bunun sonucu HPV antijenine toleranslı bölgede konak savunması geri dönüşümsüz şekilde gölgelenir ve HPV antijen spesifik efektör hücreler ya infekte bölgeye toplanamaz veya aktiviteleri baskılanır veya da her ikisi birlikte gerçekleşir. Bu sebeple persistan yüksek onkojenik riskli HPV infeksiyonu sırasında E6 ve E7'nin protein ekspresyonlarının artışı gözlenir ve uyarılmış efektör hücre kaynaklı immun cevap gelişmemektedir. Böylece HPV kaynaklı yüksek dereceli skuamoz intraepitelyal lezyonlar ve invaziv karsinom engellenmemiş olur (95).

2.4.2.4.HPV İnfeksiyonlarına Karşı İmmun Yanıt

HPV'nin konak savunmasını engelleme kabiliyetine karşın, genital HPV infeksiyonlarının çoğunda başarılı bir immun cevap oluşur. Bu; güçlü, bölgesel ve lezyonun gerilemesiyle ve serum nötralizan antikorların geliştirilmesiyle ilgili olan hücre aracılı immunite ile karakterize gibi görünmektedir. Nötralizan antikorlar infekte kişilerin çoğunda gelişir (122,123). Bu antikorlar sağlam virus partikülünün dış yüzeyinde bulunan L1 proteininin üzerindeki adaptif epitoplara karşı gelişir. Doğal HPV infeksiyonundan sonra oluşan serum nötralizan antikor düzeyleri pik yaptığı zamanlarda bile düşük düzeydedir (124). Bu, muhtemelen makrofajlardan ve antijen sunucu hücrelerden uzak bir yer olan yüzeysel epitelyum hücrelerindeki infeksiyöz siklusa dolayısıdır. Çünkü bu dönemde virus partiküllerinin intraepitelyal üretimi olur ve viremi yoktur. Bu faktörler, viral antijenlerin B ve T hücrelerine sunumunu sınırlar (125).

Bu olay HPV'nin major L1 kapsid proteinine karşı nötralizan antikor üretimini sağlayan bir aşının etkili olabileceğini düşündürmektedir. Köpek, inek ve tavşanın

L1 VLP (virus-like particle)'nin uyardığı nötralizan antikorlar ile immunizasyonu şeklinde yapılan çalışmalarda bu hayvanların virusa karşı tamamen dirençli oldukları görülmüştür (126). Bu, L1 VLP'yi insanlar için tam olarak profilaktik aşı olmaya aday yapar. Sağlıklı örneklerde faz 1 doz çalışmaları, 9-100 mikrogram HPV L1 VLP'lerin 4-6 ay arayla 3 injeksiyon şeklinde verilmesinin yüksek miktarda anti L1 antikorları üretmesi nedeniyle, yüksek oranda immunojenik olduğunu göstermiştir. Tüm VLP ile immunize edilen örneklerde, doğal hastalarda tespit edilenden daha fazla miktarda anti-VLP antikor cevabı oluştuğu tespit edilmiştir (127,128). VLP aşılmasının uyardığı dominant antikor yanıtının IgG1 alt tipinde olduğu bildirilmiştir (127,129,130).

Çeşitli çalışmalarda, HPV pozitif olduğu bildirilen baş boyun kanserlerinin prognozunun, yaşam süresi açısından, daha iyi olduğu bildirilmiştir (131). Hatta, HPV'nin p53 ve pRb üzerine etkisinin, tütün ve alkol gibi karsinojenlerin yaptığı klasik mutasyonlardan daha az zararlı olduğu söylenmektedir. Çünkü p53 inaktivasyonunun HPV E6 varlığının derecesine bağlı olduğu ve bazı p53'lerin inaktivasyondan kurtulabildiği ve kalan fonksiyonel p53'lerin radyoterapiden sonra hücrel apoptozise aracılık edebileceği bildirilmektedir. Bu durumun tartışmalı olduğu ve HPV nedenli OSCC'lerde tümörün daha iyi rayosensitif olmasıyla bağlantılı olduğu bildirilmektedir (132,133).

HPV infeksiyonlarına karşı toplum immunitisini uyarmak ve infekte kadın havuzunu küçültmek için erkeklerin aşılması tartışılmış, ancak böyle bir uygulamanın faydasının düşük olacağı ve maliyet olarak yeterince uygun olmadığı tespit edilmiştir. Diğer bir sorun da; kitlesel aşılanmanın, HPV ile etiyolojik olarak alakalı servikal kanser dışı kanserlerin insidansına etkisinin değerlendirilmemiş olmasıdır (134).

Birçok epidemiyolojik çalışmada HPV prevalansında yaşa bağlı bir düşüş olduğu görülmektedir. Yüksek oranda HPV'ye maruz kalan hayat kadınları üzerinde yapılan bir çalışmada cinsel aktivitenin yüksek oranda devam etmesine rağmen HPV prevalansında yaşla birlikte önemli bir azalma olduğu gösterilmiştir (135). Bunun sebebinin infekte olan kadınların gelecekteki infeksiyonlardan koruyucu olarak, adaptif bir immun cevap oluşturması olabileceği düşünülmektedir. Birçok çalışmada HPV infeksiyonunun 25 yaş altındaki genç kadınlarda pik yaptığı, 45-50'li yaşlarda

infeksiyonun prevalansında düşüş ve peri- veya postmenopozal dönemde ise tekrar bir pik yaptığı bildirilmektedir (136,137). Hastalığın postmenopozal dönemde yaptığı pikin sebebinin ne olduğu tam bilinmemekle birlikte; erken yaşam evresinde kazanılmış bir latent infeksiyonun, tip spesifik immünitinin aşamalı olarak kaybına bağlı olarak, reaktive olması gibi bir ya da daha fazla istisnai mekanizma veya ileriki yaşlarda yeni bir partnerle olan cinsel temasa bağlı olarak yeni bir infeksiyon kazanılması olabileceği düşünülmektedir (138).

Cinsel aktivite ile korele olarak, HPV infeksiyonuyla en uyumlu faktör, 30 yaşından sonra riskte keskin bir düşüş olduğunu gösteren birçok çalışmaya göre yaştır (139,140,141). Yaşın artmasıyla HPV infeksiyon riskindeki bu düşme seksüel davranışların değişmesinden bağımsız gibi görünüyor ve immun cevabın rolü olduğunu akla getiriyor. Yukarda tanımlandığı gibi ileriki yaşlarda olan ikinci pik de epidemiyolojik bulguların genel bir özelliğidir (138).

Bazı çalışmalarda, HPV'nin persistansı ve progresyonu üzerinde moleküler varyant, viral yük gibi bazı viral faktörlerin rolü olduğu gösterilmiştir. HPV infeksiyonunun her zaman neoplastik dönüşüme sebep olmadığı da bildirilmiştir (142,143). Bu durum, HPV infeksiyonunun gelişmesinde ve/veya iyileşmesinde kişisel immun sistemin rol oynayabileceğini göstermektedir. Bu mekanizma Human Leukocyte Antigen (HLA) sistemindeki genetik polimorfizme bağlanabilir. HLA genlerinin, HPV infeksiyonunun tüm evrelerine karşı immun cevabın düzenlenmesinde rol aldığı bildirilmiştir (144). Maciag ve ark.'larının yaptıkları bir çalışmada sınıf-2 HLA genlerinin HPV infeksiyonun gelişmesinde oldukça yüksek öneme sahip olduğu gösterilmiştir (145).

HPV infeksiyonunun iyileşmesinin, aynı virus tipiyle tekrar infeksiyon olmasına karşı koruma sağladığı ve bazı diğer tiplere karşı çapraz immunité şeklinde koruma sağladığı gösterilmiştir (10).

HPV'ye karşı kişisel immun cevabın farklılıkları infeksiyonun progresyonunu belirlemede kritik rol oynar. HPV ve immunité ile ilgili çalışmalar devam etmektedir, fakat başarılı immun cevap için hangi kişisel faktörlerin ne derece önemli olduğu tam olarak belli değildir. Sigara, çok doğum yapma ve uzun dönem oral kontraseptif kullanımı gibi faktörlerin HPV infeksiyonunun progresyonuyla ilgili olduğu ve

servikal kanser gelişmesinde etkili kofaktörler arasında olabileceği düşünülmektedir (146,147). Bunun yanında Chlamydia trachomatis infeksiyonu gibi diğer cinsel temasla bulaşan infeksiyonlar, kronik inflamasyon ve diyetin de HPV infeksiyonlarının oluşmasında önemli faktörler arasında olduğu bildirilmiştir (148). Günümüzde HPV ile infekte kadınlar arasında yapılan çeşitli çalışmalarda sadece sigaranın prekanser veya kanser için risk faktörü olduğu kanıtlanabilmiştir (149,150).

2.5.KLİNİK GÖRÜNÜMLER

2.5.1.Onkogenez

HPV hemen hemen tüm servikal kanser ve servikal intraepitelyal neoplazi olgularının etyolojik ajanı olarak sayılmaktadır. Epidemiyolojik, klinik ve laboratuvar sonuçlarına dayanılarak elde edilen veriler HPV'nin servikal kanserin en önemli sebebi olduğunu göstermektedir (82). Bu ilişki sigara içmekle akciğer kanseri arasındaki ilişkiden daha güçlüdür ancak, HPV infeksiyonundan sonra servikal kanser gelişmesi kaçınılmaz değildir. İnfekte olan her bir milyon kadından yüz bininin ya da %10'unun prekanseröz servikal hücre değişiklikleri (servikal displazi) göstereceği tahmin edilmektedir. Bunların da yaklaşık %8 (8000)'inin servikal hücrelerin dış katmanlarına özgü erken kanser geliştirdiği ve yaklaşık olarak bu kadınların 1600'ünde invaziv servikal kanser geliştiği bildirilmiştir. Diğer taraftan ölüm oranlarının servikal kanser insidansından önemli oranda düşük olduğu ve dünya genelinde bu ölüm insidans oranının %55 olduğu tahmin edilmektedir (134).

Cinsel yolla bulaşan en yaygın viral infeksiyonlardan biri genital HPV infeksiyonlarıdır (151). HPV infeksiyonlarının yaşla ilişkili olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Yaşları 15-25 arasında değişen kadınlarda prevalansın en yüksek olduğu ve tüm infeksiyonların %25-40'ının bu yaş aralığında görüldüğü bildirilmiştir. HPV'ye maruziyetin azalması ve infeksiyonun tekrarından dolayı oluşan direnç nedeniyle yaşın artması ile infeksiyon prevalansı azalmaktadır. Üç yıllık cinsel aktivitesi olan kadınlarda genital HPV infeksiyonlarının kümülatif insidansının %50 civarında olduğu tahmin edilmektedir (151). Farklı toplumlarda yaşa özgü prevalans farklılık göstermektedir. Çoğu batı toplumunda yaşın artmasıyla risk azalır. Güney Amerika'da ise ileri yaşlarda HPV prevalansı arttığı bildirilmektedir (152). Bu prevalans değişikliği orta yaş grubunda cinsel

davranışların değişmesi nedeniyle olmaktadır. Yine bu nedenden yeni HPV infeksiyonları ortaya çıkmakta veya genç yaşlarda kazanılmış latent HPV infeksiyonu yeniden aktive olmaktadır. Kadınlarda geniş yaş aralığında yaşa özgü HPV insidansının araştırıldığı bir çalışmada 40 yaş sonrası insidansta artışlar olduğu ve bu artışın nedeninin yeni cinsel partner olduğu belirlenmiştir (153). Genital infeksiyonun doğal seyri hakkında erkekler kadınlar kadar ayrıntılı araştırılmamıştır (154). Genel olarak sünnetli erkeklerde infeksiyon riski oldukça düşüktür bu nedenle; cinsel partneri sünnetli olan kadınlarda da servikal kanser riski azalmaktadır (76).

Sitolojisi normal olup HPV pozitif olan kadınların HPV negatif olan kadınlara göre anormal sitoloji geliştirme riski daha fazladır (28).

Genital infeksiyonların çoğu spontan olarak iyileşmektedir (151,72). HPV infeksiyonu iyileşebilmesine rağmen infeksiyonun CIN3'e dönüşü de mümkündür. Düşük veya yüksek onkojenik riskli HPV tipleri düşük dereceli displaziye neden olabilmektedir. Yüksek onkojenik riskli HPV tiplerinin persistan infeksiyonu nadiren görülmekte olup CIN3 veya invaziv karsinomun gelişmesi için en önemli risk faktörüdür. Persistan infeksiyonun süresi kesin olarak bilinmemesine rağmen, 6 ay gerektirdiği tahmin edilmektedir. Persistan infeksiyon genel olarak 12 ay içinde birbirinden farklı iki genital örnekte aynı HPV tipinin infeksiyonunun tespit edilmesi olarak tanımlanmaktadır. Özellikle HPV tip 16 olmak üzere farklı HPV tipleri persistan infeksiyon geliştirmektedir (156). Persistan infeksiyon tek başına displazi için yeterli değildir ve yüksek onkojenik riskli HPV tipleri düşük risklilere göre daha fazla displazi riski taşımaktadır (157). Displazi oluşması için HPV'ye ait E6 ve E7 proteinlerinin varlığı oldukça önemlidir (158).

Tüm çalışmalarda olmasa da çoğu çalışmada viral yük fazlalığının da displazi gelişme riskini arttırdığı gösterilmiştir (159). Kantitatif yöntemlerle viral yük ölçümü CIN ile ilişkilendirilebilir, ancak hastalık sürecinin belirlenmesi için gerekli değildir (160). Bununla birlikte, tekrarlayan viral yük ölçümü virus ve lezyon persistansı açısından önemlidir (161).

Onkojenik potansiyelle ilgili ilk çalışmalar hayvan papillomavirusları ile ilgilidir. Papillomlara kimyasal kanserojenlerin uygulanması malign değişimi hızlandırmıştır (162). HPV'nin benign lezyonlarında viral DNA, infekte hücrelerin

nükleusunda epizomal yani ekstrakromozomal olarak bulunur. HPV malignitelerinde viral genom sıklıkla konak hücre genomuna integre olur (163). Bu integrasyon çoğunlukla E1 ve E2 bölgesini tutar (164). Bu sırada viral DNA'nın özgül olarak E2 ORF'si bozulur ve bu da malignensi patogenezinde rol oynar. Erken bölge ORF'lerinin, transkripsiyonu hem aktive hem de inaktive eden fonksiyonları vardır. E2'den derive proteinler, genomun kontrol bölgesinde bulunan özgül DNA sırasına bağlanarak E6 ve E7'nin transkripsiyonunu inhibe ederler. Ancak viral genom integrasyonu ile E2 bölgeleri delesyona uğrar ve bu repressör bölgenin inaktivasyonu, hücre transformasyonunda rol oynayan E6 proteinlerinin yapımına sebep olur (165).

HPV'nin uzun kontrol bölgesindeki mutasyonların E2'den derive proteinlerin bağlanma yerlerinin kaybına yol açacağı da ileri sürülmüştür. Tümörlerde E6 ve E7 genleri transkripsiyonel olarak aktif bir şekilde sürekli vardır ve bu gen ürünleri keratinositleri transforme edebilir. HPV tip 16'nın E7 proteini sellüler Rb antionkogen ürününe, E6 proteini de p53 tümör supressör proteinine bağlanır ve böylece p53 ve Rb proteinini inaktive ederler. Sonuçta virus sellüler üremeyi ve differensiyasyonu değiştirme özelliği kazanır (166). Bu durumun oluşmasına yardım eden diğer faktörler tam olarak anlaşılammıştır. Sadece kanserin uzun süren HPV infeksiyonunun bir sonucu olduğu gösterilmiştir (163).

HPV transisyonel zonları tercih ettiği için diğer kanserlerle de alakalıdır. Yüksek riskli HPV tipleri penil, vulvar, vaginal, anal ve orofaringeal karsinomları da içine alır. Özellikle vulvar SCC'larının %50'si (167), penil karsinomların %30-50'si (168) HPV ilişkilidir. Genel olarak HPV pozitif vulva ve penis neoplazmları HPV negatiflere göre daha iyi prognoz gösterirler (169). Penil ve vulvar karsinomların tersine vagina karsinomlarının %60-90'ı HPV pozitifdir (167). Anal ve perianal kanserler için de bu durum aynıdır. Bunun dışında orofaringeal kanserlerin %20-75'inin HPV pozitif olduğu gösterilmiştir. Servikal kanserde yüksek onkojenik riskli tiplerin 12-15 tiple sınırlı olduğu bildirilmiştir (134).

2.5.2.Benign Kutanöz Lezyonlar

2.5.2.1.Kutanöz siğiller

Siğiller, HPV infeksiyonlarının en genel karakteristik klinik görünümüdür. Siğiller; ekstremitte cildi, mukoza, genital cilt, laringeal ve oral mukoza gibi çeşitli

bölgeleri etkileyebilen, viruslar tarafından oluşturulan, pleomorfik yapıda olan tümörlerdir (170).

2.5.2.1.1.Epidemiyoloji, bulaş ve patogenez

HPV'ler dünya genelinde yaygın dağılımı olan bir viruslardır. Viral siğiller, Avrupa'da %7-10 ve Amerika'da %1 insidansda bulunan oldukça yaygın infeksiyonlardır (171). Bu rakamlar immun sistemi baskılanmış kişilerde 50-100 kat daha fazladır. Örneğin böbrek transplantasyonu olan kişilerde transplantasyondan sonra bu oran %90'dan daha fazla olmaktadır (172). Siğiller herhangi bir yaşta çıkabilir ancak okul yaşında insidans artar, gençlerde ve erken yetişkinlerde pik yapar (173).

HPV lezyonu olan bireylerden direkt veya indirekt temas yoluyla bulaşabilir. Epitelyal bariyerin travmayla fonksiyonunu yitirmesi veya minör bir hasar ya da maserasyon infeksiyonun bulaşmasına neden olur. İnokülasyondan sonra inkübasyon süresi 3 haftayla 8 ay arasında değişir (174). Spontan gerileme çoğu vakada gösterilmiştir (175).

Hücre aracılı immünite HPV'ye karşı konak savunmasında önemli rol alır. HPV infeksiyon prevalansı böbrek transplantasyonlu ve HIV infeksiyonlu hastalar gibi immun cevabı bozuk kişiler arasında oldukça yüksektir (170).

HPV'nin yaşam siklusu direkt olarak konak hücresinin farklılaşmasına bağlıdır. HPV bazal katmanın hücrelerine ulaştığında infeksiyon başlar. Burada viral replikasyon olmaz ve kendi genomunu az sayıda kopya ile korur. Replikasyon fazı ve protein sentezi suprabazal farklılaşmış keratinositlerde başlar (176). Progresyon süresi ve lezyonun tipi saptanan virus partiküllerinin miktarı ile koreledir. Genç siğiller eski siğillere göre daha fazla miktarda virus yükü barındırır. Plantar siğiller genel siğillere göre daha fazla viral yük içerir. Lezyonun merkezi viral konsantrasyonun en fazla olduğu yerdir (177).

Benign lezyonlarda viral genom replikasyonu ekstra kromozomaldır. Malign lezyonlarda viral DNA konak hücre kromozomuna girer ve burada replikasyon gerçekleşmez. E6 ve E7 onkogenlerini inaktive eden E2 protein ekspresyonunun inaktivasyonu vardır. E6 ve E7, tümör süpresyonunda önemli olan hücre siklus

düzenleyici hücre proteinleri (p53, pRB) inhibe ederek hücre ölümsüzlüğünü sağlar (176,177).

2.5.2.1.2.Genel siğiller

Yüzeyi düzensiz nodül ve papüller şeklindedir. Lezyonlar tek veya çoklu, çeşitli boyutlarda ve asemptomatik olabilir. Lezyonların ortak noktası büyük kitleler oluşturabilmeleridir. Cildin herhangi bir yerinde oluşabilmelerine karşın el arkasında ve parmaklarda daha sık görülür (175). Çocuklarda dizde de sık görülür (170).

İzole siğiller aylar ya da yıllarca değişmeden kalabilir veya çok miktarda hızla yeni lezyonlar oluşabilir. Siğillerin gelişmesi önceden tahmin edilemez. Yaklaşık olarak siğillerin %65'i 2 yıl içinde kendiliğinden iyileşir. Hastaların yaşı ve lezyonların miktarı prognozu etkilemez (178).

Genel siğillerde veya Verruca vulgariste en sık bulunan HPV tipleri; HPV tip 2, 27, 57, 4 ve 1'dir (176). Kasaplarda, kümes hayvanları ve balıkçılarda HPV tip 7 en sık görülen tiptir (179).

2.5.2.1.3.Plantar siğiller

Plantar bölgede oluşan siğillerdir. Derinlere uzanabilirler ve bu yerleşim şekli myrmecia olarak bilinir. Genellikle HPV tip 1 etkendir ve lezyonları ağrılıdır. Hiperkeratotik plak oluşturacak şekilde yüzeysel geliştiklerinde, mozaik siğil olarak adlandırılırlar. Bunlarda HPV tip 2 etkendir ve daha az ağrılıdır. Plantar siğillerde ve lezyonlarda HPV tip 4 de saptanabilir (180).

2.5.2.1.4.Düz siğiller

Düz siğiller hafifçe kabarık şekilde bulunurlar. Cilt renginde (kahverengimsi veya hafif sarımsı) veya pigmentli, yüzeyleri düz veya hafifçe pürüzlüdür. Yuvarlak veya poligonaldirler, boyutları 1-5 mm veya daha fazladır. En sık yüzde ve el arkasında gelişirler. Çok sayıda olabilirler ve derinin soyulmasıyla ilgili olarak veya travmaya bağlı (Koebner fenomeni) lineer yayılım gösterirler. Spontan gerileme siktir. En sık neden olan HPV tipleri HPV tip 3 ve 10'dur (170).

2.5.2.1.5.İpliksi siğiller: Bunlar; pedinküllü, dikensi lezyonlardır ve cilt yüzeyine bağlı olarak dikey veya oblik gelişim gösterirler. Tekli veya çoklu

lezyonlar halinde görülebilirler ve en sık yüz ve boyunda bulunurlar. Genel siğillerin morfolojik bir varyasyonudurlar. Genel siğillerin etkenleri bunda da aynı olmakla beraber en sık etken HPV tip 2'dir (170).

2.5.2.1.6.Pigmentli siğiller

Klinik olarak pigmentli siğiller griden siyahımsı-kahverengiye kadar renk varyasyonu gösterebilirler. Histopatolojik olarak; spesifik, homojen, sitoplazmik inklüzyon cisimleri içerirler. Bu siğillerde saptanan HPV tipleri HPV tip 4, 60, 65'tir (181).

2.5.3.Epidermodisplazi Verrusiformis

Nadir, genellikle otozomal resesif genetik bir hastalıktır. Hücrel immünitinin bozuk olduğu ve HPV nedenli deri kanseri duyarlılığının arttığı bir durumdur. Epidermodisplazi verrusiformis (EV) hastalarındaki cilt kanseriyle HPV arasındaki ilişki ilk olarak 1950'lerde tanımlanmıştır. EV'li hastalar, spesifik bir HPV grubuyla enfeksiyona ve virusun onkojenik etkileriyle kutanöz malign tümör gelişmesine uygun ortam sağlar (182).

Cilt lezyonları erken çocukluk döneminde görülür ve polimorfiktirler. Boyunda ve yüzde çıktıklarında düz siğillerden ayırt edilemezler. Pullu, hipo- veya hiperpigmente eritematöz maküllerdir. Gövdede veya dudaklarda çıktığı zaman versikolorla benzerdir. Daha kalın, pembe ve menekşe renkli plaklar seboreik keratoz ile benzerdir. Malign değişim genelde; ultraviyole radyasyonun önemini gösterir bir şekilde, güneşe maruz kalan yerlerde daha fazla görülür. Aktinik keratoz gibi premalign lezyonlar ve Bowen hastalığı ve skuamöz hücre karsinomu gibi malign lezyonlar gösterilmiştir. Bazal hücre karsinomu bu hastalarda nadirdir (183).

EV'li hastalardaki lezyonlarda saptanan HPV'ler, EV ilişkili HPV'ler (HPV-EV) olarak ifade edilir. Bu tipler genel olarak HPV tip 5, 8, 9, 12, 14, 15, 17, 19, 25, 28, 29, 36, 38, 47, 49 ve 50'dir. Bu hastaların düz siğillerinde, genel toplumda olduğu gibi, HPV tip 3 ve 10 saptanır. Malign lezyonlarda en sık HPV tip 5 sonra HPV tip 8 saptandığı bildirilmiştir. Lezyonlarda en az HPV tip 14, 17, 20 ve 47 saptanmıştır (183).

Tanımlama ve tiplendirmedeki tekniklerin ilerlemesi nedeniyle HPV-EV'ler EV tanısı olmayan hastalardan ve normal kişilerden de saptanmaya başlamıştır (184).

2.5.4.Malign Kutanöz Lezyonlar

2.5.4.1.Bowen hastalığı

Bazen invaziv karsinoma ilerleyebilen skuamoz hücre karsinoma *in-situ*'sudur.

Literatüre göre; özellikle tırnak çevresi, el üstü ve daha nadiren ayakların üstü gibi bölgelerdeki ekstragenital Bowen hastalığından HPV, özellikle yüksek onkojenik riskli mukozal HPV'ler, saptanmıştır. Virusun bu bölgelerde saptanması genital lezyonlardan otoinokülasyon olduğunu gösterir (185).

HPV'nin genital Bowen hastalığındaki rolü gösterilmiştir ancak ekstragenital olanlardaki rolü açık değildir (186).

Ekstragenital Bowen hastalığında (EGBD) HPV saptanması sadece ekstremitelerle sınırlı değildir. EGBD hastalarında HPV tip 2, 6, 11, 54, 58, 61, 62, 73, 58 gibi diğer HPV tipleri de saptanmıştır (186).

Çalışmalarda yüksek onkojenik riskli mukozal HPV'lerin EGBD hastalığının patogeneğinde önemli rol oynadığı saptanmıştır.

2.5.4.2.Bazal ve skuamoz hücre karsinomu

HPV'nin non-melanoma cilt kanseri (NMSC) (skuamoz hücre karsinomu ve bazal hücre karsinomu) gelişmesindeki rolü tam olarak belirlenememiştir. Büyümedeki işaretlere göre HPV cilt kanserinin oluşumunda potansiyel olarak önemli gibi görünmektedir (187).

HPV ile NMSC arasındaki ilişki hem immunkompetan hem de immunkomprime hastalarda gösterilmiştir. Viral DNA'nın lezyonlarda pozitif saptanması ihtimali yüksektir ve aynı lezyondan farklı HPV tiplerinin saptanması da sıktır. Böbrek transplantasyonu yapılan hastalarda %90 oranında viral siğil, %40 oranında NMSC geliştiği bildirilmiştir. Bu risk normal popülasyona göre 50-100 kat daha fazladır. Bu grup hastalarda en sık gösterilen NMSC, SCC'dir (3:1 oranla bazal hücre karsinomu=BCC'den daha fazla) ve lezyonlar çoklu ve agresif olmaya

eğilimlidir. Böbrek transplantasyonu olan hastaların SCC lezyonlarında HPV-EV'ler çok sık bulunur. Bu lezyonlarda HPV saptanma ihtimalinin %80-88'lere kadar çıktığı bildirilmiştir. BCC lezyonlarında ise HPV saptanması nadirdir (187).

İmmünkompetan NMSC lezyonlu kişiler arasında yapılan çalışmalarda HPV prevalansının düşük düzeyde (SCC lezyonlarında%35-55, BCC'de %43.5) seyrettiğın gösterilmiştir. HPV-EV'ler ise ağırlıktadır. Bu tür lezyonlarda cilt ve mokoza tipler de saptanmaktadır (187).

2.5.5.Benign Mukozal Lezyonlar

2.5.5.1.Fokal epitelyal hiperplazi

Fokal epitelyal hiperplazi (FEH) ya da Heck hastalığı oral mukozanın nadir görülen bir hastalığıdır. Benign bir yapıya sahiptir ve HPV tip 13 ve 32 ile ilişkilidir. Çocuklarda ve kadınlarda daha yaygındır ve ırksal bir baskınlığı vardır. Amerika'lı yerlilerde, eskimolarda ve bazı Afrika'lılarda daha yaygındır. Klinik olarak pembemsi, çoklu küçük papüllerdir, ayrı ayrı veya plak şeklinde görülebilirler. Lezyonlar asemptomatik olup spontan gerilemeye yatkındır. En sık yerleşim yeri alt dudaktır ve en az üst dudağı, dili, oral mukozayı, orofarinks, damağı ve ağız tabanını etkiler (188).

2.5.5.2.Kondiloma aküminata

HPV'lerin genital bölgedeki en yaygın klinik görünümü siğiller veya kondiloma aküminatadır (189). Bu lezyonlar papül, nodül olarak veya yumuşak, ipliksi, pembemsi, sapsız veya pedinküllü olarak görülebilirler. Karnabahar gibi ekzofitik olarak büyüyebilirler ve asemptomatiktirler. Bu lezyonlardan en sık düşük onkogenik riskli HPV'lerden HPV tip 6 ve 11 saptanır. HPV tip 16 ve 18 gibi yüksek riskli HPV'ler de bulunabilirler ve sıklıkla HPV tip 6 ve 11 ile koenfeksiyon halinde görülürler (190).

Buschke-Löewenstein tümörü (dev kondiloma aküminata veya anogenital bölgenin verrüköz karsinoması), sıklıkla apseler ve fistüllerle ilişkili ülsere olmuş karnabahar benzeri lezyonlar halinde agresif bir tümördür. Ekzofitik ve endofitik olarak büyürler, lokal invazyon yaparlar ve yüksek rekürrens oranları vardır. Metastazları çok nadirdir ve histolojik olarak benignidir (191).

2.5.5.3.Bowenoid papülozis

Bowenoid papülozis (BP) ismi, histolojik olarak SCC *in-situ* veya Bowen hastalığı ile benzer olan, genital ya da çoklu yerleşimli papüler lezyonlar için kullanılır. Anogenital bölgede çoklu kahverengimsi veya eritematöz papüller vardır ve cinsel yönden aktif genç yetişkinleri en sık etkiler. Klinik olarak seboreik keratozdan, melanositik nevüsten ve genel siğillerden ayırt edilmelidir. BP, güçlü bir şekilde HPV tip 16 ile ilişkilidir (189).

Histolojik atipiyeye ve yüksek onkojenik riskli HPV ile ilişkisine rağmen BP erkeklerde ve gençlerde benign yapıda olup çoğu zaman spontan olarak iyileşir. Serviks kanseriyle ilişkili olması, kendinde ya da partnerinde BP lezyonu olan kadınlarda daha az benign yapıda olduğunu gösterir. Yaşlılarda ve immünkomprime hastalarda daha agresif olmaya eğilimlidir (189). HPV tip 18, 31, 35, 39, 42, 48, 51 ve 54 gibi diğer HPV'ler de BP'de saptanmıştır (192).

2.5.6.Malign Mukozal Lezyonlar

2.5.6.1.Genitalyanın Bowen hastalığı

Karsinoma *in situ* veya genitalyanın Bowen hastalığı (BD), özellikle HPV tip 16 olmak üzere yüksek riskli HPV'lerle alakalıdır (192). Klinik olarak plak halinde ve genellikle tektir. Spontan iyileşme eğilimi yoktur, SCC'ye ilerleme potansiyeli vardır. Bazı yazarlar mukozal BD'yi Queyrat eritoplazisine (EQ) benzetirler. Bununla birlikte bazı araştırmacılar farklı histolojik özellikleri olduğuna inanırlar. EQ'nun karakteristik lezyonu; glansı, prepsiyumu, üretrayı, vulvayı, oral mukozayı, dili ve konjonktivayı etkileyen eritematöz, kadifemsi, parlak, infiltrasyonsuz plaklardır. EQ'nun SCC'ye ilerlemesi BD'ninkinden fazladır (olguların %30'u). EQ lezyonlarında HPV aranması ile ilgili çalışmalar çok nadirdir ve en sık HPV tip 16 saptanmıştır (193).

2.5.6.2.Vulvar kanser

İnvaziv vulvar kanser genellikle vulvar intraepitelyal neoplaziden (VIN) veya servikal karsinomdan gelişir. Sıklıkla da uzun süreli genital siğillerden gelişir. Vulvar SCC lezyonlarında HPV saptanma oranı %30-70 arasındadır (194). Bu oran servikal karsinomda HPV saptanmasından daha düşüktür. Bu durum saptama

metodunun duyarlılığına veya lezyonda bulunabilecek yeni HPV tiplerinin henüz tanımlanmamış olmasına bağlanabilir (189).

Vulvar karsinomda en sık HPV tip 16 nadir olarak da HPV tip 18, 21, 31, 33 ve 34 saptanır.

2.5.6.3.Penis kanseri

Klinik olarak lezyonlar katılaşmış, noduler, ülser veya eroziv yapıda ve yüzeyleri verrüköz yapıda olabilir. Lezyonlarda HPV saptanması % 40-70 oranındadır ve en sık HPV tip 16 saptanır (155).

2.5.6.4.Anal kanser

HPV anal kanser lezyonlarında %80-96 oranında saptanır. En sık tip HPV tip 16 sonra 18 ve 33'tür (194).

2.5.6.5.Servikal kanser

Servikal bölge lezyonlarının büyük çoğunluğu HPV ilişkilidir. Sitolojik anormalilerle başlar ve servikal kansere kadar değişebilen displazi vardır. Servikal kanser ve HPV arasındaki nedensel ilişki olguların % 90-100'ünde gösterilmiştir (57). Bazı HPV tiplerinin servikal infeksiyonu servikal neoplazi oluşmasında bir prekürsör olur. Diğer kofaktörler de neoplazi gelişmesine katkıda bulunur.

HPV tip 16 ve 18 en önemli iki karsinojenik tiptir ve servikal karsinomların %70'inde, CIN3'lerin % 50'sinde bulunurlar. Servikal kanserde saptanan diğer HPV'ler HPV tip 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52 ve 58'dir (92).

2.6.TANI

Servikal kanser, ılımlı servikal intraepitelyal neoplaziden (CIN1) neoplazinin daha ciddi derecelerine ve mikroinvaziv lezyonlara (CIN2 veya CIN3) kadar ve sonuçta malign kanser formunda invaziv hastalığa kadar, evreler halinde ilerler (82). Bu; servikal kanserin progresyonunun, yüksek onkojenik riskli HPV infeksiyonunun erken hayatta olmasının bir sonucu olduğu anlamına gelir ve diğer hücre transformasyonunu artıran faktörlerle ilişkisine göre daha ciddi bir hastalığa dereceli olarak ilerlemeye eğilimli olabilir. Bu nedenle prekanseröz lezyonlardaki HPV

infeksiyonunun erken saptanması ve takiben erken tedavisi bu kansere ilerlemenin önlenmesi konusunda önemlidir (25).

1950'lerin ilk yıllarından beri primer tanı araçları sitoloji ve histoloji idi. Yakın geçmişte, HPV'nin DNA dizi analizini klinik örneklerde saptamak için moleküler biyolojik teknikler uygulamaya konuldu. Yüksek onkojenik riskli HPV'lerin saptanmasında en yaygın kullanılan metod hala PAP smear'dır. Son bir kaç dekatta PAP smear servikal kanser insidansını ve ölüm oranlarını azaltmaya oldukça yardım etmiştir. PAP smear servikal hücrelerdeki morfolojik değişiklikler için bir tarama aracıdır. PAP smear'ın raporlama sistemi evresel olarak geliştirilmiştir. Günümüzde kullanılan sistem Bethesda sistemidir. Bir diğer PAP smear raporlama sistemi olan CIN sistemi doku mimarisine dayalıdır. Bu her iki raporlama sistemi de servikal neoplazinin ciddiyetini skorlamak ve tanı terminolojisine bir altın standart koymak için geliştirilmiştir. PAP smear raporlama sistemine göre servikal kanserin ilerlemesi, histopatolojiye göre 4 kategoriden birinde sınıflandırılır: ASC (atypical squamous cells), LSIL (low-grade squamous intraepithelial lesions), HSIL (high-grade squamous intraepithelial lesions), ve SCC (32,33).

İmmunokimyasal boyama ve PAP smear kombinasyonu HPV spesifik antijenleri tespit etmek için kullanılabilir. Hemen hemen tüm HPV tiplerinden eksprese olan, major kapsid proteininden türetilen monoklonal ve poliklonal antikolar bazı HPV spesifik antijenleri saptamak için geliştirilmiştir. Peroksidaz substrat sistemi kullanılarak HPV spesifik antijenin varlığı kolayca skorlanabilir (25).

Ancak PAP smear prosedürünün bazı sınırlamaları vardır. Yanlış negatiflik oranlarının %20-30 kadar yüksek olduğu rapor edilmiştir. Yanlış negatif sonuçlar, hücrelerin mikroskop slaytı üzerine düzgün bir şekilde ya da tek düze bir şekilde yayılmamasından dolayı, slaytların yanlış okunmasına bağlı oluşabilir. Ek olarak; bakteri veya mantar gibi kontaminantlar da örneklerdeki anormal hücrelerin saptanmasını engelleyebilir. Örnekler slaytlara fikse edilmeden önce havaya uzun süre maruz bırakılırsa servikal hücreler bozulabilir ve okunamaz hale gelebilir. İnsan hatası, PAP smear'ı yanlış yorumlamanın muhtemelen ana sebebi olabilir. Ortalama PAP smear slaytı incelemek için 50.000-300.000 arası hücre içerir. Eğer örnek arka planda kalabalık sağlıklı hücre topluluğu içinde sadece bir kaç tane anormal hücre

içeriyorsa bunlar özellikle çok çalışan okuyucular tarafından kolayca kaçırılabilir (25).

HPV enfeksiyonunun tespiti için moleküler tekniklerin kullanıldığı bazı daha kesin metodlar da geliştirilmiştir. *İn-situ* hibridizasyon, kemi-florasans veya radyoizotoplardan biriyle işaretlenmiş DNA problemleri kullanılarak, biyopsi dokularında HPV DNA veya RNA saptamak için kullanılabilir (195). *İn-situ* hibridizasyonun ana avantajı HPV ile enfekte olan hücrelerin yerlerinin özel olarak belirlenebilmesidir. Bu nedenle doku morfolojisi ile birlikte *in-situ* hibridizasyon, HPV enfeksiyonuyla alakalı morfolojik değişimlerin aynı anda değerlendirilmesine olanak sağlamasından dolayı, daha kesin bir araçtır (25).

Farklı HPV tiplerinin E6 ve E7 genlerinde bulunan sekans varyasyonlarına dayanan tip spesifik PCR testleri de geliştirilmiştir (196).

Hibrid capture assay sistemi servikal örneklerde HPV DNA saptanması için FDA tarafından uygun bulunan tek kitlerdir. Hibrid capture assay, HPV varlığını kalitatif olarak ölçmek için kemiluminisans ile vizüalize edilen bir antikor tarafından tanınan, DNA/RNA hibridizasyonuna dayanır. Bu testte örnekteki DNA denatüre edilir sonra tampon solüsyonu içeren bir tüp içinde RNA prob havuzu ile karıştırılır. RNA prob havuzu iki setten oluşmaktadır ve test, setlerin ikisi birlikte veya ayrı ayrı kullanılarak yapılabilir. Birinci prob havuzu düşük onkojenik riskli HPV'lerden ve ikinci prob havuzu da yüksek onkojenik riskli HPV'lerden RNA'lar içerir. Hibridizasyondan sonra DNA-RNA kompleksleri, alkalen fosfatla konjuge edilmiş, DNA-RNA komplekslerine karşı antikorla kaplanmış olan mikroplyet kuyucuklarına sabitlenir. HPV'nin varlığı bir substratla karıştırıldıktan sonra bir kemiluminisans formu olarak saptanabilir. Bu test birçok klinik tanı laboratuvarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Fakat bunun en önemli dezavantajı düşük riskli veya yüksek riskli gruplar içindeki spesifik HPV tiplerini ayırt edememesidir. Ek olarak HPV problemleriyle plazmid pBR322 arasında, yüksek riskli prob havuzunda yanlış pozitif sonuçlara neden olan, çapraz aktivite bazen gösterilmiştir (49). Tahmini yanlış negatifliklerin oranı %1.1-7.5 arasındadır (25).

Yakınlarda, DNA hibridizasyonu ile birlikte DNA çip teknolojisini kullanan, yeni bir kit geliştirilmiştir. MyHPV (Mygene, Kore Cumh.) çip kitinin temeli hibrid

capture sistemi ile benzerdir ancak basit DNA-RNA hibridizasyonu ve takiben vizüalizasyondan daha iyi olarak DNA çip teknolojisini kullanır. Yirmi dört farklı HPV DNA sekansı bir DNA çipine yerleştirilerek hastaların örneklerinden PCR ile amplifiye edilen tek zincir ile hibridize edilir. Her bir PCR primeri florasan boyayla işaretlenmiş ve bu sinyal florasan saptama monitörü ile monitörize edilmektedir. Bu yöntem kullanılarak her bir HPV genotipi tek tek taranabilir. Bu sistem aynı zamanda HPV koenfeksiyonlarını da fark edebilir. Bu nedenlerle MyHPV çip kiti her bir HPV tipini birbirinden ayırt edebildiği ve koenfeksiyonları tespit edebildiği için hibrid capture kitine göre daha avantajlı ve daha kesindir. HPV enfeksiyonunun saptanması tedavi bakımından önemlidir. Çünkü çeşitli çalışmalarda çoklu HPV tipiyle enfeksiyonun servikal kanserin ciddiyetini arttırdığı gösterilmiştir (197,198,199). Son 4 yıldan fazla bir süredir bu kit kullanılarak yaklaşık olarak 15.000 örnek taranmış ve yanlış pozitiflik ve yanlış negatiflik oranları %1> olarak tahmin edilmiştir. Bu nedenle bu kit hem tanıda hem de yeni aşular için strateji geliştirmede oldukça kullanışlı olacaktır (25).

HPV; prekanseröz lezyonları, kansere dönüşen hücreleri ve lenf nodu metastazlarını da içeren tüm hastalık çeşitlerinde saptanmıştır. HPV viral yükü (biyopsi materyalindeki viral DNA miktarının ölçüsü) yalnız başına veya serolojik HPV çalışmalarıyla birlikte HPV'nin oral karsinomdaki rolünü açıklayabilir. HPV E6 ve E7'ye karşı oluşan antikorlar HPV nedenli invaziv malignansilerin güçlü belirteçleridir (200). Çalışmalarda bu seromarkırlar yüksek viral yükü olanlarda düşük viral yükü olanlara göre daha yüksek olarak bulunmuştur. Survivin ekspresyonu (apoptozis blokajının bir göstergesi) HPV negatif olgularda HPV pozitiflere göre daha yüksektir ve solid tümörlerde de daha belirgindir (201). Yükselmiş survivinin kötü prognoz ve düşük yaşam süresiyle alakalı olduğu belgelenmiştir (202). Bu nedenle HPV pozitif oral kanserler daha iyi klinik ve biyomoleküler davranış gösterirler. Rekürrens göstermezler ve mortalitenin %5 civarında olduğu bildirilmiştir. (56).

HPV DNA sitolojik smearlarda ve histolojik örneklerde bazı metodlarla tespit edilebilir. Bunlar; Southern Blot gibi amplifikasyonsuz nükleik asit hibridizasyon metodları, hibrid capture gibi sinyal amplifikasyonlu immunoassay tabanlı nükleik asit hibridizasyon metodları ve PCR gibi bir çeşit hedef amplifikasyon sistemleridir.

Amplifikasyonsuz nükleik asit hibridizasyon yöntemleri genel olarak duyarsız ve çok zahmetlidir (203). Bu problemleri aşmak ve hem duyarlılığı hem de özgüllüğü arttırmak için çeşitli amplifikasyon yöntemleri geliştirilmiştir (204).

Bir örnekten birçok HPV saptanması ve genotiplenmesi için HPV tiplerinin geniş bir spektrumu genel primerler kullanılarak amplifiye edilebilir. Bu primerler HPV'lerin arasında en çok korunmuş bölgeyi (L1 ORF) hedef alır (204). HPV'leri değerlendirmek için çeşitli primer düzenlemeleri bulunmaktadır. Bunların en sık kullanılanları GP5+/6+ PCR sistem, Roche amplicor, PGMY primer seti ve SPF10 primer setidir. Bu primer setlerinin dizaynları ve amplifiye ettikleri PCR ürününün büyüklüğü birbirinden farklıdır. HPV DNA'nın amplifikasyonu, amplikonun birçok oligonükleotide revers hibridizasyonu 37 farklı düşük onkojenik riskli, olası yüksek onkojenik riskli ve yüksek onkojenik riskli HPV genotipini aynı anda tiplendirme olasılığı sağlar. Line Blot Assay (LBA), Line Prob Assay (LİPA), ya da Linear Array (LA) olarak bilinen testler sadece küçük miktarda PCR ürünü gerektiren testlerdir (205).

Servikal lezyonların (pre-)malign değişimlerdeki spesifik HPV genotiplerinin riskinin önemi dışında (206), viral yük ve viral integrasyon gibi diğer viral parametrelerin, enfeksiyonun progresyonunu etkilemesi de önemlidir (75). Klinik örneklerde HPV miktarını belirlemek için real time PCR teknikleri geliştirilmiştir. Yüksek riskli HPV (Hr-HPV) tiplerinin düşük çeşitliliğine rağmen real time PCR metodları henüz tarama için uygun değildir (207). Bundan başka Hibrid Capture 2 (HC2) HPV DNA'nın semi-kantitatif ölçümüne olanak sağlar. Tahmini HC2 yükü, real time PCR ile tespit edilen yükle iyi korelasyon verir (208). Yüksek viral yükü olan anormal servikal smearların progresyon riski daha yüksektir (209). Bu sonuçlar diğer çalışmalarla doğrulanmamıştır (210). HPV DNA'nın fiziki durumu, (epizomal, karışık veya entegre, real time PCR ile HPV tip 16 E2/E6 oranı ölçümü) progresif servikal lezyonlar için potansiyel tanı markeri olarak önerilmiştir (211). Genellikle lezyonun ciddiyetiyle paralel olarak viral integrasyon sıklığı da artar. Bununla birlikte bazı çalışmalar bu spesifik testin duyarlılığının az olduğunu bildirmişlerdir (212). Bunun dışında Arias-pulido ve ark.'larının yaptığı bir çalışmada viral integrasyonun karsinoma *in-situ*'da %8.7 ve servikal kanserlerde sadece %15.2

olduğunu göstermişler. Oysa olguların sırasıyla, %29.4'ü ve %45.7'sinin miks infeksiyonlar olduğunu saptamışlardır (212).

2.7.KORUNMA

2.7.1.Aşı

Papilloma virusları; L1 denen, virus benzeri partiküller içinde kendiliğinden yapışma ve ökaryotik hücrelerden eksprese olma özelliği olan bir major kapsid proteinine sahiptir (45). Human papilloma virusları epitelde lokalizedir ve bu yüzden konak immun sistemiyle minimal teması vardır ve genel olarak immun cevap düşük dereceli ve geçici olabilir (134).

HPV virus benzeri partiküllerin geliştirilmesiyle birinci jenerasyon koruyucu aşılar üretildi. Profilaktik bivalan ve kuadrivalan aşılardan klinik denemeleri, aşılardan ciddi yan etkilerinin olmamasıyla ve HPV infeksiyonundan korumada yüksek etki göstermesiyle iyi tolere edildiğini göstermiştir. FDA Haziran 2006'da kadınlarda servikal kanser, adenokarsinoma *in-situ*, servikal intraepitelyal neoplazi, vulvar intraepitelyal neoplazi, vaginal intraepitelyal neoplazi ve genital siğillerle alakalı HPV tip 6/11/16/18'den korunmak için bir kuadrivalan aşığı onayladı. HPV tip 16 ve 18'den korunmak için Avrupa'da bir bivalan aşığı da onaylanmıştır (134).

HPV onkojenik tiplerine karşı koruyucu aşılardan geliştirilmesi son yılların en önemli bilimsel gelişmesi olarak değerlendirilmiştir. Çünkü aşığı servikal kanserden korunmada oldukça önemlidir (213). Fakat aynı zamanda aşının uygulaması, planlaması ve maliyeti hakkında önemli bilimsel tartışmaların çıkmasına da neden olmuştur. Mecburi aşılama batı dünyası ülkelerinde hala uygulanmamaktadır ve dini, etik ve politikal meseleler ortaya çıkmıştır çünkü cinsel tutum ve ilgili konular için içine girmiştir (214).

Aşıyla ilgili önemli bir sorun da aşının etkisinin değerlendirilmesinin ancak uygulamaya başladıktan on yıllar sonra yapılabilmesidir (215). Beş yıllık bir periyodu kapsayan uzun dönem etki yakınlarda onaylandı. Yaşlı kadınların aşılama konusunda, (kısmi koruma fikrini destekleyen çalışmalarla birlikte) HPV negatif kadınlar için kısmi koruma önerilebilir (216). Dahası toplum immunitasını uyarmak ve infekte kadın havuzunu küçültmek için erkeklerin aşılama da

tartışılmış ancak böyle bir uygulamanın etkisinin fazla olmayacağı ve maliyet olarak yeterince uygun olmadığı gösterilmiştir. Diğer bir sorun da kitlesel aşılamanın, HPV ile etiyojik olarak alakalı, servikal kanser dışı kanserlerin insidansına etkisinin değerlendirilmemiş olmasıdır. Son olarak sürekli önem kazanan bir sorun da aşılama politikalarının planlanmasını ve modellemeyi etkileyen “tarama”dır (134).

Eski bilgiler zaten VLP aşılarının dünya genelinde servikal kanser oranlarını potansiyel olarak düşürdüğünü göstermektedir. Bütün yapılan faz 2 ve faz 3 çalışmalarında kullanılan farklı aşılar iyi tolere edilmiştir (124,217). Aşılar; monovalan hr-HPV tip 16 aşısı (218), hr-HPV tip 16 ve 18’e karşı bir bivalan aşı (219) ve düşük riskli HPV (lr-HPV) tip 6, 11 ile hr-HPV tip 16, 18’e karşı bir kuadrivalan aşıdır (124,217). Faz 2 çalışmalarında oluşturulan immün cevaplar güçlü, uzun süreli ve normal infeksiyonun yaptığından 20-100 kat daha büyüktür. Persistan HPV infeksiyonları % 89-100 oranında engellenmiştir ve genç kadınlarda HPV tip 16 ve 18 için etki yaklaşık olarak %90’dır (220).

Son zamanlarda yapılan bir faz 3 çalışmada HPV DNA pozitif olan kadınlarda HPV 16/18 ilişkili lezyonlara karşı korumaya ait bulguların olmadığı bildirilmiştir (217). Yani aşı; aşılama zamanında bulunan HPV tip 16/18 ilişkili hastalığın iyileşmesinden çok HPV tip 16 ve 18’in bulaşmasına karşı korunmak için hazırlanmıştır (31).

Kuadrivalan profilaktik aşı sadece anormal sitoloji ve CIN’e karşı koruma yapmamakta, aynı zamanda HPV tip 16/18 ilişkili yüksek dereceli vulval ve vajinal lezyonlara ve HPV tip 6 ve 11 infeksiyonunun neden olduğu hastalıklara karşı da (anogenital siğiller ve düşük dereceli CIN) efektif koruma sağlamaktadır (221).

İlginç olarak aşılama ile diğer yüksek onkojenik riskli genotiplere karşı bir çapraz koruma sağlandığı da bildirilmiştir. HPV tip 16 ve 18’e karşı olan epitoplara karşı sırasıyla 31 ve 45’e karşı da koruma sağladığı bildirilmiştir (222). Ancak bu bilgilerin dikkatlice değerlendirilmesi gerekir çünkü HPV tip 16/18 olmayan yüksek dereceli CIN, çalışmalarda çok sayıda tespit edilmemektedir (223). HPV tip 16 ve 18 dünya çapında servikal kanserlerin %70-77’sinde olduğu için multivalan aşılama çapraz koruyuculuğu dünya çapındaki servikal kanser insidansını %8 kadar düşürebilir (220). Aşının koruyuculuğu umut verici olmasına ve yaklaşık olarak 60

ay etki göstermesine rağmen (224) gerçek uzun dönem koruma ve etki ve maliyet değerlendirilmelidir (31).

Bazı çalışmalarda, HPV aşılı hakkında sağlık politikasını belirleyenlere verilen öneri; aşılama programının başarılı olması için genç yetişkinlerin cinsel aktiviteye başlamadan önce aşılanmasıdır. Teira ve ark.'larının yaptıkları bir çalışmada HPV tip 16/18 aşısı ile sadece 12 yaşındaki kızlar aşılanmış ve aşılama ile enfeksiyon oranının %90 oranında azaldığı bildirilmiştir. Normal tarama programına devam edilmesiyle servikal kanser riskinin %89 oranında azalabileceği bildirilmiştir (225). İkincil korunma programları iyi organize olan ülkelerde tarama politikaları (HPV aşılıyla tanışmadan sonra) maliyeti uygun olan bir servikal kanser korunma yönetimi oluşturma hususunda modifiye edilmelidir (31).

Bütün faz 2 ve faz 3 çalışmalarında aşılardan, HPV enfeksiyonuna ve prekanseröz servikal, vulval ve vajinal lezyonlara karşı koruyuculukta yüksek etkisinin olduğu tanımlanmasına rağmen profilaktik aşılardan servikal kanser insidansını ve mortaliteyi gerçekten azalttığına dair kanıt yoktur (226). Çalışmalar sadece, aşı uygulamasının servikal kanser oranlarında önemli ölçüde azalma sağlayacağını göstermektedir (227).

Primer korunmadan, dünya genelinde servikal kanser insidansı önemli ölçüde azaltılarak fayda sağlanabilir. Farmakolojik araştırmalar ve gelişmeler tek doz ve ısıya dayanıklı, bilhassa uygun fiyatlı bir aşı (228) üzerine yoğunlaşmalıdır ve sağlık çalışanlarının halkı risk konusunda eğitmeleri gerekmektedir (31).

2.7.2.Aşı İçerikleri

Servikal kansere neden olan HPV tiplerinin %90'ından daha fazlasına karşı koruma sağlamak için aşının en sık görülen 8 HPV tipine karşı L1 VLP içermesi gerektiği bildirilmiştir (229). Servikal kanserlerle ilişkilendirilen bu 8 tipin; HPV tip 16 (53%), HPV tip 18 (17.2%), HPV tip 45 (6.7%), HPV tip 31 (2.9%), HPV tip 33 (2.6%), HPV tip 52 (2.3%), HPV tip 58 (2.2%) ve HPV tip 35 (1.4%) olduğu bildirilmiştir (230). HPV tip 16 ve 18 suşlarını içeren aşılardan başarıyla kullanılmasıyla dünyanın birçok bölgesinde servikal kanserlerin yaklaşık %70'inin önlenilebileceği bildirilmiştir (232).

Ancak yüksek dereceli premalign lezyonlarla kıyaslandığında skuamoz kanser vakalarında HPV tip 16, 18 ve 45'e daha fazla rastlanılmaktadır. Buna karşı HPV tip 31, 33, 52 ve 58 gibi bazı HPV tiplerin yüksek dereceli premalign lezyonlara göre servikal kanserlerde daha az bulunduğu bildirilmiştir (233). Yani HPV 16 ve 18 aşılmasıyla servikal kanserden korunma daha fazladır (234).

VLP aşuları tip spesifik aşular olmasına rağmen, Harper ve ark. yaptıkları bir çalışmada, HPV tip 16 ve 18 aşılmasının çapraz korumayla beklenenden daha fazla bir koruma sağladığını bildirmişlerdir (235). Aşının HPV tip 45'e karşı %94, HPV tip 31'e karşı %54 oranında koruma sağladığı gösterilmiştir. Bunun sebebinin benzer bir genomik diziyeye sahip olan HPV tip 16, 31, 18 ve 45 tiplerinin çakışan epitopları sonucu olduğu düşünülmektedir (236). Sonuç olarak sadece HPV tip 16 ve 18 aşısı ile yüksek riskli HPV'lerden korunma oranının %70'ten %75-80'lere kadar çıkabildiği öngörülmektedir (234).

Günümüzde mevcut her iki ticari aşı, Gardasil (Merck & Co.Inc.; Whitehouse Station ,NJ)ve Cervarix (GlaxoSmithKline Biologicals; rixensart, Belgium), bir adjuvanla birlikte, HPV tip 16 ve 18 viruslarının L1 kapsitinin rekombinant VLP proteinlerini içerir. Gardasil, HPV tip 16 ve 18'e ek olarak HPV tip 6 ve 11 için de VLP içeren kuadriyalan bir aşıdır. HPV tip 6 ve 11, genital siğillerin %90'ından ve düşük dereceli servikal sitolojik anormalliklerinin bir kısmından sorumlu olan düşük onkogenik riskli viruslardır (234).

Cervarix, yeni çıkmış bir adjuvan olan AS04 ile kombine olarak HPV tip 16 ve 18 VLP'lerini ve 3d-monophoryl lipid A'yı (MPL) içeren bivalan bir aşıdır. MPL'nin nötralize edici antikorların titresini arttırdığı gösterilmiştir (230). MPL ve aliminyum tuzlarının kombinasyonunun, yalnız antijen veya adjuvanla birlikte antijene kıyasla humoral ve hücrel cevapları daha fazla indüklediği gösterilmiştir (231). Bu yeni adjuvanın, diğer aşuların immunogenisitesini arttırmak için kullanıldığında güvenli olduğu ve iyi tolere edildiği gösterilmiştir (237).

Bivalan ve benzer olarak üretilen kuadriyalan aşuların, faz 2 çalışmalarında persistan HPV tip 16 ve 18 enfeksiyonuna karşı etkisinin %100'e yakın olduğu bildirilmiştir. Her iki tip aşının da persistan HPV tip 16 ve 18 enfeksiyonundan ve ilişkili premaligniteden korunmada %100'e yakın koruma sağlamasıyla, güvenli ve

etkili olduğu tespit edilmiştir. Yakın bir geçmişte piyasaya sürülen kuadrivalan aşının faz 3 çalışmalarında da faz 2 çalışmalarında elde edilen güvenilirlik onaylanmış olup (231) bu aşının (Gardasil) uygunluğu Avrupa’da EMEA (European Medicines Evaluation Agency) ve Amerika’da ise FDA tarafından onaylanmıştır (234).

2.7.3.Aşılama ve Koruyuculuk

HPV aşısının geliştirilmesi servikal kanserden korunmada oldukça önemli bir adımdır (213). Ancak, aşılama oranlarının yüksek olduğu düşünülse dahi en az yirmi yıl servikal kanser oranında düşmenin olması beklenmemelidir. Bundan da ziyade her ne kadar aşı suşları diğer genotiplere karşı çapraz koruma sağlayabilse de (222) korunma tüm hr-HPV tiplerini içermemektedir bu nedenle servikal kanser bu diğer yüksek onkojenik riskli HPV tipleriyle devam edecektir (238). Faz 2 ve faz 3 çalışmalarında aşılamanın %100 etkili olduğu bulunmasına rağmen, Franco ve ark.’ları yaptıkları bir çalışmada, hedeflenen tiplere karşı korunmanın kesin olmadığını tespit etmişlerdir (213). Yani premalign CIN’lerin taraması, birinci jenerasyon aşılama ile tanışmadan sonra da devam edecektir (31).

2.7.4.Tip Spesifite ve Çapraz Koruma

HPV L1 VLP aşılıları tarafından üretilen nötralizan antikolar tip spesifik olarak görünmektedir (239). Bu nedenle HPV tip 16 L1 VLP ile immunizasyonun HPV tip 16’ya karşı bir koruma sağlayacağı fakat diğer HPV tiplerine karşı koruma sağlayamayacağı beklenir. Mevcutta bulunan VLP aşılıları sadece iki HPV tipini (HPV tip 16 ve 18) içermektedir. HPV tip 16 servikal kanser vakalarının %50-60’nı, HPV tip 18 ise %10-12’sini kapsamaktadır. Yani, en iyi ihtimalle hedef popülasyonun %100’ü aşılanırsa dahi diğer onkojenik tiplere karşı önemli derecede çapraz koruma olmadıkça yaklaşık olarak %70’lik oranda servikal kanserden korunma sağlanacaktır. Ortak nötralizan epitopu olduğu bilinen HPV’ler HPV tip 6 ve 11 (240), HPV tip 31 ve 33, HPV tip 18 ve 45’tir (241). HPV tiplerinde genel olarak nötralize edici lineer epitoplar bulunsa da bu epitoplar tarafından oluşturulan çapraz nötralizasyon koruyuculuk için oldukça düşüktür (242). VLP’lerin doğuştan olan immunitiyi (243) ve hücre aracılı cevabı (244) güçlü bir şekilde indüklediği gösterilmiştir. VLP’lere karşı oluşan T hücre yanıtının miktarı, sitokinler ve

lenfoproliferasyon ile belirlenmiştir (245). Bir çalışmada, HPV tip 16 ilişkili VLP'ye karşı çapraz immünite geliştiği gösterilmiştir (246).

2.7.5.Tarama

Birçok gelişmiş ülkede yapılan çalışmalarda servikal kanser tarama programlarının servikal kanser insidansını başarılı bir şekilde (%70) azalttığı bildirilmiştir. Bu ülkelerde, tarama önerilen yaş gruplarında, insidanda bir yaş spesifik plato olması eğilimi vardır. Tarama programlarının uygulanmadığı az gelişmiş ülkelerde hala servikal kanser insidansının yaşla birlikte arttığı bildirilmektedir. Servikal kanser insidansı, gelişmekte olan ülkelerde on yıllar içinde toplumun yaşlanmasına ve uygun tarama programlarının olmamasına bağlı olarak yükselebilir. Bu programların başarısı, bir kadının yaşamı boyunca testi tekrarlanmasını ve servikal kanser prekürsörlerinin erken saptanması ve tedavisi için taramanın toplum bazlı bir ağ şeklinde olmasını gerektirmektedir (247).

Tarama programları olan ülkelerde koruma çalışmalarının hedefi, servikal kanser saptanmasından, kanser prekürsör lezyonlarının tanısı ve tedavisine kaymıştır. Bu programların amacı, insidansı mümkün olan en düşük seviyelere indirebilmektir. Bu programların başarı ile uygulandığı ülkelere Finlandiya'da kadınlarda servikal kanser insidansının 2-3/100.000 dolaylarına kadar düştüğü bildirilmiştir (247). Günümüzde sitoloji bazlı tarama stratejileriyle servikal kanser insidansında önemli ölçüde azalmanın olduğu bildirilmektedir (247).

Tarama programlarına rağmen gelişmiş ülkelerde kadınlar için servikal kanser hala ciddi bir sağlık sorunu olmaya devam etmektedir. Servikal kanser nedeni ölümlerin yaşla birlikte artarak devam ettiği bildirilmekte ve servikal kanser insidansının hemen hemen yarısını oluşturmaktadır. Batı Avrupa'da her yıl hala 30.000 yeni olgu tanısının konduğu ve 15.000 kadar vakada da mortaliteyle sonuçlandığı bildirilmiştir (247).

Tarama testlerinin bazı handikaplarının yanında kadınların davranışları da servikal kanser insidansının devam etmesinde en önemli sebeplerdendir. Amerika'da servikal kanser tanılı kadınların yarısının hayatları boyunca hiç PAP smear testi yaptırmadığı ve %10'luk kesimin de servikal kanser tanısı almadan önceki 5 yıl boyunca tarama testi yaptırmadığı bildirilmiştir. Tarama programlarına katılmayan

kadınların bu tür programlara katılmama nedenleri arasında; korku, utanma, anksiyete, doktor cinsiyeti, kadının göçebe yaşam sürmesi, yaşlılık, ekonomik problemler ve dini inançlar gibi sebeplerin olduğu saptanmıştır (247).

HPV tarama testlerinin, belirsiz sitolojik lezyonların yönetiminde; sitolojik incelemenin tekrarlanmasından daha etkili, primer tarama testi olarak en az sitolojik inceleme kadar etkili ve preinvaziv lezyonların tedavi sonrası rekürrensini takibi için ise sitolojik incelemeden daha etkili olduğu bildirilmiştir (248). Günümüzde FDA onaylı, servikal kansere ve HSIL'e neden olan 13 HPV tipini tespit edebilen HPV tarama test sistemi mevcuttur (247).

Korunmada kondom kullanımının etkisi üzerine yapılan araştırmalarda sonuçlar net değildir (249). Ara sıra kondom kullanmanın HPV enfeksiyon riskini arttırdığı gibi mantıksız bazı çalışmalar da mevcuttur (249,250,251). Enfeksiyon ihtimalinin artmasının nedeni olasılıkla kondom kullanmadaki alışkanlıkla alakalıdır. Örneğin insanlar kendilerinin daha fazla risk altında olduklarına inandıklarında (yeni partner, geçici gündelik partnerler veya hayat kadınlarıyla cinsel ilişkilerde) kondom kullanırlarken, kendilerini güvende hissettiklerinde kullanmamaktadırlar (uzun dönem veya eş partnerle cinsel ilişkilerde) (252). HPV'nin penetrasyon olmayan cinsel aktivite sırasında da bulaşabileceği bildirilmiştir (253).

Kondom kullanımının çelişkili etkisi sadece çiftlerin doğru bir şekilde incelendiği çalışmalarda anlaşılabilir. HPV enfeksiyonundan aşılama ile korunma, prekanseröz ve kanseröz lezyonların tedavisine göre daha tercih edilir yoldur. Aşılama ile HPV enfeksiyonuna bağlı mortalite ve morbiditenin dramatik bir şekilde azalacağı umulmaktadır (138).

Erkeklerin sünnet olması ve kondomların uygun ve sistematik kullanımı riski düşürebilirse de cinsel partnerler arası HPV geçişini önlemede total olarak yetersizdir (70,71).

HPV enfeksiyonlarında tüm genital alan tutulabildiğinden kondom kullanımı HPV enfeksiyonunun bulaşmasını önlemede yetersizdir (61). HPV vücudun diğer infekte kısımlarından da temasla bulaşabilmektedir (25).

2.8.TEDAVİ

Sağlıklı bireylerde immun sistem HPV infeksiyonlarının çoğunda tam bir iyileşme meydana getirmektedir. İnfeksiyonların yaklaşık %90'ı 12-36 ay içinde kendiliğinden iyileşmektedir (254). Lokal lenf nodlarına giren HPV infeksiyonuna karşı immun cevap normalde ilk olarak antijen sunucu hücreler aracılığıyla olur. T lenfositlerin aktive olması B lenfositlerin antikör sentezlemesine neden olur. Fakat lokal infekte dokudaki HPV'ye spesifik IgG ve IgA, viral infeksiyonların temizlenmesi için yetersizdir (255). Sağlıklı bireylerde hümoral immünite, hastalığın ilerlemesi ve semptomların derecesi hususunda anahtar rol oynar. Genetik yatkınlık, infeksiyonun tekrarlama sıklığı, HPV tipinin genetik varyasyonları, bir tipten fazla HPV tipiyle infeksiyon ve hormon düzeyleri gibi hümoral immüniteyi etkileyen faktörler vücudun infeksiyonu temizlemesini etkilemektedir (25).

Servikal kanser için tedavinin tipi ve prosedürü; boyut, evre veya tümörün histolojik özellikleri, lenfosit infiltrasyonunun derecesi ve hastaların ameliyat ve kemo-radyoterapi hakkındaki tercihleri gibi bazı kompleks faktörlere göre belirlenmiştir. Genel olarak invazyon yapmayan intraepitelyal lezyonlarda defektif malign hücrelerin ılımlı progresyonu tanımlandığı zaman basit kriyoterapi veya lazer tedavisi seçilecek tedavi yöntemidir. Bu hastalar genellikle fertilitelerini kaybetmezler. Kriyoterapi sıklıkla, anormal doku çevresinde nekrozu indükleyen, süper soğuk bir proba uygulanır. Diğer kriyoterapi tekniklerinde karbondioksit lazer ışını kullanılır. Lazer kullanıldığında iyileşme daha çabuk olur ve bozulma daha azdır ancak bu yöntem daha pahalıdır. Şüpheli lezyonların temizlenmesi önemlidir, çünkü bu lezyonların temizlenmediği hastaların rekürrens gösterme riski temizlenenlere göre daha yüksektir. HIV (Human Immunodeficiency Virus) ile infekte kişilerde de riskin daha yüksek olması HPV infeksiyonlarında immün sistemin ne kadar önemli olduğunu göstermektedir (256). Hastalığın tanısı ve tedavisinden sonra invaziv servikal kansere ilerleme nadir görülür (<%2). Bu nedenle hastalığın erken tanısının yapılması oldukça büyük öneme sahiptir (25).

Çeşitli antiviral ve immün modülatör ilaçlar, mekanik ve kemo-radyoterapik tekniklerin de dahil olduğu birçok yöntem HPV alakalı servikal lezyonların tedavisi

için değerlendirilmiştir. Sidofovirin (bir asiklik nükleosit fosfonat derivesi) DNA viruslarına karşı geniş spektrumlu aktivitesi vardır ve anormal hücre proliferasyonunu inhibe etmektedir (257). Podofilin, mitozu metafaz safhasında durduran bir sitotoksik ajandır. Vidarabin, bir DNA polimeraz inhibitörü olup sayılan ilaçların servikal kanser hastalarının tedavisinde kullanılabildiği bildirilmektedir (258). Bazı sitokinlerin de bu tür kanser hastalarının tedavisinde kullanılabileceğine dair görüşler mevcuttur. Alfa, beta ve gama interferon gibi interferonların HPV'nin E6 ve E7 gen transkriptlerini baskıladığı gösterilmiştir (259).

3.MATERYAL VE METOD

Mustafa Kemal Üniversitesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Polikliniklerine müracaat eden CIN tanısı konmuş 18-80 yaşları arasındaki 114 hasta ile herhangi bir semptomatik bulgusu olmayan, yaşları 22-53 arasında değişen 89 kadından servikal sürüntü örnekleri alındı. Sürüntü örnekleri rimel tipi smear fırçasıyla (Medbar Tıbbi Malzemeler, Türkiye) alınarak viral transport besiyerine konuldu. Öncelikle alınan örneklerden viral DNA ekstraksiyonu yapıldı. İzole edilen DNA örneklerinde MYO9, MY11 ve GP5+, GP6+ primer çiftleri kullanılarak örneklerde HPV'ye özgü ortak genomik bölge varlığı araştırıldı ve sonra pozitif bulunan örnekler fragment analiz yöntemi ile (Hitachi AB, Applied Biosystems Genetic Analyzer 3130, USA) 13 yüksek riskli (HPV tip 16,18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 ve 68) ve 2 düşük riskli (HPV tip 6 ve 11) HPV tipi açısından değerlendirilerek HPV genotiplendirilmesi yapıldı.

Tiplendirilmesi yapılan klinik örneklerde yüksek onkojenik riskli olarak tespit edilen genotiplerde E6 ve E7 gen ekspresyonu varlığı NASBA (Nucleic Acid Sequence Based Amplification) yöntemiyle, NucliSENS® EasyQ Genetic Analyzer cihazı (Biomerieux, Fransa) kullanılarak araştırıldı. Asemptomatik kadınlardan izole edilen HPV örnekleri onkoprotein varlığı açısından incelemeye dâhil edilmedi.

3.1.SERVİKAL ÖRNEKLERİN ALINMASI

Servikal sürüntü örnekleri alınmadan önce genital mukozal bölgeden mukus sekresyonunun uzaklaştırılmasına dikkat edildi. Örnekler lezyonlu bölgeden, ticari olarak sağlanan, steril özel plastik fırçalarla lezyonun üzerine bastırılıp çevrilerek alındı. Alınan örnekler direkt viral transport besiyerine konularak +4 °C'ye kaldırıldı. Soğuk zincir altında örneğin işlenmesi için Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'na transportu sağlandı. Laboratuvara gönderilen klinik örnekler homojenizasyon için 20-30 saniye vortekslendi. Örnekler çalışılıncaya kadar -86 °C'de saklandı.

3.1.1. Viral Transport Besiyeri

Örneğin uygun koşullarda laboratuara ulaştırılması ve saklanması için viral transport besiyeri kullanıldı. Bu besiyeri aşağıda belirtildiği gibi hazırlandı.

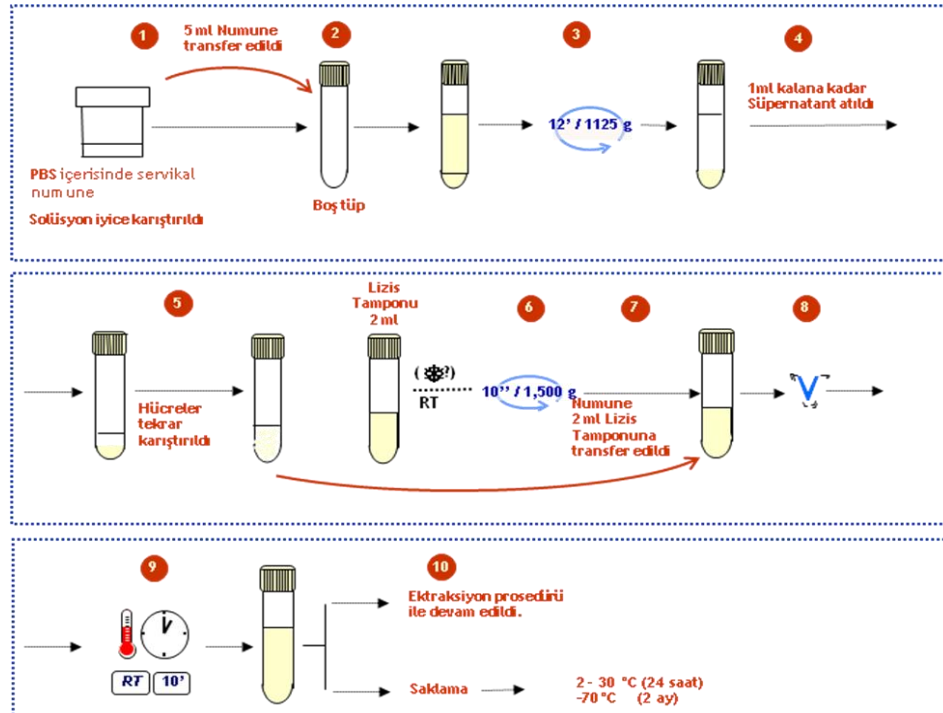
1 litre için (Ca^{++} suz ve Mg^{++} suz)

- NaCl.....8 gr
- KCl.....0.2 gr
- KH_2PO_40.2 gr
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$2.9 gr

Kimyasal maddeler 1 litre deiyonize suda çözülerek pH'sı 7.4'e ayarlandı. İçerisine 10 ml streptomisin-penisilin çözeltisi ilave edilerek kullanıncaya kadar +4 °C'de saklandı.

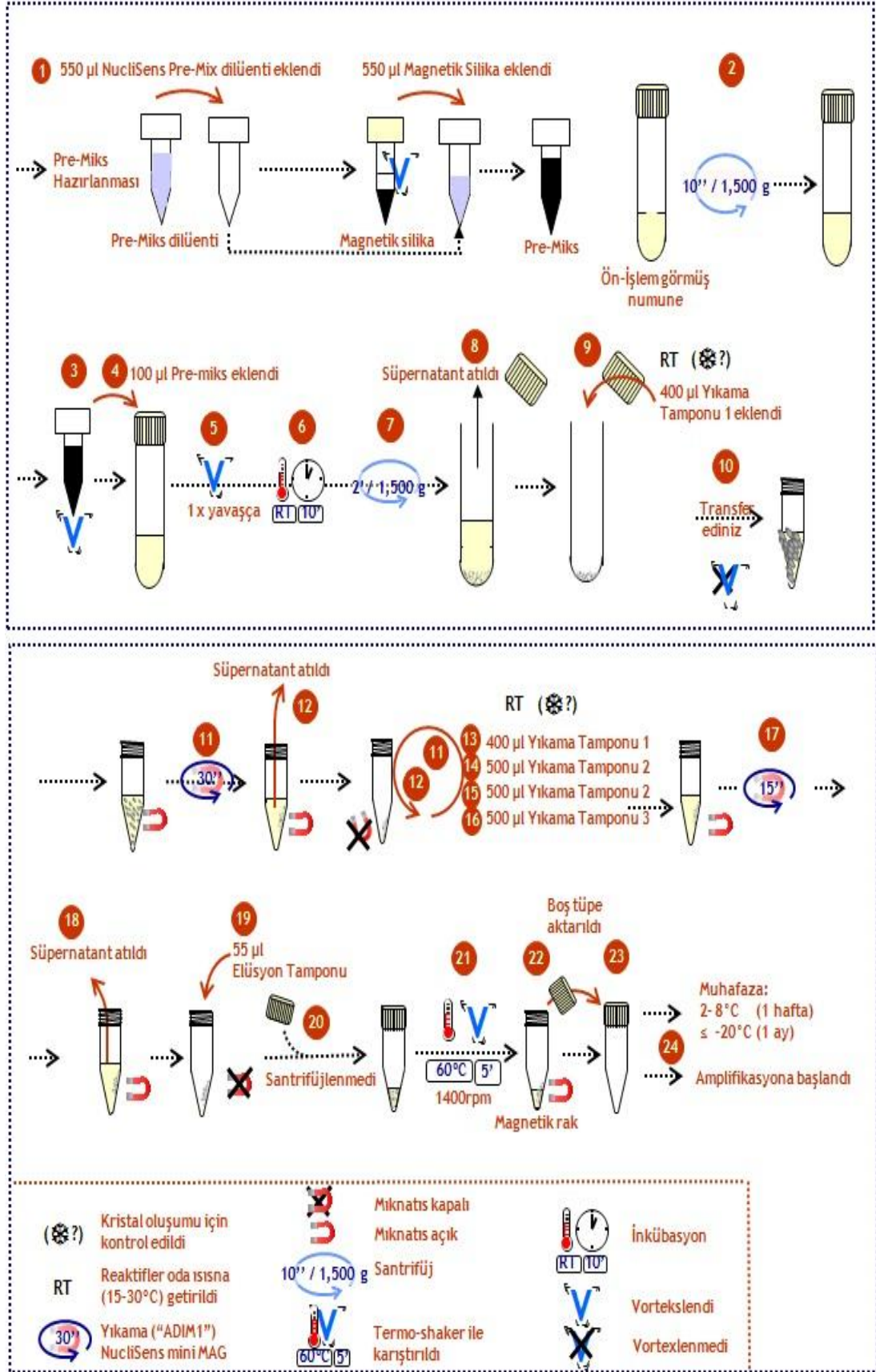
3.2. DNA EKSTRAKSİYONU

Derin dondurucudan alınan örnekler benmaride 37 °C'de çözüldü. Çözülen örnekler 1125 g'de 12 dk. santrifüj edildi. Süpernatant atılarak kalan kısım (1 ml) NucliSENS® lizis tamponu üzerine eklendi. Lizis tamponu içerisinde örnekler 10 saniye 1500 g santrifüj edildi. Daha sonra örnekler vorteksenerek lizis tamponu içinde 10 dk. oda ısısında tutuldu (Şekil 6). Bu inkübasyon sırasında premiks solüsyonu hazırlandı.



Şekil 6: Ön işleme örneklerin ekstraksiyona hazırlanması (Biomérieux, Fransa).

1. Ticari olarak temin edilen NucliSens manyetik ekstraksiyon kiti (Biomerieux, Fransa) içindeki premiks dilüentinden 550 µl bir eppendorf tüpe konuldu.
2. Üzerine 550 µl de manyetik silika eklenerek premiks solüsyonu hazırlandı.
3. Lizis tamponu içinde tutulan örnekler 10 saniye 1500 g'de santrifüj edildi.
4. Sonra hazırlanan pre-miks solüsyonunu vortekslendi.
5. Lizis tamponu bulunan her örnek üzerine 100 µl pre-miks solüsyonu eklendi.
6. Sonra örnekler vortekslenerek oda ısısında 10 dakika inkübe edildi.
7. Lizis tamponu içindeki örnekler 2 dakika 1500 g'de santrifüj edilerek süpernatant atıldı.
8. Pelletin üzerine 400 µl yıkama tamponu 1 eklenerek karıştırıldı ve örneklerin tamamı 1.5 ml'lik eppendorf tüplere alındı.
9. Eppendorf tüplere alınan örnekler NucliSENS® MiniMAG cihazına (Biomerieux, Fransa) yerleştirildi (mıknatıs kapalı konumda).
10. Örnekler NucliSENS® MiniMAG'te 30 saniye yıkandı (mıknatıs açık).
11. Süpernatant atıldı (Mıknatıs açık).
12. Üzerine 400 µl yıkama tamponu 1 mıknatıs kapalı konumda eklenerek yukarıdaki 10. ile 11. basamak tekrarlandı.
13. Benzer şekilde mıknatıs kapalı konumda 500 µl yıkama tamponu 2 eklenerek yukarıdaki 10. ile 11. basamak tekrarlandı.
14. Sonra 13. basamak tekrar edildi.
15. Örnekler üzerine 500 µl yıkama tamponu 3, mıknatıs kapalı konumda eklendi.
16. Mıknatıs açık konumda NucliSENS® MiniMAG cihazında 15 saniye yıkandı.
17. Mıknatıs açık konumda iken pelletin üst kısmındaki süpernatant kısmı atıldı.
18. Bu aşamada mıknatıs kapalı konumda iken örneklerin üzerine 55 µl elüsyon tamponu ilave edildi.
19. Örnekler 5 dakika 60°C'de (ısıtmalı çalkalayıcıda) 1400 rpm'de inkübe edildi.
20. Sonra örneklerin bulunduğu tüpler NucliSENS® MiniMAG cihazına yerleştirilerek mıknatıs açık konumda 1.5 ml'lik eppendorf tüplerine nükleik ekstrakt transfer edildi (Şekil 7).
21. Elde edilen ekstraksiyon HPV amplifikasyonu için genomik DNA olarak kullanıldı.



Şekil 7: DNA ekstraksiyon prosedürü (Biomerieux, Fransa).



Resim 1: HPV DNA izolasyonunda kullanılan ısıtmalı çalkalayıcı (thermo-shaker).



Resim 2: NucliSENS® Mini MAG manyetik DNA izolasyon cihazı.

3.3.PCR YÖNTEMİYLE HPV DNA AMPLİFİKASYONU

İzole edilen DNA örneklerinde MY09, MY11 ve GP5+, GP6+ primer çiftleri kullanılarak örneklerde HPV'ye özgü ortak genomik bölge amplifikasyonu yapıldı (Tablo 2).

Çalışmada PCR karışımı toplam hacim 50 µl olacak şekilde ayarlandı. PCR karışımı aşağıdaki oranlarda hazırlandı.

5X PCR Buffer	5 µl
MgCl ₂	3 µl
dNTP	1 µl
Forward	1,5 µl
Reverse	1,5 µl
Taq polimeraz Enzimi	0,15 µl
dH ₂ O	32,85 µl
Mix	45 µl
Kalıp DNA	5 µl

Thermal cycler'da HPV MY09/11 primerleri ile amplifikasyon döngüsü;

94 °C	10 dak.	}	40 döngü
94 °C	1 dak.		
55 °C	1 dak.		
72 °C	1 dak.		
72 °C	7dak.		

HPV GP5+/6+ Nested PCR için MY09/11 PCR ürünü kullanıldı. Amplifikasyon döngüsü aşağıdaki şekilde ayarlandı;

94 °C	10 dak.	}	40 döngü
94 °C	1 dak.		
55 °C	1 dak.		
72 °C	1 dak.		
72 °C	7dak.		

Tablo 2: Çalışmada kullanılan primer dizileri ve amplicon büyüklükleri.

Genotip	Primer dizisi (5'-3')	Amplicon (bp)
MYO9	CGT CCM ARR GGA WAC TGA TC	450
MY11	GCM CAG GGW CAT AAY AAT GG	
GP5+	TTT GTT ACT GTG GTA GAT ACT AC	143
GP6+	GAA AAA TAA ACT GTA AAT CAT ATT	

3.4.PCR ÜRÜNLERİNİN AGARUZ JEL ELEKTROFOREZİ

PCR işleminden sonra HPV'ye özgü amplifikasyon ürünlerinin varlığı % 2'lik agaroz jelde yürütülerek araştırıldı. Agaroz jelin hazırlanmasında TAE (Tris-Asetat-EDTA) tamponu kullanıldı. TAE 50X olacak şekilde stok solüsyon olarak hazırlandı ve 1xTAE olacak şekilde sulandırılarak kullanıldı.

- 50X TAE Elektroforez Tamponu: 1 litre
- 242 gr Tris Base (Sigma)
- 57.1 ml Glasiyal asetik asit
- 100 ml 0.5 M EDTA (pH 8) (Sigma)

242 Gram Tris base 600 ml distile su içerisinde çözdürüldükten sonra glasiyal asetik asit eklendi. En son olarak EDTA eklendi ve son hacim distile su ile 1 litreye tamamlandı.

1. Elektroforez için stok TAE solüsyonundan 1xTAE olacak şekilde distile su ile dilüe edildi.
2. 1xTAE tamponu içerisinde % 2'lik olacak şekilde agaroz tartılıp eritildi mikrodalga fırında çözüldü.
3. Jelin ısısı düşmeye başladığında (katılaşmadan hemen önce) içerisine 10 µg/ml olacak şekilde etidyum bromid katıldı.
4. Sonra katılaşması için uygun taraklar kullanarak jel kalıbına döküldü.
5. Jel oda sıcaklığında katılaşmaya bırakıldı.
6. Katılaşan jel elektroforez tankına (Wealtec, Elite 300 Plus, USA) yerleştirildi.
7. Amplifiye edilen örneklerden 7'şer µl 3µl loading (yükleme) tamponu (%20 sükröz, %0.25 brom fenol ile karıştırılarak jelde açılan kuyucuklara yerleştirildi.
8. Yükleme sırasında DNA marker (100 bp'lik, Fermentas) kullanıldı.
9. Yükleme sonunda tankın güç kaynağı (Wealtec, Elite 300 Plus, USA) çalıştırılarak 100 V akım altında yürütüldü.

10. Yaklaşık 30 dk sonra yürütme işlemi durdurularak jel görüntüleme cihazı (Wealtec, Dolphin-View, USA) ile bantların varlığı incelendi.

3.5.FRAGMENT ANALİZİ

1. Fragment analizi için -20 °C'de önceden bekletilen PCR rakına eppendorf tüpleri yerleştirildi.
2. F-HPV genotipleme kitinin (Molgentix, S.L. Barselona, İspanya) içerisinde bulunan PCR karışımından 12.5'er µl ve primer karışımından 7.5'er µl PCR tüplerine eklendi.
3. Sonra üzerine 5'er µl ekstraksiyon ürünü genomik DNA'dan eklendi.
4. PCR tüpleri ısı döngü cihazına (Bioder/Thermal Blocks xp cyclers, Tokyo Japan) (Resim 3) yüklenerek aşağıdaki programda amplifikasyona bırakıldı.
95 °C'de 15 dk
95 °C'de 30 sn }
64 °C'de 30 sn } 35 siklus
72 °C'de 30 sn }
60 °C'de 10 dk
5. Amplifikasyon işlemi tamamlandıktan sonra genomun fragment analizi için reaksiyon rakının içerisine Gene Scan™ LIZ™ Size Standart solüsyonundan 0.3 µl her kuyucuğa eklendi.
6. Bunun üzerine her kuyucuğa 20'şer µl Hi-Di™ formamid ilave edildi.
7. Son olarak her kuyucuğa ısı döngü cihazından alınan PCR ürünlerinden 2'şer µl eklendi.
8. İçerisinde hava kabarcığı olmamasına dikkat edilerek ısı döngü cihazında 94 °C'de 2 dakika süre ile inkübe edildi.
9. Örnekler ısı döngü cihazından alındıktan sonra -20 °C'de 2 dakika tutuldu.
10. Derin dondurucudan alınan örnekler sekans cihazında (Hitachi AB, Applied Biosystems, 3130 Genetic Analyzer) (Resim 8) bulunan Gene Mapper programına f-HPV tiplendirme kiti kullanılarak yüklendi.
11. Örneklerin konulduğu çalışma rakı cihaza yerleştirilerek sekanslama başlatıldı.



Resim 3: PCR amplifikasyonu yapılan thermal cyclers cihazı.

3.5.1.Sonuçların Yorumlanması

F-HPV tiplendirme kiti genital enfeksiyona sebep olan 15 HPV tipini (HPV tip 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 6 ve 11) saptamaktadır. Her bir tip baz büyüklüğüne ve ampikon boyutuna karşılık gelen renklere göre tanımlanmaktadır. Benzer boyuta sahip tipler farklı florokrom boya (FAM, VIC, NED ve PET) ile etiketlenmiştir. Bu boyalar elektroforetogramlarda mavi, yeşil, sarı-siyah ve kırmızı olarak saptanmaktadır. LIZ boyası (Turuncu) elektroforezde PCR ürünleriyle birlikte yürüyen standart için kullanılmaktadır (Tablo 3). HPV'ler elektroforetogramda spesifik renk ve boyutta pikler şeklinde görülmektedir.

Tablo 3: F-HPV tiplendirme kitinde renk ve boyutlara göre subtiplerin belirlenmesi.

HPV Tipi	PCR ürünü rengi	Boyut
HPV-58	PET	156
HPV-33	6-FAM	196
HPV-6	PET	256
HPV-16	NED	296
HPV-35	VIC	327
HPV-18	6-FAM	386
HPV-56	6-FAM	428
HPV-31	6-FAM	489
HPV-68	NED	189
HPV-39	VIC	244
HPV-59	6-FAM	283
HPV-52	PET	308
HPV-51	VIC	389
HPV-45	NED	414
HPV-11	PET	424
D18S391	VIC	140-180

3.5.1.1.Pozitiflik

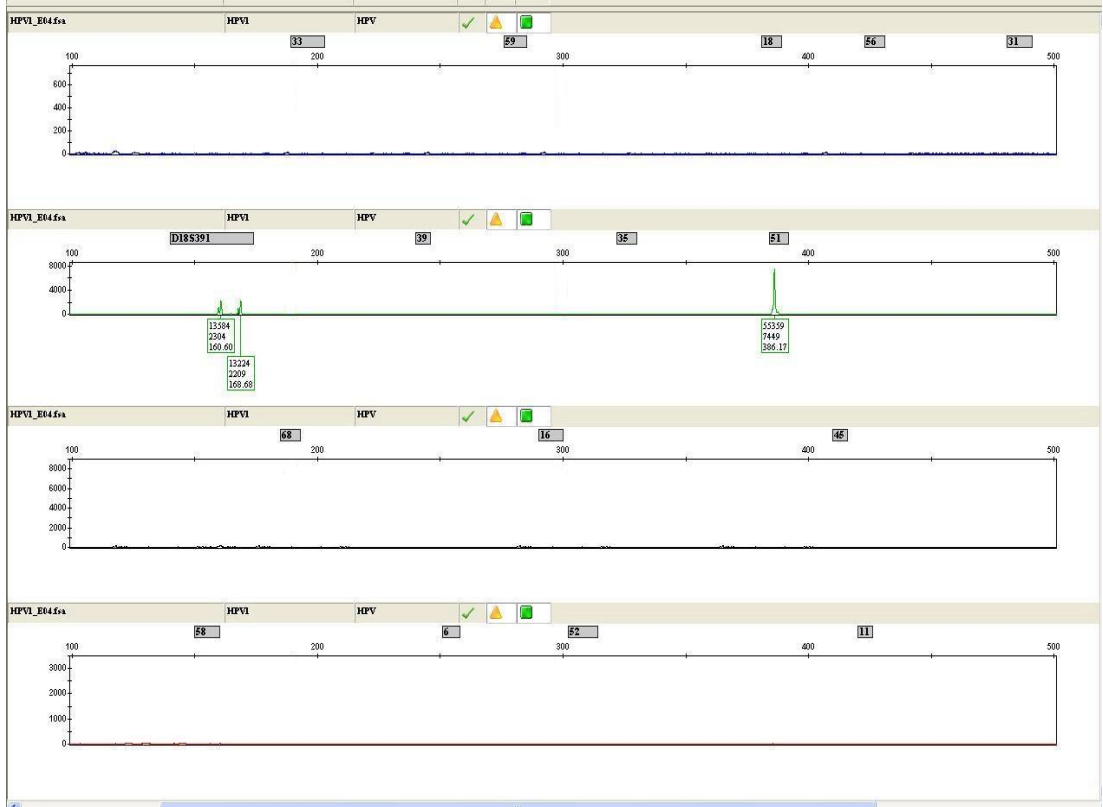
Örnekte HPV varlığı, 15 genotipten bir ya da daha fazla subtiplerin varlığı ile ilgili olarak pik vermesi şeklinde görüldü. Değerlendirme her tipin kendine özgü renk ve boyutuna göre yapıldı. Örnek analizinde 1 pikin görülmesi tek tiplerle infeksiyon olarak yorumlanırken (Resim 4), iki ya da daha fazla pikin varlığı ise çoklu infeksiyon olarak yorumlandı (Resim 5). Analiz edilen örnekte viral DNA yükü fazlalığında internal kontrol pikinin kaybolabileceği unutulmamıştır.

3.5.1.2.Negatiflik

Çalışmada internal kontrol pikinin tespit edilip, analiz edilen örnekte herhangi bir DNA pikinin görülmediği durum olarak değerlendirildi (Resim 6).

3.5.1.3.Geçersiz sonuç

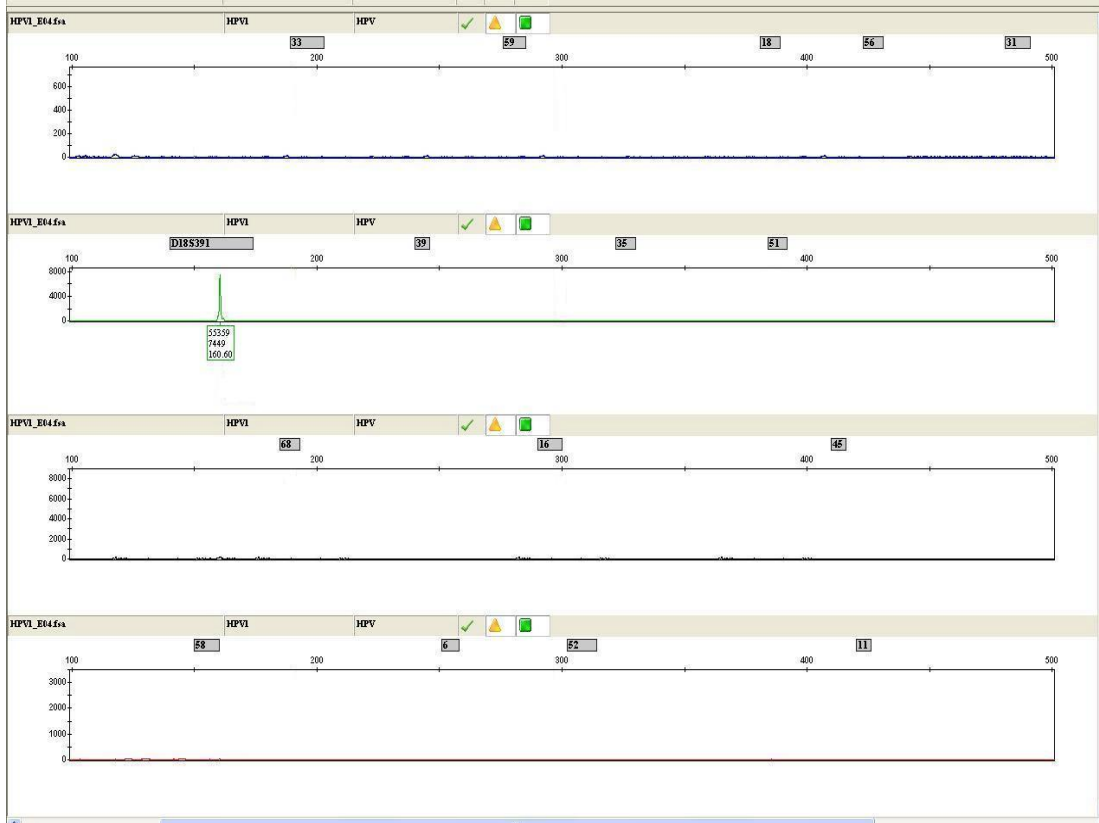
Analiz edilen örnekte internal kontrol DNA pikinin tespit edilmediği durumda sonuç geçersiz kabul edilip çalışma tekrarlandı (Resim 7).



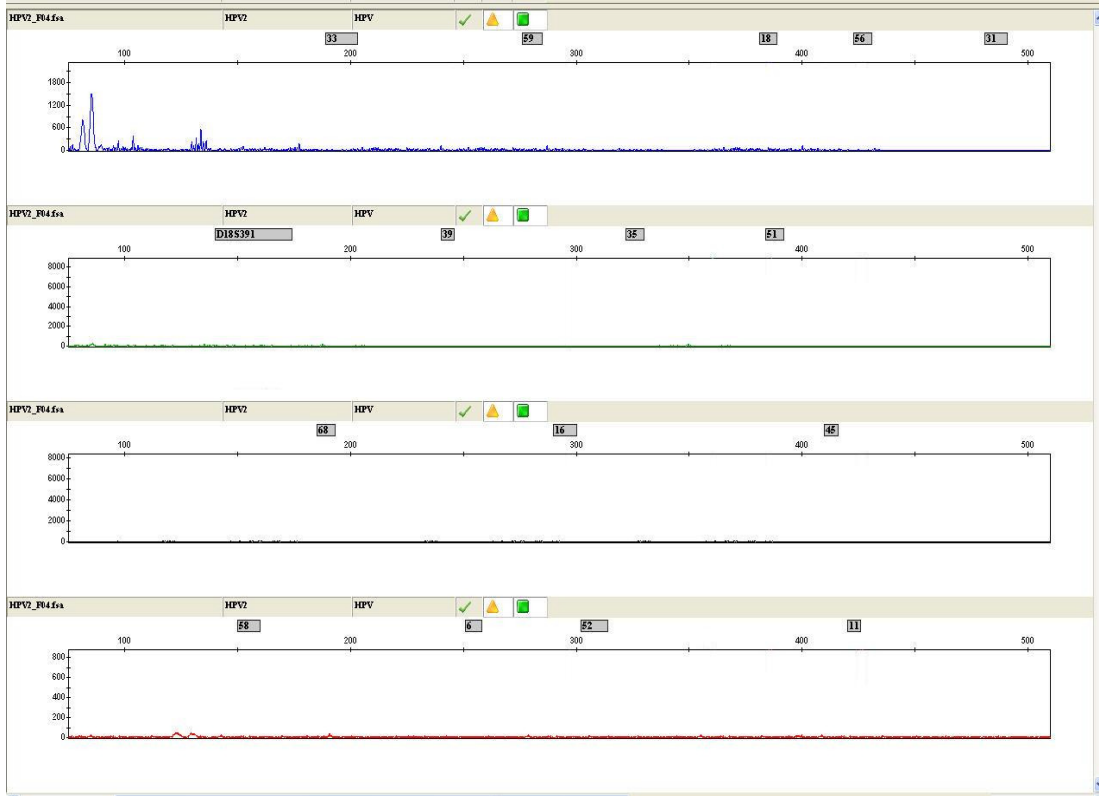
Resim 4: Tek tip pozitif sonuç.



Resim 5: Birden fazla HPV tipinin pozitif olduğu analiz sonucu.



Resim 6: Negatif analiz sonucu.



Resim 7: İnternal kontrolün çalışmadığı geçersiz analiz sonucu.



Resim 8: Applied Biosystems Genetic Analyzer 3130 cihazı ve bilgisayar donanımı.

3.6.E6 VE E7 GEN EKSPRESYONU

Fragment analiz yöntemiyle yüksek riskli HPV tipleri saptanan hasta örneklerinde E6 ve E7 gen ekspresyonu varlığı NASBA yöntemiyle, NucliSENS® EasyQ Genetic Analyzer cihazı (Biomerieux, Fransa) kullanılarak araştırıldı. Bu amaçla aşağıdaki adımlar izlendi.

1. Cihazda örnekler 8'li gruplar halinde çalışıldı.
2. İlk olarak reaktif, reaktif dilüenti ile sulandırıldı ve içindeki sıvı homojen berrak olana kadar beklendi.
3. Bu arada enzim 170 µl enzim dilüenti ile sulandırıldı ve vortekslenmeden 30 dakika inkübe edildi.
4. Miks hazırlamak için tip 16 (kapak rengi pembe), tip 33-45 (kırmızı kapaklı) ve tip 18-31 (mavi kapaklı) için olan tüplere 16 µl KCl ve 14 µl NASBA® solüsyonu eklendi. Bu tüplere kendi kapak rengiyle aynı kapak renkli tüplerden 10 mikrolitre primer prob ilave edildi.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S1	S9	S17	S25	S1	S9	S17	S25	S1	S9	S17	S25
B	S2	S10	S18	S26	S2	S10	S18	S26	S2	S10	S18	S26
C	S3	S11	S19	S27	S3	S11	S19	S27	S3	S11	S19	S27
D	S4	S12	S20	S28	S4	S12	S20	S28	S4	S12	S20	S28
E	S5	S13	S21	S29	S5	S13	S21	S29	S5	S13	S21	S29
F	S6	S14	S22	S30	S6	S14	S22	S30	S6	S14	S22	S30
G	S7	S15	S23		S7	S15	S23		S7	S15	S23	
H	S8	S16	S24		S8	S16	S24		S8	S16	S24	
	HPV 16				HPV 18/31				HPV 33/45			

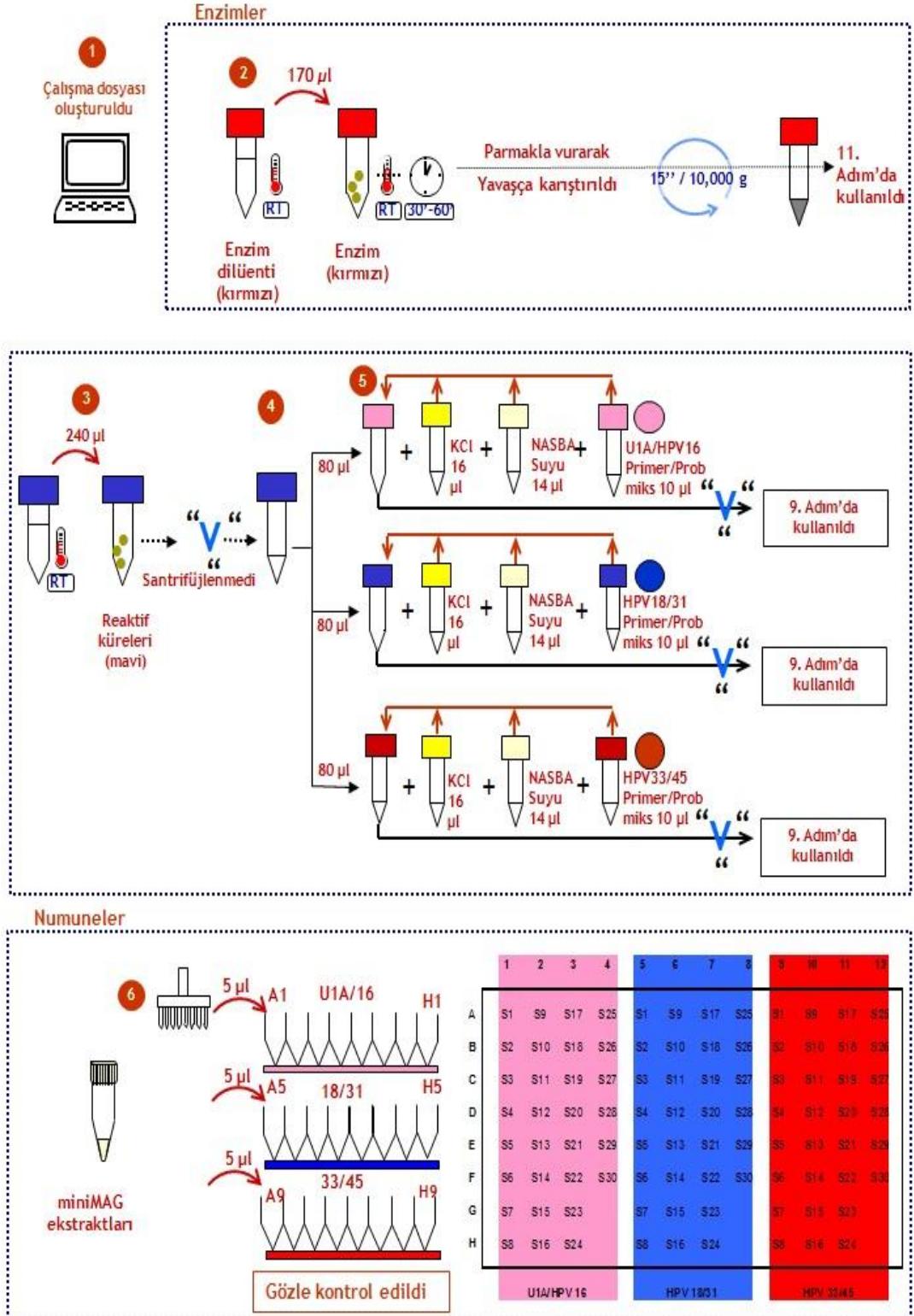
Şekil 8: Nuclisens EasyQ Genetic Analyzer cihazı çalışma rakının şematik görünümü (S= Örnek).

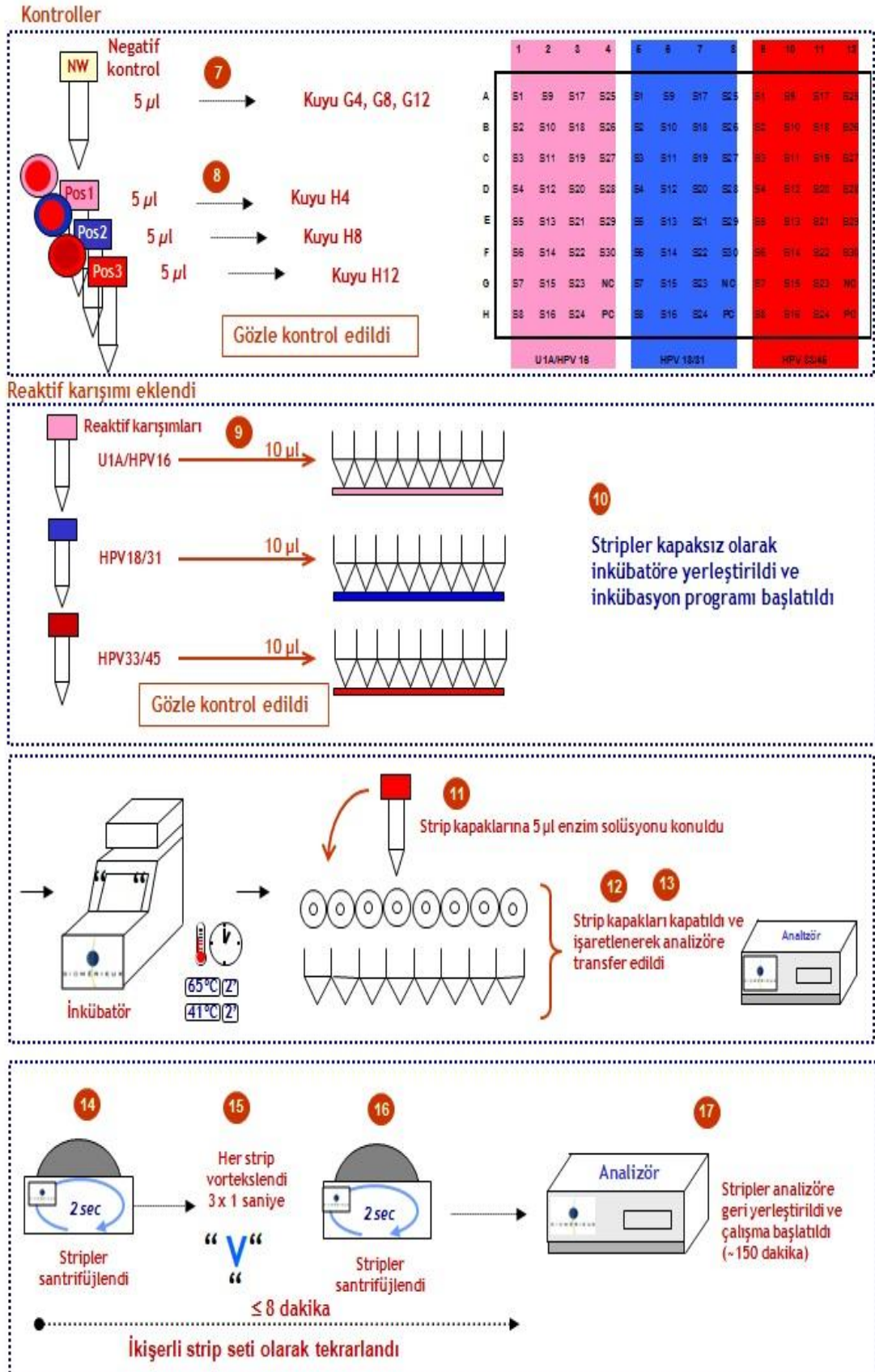
Yukardaki şekilde belirtildiği gibi örnekler için strip tüpler (Resim 9) tüp port (rack=rak)'larına (Şekil 8) 8'er örnek için ve 8'er kontrol için olmak üzere yerleştirildi. Bu işlem, pembe, mavi ve kırmızı alanlar için olmak üzere üç kez yapıldı. Kontrol için yerleştirilen tüplerin sadece son 2'ser tanesi kontrol için kullanıldı (ilki negatif, ikincisi pozitif kontrol olmak üzere). Tüm tüplerin negatif kontrolleri için ayrılan kuyucuklara ise 5 µl NASBA® solüsyonundan ilave edildi.

Ekstraksiyon ürünleri vortekslenip 5'er µl pembe, mavi ve kırmızı tüplere dağıtıldı. Daha önce hazırlanmış olan pembe, mavi ve kırmızı mikslerin içine önceden dilüe edilmiş reajenden 80'er µl eklenip vortekslendi. Boş bir eppendorf tüpüne 195 µl NASBA® solüsyonu ve bunun da üzerine daha önce sulandırılmış olan pozitif kontrolden 5'er µl pozitif kontrol kuyucuklarına konuldu. Sonra tüm örneklere hazırlanmış olan pembe, mavi ve kırmızı mikslerden renklerine uygun gelecek şekilde 10'ar µl dağıtıldı. Benzer şekilde pozitif ve negatif kontrol kuyucuklarına da aynı miktar dağıtıldı.

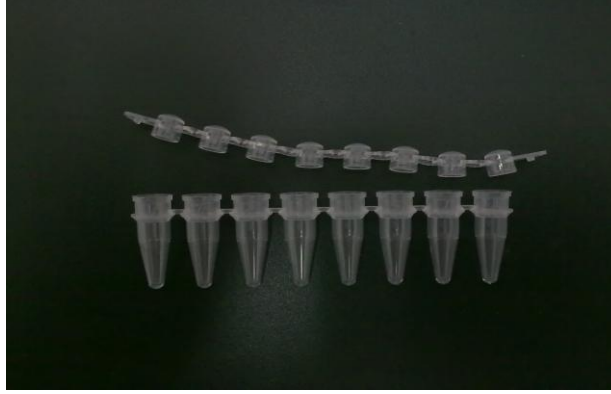
Kitin içerisinde bulunan enzimden konulmadan önce enzim 1000 g'de 15 saniye santrifüj (spin) edildi. Mikslerin dağıtıldığı kuyucuklar 65 °C'de 2 dakika ve 41 °C'de 2 dakika olacak şekilde inkübatörde (NucliSens® incubator Biomerieux, Fransa) bekletildi. Bu arada strip kuyucukların kapaklarına 5'er µl enzim dağıtıldı.

İnkübasyon sonunda strip kuyucukların kapakları kapatılıp mini santrifüjde (VWR Mini Star Silverline Mini Centrifüje, Kore) 2 saniye santrifüj edildi. Sonra örnekler E6, E7 onkoprotein analiz cihazına yerleştirilerek E6 ve E7 gen ekspresyonunun varlığı incelendi (Şekil 9).

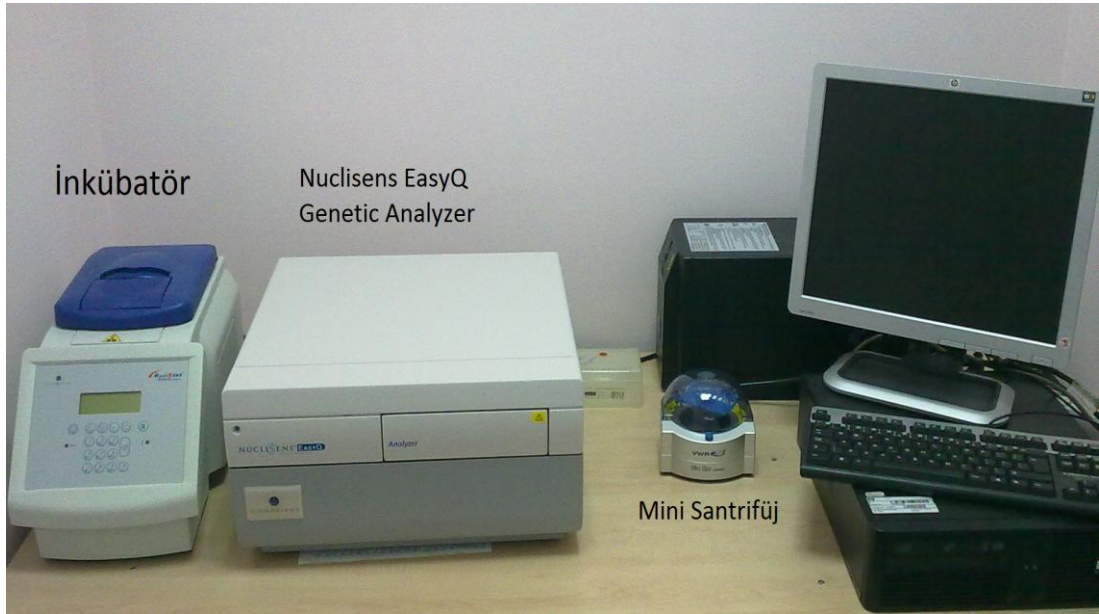




Şekil 9: E6/E7 onkoprotein çalışma prosedürü (Biomerieux, Fransa).



Resim 9: Nuclisens EasyQ Genetic Analyzer cihazında onkoprotein analizinde kullanılan strip yapılı eppendorf tüpleri.



Resim 10: E6 ve E7 onkoprotein analizinde kullanılan cihazlar (İnkübatör, Nuclisens EasyQ Genetic Analyzer, mini santrifüj ve bilgisayar donanımı).

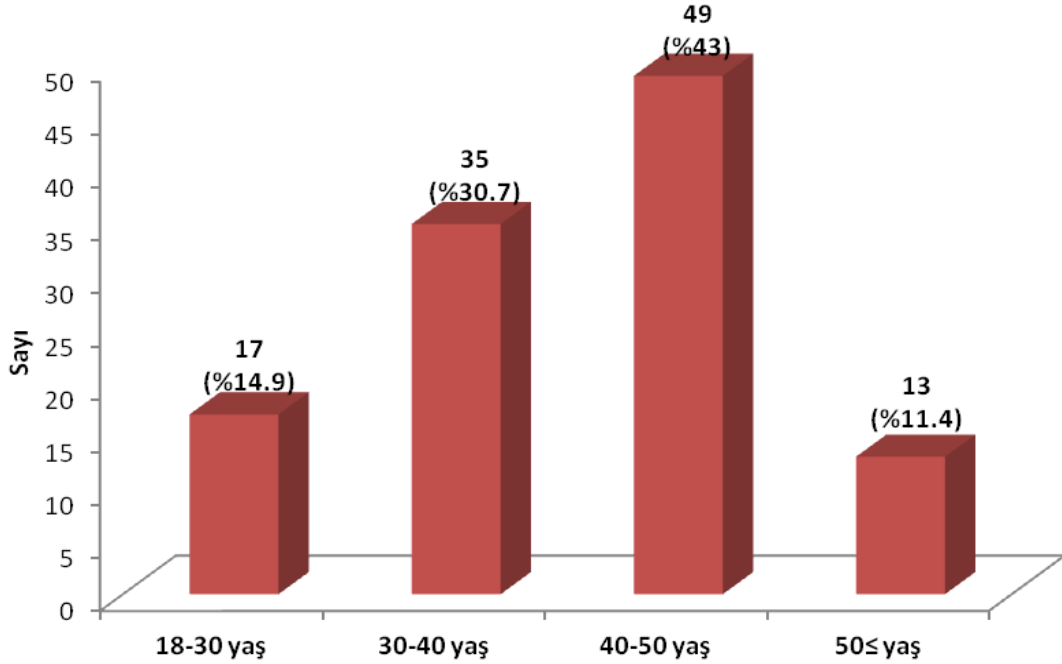
3.7.İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Hastalar arasında HPV dağılımı yaş, CIN1, CIN2 ve CIN3 değerlerini kapsayan veriler SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versiyon 13.0 programı (260) ile analiz edildi. Bağımsız örneklerde t testi, Mann Whitney ve Ki-kare testleri uygulandı. $P < 0.05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4.BULGULAR

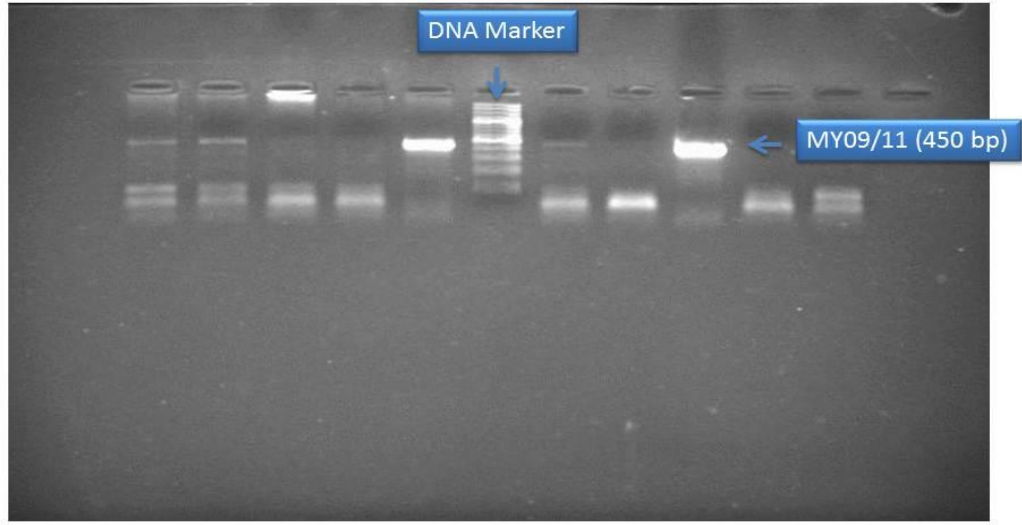
Çalışmada toplam 114 CIN tanılı kadın ile 89 asemptomatik kadından alınan genital sürüntü örneklerinde HPV tiplerinin belirlenmesi Applied Biosystems Genetic Analyzer cihazında (Hitachi AB, Applied Biosystems Genetic Analyzer 3130, USA) yapılırken, yüksek riskli HPV tipleri (HPV tip 16, 18, 31, 33 ve 45) tespit edilen örneklerde ise HPV E6 ve E7 gen ekspresyonu varlığı NucliSENS® EasyQ Genetic Analyzer (Biomerieux, Fransa) cihazıyla analiz edilerek, onkojenik aktivite tespit edildi.

Çalışmaya dahil edilen CIN tanılı kadınların yaş aralığı 18-80, asemptomatik kadınların yaş aralığı ise 22-53 idi. Kadınların yaşlara göre dağılımı yapıldığında 18-30 yaş grubunda 17 (%14.9; 17/114), 30-40 yaş grubunda 35 (%30.7; 35/114), 40-50 yaş grubunda 49 (%43; 49/114) ve 50 yaş ve üzeri grupta 13 (%11.4; 13/114) kadın mevcuttu (Grafik 1).

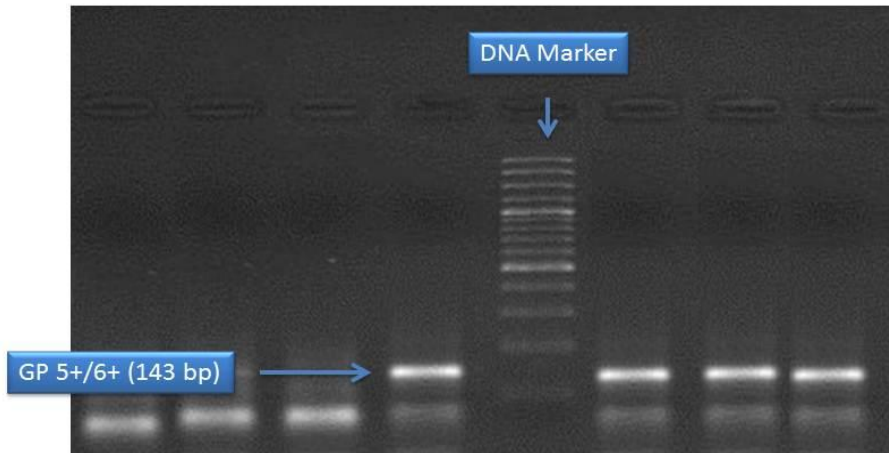


Grafik 1: Çalışmaya dahil edilen CIN tanılı kadınların yaşlara göre dağılımı.

Çalışmada CIN tanılı toplam 114 kadından alınan serviks sürüntü örneğinin 79 (%69.3)'unda HPV genomu pozitif bulunurken, asemptomatik toplam 89 kadının ise 7 (%7.9; 7/89)'sinde HPV genomu pozitif bulundu. Örnekler önce MY09/MY11 (Resim 11) ve GP5+/6+ (Resim 12) primerleri kullanılarak HPV-DNA'nın L1 geni içinden 450 bp ve 143 bp'lik bölgeleri amplifiye edildi.



Resim 11: MYO9/MY11 gen ürünlerinin %2'lik agaroz jelde görüntüsü. DNA marker; 100 bp, MYO9/MY11 (450 bp).

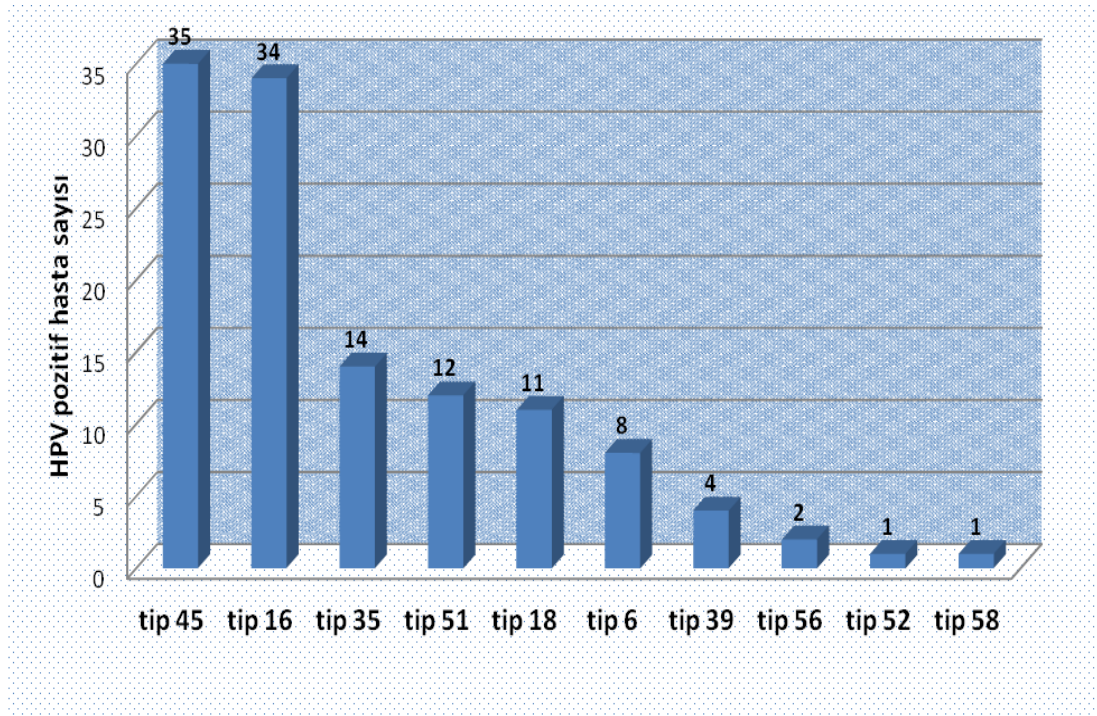


Resim 12: GP5+/GP6+ gen ürünlerinin %2'lik agaroz jelde görüntüsü. DNA marker; 100 bp, GP5+/GP6+ (143 bp).

Asemptomatik 89 kadının 7'sinde pozitif bulunan HPV'lerin genotip dağılımı şöyledi; HPV tip 16 ve 45 3 (%3.4; 3/89)'er kadında ve HPV tip 58 1 (%1.1; 1/89) kadında pozitif bulunmuştur. Asemptomatik kadınların hiçbirinde koenfeksiyon tespit edilmemiştir.

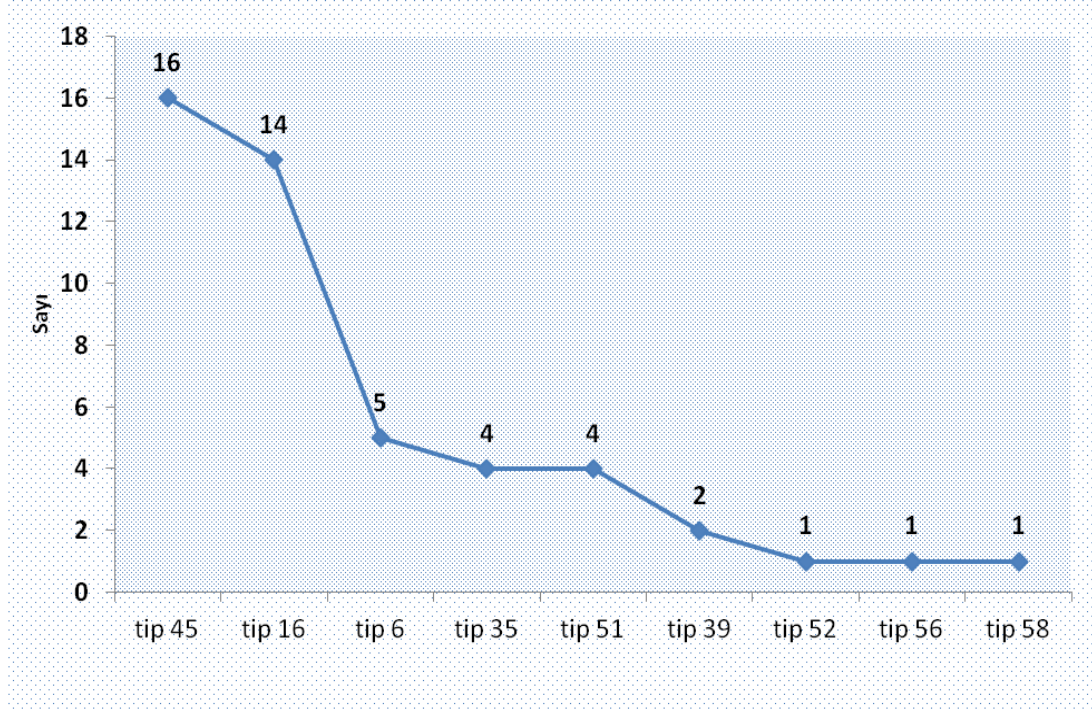
Genital sürüntü örneği alınan CIN tanılı kadınların 35 (%30.7; 35/114)'i HPV genomu açısından negatif olarak tespit edilirken 79 (%69.3; 79/114)'unda en az bir tip HPV varlığı tespit edildi. HPV pozitif olarak saptanan kadınların 57 (%50; 57/114)'sinin, yüksek onkojenik riskli tipler olan HPV tip 16, 18, 31, 33 ve 45'ten biri ya da birden fazlası ile infekte olduğu saptandı.

Çalışmada CIN tanılı kadınlarda en yüksek oranda saptanan HPV genotipinin tip 45 olduğu tespit edildi. Toplam 35 (%30.7; 35/114) kadında HPV tip 45 pozitivitesi saptandı. Bunun yanında CIN tanılı kadınların 8 (%7; 8/114)'inde HPV tip 6, 34 (%29.8; 34/114)'ünde HPV tip 16, 14 (%12.3; 13/114)'ünde HPV tip 35, 11 (%9.6; 11/114)'inde HPV tip 18, 4 (%3.5; 4/114)'ünde HPV tip 39, 12 (%10.5; 12/114)'sinde HPV tip 51, 2 (%1.7; 2/114)'sinde HPV tip 56, 1 (%0.8; 1/114)'inde HPV tip 52 tespit edilirken yine 1 (%0.8; 1/114)'inde HPV tip 58 saptanmıştır (Grafik 2).

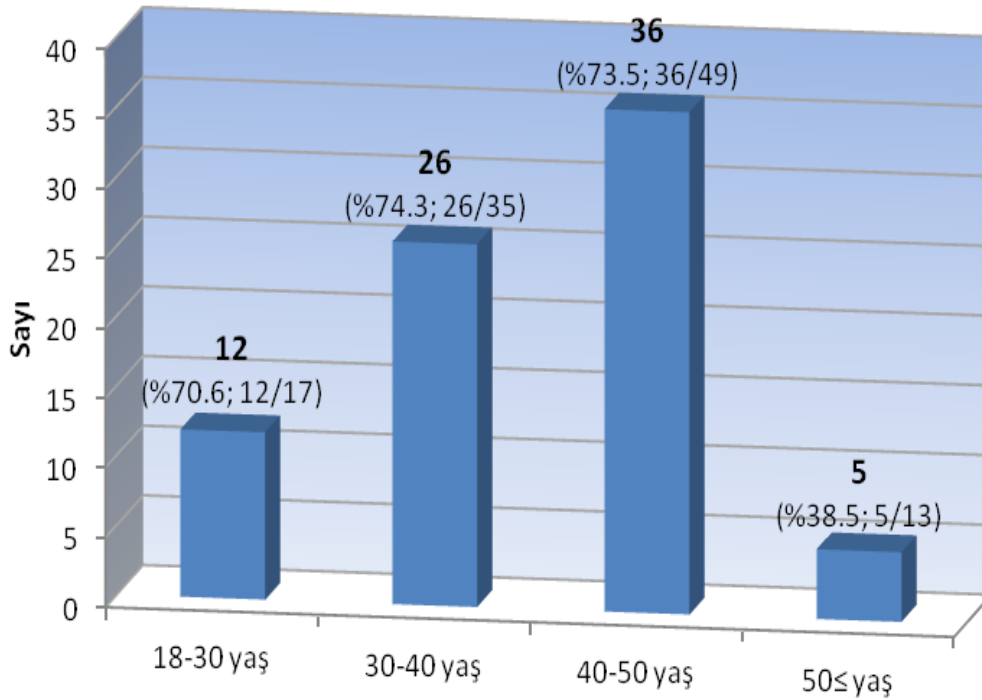


Grafik 2: Çalışmaya alınan CIN tanılı kadınlarda HPV tip dağılımı.

Çalışmada CIN tanı 31 (%27.2; 31/114) kadında 1'den fazla HPV tipiyle koenfeksiyon tespit edilirken 48 (%42.1; 48/114) hastada ise HPV tiplerinden sadece biriyle enfeksiyon varlığı tespit edildi (Grafik 3).

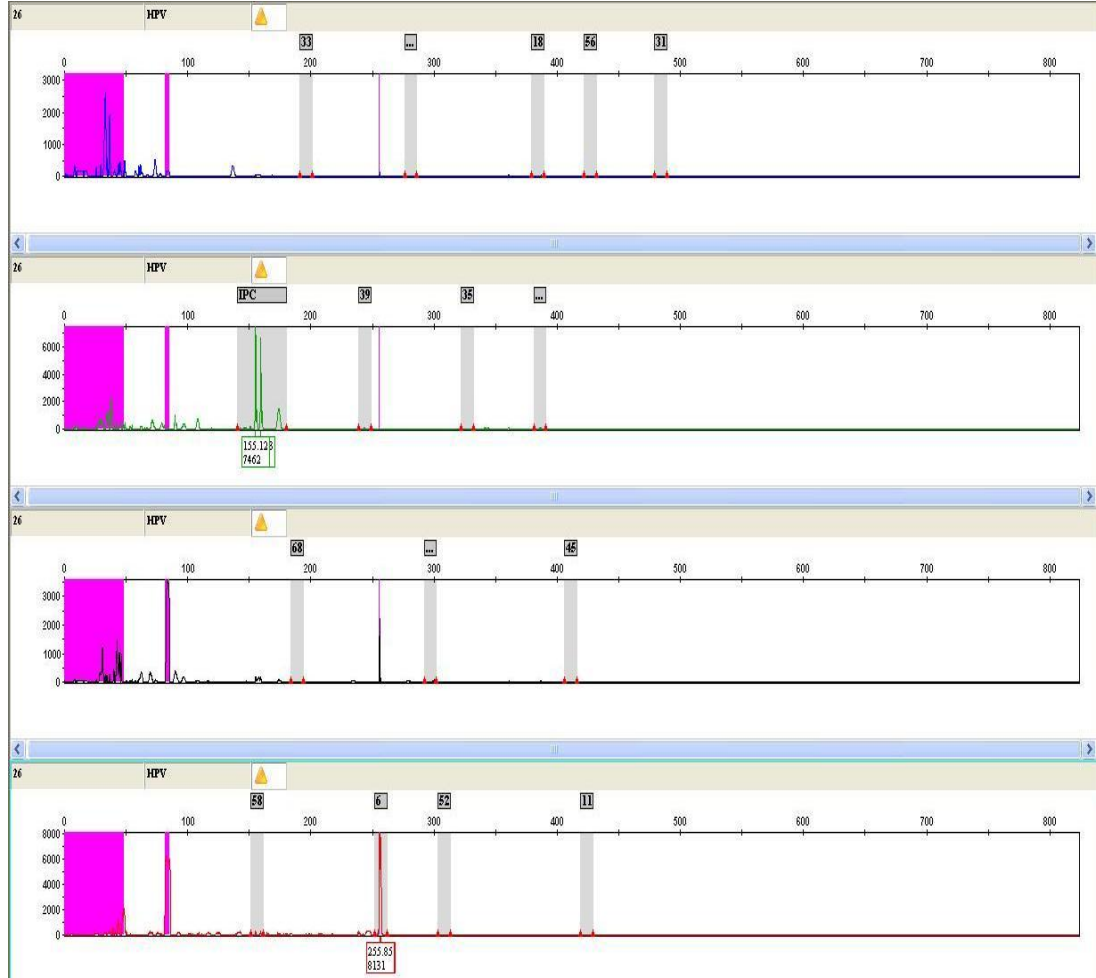


Grafik 3: Tek tip enfekte CIN tanı kadınların sayısal dağılımı.



Grafik 4: HPV ile enfekte CIN tanı kadınların yaş aralığına göre dağılımı.

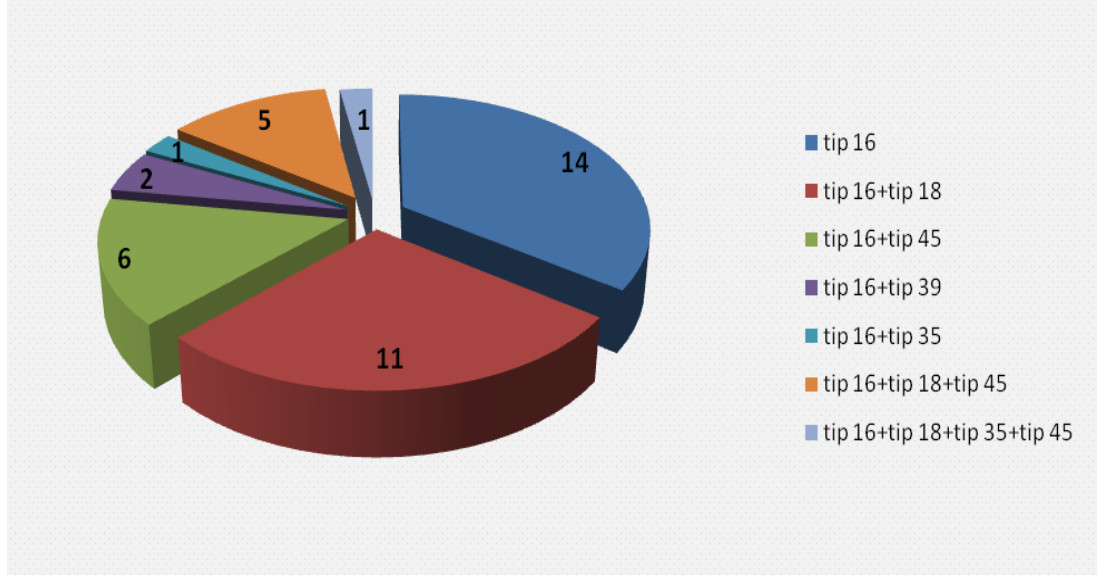
Çalışmaya alınan CIN tanılı kadınların 8 (%7; 8/114)'i HPV tip 6 ile infekteydi (Resim 13). HPV tip 6 ile infekte olan kadınların 3 (%37.5; 3/8)'ünde diğer tiplerle koenfeksiyon tespit edildi. Bu 3 kadından 1 (%33.3; 1/3)'inde HPV tip 6 ile HPV tip 35, 2 (%66.7; 2/3)'sinde ise HPV tip 51 koenfeksiyonu tespit edildi.



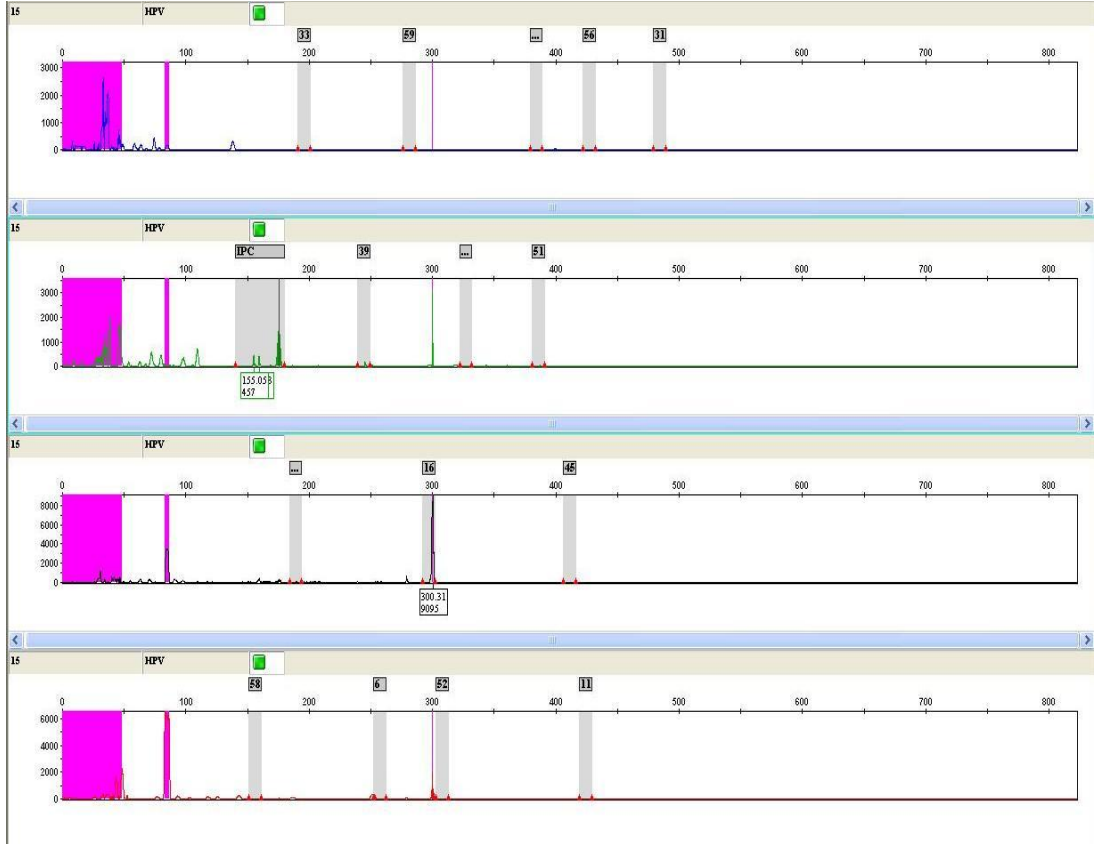
Resim 13: HPV tip 6 pozitif örnek.

Çalışmada, CIN tanılı kadınlarda, yüksek onkojenik riskli HPV tiplerinden tip 16 toplam 34 (%29.8; 34/114) kadında pozitif olarak bulundu (Resim 14). Bu kadınların 14 (%41.1; 14/34)'ünde sadece HPV tip 16 enfeksiyonu tespit edilirken 20 (%58.8; 20/34)'sinde HPV tip 16 yanında diğer HPV tiplerinin koenfeksiyonları da saptandı. HPV tip 16 ile infekte CIN tanılı kadınların 11 (%32.3; 11/34)'inde aynı zamanda HPV tip 18 enfeksiyonu tespit edilirken, 6 (%17.6; 6/34) kadında HPV tip 45, 2 (%5.9; 2/34) kadında HPV tip 39 ve 1 (%2.9; 1/34) kadında ise HPV tip 35 enfeksiyonu saptandı. HPV tip 16 tespit edilen CIN tanılı kadınların 5 (%14.7;

5/34)'inde HPV tip 18 ve 45 ve 1 (%2.9; 1/34)'inde ise HPV tip 16'nın yanında HPV tip 18, 35, 45 varlığı saptandı (Grafik 5).

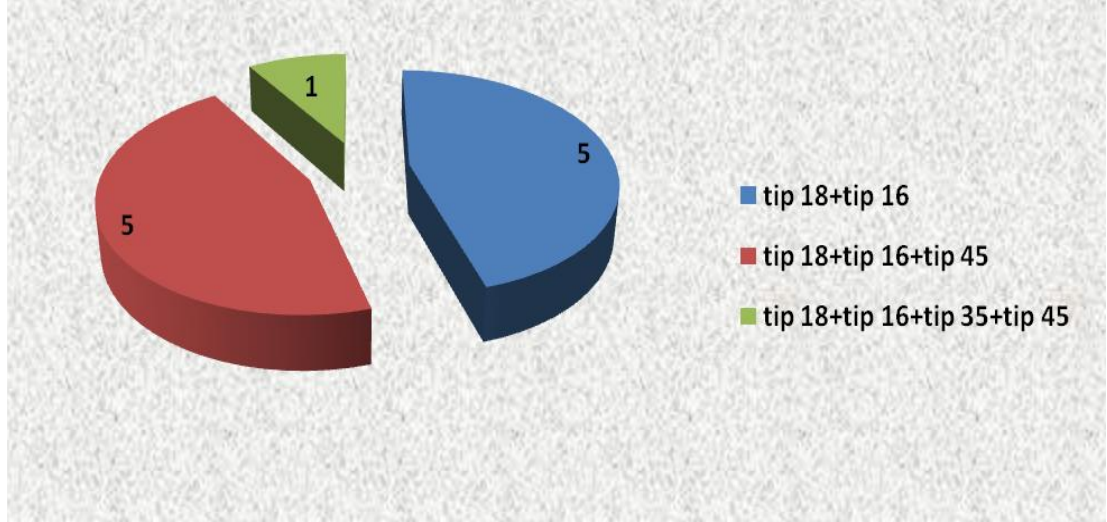


Grafik 5: HPV tip 16 ile infekte 34 CIN tanı kadında diğer HPV tipleriyle koenfeksiyon dağılımı.



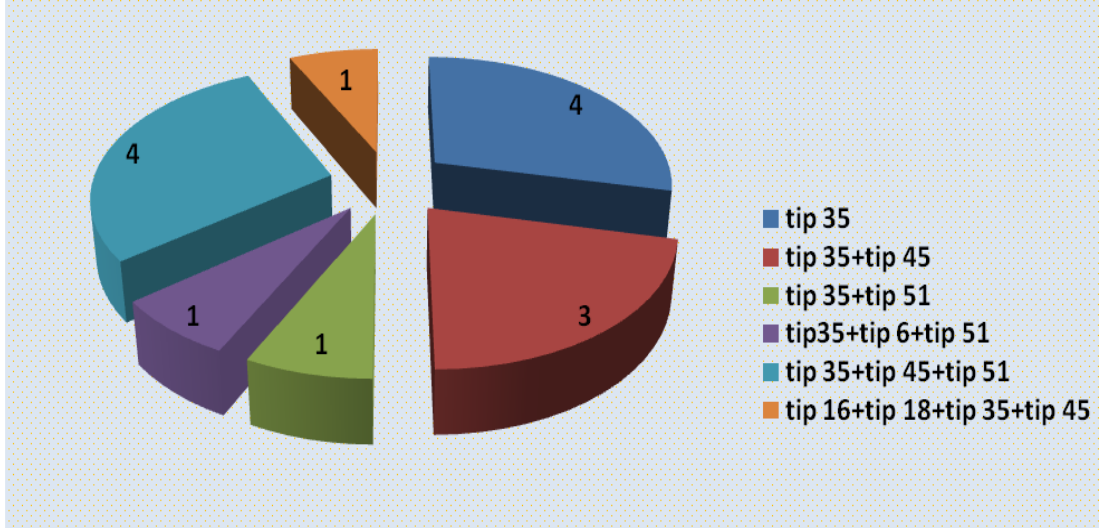
Resim 14: HPV tip 16 pozitif olan örnekte DNA pik görüntüsü.

Çalışmada HPV tip 18 tespit edilen CIN tanılı kadınların tamamında diğer HPV tipleriyle koenfeksiyon saptandı yani hiçbir hastada yalnız olarak HPV tip 18 enfeksiyonu tespit edilmedi. HPV tip 18 ile enfekte CIN tanılı toplam 11 (%9.6; 11/114) hastanın 5 (%45.4; 5/11)'inin HPV tip 16 ve 45 ile birlikte koenfeksiyon meydana getirdiği, 5 (%45.4; 5/11)'inin HPV tip 16 ile ve 1 (%9; 1/11)'inin ise HPV tip 16, 35 ve 45 ile enfekte olduğu saptandı (Grafik 6).

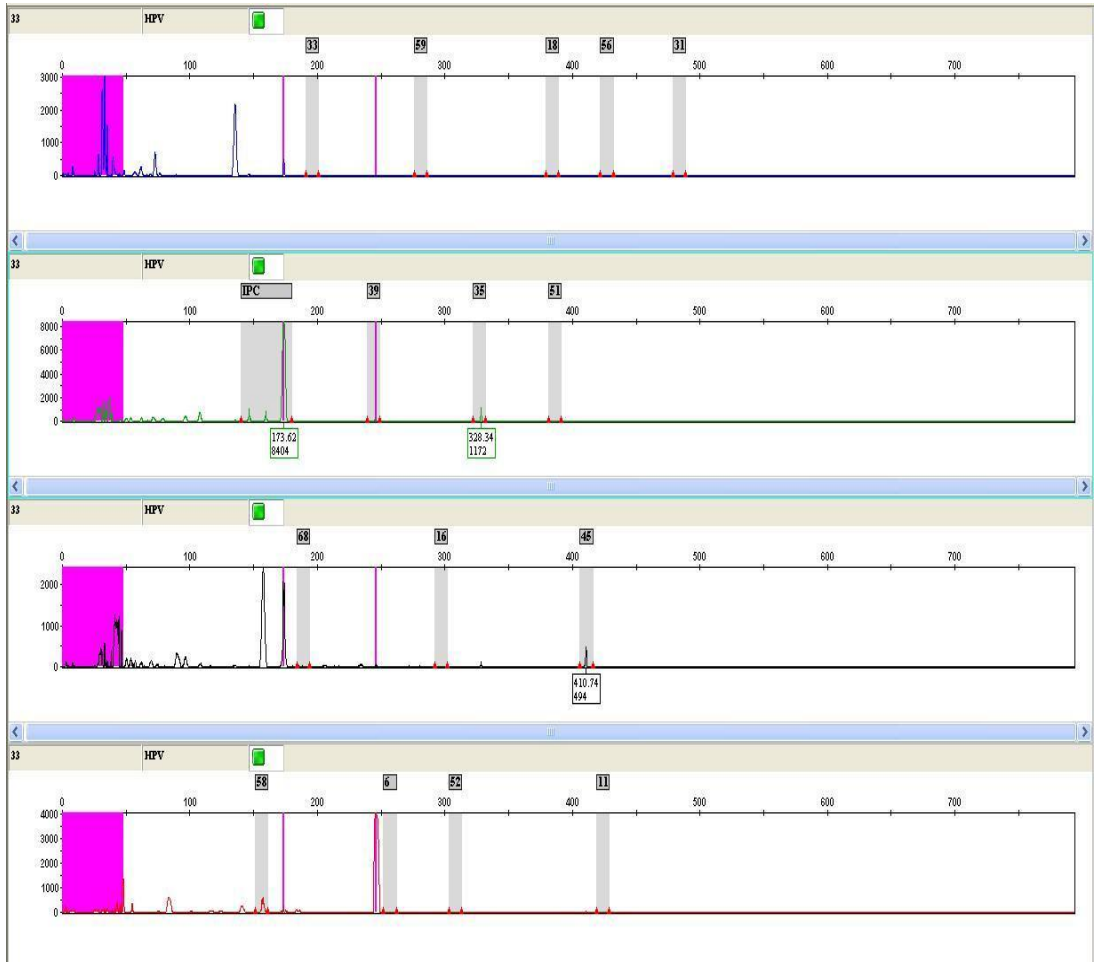


Grafik 6: HPV tip 18 ile enfekte CIN tanılı 11 kadında diğer HPV tipleriyle koenfeksiyon dağılımı.

Çalışmada CIN tanılı kadınların sadece 4 (%28.6; 4/14)'ünde yalnız HPV tip 35 tespit edilirken, toplam 10 (%71.4; 10/14) hastada HPV tip 35 ile diğer genotiplerle koenfeksiyon varlığı görüldü. Bu 10 hastanın 4 (%28.6; 4/14)'ünde HPV tip 35'in yanında HPV tip 45 ve 51 enfeksiyonu tespit edilirken, 3 (%21.4; 3/14) hastada HPV tip 35 ve 45 (Resim 15), 1 (%7.1; 1/14) hastada HPV tip 35 ve 51, 1 (%7.1; 1/14)'inde HPV tip 6, 35, 51 ve 1 (%7.1; 1/14)'inde de HPV tip 16, 18, 35, 45 koenfeksiyonu vardı (Grafik 7).

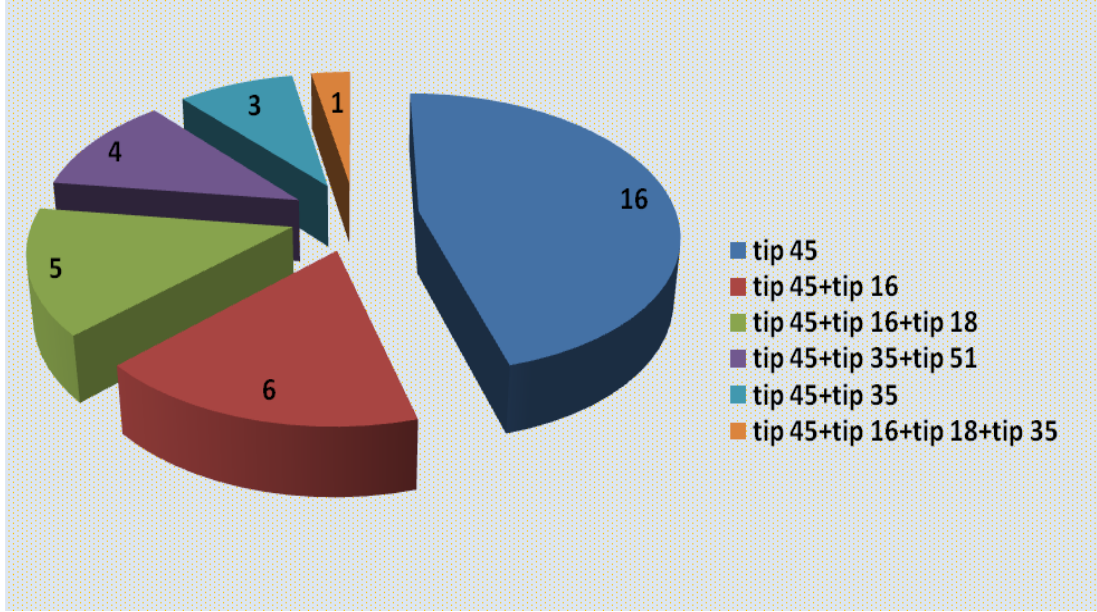


Grafik 7: HPV tip 35 ile infekte CIN tanılı 14 kadında diğer HPV tipleriyle koenfeksiyon dağılımı.



Resim 15: HPV tip 35 ve 45 pozitif olan örnekte DNA pik görüntüleri.

CIN tanılı toplam 35 (%30.7; 35/114) kadında HPV tip 45 infeksiyonu tespit edilirken bunların 16 (%45.7; 16/35)'sında sadece HPV tip 45 infeksiyonu saptandı. HPV tip 45 infeksiyonu tespit edilen CIN tanılı kadınların 6 (%17.1; 6/35)'sında HPV tip 16, 5 (%14.3; 5/35)'inde HPV tip 16 ve 18, 4 (%11.4; 4/35)'ünde HPV tip 35 ve 51, 3 (%8.6; 3/35)'ünde HPV tip 35 ve 1 (%2.8; 1/35)'inde de HPV tip 16, 18, 35 koenfeksiyonu olduğu bulundu (Grafik 8).



Grafik 8: HPV tip 45 ile infekte CIN tanılı 35 kadında diğer HPV tipleriyle koenfeksiyon dağılımı.

Çalışmada CIN tanılı 4 (%3.5; 4/114) kadında HPV tip 39 tespit edilirken bu kadınların 2 (%50; 2/4)'sinde HPV tip 39 ve HPV tip 16 saptandı.

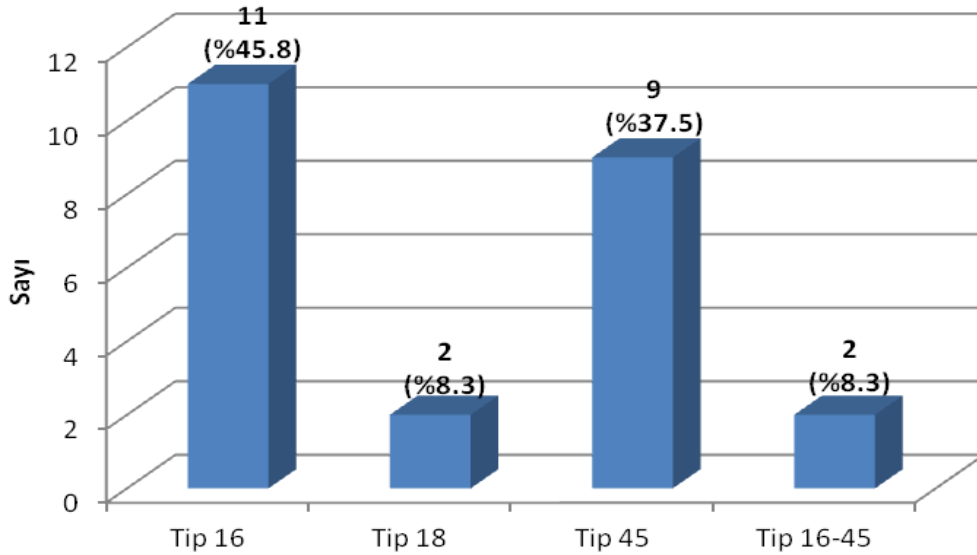
CIN tanılı kadınların 12 (%10.5; 12/114)'sinde HPV tip 51 infeksiyonu tespit edilirken bunların 8 (%66.7; 8/12)'inde diğer HPV tipleriyle koenfeksiyon varlığı görüldü. Bu kadınların 4 (%33.3; 4/12)'ünde HPV tip 51'in yanında HPV tip 35 ve 45, 1 (%8.3; 1/12)'inde HPV tip 35, 2 (%16.7; 2/12)'sinde HPV tip 6, 1 (%8.3; 1/12)'inde HPV tip 6 ve 35 koenfeksiyonu tespit edildi.

Çalışmaya dahil olan CIN tanılı kadınların 2 (%1.7; 2/114)'sinde HPV tip 56 saptanırken bunlardan 1 (%50; 1/2)'inin HPV tip 16 ile koenfekte olduğu görüldü. Ayrıca CIN tanılı kadınların 1 (%0.8; 1/114)'inde sadece HPV tip 52 ve 1 (%0.8; 1/114)'inde de sadece HPV tip 58 bulundu.

Yüksek onkojenik riskli HPV tipleriyle infekte olduğu bulunan toplam 57 (57/114) CIN tanılı kadında E6 ve E7 gen ekspresyonu oranı şu şekilde belirlendi: Elli yedi kadının 24 (%42.1; 24/57)'ünde E6/E7 gen ekspresyonu tespit edilirken, 33 (%57.9; 33/57) kadın E6/E7 yönünden negatif bulundu.

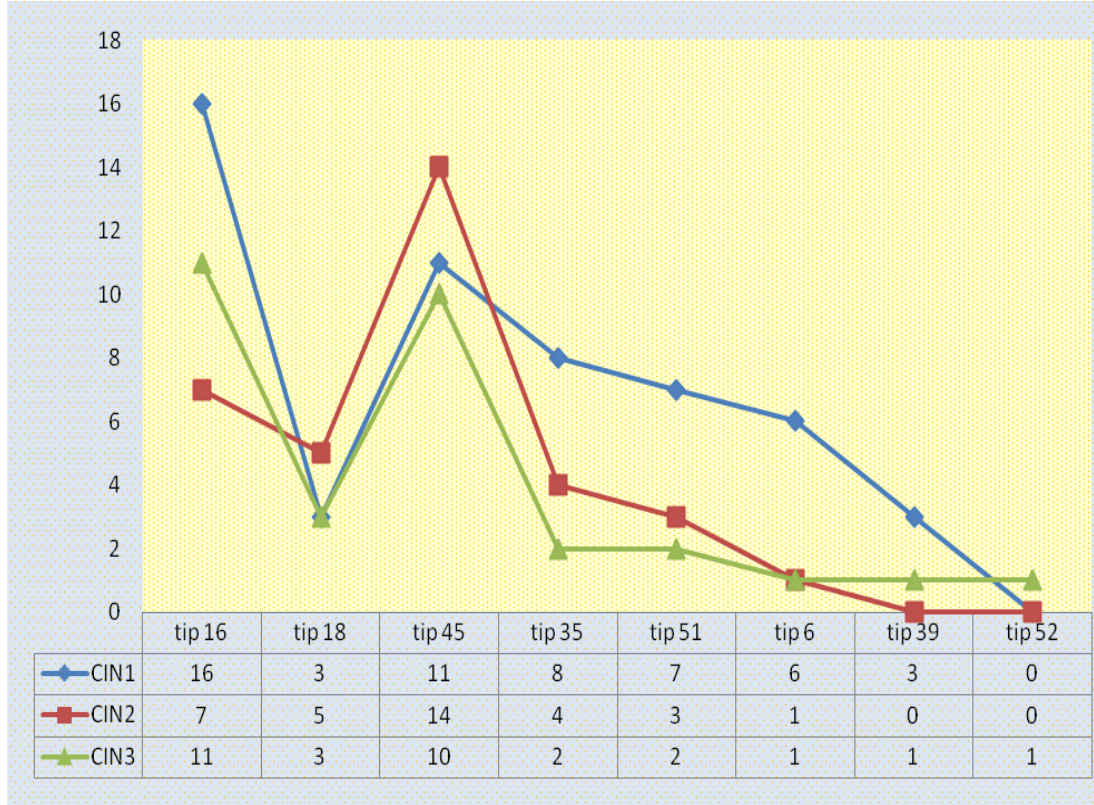
Onkoprotein açısından pozitif olduğu belirlenen 24 CIN tanılı kadından 11 (%45.8; 11/24)'inde yalnız HPV tip 16, 2 (%8.3; 2/24)'sinde HPV tip 16 ve 45 pozitif olarak saptanırken, 9 (%37.5; 9/24) kadında HPV tip 45, 2 (%8.3; 2/24) kadında ise HPV tip 18'e bağlı onkojenik aktivite tespit edilmiştir (Grafik 9).

Çalışmada yüksek riskli grupta yer alan HPV tiplerinden HPV tip 31 ve 33 pozitivitesi saptanmamıştır.



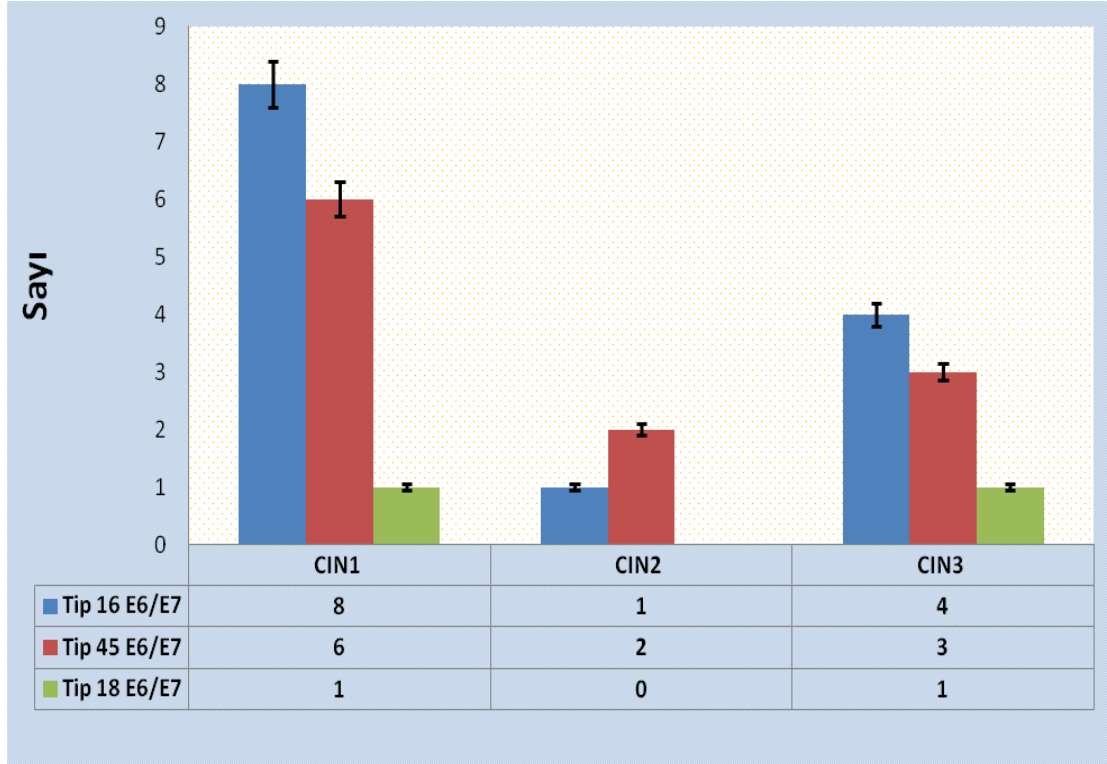
Grafik 9: CIN tanılı kadınlarda E6/E7 gen ekspresyonunun (viral onkoproteinlerin) HPV tiplerine göre dağılımı.

Çalışmada CIN1, CIN2 ve CIN3 tanılı kadınlardaki HPV genotip dağılımına bakıldığında CIN1 tanılı kadınlarda en yüksek oranda HPV tip 16 (%23.2), HPV tip 45 (%15.9) ve HPV tip 51 (%10.1) tespit edilmiştir. CIN2 tanılı 26 hastada ise en yüksek oranda saptanan genotiplerin sırasıyla, HPV tip 45 (%53.8), tip 16 (%26.9) ve HPV tip 18 (%19.2) olduğu bulunmuştur. CIN3 tanılı kadınlar arasında en sık rastlanılan HPV tipinin ise CIN1 tanılı kadınlarda olduğu gibi HPV tip 16 (%57.9), HPV tip 45 (%52.6) ve HPV tip 18 olduğu tespit edilmiştir (Grafik 10).



Grafik 10: CIN evrelerine göre HPV genotiplerinin dağılımı.

Çalışmada CIN1, CIN2 ve CIN3 tanılı kadınlardaki yüksek onkojenik riskli HPV genotiplerinin E6/E7 gen ekspresyonu oranları incelendiğinde CIN1 tanılı kadınlarda en yüksek oranda onkojenik aktivite HPV tip 16 (%11.6; 8/69) ile infekte kadınlarda tespit edilirken bunu HPV tip 45 (%8.7; 6/69) ve HPV tip 18 (%1.4; 1/69) izlemiştir. CIN2 tanılı kadınlarda ise en yüksek onkojenik aktivite HPV tip 45 (%7.7; 2/26) pozitif kadınlarda elde edilirken bunu HPV tip 16 (%3.8; 1/26) izlemiştir. CIN2 tanılı HPV tip 18 ile infekte kadınlarda onkojenik aktiviteye rastlanmamıştır. CIN3 tanılı kadınlarda ise E6/E7 gen ekspresyonu CIN1 tanılı kadınlarda olduğu gibi en çok HPV tip 16 (%21.0; 4/19), HPV tip 45 (%15.8; 3/19) ve HPV tip 18 (%5.3; 1/19) ile infekte hastalarda tespit edildi (Grafik 11).



Grafik 11: CIN evrelerine göre E6/E7 onkoprotein varlığının dağılımı.

5.TARTIŞMA

Cinsel temasla bulaşan HPV infeksiyonları, uterin serviks ve eksternal genital bölgede benign papilloma ya da intraepitelyal neoplazi gelişmesine yol açan önemli infeksiyonlardır. Literatürde HPV infeksiyonlarıyla servikal SCC'nun birbirleriyle yakın ilişkili oldukları bildirilmiştir (261). Serviksin invaziv SCC'ü genellikle bir non-invaziv skuamoz lezyondan kaynaklanmaktadır. Uterin serviks karsinomu için major epidemiyolojik faktörün HPV infeksiyonu olduğu düşünülmektedir. Fakat genetik değişiklikler de bu lezyonun ortaya çıkması ve oluşması için önemli diğer faktörler arasında sayılabilir. Günümüze kadar yapılmış servikal HPV infeksiyonu prevalansıya ilgili çalışmaların çoğu genç ve orta yaş kadınları kapsamaktadır. Bu tür çalışmaların az bir bölümü ise ancak yaşlı kadınlar arasında yapılmıştır. Bu çalışmalarda HPV infeksiyonu prevalansının yaşlılarda genç kadınlardan daha düşük olduğu tespit edilmiştir (262,263,264). Takubo ve ark. 2005 yılında yaptıkları bir çalışmada HPV ve serviks kanseri ilişkisi PCR yöntemiyle araştırılmış, yaşları 60-105 arasında değişen 335 kadından servikal sürüntü örnekleri alınmış ve bu kadınlarda HPV pozitifliğinin skuamoz intraepitelyal lezyonlarla (SIL) sıkı ilişkisi gösterilmiştir. Normal servikal sitolojili genç kadınlardaki HPV infeksiyonu ileriki yaşlarda devam etme eğiliminde değildir. Bu çalışmada biyopsi yapılan kadınların %6'sında SIL, %5.4'ünde LSIL ve %0.6'sında da HSIL olduğu bildirilmiştir. Normal servikal sitolojili hiçbir kadında HPV DNA'sı saptanmamış fakat SIL tespit edilen kadınların %45'inde HPV DNA pozitifliği bulunmuştur (265).

Servikal kanser dünyada kadınları etkileyen ikinci en sık ve önemli kanserdir. Günümüzdeki tarama programları bu hastalığın morbidite ve mortalitesini önemli ölçüde azaltmış olsa da her yıl yaklaşık binlerce yeni vakanın tanısının konduğu bildirilmektedir. Epidemiyolojik ve moleküler çalışmalar HPV tiplerinin servikal kanserlerin en önemli sebepleri arasında olduğunu göstermiştir (266). HPV'lerin bu güne kadar; biyolojik yapı, onkojenik potansiyel ve filogenetik özelliklerine göre onlarca subtipi tanımlanmıştır. Genital infeksiyon yapan papillomavirusların çoğu alfa subgenusunda sınıflandırılmakta olup sayılarının 40'tan fazla olduğu bilinmektedir (267). Moleküler ve epidemiyolojik tabanlı çalışmalara göre genital HPV tipleri düşük ve yüksek onkojenik riskli gruplar olarak sınıflandırılmışlardır. Yüksek onkojenik riskli tipler arasında HPV tip 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56,

58, 59 ve 66 sayılabilirken HPV tip 6 ve 11'in genellikle kondiloma aküminata gibi benign lezyonlarda tespit edildiği bildirilmiştir (266). Yüksek onkojenik riskli HPV tipleriyle infekte kadınların, servikal kanser gelişimi olasılığının HPV ile infekte olmayan ya da düşük onkojenik riskli HPV tipleriyle infekte olan kadınlara göre daha yüksek olduğu bildirilmektedir (57). Dünyada kadınlarda genital infeksiyonlardan sorumlu en yaygın HPV genotipinin tip 16 olduğu bildirilmiştir. HPV tip 16'dan sonra en sık rastlanılan HPV tiplerinin ise HPV tip 18, 31, 33 ve 45 olduğu bildirilmiştir. Bundan farklı olarak Asya'da ise HPV tip 16'dan sonra en yaygın HPV genotiplerinin HPV tip 58 ve 52 olduğu tespit edilmiştir (268). Bunun yanında HPV pozitif vakaların %10-20'sinde multipl genotiplerle HPV infeksiyonu gelişebildiği de bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda Meijer ve ark.'larının yaptığı çalışmadan farklı olarak, istatistiksel olarak aradaki farkın anlamlı olmamasına rağmen, bölgemizde en sık HPV tip 45 (%30.7; 35/114), ikinci sırada ise HPV tip 16'nın izole edildiği saptanmıştır (p>0.05). Ayrıca çalışmamızda Meijer ve ark.'larının yaptığı çalışma ile uyumlu olarak kadınların %27.2 (31/114)'inde çoklu (multipl) genotip ile infekte HPV infeksiyonu tespit ettik. Bu multipl HPV genotipiyle infekte kadınların %17.5 (20/114)'inin 2 HPV tipiyle, %8.8 (10/114)'inin 3 HPV tipiyle ve %0.9 (1/114)'unun da 4 HPV tipiyle infekte olduğunu tespit ettik.

Zandi ve ark.'larının 2010 yılında İran'da jinekoloji polikliniğine rutin PAP smear testi için başvuran 200 kadın arasında yaptıkları bir çalışmada serviks sürüntü örnekleri alınarak HPV genotipleri açısından değerlendirilmiş ve çalışmada örneklerin %5.5'inde HPV DNA pozitifliği tespit edilirken %94.5'inin de negatif olduğu bulunmuştur. PCR testiyle HPV DNA pozitif saptanan örneklerin %2'sinin aynı zamanda PAP smear testiyle de pozitif olduğu saptanmıştır. Örneklerin 5'i PAP smear testiyle negatif olarak bulunurken, PCR testiyle aynı örneklerin HPV genomu açısından pozitif bulunduğu bildirilmiştir. HPV DNA pozitif olarak bulunan bu 11 hastanın 7'sinde HPV tip 16, 3'ünde HPV tip 18, 1'inde de HPV tip 53 tespit edilmiştir. Literatürde birçok çalışmada PAP smear testinin spesifite (özellik) ve sensitivite (duyarlılık) sorunu bildirildiğinden biz çalışmamızı PCR tabanlı moleküler yöntemler kullanarak gerçekleştirdik.

HPV'ler en yaygın olarak cinsel yolla bulaşır ve CIN'nin bir etkenidirler. HPV infeksiyonunun taramasında en sık kullanılan yöntemlerden biri PAP smear

yöntemidir. Hâlbuki PAP smear yöntemi CIN için bir ön tarama niteliğinde olup bu yöntemle yüksek oranda yanlış negatif ve yanlış pozitif sonuçlar verilebilmektedir (269). Bu testin spesifite ve sensitivite probleminden dolayı servikal neoplazik hastaların değerlendirilmesi için alternatif yöntemlere ihtiyaç duyulmuştur. HPV DNA'nın tespit edildiği moleküler tabanlı testlerin, CIN hastalığının tanısında ve progresyonunun takibinde en duyarlı yöntemler olduğu bildirilmektedir (270). Bu nedenle çalışmamızda CIN tanılı kadınların tanısı ve genotiplendirilmesinde PCR yöntemi ve PCR tabanlı fragment analiz yöntemleri kullanılmıştır.

Servikal kanser üzerine yapılan epidemiyolojik çalışmalar HPV'nin önemi hakkında hiçbir şüphenin olmadığını göstermektedir. HPV enfeksiyonunun tespiti ve tedavisi, servikal kanserin tespiti ve tedavisinde önemli bir adımdır. HPV'nin tanısında en duyarlı yöntemlerden biri HPV DNA'sının tespitine dayanır. Çünkü koilositoz gibi sitolojideki morfolojik değişimler onkojenik HPV enfeksiyonu için spesifik değildir. HPV DNA'nın tespiti özellikle latent enfeksiyonlarda, kanser ve prekürsör lezyonların tespitinde oldukça önemlidir. Servikal displazi ve kanser gelişimi için en önemli risk faktörlerinden birinin HPV olduğu bildirilmektedir. Servikal kanserli hastaların %99.7'sinde HPV genomu varlığı saptanmıştır. Servikal kanser gelişmesini önlemede en önemli yollardan biri HPV'yi tespit ve tedavi etmektir (264). Ülkemizde 1996 yılında yapılan bir çalışmada CIN1, CIN2, CIN3 ve invaziv karsinom örneklerinde HPV tip 16 pozitivitesi sırasıyla %12.5, %19.4, %46.3, %83.3 olarak bildirilmiştir. Biz bu çalışmada ise intraepitelyal neoplazili hastalarda HPV tip 16 varlığını CIN1, CIN2 ve CIN3 için sırasıyla %14, %6 ve %9.6 olarak tespit ettik. HPV tip 16'nın yanında çalışmamızda HPV tip 18; %9.6 ve HPV tip 45 varlığı ise %30.7 gibi yüksek oranlarda tespit edilen diğer HPV genotipleri olarak saptanmıştır. Yine ülkemizde yapılan başka bir çalışmada da Onan ve ark.'ları 2005 yılında CIN tanılı hastalarda HPV tip 16 sıklığını CIN1 tanılı kadınlarda; %4.2, CIN2 tanılı kadınlarda; % 14.8, CIN3 tanılı kadınlarda ise %45 olarak tespit etmişlerdir. Bu çalışmada bizim çalışmamızla uyumlu olarak CIN3 tanılı hastalarda HPV pozitivitesi CIN1 ve CIN2 tanılı hastalardan daha yüksek oranda bulunmuştur.

Yurdumuzda yapılan çalışmalar arasında bir diğer çalışma Dinç ve ark.'ları tarafından 2009 yılında yapılmış ve kolposkopik muayenesi pozitif olan hastalarda

real time PCR yöntemiyle HPV tip 16 prevalansı %18 bulunmuştur. Kolposkopik muayenesi negatif olan hastaların ise %5.7'sinin HPV genomu açısından pozitif olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada kolposkopi pozitif ve negatif olan hastaların HPV tip 16 ile total HPV pozitivitesi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olduğu tespit edilmiştir. Dinç ve ark.'larının çalışmalarında HPV genomunun tespit edilmesinin ve tiplendirmesinin servikal kanser taramasında ve önlenmesinde oldukça önemli ve yardımcı bir bulgu olabileceği bildirilmiştir.

Son zamanlarda bu konuda dünyanın çeşitli ülkelerinde çok çeşitli çalışmalar yapıldığını görmek mümkündür. Freitas ve ark.'larının 2007 yılında Brezilya'da yaptıkları bir çalışmada 174 kadından servikal sürüntü örnekleri histopatolojik ve moleküler yöntemlerle değerlendirilmek için alınmıştır. Çalışmada MY09 ve MY11 primerleriyle HPV tip 16 ve 18 tip spesifik primerleri kullanılarak HPV enfeksiyonunun varlığı, HPV genomu açısından PCR yöntemiyle analiz edilerek, araştırılmıştır. Bu 174 kadının %20.7'sinde histopatolojik analizlere göre intraepitelyal ve/veya invaziv lezyon saptanmış. İntraepitelyal ve/veya invaziv lezyonları olan kadınların %94.4'ünde HPV enfeksiyonu tespit edilmiştir. HPV tip 16 LSIL'li hastaların %20'sinde pozitif bulunurken, HPV tip 18 için bu oranın %6.7 olduğu tespit edilmiştir. Çalışmada 2 hastada ise hem HPV tip 16 hem de tip 18 enfeksiyonu tespit edilmiştir. HSIL'li hastaların ise %50'sinde HPV DNA pozitif bulunmuştur. Bu çalışma bulgularıyla uyumlu olarak bizim yaptığımız çalışmada da CIN1 tanılı hastaların %14'ünde HPV tip 16, %2.6'sında ise HPV tip 18 varlığı saptanmıştır. CIN2 ve/veya CIN3 tanılı hastaların ise %88.9'u HPV genomu açısından pozitif bulunurken, %11.1'inin ise HPV DNA negatif olduğu saptanmıştır. Bu sonuçların Freitas ve ark.'larının çalışma sonuçlarıyla uyumlu olmadığı tespit edilmiştir. Bizim çalışmamızda sitopatoloji açısından Freitas ve ark.'larının çalışmasından farklı olarak pozitif bulunan örneklerin %68.4'ünde HPV pozitifliği saptanmıştır. Daha önce bu konuda yapılan çalışmalar incelendiğinde HPV enfeksiyon oranının lezyonun şiddetiyle doğru orantılı olduğu görülmektedir (61,271). Çalışmamızda da CIN1 tanılı hastalarda HPV oranı %55 olarak saptanırken CIN2 ve/veya CIN3 tanılı hastaların oranının %88.9 olduğu tespit edilmiştir.

Bilindiği gibi HPV'ler servikal kanserlerin en önemli etiyolojik faktörüdür ve HPV genotiplerinden özellikle bazılarının servikal kanser gelişiminde daha önemli

rol oynadığı bildirilmektedir. Dünya genelinde yapılan birçok çalışmada HPV genotiplerinden tip 16, 18, 31, 33 ve 45 servikal kanserle en sık ilişkilendirilen tiplerin başında geldiği bildirilmiştir (196). Servikal kanserin gelişmesinde çeşitli viral antijenlere karşı hümmoral immün yanıtın rol aldığı bilinmektedir. Bu viral antijenlerden L1 major kapsit proteini en önemli hümmoral immün yanıt oluşturan faktördür. HPV dışında diğer viral infeksiyonların tanısında kullanılan tekniklerin çoğu, HPV tanısında, virusun hücre kültüründe üretilmesinin mümkün olmamasından dolayı başarısızlıkla sonuçlanmıştır.

Bilindiği üzere HPV genomu çift zincirli olup, yaklaşık 8000 bp uzunluğundadır. Viral genom üç bölgede ORF (Open Reading Frame)'ler içermekte olup bu bölgeler; erken ekspresyon bölgesi (E), geç bölge (L) ve uzun kontrol bölgesi (LCR)'dir. E bölgesi replikasyonla ilişkili proteinleri (E1) ve viral DNA aktivasyon proteinlerini (E2) kodlar. E1 proteini bir ATP hidrolaz olup HPV replikasyonunda görev alır (272). E2 proteini ise bir DNA bağlayıcı protein olup HPV LCR bölgesini transaktive edebilme yeteneğine sahiptir. E2 ORF, transkripsiyon faktörleri ve E6/E7 onkogen ekspresyonunun internal regülatörleri gibi en az iki proteini kodlamaktadır (273). E2 ORF'de delesyon servikal kanser biyopsilerinde sıklıkla görülebilir ve bu olay transformasyon proseslerini başlatan E6/E7 gen ekspresyon regülasyonunun kaybıyla sonuçlanır (274). E4 diğer erken eksprese edilen proteinlerden olup hücre iskeletine, keratinlerine ve çinkoya bağlanır. Bu proteinlerin virus salınımını arttıran hücre iskeletinin kollapsıyla ilgili olduğu düşünülmektedir. HPV ve hücre transformasyonu ile ilgili çalışmalar son zamanlarda artmıştır. E6/E7 ORF'ler tümörlerde veya tümör hücre kültürlerinde en çok bulunan viral transkriptlerdir. Bir çalışmada bu onkogenlerin HPV ilişkili murin hücrelerinin transformasyonunun indüklenmesi için etkili ve gerekli olduğu gösterilmiştir (275). Başka bir çalışmada ise bu genlerin insan fibroblastlarının ölümsüzleşmesine de katkı sağladığı bildirilmiştir. Hatta E2 geninin primer insan keratinositleri ve yeni doğmuş sıçan böbrek hücrelerinin transformasyonunda rol aldığı da bildirilmiştir (276). Yüksek onkojenik riskli HPV tiplerindeki E6/E7 onkoproteinlerinin p53 ve pRB süpresör proteinlerinin düzenleyici rollerini nötralize ederek hücre siklusunu bozma yetenekleri vardır (277). Çok yakın bir geçmişte HPV tip 16 E7 proteinlerinin, pRB ve E2F promotorlarının etkileşimini inhibe eden siklin A/CDK2

ve pRB ilişkili p107 gibi hücre siklusu progresyonunda önemli olan diğer proteinleri bağladığı gösterilmiştir (278). Bütün bu çalışmalar E7 proteinlerinin transformasyon proseslerinde merkezi bir role sahip olduğunu göstermektedir. Yüksek onkojenik riskli HPV genotiplerindeki E6 proteini bir ubiquitin bağımlı yol üzerinden p53'ün hızla degradasyonunu indükleyebildiği ve *in-vivo* koşullarda p53'ün transkripsiyonel fonksiyonunu interfere edebilme kabiliyetine sahip olduğu gösterilmiştir (279). Kısaca özetlemek gerekirse E6/E7 onkogen proteinler p53 ve pRb gibi inhibisyon proteinleri aracılığıyla negatif büyüme regülasyon proseslerini bozmakta ve sonuçta genetik instabilite sağlamaktadır. Çalışmamızda yüksek onkojenik riskli olarak tespit edilen toplam 57 hastada E6/E7 gen ekspresyonu varlığı 24 hastada pozitif olarak bulunmuştur. Bizim çalışmamızdan farklı olarak bir çalışmada; 181'i HPV tip 16, 18, 31, 33 veya 45 pozitif olan 204 hastadan alınan örneklerin 188 (%92)'inde E6/E7 onkoprotein varlığının tespit edildiği bildirilmiştir (158). Yapılan diğer bir çalışmada ise, bizim çalışmamızla uyumlu olarak, HPV tip 16, 18, 31, 33 veya 45 pozitif olan 80 örneğin %20'sinde E6/E7 onkoprotein varlığının tespit edildiği bildirilmiştir (280).

Çalışmamızda CIN2 ve/veya CIN3 tanılı kadınların yer aldığı grupta bulunan 45 kadından 18 (%40)'inde HPV tip 16 ve bunların da %27.8 (5/18)'inde E6/E7 onkoprotein varlığı saptanırken, CIN1 tanılı kadınların bulunduğu grupta yer alan toplam 16 (%23.2; 16/69) kadında ise HPV tip 16 ve bu kadınların da %50 (8/16)'sinde E6/E7 onkoprotein varlığı tespit edilmiştir. Bunun yanında en yüksek ikinci sırada E6/E7 onkoprotein varlığı HPV tip 45 enfeksiyonlu kadınlarda (%31.4; 11/35) tespit edilmiştir. HPV tip 45'in CIN tanılı kadınlardaki dağılımı yapıldığında ise CIN2 ve/veya CIN3 tanılı toplam 45 kadın arasından 24 (%53.3; 24/45) kadında HPV tip 45 varlığı tespit edilirken, bu HPV tip 45 tespit edilen kadınların %20.8 (5/24)'inde E6/E7 onkoprotein varlığı saptanmıştır. CIN1 tanılı hastaların ise %15.9 (11/69)'unda HPV tip 45 enfeksiyonu ve bu HPV tip 45 pozitif olarak saptanan hastaların ise %54.5 (6/11)'inde E6/E7 onkoprotein varlığı tespit edilmiştir. Ayrıca çalışmamızda karsinogenezle yüksek ölçüde ilişkili olduğu bilinen HPV tip 16, 18, 31, 33 ve 45 genotiplerinden sadece HPV tip 16, 18 ve 45 tiplerine onkoprotein varlığına rastlanmıştır. Bu üç genotip arasında onkojenik aktivitenin en düşük oranda tespit edildiği HPV genotipinin tip 18 olduğu saptanmıştır. HPV tip 18 ile infekte

kadınların sadece 2 (%18.2; 2/11)'sinde E6/E7 mRNA gen ekspresyonuna (E6/E7 onkoprotein varlığı) rastlanılmıştır.

Yurdumuzda yapılan çalışmalardan 2010 yılında Adana'da servikal kanser ve prekanseröz lezyonları olan kadınlarda HPV genotiplerinin prevalansının saptanması amacıyla yapılan bir çalışmada HPV prevalansının skuamoz hücreli servikal kanser tanılı 27 kadında %92.5, CIN2 ve/veya CIN3 tanılı 16 kadında %81.2, CIN1 tanılı 18 kadında %66.6 olarak bulunmuştur. Servikal kanser vakalarında en yaygın tipin HPV tip 16 (%66.6) olduğu bunu %11.1'lik oranla HPV tip 18 ve %3.7'lik oranla ise HPV tip 31, 58, 59 ve 68'in takip ettiği bildirilmiştir. CIN2 ve/veya CIN3 tanılı kadınlarda en yaygın tipin ise %12.5'lik oranla HPV tip 18 olduğu bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda ise CIN1 tanılı kadınlarda en sık HPV tip 16 (%23.2), CIN2 ve/veya CIN3 tanılı kadınlarda ise HPV tip 45 (%53.3) tespit edilmiştir. Ayrıca CIN1 tanılı kadınlardan izole edilen yüksek riskli HPV tiplerinde E6/E7 gen ekspresyonu varlığı %20.3 (14/69) olarak tespit edilirken, CIN2 ve/veya CIN3 tanılı kadınlarda bu oran %22.2 (10/45) olarak bulunmuştur.

Servikal kansere sebep olan HPV genotiplerinin dünyadaki dağılımı ülkeden ülkeye hatta bölgeden bölgeye değişebilmektedir. HPV genotip dağılımının bölgemizde ve ülkemizde belirlenmesi HPV infeksiyonundan korunmada kullanılan aşılardan etkinliği hakkında da doğru bilgi verecektir.

HPV cinsel temasla en sık bulaşan hastalıklar arasında yer almaktadır. Her yıl yaklaşık 5.5 milyon yeni vakada genital HPV infeksiyonu olduğu bildirilmektedir. HPV infeksiyonunun hem servikal kanserde hem de preinvaziv servikal neoplazilerdeki rolü iyi bilinmektedir. Hemen hemen servikal preinvaziv neoplazi ve invaziv skuamoz hücreli servikal kanserlerin tamamında HPV ilişkisi ortaya konmuştur. Servikal karsinomun dünyada kadınlar arasında en yaygın ikinci malign hastalık olduğu bildirilmektedir. Prevalans çalışmaları incelendiğinde ise servikal kanserlerin %80'inden fazlasının az gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde görüldüğü bildirilmektedir (281). Ülkemizde Sağlık Bakanlığı'nın verilerine dayanılarak elde edilen bilgiler, her yıl yaklaşık 1500 yeni servikal kanser vakasının geliştiğini ve bu servikal kanser hastalarının da yarısının kaybedildiğini göstermektedir.

Yurdumuzda HPV insidansının araştırıldığı çalışma sayısı oldukça sınırlıdır. Ülkemizde kısıtlı sayıda yapılan çalışmalarda HPV prevalansının düşük riskli kadınlarda %2-7, yüksek riskli kadınlarda ise %80'lere kadar çıktığı bildirilmiştir (282,283).

HPV infeksiyonlarından korunmak için FDA onaylı, 2006 yılında lisans almış HPV aşuları geliştirilmiştir. Bu aşıardan bivalan olanı HPV tip 16 ve 18 genotiplerini, kuadrivalan olan ise HPV tip 6, 11, 16 ve 18 genotiplerini içermektedir. Korunmada aşı içeriğinin yaygın olan tiplerle uyumlu olması mutlak gereklilik arz etmektedir. Çalışmamızda bivalan ve kuadrivalan aşıarda bulunmayan HPV tip 45'in bölgemizde en yüksek insidanda bulunduğu tespit edilmiştir. Bunun yanında aşı içeriğiyle uyumlu olarak HPV tip 6 kadınların %7'sinde, HPV tip 16 kadınların %29.8'inde, HPV tip 18 kadınların %9.6'sında saptanırken, aşı içeriğinde yer alan HPV tip 11 infeksiyonuna çalışmamızda rastlanılmamıştır. Yani ülkemizde korunma amacıyla kullanılan aşı içeriğiyle uyumlu tiplerin prevalansının %46.4 olduğu tespit edilirken, HPV infeksiyonu tespit edilen kadınların %53.6'sının her iki aşı içeriğinde bulunmayan farklı HPV genotipleriyle infekte olduğu saptanmıştır.

Ülkemizde 2007 yılında İstanbul'da yapılan prekanseröz servikal lezyonlu hastalarda HPV prevalansının araştırıldığı bir çalışmada, yaşları 22-68 arası değişen 61 vakada HPV DNA pozitifliğinin %45.9 olduğu tespit edilmiştir. Bizim yaptığımız çalışmada ise genel olarak değerlendirildiğinde CIN1, CIN2 ve CIN3 tanılı toplam 114 kadında HPV DNA pozitifliğinin %69.3 (79/114) olduğu saptanmıştır.

Günümüzde servikal örneklerde HPV E6/E7 mRNA tespiti ve onkojenik aktivite varlığının araştırılması, reverse transcriptase (RT)-PCR ya da nükleik asit sekans tabanlı amplifikasyon (nucleic acid sequence based amplification=NASBA) yöntemleriyle yapılabilmektedir (284,285). Servikal örneklerde en yaygın yüksek onkojenik riskli HPV tiplerinde (HPV tip 16, 18, 31, 33 ve 45) E6/E7 tespiti yapabilen NASBA bazlı yöntemler arasında PreTect™ HPV-Proof, NorChip AS ve NucliSENS EasyQ® gibi yöntemler sayılabilir. NASBA tekniklerinde tek sarmallı nükleik asit ya da RNA (viral genomik RNA, mRNA ya da ribozomal RNA) çift sarmallı DNA oluşturmak için amplifiye edilir (286). Real time multiplex NASBA tekniğinde tek tüp içinde amplifikasyon ve saptama yapıldığından kontaminasyon riskinin çok düşük olduğu bildirilmiştir (284).

Çeşitli çalışmalarda HPV infeksiyonlarında E6/E7 onkoproteinlerin varlığının lezyonun şiddetiyle doğrudan ilişkili olabileceği bildirilmektedir (285,287,288,289). Bu nedenle HPV infeksiyonlarında E6/E7 mRNA testinin tanı değeri yüksektir. Diğer tarama amaçlı HPV DNA testleriyle kıyaslandığında spesifite ve sensitivitesinin daha yüksek olduğu bildirilmiştir (290).

Viral proteinlerden E6/E7 mRNA ekspresyonu hücre siklusu kontrolünü etkileyerek servikal kanser gelişimini başlatmaktadır. Çalışmalarda HPV genotiplerinin sebep olduğu servikal kanser vakalarının yaklaşık %70'inden HPV tip 16 ve 18'in sorumlu olduğu bildirilmiştir (196). Bizim çalışmamızda HPV tip 16 ile infekte 34 kadının 13 (%38.2)'ünde HPV tip 16'ya bağlı viral onkoproteinlerin (E6/E7) varlığını tespit ettik. Yani çalışmamızda HPV tip 16 pozitif kadınların % 38.2'sinde onkojenik aktivite pozitif bulunmuştur. HPV tip 45 ile infekte 35 kadında onkojenik aktivite oranı ise %31.4 (11/35) olarak bulunmuştur. Çalışmamızda en düşük oranda onkojenik transformasyon yapan viral HPV tipinin ise HPV tip 18 olduğu tespit edilmiştir. Toplam 11 HPV tip 18 ile infekte hastanın 2 (%18.2)'sinde E6/E7 onkoprotein varlığı saptanmıştır.

Bunun yanında çalışmamızda yüksek onkojenik riskli HPV tiplerinden HPV tip 31 ve 33 ile infekte kadınların hiçbirinde E6/E7 onkoprotein varlığına rastlanılmamıştır. Bu çalışmada literatürden farklı olarak servikal kanserlerle ilişkisi en yüksek düzeyde olduğu bildirilen HPV tip 16 ve 18'in dışında HPV tip 45 ile infekte kadınlarda da oldukça yüksek düzeyde (%31.4) onkoprotein varlığı tespit edilmiştir (196).

6.SONUÇLAR VE ÖNERİLER

1. Bu çalışma, Hatay bölgesinde, servikal intraepitelyal neoplazi (CIN1, CIN2 ve CIN3) tanısı konmuş, 18-80 yaşları arasındaki 114 hastada ve asemptomatik 89 kadında HPV infeksiyonunun insidansı ve genotip dağılımı araştırılmak amacıyla yapılmıştır. Ayrıca, CIN tanılı kadınlardan izole edilen, servikal kanser ilişkisi olduğu bildirilen yüksek riskli 5 HPV tipi (HPV tip 16, 18, 31, 33 ve 45)'nde, HPV'ye bağlı onkojenik transformasyon oranının tespit edilmesi amaçlanmıştır.

2. Asemptomatik kadınlarda HPV pozitivite oranı %7.9 (7/89) bulunmuştur. Bu kadınlar arasındaki genotip dağılımı; %3.4 (3/89) HPV tip16, %3.4 (3/89) HPV tip 45 ve %1.1 (1/89) HPV tip 58 şeklinde bulunmuştur.

3. CIN1 tanılı kadınların %56.5 (39/69)'inde; CIN2 tanılı kadınların %88.5 (23/26)'inde ve CIN3 tanılı kadınların ise %89.5 (17/19)'inde HPV genomu açısından pozitivite saptanmıştır.

4. CIN1 tanılı kadınlarda en yüksek oranda HPV tip 16, CIN2 tanılı kadınlarda HPV tip 45 ve CIN3 tanılı kadınlarda ise HPV tip 16 tespit edilmiştir.

5. Çalışmada toplam 31 (%27.2; 31/114) CIN tanılı kadında birden fazla HPV tipiyle koenfeksiyon tespit edilmiştir.

6. Yüksek riskli HPV tipleriyle infekte toplam 57 (%50; 57/114) CIN tanılı kadının 24'ü (%42.1; 24/57) E6/E7 onkoprotein varlığı açısından pozitif bulunmuştur.

7. Çalışmada E6/E7 onkoprotein varlığının tiplere göre dağılımı şöyledi: CIN1 tanılı HPV tip 16 ile infekte toplam 16 kadının 8 (%50)'inde, HPV tip 45 ile infekte toplam 11 kadının 6 (%54.5)'sında ve HPV tip 18 ile infekte toplam 3 kadının 1 (%33.3)'inde E6/E7 onkoprotein varlığı saptanmıştır.

8. CIN2 tanısı almış HPV tip 45 ile infekte toplam 14 kadının 2 (%14.3)'sinde ve HPV tip 16 ile infekte 7 kadının 1 (%14.3)'inde E6/E7 onkoprotein varlığı saptanırken HPV tip 18'le infekte 5 kadının hiçbirinde E6/E7 onkoprotein varlığı saptanmamıştır.

9. CIN3 tanılı kadınlarda E6/E7 onkoprotein varlığı incelendiğinde ise; HPV tip 16 ile infekte 11 kadının 4 (%36.4)'ünde, HPV tip 45 ile infekte 9 kadının 3

(%33.3)'ünde ve HPV tip 18 ile infekte 3 kadının 1 (%33.3)'inde onkojenik aktivite pozitif bulunmuştur.

10. Çalışmamızda bölgemizdeki CIN tanılı kadınlarda en sık rastlanılan tip HPV tip 45 (%30.7; 35/114) olurken, bunu HPV tip 16 ve HPV tip 35 izlemiştir. HPV sıklığı açısından HPV tip 45 ile HPV tip 16 arasında istatistiksel açıdan anlamlı derecede fark bulunmazken ($p>0.05$), HPV tip 45 ile HPV tip 18 ve HPV tip 16 ile HPV tip 18 arasında istatistiksel açıdan anlamlı derecede farkın olduğu tespit edilmiştir ($p<0.01$).

11. HPV enfeksiyonundan korunmada ülkemizde en sık önerilen ve tercih edilen dörtlü aşı (quadrivalan aşı; tip 6, 11, 16 ve 18'e karşı) HPV tip 45'i içermediğinden bölgemizde en yüksek düzeyde saptanan bu HPV genotipi servikal kanser açısından ciddi bir risk olarak tespit edilmiştir.

12. HPV tip 45 servikal kanserle ilişkilendirilen ve yüksek risk grubunda yer alan bir HPV tipidir. En az HPV tip 16 ve tip 18 kadar önemli ve karsinojen bir genotip olduğu bildirilmektedir. Hiç şüphesiz, HPV enfeksiyonlarına karşı korunmada önemli olan aşı içeriğinin ülkemiz ya da bölgemiz genotip profili göz önüne alınarak hazırlanması koruyuculuğu artıran önemli bir adım olacaktır.

13. Çalışmamızda yüksek riskli HPV genotipleriyle (HPV tip 16, 18, 31, 33 ve 45) enfeksiyon oranı oldukça yüksek bulunmuştur. Toplam 114 CIN tanılı kadının 57 (%50)'sinde yüksek riskli HPV genotipleri tespit edilmiş olup, bu kadınların 24 (%42.1)'ünde ise onkojenik aktivite (E6/E7 mRNA) tespit edilmiştir.

14. Çalışmamızda onkojenik aktivite testlerine dayanarak şu söylenebilir ki, onkojenik aktivite testleri yapılamadığı durumlarda, yüksek riskli HPV genotipleriyle infekte olduğu tespit edilen hemen hemen iki kadından birinde onkojenik dönüşümün olabileceği unutulmamalıdır.

Sonuç olarak çalışmamızda elde edilen bulgular, servikal intraepitelyal neoplazik hastalarda, gerek total HPV enfeksiyonu prevalansı ve gerekse de yüksek riskli HPV tipleriyle HPV enfeksiyonu oranının oldukça yüksek olduğunu göstermektedir. Ayrıca çalışmada bu tiplerde yüksek oranda onkojenik aktivite tespit edilmiştir. Servikal kanser prevalansını azaltmada HPV enfeksiyonlu kadınların erken

ve doğru tanısının yapılması, genotip analizi ve onkojenik aktivite açısından incelenmesi büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle cinsel yönden aktif kadınların HPV infeksiyonu açısından spesifite ve sensitivitesi yüksek olan moleküler tabanlı yöntemlerle araştırılması önerilir.

7.KAYNAKLAR

1. Syrjänen KJ, Natural history of genital human papillomavirus infections. C. Lacey ed. Leeds, United Kingdom. Papillomavirus reviews. Leeds University Press; 1996. p.189-206.
2. Stanley M. Pathology and epidemiology of HPV infection in females. *Gynecol Oncol.* 2010 May;117(2):5-10.
3. Yavuzer D, Karadayi N, Salepci T, Baloglu H, Bilici A, Sakirahmet D. Role of human papillomavirus in the development of urothelial carcinoma. *Med Oncol.* 2011 Sep;28(3):919-23.
4. O'Meara AT. Present standards for cervical cancer screening. *Current Opinion Oncol.* 2002 Sep;14(5):505-11.
5. Haverkos HW. Multifactorial etiology of cervical cancer, a hypothesis. *Med Gen Med.* 2005 Nov; 30 7(4):57
6. Bosch FX, Qiao YL, Castellsagué X. CHAPTER 2 The epidemiology of human papillomavirus infection and its association with cervical cancer. *Int J Gynaecol Obstet* 2006; 94(1):8–21.
7. Doorbar J. The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol.* 2005; 32(1):7–15.
8. Smith PP, Bryant EM, Kaur P, McDougall JK. Cytogenetic analysis of eight human papillomavirus immortalized human keratinocyte cell lines. *Int J Cancer.* 1989; 44:1124–31.
9. Walmer DK, Merisier D, Littman E, Rodriguez G, Venero N, Henderson M, et al. Portable colposcopy in low-resource settings. *J Acquir Immune Defic Syn.* 2004 Oct; 37 (3):167-70.
10. Castellsagué X. Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer. *Gynecologic Oncology.* 2008 110:4–7.
11. Lehtinen M, Paavonen J. Effectiveness of preventive human papillomavirus vaccination. *Int J STD AIDS.* 2003; 14: 787–92.
12. Lancaster WD, Olson C. Animal papillomaviruses. *Microbiol Rev.* 1982; 46:191-207.
13. Sundberg JP. Papillomavirus infections in animals. Syrjanen K, Gissmann LL, Koss LG ed. Berlin, Springer-Verlag. Papillomaviruses and Human Disease; 1987. p.253.
14. Howley PM, Lowy DR. Papillomaviruses *Fields virology.* Knipe DM, Howley PM ed. Philadelphia, Lippincot Williams & Wilkins. Papillomaviruses; 2007. p.2231-64.
15. Papanicolaou GN, Traut HF. The diagnostic value of vaginal smears and its precursors is improved by using a primary diagnos- in carcinoma of the uterus. *Am J Obstet Gynecol.* 1941;42:193–206.
16. Papanicolaou GN. A survey of actualities and potentialities of exfoliative cytology in cancer diagnosis. *Ann. Intern. Med.* 1949;31:661-74.
17. Strauss MJ, Shaw EW. Crystalline virus-like particles from skin papillomas characterized by intranuclear inclusion bodies. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1949; 72(1):46–50.
18. de Villiers EM, Gissmann L, zur Hausen H. Molecular cloning of viral DNA from human genital warts. *J Virol.* 1981; 40(3):932–935.
19. Orth G, Favre M, Croissant O. Characterization of a new type of human papillomavirus that causes skin warts. *J Virol.* 1977; 24(1):108–20.
20. Dekelboum AM. Papillomas of the larynx. *Arch Otolaryngol.* 1965; 81:390-7.

21. Rabbett WF. Juvenile laryngeal papillomatosis: The relation of irradiation to malignant degeneration in this disease. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1965; 74:1149-63.
22. Löning T, Ikenberg H, Becker J, Gissmann L, Hoepfer I, zur Hausen H. Analysis of oral papillomas, leukoplakias, and invasive carcinomas for human papillomavirus type related DNA. *J Invest Dermatol.* 1985; 84:417-20.
23. Shroyer KR, Greer RO, Fankhouser CA, McGuirt WF, Marshall R. Detection of human papillomavirus DNA in oral verrucous carcinoma by polymerase chain reaction. *Mod Pathol.* 1993; 6:669-72.
24. Ishibashi T, Matsushima S, Tsunokawa Y, Asai M, Nomura Y, Sugimura T, et al. Human papillomavirus DNA in squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1990; 116:294-8.
25. Jung WW, Chun T, Sul D, Hwang KW, Kang HS, Lee DJ, Han IK. Strategies against human papillomavirus infection and cervical cancer. *J Microbiol.* 2004 Dec; 42(4):255-66.
26. zur Hausen H. Condylomata acuminata and human genital cancer. *Cancer Res.* 1976; 36(2, Pt 2):794.
27. Meisels A, Fortin R. Condylomatus lesions of the cervix and vagina. Cytologic patterns. *Acta Cytol.* 1976; 20:505-9.
28. Koutsky LA, Holmes KK, Critchlow CW, Stevens CE, Paavonen J, Beckmann AM, et al. A cohort study of the risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 in relation to papillomavirus infection. *N Engl J Med.* 1992; 327(18):1272-8.
29. Munoz N, Bosch FX, Desanjose S, Tafur L, Izarzugaza I, Gili M, et al. The causal link between human papillomavirus and invasive cervical cancer: a population-based case-control study in Colombia and Spain. *Int J Cancer.* 1992; 52(5):743-9.
30. Schiffman MH, Bauer HM, Hoover RN, Glass AG, Cadell DM, Rush BB, et al. Epidemiologic evidence showing that human papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia. *J. Natl Cancer Inst.* 1993; 85(12):958-64.
31. van Hamont D, Bekkers RL, Massuger LF, Melchers WJ. Detection, management, and follow-up of pre-malignant cervical lesions and the role for human papillomavirus. *Rev Med Virol.* 2008 Mar-Apr; 18(2):117-32.
32. Kiviat NB, Koutsky LA. Specific human papillomavirus types as the causal agents of most cervical intraepithelial neoplasia: implications for current views and treatment. *J. Natl. Cancer Inst.* 1993;85:934-5.
33. Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarity A, Oconnor D, Prey M, et al. The 2001 Bethesda System. Terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA.* 2002; 287:2114-9.
34. Chuang TY, Perry HO, Kurland LT, Ilstrup DM. Condyloma acuminatum in Rochester, Minn. 1950-1978. I. Epidemiology and clinical features. *Arch Dermatol.* 1984; 120(4):469-75.
35. IARC. Epidemiology of infection: human papillomaviruses. *Carcinog Risk Chem Hum.* 1995; 64:60-5.
36. Cogliano V, Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, El GF. Carcinogenicity of human papillomaviruses. *Lancet Oncol.* 2005; 6(4):204.
37. IARC. Human Papillomaviruses. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. 2005.

38. Bezerra AL, Lopes A, Santiago GH, Ribeiro KC, Latorre MR, Villa LL. Human papillomavirus as a prognostic factor in carcinoma of the penis: analysis of 82 patients treated with amputation and bilateral lymphadenectomy. *Cancer*. 2001; 91:2315–21.
39. Dobson S, Deeks S, Money D, group atNw. Statement on human papillomavirus vaccine. *Can Commun Dis Rep*. 2007; 33(ACS-2):1-31.
40. zur Hausen H. Papillomaviruses in human cancers. *Proc. Assoc. Am. Physicians*. 1999; 111:581-7.
41. Scully C, Cox MF, Prime SS, Maitland NJ. Papillomaviruses: The current status in relation to oral disease. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1988; 65:526-32.
42. Moscicki AB, Palefsky J, Gonzales J, Schoolnik GK. Human papillomavirus infection in sexually active adolescent females: Prevalence and risk factors. *Pediatr Res*. 1990; 28:507-13.
43. Baker TS, Newcomb WW, Olson NH, Cowsert LM, Olson C, Brown JC. Structures of bovine and human papillomaviruses. Analysis by cryoelectron microscopy and threedimensional image reconstruction. *Biophys J*. 1991; 60:1445-56.
44. Favre M. Structural polypeptides of rabbit, bovine, and human papillomaviruses. *J. Virol*. 1975; 15:1239-47.
45. Zhou JA, McIndoe A, Davies H, Sun XY, Crawford L. The induction of cytotoxic T-lymphocyte precursor cells by recombinant vaccinia expressing human papillomavirus type 16 L1. *Virol*. 1991; 18:203–10.
46. Münger K, Baldwin A, Edwards KM, Hayakawa H, Nguyen CL, Owens M, et al. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J Virol*. 2004; 78(21):11451–60.
47. Bosch F, Manos MM, Munoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, et al. Prevalence of human HPV in cervical cancer: a worldwide perspective. *J. Natl. Cancer Inst*. 1995; 87:796-802.
48. Bonnez W, Richman RC. Papillomaviruses. Mandell GL, Bennett JE, Dolin RR ed. *Nandell, Douglas, Bennetts principles and practice of infectious diseases*. 5th ed. Philadelphia, Pennsylvania. Churchill Livingstone; 1994. p. 1630-40.
49. Burd EM. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin. Microbiol. Rev*. 2003; 16:1-17.
50. Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA. Papovaviruses. In *Medical Microbiology*. London, United Kingdom. Mosby Press; 2002. p. 460.
51. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology*. 2004; 324(1):17–27.
52. Orth G, Favre M. Human papillomaviruses. Biochemical and biologic properties. *Clin. Dermatol*. 1985; 3:27-42.
53. Das BC, Gopalkrishna V, Hedau S, Katiyar S. Cancer of the uterine cervix and human papillomavirus infection. *Curr Sci*. 2000; 78:52-63.
54. Zur Hausen H. Viruses in human cancer. *Science*. 1991; 254:1167-73.
55. Chang F, Syrjanen S, Kellokoski J, Syrjanen K. Human papillomavirus (HPV) infections and their associations with oral disease. *J Oral Pathol Med*. 1991; 20:305-17.

56. Chocolatewala NM, Chaturvedi P. Role of human papilloma virus in the oral carcinogenesis: an Indian perspective. *J Cancer Res Ther.* 2009 Apr-Jun; 5(2):71-7.
57. Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Eng J Med.* 2003; 348:518–27.
58. Gravitt PE, Shah KV. The biology of human papillomavirus infections. In *Cervical cancer: from etiology to prevention.* Rohan TE, Shah KV ed. Kluwer Academic Publishers: Boston, MA, 2004; p. 81–99.
59. De Villiers EM, Gunst K, Stein H, Scherubl H. Esophageal squamous cell cancer in patients with head and neck cancer: prevalence of human papillomavirus DNA sequences. *Int J Cancer.* 2004; 109(2):253–8.
60. zur Hausen H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from hostcell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst.* 2000; 92(9):690–8.
61. Schiffman M, Castle PE. Human papillomavirus: epidemiology and public health. *Arch Pathol Lab Med.* 2003 Aug; 127(8):930-4.
62. Hummel M, Hudson JB, Laimins LA. Differentiation- induced and constitutive transcription of human papillomavirus type 31b in cell lines containing viral episomes. *J. Virol.* 1992; 66:6070-80.
63. Meyers C, Frattini MG, Hudson JB, Laimins LA. Biosynthesis of human papillomavirus from a continuous cell line upon epithelial differentiation. *Science.* 1992; 257:971-73.
64. Jeon S, Allen-Hoffman BL, Lambert PF. Integration of human papillomavirus type 16 into the human genome correlates with a selective growth advantage of cells. *J. Virol.* 1995; 69:2989-97.
65. Evander M, Frazer IH, Payne E. Qui YM, Hengst K, McMillan NA. Identification of the alpha6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. *J. Virol.* 1997; 71:2449-56.
66. Joyce JG, Tung JS, Przysiecki CT, Cook JC, Lehman ED, Sands JA, et al. The L1 major capsid protein of human papillomavirus type 11 recombinant virus-like particles interacts with heparin and cell-surface glycosaminoglycans on human keratinocytes. *J. Biol. Chem.* 1999; 274:5810-22.
67. Giroglu T, Florin L, Schäfer F, Stre RE, Sapp M. Human papillomavirus infection requires cell surface heparin sulfate. *J. Virol.* 2001; 75:1565-70.
68. Thomas M, Pim D, Banks L. The role of the E6-p53 interaction in the molecular pathogenesis of HPV. *Oncogene* 1999; 18:7690-700.
69. Castellsague X, Bosch FX, Munoz N. The male role in cervical cancer. *Salud Publica Mex.* 2003; 45(3):345–53.
70. Castellsague X, Bosch FX, Munoz N, Meijer CJ, Shah KV, de Sanjose S, et al. Male circumcision, penile human papillomavirus infection, and cervical cancer in female partners. *N Engl J Med.* 2002; 346:1105–12.
71. Hogewoning CJ, Bleeker MC, van Den Brule AJ, Voorhorst FJ, Snijders PJ, Berkhof J, et al. Condom use promotes regression of cervical intraepithelial neoplasia and clearance of human papillomavirus: a randomized clinical trial. *Int J Cancer.* 2003; 107:811–6.
72. Woodman CB, Collins S, Winter H, Bailey A, Ellis J, Prior P, et al. Natural history of cervical human papillomavirus infection in young women: a longitudinal cohort study. *Lancet* 2001; 357(9271):1831-6.

73. Elfgrén K, Kalantari M, Moberger B, Hagmar B, Dillner J. A population-based five-year follow-up study of cervical human papillomavirus infection. *Am J Obstet Gynecol*. 2000; 183:561–7.
74. Schlecht NF, Kulaga S, Robitaille J, Ferreira S, Santos M, Miyamura RA, et al. Persistent human papillomavirus infection as a predictor of cervical intraepithelial neoplasia. *J Am Med Assoc*. 2001; 286:3106–14.
75. Castellsague X, Munoz N. Chapter 3: Cofactors in human papillomavirus carcinogenesis-role of parity, oral contraceptives, and tobacco smoking. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2003:20–8.
76. Castellsague X, Bosch FX, Munoz N. Environmental co-factors in HPV carcinogenesis. *Virus Res*. 2002; 89:191-9.
77. Garcia-Closas R, Castellsague X, Bosch X, Gonzalez CA. The role of diet and nutrition in cervical carcinogenesis: A review of recent evidence. *Int J Cancer* 2005 Nov 20; 117(4):629-37.
78. Smith JS, Herrero R, Bosetti C, Munoz N, Bosch FX, Eluf-Neto J, et al. Herpes simplex virus-2 as a human papillomavirus cofactor in the etiology of invasive cervical cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2002; 94:1604–13.
79. Motoyama S, Ladines-Llave CA, Luis Villanueva S, Maruo T. The role of human papillomavirus in the molecular biology of cervical carcinogenesis. *Kobe J Med Sci*. 2004; 50:9-19.
80. Syrjanen SM, Syrjanen KJ, Happonen RP. Human papillomavirus (HPV) DNA sequences in oral precancerous lesions and squamous cell carcinoma demonstrated by in situ hybridization. *J Oral Pathol*. 1988; 17:273-8.
81. Tsuchiya H, Tomita Y, Shirasawa H, Tanzawa H, Sato K, Simizu B. Detection of human papillomavirus in head and neck tumors with DNA hybridization and immunohistochemical analysis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1991; 71:721-5.
82. Bosch FX, Lorincz A, Munoz N, Meijer CJLM, Shah KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol*. 2002; 55:244–265.
83. Bekkers RL, Massuger LF, Bulten J, Melchers WJ. Epidemiological and clinical aspects of human papillomavirus detection in the prevention of cervical cancer. *Rev Med Virol* 2004; 14(2):95–105.
84. Janicek MF, Averette HE. Cervical cancer: prevention, diagnosis and therapeutics. *CA Cancer J Clin*. 2001; 51:92–114.
85. Beaudenon S, Huibregtse MJ. HPV E6, E6AP and cervical cancer. *BMC Biochem*. 2008; 9:4.
86. Nobbenhuis MA, Walboomers JM, Helmerhorst TJ, Rozendaal L, Remmink AJ, Risse EK, et al. Relation of human papillomavirus status to cervical lesions and consequences for cervical cancer screening: a prospective study. *Lancet*. 1999; 354(9172):20–5.
87. zur Hausen H, Gissmann L, Schlehofer JR. Viruses in the etiology of human genital cancer. *Prog Med Virol*. 1984; 30:170–86.
88. Wilson VG, West M, Woytek K, Rangasamy D. Papillomavirus E1 proteins: form, function, and features. *Virus Genes*. 2002; 24(3):275–90.
89. Gravitt PE, Peyton CL, Alessi TQ, Wheeler CM, Coutlée F, Hildesheim A, et al. Improved amplification of genital human papillomaviruses. *J Clin Microbiol*. 2000; 38(1):357–61.

90. Kalantari M, Karlsen F, Kristensen G, Holm R, Hagmar B, Johansson B. Disruption of the E1 and E2 reading frames of HPV 16 in cervical carcinoma is associated with poor prognosis. *Int J Gynecol Pathol*. 1998; 17(2):146–53.
91. Park JS, Hwang ES, Park SN, Ahn HK, Um SJ, Kim CJ, et al. Physical status and expression of HPV genes in cervical cancers. *Gynecol Oncol*. 1997; 65(1):121–9.
92. zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer*. 2002; 2(5):342–50.
93. Kalantari M, Calleja-Macias IE, Tewari D, Hagmar B, Lie K, Barrera-Saldana HA, et al. Conserved methylation patterns of human papillomavirus type 16 DNA in asymptomatic infection and cervical neoplasia. *J Virol*. 2004; 78(23):12762–72.
94. Turan T, Kalantari M, Cuschieri K, Cubie HA, Skomedal H, Bernard HU. High-throughput detection of human papillomavirus-18 L1 gene methylation, a candidate biomarker for the progression of cervical neoplasia. *Virology*. 2007; 361(1):185–93.
95. Stanley M. Immune responses to human papillomavirus. *Vaccine*. 2006 Mar 30; 24(1):16–22.
96. Sterling JC, Skepper JN, Stanley MA. Immunoelectron microscopical localization of human papillomavirus type 16 L1 and E4 proteins in cervical keratinocytes cultured in vivo. *J Invest Dermatol*. 1993; 100:154–8.
97. Middleton K, Peh W, Southern S, Griffin H, Sotlar K, Nakahara T, et al. Organization of human papillomavirus productive cycle during neoplastic progression provides a basis for selection of diagnostic markers. *J Virol*. 2003; 77:10186–201.
98. Oriel JD. Natural history of genital warts. *Br J Vener Dis*. 1971; 47:1–13.
99. Stanley M. Pathology and epidemiology of HPV infection in females. *Gynecol Oncol*. 2010 May; 117(2):5–10.
100. Coleman N, Birley HDL, Renton AM, Hanna NF, Ryait BK, Byrne M, et al. Immunological events in regressing genital warts. *Am J Clin Pathol* 1994; 102:768–74.
101. Ghim S, Newsome J, Sundberg JP, Schlegel R, Jenson AB. Spontaneously regressing oral papillomas induce systemic antibodies that neutralize canine oral papillomavirus. *Exp Mol Pathol*. 2000; 68:147–51.
102. Ho GYF, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ, Burk RD. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med*. 1998; 338:423–8.
103. Schiffman M, Kjaer SK. Chapter 2: natural history of anogenital human papillomavirus infection and neoplasia. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2003; 31:14–9.
104. Brown DR, Shew ML, Qadadri B, Neptune N, Vargas M, Tu W, et al. A longitudinal study of genital human papillomavirus infection in a cohort of closely followed adolescent women. *J Infect Dis*. 2005; 191:182–92.
105. Franco EL, Villa LL, Sobrinho JP, Prado JM, Rousseau MC, D'esy M, et al. Epidemiology of acquisition and clearance of cervical human papillomavirus infection in women from a high-risk area for cervical cancer. *J Infect Dis*. 1999; 180:1415–23.
106. Remmink AJ, Walboomers JMM, Helmerhorst TJM, Voorhorst FJ, Rozendaal L, Risse EKJ, et al. The presence of persistent highrisk HPV genotypes in

- dysplastic cervical lesions is associated with progressive disease: natural history up to 36 months. *Int J Cancer*. 1995; 61:306–11.
107. Fruchter RG, Maiman M, Sedlis A, Bartley L, Camilien L, Arrastia CD. Multiple recurrences of cervical intraepithelial neoplasia in women with the human immunodeficiency virus. *Obstet Gynecol*. 1996; 87:338–44.
 108. Fennema JSA, van Ameijden EJC, Coutinho RA, van den Hoek AAR. HIV, sexually transmitted diseases and gynaecologic disorders in women: increased risk for genital herpes and warts among HIV-infected prostitutes in A/msterdam. *AIDS*. 1995; 9:1071–8.
 109. Chirgwin KD, Feldman J, Augenbraun M, Landesman S, Minkoff H. Incidence of venereal warts in human immunodeficiency virusinfected and uninfected women. *J Infect Dis*. 1995; 172:235–8.
 110. Moscicki AB, Ellenberg JH, Farhat S, Xu J. Persistence of human papillomavirus infection in HIV-infected and -uninfected adolescent girls: risk factors and differences, by phylogenetic type. *J Infect Dis*. 2004; 190:37–45.
 111. Moscicki AB, Ellenberg JH, Crowley-Nowick P, Darragh TM, Xu J, Fahrat S. Risk of high-grade squamous intraepithelial lesion in HIV-infected adolescents. *J Infect Dis*. 2004; 190:1413–21.
 112. Kupper TS, Fuhlbrigge RC. Immune surveillance in the skin: mechanisms and clinical consequences. *Nat Rev Immunol*. 2004; 4:211–22.
 113. Le Bon A, Tough DF. Links between innate and adaptive immunity via type I interferon. *Curr Opin Immunol*. 2002; 14:432–6.
 114. Theofilopoulos AN, Baccala R, Beutler B, Kono DH. Type I interferons (alfa/beta) in immunity and autoimmunity. *Annu Rev Immunol*. 2005; 23:307–36.
 115. Chang YE, Laimins LA. Microarray analysis identifies interferoninducible genes and Stat-1 as major transcriptional targets of human papillomavirus type 31. *J Virol*. 2000; 74:4174–82.
 116. Nees M, Geoghegan JM, Hyman T, Frank S, Miller L, Woodworth CD. Papillomavirus type 16 oncogenes downregulate expression of interferon-responsive genes and upregulate proliferationassociated and NF- κ B-responsive genes in cervical keratinocytes. *J Virol*. 2001; 75:4283–96.
 117. Barnard P, McMillan NA. The human papillomavirus E7 oncoprotein abrogates signaling mediated by interferon. *Virology*. 1999; 259:305–13.
 118. Ronco LV, Karpova AY, Vidal M, Howley PM. Human papillomavirus 16 E6 oncoprotein binds to interferon regulatory factor-3 and inhibits its transcriptional activity. *Genes Dev*. 1998; 12:2061–72.
 119. Fausch SC, Da Silva DM, Rudolf MP, Kast WM. Human papillomavirus virus-like particles do not activate Langerhans cells: a possible immune escape mechanism used by human papillomaviruses. *J Immunol*. 2002; 169:3242–9.
 120. Fausch SC, Da Silva DM, Kast WM. Heterologous papillomavirus virus-like particles and human papillomavirus virus-like particle immune complexes activate human Langerhans cells. *Vaccine*. 2005; 23:1720–9.
 121. Kobayashi A, Greenblatt RM, Anastos K, Minkoff H, Massad LS, Young M, et al. Functional attributes of mucosal immunity in cervical intraepithelial neoplasia and effects of HIV infection. *Cancer Res*. 2004; 64:6766–74.
 122. Kirnbauer R, Hubbert NL, Wheeler CM, Becker TM, Lowy DR, Schiller JT. A virus-like particle enzyme-linked immunosorbent assay detects serum

- antibodies in a majority of women infected with human papillomavirus type 16. *J Natl Cancer Inst.* 1994; 86:494–9.
123. Carter JJ, Wipf GC, Hagensee ME, McKnight B, Habel LA, Lee SK, et al. Use of human papillomavirus type 6 capsids to detect antibodies in people with genital warts. *J Infect Dis.* 1995; 172:11–8.
 124. Villa LL, Costa RLR, Petta CA, Andrade RP, Ault KA, Giuliano AR, et al. Prophylactic quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11 16 and 18) L1 virus-like particle vaccine in young women: a randomised double-blind placebo-controlled multicentre phase II efficacy trial. *Lancet Oncol.* 2005; 6:271–8.
 125. Kreider JW, Bartlett GL. The Shope papilloma-carcinoma complex of rabbits: a model system of neoplastic progression and spontaneous regression. *Adv Cancer Res.* 1981; 35:81–110.
 126. Stanley MA. Human papillomavirus vaccines. *Curr Opin Mol Ther.* 2002; 4:15–22.
 127. Harro CD, Pang YYS, Roden RBS, Hildesheim A, Wang Z, Reynolds MJ, et al. Safety and immunogenicity trial in adult volunteers of a human papillomavirus 16 L1 virus-like particle vaccine. *J Natl Cancer Inst.* 2001;93:284–92.
 128. Ault KA, Giuliano AR, Edwards RP, Tamms G, Kim LL, Smith JF, et al. A phase I study to evaluate a human papillomavirus (HPV) type 18 L1 VLP vaccine. *Vaccine.* 2004; 22:3004–7.
 129. White WI, Wilson SD, Bonnez W, Rose RC, Koenig S, Suzich JA. In vitro infection and type-restricted antibody-mediated neutralization of authentic human papillomavirus type 16. *J Virol.* 1998; 72:959–64.
 130. Yeager MD, Aste-Amezaga M, Brown DR, Martin MM, Shah MJ, Cook JC, et al. Neutralization of human papillomavirus (HPV) pseudovirions: a novel and efficient approach to detect and characterize HPV neutralizing antibodies. *Virology.* 2000; 278:570–7.
 131. Ritchie JM, Smith EM, Summersgill KF, Hoffman HT, Wang D, Klussmann JP, et al. Human papillomavirus infection as a prognostic factor in carcinomas of the oral cavity and oropharynx. *Int J Cancer.* 2003; 104:336-44.
 132. Lindel K, Beer KT, Laissue J, Greiner RH, Aebersold DM. Human papillomavirus positive squamous cell carcinoma of the oropharynx: A radiosensitive subgroup of head and neck carcinoma. *Cancer.* 2001;92:805-13.
 133. Gillison ML, Koch WM, Shah KV. Human papillomavirus in head and neck squamous cell carcinoma: Are some head and neck cancers a sexually transmitted disease? *Curr Opin Oncol.* 1999; 11:191-9.
 134. Galani E, Christodoulou C. Human papilloma viruses and cancer in the post-vaccine era. *Clin Microbiol Infect.* 2009 Nov; 15(11):977-81.
 135. Kjaer SK, Svare EI, Worm AM, Walboomers JM, Meijer CJ, van den Brule AJ. Human papillomavirus infection in Danish female sex workers. Decreasing prevalence with age despite continuously high sexual activity. *Sex Transm Dis.* 2000; 27(8):438–45.
 136. Castle PE, Schiffman M, Herrero R, Hildesheim A, Rodriguez AC, Bratti MC, et al. A prospective study of age trends in cervical human papillomavirus acquisition and persistence in Guanacaste, Costa Rica. *J Infect Dis.* 2005; 191(11):1808–16.

137. Smith EM, Johnson SR, Ritchie JM, Feddersen D, Wang D, Turek LP, et al. Persistent HPV infection in postmenopausal age women. *Int J Gynaecol Obstet.* 2004; 87(2):131–7.
138. Trottier H, Franco EL. The epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Vaccine.* 2006 Mar 30; 24 (1):1-15.
139. Giuliano AR, Papenfuss M, Abrahamsen M, Inserra P. Differences in factors associated with oncogenic and nononcogenic human papillomavirus infection at the United States–Mexico border. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2002; 11(9):930–4.
140. Rousseau MC, Franco EL, Villa LL, Sobrinho JP, Termini L, Prado JM, et al. A cumulative case-control study of risk factor profiles for oncogenic and nononcogenic cervical human papillomavirus infections. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2000; 9(5):469–76.
141. Sellors JW, Karwalajtys TL, Kaczorowski J, Mahony JB, Lytwyn A, Chong S, et al. Incidence, clearance and predictors of human papillomavirus infection in women. *CMAJ.* 2003; 168(4):421–5.
142. Villa LL, Sichero L, Rahal P, Caballero O, Ferenczy A, Rohan T, et al. Molecular variants of human papillomavirus types 16 and 18 preferentially associated with cervical neoplasia. *J Gen Virol.* 2000; 81(12):2959–68.
143. Schlecht NF, Trevisan A, Duarte-Franco E, Rohan TE, Ferenczy A, Villa LL, et al. Viral load as a predictor of the risk of cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Cancer.* 2003; 103(4):519–24.
144. Wang SS, Hildesheim A. Viral and host factors in human papillomavirus persistence and progression. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2003; 31:35–40.
145. Maciag PC, Schlecht NF, Souza PS, Rohan TE, Franco EL, Villa LL. Polymorphisms of the human leukocyte antigen DRB1 and DQB1 genes and the natural history of human papillomavirus infection. *J Infect Dis.* 2002; 186(2):164–72.
146. Munoz N, Franceschi S, Bosetti C, et al. Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: the IARC multicentric case-control study. *Lancet.* 2002; 359:1093–1101.
147. Hildesheim A, Herrero R, Castle PE, Wacholder S, Bratti MC, Sherman ME, et al. HPV co-factors related to the development of cervical cancer: results from a population-based study in Costa Rica. *Br J Cancer.* 2001; 84:1219–26.
148. Smith JS, Muñoz N, Herrero R, Eluf-Neto J, Ngelangel C, Franceschi S, et al. Evidence for *Chlamydia trachomatis* as a human papillomavirus cofactor in the etiology of invasive cervical cancer in Brazil and the Philippines. *J Infect Dis.* 2002; 185:324–31.
149. Deacon JM, Evans CD, Yule R, Desai M, Binns W, Taylor C, et al. Sexual behaviour and smoking as determinants of cervical HPV infection and of CIN3 among those infected: a casecontrol study nested within the Manchester cohort. *Br J Cancer.* 2000; 83:1565– 72.
150. Castle PE, Wacholder S, Lorincz AT, Scott DR, Sherman ME, Glass AG, et al. A prospective study of highgrade cervical neoplasia among human papillomavirus-infected women. *J Natl Cancer Inst.* 2002; 94:1406–14.
151. Baseman JG, Koutsky LA. The epidemiology of human papillomavirus infections. *J Clin Virol.* 2005; 32:16-24.
152. Salmerón J, Lazcano-Ponce E, Lorincz A, Hernández M, Hernández P, Leyva A, et al. Comparison of HPV-based assays with Papanicolaou testis for

- cervical cancer screening in Morelos State, Mexico. *Cancer Causes Control*. 2003; 14:505-12.
153. Muñoz N, Méndez F, Posso H, Molano M, van den Brule AJ, Ronderos M, et al. Incidence, duration, and determinants of cervical human papillomavirus infection in a cohort of Colombian women with normal cytological results. *J Infect Dis*. 2004; 190:2077-87.
 154. Partridge JM, Koutsky LA. Genital human papillomavirus infection in men. *Lancet Infect Dis*. 2006; 6:2131.
 155. Heideman DAM, Waterboer T, Pawlita M, Van Diemen PD, Nindl I, Leijte JA, et al. Human papillomavirus-16 is the predominant type etiologically involved in penile squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol*. 2007; 25:4550-6.
 156. Liaw KL, Hildesheim A, Burk RD, Gravitt P, Wacholder S, Manos MM, et al. A prospective study of human papillomavirus (HPV) type 16 DNA detection by polymerase chain reaction and its association with acquisition and persistence of other HPV types. *J Infect Dis*. 2001; 183:8-15.
 157. Schiffman M, Herrero R, Desalle R, Hildesheim A, Wacholder S, Rodriguez AC, et al. The carcinogenicity of human papillomavirus types reflects viral evolution. *Virology*. 2005; 337:76-84.
 158. Kraus I, Molden T, Holm R, Lie AK, Karlsen F, Kristensen GB, Skomedal H. Presence of E6 and E7 mRNA from human papillomavirus types 16, 18, 31, 33, and 45 in the majority of cervical carcinomas. *J Clin Microbiol*. 2006 Apr; 44(4):1310-7.
 159. Nobbenhuis MA, Helmerhorst TJ, van den Brule AJ, Rozendaal L, Voorhorst FJ, Bezemer PD, et al. Cytological regression and clearance of high-risk human papillomavirus in women with an abnormal cervical smear. *Lancet*. 2001; 358:1782-3.
 160. Gravitt PE, Kovacic MB, Herrero R, Schiffman M, Bratti C, Hildesheim A, et al. High load for most high risk human papillomavirus genotypes is associated with prevalent cervical cancer precursors but only HPV16 load predicts the development of incident disease. *Int J Cancer*. 2007; 121:2787-93.
 161. Trimble CL, Piantadosi S, Gravitt P, Ronnett B, Pizer E, Elko A, et al. Spontaneous regression of high-grade cervical dysplasia: effects of human papillomavirus type and HLA phenotype. *Clin Cancer Res*. 2005; 11:4717-23.
 162. Balows A., Hausler WJ, Herman K.L. *Manuel of Clinical Microbiology*. 5th ed. 1991. Washington DC; p. 998-1004.
 163. Murray PR, Orew WL, Kobayashi GS, et al. *Medical Microbiology*. 1990. Mosby company, USA; p. 539-46.
 164. Mandell GL, Bennett JE, Dalin R. *Principles and practice of infectious diseases*. 4th ed. 1995. Churchill Livingstone. USA; p. 1379-97.
 165. Arvas M. İ.Ü.Cerrahpaşa Tıp Fakültesi sürekli tıp eğitimi etkinlikleri. *Adolesan sağlığı II. Sempozyum dizisi No:63*.2008; p. 111-116.
 166. Morrison E.A.B. Natural History of cervical infection with human papillomaviruses. *Clin.Infect Dis*. 1994; 18:172-80.
 167. Madsen BS, Jensen HL, van den Brule AJ, Wohlfahrt J, Frisch M. Risk factors for invasive squamous cell carcinoma of the vulva and vaginapopulation based case control study in Denmark. *Int J Cancer*. 2008; 122:2827-34.
 168. Bezerra AL, Lopes A, Santiago GH, Ribeiro KC, Latorre MR, Villa LL. Human papillomavirus as a prognostic factor in carcinoma of the penis:

- analysis of 82 patients treated with amputation and bilateral lymphadenectomy. *Cancer*. 2001; 91:2315–21.
169. Lont AP, Kroon BK, Horenblas S, Gallee MP, Berkhof J, Meijer CJ, et al. Presence of high risk human papillomavirus DNA in penile carcinoma predicts favorable outcome in survival. *Int J Cancer*. 2006; 119:1078–81.
 170. Sterling, JC. Viral infections. Burns T, Breathnach S, Cox N, Griffiths C, ed. *Textbook of Dermatology*. 7 ed. Oxford: Blackwell Science; 2004. p. 25.37-60.
 171. Hengge UR. Papillomavirus diseases. *Hautarzt*. 2004; 55:841-51.
 172. Lindelof B, Sigurgeirsson B, Gabel H, Stern RS. Incidence of skin cancer in 5356 patients following organ transplantation. *Br J Dermatol*. 2000;143:614-8.
 173. Kilkenny M, Marks R. The descriptive epidemiology of warts in the community. *Aust J Dermatol*. 1996; 37:80-6.
 174. Harwood CA, Suretheran T, Mcgregor JM, Spink PJ, Leigh IM, Breuer J, et al. Human papillomavirus infection and non-melanoma skin cancer in immunosuppressed and immunocompetent individuals. *J Med Virol*. 2000; 61:289-97.
 175. Jablonska S, Majewski S, Obalek S, Orth, G. Cutaneous wart. *Clin Dermatol*. 1997; 15:309-19.
 176. Doorbar J. The papillomaviruses life cycle. *J Clin Virol*. 2005; 32(1):7- 15.
 177. Tyring SK. Human papillomavirus infections: epidemiology, pathogenesis, and host immune response. *J Am Acad Dermatol*. 2000; 43:18-26.
 178. Berman A, Winkelmann RK. Involuting common warts. *J Am Acad Dermatol*. 1980; 3:356-62.
 179. Keefe M, Al-Ghamdi A, Coggon D, Maitland NJ, Egger P, Keefe CJ, et al. Cutaneous warts in butchers [see comments]. *Br J Dermatol*. 1994; 130:9-14.
 180. Lai JY, Doyle RJ, Bluhm JM, Johnson JC. Multiplexed PCR genotyping of HPVs from plantaris verrucae. *J Clin Virol*. 2006; 35:435-41.
 181. Egawa K, Honda Y, Inaba Y, Ono T. Pigmented viral warts: a clinical and histopathological study including human papillomavirus type. *Br J Dermatol*. 1998; 138:381-9.
 182. Orth G. Human Papillomaviruses Associated with Epidermodysplasia Verruciformis in Non-Melanoma Skin Cancers: Guilty or Innocent? *J Invest Dermatol*. 2005; 125:12-13.
 183. de Oliveira WRP, Festa Neto C, Rady PL, Tyring SK. Clinical aspects of epidermodysplasia verruciformis. *J Eur Acad Dermatol Venereal*. 2003; 17:394-8.
 184. Berkhout RT, Bouwes-Bavinck JN, Ter-Schegget T. Persistence of human papillomavirus DNA in benign and (pre)malignant skin lesions from renal transplant recipients. *J Clin Microbiol*. 2000; 38:2087-96.
 185. Derancourt C, Mouglin C, Chopard-Lallier M, Coumes-Marquet S, Drobacheff C, et al. Oncogenic human papillomaviruses in extra-genital Bowen disease revealed by in situ hybridization. *Ann Dermatol Venereol*. 2001; 128:715-8.
 186. Zheng S, Adachi A, Shimizu M, Shibata SI, Yasue S, Sakakibara A, et al. Human papillomaviruses of the mucosal type are present in some cases of extragenital Bowen's disease. *Br J Dermatol*. 2005; 152:1243-7.
 187. Harwood CA, Proby CM. Human papillomavirus and non-melanoma skin cancer. *Curr Opin Infect Dis*. 2002; 15:101-14.

188. Vera-Iglesias E, Garcia-Arpa M, Sanchez-Caminero P, Romero-Aguilera G, De La Calle C. Focal epithelial hyperplasia. *Actas Dermosifiliogr.* 2007;98:621-3.
189. Majewski S, Jablonska S. Human papillomaviruses-associated tumors of the skin and mucosa. *J Am Acad Dermatol.* 1997; 36:658-9.
190. Chan PKS, Luk ACS, Luk TNM, Lee KF, Cheung JLK, Ho KM, et al. Distribution of human papillomavirus types in anogenital warts of men. *J Clin Virol.* 2009; 44:111-4.
191. Asato Y, Taira K, Yamamota Y, Uezato H. Detection of human papillomavirus type 11 in a case of Buschke-Lowenstein tumor. *Eur J Dermatol.* 2008; 18:329-31.
192. Bonvicini F, Venturoli S, Ambretti S, Paterini P, Santini D, Ceccarelli C, Zerbini M, Musiani M. Presence and type of oncogenic papillomavirus in classic and in differentiated vulvar intraepithelial neoplasia and keratinizing vulvar squamous cell carcinoma. *J Med Virol.* 2005; 77:102-6.
193. Wieland U, Jurk S, We, enborn S, Krieg T, Pfister H, Ritzkowsky A. Erythroplasia of Queyrat: coinfection with cutaneous carcinogenic human papillomavirus type 8 and genital papillomaviruses in a carcinoma in situ. *J Inv Dermatol.* 2000; 115:396-401.
194. de Vuyst H, Clifford GM, Nascimento MC, Madeleine MM, Franceschi S. Prevalence and type distribution of human papillomavirus in carcinoma and intraepithelial neoplasia of the vulva, vagina and anus: A meta-analysis. *Int J Cancer.* 2009; 124:1626-36.
195. Lizard G, De'mares-Poulet MJ, Roignot P, Gambert P.. In situ hybridization detection of single-copy human papillomavirus on isolated cells using a catalyzed signal amplification system: GenPoint™. *Diagn. Cytopathol.* 2001; 24:112-6.
196. Walboomers JMM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J. Pathol.* 1999; 189:12-9.
197. Jacobs MV, Snijders PJ, van den Brule AJ, Helmerhorst TJ, Meijer CJ, Walboomers JM. A general primer-mediated PCR enzyme immunoassay method for rapid detection of 14 high-risk and 6 low-risk human papillomavirus genotypes in cervical scrapings. *J. Clin. Microbiol.* 1997; 35; 791-5.
198. Kleter B, van Doorn LJ, Schrauwen L, Molijn A, Sastrowijoto S, TerScheget J, et al.. Development and clinical evaluation of a highly sensitive PCR-reverse hybridization line probe assay for detection and identification of anogenital human papillomavirus. *J. Clin. Microbiol.* 1999; 37:2508-17.
199. Quint WGV, Scholte G, Van Doorn LJ, Kleter B, Smits PHM, Lindeman J. Comparative analysis of human papillomavirus infections in cervical scrapes and biopsy specimens by general SPF10 PCR and HPV genotyping. *J. Pathol.* 2001; 194:51-8.
200. Sun Y, Eluf-Neto J, Bosch FX, Muñoz N, Booth M, Walboomers JM, et al. Human papillomavirus-related serological markers of invasive cervical carcinoma in Brazil. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1994; 3:341-7.
201. Tanaka K, Iwamoto S, Gon G, Nohara T, Iwamoto M, Tanigawa N. Expression of surviving and its relationship to loss of apoptosis in breast carcinomas. *Clin Cancer Res.* 2000; 6:127-34.

202. Lo Muzio L, Staibano S, Pannone G, Mignogna MD, Marigliò A, Salvatore G, et al. Expression of the apoptosis inhibitor survivin in aggressive squamous cell carcinoma. *Exp Mol Pathol*. 2001; 70:249-54.
203. Melchers WJ, Herbrink P, Walboomers JM, Meijer CJ, vd Drift H, Lindeman J, et al. Optimization of human papillomavirus genotype detection in cervical scrapes by a modified filter in situ hybridization test. *J Clin Microbiol*. 1989; 27(1):106–10.
204. Molijn A, Kleter B, Quint W, van Doorn LJ. Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. *J Clin Virol*. 2005; 32(1):43–51.
205. Gravitt PE, Peyton CL, Apple RJ, Wheeler CM. Genotyping of 27 human papillomavirus types by using L1 consensus PCR products by a single hybridization, reverse line blot detection method. *J Clin Microbiol*. 1998; 36(10):3020–7.
206. Castle PE, Solomon D, Schiffman M, Wheeler CM. Human papillomavirus type 16 infections and 2-year absolute risk of cervical precancer in women with equivocal or mild cytologic abnormalities. *J Natl Cancer Inst*. 2005; 97(14):1066–71.
207. Brink AA, Snijders PJ, Meijer CJ, Berkhof J, Verheijen RH. HPV testing in cervical screening. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2006; 20(2):253–66.
208. Pretet JL, Dalstein V, Monnier-Benoit S, Delpout S, Mougin C. High risk HPV load estimated by Hybrid Capture II correlates with HPV16 load measured by real-time PCR in cervical smears of HPV16-infected women. *J Clin Virol*. 2004; 31(2):140–7.
209. Dalstein V, Riethmuller D, Prétet JL, Le Bail Carval K, Sautière JL, Carbillet JP, et al. Persistence and load of high-risk HPV are predictors for development of high-grade cervical lesions: a longitudinal French cohort study. *Int J Cancer* 2003; 106(3):396–403.
210. Castle PE, Schiffman M, Wheeler CM. Hybrid capture 2 viral load and the 2-year cumulative risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 3 or cancer. *Am J Obstet Gynecol*. 2004; 191(5):1590–7.
211. Kulmala SM, Syrjänen SM, Gyllensten UB, Shabalova IP, Petrovichev N, Tosi P, et al. Early integration of high copy HPV16 detectable in women with normal and low grade cervical cytology and histology. *J Clin Pathol*. 2006; 59(5):513–7.
212. Arias-Pulido H, Peyton CL, Joste NE, Vargas H, Wheeler CM. Human papillomavirus type 16 integration in cervical carcinoma in situ and in invasive cervical cancer. *J Clin Microbiol*. 2006; 44(5):1755–62.
213. Franco EL, Cuzick J, Hildesheim A, de Sanjose S. Chapter 20: issues in planning cervical cancer screening in the era of HPV vaccination. *Vaccine* 2006; 24(3):171–7.
214. Colgrove J. The ethics and politics of compulsory HPV vaccination. *N Engl J Med*. 2006; 355:2389–91.
215. Newall AT, Beutels P, Wood JG, Edmunds WJ, MacIntyre CR. Costeffectiveness analyses of human papillomavirus vaccination. *Lancet Infect Dis*. 2007; 7:289.
216. Muñoz N, Manalastas R Jr, Pitisuttithum P, Tresukosol D, Monsonego J, Ault K, et al. Safety, immunogenicity and efficacy of quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16, 18) recombinant vaccine in women aged 24–45 years: a randomized, double-blind trial. *Lancet*. 2009; 373:1949–57.

217. Future II Study Group. Quadrivalent vaccine against human papillomavirus to prevent highgrade cervical lesions. *N Engl J Med.* 2007; 356(19):1915–27.
218. Koutsky LA, Ault KA, Wheeler CM, Brown DR, Barr E, Alvarez FB, et al. A controlled trial of a human papillomavirus type 16 vaccine. *N Engl J Med.* 2002; 347(21):1645–51.
219. Harper DM, Franco EL, Wheeler C, Ferris DG, Jenkins D, Schuind A, et al. Efficacy of a bivalent L1 virus-like particle vaccine in prevention of infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: a randomised controlled trial. *Lancet.* 2004; 364(9447):1757–65.
220. Quint WG, ter Harmsel W, van Doorn LJ. Vaccination against Human papillomavirus for the prevention of cervical cancer. *Nederlands Tijdschrift voor Geneeskunde.* 2006; 150(25):1380–4.
221. Garland SM, Hernandez-Avila M, Wheeler CM, Perez G, Harper DM, Leodolter S, et al. Quadrivalent vaccine against human papillomavirus to prevent anogenital diseases. *N Engl J Med.* 2007; 356(19):1928–43.
222. Harper DM, Franco EL, Wheeler CM, Moscicki AB, Romanowski B, Roteli-Martins CM, et al. Sustained efficacy up to 4.5 years of a bivalent L1 virus-like particle vaccine against human papillomavirus types 16 and 18: follow-up from a randomised control trial. *Lancet.* 2006; 367(9518):1247–55.
223. Paavonen J, Jenkins D, Bosch FX, Naud P, Salmerón J, Wheeler CM, et al. Efficacy of a prophylactic adjuvanted bivalent L1 virus-likeparticle vaccine against infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: an interim analysis of a phase III double-blind, randomised controlled trial. *Lancet.* 2007; 369(9580):2161–70.
224. Olsson SE, Villa LL, Costa RL, Petta CA, Andrade RP, Malm C, et al. Induction of immune memory following administration of a prophylactic quadrivalent human papillomavirus (HPV) types 6/11/16/18 L1 virus-like particle (VLP) vaccine. *Vaccine.* 2007; 25(26):4931–9.
225. Taira AV, Neukermans CP, Sanders GD. Evaluating human papillomavirus vaccination programs. *Emerg Infect Dis.* 2004; 10(11):1915–23.
226. Rambout L, Hopkins L, Hutton B, Fergusson D. Prophylactic vaccination against human papillomavirus infection and disease in women: a systematic review of randomized controlled trials. *Can Med Assoc J.* 2007; 177(5):469–79.
227. Ault KA. Effect of prophylactic human papillomavirus L1 virus-like-particle vaccine on risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 2, grade 3, and adenocarcinoma in situ: a combined analysis of four randomised clinical trials. *Lancet.* 2007; 369(9576):1861–8.
228. Chan JK, Berek JS. Impact of the human papilloma vaccine on cervical cancer. *J Clin Oncol.* 2007; 25(20):2975–82.
229. Munoz N, Bosch FX, Castellsaque X, Diaz M, de Sanjose S, Hamouda D, et al. Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective. *Int J Cancer.* 2004; 111:278–85.
230. Stanberry LR, Spruance SL, Cunningham AL. Glycoprotein-dadjuvant vaccine to prevent genital herpes. *N Engl J Med.* 2002; 347:1652–61.
231. Koutsky LA, Harper DM. Current findings from prophylactic HPV vaccine trials. *Vaccine.* 2006; 24S3:114–21.
232. Clifford GM, Gallus S, Herero R, Munoz N, Snijders PJ, Vacarella S, et al. Worldwide distribution of human papillomavirus types in cytologically

- normalwomen in the International Agency for Research on Cancer HPV prevalence surveys: a pooled analysis. *Lancet*. 2005; 366:991–8.
233. Clifford GM, Ran RK, Franceschi S, Smith JS, Gough G, Pimenta JM, et al. Human papilloma virus genotype distribution in low grade lesions: comparison by geographic region and with cervical cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005; 14:278–85.
 234. Adams M, Jasani B, Fiander A. Human papilloma virus (HPV) prophylactic vaccination: challenges for public health and implications for screening. *Vaccine*. 2007 Apr 20;25(16):3007-13.
 235. Harper DM, Franco EL, Wheeler CM, Mosicki AB, Romanowski B, Rotelli-Martins CM, et al. Sustained efficacy up to 4.5 years of a bivalent L1 virus-like particle vaccine against human papillomavirus types 16 and 18: follow up from a randomised control trial. *Lancet*. 2006; 367:1247.
 236. Hagensee ME, Yaegashi N, Galloway DA. Self assembly of human papillomavirus type 1 capsids by expression of the L1 protein alone or by coexpression of the L1 and L2 capsid proteins. *J Virol*. 1993; 67:315-22.
 237. Bulk S, Visser O, Roendaal L, Verheijen RH, Meijer CJ. Cervical cancer in the Netherlands 1989–1998: decrease of squamous carcinoma in older women, increase of adenocarcinoma in younger women. *Int J Cancer*. 2005; 1134:1005–9.
 238. Griffiths PD. Anticipating full benefits from the new papillomavirus vaccines. *RevMed Virol*. 2007; 17(1):1–3.
 239. Wang Z, Christensen N, Schiller JT, Dillner J. A monoclonal antibody against intact human papillomavirus type 16 capsids blocks the serological reactivity of most human sera. *J Gen Virol*. 1997; 78:2209–15.
 240. Christensen ND, Reed CA, Cladel NM, Hall K, Leiserowitz GS. Monoclonal antibodies to HPV-6 L1 virus-like particles identify conformational and linear neutralizing epitopes on HPV-11 in addition to type-specific epitopes on HPV-6. *Virology*. 1996; 224:477–86.
 241. Giroglou T, Sapp M, Lane C, Fligge C, Christensen ND, Streeck RE, et al. Immunological analyses of human papillomavirus capsids. *Vaccine* 2001; 19:1783–93.
 242. Combita AL, Touz'e A, Bousarghin L, Christensen ND, Coursaget P. Identification of two cross-neutralizing linear epitopes within the L1 major capsid protein of human papillomaviruses. *J. Virol*. 2002; 76:6480–6.
 243. Lenz P, Thompson CD, Day PM, Bacot SM, Lowy DR, Schiller JT. Interaction of papillomavirus virus-like particles with human myeloid antigen-presenting cells. *Clin Immunol*. 2003; 106:231–7.
 244. Ohlschlager P, Osen W, Dell K, Faath S, Garcea RL, Jochmus I, et al. Human papillomavirus type 16 L1 capsomeres induce L1-specific cytotoxic T lymphocytes and tumor regression in C57BL/6 mice. *J. Virol*. 2003; 77:4635–45.
 245. Emeny RT, Wheeler CM, Jansen KU, Hunt WC, Fu TM, Smith JF, et al. Priming of human papillomavirus type 11-specific humoral and cellular immune responses in college-aged women with a virus-like particle vaccine. *J. Virol*. 2002; 76:7832–42.
 246. Evans TG, Bonnez W, Rose RC, Koenig S, Demeter L, Suzich JA, et al. A phase 1 study of a recombinant viruslike particle vaccine against human

- papillomavirus type 11 in healthy adult volunteers. *J. Infect. Dis.* 2001; 183:1485–93.
247. Bosch X, Harper D. Prevention strategies of cervical cancer in the HPV vaccine era. *Gynecol. Oncol.* 2006 Oct;103(1):21-4.
 248. Cuzick J, Clavel C, Petry KU, Meijer CJLM, Hoyer H, Ratnam S, et al. Overview of the European and North American studies on HPV testing in primary cervical cancer screening. *Int. J. Cancer.* 2006; 119:1095–105.
 249. Manhart LE, Koutsky LA. Do condoms prevent genital HPV infection, external genital warts, or cervical neoplasia? A meta-analysis. *Sex. Transm. Dis.* 2002; 29(11):725–35.
 250. Kjaer SK, van den Brule AJ, Bock JE, Poll PA, Engholm G, Sherman ME, et al. Determinants for genital human papillomavirus (HPV) infection in 1000 randomly chosen young Danish women with normal Pap smear: are there different risk profiles for oncogenic and nononcogenic HPV types? *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 1997; 6(10):799–805.
 251. Richardson H, Franco E, Pintos J, Bergeron J, Arella M, Tellier P. Determinants of low-risk and high-risk cervical human papillomavirus infections in Montreal University students. *Sex. Transm. Dis.* 2000; 27(2):79–86.
 252. Aral SO, Peterman TA. A stratified approach to untangling the behavioral/biomedical outcomes conundrum. *Sex. Transm. Dis.* 2002; 29(9):530–2.
 253. Sonnex C, Strauss S, Gray JJ. Detection of human papillomavirus DNA on the fingers of patients with genital warts. *Sex. Transm. Infect.* 1999; 75(5):317–9.
 254. Moscicki AB, J Palefsky, G Smith, S Siboshski, G. Variability of human papillomavirus DNA testing in a longitudinal cohort of young women. *Schoolnik. Obstst. Gynecol.* 1993; 82:578-85.
 255. Bontkes HJ, Van Duin M, deGruijl TD, Duggan-Keen MF, Walboomers JM, Stukart MJ, et al. HPV 16 infection and progression of cervical intraepithelial neoplasia: analysis of HLA polymorphism and HPV 16 E6 sequences variants. *Int. J. Cancer.* 1998; 78:166-71.
 256. Calore EE, Pereira SMM, Cavaliere MJ. Progression of cervical lesions in HIV-seropositive women: a cytological study. *Diagn. Cytopathol.* 2001; 24:117-9.
 257. Andrei G, Snoeck R, Piette J, Delvenne P, DeClercq E. Antiproliferative effects of acyclic nucleoside phosphonates on human papillomavirus (HPV)-harboring cell lines compared with HPV-negative cell lines. *Oncol. Res.* 1998; 10:523-31.
 258. Okamoto A, Woodworth CD, Yen K, Chun J, Isonishi S, Nikaido T, et al. Combination therapy with podophyllin and vidarabine for human papillomavirus positive cervical intraepithelial neoplasia. *Oncol. Rep.* 1999; 6:269-76.
 259. Kim KY, Blatt L, Taylor MW. The effects of interferon on the expression of human papillomavirus oncogenes. *J. Gen. Virol.* 2000; 81:695-700.
 260. SPSS1 for Windows V.11.5, Chicago, USA.
 261. Kurman RJ, Norris HJ, Wilkinson E. Human papillomaviruses and cancer of the lower female genital tract. In: *Tumors of the cervix, vagina, and vulva.* Washington (DC): Armed Forces Institute of Pathology. 1992; p. 19-28.

262. Villa LL, Franco ELF. Epidemiologic correlates of cervical neoplasia and risk of human papillomavirus infection in asymptomatic women in Brazil. *J. Natl. Cancer Inst.* 1989; 81:332-40.
263. Moscicki AB, Hills N, Shiboski S, Powell K, Jay N, Hanson E, et al. Risks for incident human papillomavirus infection and low-grade squamous intraepithelial lesion development in young females. *JAMA.* 2001; 285:2995-3002.
264. de Villiers EM, Wagner D, Schneider A, Wesch H, Miklaw H, Wahrendorf J, et al. Humanpapillomavirus infections in women with and without abnormal cervical cytology. *Lancet.*1987; 2:7035.
265. Takubo K, Shimomura-Izumiyama N, Koiwai H, Honma N, Esaki Y, Yoshida T, et al. Detection of human papillomavirus infection of the cervix in very elderly women using PCR. *Clin. Cancer. Res.* 2005 Apr 15; 11(8):2919-23.
266. Cutts FT, Franceschi S, Goldie S, Castellsague X, Sanjose S, et al: Human Papillomavirus and HPV vaccines: a review. *Bull of the world Heal Org.* 2007; 85:719-26.
267. Szostek S, Klimek M, Zawilinska B, Rys J, Kopec J, et al: Detection of human papillomavirus in cervical cell specimens by hybrid capture and PCR with different primers. *Acta. Biochim. Polon.* 2006; 53:603-7.
268. Meijer CJ, Snijders PJ, Castle PE. Clinical utility of HPV genotyping. *Gynecol. Oncol.* 2006; 103:12-17.
269. Lytwyn A, Sellors JW, Mahony JB, Daya D, Chapman W, Ellis N, et al. Comparison of human papillomavirus DNA testing and repeat Papanicolaou test in womenwith low-grade cervical abnormalities: a randomized trial. *Can. Med. Assoc. J.* 2000; 163:701–7.
270. Rozendaal L, Walboomers JM, van der Linden JC, Voorhorst FJ, Kenemans P, Helmerhorst TJ, et al. PCR-based high-risk HPV test in cervical cancer screening gives objective assessment of women with cytomorphologically normal cervical smears. *Int. J. Cancer.* 1996; 68:766–9.
271. Muñoz N. Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence. *J. clin. Virol.* 2000; 19:1-5.
272. Beutner KR, Tyring S. Human papillomavirus and human disease. *Am. J. Med.* 1997; 102(5):9-15.
273. zur Hausen H. Roots and perspectives of contemporary papillomavirus research. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 1996; 122:3-13.
274. zur Hausen H. Papillomaviruses in human cancers. In: *Infectious causes of cancer: Targets for intervention.* Ed. Goedert JJ. USA:Humana Press. 2000; p. 245-261.
275. Yasumoto S, Burkhardt AL, Doniger J, DiPaolo JA. Human papillomavirus type 16 DNA-induced malignant transformation of NIH 3T3 cells. *J. Virol.* 1986; 57:572-7.
276. Pirisi L, Yasumoto S, Feller M, Doniger J, DiPaolo JA. Transformation of human fibroblasts and keratinocytes with human papillomavirus type 16 DNA. *J. Virol.* 1987; 61:1061-6.
277. Dyson N, Guida P, Munger K, Harlow E. Homologous sequences in adenovirus E1A and human papillomavirus E7 proteins mediate interaction with the same set of cellular proteins. *J. Virol.* 1992; 66:6893-902.

278. Arroyo M, Bagchi S, Raychaudhuri P. Association of the human papillomavirus type 16 E7 protein with the S-phase-specific E2F-cyclin A complex. *Mol. Cell. Biol.* 1993 Oct; 13(10):6537-46.
279. Mietz JA, Unger T, Huibregtse JM, Howley PM. The transcriptional transactivation function of wild-type p53 is inhibited by SV40 large T-antigen and by HPV-16 E6 oncoprotein. *EMBO. J.* 1992; 11(13):5013-20.
280. Bertuccio MP, Spataro P, Caruso C, Picerno I. Detection of human papillomavirus E6/E7 mRNA in women with high-risk HPV types 16, 18, 31, 33 and 45 which are associated with the development of human cervical cancer. *Eur. J. Gynaecol. Oncol.* 2011; 32(1):62-4.
281. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics. 2002. *CA. Cancer J. Clin.* 2005; 55:74–108.
282. Inal MM, Köse S, Yildirim Y, Ozdemir Y, Töz E, Ertopçu K, et al. The relationship between human papillomavirus infection and cervical intraepithelial neoplasia in Turkish women. *Int. J. Gynecol. Cancer.* 2007 Nov-Dec; 17(6):1266-70
283. Yıldırım D. Bölgemizde servikal kanser ve prekanseröz lezyonları olan kadınlarda onkojenik human papillomavirus genotiplerinin prevalansının belirlenmesi. Yüksek lisans tezi. Adana 2010.
284. Smits HL, van Gemen B, Schukink R, van der Velden J, Tjong-A-Hung SP, Jebbink MF, et al. Application of the NASBA nucleic acid amplification method for the detection of human papillomavirus type 16 E6-E7 transcripts. *J. Virol. Methods.* 1995; 54(1):75–81.
285. Sotlar K, Stubner A, Diemer D, Menton S, Menton M, Dietz K, et al. Detection of high-risk human papillomavirus E6 and E7 oncogene transcripts in cervical scrapes by nested RT-polymerase chain reaction. *J. Med. Virol.* 2004; 74(1):107–16.
286. Molden T, Kraus I, Skomedal H, Nordstrom T, Karlsen F. PreTect HPV-Proofer: real-time detection and typing of E6/E7 mRNA from carcinogenic human papillomaviruses. *J. Virol. Methods.* 2007; 142(1–2):204–12.
287. Lie AK, Risberg B, Borge B, Sandstad B, Delabie J, Rimala R, et al. DNA-versus RNA-based methods for human papillomavirus detection in cervical neoplasia. *Gynecol. Oncol.* 2005; 97(3):908–15.
288. Castle PE, Dockter J, Giachetti C, Garcia FA, McCormick MK, Mitchell AL, et al. A cross-sectional study of a prototype carcinogenic human papillomavirus E6/E7 messenger RNA assay for detection of cervical precancer and cancer. *Clin. Cancer Res.* 2007; 13(9):2599–605.
289. Wang-Johanning F, Lu DW, Wang Y, Johnson MR, Johanning GL. Quantitation of human papillomavirus 16 E6 and E7 DNA and RNA in residual material from ThinPrep Papanicolaou tests using realtime polymerase chain reaction analysis. *Cancer.* 2002; 94(8):2199–210.
290. Molden T, Kraus I, Karlsen F, Skomedal H, Nygard JF, Hagmar B. Comparison of human papillomavirus messenger RNA and DNA detection: a cross-sectional study of 4,136 women >30 years of age with a 2-year follow-up of high-grade squamous intraepithelial lesion. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2005; 14(2):367–72.